



Bayerische
Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

Fakultät für Chemie und Pharmazie

Neue künstliche Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren zur Komplexierung von Oxo-Anionen in Wasser

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

vorgelegt von
Volker Bickert
aus Fulda

Würzburg 2008

Dissertation eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: Prof. Dr. Carsten Schmuck

2. Gutachter: Prof. Dr. Tanja Schirmeister

der Dissertation

1. Prüfer: Prof. Dr. Carsten Schmuck

2. Prüfer: Prof. Dr. Tanja Schirmeister

3. Prüfer: Prof. Dr. Bernd Engels

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

„den weg zum ziel nennt man hin-richtung“

(unbekannt)

„immer locker bleiben, sag ich, immer locker bleiben
immer locker bleiben, sag ich, immer locker bleiben“

(Die Fantastischen Vier 2004)

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von November 2003 bis November 2008 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Carsten Schmuck am Institut für Organische Chemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits an nachfolgenden Stellen veröffentlicht:

- **Publikationen**

C. Schmuck, V. Bickert: „*N*’-alkylated Guanidiniocarbonyl Pyrroles: New Receptors for Amino Acid Recognition in Water”, *Org. Lett.* **2003**, 5, 4579 - 4581.

C. Schmuck, V. Bickert: „Oxoanion Binding by Flexible Guanidiniocarbonyl Pyrrole-Ammonium Bis-Cations in Water: Increase of Complex Stability with Increasing Flexibility of the Host”, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 6832 - 6839.

C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm, U. Machon: „A Facile and Efficient Multi-Gram Synthesis of *N*-Protected 5-(Guanidiniocarbonyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic Acids”, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2, 324 - 329.

- **Öffentliche Konferenzbeiträge**

ORCHEM 2004: „*Potential Amino Acid Receptors Based on the Guanidiniocarbonyl-pyrrole Motif – New Synthetic Route and what Might They Promise*”, Bad Nauheim, Deutschland, **2004**.

1st European Chemistry Congress: „*Artificial Bis-Cationic Receptors for Oxoanion Complexation in Water*”, Budapest, Ungarn, **2006**.

Chem-SyStM 2007: “*Oxoanion Binding by Flexible Guanidiniocarbonyl Pyrrole-Ammonium Bis-Cations in Water*”, Würzburg, Deutschland, **2007**.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei all jenen Personen bedanken, die mich auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt und so zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Carsten Schmuck für die sehr interessante Themenstellung in einem faszinierenden Forschungsbereich danken, noch mehr aber für seine sehr gute und intensive Betreuung. Überaus dankbar bin ich für die stets fachlich hilfreichen, kompetenten und anregenden Forschungsgespräche und vor allem dafür, dass er sich stets Zeit für Diskussionen nahm und hierbei einen unkomplizierten Umgang pflegte.

Mein Dank gilt auch den Wissenschaftlern in der Analytik: Herrn Dr. M. Grüne, Frau E. Ruckdeschel und Herrn Dr. R. Bertermann für die Durchführung von NMR-Messungen sowie Herrn Dr. M. Büchner und Herrn F. Dadrich für die Aufnahmen von Massen-Spektren. Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Carolin Kisker vom Rudolf-Virchow-Zentrum der Universität Würzburg für die Möglichkeit zur Aufnahme von ITC-Messungen. Weiterhin möchte ich mich bei der Verwaltung und der Werkstatt des Instituts, besonders bei Herrn M. Braun und Herrn B. Brunner für prompte, kompetente Abhilfe bei diversen Problemen bedanken.

Besonders möchte ich dem kompletten Arbeitskreis Schmuck für die freundliche Aufnahme bedanken. Wir hatten immer eine besonders lockere Arbeitsatmosphäre und einen sehr freundlichen Umgang miteinander, vor allem mit meinen engen Laborkollegen Nicholas Walden, Jürgen Dudaczek und Daniel Rupprecht. Außerdem danke ich Uwe Machon, Peter Wich, Karsten Klemm, Michael Merschky und Christian Urban für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen treuen Freunden Nicki, Stefan, Daniel, Kalle, Rupprecht sowie bei Guido und Gerrit. Sie haben mein Leben gerade auch außerhalb des Studiums enorm bereichert und angenehm gestaltet. Zuletzt möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder Thomas und meiner Schwester Tatjana danken, die mich stets auf meinem Weg unterstützt und gefördert haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	GRUNDLAGEN	5
2.1	Oxo-Anionen-Erkennung	5
2.2	Grundlagen der Komplex-Bildung	15
2.3	Bestimmung von Bindungskonstanten	22
2.4	Bestimmung der Bindungsstöchiometrie	46
3	KONZEPTION UND ZIELSETZUNG	51
3.1	Guanidinocarbonylpyrrol-Grundbausteine: Syntheseoptimierung	52
3.2	<i>N</i> '-alkylierte Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren	53
3.3	Biskationische Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren	57
4	DURCHFÜHRUNG UND DISKUSSION	61
4.1	Guanidinocarbonylpyrrol-Grundbausteine: Optimierung der Synthese	62
4.2	Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren	68
4.2.1	Synthese der Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren	69
4.2.2	Bindungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren	83
4.3	Biskationische Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren	112
4.3.1	Synthese der biskationischen Rezeptoren	113
4.3.2	Bindungseigenschaften der biskationischen Rezeptoren	117
5	AUSBLICK	137
6	ZUSAMMENFASSUNG	143
7	SUMMARY	151
8	EXPERIMENTELLER TEIL	159
8.1	Allgemeiner experimenteller Teil	159
8.2	Generelle analytische Methoden	160
8.3	Synthese der Guanidinocarbonylpyrrol-Grundbausteine	163

8.3.1	Darstellung von Trichloracetylpyrrol (30)	163
8.3.2	Darstellung von 2-Pyrrolcarbonsäure-Benzylester (31)	164
8.3.3	Darstellung von Benzyl-5-Formylpyrrol-2-Carboxylat (32)	165
8.3.4	Darstellung von 1 <i>H</i> -Pyrrol-2,5-Dicarbonsäuremonobenzylester (34)	167
8.3.5	Darstellung von <i>N</i> -Boc-Guanidin (36)	168
8.3.6	Darstellung von 5-(Boc-Guanidinocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (19)	169
8.3.7	Darstellung von 5-(Boc-Guanidinocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäure (20)	170
8.4	Synthese der Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren	171
8.4.1	Darstellung von Boc- β -Alanin- <i>L</i> -Valinamid (49)	171
8.4.2	Darstellung von <i>H</i> - β -Alanin- <i>L</i> -Valinamid-Hydrochlorid (44)	172
8.4.3	Darstellung von <i>N</i> _{α} -Cbz- β -Amino- <i>L</i> -Alanin (51)	173
8.4.4	Darstellung von <i>N</i> _{α} -Cbz- β -Amino- <i>L</i> -Alaninmethylester-Hydrochlorid (45)	174
8.4.5	Darstellung von <i>N</i> _{α} -Cbz- <i>N</i> _{β} -Dns- β -Amino- <i>L</i> -Alaninmethylester (52)	175
8.4.6	Darstellung von <i>N</i> _{β} -Dns- β -Amino- <i>L</i> -Alaninmethylester (42)	176
8.4.7	Darstellung von <i>N</i> _{α} -Cbz- <i>N</i> _{β} -Boc- β -Amino- <i>L</i> -Alaninmethylester (53)	177
8.4.8	Darstellung von <i>N</i> _{β} -Boc- β -Amino- <i>L</i> -Alaninmethylester (54)	178
8.4.9	Darstellung von <i>N</i> _{α} -Dns- <i>N</i> _{β} -Boc- β -Amino- <i>L</i> -Alaninmethylester (55)	179
8.4.10	Darstellung von <i>N</i> _{α} -Dns- β -Amino- <i>L</i> -Alaninmethylester-Hydrochlorid (46)	180
8.4.11	Darstellung von 5-(<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -Tf-Guanidinocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (24)	181
8.4.12	Darstellung von 5-(<i>N'</i> -Tf-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (37)	183
8.4.13	Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der <i>N'</i> -substituierten <i>N</i> -Boc-geschützten Guanidiniocarbonylpyrrole 56 bis 61	184
8.4.14	Darstellung von 5-(<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -Ethyl-Guanidinocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (56)	185
8.4.15	Darstellung von 5-(<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -(ethanyl-2-(<i>L</i> -ethylbenzol)-carbonsäureethylester)-Guanidinocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (57)	186
8.4.16	Darstellung von 5-(<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -(Propan-3-yl-carbonsäuremethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (58)	187
8.4.17	Darstellung von 5-(<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -(Propan-3-yl-carboxamid- <i>L</i> -Valinamid)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (59)	188
8.4.18	Darstellung von 5-(<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -(<i>N</i> -Cbz- <i>L</i> -Alaninylmethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (60)	190
8.4.19	Darstellung von 5-(<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -(<i>N</i> -Dns- <i>L</i> -Alaninylmethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (61)	191
8.4.20	Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der <i>N'</i> -substituierten Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren 62 bis 67 als Hydrochlorid-Salze	192
8.4.21	Darstellung von 5-(<i>N'</i> -Ethyl-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (62)	193
8.4.22	Darstellung von 5-(<i>N'</i> -(ethanyl-2-(<i>L</i> -ethylbenzol)-carbonsäureethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (63)	194
8.4.23	Darstellung von 5-(<i>N'</i> -(Propan-3-yl-carbonsäuremethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (64)	195

8.4.24	Darstellung von 5-(<i>N'</i> -(Propan-3-yl-carboxamid- <i>L</i> -Valinamid)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (65)	196
8.4.25	Darstellung von 5-(<i>N'</i> -(<i>N</i> -Cbz- <i>L</i> -Alaninylmethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (66)	197
8.4.26	Darstellung von 5-(<i>N'</i> -(<i>N</i> -Dns- <i>L</i> -Alaninylmethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (67)	198
8.4.27	Darstellung von 5-(<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -(Propan-3-yl-carboxamid- <i>L</i> -Valinamid)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäure (70)	199
8.4.28	Darstellung von 5-(<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -(Propan-3-yl-carboxamid- <i>L</i> -Valinamid)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäure- <i>L</i> -Valinamid (71)	200
8.4.29	Darstellung von 5-(<i>N'</i> -(Propan-3-yl-carboxamid- <i>L</i> -Valinamid)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäure- <i>L</i> -Valinamid-Hydrochlorid (72)	202
8.4.30	Darstellung von 5-(<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -(<i>N</i> -Dns- <i>L</i> -Alaninylmethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäure (73)	204
8.4.31	Darstellung von 5-(<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -(<i>N</i> -Dns- <i>L</i> -Alaninylmethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäure- <i>L</i> -Phenylalaninamid (74)	205
8.4.32	Darstellung von 5-(<i>N'</i> -(<i>N</i> -Dns- <i>L</i> -Alaninylmethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1 <i>H</i> -Pyrrol-2-Carbonsäure- <i>L</i> -Phenylalaninamid-Hydrochlorid (75)	206
8.5	Synthese der Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskationen	208
8.5.1	Darstellung von <i>N</i> -Boc-1,2-Diaminoethan (88)	208
8.5.2	Darstellung von <i>N</i> -Boc-1,3-Diaminopropan (89)	209
8.5.3	Darstellung von <i>N</i> -Boc-1,4-Diaminobutan (90)	210
8.5.4	Darstellung von <i>N</i> -Boc-1,5-Diaminopentan (91)	211
8.5.5	Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der di-Boc-geschützten Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskationen 92 bis 95	212
8.5.6	Darstellung des di-Boc-geschützten Guanidiniocarbonylpyrrol-Biskations 92	213
8.5.7	Darstellung des di-Boc-geschützten Guanidiniocarbonylpyrrol-Biskations 93	214
8.5.8	Darstellung des di-Boc-geschützten Guanidiniocarbonylpyrrol-Biskations 94	215
8.5.9	Darstellung des di-Boc-geschützten Guanidiniocarbonylpyrrol-Biskations 95	216
8.5.10	Darstellung des Lysin(Cbz)-Boc-geschützten Guanidiniocarbonylpyrrol-Biskations 96	217
8.5.11	Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskationen 79 bis 82	218
8.5.12	Darstellung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskations 79	219
8.5.13	Darstellung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskations 80	220
8.5.14	Darstellung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskations 81	221
8.5.15	Darstellung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskations 82	222
8.5.16	Darstellung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskations 83	223
8.6	Bindungsstudien via UV- und Fluoreszenz-Messungen	224
8.7	Bindungsstudien via NMR-Messungen	226
8.8	Bindungsstudien via ITC-Messungen	228
9	ANHANG	231
9.1	Literaturverzeichnis	231
9.2	Abkürzungsverzeichnis	238

1 EINLEITUNG

In der heutigen Zeit verwischen zunehmend die Grenzen der klassischen Naturwissenschaften, wie der Biologie, Chemie und Physik, und in den Randgebieten entstehen neue Forschungsfelder. So beschäftigt sich die bioorganische Chemie neben der organischen Synthese von biologisch relevanten Substanzen, z. B. Naturstoffen, biomimetischen Substanzen und künstlichen Rezeptoren, auch mit deren Funktionsweise in biologischen Systemen. Dabei geht es nicht allein um die Erforschung und Optimierung bestehender biologischer Systeme, sondern auch um das Auffinden neuer Leitstrukturen in der Wirt-Gast-Chemie auf molekularer Ebene. Um in biologische Prozesse verändernd eingreifen zu können, muss man deren Abläufe kennen und die Auswirkungen der verschiedenen Einflüsse verstehen, und hier vor allem den Prozess der Molekularen Erkennung. Sie ist ein in der bioorganischen Chemie ubiquitäres Grundprinzip und steht im Zentrum jeder selektiven Bindung eines Substrates an einen Rezeptor. Die Erkennung beruht dabei auf komplementären Eigenschaften der beiden Partner, wie zum Beispiel sterische oder elektronische Parameter, und wird durch das Zusammenspiel sowohl attraktiver als auch repulsiver nichtkovalenter Wechselwirkungen^[1] bestimmt.

Eine fundamentale Bedeutung besitzt die Molekulare Erkennung in der Biochemie und pharmazeutisch-medizinischen Chemie. Durch Verstehen des Zusammenspiels von Rezeptoren und Substraten können neue Konzepte in der Wirkstoffforschung entwickelt und aktive Molekülstrukturen gefunden werden. Hierbei kann die Molekulare Erkennung nicht nur zur selektiven Bindung von Substraten führen, sondern auch deren Transport, Assoziation oder katalytische Veränderung bewirken. Dafür ist aber eine genaue Kenntnis der unterschiedlichen Einflüsse der verschiedenen Parameter wie beispielsweise Konzentration, Lösemittel, Temperatur und Anwesenheit konkurrierender Substrate auf die Molekulare Erkennung nötig. Die natürlichen Vorbilder sind aber oft zu komplex und die meisten Substanzen zu schwierig zu isolieren oder zu synthetisieren, um Untersuchungen an diesen durchzuführen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Molekulare Erkennung ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von verschiedenen Molekülen, einschließlich des umgebenden Mediums. Denn

prinzipiell wechselwirkt in Lösung jedes Molekül mit jedem.^[2] Alle Einflüsse können somit im Labor nicht gleichzeitig berücksichtigt und analysiert werden, da es unmöglich ist, in einem derart komplexen physiologischen System alle einzelnen Beiträge zu quantifizieren. Vielmehr müssen Modellsysteme entwickelt werden, an denen Untersuchungen durchgeführt und einzelne Fragestellungen behandelt werden können. Dadurch wird es möglich, Ausschnitte des Komplexierungsvorgangs zu beleuchten und die vielschichtigen Zusammenhänge zu erforschen. Beispielsweise kann eine Rezeptor-Substrat-Komplexierung im lebenden Organismus (*in vivo*) aufgrund der Vielzahl von beeinflussenden unbekanntem Parametern niemals exakt vorhergesagt werden, wohl aber durch das Bestimmen von Bindungskonstanten in wässrigem Medium oder unter physiologischen Bedingungen (*in vitro*) meist in guter Übereinstimmung abgeschätzt werden. Diese Modellsysteme können beispielsweise kleine künstliche Rezeptormoleküle sein. Anhand derer kann man in wässriger Lösung Wechselwirkungen und Einflüsse zwischen Rezeptor und Substrat studieren, um Erkenntnisse für das System als Ganzes zu erhalten.

Die in unserem Arbeitskreis entwickelten kationischen Verbindungen stellen Rezeptoren für die Komplexierung von Carboxylaten oder anderer Oxo-Anionen dar. In der Natur sind für die Erkennung sauerstoffreicher Strukturen meist Enzyme verantwortlich, die dazu kationische Aminosäuren wie Arginin oder Lysin enthalten.^[3] Im Allgemeinen sind einzelne nichtkovalente Wechselwirkungen in Wasser nicht sehr stark. Enzyme umgehen dieses Problem dadurch, dass die Molekulare Erkennung meist in einer weniger polaren Mikroumgebung, z. B. in einer hydrophoben Kavität, stattfindet.

Für die effektive Komplexierung von Oxo-Anionen hat *Schmuck* ein Guanidiniocarbonylpyrrol-Kation-Motiv entwickelt, das zusätzlich zum Ionenpaar noch durch Wasserstoffbrückenbindungen die Komplexstabilität erhöht und durch Präorganisation die Entropie positiv beeinflusst. Zusätzlich besitzen die Rezeptoren in variable Peptidkette, die es ermöglicht, weitere Ladungen in die Rezeptoren einzubringen, um polare oder ionische Wechselwirkungen zu nutzen. Andererseits können auch attraktive π - oder hydrophobe Wechselwirkungen durch ausgedehnte aromatische Systeme aufgebaut werden. Auf diese Weise können Rezeptoren für die Komplexierung bestimmter Substrate optimiert werden. Mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv wurden bereits effektive Rezeptoren und Sensoren für Biomoleküle wie Aminosäurecarboxylate und kurze C-terminale Peptide entwickelt^[4-9] sowie Nanomaterialien (z. B. Vesikel) durch Selbstassoziation von definierten Monomeren auf Basis von komplementären Zwitterionen erforscht.^[10, 11] Auch konnten

effektive, metallfreie, oktapeptidische Katalysatoren zur Phosphoesterspaltung in Wasser synthetisiert werden.^[12] Mit der Klasse der Guanidiniocarbonylpyrrole von *Schmuck* wird ein breites Forschungsspektrum der Molekularen Erkennung abgedeckt. Damit steht ein gutes Bindungsmotiv zur Verfügung, um nichtkovalente Wechselwirkungen in der Anionen-Erkennung zu untersuchen.

In dieser Arbeit wird eine verbesserte, effektivere Synthese dieses Strukturmotivs vorgestellt. Weiterhin wird die Optimierung der Komplexierungseigenschaften evaluiert. Dies soll durch die Entwicklung von Tweezer-Rezeptoren zum Aufbau einer hydrophoben Kavität erreicht werden. Auch soll die Bindungsaffinität durch das Einbringen einer weiteren positiven Ladung im Rezeptor, die ebenfalls das anionische Substrate durch Coulomb-Wechselwirkungen zur Carboxylat-Einheit zusätzlich binden kann, erhöht werden.

2 GRUNDLAGEN

2.1 Oxo-Anionen-Erkennung

Den Grundstein der Molekularen Erkennung legte *Emil Fischer*, als er 1894 in seinem Artikel „Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme“ das Bild vom „Schloss und Schlüssel“ für die chemische Wirkung von Enzym und Substrat verwendete.^[13] Der Grundgedanke hierbei liegt darin, dass die gegenseitige Passform zweier Bindungspartner ihre thermodynamische Affinität, also letztendlich die Assoziationseigenschaft bestimmt. Eine Erweiterung dieses Konzeptes brachte 1958 die Theorie des „Induced Fit“ von *Daniel E. Koshland*. Sie besagt, dass viele Enzyme bzw. Substrate nicht statisch sind, also keine starre Geometrie besitzen, sondern bei Annäherung durch gegenseitige Wechselwirkungen miteinander zunächst ihre Konformation ändern und erst dann wie Schlüssel und Schloss zusammenpassen.^[14] Heutzutage gehört die Molekulare Erkennung, auch unter dem Begriff der Wirt-Gast-Chemie bekannt, zum Gebiet des von *Jean-Marie Lehn* eingeführten Begriffs der „Supramolekularen Chemie“.^[15-17] Er erhielt 1987 gemeinsam mit *Donald J. Cram* und *Charles J. Pedersen* den Nobelpreis für Chemie für die Entwicklung und Verwendung von Molekülen mit strukturspezifischer Wechselwirkung und von hoher Selektivität.^[18] Die Supramolekulare Chemie beschäftigt sich u. a. mit der Entwicklung von künstlichen Enzymen bzw. Rezeptoren, dem „*de novo* Design von Proteinen“, aber auch mit der Selbstorganisation („self-assembly“) und der Selbstassoziation von Molekülen durch nichtkovalente Wechselwirkungen.

Auf dem Gebiet der bioorganischen Rezeptor-Substrat-Erkennung ist die Oxo-Anionen-Erkennung ein sehr lebhaftes Forschungsgebiet, gerade auch wegen ihrer biologischen Relevanz. Dabei liegt ein besonderer Schwerpunkt auf der Erforschung von Anionen-Rezeptoren als Membrantransporter von Ionen in biologischen Lipid-Doppelschichten, auf organischer Katalyse in protischen Lösemitteln und auf Ionenpaar-Rezeptoren als Sensoren für biologisch interessante anionische Spezies.^[19]

Die Bezeichnungen Rezeptor und Substrat werden in der Chemie anders verwendet als in der Medizin, Pharmakologie oder Biologie. Dort versteht man unter einem Substrat z. B. einen Botenstoff oder ein Medikament, während der Rezeptor ein Antagonist zu diesem im menschlichen Körper ist. Im Folgenden werden synthetisch hergestellte organische Moleküle, z. B. die Guanidiniocarbonylpyrrol-Derivate, als chemische Rezeptoren bezeichnet und als Substrate deren mögliche Bindungspartner, die durch diese Rezeptoren erkannt werden, also hier die Oxo-Anionen.

Die Rezeptortypen für die Anionen-Erkennung sind sehr unterschiedlich. Einige der gängigen Bausteine für die Anionen-Rezeptoren sind in **Abb. 1** dargestellt. Das Spektrum der Struktur-motive reicht von einfachen Amiden **A** und Sulfonamiden **B** über Pyrrole **C** und Indole **D**, Harnstoffe **E** und Thioharnstoffe **F**, Ammonium- **G** und Guanidinium-Gruppen **H** und Imidazole **I** bis hin zu Hydroxygruppen **K**.

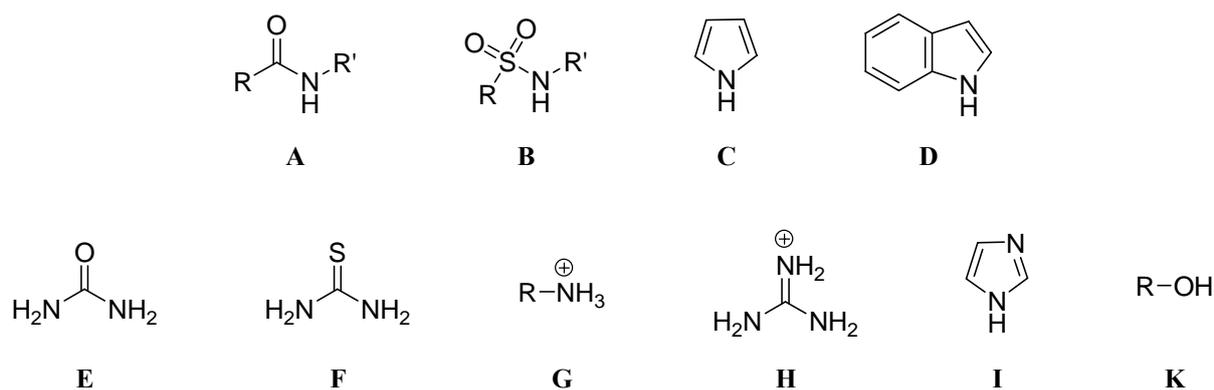


Abb. 1 Verschiedene Bausteine in Rezeptoren zur Oxo-Anionen-Erkennung: **A**: Amid, **B**: Sulfonamid, **C**: Pyrrol, **D**: Indol, **E**: Harnstoff, **F**: Thioharnstoff, **G**: Ammonium-Gruppe, **H**: Guanidinium-Gruppe **I**: Imidazol, **K**: Hydroxy-Gruppe. R und R' sind beliebige Reste.

Hierbei umfasst die Anionen-Erkennung im Wesentlichen Halogenide, Sulfate, Phosphate und Acetat. Die Lösemittel für Bindungsstudien sind überwiegend Chloroform, Dichlormethan, Acetonitril und gelegentlich als polarstes Lösemittel auch DMSO. Wasser wird, wenn überhaupt, meist nur als 0.5 bis 5 %iger Volumenanteil verwendet. Die Gründe dafür liegen darin, dass einerseits die Bindungskonstante in protischen Lösemitteln, vor allem in Wasser, sehr stark sinkt und andererseits die Löslichkeit der meist hydrophoben Rezeptoren in diesen Lösemitteln sehr schlecht ist. Gerade neutrale Rezeptoren lösen sich meist eher mäßig in protischen Lösemitteln. Die kationischen Rezeptoren auf Ammonium-, Guanidinium- oder Imidazol-Basis sowie die Rezeptoren mit Hydroxygruppen zeigen hierbei meist ein besseres Löslichkeitsverhalten, sodass wässrige Lösemittelgemische oder sogar

reines Wasser verwendet werden könnten, aber aufgrund der schlechteren Komplexeigenschaften meist doch nicht eingesetzt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Rezeptoren zur Oxo-Anionen-Erkennung in wässrigen Lösemittelsystemen sind Guanidiniocarbonylpyrrole. Im Folgenden wird die Komplexierung sowie einige interessante und wichtige Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Anionen-Erkennung vorgestellt, die als Strukturmotiv entweder die funktionelle Guanidin-Einheit und/oder Pyrrol aufweisen. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von derart modifizierten Guanidinium-Kation-Systemen^[19-22] synthetisiert und erforscht.

In wässrigen biologischen Systemen sind bei der Komplexierung von Oxo-Anionen durch Enzyme meist ein oder mehrere Ammonium-Kationen in Form der Aminosäure Lysin (pK_S-Wert der Seitenkette 10.53) oder ein oder mehrere Guanidinium-Kationen in Form der Aminosäure Arginin (pK_S-Wert der Seitenkette 12.48) beteiligt.^[3] Unter physiologischen Bedingungen liegen beide protoniert vor. Das Guanidinium-Kation kann zusätzlich zu Wasserstoffbrückenbindungen aufgrund seiner geometrischen Anordnung und der Delokalisierung der positiven Ladung über die drei Stickstoffatome direkte, bidentate (zweizählige) Ionenpaare ausbilden. Zwei Wasserstoffatome zeigen dabei parallel in dieselbe Richtung und ermöglichen einen günstigen DD-AA-Komplex (Donor-Donor-Akzeptor-Akzeptor), der zusätzliche attraktive Wechselwirkungen besitzt (grün-gestrichelte Linien in **Abb. 2**). Aufgrund dieser Eigenschaften zeigen Guanidinium-basierte Rezeptoren hohe Affinitäten zu Oxo-Anionen, selbst in sehr polaren Lösemitteln oder in Wasser. In einer Kristallstruktur eines Komplexes aus einem Guanidinium-Derivat mit Acetat fand *Schmidtchen* die Bildung von zwei starken symmetrischen Wasserstoffbrücken mit einem Stickstoff-Sauerstoff-Abstand von 2.85 Å.^[23] Zu einer ungünstigeren AD-DA-Komplexierung (rot-gestrichelte Linien zeigen repulsive Wechselwirkungen in **Abb. 2**) durch Transprotonierung kann es aufgrund des großen Unterschiedes der pK_S-Werte von ungefähr 8 Einheiten zwischen Guanidinium-Einheit und Oxo-Anion in Wasser nicht kommen (**Abb. 2**).^[20, 24] Bei *N, N'*-substituierten Guanidinium-Ionen ist eine syn- und eine anti-Konformation möglich, wobei zur Komplexierung von Oxo-Anionen die syn-Konformation durch Ausbildung zweier annähernd paralleler Wasserstoffbrücken eine wesentlich bessere Komplexierung bewirkt. Dieses bidentate Ionenpaar kann in der anti-Konformation nicht ausgebildet werden.

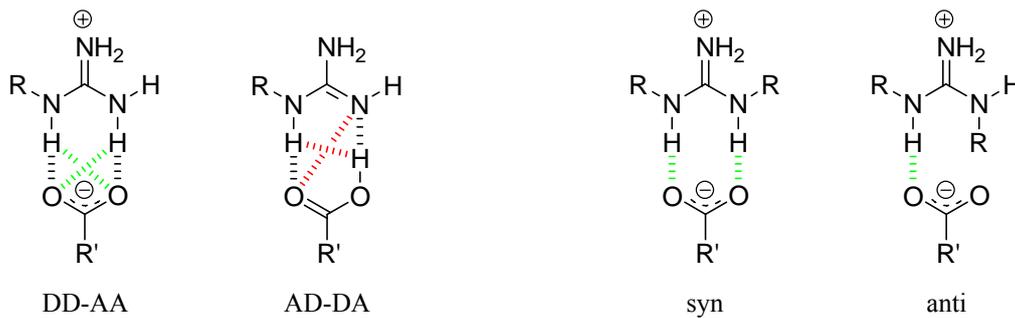


Abb. 2 Links: die günstige DD-AA-Komplexierung von Carboxylat durch ein Guanidiniumion (D = Donor, A = Akzeptor), bei der attraktive Wechselwirkungen grün-gestrichelt dargestellt sind. Bei der ungünstigeren AD-DA-Komplexierung aufgrund von Transprotonierung kommt es zu den rot-gestrichelten repulsive Wechselwirkungen. Rechts: anti- und syn-Konformation N, N' -substituierter Guanidiniumionen ($R \neq H$). Wasserstoffbrücken sind grün-gestrichelt eingezeichnet.

Einer der Pioniere der Oxo-Anionen Erkennung in Wasser ist der Nobelpreisträger *J.-M. Lehn*. Bereits Ende der 70er Jahre stellte er die Guanidinium-Markocyclen **1** und **2** vor, die Phosphat in Wasser komplexierten, jedoch sehr schwach mit Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} = 50 \text{ M}^{-1}$ bzw. 250 M^{-1} .

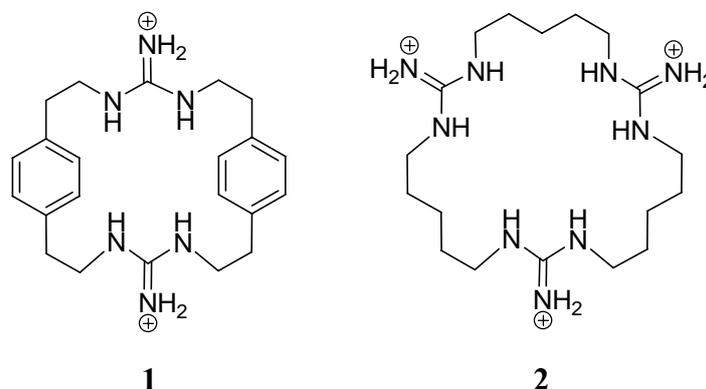


Abb. 3 Bivalenter **1** und trivalenter **2** Guanidinium-Rezeptor nach *Lehn* zur Komplexierung von Phosphat.

In dem chiralen bicyclischen Rezeptor **3** von *de Mendoza* ist in Anlehnung an Arbeiten von *Lehn* die Guanidinium-Gruppe durch die Einschränkung der konformationellen Freiheit hinsichtlich der syn-Konformation präorganisiert, was positiv für eine Komplexierung nach dem DD-AA-Schema ist. Dieser Rezeptor zeigte zu *p*-Nitrobenzoat in Chloroform eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 1.6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. In Wasser ist Rezeptor **3** unlöslich, weshalb Flüssig-Flüssig-Extraktionsexperimente von Carboxylaten in Wasser gegen chlorierte Löse-mittel durchgeführt wurden, wobei das Ionenpaar aus Rezeptor und Carboxylat quantitativ im organischen Solvens gefunden wurde.^[20]

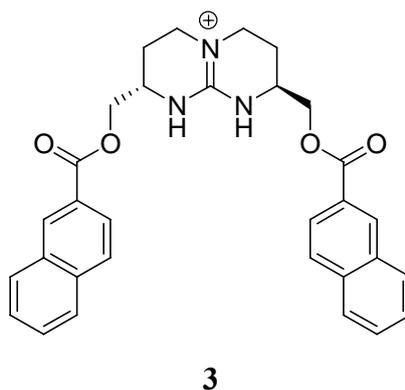


Abb. 4 Bicyclischer Guanidin-Rezeptor **3** nach *de Mendoza* zur Komplexierung von *p*-Nitrobenzoat und zur Flüssig-Flüssig-Extraktionsexperimenten von Carboxylaten.

Mit ähnlichen Systemen führte *Schmidtchen* ITC-Bindungsstudien (isothermale Titrationskalorimetrie, siehe **2.3 Bestimmung von Bindungskonstanten**) durch. Er fand dabei heraus, dass die Stabilisierung des Guanidinium-Carboxylat-Komplexes nicht nur auf starken elektrostatischen Wechselwirkung beruht (Reaktionsenthalpie), sondern auch auf der Freisetzung von Lösemittelmolekülen (Entropie).^[25] *Hamilton* konnte zeigen, dass die entscheidende Komponente bei der Assoziation eines Guanidinium-Derivates mit einem Carboxylat in Methanol und Wasser die Entropie ist, während die Komplexierung in DMSO oder noch unpolareneren Lösemitteln enthalpisch getrieben ist.^[26]

Der Bisacylguanidinio-Rezeptor **4** wurde von *Hamilton* entwickelt, um Phosphordiester zu komplexieren. In Acetonitril zeigt er in UV-Bindungsstudien zu Diphenylphosphat eine Assoziationskonstante von $K_{\text{Ass}} = 4.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Die Einführung der Carbonyl-Gruppen hat zwei Vorteile: sie erhöhen einerseits die Acidität der Guanidinio-Gruppen, ohne zu einer Transprotonierung zu führen, und andererseits präorganisieren sie den Rezeptor durch intramolekulare Wasserstoffbrücken, um das Phosphat optimal zu komplexieren (Chelat-Effekt).^[27] Ähnlich aufgebaut ist der Bisguanidinium-Rezeptor **5** von *Grossel* zur Komplexierung von Sulfat, jedoch ohne die präorganisierenden Carbonyl-Gruppen. Diesen Effekt übernimmt der Pyridin-Stickstoff. Andererseits verursacht dieser sp^2 -hybridisierte Pyridin-Stickstoff mit seinem freien Elektronenpaar eine repulsive Wechselwirkung, da es direkt in Richtung der Bindungsstelle zeigt. Dies hat bei der Komplexierung von Oxo-Anionen aufgrund der erhöhten Ladungsdichte in der Bindungstasche eine negative Auswirkung und eine effektive Komplexierung ist nicht möglich. In Kristallstrukturen von Rezeptor **4** und **5** mit Sulfat erhält man für den Bisacylguanidinio-Rezeptor **4** von *Hamilton*

einen Komplex, bei dem das Sulfat perfekt in der Bindungstasche zwischen den beiden Guanidinio-Einheiten gebunden ist. Für den Rezeptor **5** von *Grossel* ist dies nicht der Fall. Hier wird das Sulfat nur einseitig über eine Guanidinium-Einheit außerhalb der Bindungstasche komplexiert.^[28]

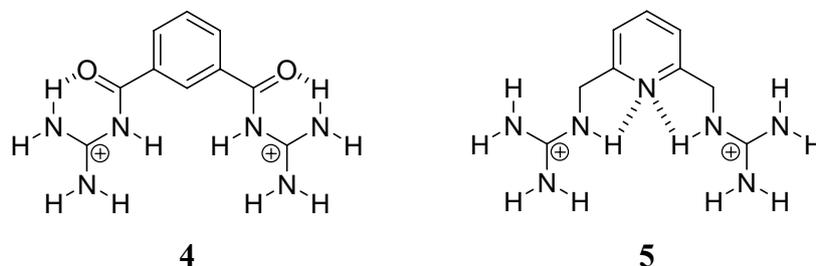


Abb. 5 Bisacylguanidinium-Rezeptor **4** nach *Hamilton* und Bisguanidinium-Rezeptor **5** nach *Grossel*. Die gestrichelten Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen, die die Rezeptoren präorganisieren.

Anslyn entwickelte den trivalenten Rezeptor **6** auf der Basis von Triethyl-Trimethylbenzol. Mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurde in reinem Wasser zu Citrat einer Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} = 6.9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ermittelt. Citrat konnte sogar in einem Rohextrakt von Orangensaft komplexiert werden, was auf die Selektivität gegenüber anderen Carboxylaten hinweist.^[29]

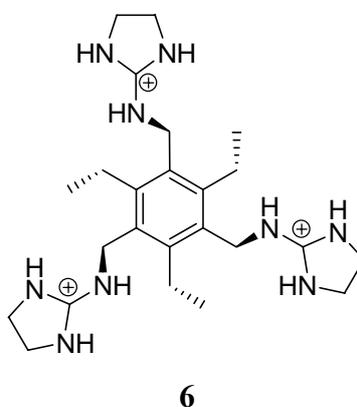


Abb. 6 Trivalenter Rezeptor **6** nach *Anslyn*. Durch das 1,3,5-Triethyl-2,4,6-Trimethylbenzol als Templat wird der Rezeptor derart präorganisiert, dass sich die drei Guanidinium-Einheiten auf der gleichen Seite des Benzolrings befinden.

Einfache, neutrale, symmetrische Amid- **7** und Thioamid-Rezeptoren **8** auf der Basis von Pyrroldicarbonsäure synthetisierte *Jurczak* (**Abb. 7**),^[30] inspiriert von Arbeiten von *Gale*.^[31] Dabei erforschte er die Komplexierungseigenschaften dieser beiden Grundmotive als Wasserstoffbrücken-Donoren bzw. -Akzeptoren. Im allgemeinen sind die Thioamide acider als Amide sowie bessere Wasserstoffbrücken-Donoren^[32] und damit geeignet als Oxo-

Anionen-Rezeptoren. Für Chlorid, Dihydrogenphosphat und Phenolat wurden mittels ^1H -NMR-Spektroskopie in DMSO mit 0.5 % Wasser Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} = 50$ bis 200 M^{-1} bestimmt, die beim Wechsel zu Acetonitril um zwei Größenordnungen stiegen und dadurch mittels UV-Spektroskopie ermittelt werden konnten. Hinsichtlich der Komplexstabilität konnte zwischen den Amid- **7** und Thioamiden **8** kein Unterschied gefunden werden. ITC-Messungen hingegen weisen darauf hin, dass die eigentliche Komplexierung für die Thioamide zwar stärker ist als für die Amide (negativere Reaktionsenthalpie, exotherm), sich aber letztendlich die Assoziationskonstante aufgrund der Enthalpie-Entropie-Kompensation für beide Bindungsmotive ausgleicht (**2.2 Grundlagen der Komplex-Bildung**).

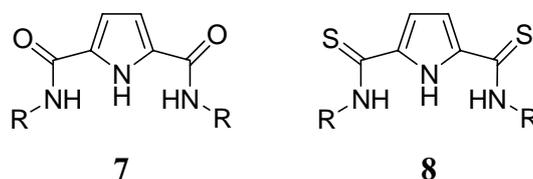


Abb. 7 Amid- **7** und Thioamid-Rezeptoren **8** auf Basis von Pyrroldicarbonsäure nach *Jurczak*. R steht für Methyl, Phenyl oder n-Butyl.

Eine Verknüpfung von Guanidin- und Pyrrol-Baustein in Form eines Guanidiniocarbonylpyrrol-Kations wurde erstmals von *Schmuck* vor einigen Jahren die **CBS** (Carboxylat-Bindungsstelle) als verbesserter Carboxylat-Rezeptor eingeführt (**Abb. 8**).^[6, 33, 34] Hierbei wird die Bindungsstärke durch die Kombination ionischer Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Rezeptor und Substrat erreicht. Zusätzliche Wasserstoffbrücken, hydrophobe Effekte und π -Wechselwirkungen erhöhen diese, sorgen aber vor allem auch für Selektivität der Erkennung. Durch die Acylguanidin-Einheit werden diese Rezeptoren einerseits präorganisiert und zum anderen erhöht sich die Acidität der Guanidinio-Protonen, wodurch eine effektivere Komplexierung von Anionen möglich ist. Der einfache chiralen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **9** zeigt in 40 % Wasser in DMSO eine Bindungskonstante zu *L*-Acetylalanin von $K_{\text{Ass}} = 6.8 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$.^[33] Auch zeigt er enantioselektive Erkennung bei einfachen acylierten Aminosäuren um einen Faktor bis zu 2.7. Der *N,N'*-substituierte Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **10** zeigt im gleichen Lösemittelgemisch eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 2.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ zu *L*-Acetylvalin, während *L*-Acetylalanin nur mit einer um den Faktor vier niedrigeren Bindungskonstante komplexiert wird.^[7, 35]

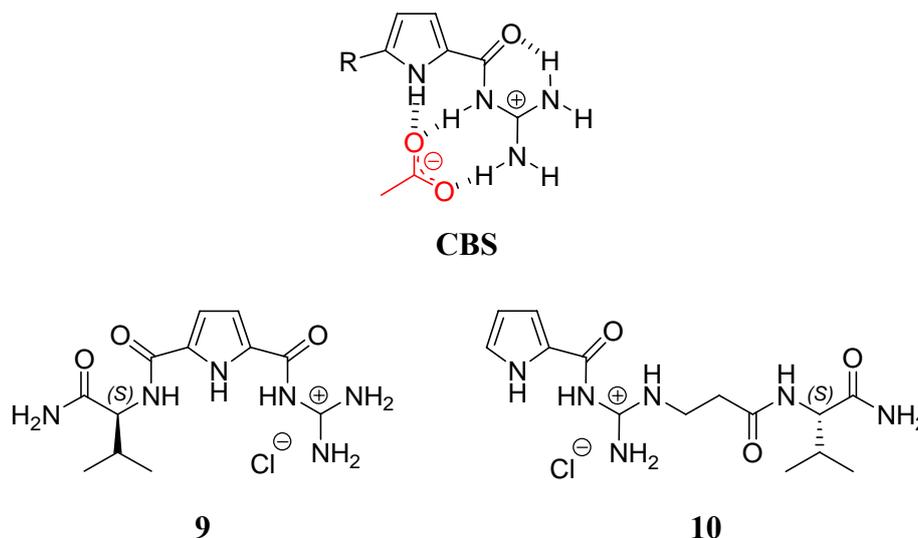


Abb. 8 Oben: allgemeine Struktur der kationischen CBS (Carboxylat-Bindungsstelle) bei der Komplexierung eines Carboxylates (rot). Die gestrichelten Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar. Unten: chiraler Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **9** und N, N' -substituierter Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **10** nach *Schmuck*.

Auch Tetrapeptide mit freiem Carboxylat-Terminus konnten von multi-kationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren effektiv in Wasser komplexiert werden. Dazu wurde eine maßgeschneiderte kombinatorische Bibliothek aus tripeptidischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren synthetisiert. Ein anschließendes *on-bead*-Screening lieferte den stark bindenden triskationischen Rezeptor **11** für das Tetrapeptid Ac-*D*-Glu-*L*-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala-OH (**12**) mit einer Assoziationskonstante von $K_{\text{Ass}} = 1.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ in reinem Wasser bei einem pH-Wert von 6.15.^[36] Die biologische Bedeutung dieses Tetrapeptid liegt darin, dass es die C-terminale Endsequenz eines Glykopeptids ist, das durch Quervernetzung durch eine Transpeptidase die Zellwand von Gram-positiven Bakterien stabilisiert. Wird dieser Teil der Zellwandbiosynthese gestört oder verhindert (z. B. durch Komplexierung abgeschirmt), kann sich das Bakterium nicht vermehren und damit nicht überleben. Hierauf beruht auch die antibakterielle Wirkung der Glykopeptid-Antibiotika wie z. B. die des Vancomycins (**13**) bei der Komplexierung des Tripeptids **14** in **Abb. 9**.^[37-40]

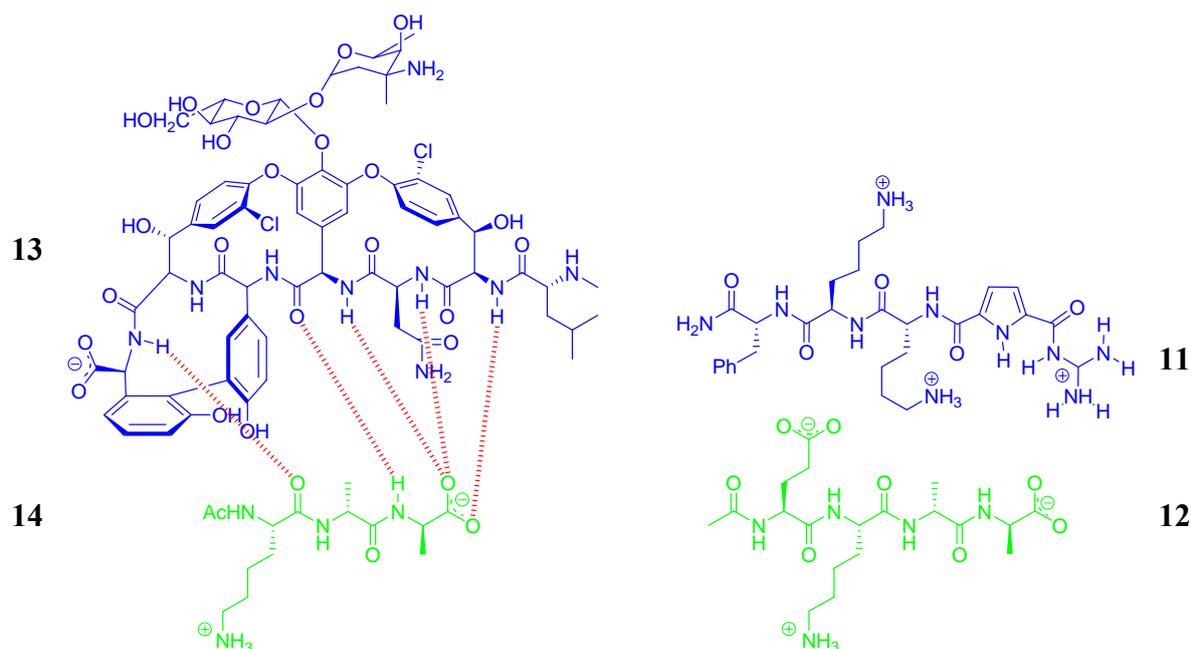


Abb. 9 Links: Komplexierung der tripeptidischen Glykopeptidensequenz **14** Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH (grün) durch Vancomycin (**13**, blau). Rechts: Komplexierung der tetrapeptidischen Glykopeptidensequenz **12** Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH (grün) durch den künstlichen Guanidiniocarbonyl-pyrrol-Rezeptor **11** (blau).

In weiteren Arbeiten von *Schmuck* wurde im Rezeptor **15** der Pyrrol-Heteroaromat ausgetauscht. Es wurden die drei Rezeptoren **16** bis **18** auf Basis von Furan, Pyridin und Benzol hergestellt und in Bindungsstudien untersucht.^[41, 42] Dabei zeigte sich, dass mit dem Rezeptor **16** keine Bindung beobachtet werden konnte. Der Grund hierfür lag im niedrigen pK_S -Wert des Acylguanidins, das einen Wert von etwa 4.5 besitzt. Messungen bei einem pH-Wert < 4 bewirkten die Zersetzung der säurelabilen Furan-Rezeptoren. Außerdem lagen bei einem derart niedrigen pH-Wert die Aminosäuren nicht mehr als Carboxylate sondern als Carbonsäuren vor, was ebenfalls äußerst ungünstig für eine Komplexierung ist. Bei Titrationsexperimenten bei $pH = 6.00$ war somit die Guanidinio-Funktion nicht protoniert, und es konnte keine Komplexierung von Oxo-Anionen beobachtet werden. Der Pyridin-Rezeptor **17** zeigte nur mäßige Bindungseigenschaften, aufgrund der repulsiven Wechselwirkungen des freien Elektronenpaares am Stickstoff, ähnlich des Bisguanidinium-Rezeptors **5** nach *Grossel*. Diese ungünstige Wechselwirkung tritt bei den Pyrrol-Rezeptoren (z. B. bei Rezeptor **15**) nicht auf, da hier das freie Elektronenpaar des ebenfalls sp^2 -hybridisierten Stickstoffs nicht in die Bindungsstelle zeigt, sondern an der Aromatizität des Pyrrolrings beteiligt ist. Für die Komplexierung von Acetylalanin in 40 % Wasser in DMSO besitzt Rezeptor **17** eine Bindungskonstante von $K_{Ass} = 4.5 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$. Der Benzol-Rezeptor **18** zeigte eine Assoziationskonstante von $K_{Ass} = 6.0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$. Die beste Komplexierung mit

$K_{\text{Ass}} = 8.0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ besitzt in dieser Reihe der Pyrrol-Rezeptor **15**. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei der Komplexierung der Aminosäure *N*-Acetylglycin gefunden.

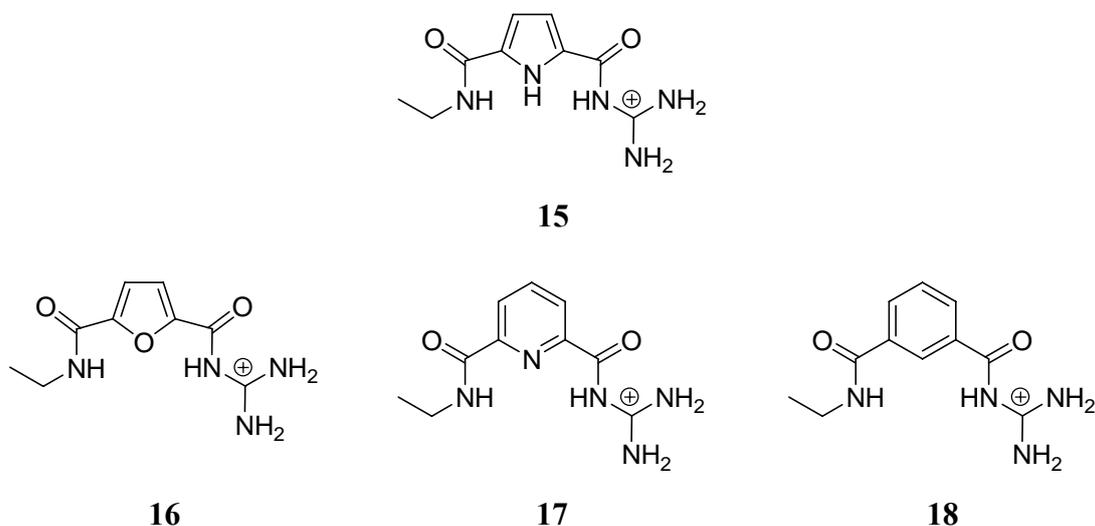


Abb. 10 Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **15**, Guanidiniocarbonylfuran-Rezeptor **16**, Guanidiniocarbonylpyridin-Rezeptor **17** und Guanidiniocarbonylbenzol-Rezeptor **18** nach *Schmuck* zur Komplexierung von Aminosäurecarboxylaten.

Die Kombination von Acylguanidin und Pyrrol in den Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren nach *Schmuck* ist aufgrund der verbesserten Assoziationseigenschaften ein geeignetes Strukturmotiv zur optimalen Komplexierung von Aminosäurecarboxylaten in wässrigen Systemen.

2.2 Grundlagen der Komplex-Bildung

Der Prozess der Molekularen Erkennung ist sehr komplex.^[43] Generell wird die Molekulare Erkennung nicht nur durch eine einzige quantifizierbare Wechselwirkung bestimmt. Vielmehr ist das Zusammenspiel vieler verschiedener nichtkovalenter Wechselwirkungen (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen) und sich gegenseitig beeinflussender unterschiedlicher Prozesse (z.B. Enthalpie, Entropie und Lösemittelleffekte) entscheidend, ob letztendlich eine stabile Komplexierung zustande kommt oder nicht.

In **Abb. 11** nach *P.R. Andrews* ist dieser Vorgang schematisch auf molekularer Ebene gezeigt: eine Komplexierung zwischen einem Rezeptor und einem Substrat in Wasser.^[44]

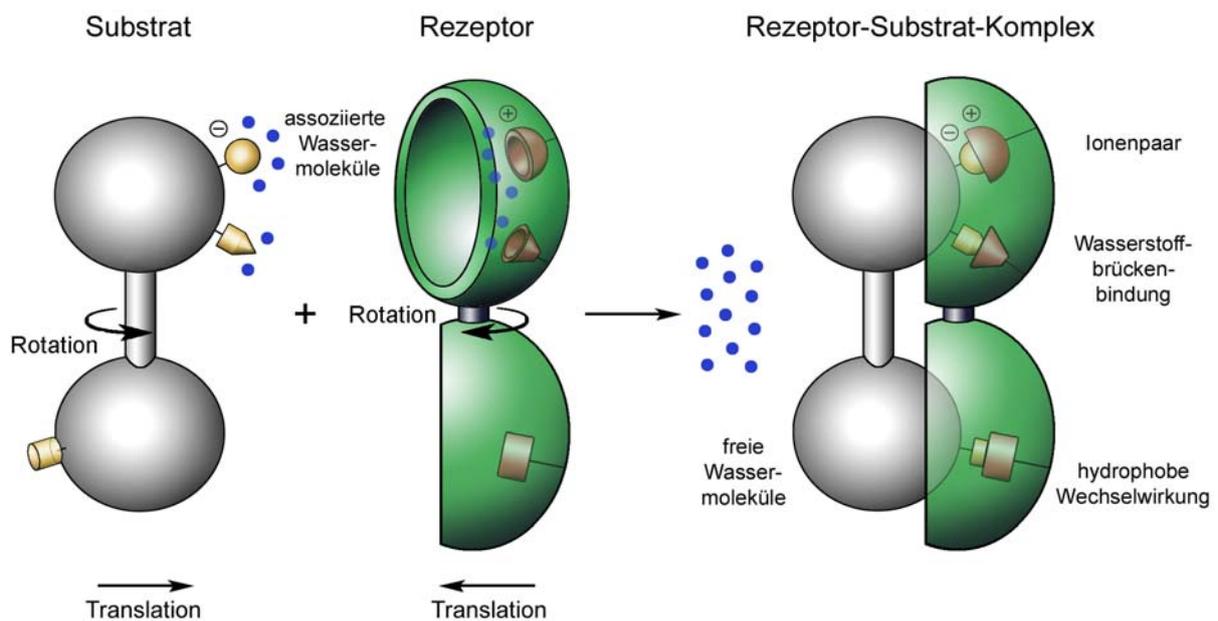


Abb. 11 Schematische Darstellung der Molekularen Erkennung: Ein Substrat (grau) geht mit einem Rezeptor (grün) einen stabilen Komplex ein.

In der obigen **Abb. 11** ist der Komplexierungsvorgang eines Substrates (grau), das drei unterschiedliche Bindungsstellen (beige) besitzt, mit einem komplementären Rezeptor (grün) dargestellt. Vor der Komplexierung sind Rezeptor und Substrat vom Lösemittel (blau) umgeben und vor allem die polaren und ionischen Bindungsstellen durch Wassermoleküle solvatisiert. Diese Solvathülle muss aufgebrochen werden, damit die Bindungsstellen dem jeweiligen

Bindungspartner zur Verfügung stehen können. Stabile Bindung wird nur dann stattfinden, wenn entweder die Enthalpie der neu entstandenen nichtkovalenten Bindungen oder die Erhöhung der Entropie durch die Lösemittelfreisetzung die Desolvatisierungsenergie überkompensieren kann. Weiterhin besitzen Rezeptor und Substrat vor der Bindung Freiheitsgrade (Flexibilität), die im Zuge der Bindung eingeschränkt oder gar gänzlich eingebüßt werden. Dies geht einher mit einem „induced fit“, bei dem die Partner die für eine Komplexierung günstigste Konformation einnehmen. In **Abb. 11** muss sich der untere Teil des Substrates um 180° gegen den Uhrzeigersinn verdrehen, während der obere Teil des Rezeptors sich leicht im Uhrzeigersinn verdrehen muss. Diese Einnahme einer starren Haltung erniedrigt die Entropie und ist damit ungünstig für die Komplexierung. Gut präorganisierte Rezeptoren sind somit günstiger für die Komplexierung, da weniger Energie in die richtige Komplexgeometrie investiert werden muss. Andererseits darf der Rezeptor nicht zu starr sein, weil dann kein „induced fit“ möglich ist, und der Rezeptor nicht die optimale geometrische Passform einnehmen kann. Eine gewisse Restflexibilität des Rezeptors ist somit für eine bestmögliche Komplexierung notwendig.

Eine genauere Betrachtung der physikalisch-chemischen Vorgänge

Die entscheidende thermodynamische Größe, ob letztendlich eine Komplexierung stattfindet oder nicht, ist die **Freie Komplexierungsenergie** ΔG . Sie setzt sich aus der **Enthalpie** ΔH und der **Entropie** ΔS des Komplexierungsvorgangs zusammen (siehe Gibbs-Helmholtz-Gleichung (2.32) in 2.3 *Bestimmung von Bindungskonstanten*). Nur bei negativer Komplexierungsenergie findet die Assoziation spontan statt.

Ein Bindungsvorgang, bei dem aus zwei einzelnen Molekülen (Rezeptor und Substrat) ein Komplex entsteht, ist rein formal betrachtet aufgrund der Einschränkung translatorischer Freiheitsgrade entropisch ungünstig. Denn Aufgrund der Assoziation zweier Moleküle zu einem Komplex wird die Ordnung des Systems erhöht. Weiterhin werden rotatorische und interne Freiheitsgrade eingeschränkt. Dieser Energiebetrag muss entweder durch andere entropische Effekte (z. B. Lösemittelfreisetzung) oder durch die Reaktionsenthalpie kompensiert werden. Deshalb ist es nötig, diesen Beitrag zu minimieren.^[2] Dies kann dadurch geschehen, dass man in ein Rezeptormolekül mehrere Bindungsstellen einbaut. So tritt der ungünstige Entropiebeitrag nur einmal auf, während die weiteren Bindungsstellen im Wesentlichen mehr zur freien Bindungsenthalpie beitragen können. In der Koordinationschemie spricht man hierbei vom „Chelat-Effekt“. In der Supramolekularen Chemie gibt es den Ausdruck der Multivalenz oder polyvalenten Wechselwirkungen.^[45-48] Während der

Chelat-Effekt die Komplexierung mehrerer Bindungsstellen im Rezeptor (z. B. EDTA) mit einer Bindungsstelle im Substrat (z. B. Metallion) bezeichnet, bezieht sich die Multivalenz auf die Komplexierung von Rezeptor und Substrat, bei der mehrere Bindungsstellen miteinander wechselwirken. Durch das Zusammenspiel vieler Wechselwirkungen (auch unterschiedlicher Art) und dadurch auch die gegenseitige Beeinflussung von verschiedenen Liganden, die an einen Rezeptor binden, entstand „Das Konzept der Kooperativität“, auch „Gulliver-Prinzip“ genannt (**Abb. 12**).^[4, 49] Dieses Wechselspiel kann positiv (synergetisch) sein, wenn ein weiterer Ligand besser gebunden wird als ein vorheriger, negativ (interferierend), wenn er schlechter gebunden wird, oder nichtkooperativ (additiv), wenn er genauso gut gebunden wird.^[48]

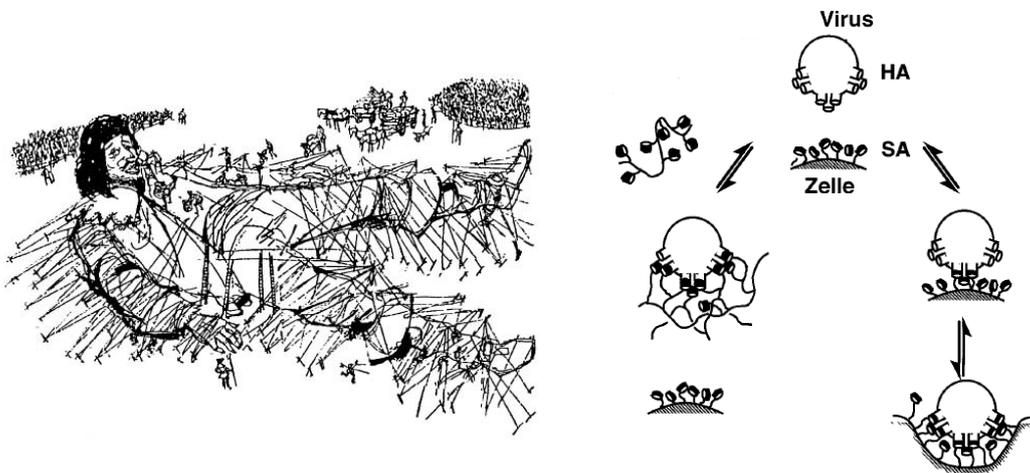


Abb. 12 Links: Beispiel für Kooperativität: Der Riese Gulliver, gefesselt mit einer Vielzahl schwacher „Bindungen“^[49]. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission. Rechts: Beispiel für polyvalente Wechselwirkungen: Die Anlagerung eines Influenzavirus an eine Zielzelle.^[46] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Auch durch gute Präorganisation, d. h. zum Substrat strukturell komplementär vorgeformte und bereits in der Flexibilität eingeschränkte Rezeptormoleküle, erhält man bei einer Komplexierung einen geringeren ungünstigen entropischen Energiebetrag, da Energie zur Einschränkung der Freiheitsgrade nicht zusätzlich während der Komplexierung aufgebracht werden muss.^[50]

Ein weit verbreitetes Phänomen in der Rezeptor-Substrat-Chemie ist die **Enthalpie-Entropie-Kompensation**. Darunter versteht man bei einer Komplexierung das Phänomen, dass trotz zunehmender Komplexstärke (ΔH) die Gesamtbindungsenergie (ΔG) aufgrund der zusätzlichen Bewegungseinschränkung sich kaum ändert. Eine Verstärkung einer intermolekularen

Bindung (z. B. Assoziation) führt auch gleichzeitig zu einem Verlust bzw. Einschränkung an Freiheitsgraden der Bewegung und umgekehrt. Eine stärkere Bindung bedingt hierbei eine stärker negativere Reaktionsenthalpie ΔH (günstig), aber auch gleichzeitig eine stärker negativere Reaktionsentropie ΔS (ungünstig).^[51] Dieses gegenläufige Wechselspiel zwischen Enthalpie und Entropie ist ein fundamentales Merkmal nichtkovalenter Wechselwirkungen. Die Ursache dafür liegt in der gegenläufigen Natur von Bindung und Bewegung. Für kovalente Bindungen spielt sie keine Rolle, da deren Energien viel größer sind als die der thermischen Bewegung.^[52] In der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (siehe Gleichung (2.32) in 2.3 Bestimmung von Bindungskonstanten) fließt die absolute Temperatur zwar mit ein, aber die freie molare Gibbs-Energie ΔG^0 ist häufig nur schwach temperaturabhängig.^[53] Gerade Wasserstoffbrückenbindungen tragen zu dieser Korrelation bei, da stärkere Wasserstoffbrücken zu weniger Bewegungsfreiheit und zur Erniedrigung der Entropie führen.^[54] Meist wird die Enthalpie-Entropie-Kompensation als lineare Funktion beschrieben, was auch im Allgemeinen zulässig ist, wie *Dunitz* mit einer mathematischen Beschreibung dieses Phänomens zeigen konnte.^[55]

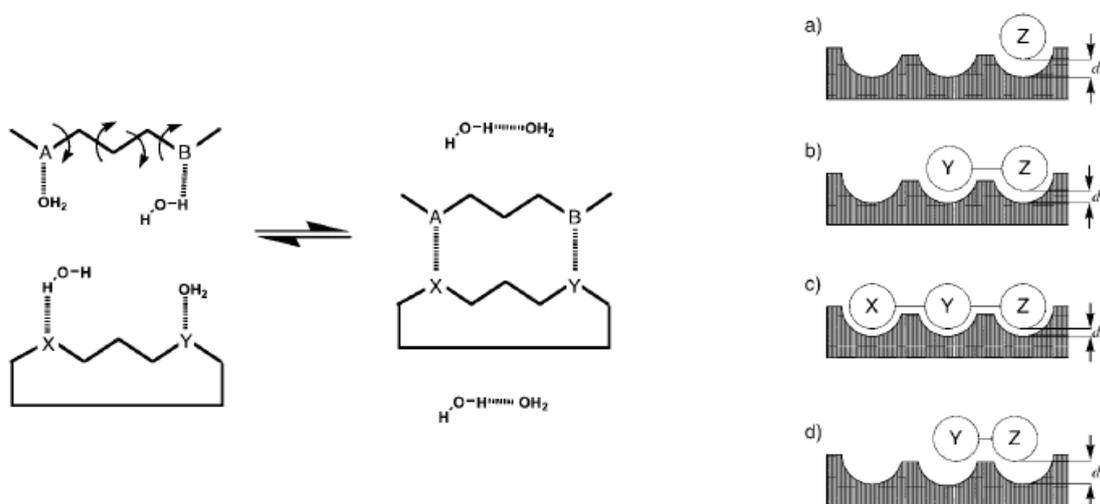


Abb. 13 Links: Ungünstige entropische Effekte: Bei der Komplexbildung werden Wassermoleküle verdrängt, die sich anschließend wiederum selber organisieren. Weiterhin hat im Komplex das obige Substrat Rotationsfreiheitsgrade um C-C-Einfachbindungen eingebüsst.^[52] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission. Rechts: Je mehr komplementäre Bindungsstellen ein Rezeptor-Substrat-System besitzt, desto stärker wird die Assoziation (a bis c). Besitzt ein Linker nicht die optimale Länge, so ist die Komplexbildung schwächer und ein Substrat wird weniger stark an den Rezeptor gebunden (d). Andererseits werden hierbei die Freiheitsgrade innerhalb des Substrates weniger stark eingeschränkt (b und d).^[52] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Auch **Lösemittleffekte** beeinflussen die Komplexierung. Bei einer Assoziation von Rezeptor und Substrat werden Lösemittelmoleküle frei, die vorher die Bindungsstelle besetzt hatten, und das Lösemittelnetzwerk muss neu geordnet werden. Bei einer 1:1-Komplexierung wird zwar die Entropie durch die Komplexierung selber erniedrigt, jedoch ist hierbei die Anzahl der freiwerdenden Lösemittelmoleküle meist wesentlich größer. Wird mehr Energie zur Entfernung der Lösemittelmoleküle nötig als durch deren Freisetzung gewonnen wird, entsteht ein enthalpisch ungünstiger Energiebeitrag. Werden jedoch durch die Komplexierung polare Lösemittelmoleküle freigesetzt, die zuvor mit hydrophoben Oberflächen von Rezeptor oder Substrat wechselwirkten, kann eine günstige Entropieänderung für diesen Vorgang beobachtet werden. Ein weiteres Phänomen hierbei ist, dass sich Lösemittelmoleküle organisieren bzw. untereinander ausrichten. Gerade durch die Anwesenheit anderer chemischer Substanzen wird die Ausrichtung beeinflusst. Besonders Wasser, im Hinblick auf biologische Relevanz, besitzt eine sehr geordnete Struktur.

Ein weiteres wichtiges Phänomen bei der Molekularen Erkennung ist der **Salzeffekt**. Dieser entsteht bei Zusatz weiterer Ionen zur Lösung, beispielsweise durch die Verwendung eines Puffers. Dadurch wird die Gesamtionenkonzentration erhöht und damit einerseits auf molekularer Ebene die Zahl der um die Bindungsstellen konkurrierenden Teilchen vergrößert. Andererseits wird durch die Erhöhung der Gesamtionenkonzentration die Anzahl der ladungstragenden Teilchen in der Lösung im Ganzen erhöht, damit aber die effektive Coulomb-Anziehung der einzelnen Ionenpaare verringert. Eine einfache Erklärung dieses Phänomens liegt darin, dass die Polarität einer Salzlösung größer ist als die des reinen Lösemittels. Im ungünstigsten Fall kann dies dazu führen, dass die Komplexierung so sehr gestört wird, dass keine Komplexierung mehr stattfindet.

Eine genauere Betrachtung der einzelnen nichtkovalente Beiträge

Die supramolekulare Anionenerkennung^[6, 46, 56-62] beruht auf nichtkovalenten Wechselwirkungen, und hierbei im Wesentlichen auf elektrostatischen Wechselwirkungen, wie Ionenpaaren (z. B. Metallionen) und Wasserstoffbrückenbindungen. Eine graphische Übersicht ist in **Abb. 14** dargestellt.

Ionenpaare und dipolare Wechselwirkungen sind auf die Coulomb-Anziehung entgegengesetzter Ladungen zurückzuführen. Dabei sind die stärksten Wechselwirkungen ionischer Art, da bei diesen die Ladungsdichte größer ist als bei Dipolen. Die ionischen Wechselwirkungen sind ungerichtet, während dipolare Wechselwirkungen eine bestimmte Orientierung besitzen, und sich somit auf einen bestimmten Partner ausrichten müssen. Die Metall-Ligand-

Wechselwirkungen (koordinative oder dative Bindung) können annähernd die Stärke kovalenter Bindungen erreichen.^[63-65]

Wasserstoffbrückenbindungen^[66] sind eine besondere Art der Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen einem Protonen-Donor und einem Protonen-Akzeptor. Donoren sind solche Gruppen, bei denen ein Wasserstoffatom an ein elektronegativeres Element gebunden ist, woraus ein Dipol mit leicht positiver Polarisierung am Wasserstoffatom resultiert. Akzeptoren sind Dipole mit elektronenziehenden Atomen, was zu einer leicht negativen Polarisierung führt. Diese Bindung ist eine gerichtete und somit neben der Acidität des Donors auch abhängig von der Geometrie der Komplexierung. Treffen bei der Komplexierung Donoren aufeinander, führt dies zu repulsive Wechselwirkungen. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind besonders in organischen, unpolaren Lösemitteln effektiv und büßen sehr oft an Stärke ein, wenn die Polarität des Lösemittels erhöht wird.^[43, 67] Gerade in wässrigen Lösemittelsystemen wird aufgrund der Konkurrenz des Rezeptors bzw. des Substrates um die Komplexbindungsstellen (Wasserstoff-Donoren und -Akzeptoren) mit den Wassermolekülen die Komplexierung geschwächt. Dies beschränkt oft die Rezeptor-Substrat-Chemie, die in der Vergangenheit überwiegend auf Wasserstoffbrücken basierte, auf unpolare Lösemittel wie Chloroform oder Hexan.

Unter **Stapelwechselwirkungen** versteht man entweder Kation- π -Wechselwirkungen oder π - π -Wechselwirkungen.^[68] Kationen sind hierbei meist Metallionen oder auch eine Ammonium- oder Guanidinium-Einheit, die mit aromatischen Systemen z. B. in Peptidsträngen stabile Wechselwirkungen ausbilden konnten.^[69-71] Bei π - π -Wechselwirkungen zwischen zwei aromatischen Systemen unterscheidet man die *face-to-face*-Anordnung, bei der die Ringsysteme parallel übereinander aber etwas gegeneinander verschoben mit einem Abstand von etwa 3.5 Å angeordnet sind. Bei der *edge-to-face*-Anordnung stehen die beiden aromatischen Ringsysteme senkrecht zueinander (**Abb. 14**). Diese aromatischen Wechselwirkungen sind in unpolaren Medien eher schwach und gewinnen erst bei polaren Lösemitteln (z. B. Wasser) an Bedeutung. Ihre Verwendung ist aber bezüglich einer Komplexierung schwieriger einzuschätzen, da sie weniger gerichtet und weniger spezifisch wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen sind.

Die **Van der Waals-Wechselwirkungen** beruhen auf Dispersionseffekten. Durch spontane Fluktuation der Elektronendichte wird ein Dipol erzeugt, der in einem benachbarten Molekül ebenfalls einen Dipol induziert. Daraufhin ziehen sich beide Moleküle an. Die Stärke ist dabei abhängig von der Polarisierbarkeit des benachbarten Moleküls sowie dessen Entfernung.

Hydrophobe Wechselwirkungen ergeben sich dadurch, dass polare Gruppen oder polare Lösemittelmoleküle mit unpolaren Gruppen oder unpolaren Lösemittelmolekülen nur schwache attraktive Wechselwirkungen zeigen, während sie untereinander wesentlich stärker sind. Ersetzt ein eher unpolares hydrophobes Substrat Wasser in einer hydrophoben Kavität eines Rezeptors, so ist dies eine günstige enthalpische hydrophobe Wechselwirkung, da das nur sehr schwach wechselwirkende Wasser freigesetzt wird und starke Wechselwirkungen zu anderen Lösemittelmolekülen aufbauen kann.

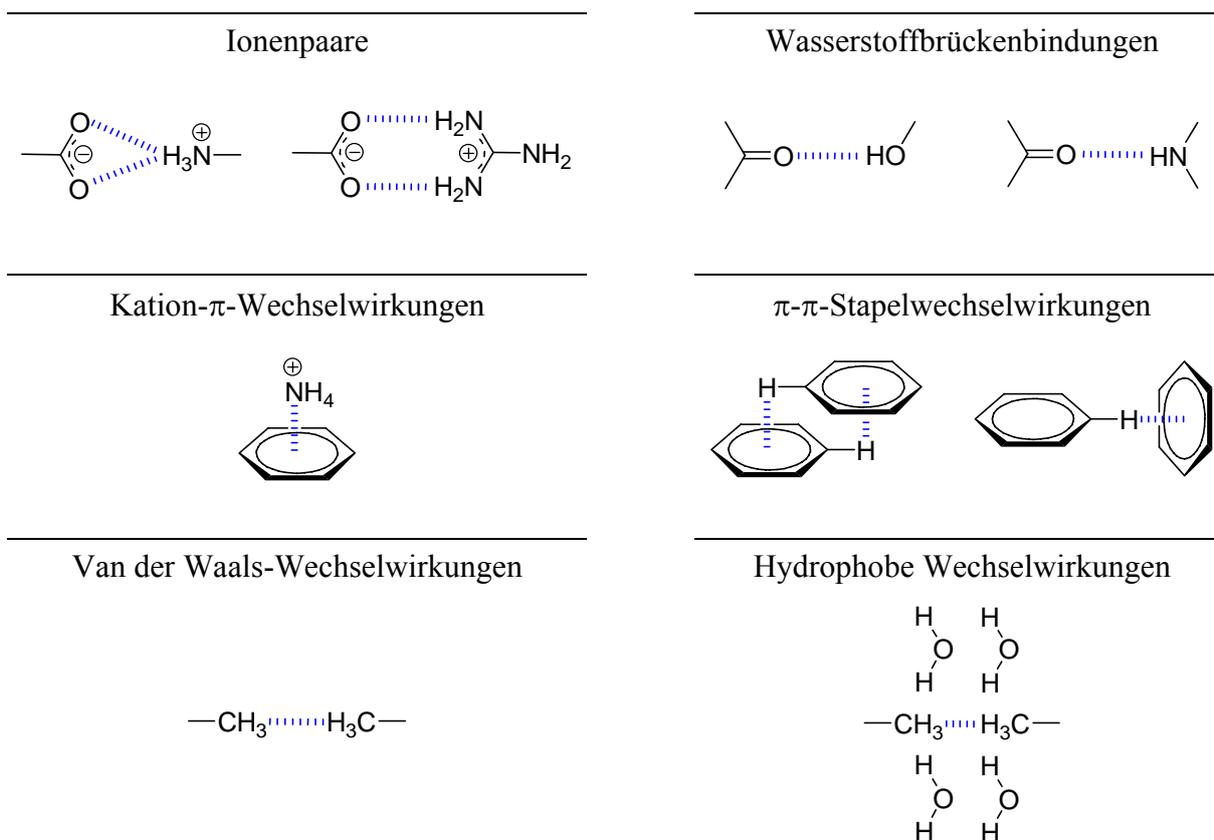


Abb. 14 Nichtkovalente Wechselwirkungen: Ionenpaare mit v-förmiger und bidentater Komplexierung, Wasserstoffbrückenbindungen von Alkoholen und Aminen, Kation- π -Wechselwirkungen, π - π -Stapelwechselwirkungen mit *face-to-face*- (links) und *edge-to-face*- (rechts) Anordnung, Van der Waals-Wechselwirkungen sowie Hydrophobe Wechselwirkungen mit Lösemiteleinfluss.

Durch die Kombination verschiedener schwächerer nichtkovalenter Wechselwirkungen kann durch kooperative Effekte eine starke Komplexierung erzielt werden.^[46, 49] Bei der Rezeptorentwicklung können, abgestimmt auf das jeweilige Substrat, verschieden nichtkovalente Wechselwirkungen gezielt eingesetzt werden. Dadurch kann man letztendlich die Substratspezifität verbessern und effektive Rezeptoren erhalten.

2.3 Bestimmung von Bindungskonstanten

Die Quantifizierung der Bindungsstärke eines supramolekularen Komplexes setzt voraus, dass sich während eines Komplexierungsvorgangs eine physikalische Eigenschaft des betrachteten Systems verändert, die mit physikalisch-chemischen Methoden verfolgt werden kann. Durch die Verfolgung der Veränderung dieser Observablen kann anschließend eine Assoziationskonstante berechnet werden.

Die Stärke einer Bindung von Substrat und Rezeptor kann dabei auf zahlreiche Arten bestimmt werden,^[2] die man in zwei Kategorien unterteilen kann: Die nicht-invasiven Messmethoden, bei denen das ursprüngliche System erhalten bleibt und das Gleichgewicht völlig ungestört „beobachtet“ werden kann, und solche, bei denen vorherige Eingriffe in das ursprüngliche System u. a. in Form von chemischer Manipulation (Derivatisierung) durchgeführt werden müssen.

Zu den nicht invasiven Methoden gehören die spektroskopischen Methoden. Bei der Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie), werden z. B. die durch eine Komplexierung hervorgerufenen Shifts von ^1H -Signalen beobachtet. Diesen Shift bezeichnet man auch als CIS (complexation induced shift). Die NMR-Spektroskopie ist eine der gängigsten Methoden, da sie zusätzlich zur Stärke der Assoziation noch Informationen liefert, welche Atome an einer Bindung beteiligt sind. Auch die Ultraviolett- (UV) und die Fluoreszenz-Spektroskopie fallen darunter, sofern ein geeigneter Chromophor in einem der beiden Bindungspartner vorhanden ist. Hierbei wird die Änderung der Absorption bzw. Emission gemessen, was eine Veränderung der elektronischen Eigenschaften des Moleküls aufgrund der Komplexierung widerspiegelt. Als physikalisch-chemische Messmethode lässt sich die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) ebenfalls zu dieser Gruppe zählen. Mit dieser Methode kann man ein komplettes thermodynamisches Profil einer chemischen Reaktion oder Komplexierung erhalten. Sie beruht darauf, dass während einer Reaktion Wärme frei oder verbraucht wird.

Eine invasive Methode ist beispielsweise die chemische Manipulation zum Anbringen eines Sensors. Dies kann durch Einführung einer optisch aktiven Gruppe durch eine chemische Reaktion geschehen. Dieses „Label“ wird meist so weit vom eigentlichen Bindungsmotiv

entfernt angebracht, dass es eigentlich keinen Einfluss mehr auf die Komplexierung haben sollte. Diese Sensoren kann man dann mit optischen spektroskopischen Methoden beobachten (z. B. Fluoreszenz-Label).

Eine andere invasive Technik ist die Immobilisierung (Fixierung), die z. B. beim BIACORE-Verfahren zum Einsatz kommt. Dabei wird ein Reaktionspartner an einen Sensorchip (Goldfilm) immobilisiert, d. h. kovalent über Amine oder Disulfidbrücken verknüpft. Der andere Bindungspartner wird dann in einer Flusskammer darüber gespült. Die Interaktion beider Partner miteinander kann in Echtzeit mittels des optischen Phänomens der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (surface plasmon resonance, SPR) beobachtet werden. Dabei misst man den Brechungsindex in der oberflächennahen Schicht (einige 100 nm über dem Goldfilm), dessen Änderung direkt mit der Interaktion korreliert ist. Das BIACORE-Verfahren kommt vor allem zur Messung von Protein-Protein-Wechselwirkungen zum Einsatz.^[72]

In dieser Arbeit kommen nur Techniken mit nicht-invasiven Methoden zum Einsatz. Aufgrund des Vorhandenseins eines Pyrrol-Grundkörpers konnten UV- und Fluoreszenz-Messungen durchgeführt werden. Auch NMR- und ITC-Experimente fanden Anwendung. Diese Methoden sollen nun im Detail vorgestellt und deren Hintergrund beleuchtet werden.

Die Methoden^[2, 73-75] haben gemeinsam, dass man zur Bestimmung der Bindungskonstante ein Titrationsexperiment durchführt und dabei eine physikalisch-chemische und für den Komplex charakteristische Eigenschaft beobachtet. Diese ändert sich im Verlauf des Titrationsexperimentes und führt schließlich zu einer Sättigung, d. h., die Veränderung erreicht ein Plateau. Eine solche Auftragung ist in **Abb. 15** gezeigt. Zur mathematischen Auswertung ist eine gute experimentelle Beschreibung der gesamten Kurve nötig. Hierbei gibt aber nicht die absolute Größe der Änderung die Stärke der Komplexierung wieder. Die Assoziationskonstante wird vielmehr durch die Krümmung der Kurve erhalten, während die absolute Größenänderung lediglich den systematischen und mathematischen Fehler verringert. Das annähernde Erreichen des Plateaus ist zur iterativen Bestimmung mittels nichtlinearer Kurvenanpassung rechnerisch (als Grenzwert) nötig, wobei ein tatsächliches Erreichen nicht möglich ist (es sei denn, die Assoziation wäre unendlich stark).

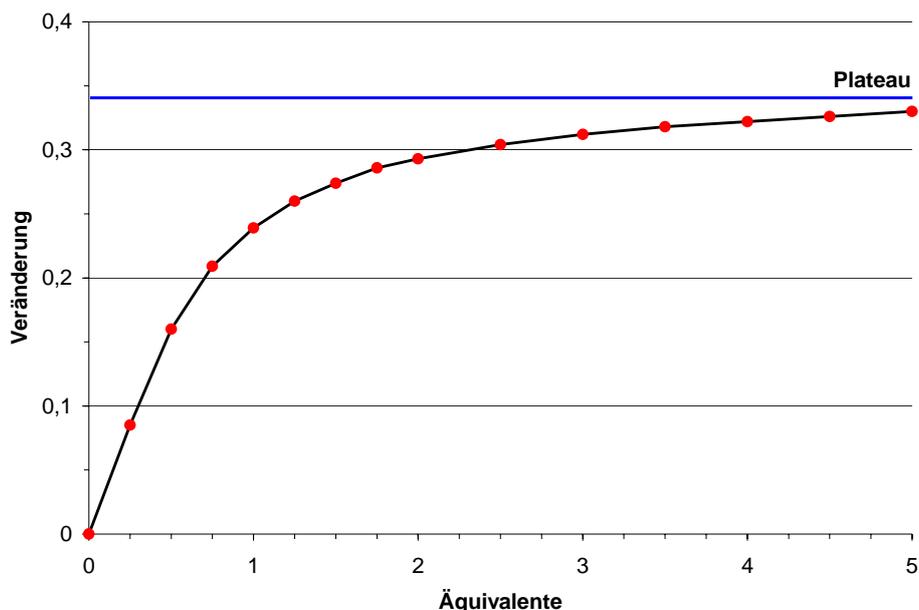


Abb. 15 Auftragung einer physikalisch-chemischen Größe (Observablen) der Komplexierung gegen die zutitrierten Äquivalente an Substrat zu einem Rezeptor. Mittels nichtlinearer Kurvenanpassung kann die Bindungsisotherme berechnet werden. Die blaue Line stellt das nichterreichte Plateau dar.

Zur Beschreibung eines Bindungsprozesses muss man zuerst die Stöchiometrie des Komplexes bestimmen, denn sowohl die chemische als auch die mathematische Herangehensweise ist sehr davon abhängig. Je höher diese Stöchiometrie, desto komplizierter wird die Beschreibung, denn neben der eigentlichen Komplexzusammensetzung müssen auch die kleineren Aggregationen des sich bildenden Komplexes berücksichtigt werden. Denn bei einer Assoziation werden in der Regel zunächst diese niederen Komplexstöchiometrien gebildet, bis sich letztendlich der Komplex mit der stabilsten Zusammensetzung entwickelt. Für eine solche Assoziation kann man dann auch die verschiedenen Komplexbildungskonstanten ermitteln. Dies gilt jedoch nicht für besonders starke Assoziationen höherer Stöchiometrie, da hierbei die niederen Komplexstöchiometrien praktisch keine Rolle spielen.

Eine Komplexierung eines Rezeptors R mit einem Substrat S zu dem Komplex R_rS_s kann durch eine Gleichgewichtsreaktion beschrieben werden (2.1), wobei r und s die Stöchiometrie des Komplexes bezeichnen. Unter Verwendung des Massenwirkungsgesetzes erhält man durch Gleichung (2.2) die Assoziationskonstante K_{Ass} , auch Komplexbildungskonstante genannt, bzw. deren reziprokes Pendant, die Dissoziationskonstante K_{Diss} . Exakterweise müssten anstelle der Konzentrationen die Aktivitäten eingesetzt werden. Da die Messungen meistens in sehr verdünnten Lösungen durchgeführt werden, ist die Verwendung der Konzentrationen anstelle der Aktivitäten als Näherung legitim.



$$K_{\text{Ass}} = \frac{[R_r S_s]}{[R]^r \cdot [S]^s} = \frac{1}{K_{\text{Diss}}} \quad (2.2)$$

mit $[R_r S_s]$ = Komplexkonzentration im Gleichgewicht, $[R]$ = Rezeptorkonzentration im Gleichgewicht, r = Stöchiometrie des Rezeptors, $[S]$ = Substratkonzentration im Gleichgewicht, s = Stöchiometrie des Substrates, K_{Ass} = Assoziationskonstante, K_{Diss} = Dissoziationskonstante.

Die Konzentrationen von Rezeptor $[R]$ und Substrat $[S]$ im Gleichgewicht können nun durch die Differenz ihrer Startkonzentrationen, also der Rezeptorstartkonzentration $[R_0]$ und der Substratstartkonzentration $[S_0]$, mit der anteiligen (r , s) Konzentration an gebildetem Komplex $[R_r S_s]$ ersetzt werden.

$$[R] = [R_0] - r \cdot [R_r S_s] \quad (2.3)$$

$$[S] = [S_0] - s \cdot [R_r S_s] \quad (2.4)$$

Im Folgenden wird nun eine 1:1-Komplexierung betrachtet, wobei sich die Gleichungen (2.1) und (2.2) wie folgt vereinfachen:



$$K_{\text{Ass}} = \frac{[RS]}{[R] \cdot [S]} \quad (2.6)$$

Für die Konzentrationen im Gleichgewicht gelten nun:

$$[R] = [R_0] - [RS] \quad (2.7)$$

$$[S] = [S_0] - [RS] \quad (2.8)$$

Setzt man nun die Gleichungen (2.7) und (2.8) in die Gleichung (2.6) ein, so erhält man Gleichung (2.9), die als quadratische Gleichung für die Komplexkonzentration $[RS]$ umgeformt und mittels quadratischer Ergänzung (p-q-Formel) gelöst werden kann:

$$K_{\text{Ass}} = \frac{[\text{RS}]}{([\text{R}_0] - [\text{RS}]) \cdot ([\text{S}_0] - [\text{RS}])} \quad (2.9)$$

$$K_{\text{Ass}} = \frac{[\text{RS}]}{[\text{R}_0] \cdot [\text{S}_0] - [\text{R}_0] \cdot [\text{RS}] - [\text{S}_0] \cdot [\text{RS}] + [\text{RS}]^2}$$

$$\frac{[\text{RS}]}{K_{\text{Ass}}} = [\text{R}_0] \cdot [\text{S}_0] - [\text{R}_0] \cdot [\text{RS}] - [\text{S}_0] \cdot [\text{RS}] + [\text{RS}]^2$$

$$0 = [\text{RS}]^2 - \left(\frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [\text{R}_0] + [\text{S}_0] \right) \cdot [\text{RS}] + [\text{R}_0] \cdot [\text{S}_0]$$

$$[\text{RS}] = \frac{1}{2} \cdot \left\{ \frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [\text{R}_0] + [\text{S}_0] - \sqrt{\left(\frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [\text{R}_0] + [\text{S}_0] \right)^2 - 4 \cdot [\text{R}_0] \cdot [\text{S}_0]} \right\} \quad (2.10)$$

$$[\text{RS}] = \frac{1}{2} \cdot \left\{ K_{\text{Diss}} + [\text{R}_0] + [\text{S}_0] - \sqrt{\left(K_{\text{Diss}} + [\text{R}_0] + [\text{S}_0] \right)^2 - 4 \cdot [\text{R}_0] \cdot [\text{S}_0]} \right\} \quad (2.11)$$

mit $[\text{RS}]$ = Komplexkonzentration im Gleichgewicht, K_{Ass} = Assoziationskonstante, K_{Diss} = Dissoziationskonstante, $[\text{R}_0]$ = Startkonzentration des Rezeptors, $[\text{S}_0]$ = Startkonzentration des Substrates.

Die beiden Gleichungen (2.10) und (2.11) beschreiben im Gleichgewicht die Konzentration des Komplexes $[\text{RS}]$ in Abhängigkeit der Assoziations- K_{Ass} bzw. der Dissoziationskonstante K_{Diss} und der Startkonzentrationen des Rezeptors $[\text{R}_0]$ und des Substrates $[\text{S}_0]$.

Bis hierhin ist die Herleitung für alle Methoden identisch. In den weiteren Schritten ergeben sich aber Unterschiede zwischen den Herleitungen der Auswertung für die NMR-Spektroskopie, die beiden optischen Methoden, UV- und der Fluoreszenz-Spektroskopie, und die ITC-Methode. Bei der NMR-Technik wird die Komplexkonzentration im Gleichgewicht durch den CIS beschrieben. Diese Konzentration wird im Fall schnell austauschender Protonen indirekt über eine Mittelung der Rezeptor-Protonen der freien und der komplexierten Spezies dargestellt. Bei den optischen Methoden wird die Änderung der Absorption bzw. der Intensität des sich bildenden Komplexes direkt beobachtet, d. h. die Komplexkonzentration ist direkt proportional der beobachteten Größe. Bei der ITC-Methode wird die Wärmetönung der Komplexbildung verfolgt, die ebenfalls direkt proportional der Komplexkonzentration ist.

Im Folgenden werden nun die verschiedenen, im Zuge der Anfertigung dieser Arbeit verwendeten Methoden dargestellt und knapp deren mathematische Grundlagen beleuchtet.

NMR-Spektroskopie

Die wichtigste Methode zur Quantifizierung einer Komplexierungsstärke ist die Kernspinresonanz-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance, NMR). Denn neben der reinen Bindungskonstante erhält man bei dieser Technik auch zusätzlich Strukturinformationen über die Komplexierung. Die Verschiebungen der NMR-Signale zeigen, welche funktionellen Gruppen bzw. Atome direkt an der Komplexierung mittels nichtkovalenter Wechselwirkungen, wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen, teilnehmen. Dies geschieht durch eine Beobachtung der Änderung der chemischen Verschiebung von Wasserstoffatomen, hervorgerufen durch eine elektronische Veränderung infolge der Komplexierung. Dies bezeichnet man als „complexation induced shift“ (CIS). Alle Signale, bei denen ein solcher CIS beobachtbar ist, nehmen entweder direkt an der Komplexierung teil oder werden durch Nachbargruppen beeinflusst. Dabei variiert die absolute Größe des CIS für verschiedene Protonensignale. Letztendlich sollte aber die Auswertung aller CIS die gleiche Bindungskonstante liefern, da die Kurvenkrümmung und nicht der Absolutwert dafür verantwortlich ist. Würde die Auswertung verschiedener CIS unterschiedliche Bindungskonstanten ergeben, weist dies auf verschiedene Bindungsmodi, eine andere Stöchiometrie oder eventuell auf eine wahllose Aggregation hin. Zumindest sind die Bedingungen für die Auswertung einer 1:1-Komplexierung nicht mehr gegeben.

Experimentell wird hierzu eine Messreihe von ^1H -NMR-Spektren aufgenommen, bei denen die Startkonzentrationen von Rezeptor und Substrat variieren. Dazu wird z. B. der Rezeptor (falls man dessen Protonen beobachten möchte) vorgelegt und feste Aliquote an Substrat zugegeben. Durch die Zugabe an Substrat wird der Komplex gebildet, wodurch sich die beteiligten Signale verschieben. Trägt man die Verschiebung gegen die Äquivalente auf, so erhält man mittels nichtlinearer Kurvenanpassung eine Titrationsisotherme, bei deren Auswertung man die Assoziationskonstante erhält. In **Abb. 16** ist links eine Überlagerung von ^1H -NMR-Spektren gezeigt. Vom Rezeptor sind die beiden rechten Protonen, Pyrrol-Protonen bei 6.67 ppm und 6.69 ppm, und daneben ein NH-Proton bei 6.85 ppm zu sehen. Da die Protonensignale zum vorgelegten Rezeptor gehören, sind sie anfangs am größten und nehmen mit zunehmender Verdünnung an Intensität ab. Daneben sind benzyliche Protonen bei 7.06 bis 7.21 ppm und ein NH-Proton bei 7.52 bis 7.56 ppm des Substrates zu sehen, die an Intensität zunehmen. Im rechten Bild ist die berechnete Bindungisotherme für das rechte Pyrrol-Proton des Rezeptors gezeigt. Aus der Krümmung der Kurve erhält man die Bindungsstärke.

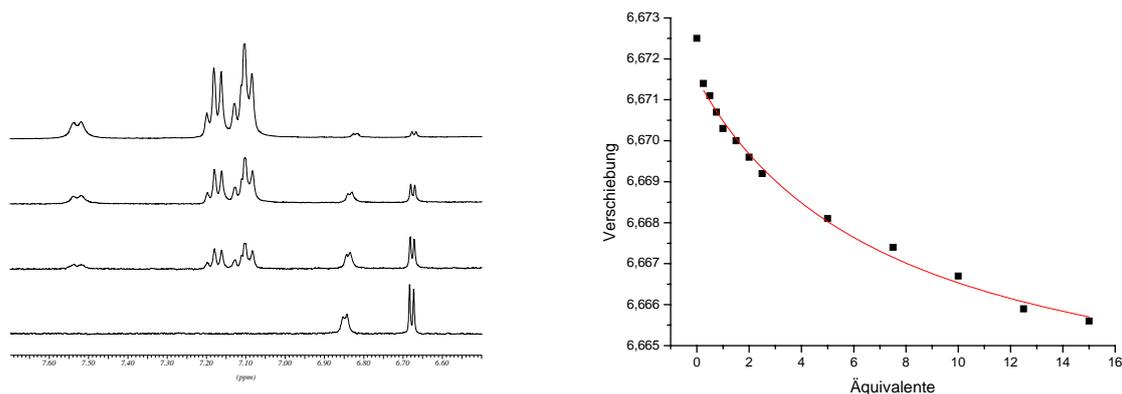


Abb. 16 NMR-Titrationsexperiment zur Bestimmung der Bindungskonstante. Links: Überlagerung von ¹H-NMR-Spektren. Rechts: berechnete Bindungsisotherme für das rechte Pyrrol-Proton bei 6.67 ppm.

Bei der NMR-Spektroskopie muss man bei der Quantifizierung der Bindungsstärke unterscheiden, ob eine Komplexbildung langsam oder schnell auf der NMR-Zeitskala (ca. 10^{-2} s) abläuft.^[76] Ist sie langsamer, so erhält man separate Signale für die komplexierte und die unkomplezierte Form (**Abb. 17**). Durch Integration der einzelnen Signale können die Konzentrationen der freien und komplexierten Form direkt bestimmt und die Bindungskonstante über das Massenwirkungsgesetz berechnet werden. Eine Titration ist nicht nötig, wird aber für ein exaktes Ergebnis dennoch durchgeführt.

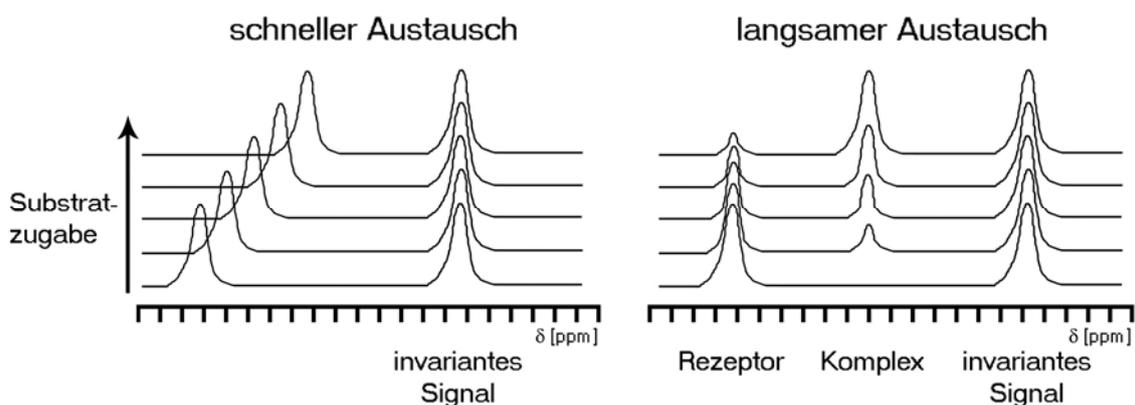


Abb. 17 NMR-Titrationsexperiment bei schneller und langsamer Komplexbildung.

Meist jedoch werden Bindungsstudien bei Raumtemperatur durchgeführt, bei der die Dynamik der Komplexbildung so schnell ist, dass man mit der NMR-Spektroskopie nur einen gemittelten Signalsatz aus freien Bindungspartnern und Komplex erhält. Aus der Signalverschiebung während der Komplexbildung relativ zum unkomplexierten Signal kann die Konzentration des Komplexes berechnet werden.

Für eine 1:1-Komplexierung setzen sich die gemittelten Signale anteilig aus der Verschiebung des freien Rezeptors δ_R und der Verschiebung des sich bildenden Komplexes δ_{RS} zusammen **(2.12)**. Mathematisch kann man dies dadurch beschreiben, dass das beobachtete Signal δ_{beo} die Summe der chemischen Verschiebungen ist, unter Berücksichtigung des jeweiligen Anteils des freien bzw. des komplexierten Rezeptors, normiert auf die Startkonzentration des Rezeptors **(2.12)**. Setzt man Gleichung **(2.7)** in **(2.12)** ein, erhält man Gleichung **(2.13)**.

$$\delta_{\text{beo}} = \frac{[R]}{[R_0]} \cdot \delta_R + \frac{[RS]}{[R_0]} \cdot \delta_{RS} \quad (2.12)$$

$$\delta_{\text{beo}} = \frac{[R_0] - [RS]}{[R_0]} \cdot \delta_R + \frac{[RS]}{[R_0]} \cdot \delta_{RS} \quad (2.13)$$

mit δ_{beo} = experimentell gemessene chemische Verschiebung, δ_R = chemische Verschiebung des freien Rezeptors, δ_{RS} = chemische Verschiebung des Komplexes, $[R_0]$ = Startkonzentration des Rezeptors, $[R]$ = Konzentration des Rezeptors im Gleichgewicht, $[RS]$ = Konzentration des Komplexes im Gleichgewicht.

Nun führt man die Differenz $\Delta\delta$ der chemischen Verschiebungen des Komplexes δ_{RS} und der des Rezeptors δ_R ein, substituiert dies in Gleichung **(2.13)** man erhält die Gleichung **(2.15)**.

$$\Delta\delta = \delta_{RS} - \delta_R \quad (2.14)$$

$$\delta_{RS} = \delta_R + \Delta\delta$$

$$\delta_{\text{beo}} = \frac{[R_0] - [RS]}{[R_0]} \cdot \delta_R + \frac{[RS]}{[R_0]} \cdot (\delta_R + \Delta\delta)$$

$$\delta_{\text{beo}} = \delta_R - \frac{[RS]}{[R_0]} \cdot \delta_R + \frac{[RS]}{[R_0]} \cdot \delta_R + \frac{[RS]}{[R_0]} \cdot \Delta\delta$$

$$\delta_{\text{beo}} = \delta_R + \frac{[RS]}{[R_0]} \cdot \Delta\delta \quad (2.15)$$

In dieser Gleichung ersetzt man nun die zuvor in Gleichung **(2.11)** hergeleitete Komplexkonzentration im Gleichgewicht $[RS]$ und erhält schließlich die Gleichung **(2.16)**.

$$\delta_{\text{beo}} = \delta_{\text{R}} + \frac{\Delta\delta}{2 \cdot [\text{R}_0]} \cdot \left\{ \frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [\text{R}_0] + [\text{S}_0] - \sqrt{\left(\frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [\text{R}_0] + [\text{S}_0] \right)^2 - 4 \cdot [\text{R}_0] \cdot [\text{S}_0]} \right\} \quad (2.16)$$

mit δ_{beo} = experimentell gemessene chemische Verschiebung, δ_{R} = chemische Verschiebung des freien Rezeptors, $\Delta\delta$ = Differenz der chemischen Verschiebungen aus Komplex und freiem Rezeptor, $[\text{R}_0]$ = Startkonzentration des Rezeptors, $[\text{S}_0]$ = Startkonzentration des Substrates, K_{Ass} = Assoziationskonstante.

In dieser Gleichung beschreiben die Variablen $[\text{R}_0]$, $[\text{S}_0]$ und $\Delta\delta$ eine dreidimensionale Hyperfläche. Da aber in einem Titrationsexperiment die Konzentration der vorgelegten Komponente konstant gehalten wird, während sich die der zutitrierten allmählich verändert, wird nur ein zweidimensionaler Ausschnitt dieser Hyperfläche betrachtet. Durch Implementierung der Gleichung (2.16) in ein Programm zur mathematischen Kurvendiskussion (z. B. *Origin*) kann mittels nichtlinearer Kurvenanpassung aus den chemischen Verschiebungen die Komplexbildungskonstante berechnet werden.

Die NMR-Methode eignet sich besonders zur Bestimmung von kleineren Bindungskonstanten. *Person, Deranleau* und *Wilcox* haben gezeigt, dass Titrationskurven nur dann verlässliche Werte über die Bindungsstärke liefern, wenn von dieser ein bestimmter Bereich aufgenommen wird.^[77-79] Dieser Kurvenbereich wird durch den von *Weber*^[80] eingeführten p-Wert (probability of binding) eingegrenzt. Definiert ist dieser Wert als das Verhältnis der Komplexkonzentration $[\text{RS}]$ im Gleichgewicht und dessen maximal möglichen Konzentration des Rezeptors $[\text{R}_0]$. Bei einer Titration soll dabei ein Bereich von p zwischen 0.2 und 0.8 überstrichen werden. Außerhalb dieses Bereiches liegen Rezeptor bzw. Substrat in hohem Überschuss vor, und die Bindungsisotherme unterscheidet sich kaum noch bei schwacher und starker Komplexierung (**Abb. 18**).

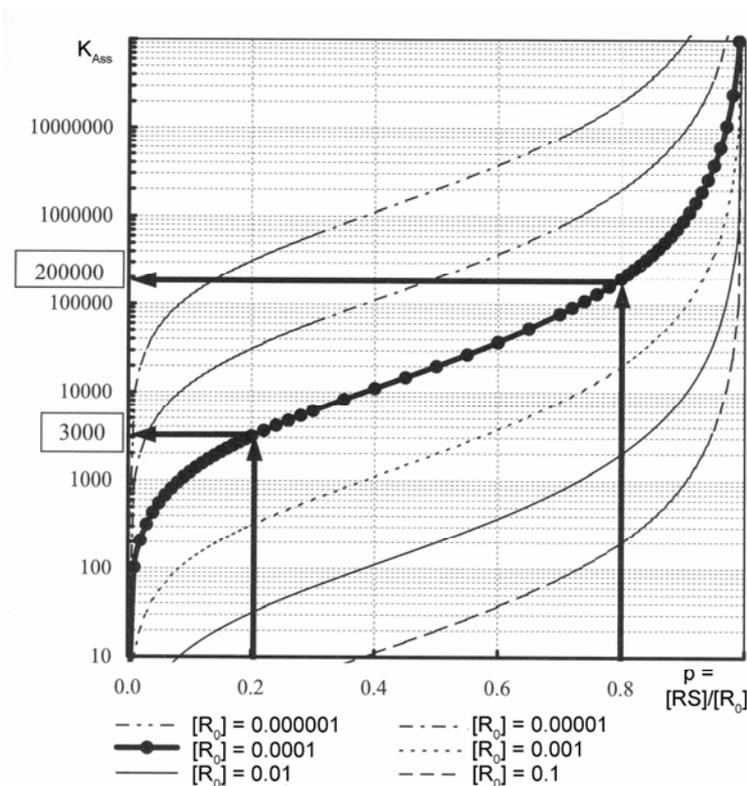


Abb. 18 Korrelation zwischen p-Wert und der Bindungskonstante.^[2] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Als Faustformel sollte daher die Startkonzentration des vorgelegten Rezeptors etwa reziprok der Bindungskonstante sein (\pm Faktor 10), um optimale Ergebnisse bezüglich der mathematischen Auswertung zu erhalten. Dies bedeutet auch, dass höhere Bindungskonstanten sehr verdünnte Startkonzentrationen benötigen. Dabei gelangt die NMR-Methode aber an ihre Grenzen, denn um experimentell auswertbare, gut aufgelöste NMR-Spektren zu erhalten, benötigt man Konzentrationen im oberen μmol bis mmol Bereich. Die bestimmbar liegenden Bindungskonstanten liegen somit im Bereich von $K_{Ass} = 10^2$ bis 10^4 M^{-1} . Weiterhin muss etwa 75 % der Sättigungskurve beobachtet werden, um akkurate Ergebnisse zu erhalten. Gerade für kleine Bindungskonstanten bedeutet dies die Titration von wesentlich mehr Äquivalenten als es bei einer starken Komplexierung nötig ist.^[78]

Nachteilig bei der NMR-Spektroskopie ist, dass häufig nicht alle für die Komplexierung interessanten Signale beobachtet werden können oder beobachtbar sind. Die Ursachen dafür können darin liegen, dass man keinen scharfen Peak erhält, dass sich Peaks überlagern, dass die chemische Verschiebung zu gering ist oder dass Signale während der Datensammlung im Hintergrundrauschen verschwinden. Auch die Wahl des Lösemittels stellt eine gewisse

Herausforderung dar. So muss zum Beispiel bei protischen Lösemitteln mit normalen Wasserstoff-Protonen (^1H), also bei Verwendung nicht vollständig deuterierter (^2H oder D) Lösemittel, eine spezielle Messmethode angewendet werden, um überhaupt Signale zu erhalten. Denn aufgrund der Größe des Lösemittelpeaks wären die meisten Signale nicht detektierbar. Zudem können mit dem Lösemittel schnell austauschende Protonen, wie Amin-, Amid- oder Guanidinio-Protonen, nicht beobachtet werden. Dies ist z. B. bei Verwendung von H_2O oder $\text{d}_3\text{-MeOH}$ der Fall. Deswegen werden Spektren mit Lösemittelunterdrückung durch Vorsättigung der entsprechenden Signale aufgenommen. Dabei wird selektiv die Resonanzfrequenz des Lösemittelpeaks (z. B. Wasser bei etwa 4.3 ppm) eingestrahlt, wodurch sich eine Gleichbesetzung (Sättigung) der Energieniveaus einstellt und das Signal im NMR-Spektrum unterdrückt ist. Dabei gehen in erster Linie auch Signale verloren, die in der näheren Umgebung des Lösemittelpeaks liegen, solche in bestimmten definierten periodischen Abständen sowie eben auch schnell austauschende Protonen.

Auch ist es problematisch, wenn bei NMR-Titrationen neben der Komplexbildung auch Protonierungsreaktionen ablaufen (**Abb. 19**). Dies tritt ein, wenn der pH-Wert von Rezeptor- und Substratlösung nicht identisch ist. Auch hier erhält man eine Signal-Verschiebung durch Protonierungs- bzw. Deprotonierungsreaktionen. Zur Vermeidung muss der pH-Wert mittels Säure- oder Basenzugabe korrigiert werden. Auch durch die Verwendung eines Puffers vermeidet man solche störenden Reaktionen, jedoch erhält man dadurch wieder zusätzliche NMR-Signale, die möglicherweise bei der Spektrenauswertung störend sind. Um Protonierungsreaktionen auszuschließen, beobachtet man in einem Titrationsexperiment mit äquimolaren Mengen an Rezeptor und Substrat den CIS bei allmählicher Verdünnung. Zeigt er einen linearen Verlauf, handelt es sich um eine Säure-Base-Reaktion, da diese konzentrationsunabhängig ist. Ein hyperbolischer Verlauf hingegen bedeutet eine Komplexbildung, da diese sehr wohl konzentrationsabhängig ist.

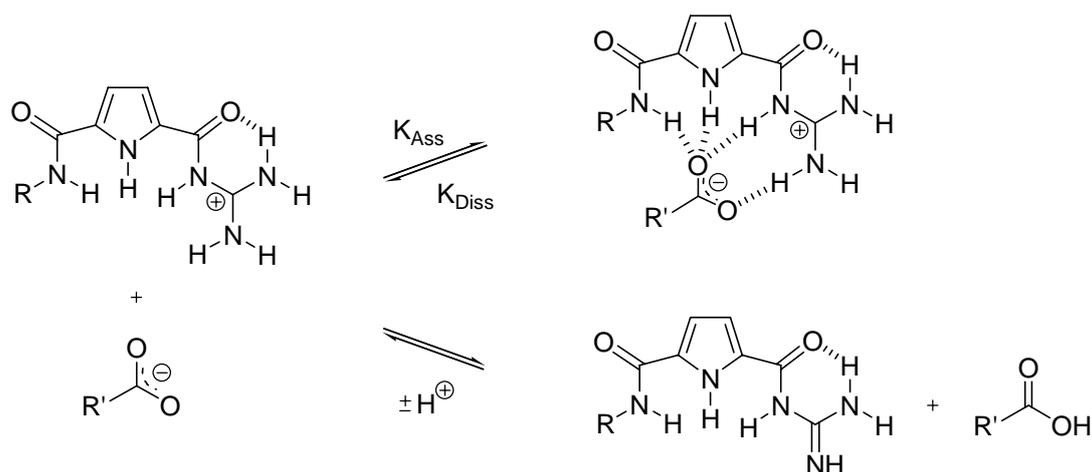


Abb. 19 Unterschied von Komplexierung und Protonierungsreaktion: Während bei einer Protonierung (unten) ein Wasserstoffproton übertragen wird, kommt es bei der Komplexierung (oben) zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ohne eine Transprotonierung.

UV- und Fluoreszenz-Spektroskopie

Zur Untersuchung einer Komplexierung mit optischen Spektroskopiemethoden wird ebenfalls ein Titrationsexperiment durchgeführt. Eine Grundvoraussetzung für die Verwendung dieser beiden optischen Spektroskopiemethoden ist die Photostabilität der verwendeten Proben im UV-Bereich (250 bis 500 nm). Durch die Komplexierung wird in einem chromophoren System des Rezeptors oder des Substrates eine elektronische Änderung beobachtet, die durch eine Verschiebung der Elektronendichte während dieses Vorgangs verursacht wird. Dabei wird bei der UV-Spektroskopie die Absorption von Licht beim Durchgang durch Proben verschiedener Startkonzentrationen von Rezeptor und Substrat gemessen, um letztendlich die Konzentration des Komplexes im Gleichgewicht zu bestimmen. Bei der Fluoreszenz-Spektroskopie absorbiert der Chromophor Licht bestimmter Wellenlänge und sendet energieärmeres, also längerwelligeres Licht, wieder aus. Die Intensität dieses Lichtes wird üblicherweise in einem Winkel von 90 Grad gemessen und kann zur Bestimmung von Bindungskonstanten dienen. Ein Vorteil der Fluoreszenz-Spektroskopie gegenüber der Absorptionsspektroskopie ist die um die Größenordnung 10^3 höhere Empfindlichkeit gegenüber der Absorptionsspektroskopie. Dies liegt vor allem daran, dass bei der Absorptionsspektroskopie ein Quotient der eingestrahnten und emittierten Lichtintensitäten gebildet wird, während bei der Fluoreszenz-Spektroskopie direkt eine Intensität gemessen wird.^[81] In **Abb. 20** ist schematisch ein beobachtetes UV-Spektrum gezeigt. Hierbei wird die Wellenlänge gegen die Absorption aufgetragen. Es setzt sich additiv aus den drei Einzel-Spektren des Rezeptors, des Substrates und des Komplexes zusammen. Durch Aufnahme des

beobachteten Spektrums und der Spektren von Rezeptor und Substrat kann das Spektrum des Komplexes berechnet werden.

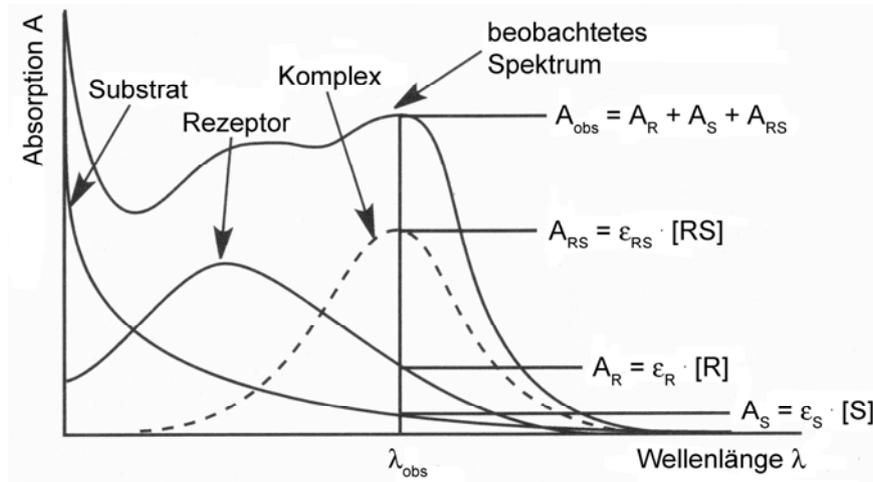


Abb. 20 Schematische inkrementelle Darstellung des beobachteten UV-Spektrums: das während der Titration aufgenommene Spektrum ist das Ergebnis einer Überlagerung der einzelnen Spektren des Rezeptors R, des Substrates S und des Komplexes RS.^[2] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission

Man beobachtet die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge (λ_{obs}). In **Abb. 21** ist der Titrationsverlauf einer UV-Bindungsstudie eines Pyrrol-Derivates dargestellt. Deutlich ist im linken Bild die Abnahme der Absorption der Pyrrol-Bande zu sehen. Diese ist hauptsächlich auf die Verdünnung der Probe während der Titration zurückzuführen. Über das Lambert-Beersche Gesetz kann diese Verdünnung berechnet werden. Durch die Komplexbildung nimmt die UV-Absorption stärker ab, als dies allein die Verdünnung bewirken würde. Der Unterschied zwischen dieser berechneten Verdünnung und der gemessenen Abnahme der Absorption wird durch die Komplexbildung hervorgerufen. Würde man diese Differenz gegen die Äquivalente auftragen, würde man eine Sättigungskurve erhalten (siehe **Abb. 15**). Im rechten Bild von **Abb. 21** sind die Messpunkte bei einer Absorption von 300 nm dargestellt. Die grüne Kurve zeigt die berechnete Verdünnung, während die rote Kurve die mittels nichtlinearer Kurvenanpassung berechnete Bindungsisotherme darstellt.

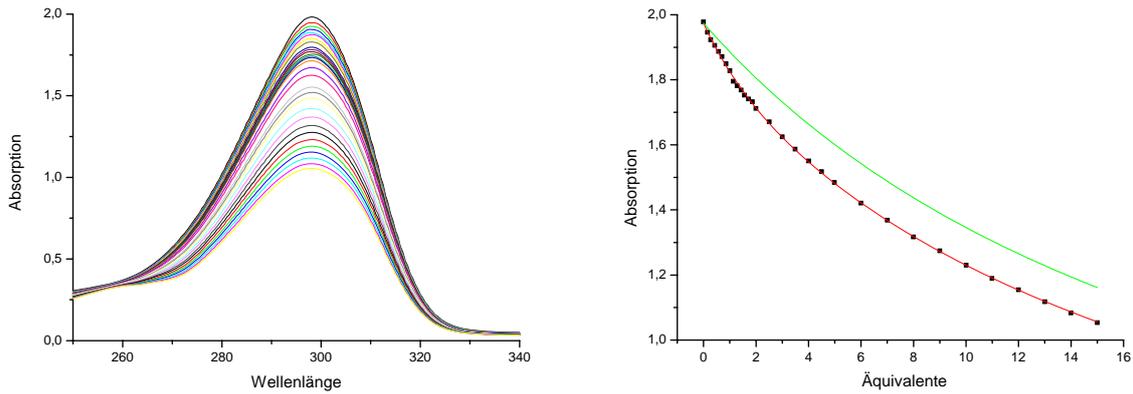


Abb. 21 UV-Titrationsexperiment zur Bestimmung der Bindungskonstante. Links: Überlagerung der UV-Spektren. Rechts: Bindungsisotherme (rot) und berechnete Verdünnungskurve bei 300 nm (grün).

Der Quantifizierung der Komplexbildung mittels UV- oder Fluoreszenz-Spektroskopie liegt das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde (2.17), bei dem A die Absorption, ϵ der molare Extinktionskoeffizient, d die Schichtdicke und c die Konzentration ist. Bezogen auf ein Titrationsexperiment setzt sich die Absorption A als Summe aller absorbierenden Spezies dar, also aus freiem Rezeptor, freiem Substrat und dem Komplex, und man erhält unter Berücksichtigung der Schichtdicke der Küvette von $d = 1$ cm die Gleichung (2.18).

$$A = \epsilon \cdot d \cdot c \tag{2.17}$$

$$A = \epsilon_R \cdot [R] + \epsilon_S \cdot [S] + \epsilon_{RS} \cdot [RS] \tag{2.18}$$

mit A = experimentell gemessene Absorption, ϵ = molarer Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke der Messküvette, c = Konzentration der absorbierenden Spezies, ϵ_R = molarer Extinktionskoeffizient des Rezeptors, ϵ_S = molarer Extinktionskoeffizient des Substrates, ϵ_{RS} = molarer Extinktionskoeffizient des Komplexes, $[R]$ = Konzentration des Rezeptors im Gleichgewicht, $[S]$ = Konzentration des Substrates im Gleichgewicht, $[RS]$ = Konzentration des Komplexes im Gleichgewicht.

In Gleichung (2.18) kann man nun analog der NMR-Methode die Konzentration des Rezeptors im Gleichgewicht $[R]$ und die Konzentration des Substrates im Gleichgewicht $[S]$ durch die Gleichungen (2.7) und (2.8) ersetzen.

$$A = \epsilon_R \cdot ([R_0] - [RS]) + \epsilon_S \cdot ([S_0] - [RS]) + \epsilon_{RS} \cdot [RS] \tag{2.19}$$

$$A = \epsilon_R \cdot [R_0] + \epsilon_S \cdot [S_0] + (\epsilon_{RS} - \epsilon_R - \epsilon_S) \cdot [RS] \tag{2.20}$$

Die so erhaltene Gleichung (2.20) kann vereinfacht werden, indem man $\Delta\varepsilon$ einführt. Dies ist die Differenz aus dem molaren Extinktionskoeffizient des Komplexes ε_{RS} und den molaren Extinktionskoeffizienten des Rezeptors ε_R und des Substrates ε_S .

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_{RS} - \varepsilon_R - \varepsilon_S \quad (2.21)$$

$$A = \varepsilon_R \cdot [R_0] + \varepsilon_S \cdot [S_0] + \Delta\varepsilon \cdot [RS] \quad (2.22)$$

Analog der NMR-Methode wird nun wiederum die Komplexkonzentration im Gleichgewicht [RS] in dieser Formel durch Gleichung (2.11) ersetzt.

$$A = \varepsilon_R \cdot [R_0] + \varepsilon_S [S_0] + \frac{\Delta\varepsilon}{2} \cdot \left\{ \frac{1}{K_{Ass}} + [R_0] + [S_0] - \sqrt{\left(\frac{1}{K_{Ass}} + [R_0] + [S_0] \right)^2 - 4 \cdot [R_0] \cdot [S_0]} \right\} \quad (2.23)$$

mit A = experimentell gemessene Absorption, ε_R = molarer Extinktionskoeffizient des freien Rezeptors, ε_S = molarer Extinktionskoeffizient des freien Substrates, $\Delta\varepsilon$ = Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten zwischen Komplex und freiem Rezeptor und freiem Substrat, $[R_0]$ = Startkonzentration des Rezeptors, $[S_0]$ = Startkonzentration des Substrates, K_{Ass} = Assoziationskonstante.

Auch hier wird durch die Variablen $[R_0]$, $[S_0]$ und $\Delta\varepsilon$ eine Hyperfläche beschrieben. Wiederum wird im Titrationsexperiment ein zweidimensionaler Ausschnitt beobachtet. Durch Implementierung der Gleichung (2.23) in ein Programm zur mathematischen Kurvendiskussion (z. B. *Origin*) kann mittels nichtlinearer Kurvenanpassung aus der Absorption und den molaren Extinktionskoeffizienten die Komplexbildungskonstante berechnet werden.

Die Gleichung (2.23) gilt für die Bestimmung der Bindungskonstante mittels UV-Spektroskopie. Man kann sie aber auch für die Fluoreszenz-Spektroskopie einsetzen, unter der Voraussetzung, dass das Lambert-Beersche Gesetz gültig ist. Dabei ersetzt man lediglich die Adsorption A durch die Intensität I und erhält Gleichung (2.24)

$$I = \varepsilon_R \cdot [R_0] + \varepsilon_S [S_0] + \frac{\Delta\varepsilon}{2} \cdot \left\{ \frac{1}{K_{Ass}} + [R_0] + [S_0] - \sqrt{\left(\frac{1}{K_{Ass}} + [R_0] + [S_0] \right)^2 - 4 \cdot [R_0] \cdot [S_0]} \right\} \quad (2.24)$$

mit I = experimentell gemessene Intensität, ε_R = molarer Extinktionskoeffizient des freien Rezeptors, ε_S = molarer Extinktionskoeffizient des freien Substrates, $\Delta\varepsilon$ = Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten zwischen Komplex, freiem Rezeptor und freiem Substrat, $[R_0]$ = Startkonzentration des Rezeptors, $[S_0]$ = Startkonzentration des Substrates, K_{Ass} = Assoziationskonstante.

Für das Verhältnis von Startkonzentration und Assoziationskonstante gilt auch hier wie bei der NMR-Methode die reziproke Beziehung (+/- Faktor 10), um optimale Ergebnisse bezüglich der mathematischen Auswertung zu erhalten. Darin liegt ein großer Vorteil dieser beiden optischen spektroskopischen Methoden. Denn es können sehr große Bindungskonstanten gemessen werden, da schon Konzentrationen im mittleren nmol Bereich experimentell ausreichend sind. Für höher konzentrierte Lösungen kann die Spaltbreite des Photometers verringert werden und somit auch kleinere Bindungsaffinitäten gemessen werden. Bestimmbare Bindungskonstanten liegen somit im Bereich von $K_{\text{Ass}} = 10^2$ bis 10^8 M^{-1} .

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung von sehr hohen Bindungskonstanten mittels der optischen spektroskopischen Methoden ist die Verdrängungstitration, auch „indicator displacement assay“ (IDA) genannt.^[74, 75] Hierbei wird ein UV- bzw. fluoreszenz-aktiver Indikator verwendet, der bei Zugabe vom Rezeptor gebunden wird. Durch ein Titrationsexperiment kann dessen Bindungskonstante bestimmt werden. Besitzt ein Substrat eine höhere Affinität zum Rezeptor, verdrängt er bei Zugabe den Indikator. Durch ein weiteres Titrationsexperiment des Substrates zu einem Rezeptor-Indikator-Komplex kann nun die Bindungskonstante des Substrates zum Rezeptor unter Berücksichtigung eines kompetitiven Bindungsmodus der zuvor bestimmten Bindungskonstanten zwischen Indikator und Rezeptor berechnet werden. Auf diese Weise ist es auch möglich, nicht UV- bzw. fluoreszenz-aktive Rezeptor-Substrat-Systeme zu untersuchen. Eine Grundvoraussetzung zur Anwendung dieser Methode ist, dass keine Wechselwirkungen zwischen Indikator und Substrat auftreten.

Das Lambert-Beersche Gesetz verliert seine Gültigkeit, wenn bei der Bestimmung der Bindungskonstante mittels UV- oder Fluoreszenz-Spektroskopie neben einer Zu- oder Abnahme einer spektroskopischen Bande (hyperchromer oder hypochromer Shift) noch zusätzlich eine Wanderung der Bande zu höheren oder niedrigeren Wellenlängen (bathochromer oder hypsochromer Shift) vorkommt. Das physikalische Gesetz und die weitere Ableitung der Komplexbildung beruhen nämlich auf der Annahme, dass die Komplexbildung innerhalb einer Wellenlänge beobachtbar ist. Ist dies nicht der Fall, ist keine einfache nichtlineare Regressionsanalyse einer einzigen Wellenlänge möglich, sodass extra für die Spektroskopie entwickelte Computerprogramme (z. B. *Specfit*) verwendet werden müssen.

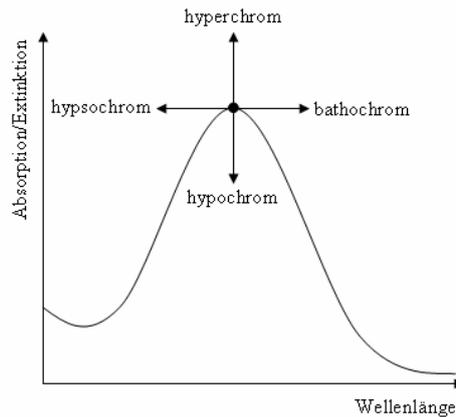


Abb. 22 Schematische Darstellung der möglichen Änderungen von Absorptions- bzw. Extinktionsspektren bei UV- und Fluoreszenz-Spektroskopie.

Bei Fluoreszenz-Messungen kann es auch zu Quenching-Effekten (Fluoreszenzlöschung) kommen, die die Fluoreszenz teilweise oder ganz auslöschen. In diesem Fall gilt die Herleitung der Gleichung (2.24) nicht mehr, da das Lambert-Beersche Gesetz seine Gültigkeit verliert. Die Ursache für Quenching-Effekte kann entweder in den verwendeten Substanzen selber oder auch im Lösemittel liegen. Vor allem Sauerstoff in den Lösemitteln führt zu Quenching-Effekten, weshalb gerade bei viskoserem Lösemitteln wie DMSO unbedingt eine Entgasung, z. B. durch Behandlung mit Ultraschall, notwendig ist. Als Lösemittelleffekt ist bekannt, dass in wässrigem Medium die Fluoreszenz wesentlich geringer ist als z. B. in Alkoholen.^[82] Bei solchen Fällen ist die Fluoreszenz-Spektroskopie eine ungeeignete Messmethode zur Bestimmung von Bindungskonstanten, sodass auf andere Methoden ausgewichen werden muss.

Ein weiteres Problem bei Fluoreszenz-Messungen ist die Photoinstabilität von Proben. Tritt dieses Phänomen ein, sind keine Bindungsstudien mit dieser Methode möglich.

Kalorimetrische Methode: ITC

Bei der isothermalen Titrationskalorimetrie^[83, 84] (Isothermal titration calorimetry, ITC) wird die bei einer Reaktion freiwerdende oder verbrauchte Wärmeentwicklung bei konstanter Temperatur gemessen. Dabei können nichtkovalente Bindungen (z. B. zwischen Proteinen oder zwischen Rezeptor/en und Substrat/en) mit gleichem Formalismus betrachtet werden wie chemische Reaktionen, die zu kovalenten Bindungen führen.

Die erhaltenen Parameter sind die Reaktionsenthalpie oder Bindungsenthalpie ΔH , die freie Reaktionsenthalpie ΔG , die Stöchiometrie N , die Bindungskonstante K_{Ass} , die Entropie ΔS und die Wärmekapazität c_p . Üblicherweise werden die thermodynamischen Parameter in Kalorien (cal) angegeben.

Bei der ITC-Methode hat man zwei Zellen, eine Messzelle und eine Referenzzelle, die sich beide in einem äußeren temperierten Mantel befinden. Damit beide Zellen aber immer auf der gleichen Temperatur gehalten werden können, wird an beiden eine kontinuierliche Heizspannung angelegt. Findet in der Reaktionszelle nun eine chemische Reaktion oder eine Komplexierung statt, wird entweder Wärme verbraucht oder freigesetzt. Dies führt dazu, dass die Heizspannung an der Messzelle so reguliert werden muss, dass die Messzelle wieder die gleiche Temperatur wie die Referenzzelle besitzt. Dies bedeutet, dass bei Wärmeverbrauch (endotherme Reaktion) die Heizspannung erhöht und bei Wärmefreisetzung (exotherme Reaktion) die Spannung verringert werden muss. Damit entspricht die Änderung der Heizspannung an der Messzelle genau der Wärmetönung der Reaktion bzw. der Komplexierung und kann als Observable genutzt werden.

In **Abb. 23** ist im oberen Bild eine typische ITC-Messung gezeigt. Die Peaks entsprechen jeweils einer Injektion von Substrat und sind gegen den Wärmeimpuls (Wärmeentwicklung pro Zeit) aufgetragen. Das untere Bild zeigt die berechnete sigmoidale Kurvenanpassung der Wärmeimpulse der Injektionen gegen die Äquivalente. Die x-Koordinate des Wendepunktes gibt die Stöchiometrie der Komplexierung wieder. Ein weiteres Titrationsexperiment wie bei den spektroskopischen Messmethoden ist dabei nicht notwendig (zusätzliches Titrationsexperiment: siehe **2.4 Bestimmung der Bindungsstöchiometrie**). Aus der Steigung im Wendepunkt kann die Komplexstärke berechnet werden. Die absolute Enthalpie lässt Rückschlüsse auf den Bindungsmodus zu. Je nach Stärke der nichtkovalenten Wechselwirkungen variiert die Größe der Enthalpie.

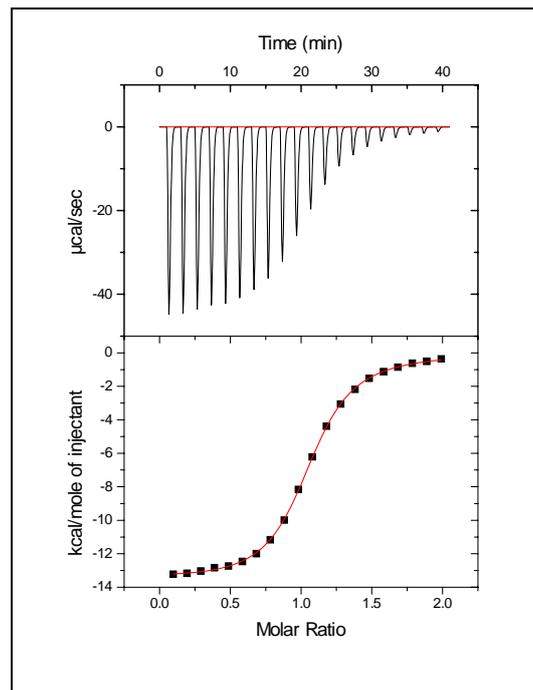


Abb. 23 ITC-Titrationsexperiment. Oben: Spektrum, Unten: Bindungsisotherme.^[83]

Nach dem ersten Hauptsatz der Thermodynamik, dem Energieerhaltungssatz, gilt, dass sich die Innere Energie U eines Systems als Summe der Wärme Q und der Arbeit W zusammensetzt (2.25). Die Wärme Q entspricht hierbei der Änderung der Enthalpie ΔH , und die Arbeit W wird durch $p \cdot \Delta V$ (für $\Delta V \neq 0$) beschrieben (2.26). Wird unter isobaren Bedingungen (bei konstantem Druck) keine Arbeit verrichtet, entspricht die Innere Energie der Wärme der Reaktion (2.27). Dies ist beispielsweise bei Reaktionen in Lösungen der Fall, bei denen sich das Volumen nicht ändert ($\Delta V = 0$).

$$\Delta U = Q + W \quad (2.25)$$

$$\Delta U = \Delta H + p \cdot \Delta V \quad (2.26)$$

$$\Delta U = \Delta H \quad (2.27)$$

Die gesamte Wärmemenge Q der Lösung ist abhängig von der Stoffmenge des sich bildenden Komplexes n_{RS} (2.28) und damit von der Konzentration des Komplexes $[RS]$ und dem Reaktionsvolumen V (2.29).

$$Q = \Delta H \cdot n_{RS} \quad (2.28)$$

$$Q = \Delta H \cdot [RS] \cdot V \quad (2.29)$$

Wie schon zuvor kann auch hier die Komplexkonzentration durch die Gleichung (2.11) eingesetzt werden:

$$Q = \frac{\Delta H \cdot V}{2} \cdot \left\{ \frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [R_0] + [S_0] - \sqrt{\left(\frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [R_0] + [S_0] \right)^2 - 4 \cdot [R_0] \cdot [S_0]} \right\} \quad (2.30)$$

mit Q = gesamte Wärme der Reaktion, ΔH = molare Wärme der Komplexierung, V = Volumen der Reaktionslösung, $[R_0]$ = Startkonzentration des Rezeptors, $[S_0]$ = Startkonzentration des Substrates, K_{Ass} = Assoziationskonstante.

Trägt man nun die Wärme pro Injektion gegen das Molverhältnis auf, kann man mittels nichtlinearer Kurvenanpassung die Bindungskonstante K_{Ass} bestimmen.

Über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung (2.32) können nun weitere physikalisch-chemische Parameter erhalten werden, die freie Reaktionsenthalpie ΔG und die Entropie ΔS :

$$\Delta G^0 = -R \cdot T \cdot \ln K_{\text{Ass}} \quad (2.31)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \quad (2.32)$$

mit ΔG^0 = molare freie Reaktionsenthalpie der Reaktion, R = allgemeine Gaskonstante, T = Temperatur in Kelvin, K_{Ass} = Assoziationskonstante, ΔH^0 = molare Reaktionsenthalpie der Komplexierung, ΔS^0 = molare Entropie.

Eine weitere wichtige Größe in der physikalischen Chemie, die Wärmekapazität c_p , kann durch folgende Beziehung erhalten werden. Sie gilt unter der Voraussetzung, dass die Änderung der Wärmekapazität temperaturunabhängig ist. Hierzu sind weitere ITC-Messreihen bei verschiedenen Temperaturen nötig.

$$\Delta Q = c_p \cdot \Delta T \quad (2.33)$$

$$\Delta c_p = d \frac{\Delta H}{\Delta T} = \frac{\Delta H_{T_2} - \Delta H_{T_1}}{T_2 - T_1} \quad (2.34)$$

mit ΔQ = Wärmeänderung der Reaktion, c_p = Wärmekapazität, ΔT = Temperaturänderung in Kelvin, ΔH = Reaktionsenthalpie.

Der Hauptvorteil dieser Messmethode liegt demnach darin, dass ein vollständiges thermodynamisches Profil einer Reaktion erstellt werden kann, ohne in das Gleichgewicht in irgendeiner Art einzugreifen. Weiterhin gibt es keine Einschränkung bezüglich der Größe (Molmassen) der Reaktionspartner, alle gängigen Lösemittel können frei gewählt werden

(z. B. Pufferlösungen oder Salzlösungen). Selbst Suspensionen oder kolloidale Lösungen können verwendet werden. Auch können alle Arten von Wechselwirkungen untersucht werden.

Darin wird aber auch wiederum die Schwierigkeit der Messmethode deutlich, da nur die Gesamtsumme an Wechselwirkungen, also die Reaktionsenthalpie, gemessen werden kann und so mehrere Effekte bzw. Einzelenergiebeiträge einer Komplexierung überlagern. Heben sich positive und negative Energiebeiträge gegeneinander auf, so ist schließlich keine Messung mehr möglich, und die Messmethode stößt an ihre Grenzen. Weiterhin ist die Messmethode sehr empfindlich gegenüber Lösemittelgemischen, denn frei werdende oder benötigte Mischungswärme beeinflusst die Messung stark.

Um etwaige Wärmeentwicklungen, die nicht durch die Komplexierung hervorgerufen werden, wie z. B. durch Verdünnen sowohl der Substratlösung als auch der Rezeptorlösung während der Titration, zu ermitteln, werden Verdünnungsexperimente unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Die erhaltenen Wärmeentwicklungen werden anschließend vom eigentlichen Experiment korrigiert.

In **Abb. 24** sind verschiedene mögliche thermodynamische Reaktionsabläufe gezeigt. Alle haben gemeinsam, dass sie spontan ablaufen, da die freie Reaktionsenthalpie ΔG negativ ist. Hierbei zeigt **A** eine enthalpisch getriebene Reaktion, die im Wesentlichen durch Wasserstoffbrückenbindungen, Protonierungsreaktionen und Konformationsänderungen zustande kommt. **B** stellt ein entropisch getriebenes Reaktionsprofil dar, bedingt durch hydrophobe Wechselwirkungen, Freisetzung von Lösemittelmolekülen oder Ionen und ein eher starres Gerüst (gute Präorganisation). Das Reaktionsprofil von **C** zeigt eine leicht enthalpische und entropische Reaktion.

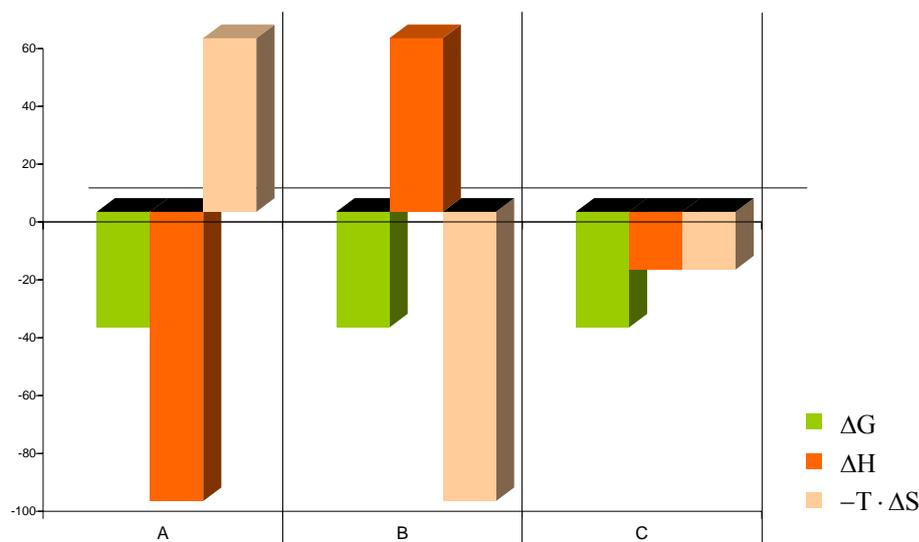


Abb. 24 Unterschiedliche energetische Reaktionsprofile: **A** zeigt ein enthalpisch, **B** ein entropisch und **C** ein leicht enthalpisch und leicht entropisch getriebenes Reaktionsprofil.

Der Vorteil dieser Messmethode liegt auch darin, dass sie automatisiert abläuft. Nachteilig erweist sich aber der hohe Substanzverbrauch (mmol-Bereich), und dass das System rausch-anfällig gegenüber Erschütterung, Luftblasen und Temperaturveränderungen ist. Weitere Probleme bereiten Lösemittelmischungen, Verdünnungsprozesse, in Moleküle eingeschlossenes Lösemittel und Zersetzungsprozesse, da sie alle eine Wärmetönung hervorrufen, die nichts mit der eigentlichen Komplexbildung zu tun haben.

Mit der isothermalen Titrationskalorimetrie können Bindungskonstanten im Bereich von $K_{\text{Ass}} = 10^2$ bis 10^8 M^{-1} bestimmt werden. Weiterhin kann man durch die Wahl der Mess-temperatur die Bindungskonstante derart beeinflussen, dass sie in einem für die ITC-Messung guten Messbereich liegt. So beschreibt *Schmidtchen* für einfache Rezeptor-Substrat-Systeme mit negativen Enthalpien folgende Temperaturabhängigkeit der supramolekularen Wechselwirkungen: Temperaturerhöhung um $50 \text{ }^\circ\text{C}$ bewirkt eine Verringerung der Bindungskonstante eines Rezeptor-Substrat-Systems um etwa den Faktor 13.^[2] Hierbei ist natürlich die Temperaturstabilität von Rezeptor und Substrat vorausgesetzt. Dadurch können sehr große Bindungskonstanten herabgesetzt werden. Die Erhöhung niedrigerer Bindungskonstanten durch Temperatursenkung ist meist nicht möglich, da wässrige Systeme gefrieren bzw. die Viskositäten von anderen Lösemitteln oder -gemischen stark abnehmen würde. Dies würde zu einem verstärkten Hintergrund-Rauschen führen und keine vernünftige Messung zulassen. Auch die Polarität des Lösemittels oder des Lösemittelgemisches beeinflusst die Bindungs-

konstante, da dadurch nichtkovalente Wechselwirkungen entweder an Bedeutung gewinnen oder verlieren.^[2]

Bei der Verwendung von Puffern ist zu berücksichtigen, dass verschiedene Puffer die Reaktionsenthalpie unterschiedlich beeinflussen. So fand man experimentell heraus, dass zum Beispiel ein Hydrogensulfit-Puffer eine negative Reaktionsenthalpie bewirkt, während ein Tris-Puffer eine stark positive Reaktionsenthalpie hervorruft.^[2, 85]

Einen weiteren Effekt auf die Wärmetönung zeigen auch Proteine mit Metallionen im aktiven Zentrum, die bei einer Komplexierung u. a. Metallionen freisetzen können oder durch andere anwesende Metallionen in der Komplexierung gestört werden. Abhilfe hierbei erhält man durch Verwendung von EDTA als Chelat-Komplexbildner für Metallionen. Die daraus resultierende Wärmetönung ist aber unbedingt durch eine Referenzmessung zu ermitteln und von den Messdaten zu subtrahieren.^[2]

Wahl der Messmethode

Die richtige Wahl der Messmethode zur Bestimmung von Bindungskonstanten ist nicht ganz trivial. Wenn möglich, ist unter den spektroskopischen Methoden die NMR-Spektroskopie zu bevorzugen, da zusätzlich strukturelle Informationen über die Komplexierung und die Art des Assoziats gewonnen werden können. Die optischen spektroskopischen Methoden zeigen in der Regel keinen Unterschied zwischen strukturell eindeutig definierter Komplexierung und unspezifischer Cluster-Bildung.^[75, 79] Jedoch kann die NMR-Spektroskopie nur für Bindungskonstanten im Bereich von $K_{\text{Ass}} = 10^2$ bis 10^4 M^{-1} eingesetzt werden. Weiterhin muss eine ausreichend hohe Löslichkeit der Substanzen gewährleistet sein. Eine Verwendung gepufferter Lösungen ist meist aufgrund der Überlagerung von Protonensignalen nicht möglich, weshalb der pH-Wert der Lösungen exakt eingestellt werden muss, um Protonierungsreaktionen zu vermeiden.

Optische spektroskopische Methoden können angewendet werden, wenn ein geeigneter Chromophor im Rezeptor bzw. Substrat vorhanden ist, indem die Komplexierung einer Änderung der Elektronendichte bewirkt. Dieser Chromophor muss photostabil gegenüber UV-Licht sein. Der wesentliche Vorteil dieser Methoden liegt darin, dass geringere Konzentrationen verwendet werden können. Dies bedeutet, dass man neben einem geringeren Substanzverbrauch auch meistens kein Problem mit der Löslichkeit hat. Weiterhin ist die Verwendung gepufferter Lösungen unproblematisch, solange der verwendete Puffer keine UV- bzw. Fluoreszenz-Aktivität im betrachteten Wellenlängenbereich zeigt. Dadurch werden

Protonierungsreaktionen im Vorfeld ausgeschlossen. Jedoch kann bei Zugabe weiterer Ionen zur Lösung der Salzeffekt auftreten, der zu einer Verringerung der Komplexierungskonstanten führt (**2.2 Grundlagen der Komplex-Bildung**). Weiterhin wirkt sich der Zeit- und Arbeitsaufwand bei der Durchführung optischer Titrationsexperimente vorteilhaft gegenüber der NMR-Methode aus. Er ist um den Faktor 2 bis 5 geringer, bedingt durch die Art der Spektrenaufnahme und -auswertung.

Die isothermale Titrationskalorimetrie besitzt den Vorteil, dass man ein komplettes thermodynamisches Profil einer Komplexierung erhält und das Titrationsexperiment automatisiert abläuft. Ähnlich der NMR-Methode sind aber auch hier höhere Konzentrationen nötig, die zu Löslichkeitsproblemen führen können, einhergehend mit einem höheren Substanzverbrauch.

Die Ergebnisse der verschiedenen Messmethoden sind in der Regel nicht ohne weiteres vergleichbar, da die Voraussetzungen bzw. die Messbedingungen unterschiedlich sind. So muss eventuell bei der einen Methode das Lösemittelgemisch verändert werden, während bei einer anderen Messmethode der Konzentrationsbereich verändert werden muss. Dadurch sind die absoluten Bindungskonstanten verschieden, während die Trends beim Vergleich von Bindungskonstanten innerhalb einer Messmethode gleich sein sollten.

Somit muss man die Vor- und Nachteile der jeweiligen Messmethode bei jeder Bestimmung der Bindungskonstante für jedes Rezeptor-Substrat-System neu abwägen. Um ein Gesamtbild eines Komplexierungsvorgangs zu erhalten, ist es sehr ratsam, mehrerer Messmethoden anzuwenden. Denn erst durch das Zusammenführen der unterschiedlichen Informationen wird auch die Bedeutung einzelner Wechselwirkungen ersichtlich.

2.4 Bestimmung der Bindungsstöchiometrie

Während die Komplexstöchiometrie bei ITC-Messungen direkt aus dem Titrationsexperiment erhalten wird, muss die Zusammensetzung eines Komplexes bei spektroskopischen Messmethoden durch weitere Experimente bestimmt werden. Diese kann u. a. durch komplett andere Messmethoden, wie der Massenspektrometrie oder der Röntgenstrukturanalyse, ermittelt werden. Jedoch spiegeln diese beiden Möglichkeiten nicht notwendigerweise die Situation in Lösung wider, da die eine Messung in der Gasphase und die andere im Festkörper durchgeführt werden. Dadurch erlangen die verschiedenen Einflüsse auf die Komplexbildung, vor allem die nichtkovalenten Wechselwirkungen, eine andere Gewichtung. Eine Möglichkeit der Bestimmung der Bindungsstöchiometrie in Lösung unter Verwendung der spektroskopischen Messmethoden bietet die „Methode der kontinuierlichen Veränderung“,^[86] die auch als Job-Plot bezeichnet wird. Daten hierfür können aus zusätzlichen spektroskopischen Experimenten, z. B. aus UV-, Fluoreszenz- oder NMR-Untersuchungen, erhalten werden. Für solche Messungen werden mehrere zu untersuchende Lösungen hergestellt, die unterschiedliche Ausgangskonzentrationsverhältnisse von Substrat und Rezeptor beinhalten, jedoch von der Gesamtkonzentration konstant sind. So variiert in den jeweiligen Lösungen nur der Molenbruch. Die chemische Überlegung dabei ist, dass die Ausbeute des sich bildenden Komplexes dann maximal sein sollte, wenn Rezeptor und Substrat in richtigen stöchiometrischen Mengen vorliegen. Beim Job-Plot trägt man in einem Graphen die Observable der Komplexbildung, die proportional zur Konzentration des Komplexes ist, gegen den Molenbruch auf, und erhält so eine Glockenkurve, wobei das Maximum die Zusammensetzung des Komplexes darstellt. Ergibt das Maximum einen zugehörigen Molenbruch von 0.5, so handelt es sich um eine 1:1-Komplexbildung (**Abb. 25**), dementsprechend ergibt ein Molenbruch von 0.33 einen 1:2-Komplex und 0.67 einen 2:1-Komplex. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass man vorher keine Kenntnisse über die Stöchiometrie benötigt.

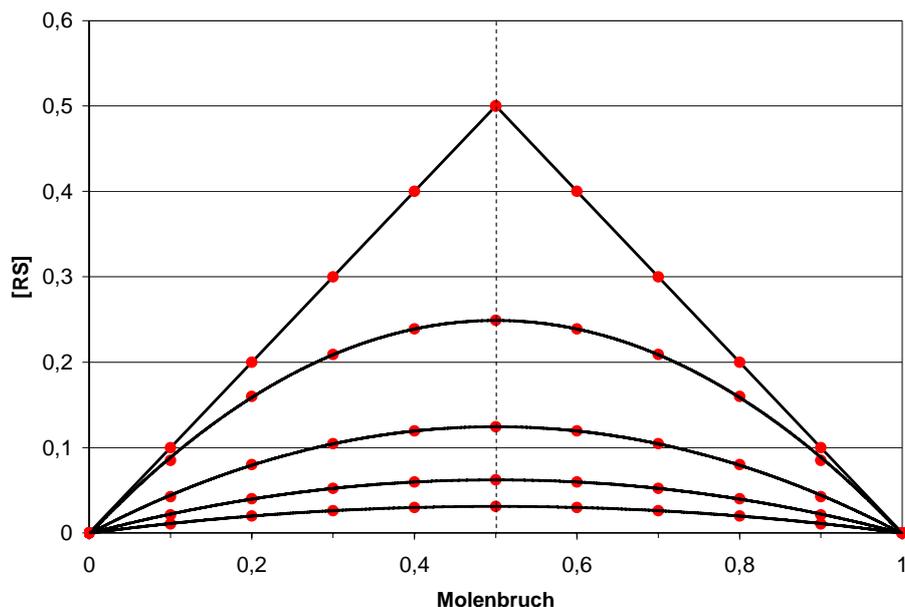


Abb. 25 Job-Plot eines 1:1-Komplexes: Auftragung des Molenbruchs gegen die Konzentration. Die roten Punkte sind die Messwerte. Die obere Kurve zeigt einen Job-Plot für eine sehr starke Komplexierung. Bei abnehmender Assoziationsstärke wird die Kurve des Job-Plots immer flacher, bis kaum noch eine vernünftige Aussage über die Komplexstöchiometrie gemacht werden kann.

Für die Auswertung des Job-Plots einer sehr starken Komplexierung erhält man zwei sich bei der exakten Komplexstöchiometrie schneidende Geraden. Wird die Assoziationsstärke schwächer, erhält man eine Glockenkurve, die ihr Maximum bei der richtigen Komplexzusammensetzung besitzt. Ist die Assoziationskonstante jedoch sehr niedrig, ist kaum noch eine vernünftige Aussage über die Komplexstöchiometrie möglich, da das Maximum nicht eindeutig bestimmt werden kann, da die Messwerte dann meist innerhalb der Fehlergrenze der Messungen liegen.

Bei UV-Messungen beobachtet man dazu die sich ändernde Absorption und bei Fluoreszenz-Messungen die sich ändernde Emissionsintensität. Auf der y-Achse trägt man statt der Komplexkonzentration die dieser Größe proportionalen Observablen von (2.35) bzw. (2.36) auf.

$$A_{\text{beo}} = (A_{\text{R}} + A_{\text{S}}) \quad (2.35)$$

$$I_{\text{beo}} = (I_{\text{R}} + I_{\text{S}}) \quad (2.36)$$

Bei NMR-Messungen beobachtet man die Änderung der chemischen Verschiebung des Komplexes (CIS). Als proportionale Größe zur Komplexkonzentration trägt man hier die

Messgröße (2.37) auf. Hierbei ist der Molenbruch x als Faktor wichtig, da er den Beitrag der chemischen Verschiebung des Rezeptors im gemittelten beobachteten NMR-Signal widerspiegelt.

$$(\delta_{\text{beo}} - \delta_{\text{R}}) \cdot x \quad (2.37)$$

Mathematisch leitet sich der Job-Plot wie folgt ab: Der Molenbruch x gibt den Stoffmengenanteil des Rezeptors, bezogen auf die Gesamtkonzentration beider Ausgangsstoffe. Er wird auf der x-Achse aufgetragen und setzt sich wie folgt zusammen:

$$x = \frac{[\text{R}_0]}{[\text{R}_0] + [\text{S}_0]} \quad (2.38)$$

Zur rechnerischen Vereinfachung führt man folgende Variablen α und y ein, um die Startkonzentrationen von Rezeptor und Substrat sowie die Komplexkonzentration dadurch auszudrücken:

$$\alpha = [\text{R}_0] + [\text{S}_0] \quad (2.39)$$

$$y = [\text{R}_r \text{S}_s] \quad (2.40)$$

$$[\text{R}_0] = \alpha x \quad (2.41)$$

$$[\text{S}_0] = \alpha - \alpha x \quad (2.42)$$

Einsetzen ins Massenwirkungsgesetz liefert:

$$K = \frac{y}{(\alpha x - ry)^r \cdot (\alpha - sy - \alpha x)^s} \quad (2.43)$$

$$y = K \cdot [(\alpha x - ry)^r \cdot (\alpha - sy - \alpha x)^s] \quad (2.44)$$

Um das Maximum dieser Kurvenfunktion zu erhalten, muss die erste Ableitung null werden.

$$\frac{dy}{dx} = 0 \quad (2.45)$$

Ableitung nach x liefert:

$$\frac{dy}{dx} = K \cdot [(\alpha x - ry)^r \cdot \{(\alpha - sy - \alpha x)^s\}' + \{(\alpha x - ry)^r\}' \cdot (\alpha - sy - \alpha x)^s] \quad (2.46)$$

$$\frac{dy}{dx} = K \cdot [(\alpha x - ry)^r \cdot s \cdot (\alpha - sy - \alpha x)^{s-1} \cdot (-s \frac{dy}{dx} - \alpha) + r(\alpha x - ry)^{r-1} \cdot (\alpha - r \frac{dy}{dx}) \cdot (\alpha - sy - \alpha x)^s]$$

$$0 = K \cdot [(\alpha x - ry)^r \cdot s \cdot (\alpha - sy - \alpha x)^{s-1} \cdot (-\alpha) + r(\alpha x - ry)^{r-1} \cdot (\alpha) \cdot (\alpha - sy - \alpha x)^s] \quad (2.47)$$

Division durch

$$K \cdot (\alpha - sy - \alpha x)^{s-1} \cdot \alpha \cdot (\alpha x - ry)^{r-1} \quad (2.48)$$

liefert:

$$0 = -s \cdot (\alpha x - ry) + r(\alpha - sy - \alpha x) \quad (2.49)$$

$$0 = -s\alpha x + rsy + r\alpha - rsy - r\alpha x$$

$$0 = r\alpha - s\alpha x - r\alpha x$$

Division durch α liefert:

$$0 = r - sx - rx \quad (2.50)$$

$$x = \frac{r}{s+r} \quad (2.51)$$

Gleichung (2.51) zeigt, wann die Ausbeute an Komplex maximal wird. Somit erhält man durch den Job-Plot die richtige Stöchiometrie und die stabilste Zusammensetzung des Komplexes. Der Job-Plot ist für die spektroskopischen Methoden zum Herausfinden der Bindungsstöchiometrie unbedingt notwendig, da die mathematische Berechnung der Bindungskonstanten davon abhängig ist. Vor allem ist es eine Methode, die es erlaubt die Stöchiometrie in Lösung herauszufinden.

3 KONZEPTION UND ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit ist es, verbesserte Rezeptoren auf der Basis der Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren nach *Schmuck* für die Erkennung von Oxo-Anionen zu entwickeln, zu synthetisieren und zu evaluieren. Hierbei ist von großer Bedeutung, dass die Komplexierung hinsichtlich biologischer Relevanz in wässrigem Medium stattfindet. Deshalb müssen die künstlichen Rezeptoren in Wasser oder zumindest in wässrigen Systemen (Lösemittelgemische) löslich sein und gleichzeitig gute Bindungseigenschaften mit Oxo-Anionen, und vor allem Carboxylaten, zeigen.

Zur Untersuchung der Komplexierungseigenschaften der Rezeptoren ist das zusätzliche Einführen eines Labels für UV- oder Fluoreszenz-Bindungsstudien nicht notwendig. Alle Rezeptoren besitzen ein Pyrrol-Grundgerüst, das ein guter Chromophor ist und Licht im UV-Bereich absorbiert (Maximum bei $\lambda = 300$ nm). Die durch die Komplexierung hervorgerufene elektronische Veränderung im Pyrrolring beruht dabei im Wesentlichen auf zwei Bindungsarten: Einerseits kann der Heteroaromat über sein Pyrrol-NH eine Wasserstoffbrückenbindung zum Oxo-Anion aufbauen, und andererseits beeinflusst die ionische Wechselwirkung des oxo-anionischen Substrates mit dem Acylguanidinio-Kation als Nachbargruppe die Elektronendichte des Pyrrol-basierten Rezeptors. Damit besitzen die Rezeptoren bereits ein intrinsisches Label (UV-Sonde).

In dieser Arbeit wurden drei Projekte in Angriff genommen: Zum einen ist die Verbesserung der Synthese der Pyrrol-Grundbausteine und zwei weitere Projekte zur Rezeptor-Optimierung der Guanidiniocarbonylpyrrole bei der Assoziation von Oxo-Anionen, sowohl hinsichtlich der Bindungsstärke als auch der Substratspezifität.

3.1 Guanidinocarbonylpyrrol-Grundbausteine: Syntheseoptimierung

Die Syntheseweg der Boc-geschützten Grundbausteine, des Guanidinocarbonylpyrrol-Carbonsäuremonobenzylesters **19** und der Guanidinocarbonylpyrrol-Carbonsäure **20**, ist schon länger in unserem Arbeitskreis bekannt. Nach ihr wurden bereits erfolgreich Rezeptoren mit guten Komplexierungseigenschaften synthetisiert.^[73, 87]

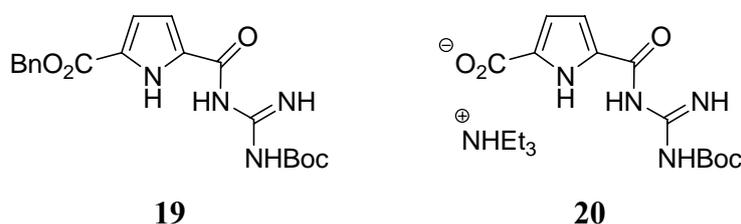


Abb. 26 Die Grundbausteine *N*-Boc-Guanidinocarbonylpyrrol-Carbonsäuremonobenzylester **19** und *N*-Boc-Guanidinocarbonylpyrrol-Carbonsäure **20** als Triethylammoniumsalz.

In diesem Projekt soll nicht der Syntheseweg verändert, sondern vielmehr einige Reaktionsschritte überarbeitet werden. Dabei liegt vor allem die Aufarbeitung von Zwischenprodukten im Focus der Optimierung. Zusätzlich sollen einzelne alte Syntheseschritte, die sehr umständlich sind, zukünftig einfacher und damit effizienter durchzuführen sein. Dadurch wird die Herstellung dieser in unserem Arbeitskreis sehr wichtigen Bausteine **19** und **20** in größeren Mengen erleichtert.

3.2 *N'*-alkylierte Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren

Eine Möglichkeit, die Selektivität und Stabilität von Komplexen zu erhöhen, ist die Verwendung von Tweezer-Rezeptoren. Diese besondere Klasse von Rezeptoren zeichnet sich häufig neben ihrer strukturellen Besonderheit durch eine entropisch günstige Komplexierung von Rezeptor und Substrat aus, ähnlich dem Chelat-Effekt (siehe **2.2 Grundlagen der Komplexbildung**). Ein Tweezer-Rezeptor ist so aufgebaut, dass er eine Kopfgruppe besitzt, die ein terminales Ende eines Substrates zu komplexieren vermag und somit wesentlichen Anteil zur Stärke der Assoziation beiträgt. An dieser Kopfgruppe sind in der Regel zwei Seitenarme gebunden, deren Bedeutung einerseits in der Erhöhung der Selektivität und andererseits im Aufbau einer hydrophilen/hydrophoben bzw. polaren/unpolaren Mikroumgebung liegt. Bei einer Komplexierung in wässrigem Medium wird diese Strategie oft dazu verwendet, eine hydrophobe Kavität zu schaffen, ähnlich der Funktionsweise von Enzymen. In der Natur stellen spezifische, präorganisierte Bindungstaschen sicher, dass einerseits nur ausgewählte Substrate binden können und andererseits bestimmte Strukturelemente für die nötige Mikroumgebung (polar, unpolar, ionisch, aromatisch oder hydrophob) vorhanden sind. Damit sorgt das Enzym auch dafür, dass in den Bindungstaschen keine oder nur geringe Konkurrenz um die Bindungsstellen zwischen Substrat und Lösemittel herrscht. Dadurch gewinnen Wechselwirkungen (z. B. Wasserstoffbrückenbindungen) zwischen Enzym und Substrat an Stärke, da in der Regel ungünstige enthalpische Effekte vermieden werden. Bei kleineren Molekülen kann man dies dadurch bewerkstelligen, dass man um die eigentliche Bindungsstelle herum funktionelle Gruppen bzw. Seitenarme einführt, die die gewünschten Eigenschaften besitzen. Bringt man zwei Gruppen an beiden Seiten des Bindungsmotivs an, so erhält man einen Tweezer-Rezeptor, der pinzettenartig ein Substrat binden und gleichzeitig die Bindungsstelle und das Substrat von den umgebenen Lösemittelmolekülen abschirmen kann. Sind aromatische Gruppen in den Rezeptorarmen vorhanden, so können diese, gerade in wässrigem Medium, eine hydrophobe Kavität ausbilden und mit aromatischen Substraten zusätzliche, attraktive π -Wechselwirkungen eingehen.

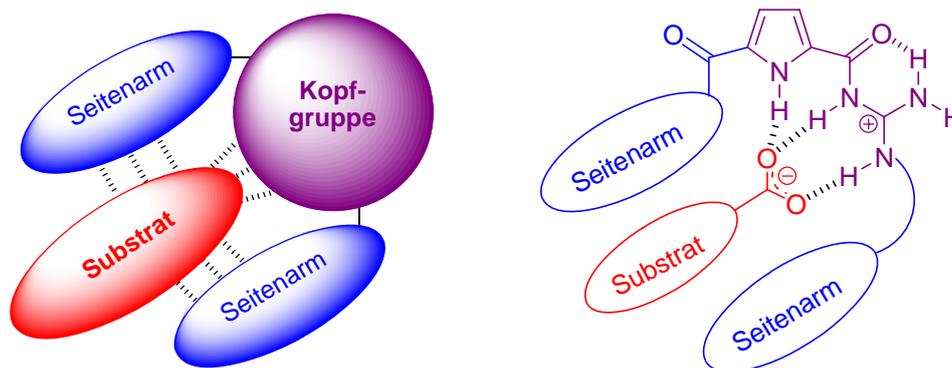


Abb. 27 Schema eines Tweezer-Rezeptors und Übertragung auf die Komplexbildung eines Carboxylates durch einen Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptor: Die Kopfgruppe entspricht der CBS, während die Seitenarme aromatischer oder peptidischer Natur sind.

In dieser Arbeit sollen Tweezer-Rezeptoren mit unterschiedlichen Seitenarmen synthetisiert werden. Am kationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Motiv als Kopfgruppe soll eine flexiblere Seitenarm mittels N^2 -Alkylierung an der Guanidinio-Einheit eingeführt werden. Der zweite Seitenarm in 5-Position des Pyrrols soll entweder durch einen aromatischen Benzylester (Rezeptortyp **21**) oder durch eine Aminosäure (Rezeptortyp **22**) gebildet werden. In **Abb. 28** sind die generellen Strukturen dieser Tweezer-Rezeptoren dargestellt.

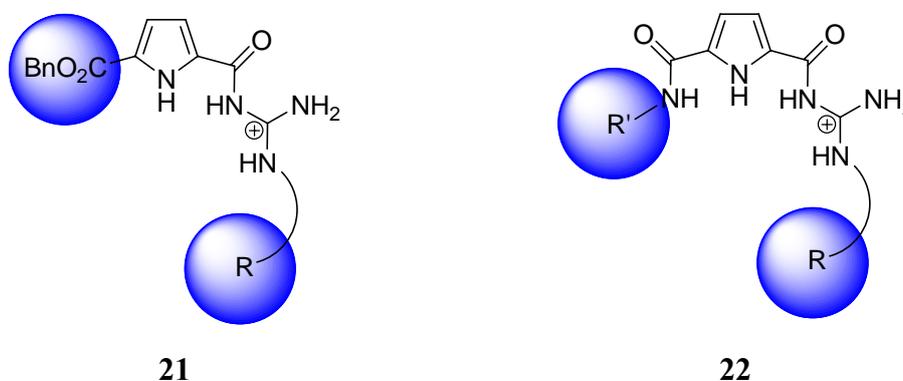


Abb. 28 Generelle Struktur der Tweezer-Rezeptoren: Links: Rezeptortyp **21** mit einer Aminosäure (R) an der Guanidinio-Einheit und einem Benzylester am Pyrrol. Rechts: Rezeptortyp **22** ebenfalls mit einer Aminosäure (R) an der Guanidinio-Einheit, sowie einer Aminosäure (R') am Pyrrol.

Bei der Synthese soll von dem Grundbaustein **19** ausgegangen werden. Dieser soll zunächst an der Guanidino-Einheit durch Triflatisierung aktiviert (**24**) und dort anschließend in einer Substitutionsreaktion zur Verbindung **23** N^2 -alkyliert werden. Durch Entfernung der Boc-Schutzgruppe sollten die Benzyl-Tweezer-Rezeptoren **21** (Retrosynthese **Abb. 29**) erhalten werden.

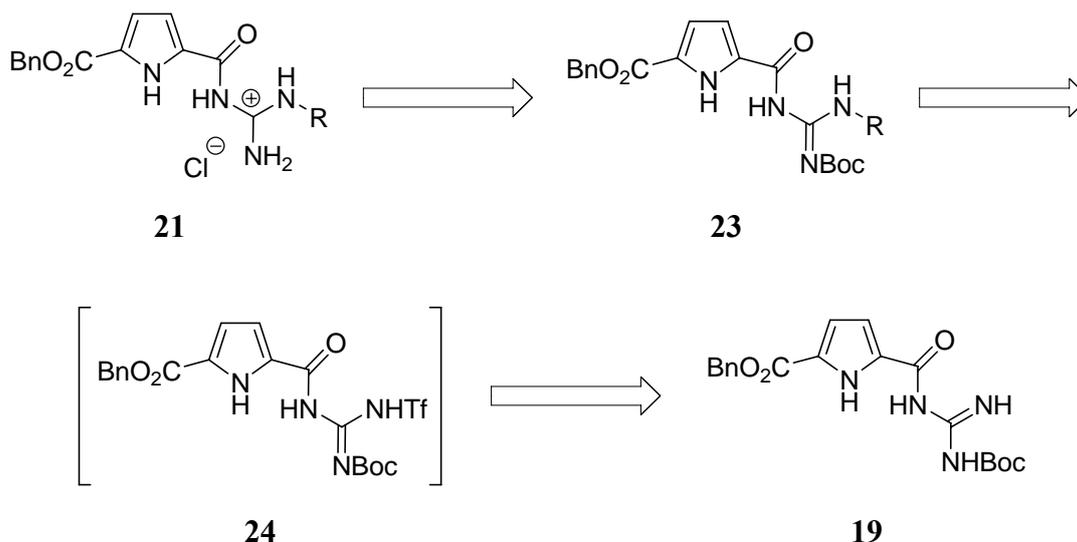


Abb. 29 Retrosynthese der Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren **21** mit R als Aminosäurederivate.

Ohne die Boc-Entschützung durchzuführen, soll der Benzylester der *N'*-alkylierten Verbindungen **23** zur Carbonsäure **26** hydriert und anschließend mittels Kupplungsreagenz (z. B. PyBOP) mit einem Aminosäureamid zur Verbindung **25** verknüpft werden. Eine saure Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am Guanidin soll schließlich die Tweezer-Rezeptoren **22** liefern.

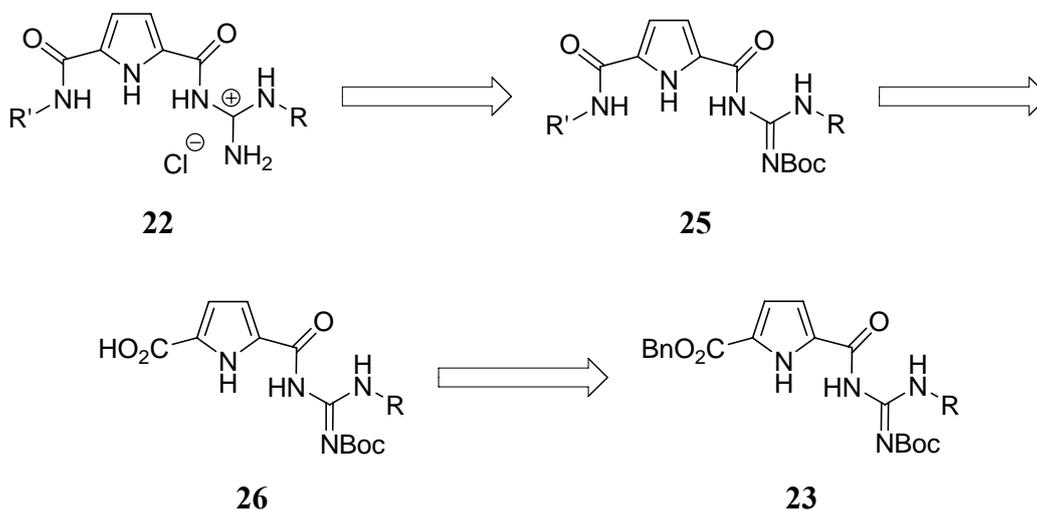


Abb. 30 Retrosynthese der Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren **22** mit R und R' als Aminosäurederivate.

Als funktionelle Gruppen im R'-Seitenarm der Tweezer-Rezeptoren soll neben der aromatischen Aminosäure *L*-Phenylalanin auch *L*-Valin eingebaut werden. Am *N'*-Seitenarm der

Guanidinio-Funktion, also am R-Seitenarm, sollen neben einem einfachen Amin auch α - und β -Aminosäuren und ein Peptid verwendet werden (siehe Bausteine in **Abb. 45**).

Auf diese Weise sollen die Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren des Typs **21** und des Typs **22** synthetisiert werden. Die Reinigung dieser Rezeptoren wird säulenchromatographisch an RP-18-Material durchgeführt und deren Reinheit mittels HPLC überprüft werden.

Aminofunktionalisierte Seitengruppen von künstlichen Aminosäuren für R sollen hierbei mit verschiedenen aromatischen Schutzgruppen versehen werden, die in ihrer Größe unterschiedlich sind, wie beispielsweise die Cbz- und die Dansyl-Gruppe (Dns). Dem Tweezer-Rezeptor sollte es dann möglich sein, eine hydrophobe Kavität zur besseren Komplexierung von aromatischen Carboxylaten aufzubauen. Dadurch wird eine gute Komplexierung vor allem für aromatische Aminosäuren wie *N*-Ac-*L*-Phenylalanin erwartet. Aber auch andere Aminosäure-Carboxylate sowie größere aromatische natürliche Substanzen, wie Folsäure (Vitamin B₉), Hippursäure oder Zimtsäure, sollen in Bindungsstudien untersucht werden. Als Messmethode für diese Studien soll hauptsächlich die UV-Spektroskopie in wässriger, gepufferter Lösung angewendet werden. Aber auch Fluoreszenz-, NMR-, und ITC-Experimente sollen neben Kraftfeldrechnungen zur Visualisierung von Komplexgeometrien angewendet werden.

3.3 Biskationische Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Tetrapeptide mit einem freien Carboxylat-Terminus von multi-kationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren effektiv in Wasser komplexiert werden.^[36] Die Bindungsstabilität beruht dabei im Wesentlichen auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Weitere zusätzliche nichtkovalente Wechselwirkungen in Seitenketten erhöhen die Selektivität bezüglich der Komplexierung. Durch den Aufbau einer kombinatorischen Bibliothek mit tripeptidischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren und anschließendem Screening konnte der stark komplexierende Rezeptor **11** für das Tetrapeptid Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH (**12**) gefunden werden (**Abb. 9**),^[36] der die gleiche terminale Peptidsequenz als Angriffspunkt hat wie das Antibiotikum Vancomycin (siehe **2.1 Oxo-Anionen-Erkennung**).

Aus dem Screening der kombinatorischen Bibliothek wurde weiterhin ersichtlich, dass eine zweite positive Ladung im Rezeptor neben dem Guanidiniocarbonylpyrrol-Motiv die Bindung noch verstärken kann, indem sie ebenfalls mit dem Carboxylat des Tetrapeptids wechselwirkt. Immer, wenn in einem Rezeptor Lysin (K) mit seiner Ammonium-Einheit in der Seitenkette direkt neben dem Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv (CBS) vorhanden war, stieg die Komplexstabilität signifikant im Vergleich zu nicht-kationischen Aminosäuren an dieser Stelle im Rezeptor (**Abb. 31**).^[36]



Rezeptor	K_{Ass} in M^{-1}
CBS-KKF (11)	17100
CBS-KKL	15400
CBS-KKE	15300
CBS-KSK	13200
CBS-KFK	12900
CBS-LYK	10000
CBS-FKK	6200
CBS-FEK	1600
CBS-VYV	300
CBS-VEF	200

Abb. 31 Links: Festphasenscreening der Rezeptorbibliothek hinsichtlich des Tetrapeptids Ac-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala-OH (**12**).^[36] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission. Rechts: Bindungskonstanten dieses Screenings für verschiedene Rezeptoren (CBS = Carboxylat-Bindungsstelle, K = Lysin, F = Phenylalanin, L = Leucin, E = Glutaminsäure, S = Serin, Y = Tyrosin, V = Valin).^[36]

Um dieses Verhalten näher zu untersuchen, soll eine Reihe von Biskationen des Typs **27** synthetisiert werden, bei denen zusätzlich zum Guanidiniocarbonylpyrrol-Kation eine zweite positive Ladung in den Rezeptor eingeführt wird. Dabei soll ein einfaches Ammonium-Kation über flexible Linker verschiedener Länge an den Guanidiniocarbonylpyrrol-Baustein gebunden werden. Die zusätzliche positive Ladung soll bei dieser biskationischen Rezeptorgruppe die Assoziation verstärken, indem das zu bindende Carboxylat mit einem zweiten Kation wechselwirkt (**Abb. 32**). Durch die Synthese und anschließende Ermittlung der Bindungseigenschaften soll gezeigt werden, welche Spacerlänge für welches Substrat zu einer optimalen Komplexierung führt.

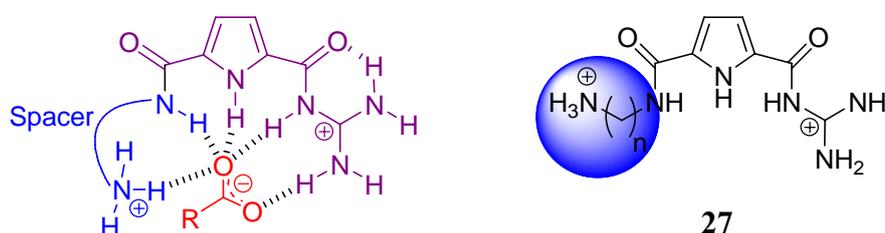


Abb. 32 Links: Schematische Komplexierung eines Carboxylates (rot) durch einen biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor mit einer zusätzlichen terminalen Ammoniumgruppe an einem flexiblen Linker (blau). Die CBS ist violett dargestellt und die gestrichelten Linien sind mögliche Wasserstoffbrückenbindungen. Rechts: Generelle Struktur der biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren.

Synthetisch soll wieder von dem Grundbaustein **19** ausgegangen werden, dessen Benzylester zur Carbonsäure hydriert wird. Anschließend sollen verschiedene mono-Boc-geschützte Diamine mit Hilfe von Kupplungsreagenzien peptidisch zu den geschützten Verbindungen **28** verknüpft werden. Die anschließende saure Abspaltung der Boc-Schutzgruppen soll die biskationischen Rezeptoren **27** liefern (Retrosynthese **Abb. 33**).

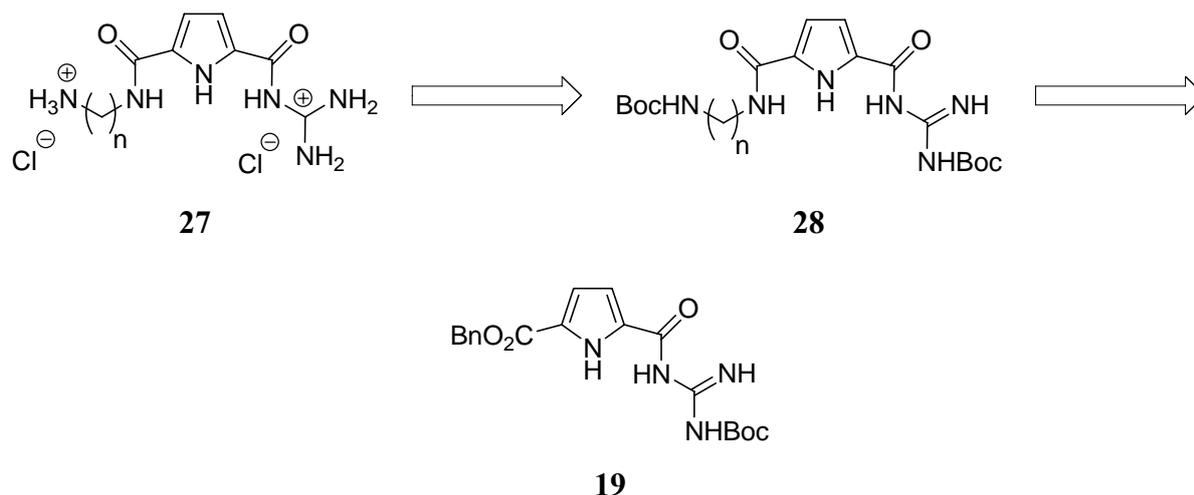


Abb. 33 Retrosynthese der biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren.

Die Reinigung der biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren **27** soll ebenfalls säulenchromatographisch an RP-18-Material durchgeführt werden und deren Reinheit mittels HPLC überprüft werden.

Neben der Komplexstabilität soll hier auch die Selektivität in Bindungsstudien untersucht werden, denn ein guter Rezeptor zeichnet sich sowohl durch hohe Assoziationskonstanten als auch Substratspezifität aus. Als Substrate für Bindungsstudien sollen *N*-acetylierte Aminosäurecarboxylate, wie *Ac-L*-Alanin, *Ac-L*-Phenylalanin, *Ac-L*-Valin, *Ac-L*-Glutamat und *Ac-L*-Aspartat, sowie Acetat und Natriumsulfat verwendet werden. Die Bindungseigenschaften sollen dabei hauptsächlich durch UV-Titrationsexperimente in wässriger Lösung ermittelt werden. Zusätzlich sollen Fluoreszenz-, NMR-, und ITC-Experimente weitere Daten über die Komplexierung liefern. Schließlich sollen Kraftfeldrechnungen für Komplexgeometrien die Messdaten untermauern und die Komplexierung visualisieren.

4 DURCHFÜHRUNG UND DISKUSSION

Im ersten Abschnitt wird die Darstellung des Grundbausteins des Bindungsmotivs **19** bzw. **20** von *Schmuck* beschrieben, der Ausgangspunkt für die Synthese der künstlichen Rezeptoren zur Oxo-Anionen-Erkennung ist.

Der zweite Abschnitt beinhaltet die Synthese von Tweezer-Rezeptoren. Hierzu wurden Guanidiniocarbonylpyrrole in *N'*-Position alkyliert. Dadurch erhielten die Rezeptoren neben dem Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv als Kopfgruppe zwei Seitenarme.

Im dritten Abschnitt wird die Synthese verschiedener biskationischer Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren vorgestellt. Dabei wurden primäre Ammonium-Kationen über flexible, in der Länge variierende Linker mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol-Motiv verbunden.

4.1 Guanidinocarbonylpyrrol-Grundbausteine: Optimierung der Synthese

Die Synthese der Guanidinocarbonylpyrrole **19** bzw. **20** ist schon seit längerem in unserem Arbeitskreis bekannt und wird auch zur Darstellung von Peptid-Rezeptoren, wie beispielsweise dem oben erwähnten Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **11** zur Komplexierung einer tetrapeptidischen Glykopeptidensequenz, verwendet.^[34, 87] Im Zuge dieser Arbeit wurde die Synthese an einigen Stellen optimiert und effizienter gestaltet. Einige Aufarbeitungsschritte waren sehr umständlich wie beispielsweise die Isolierung des Derivates **20** mittels Heißfiltration. Durch die Überarbeitung konnten Ausbeuten um bis zu 15 % gesteigert werden. Um diese einzelnen Schritte nicht zusammenhangslos wiederzugeben, ist hier nun die vollständige, überarbeitete und verbesserte Synthese, ausgehend von einfachen kommerziell erhältlichen Edukten, beschrieben. Durch Entschützen des Benzylesters **19** erhält man den Baustein **20**, der sich über seine Carbonsäurefunktion zur Knüpfung von Peptidbindungen eignet. Dadurch kann die CBS nach saurer Boc-Entschützung als künstliche Aminosäure verwendet und als Baustein zur Anionen-Komplexierung eingesetzt werden.

Teile dieser Synthese sind bereits in früheren Doktorarbeiten beschrieben.^[73, 87] Die überarbeitete und verbesserte Synthese, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird, ist als Publikation mit dem Titel „A Facile and Efficient Multi-Gram Synthesis of *N*-Protected 5-(Guanidinocarbonyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic Acids“ erschienen.^[88]

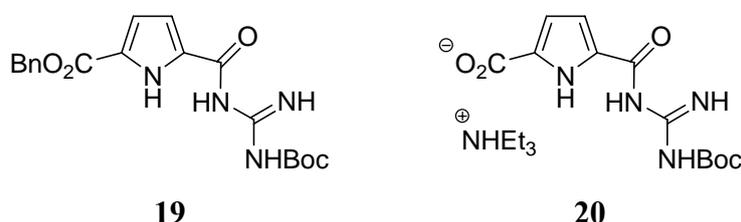


Abb. 34 Die Grundbausteine *N*-Boc-5-(Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäuremonobenzylester (**19**) und *N*-Boc-5-(Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäure (**20**) als Triethylammoniumsalz.

Zu Beginn der Synthese von Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren in unserem Arbeitskreis wurde die Guanidinio-Einheit noch durch Refluxieren eines Pyrrolcarbonsäuremethylesters

mit Guanidiniumchlorid in Natriummethanolat durchgeführt.^[33] Dies ist eine sehr harsche Methode. Will man das Einführen einer Guanidinio-Einheit in einer Reaktionssequenz verwenden, sind mildere Bedingungen nötig, um die Edukte der Guanidinylierung nicht zu zerstören. Das Problem wurde dadurch gelöst, dass das Guanidin als mono-Boc geschützte Einheit (Boc-Guanidin) verwendet wurde, die mittels klassischer Peptidkupplung mit einer Pyrrolcarbonsäure umgesetzt werden konnte. Ein weiterer umständlicher Schritt war die Isolierung der Guanidinocarbonylpyrrolcarbonsäure **20** nach der Benzylester-Entschützung, da das Produkt mit heißem DMF von der Aktivkohle abfiltriert werden musste. Im Zuge dieser Arbeit durchgeführte Löslichkeitsversuche in verschiedenen Lösemitteln zeigten, dass sich die Carbonsäure **20** in Methanol unter Zusatz von Triethylamin (2 Vol %) als Ammoniumsalz gut löst, und so die Aufarbeitung wesentlich verbessert, vereinfacht und die Ausbeute um knapp 10 % erhöht werden konnte (**Abb. 37**).

Die Synthese dieses Grundbausteins **19** beginnt vom kommerziell erhältlichen Pyrrol (**29**). Dieses wird frisch destilliert und mittels Trichloracetylchlorid in Diethylether in der 2-Position acetyliert. Zur Aufarbeitung wäscht man die organische Phase mit Wasser, wobei aufgrund der tief violett-schwarzen Färbung die Phasengrenze schwer erkennbar ist. Nur durch die Verwendung größerer Lösemittelmengen wird die Phasengrenze sichtbar. Der farblose Feststoff Trichloracetylpyrrol (**30**) wird in einer Ausbeute von 89 % erhalten. Da er von Luftfeuchtigkeit leicht zur Pyrrolcarbonsäure hydrolysiert, ändert sich seine Farbe schnell in metallisch grau.

Anschließend wird eine Haloform-Reaktion mit Benzylalkohol in Chloroform durchgeführt. Das Natriumbenzylat wird dabei aus Natrium-Stücken in frisch destilliertem Benzylalkohol hergestellt. Zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde mittels Heizpistole unter Rückfluss erhitzt, bis eine klare gelbe Lösung entstand. Bei dieser Reaktion wird das Natrium als Base katalytisch (20 Mol %) eingesetzt, denn nach Reaktion des Benzylats mit dem Trichloracetylpyrrol (**30**) wird das ebenfalls basische Trichlormethan-Anion freigesetzt. Dieses wird vom Benzylalkohol sofort protoniert, sodass als Nukleophil weiteres Benzylalkoholat entsteht. Während der Aufarbeitung ist darauf zu achten, dass der entstehende Benzylester **31** nicht durch zu basische Bedingungen hydrolysiert wird und man die entsprechende Pyrrolcarbonsäure erhält. Denn die Benzylester-Entschützung kann in einem Zweiphasengemisch schon mit wässriger Kaliumcarbonatlösung als Base durchgeführt werden.^[89] Deshalb wird nach Ende der Reaktion eine äquimolare Salzsäurelösung, bezogen auf die Menge Natrium, hinzugegeben, um die Base zu neutralisieren. Klassischerweise

würde man an dieser Stelle nun eine Phasentrennung durchführen und anschließend eine Extraktion durchführen. Da dies aber aufgrund der tiefschwarzen Färbung der Reaktionslösung nur schlecht möglich ist, wurde die Aufarbeitung dahingehend geändert, dass zuerst das organische Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und die übrige Reaktionsmischung, die u. a. noch Benzylalkohol enthält, nach weiterer Wasserzugabe lyophilisiert wird. Das erhaltene Rohprodukt wird dann säulenchromatographisch an Kieselgel (Hexan/Essigester/ Dichlormethan 70/15/15) gereinigt. Auf diese Weise erhält man nun den Benzylester **31** in einer Ausbeute von 95 %.

Diese Verbindung wird nun mittels Vilsmeier-Haack-Reaktion formyliert. Dazu wurde das Vilsmeier-Reagenz aus Phosphorylchlorid und Dimethylformamid hergestellt und bei -15 °C zum Pyrrolsäurebenzylester **31** zugetropft. Man erhält die zwei in 4- und in 5-Position substituierten Regioisomere, die säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Essigester/Dichlormethan 70/15/15) getrennt werden. Dabei beträgt die Ausbeute des gewünschten 2,5-substituierten Produktes **32** 62 % und die des 2,4-substituierten Nebenproduktes **33** 33 %.

Der Aldehyd **32** wird dann mit Kaliumpermanganat in einer Aceton-Wassermischung zur Säure oxidiert. Nach der Reaktion wird der entstandene Braunstein über Celite abfiltriert und anschließend durch Ansäuern des Filtrats die Carbonsäure **34** ausgefällt. Nach Filtration und Trocknung erhält man den Pyrroldicarbonsäuremonobenzylester **34** in einer Ausbeute von 67 % als farblosen Feststoff.

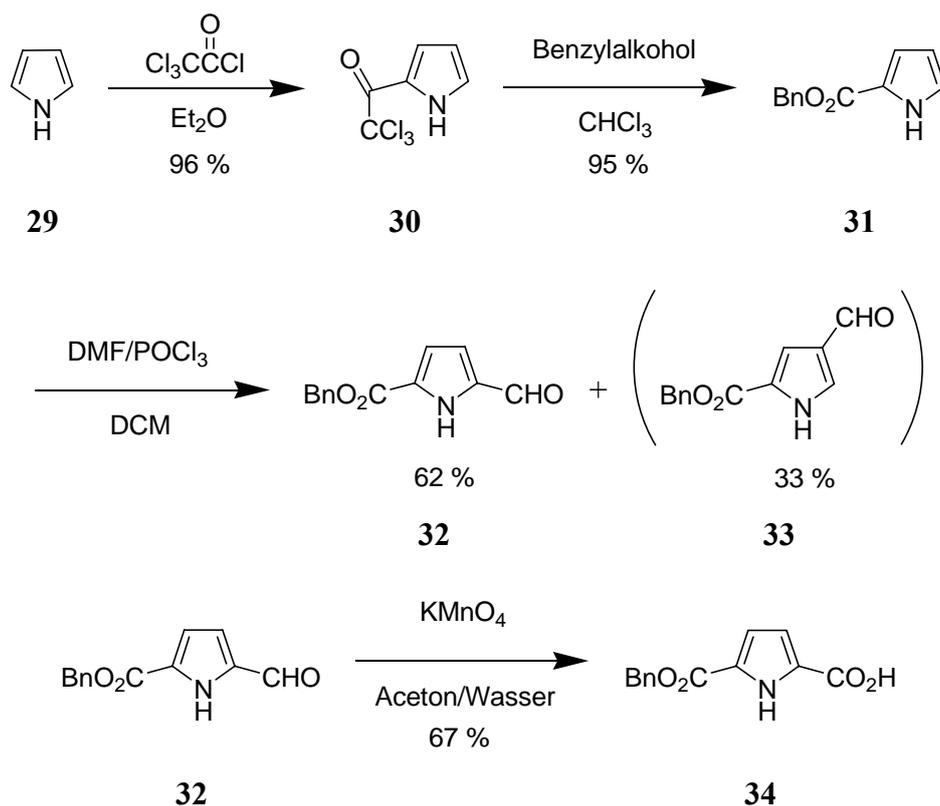


Abb. 35 Synthese von 1H-Pyrrol-2,5-dicarbonsäuremonobenzyloxyester (34).

Die Pyrrolcarbonsäure **34** kann nun mit *N*-geschützten Guanidin-Derivaten unter Verwendung von Peptid-Kupplungsreagenzien verknüpft werden. Dabei hat die Schutzgruppe am Guanidin zwei Vorteile: Das Produkt kann säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt werden, was mit freien Guanidin-Basen fast nicht möglich ist, und zum anderen wird die Bildung von Guanidiniocarbonylpyrrol-Zwitterionen in nachfolgenden Reaktionssequenzen verhindert, die sehr stabile Dimere bilden und nahezu unlöslich in jeglichen Lösemitteln sind.^[90]

Das mono-Boc-geschützte Guanidin **36** erhält man durch die Umsetzung von Guanidiniumchlorid **35** mit Boc-Anhydrid in wässriger Natriumhydroxid-Dioxan-Lösung in einer Ausbeute von 97%. Für die Reaktion des Pyrroldicarbonsäurebenzyloxyesters **34** ist ein Kupplungsreagenz nötig, da Pyrrolcarbonsäure-Derivate i. A. sehr unreaktiv sind. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass das Pyrrol ein elektronenreicher Aromat ist und dadurch die Carbonylverbindung stabilisiert wird, die somit weniger reaktiv gegenüber einem nukleophilen Angriff ist. Die Umsetzung der Säure **34** mit *N*-Boc-Guanidin (**36**) mittels PyBOP und *N*-Methylmorpholin (NMM) als Base in Dimethylformamid (DMF) liefert den Grundbaustein **19**, der bei Wasserzugabe ausfällt. Dieser Niederschlag wird mit Diethylether gelöst, mehrfach mit viel Ether extrahiert und schließlich das organische Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Man erhält den Guanidincarbonylpyrrol-Baustein

19 in einer Ausbeute von 93 % als farblosen Feststoff. Durch Lösen und Extraktion des Produktes mit Diethylether konnte die Ausbeute um 15 % gesteigert werden, im Vergleich zur früheren Synthesevorschrift mit direktem Abfiltrieren und Waschen des Niederschlages. Die Kupplung mittels DCC verlief erfolglos, und eine Aktivierung der Säurefunktion mit Oxalylchlorid führte zur teilweisen Entschützung der Boc-Schutzgruppe am Guanidin. HCTU als Kupplungsreagenz ist möglich, wobei die Ausbeute im Vergleich zu PyBOP um 10 % niedriger liegt.

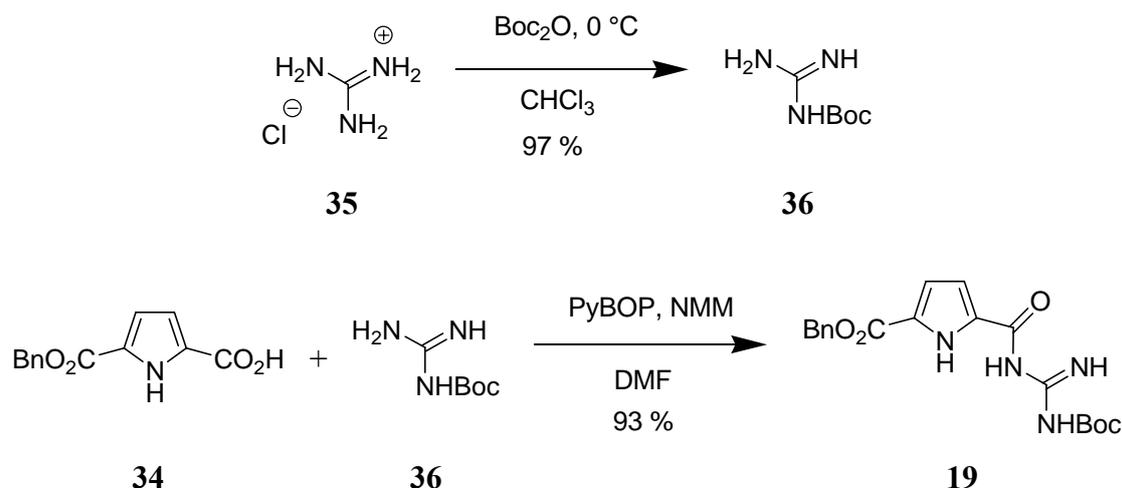


Abb. 36 Synthese von *N*-Boc-Guanidin (**36**) und *N*-Boc-5-(Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäuremonobenzyloxyester (**19**).

Der Benzylester in **19** kann nun leicht mittels Hydrogenolyse entfernt werden. Dazu wird dieser in Methanol mit einer katalytischen Menge Palladium auf Aktivkohle (10 %) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der freien Carbonsäure wurde früher beim Abfiltrieren der Aktivkohle über Celite viel heißes Dimethylformamid benötigt. Bei anschließender Zugabe von Wasser fiel die Pyrrolcarbonsäure **20** aus, konnte abfiltriert und getrocknet werden. Die Ausbeute war mit 86 % noch zufriedenstellend, aber die Prozedur umständlich und recht aufwendig. Eine bessere Möglichkeit der Isolierung eröffnete sich, als Löslichkeitsversuche zeigten, dass die Pyrrolcarbonsäure **20** als Ammoniumsalz gut in Methanol löslich ist. Daraufhin wurde die Hydrogenolyse mit einem Zusatz von Triethylamin (2 Vol %) durchgeführt, und das Produkt wurde annähernd quantitativ nach Filtration über Celite und anschließender Entfernung des Lösemittels erhalten.

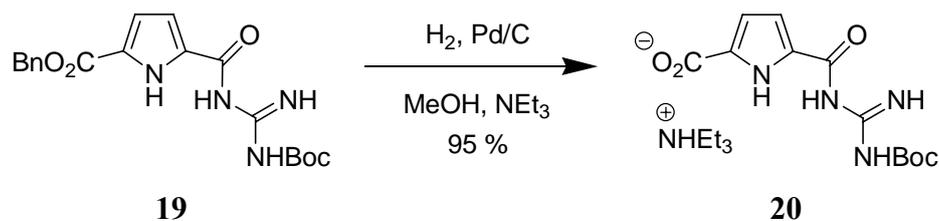


Abb. 37 Synthese von *N*-Boc-5-(Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäure (**20**) als Triethylammoniumsalz.

Wesentliche Neuerungen im Zuge dieser Arbeit waren die Aufarbeitung des Benzylester **31** mittels Lyophilisation und säulenchromatographischer Isolierung, Man erhält diese Verbindung nun in einer Ausbeute von 95 %. Weiterhin konnte durch Extraktion des Guanidinocarbonylpyrrol-Bausteins **19** mit einer größeren Menge an Diethylether anstatt des bloßen Ausfällens die Ausbeute um 15 % auf 93 % verbessert werden. Auch stellte sich heraus, dass unter den Kupplungsreagenzien PyBOP die besten Ergebnisse zur Knüpfung der Pyrrolcarbonsäure mit Boc-Guanidin liefert. Durch Löslichkeitsexperimente konnte die Isolierung der Pyrrolcarbonsäure **20** wesentlich verbessert und vereinfacht werden, da eine Heißfiltration mit DMF überflüssig wird. Die Ausbeute konnte auch hier um knapp 10 % auf 95 % verbessert werden.

Durch die Optimierungen und Neuerungen einzelner Syntheseschritte ist es nun möglich, die Guanidinocarbonylpyrrol-Grundbausteine **19** und **20** effizient zu synthetisieren und im Multigramm-Maßstab für die Darstellung zur Oxo-Anionen-Erkennung zur Verfügung zu stellen.

4.2 Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren

Ein möglicher Ansatz, die Selektivität und Stabilität von Komplexen zu erhöhen, ist die Verwendung von Tweezer-Rezeptoren. Diese besondere Klasse von Rezeptoren besitzt eine Kopfgruppe, die ein terminales Ende eines Substrates zu komplexieren vermag und einen wesentlichen Anteil an der Assoziation beiträgt. An dieser Kopfgruppe sind in der Regel zwei oder mehr Seitenarme gebunden, deren Bedeutung hauptsächlich in der Erhöhung der Selektivität liegt. In diesem Teilprojekt wurde eine Reihe von unterschiedlichen Tweezer-Rezeptoren synthetisiert. An das kationische Guanidiniocarbonylpyrrol-Motiv als Kopfgruppe wurde ein Seitenarm mittels *N'*-Alkylierung an der Guanidino-Einheit angebracht. An der 5-Position des Pyrrols befindet sich entweder ein Benzylester (Rezeptor-Typ **21**) oder eine peptidisch gebundene α -Aminosäure (Rezeptor-Typ **22**). In **Abb. 38** sind die Strukturen dieser zwei Tweezer-Rezeptoren dargestellt.

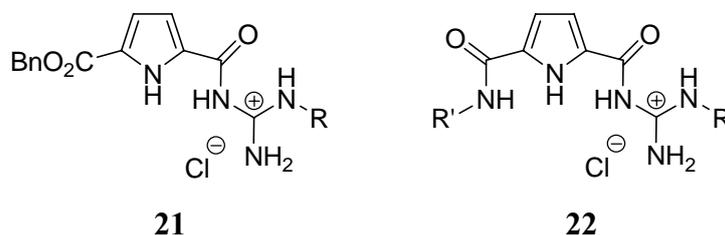


Abb. 38 Generelle Strukturen der Tweezer-Rezeptoren: Links: mit einer Ethylgruppe, Aminosäure oder Dipeptid (R) und einem Benzylester als Seitenarme (**21**). Rechts: mit einer Aminosäure oder Dipeptid (R) und einer Aminosäure (R') als Seitenarme (**22**).

Durch u. a. die Verwendung künstlicher Aminosäurederivate wurde auch eine aromatische Dansyl-Schutzgruppe (**Abb. 39**) in den Rezeptor eingebracht. In der Aminosäuren-, Peptid- und Proteinchemie^[91, 92] wird diese fluoreszenz-aktive Einheit oft an amino-funktionalisierte Bausteine angebracht, wobei sie neben der Funktion als Schutzgruppe vor allem auch als Fluoreszenzlabel zur Detektion verwendet wird. In dieser Arbeit soll sie in erster Line zusätzliche nichtkovalente Wechselwirkungen zum Substrat aufbauen und so Bindungsstärke und Substratspezifität erhöhen. Die Optimierung der Komplexierung kann dadurch zustande kommen, dass die Naphthalin-Einheit aufgrund ihrer Größe und hydrophoben Eigenschaft eine kleine hydrophobe Kavität ausbilden und so unpolare Substrate eine bessere

Komplexierung ermöglichen könnte. Auch bietet die aromatische Naphthalin-Einheit die Möglichkeit, π -Wechselwirkungen mit aromatischen Substraten auszubilden. Ebenfalls sind Sulfonamide gute Wasserstoffbrücken-Donoren. Sulfonamide sind acider als analoge sekundäre Amide und dadurch in der Lage, zur Komplexierung von Anionen beizutragen.

Natürlich wird ebenfalls die Fluoreszenzaktivität für Bindungsstudien genutzt. Bei einer Anregung von 330 nm zeigt die Dansylgruppe eine Emissionsbande bei 520 nm. Ein Vorteil der Dansylgruppe ist, dass sie keinen Lösemittelleffekt in Form eines hypsochromen bzw. bathochromen Shifts (siehe **Abb. 22** in **2.3 Bestimmung von Bindungskonstanten**) durch Änderung der Polarität des Lösemittels zeigt. Dadurch ist die mathematische Auswertung über eine berechnete Bindungsisotherme bei einer Wellenlänge möglich. Jedoch nimmt die Fluoreszenz-Intensität bei Erhöhung der Polarität des Lösemittels (beispielsweise höhere Wasseranteile) stark ab.^[82] Trotz dieses Nachteils waren Fluoreszenz-Messungen in wässrigen Lösemittelsystemen möglich.

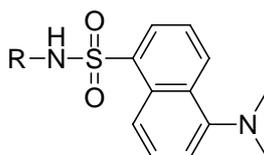


Abb. 39 Struktur der Dansyl-Schutzgruppe für Amine.

Die einzelnen Syntheseschritte der Darstellung der Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren sollen weiterhin wertvolle Erkenntnisse liefern hinsichtlich eines möglichen Aufbaues einer künstlichen, maßgeschneiderten und zielgerichteten Rezeptorbibliothek. Deshalb wurde versucht, in erster Linie natürliche α -Aminosäuren in die Rezeptoren einzubauen. Durch erste Bindungsstudien mit Aminosäurecarboxylaten konnten erste Einblicke erhalten werden, welche Targets sinnvoll und somit vielversprechend für eine gute Molekulare Erkennung wären.

4.2.1 Synthese der Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren

Die N^7 -Alkylierung von Guanidiniocarbonylpyrrolen erwies sich als nichttriviale Synthese. In früheren Arbeiten^[35, 93] wurde versucht, diese N^7 -Alkylierung durch unterschiedlichste Reaktionen zu erzielen. Ein Weg war die Mitsunobu-Reaktion, bei der ein Guanidino-

carbonylpyrrol als Nukleophil mit einem primären Alkohol umgesetzt wird. Als Zwischenprodukt entsteht dabei ein Oxophosphoniumsalz. Jedoch konnte nur mit Benzylalkohol eine erfolgreiche Synthese erzielt werden. Andere Alkohole waren dabei zu unreaktiv.^[35] Eine ähnliche Strategie ist die Aktivierung des zu kuppelnden Bausteins hinsichtlich einer nukleophilen Substitution an der Guanidino-Funktion. Beispielsweise verwendete *Rehm* dabei als Abgangsgruppe Bromid. Aber auch hier konnte eine erfolgreiche Reaktion nur mit dem aktivierten, elektronenarmen Benzylbromid als Elektrophil erzielt werden. Bei aliphatischen Reaktionspartnern zeigte selbst die bessere Abgangsgruppe Jodid hierbei keine Reaktion.^[94] Eine andere Syntheseroute war die Guanidinio-Funktion in *N*⁷-alkylierten Carbonylpyrrol-Derivaten mittels Guanidinylierungsreagenzien aufzubauen. Dabei wurde versucht, eine Pyrrolcarbonsäure mit einem Pyrazol bzw. Harnstoffderivat umzusetzen und in einer weiteren Reaktion mit einem primären Amin zur Guanidino-Funktion zu gelangen. Aber auch hier konnten keine Erfolge erzielt werden.^[35] Eine weitere Möglichkeit ist die Aktivierung der Imin-Funktion im Guanidin zur Abgangsgruppe. Eine solche Aktivierung erzielt man beispielsweise durch die Funktionalisierung als Trifluormethansulfonsäureamid (Triflat).^[35, 95, 96]

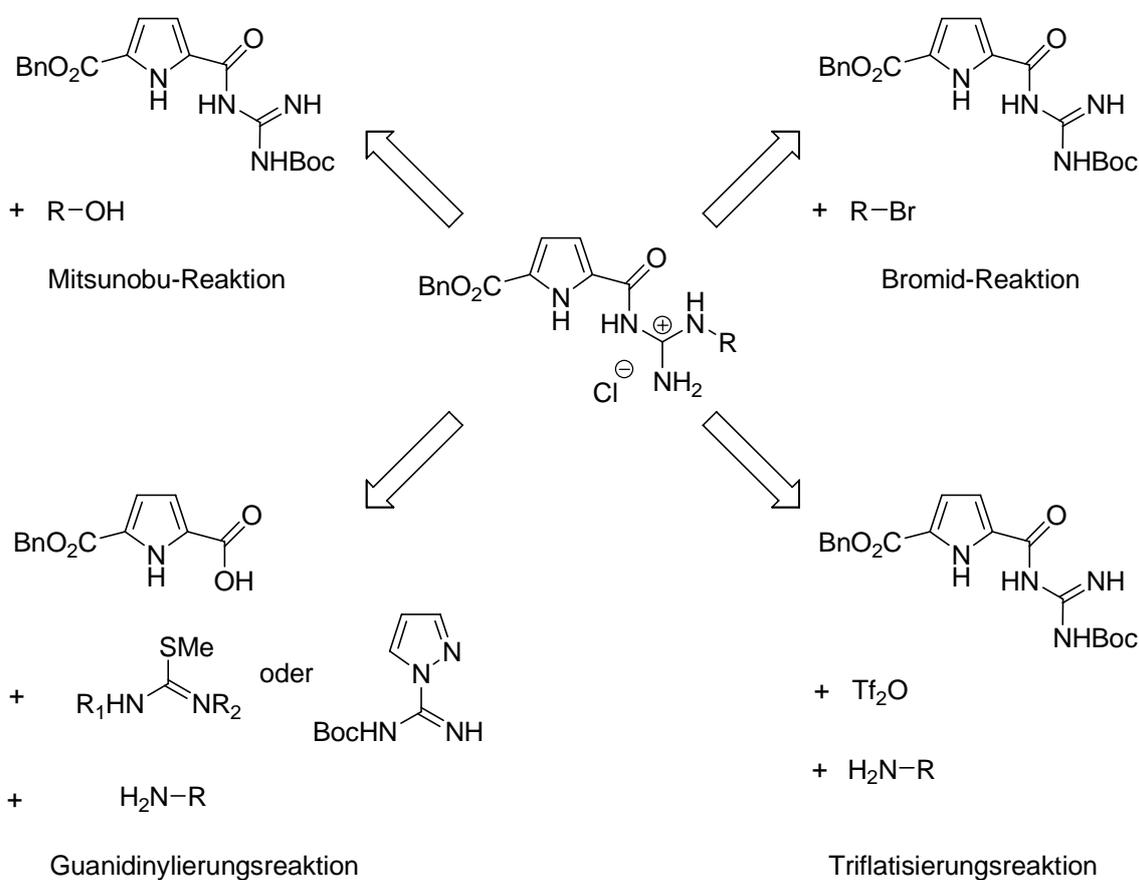


Abb. 40 Verschiedene Reaktionswege zur Darstellung *N*⁷-alkylierter Guanidiniocarbonylpyrrole.

Mit der Mitsunobu-Reaktion, der Bromid-Reaktion und der Guanidinylierungsreaktion war es nur möglich, wenn überhaupt, ganz bestimmte Bausteine in *N'*-alkylierte Guanidiniocarboxylpyrrole einzuführen. Mit der Triflatisierungsreaktion hingegen konnten verschieden Bausteine in moderaten bis guten Ausbeuten synthetisiert werden.

Bei der Triflatisierungsreaktion wird das Boc-geschütztes Guanidiniocarboxylpyrrol-Derivat **19** am Carbamat-Stickstoff mit Natriumhydrid deprotoniert und anschließend mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid umgesetzt (**Abb. 41**). Für weitere Reaktionen wird das Trifluormethansulfonsäureamid-Intermediat **24** nicht isoliert, sondern *in situ* direkt mit einem Amin umgesetzt. Zur Bestätigung des Reaktionsmechanismus und zur Charakterisierung wurde es allerdings anfangs einmal in einer Ausbeute von 59 % isoliert.

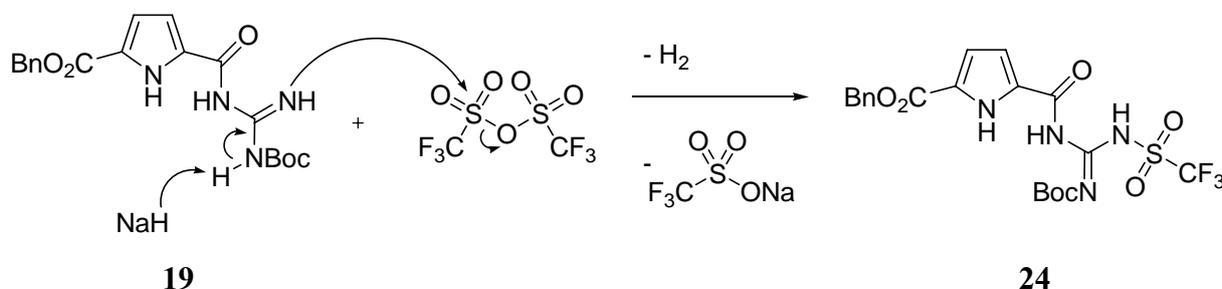


Abb. 41 Mechanismus der Triflatisierung des Guanidiniocarboxylpyrrol-Bausteins **19**.

Das triflatisierte Guanidiniocarboxylpyrrol-Derivat ist dabei so stabil, dass es säulenchromatographisch aufgearbeitet werden kann. Eine Boc-Entschützung mit konzentrierter Salzsäure in Methanol zum kationischen Guanidiniocarboxylpyrrol-Derivat **37** ist in knapp 50 % Ausbeute möglich. Die triflatisierte Guanidinio-Einheit bleibt trotz dieser harschen Bedingungen erhalten und konnte u. a. durch ^{19}F -NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden.

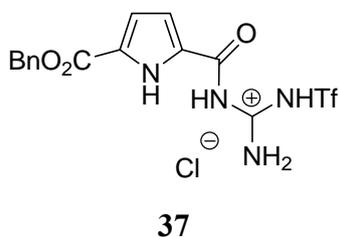


Abb. 42 Guanidiniocarboxylpyrrol-Derivat **37** mit Triflat-Gruppe an der *N'*-Position.

Die nukleophile Substitution erfolgt anschließend durch ein primäres Amin. Dabei wird das Trifluormethansulfonsäureamid ersetzt, und man erhält ein *N'*-alkyl-funktionalisiertes Guanidinocarbonylpyrrol-Derivat.

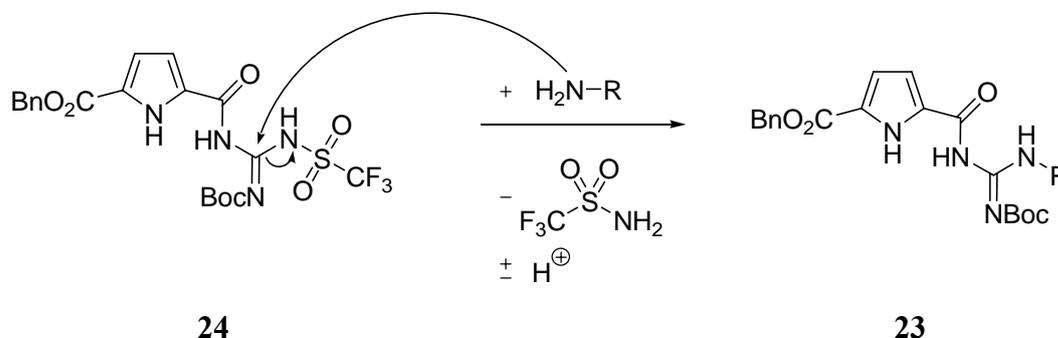


Abb. 43 Nukleophile Substitutionsreaktion am triflatierten Guanidinocarbonylpyrrol-Baustein **24**.

Die Umsetzung mit primären Aminen in einer Eintopf-Reaktion liefert Ausbeuten zwischen 16 und 63 %. Die besten Ausbeuten wurden mit einfachen primären Aminen und β -Aminosäuren erzielt. Anilin reagierte nur mäßig, mit sekundären Aminen und sterisch anspruchsvollen primären Aminen konnte keine Umsetzung erzielt werden. Auch mit Triethylamin und Diisopropylethylamin (Hünig-Base, DIPEA) als Base wurde die Reaktion durchgeführt, allerdings mit etwa 10 % niedrigerer Ausbeute als mit Natriumhydrid.^[35]

Die Darstellung der Tweezer-Rezeptoren geht von dem Grundbaustein **19** aus, dessen Synthese bereits in Kapitel 4.1 *Guanidinocarbonylpyrrol-Grundbausteine: Optimierung der Synthese* beschrieben wurde.

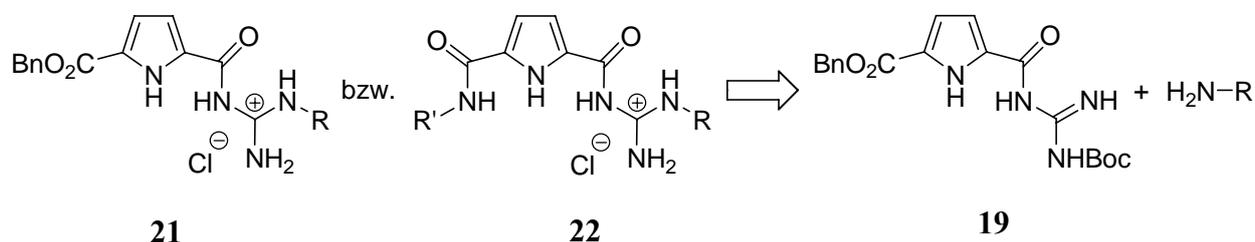


Abb. 44 Die Tweezer-Rezeptoren erhält man durch die Umsetzung des Guanidinocarbonylpyrrol-Grundbausteins **19** mit einem primären Amin.

Die Bausteine für die nukleophile Substitution, ein primäres Amin, α - und β -Aminosäure-Derivate sowie ein Dipeptid, sind in **Abb. 45** dargestellt. Bis auf Ethylamin **38** lagen alle Substrate als Hydrochloridsalze vor. Ethylamin **38**, *L*-Alaninylester **39**, *L*-Valinmethyl ester

40, *L*-Phenylalaninethylester **41** und β -Alaninmethylester **43** sind käuflich erhältlich, während die Aminosäure-Derivate **42**, **45** und **46** sowie das Dipeptid **44** synthetisiert wurden.

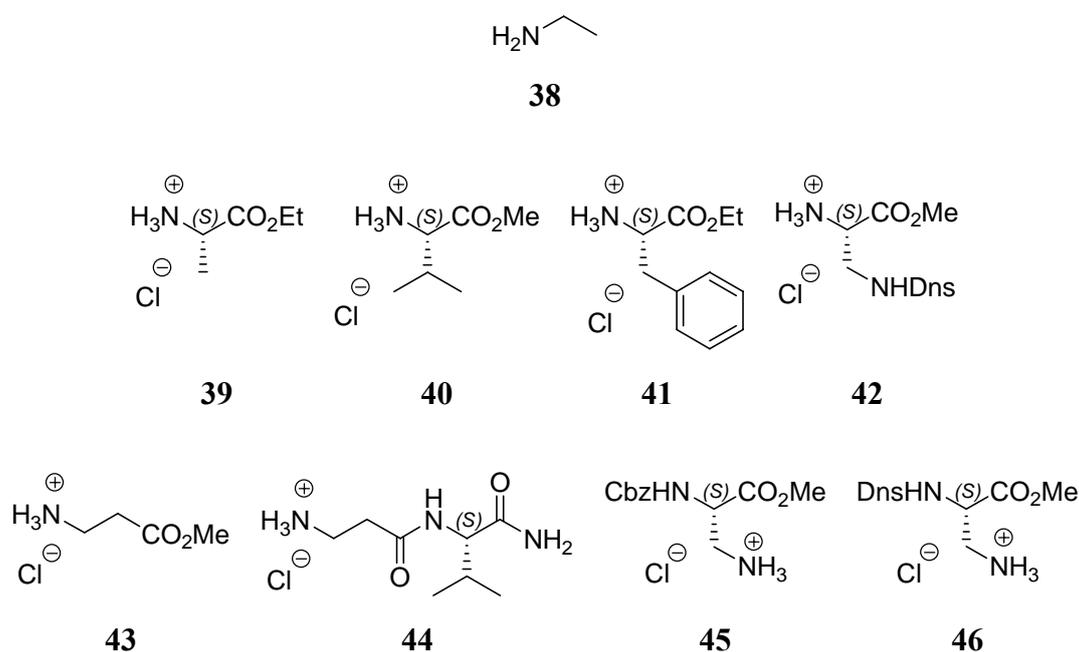


Abb. 45 Bausteine zur Herstellung der Rezeptoren **21**: primäres Amin Ethylamin (**38**), die α -Aminosäuren *H*-*L*-Alaninethylester-Hydrochlorid (**39**), *H*-*L*-Valinmethylester-Hydrochlorid (**40**), *H*-*L*-Phenylalaninethylester-Hydrochlorid (**41**), *N* $_{\beta}$ -Dns- β -Amino-*L*-Alaninmethylester-Hydrochlorid (**42**) und die β -Aminosäurederivate *H*- β -Alaninmethylester-Hydrochlorid (**43**), *H*- β -Alanin-*L*-Valinamid-Hydrochlorid (**44**) sowie die künstlichen Aminosäuren *N* $_{\alpha}$ -Cbz- β -Amino-*L*-Alaninmethylester-Hydrochlorid (**45**) und *N* $_{\alpha}$ -Dns- β -Amino-*L*-Alaninmethylester-Hydrochlorid (**46**).

Das Dipeptid **44** wurde in drei Schritten nach Literaturvorschrift synthetisiert. Zuerst wurde Boc- β -Alanin **47** mit *L*-Valinamid **48** unter Verwendung von Chlorameisensäureisobutylester und NMM in Dichlormethan in einer Ausbeute von 70 % gekuppelt. Anschließend wurde mit einer Lösung aus 10 % konzentrierter Salzsäurelösung in Ethanol die Boc-Schutzgruppe des Dipeptids **49** in einer Ausbeute von 97 % abgespalten. Die Ausbeute über beide Schritte betrug 68 %.^[35]

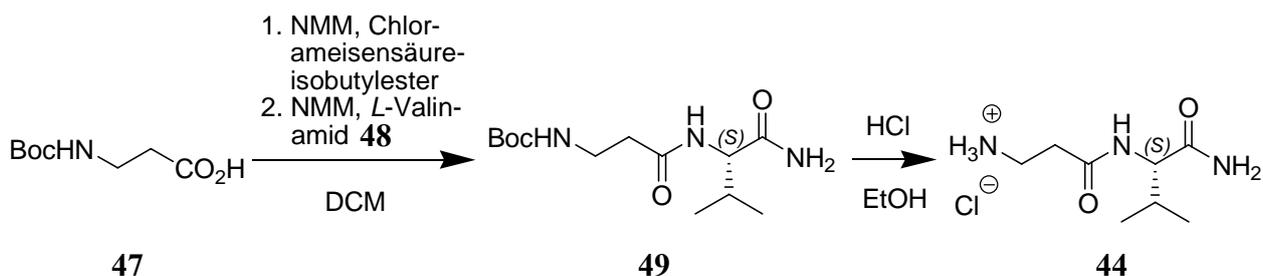


Abb. 46 Darstellung des Dipeptids **44**.

Das künstliche β -Aminosäure-Derivat **45** erhielt man durch einen Hoffmann-Abbau des kommerziell erhältlichen Cbz-*L*-Asparagins (**50**) mittels PIDA. Dadurch wurde eine β -Amino-Funktion in einer Ausbeute von 95 % erhalten, während weiterhin die α -Amino-Funktion Cbz-geschützt blieb. Anschließend wurde die Carbonsäurefunktion von **51** mit Thionylchlorid in Methanol zum Methylester in einer Ausbeute von 90 % umgesetzt. Die Ausbeute über beide Stufen zum β -Aminosäure-Derivat **45** betrug 86 %.

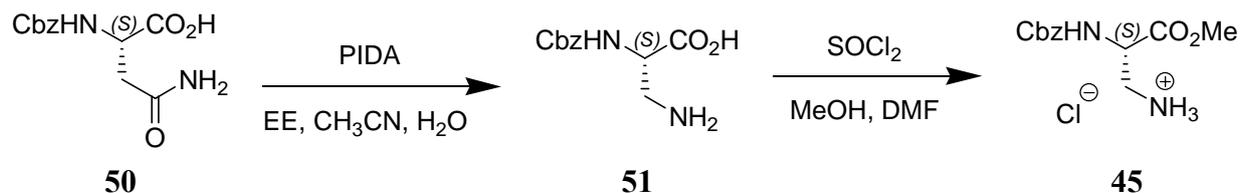


Abb. 47 Darstellung des β -Aminosäure-Derivates **45**.

Die Synthese der künstlichen Aminosäure **42** begann mit der β -Aminosäure **45**. Dazu wurde die β -Amino-Funktion mit Dansylchlorid in einer Ausbeute von 66 % umgesetzt. Durch Hydrierung der Cbz-Schutzgruppe von **52** erhielt man die α -Aminosäure **42** in einer Ausbeute von 99 %, über alle Stufen 56 %.

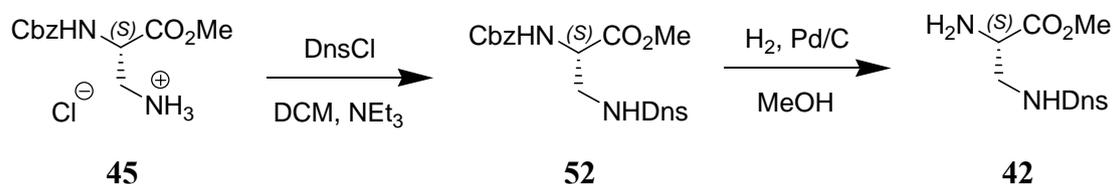


Abb. 48 Darstellung der α -Aminosäure **42**.

Zur Darstellung der dansylierten, künstlichen β -Aminosäure **46** musste die Cbz-Schutzgruppe von **45** gegen eine Dansyl-Schutzgruppe (5-Dimethylaminonaphthalen-Sulfonyl-Gruppe, Dns) ausgetauscht werden. Dazu wurde die β -Amino-Funktion mit Boc-Anhydrid in einem Zwei-Phasen-Gemisch aus Dichlormethan und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung zu einer Boc-Schutzgruppe in einer Ausbeute von 98 % umgesetzt werden. Danach wurde die Cbz-Schutzgruppe von **53** in einer Ausbeute von 97 % durch Hydrierung entfernt. Durch Umsetzung der freien α -Amino-Funktion mit Dansylchlorid und Pyridin als Base erhielt man in einer Ausbeute von 86 % die dansylierte Aminosäure **55**.^[97] Letztendlich lieferte die saure

Abspaltung der Boc-Schutzgruppe die künstliche Aminosäure **46** in einer Ausbeute von 97 %. Ausgehend von Cbz-*L*-Asparagin ergibt sich über alle Stufen eine Ausbeute von 68 %.

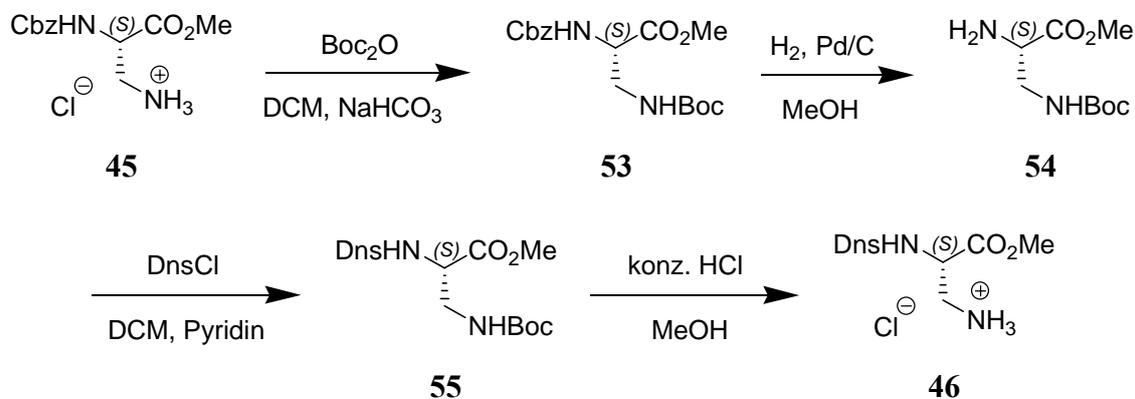


Abb. 49 Darstellung des künstlichen dansylierten Aminosäure-Derivates **46**.

Schlüsselschritt bei der Synthese der *N, N'*-substituierten Tweezer-Rezeptoren ist die Aktivierung des Imin-Stickstoffs der Boc-geschützten Guanidino-Einheit im Pyrrol-Derivat **19** als Triflat und anschließender nukleophiler Substitutionsreaktion eines primären Amins oder einer C-terminal geschützten α - oder β -Aminosäure. Dazu wird das Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol **19** in absolutem und über Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe I) filtriertem Dichlormethan vorgelegt und unter Schutzgas in einem Aceton-Trockeneisbad auf -20 °C gekühlt. Schutzgas und absolute Lösemittel sind deshalb notwendig, da das Trifluormethansulfonsäureanhydrid schon mit Spuren von Wasser zur freien Sulfonsäure reagiert. Als Base zur Deprotonierung des Imin-Stickstoffs wird Natriumhydrid als Öl-Suspension zugegeben. Die Reaktionslösung wird auf -50 °C gekühlt, das Anhydrid hinzuge tropft und nach beendeter Reaktion auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wird mit wenig Wasser überschüssiges Trifluormethansulfonsäureanhydrid und Natriumhydrid zersetzt.

Die so erhaltene Zwischenstufe **24** wird nicht isoliert, weil dies unnötige Aufarbeitungsschritte und vermeidbare Ausbeuteverluste zur Folge hat. Sie wird direkt in einer Eintopf-Reaktion mit einem Amin und Triethylamin als Base umgesetzt und über Nacht bei 40 °C in Dichlormethan refluxiert. Bei Ammoniumchlorid-Salzen der Aminosäuren wird ein zusätzliches Äquivalent Triethylamin verwendet. Anschließend wird zur Aufarbeitung wässrig extrahiert und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Silicagel gereinigt. Man

erhält die *N,N'*-substituierten Guanidinocarbonylverbindungen **23** als farblose bis leicht gelbliche Feststoffe in Ausbeuten von 19 bis 77 %.

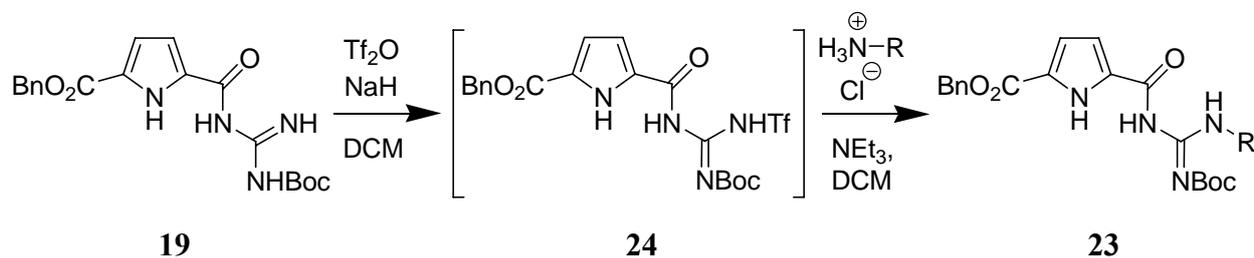


Abb. 50 Allgemeines Reaktionsschema zur Darstellung *N,N'*-substituierter Guanidinocarbonylpyrrol Verbindungen **23** durch Triflatisierung und anschließender Umsetzung mit einem Amin.

Die schlechteste Ausbeute von 19 % wurde bei der Umsetzung mit *L*-Phenylalaninethylester **41** erzielt und dies auch nur bei Refluxieren über zwei Tage. Hauptsächlich wurde die Triflat-Zwischenstufe **24** in einer Ausbeute von 63 % reisoliert, ebenso die Ausgangsverbindung **19** in einer Ausbeute von etwa 17 %. Nach eintägigem Refluxieren konnte kein Produkt isoliert werden. Auch *L*-Alaninethylester **39**, *L*-Valinmethylester **40** und die künstliche Aminosäuren **42** zeigten keine Umsetzung unter den anfangs verwendeten Reaktionsbedingungen. Selbst durch Refluxieren über mehrere Tage konnte für die dansylierte α -Aminosäure **42** keine Umsetzung beobachtet werden, die hinsichtlich des Aufbaues einer hydrophoben Kavität für die Tweezer-Rezeptoren am interessantesten war. Die ähnliche dansylierte Aminosäure **46** wurde letztendlich erfolgreich umgesetzt. Die Isolierung der Zwischenstufe **24** als Hauptprodukt zeigt, dass nicht die Aktivierung der Guanidino-Einheit der problematische Schritt ist, sondern bei den α -Aminosäuren vor allem die anschließende nukleophile Substitutionsreaktion. In vielen Fällen reicht die Reaktivität dieser Aminofunktionen dazu nicht aus. Anscheinend sind in den α -Aminosäuren die Aminogruppen durch die elektronenziehenden Effekte der Carbonsäureester nicht nukleophil genug, um die Reaktion einzugehen. Eventuell könnte auch einer der Gründe darin liegen, dass bei den Reaktionen anstatt der freien Amine die Hydrochloridsalze der Aminosäuren verwendet wurden und die Deprotonierung *in situ* mit Triethylamin durchgeführt wurde. Alleinige Ursache der äußerst schlechten Reaktivität kann dies aber nicht sein, denn bei der im Folgenden beschriebenen erfolgreichen Umsetzung der β -Aminosäuren lagen diese ebenfalls als Hydrochloride vor. Aufgrund der allgemein schlechten Reaktivität der α -Aminosäuren wurden keine weiteren Versuche zu deren Einführung in die Rezeptoren unternommen.

primäre Amin Ethylamin (**38**) als gekuppelten Baustein eine Ausbeute von 95 % lieferte. Die schlechte Ausbeute des α -Aminosäure-Derivates **63** ist wohl nicht auf eine schlechte Reaktivität bezüglich der Boc-Entschützung zurückzuführen, als vielmehr auf ein säulenchromatographisches Aufarbeitungsproblem.

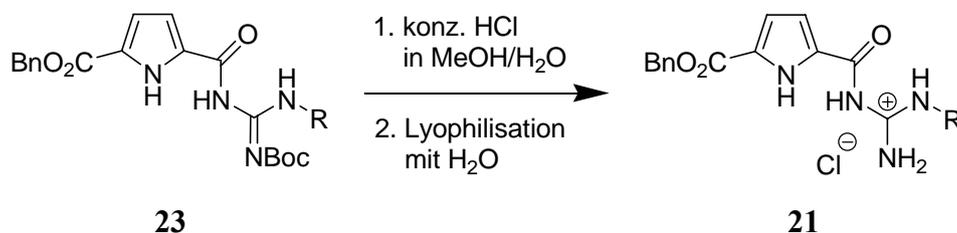


Abb. 52 Herstellung der Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren **21** durch Abspaltung der Boc-Schutzgruppe.

Auf diese Weise wurden die sechs Guanidiniocarbonylpyrrol-Benzyl-Tweezer-Rezeptoren **62** bis **67** als Hydrochloridsalze synthetisiert (**Abb. 53**).

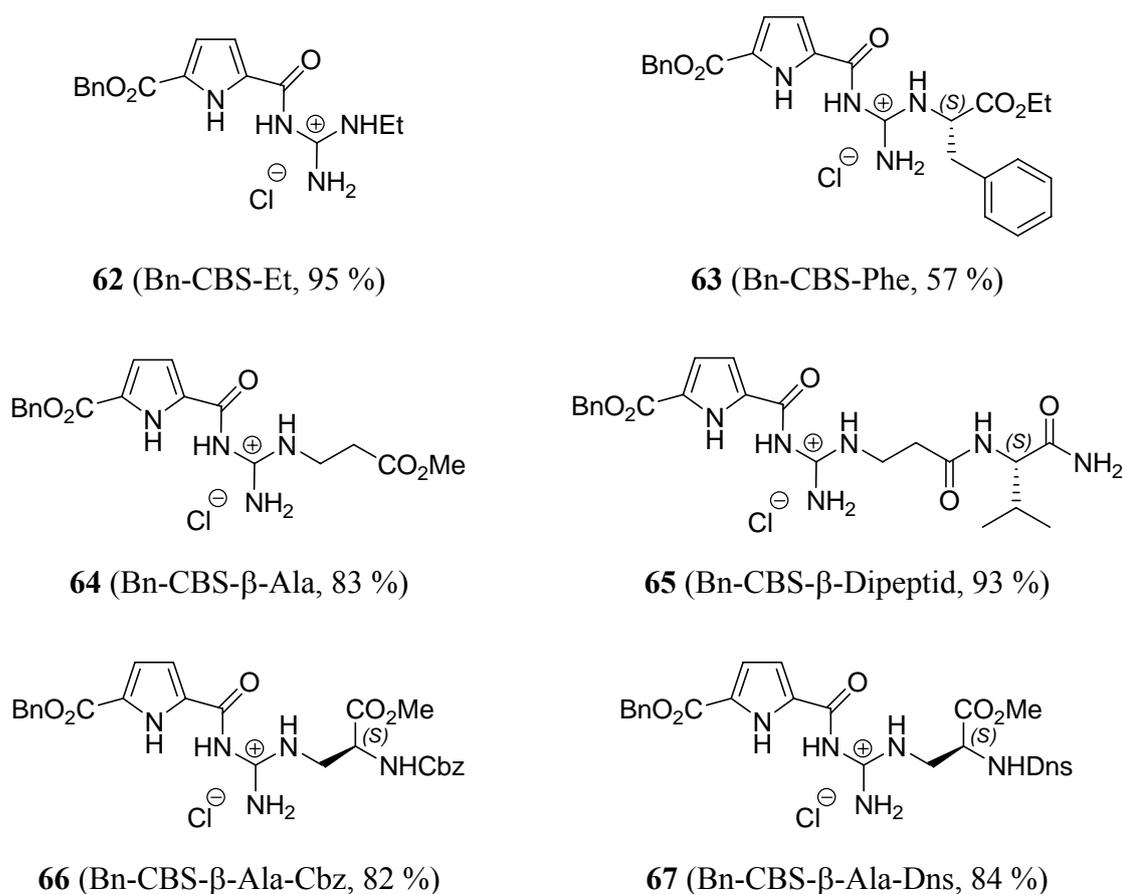


Abb. 53 Guanidiniocarbonylpyrrol-Benzyl-Tweezer-Rezeptoren **62** bis **67**. In Klammern sind Kürzel der Rezeptoren zur einfacheren Orientierung und die Ausbeuten der isolierten Verbindungen nach Entschützung und Lyophilisation angegeben.

Die Reinheit der erhaltenen Guanidiniocarbonylpyrrol-Benzyl-Tweezer-Rezeptoren **62** bis **67** wurde mittels RP-18-HPLC untersucht. Als Methode wurde ein Wasser-Methanol-Gradient mit 0.1 % TFA von 0 auf 100 % Methanol verwendet. Detektiert wurden UV-Spektren bei verschiedenen Wellenlängen sowie ein komplettes 3D-Spektrum über den Wellenlängenbereich von 210 bis 595 nm. Das Einzelspektrum bei 300 nm und das 3D-Spektrum sind für den Rezeptor **66** (Bn-CBS- β -Ala-Cbz, 82 %) in **Abb. 54**, beispielhaft für alle Guanidiniocarbonylpyrrol-Benzyl-Tweezer-Rezeptoren, dargestellt. Der langgezogene Peak im 3D-Spektrum zwischen 210 und 255 nm ist auf die zunehmende Absorption des Methanols aufgrund dessen höheren Anteils am Eluenten zurückzuführen. Im dritten Spektrum ist die Reinheit des Hauptpeaks zu sehen. Hier sind neben dem Spektrum vom Peak-Maximum vom 2. Peak auch die beiden Spektren der halben Höhe dieses Peaks übereinandergelegt worden. Die hohe Übereinstimmung unterstreicht die Reinheit dieses Peaks und damit dieser Verbindung. Aus der relativen Fläche in der Tabelle dieser Abbildung wird ersichtlich, dass der Rezeptor **66** bei einer Wellenlänge von 300 nm zu knapp 96 % HPLC-rein ist. Die anderen Rezeptoren lagen hierbei zwischen 95 und 98 %.

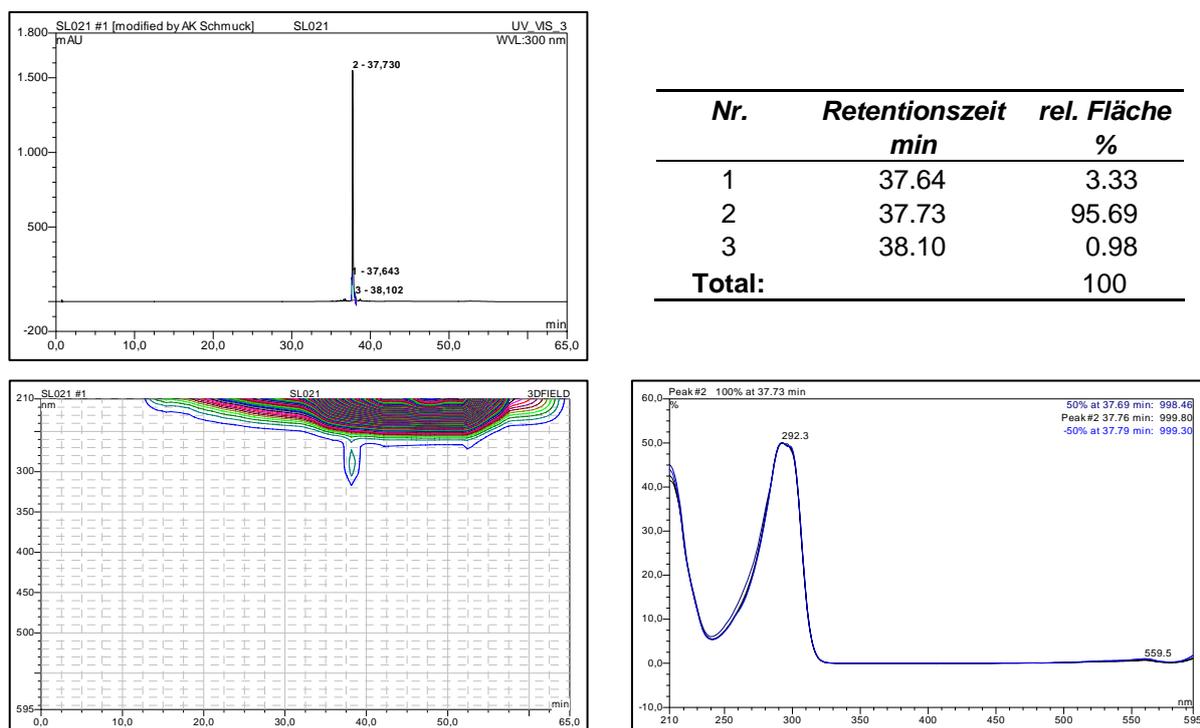


Abb. 54 Oben links: HPLC-Diagramm zur Überprüfung der Reinheit des Rezeptors **66** (Bn-CBS- β -Ala-Cbz, 82 %) bei einer Wellenlänge von 300 nm bei Wasser-Methanol-Gradient (mit 0.1 % TFA) von 0 auf 100 %. Peak 2 wird bei einem Mischungsverhältnis von ungefähr 81 %Methanol in Wasser detektiert. Oben rechts: Die Tabelle zeigt eine Reinheit von knapp 96 % für den Rezeptor **66**. Unten links: 3D-HPLC-Spektrum: der langgezogene Peak zwischen 210 und 255 nm ist auf die Absorption des Methanols zurückzuführen. Unten rechts: Zur Überprüfung der Reinheit ist das UV-Spektrum des Peaks 2 bei der Retentionszeit von 37.73 Minuten mit nahezu zwei identischen UV-Spektren bei jeweils halber Peakhöhe überlagert.

Mit einer HPLC-Reinheit von über 95 % für die erfolgreich synthetisierten Guanidiniocarbonylpyrrol-Benzyl-Tweezer-Rezeptoren **62** bis **67** konnten Bindungsstudien durchgeführt werden.

Die Tweezer-Rezeptoren des Typs **22** wurden synthetisiert, indem man ohne die Boc-Schutzgruppe in **23** zu entfernen den Benzylester in 5-Position am Pyrrol mit Wasserstoff an Palladium auf Aktivkohle hydrierte und so die freie Pyrrolcarbonsäure **68** herstellte. Für Verbindung **70** (R = Dipeptid **44**) lag die Ausbeute bei 94 %, für die Verbindung **73** (R = dansylierte Aminosäure **46**) bei 95 %. Diese Carbonsäure **68** konnte nun mit C-terminal geschützten *L*-Aminosäuren mittels der Kupplungsreagenzien HCTU bzw. PyBOP zur Verbindung **69** umgesetzt werden. Die Verwendung eines solchen Reagenzes war aufgrund der schlechten Reaktivität der Pyrrolcarbonsäure nötig (**4.1 Guanidiniocarbonylpyrrol-Grundbausteine: Optimierung der Synthese**). Dadurch wurden das Guanidiniocarbonylpyrrol-Derivat **71** in 33 % und das Derivat **74** in 59 % erhalten. Die Entschützung der Boc-Schutzgruppe sowie die Reinigung der Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren **22** erfolgte analog der Tweezer-Rezeptoren des Typs **21**. Die Ausbeuten der Boc-Entschützung hierbei lag für den Tweezer-Rezeptor **72** bei 76 %, für den Tweezer-Rezeptor **75** bei 82 %.

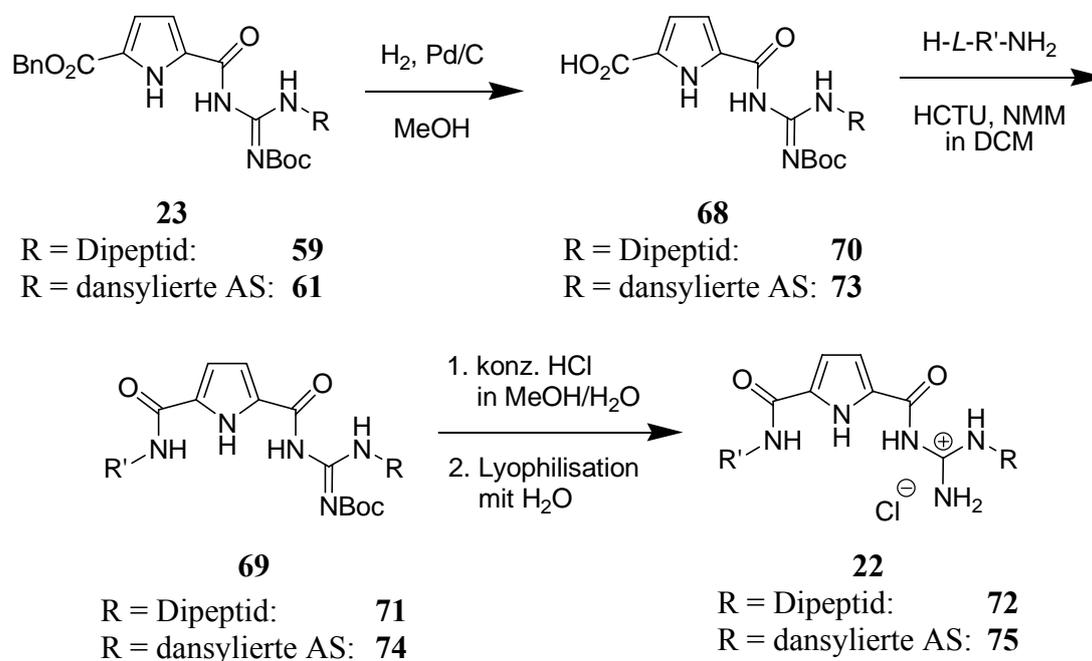


Abb. 55 Synthese der Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren des Typs **22**. Die vollständigen Strukturen der Rezeptoren **72** und **75** sind in **Abb. 56** dargestellt.

Auf diese Weise wurden die zwei Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren **72** und **75** synthetisiert (**Abb. 56**): der Rezeptor **72** mit dem Dipeptidbaustein **44** als Rest R und *L*-Valinamid als Rest R' sowie Rezeptor **75** mit der künstlichen, dansylierten Aminosäure **46** als Rest R und *L*-Phenylalaninamid als Rest R'. Ausgehend von der Verbindung **23** mit den jeweiligen Resten wurden über drei Stufen die Verbindung **72** in 24 % und Verbindung **75** in 46 % Ausbeute hergestellt.

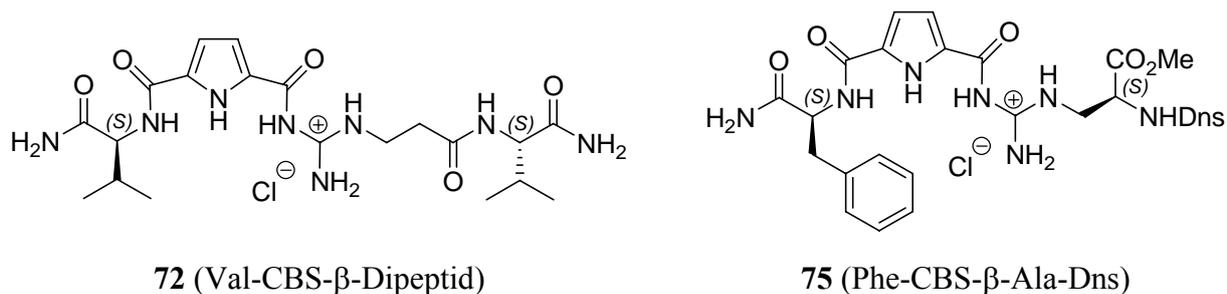


Abb. 56 Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren **72** und **75**. In Klammern sind Kürzel der Rezeptoren zur einfacheren Orientierung angegeben

Die Reinheit der beiden Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren **72** und **75** wurde mittels RP-18-HPLC überprüft. Als Methode wurde ebenfalls ein Wasser-Methanol-Gradient mit 0.1 % TFA von 0 auf 100 % Methanol verwendet und Einzelspektren u. a. bei einer Wellenlänge von 300 nm und ein 3D-Spektrum aufgenommen. Die Reinheit lag auch hier zwischen 95 und 98 %. Damit konnten die beiden so hergestellten Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren **72** und **75** ebenfalls in Bindungsstudien untersucht werden.

Zur weiteren Analytik wurden Kristallisationsversuche mit den Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren unternommen, um Einkristalle für die Röntgenstrukturanalyse zu gewinnen. Dazu wurden Lösungen der Rezeptoren u. a. in Methanol, Methanol/Wasser-Mischungen und Hexan/Essigester-Mischungen angesetzt. Anstatt der erhofften Einkristalle erhielt man jedoch lediglich amorphe Feststoffe, mit denen keine kristallographischen Röntgenstrukturanalysen möglich waren.

In **Abb. 57** ist exemplarisch für die alle anderen Tweezer-Rezeptoren das ^1H -NMR-Spektrum von **63** (Bn-CBS-Phe) gezeigt. Die Protonen des Ethylesters sind bei 1.21 (CH_3) und 3.17 ppm (CH_2), die benzyliischen Protonen bei 3.66 und 5,34 ppm und das CH-Proton bei

4.18 ppm zu sehen. Die Pyrrol-Protonen erscheinen bei 6.96 und 7.25 ppm. Zwischen 7.32 und 7.46 ppm liegen die zehn aromatischen Protonen. Die Protonen der Guanidinio-Einheit sind bei 9.13 (NH₂), 9.40 (NH) und 11.76 ppm (NH) sowie das Pyrrol-NH bei 12.99 ppm zu sehen.

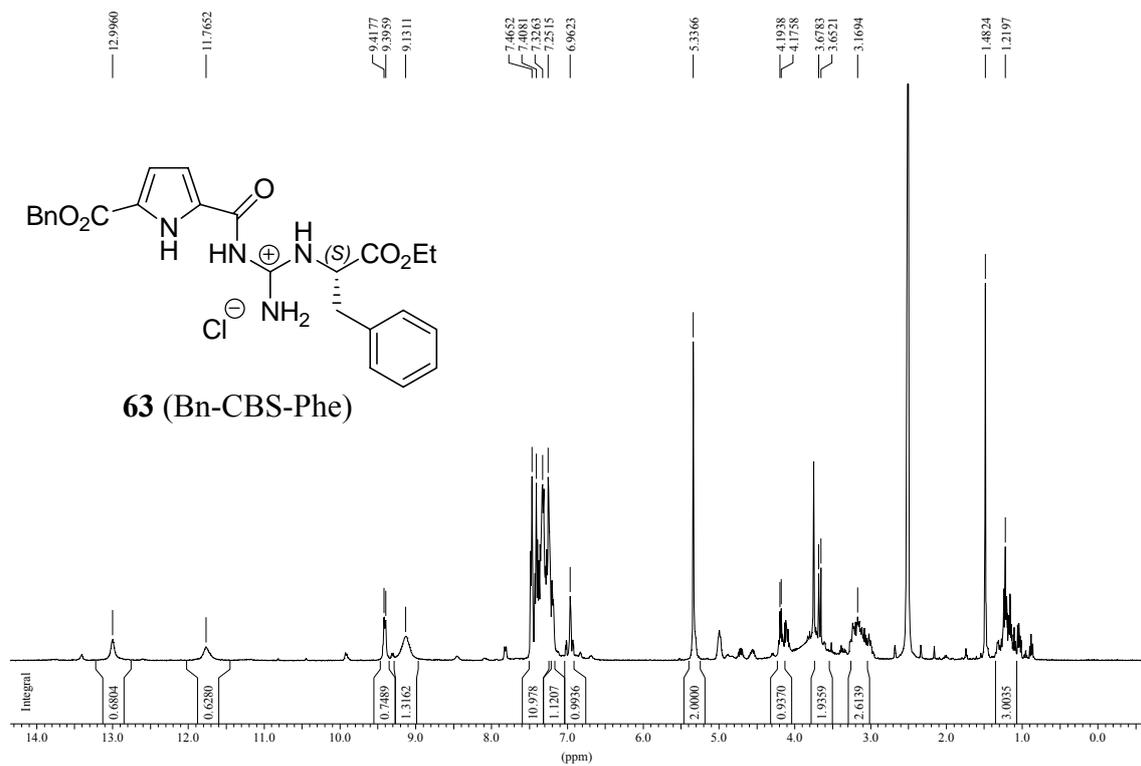


Abb. 57 ¹H-NMR-Spektrum des Tweezer Rezeptors **63**.

4.2.2 Bindungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren

Entscheidend bei der Komplexierung von Carboxylaten durch die Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren ist die geometrische Anordnung des zusätzlichen Seitenarms an der Guanidinio-Einheit. Hierbei kommt es darauf an, dass dieser durch seine Ausrichtung und nichtkovalenten Wechselwirkungen mit dem Substrat die Komplexierung zusätzlich verstärkt bzw. die Selektivität erhöht. Hierzu wurde der zusätzliche Seitenarm variiert und vor allem auch mit aromatischen Gruppen ausgestattet, um die Komplexierung von aromatischen Aminosäuren (z. B. Ac-*L*-Phenylalanin **C**) bzw. anderen oxo-anionischen Substraten (z. B. Folsäure **G**) durch π - π -Wechselwirkungen zu verbessern. Aus diesem Grund wurde u. a. auch die Dansylgruppe in die Tweezer-Rezeptoren **67** (Bn-CBS- β -Ala-Dns) und **75** (Phe-CBS- β -Ala-Dns) eingebaut.

Um die Komplexierungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren gegenüber verschiedenen Oxo-Anionen zu untersuchen, wurden Bindungsstudien durchgeführt. Diese wurden im Wesentlichen in wässrigen Systemen durchgeführt, mit einem Anteil von 10 bis 40 % an organischen Lösemitteln wie Dimethylsulfoxid oder Methanol. Messungen in reinem Wasser waren nicht möglich, da der durch die *N'*-Alkylierung eingeführte hydrophobe Rest eine gute Wasserlöslichkeit verhinderte. Neben dem Löslichkeitsproblem für die Tweezer-Rezeptoren wurde durch die Zugabe von Dimethylsulfoxid oder Methanol auch gleichzeitig ein Löslichkeitsproblem für die Substrate, also die acetylierten Aminosäurecarboxylate und weitere Oxo-Anionen, verhindert. Die Substrate für die Bindungsstudien sind in **Abb. 58** gezeigt. Neben den in der Tabelle aufgeführten *L*-Aminosäuren wurden zur Untersuchung der Enantioselectivität u. a. auch deren *D*-Enantiomer, im Folgenden gekennzeichnet mit 'D', eingesetzt. Die *N*-acetylierten α -Aminosäuren **A** bis **F** sowie die Hippursäure **I**, Zimtsäure **K** und die Dihydroxymimtsäure (Kaffeensäure) **L** wurden als freie Säuren eingesetzt, die durch Einstellung des pH-Wertes auf 6.00 deprotoniert wurden und damit als Carboxylate vorlagen. Folsäure **G** und *L*-Dopa **H** wurden als deren Dinatrium- bzw. Natriumsalze verwendet.

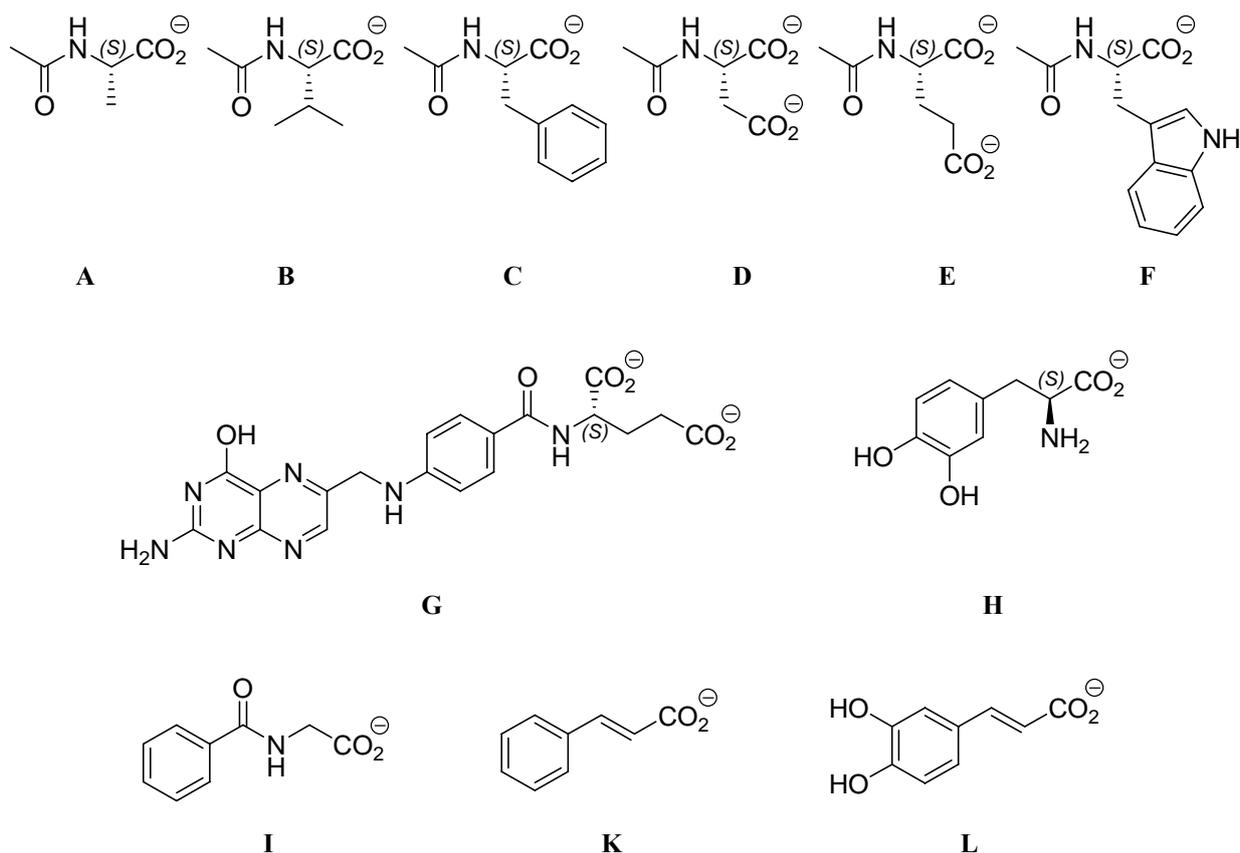


Abb. 58 Substrate der Bindungsstudien: Oben: *N*-acetylierte Aminosäuren *L*-Alanin **A**, *L*-Valin **B**, *L*-Phenylalanin **C**, *L*-Aspartat **D**, *L*-Glutamat **E** und *L*-Tryptophan **F**. Mitte: Folsäure **G** und *L*-Dopa **H**. Unten: Hippursäure **I** Zimtsäure **K** und Dihydroxymzimsäure (Kaffeensäure) **L**. Die *D*-Enantiomere der Aminosäuren werden im Folgenden mit ' gekennzeichnet.

Die Bindungsstudien wurden bei einem pH-Wert von 6.00 durchgeführt. Um sicher zu gehen, dass einerseits die Rezeptoren überwiegend protoniert sind und andererseits die oxoanionischen Substrate **A** bis **L** in deprotonierter Form vorliegen, wurden die pK_S -Werte der Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren **62** bis **67**, **72** und **75** sowie der Substrate in pH-Experimenten, beruhend auf der Henderson-Hasselbalch-Gleichung, nach der Halbäquivalenzmethode bestimmt. Dazu wurden 0.5 mM Lösungen in Wasser angesetzt und zur Bestimmung der pK_S -Werte der Guanidinio-Gruppen bzw. der Carboxylate mit der halben Molmenge an Natronlauge versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert gemessen. Zur Bestimmung der zweiten pK_S -Werte wurde ein weiteres Äquivalent an Natronlauge zugegeben und wiederum der pH-Wert gemessen. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und die Ergebnisse in **Tab. 1** und **Tab. 2** dargestellt.

<i>Tweezer-Rezeptoren</i>	<i>Guanidinio-Gruppe</i>
62 (Bn-CBS-Et)	6.45
63 (Bn-CBS-Phe)	6.30
64 (Bn-CBS- β -Ala)	6.25
65 (Bn-CBS- β -Dipeptid)	6.30
66 (Bn-CBS- β -Ala-Cbz)	6.25
67 (Bn-CBS- β -Ala-Dns)	6.20
72 (Val-CBS- β -Dipeptid)	6.25
75 (Phe-CBS- β -Ala-Dns)	6.20

Tab. 1 pK_S -Werte der Tweezer-Rezeptoren **62** bis **67** sowie **72** und **75**.

Die pK_S -Werte der Tweezer-Rezeptoren liegen zwischen 6.20 und 6.45, die der getesteten Substrate zwischen 1.90 und 4.75 (**Tab. 2**). Somit garantiert während der Titrationsexperimente der eingestellte pH-Wert von 6.00, dass die Carbonsäurefunktion(en) der Substrate deprotoniert sind und die Rezeptoren weitgehend protoniert vorliegen.

<i>Substrat</i>		<i>pK_S 1</i>	<i>pK_S 2</i>
Ac-L-Ala	A	2.30	-
Ac-L-Val	B	2.30	-
Ac-L-Phe	C	2.60	-
Ac-L-Asp	D	1.90	3.65
Ac-L-Glu	E	2.20	4.25
Ac-L-Trp	F	2.20	-
Folsäure	G	2.70	4.10
L-Dopa	H	2.30	-
Hippursäure	I	3.66	-
Zimtsäure	K	4.44	-
Kaffeensäure	L	4.72	-

Tab. 2 pK_S -Werte der Substrate der Mono- bzw. Dicarboxylate.^[98]

Als Messmethode wurde die UV-Spektroskopie gewählt. Sie erlaubt Messungen in verschiedenen Lösemittelsystemen mit geringem Substanzverbrauch. Weiterhin ist die Verwendung eines Puffers unproblematisch, sodass pH-Schwankungen und Protonierungsreaktionen ausgeschlossen werden können. Standardmäßig wurden die Bindungsstudien in einem wässrigen System mit 40 % Dimethylsulfoxid durchgeführt. Für die UV-Titrationen wurden Lösungen der Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren mit einer Konzentration von $7 \cdot 10^{-5}$ M hergestellt. Hierbei lag die Absorption der Pyrrol-Bande bei 300 nm in einem optimalen Bereich zwischen 0.9 und 1.7. Die Substrate wurden in einer Konzentration von 2 mM verwendet. Der Bis-Tris-Puffer (pK_S -Wert 6.4) wurde in einer Konzentration von 5 mM

eingesetzt. Die jeweiligen Lösungen wurden anschließend mittels Salzsäurelösung bzw. Natronlauge auf einen pH-Wert von 6.00 eingestellt. Die niedriger konzentrierten Rezeptorlösungen wurden zur Titration vorgelegt und feste Aliquote der Substrate zutitriert. Nach jeder Zugabe nahm man ein UV-Spektrum von 250 bis 340 nm auf. Mittels Lambert-Beerschem Gesetz konnte die Verdünnung und über eine nichtlinearer Kurvenanpassung der Messwerte für eine 1:1-Komplexierung die Bindungskonstante berechnet werden (siehe **2.3 Bestimmung von Bindungskonstanten**). Die Komplexstöchiometrie wurde in unabhängigen Experimenten nach der „Methode der kontinuierlichen Veränderung“, auch Job-Plot genannt, mittels Fluoreszenz- und NMR-Spektroskopie bestimmt (siehe **2.4 Bestimmung der Bindungstöchiometrie**).^[99, 100]

In **Abb. 59** ist eine typische Titration des Tweezer-Rezeptors **67** (Bn-CBS- β -Ala-Dns) mit *L*-Alanin **A** in wässrigem Medium zu sehen. Aus der Abweichung von der Verdünnung wird die Bindungskonstante berechnet.

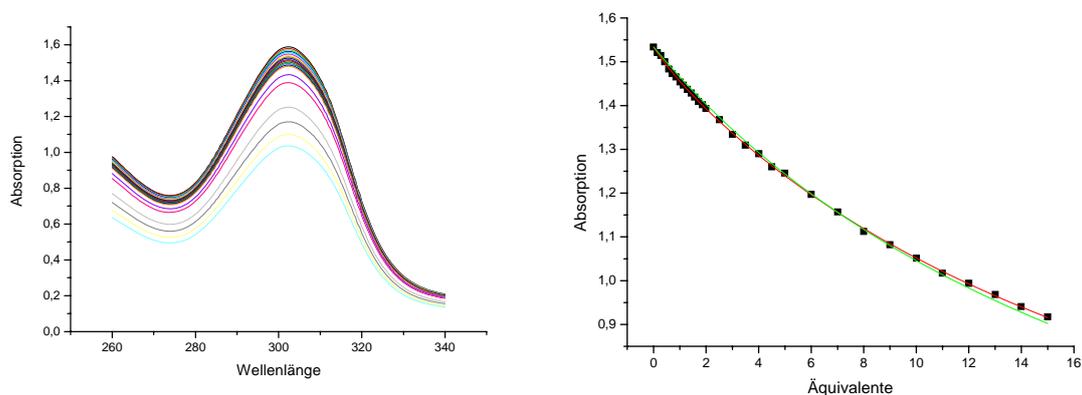


Abb. 59 Links: Überlagerte UV-Absorptionsspektren der Titration des Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptors **67** (Bn-CBS- β -Ala-Dns) mit *L*-Alanin **A** in wässrigem Medium. Rechts: Bindungsisotherme (rot) und berechnete Verdünnungskurve bei 300 nm (grün).

Zur Auswertung der UV-Spektren wurden die molaren Extinktionskoeffizienten der Tweezer-Rezeptoren **63**, **66**, **67**, **72** und **75** sowie der oxo-anionischen Substrate bei einer Wellenlänge von $\lambda = 300$ nm ermittelt. Nur für die Folsäure **G**, die Zimtsäure **K** und die Dihydroxymizsäure (Kaffeensäure) **L** wurden diese Werte nicht bestimmt, da ihre Eigenabsorption zu hoch für die UV-Bindungsstudien ist. Die molaren Extinktionskoeffizienten erhält man aus einem Verdünnungsexperiment, bei dem die Rezeptoren und Substrate in der gleichen Konzentration wie bei der Titration zur Bestimmung der Bindungskonstanten ($[R] = 70 \mu\text{M}$, $[S] = 1.5 \text{ mM}$)

vorgelegt werden und mit festen Aliquoten des Lösemittels versetzt werden. Nach jeder Zugabe wurden Absorptionsspektren aufgenommen. Anschließend wurden die Absorptionswerte bei $\lambda = 300$ nm gegen die Konzentration aufgetragen. Die Steigung der Ausgleichsgeraden durch diese Punkte entspricht dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ . Hierbei kann auch gleichzeitig die Gültigkeit des Lambert-Beerschem Gesetzes überprüft werden. Eine signifikante Abweichung der Messwerte von der linearen Ausgleichsgeraden (z. B. ein polynomischer Verlauf) würde gegen die Gültigkeit sprechen. Dieses Problem wurde bei 300 nm hier aber nicht beobachtet. Die molaren Extinktionskoeffizienten der Substrate sind alle Null (**Tab. 3**). Dies ist auch logisch, da die Oxo-Anionen bei der beobachteten Wellenlänge keine Absorption zeigen. Eigentlich wären ebenfalls die molaren Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Komplexe notwendig. Da diese aber experimentell nicht bestimmt werden können, müssen sie durch nichtlineare Kurvenanpassung bei der Bestimmung der Bindungskonstanten berechnet werden.

<i>Tweezer-Rezeptor</i>	ϵ_R in $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$	<i>Substrate</i>	ϵ_S in $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$
63 (Bn-CBS-Phe)	24500	Ac-L-Ala A	0
66 (Bn-CBS- β -Ala-Cbz)	24900	Ac-L-Val B	0
67 (Bn-CBS- β -Ala-Dns)	25100	Ac-L-Phe C	0
72 (Val-CBS- β -Dipeptid)	23300	Ac-L-Asp D	0
75 (Phe-CBS- β -Ala-Dns)	22200	Ac-L-Glu E	0
		Ac-L-Trp F	0
		L-Dopa H	0
		Hippursäure I	0

Tab. 3 Molare Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{R/S}$ der Tweezer-Rezeptoren **63**, **66**, **67**, **72** und **75** sowie der oxo-anionischen Substrate bei einer Wellenlänge von $\lambda = 300$ nm. Folsäure **G**, Zimtsäure **K** und Dihydroxymzimsäure (Kaffeesäure) **L** sind nicht aufgeführt, da ihre Eigenabsorption zu hoch für die UV-Bindungsstudien ist.

In der Überlagerung der UV-Spektren der einfachen acetylierten Aminosäuren wie beispielsweise in **Abb. 59** für den Tweezer-Rezeptors **67** (Bn-CBS- β -Ala-Dns) mit *L*-Alanin **A** sind keine isosbestischen Punkte zu erkennen. Anders verhält es sich bei den Titrationsen in der **Abb. 60** des Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptor **63** (Bn-CBS-Phe) mit *L*-Dopa **H** und mit Hippursäure **I**, bei denen jeweils ein isosbestischer Punkt bei einer Wellenlänge von 296 nm bzw. 278 nm erscheint. Isosbestische Punkte sind invariante Kreuzungspunkte, die sich bei der Überlagerung von Spektren ergeben. An diesem Punkt ändern sich die molaren Extinktionskoeffizienten zweier absorbierender/fluoreszierender Spezies proportional zueinander. Das Auftreten solcher Punkte ist in der Spektroskopie i. A. ein Indiz für einen

linearen Zusammenhang der Konzentrationsänderung nebeneinander vorliegender Spezies, die unterschiedliche Absorptions- bzw. Emissionsmaxima aufweisen. In der Rezeptor-Substrat-Chemie weist ein isosbestischer Punkt auf ein im Gleichgewicht befindliches System von freiem Rezeptor und einem wohl-definierten Rezeptor-Substrat-Komplex mit Bevorzugung eines Bindungsmodus hin.^[101, 102] Bei unseren Systemen sind solche isosbestischen Punkte nicht zu erwarten, da durch die Komplexbildung der Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren keine neue Absorptions- bzw. Fluoreszenzbande auftritt, sondern lediglich eine Intensitätsänderung einer vorhandenen Bande die Folge ist. Neue Banden aufgrund von Komplexbildung treten insbesondere bei der Bildung von Charge-transfer-Komplexen auf. Im Unterschied zu den Elektronen-Donor-Akzeptor-Komplexen geht hierbei die negative Ladung reversibel vom Donor zum Akzeptor über. Die beiden in **Abb. 60** beobachteten isosbestischen Punkte sind nicht das Ergebnis einer Überlagerung der Absorptionsspektren von freiem und komplexiertem Rezeptor, was Hinweis auf eine Assoziation geben würde, als vielmehr auf die Überlagerung der Absorptionsspektren des Rezeptors und des Substrates zurückzuführen. Damit liefern diese isosbestischen Punkte keine Interpretationsgrundlage hinsichtlich einer Komplexbildung.

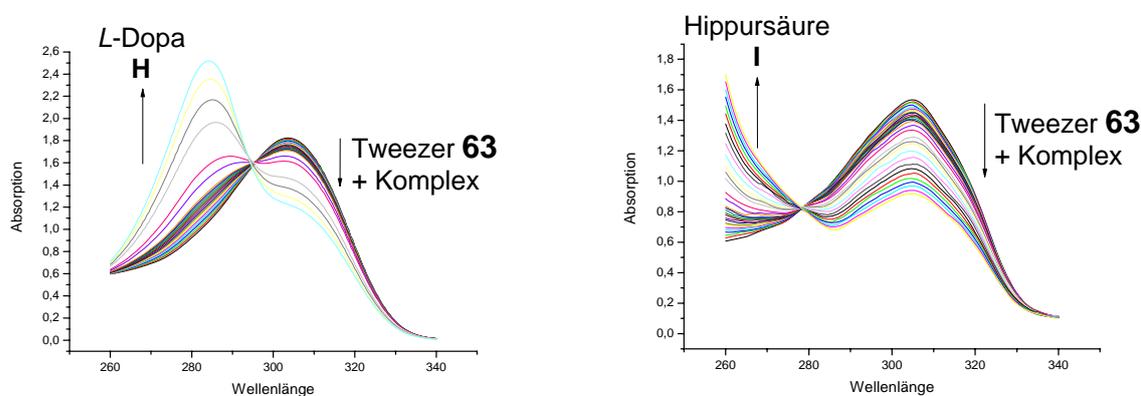
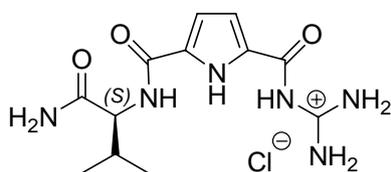


Abb. 60 Überlagerte UV-Absorptionsspektren der Titrations des Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptors **63** (Bn-CBS-Phe) mit *L*-Dopa **H** (links) und mit Hippursäure **I** (rechts) in wässrigem Medium. Bei Wellenlängen von 296 nm (links) bzw. 278 nm (rechts) sind isosbestische Punkte zu sehen. Diese haben mit der Komplexbildung aber nichts zu tun. Die Absorption des Komplexes liegt wie die des freien Rezeptors **63** bei 300 nm.

Die Messergebnisse der UV-Bindungsstudien für die Tweezer-Rezeptoren **63**, **66**, **67**, **72** und **75** gegenüber acetylierten Aminosäurecarboxylaten sind in **Tab. 4** und in

Abb. 62 dargestellt. Die Daten zeigen gute Bindungskonstanten in wässrigem System. Diese liegen im Bereich des einfachen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptors **76** (Val-CBS, **Abb. 61**, $K_{\text{Ass}} < 1500 \text{ M}^{-1}$).^[6] Mittels UV-Messungen sind diese Bindungskonstanten gerade noch

bestimmbar, obwohl der verwendete Konzentrationsbereich der Rezeptoren am unteren Limit liegt (siehe **2.3 Bestimmung von Bindungskonstanten**). Bei einigen Systemen war die Assoziationskonstante jedoch so gering, dass eine Bestimmung nicht möglich war. Eine signifikante Enantioselektivität wurde für die Tweezer-Rezeptoren nicht gefunden. In der Tabelle ist zu erkennen, dass *L*-Alanin **A** und *L*-Valin **B** von den Rezeptoren **63** (Bn-CBS-Phe), **66** (Bn-CBS- β -Ala-Cbz) und **67** (Bn-CBS- β -Ala-Dns) gleich stark bzw. schwach gebunden werden mit $K_{\text{Ass}} \approx 1400 \text{ M}^{-1}$. Eine Substratspezifität ist hierbei nicht zu erkennen. Eine in etwa doppelt so starke Komplexierung zeigen die beiden Rezeptoren **63** und **66** bei der Komplexierung der Dicarboxylate *L*-Aspartat **D** und *L*-Glutamat **E** mit einer Assoziationskonstanten von $K_{\text{Ass}} \approx 3100 \text{ M}^{-1}$. Eine Substratspezifität gibt es hierbei ebenfalls nicht. Die Erhöhung der Komplexierungsstärke ist im Wesentlichen wohl auf die zusätzliche Ladung im Substrat und damit auf eine weitere Ionenbrücke zurückzuführen. Besser als eine zusätzliche ionische Bindungsstelle im Substrat wirkt sich das Vorhandensein eines Aromaten aus. Hier zeigt *L*- bzw. *D*-Phenylalanin **C** bzw. **C'** die stärkste Assoziation. Während der Rezeptor **63** (Bn-CBS-Phe) eine gute Komplexierung für *L*-Phenylalanin **C** und *D*-Phenylalanin **C'** von $K_{\text{Ass}} = 4450 \text{ M}^{-1}$ und $K_{\text{Ass}} = 5250 \text{ M}^{-1}$ zeigt, ist die Komplexierung für den Rezeptor **66** (Bn-CBS- β -Ala-Cbz) mit $K_{\text{Ass}} = 7800 \text{ M}^{-1}$ und $K_{\text{Ass}} = 10400 \text{ M}^{-1}$ fast doppelt so stark. Auch ist bei beiden Rezeptoren eine leichte Bevorzugung von *D*-Phenylalanin **C'** ersichtlich. Für den Rezeptor **75** (Phe-CBS- β -Ala-Dns) ist ebenfalls eine starke Komplexierung von *L*-Phenylalanin **C** mit $K_{\text{Ass}} = 5700 \text{ M}^{-1}$ gefunden worden. Damit ist der Einfluss aromatischer π - π -Wechselwirkungen ein entscheidender Faktor, gerade in polaren wässrigen Systemen. Für die Aminosäure Ac-*L*-Tryptophan **F** waren keine UV-Bindungsstudien möglich, da dessen Eigenabsorption die Pyrrol-Bande der Rezeptoren zu stark überlagerte.



76 (Val-CBS)

Abb. 61 Einfacher Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **76** (Val-CBS) zum Vergleich der Bindungskonstanten. Für einfache Aminosäurecarboxylate zeigt dieser Rezeptor Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} < 1500 \text{ M}^{-1}$.^[6]

Tweezer Rezeptor	L-Ala A	D-Ala A'	L-Val B	L-Phe C	D-Phe C'	L-Asp D	L-Glu E	L-Trp F
63 (Bn-CBS-Phe)	1000	n. d.	1800	4450	5250	3350	1950	n. d.
66 (Bn-CBS- β -Ala-Cbz)	1700	n. d.	1100	7800	10400	2900	4100	n. d.
67 (Bn-CBS- β -Ala-Dns)	< 1000	n. d.	< 1000	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
72 (Val-CBS- β -Dipeptid)	2700	3100	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
75 (Phe-CBS- β -Ala-Dns)	< 1000	n. d.	< 1000	5700	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Tab. 4 Bindungskonstanten K_{Ass} in M^{-1} der Tweezer-Rezeptoren **63**, **66**, **67**, **72** und **75** gegenüber *N*-acetylierten Aminosäurecarboxylaten, ermittelt durch UV-Titrationsexperimente.

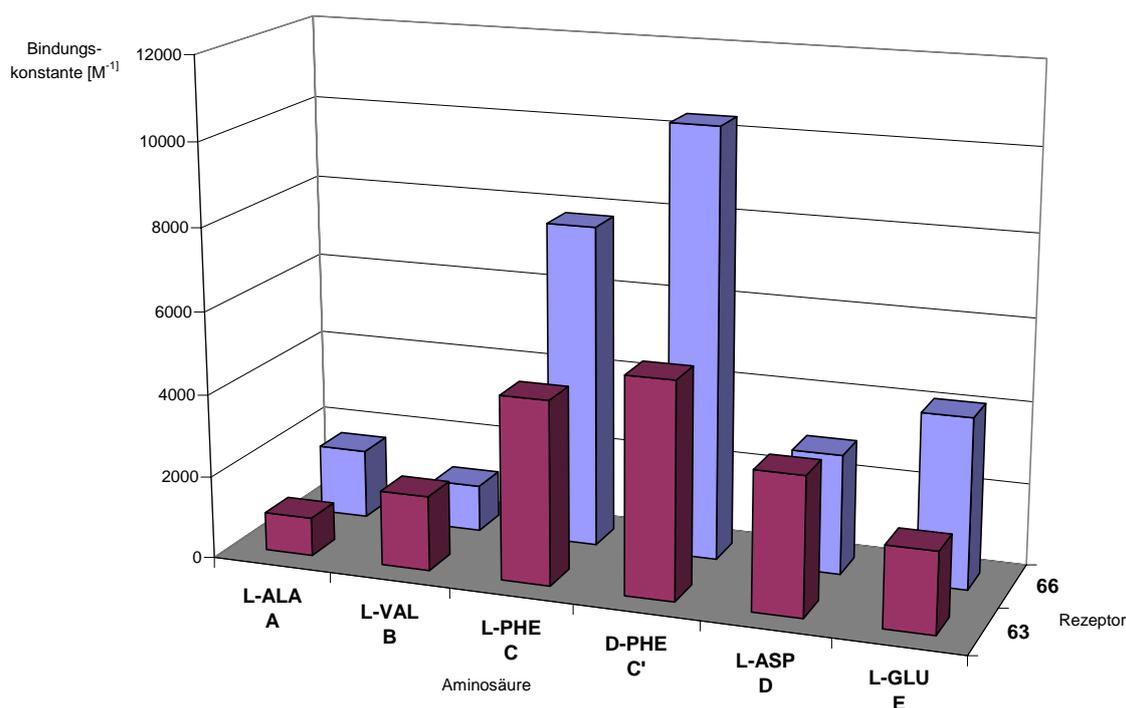


Abb. 62 Graphische Darstellung der Bindungskonstanten der Rezeptoren **63** (Bn-CBS-Phe) und **66** (Bn-CBS- β -Ala-Cbz) von **Tab. 4**

Die hohe Bindungskonstante der Tweezer-Rezeptoren gegenüber *L*-Phenylalanin **C** ist im Wesentlichen auf zusätzliche Kation- π -Wechselwirkungen (2.2 Grundlagen der Komplex-Bildung) der positiven Ladung der Guanidiniocarbonylpyrrol-Einheit des Rezeptors mit dem Benzolring der Aminosäure sowie π - π -Wechselwirkungen der beiden Aromaten zurückzuführen. In den **Abb. 64** bis **Abb. 66** sind berechnete energieminierte Strukturen (mittels Monte Carlo Konformationssuche von Macromodel 8.0, Amber* Kraftfeld, GB/SA Solvation von Wasser)^[103] der Tweezer-Rezeptoren **63** (Bn-CBS-Phe), **66** (Bn-CBS- β -Ala-Cbz) und **67** (Bn-CBS- β -Ala-Dns) gezeigt. Dabei zeigen in **Abb. 64** und **Abb. 66** die Rezeptoren **63** und **67** die aromatische π - π -Wechselwirkung des Pyrrols mit dem Phenylring des Substrates, während der Rezeptor **66** in **Abb. 65** die Kation- π -Wechselwirkung zwischen der Guanidinio-

Einheit und dem Phenylring vom *L*-Phenylalanin **C** bevorzugt. Bei den beiden einfachen Tweezer-Rezeptoren **63** und **66** ist weiterhin eine zusätzliche π - π -Wechselwirkung der Benzylgruppe des Rezeptors mit der Methylgruppe des Ac-*L*-Phenylalanins **C** zu erkennen. Diese ergibt eine zusätzliche Stabilisierung, bei der ein Proton der Methylgruppe in der *edge-to-face*-Anordnung senkrecht zum Phenylring ausgerichtet ist.

Über die Beteiligung des zusätzlichen Seitenarms an der Komplexierung erhält man durch die theoretischen Berechnungen und die experimentell gemessenen Bindungskonstanten widersprüchliche Aussagen. Im berechneten Komplex von Rezeptor **63** (Bn-CBS-Phe) mit Phenylalanin **C** in **Abb. 64** nimmt der Seitenarm an der Komplexierung teil. Hier ist eine zusätzliche *edge-to-face*-Anordnung der beiden Phenylringe von Rezeptor und Substrat zu sehen, was eine weitere Stabilisierung durch π - π -Wechselwirkungen bedeuten sollte. Bei der Assoziation von Rezeptor **66** (Bn-CBS- β -Ala-Cbz) in **Abb. 65** nimmt der Seitenarm jedoch nicht an der Komplexierung teil. Stattdessen findet eine intramolekulare Kation- π -Wechselwirkung zwischen dem Phenylring des Rezeptors und der Guanidinio-Einheit statt. Falls aber eine zusätzliche Wechselwirkung des Seitenarms des Rezeptors mit dem Substrat zu einer besseren Komplexierung führen sollte, so müsste Rezeptor **63** (Bn-CBS-Phe) auch experimentell eine stärkere Assoziation zu Phenylalanin **C** und **C'** zeigen als der Tweezer-Rezeptor **66**. Im Experiment findet man jedoch für den Rezeptor **66** eine fast doppelt so starke Komplexierungskonstante. Möglicherweise wird die zusätzliche π - π -Wechselwirkung des Seitenarms von **63** mit *L*-Phenylalanin **C**, die aus der theoretischen Berechnung hervorgeht, überbewertet und ist für die Komplexierung kaum von Bedeutung.

Intramolekulare Wechselwirkungen sind bei einer Assoziation i. a. ungünstig bezüglich des Komplexierungsverhaltens und müssen erst gelöst werden. Dieses Phänomen der intermolekularen Wechselwirkungen wurde auch von *Rehm* bei der Selbstassoziation von Guanidiniocarbonylpyrrol-Carboxylat-Zwitterionen beschrieben.^[11] Bei geeigneter Linkerlänge zwischen positiver und negativer Ladung findet entweder eine intramolekulare Ringbildung statt, die im Gleichgewicht mit der Ausbildung kleiner dimerer Aggregate steht (**Abb. 63**). Auch *K. L. Mardis* fand den Effekt der intramolekularen Komplexierung von Diaminen mit Dicarboxylaten.^[104]

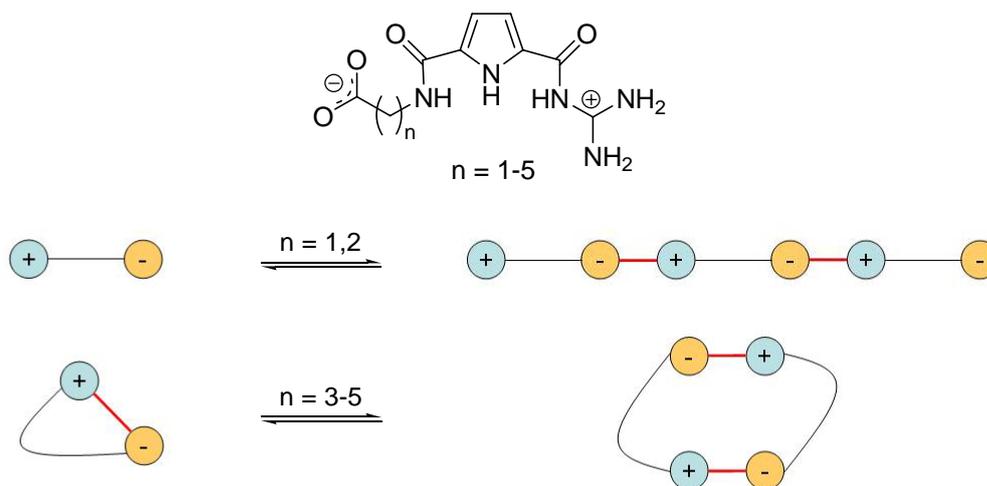


Abb. 63 Selbstassoziation von Guanidiniocarbonylpyrrol-Carboxylat-Zwitterionen. Je nach Abhängig von der Linkerlänge findet eine lineare, kettenartige Assoziation oder die Formation kleine Aggregate statt. Bei kurzen Linkern liegen die Monomere unkomplexiert, bei längeren als intramolekulare Assoziante vor.

Ein Grund für die unterschiedlichen Bindungsmodi liegt wohl bei den Rezeptoren in der Distanz der Phenylringe zur Guanidinio-Einheit. Während in Rezeptor **63** (Bn-CBS-Phe) der Abstand zwei Kohlenstoffatome beträgt, sind es im Rezeptor **66** (Bn-CBS- β -Ala-Cbz) schon sechs Atome. Der durch die zwei Atome gebildete Spacer reicht gerade dafür aus, eine zum Substrat-Phenylring senkrechte Wechselwirkung aufzubauen, während er für eine intramolekulare Wechselwirkung viel zu kurz ist. Im Rezeptor **66** verhält es sich gerade umgekehrt. Für eine *edge-to-face*-Wechselwirkung mit dem Substrat-Phenylring ist der Spacer mit sechs Atomen zu lang, sodass eine intramolekulare Wechselwirkung günstiger wird. Das gleiche Phänomen der intramolekularen Wechselwirkungen zeigt auch der Tweezer-Rezeptor **67** (Bn-CBS- β -Ala-Dns) in **Abb. 66**. Auch hier leistet der zusätzliche an der Guanidinio-Einheit N' -alkylierte Seitenarm keinen Beitrag zu Assoziation hinsichtlich Bindungsstärke und Selektivität.

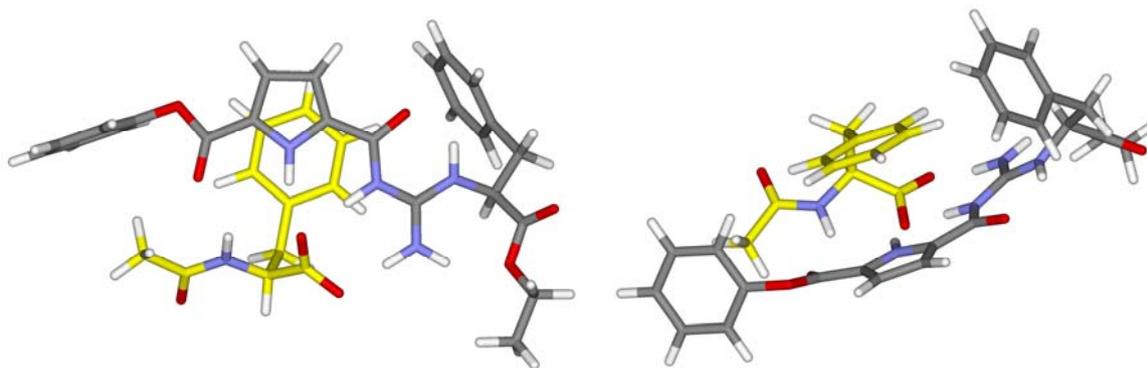


Abb. 64 Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von **63** (Bn-CBS-Phe) mit *L*-Phenylalanin C.

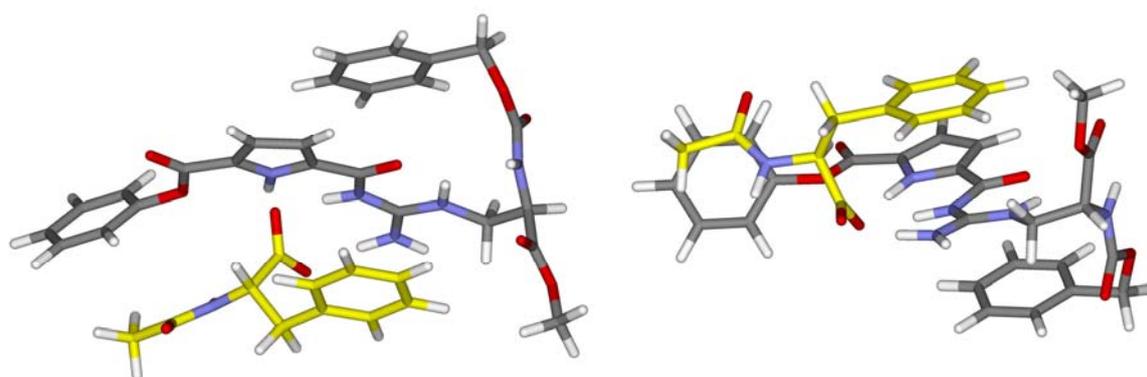


Abb. 65 Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von **66** (Bn-CBS- β -Ala-Cbz) mit *L*-Phenylalanin C.

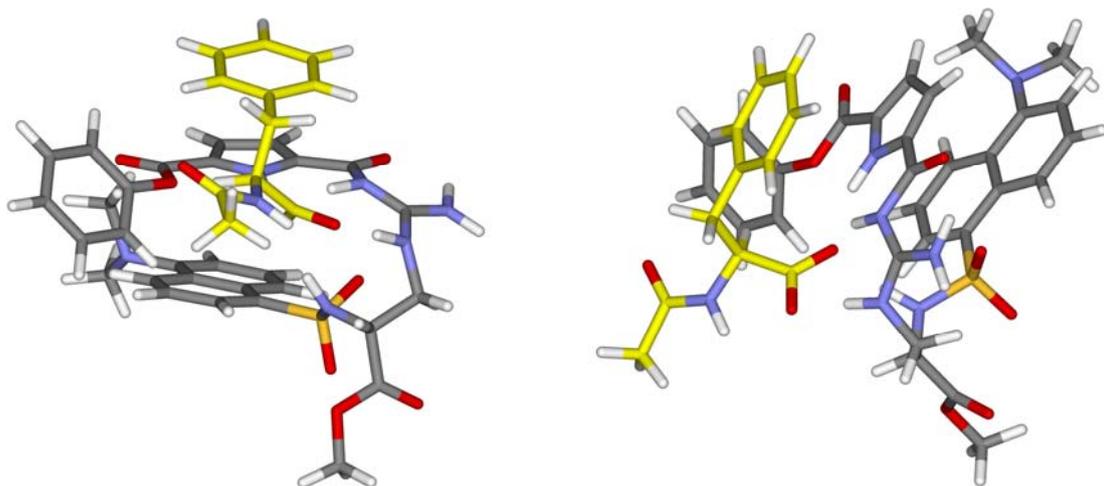


Abb. 66 Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von **67** (Bn-CBS- β -Ala-Dns) mit *L*-Phenylalanin C.

Im Großen und Ganzen zeigen die verschiedenen Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren gute Komplexierungskonstanten zu *N*-acetylierten Aminosäurecarboxylaten.

Auch sind sie substratspezifisch dahingehend, dass verschiedene Aminosäuren unterschiedlich stark gebunden werden. Jedoch ist kaum ein Unterschied in der Komplexierung bei den verschiedenen Rezeptoren, also in der Variation der unterschiedlichen *N'*-Alkylierung im Seitenarm, festzustellen. Die Bindungskonstanten sind vergleichbar mit dem Vergleichsrezeptor **76** (Val-CBS). Hier beruht die Assoziation nur auf der Guanidinio-Einheit. Einen zusätzlichen Seitenarm besitzt dieser Rezeptor nicht. Dies könnte darauf hindeuten, dass der neu eingeführte Seitenarm der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren möglicherweise kaum oder gar nicht an der Komplexierung teilnimmt. Dieses Bild der Komplexierung liefern auch die berechneten Strukturen in **Abb. 65** und **Abb. 66**, bei denen der Seitenarm nicht mit dem Substrat wechselwirkt. In **Abb. 67** sind die erwarteten und die wahrscheinlicheren, aus den Messungen und Berechnungen abgeleiteten, schematischen Strukturen der Komplexierung des Tweezer-Rezeptoren-Typs **22** bzw. **22'** gezeigt. Hierbei übt der Seitenarm weder einen Einfluss auf die Komplexstabilität noch auf die Selektivität aus, da er sich wegdreht und vom Lösemittel solvatisiert wird.

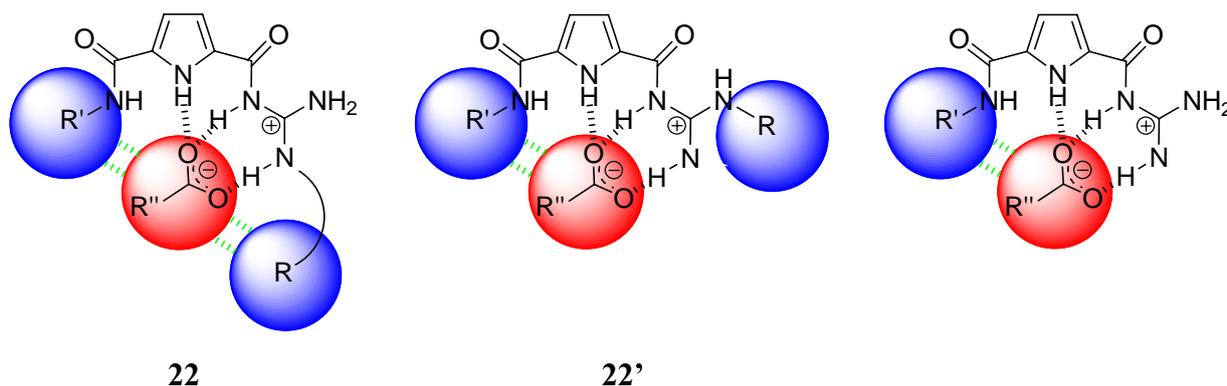


Abb. 67 Schematische Struktur der Komplexierung der Tweezer-Rezeptoren: erwartete (links) und wahrscheinlichere (Mitte) Geometrie des Seitenarms der Rezeptoren des Typs **22** bzw. **22'** aufgrund der Bindungsstudien und der Berechnungen. Damit entsprechen die Tweezer-Rezeptoren den Komplexierungseigenschaften der *N'*-unsubstituierten Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren (rechts). Dies gilt analog für den Rezeptortyp **21**. Grün gestrichelt sind mögliche nichtkovalente Wechselwirkungen. R, R' und R'' sind Aminosäuren bzw. Aminbausteine.

Bei den UV-Bindungsstudien zeigten die Folsäure **G**, die Zimtsäure **K** und die Dihydroxizimtsäure **L** im beobachteten Wellenlängenbereich von 260 bis 340 nm eine derart starke Absorption, sodass die Pyrrol-Bande der Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren vollständig überlagert wurden. Außerdem wurden die Messgrenzen des UV-Gerätes überschritten. Dadurch war es nicht möglich, auswertbare UV-Titrationsspektren zu erhalten (**Abb. 68** und **Tab. 5**).

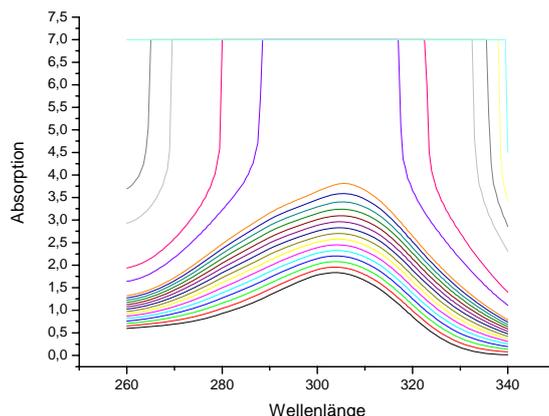


Abb. 68 Überlagerte UV-Absorptionsspektren der Titration des Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptors **63** (Bn-CBS-Phe) mit Kaffeesäure **L** in wässrigem Medium. Anstatt einer Abnahme der Pyrrol-Bande ist aufgrund der starken Absorption des Substrates eine Zunahme der Absorption zu sehen, die die Messgrenzen des UV-Gerätes überschreitet.

Die Tweezer-Rezeptoren **63** (Bn-CBS-Phe) und **66** (Bn-CBS- β -Ala-Cbz) zeigen gegenüber *L*-Dopa **H** und Hippursäure **I** stärkere Komplexbildungen als gegenüber den einfachen nichtaromatischen Aminosäuren *L*-Alanin **A** und *L*-Valin **B**. Jedoch reicht deren Komplexstabilität nicht an die von *L*-Phenylalanin **C**. Dies unterstreicht die besondere Assoziations-eigenschaft der Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren gegenüber der Aminosäure Phenylalanin.

Tweezer-Rezeptor	Folsäure G	Zimtsäure K	Kaffeesäure L	<i>L</i>-Dopa H	Hippursäure I
63 (Bn-CBS-Phe)	n. d.	n. d.	n. d.	1950	3350
66 (Bn-CBS- β -Ala-Cbz)	n. d.	n. d.	n. d.	4100	2900
72 (Val-CBS- β -Dipeptid)	n. d.	n. d.	n. d.		
75 (Phe-CBS- β -Ala-Dns)	n. d.	n. d.	n. d.		

Tab. 5 Bindungskonstanten K_{Ass} in M^{-1} der Tweezer-Rezeptoren **63**, **66**, **72** und **75** gegenüber verschiedenen Carboxylaten, ermittelt durch UV-Titrationsexperimente.

Ferner wurden die Komplexbildungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren mittels Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht.^[105] Dazu wurden Fluoreszenz-Titrationsexperimente bei synchroner Anregungsmethode durchgeführt. Bei dieser Art der Spektrenaufnahme wird der Abstand von der Anregungswellenlänge und der detektierten Emissionswellenlänge konstant gehalten. Der Vorteil dabei ist die Ausschaltung von Störungen durch Raman- und Rayleighstreuung, u. a. hervorgerufen durch das verwendete Lösemittel (z. B. Wasser). Insbe-

sondere wird dadurch auch der bei der klassischen Aufnahme von Emissions-Spektren bei konstanter Anregungswellenlänge auftretende Peak der Anregungswellenlänge vermieden.^[73] Dadurch erhält man eine signifikante Verbesserung der Messung hinsichtlich Empfindlichkeit und Messfehlerbreite.^[106, 107] Bei den Fluoreszenz-Messungen wurden die Intensitäten der Lichtemission zwischen 250 und 450 nm aufgenommen. Für den konstanten Abstand zwischen Anregungs- und Detektionswellenlänge wurde die optimale Differenzwellenlänge ermittelt. Dazu wurden Fluoreszenz-Spektren des Rezeptors mit verschiedenen Differenzwellenlängen zwischen $\Delta\lambda = 5$ nm und $\Delta\lambda = 30$ nm aufgenommen. Als Kriterien für die optimale Differenzwellenlänge dienten in erster Linie die Emissionsintensität und sauber unterscheidbare Emissionsbanden. Nach diesem Verfahren erhielt man eine bestmögliche Differenzwellenlänge von $\Delta\lambda = 20$ nm.

Schon das Pyrrol-Grundgerüst zeigt bei $\lambda_{Em} = 335$ nm ausreichende Fluoreszenz. Aber auch gerade für eine solche Untersuchungsmethode wurden Tweezer-Rezeptoren mit der Dansylgruppe entwickelt. Dabei sollte die Dansylgruppe bei einer Anregungswellenlänge von etwa $\lambda_{Ex} = 330$ nm eine Fluoreszenzbande bei einer Emissionswellenlänge von etwa $\lambda_{Em} = 520$ nm zeigen. Als Lösemittel wurde 40 % Methanol in Wasser mit einem Bis-Tris-Puffer bei pH = 6.00 verwendet. Die Konzentrationen der Rezeptorlösungen lagen bei $[R] = 70 \mu\text{M}$, die der Substratlösungen bei $[S] = 0.15$ mM und die des Puffers bei $[\text{Bis-Tris-Puffer}] = 10$ mM. Die experimentell bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Em} = 388$ nm sind für den Tweezer-Rezeptor **63** (Bn-CBS-Phe) $\varepsilon = 1.50 \cdot 10^7 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ und für den Tweezer-Rezeptor **75** (Phe-CBS- β -Ala-Dns) $\varepsilon = 1.02 \cdot 10^7 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Die Substrate Folsäure **G**, die Zimtsäure **K** und die Dihydroxymimtsäure **L** besitzen hierbei keine Fluoreszenzaktivität.

Als Substrate wurden vor allem die Folsäure **G**, die Zimtsäure **K** und die Dihydroxymimtsäure **L** untersucht. Diese Substrate waren aufgrund ihrer starken UV-Absorption für UV-Bindungsstudien ungeeignet. Die Bindungskonstanten K_{Ass} der Tweezer-Rezeptoren **63** und **75** mit den Aminosäurecarboxylaten *L*-Alanin **A**, *L*-Valin **B** und *L*-Phenylalanin **C** aus Fluoreszenz-Titrationen waren entweder kleiner als 1000 M^{-1} oder nicht ermittelbar. Damit liegen die Bindungskonstanten in einem ähnlichen Bereich wie bei den UV-Messungen. Hingegen wurden sehr starke Komplexbildungen der Rezeptoren **63** und **75** mit der Folsäure **G** und der Kaffeesäure **L** gefunden.

Bei Zugabe der Folsäure **G** nehmen die Fluoreszenzbanden bei $\lambda_{Em} = 335$ nm und $\lambda_{Em} = 388$ nm stark ab. Diese Abnahme ist deutlich stärker, als sie aufgrund der Verdünnung zu erwarten wäre. Die Komplexbildung resultiert demnach in einer verstärkten Abnahme der Fluoreszenz-Intensitäten. Die Bande bei $\lambda_{Em} = 388$ nm wird analog der UV-Titrationspektren ausgewertet, indem man unter Berücksichtigung der Verdünnung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptors **63** bzw. **75** die Bindungsisotherme mittels nichtlinearer Kurvenanpassung berechnet.

<i>Tweezer-Rezeptor</i>	<i>Folsäure G</i>	<i>Zimtsäure K</i>	<i>Kaffeensäure L</i>
63 (Bn-CBS-Phe)	22500	n. d.	25700
75 (Phe-CBS- β -Ala-Dns)	16500	n. d.	n. d.

Tab. 6 Bindungskonstanten K_{Ass} in M^{-1} der beiden Tweezer-Rezeptoren **63** und **75** gegenüber Folsäure **G**, Zimtsäure **K** und Dihydroxizimtsäure **L**, ermittelt durch Fluoreszenz-Titrationsexperimente.

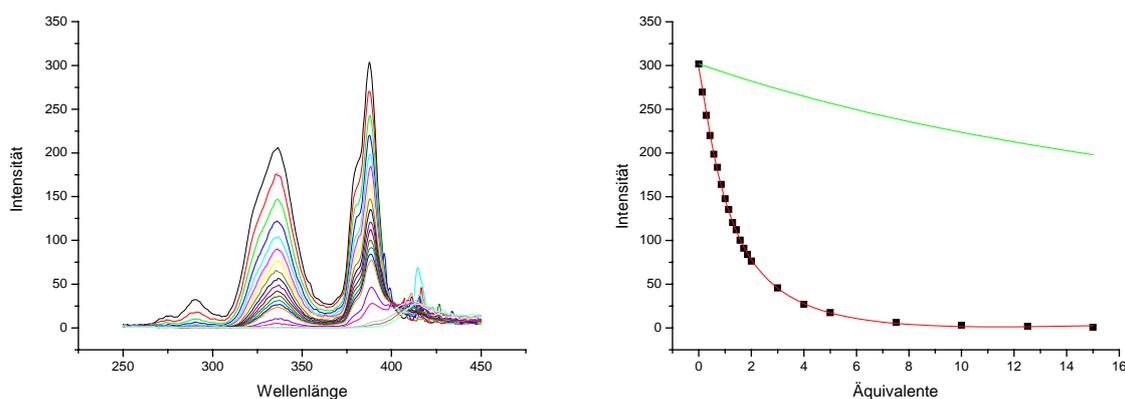


Abb. 69 Links: Fluoreszenz-Titrationsspektrum des Tweezer-Rezeptors **63** (Bn-CBS-Phe) mit Folsäure **G** bei synchroner Anregung mit $\Delta\lambda = 20$ nm; Rechts: Bindungsisotherme (rot) und berechnete Verdünnung (grün) bei $\lambda_{Em} = 388$ nm.

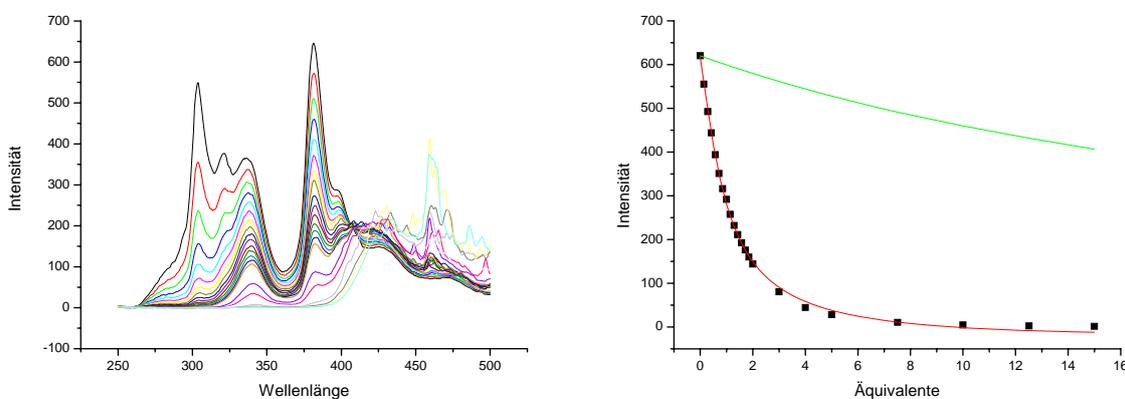


Abb. 70 Links: Fluoreszenz-Titrationsspektrum des Tweezer-Rezeptors **75** (Phe-CBS- β -Ala-Dns) mit Folsäure **G** bei synchroner Anregung mit $\Delta\lambda = 20$ nm; Rechts: Bindungsisotherme (rot) und berechnete Verdünnung (grün) bei $\lambda_{Em} = 388$ nm.

In der Überlagerung der Fluoreszenz-Spektren **Abb. 69** und **Abb. 70** sind keine isosbestischen Punkte zu erkennen. Damit liefern diese Spektren hinsichtlich der Auswertung solcher Punkte keinen Hinweis auf das Assoziationsverhalten bzw. das Vorliegen von freiem und komplexiertem Rezeptor im Gleichgewicht.

Da die Folsäure **G** ein Dicarboxylat ist, wäre auch eine 2:1-Komplexierung von Rezeptor und Substrat möglich. Deshalb wurde die Bindungsstöchiometrie in einem weiteren Experiment ermittelt. Dazu wurde ein Job-Plot (**2.4 Bestimmung der Bindungsstöchiometrie**) mit dem Tweezer-Rezeptor **63** (Bn-CBS-Phe) und der Folsäure **G** mittels Fluoreszenz-Spektroskopie angefertigt. Dieser ist in **Abb. 71** gezeigt und weist auf eine 1:1-Komplexierung hin. Eine 2:1-Komplexierung von Rezeptor **63** und der Folsäure **G** wurde nicht gefunden.

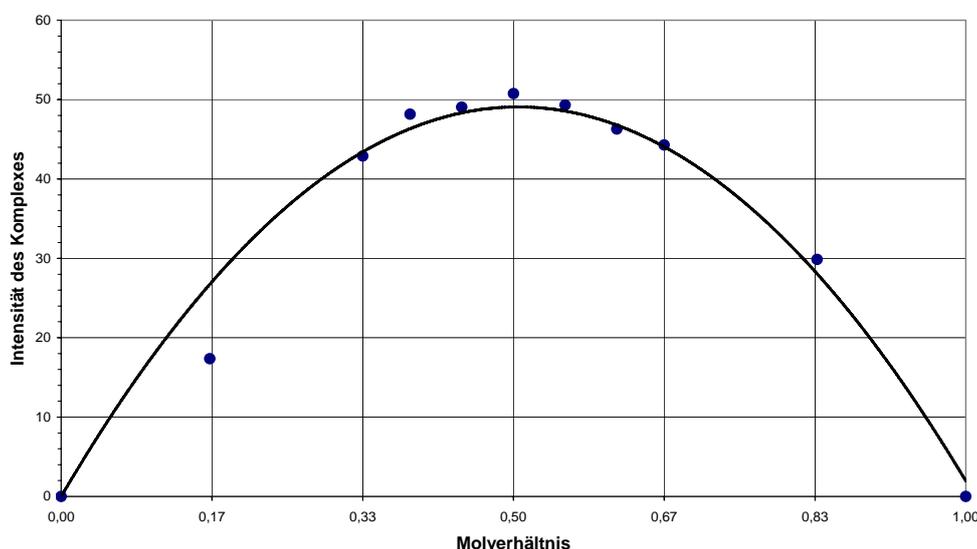


Abb. 71 Job-Plot der Fluoreszenz-Messungen des Tweezer-Rezeptors **63** (Bn-CBS-Phe) mit Folsäure **G** bei synchroner Anregung mit $\Delta\lambda = 20$ nm bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Em} = 388$ nm.

Die gefundenen Bindungskonstanten von $K_{Ass} = 1.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ bis $2.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ für die beiden Tweezer-Rezeptoren **63** (Bn-CBS-Phe) und **75** (Phe-CBS- β -Ala-Dns) gegenüber der Folsäure **G** und der Kaffeesäure **L** zeigen eine sehr starke Komplexierung in wässrigem Medium. Aus diesem Grund wurde die Komplexierung der Folsäure **G** näher untersucht. So wurden Fluoreszenz-Titrations auch mit den Bausteinen **G-1** bis **G-3** der Folsäure **G** (**Abb. 72**) durchgeführt, um die starke Abnahme der Fluoreszenz näher zu beleuchten. Quenching-Effekte der Titrationspartner, die zu einer solch starken Abnahme der Fluoreszenz-Intensität bei den Bindungsstudien führen könnten, konnten ausgeschlossen werden. Denn bei

Verdünnungsexperimenten zur Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten für die beiden Tweezer-Rezeptoren **63** und **75** und der Folsäure **G** wurde ein linearer Zusammenhang zwischen Intensität und Konzentration gefunden und damit die Einhaltung des Lambert-Beerschen Gesetzes bestätigt.

Bei Bindungsstudien zeigte Pterin **G-1** keine Assoziation zu den Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren **63** und **75**. Mit der 4-Aminobenzoesäure **G-2** wurden keine Bindungsstudien durchgeführt, da sie in der Folsäure **G** so eingebaut ist, dass sie keine geeignete Bindungsstelle für die beiden Rezeptoren besitzt. Lediglich aromatische π - π -Wechselwirkungen sind hierbei möglich. Jedoch muss man diese als innerhalb der Folsäure **G** eingebettet betrachten, da entscheidend für deren Einfluss die sterischen und geometrischen Gegebenheiten bei der Komplexierung sind. Somit würde eine Bindungsstudie sicher eine Assoziation zeigen, die aber so nicht ohne weiteres in Überlegung der Komplexierung der Rezeptoren mit Folsäure **G** einfließen kann. Die Glutaminsäure **G-3** wurde als das Dinatriumsalz von *N*-Ac-*L*-Glutamat **E** eingesetzt. Aus der Bindungsisotherme, die recht nah an der Verdünnungskurve lag, konnte jedoch keine Assoziationskonstante bestimmt werden.

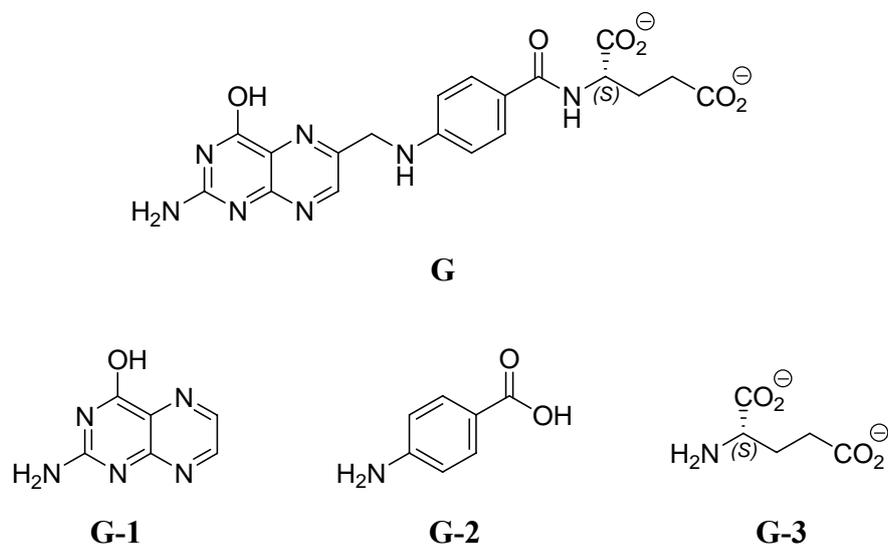


Abb. 72 Folsäure **G** und dessen inkrementellen Bestandteile: Pterin **G-1**, *p*-Aminobenzoesäure **G-2** und *L*-Glutaminsäure **G-3**.

Aus den Bindungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie wird deutlich, dass auch aromatische natürliche Verbindungen wie Folsäure **G** und Kaffeesäure **L** besonders stark durch die beiden Tweezer-Rezeptoren **63** (Bn-CBS-Phe) und **75** (Phe-CBS- β -Ala-Dns) in einem 1:1-Komplex gebunden werden. Durch weitere Experimente konnte gezeigt werden,

dass die Messergebnisse im Fall der Folsäure **G** keine Artefakte sind und zum Auftreten der starken Komplexierung das gesamte Folsäuremolekül von Bedeutung ist.

Auch die NMR-Spektroskopie wurde zur Untersuchung der Assoziation des Tweezer-Rezeptors **72** (Val-CBS- β -Dipeptid) mit verschiedenen acetylierten α -Aminosäurecarboxylaten eingesetzt. Als Lösemittel für die Titrationsexperimente wurde 40 % Wasser in DMSO- d_6 verwendet. Der erhöhte Anteil von DMSO wurde gewählt, um die erhaltenen Daten mit früheren Messungen von Rezeptor **76** (Val-CBS) einigermaßen vergleichen zu können. Trotzdem gab es Unterschiede in den Messbedingungen. Neben unterschiedlichen Konzentrationen und Titrationsschritten lag der Rezeptor **76** als Pikrat und die eingesetzten Aminosäuren als Tetramethylammoniumsalz vor, während bei den neueren Messungen mit dem Rezeptor **72** dieser als Chloridsalz eingesetzt wurde und die Aminosäurecarboxylate durch Einstellen des pH-Wertes der freien Aminosäuren auf pH = 6.00 generiert wurden. Aufgrund des protischen Lösemittelanteils von Wasser war es nötig, die ^1H -NMR-Spektren mittels Wasserunterdrückung (siehe **2.3 Bestimmung von Bindungskonstanten**) aufzunehmen. In **Abb. 73** sind zwei berechnete Bindungsisothermen aus der ^1H -NMR Titration des Rezeptors **72** (Val-CBS- β -Dipeptid) mit *L*-Alanin **A** gezeigt. Dabei wurden die CISs von zwei Amid-Protonen bei 8.29 ppm und bei 6.97 ppm verfolgt und gegen die Äquivalente an Substrat aufgetragen.

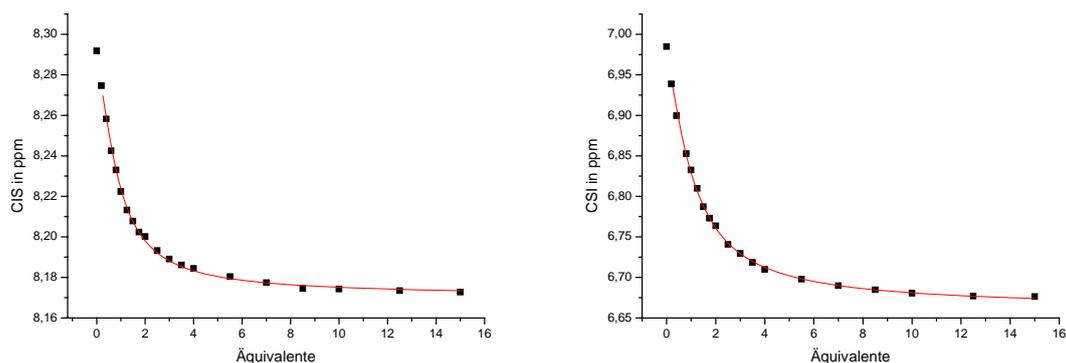
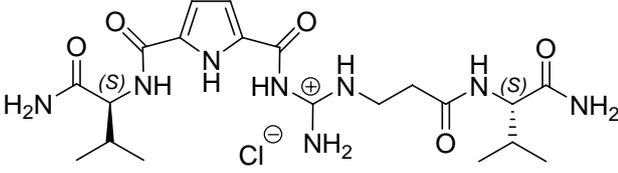


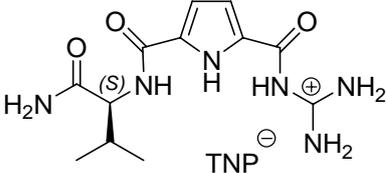
Abb. 73 Bindungsisothermen aus der ^1H -NMR Titration des Rezeptors **72** (Val-CBS- β -Dipeptid) mit *L*-Alanin **A**, berechnet aus der chemischen Verschiebung von Amid-Protonen bei 8.29 ppm (links) und bei 6.97 ppm (rechts).

Bei den Bindungsstudien mittels NMR sollte neben der Substratspezifität für Aminosäurecarboxylate vor allem die enantioselektive Fähigkeit des Rezeptors **72** (Val-CBS- β -Dipeptid)

untersucht werden, also die Diskriminierung zwischen *L*- und *D*-Enantiomeren. Denn bereits der Rezeptor **76** (Val-CBS) zeigte in **Abb. 74** eine Bevorzugung von *L*-Alanin **A** gegenüber *D*-Alanin **A'** um den Faktor 1.7. Jedoch verliert dieser Rezeptor die Enantioselektivität bei Phenylalanin **C** bzw. **C'**.^[33] Die Bindungskonstanten für den Tweezer-Rezeptor **72** für die *L*-Enantiomere von Alanin **A** und Valin **B** liegen mit $K_{\text{Ass}} \approx 1740 \text{ M}^{-1}$ und von den *D*-Enantiomeren von Alanin **A'** und Valin **B'** $K_{\text{Ass}} \approx 1480 \text{ M}^{-1}$. Diese leichte Diskriminierung um den Faktor 1.2 ist wenig aussagekräftig, beachtet man einen systematischen Messfehler um 20 %.



72 (Val-CBS-β-Dipeptid)



76 (Val-CBS)

<i>L</i> -Ala A	1780	1610
<i>D</i> -Ala A'	1470	930
<i>L</i> -Val B	1690	-
<i>D</i> -Val B'	1480	-
<i>L</i> -Phe C	n. d.	590
<i>D</i> -Phe C'	n. d.	680

Abb. 74 Bindungskonstanten K_{Ass} in M^{-1} von NMR-Titrationsen in 40 % Wasser in DMSO des Tweezer-Rezeptors **72** im Vergleich mit dem einfachen Guanidiniocarboxylpyrrol-Rezeptor **76** gegenüber den *N*-acetylierten Aminosäurecarboxylaten *L*- und *D*-Alanin **A** und **A'**, *L*- und *D*-Valin **B** und **B'** sowie *L*- und *D*-Phenylalanin **C** und **C'**.^[33] Das Gegenion von Rezeptor **76** ist Trinitrophenolat (TNP^-), auch Pikrat genannt.

Die Komplexstöchiometrie der Tweezer-Rezeptoren wurde mit der NMR-Spektroskopie nach der Job-Plot-Methode überprüft (**2.4 Bestimmung der Bindungstöchiometrie**). Dazu wurden sowohl vom Rezeptor als auch von den Aminosäuren 1.5 mmolare Lösungen in 40 % Wasser in $\text{DMSO-}d_6$ angesetzt und in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren mit Lösemittelunterdrückung aufgenommen. Dabei zeigte der Tweezer-Rezeptor **72** (Val-CBS-β-Dipeptid) für die einfachen Aminosäurecarboxylate *L*-Alanin **A**, *D*-Alanin **A'** und *L*-Valin **B**, die als Ammoniumsalze eingesetzt wurden, eine klare 1:1-Komplexierung.

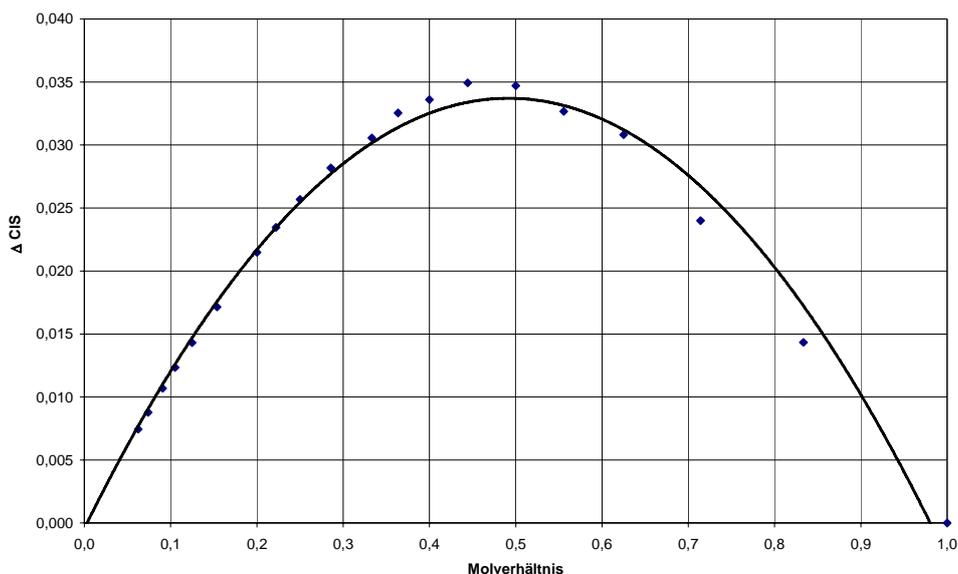


Abb. 75 Job-Plot der NMR-Messungen des Tweezer-Rezeptors **72** (Val-CBS-β-Dipeptid) mit Ac-L-Alanin **A** zeigt eine 1:1-Komplexierung.

Mit der NMR-Spektroskopie ist einer guten Komplexierung des Tweezer-Rezeptors **72** (Val-CBS-β-Dipeptid) erhalten worden. Jedoch eine Enantioselektivität war nicht erkennbar. Weiterhin liegen die ermittelten Bindungskonstanten des Tweezer-Rezeptors **72** in einem ähnlichen Bereich wie die des Vergleichsrezeptor **76** (Val-CBS). Dies wurde auch bereits bei den UV-Bindungsstudien gefunden. Dadurch wird die Annahme, dass der zusätzliche Seitenarm an der Guanidinio-Einheit keinen Einfluss auf die Komplexierung ausübt, weiter untermauert.

Als weitere Untersuchungsmethode wurden Bindungsstudien für das vielversprechende System des Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptors **63** (Bn-CBS-Phe) mit Folsäure **G** mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) durchgeführt.

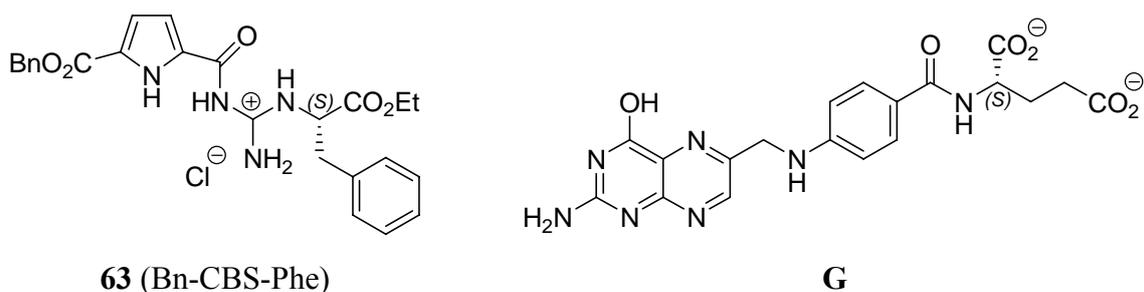


Abb. 76 Links: Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptor **63**. Rechts: Folsäure **G** als Dicarboxylat

Zur Evaluierung der Parameter (im Wesentlichen Lösemittelgemisch und Konzentrationen) wurden verschiedene Messbedingungen getestet (**Tab. 7**). Überwiegend wurde eine Lösemittelmischung aus 40 % Dimethylsulfoxid in Wasser (Messungen A bis E) verwendet, aber auch reines Dimethylsulfoxid, reines Methanol und reines Acetonitril (Messungen F bis H). Die Änderung des Lösemittelgemisches im Vergleich zu den optischen spektroskopischen Untersuchungsmethoden wurde aus zwei Gründen nötig: Zum einen musste der organische Anteil des Lösemittelgemisches aufgrund Löslichkeitsproblemen erhöht werden, da für die ITC-Messungen Konzentrationen für Rezeptor und Substrat im millimolaren Bereich nötig sind, um signifikante Wärmetönungen zu erhalten. Zum anderen sollte auf Methanol als organisches Lösemittel umgestellt werden, da ein zu hoher Anteil an Dimethylsulfoxid die Viskosität negativ beeinflusst. Dies hätte trotz Rühren eine inhomogene Wärmeentwicklung zur Folge, auf Kosten der Genauigkeit der Messwerte.

Bei den ITC-Experimenten treten u. a. aufgrund der Empfindlichkeit der Messmethode auch Wärmetönungen durch die Verdünnung von Rezeptor und Substrat auf. Diese wurden ebenfalls bestimmt, indem einerseits das Lösemittelgemisch zur Rezeptorlösung und andererseits die Substrat-Lösung zum Lösemittelgemisch titriert wurden. Anschließend konnten diese unerwünschten Wärmetönungen von der eigentlichen Titration subtrahiert (bereinigt) werden. Bei den Messungen A bis C wurde die Folsäure **G** vorgelegt und der Tweezer-Rezeptor **63** zutitriert. Da aber die Auswertung nicht auf einen 1:1-Komplex und auch nicht, wie eigentlich zu erwarten gewesen wäre, auf einen 2:1-Komplex von Rezeptor und Substrat hinwies, sondern vielmehr auf einen 1:2-Komplex von Rezeptor und Substrat hindeutete, wurde die vorgelegte Komponente mit der zuzugebenden vertauscht (Messung D bis H). Dies ist insoweit sinnvoll, da bei ITC-Messungen in der Regel die Komponente (Makromolekül) vorgelegt wird, die mehrere der anderen an sich binden kann. Hierfür ist auch die Auswertung vorgesehen. Andererseits müsste bei der Anwendung der richtigen Auswertungsformel bei beiden Titrationsvarianten das gleiche Ergebnis für die Bindungskonstante und die thermodynamischen Parameter berechnet werden.

<i>Messung</i>	<i>Lösemittel</i>	<i>[63] in mM</i>	<i>[Folsäure G] in mM</i>	<i>[Puffer] in mM</i>	<i>pH</i>
A	60 % Wasser 40 % DMSO	3	150	200	6.00
B	60 % Wasser 40 % DMSO	0.3	5	-	6.00
C	60 % Wasser 40 % DMSO	0.6	8	-	6.00
D	60 % Wasser 40 % DMSO	3	0.5	-	6.00
E	60 % Wasser 40 % DMSO	3	0.2	-	6.00
F	100 % DMSO	3	0.2	-	-
G	100 % Methanol	3	0.2	-	-
H	100 % Acetonitril	3	0.2	-	-

Tab. 7 Evaluierung der Messbedingungen für die ITC-Untersuchungen am System Tweezer-Rezeptor **63** (Bn-CBS-Phe) und Folsäure **G** bei der isothermalen Temperatur von 25 °C.

In **Abb. 77** sind einige der misslungenen ITC-Messkurven bei verschiedenen Bedingungen gezeigt: Bei Messung A wurde ein 200 mM Bis-Tris-Puffer verwendet und die Lösungen auf pH = 6.00 eingestellt. Diese Titration lieferte eine völlig unregelmäßige Wärmetönung, bei der die Messwerte außerhalb des Messbereichs lagen. Daraufhin wurden für weitere Messungen die Konzentrationen von Rezeptor **63** (Bn-CBS-Phe) und der Folsäure **G** erniedrigt und auf die Verwendung eines Puffers verzichtet. Der pH-Wert wurde zuvor mittels Natronlauge und Salzsäurelösung so eingestellt, dass die genaue Lösemittelzusammensetzung nicht verändert wurde. Die Messung in reinem Dimethylsulfoxid zeigte ebenfalls ein unerwartetes Bild der Komplexierung. Bei Messung F in **Abb. 77** ist eine exotherme Reaktion zu erkennen. Dies widerspricht jedoch sowohl bisherigen Erfahrungen als auch der Literatur.^[108, 109] Möglicherweise führte ein leichter Unterschied im Wasseranteil in der Rezeptor- und Substratlösung zu dieser exothermen Reaktion, obwohl frisch destilliertes und getrocknetes Dimethylsulfoxid verwendet wurde. Messung H konnte erst gar nicht durchgeführt werden, da die Löslichkeit der Folsäure und des Rezeptors in Acetonitril nicht ausreichend waren.

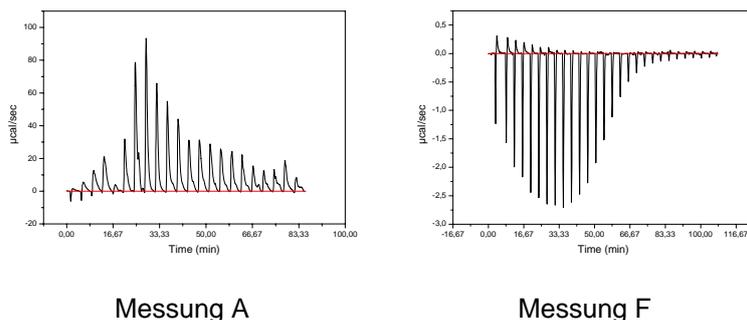


Abb. 77 Misslungenen ITC-Messungen der Titration des Tweezer-Rezeptors **63** (Bn-CBS-Phe) mit Folsäure **G**, bei denen die Wärmetönung gegen die Zeit bzw. Injektionen aufgetragen wurde. Die Messbedingungen sind in **Tab. 7** aufgelistet. Messung A zeigt eine völlig unregelmäßige Wärmetönung und Messung F eine exotherme Reaktion.

In **Abb. 78** sind ITC-Messungen zu sehen, die im Ansatz richtig erscheinen, hinsichtlich endothermer Reaktion und eines annähernd sigmoiden Kurvenverlaufs. Die berechneten Bindungsisothermen sind bereits bereinigt, d. h., die Wärmetönung durch die Verdünnung des Rezeptors und des Substrates sind bereits subtrahiert. Messung B und C zeigen beide einen ähnlichen Kurvenverlauf. Eine Anpassung an eine 1:1-Komplexierung ist nicht möglich, während eine sequentielle Bindung auf eine 1:2-Komplexierung von Rezeptor und Substrat hindeutet. Dies ist erstaunlich, da die Folsäure **G** ein Dicarboxylat ist und somit ein Komplex aus zwei Rezeptormolekülen und einer Folsäure **G** logisch wäre. Wie bereits oben erwähnt, wurde daraufhin die vorgelegte mit der zutitrierten Komponente vertauscht. Doch die Messungen D und E lieferten keine verwertbaren Ergebnisse. Die Messung G in reinem Methanol, bei der kein pH-Wert eingestellt wurde, da es sich hier um ein nicht wässriges System handelt, zeigte ebenfalls die schon bei Messung B und C beobachtete Komplexierung. Bezüglich Bindungskonstanten konnten aber die Messungen B, C und G aufgrund eines zu hohen Fehlers nicht ausgewertet werden.

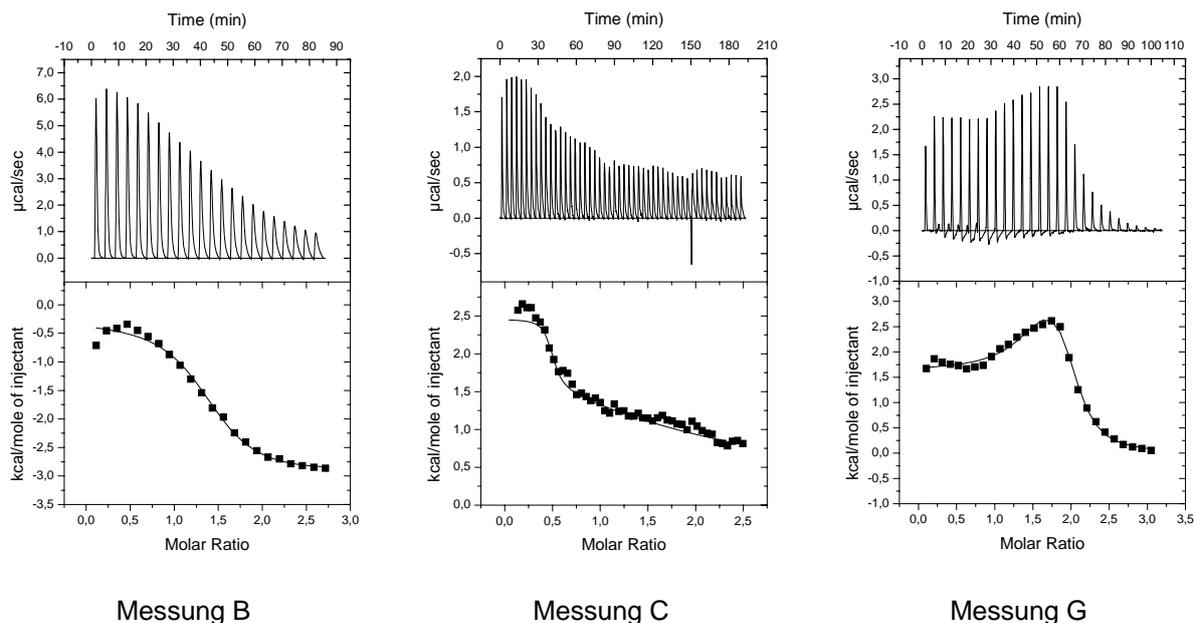


Abb. 78 ITC-Messungen des Tweezer-Rezeptors **63** (Bn-CBS-Phe) mit Folsäure **G**. Die Messbedingungen sind in **Tab. 7** aufgelistet. Jeweils oben: Titrationsdiagramm, bei dem die Wärmetönung gegen die Zeit bzw. Injektionen aufgetragen wurde. Jeweils unten: Bindungsisotherme, bei der die Wärmeenergie gegen das Molverhältnis aufgetragen wurde. Hierbei wurden bereits die Wärmetönungen der Verdünnungen von Rezeptor und Substrat subtrahiert. Alle drei Messungen zeigen eine entropische Reaktion. Bei Messungen B und C wurde der Rezeptor **63** vorgelegt und die Folsäure **G** zugegeben, bei Messung G umgekehrt.

Die ITC-Daten erlauben keine Interpretation bezüglich einer Bindungskonstante und der thermodynamischen Parameter. Die Messdaten weisen darauf hin, dass die Komplexbildung eine entropisch getriebene Reaktion ist. Dies steht im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Beobachtungen beim gleichzeitigen Auftreten von Ionenpaaren und Kation- π -Wechselwirkungen in wässriger Lösung.^[108, 109] ITC-Bindungsstudien von *Schmidtchen* mit dem bicyclischen Guanidinium-Derivat **77** zeigten, dass die Komplexbildung von Carboxylaten neben den auftretenden starken elektrostatischen Wechselwirkungen (ΔH°) insbesondere auch auf die Freisetzung von Lösemittelmolekülen (ΔS°) zurückzuführen ist.^[25] Ebenso fand *Hamilton* einen entropischen Effekt als treibende Kraft bei der Assoziation des Bis-Guanidinium-Derivates **78** mit Carboxylaten in polaren Lösemitteln.^[26, 110]

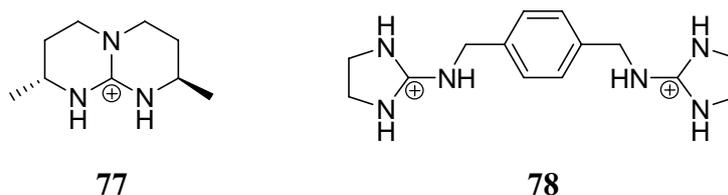


Abb. 79 Rezeptoren, die bei Komplexbildungen entropische Effekt zeigen: bicyclisches Guanidinium-Derivat **77** nach *Schmidtchen* und das Bis-Guanidinium-Derivat **78** nach *Hamilton*.

Die endotherme Assoziation von Guanidinio-Kationen mit Oxo-Anionen in protischen Lösemitteln lässt sich dadurch erklären, dass die positiv geladene Guanidinio-Gruppe, ebenso wie das negativ geladene Substrat, in protischen Lösemitteln stark solvatisiert sind.^[111] Diese Lösemittelmoleküle konkurrieren mit Rezeptor und Substrat um die Bindungsstellen. Infolge der Assoziation müssen die Solvathüllen von Rezeptor und Substrat neu organisiert werden. Da der Komplex aber weniger stark solvatisiert ist als der freie Rezeptor und das freie Substrat zuvor, werden Lösemittelmoleküle freigesetzt, und die Unordnung im System steigt. Der Entropieterm wird somit stärker negativ als der Enthalpieterm positiver wird.

Neben dem Lösemiteleinfluss spielt auch das Gegenion eine wichtige Rolle.^[109, 112, 113] *Schmidtchen* konnte zeigen, dass sich die Bindungsaffinität K_{Ass} um eine Größenordnung nur durch den Austausch des Gegenions ändern kann. Bei seinen geladenen Guanidinium-Rezeptoren zeigten dabei größere Anionen, die weniger zu Wasserstoffbrückenbindungen neigen, höhere Bindungskonstanten. Chlorid als Gegenion in Acetonitril wies hierbei die schwächste Komplexierung auf, während Hexafluorophosphat und Tetrafluoroborat im gleichen System eine um den Faktor zehn bis elf höhere Komplexierung zeigten. Eine weitere Besonderheit für Chlorid als Gegenion ist auch, dass der Entropieterm betragsmäßig größer ist als die Reaktionsenthalpie. Die Enthalpie-Entropie-Kompensation führt aber dazu, dass sich größere Unterschiede in der Reaktionsenthalpie nicht in der freien Gibbs-Energie niederschlagen.^[53]

Mit der ITC-Methode kann eine Assoziation des Tweezer-Rezeptors **63** (Bn-CBS-Phe) mit Folsäure **G** zwar qualitativ nachgewiesen werden. Sie weist auf eine zusätzliche 2:1-Komplexierung hin. Thermodynamische Parameter könnten jedoch nicht bestimmt werden. Hier ist auch der Einsatz von wasserziehenden Lösemitteln (z. B. Dimethylsulfoxid) oder Lösemittelgemischen sehr schwer zu handhaben, da geringste Änderungen der Zusammensetzung das Bild der Komplexierung verfälschen. Ein gutes Indiz für unzureichende Messbedingungen bei unseren Systemen war das Auftreten exothermer Komplexierungsreaktionen. Für die quantitative Bestimmung von Bindungsparametern dieser Rezeptor-Substrat-Systeme scheint die ITC-Methode daher leider nicht geeignet.

Zur Visualisierung der Komplexierung des Tweezer-Rezeptors **63** mit Folsäure **G** in Wasser wurde mittels *molecular modeling* (Macromodel 8.0, Amber* Kraftfeld, GB/SA Solvation von Wasser) Berechnungen der verschiedenen Komplexstöchiometrien angefertigt.^[103] Dazu

wurden energieminierte Strukturen mittels *Monte Carlo*-Methode berechnet (100.000 Schritte). Die Ergebnisse der jeweiligen Konformationssuche sind in **Abb. 80**, **Abb. 81** und **Abb. 82** dargestellt. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die Carboxylat-Einheiten der Folsäure **G** mit der positiven Guanidinio-Einheit des Rezeptors **63** (Bn-CBS-Phe) wechselwirken. Auch ist eine zusätzliche aromatische π - π -Wechselwirkung des Benzylesters des Rezeptors **63** mit dem aromatischen System der Folsäure **G** zu erkennen. Diese Wechselwirkungen sind bei allen drei Stöchiometrie-Varianten zu beobachten. Ebenfalls bei allen Komplexierungsmöglichkeiten wird deutlich, dass der zusätzliche Seitenarm an der Guanidinio-Einheit keinen Einfluss auf die Assoziation ausübt. Bei den theoretischen Berechnungen dreht sich dieser Seitenarm immer von dem Substrat weg, sodass er lediglich vom Wasser solvatisiert wird.

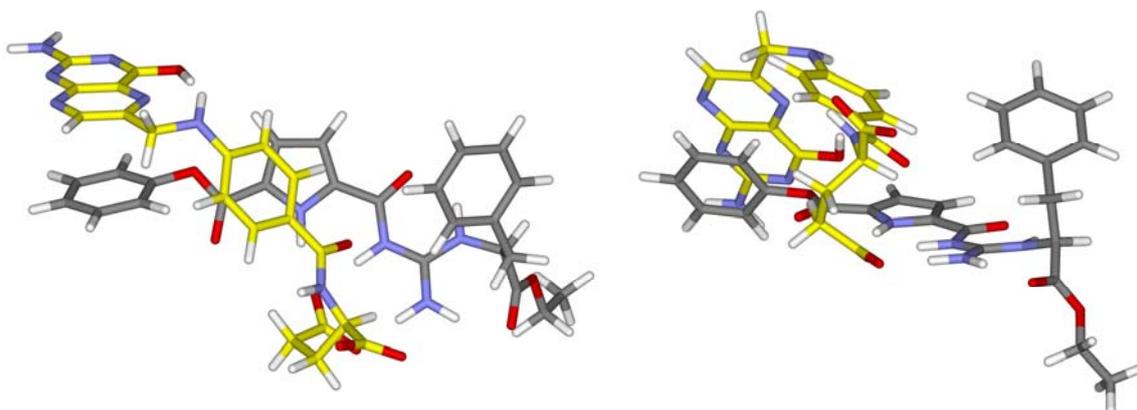


Abb. 80 Berechnete energieminierte Struktur des 1:1-Komplexes des Rezeptors **63** (Bn-CBS-Phe) mit Folsäure **G**.

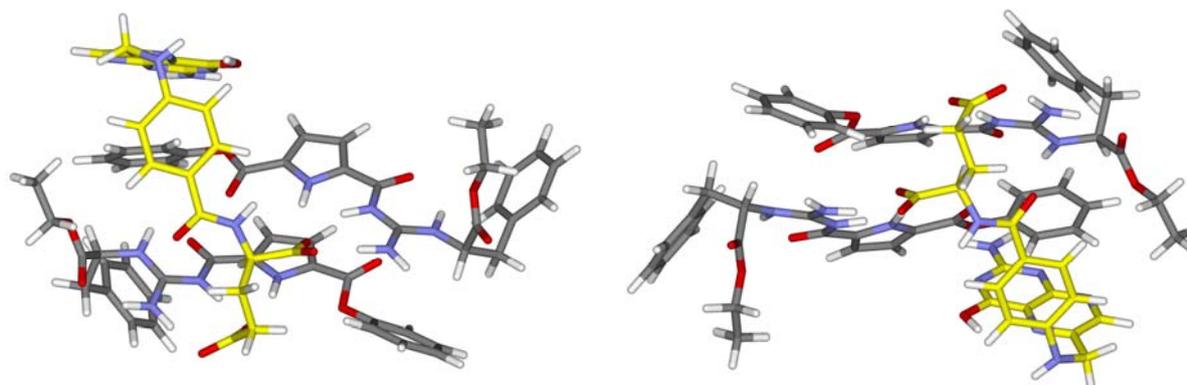


Abb. 81 Berechnete energieminierte Struktur des 2:1-Komplexes des Rezeptors **63** (Bn-CBS-Phe) mit Folsäure **G**.

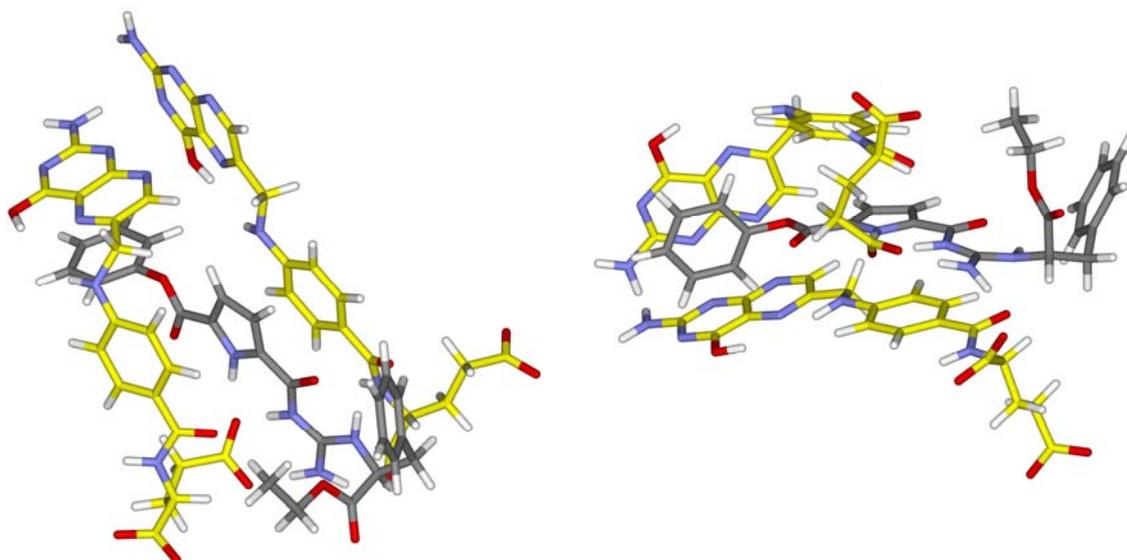


Abb. 82 Berechnete energieminierte Struktur des 1:2-Komplexes des Rezeptors **63** (Bn-CBS-Phe) mit Folsäure **G**.

Ein ähnliches Bild der Komplexierung bezüglich des zusätzlichen Seitenarms zeigen die **Abb. 83** und **Abb. 84**. Dabei handelt es sich um eine 2:1-Komplexierung des Rezeptors **67** (Bn-CBS- β -Ala-Dns) bzw. **75** (Phe-CBS- β -Ala-Dns) mit der Folsäure **G**. Hierbei kommt es nicht auf die Stöchiometrie an, als vielmehr auf die Tatsache, dass auch bei diesen Assoziaten der zusätzliche Seitenarm keine Komplexierung mit dem Substrat eingeht.

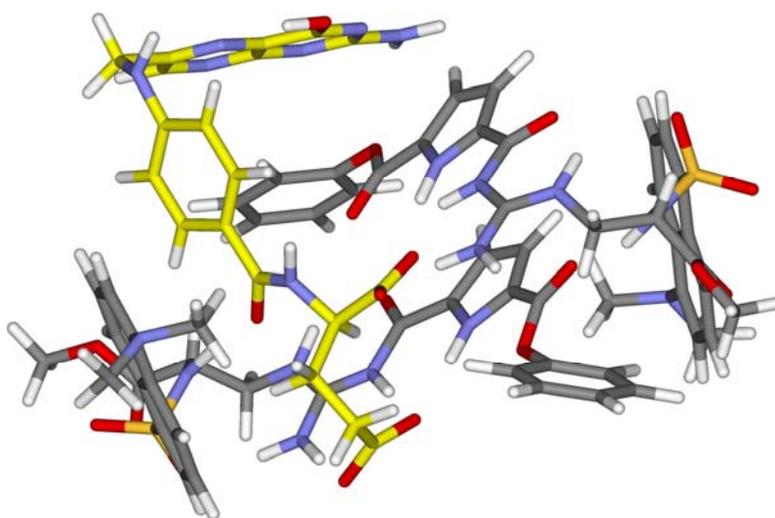


Abb. 83 Berechnete energieminierte Struktur des 2:1-Komplexes des Rezeptors **67** (Bn-CBS- β -Ala-Dns) mit Folsäure **G**.

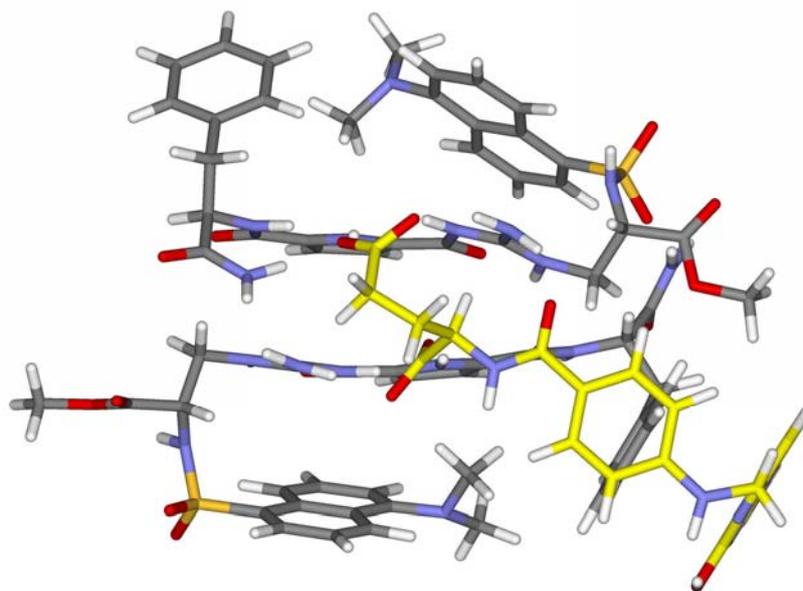


Abb. 84 Berechnete energieminierte Struktur des 2:1-Komplexes des Rezeptors **75** (Phe-CBS- β -Ala-Dns) mit Folsäure **G**.

Die Berechnungen weisen darauf hin, dass der zusätzliche Seitenarm an der Guanidinio-Einheit Solvation vom Lösemittel oder intramolekulare Wechselwirkungen bevorzugt, anstatt an der Komplexierung des Substrates mitzuwirken.

Weiter experimentelle Untersuchungen des Folsäure-Systems, insbesondere hinsichtlich der Komplexstöchiometrie wurden mit der Massenspektrometrie unternommen. Aber ESI-MS-Messung in Methanol lieferten keine Komplexmasse des Rezeptors **75** (Phe-CBS- β -Ala-Dns) mit Folsäure **G**. Damit konnten keine weiteren Hinweise, weder auf einen 1:1-Komplex noch auf ein 2:1-Komplex, erhalten werden. Auch Kristallisationsversuche eines Komplexes für die Röntgenstrukturanalyse verliefen leider erfolglos. Es wurden lediglich für die Röntgenstruktur-Kristallographie ungeeignete amorphe Feststoffe erhalten.

Ein Problem der Tweezer-Rezeptoren bei der Komplexierung oxo-anionischer Substrate liegt darin, dass der *N'*-alkylierte Seitenarm an der Guanidinio-Einheit nicht wie erhofft an der Komplexierung teilnimmt, sondern sich vom Substrat derart wegdreht, dass er von Lösemittelmolekülen umgeben ist. Dadurch zeigen die Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren keine verbesserten Bindungseigenschaften gegenüber *N'*-unsubstituierten Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren, sowohl hinsichtlich der Assoziationskonstanten als

auch der Substratspezifität. Wahrscheinlich kann die Energie für Torsionskräfte, die bei einer nötigen Verdrehung des Rezeptorarms für eine Komplexierung überwunden werden müssten, nicht durch die Komplexierungsenergie aufgebracht werden. Weiterhin können polare Seitenarme in einem energetisch günstigen Vorgang gut von polaren Lösemittelmolekülen (Wasser, Methanol oder DMSO) solvatisiert werden.

4.3.1 Synthese der biskationischen Rezeptoren

Für die Synthese der biskationischen Rezeptoren **79** bis **82** sind mono-Boc-geschützte Diamine notwendig. Dazu wurden die Diamine **84** bis **87** in fünffachem Überschuss mit Boc-Anhydrid in Chloroform umgesetzt. Nach wässriger Aufarbeitung, Extraktion mit Essigester und anschließender Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck erhielt man schließlich die mono-Boc-geschützten Diamine **88** bis **91** als ölige Flüssigkeiten in Ausbeuten von 92 bis 99 %, die in der Gefriertruhe zu einem weißen Feststoff kristallisierten.

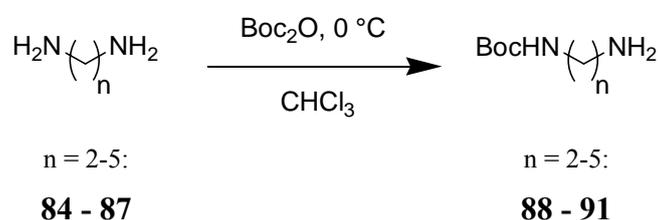


Abb. 86 Einfach-Schätzung von vier Diaminen zu den mono-Boc-geschützten Diaminen **88** bis **91**.

Die allgemeine Synthesevorschrift für die biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren **79** bis **82** ist in **Abb. 87** dargestellt. Dabei werden die mono-Boc-geschützten Diamine (**88** bis **91**) mittels PyBOP als Kupplungsreagenz mit der Pyrrolcarbonsäure **20** peptidisch verknüpft. Als Lösemittel dient Dichlormethan, versetzt mit einer kleinen Menge Dimethylformamid zwecks besserer Löslichkeit. Die Ausbeuten für die verschiedenen Diamine variierten zwischen 52 und 74 %. Anschließend werden die beiden Boc-Schutzgruppen mit konzentrierter Salzsäurelösung in einem Wasser-Methanol-Gemisch abgespalten. Durch zweifache Lyophilisation mit destilliertem Wasser erhält man die gewünschten biskationischen Rezeptoren **79** bis **82** in fast quantitativer Ausbeute als HPLC-reine (Detektionswellenlänge 300 nm), farblose und voluminöse Feststoffe.

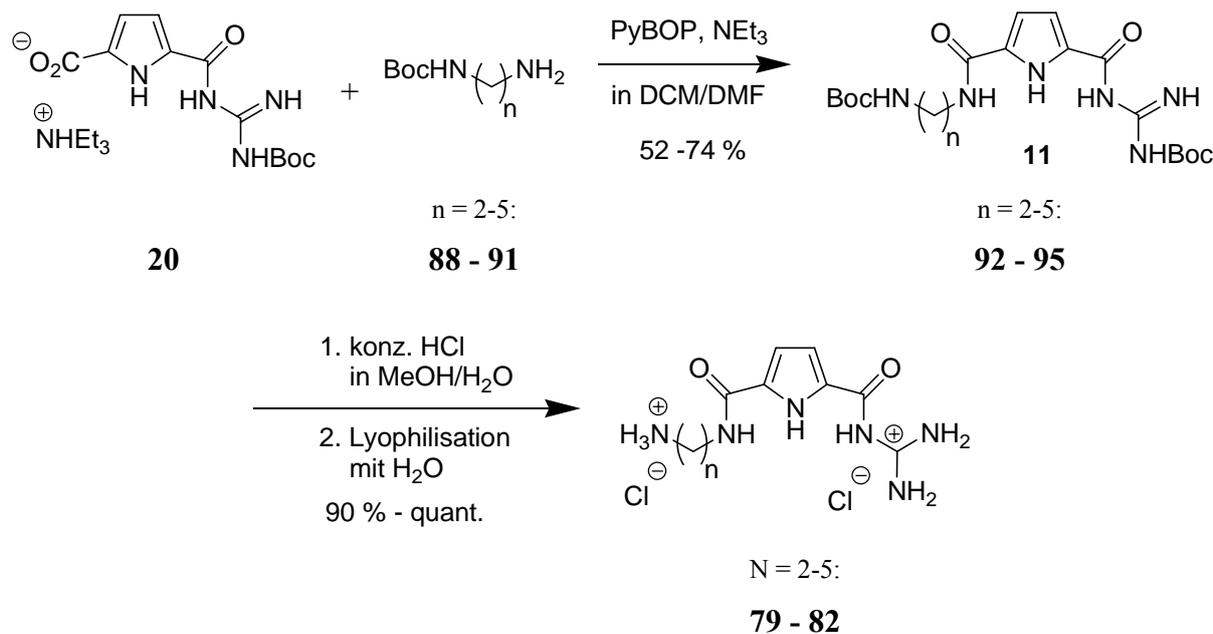


Abb. 87 Allgemeine Synthese der biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren.

Das Lysin-Derivat **83** wurde auf ähnliche Weise synthetisiert (**Abb. 88**). Die Pyrrolcarbonsäure **20** wurde mit *H*-Lys(Cbz)OMe unter Verwendung von PyBOP als Kupplungsreagenz verknüpft. Dabei lag die Ausbeute des geschützten Rezeptors **96** sogar noch über den Kupplungsausbeuten der mono-Boc-geschützten Aminosäuren, nämlich bei 86 %. Zur Entschützung mussten nun zwei verschiedene Schutzgruppen entfernt werden. Zum einen die Cbz-Gruppe, die durch Hydrierung unter Wasserstoffatmosphäre mit Aktivkohle als Katalysator in Methanol abgespalten wurde, und zum anderen die Boc-Gruppe an der Guanidino-Einheit, die durch eine konzentrierte Salzsäurelösung in Methanol entfernt wurde. Normalerweise liegt die Ausbeute bei solchen Entschützungen über 90 %. Die hier erzielte mäßige Ausbeute von 60 % für das Biskation **83** ist darauf zurückzuführen, dass auch eine Entschützung des Methylesters mit 20 % in größerem Ausmaß stattfand. Dadurch entstand die freie Carbonsäure an der Lysin-Einheit, und man erhielt die biskationische Verbindung **97**. Die Trennung dieser beiden Substanzen konnte säulenchromatographisch an RP-18-Material durchgeführt werden.

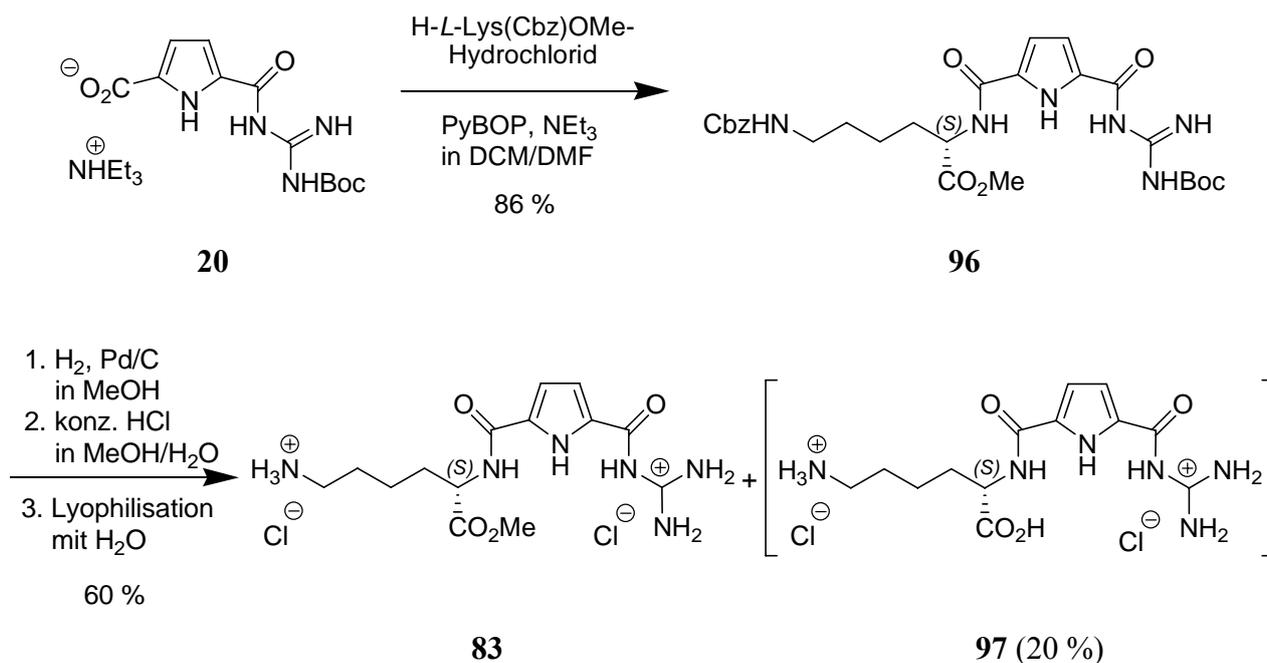
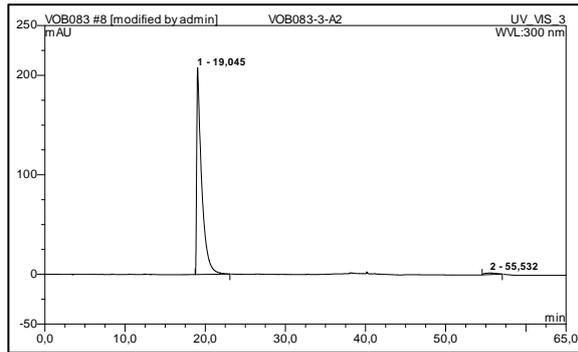


Abb. 88 Synthese des biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptors **83** mit *L*-Lysin sowie dessen bei der Entschützung entstandene Nebenprodukt **97**.

Die so erhaltenen biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren **79** bis **83** wurden mittels RP-18-HPLC auf Reinheit untersucht. Als Eluent wurde ein von 0 auf 100 % gesteigerter Wasser-Methanol-Gradient mit 0.1 % TFA verwendet, um sicherzustellen, dass es nur einen Protonierungszustand gibt. Die Detektion wurde mit UV-Vis vorgenommen, wobei einerseits ein komplettes 3D-Spektrum über den Wellenlängenbereich von 210 bis 595 nm sowie ein Einzelspektrum bei der Wellenlänge von 300 nm aufgenommen wurde. Diese beiden Spektrenarten sind für den biskationischen Rezeptor **81** in **Abb. 89**, beispielhaft für alle anderen biskationischen Rezeptoren, dargestellt. Der zweite, langgezogene Peak im 3D-Spektrum zwischen 210 und 255 nm ist auf die zunehmende Absorption des Methanols aufgrund dessen höheren Anteils am Eluenten zurückzuführen. Das dritte Spektrum zeigt die Reinheit des Hauptpeaks, da hier neben dem Spektrum vom Peak-Maximum auch die beiden Spektren der halben Höhe dieses Peaks übereinandergelegt wurden. Die hohe Übereinstimmung unterstreicht die Reinheit dieses Peaks. Aus der relativen Fläche (Tabelle) wird ersichtlich, dass der Rezeptor **81** bei einer Wellenlänge von 300 nm zu 98 % HPLC-rein ist. Die anderen Rezeptoren ergaben hierbei Werte zwischen 95 und 98 %.



<i>Nr.</i>	<i>Retentionszeit min</i>	<i>rel. Fläche %</i>
1	19.04	98.30
2	55.53	1.70
Total:		100

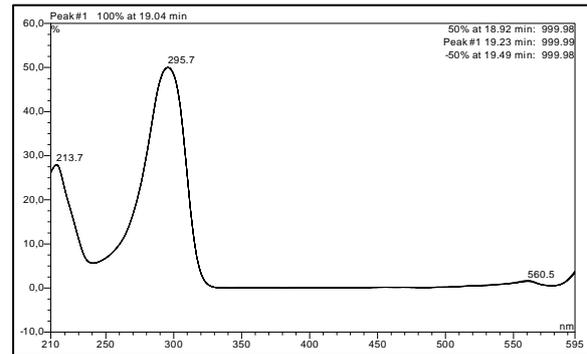
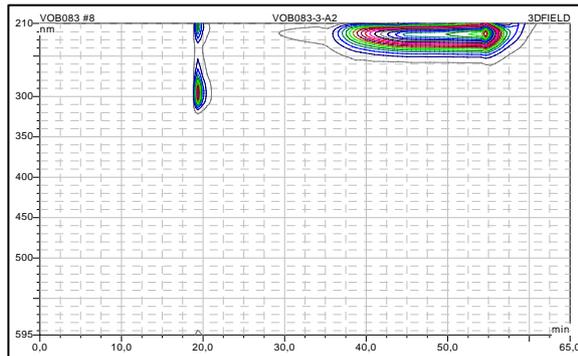


Abb. 89 Oben links: HPLC-Diagramm zur Überprüfung der Reinheit des Rezeptors **81** bei einer Wellenlänge von 300 nm bei Wasser-Methanol-Gradient (mit 0.1 % TFA) von 0 auf 100 %. Peak 1 wird bei einem Mischungsverhältnis von ungefähr 9 % Methanol in Wasser detektiert. Oben rechts: Die Tabelle zeigt eine Reinheit von 98 % für den Rezeptor **81**. Unten links: 3D-HPLC-Spektrum: der zweite, langgezogene Peak zwischen 210 und 255 nm ist auf die Absorption des Methanols zurückzuführen. Unten rechts: UV-Spektrum des Peaks 1 bei der Retentionszeit von 19.04 Minuten mit zwei nahezu identischen überlagerten UV-Spektren bei jeweils halber Peakhöhe, was die Reinheit dieses Peaks unterstreicht.

Als Beispiel für typische ^1H -NMR-Spektren der biskationischen Rezeptoren ist in **Abb. 90** das Spektrum von Rezeptor **81** gezeigt. Die Methylen-Einheiten sind bei 1.58, 2.79 und 3.26 ppm, während die Pyrrol-Protonen bei 6.86 und 7.56 ppm liegen. Die Ammonium-Gruppe erscheint bei 7.92 ppm, während die vier Protonen der Guanidinio-Einheit bei 8.50 und 8.69 als verbreiterte Signale zu sehen sind. Weitere NH-Protonen sind bei 8.62, 12.12 und 12.34 ppm.

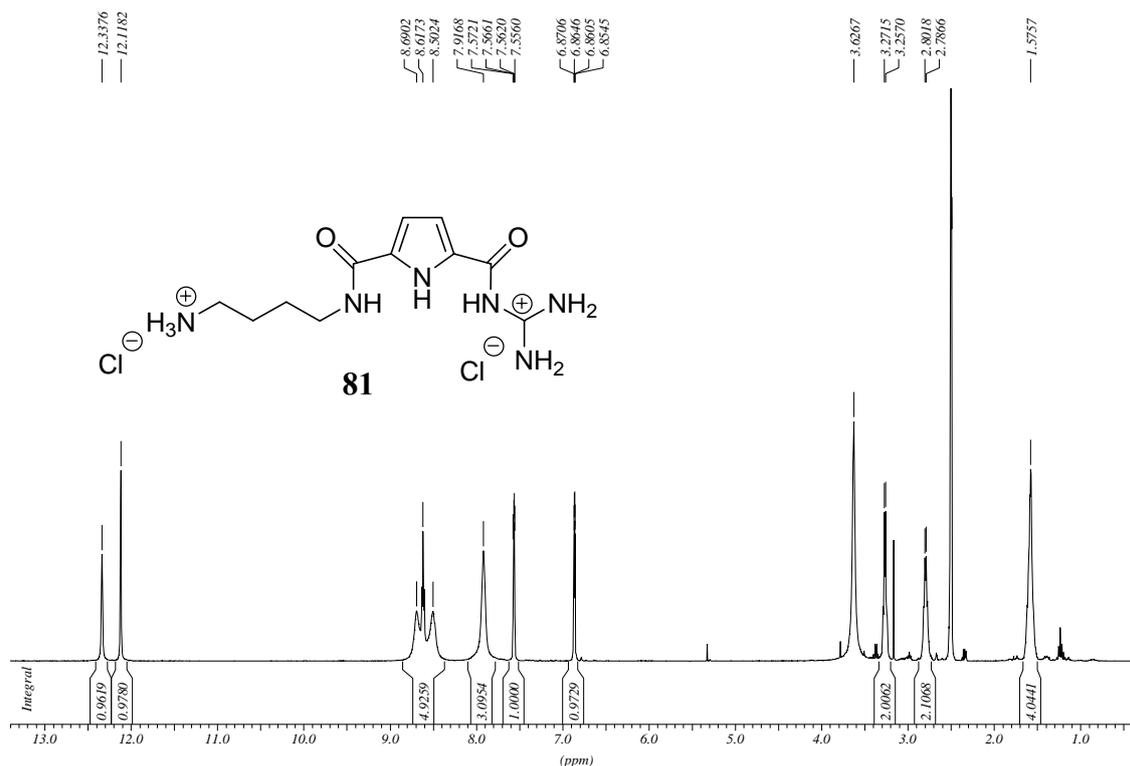


Abb. 90 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des biskationischen Rezeptors **81**.

Nach erfolgreicher Synthese und Überprüfung der Reinheit konnten mit den biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren **79** bis **83** Bindungsstudien durchgeführt werden, die im nächsten Kapitel vorgestellt und deren Ergebnisse diskutiert werden.

4.3.2 Bindungseigenschaften der biskationischen Rezeptoren

Bindungsstudien dieser Serie von Biskationen wurden in wässriger Pufferlösung durchgeführt. Als Messmethode wurde die UV-Spektroskopie gewählt, da bei dieser Methode eine größere Anzahl von verschiedenen Rezeptor-Substrat-Systemen mit angemessenem Zeitaufwand und geringem Substanzverbrauch getestet und untersucht werden können. Die Biskationen zeigten dabei effiziente Bindungseigenschaften gegenüber den *N*-acetylierten Aminosäurecarboxylaten, signifikant abhängig von der jeweiligen Aminosäure einerseits und der Linkerlänge andererseits.

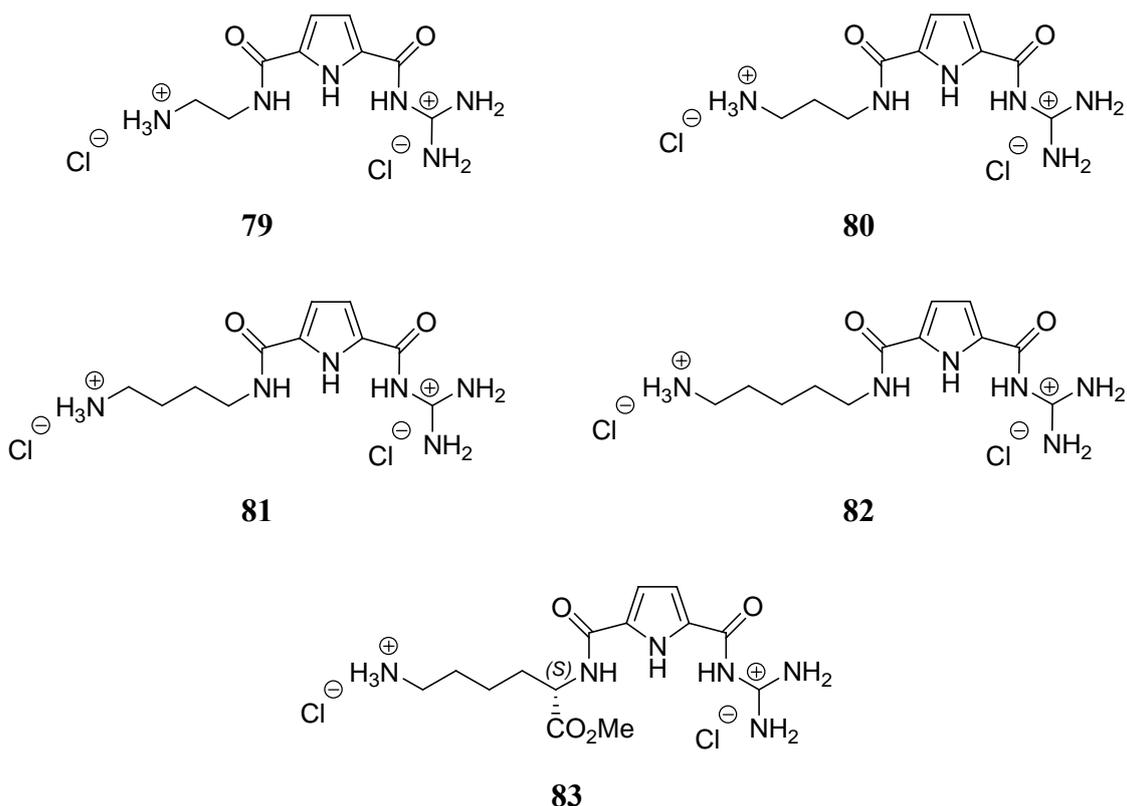


Abb. 91 Synthetisierte und hinsichtlich ihrer Komplexeigenschaften gegenüber Oxo-Anionen untersuchte biskationische Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren **79** bis **83**.

Mit wachsender Linkerlänge steigt zuerst die Komplexstabilität, bis sie mit dem Biskation **81** mit vier Methylen-Einheiten als Spacer die stärkste Assoziation zeigt. Anschließend sinkt die Komplexstabilität wieder. In Bindungsstudien dieser Serie von Rezeptorsystemen mit Oxo-Anionen (**Abb. 92**) wurde die beste Komplexierung für den Rezeptor **81** mit *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin **C** ermittelt. Dies ist neben der Komplexierung des Carboxylates durch die Guanidiniocarbonylpyrrol-Einheit im Wesentlichen auch auf die Kation- π -Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Ring des Phenylalanins **C** und der positiven Ladung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Kations zurückzuführen. Aufgrund dieser optimalen Komplexierung wurde dieses Rezeptor-Substrat-System mit Fluoreszenz-Spektroskopie, NOE-Studien und der ITC im Detail weiter untersucht. Weiterhin wurden auch *molecular modeling* Berechnungen mittels *Macromodel* durchgeführt.

Die Bindungsstudien wurden in einem wässrigen System durchgeführt. Zur besseren Löslichkeit der acetylierten Aminosäuren, hier vor allem Phenylalanin **C**, wurde ein Lösemittelgemisch aus 10 % Dimethylsulfoxid in Wasser verwendet.

Als Substrate für die Bindungsstudien wurden die in **Abb. 92** dargestellten Oxo-Anionen verwendet. Die *N*-acetylierten *L*-Aminosäuren **A** bis **E** wurden als freie Säuren eingesetzt, die durch Einstellung des pH-Wertes auf 6.00 deprotoniert wurden. Acetat **F** und Sulfat **G** wurden als deren Natrium- bzw. Dinatriumsalze verwendet.

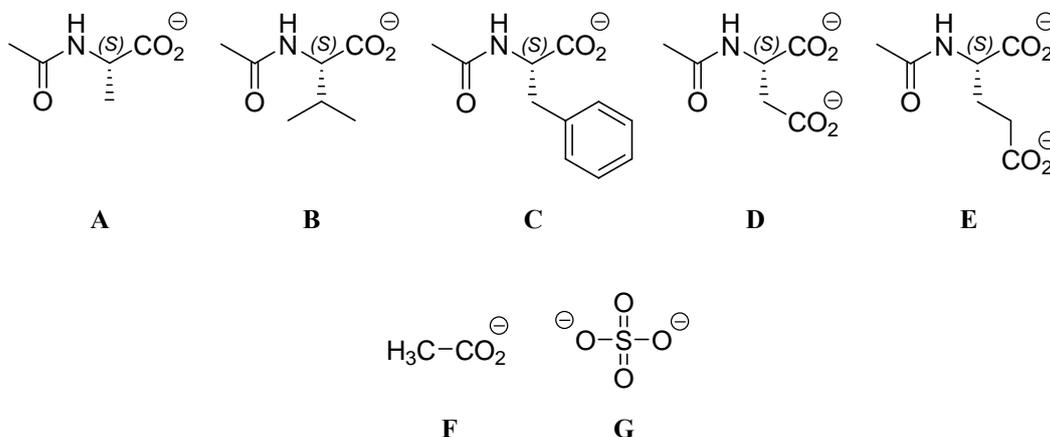


Abb. 92 Substrate der Bindungsstudien: Oben: *N*-acetylierte Aminosäuren *L*-Alanin **A**, *L*-Valin **B**, *L*-Phenylalanin **C**, *L*-Aspartat **D** und *L*-Glutamat **E**. Unten: Acetat **F** und Sulfat **G**.

Die pK_S -Werte der Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren **79** bis **83** sowie der Substrate **A** bis **G** wurde in pH-Experimenten nach der Halbäquivalenzmethode bestimmt (siehe **4.2.2 Bindungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren**). Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und die Ergebnisse in **Tab. 8** und **Tab. 9** dargestellt. Die Guanidinio-Gruppen zeigten dabei pK_S -Werte zwischen 6.20 und 6.45, während die primären Ammonium-Gruppen Werte zwischen 9.20 und 9.70 aufweisen. Damit liegen diese pK_S -Werte alle über dem pH-Wert von 6.00, bei dem die Messungen durchgeführt wurden. Die Rezeptoren sind somit weitgehend protoniert.

<i>Biskation</i>	pK_S 1 (Guanidinio-Gruppe)	pK_S 2 (Ammonium-Gruppe)
79 (n = 2)	6.20	9.20
80 (n = 3)	6.25	9.25
81 (n = 4)	6.30	9.45
82 (n = 5)	6.45	9.70
83 (Lys)	6.40	9.65

Tab. 8 pK_S -Werte der Biskationen **79** bis **83**.

Die pK_S -Werte der getesteten Substrate liegen zwischen 1.90 und 4.75. Während der Titrationsexperimente sind sie somit deprotoniert.

<i>Substrat</i>		<i>pK_s 1</i>	<i>pK_s 2</i>
Ac-L-Ala	A	2.30	-
Ac-L-Val	B	2.30	-
Ac-L-Phe	C	2.60	-
Ac-L-Asp	D	1.90	3.65
Ac-L-Glu	E	2.20	4.25
NaOAc	F	4.75	-
NaHSO ₄	G	1.99	-

Tab. 9 pK_s-Werte der oxo-anionischen Substrate.^[98] Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind einige Werte aus **Tab. 2** nochmals aufgelistet.

Die Konzentration der Biskationen lag dabei bei $7 \cdot 10^{-5}$ M. Bei diesen Konzentrationen zeigten die biskationischen Rezeptoren eine für die Titrationsexperimente optimale UV-Absorption der Pyrrol-Bande bei 300 nm. Als Substrate wurden die verschiedenen Oxo-Anionen mit einer Konzentration von 1.5 mM eingesetzt. Um pH-Schwankungen auszuschließen, wurden die Lösungen für die Titrationsexperimente in einer 5 mM Bis-Tris-Pufferlösung angesetzt, deren pH auf 6.00 eingestellt wurde. Der Puffer besitzt einen pK_s-Wert von 6.4, sodass eine gute Pufferung bei pH 6.00 gewährleistet ist.

Zur Titration wurde eine Rezeptorlösung der Guanidiniocarbonylpyrrole vorgelegt und Aliquote einer Stammlösung des Substrates zutitriert. Dabei wurde sowohl die Rezeptorlösung als auch die Substratlösung verdünnt. Nach jeder Zugabe nahm man ein UV-Spektrum auf. Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat bewirkten, unter Berücksichtigung der Verdünnung, eine signifikante Abschwächung der Absorption der Pyrrol-Bande. Die Verdünnung konnte mittels Lambert-Beerschem Gesetz herausgerechnet werden. Somit konnte aus der Abschwächung der Pyrrol-Bande die Komplexbildung quantitativ verfolgt werden (Observable) und mittels nichtlinearer Kurvenanpassung für eine 1:1-Komplexbildung die Bindungskonstante berechnet werden. Alle Titrationen wurden mehrfach wiederholt und lieferten gleiche Werte innerhalb des experimentellen Fehlers. Eine repräsentative Titration und die kalkulierte Bindungsisotherme sind in **Abb. 93** dargestellt. Im Gegensatz zu den schwächer bindenden biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren (**4.2.2 Bindungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren**) ist hier die Abweichung von der Verdünnung gerade im kleineren Äquivalent-Bereich etwas stärker.

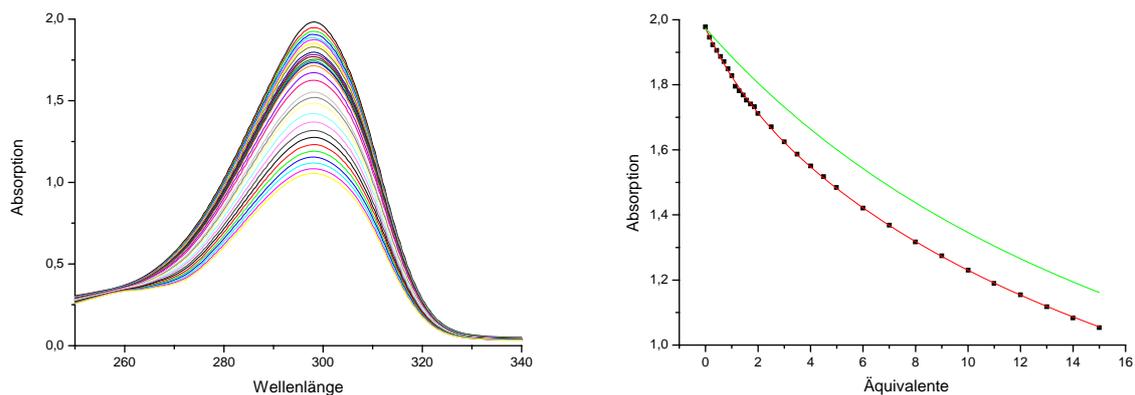


Abb. 93 Links: Änderung der Absorption in einer UV-Titration des biskationischen Rezeptors **81** mit *N*-Ac-*L*-Phenylalanin. Rechts: Bindungsisotherme (rot) und berechnete Verdünnungskurve bei 300 nm (grün).^[114] Reproduced with permission. Copyright 2007 American Chemical Society.

Die Komplexstöchiometrie wurde in unabhängigen Experimenten nach der Job-Plot Methode bestimmt (siehe 2.4 *Bestimmung der Bindungstöchiometrie* und 4.2.2 *Bindungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren*).^[99, 100]

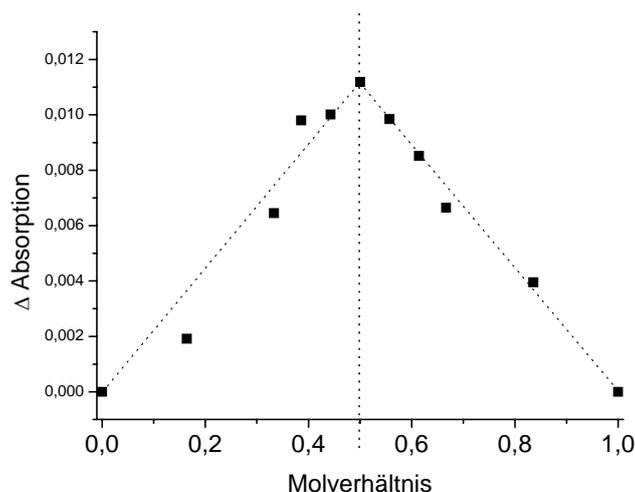


Abb. 94 Job-Plot der Komplexierung von **81** mit *N*-Ac-*L*-Phenylalanin **C** zeigt eine 1:1-Komplexierung.^[114] Reproduced with permission. Copyright 2007 American Chemical Society.

Auch hier waren für die mathematische Auswertung mittels nichtlinearer Kurvenanpassung die molaren Extinktionskoeffizienten notwendig. Für die Substrate sind sie bei der beobachteten Wellenlänge alle Null. Für die biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren **79** bis **83** sind die molare Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 300 nm in **Tab. 10** dargestellt (siehe 4.2.2 *Bindungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren*).

Biskation	ε_R in $l\ mol^{-1}\cdot cm^{-1}$	Substrate	ε_S in $l\ mol^{-1}\cdot cm^{-1}$
79 (n = 2)	20000	L-Ala A	0
80 (n = 3)	24200	L-Val B	0
81 (n = 4)	24400	L-Phe C	0
82 (n = 5)	25000	L-Asp D	0
83 (Lys)	23900	L-Glu E	0
		NaOAc F	0
		Na ₂ SO ₄ G	0

Tab. 10 Molare Extinktionskoeffizienten der biskationischen Rezeptoren **79** bis **83** sowie der Substrate **A** bis **G** bei einer Wellenlänge von $\lambda = 300$ nm. Einige Substrate aus **Tab. 3** sind zwecks Übersichtlichkeit nochmals aufgeführt.

Die Ergebnisse der UV-Bindungsstudien sind in **Tab. 11** und **Abb. 95** dargestellt. Die Daten zeigen, dass die Komplexierung der Oxo-Anionen durch biskationische Guanidiniocarbonyl-pyrrol-Rezeptoren sehr stark von der Länge des Linkers sowie des Substrates abhängig ist.

Biskation	L-Ala A	L-Val B	L-Phe C	L-Asp D	L-Glu E	NaOAc F	Na₂SO₄ G
79 (n = 2)	1400	1600	1400	2200	1100	1500	1300
80 (n = 3)	1400	1400	2600	3200	1300	<1000	<1000
81 (n = 4)	5800	2200	10700	3900	6100	3600	1800
82 (n = 5)	2100	2700	4700	1700	2100	3300	2600
83 (Lys)	3700	1100	1850	3000	3100	3300	2400

Tab. 11 Bindungskonstanten K_{Ass} in M^{-1} der biskationischen Rezeptoren **79** bis **83** gegenüber *N*-acetylierten *L*-Aminosäurecarboxylaten sowie weiteren Oxo-Anionen, die mittels UV-Spektroskopie ermittelt wurden.

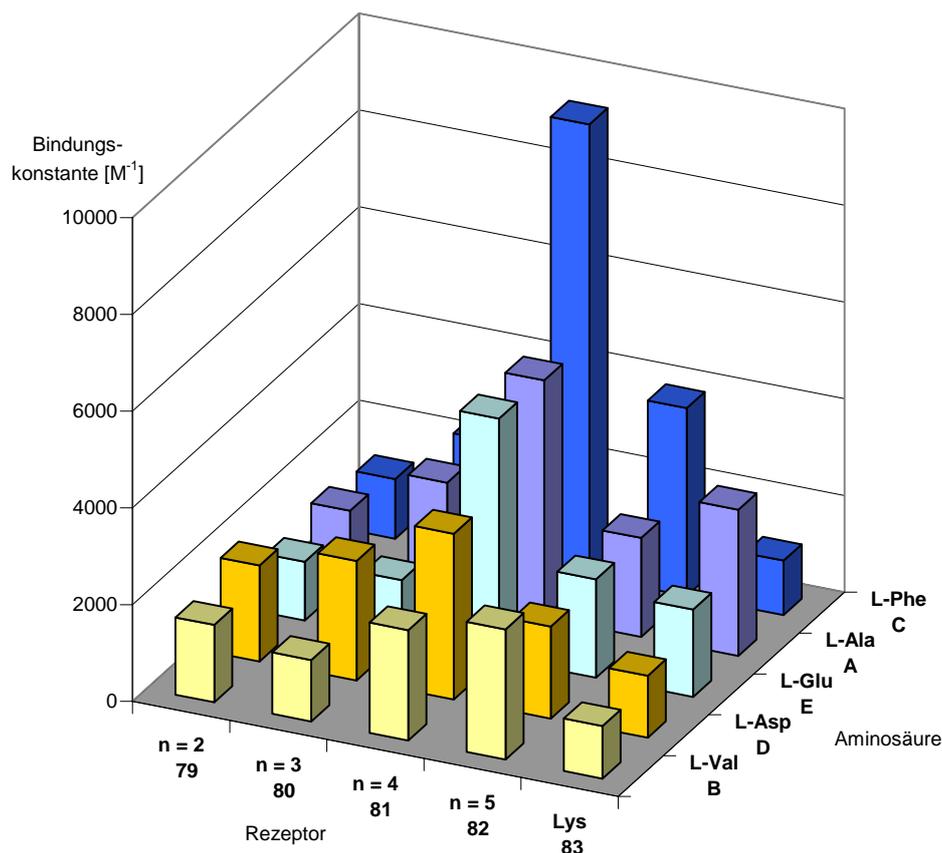


Abb. 95 Graphische Darstellung der Bindungskonstanten der Rezeptoren **79** bis **83** von **Tab. 11**.^[114] Reproduced with permission. Copyright 2007 American Chemical Society.

Mit länger werdendem Linker würde man generell eine schwächere Komplexierung erwarten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die Komplexierung die vorher vorhandene Flexibilität in Form von freier Drehbarkeit um die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen im Linker eingefroren wird und damit ein Teil dieses Freiheitsgrades verloren geht. Generell hat dies einen negativen entropischen Effekt zur Folge (siehe **2.2 Grundlagen der Komplex-Bildung**). Einen solchen Effekt beobachtete *H.-J. Schneider*, als er den Einfluss von Alkyl-Spacern bei der Komplexierung von flexiblen Bis-Ammonium-Kationen mit Bis-Anionen in Wasser untersuchte. Es zeigte sich, dass die Komplexstabilität stetig mit steigender Spacerlänge sank.^[115]

Die UV-Bindungsstudie unserer biskationischen Rezeptoren hingegen zeigt ein anderes Bild: Die Komplexstabilität steigt für alle Oxo-Anionen, ausgehend vom Rezeptor mit dem kürzesten Spacer an, bis sie für das Biskation **81** mit einer Spacerlänge von vier Methylengruppen ein Maximum erreicht. Erst für noch längere Linker sinkt die Komplexstabilität wieder, erwartungsgemäß des oben beschriebenen Befundes. Dieser anscheinend anormale

Effekt für die Rezeptoren mit kurzem Spacer ist nicht verwunderlich, da die Spacerlänge der biskationischen Rezeptoren **79** und **80** nicht ausreichend lang ist, um mit der zweiten positiven Ladung des Ammonium-Kations die Carboxylat-Einheit zusätzlich zu komplexieren. Die Bindungskonstanten dieser beiden Biskationen **79** und **80** liegen in der Größenordnung der Bindungskonstante, die dem einfachen Guanidiniocarbonylpyrrol-Monokation **76** (**Abb. 61**) entspricht, also $K < 1500 \text{ M}^{-1}$.^[6] Somit ist ein komplexierender Chelat-Effekt der Ammonium-Gruppe bei diesen beiden Rezeptoren nicht erkennbar. Der Rezeptor **81** mit vier Methylen-Einheiten als Spacer hingegen zeigt deutlich stärkere Assoziationseigenschaften. Hier ist der Spacer lang genug, damit die positiv geladene Ammonium-Gruppe zusammen mit der positiv geladenen Guanidiniocarbonylpyrrol-Gruppe das Carboxylat gemeinsam chelatartig komplexieren kann. Wird der Spacer noch länger, wie im Biskation **82** und **83** mit jeweils fünf Methylen-Einheiten, so sinkt die Komplexstabilität. Dies lässt sich durch den oben beschriebenen entropischen Effekt erklären, da sich jetzt die Einschränkung der Flexibilität durch die Komplexierung auf Kosten der Bindungsenthalpie auswirkt. Eine andere Erklärung der schlechteren Komplexierung dieser Rezeptoren könnte darauf beruhen, dass bei diesen Rezeptoren die Möglichkeit besteht, günstige intramolekulare Wechselwirkungen auszubilden. Diese müssten bei einer intermolekularen Komplexierung eines Substrates erst gelöst werden, was sich ungünstig auf die Assoziation auswirkt. Diesen Effekt fanden auch *Rehm* bei der Selbstassoziation von Guanidiniocarbonylpyrrol-Carboxylat-Zwitterionen^[11] und *K. L. Mardis* bei der intramolekularen Komplexierung von Diaminen mit Dicarboxylaten^[104] (siehe **4.2.2 Bindungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren**).

Die beste Komplexierung unter den verschiedenen Oxo-Anionen mit den biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren zeigte *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin-Carboxylat, außer mit dem Lysin-Derivat **83**. Auch hier erreichte die Assoziationskonstante ihren größten Wert für das Biskation **81** mit einem Wert von $K_{\text{Ass}} = 1.07 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Für wässrige gepufferte Systeme ist eine solche Komplexbildungskonstante für die Bindung von Aminosäuren sehr hoch und bedeutet eine sehr gute Komplexierung. Hingegen ist die Assoziation mit *N*-Acetyl-*L*-Alanin-Carboxylat nur etwa halb so stark ($K_{\text{Ass}} = 5.8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$) und etwa nur ein Fünftel für *N*-Acetyl-*L*-Valin-Carboxylat ($K_{\text{Ass}} = 2.2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$). Die hohe Bindungskonstante ist im Wesentlichen auf zusätzliche Kation- π -Wechselwirkungen (**2.2 Grundlagen der Komplexbildung**) der Guanidiniocarbonylpyrrol-Einheit des Rezeptors mit dem aromatischen Phenylring

der Aminosäure sowie π - π -Wechselwirkungen der beiden Aromaten zurückzuführen. In **Abb. 96** ist eine berechnete energieminierte Struktur (mittels Monte Carlo Konformationsuche) des Komplexes des Biskations **81** und *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin **C** gezeigt, bei der die positive Guanidinio-Einheit über dem Phenylring zu sehen ist.

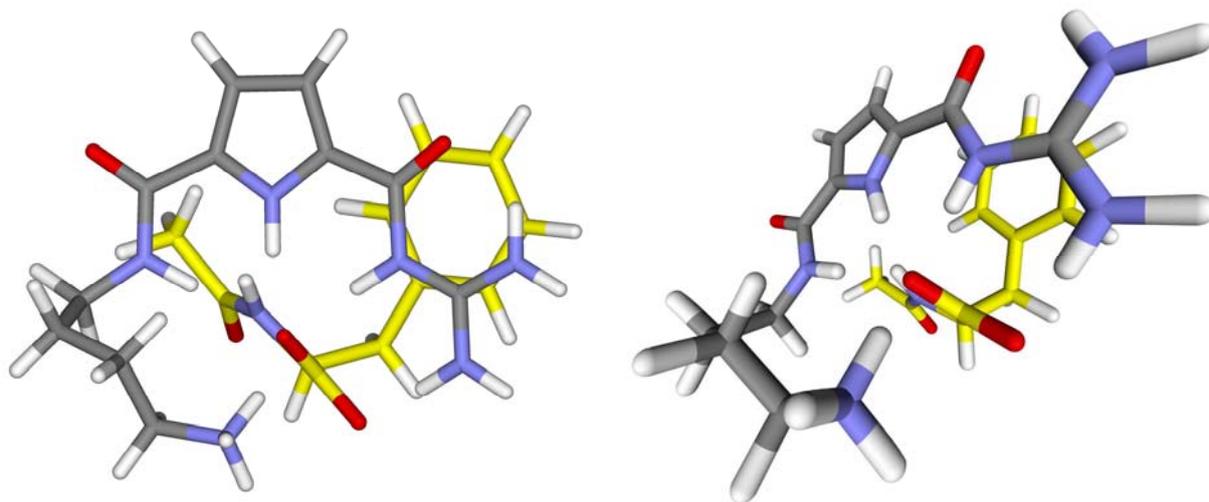


Abb. 96 Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von **81** mit *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin **C**.

Auch für die beiden sauren Aminosäuren (zwei Carboxylat-Funktionen), also *N*-Acetyl-Aspartat **D** und *N*-Acetyl-*L*-Glutamat **E**, wurde eine 1:1-Komplexierung gefunden. Diese beiden polaren anionischen Aminosäuren werden ebenfalls durch das Biskation **81** sehr gut gebunden. So wird beispielsweise Glutamat **E** von dem um eine Methylen-Einheit kürzeren Rezeptor **80** fünfmal schlechter komplexiert als vom Rezeptor **81** ($K_{\text{Ass}} = 1.3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ versus $6.1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$). Für die Rezeptoren mit längeren Spacern sinkt die Assoziationskonstante wieder, ähnlich wie bei den Monocarboxylaten. Bei den Dicarboxylaten ist aber dennoch ein interessanter Effekt zu beobachten: während die Biskationen **79** und **80** mit kürzerem Spacer (Ethyl- und Propyl-Einheit) besser Aspartat **D** komplexieren, gehen die Biskationen **81**, **82** und **83** mit Glutamat **E** stärkere Komplexe ein (z. B. Biskation **81** mit $K_{\text{Ass}} = 3.9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ versus $6.1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$). Dieser Unterschied ist aber nicht überraschend, wenn man einfach die Tatsache bedenkt, dass Rezeptoren mit kürzerem Spacer besser die kürzere Aminosäure komplexieren sollten, bei der die beiden Carboxylate enger beieinander sind. Wird der Spacer der Rezeptoren länger, kann Aspartat **D** schlechter komplexiert werden, während jetzt Glutamat **E** die optimale Länge besitzt. *Molecular modeling* Studien (Macromodel 8.0, Amber* Kraftfeld, GB/SA Solvation von Wasser)^[103] untermauern diese Erklärung. Sie lassen vermuten, dass eine optimale Komplexierung u. a. auch aufgrund der komplementären

Entfernung der beiden Ladungen sowohl in den Rezeptoren als auch in den Aminosäuren zustande kommt, da dann optimale Wechselwirkungen von Rezeptor und Substrat mit minimierten Torsionskräften vorliegen. Die Komplexierung von Biskation **79** und *N*-Acetyl-*L*-Aspartat **D** ist in **Abb. 96** zu sehen, während **Abb. 97** die Komplexierung von Biskation **81** und *N*-Acetyl-*L*-Glutamat **E** zeigt.

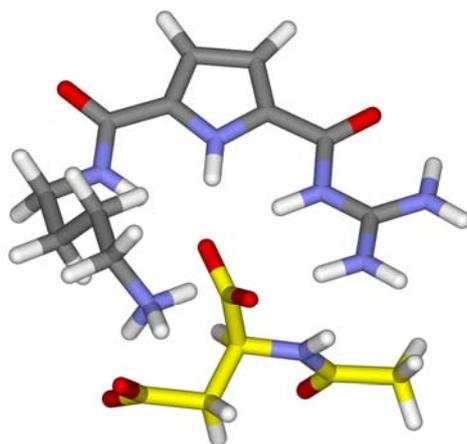


Abb. 97 Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von **79** mit *N*-Acetyl-*L*-Aspartat **D**.

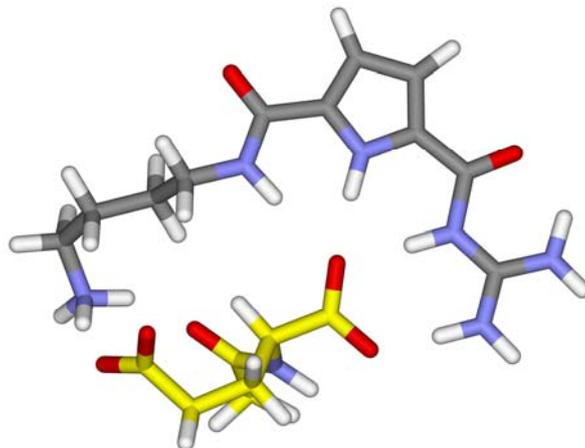


Abb. 98 Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von **81** mit *N*-Acetyl-*L*-Glutamat **E**.

Dies kann auch die signifikante Erhöhung der Komplexstabilität für Glutamat erklären, betrachtet man die Assoziation mit den Biskationen **80** ($n = 3$) und **81** ($n = 4$). Für Aspartat **D** mit einer Methylen-Einheit weniger als Glutamat **E** zwischen den beiden Carboxylat-Einheiten ist es schon dem Biskation **79** möglich, mit beiden positiven Ladungen beide Carboxylat-Funktionen zu komplexieren. Auch zeigen die theoretischen Berechnungen, dass das Ionenpaar zwischen dem Guanidiniocarbonylpyrrol-Kation und dem α -Carboxylat des

Aspartats **D** etwas gewinkelt ist. Während normalerweise ein Carboxylat in einer planaren bidentaten Geometrie komplexiert wird, ist hier die Abwinkelung dadurch zu erklären, dass durch die zusätzliche Wechselwirkung der zweiten positiven Ladung im Substrat-Molekül eine Spannung erzeugt wird. Die Abschwächung der Bindung durch die Abwinkelung wird aber durch die zweite zusätzliche ionische Komplexierung überkompensiert.

Neben den Aminosäurecarboxylaten wurden auch Acetat **F** und das anorganische Substrat Sulfat **G** mit in die Bindungsstudien einbezogen. Beide Anionen werden durch die beiden Biskationen **79** und **80** nur unzureichend ($K_{\text{Ass}} < 1.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$) gebunden. Für Acetat **F** erhöht sich wiederum die Bindungsaffinität deutlich durch das Biskation **81** und bleibt für die Biskationen mit noch längerem Spacer **82** und **83** auf ähnlichem Niveau ($K_{\text{Ass}} \sim 3.4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$). Sulfat **G** wird von den drei Biskationen **81**, **82** und **83** etwas schwächer gebunden ($K_{\text{Ass}} \sim 2.3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$), hauptsächlich wohl aufgrund der höheren Basizität von Acetat **F** oder der unterschiedlichen Solvatation der beiden Anionen.

Aufgrund der besonders guten Assoziation des Biskations **81** mit *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin Carboxylat **C** im Vergleich zu allen anderen Rezeptor-Substrat-Systemen, wurde dieses Komplexpaar in weiteren Bindungsstudien mit anderen Messmethoden untersucht.

In Fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurde ebenfalls die synchrone Anregungsmethode angewendet aufgrund größerer Empfindlichkeit und geringerer Messungenauigkeit gegenüber der gängigen Anregungsmethode bei konstanter Wellenlänge (siehe **4.2.2 Bindungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren**). Hierbei wurden Spektren zwischen 250 und 400 nm mit einer Wellenlängendifferenz zwischen Anregung und Emission von $\Delta\lambda = 20$ nm aufgenommen. Als Lösemittel wurde, wie zuvor bei den UV-Bindungsstudien, eine 10 %ige Lösung von DMSO in Wasser mit einem Bis-Tris-Puffer ($c = 10$ mM) und einem eingestellten pH-Wert von 6.00 verwendet. Die Konzentrationen des Rezeptors **81** war $c = 7 \mu\text{M}$ und für Phenylalanin **C** $c = 0.15$ mM. Bei Zugabe des Carboxylates entstand eine neue Fluoreszenzbande bei $\lambda_{\text{Em}} = 285$ nm, die dem Phenylalanin zuzuordnen ist. Bei $\lambda_{\text{Em}} = 335$ nm ist die Fluoreszenzbande des Pyrrols zu sehen, die im Gegensatz zur Aminosäurebande abnimmt. Diese Abnahme beruht allein auf der Verdünnung des biskationischen Rezeptors. Da die berechnete Verdünnungskurve unterhalb der experimentellen Messpunkte liegt,

resultiert aus der Komplexierung eine Zunahme der Fluoreszenz-Intensität bei $\lambda_{Em} = 335$ nm. Dies steht im Gegensatz zu den Fluoreszenz-Titrationen der Tweezer-Rezeptoren mit Folsäure, wo eine starke Abnahme der Fluoreszenz-Intensitäten zu beobachten war (**4.2.2 Bindungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren**). Die experimentell bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten bei dieser Wellenlänge sind für den biskationischen Rezeptor **81** $\varepsilon = 1.86 \cdot 10^7 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ und für Phenylalanin **C** $\varepsilon = 25 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Die Fluoreszenzbande wird analog der UV-Titrationsspektren ausgewertet, indem man unter Berücksichtigung der Verdünnung des Biskations **81** die Bindungsisotherme mittels nichtlinearer Kurvenanpassung berechnen kann (**Abb. 99**).

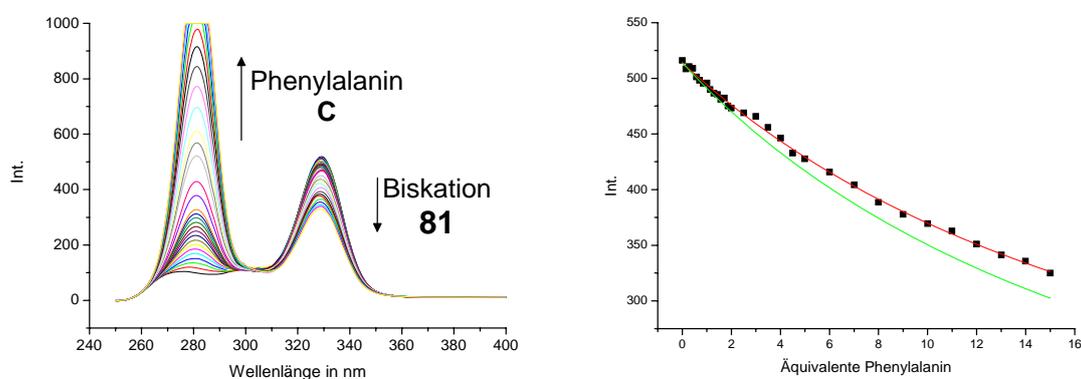


Abb. 99 Links: Fluoreszenz-Titrationsspektrum des Rezeptors **81** mit *N*-Acetyl-Phenylalanin **C** bei synchroner Anregung mit $\Delta\lambda = 20$ nm. Rechts: Bindungsisotherme (rot) und berechnete Verdünnung (grün) bei $\lambda_{Em} = 335$ nm.^[114] Reproduced with permission. Copyright 2007 American Chemical Society.

Hierbei wurde eine Bindungskonstante von $K_{Ass} = 4.6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ gefunden, was auf die Bildung eines ziemlich starken Komplexes in wässrigem Medium hinweist. Der unterschiedliche absolute Wert von UV- und Fluoreszenz-Untersuchungen (etwa Faktor zwei) ist auf die unterschiedlichen Messbedingungen beider spektroskopischen Methoden, also unterschiedliche Konzentrationen von Rezeptor, Substrat und Puffer, zurückzuführen. (siehe **2.3 Bestimmung von Bindungskonstanten**).

Weiterhin wurden auch Bindungsstudien mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) versucht. Dazu wurden Rezeptor **81** und Substrat **C** in einer 1:1-Mischung aus Methanol und Wasser gelöst, die einen Bis-Tris-Puffer ($c = 20$ mM) enthielt und auf $\text{pH} = 6.00$ eingestellt wurde. Die im Wesentlichen messtechnisch begründeten veränderten Messbedingungen

wurden bereits bei der Diskussion der biskationischen Rezeptoren dargelegt (**4.2.2 Bindungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren**). Das Biskation wurde in der Konzentration von $[81] = 0.6 \text{ mM}$ in der Messzelle vorgelegt, während die Aminosäure in einer Konzentration von $[C] = 10 \text{ mM}$ in festen Aliquoten zugegeben wurde. Die dazugehörige Messkurve ist in **Abb. 100 A** zu sehen. Die Wärmetönungen durch Verdünnungen wurden ebenfalls bestimmt, indem einerseits das Lösemittelgemisch zur Rezeptorlösung (**Abb. 100 B**) und andererseits die Substrat-Lösung zum Lösemittelgemisch (**Abb. 100 C**) titriert wurde.

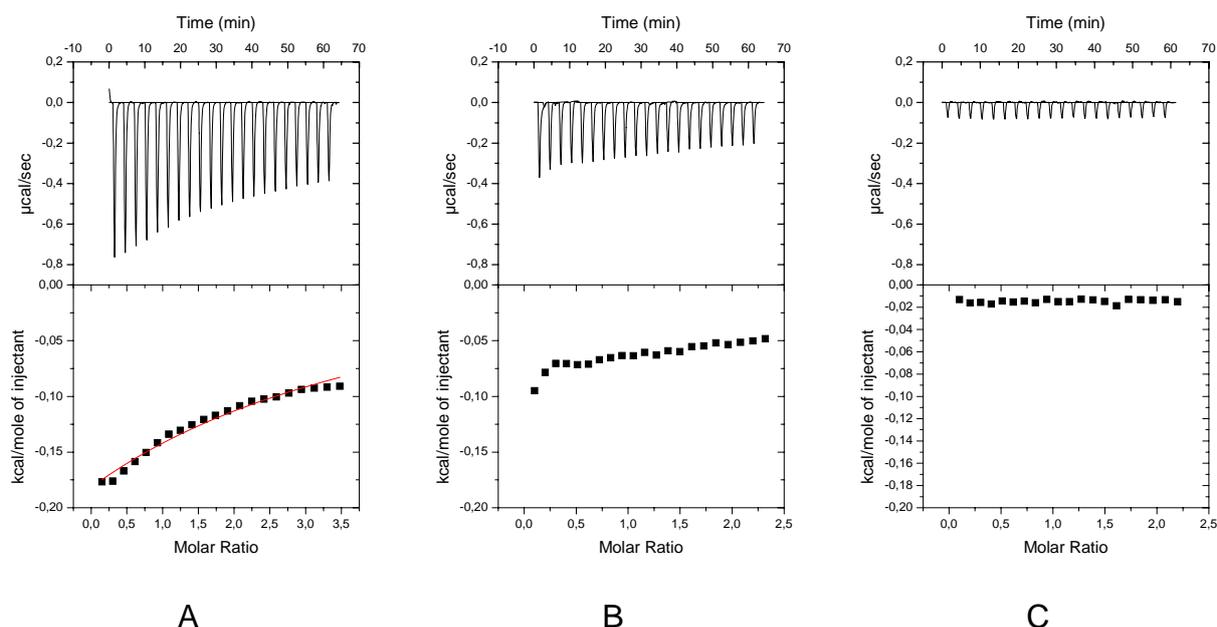


Abb. 100 Jeweils oben: ITC-Messkurve, wobei die freiwerdende Wärmeenergie bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ gegen das Molverhältnis aufgetragen ist; Jeweils unten: Integration der Peaks. Messung A: Titration des Rezeptors **81** mit *N*-Acetyl-Phenylalanin **C**, Messung B: Verdünnung des Biskations **79** und Messung C: Verdünnung von *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin **C**.

Nach Subtraktion der Wärmetönungen der Messungen B und C von A (**Abb. 100**), erhielt man die Messkurve in **Abb. 101**. Jedoch sind die beobachteten Wärmeentwicklungen derartig gering, dass keine glaubwürdige Interpretation dieser Daten bezüglich einer Bindungskonstante möglich ist. Allerhöchstens lassen die Daten einen vagen Hinweis auf eine entropisch getriebene Reaktion zu, wie dies auch bei ITC-Messungen der Tweezer-Rezeptoren beobachtet wurde (siehe **4.2.2 Bindungseigenschaften der Tweezer-Rezeptoren**). In der Literatur wird ebenfalls von entropisch getriebenen Reaktionen beim gleichzeitigen Auftreten von Ionenpaaren und Kation- π -Wechselwirkungen in wässriger Lösung berichtet.^[108, 109]

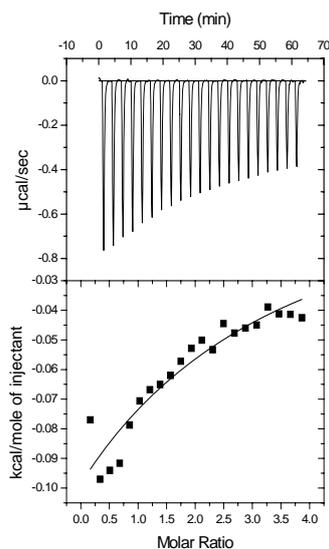


Abb. 101 Oben: ITC-Daten der Titration des Rezeptors **81** mit *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin **C**. Die freiwerdende Wärmeenergie bei 25 °C der Komplexbildung ist gegen das Molverhältnis aufgetragen. Unten: Bindungsisotherme nach Subtraktion der Verdünnungsenergien von Rezeptor und Substrat.

Zur weiteren Untersuchung der Assoziation des Biskations **81** mit *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin **C** wurden NMR-Bindungsstudien durchgeführt. Neben Titrationsexperimenten zur Bestimmung der Assoziationskonstante wurden auch NOE-Messungen aufgenommen, um strukturelle Informationen der Komplexbildung zu erhalten. Als Lösemittel für die Titrationsexperimente wurde Wasser mit 10 % DMSO- d_6 verwendet. Daher war es nötig, die ^1H -NMR Spektren mittels Wasserunterdrückung (siehe **2.3 Bestimmung von Bindungskonstanten**) aufzunehmen. Der Rezeptor **81** wurde in der Konzentration von $[\mathbf{81}] = 1.5 \text{ mM}$ vorgelegt, während Phenylalanin **C** in einer Konzentration von $[\mathbf{C}] = 15 \text{ mM}$ zutitriert wurde. In **Abb. 102** (oben) ist eine NMR-Titration zu sehen. Die überlagerten ^1H -Spektren von unterschiedlichen Molverhältnissen wurde mit Wasserunterdrückung bei $\delta = 4.57 \text{ ppm}$ aufgenommen. Dabei erkennt man die charakteristische Hochfeldverschiebung der Pyrrol-Protonen, die bereits bei anderen Komplexbildungsvorgängen unseres Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotivs mit Oxo-Anionen beobachtet wurde.^[74] Jedoch sind die Änderungen der chemischen Verschiebung zu gering ($\Delta\delta \sim 0.015$), um eine Bindungskonstante zu berechnen, wie es in **Abb. 102** (unten) angedeutet ist. Signale, die durch die Komplexbildung eine deutlichere Verschiebung zeigen sollten, z. B. die Guanidinio-Protonen, konnten aufgrund des schnellen Austauschs mit dem wässrigen Lösemittel nicht detektiert werden. Auch bei allen anderen Protonen des Rezeptors **81** sind Tendenzen in der chemischen Verschiebung zu erkennen, bis auf das Amid-NH bei $\delta = 8.23 \text{ ppm}$ sowie drei Methylen-Einheiten bei $\delta = 3.21 \text{ ppm}$ (zwei

Protonen) und $\delta = 1.51$ ppm (vier Protonen). Beim Substrat Phenylalanin **C** weisen die Änderungen der chemischen Verschiebung des Amid-Protons und die der benzyllischen Methylen-Gruppe auf eine gute Assoziation hin. Die aromatischen Protonen lassen sich hinsichtlich einer Komplexierung nicht auswerten.

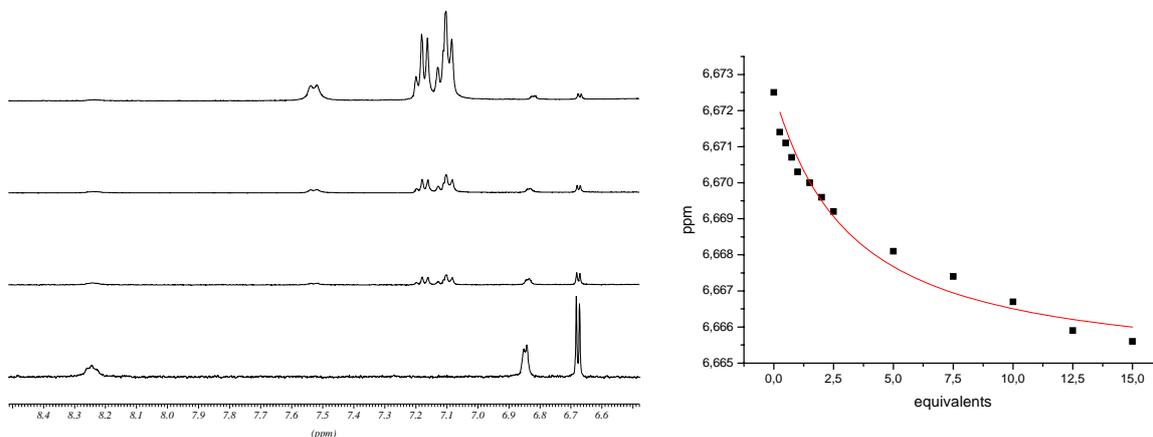


Abb. 102 Links: Überlagerung von ^1H -NMR-spektren der Titration des Rezeptors **81** mit *N*-Acetylphenylalanin **C**. Bei $\delta = 6.67$ ppm und $\delta = 6.84$ ppm sind die beiden Pyrrol-Protonen und bei $\delta = 8.25$ ppm ein Amid-Proton des Biskations **81** zu sehen, während bei $\delta = 7.05$ bis 7.25 ppm die benzyllischen Protonen und bei $\delta = 7.51$ ppm das Amid-Proton von Phenylalanin **C** dargestellt. Äquivalente von Rezeptor zu Substrat bei den Spektren von unten nach oben: reines Biskation **81**, 0.4 eq, 1 eq und 10 eq. Rechts: Bindungsisotherme, berechnet aus der chemischen Verschiebung des rechten Pyrrol-Protons bei $\delta = 6.67$ ppm.

Eine Vorstellung der Komplexierung lieferte eine NOE-Studie des Biskations **81** mit Phenylalanin **C**, die in $\text{MeOH-}d_3$ bei 213 K und einer Mischungszeit von 300 ms durchgeführt wurde. In **Abb. 103** ist oben links ein Komplexierungsschema aufgrund von intermolekularen NOE-Kreuzsignalen (rote Kreise in den NOE-Spektren) zu sehen, die eine räumliche Nähe (Abstand bis $5 \text{ \AA} = 0.5 \text{ nm}$) der Protonen anzeigen. Die weiteren Graphiken in **Abb. 103** sind Ausschnitte des NOE-Spektrums. Dabei werden Kreuzsignale zwischen der *N*-Acetylgruppe des Phenylalanins **C** und den Methylen-Gruppen des Linkers von Biskation **81** beobachtet (oben rechts). Diese Methylen-Gruppen zeigen ebenfalls auch eine räumliche Nähe zum Amid-Proton (unten links) und zu den phenylischen Protonen (unten rechts) des Substrates. Der aromatische Ring des Phenylalanins **C** erzeugt auch NOE-Signale zum Linker-Amid-Proton sowie zu einem Pyrrol-Proton. Die NOE-Kreuzsignale machen deutlich, dass es sich bei der Assoziation nicht um eine wahllose Aggregation als vielmehr um einen wohl definierten Komplex mit fester Geometrie handelt.

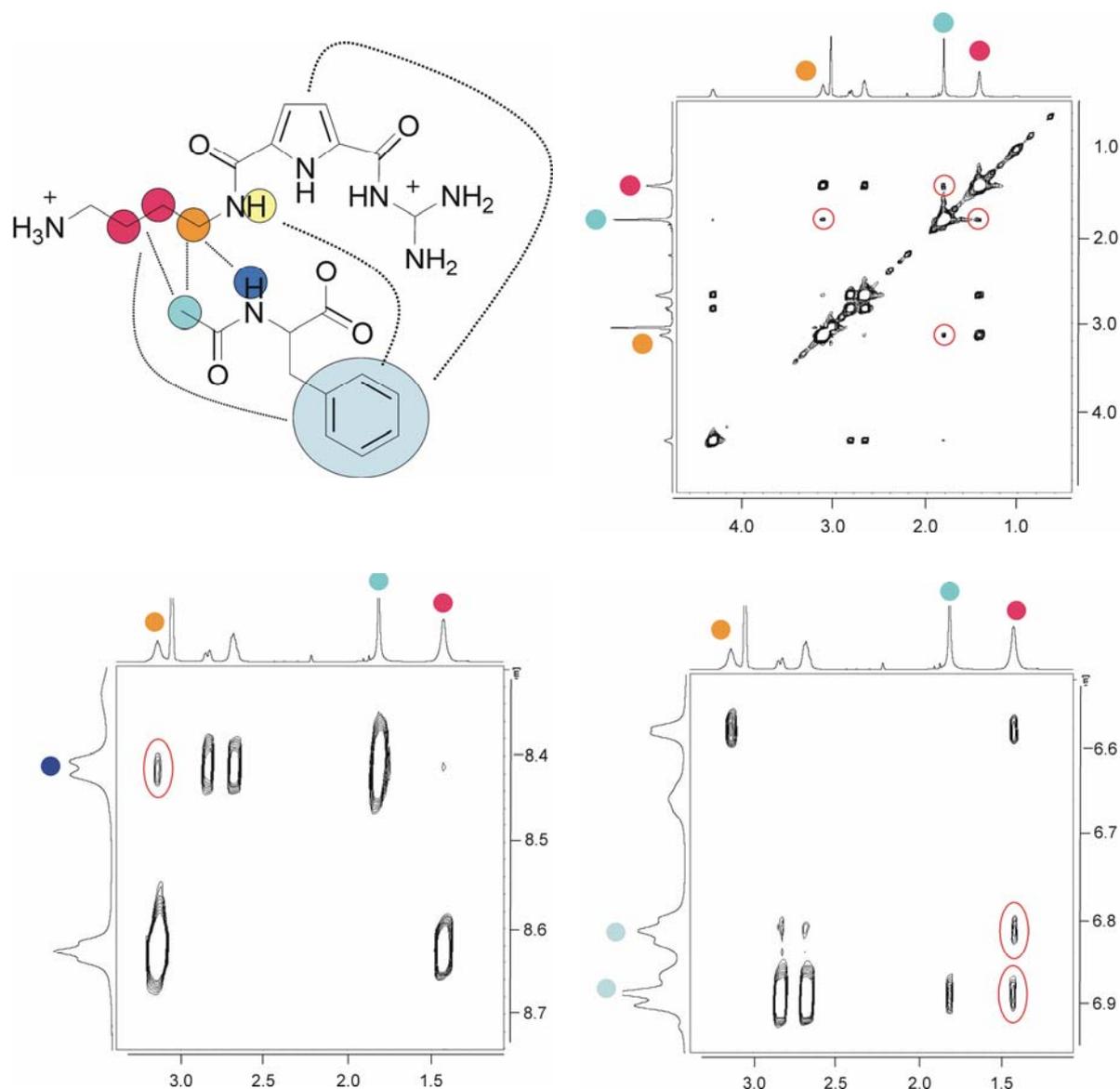


Abb. 103 Ausschnitte des NOE-Spektrums vom Biskation **81** mit *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin **C** in MeOH-*d*₃ mit ausgewählten intermolekularen NOEs (rote Kreise).^[114] Reproduced with permission. Copyright 2007 American Chemical Society.

Als weitere Untersuchungsmethode des Komplexes wurde eine ESI-MS-Messung in Methanol durchgeführt. Im positiven Messmodus konnte neben dem Massenpeak des Biskations **81** von $m/z = 267.1542$ für $(R + H)^+$ (ber. für $C_{11}H_{19}N_6O_2^+$: 267.1564) und dem des Substrates **C** von $m/z = 230.0819$ für $(S + Na)^+$ (ber. für $C_{11}H_{13}NNaO_3^+$: 230.0793) auch der Peak für die Komplexmasse von $m/z = 474.2472$ für $(R + S + H)^+$ (ber. für $C_{22}H_{32}N_7O_5^+$: 457.219) gefunden werden. Diese Massen wurden sowohl als einfach protoniert als auch als Natrium-Addukt gefunden (**Abb. 104**).

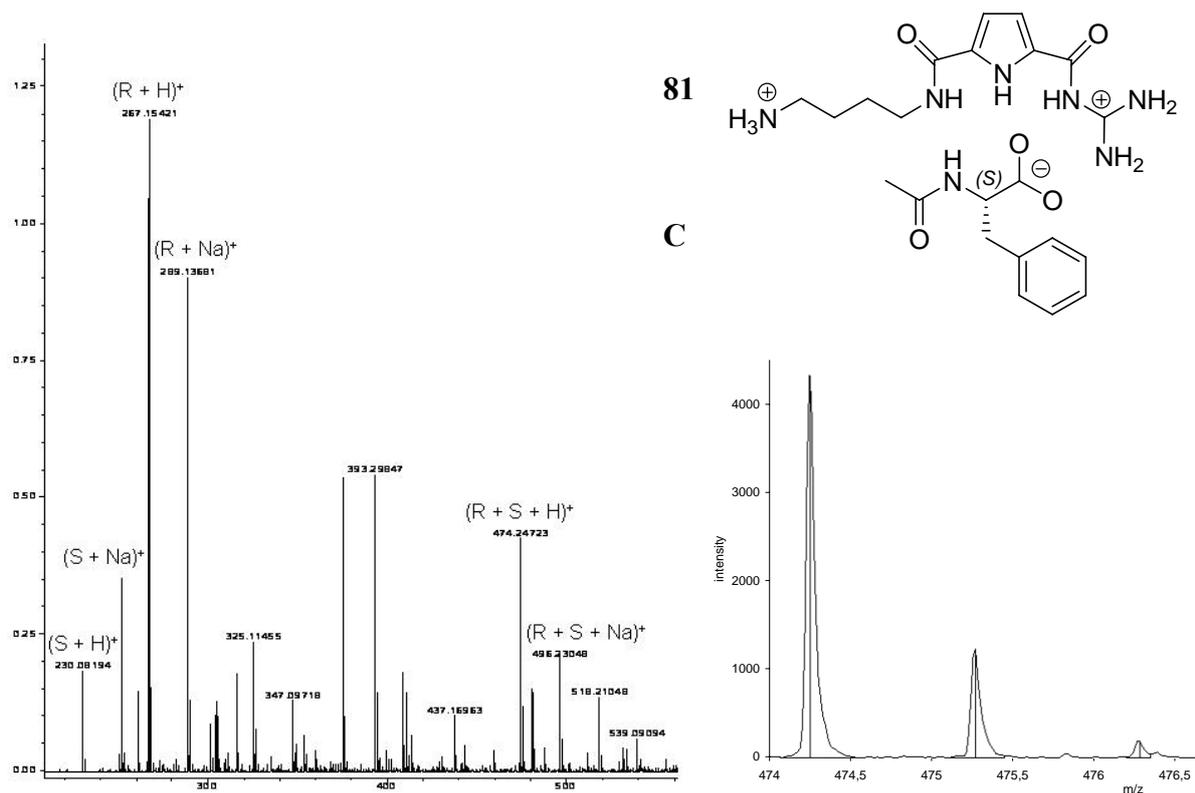


Abb. 104 Links: ESI-MS-Spektrum des Komplexes von Rezeptor **81** (R) mit Phenylalanin **C** (S). Rechts: Ausschnittsvergrößerung der Komplexmasse für $(R + S + H)^+$: $m/z = 474.2472$ (ber. für $C_{22}H_{32}N_7O_5^+$: 457.219).

Um eine bessere geometrische Vorstellung der Komplexbildung des Biskations **81** mit Phenylalanin **C** in Wasser zu bekommen, wurde mittels *molecular modeling* Berechnungen (Macromodel 8.0, Amber* Kraftfeld, GB/SA Solvation von Wasser)^[103] eine energieminierte Struktur berechnet (Monte Carlo, 100.000 Schritte). Das Ergebnis der Konformationssuche ist in **Abb. 105** dargestellt. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die Carboxylat-Einheit des Phenylalanins **C** mit beiden positiven Einheiten des Rezeptors **81** wechselwirkt. Durch die zusätzliche Wechselwirkung der positiven Ladung des primärenamins wird die normalerweise planare Komplexbildungsgeometrie zwischen dem Carboxylat und der Guanidinio-Einheit etwas verzerrt und abgewinkelt. Dieses Phänomen wurde bereits bei der Modellierung der Komplexbildung des Biskations **79** mit *N*-Acetyl-*L*-Aspartat **D** beobachtet (**Abb. 97**). Weiterhin ist in der berechneten Struktur die Kation- π -Wechselwirkung des aromatischen Phenylrings mit der Guanidiniocarbonylpyrrol-Einheit zu sehen, die sich beide parallel übereinander anordnen.

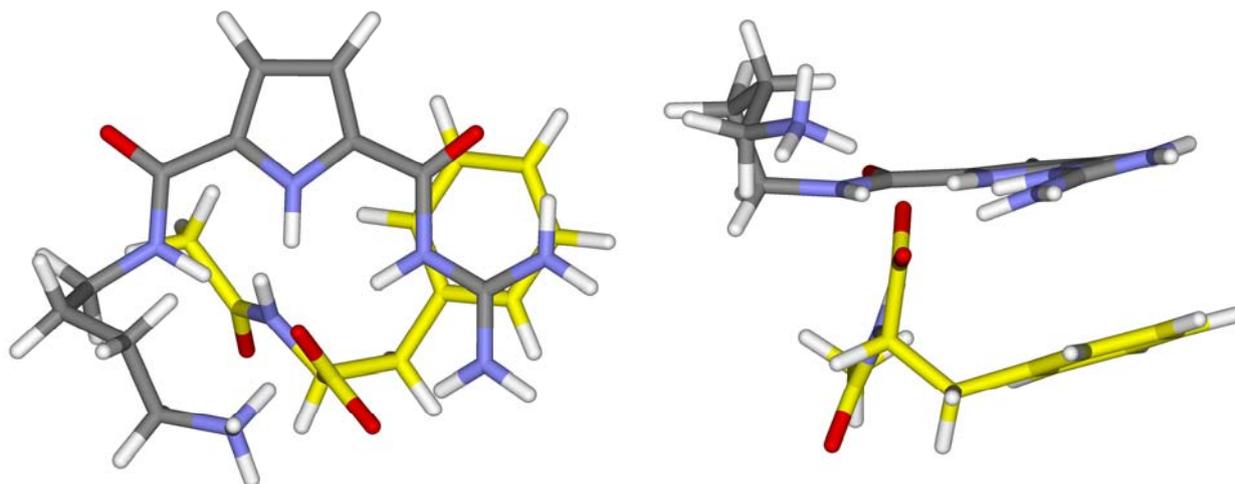


Abb. 105 Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von **81** und *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin **C**. Während das Carboxylat ionische Wechselwirkungen zu beiden kationischen Gruppen des Rezeptors (Guanidinio-Einheit und primäres Amin) aufweist, zeigt der aromatische Phenylring π -Wechselwirkungen zum planaren Guanidiniocarbonylpyrrol-Motiv.

Ein ähnlicher Effekt wurde auch schon bei der Komplexierung des monokationischen Rezeptors **98** mit *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin **C** beobachtet (**Abb. 106**).^[6, 34]

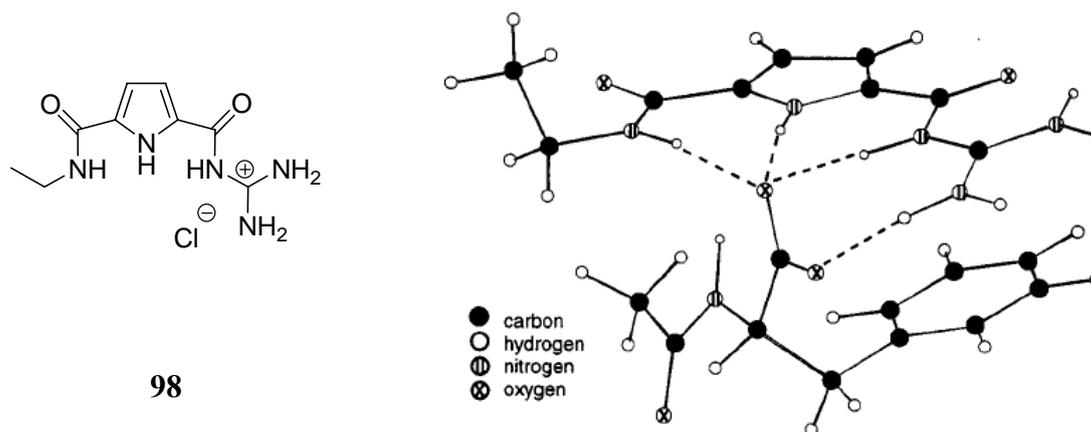


Abb. 106 Links: Monokationischer Rezeptor **98**. Rechts: berechnete Komplexstruktur von Rezeptor **98** mit Phenylalanin **C**, bei der die gestrichelten Linien Wasserstoffbrückenbindungen darstellen.^[6, 34] Reproduced by permission of the Society of Chemistry.

Die experimentell ermittelten strukturellen Daten aus der NMR-Spektroskopie (Titrationsexperimente und NOE-Studien) stimmen sehr gut mit der berechneten Komplexstruktur der **Abb. 105** überein. So ist beispielsweise die *N*-Acetylgruppe der Aminosäure derart zum Linker des Rezeptors gedreht, dass man im 2D-NMR einen NOE-Kontakt beobachten konnte. Auch die π -Wechselwirkung zwischen den Phenyl-Protonen und einem Pyrrol-Proton wurde im NOE-Spektrum beobachtet, ebenso wie die räumliche Nähe zwischen dem Amid-Proton

des Phenylalanins und der Methylen-Einheit des Linkers. Von den benzyllischen Protonen des Phenylalanins sind keine NOE-Kreuzsignale beobachtet, was durch die berechnete Struktur bestätigt wird. Darin zeigen diese Protonen von dem Rezeptor weg.

Kristallisationsversuche des Komplexes von **81** und *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin **C** zum Zweck von Röntgenstruktur-Aufnahmen waren leider nicht erfolgreich. Versuche zur Darstellung des notwendigen Einkristalls in einem definierten 1:1-Komplex aus Wasser, Methanol bzw. deren Gemisch lieferten lediglich amorphe Feststoffe.

Es wird allgemein angenommen, dass in der Supramolekularen Chemie, und hier vor allem in der Rezeptor-Substrat-Komplexierung, flexible Linker vermieden werden sollten. Aufgrund des entropischen Effekts führen sie überwiegend zu einer Schwächung der Assoziation. Meistens kann dieser Effekt durch gute Präorganisation verringert werden, indem Flexibilität und Freiheitsgrade schon im Vorfeld in den einzelnen Komponenten verringert bzw. eingeschränkt werden.

Mit dieser Serie von den Biskationen **79** bis **83** konnte gezeigt werden, dass trotz der Erhöhung der Linkerlänge und damit auch der Flexibilität des Linkers die Stärke der Komplexierung zunächst zunimmt. Während die beiden Biskationen **79** und **80** mit kürzerem Linker eine nur schwache Komplexierung zu Aminosäurecarboxylaten in Wasser zeigen, ist für den Rezeptor **81** mit vier Methylen-Einheiten eine signifikante Erhöhung der Bindungskonstante beobachtet worden. Dieses eigentlich untypische Verhalten ist darauf zurückzuführen, dass erst die Linkerlänge des Biskations **81** optimal ist, um mit beiden positiven Ladungen die Carboxylat-Einheit von Aminosäuren bestmöglich zu komplexieren. Diese besondere Komplexstabilität sinkt wieder für die Biskationen **82** und **83** mit länger werdendem flexibleren Linkern, wie dies auch zu erwarten war.

Auch wird deutlich, dass hier nicht nur ungerichtete Coulomb-Wechselwirkungen für die Anionen-Erkennung verantwortlich sind, als vielmehr die Ausbildung von gerichteten, bidentaten Ionenpaaren, die eine bestimmte geometrische Ausrichtung von Rezeptor und Substrat voraussetzen. Ein längerer, flexibler Linker muss sich also im Design von Oxo-Anionen-Rezeptoren in der Supramolekularen Chemie nicht zwingend negativ auswirken. Hier ist eine umfassende Betrachtung der einzelnen miteinander wechselwirkenden Beiträge unbedingt nötig, um die komplexierenden Eigenschaften eines Rezeptors bewerten zu können.

5 AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde die Weiterentwicklung von Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren hinsichtlich ihrer Komplexierungseigenschaften gegenüber Oxo-Anionen in zwei Teilprojekten untersucht. Dabei zeigte sich, dass durch das Einfügen eines zweiten flexiblen Seitenarms an der Guanidinio-Einheit keine Verbesserung erreicht werden konnte, da dieser nicht an der Komplexierung teilnimmt. Durch den Einbau einer zweiten positiven Ladung in den Rezeptor konnte jedoch die Assoziation und die Substratspezifität erhöht werden. Neben einem Optimierungsvorschlag zur Darstellung *N, N'*-alkylierter Tweezer-Rezeptoren werden im Folgenden Anregungen für weitere Verbesserungsmöglichkeiten zur Komplexierung oxo-anionischer Substrate aufgezeigt.

Ein wesentlicher Schritt bei der Synthese der Tweezer-Rezeptoren war die Umsetzung des *in situ* erzeugten triflatierten Guanidiniocarbonylpyrrols **24** mit α -Aminosäuren zur Verbindung **101** (Abb. 107). Dabei war die Aminogruppe der Aminosäure oft nicht nukleophil genug, da sie als Hydrochloridsalz eingesetzt und mit Triethylamin deprotoniert wurde. Um diese Reaktion zu optimieren, könnte man die nukleophilere freie Aminofunktion der α -Aminosäure einsetzen. Dies erreicht man dadurch, dass die Aminosäure zuvor mit einem basischen Ionenaustauscher, beladen mit Natronlauge, behandelt wird. Auf diese Weise könnten Tweezer-Rezeptoren mit α -Aminosäure-Bausteinen synthetisch besser zugänglich sein.

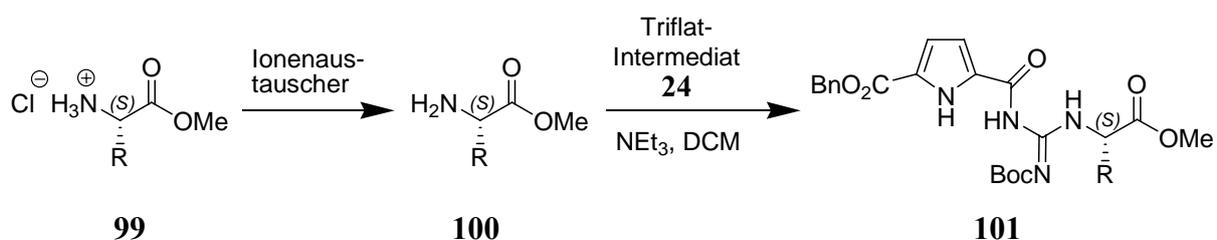


Abb. 107 Durch Behandlung eines α -Aminosäuremethylester-Hydrochlorids **99** mit einem Ionenaustauscher erhält man das freie Amin **100**. Anschließende Umsetzung mit der triflatierten Guanidiniocarbonylverbindung **24** liefert die *N, N'*-substituierte Guanidiniocarbonylverbindung **101**.

Bei der Komplexbildung der hier synthetisierten Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren liegt ein grundlegendes Problem darin, dass sich der zusätzliche Seitenarm an der Guanidinio-Einheit so ausrichtet, dass er weder zur Erhöhung der Komplexbildungskonstanten noch zur Substratspezifität beiträgt und lediglich vom Lösemittel solvatisiert wird. Diese Passivität des zusätzlichen Seitenarms wird durch eine freie Drehbarkeit um die Stickstoff-Kohlenstoff-Bindungen in und an der Guanidinio-Einheit ermöglicht. Um diese freie Drehbarkeit einzuschränken und dadurch für die Komplexbildung präorganisierte Strukturen zu erhalten, könnten verbrückte Guanidinio-Derivate wie das Aminopyrimidon **102** oder das bicyclische Derivat **103** verwendet werden. In Struktur **104** sind diese beiden Motive kombiniert und durch den Benzolring die Ausrichtung des Restes R vorgegeben.

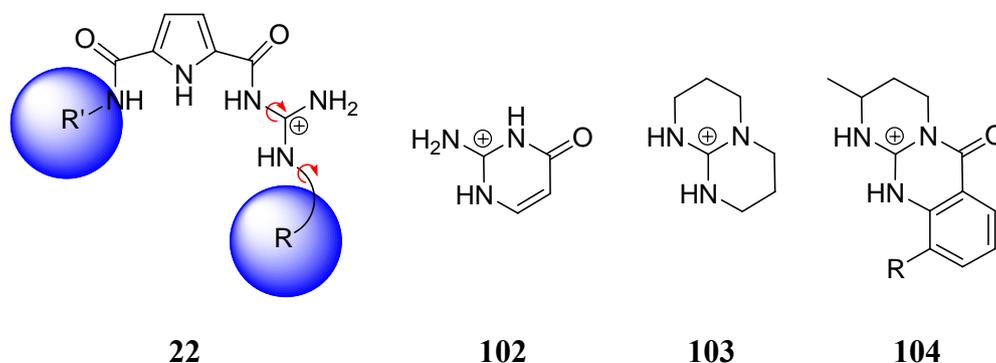


Abb. 108 Links: Problem das Wegdrehens des N' -substituierten Seitenarms der Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren (rote Pfeile). Daneben: Mögliche Lösungsvorschläge durch Einführen starrer Molekülfragmente wie Aminopyrimidon **102** oder das bicyclische Derivat **103**. In Struktur **104** sind diese beiden Motive kombiniert und durch den Benzolring der Rest R zur Komplexbildung eines Substrates in der Bindungstasche besser präorganisiert.

Die Einführung von starren Molekülbauteilen könnte zu den in **Abb. 109** dargestellten Rezeptoren führen. Der Einbau von Aminopyrimidon **102** in Rezeptor **105**, führt zu einer zyklisch verbrückten Guanidinio-Einheit. Allerdings besitzt dieser Rezeptor noch immer eine freie Drehbarkeit um die Stickstoff-Kohlenstoff-Bindungen in der Guanidinio-Einheit. Erst die Kombination beider Struktur motive (**104**) führt zu einer starren Rezeptoreinheit von Guanidinio-Einheit und einem zusätzlichen Seitenarm in Verbindung **106**. Jedoch wird dadurch das Guanidiniocarbonylpyrrol-Motiv zu einem Acylguanidiniopyrrol-Motiv verändert. Damit sind die Pyrrol- und die Guanidinio-Einheit nicht mehr planar präorganisiert. Höchst wahrscheinlich wird sich das Pyrrol-System aus der Guanidinio-Ebene herausdrehen. Die Acidität der Guanidinio-Protonen sollte ähnlich der Guanidiniocarbonylpyrrol-Protonen sein, da es sich immer noch um ein Acylguanidin handelt, jedoch mit der Acylgruppe an einer anderen Stelle als in den ursprünglichen Rezeptoren.

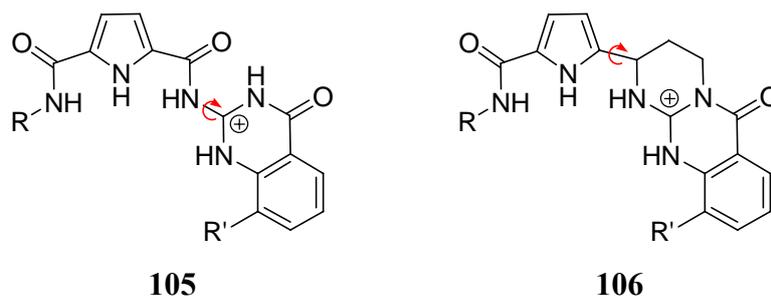


Abb. 109 Durch Einführung starrer Molekülfragmente wird der zusätzliche Seitenarm an der Guanidinio-Einheit präorganisiert. Die Struktur **106** zeigt eine Möglichkeit der Weiterentwicklung zu neuen Acylguanidiniopyrrol-Tweezer-Rezeptoren.

Eine weitere Möglichkeit, den Seitenarm der Tweezer-Rezeptoren an der Komplexierung zu beteiligen ohne starre Molekülteile einzusetzen, liegt in der Kombination der beiden Optimierungsvorsuche dieser Arbeit, resultierend im biskationischen Tweezer-Rezeptor **107** bzw. **107'**. Hierbei sollte die freie Drehbarkeit kein Problem darstellen, da nur die Länge des Linkers entscheidenden Einfluss darauf hat, ob die zweite positive Ladung an der Komplexierung teilnehmen kann. Bei optimaler Linkerlänge wird die zusätzliche positive Ladung ebenfalls das oxo-anionische Substrat komplexieren, da Coulomb-Wechselwirkungen wesentlich stärkere nichtkovalente Wechselwirkungen sind als die in den Tweezer-Rezeptoren zuvor verwendeten Wasserstoffbrücken, π - π -Wechselwirkungen bzw. hydrophobe Wechselwirkungen.

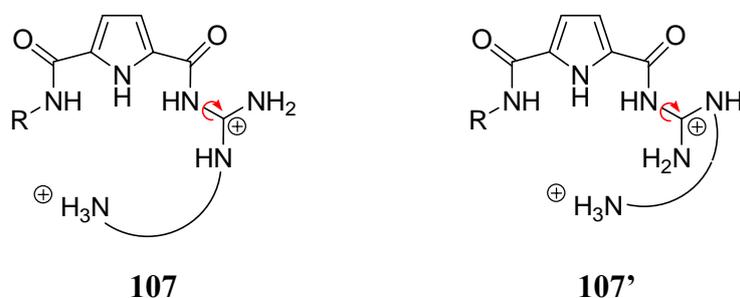


Abb. 110 Durch Einführung einer zusätzlichen positiven Ladung am Seitenarm an der Guanidinio-Einheit in **107** bzw. **107'** könnte dieser an der Komplexierung teilnehmen, ohne das ursprüngliche Bindungsmotiv zu zerstören oder starre Molekülfragmente einzubauen.

Schließlich könnte durch die Nutzung des Templats von *Anslyn* der Rezeptor **108** präorganisiert werden.^[29] Dieser sollte synthetisch ebenfalls über die Triflatisierungsreaktion zugänglich sein. Hierbei wäre der positive entropische Effekt nochmals größer, da anstelle von zwei Seitenarmen hier drei Seitenarme beteiligt wären. Weiterhin sind drei Carboxylat-Bindungsstellen vorhanden, die drei kationische Wechselwirkungen ermöglichen. Dieser trivalente Rezeptor würde sich somit besser zur Komplexierung eines Tricarboxylates, wie

z. B. Trimisinsäure **109**, Kempische Trisäure **110** und Zitronensäure **111**, eignen. Einen ähnlichen Ansatz wählte *Schwegmann* zur Darstellung „Molekularer Fliegenfallen“ für polyanionische Substrate, wobei dieser die CBS nicht am Templat, sondern am Ende der Seitenarme angebracht hat.^[74] Die Reste R sollten jedoch nicht allzu groß gewählt werden, um dem Substrat die Bindungstasche nicht zu versperren. Durch Variation dieser Reste sollte es möglich sein, höhere Selektivität bei der Komplexierung zu erreichen.

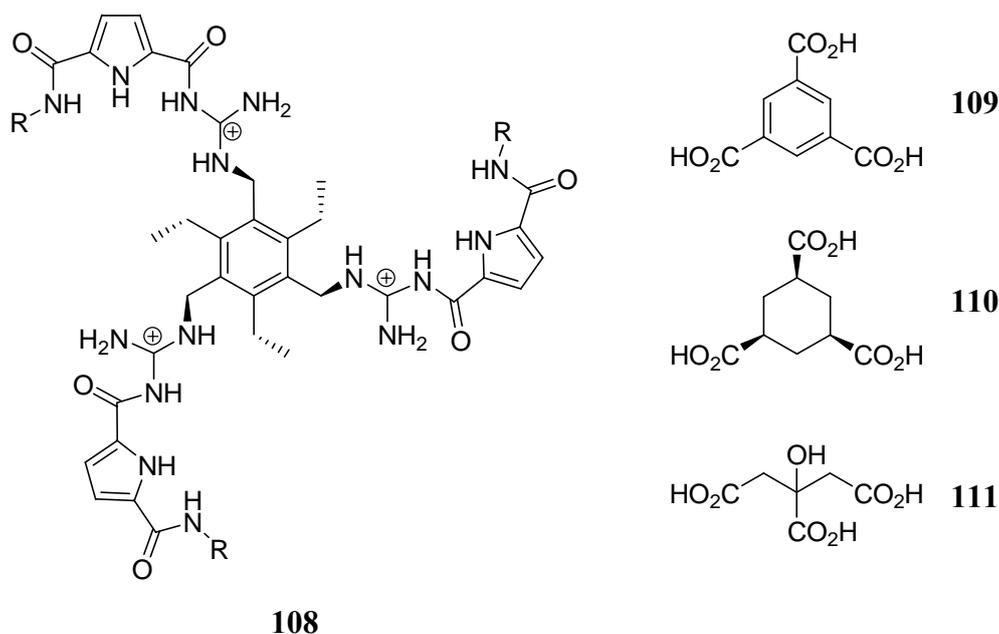
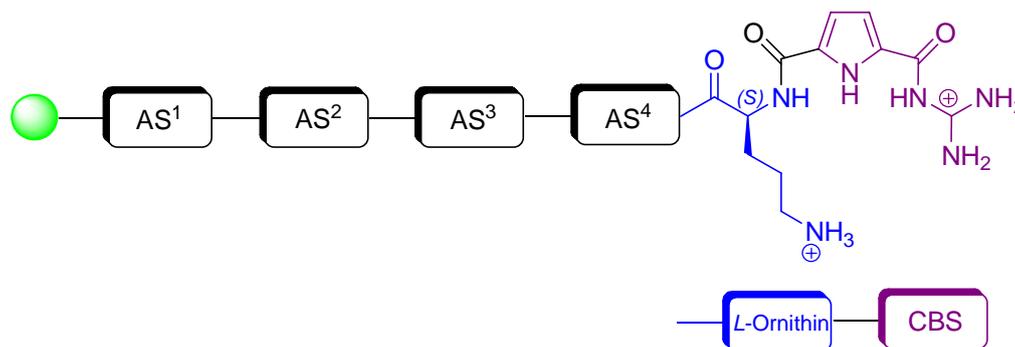


Abb. 111 Trivalenter Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptor **108**, präorganisiert mit dem Templat von *Anslyn* zur Komplexierung von Tricarboxylaten, beispielsweise Trimisinsäure **109**, Kempische Trisäure **110** und Zitronensäure **111**.

Weiterhin könnte eine angestrebte Erhöhung der Bindungskonstanten möglicherweise dadurch erreicht werden, dass man anstatt der Chloridsalze der Rezeptoren als Gegenion Hexafluorophosphat oder Tetrafluoroborat verwendet. Mit diesen Gegenionen konnte *Schmidtchen* bei seinen Guanidin-Rezeptoren die Bindungskonstante um den Faktor zehn bis elf erhöhen.^[109, 112, 113]

Das Projekt der biskationischen Rezeptoren wurde mit den Bindungsstudien abgeschlossen. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche zweite positive Ladung im Rezeptor **81** an einem C4-Spacer die Assoziation zu einem oxo-anionischen Substrat wesentlich verbessert. Der Rezeptor **81** zeigte mit Phenylalanin eine besonders starke Bindung. Die Erkenntnisse aus den Bindungsstudien können nun dazu verwendet werden, um in künftigen Rezeptor-Bibliotheken zur Carboxylat-Erkennung von biologisch relevanten Peptiden die Bin-

dungsaffinität zu erhöhen. In einer früheren Bibliothek wurde eine zusätzliche positive Ladung in Form der Aminosäure *L*-Lysin eingeführt, die bereits eine Verstärkung der Komplexierung zeigte.^[36] Aufgrund der Bindungsstudien der biskationischen Rezeptoren dieser Arbeit scheint jedoch der Spacer zur Aminofunktion im *L*-Lysin um eine Kohlenstoffeinheit zu lang zu sein. Die basische, nichtproteinogene α -Aminosäure *L*-Ornithin mit einem um eine Methylen-Einheit kürzeren C4-Spacer sollte besser für die Komplexierung geeignet sein.



112

Abb. 112 Schema einer Bibliothek **112** an der Festphase mit fünf Aminosäuren. Vier dieser Aminosäuren sind variabel, während die fünfte Aminosäure mit *L*-Ornithin (blau) direkt benachbart zur CBS (violett) sein muss.

Damit leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Weiterentwicklung der Guanidinio-carbonylpyrrol-Rezeptoren zur Carboxylat-Erkennung in wässrigem Medium. Diese Rezeptoren könnten möglicherweise im Hinblick auf biologische Anwendungen als Rezeptoren, Katalysatoren oder Inhibitoren eingesetzt werden. Für einen konkreten pharmakologischen Einsatz, beispielsweise in der Antibiotika-Entwicklung oder der Alzheimer-Bekämpfung, müsste allerdings zuerst noch die Frage der Toxizität und vor allem der Zytotoxizität geklärt werden. Ebenfalls müssten man die pharmakologischen oder toxikologischen Eigenschaften bei dem zuvor erwähnten Austausch des Gegenions noch untersuchen, sollte eine medizinische Verwendung beabsichtigt werden.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, auf welche Weise die Synthese der Guanidinio-carbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren möglich ist und eröffnet damit eine Vielzahl von Möglichkeiten, solche Systeme strukturell und funktionell zu variieren. Gerade mit der Verbesserung der Komplexierungseigenschaften durch die biskationischen Rezeptoren sollte es möglich werden, die Assoziationsstärke zukünftiger Rezeptoren, Inhibitoren, Katalysatoren oder Nanomaterialien unseres Bindungsmotivs weiter zu erhöhen.

Weiterhin wurde die Verbesserung der Komplexierungseigenschaften von Carboxylaten auf zwei Arten untersucht: zum einen durch das Anbringen eines zusätzlichen Seitenarms an der Guanidinio-Einheit zur Bildung von Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren, zum anderen durch das Einführen einer zweiten positiven Ladung neben der Carboxylat-Bindungsstelle (CBS) zur Darstellung biskationischer Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren. Schematisch sind diese beiden Rezeptortypen in **Abb. 114** gezeigt. Dabei ist das oxo-anionische Substrat rot dargestellt, der ursprüngliche Teil des Rezeptors violett (CBS) und die Veränderung im Zuge dieser Arbeit blau (Seitenarme bzw. Spacer mit Ammonium-Gruppe).

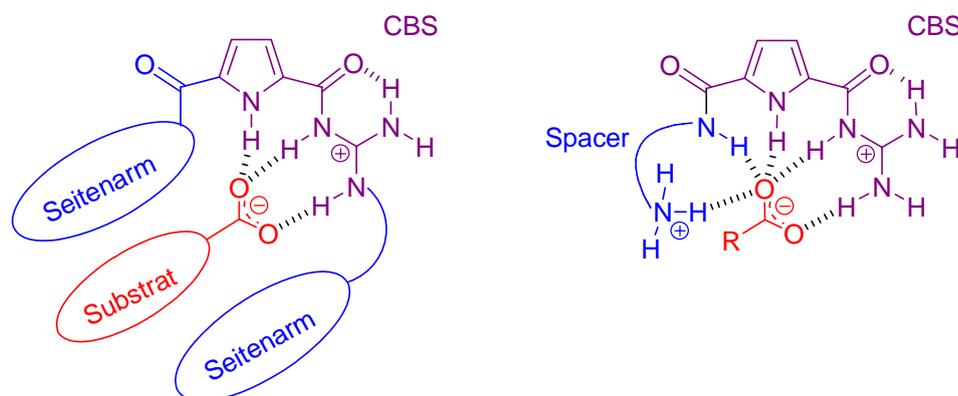


Abb. 114 Links: Schematische Komplexierung eines oxo-anionischen Substrates (rot) durch einen Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptor, dessen Seitenarme blau und die CBS violett dargestellt sind. Die gestrichelten Linien sind mögliche Wasserstoffbrückenbindungen. Rechts: Schematische Komplexierung eines Carboxylates durch einen biskationischen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor mit einer terminalen Ammonium-Gruppe an einem flexiblen Linker (blau).

Eine mögliche Verbesserung des Komplexierungsverhalten gegenüber Oxo-Anionen wurde durch die Darstellung von Tweezer-Rezeptoren versucht. Dabei sollte ein zusätzlicher Seitenarm an der N' -Position der Guanidinio-Einheit angebracht werden, um ein Substrat von zwei Seiten, mit der CBS als Kopfgruppe, komplexieren zu können (**Abb. 114** links). Durch zusätzliche Wechselwirkungen des neuen Seitenarms sollte neben einer stärkeren Komplexierung vor allem eine höhere Substratspezifität erzielt werden. Die Synthese dieser Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren gestaltete sich schwierig. Nach erfolglosen Versuchen u. a. mittels Mitsunobu-Reaktion und Guanidinylierungsreaktionen, wurde letztendlich doch ein Reaktionsweg gefunden. Er bestand in der Aktivierung der Imin-Funktion im Guanidin als Abgangsgruppe, was durch die Funktionalisierung als Trifluormethansulfonsäureamid erreicht wurde. Dabei wird das Boc-geschützte Guanidiniocarbonylpyrrol-Derivat **19** am Carbamat-Stickstoff deprotoniert und anschließend mit Trifluormethan-

sulfonsäureanhydrid zu der Verbindung **24** umgewandelt. Ohne Isolierung wird diese direkt mit einem primären Amin bzw. einer α - oder β -Aminosäure zu **23** umgesetzt (**Abb. 115**).

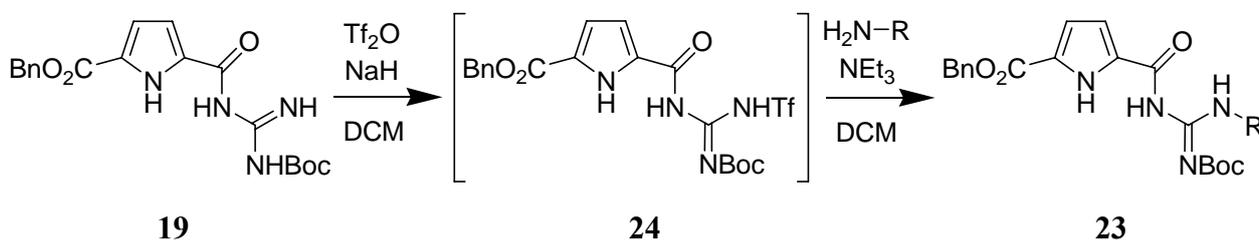
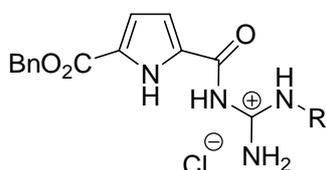


Abb. 115 Reaktionsschema zur Darstellung der N,N' -substituierten Guanidino carbonyl pyrrole Verbindung **23** durch Triflatisierung und anschließender Umsetzung mit einem Amin.

Nach saurer Abspaltung der Boc-Schutzgruppen wurden auf diese Weise die Guanidino carbonyl pyrrole-Tweezer-Rezeptoren **62** bis **67** in Ausbeuten von 11 bis 73 % erhalten. Zur Synthese der Tweezer-Rezeptoren **72** und **75** waren nach der Triflat-aktivierten Substitutionsreaktion die Entschützung des Benzylesters, die Kupplung der nun freien Pyrrolcarbonsäure mit einem L -Aminosäureamid mittels PyBOP als Kupplungsreagenz und anschließend eine saure Boc-Entschützung notwendig (**Abb. 117**). Die Rezeptoren **72** und **75** wurden ausgehend von Verbindung **19** in Ausbeuten von 10 und 18 % erhalten.



62	R = Et	63	R =
64	R =	65	R =
66	R =	67	R =

Abb. 116 Synthetisierte Guanidino carbonyl pyrrole-Benzyl-Tweezer-Rezeptoren **62** bis **67**.

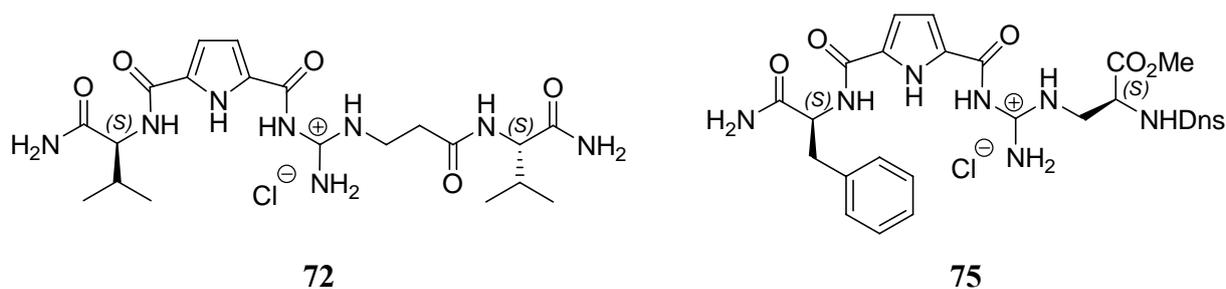


Abb. 117 Synthetisierte Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren **72** und **75**.

Mit den Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren **63** bis **67**, **72** und **75** wurden UV-Bindungsstudien durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass sowohl acetyliertes *L*- als auch *D*-Phenylalanin am stärksten gebunden werden, vor allem von dem Tweezer-Rezeptor **66** mit $K_{\text{Ass}} \approx 9100 \text{ M}^{-1}$. Weitere interessante Komplexbildungen lieferten die Tweezer-Rezeptoren **63** und **75** mit Folsäure **G**. Aufgrund der starken Eigenabsorption der Folsäure **G** waren keine UV-Bindungsstudien möglich. Die Fluoreszenz-Spektroskopie mit synchroner Anregungsmethode lieferte Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} = 2.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ und $K_{\text{Ass}} = 1.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ für diese Rezeptoren bei einer über einen Job-Plot bestimmten Komplexstöchiometrie von 1:1. ITC-Messungen von **63** mit **G** unter verschiedenen Messbedingungen lieferten leider keine eindeutig interpretierbaren Daten. Sie weisen jedoch, anders als die Daten der Fluoreszenz-Spektroskopie, auf eine zusätzliche 1:2-Komplexierung von Rezeptor **63** mit dem Dicarboxylat Folsäure **G** hin. Weiterhin deuten sie auf eine endotherme Komplexbildung der Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren und damit auf eine entropisch getriebene Reaktion hin.

Hinsichtlich der Erhöhung der Bindungskonstanten konnte mit der Synthese der Tweezer-Modifikationen keine Verbesserung erzielt werden. Wie u. a. durch *Molecular modeling* Berechnungen gezeigt werden konnte, nimmt der *N'*-alkylierte Seitenarm der Guanidinio-Einheit nicht wie erhofft an der Komplexbildung teil. Die Solvatisierung durch Wasser scheint vorteilhafter zu sein. Wahrscheinlich kann die Energie für Torsionskräfte, die bei einer nötigen Verdrehung des Rezeptorarms für eine Komplexbildung überwunden werden müssten, nicht durch die Komplexbildungsenergie aufgebracht werden (Abb. 118). Die Bindungseigenschaften konnten somit nicht verbessert werden und sind vergleichbar mit *N'*-unsubstituierten Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren, weder hinsichtlich der Assoziationskonstanten noch der Substratspezifität.

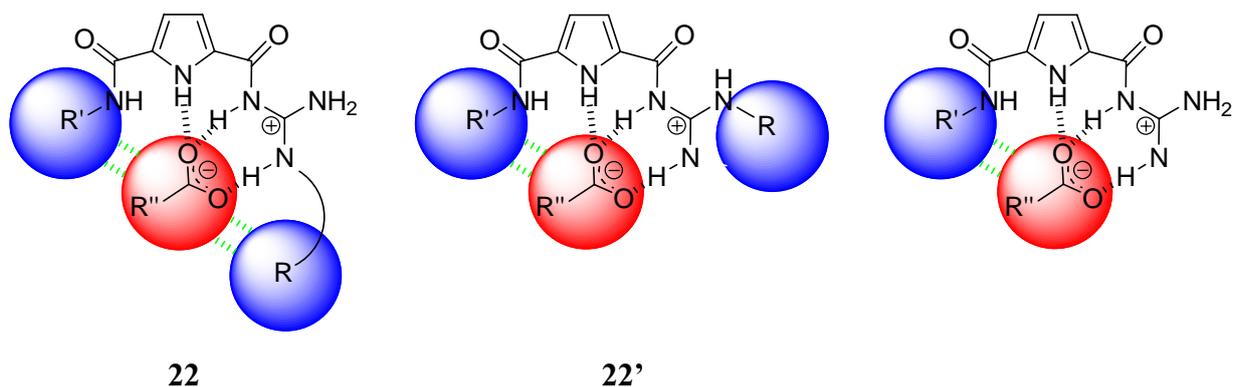


Abb. 118 Schematische Struktur der Komplexierung der Tweezer-Rezeptoren: erwartete (links) und wahrscheinlichere (Mitte) Geometrie des Seitenarms der Rezeptoren des Typs **22** bzw. **22'** aufgrund der Bindungsstudien und der Berechnungen. Damit entsprechen die Tweezer-Rezeptoren den Komplexierungseigenschaften der *N'*-unsubstituierten Guanidiniocarboxylpyrrol-Rezeptoren (rechts). Grün gestrichelt sind mögliche nichtkovalente Wechselwirkungen. R, R' und R'' sind Aminosäuren bzw. Aminbausteine.

In einem weiteren Projekt wurde für die Rezeptor-Optimierung durch Einführen einer zweiten positiven Ladung die biskationischen Guanidiniocarboxylpyrrol-Rezeptoren **79** bis **83** erfolgreich synthetisiert (**Abb. 119**). Sie wurden durch Kupplung eines mono-Boc-geschützten Diamins bzw. des in der Seitengruppe Boc-geschützten *L*-Lysinmethylesters dargestellt. Als Kupplungsreagenz wurde PyBOP verwendet. Mittels Boc-Entschützung im Sauren an der Amino- und der Guanidinio-Funktion wurden die biskationischen Rezeptoren in Ausbeuten von 47 bis 74 % als Hydrochloridsalze erhalten.

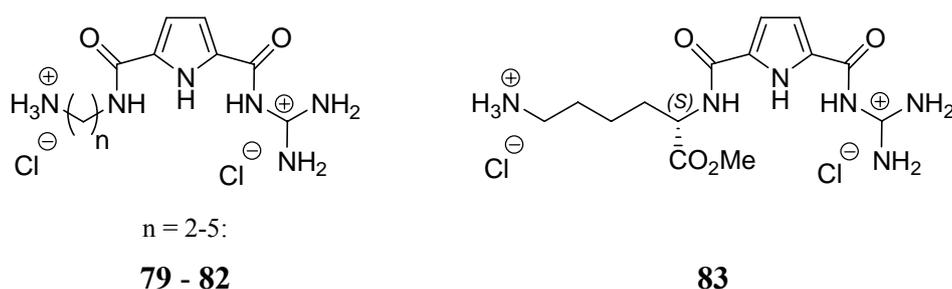


Abb. 119 Synthetisierte biskationische Guanidiniocarboxylpyrrol-Rezeptoren **79** bis **83**.

Die Komplexierungseigenschaften dieser fünf biskationischen Rezeptoren wurden in Bindungsstudien mittels UV-Titrationsexperimenten untersucht. Bei einem größer angelegten Screening von oxo-anionischen Substraten, vornehmlich Aminosäurecarboxylaten, wurde ersichtlich, dass die Bindungsaffinitäten dieser Rezeptoren mit $K_{Ass} > 1100 \text{ M}^{-1}$ in 10 % DMSO in Wasser schon recht stark ist (**Abb. 120**). Die 1:1-Komplexstöchiometrie wurde

durch weitere UV-spektroskopische Untersuchungen mit der Job-Plot-Methode bestätigt. Die beste Komplexierung lieferte mit $K_{\text{Ass}} = 10700 \text{ M}^{-1}$ der biskationische Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **81** mit der α -Aminosäure *N*-Ac-*L*-Phenylalanin **C**. Eine besonders gute Komplexierung von Phenylalanin wurde zuvor schon bei den Tweezer-Rezeptoren gefunden.

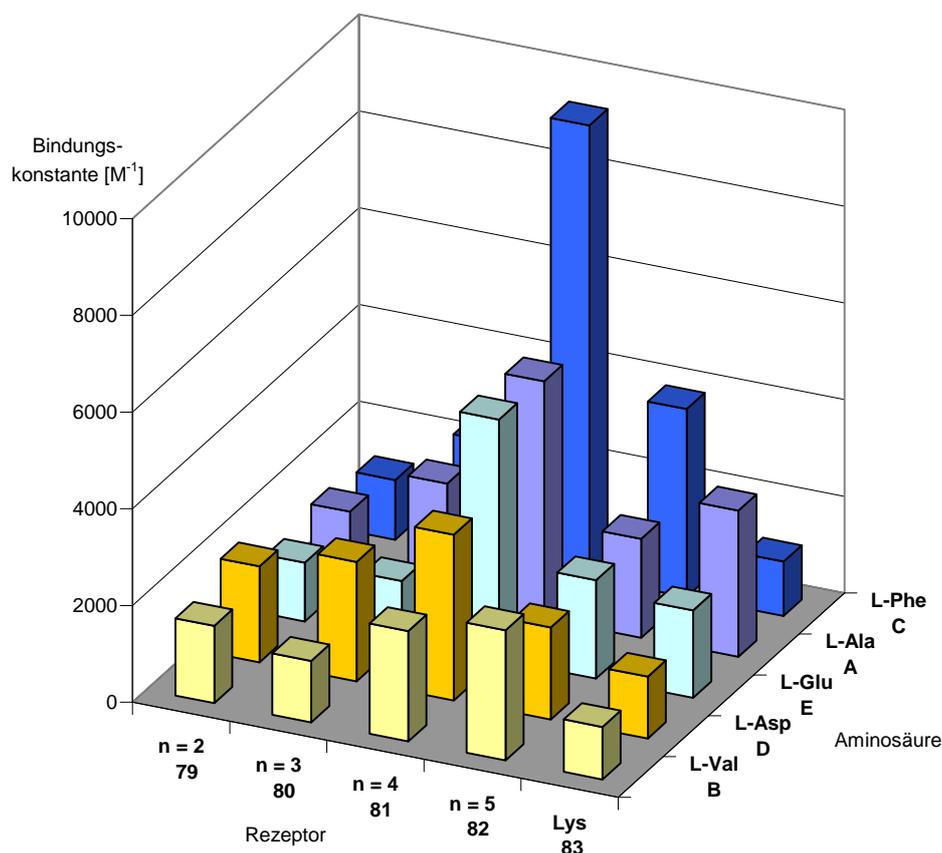


Abb. 120 Graphische Darstellung der Bindungskonstanten K_{Ass} der biskationischen Rezeptoren **79** bis **83** gegenüber verschiedenen *N*-acetylierten *L*-Aminosäurecarboxylaten (Werte in **Tab. 11**).^[114] Reproduced with permission. Copyright 2007 American Chemical Society.

Dieser Komplex aus **81** und **C** (**Abb. 120**) wurde nun mit den Methoden der Fluoreszenzspektroskopie, Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie, ITC und *Molecular modeling* Berechnungen näher untersucht. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen bestätigten die starke Komplexierung. Ebenfalls konnte die Komplexmasse in einem ESI-MS-Spektrum einer 1:1-Mischung gefunden werden. ¹H-NOE-Experimenten zeigten klare Kreuzsignale zwischen dem biskationischen Rezeptor **81** und dem *L*-Phenylalanin **C**, die auf eine konkrete, strukturell eindeutige Komplexierung hinweisen. In ITC-Experimenten konnte leider kein thermodynamisches Profil der Komplexierung mit der Bestimmung der physikalisch-chemischen Parameter wie Reaktionsenthalpie und Entropie ermittelt werden. Dazu waren die

Wärmetönungen auch bei verschiedenen Messbedingungen zu gering. Aus den Daten wird dennoch ersichtlich, dass die Komplexbildung endotherm ist und damit entropisch getrieben ist. Bei den *Molecular modeling* Studien zeigte sich, dass die zusätzliche positive Ladung an der Komplexbildung des Carboxylates beteiligt ist und damit einen positiven Beitrag für die Stärke der Bindungskonstante liefert. Weiterhin ist eine zusätzliche Kation- π -Wechselwirkung der Guanidinio-Einheit von **81** mit dem Phenylring der Aminosäure **C** ersichtlich. Diese Wechselwirkung dürfte in erster Linie für die Substratspezifität verantwortlich sein (**Abb. 121**).

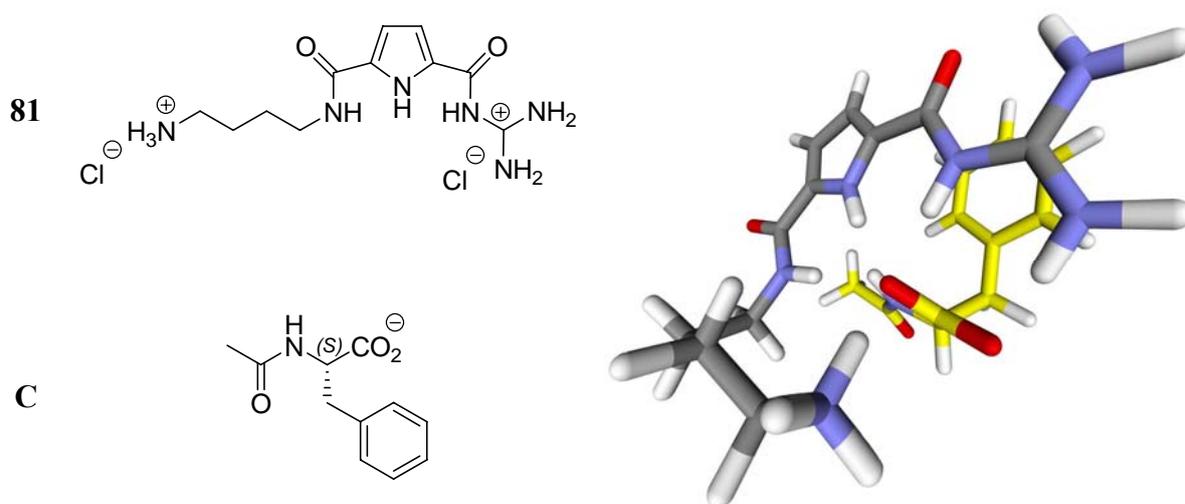


Abb. 121 Links: Biskationischer Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **81** und die Aminosäure *N*-Acetyl-*L*-Phenylalanin **C**. Rechts: Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von **81** mit **C**.

Anhand der Substratspezifität der biskationischen Rezeptoren wird deutlich, dass die Spacerlänge, an der die zusätzliche positive Ladung angebracht ist, eine entscheidende Rolle bei der Komplexbildung spielt. Galten eigentlich starre, präorganisierte, kurze Linker als vorteilhaft hinsichtlich der Entropie, so ist hier zu erkennen, dass auch längere, flexiblere Linker zu einer besseren Komplexbildung führen können, wenn geeignete zusätzliche nicht-kovalente Wechselwirkungen möglich sind. Eine zusätzliche Wechselwirkung wird durch die Einführung einer weiteren positiven Ladung in Form einer Ammonium-Gruppe bewirkt. Die biskationischen Rezeptoren, vor allem Rezeptor **81**, stellen damit eine Optimierung des Carboxylat-Bindungsmotivs der Gruppe von Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren in der Anionen-Erkennung dar.

7 SUMMARY

The main focus of this thesis is the optimization of our guanidiniocarbonyl pyrrole receptors for oxo-anion recognition in water. Beside an improvement of the synthesis of this class of receptors, two strategies for optimization have been pursued: On the one hand tweezer receptors were developed and on the other hand another second positive charge was introduced into the receptor.

The two *N*-protected guanidiniocarbonyl pyrroles **19** and **20** are very important building blocks in our group. Therefore, the details of the synthesis were completely revised. The yields were increased by changing reaction conditions, workup and isolation steps. For example, the yield of the final step for the compound **19** was improved by 15 % to 93 % by extracting with diethyl ether instead of crystallising. The pyrrole carboxylic acid **20** could be isolated by extraction as an ammonium salt after removal of the benzyl ester by hydrogenolysis. Therefore, an extensive filtration with hot DMF was not necessary any longer. The yield of the last step was increased to 95 %.

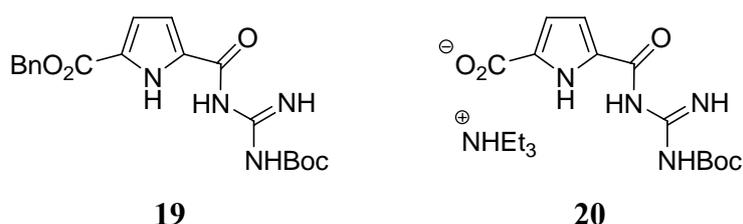


Fig. 113 Guanidiniocarbonyl pyrrole building blocks **19** and **20**.

The new optimized, facile and efficient synthetic route to the guanidiniocarbonyl pyrrole derivatives **19** and **20** allows now a multi-gram synthesis of these versatile compounds as needed for the synthesis for a variety of supramolecular anion binding motifs.

The goal was to improve the binding properties of oxo-anions by achieving new artificial guanidiniocarbonyl-pyrrole receptors. In one project guanidiniocarbonyl pyrrole tweezer receptors were built. This was done by coupling an additional side chain to the head group at the N^7 -position of the guanidino group. The other project aimed to introduce a second positive charge at the end of a flexible linker next to the carboxylate binding site (CBS) to create guanidiniocarbonyl pyrrole ammonium bis-cations. Both receptor types are shown schematically in **Fig. 114**, where the oxo-anionic guest is illustrated in red, the original part of the receptor (CBS) in violet and the newly introduced part in blue (side chains and spacer).

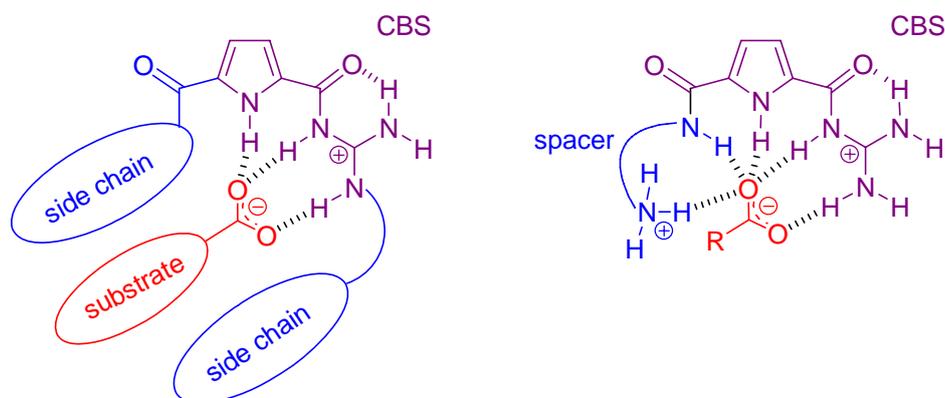


Fig. 114 Left: Scheme of the complexation of an oxo-anionic guest (red) by a guanidiniocarbonyl pyrrole tweezer receptor, with blue side chains and a violet CBS. The dashed lines are possible hydrogen bonds. Right: Scheme of complexation of a carboxylate by a bis-cationic guanidiniocarbonyl pyrrole receptor, with an additional terminal ammonium group (blue) attached to a flexible linker.

One possibility to improve the binding properties of oxo-anionic substrates is the synthesis of tweezer receptors in order to complex the guest from more than one side. A second side chain, connected to the N^7 -position of the guanidino motif, leads to these kinds of receptors, with the CBS as a head group. By using additional non covalent interactions in both side chains, the association constant as well as the specificity should be increased. In the synthetic strategy first reactions like a Mitsunobu reaction and a guanidinylation reaction were tried unsuccessfully until the activation of the imine function of the guanidino-group as a trifluoromethansulfonic acid amide worked out. Therefore, the Boc-protected guanidiniocarbonyl pyrrole derivative **19** was deprotonated at the carbamate nitrogen and afterwards converted with trifluoromethansulfonic acid anhydride to yield the compound **24**. Now, without isolation the reaction with a primary amine, α - or β -amino acid in a substitution reaction was possible (**Fig. 115**).

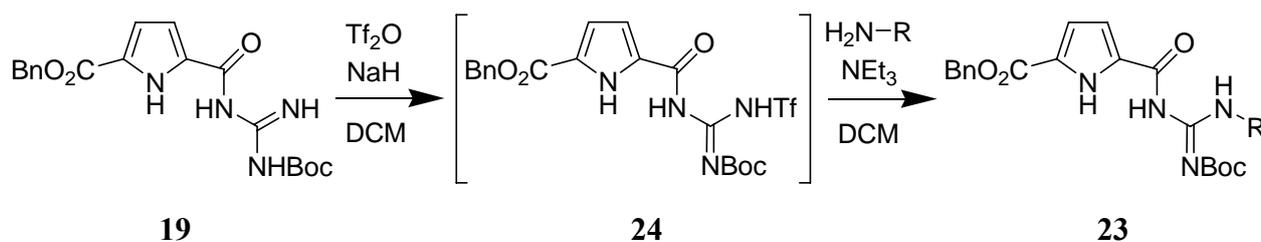


Fig. 115 Reaction scheme of the synthesis of *N, N'*-substituted guanidinocarbonyl pyrrole compound **23**.

After acidic treatment in order to remove of the Boc-protecting groups, the guanidiniocarbonyl pyrrole tweezer receptors **62** to **67** were obtained in 11 to 73 % yield (**Fig. 116**). In the synthesis of the tweezer receptors **72** and **75** two more steps were needed (**Fig. 117**). After the triflate-activated substitution reaction the benzyl ester was cleaved off and a α -amino acid was attached by using PyBOP as coupling reagent. The resulting compounds had an over all yield of 10 and 18 %.

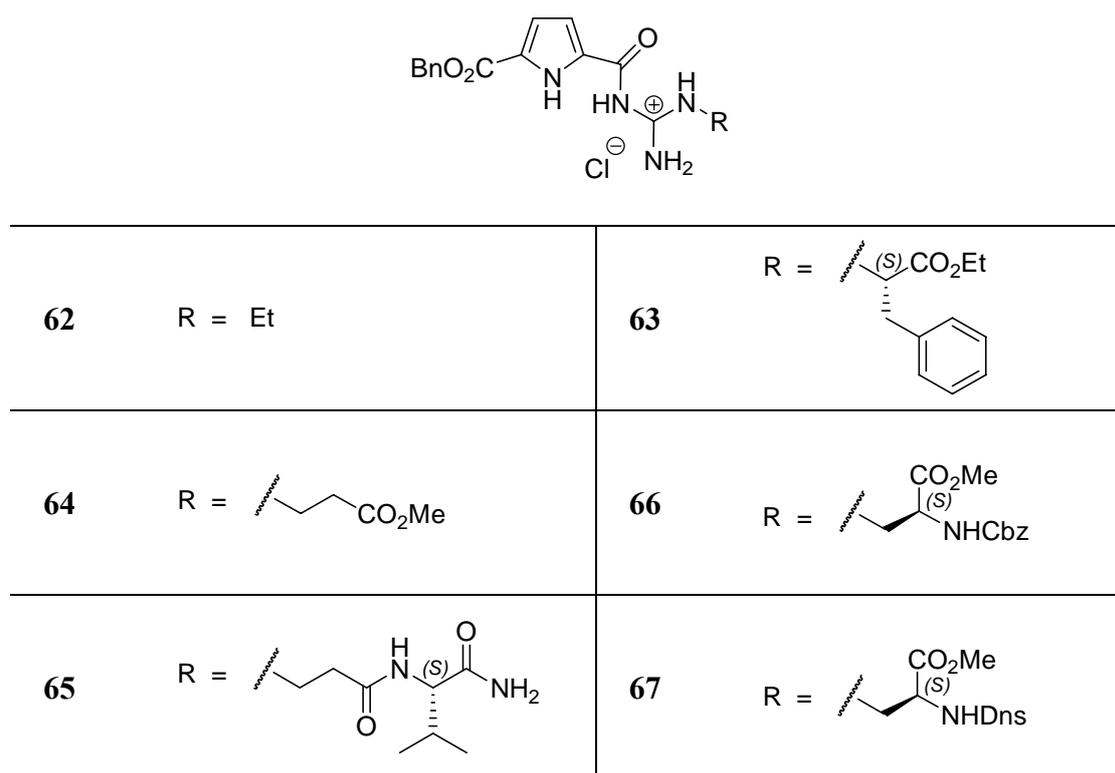


Fig. 116 Synthesized guanidiniocarbonyl pyrrole benzyl tweezer receptors **62** to **67**.

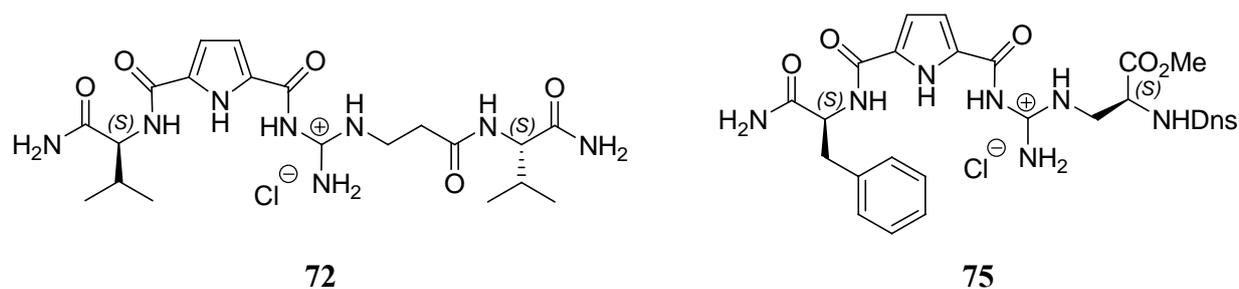


Fig. 117 Synthesized guanidiniocarbonyl pyrrole tweezer receptors **72** and **75**.

Finally, the guanidiniocarbonyl pyrrole tweezer receptors **63** to **67**, **72** and **75** were examined in UV-binding studies with different carboxylates, which showed that acetylated *L*- and *D*-phenyl alanine were bound strongly, specially from the tweezer receptor **66** with $K_{\text{Ass}} \approx 9100 \text{ M}^{-1}$. Furthermore, complexation of folic acid **G** was observed for the tweezer receptors **63** and **75**. Binding constants of $K_{\text{Ass}} = 2.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $K_{\text{Ass}} = 1.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ were measured by fluorescence spectroscopy with synchronous excitation and a 1:1 complex stoichiometry was verified via a Job-Plot. ITC experiments of **63** and folic acid **G** showed no consistent and reliable data. They suggest an additional 1:2 complexation of receptor **63** and the dicarboxylate folic acid **G**. However, they support an endothermic complexation of the guanidiniocarbonyl pyrrole receptors and therefore an entropic driven reaction patter.

In case of the optimization of the binding properties, the tweezer receptors did not show better complexation. As shown by *molecular modeling studies* the *N*²-alkylated side chain at the guanidinio-motif has not taken part in the complexation and solvation by water was favoured. Most likely the energy of torsion forces, which had to conquer for complexation due to the twisting of the receptor side chain, can not be compensated by the energy gain of the complexation (**Fig. 118**). For this reason the tweezer receptors had similar binding properties to the *N*²-unsubstituted guanidiniocarbonyl pyrrole receptors with respect to association constants and specificity.

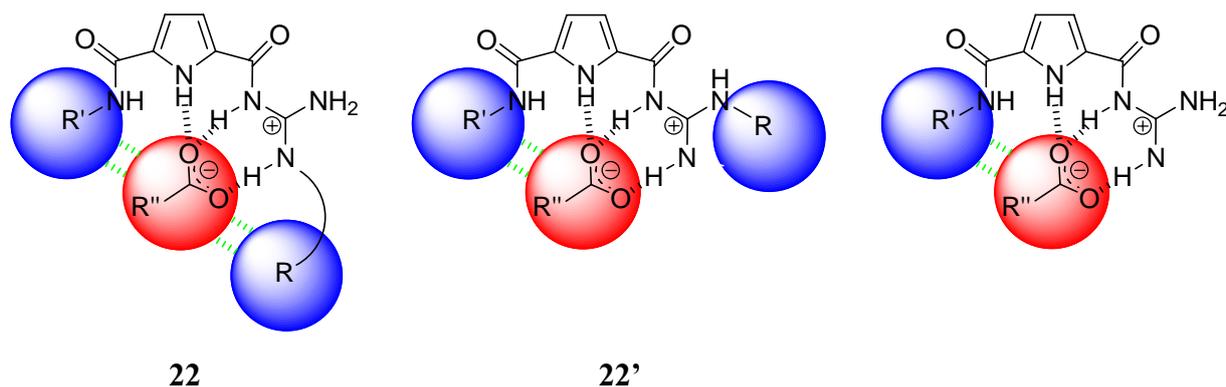


Fig. 118 Scheme of the geometric structure of the complexation of the tweezer receptors: estimated (left) and probably realistic (middle) geometry of the side chain of the type **22** and **22'**. For this reason the tweezer receptors have analogue binding properties as *N'*-unsubstituted guanidiniocarbonyl pyrrole receptors. The green dashed lines are possible non covalent bonds. R, R' and R'' are amino acids or amino derivatives.

In another project for optimization of the binding properties of several bis-cations **79** to **83** were synthesized, with a simple primary ammonium cation attached via flexible linkers of varying length to a guanidiniocarbonyl pyrrole (**Fig. 119**). PyBOP was used as coupling reagent for the reaction of the pyrrole carboxylic acid with mono-Boc-protected diamines and *L*-lysine methyl ester, respectively. Finally, the remaining protecting groups were cleaved off by acidic treatment and the bis-cations were obtained in 47 to 74 % yield.

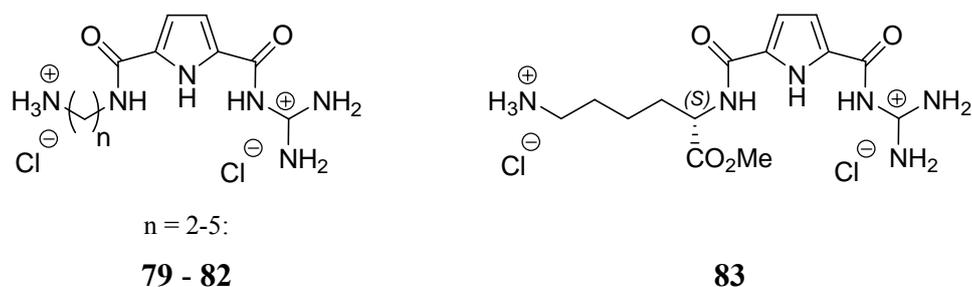


Fig. 119 Synthesized bis-cationic guanidiniocarbonyl pyrrole receptors **79** to **83**.

In UV-binding studies in aqueous buffer these bis-cations have shown efficient binding of various *N*-acetyl amino acid carboxylates. Strong binding affinities of $K_{\text{Ass}} > 1100 \text{ M}^{-1}$ in 10 % DMSO in water were found (**Fig. 120**). The 1:1 complex stoichiometry was confirmed with a Job-Plot in an additional UV-experiment. The bis-cationic receptor **81** with a C4-linker has shown the strongest association towards *N*-acetyl phenyl alanine carboxylate **C** with $K_{\text{Ass}} = 10700 \text{ M}^{-1}$.

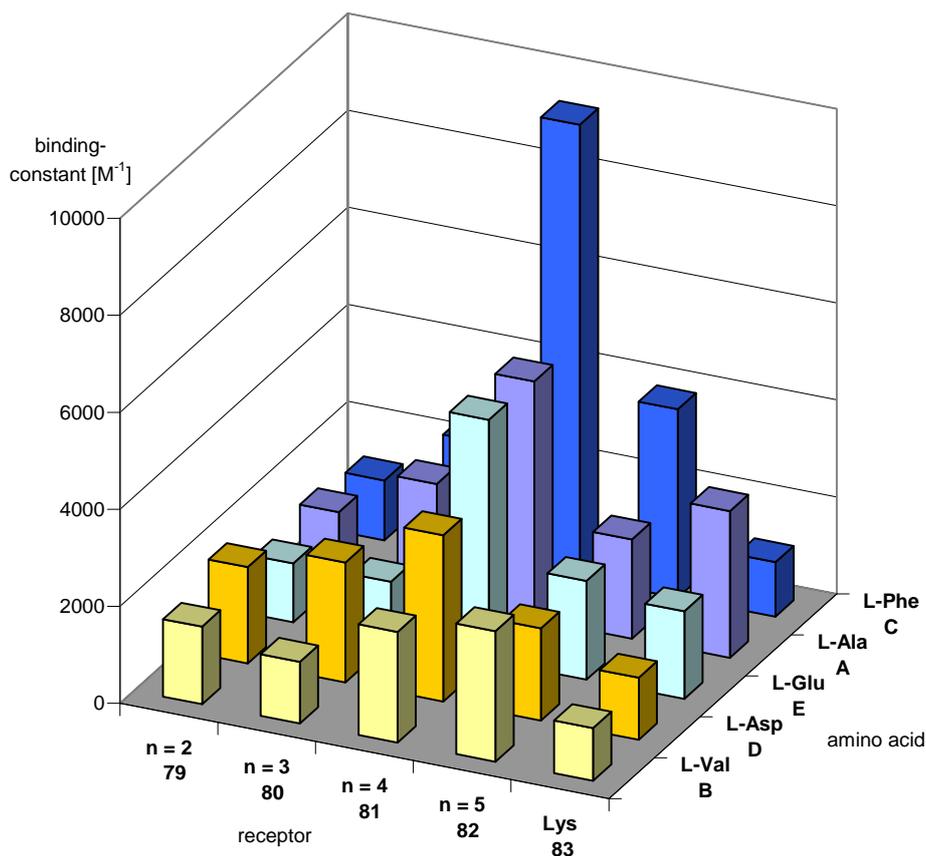


Fig. 120 Graphical scheme of the binding constants K_{Ass} of the bis-cationic receptors **79** to **83** towards several *N*-acetyl-*L*-amino acid carboxylates (data in **Tab. 11**).^[114] Reproduced with permission. Copyright 2007 American Chemical Society.

The formation of the strong complex between bis-cation **81** and *N*-acetyl *L*-phenyl alanine carboxylate **C** was investigated further by fluorescence spectroscopy, mass spectrometry, NMR spectroscopy, ITC as well as molecular mechanics calculations. The strong complexation could be confirmed by fluorescence titrations and the 1:1 complex was also found with ESI-MS experiments. In NOE studies clear cross signals between the receptor and the *L*-phenyl alanine were observed as indication for precise and structural definite complexation. A full thermodynamic characterization of the binding process via ITC was not possible due to the low heat of the complexation. But the data pointed out an endothermic complexation reaction. The *molecular modelling studies* have clearly shown a participation of the second charge in the complexation of the carboxylic function and therefore an increasing in complex stability. Furthermore, the substrate specificity is most likely due to additional cation- π -interactions between the aromatic ring of **C** and the guanidiniocarbonyl pyrrole cation of **81** (**Fig. 121**).

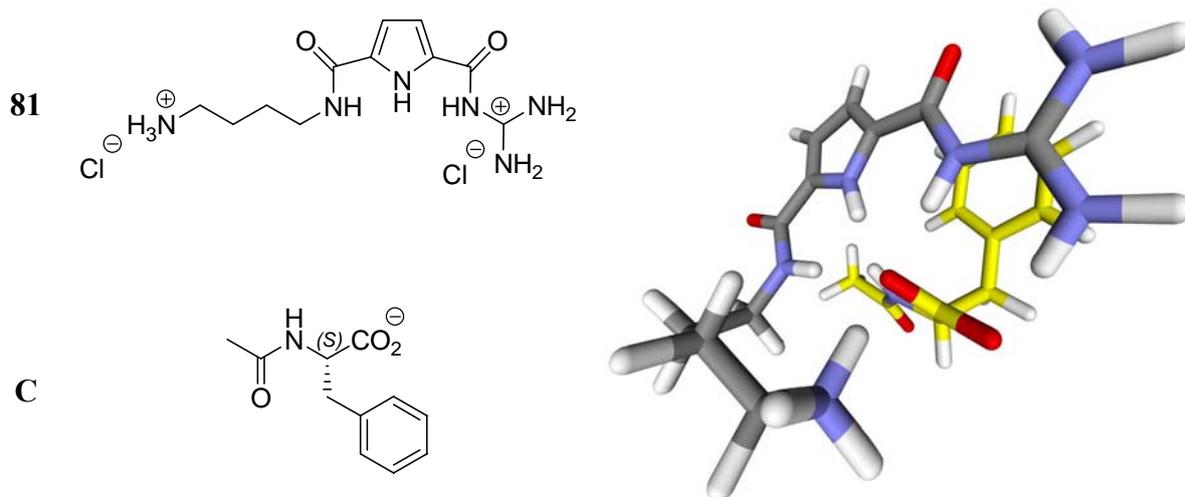


Fig. 121 Left: bis-cationic guanidiniocarbonyl pyrrole receptor **81** and the amino acid *N*-acetyl *L*-phenyl alanine **C**. Right: Calculated structure of the complex of **81** with **C**.

It is generally assumed, that short and rigid linkers are better for complexation due to the entropy and that a steady decrease of a linker length increase the complex stability. However, in this case for all anions complex stability first increases with increasing linker length until a pronounced maximum in complex stability is reached for bis-cation **81** with a C4-linker. Then the complex stability decreases again. Hence, complex affinity is significantly depending on both the anion and the length of the linker in the bis-cation. The bis-cationic receptors, and specially the receptor **81**, indeed represent an optimisation of the guanidiniocarbonyl pyrrole receptors for oxo-anion-binding.

8 EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 Allgemeiner experimenteller Teil

Lösemittel und Reagenzien:

Alle verwendeten Lösemittel wurden destilliert. Wasserfreie Lösemittel wurden wie folgt erhalten: Diethylether wurde mit Natrium und Benzophenon als Indikator, Dichlormethan und Triethylamin mit Calciumhydrid und Methanol mit Magnesiumspänen unter Rückfluss erhitzt. Alle vier Lösemittel wurden anschließend destilliert. Dimethylformamid wurde über Calciumhydrid unter vermindertem Druck zum Sieden erhitzt und anschließend destilliert, wobei 20 Volumenprozent Vorfraktion verworfen wurden. Hochreines Wasser für die Chromatographie sowie spektroskopische Messungen wurde mittels MicroPure Wasseraufbereitungssystem der Firma *TKA* durch Behandlung von vollentsalztem Wasser erzeugt.

Bei den eingesetzten Reagenzien handelt es sich, soweit nicht anders vermerkt, um kommerziell erhältliche Chemikalien der Firmen *Merck*, *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Lancaster*, *Iris Biotech*, *Bachem*, *GL Biochem* (Shanghai) oder *Aldrich*, die ohne weitere Reinigung eingesetzt wurden. Die deuterierten Lösemittel wurden von der Firma *Deutero* bezogen.

Schutzgas:

Als Schutzgas wurde Argon (99.998 %) der Firma *Linde* verwendet. Alternativ kam auch Stickstoff (99.996 %) der Firma *Linde*, der zuvor über Calciumchlorid und Blaugel getrocknet wurde, zum Einsatz.

Dünnschichtchromatographie (DC):

Es wurden Kieselgel-Fertigfolien des Typs Kieselgel 60 F₂₅₄ mit einer Schichtdicke von 0.2 mm der Firma *Merck* verwendet. Laufmittelgemische sind in Volumenanteile (v/v) angegeben. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht bei $\lambda = 254$ nm. Nicht UV-aktive Substanzen wurden durch verschiedene Methoden angefärbt: durch Behandlung in einer Jodkammer, durch Besprühen mit einer Ninhydrin-Lösung (90 ml Ethanol, 10 ml Essigsäure,

500 mg Ninhydrin, 1 ml Trifluoressigsäure) oder durch Besprühen mit einer Cer-Reagenzlösung (25 g Molybdätophosphorsäure, 10 g Cer(IV)sulfat-Tetrahydrat, 60 ml konzentrierte Schwefelsäure auf 1 L Wasser).

Säulenchromatographie:

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel des Typs MP-Silica 32-63, 60 Å der Firma *MP Biomedicals GmbH* verwendet. Die jeweiligen Lösemittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben. Die Säulenlänge und -dicke wurde dem jeweiligen Trennproblem individuell angepasst. Die Laufgeschwindigkeit wurde mittels Druckluft (*Linde*) beschleunigt. Das zu reinigende Produkt wurde entweder als Lösung im jeweiligen Laufmittelgemisch oder als auf Silicagel aufgezogener Feststoff aufgetragen.

8.2 Generelle analytische Methoden

Schmelzpunktbestimmung:

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Glaskapillaren mit einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur SMP 20 nach Dr. Tottoli der Firma *Büchi* bestimmt. Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie):

Die Kernresonanzspektren wurden, sofern nicht anders angegeben, an einem AVANCE 400 NMR-Spektrometer der Firma *Bruker* bei 25 °C aufgenommen. Die Angaben der chemischen Verschiebungen beziehen sich auf deuterierte Lösemittel (DMSO- d_6 , CDCl₃, MeOH- d_3 oder MeOD- d_6) als internen Standard und sind in δ -Werten in ppm angegeben. Kopplungen werden in Hz angegeben. Für die Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, brs = verbreitertes Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, m = Multiplett und quat. = quaternär. Die Spektren wurden nach erster Ordnung interpretiert, wobei die Zuordnung der ¹H-, ¹³C- und ¹⁹F-Signale, soweit vorhanden, mittels Literatur^[116] oder Vergleich mit Spektren ähnlicher Verbindungen erfolgte.

Automatisierte Flashchromatographie (MPLC):

Zur Reinigung polaren Substanzen wurde die MPLC-Anlage Isco der Firma *Inc. Combi Flash* verwendet. Als Säulen standen C-18-Säulen (reversed Phase) der Firma *RediSep* mit 4.3 g, 13 g, 43 g, 130 g oder 360 g zur Verfügung. Lösemittel waren hochreines Wasser und destilliertes Methanol, die als Gradient, beginnend mit 100 % Wasser, automatisch gemischt wurden. Das zu reinigende Produkt wurde entweder als Lösung im jeweiligen Laufmittelgemisch oder als auf RP-18-Material (*Aldrich*) aufgezogener Feststoff aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 300 nm.

Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC):

Zur Kontrolle der Reinheit wurde eine HPLC-Anlage der Firma *Dionex* mit den folgenden Komponenten verwendet: P680 HPLC-Pumpe, ASI-100 Automated Sample Injector und UVD 340U Detektor. Als Säulen standen verschiedene Supelcosil-Fertigsäulen der Firma *Supelco* zur Verfügung, für die Normalphasenchromatographie des Typs LC-SI und für die Umkehrphasenchromatographie des Typs LC-18. Als Lösemittel wurden neben hochreinem Wasser ausschließlich Lösemittel speziell für die Chromatographie (HPLC-grade) verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor, wobei neben der typischen Wellenlänge für Pyrrol von 300 nm auch weitere Wellenlängen sowie ein 3D-Spektrum aufgenommen wurden.

Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR-Spektroskopie):

Die Infrarotspektren wurden an einem FT-IR 410 der Firma *Jasco* gemessen. Die Lage der Banden wurde in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) und deren Bandenintensitäten mit den Buchstaben s (strong), m (medium) und w (weak) bezeichnet.^[116] Dazu wurde entweder ein Kaliumbromid-Pressling oder eine Nujol-Verreibung angefertigt und vermessen.

Ultraviolett-spektroskopie (UV-Spektroskopie):

UV/Vis-Spektren wurden mit einem *Jasco V-530*-Spektrometer bzw. *Jasco V-660*-Spektrometer aufgenommen. Dazu wurden Standard-Quarzglasküvetten für die UV-Spektroskopie mit Schichtdicke von 10 mm verwendet. Die Baseline-Messung erfolgte bei leerem Gerät. Die Referenzküvette und die Messküvette wurde mit dem gleichen Lösemittelgemisch befüllt. Die Wellenlängen sind in nm angegeben. Die Auswertung der UV-Messungen wurde sowohl mit

ORIGIN 7 der Firma *Origin Lab* als auch mit dem Programm SPECFIT in der Version 3.0.32 der Firma *Spectrum Software Associates* vorgenommen.

Fluoreszenz-Spektroskopie:

Alle Fluoreszenz-Messungen erfolgten an einem *Jasco* FP 6500 Spektrometer und wurden in Standard-Quarzglasküvetten für die Fluoreszenz-Spektroskopie mit Schichtdicke von 10 mm durchgeführt. Die Wellenlängen sind in nm angegeben. Die Auswertung erfolgte analog der Auswertung für UV-Spektren.

Isothermale Mikrokolorimetrie (ITC):

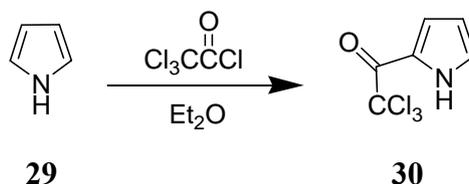
Die ITC-Messungen wurden im Arbeitskreis von Prof. Kisker im DFG-Forschungszentrum für experimentelle Biomedizin des Rudolf-Virchow-Zentrums der Universität Würzburg durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten mit einem VP-ITC-Mikrokolorimeter der Firma *MicroCal* (Northampton, USA). Die Referenzzelle des Kalorimeters wurde mit hochreinem und entgastem Wasser befüllt. Zur Auswertung der Messdaten wurde ein Plugin des Herstellers in ORIGIN 7 der Firma *Origin Lab* implementiert.

Massenspektrometrie:

Die HR-EI-Massenspektren wurden mit einem *Finnigan* MAT 900 S, die HR-ESI-Massenspektren mit einem *Bruker* microTOF focus aufgenommen.

8.3 Synthese der Guanidinocarbonylpyrrol-Grundbausteine

8.3.1 Darstellung von Trichloracetylpyrrol (30)



Zu einer Lösung aus Trichloressigsäurechlorid (225 g, 139 ml, 1.23 mol, 1.07 eq) in absolutiertem Diethylether (200 ml) wurde innerhalb von drei Stunden frisch destilliertes Pyrrol (**29**) (77.0 g, 80.0 ml, 1.15 mol, 1 eq) zugegeben.^[117] Dabei färbte sich die Lösung nach eineinhalb Stunden dunkel-violett. Nach beendeter Zugabe wurde die Lösung noch eine Stunde lang gerührt und anschließend vorsichtig mit einer Kaliumcarbonat-Lösung (100 g, 0.72 mol in 100 ml Wasser) versetzt. Die beiden Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, mit Aktivkohle behandelt und über Celite abfiltriert. Anschließend wurde der Diethylether am Rotationsverdampfer entfernt. Der so erhaltene Rückstand wurde aus Hexan (250 ml) umkristallisiert und man erhielt 221 g Trichloracetylpyrrol (**30**) als hellbraune/grau-metallische Kristalle (96 %).

$\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_3\text{NO}$ 212.46 g/mol.

Smp. 75 °C.

R_f 0.49 (Silicagel, Dichlormethan).

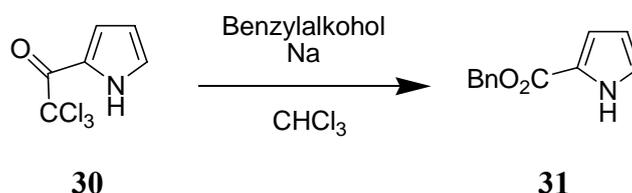
¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.39 (m, 1 H, CH), 7.17 (m, 1 H, CH), 7.39 (m, 1 H, CH), 9.58 (brs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 94.9 (quat. C), 111.9, 121.2 (beide CH), 123.0 (quat. C), 127.2 (CH), 173.2 (quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 3323 (s), 2921 (w), 1656 (s), 1536 (w), 1425 (w), 1387 (m), 1137 (m), 1112 (m), 1064 (m), 1036 (m), 843 (w), 756 (m), 740 (m).

HR-MS (EI): m/z : ber.: $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_3\text{NO}^{\bullet+}$ (M) $^{\bullet+}$ 210.9361, gef.: 210.9358.

8.3.2 Darstellung von 2-Pyrrolcarbonsäure-Benzylester (**31**)



Eine Natrium-Benzylat-Lösung wurde hergestellt, indem man Natrium (1.08 g, 47.0 mmol, 0.2 eq) in kleinen Portionen zu frisch destilliertem Benzylalkohol (26.8 ml, 259 mmol, 1.1 eq) gab und diese Lösung leicht erwärmte.^[117] Nachdem das Natrium vollständig gelöst war, wurde diese Mischung zu einer Lösung aus Trichloroacetylpyrrol (**30**) (50.0 g, 235 mmol, 1 eq) in Chloroform (50 ml) gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde 1 N Salzsäurelösung (50 ml, 50.0 mmol, 0.2 eq) zugegeben, zehn Minuten gerührt und anschließend das organische Lösemittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Die schwarze zurückbleibende wässrige Reaktionsmischung wurde mit Wasser (100 ml) versetzt und lyophilisiert, um überschüssigen Benzylalkohol zu entfernen. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silicagel, 70:15:15 Hexan/Essigester/Dichlormethan) gereinigt und man erhielt den 2-Pyrrolcarbonsäure-Benzylester (**31**) als leicht gelblichen Feststoff (44.9 g, 95 %).

C₁₂H₁₁NO₂ 201.22 g/mol.

Smp. 55 °C.

R_f 0.55 (Silicagel, 70:15:15 Hexan/Essigester/Dichlormethan).

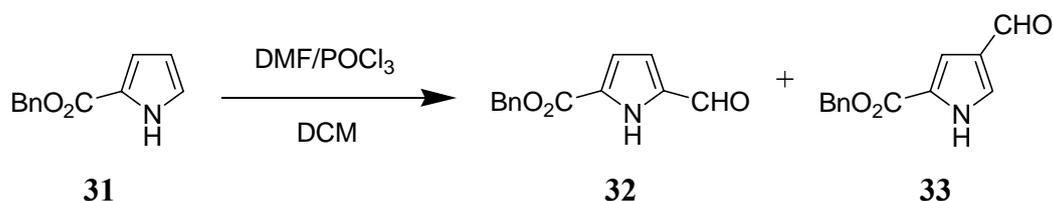
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.32 (s, 2 H, CH₂), 6.26-6.28 (m, 1 H, CH), 6.94-6.97 (m, 1 H, CH), 6.98-6.99 (m, 1 H, CH), 7.32-7.44 (m, 5 H, CH), 9.19 (brs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 66.1 (CH₂), 110.7, 115.8 (beide CH), 122.8 (quat. C), 123.1 (CH), 128.3, 128.4, 128.7 (alle CH), 136.3, 161.0 (beide quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3310 (s), 3190 (s), 2325 (m), 2320 (m), 1696 (s), 1420 (s), 1320 (s), 1190 (s), 1130 (s), 735 (m), 745 (m), 765 (m).

HR-MS (EI): *m/z*: ber.: C₁₂H₁₁NO₂^{•+} (M^{•+}) 201.0790, gef.: 201.0793.

8.3.3 Darstellung von Benzyl-5-Formylpyrrol-2-Carboxylat (**32**)



Zur Herstellung des Vilsmeier-Reagenz wurde Phosphorylchlorid (11.0 ml, 0.12 mol, 2 eq) bei 5 – 10 °C zu Dimethylformamid (23.4 ml, 0.30 mol, 5 eq) getropft und eine halbe Stunde gerührt.^[118] 2-Pyrrolcarbonsäure-Benzylester (**31**) (12.1 g, 0.06 mol, 1 eq) wurde in Dichlormethan (250 ml) gelöst, auf -15 °C gekühlt und im Anschluss das zuvor hergestellte Vilsmeier-Reagenz innerhalb von fünfzehn Minuten zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde drei Stunden bei 0 °C und weitere vierundzwanzig Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde eine wässrige gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung (150 ml) zugegeben und fünfzehn Minuten refluxiert. Nach Abfiltrieren des Feststoffes wurden die beiden Phasen getrennt, die organische Phase mit Brine (zweimal 50 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet, um verbliebenes Dimethylformamid zu entfernen. Das erhaltene bräunliche, ölige Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silicagel, 70:15:15 Cylohexan/Essigester/Dichlormethan) gereinigt und man erhielt das gelbliche 2,5-substituierte Produkt **32** (8.45 g, 62 %) und das rötliche 2,4-substituierte Nebenprodukt **33** (4.50 g, 33 %).

Daten für Benzyl 5-Formylpyrrol-2-Carboxylat (**32**):

$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 229.23 g/mol.

Smp. 105 °C.

R_f 0.55 (Silicagel, 70:15:15 Cylohexan/Essigester/Dichlormethan).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.35 (s, 2 H, CH₂), 6.93-6.98 (m, 2 H, CH), 7.36-7.44 (m, 5 H, CH), 9.66 (s, 1 H, CH), 9.84 (brs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 67.2 (CH₂), 116.1, 119.9 (beide CH), 128.3 (CH), 128.6, 128.7, 128.8 (alle CH), 134.7, 135.4, 160.3, 180.5 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3280 (s), 2320 (m), 2350 (m), 1690 (s), 1700 (s),

1550 (s), 1390 (s), 1340 (s), 1220 (s), 780 (m), 770 (m), 700 (m).

HR-MS (EI): m/z : ber.: $C_{13}H_{11}NO_3^{\bullet+}$ ($M^{\bullet+}$) 229.074, gef.: 229.074.

Daten für Benzyl 4-Formylpyrrol-2-Carboxylat (**33**):

$C_{13}H_{11}NO_3$ 229.23 g/mol.

Smp. 99 °C.

R_f 0.13 (Silicagel, 70:15:15 Cylohexan/Essigester/Dichlormethan).

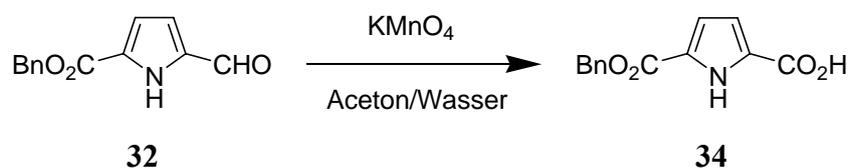
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.3 (s, 2 H, CH₂), 7.32-7.41 (m, 6 H, CH), 7.52-7.54 (m, 1 H, CH), 9.80 (s, 1 H, CH), 10.20 (s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 66.7 (CH₂), 114.7, 127.5 (beide CH), 128.2, 128.5, 128.6 (alle CH), 128.7, 135.4, 160.7, 185.7 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3138 (m), 2990 (m), 1707 (s), 1636 (s), 1567 (m), 1502 (m), 1452 (m), 1416 (m), 1383 (m), 1344 (m), 1268 (m), 1202 (s), 1152 (m), 1113 (m), 953 (w), 909 (w), 810 (w), 788 (w), 759 (m), 693 (m), 615 (w), 584 (w), 536 (w).

HR-MS (EI): m/z : ber.: $C_{13}H_{11}NO_3^{\bullet+}$ ($M^{\bullet+}$) 229.074, gef.: 229.074.

8.3.4 Darstellung von 1*H*-Pyrrol-2,5-Dicarbonsäuremonobenzylester (**34**)



Zu einer Lösung des Aldehyds **32** (17.2 g, 75.0 mmol, 1 eq) in Aceton (100 ml) wurde innerhalb einer Stunde eine Lösung aus Kaliumpermanganat (23.7 g, 150 mmol, 2 eq) in eine Aceton-Wasser-Mischung (1:1, 300 ml) getropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung eine Stunde bei 40 °C und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde Natriumdithionit (1.31 g, 7.50 mmol, 0.1 eq) zugegeben, zehn Minuten gerührt und über Celite abfiltriert. Die Celite wurde mit 1 M Natriumhydroxidlösung (150 ml) gewaschen und das Filtrat mit 2 M Salzsäurelösung auf pH 1 angesäuert. Dabei fiel ein Niederschlag aus, der abfiltriert, mit kalter 2 M Salzsäurelösung (zweimal 25 ml) gewaschen und über Phosphorpentoxid im Exsikkator getrocknet wurde. Man erhielt den Dicarbonsäuremonobenzylester **34** als farbloses Pulver (12.3 g, 67 %).

C₁₃H₁₁NO₄ 245.23 g/mol.

Smp. 234 °C (Zersetzung).

R_f 0.59 (Silicagel, 1:1 Dichlormethan/Essigester mit 1 % Triethylamin).

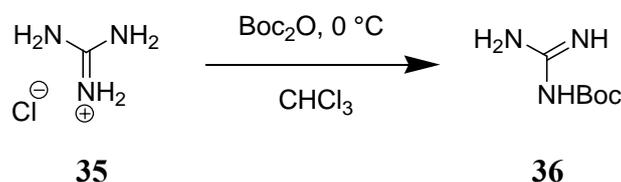
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.29 (s, 2 H, CH₂), 6.75-6.77 (m, 1 H, CH), 6.83-6.85 (m, 1 H, CH), 7.32-7.47 (m, 5 H, CH), 12.54 (s, 1 H, NH), 12.83 (brs, 1 H, CO₂H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 65.5 (CH₂), 115.1, 115.6 (beide CH), 125.9, 127.9 (beide quat. C), 128.0, 128.0, 128.4 (alle CH), 136.2, 159.6, 161.2 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3408 (s), 1650 (s), 1540 (s), 1450 (m), 1311 (s), 1253 (m), 1142 (s), 1066 (s), 950 (w), 806 (m).

HR-MS (EI): *m/z*: ber.: C₁₃H₁₁NO₄^{•+} (M^{•+}) 245.0687, gef.: 245.0688.

8.3.5 Darstellung von *N*-Boc-Guanidin (**36**)



Eine gekühlte Lösung von Boc-Anhydrid (12.0 g, 55.0 mmol, 1 eq) in Dioxan (100 ml) wurde innerhalb von acht Stunden unter starkem Rühren zu einer eisgekühlten Lösung von Guanidiniumchlorid (**35**) (26.3 g, 275 mmol, 5 eq) in wässriger Natriumhydroxidlösung (12.1 g, 303 mmol, 5.5 eq NaOH in 50 ml Wasser) getropft.^[96] Die erhaltene Suspension wurde weitere zwanzig Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Essigester (dreimal 100 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Nach Trocknung mittels Ölpumpenvakuum erhielt man *N*-Boc-Guanidin (**36**) als farblose Kristalle (8.51 g, 97 %).

C₆H₁₃N₃O₂ 159.19 g/mol.

Smp. 165 °C (Zersetzung).

R_f 0.25 (Silicagel, 5:1 Dichlormethan/Methanol mit 1 % Triethylamin).

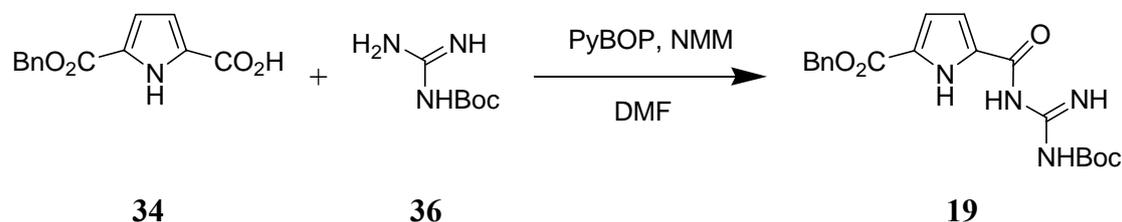
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.34 (s, 9 H, CH₃), 6.82 (brs, 4 H, NH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 28.4 (CH₃), 75.8, 162.8, 163.4 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3408 (s), 1650 (s), 1540 (s), 1450 (m), 1311 (s), 1253 (m), 1142 (s), 1066 (s), 950 (w), 806 (m).

HR-MS (EI): *m/z*: ber.: C₆H₁₃N₃O₂^{•+} (M^{•+}) 159.101, gef.: 159.101.

8.3.6 Darstellung von 5-(Boc-Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (**19**)



Eine Reaktionsmischung aus 1*H*-Pyrrol-2,5-Dicarbonsäuremonobenzylester (**34**) (2.45 g, 10.0 mmol, 1 eq), PyBOP (5.72 g, 11.0 mmol, 1.1 eq) und *N*-Methylmorpholin (2.45 ml, 22.0 mmol, 2.2 eq) wurde in Dimethylformamid (50 ml) bei Raumtemperatur eine halbe Stunde gerührt. Anschließend wurde Boc-Guanidin (**36**) (3.19 g, 20.0 mmol, 2 eq) in einer Portion zugegeben und über Nacht gerührt. Die gelbe Lösung wurde langsam unter starkem Rühren in Wasser (150 ml) gegeben, wobei ein weißer Niederschlag ausfiel. Dieser wurde durch Zugabe von Diethylether (150 ml) aufgelöst. Nach anschließender Phasentrennung und Extraktion der Wasser-Dimethylformamid-Phase mit Diethylether (zweimal 150 ml) wurde der Ether unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie (Silicagel, 3:2 Hexan/Essigester mit 1 % Triethylamin) gereinigt. Man erhielt 3.59 g eines farblosen Pulvers **19** (93 %).

C₁₉H₂₂N₄O₅ 386.40 g/mol.

Smp. 88 °C.

R_f 0.51 (Silicagel, 3:2 Hexan/Essigester mit 1 % Triethylamin).

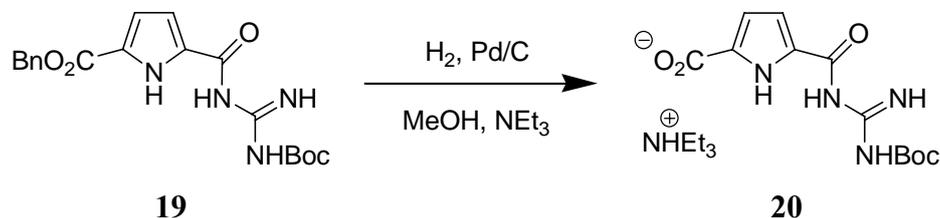
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.46 (s, 9 H, CH₃), 5.31 (s, 2 H, CH₂), 6.85 (m, 2 H, CH), 7.30-7.46 (m, 5 H, CH), 8.58 (brs, 1 H, NH), 9.31 (brs, 1 H, NH), 10.74 (brs, 1 H, NH), 11.62 (brs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 27.7 (CH₃), 65.5 (CH₂), 81.2 (quat. C), 113.8 115.8 (beide CH), 124.5 (quat. C), 127.8, 128.0, 128.4 (alle CH), 134.0, 136.2, 155.6, 158.3, 159.8, 168.0 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3393 (m), 3256 (m), 2360 (s), 2340 (m), 1719 (s), 1717 (s), 1635 (s), 1540 (s), 1286 (s), 1149 (s), 842 (w).

HR-MS (pos. ESI): *m/z*: ber.: C₁₉H₂₂N₄NaO₅⁺ (M + Na⁺) 409.146, gef.: 409.149.

8.3.7 Darstellung von 5-(Boc-Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäure (**20**)



Der Benzylester **19** (1.94 g, 5.00 mmol, 1 eq) wurde in Methanol (30 ml) gelöst und mit einer katalytischen Menge an Pd/C (\approx 200 mg, 10 %) und Triethylamin (1.05 ml, 7.50 mmol, 1.5 eq) versetzt. Anschließend wurde unter starkem Rühren bei 40 °C für fünf Stunden Wasserstoff eingeleitet. Danach wurde die Lösung über Celite abfiltriert und der Filterkuchen mehrmals mit einer 2 %igen Triethylamin-Lösung in Methanol gewaschen. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Nach Zugabe von Wasser (10 ml) zum zurückgebliebenen Öl erhielt man nach Lyophilisation das gewünschte Produkt **20** als farblosen Feststoff (1.89 g, 95 %).

C₁₉H₂₂N₄O₅ 386.40 g/mol.

Smp. > 300 °C.

R_f 0.64 (Silicagel, 8:2 Dichlormethan/Methanol mit 1 % Triethylamin).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.08 (t, 9 H, $^3J(\text{H,H}) = 7.20$ Hz, CH₃), 1.45 (s, 9 H, CH₃), 2.79 (q, 6 H, $^3J(\text{H,H}) = 7.20$ Hz, CH₂), 6.47 (d, $^3J(\text{H,H}) = 3.64$ Hz, 1 H, CH), 6.77 (d, $^3J(\text{H,H}) = 3.68$ Hz, 1 H, CH), 8.58 (brs, 1 H, NH), 9.31 (brs, 1 H, NH); 10.84 (brs, 1 H, NH).

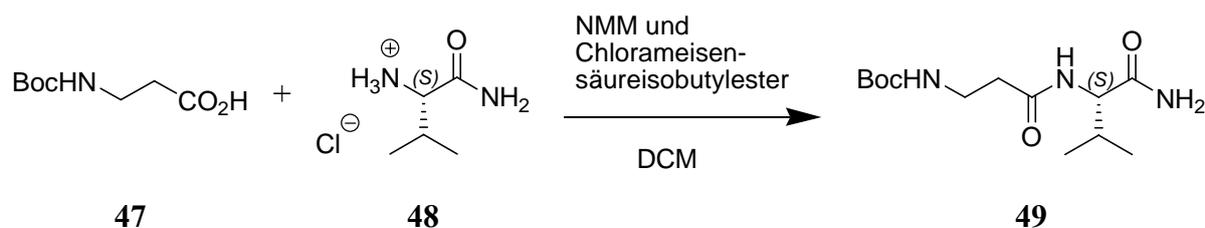
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.7 (CH₃), 27.8 (CH₃), 45.2 (CH₂), 80.2 (quat. C), 112.1, 114.1 (beide CH), 128.8, 133.0, 158.5, 160.6, 163.9, 167.2 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3393 (m), 2958 (w), 1650 (s), 1542 (s), 1319 (s).

HR-MS (neg. ESI): *m/z*: ber.: C₁₂H₁₅N₄O₅⁻ (M - H⁺) 295.105, gef.: 295.105.

8.4 Synthese der Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptoren

8.4.1 Darstellung von Boc- β -Alanin-*L*-Valinamid (**49**)



Boc- β -Alanin (**47**) (1.42 g, 7.50 mmol, 1 eq) wurde in absolutiertem Dichlormethan (25 ml) unter Schutzgas vorgelegt und mittels eines Aceton-Trockeneisbades auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Dann wurde *N*-Methylmorpholin (770 mg, 8.25 mmol, 1.1 eq) zugegeben und anschließend frisch destillierter Chlorameisensäureisobutylester (1.13 g, 8.25 mmol, 1.1 eq) langsam zuge tropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionsmischung noch eine halbe Stunde bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, nochmals *N*-Methylmorpholin (770 mg, 8.25 mmol, 1.1 eq) und dann *L*-Valinamid-Hydrochlorid (**48**) (1.14 g, 7.5 mmol, 1 eq) zugegeben. Nach weiteren zwei Stunden Rühren bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Suspension über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 ml), 0.1 M Natriumhydrogensulfat-Lösung (10 ml) und wieder mit Wasser (10 ml) gewaschen. Man erhielt 1.51 g (70 %) Boc- β -Alanin-*L*-Valinamid (**49**) als farblosen Feststoff.

$\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$ 287.36 g/mol.

Smp. 182 $^{\circ}\text{C}$.

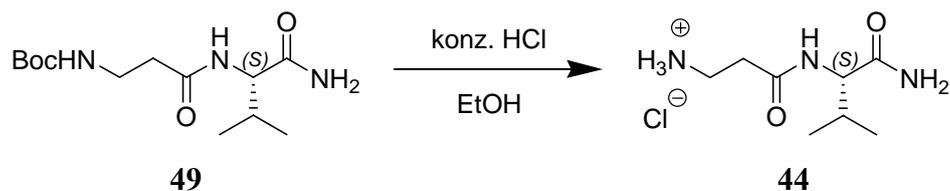
R_f 0.17 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.83 (d, 6H, $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 6.8\text{ Hz}$, CH₃), 1.37 (s, 9 H, CH₃), 1.95 (q, 1 H, $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 6.7\text{ Hz}$, CH), 2.32 (q, 2 H, $^4\text{J}(\text{H},\text{H}) = 3.9\text{ Hz}$, CH₂), 3.12 (m, 2 H, CH₂), 4.10 (m, 1 H, CH), 6.66 (brs, 1 H, NH), 6.97 (brs, 1 H, NH), 7.32 (brs, 1 H, NH), 7.73 (d, 1 H, $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 8.9\text{ Hz}$, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 17.8 (CH₃), 19.2 (CH), 28.2 (CH₃), 30.1 (CH), 35.4, 36.8 (beide CH₂), 57.3 (CH), 77.5, 170.3, 173.0 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 3313 (m), 2867 (w), 2372 (w), 2312 (w), 1734 (s), 1693 (s), 1635 (m), 1540 (s), 1243 (s), 1146 (s), 1011 (w), 816 (m), 757 (w).

8.4.2 Darstellung von *H*- β -Alanin-*L*-Valinamid-Hydrochlorid (**44**)



Boc- β -Alanin-*L*-Valinamid (**49**) (718 mg, 2.50 mmol, 1eq) wurde in Ethanol (20 ml) gelöst, mit konzentrierter Salzsäure (2 ml) versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert und man erhielt 544 mg des Dipeptids *H*- β -Alanin-*L*-Valinamid-Hydrochlorid (**44**) als hellbraunes Pulver (97 %).

$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2$ 223.70 g/mol.

Smp. 209 °C (Zersetzung).

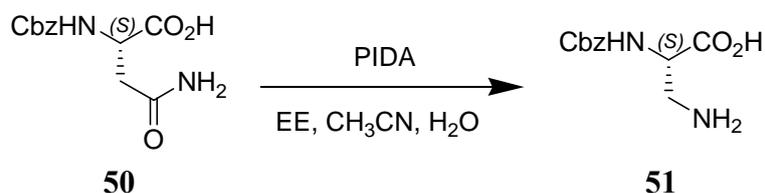
R_f 0.58 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.84 (t, 6H, ³J(H,H) = 6.4 Hz, CH₃), 1.99 (m, 1 H, CH), 2.60 (m, 2 H, CH₂), 2.96 (m, 2 H, CH₂), 4.12 (m, 1 H, CH), 7.02 (s, 1 H, NH), 7.45 (s, 1 H, NH). 7.99 (brs, 3 H, NH₃), 8.13 (brs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 18.0 (*i*Pr-CH₃), 19.4 (*i*Pr-CH₃), 30.2 (CH), 31.9 (CH₂), 35.3 (CH₂), 57.7 (CH), 169.6, 173.0 (quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 3387 (w), 3295 (m), 3197 (w), 2963 (w), 1674 (m), 1623 (s), 1556 (m), 1422 (m), 1239 (m), 1139 (w), 951 (m).

8.4.3 Darstellung von N_α -Cbz- β -Amino-*L*-Alanin (**51**)



Cbz-*L*-Asparagin (**50**) (15.0 g, 56.3 mmol, 1 eq) wurde zu einer Suspension aus PIDA (21.8 g, 67.6 mmol, 1.2 eq) in Essigester (90 ml), Acetonitril (90 ml) und Wasser (40 ml) gegeben und für eine halbe Stunde bei 15 °C mittels KPG-Rührer gerührt.^[119] Danach wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur aufgewärmt und eine weitere Stunde gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf 0 °C im Eisbad wurde der ausfallende Feststoff abfiltriert, mit Diethylether (viermal 25 ml) gewaschen und im Exsikkator über Blaugel getrocknet. Man erhielt 12.7 g (95 %) des farblosen Feststoffs N_α -Cbz- β -Amino-*L*-Alanin (**51**).

C₁₁H₁₄N₂O₄ 238.24 g/mol.

Smp. 237 °C (Zersetzung).

R_f 0.69 (Silicagel, 5:3:1 Dichlormethan/Methanol/Essigester).

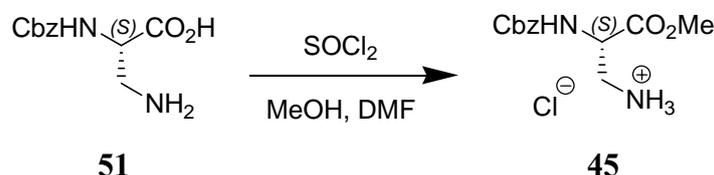
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.03 (m, 1 H, CH₂), 3.25 (m, 1 H, CH₂), 4.31 (m, 1 H, CH), 5.07 (s, 2 H, CH₂), 7.28 – 7.40 (m, 5 H, CH), 7.73 (d, ³J(H,H) = 8.64 Hz, NH), 8.04 (brs, 2 H, NH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 39.4 (CH₂), 51.9 (CH), 65.9 (CH₂), 127.9, 128.0, 128.4 (alle CH), 136.7, 156.3, 170.9 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3403 (m), 3363 (m), 3301 (m), 2947 (w), 2695 (w), 2360 (m), 1694 (s), 1635 (m), 1586 (m), 1538 (s), 1455 (w), 1411 (m), 1313 (m), 1262 (s), 1213 (s), 1121 (w), 1001 (m), 743 (m).

HR-MS (pos. ESI) *m/z*: ber.: C₁₁H₁₅N₂O₄⁺ (M + H⁺) 239.103, gef.: 239.102.

8.4.4 Darstellung von *N*_α-Cbz-β-Amino-*L*-Alaninmethylester-Hydrochlorid (**45**)



*N*_α-Cbz-β-Amino-*L*-Alanin (**51**) (12.8 g, 53.7 mmol, 1 eq) wurde in absolutiertem Methanol (100 ml) und Dimethylformamid (ein paar Tropfen) vorgelegt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt.^[120] Anschließend wurde Thionylchlorid (7.03 g, 4.29 ml, 59.1. mmol, 1.1 eq) tropfenweise zugegeben. Dann wurde die Lösung bei 50 °C über Nacht gerührt, das Lösemittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert, und der erhaltene Rückstand aus Methanol/Diethylether umkristallisiert und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhielt 13.9 g (90 %) von *N*_α-Cbz-β-Amino-*L*-Alaninmethylester-Hydrochlorid (**45**) als farblosen Feststoff.

C₁₂H₁₇ClN₂O₄ 288.73 g/mol.

Smp. 171 °C (Zersetzung).

R_f 0.23 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).

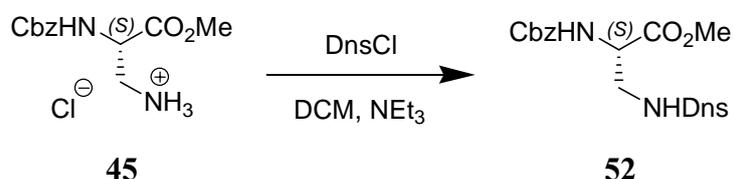
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.07 (m, 1 H, CH₂), 3.20 (m, 1 H, CH₂), 3.67 (s, 3 H, CH₃), 4.4 (m, 1 H, CH), 5.07 (s, 2 H, CH₂), 7.29 – 7.39 (m, 5 H, CH), 7.94 (d, ³J(H,H) = 8.20 Hz, NH), 8.33 (brs, 3 H, NH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 39.1 (CH₂), 51.8 (CH), 52.7 (CH₃), 66.0 (CH₂), 127.9, 128.0 128.5 (alle CH), 136.7, 156.2, 169.9 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3311 (m), 2868 (m), 2016 (w), 1734 (s), 1688 (s), 1596 (m), 1539 (s), 1437 (m), 1306 (s), 1263 (s), 1226 (s), 1156 (m), 1059 (m), 1012 (m), 986 (m), 840 (w).

MS (EI): m/z: ber.: C₁₂H₁₆N₂O₄^{•+} (M)^{•+} 252.1, gef.: 252.1.

8.4.5 Darstellung von N_α -Cbz- N_β -Dns- β -Amino- L -Alaninmethylester (**52**)



Dansylchlorid (809 mg, 3.00 mmol, 1.5 eq) wurde in absolutiertem Dichlormethan (30 ml) mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt. Dazu wurde eine Lösung aus dem Ammoniumsalz **45** (578 mg, 2.00 mmol, 1 eq) und absolutiertem Triethylamin (607 mg, 832 μ l, 6.00 mmol, 3 eq) in absolutiertem Methanol (3 ml) langsam hinzu getropft und zuerst eine Stunde bei 0 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionskolben wurde dabei mit Alufolie abgedunkelt. Die Reaktionsmischung wurde mit Brine (30 ml) und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (30 ml) extrahiert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch (Silicagel, 2:1 Hexan/Essigester) gereinigt. Man erhielt 645 mg (66 %) des gelblich fluoreszierenden Feststoffs **52**.

C₂₄H₂₇N₃O₆S 485.55 g/mol.

Smp. 107 °C.

R_f 0.23 (Silicagel, 2:1 Hexan/Essigester).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.82 (s, 6 H, CH₃), 3.15 (brs, 2 H, CH₂), 3.46 (s, 3 H, CH₃), 4.16 (q, ³J(H,H) = 7.92 Hz, 1 H, CH), 4.99 (s, 2 H, CH₂), 7.25 (d, ³J(H,H) = 7.32 Hz, 1 H, CH), 7.29 – 7.39 (m, 5 H, CH), 7.51 (d, ³J(H,H) = 8.20 Hz, 1 H, NH), 7.56 – 7.64 (m, 2 H, CH), 8.08 (s, 1 H, NH), 8.09 (d, ³J(H,H) = 6.32 Hz, 1 H, CH), 8.23 (d, ³J(H,H) = 8.60 Hz, 1 H, CH), 8.47 (d, ³J(H,H) = 8.60 Hz, 1 H, CH).

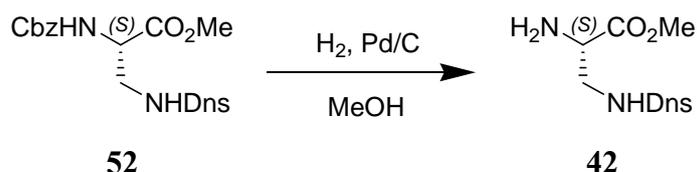
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 43.3 (CH₂), 45.0 (CH₃), 51.9 (CH₃), 54.1 (CH), 65.7 (CH₂), 115.1, 119.0, 123.6, 127.7, 127.9, 128.0, 128.3, 128.3 (alle CH), 128.9, 129.1 (beide quat. C), 129.6 (CH), 135.6, 136.7, 151.4, 155.7 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3401 (w), 3319 (w), 3216 (w), 2960 (m), 2828 (w), 2779 (w), 1755 (m), 1701 (s), 1658 (m), 1614 (m), 1530 (s), 1449 (m),

1325 (s), 1206 (s), 1144 (s), 1072 (s), 978 (m), 790 (s), 736 (s), 700 (m).

HR-MS (pos. ESI) m/z : ber.: $C_{24}H_{27}N_3NaO_6S^+$ ($M + Na^+$) 508.151, gef.: 508.152.

8.4.6 Darstellung von N_β -Dns- β -Amino- L -Alaninmethylester (**42**)



Der Benzylester **52** (200 mg, 412 μmol , 1 eq) wurde in Methanol (20 ml) gelöst, mit Pd/C (20.0 mg, 10 %) versetzt und fünf Stunden unter Wasserstoffatmosphäre stark gerührt. Anschließend wurde die Aktivkohle über Celite abfiltriert, mit Methanol (30 ml) nachgewaschen und das Lösemittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Man erhielt 143 mg (99 %) des Produkts **42** als gelblich fluoreszierenden Feststoff.

$C_{16}H_{21}N_3O_4S$ 351.42 g/mol.

Smp. 84 °C.

R_f 0.63 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).

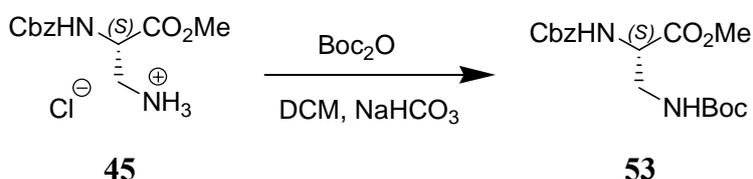
¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.83 (s, 6 H, CH₃), 2.90 – 3.03 (m, 2 H, CH₂), 3.36 (m, 1 H, CH), 3.42 (s, 3 H, CH₃), 7.25 (d, ³J(H,H) = 6.96 Hz, 1 H, CH), 7.56 – 7.64 (m, 2 H, CH), 8.09 (d, ³J(H,H) = 7.20 Hz, 1 H, CH), 8.26 (d, ³J(H,H) = 8.72 Hz, 1 H, CH), 8.46 (d, ³J(H,H) = 8.48 Hz, 1 H, CH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 45.1 (CH₃), 46.7 (CH₂), 51.4 (CH₃), 54.2 (CH), 115.1, 119.0, 123.5, 127.8, 128.2, (alle CH), 129.0, 129.1 (beide quat. C), 129.5 (CH), 135.8, 151.3, 173.7 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3301 (w), 2945 (w), 2826 (w), 2776 (m), 1731 (s), 1587 (s), 1454 (m), 1406 (m), 1310 (s), 1201 (m), 1140 (s), 1062 (m), 941 (w), 788 (s), 983 (w), 621 (s).

HR-MS (pos. ESI) m/z : ber.: $C_{16}H_{22}N_3O_4S^+$ ($M + H^+$) 352.133, gef.: 352.133.

8.4.7 Darstellung von N_α -Cbz- N_β -Boc- β -Amino- L -Alaninmethylester (53)



Das Amin **45** (1.89 g, 6.55 mmol, 1 eq) wurde in einem Zwei-Phasen-Gemisch aus Dichlormethan (40 ml) und einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung (20 ml) vorgelegt. Anschließend wurde Boc-Anhydrid (1.43 g, 6.55 mmol, 1 eq) zugegeben und vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (50 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Brine (40 ml) gewaschen. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Öl mit Hexan (50 ml) digeriert. Man erhielt 2.28 g (98 %) des farblosen Feststoffs N_α -Cbz- β -Amino-Boc- L -Alaninmethylester (**53**).

$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$ 352.38 g/mol.

Smp. 100 °C.

R_f 0.37 (Silicagel, 8:5 Hexan/Essigester mit 1 % Triethylamin).

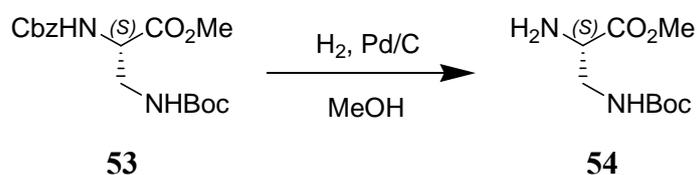
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.36 (s, 9 H, CH₃), 3.27 (t, ³J(H,H) = 6.08 Hz, 2 H, CH₂), 3.60 (s, 3 H, CH₃), 4.13 (q, ³J(H,H) = 6.04 Hz, 1 H, CH), 5.03 (s, 2 H, CH₂), 6.86 (t, ³J(H,H) = 5.68 Hz, NH), 7.39 (m, 5 H, CH), 8.41 (d, ³J(H,H) = 7.72 Hz, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 28.1 (CH₃), 41.1 (CH₂), 52.0 (CH₃), 54.2 (CH), 66.9 (CH₂), 78.1 (quat. C), 127.8, 127.9 128.4 (alle CH), 136.8, 155.6, 171.2 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3401 (w), 3352 (m), 3302 (s), 3027 (w), 2979 (w), 2362 (m), 1695 (s), 1635 (s), 1587 (s), 1539 (s), 1455 (w), 1379 (m), 1313 (m), 1264 (s), 1213 (s), 1184 (m), 1120 (m), 1098 (m), 1001 (m), 892 (w).

HR-MS (pos. ESI) *m/z*: ber.: C₁₇H₂₄N₂NaO₆⁺ (M + Na⁺) 375.153, gef.: 375.152.

8.4.8 Darstellung von *N*_β-Boc-β-Amino-*L*-Alaninmethylester (**54**)



Der Benzylester **53** (2.00 g, 5.68 mmol, 1 eq) wurde in Methanol (200 ml) gelöst, mit Pd/C (200 mg, 10 %) versetzt und fünf Stunden unter Wasserstoffatmosphäre stark gerührt. Anschließend wurde die Aktivkohle über Celite abfiltriert, mit Methanol (50 ml) nachgewaschen und das Lösemittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Man erhielt 1.19 g (97 %) des Produkts **54** als farblosen Feststoff.

C₉H₁₈N₂O₄ 218.25 g/mol.

Smp. 182 °C (Zersetzung).

R_f 0.20 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).

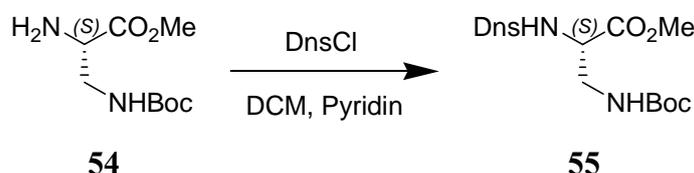
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.36 (s, 9 H, CH₃), 1.75 (s, 2 H, NH₂), 3.11 (m, 2 H, CH₂), 3.36 (t, ³J(H,H) = 5.92 Hz, 1 H, CH), 3.59 (s, 3 H, CH₃), 6.80 (t, ³J(H,H) = 5.04 Hz, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 28.1 (CH₃), 51.5 (CH₃), 53.9 (CH), 54.2 (CH₂), 78.0, 155.5, 167.9 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 2970 (m), 2929 (w), 2363 (m), 1715 (s), 1688 (s), 1507 (s), 1456 (w), 1365 (s), 1232 (s), 1162 (s), 860 (m), 777 (m).

HR-MS (pos. ESI) *m/z*: ber.: C₉H₁₉N₂O₄⁺ (M + H⁺) 219.134, gef.: 219.134.

8.4.9 Darstellung von N_α -Dns- N_β -Boc- β -Amino- L -Alaninmethylester (**55**)



Das Amin **54** (950 mg, 4.35 mmol, 1 eq) und destilliertes Pyridin (688 mg, 702 μl , 8.70 mmol, 2 eq) wurden in absolutiertem Dichlormethan vorgelegt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung aus Dansylchlorid (8.00 g, 33.6 mmol, 1 eq) in absolutiertem Dichlormethan (40 ml) wurde langsam hinzu getropft und zuerst eine Stunde bei 0 °C und anschließend zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Brine (50 ml) und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (50 ml) extrahiert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch (Silicagel, 8:5 Hexan/Essigester mit 1 % Triethylamin) gereinigt. Man erhielt 1.69 g (86 %) des gelblich fluoreszierenden Feststoffs **55**.

$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ 451.54 g/mol.

Smp. 60 °C.

R_f 0.24 (Silicagel, 8:5 Hexan/Essigester mit 1 % Triethylamin).

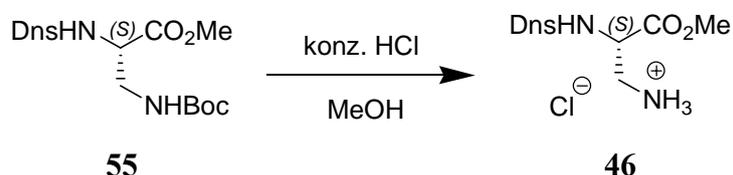
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.28 (s, 9 H, CH₃), 2.83 (s, 6 H, CH₃), 3.06 (m, 1 H, CH₂), 3.14 (s, 3 H, CH₃), 3.15 (m, 1 H, CH₂), 3.89 (t, ³J(H,H) = 5.80 Hz, 1 H, CH), 6.76 (t, ³J(H,H) = 5.82 Hz, 1 H, NH), 7.25 (d, ³J(H,H) = 7.48 Hz, 1 H, CH), 7.59 (t, ³J(H,H) = 7.72 Hz, 2 H, CH), 8.08 (d, ³J(H,H) = 6.80 Hz, 1 H, CH), 8.26 (d, ³J(H,H) = 8.72 Hz, 1 H, CH), 8.46 (d, ³J(H,H) = 8.44 Hz, 1 H, CH), 8.54 (brs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 28.0 (CH₃), 41.9 (CH₂), 45.0 (CH₃), 51.4 (CH₃), 55.2 (CH), 78.0 (quat. C), 115.0, 119.1, 123.4, 127.8, 128.5 (alle CH), 128.9, 129.0 (beide quat C), 129.7 (CH), 135.7, 151.2, 155.3, 169.9 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 2970 (m), 2875 (w), 2830 (w), 2773 (w), 2362 (m), 1736 (s), 1578 (w), 1507 (s), 1455 (s), 1365 (w), 1338 (w), 1232 (m), 1144 (s), 1061 (m), 941 (m), 844 (w), 788 (s).

HR-MS (pos. ESI) *m/z*: ber.: C₂₁H₂₉N₃NaO₆S⁺ (M + Na⁺) 474.167, gef.: 474.167.

8.4.10 Darstellung von N_{α} -Dns- β -Amino-*L*-Alaninmethylester-Hydrochlorid (**46**)



Das geschützte Amin **55** (500 g, 1.11 mmol, 1 eq) wurde in Methanol (20 ml) gelöst, mit konzentrierter Salzsäure (2 ml) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck, wurde die Boc-Entschützung erneut durchgeführt. Anschließend wurde der ölige Rückstand zweimal mit Wasser (25 ml) lyophilisiert, und man erhielt 414 mg (97 %) des Produkts **46** als gelblich fluoreszierenden Feststoff.

C₁₆H₂₂ClN₃O₄S 387.88 g/mol.

Smp. 141 °C.

R_f 0.44 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).

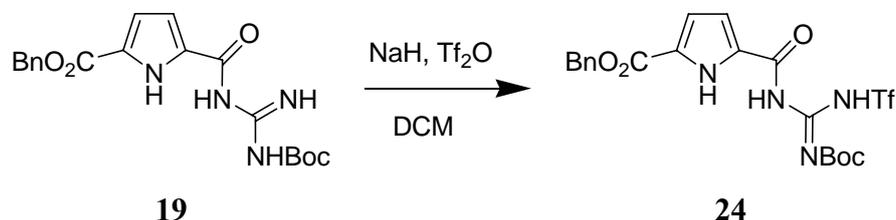
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.92 (m, 2 H, CH₂), 3.04 (s, 6 H, CH₃), 3.04 (s, 3 H, CH₃), 4.24 (q, ³J(H,H) = 8.56 Hz, 1 H, CH), 7.65 (s, 1 H, NH), 7.73 (t, ³J(H,H) = 7.44 Hz, 2 H, CH), 8.19 (d, ³J(H,H) = 7.20 Hz, 1 H, CH), 8.34 (s, 3 H, NH₃), 8.46 (d, ³J(H,H) = 8.36 Hz, 1 H, CH), 8.75 (d, ³J(H,H) = 7.80 Hz, 1 H, CH), 9.01 (d, ³J(H,H) = 8.96 Hz, 1 H, CH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 39.8 (CH₂), 45.8 (CH₃), 52.0 (CH₃), 53.2 (CH₃), 117.5, 124.7 (beide CH), 127.4, 127.6 (beide quat. C), 127.8 (CH), 128.9 (quat. C), 129.0, 129.2 (beide CH), 135.9, 168.5 (beide quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3019 (w), 2970 (w), 2865 (w), 2360 (m), 2334 (w), 1735 (s), 1507 (m), 1456 (m), 1338 (w), 1216 (s), 1137 (s), 1094 (m), 1045 (m), 889 (m), 791 (s).

HR-MS (pos. ESI) *m/z*: ber.: C₁₆H₂₂N₃O₄S⁺ (M + H⁺) 352.133, gef.: 352.133.

8.4.11 Darstellung von 5-(*N*-Boc-*N'*-Tf-Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (**24**)



Das Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol **19** (386 mg, 1.00 mmol, 1 eq) wurde in absolutiertem und über Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe I) filtriertem Dichlormethan (15 ml) vorgelegt und unter Schutzgas in einem Aceton-Trockeneisbad auf -20 °C heruntergekühlt. Anschließend wurde Natriumhydrid (85.9 mg, 2.00 mmol, 2 eq) als 55 – 65 %ige feste Öl-Suspension in einer Portion hinzugegeben und zehn Minuten gerührt. Danach wurde auf -50 °C heruntergekühlt und Trifluormethansulfonsäureanhydrid (330 µl, 2.00 mmol, 2 eq) innerhalb von fünfzehn Minuten langsam zugetropft. Die gelbliche Reaktionslösung wurde eine Stunde bei -50 °C und weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann mit Wasser (fünf Tropfen) versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (zweimal 8 ml) und Brine (zweimal 8 ml) gewaschen. Anschließend wurde das organische Lösemittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin) gereinigt, und man erhielt 306 mg der Verbindung **24** als gelblichen Feststoff in 59 % Ausbeute.

C₂₀H₂₁F₃N₄O₇S 518.46 g/mol.

Smp. 91 °C.

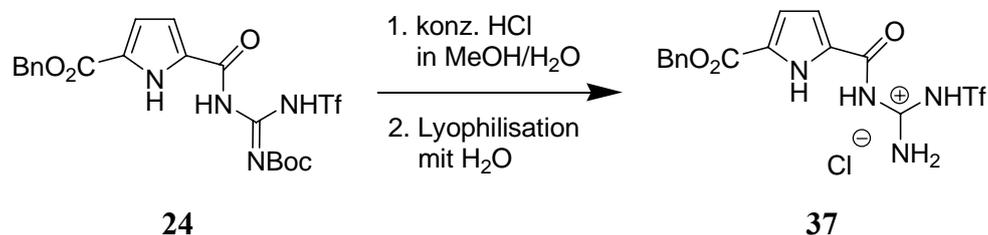
R_f 0.73 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3405 (w), 3359 (w), 3302 (m), 2979 (w), 2362 (w), 1696 (s), 1635 (m), 1539 (s), 1455 (w), 1368 (w), 1262 (s), 1174 (s), 1122 (s), 1026 (m), 1001 (m), 862 (m), 762 (s).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.43 (s, 9H, CH₃), 5.29 (s, 2H, CH₂), 6.72 (s, 1 H, CH), 6.84 (s, 1 H, CH), 7.31 – 7.48 (m, 5 H, CH), 8.98 (brs, 1 H, NH), 11.02 (s, 1 H, NH). 11.59 (s, 1 H, NH).

^{13}C-NMR	(100 MHz, DMSO- d_6) δ 27.7 (CH ₃), 64.4 (CH ₂), 80.4 (quat. C), 113.6, 115.8, 127.8, 127.9, 128.0, 128.4 (alle CH), 136.2, 159.7 (beide quat. C).
^{19}F-NMR	(376 MHz, DMSO- d_6) δ -78.26 (s, 3 F, CF ₃).
HR-MS	(neg. ESI): m/z : ber.: C ₂₀ H ₂₀ F ₃ N ₄ O ₇ S ⁻ (M - H ⁺) 517.101, gef.: 517.101.

8.4.12 Darstellung von 5-(*N'*-Tf-Guanidiniocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (**37**)



Die Verbindung **24** (426 mg, 822 μmol , 1 eq) wurde in Methanol (10 ml) gelöst, mit konzentrierter Salzsäure (2 ml) versetzt und bei Raumtemperatur für zwei Stunden gerührt. Anschließend wurde das organische Lösemittel unter vermindertem Druck abdestilliert und mit Wasser (20 ml) lyophilisiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (RP-18, 7:3 Methanol/Wasser mit 1 % TFA) gereinigt. Man erhielt 179 mg des Hydrochlorids **37** als farblosen Feststoff in 48 % Ausbeute.

$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ 454.81 g/mol.

Smp. 191 °C.

R_f 0.89 (RP-18, 7:3 Methanol/Wasser mit 1 % TFA).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.35 (s, 2H, CH₂), 6.92 (t, 1H, ³J(H,H) = 2.02 Hz, CH), 7.22 (t, 1H, ³J(H,H) = 2.02 Hz, CH), 7.45 (m, 5H, CH), 8.65 (s, 1H, NH), 9.69 (s, 1H, NH), 11.55 (s, 1H, NH). 12.84 (s, 1H, NH).

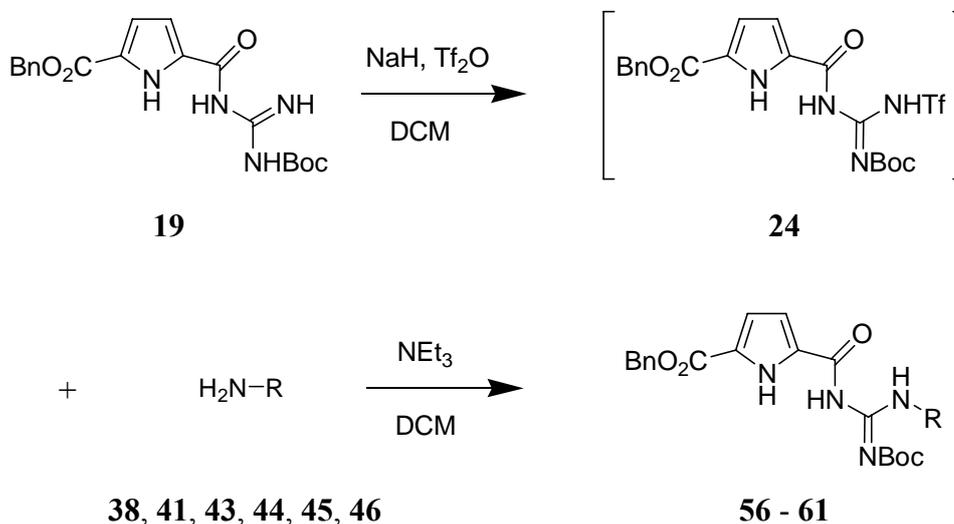
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 65.9 (CH₂), 115.7 117.3 (beide CH), 119.8 (q, quat. C, ¹J(C,F) = 320.7 Hz, CF₃) 127.4, 127.6 (beide quat. C), 127.9, 128.1, 128.5 (alle CH), 135.9, 156.7, 159.5, 160.9 (alle quat. C).

¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -78.44 (s, 3 F, CF₃)

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3402 (w), 3363 (w), 3312 (w), 2977 (w), 2363 (w), 1717 (m), 1671 (m), 1636 (s), 1556 (s), 1456 (m), 1331 (m), 1261 (s), 1213 (s), 1143 (s), 1097 (s), 996 (m), 892 (m), 796 (m), 764 (s).

HR-MS (pos. ESI): *m/z*: ber.: C₁₅H₁₃F₃N₄NaO₅S⁺ (M + Na⁺) 441.046, gef.: 441.045.

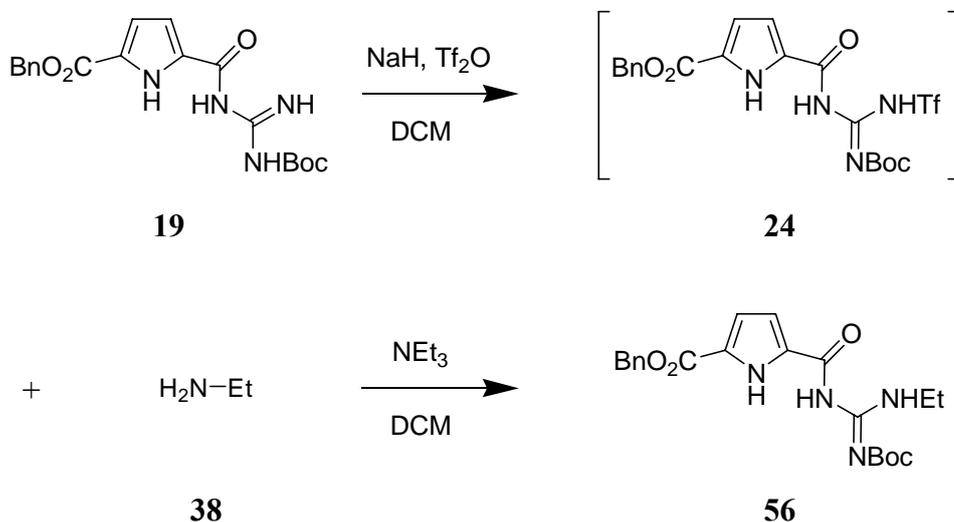
8.4.13 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der *N'*-substituierten *N*-Boc-geschützten Guanidinocarbonylpyrrole **56** bis **61**



Das Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol **19** (386 mg, 1.00 mmol, 1 eq) wurde in absolutiertem und über Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe I) filtriertem Dichlormethan (15 ml) vorgelegt und unter Schutzgas in einem Aceton-Trockeneisbad auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ heruntergekühlt. Anschließend wurde Natriumhydrid (85.9 mg, 2.00 mmol, 2 eq) als 55 – 65 %ige feste Öl-Suspension in einer Portion hinzugegeben und zehn Minuten gerührt. Danach wurde auf $-50\text{ }^\circ\text{C}$ heruntergekühlt und Trifluormethansulfonsäureanhydrid (330 μl , 2.00 mmol, 2 eq) innerhalb von fünfzehn Minuten langsam zugetropft. Die gelbliche Reaktionslösung wurde eine Stunde bei $-50\text{ }^\circ\text{C}$ und weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann Wasser (drei bis fünf Tropfen) hinzugegeben.

Ohne die Zwischenstufe **24** zu isolieren wurde anschließend eine Lösung aus einem der Amine **38**, **41**, **43**, **44**, **45** und **46** (1.00 mmol, 1 eq) und Triethylamin (278 μl , 2.00 mmol, 2 eq) in absolutiertem Dichlormethan (5 ml) langsam zugetropft und über Nacht bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (zweimal 8 ml) und Brine (8 ml) gewaschen und dann das organische Lösemittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin) gereinigt, und man erhielt die Verbindungen **56** bis **61** als farblose bis leicht gelbliche Feststoffe in Ausbeuten von 19 bis 77 %.

8.4.14 Darstellung von 5-(*N*-Boc-*N'*-Ethyl-Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (**56**)



Der Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptor **56** wurde als farbloser Feststoff in 339 mg Ausbeute (77 %) erhalten.

$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5$ 414.45 g/mol.

Smp. 113 °C.

R_f 0.73 (Silicagel, 8:5 Cyclohexan/Essigester mit 1 % Triethylamin).

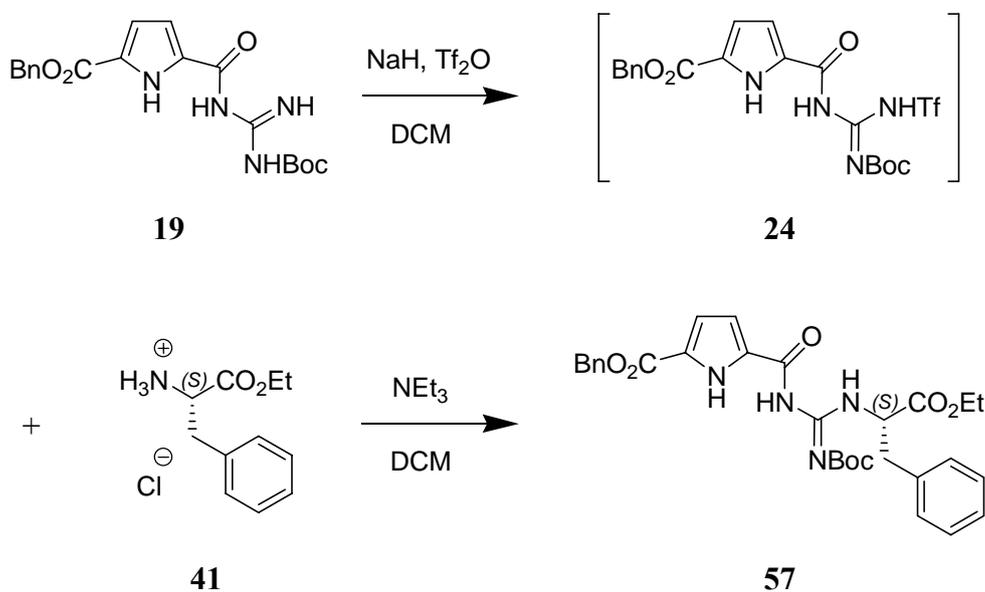
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.16 (t, ³J(H,H) = 7.08 Hz, 3 H, CH₃), 1.49 (s, 3 H, CH₃), 3.55 (quin, ³J(H,H) = 6.92 Hz, 2H, CH₂), 5.30 (s, 2H, CH₂), 6.79 (dd, ³J(H,H) = 3.52 Hz, ⁴J(H,H) = 1.64 Hz, 1 H, CH), 6.84 (dd, ³J(H,H) = 3.68 Hz, ⁴J(H,H) = 1.92 Hz, 1 H, CH), 7.31 – 7.49 (m, 5 H, CH), 8.57 (t, 1 H, ³J(H,H) = 5.56 Hz, NH), 11.83 (s, 1 H, NH), 12.35 (s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.5 (CH₃), 27.6 (CH₃), 35.7 (CH₂), 65.4 (CH₂), 82.8 (quat. C), 114.2 115.7 (beide CH), 124.8 (quat. C), 127.9, 128.0, 128.4 (alle CH), 135.5, 136.3, 152.0, 155.3, 159.8, 169.9 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3312 (w), 3190 (w), 2929 (m), 2366 (w), 1705 (s), 1615 (m), 1578 (s), 1540 (s), 1455 (w), 1364 (s), 1267 (s), 1143 (s).

HR-MS (pos. ESI): *m/z*: ber.: C₂₁H₂₆N₄O₅⁺ (M + Na⁺) 437.180, gef.: 437.181.

8.4.15 Darstellung von 5-(*N*-Boc-*N'*-(ethanyl-2-(*L*-ethylbenzol)-carbon-säureethylester)-Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (**57**)



Änderung von **8.4.13 Allgemeiner Vorschrift zur Darstellung *N'*-substituierter Guanidinocarbonylpyrrole**: Anstatt die Reaktionsmischung nur über Nacht bei 40 °C zu refluxieren, wurden hier drei Tage unter Rückfluss erhitzt.

Der Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptor **57** wurde als farbloser Feststoff in 107 mg Ausbeute (19 %) erhalten.

C₃₀H₃₄N₄O₇ 562.61 g/mol.

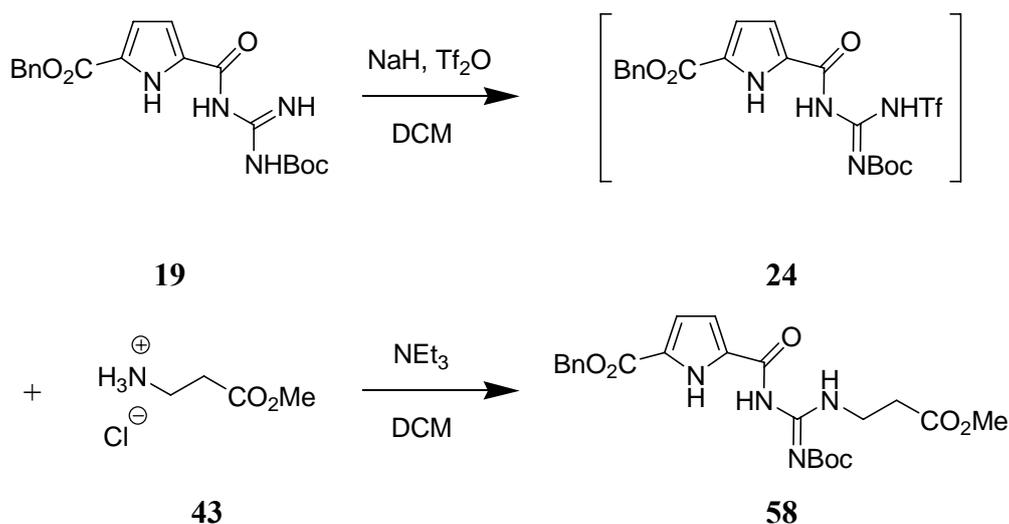
Smp. 142 °C.

R_f 0.84 (Silicagel, 8:5 Hexan/Essigester mit 1 % Triethylamin).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.14 (t, ³J(H,H) = 7.12 Hz, 3 H, CH₃), 1.48 (s, 9H, CH₃), 3.22 (m, 2 H, CH₂), 4.11 (q, 2 H, ³J(H,H) = 7.04 Hz, CH₂), 5.16 (q, 1 H, ³J(H,H) = 6.60 Hz, CH), 5.33 (s, 2 H, CH₂), 6.80 (dd, ³J(H,H) = 2.08 Hz, ⁴J(H,H) = 2.04 Hz, 1 H, CH), 6.86 (dd, ³J(H,H) = 2.16 Hz, ⁴J(H,H) = 2.12 Hz, 1 H, CH), 7.20 – 7.47 (m, 10 H, CH), 8.72 (d, 1 H, ³J(H,H) = 6.92 Hz, NH), 11.86 (brs, 1 H, NH), 12.21 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$	(100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.9 (CH_3), 27.5 (CH_3), 36.7 (CH_2), 54.9 (CH), 61.0, 65.5 (beide CH_2), 83.6 (quat. C), 114.7, 115.8 (beide CH), 125.1 (quat. C) 126.8, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 128.5, 129.3 (alle CH), 135.0, 136.2, 136.3, 151.9, 154.8, 159.8, 169.8, 170.8 (alle quat. C).
FT-IR	(KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 2979 (m), 2948 (w), 1687 (s), 1579 (w), 1488 (s), 1420 (m), 1305 (s), 1282 (s), 1003 (m), 914 (w), 809 (s).
HR-MS	(pos. ESI): m/z : ber.: $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_7^+$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 563.250, gef.: 563.250. ber.: $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{NaO}_7^+$ ($\text{M} + \text{Na}^+$) 585.232, gef.: 585.232.

8.4.16 Darstellung von 5-(*N*-Boc-*N'*-(Propan-3-yl-carbonsäuremethylester)-Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (**58**)



Der Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptor **58** wurde als farbloser Feststoff in 217 mg Ausbeute (46 %) erhalten.

$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_7$ 472.19 g/mol.

Smp. 123 °C.

R_f 0.61 (Silicagel, 8:5 Cyclohexan/Essigester mit 1 % Triethylamin).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.50 (s, 9H, CH_3), 2.69 (t, 2 H, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6.16$ Hz,

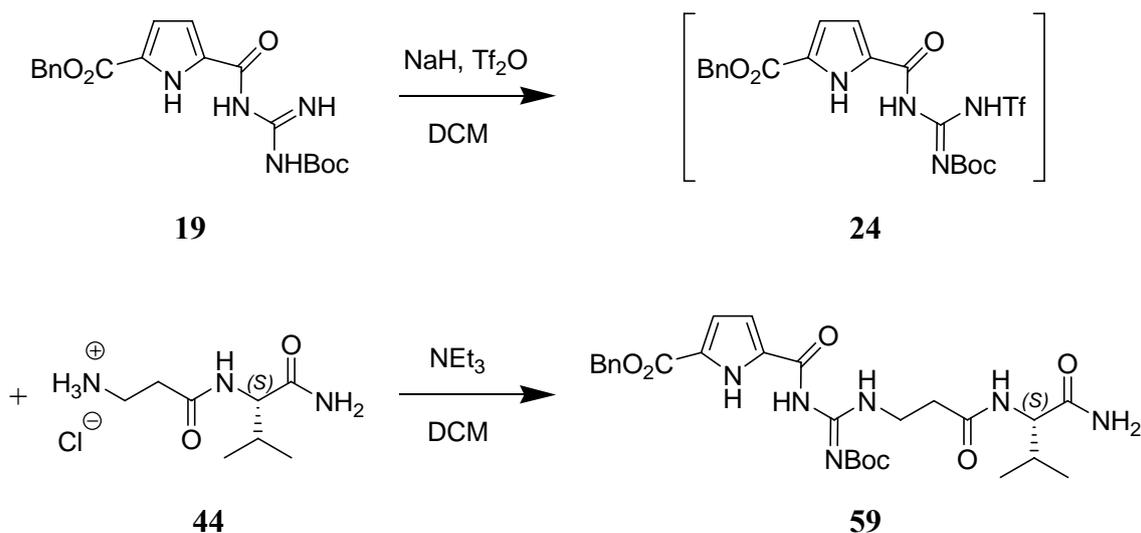
CH₂), 3.71 (s, 3 H, CH₃), 3.82 (q, 2 H, ³J(H,H) = 6.32 Hz, CH₂), 5.33 (s, 2 H, CH₂), 6.88 (dd, ³J(H,H) = 3.92 Hz, ⁴J(H,H) = 2.40 Hz, 1 H, CH), 6.92 (dd, ³J(H,H) = 3.92 Hz, ⁴J(H,H) = 2.68 Hz, 1 H, CH), 7.37 (m, 5 H, CH), 8.86 (t, 1 H, ³J(H,H) = 5.56 Hz, NH), 9.88 (brs, 1 H, NH), 12.17 (s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 28.1 (CH₃), 34.1, 36.9 (beide CH₂), 52.1 (CH₃), 66.5 (CH₂), 83.6 (quat. C), 114.5 116.3 (beide CH), 124.7 (quat. C) 128.4, 128.4, 128.7, 128.8 (alle CH), 134.8, 136.0, 153.2, 156.6, 160.6, 170.4 172.4 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3317 (m), 3298 (s), 2975 (w), 1719 (s), 1674 (s), 1650 (s), 1603 (s), 1545 (s), 1498 (w), 1442 (m), 1365 (m), 1315 (s), 1244 (s), 1194 (m), 1157 (s), 1105 (m), 1021 (s), 822 (s), 770 (s), 758 (s), 732 (s), 695 (s).

HR-MS (pos. ESI): *m/z*: ber.: C₂₃H₂₈N₄NaO₇⁺ (M + Na⁺) 495.185, gef.: 495.186.

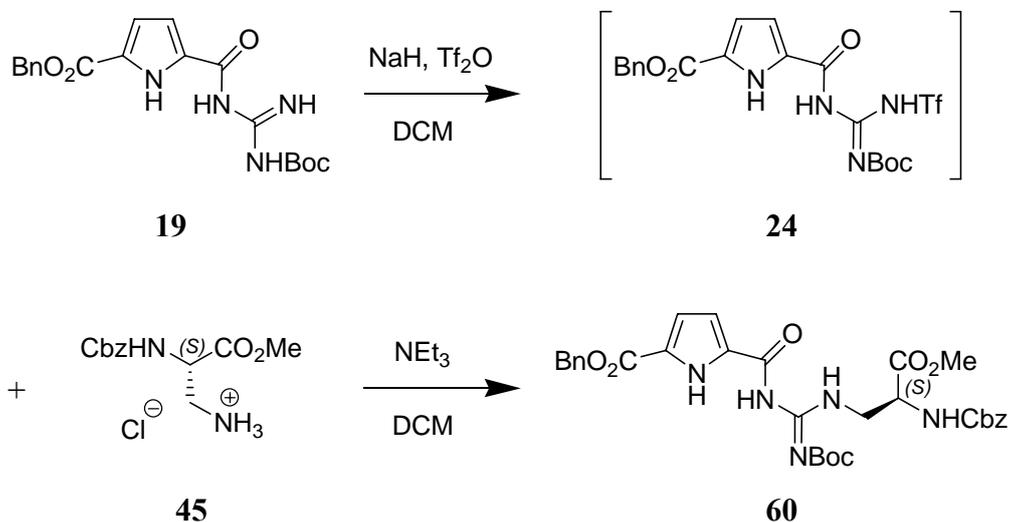
8.4.17 Darstellung von 5-(*N*-Boc-*N'*-(Propan-3-yl-carboxamid-*L*-Valinamid)-Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (59)



Der Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptor **59** wurde als farbloser Feststoff in 234 mg Ausbeute (42 %) erhalten.

C₂₇H₃₆N₆O₇	556.26 g/mol.
Smp.	93 °C.
R_f	0.47 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).
¹H-NMR	(400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.81 (t, ³ J(H,H) = 5.53 Hz, 6 H, CH ₃), 1.47 (s, 9H, CH ₃), 1.95 (m, 1H, CH), 3.03 (q, 2 H, ³ J(H,H) = 7.36 Hz, CH ₂), 3.76 (q, 2 H, ³ J(H,H) = 6.32 Hz, CH ₂), 4.15 (m, 1H, CH), 5.36 (s, 2 H, CH ₂), 6.79 (dd, ³ J(H,H) = 3.92 Hz, ⁴ J(H,H) = 2.40 Hz, 1 H, CH), 6.82 (dd, ³ J(H,H) = 3.92 Hz, ⁴ J(H,H) = 2.68 Hz, 1 H, CH), 7.37 (m, 5 H, CH), 7.45 (s, 2 H, NH ₂), 8.86 (d, 1 H, ³ J(H,H) = 9.08 Hz, NH), 8.78 (t, 1 H, ³ J(H,H) = 5.51 Hz, NH), 11.90 (brs, 1 H, NH), 12.34 (s, 1 H, NH).
¹³C-NMR	(100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 17.9 (CH ₃), 27.6 (CH ₃), 34.4, 37.3 (beide CH ₂), 57.4 (CH), 65.4 (CH ₂), 82.9 (quat. C), 114.4, 115.7 (beide CH), 124.8, 127.8 (beide quat. C) 127.8, 128.0, 128.4 (alle CH), 135.5, 136.3, 151.9, 155.4, 159.8, 169.9, 170.8 (alle quat. C).
FT-IR	(KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] 3400 (w), 3301 (w), 2982 (w), 1717 (m), 1672 (m), 1637 (s), 1620 (s), 1587 (s), 1542 (s), 1478 (m), 1403 (m), 1357 (s), 1290 (s), 1255 (s), 1150 (s), 1034 (w), 1003 (m), 902 (w), 802 (s), 760 (s), 695 (s).
HR-MS	(pos. ESI): <i>m/z</i> : ber.: C ₂₇ H ₃₇ N ₆ O ₇ ⁺ (M + H ⁺) 557.272, gef.: 557.273.

8.4.18 Darstellung von 5-(*N*-Boc-*N'*-(*N*-Cbz-*L*-Alaninylmethylester)-Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (**60**)



Der Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptor **60** wurde als farbloser Feststoff in 261 mg Ausbeute (42 %) erhalten.

C₃₁H₃₅N₅O₉ 621.24 g/mol.

Smp. 134 °C.

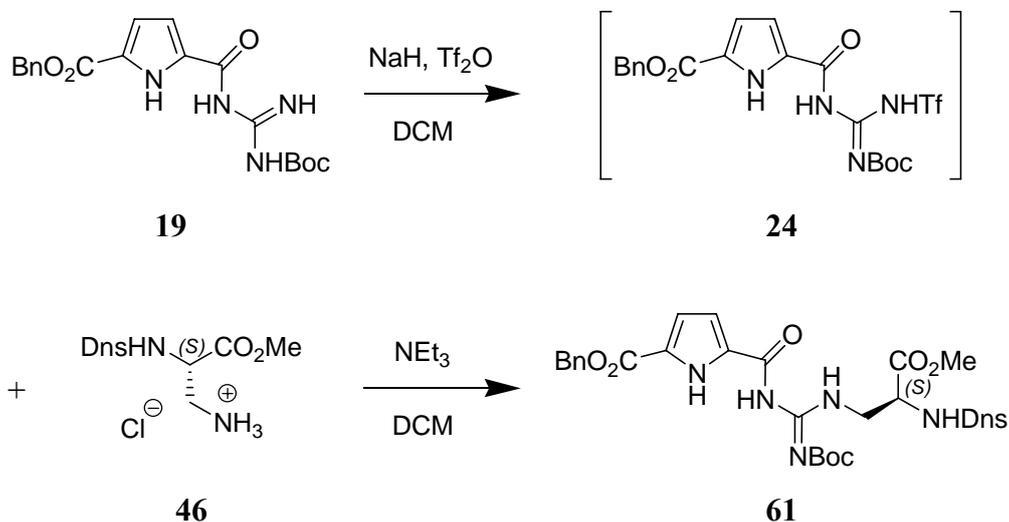
R_f 0.81 (Silicagel, 3:2 Hexan/Essigester mit 1 % Triethylamin).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.49 (s, 9 H, CH₃), 3.28 (m, 2 H, CH₂), 3.63 (s, 3 H, CH₃), 3.65 (m, 1 H, CH), 4.98 (s, 2 H, CH₂), 5.30 (s, 2 H, CH₂), 6.84 (s, 1 H, CH), 6.85 (s, 1 H, CH), 7.27 – 7.48 (m, 10 H, CH), 7.90 (d, ³J(H,H) = 8.45 Hz, 1 H, NH), 8.77 (t, ³J(H,H) = 8.60 Hz, 1 H, NH), 11.75 (s, 1 H, NH), 12.34 (s, 1 H, NH).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3343 (s), 3168 (m), 2362 (w), 1698 (s), 1650 (s), 1560 (s), 1477 (m), 1440 (w), 1287 (s), 1197 (m), 1068 (w), 760 (w).

HR-MS (pos. ESI): *m/z*: ber.: C₃₁H₃₅N₅NaO₉⁺ (M + Na⁺) 644.627, gef.: 644.629.

8.4.19 Darstellung von 5-(*N*-Boc-*N'*-(*N*-Dns-*L*-Alaninylmethylester)-Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (**61**)



Der Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptor **61** wurde als farbloser Feststoff in 274 mg Ausbeute (38 %) erhalten.

$\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$ 720.79 g/mol.

Smp. 118 °C.

R_f 0.73 (Silicagel, 3:2 Hexan/Essigester mit 1 % Triethylamin).

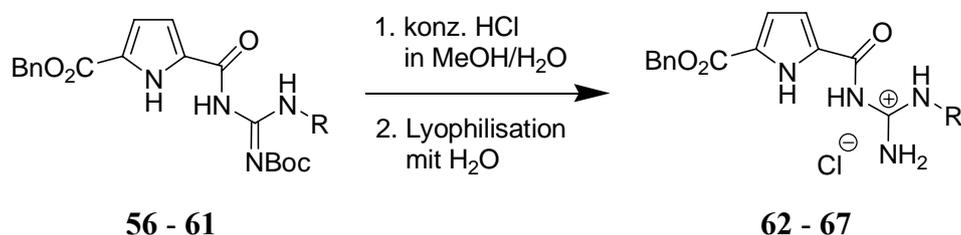
¹H-NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 1.53 (s, 9 H, CH₃), 2.89 (s, 6 H, CH₃), 3.44 (dd, ²J(H,H) = 13.64 Hz, ³J(H,H) = 9.24 Hz, 1 H, CH₂), 3.49 (s, 3 H, CH₃), 3.76 (dd, ²J(H,H) = 13.76 Hz, ³J(H,H) = 5.04 Hz, 1 H, CH₂), 4.48 (q, ³J(H,H) = 4.04 Hz, 1 H, CH), 5.36 (s, 2 H, CH₂), 6.78 (d, ³J(H,H) = 3.92 Hz, 1 H, CH), 6.88 (d, ³J(H,H) = 3.92 Hz, 1 H, CH), 7.15 – 7.23 (m, 2 H, CH), 7.31–7.49 (m, 6 H, CH), 8.04 (dd, ³J(H,H) = 7.20 Hz, ⁴J(H,H) = 1.12 Hz, 1 H, CH), 8.30 (d, ³J(H,H) = 8.72 Hz, 1 H, CH), 8.30 (d, ³J(H,H) = 8.60 Hz, 1 H, CH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 28.0 (CH₃), 45.4 (CH₃), 46.0 (CH₂), 52.4 (CH₃), 54.5 (CH), 65.8 (CH₂), 83.3 (quat. C), 114.9, 115.5, 116.1, 119.4, 123.3 (alle CH), 125.4 (quat. C), 127.9, 128.2, 128.3, 128.4, 128.8, 128.8, (alle CH), 129.1 (quat. C), 129.3 (CH), 129.4 (quat. C), 130.2 (CH), 135.2, 135.5, 136.7, 151.5, 151.7, 155.6, 160.2, 169.7, 170.9 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 3266 (m), 2292 (w), 1719 (s), 1628 (s), 1549 (s), 1249 (s), 1131 (s), 754 (m).

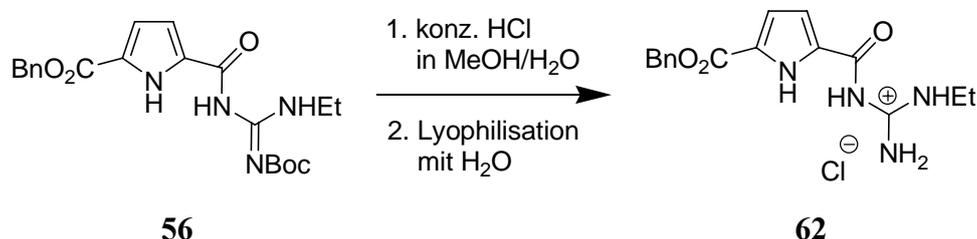
HR-MS (pos. ESI): m/z : ber.: $\text{C}_{35}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}^+$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 721.265, gef.: 721.265.

8.4.20 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der N' -substituierten Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren **62** bis **67** als Hydrochlorid-Salze



Die Entschützung der Boc-Schutzgruppe wurde mit konzentrierter Salzsäure (2 ml) in Methanol (10 ml) durchgeführt. Dazu wurden die Boc-geschützten Verbindungen **56** bis **61** (0.10 mmol) in einer Salzsäure-Lösung bei Raumtemperatur für zwei Stunden gerührt. Nach destillativer Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde diese Prozedur wiederholt. Anschließend wurde der Rückstand zweimal mit Wasser (je 20 ml) lyophilisiert, und man erhielt die meist voluminös-flockigen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren **62** bis **67** als farblose Salze in Ausbeuten von 57 bis 95 %.

8.4.21 Darstellung von 5-(*N'*-Ethyl-Guanidiniocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (**62**)



Der Guanidiniocarbonylpyrrol-Benzylester-Tweezer-Rezeptor **62** wurde als farbloser Feststoff in 33 mg Ausbeute (95 %) erhalten.

$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{ClN}_4\text{O}_3$ 350.80 g/mol.

Smp. > 220 °C.

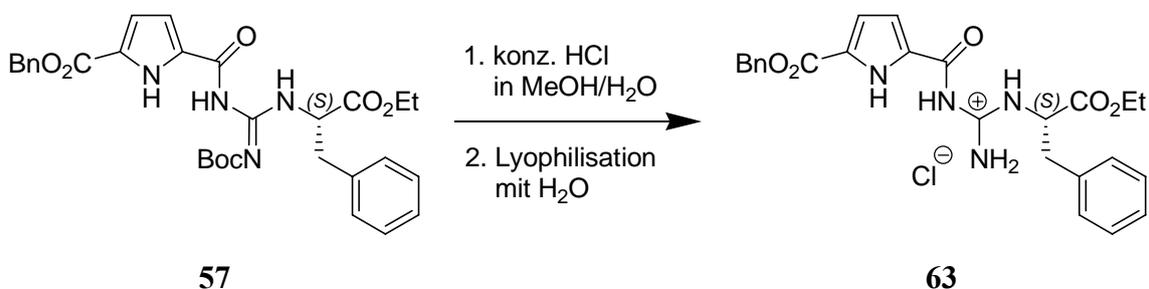
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.17 (t, 3 H, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 7.12$ Hz, CH_3), 3.35 (quin, 2 H, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6.48$ Hz, CH_2), 5.33 (s, 2H, CH_2), 6.94 (dd, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 4.12$ Hz, $^4\text{J}(\text{H,H}) = 2.36$ Hz, 1 H, CH), 7.39 – 7.45 (m, 5 H, CH), 7.56 (dd, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 3.96$ Hz, $^4\text{J}(\text{H,H}) = 2.32$ Hz, 1 H, CH), 8.89 (brs, 1 H, NH), 8.99 (brs, 1 H, NH), 9.43 (t, 1 H, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 5.56$ Hz, NH), 12.06 (s, 1 H, NH). 12.95 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.5 (CH_3), 36.2, 65.9 (beide CH_2), 115.8 116.0 (beide CH), 127.8, 127.9 (beide quat. C), 128.0, 128.1, 128.5, 128.5 (alle CH), 136.0, 153.5, 159.5, 160.0 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 3311 (m), 2931 (w), 2363 (w), 2303 (w), 1731 (m), 1698 (s), 1617 (w), 1581 (m), 1541 (m), 1455 (w), 1365 (w), 1277 (s), 1146 (s), 1004 (m), 818 (w), 762 (s).

HR-MS (pos. ESI): m/z : ber.: $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3^+$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 315.145, gef.: 315.146.

8.4.22 Darstellung von 5-(*N'*-(ethanyl-2-(*L*-ethylbenzol)-carbonsäureethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (**63**)



Der Guanidiniocarbonylpyrrol-Benzylester-Tweezer-Rezeptor **63** wurde als farbloser Feststoff in 28 mg Ausbeute (57 %) erhalten.

$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{ClN}_4\text{O}_5$ 498.96 g/mol.

Smp. > 220 °C.

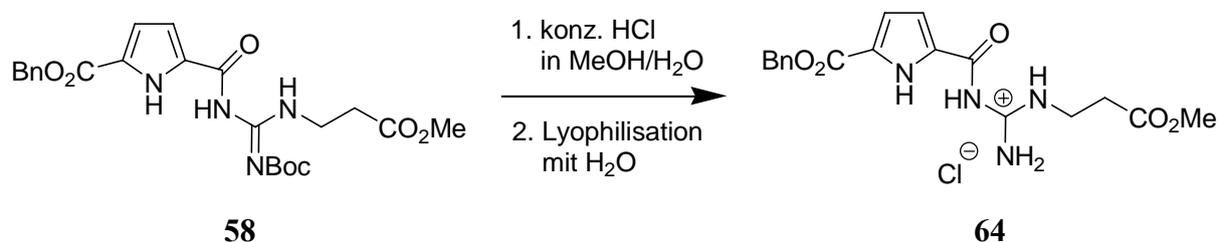
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.21 (t, 3 H, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 7.20$ Hz, CH_3), 3.16 (m, 2 H, CH_2), 3.66 (q, 2 H, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 7.20$ Hz, CH_2), 4.17 (m, 1 H, CH), 5.33 (s, 2 H, CH_2), 6.96 (s, 1 H, CH), 7.00 (s, 1 H, CH), 7.24-7.46 (m, 10 H, CH), 9.12 (brs, 2 H, NH_2), 9.40 (d, 1 H, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8.68$ Hz, NH), 11.76 (brs, 1 H, NH), 12.99 (brs, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 13.9 (CH_3), 36.7 (CH_2), 52.8 (CH), 52.4 (CH_3), 61.7 (CH_2), 65.9 (CH_2), 115.4, 115.8 (beide CH), 126.8, 127. (beide quat. C), 128.0, 128.1, 128.4, 129.1, 129.3 (alle CH), 129.3, 135.9, 157.1, 169.4, 171.6 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 3381 (m), 3240 (m), 2252 (w), 1691 (m), 1622 (s), 1522 (w), 1483 (w), 1396 (w), 1296 (w), 1114 (s), 957 (s), 831 (m), 767 (m).

HR-MS (pos. ESI): m/z : ber.: $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_5^+$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 463.198, gef.: 463.198.

8.4.23 Darstellung von 5-(*N'*-(Propan-3-yl-carbonsäuremethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (**64**)



Der Guanidiniocarbonylpyrrol-Benzylester-Tweezer-Rezeptor **64** wurde als farbloser Feststoff in 34 mg Ausbeute (83 %) erhalten.

$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_5$ 408.12 g/mol.

Smp. > 200 °C.

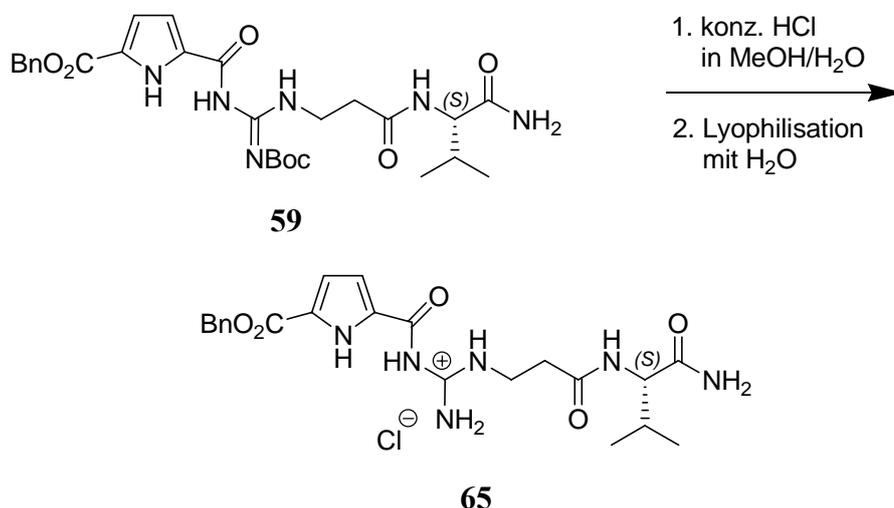
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.71 (t, 2 H, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6.04$ Hz, CH_2), 3.77 (s, 3 H, CH_3), 3.96 (q, 2 H, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6.11$ Hz, CH_2), 5.28 (s, 2 H, CH_2), 6.91 (dd, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 3.72$ Hz, $^4\text{J}(\text{H,H}) = 2.12$ Hz, 1 H, CH), 6.99 (dd, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 3.52$ Hz, $^4\text{J}(\text{H,H}) = 2.38$ Hz, 1 H, CH), 7.25-7.32 (m, 5 H, CH), 8.99 (t, 1 H, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 5.12$ Hz, NH), 11.88 (brs, 1 H, NH), 12.17 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 34.9, 38.9 (beide CH_2), 51.9 (CH_3), 68.5 (CH_2), 112.3, 115.5 (beide CH), 127.8, 128.0, 128.2, 128.7 (alle CH), 138.0, 138.2, 155.2, 157.6, 161.8, 172.4, 175.4 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 3327 (s), 2366 (w), 1701 (s), 1647 (m), 1555 (m), 1475 (m), 1286 (s), 1154 (w), 758 (w), 608 (w).

HR-MS (pos. ESI): m/z : ber.: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{NaO}_5^+$ ($\text{M} + \text{Na}^+$) 396.140, gef.: 396.142.

8.4.24 Darstellung von 5-(*N'*-(Propan-3-yl-carboxamid-*L*-Valinamid)-Guanidiniocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (**65**)



Der Guanidiniocarbonylpyrrol-Benzylester-Tweezer-Rezeptor **65** wurde als farbloser Feststoff in 46 mg Ausbeute (93 %) erhalten.

$C_{22}H_{29}ClN_6O_5$ 492.96 g/mol.

Smp. 118 °C.

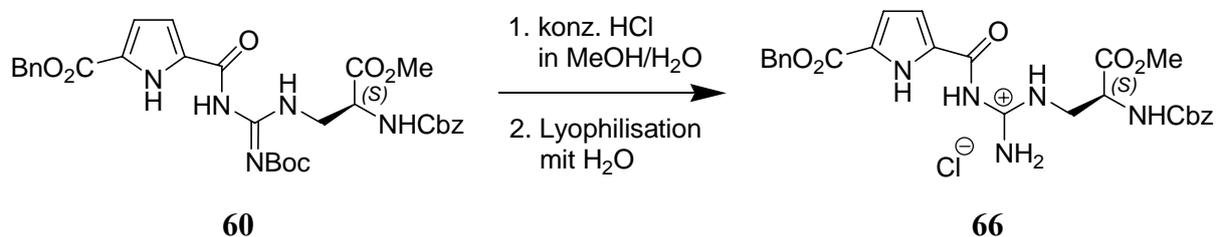
1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 0.84 (t, $^3J(H,H) = 7.23$ Hz, 6 H, CH₃), 2.01 (m, 1 H, CH), 2.60 (t, 2 H, $^3J(H,H) = 6.32$ Hz, CH₂), 3.02 (m, 2 H, CH₂), 4.11 (dd, $^3J(H,H) = 6.28$ Hz, $^3J(H,H) = 8.96$ Hz, 2 H, CH₂), 5.32 (s, 2 H, CH₂), 6.92 (dd, $^3J(H,H) = 4.12$ Hz, $^4J(H,H) = 2.32$ Hz, 1 H, CH), 7.03 (s, 1 H, CH), 7.39-7.45 (m, 5 H, CH), 7.48 (s, 1 H, NH), 7.65 (q, 1 H, $^3J(H,H) = 2.40$ Hz, NH), 8.21 (d, 1 H, $^3J(H,H) = 8.96$ Hz, NH), 9.16 (brs, 2 H, NH₂), 12.30 (s, 1 H, NH), 12.96 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 17.9 (CH₃), 19.3 (CH₃), 30.2 (CH), 45.2 (CH₂), 57.8 (CH), 62.7, 65.8 (beide CH₂), 115.8, 116.1 (beide CH), 127.7, 127.9 (beide quat. C) 128.0, 128.1, 128.5, 128.5, 128.5 (alle CH), 136.0, 153.9, 159.5, 159.7, 170.1, 172.9 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3301 (m), 1697 (m), 1624 (m), 1550 (m), 1278 (s), 1194 (m), 1143 (m), 105 (w), 957 (m), 819 (w), 765 (s), 738 (w), 690 (m).

HR-MS (pos. ESI): m/z : ber.: $C_{22}H_{29}N_6O_5^+$ ($M + H^+$) 457.219, gef.: 457.219.

8.4.25 Darstellung von 5-(*N'*-(*N*-Cbz-*L*-Alaninylmethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (**66**)



Der Guanidiniocarbonylpyrrol-Benzylester-Tweezer-Rezeptor **66** wurde als farbloser Feststoff in 46 mg Ausbeute (82 %) erhalten.

$C_{26}H_{28}ClN_5O_7$ 557.98 g/mol.

Smp. 148 °C.

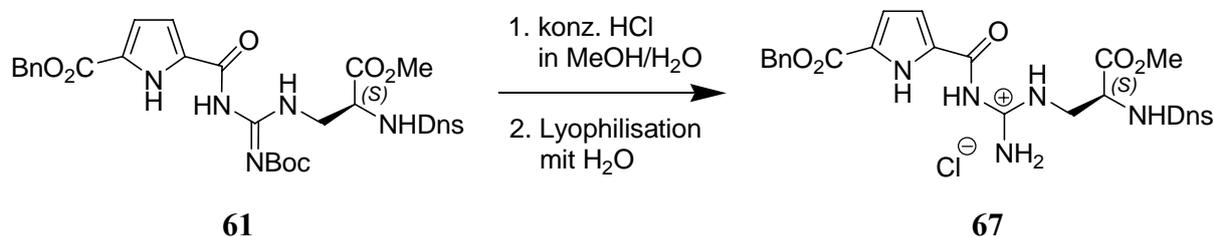
1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.69 (s, 3 H, CH₃), 3.78 (m, 2 H, CH₂), 4.48 (m, 1 H, CH), 5.06 (s, 2 H, CH₂), 5.33 (s, 2 H, CH₂), 6.97 (s, 1 H, CH), 7.08 (s, 1 H, CH), 7.29 – 7.49 (m, 10 H, CH), 7.93 (d, $^3J(H,H) = 7.92$ Hz, 1 H, NH), 8.85 (brs, 2 H, NH₂), 8.99 (s, 1 H, NH), 11.20 (s, 1 H, NH), 12.99 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 41.6 (CH₂), 52.1 (CH), 52.4 (CH₃), 65.9 (CH₂), 65.8 (CH₂), 115.5, 115.9 (beide CH), 127.7, 127.9, 128.0, 128.2, 128.4, 128.5 (alle CH), 136.0, 136.6, 156.2, 159.5, 170.2 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3263 (m), 2253 (w), 1703 (s), 1621 (s), 1527 (s), 1409 (w), 1292 (m), 1204 (m), 1134 (m), 1024 (m), 1001 (m), 961 (m), 827 (m), 756 (m).

HR-MS (pos. ESI): m/z : ber.: $C_{26}H_{29}N_5O_7^+$ ($M + H^+$) 522.198, gef.: 522.198.

8.4.26 Darstellung von 5-(*N'*-(*N*-Dns-*L*-Alaninylmethylester)-Guanidiniocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester-Hydrochlorid (**67**)



Der Guanidiniocarbonylpyrrol-Benzylester-Tweezer-Rezeptor **67** wurde als farbloser Feststoff in 55 mg Ausbeute (84 %) erhalten.

$\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{ClN}_6\text{O}_7\text{S}$ 657.14 g/mol.

Smp. 128 °C (Zersetzung).

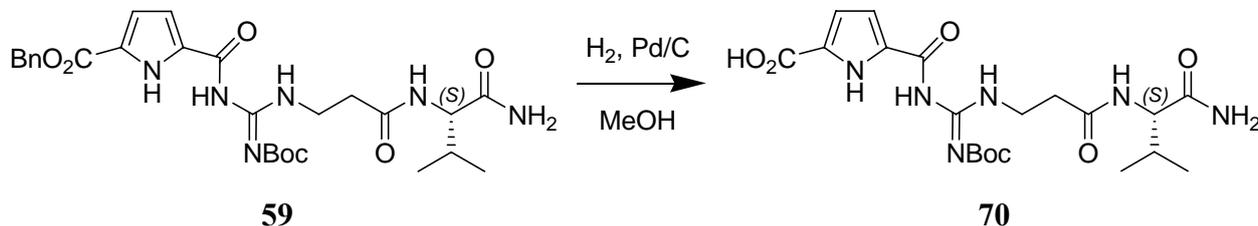
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.76 (s, 6 H, CH₃), 3.19 (s, 3 H, CH₃), 3.62 (m, 2 H, CH₂), 4.15 (m, 1 H, CH), 5.35 (s, 2 H, CH₂), 6.96 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 1.8$ Hz, 1 H, CH), 7.15 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 7.08$ Hz, 1 H, CH), 7.31 – 7.61 (m, 8 H, CH), 8.13 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 7.20$ Hz, 1 H, CH), 8.22 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8.56$ Hz, 1 H, CH), 8.46 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8.56$ Hz, 1 H, CH), 8.72 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 9.36$ Hz, 1 H, CH), 8.93 (brs, 1 H, NH), 9.31 (t, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 5.68$ Hz, 1 H, NH), 11.85 (s, 1 H, NH), 12.93 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 41.9 (CH₂), 45.0 (CH₃), 51.9 (CH₃), 53.9 (CH), 65.9 (CH₂), 115.8, 116.2 (beide CH), 123.6, 127.5 (beide quat. C), 127.9, 128.1, 128.5, 128.9, 129.7, (alle CH), 135.4, 136.0, 154.3, 159.3, 159.5, 169.2 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3281 (m), 2252 (w), 1711 (s), 1622 (s), 1545 (s), 1252 (s), 1139 (s), 955 (s), 816 (w), 764 (m).

HR-MS (pos. ESI): m/z : ber.: $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{NaO}_5^+$ ($\text{M} + \text{Na}^+$) 621.213, gef.: 621.212.

8.4.27 Darstellung von 5-(*N*-Boc-*N'*-(Propan-3-yl-carboxamid-*L*-Valinamid)-Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäure (**70**)



Der Benzylester **59** (153 mg, 0,28 mmol, 1 eq) wurde in Methanol (20 ml) gelöst, mit Pd/C (15 mg, 10 %) versetzt und fünf Stunden unter Wasserstoffatmosphäre stark gerührt. Anschließend wurde die Aktivkohle über Celite abfiltriert, mit Methanol (20 ml) nachgewaschen und das Lösemittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Man erhielt 120 mg (94 %) des Produkts **70** als farblosen Feststoff.

C₂₀H₃₀N₆O₇ 466.49 g/mol.

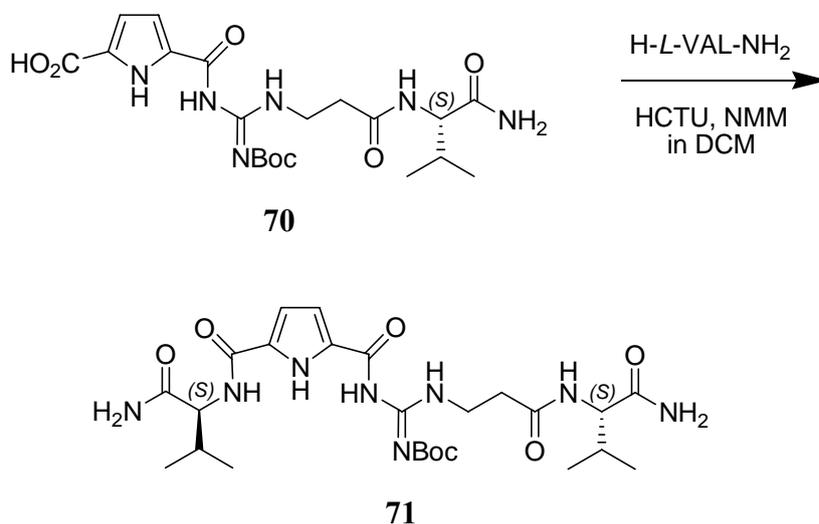
Smp. 98 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.82 (t, ³J(H,H) = 5.41 Hz, 6 H, CH₃), 1.48 (s, 9H, CH₃), 1.94 (m, 1H, CH), 3.36 (q, 2 H, ³J(H,H) = 7.20 Hz, CH₂), 3.76 (q, 2 H, ³J(H,H) = 7.51 Hz, CH₂), 4.14 (m, 1H, CH), 6.61 (d, ³J(H,H) = 3.62 Hz, 1 H, CH), 6.73 (d, ³J(H,H) = 3.78 Hz, 1 H, CH), 7.37 (s, 2 H, NH₂), 7.93 (d, 1 H, ³J(H,H) = 8.88 Hz, NH), 8.72 (t, 1 H, ³J(H,H) = 5.11 Hz, NH), 11.08 (brs, 1 H, NH), 12.42 (s, 1 H, NH).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3315 (m), 2966 (m), 1616 (s), 1540 (s), 1402 (m), 1316 (s), 1209 (m), 1140 (s), 1035 (w), 778 (s).

HR-MS (pos. ESI): *m/z*: ber.: C₂₀H₃₁N₆O₇⁺ (M + H⁺) 467.225, gef.: 467.225.

8.4.28 Darstellung von 5-(*N*-Boc-*N'*-(Propan-3-yl-carboxamid-*L*-Valinamid)-Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäure-*L*-Valinamid (71)

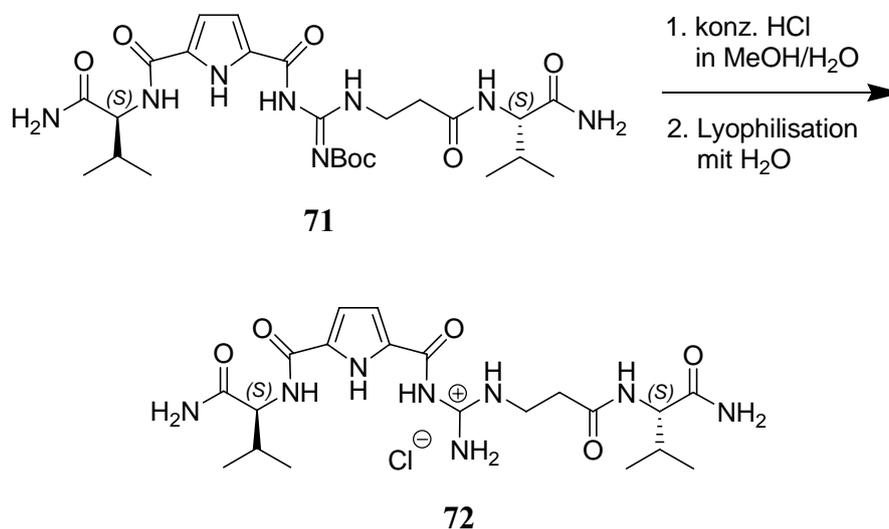


Die Carbonsäure **70** (107 mg, 0.23 mmol, 1 eq) wurde zu einer Lösung von HCTU (114 mg, 0.28 mmol, 1.2 eq) und *N*-Methylmorpholin (38.9 mg, 38.5 μ l, 0.35 mmol, 1.5 eq) in trockenem Dichlormethan (10 ml) mit trockenem Dimethylformamid (2 ml) gegeben und für zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Diese Lösung wurde nun zu einer Lösung von *L*-Valinamid-Hydrochlorid (42.0 mg, 0.28 mmol, 1.2 eq) und *N*-Methylmorpholin (38.9 mg, 38.5 μ l, 0.35 mmol, 1.5 eq) in trockenem Dichlormethan (10 ml) mit trockenem Dimethylformamid (2 ml) langsam zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das organische Lösemittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der erhaltene Rückstand mit Wasser (20 ml) and Essigester (30 ml) aufgenommen. Zur besseren Löslichkeit wurde Ultraschall eingesetzt. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase mit Diethylether (fünfmal 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und schließlich das Lösemittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Die weitere Reinigung des Rohproduktes wurde säulenchromatographisch (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin) durchgeführt, und man erhielt 42 mg der Verbindung **71** als leicht gelblichen Feststoff (33 %).

$C_{25}H_{40}N_8O_7$ 564.63 g/mol.

Smp.	184 °C (Zersetzung).
R_f	0.79 (Silicagel, 3:2 Hexan/Essigester mit 1 % Triethylamin).
¹H-NMR	(400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.83 (t, ³ J(H,H) = 7.44 Hz, 6 H, CH ₃), 0.92 (d, ³ J(H,H) = 7.24 Hz, 6 H, CH ₃), 1.48 (s, 9 H, CH ₃), 1.95 (m, 1 H, CH), 2.06 (m, 1 H, CH), 2.69 (m, 2 H, CH ₂), 3.74 (m, 2 H, CH ₂), 4.16 (m, 1 H, CH), 4.32 (m, 1 H, CH), 6.78 (s, 1 H, CH), 6.79 (s, 1 H, CH), 6.98 (s, 1 H, NH), 7.05 (s, 1 H, NH), 7.95 (d, ³ J(H,H) = 8.96, 1 H, NH), 8.21 (d, ³ J(H,H) = 8.84, 1 H, NH), 8.72 (t, ³ J(H,H) = 5.60, 1 H, NH), 11.84 (s, 1 H, NH), 12.37 (s, 1 H, NH).
¹³C-NMR	(100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 17.8, 18.9, 26.6 (alle CH ₃), 34.8, 36.2 (beide CH ₂), 57.4, 57.9, 65.4 65.9 (alle CH), 82.9 (quat. C), 114.7, 115.8 (beide CH), 135.4, 136.8, 152.5, 157.4, 159.8, 169.9, 170.8 (alle quat. C).
FT-IR	(KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] 3437 (w), 3299 (m), 2961 (w), 1719 (m), 1670 (m), 1619 (s), 1549 (s), 1469 (m), 1405 (m), 1325 (m), 1255 (s), 1227 (w), 1137 (s), 1061 (w), 831 (w), 770 (s), 758 (s).
HR-MS	(pos. ESI): <i>m/z</i> : ber.: C ₂₅ H ₄₀ N ₈ NaO ₇ ⁺ (M + Na ⁺) 587.291, gef.: 587.290.

8.4.29 Darstellung von 5-(*N'*-(Propan-3-yl-carboxamid-*L*-Valinamid)-Guanidiniocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäure-*L*-Valinamid-Hydrochlorid (**72**)



Die Entschützung der Boc-Schutzgruppe wurde mit konzentrierter Salzsäure (2 ml) in Methanol (10 ml) durchgeführt. Dazu wurden die Verbindungen **71** (20.0 mg, 35.5 μ mol) in einer Salzsäure-Lösung bei Raumtemperatur für zwei Stunden gerührt. Nach destillativer Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde diese Prozedur wiederholt. Anschließend wurde der Rückstand zweimal mit Wasser (je 20 ml) lyophilisiert, und man erhielt 13.5 mg des Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptors **72** als farbloses Chloridsalz 76 %.

$C_{20}H_{33}ClN_8O_5$ 500.98 g/mol.

Smp. 178 °C (Zersetzung).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 0.86 (t, $^3J(H,H) = 7.23$ Hz, 6 H, CH₃), 0.88 (d, $^3J(H,H) = 7.21$ Hz, 6 H, CH₃), 2.01 (m, 1 H, CH), 2.09 (m, 1 H, CH), 2.69 (m, 2 H, CH₂), 3.72 (m, 2 H, CH₂), 4.22 (m, 1 H, CH), 4.45 (m, 1 H, CH), 6.77 (s, 1 H, CH), 6.79 (s, 1 H, CH), 7.08 (s, 1 H, NH), 7.12 (s, 1 H, NH), 7.82 (d, $^3J(H,H) = 8.96$, 1 H, NH), 8.44 (d, $^3J(H,H) = 8.89$, 1 H, NH), 8.85 (brs, 2 H, NH₂), 11.23 (s, 1 H, NH), 12.97 (s, 1 H, NH).

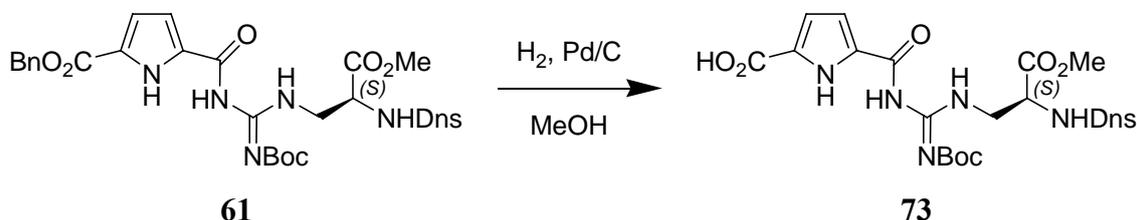
^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 17.5, 18.3, (alle CH₃), 33.8, 36.2 (beide CH₂),

56.1, 56.9, 62.4 65.1 (alle CH), 115.7, 115.9 (beide CH), 134.8, 136.1, 153.3, 156.2, 170.1 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 3531 (w), 3395 (w), 3237 (w), 2969 (w), 2369 (m), 2337 (m), 1657 (s), 1551 (s), 1276 (s), 1200 (s), 1121 (w), 1062 (m), 866 (w), 758 (m).

HR-MS (pos. ESI): m/z : ber.: $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{N}_8\text{O}_5^+$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 465.257, gef.: 465.257.

8.4.30 Darstellung von 5-(*N*-Boc-*N'*-(*N*-Dns-*L*-Alaninylmethylester)-Guanidinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäure (**73**)



Der Benzylester **61** (100 mg, 0,14 mmol, 1 eq) wurde in Methanol (20 ml) gelöst, mit Pd/C (10 mg, 10 %) versetzt und fünf Stunden unter Wasserstoffatmosphäre stark gerührt. Anschließend wurde die Aktivkohle über Celite abfiltriert, mit Methanol (20 ml) nachgewaschen und das Lösemittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Man erhielt 83 mg des Produkts **73** als gelblichen Feststoff (95 %).

C₂₈H₃₄N₆O₉S 630.67 g/mol.

Smp. 138 °C.

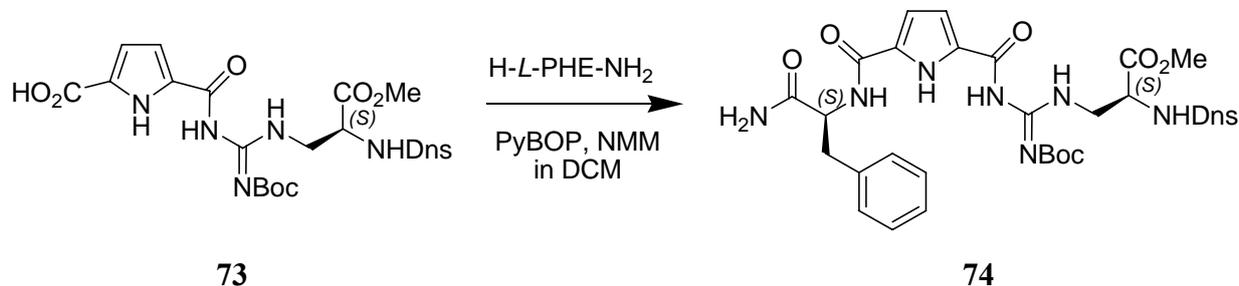
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.48 (s, 9 H, CH₃), 2.84 (s, 6 H, CH₃), 3.09 (m, 1 H, CH₂), 3.46 (s, 3 H, CH₃), 3.69 – 3.74 (m, 1 H, CH₂), 4.34 (m, 1 H, CH), 6.67 (d, ³J(H,H) = 3.64 Hz, 1 H, CH), 6.71 (d, ³J(H,H) = 3.68 Hz, 1 H, CH), 7.20 – 7.28 (m, 2 H, CH), 7.47 (t, ³J(H,H) = 7.56 Hz, 1 H, CH), 7.96 (d, ³J(H,H) = 7.32 Hz, 1 H, CH), 8.20 (d, ³J(H,H) = 8.72 Hz, 1 H, CH), 8.36 (d, ³J(H,H) = 8.00 Hz, 1 H, NH), 8.57 (brs, 1 H, NH), 11.06 (brs, 1 H, NH), 11.68 (s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 27.6 (CH₃), 41.7, (CH₂), 45.1 48.6 (beide CH₃), 52.1 (CH), 82.9 (quat. C), 114.4, 115.2, 126.3, 127.6, (alle CH), 128.7, 128.9 (beide quat. C), 129.0 (CH), 134.3, 134.8, 151.1, 151.4, 155.2, 161.5, 169.4, 170.6, (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3293 (w), 2966 (w), 2306 (w), 1725 (s), 1584 (s), 1545 (m), 1398 (w), 1370 (s), 1277 (s), 1141 (s), 1062 (w), 829 (w), 777 (s), 620 (s).

HR-MS (pos. ESI): *m/z*: ber.: C₂₈H₃₅N₆O₉S⁺ (M + H⁺) 631.218, gef.: 631.219.

8.4.31 Darstellung von 5-(*N*-Boc-*N'*-(*N*-Dns-*L*-Alaninylmethylester)-Guandinocarbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäure-*L*-Phenylalaninamid (**74**)



Die Carbonsäure **73** (50 mg, 79.3. μmol , 1 eq) wurde zu einer Lösung von PyBOP (61.8 mg, 119 μmol , 1.5 eq) und *N*-Methylmorpholin (15.9 mg, 17.4 μl . 159 mmol, 2 eq) in trockenem Dichlormethan (10 ml) gegeben und für fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Diese Lösung wurde nun zu einer Lösung von *L*-Valinamid-Hydrochlorid (31.7 mg, 158 μmol , 2 eq) und *N*-Methylmorpholin (19.9 mg, 21.7 μl . 198 mmol, 2.5 eq) in trockenem Dichlormethan (10 ml) mit trockenem Dimethylformamid (1.5 ml) langsam zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das organische Lösemittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch (RP-18, Wasser/Methanol-Gradient) gereinigt, und man erhielt 36 mg der Verbindung **74** als leicht gelblichen Feststoff (59 %).

C₃₇H₄₄N₈O₉S 776.86 g/mol.

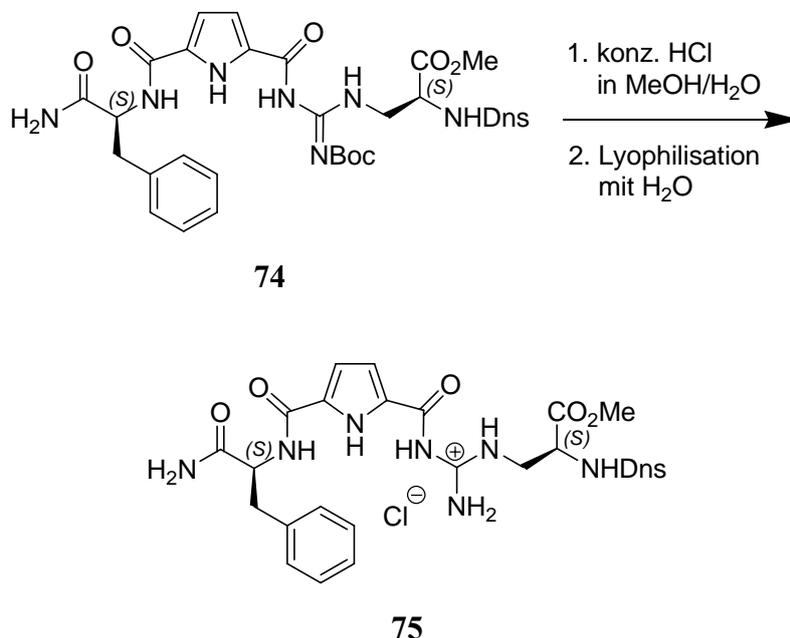
Smp. 182 °C (Zersetzung).

R_f 0.62 (Silicagel, 3:2 Hexan/Essigester mit 1 % Triethylamin).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.48 (s, 9 H, CH₃), 2.85 (s, 6 H, CH₃), 3.01 (m, 2 H, CH₂), 3.08 – 3.14 (m, 1 H, CH₂), 3.46 (s, 3 H, CH₃), 3.62 – 3.68 (m, 1 H, CH₂), 4.35 – 3.38 (m, 1 H, CH), 4.64 – 4.67 (m, 1 H, CH), 6.60 (d, ³J(H,H) = 3.84 Hz, 1 H, CH), 6.73 (d, ³J(H,H) = 3.72 Hz, 1 H, CH), 7.05 – 7.36 (m, 5 H, CH), 7.05 – 7.36 (m, 3 H, NH), 7.46 (t, ³J(H,H) = 7.80 Hz, 1 H, CH), 7.62 (s, 1 H, NH), 7.90 (d, ³J(H,H) = 7.26 Hz, 1 H, CH), 8.20 (d, ³J(H,H) = 8.70 Hz, 1 H, CH), 8.31 (t, ³J(H,H) = 5.76 Hz, 1 H, NH), 8.34 (d, ³J(H,H) = 8.46 Hz, 1 H, CH), 8.56 (d, ³J(H,H) = 8.46 Hz, 1 H, CH), 11.44 (brs, 1 H, NH), 11.58 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$	(150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 27.7 (CH_3), 37.6, 41.7 (beide CH_2), 45.1 52.1 (beide CH_3), 53.9, 54.0 (beide CH), 82.9 (quat. C), 113.0, 114.2, 115.1, 119.0, 122.8, 126.3, 127.6, 128.1, 128.1 (alle CH), 128.7, 129.0 (beide quat. C), 129.1, 129.1, 129.2 (CH), 129.5 (quat. C), 129.7 (CH), 132.8, 134.7, 138.3, 151.1, 151.3, 154.9, 159.2, 169.7, 170.6, 173.3 (alle quat. C).
FT-IR	(KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 3295 (m), 2970 (w), 1718 (s), 1674 (s), 1649 (s), 1602 (s), 1545 (s), 1442 (m), 1409 (m), 1365 (s), 1314 (s), 1232 (s), 1157 (s), 1092 (m), 1022 (m), 849 (m), 819 (m), 767 (s), 730 (m), 694 (m).
HR-MS	(pos. ESI): m/z : ber.: $\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{N}_8\text{NaO}_9\text{S}^+$ ($\text{M} + \text{Na}^+$) 799.284, gef.: 799.284.

8.4.32 Darstellung von 5-(*N'*-(*N*-Dns-*L*-Alaninylmethylester)-Guanidinio-carbonyl)-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäure-*L*-Phenylalaninamid-Hydrochlorid (75)



Die Entschützung der Boc-Schutzgruppe wurde mit konzentrierter Salzsäure (2 ml) in Methanol (10 ml) durchgeführt. Dazu wurden die Verbindungen **74** (8.00 mg, 10.3 μmol) in einer Salzsäure-Lösung bei Raumtemperatur für zwei Stunden gerührt. Nach destillativer Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde diese Prozedur wiederholt.

Anschließend wurde der Rückstand zweimal mit Wasser (je 20 ml) lyophilisiert, und man erhielt 6.00 mg des Guanidiniocarbonylpyrrol-Tweezer-Rezeptors **75** als gelbliches Chloridsalz 82 %.

$C_{32}H_{37}ClN_8O_7S$ 713.20 g/mol.

Smp. 191 °C (Zersetzung).

1H -NMR (600 MHz, MeOH- d_3) δ 2.79 (s, 6 H, CH₃), 3.03 (m, 1 H, CH₂), 3.14 – 3.16 (m, 1 H, CH), 3.22 (s, 3 H, CH₃), 3.24 – 3.28 (m, 1 H, CH₂), 3.52 – 3.58 (m, 1 H, CH₂), 3.68 – 3.73 (m, 1 H, CH₂), 4.20 – 4.26 (m, 1 H, CH), 6.90 (d, $^3J(H,H) = 3.72$ Hz, 1 H, CH), 6.97 (d, $^3J(H,H) = 3.90$ Hz, 1 H, CH), 7.11 – 7.31 (m, 5 H, CH), 7.11 – 7.31 (m, 3 H, NH), 8.21 (d, $^3J(H,H) = 6.06$ Hz, 1 H, CH), 8.30 (d, $^3J(H,H) = 8.70$ Hz, 1 H, CH), 8.42 (d, $^3J(H,H) = 8.10$ Hz, 1 H, CH), 8.51 (d, $^3J(H,H) = 8.46$ Hz, 1 H, CH), 8.60 (brs, 1 H, NH), 9.04 (brs, 1 H, NH), 12.15 (s, 1 H, NH).

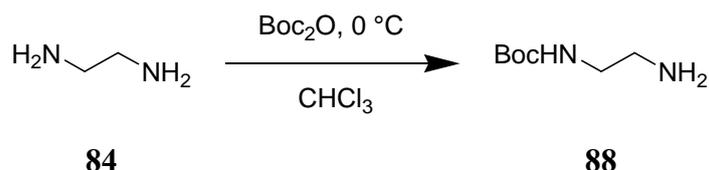
^{13}C -NMR (150 MHz, MeOH- d_3) δ 38.9, 43.5 (beide CH₂), 45.6 52.7 (beide CH₃), 55.5, 55.9 (beide CH), 113.6, 115.6, 116.3, 120.2, 124.2 (alle CH), 126.9 (quat. C), 127.7, 129.1, 129.3, 130.1, 130.5, (alle CH), 130.7, 130.8 (beide quat. C), 131.5 (CH), 133.5, 136.4, 138.5, 152.6, 156.1, 161.3, 161.5, 170.3, 176.2 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3371 (m), 3281 (s), 2251 (w), 1675 (s), 1623 (s), 1550 (m), 1440 (w), 1261 (s), 1132 (s), 1014 (w), 956 (s), 798 (s), 764 (s), 672 (s).

HR-MS (pos. ESI): m/z : ber.: $C_{32}H_{37}N_8O_7S^+$ ($M + H^+$) 677.250, gef.: 677.250.
ber.: $C_{32}H_{36}N_8NaO_7S^+$ ($M + Na^+$) 699.232, gef.: 699.232.

8.5 Synthese der Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskationen

8.5.1 Darstellung von *N*-Boc-1,2-Diaminoethan (**88**)



1,2-Diaminoethan (**84**) (6.01 g, 6.67 ml, 0.10 mol, 5 eq) wurde in Chloroform (75 ml) bei 0 °C vorgelegt und stark gerührt. Boc-Anhydrid (4.37 g, 20.0 mmol, 1 eq) wurde in Chloroform (20 ml) gelöst und innerhalb von einer Stunde zugetropft und anschließend über Nacht gerührt. Der ausgefallene weiße, milchige Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat unter vermindertem Druck eingeeengt und mit Essigester (75 ml) aufgenommen. Anschließend wurde die organische Phase mit Brine (zweimal 20 ml) gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen mit Essigester (15 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösemittel unter vermindertem Druck abdestilliert, und man erhielt 3.16 g des klaren, leicht viskosen Öls *N*-Boc-1,2-Diaminoethan (**88**) (99 %).

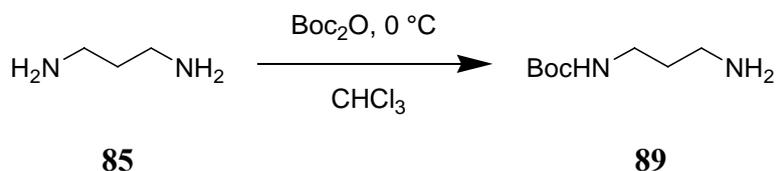
C₇H₁₆N₂O₂ 160.21 g/mol.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.37 (s, 9 H, CH₃), 2.52 (t, ³J(H,H) = 6.44 Hz, 2 H, CH₂), 2.90 (q, ³J(H,H) = 6.28 Hz, 2 H, CH₂), 6.72 (brs, 1 H, NH), NH₂ fehlt.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 28.2 (CH₃), 41.6, 43.7 (beide CH₂), 77.3, 155.7 (beide quat. C).

FT-IR (Nujol): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3363 (m), 2923 (s), 2723 (w), 1695 (m), 1516 (w), 1458 (s), 1377 (s), 1172 (m), 965 (w), 724 (w).

8.5.2 Darstellung von *N*-Boc-1,3-Diaminopropan (**89**)



1,3-Diaminopropan (**85**) (29.7 g, 33,7 ml, 0.40 mol, 5 eq) wurde in Chloroform (300 ml) bei 0 °C vorgelegt und stark gerührt. Boc-Anhydrid (17.5 g, 80.0 mmol, 1 eq) wurde in Chloroform (75 ml) gelöst und innerhalb von vier Stunden zugetropft und anschließend über Nacht gerührt. Der ausgefallene weiße, milchige Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat unter vermindertem Druck eingengt und mit Essigester (300 ml) aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung mit Brine (zweimal 80 ml) gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen mit Essigester (50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösemittel unter vermindertem Druck abdestilliert, und man erhielt 13.7 g eines leicht gelblich viskosen Öls (98 %) von *N*-Boc-1,3-Diaminopropan (**89**).

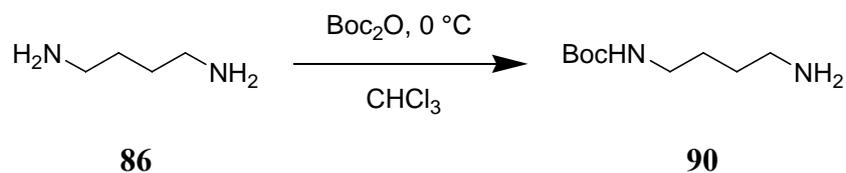
C₈H₁₈N₂O₂ 174.24 g/mol.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.37 (s, 9 H, CH₃), 1.43 (t, ³J(H,H) = 6.80 Hz, 2 H, CH₂), 2.51 (t, ³J(H,H) = 6.78 Hz, 2 H, CH₂), 2.95 (q, ³J(H,H) = 6.20 Hz, 2 H, CH₂), 6.76 (brs, 1 H, NH), NH₂ fehlt.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 28.3 (CH₃), 33.4, 37.7, 39.1 (alle CH₂), 77.3, 155.7 (beide quat. C).

FT-IR (Nujol): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3362 (m), 2923 (s), 2724 (w), 1695 (m), 1515 (w), 1455 (s), 1376 (s), 1172 (m), 724 (w).

8.5.3 Darstellung von *N*-Boc-1,4-Diaminobutan (**90**)



1,4-Diaminobutan (**86**) (44.1 g, 0.50 mol, 5 eq) wurde in Chloroform (300 ml) bei 0 °C vorgelegt und stark gerührt. Boc-Anhydrid (21.9 g, 0.10 mmol, 1 eq) wurde in Chloroform (75 ml) gelöst und innerhalb von vier Stunden zugetropft und anschließend über Nacht gerührt. Der ausgefallene weiße, milchige Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat unter vermindertem Druck eingengt und mit Essigester (300 ml) aufgenommen. Anschließend wurde die organische Phase mit Brine (zweimal 80 ml) gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen mit Essigester (50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösemittel unter vermindertem Druck abdestilliert, und man erhielt 18.7 g eines leicht gelblichen viskosen Öls (99 %) von *N*-Boc-1,4-Diaminobutan (**90**), welches bei -15 °C weiß und wachsartig wurde.

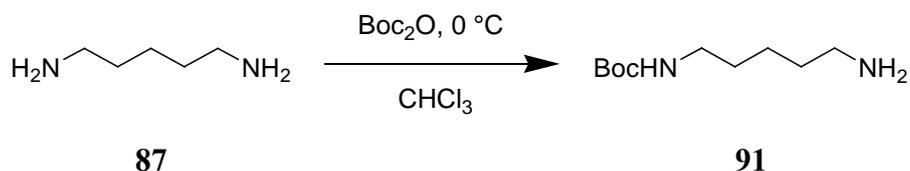
C₉H₂₀N₂O₂ 188.27 g/mol.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.30 (m, 4 H, CH₂), 1.37 (s, 9 H, CH₃), 2.49 (m, 2 H, CH₂), 2.88 (m, 2 H, CH₂), 6.75 (brs, 1 H, NH), NH₂ fehlt.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 27.1 (CH₂), 28.3 (CH₃), 30.6, 39.9, 41.4 (alle CH₂), 77.3, 155.6 (beide quat. C).

FT-IR (Nujol): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3354 (m), 2923 (s), 1694 (m), 1518 (w), 1456 (s), 1377 (s), 1172 (m), 724 (w).

8.5.4 Darstellung von *N*-Boc-1,5-Diaminopentan (**91**)



1,5-Diaminopentan (**87**) (7.25 g, 8,33 ml, 70.9. mmol, 5 eq) wurde in Chloroform (50 ml) bei 0 °C vorgelegt und stark gerührt. Boc-Anhydrid (3.10 g, 14.2 mmol, 1 eq) wurde in Chloroform (10 ml) gelöst und innerhalb von vier Stunden zugetropft und anschließend über Nacht gerührt. Der ausgefallene weiße, milchige Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat unter vermindertem Druck eingeeengt und mit Essigester (50 ml) aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung mit Brine (zweimal 15 ml) gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen mit Essigester (10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösemittel unter vermindertem Druck abdestilliert, und man erhielt 2.64 g eines leicht gelblich viskosen Öls (92 %) von *N*-Boc-1,5-Diaminopentan (**91**), welches bei -15 °C weiß und wachsartig wurde.

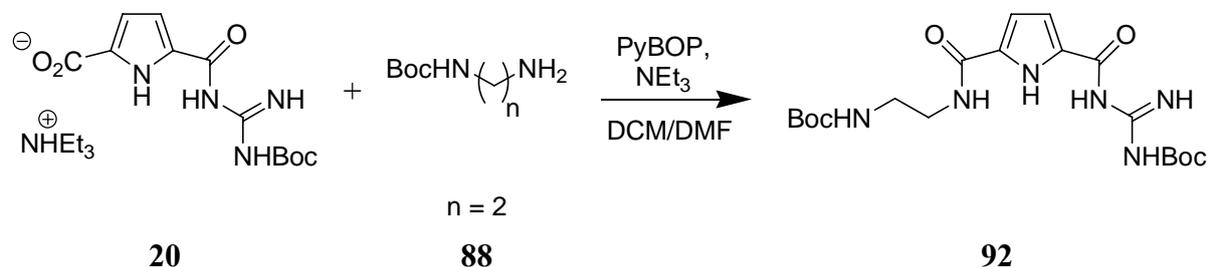
C₁₀H₂₂N₂O₂ 202.29 g/mol.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.24 (m, 2 H, CH₂), 1.28 (m, 4 H, CH₂), 1.37 (s, 9 H, CH₃), 2.50 (m, 2 H, CH₂), 2.89 (m, 2 H, CH₂), 6.75 (brs, 1 H, NH), NH₂ fehlt.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 23.8 (CH₂), 28.3 (CH₃), 29.5, 33.1, 39.9, 41.7 (alle CH₂), 77.3, 155.6 (beide quat. C).

FT-IR (Nujol): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3372 (m), 2921 (s), 2723 (w), 1712 (m), 1459 (s), 1377 (s), 1169 (w), 724 (w).

8.5.6 Darstellung des di-Boc-geschützten Guanidinocarbonylpyrrol-Biskations **92**



Das di-Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskation **92** wurde als farbloser Feststoff in 275 mg Ausbeute (63 %) erhalten.

$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_6$ 438.48 g/mol.

Smp. 128 °C.

R_f 0.75 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).

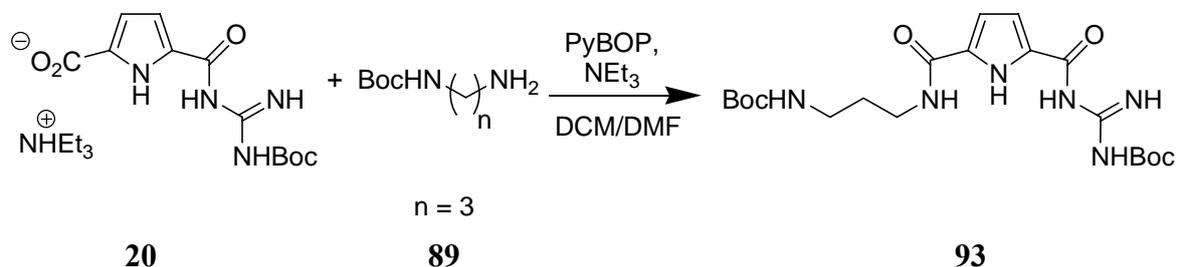
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.37 (s, 9 H, CH₃), 1.46 (s, 9 H, CH₃), 3.07 (q, ³J(H,H) = 6.20 Hz, 2 H, CH₂), 3.25 (q, ³J(H,H) = 6.16 Hz, 2 H, CH₂), 6.76 (s, 1 H, CH), 6.81 (s, 1 H, CH), 6.87 (t, ³J(H,H) = 5.56 Hz, 1 H, NH), 8.35 (t, ³J(H,H) = 5.40 Hz, 1 H, NH), 8.56 (brs, 1 H, NH), 9.32 (brs, 1 H, NH), 10.83 (brs, 1 H, NH), 11.26 (brs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 27.8, 28.2 (beide CH₃), 38.9, 39.7 (beide CH₂), 78.0 (quat. C), 112.0, (CH), 156.0, 158.8, 160.1 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3312 (m), 2976 (m), 2930 (m), 2352 (w), 2314 (w), 1694 (s), 1622 (s), 1541 (s), 1457 (m), 1366 (m), 1267 (s), 1241 (s), 1146 (s), 1047 (w), 839 (m), 753 (m).

HR-MS (pos. ESI): *m/z*: ber.: $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_6^+$ ($\text{M} + \text{H}^+$) 439.2299, gef.: 439.2299; ber.: $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{NaO}_6^+$ ($\text{M} + \text{Na}^+$) 461.2119, gef.: 461.2117.

8.5.7 Darstellung des di-Boc-geschützten Guanidinocarbonylpyrrol-Biskations **93**



Das di-Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskation **93** wurde als farbloser Feststoff in 281 mg Ausbeute (62 %) erhalten.

C₂₀H₃₂N₆O₆ 452.50 g/mol.

Smp. 117 °C.

R_f 0.79 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).

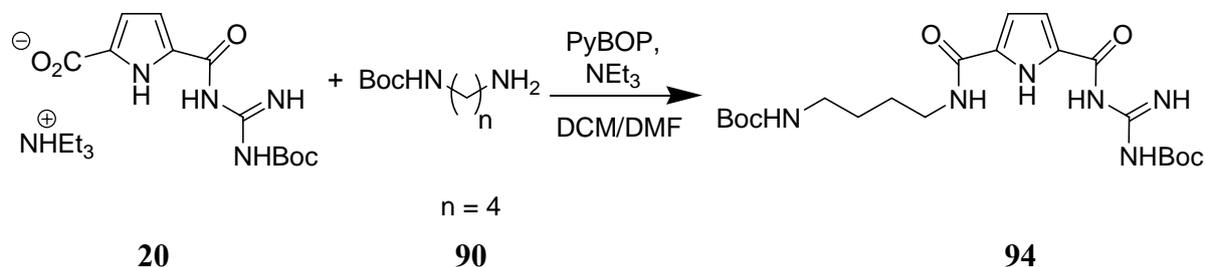
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.37 (s, 9 H, CH₃), 1.46 (s, 9 H, CH₃), 1.60 (quin, ³J(H,H) = 6.96 Hz, 2 H, CH₂), 2.96 (q, ³J(H,H) = 6.72 Hz, 2 H, CH₂), 3.21 (q, ³J(H,H) = 6.68 Hz, 2 H, CH₂), 6.75 (d, ³J(H,H) = 2.00 Hz, 1 H, CH), 6.76 (d, ³J(H,H) = 1.76 Hz, 1 H, CH), 6.79 (t, ³J(H,H) = 5.28 Hz, 1 H, NH), 8.29 (t, ³J(H,H) = 5.68 Hz, 1 H, NH), 8.56 (brs, 1 H, NH), 9.31 (brs, 1 H, NH), 10.84 (brs, 1 H, NH), 11.23 (brs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 27.7, 28.2 (beide CH₃), 29.6, 36.4, 37.7 (alle CH₂), 77.5 (quat. C), 111.6 (CH), 155.6, 158.4, 159.6, (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3312 (m), 2931 (m), 2364 (w), 2319 (w), 1693 (s), 1617 (s), 1540 (s), 1455 (w), 1366 (m), 1304 (s), 1267 (s), 1244 (s), 1148 (s), 1059 (w), 863 (m).

HR-MS (pos. ESI): *m/z*: ber.: C₂₀H₃₃N₆O₆⁺ (M + H⁺) 453.246, gef.: 453.246;

8.5.8 Darstellung des di-Boc-geschützten Guanidinocarbonylpyrrol-Biskations 94



Das di-Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskation **94** wurde als farbloser Feststoff in 317 mg Ausbeute (68 %) erhalten.

C₂₁H₃₄N₆O₆ 466.53 g/mol.

Smp. 103 °C.

R_f 0.81 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).

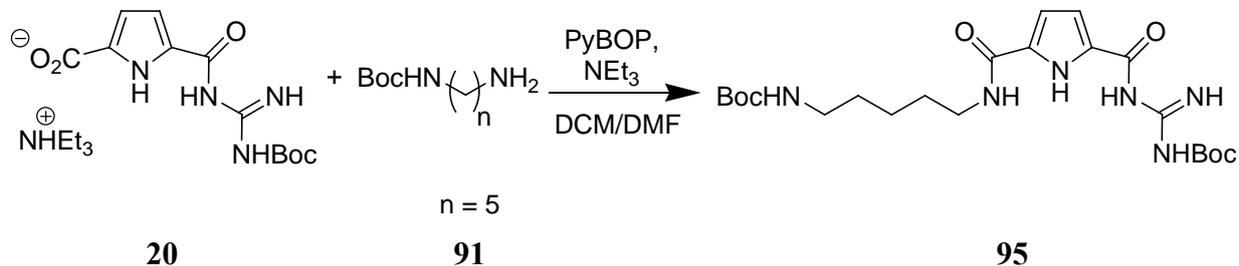
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.36 (s, 9 H, CH₃), 1.37 – 1.44 (m, 4 H, CH₂), 1.46 (s, 9 H, CH₃), 2.93. (q, ³J(H,H) = 6.08 Hz, 2 H, CH₂), 3.21 (q, ³J(H,H) = 5.80 Hz, 2 H, CH₂), 6.76 (d, ³J(H,H) = 3.92 Hz, 1 H, CH), 6.78 (m, 1 H, NH), 6.81 (d, ³J(H,H) = 3.22 Hz, 1 H, CH), 8.29 (t, ³J(H,H) = 5.56 Hz, 1 H, NH), 8.56 (s, 1 H, NH), 9.31 (s, 1 H, NH), 10.86 (brs, 1 H, NH), 11.26 (brs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26.5, 27.0 (beide CH₂), 27.8, 28.2 (beide CH₃), 38.4, 39.6 (beide CH₂), 77.3 (quat. C), 111.6, 113.7 (beide CH), 155.6, 158.4, 159.5 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3359 (m), 3279 (m), 2970 (m), 2930 (m), 1684 (s), 1625 (s), 1522 (s), 1456 (m), 1292 (s), 1239 (s), 1146 (s), 1040 (w), 841 (m), 755 (m).

HR-MS (pos. ESI): *m/z*: ber.: C₂₁H₃₅N₆O₆⁺ (M + H⁺) 467.261, gef.: 467.261;

8.5.9 Darstellung des di-Boc-geschützten Guanidinocarbonylpyrrol-Biskations **95**



Das di-Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskation **95** wurde als farbloser Feststoff in 356 mg Ausbeute (74 %) erhalten.

$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_6$ 480.56 g/mol.

Smp. 92 °C.

R_f 0.82 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).

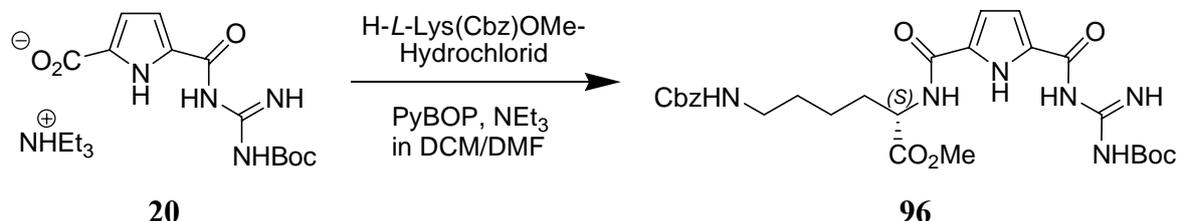
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.27 (m, 2 H, CH₂), 1.36 (s, 9 H, CH₃), 1.39 (m, 2 H, CH₂), 1.46 (s, 9 H, CH₃), 1.48 (m, 2 H, CH₂), 2.89 (q, ³J(H,H) = 6.20 Hz, 2 H, CH₂), 3.20 (q, ³J(H,H) = 6.08 Hz, 2 H, CH₂), 6.74 (d, ³J(H,H) = 4.28 Hz, 1 H, CH), 6.76 (d, ³J(H,H) = 3.80 Hz, 1 H, CH), 6.81 (brs, 1 H, NH), 8.27 (t, ³J(H,H) = 5.04 Hz, 1 H, NH), 8.56 (brs, 1 H, NH), 9.31 (brs, 1 H, NH), 10.85 (brs, 1 H, NH), 11.17 (brs, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 23.7 (CH₂), 27.8, 28.2 (alle CH₃), 28.8, 29.2, 38.6, 39.7 (alle CH₂), 77.3 (quat. C), 111.6 (CH), 155.6, 159.4, (beide quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3005 (w), 2965 (w), 2930 (w), 2336 (m), 1689 (s), 1631 (s), 1525 (s), 1455 (m), 1366 (m), 1241 (s), 1146 (s), 843 (m), 757 (m).

HR-MS (pos. ESI): *m/z*: ber.: C₂₂H₃₇N₆O₆⁺ (M + H⁺) 481.277, gef.: 481.277.

8.5.10 Darstellung des Lysin(Cbz)-Boc-geschützten Guanidinocarbonylpyrrol-Biskations **96**



Die Carbonsäure **20** (199 mg, 0.50 mmol, 1 eq) wurde zu einer Lösung von PyBOP (520 mg, 1.00 mmol, 2 eq) und Triethylamin (139 μl , 1.00 mmol, 2 eq) in trockenem Dichlormethan (15 ml) mit trockenem Dimethylformamid (2 ml) gegeben und für fünfzehn Minuten gerührt. Die leicht gelbe Suspension wurde nun zu einer Lösung von H-Lys(Cbz)OMe-Hydrochlorid (331 mg, 1.00 mmol, 2 eq) und Triethylamin (139 μl , 1.00 mmol, 2 eq) in trockenem Dichlormethan (15 ml) mit trockenem Dimethylformamid (2 ml) langsam zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das organische Lösemittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der erhaltene Rückstand mit Wasser (30 ml) and Diethylether (45 ml) aufgenommen. Zur besseren Löslichkeit wurde Ultraschall eingesetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit Diethylether (fünfmal 45 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und schließlich das Lösemittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Die weitere Reinigung des Rohproduktes wurde mittels Säulenchromatographie (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin) durchgeführt, und man erhielt 246 mg der Verbindung **96** als farblosen Feststoff (86 %).

$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_8$ 572.61 g/mol.

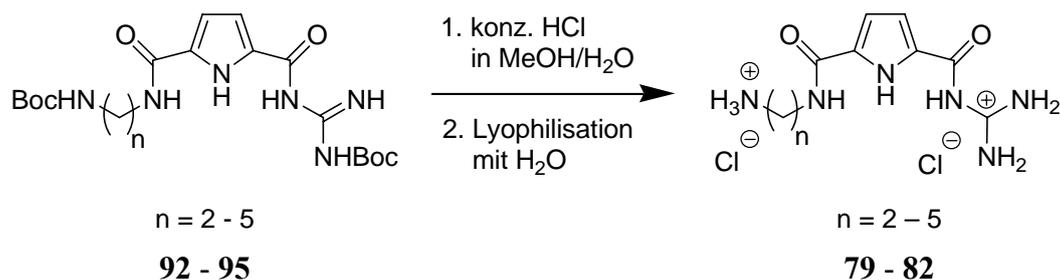
Smp. 89 °C.

R_f 0.71 (Silicagel, 3:2 Dichlormethan/Aceton mit 1 % Triethylamin).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.30 – 1.48 (m, 4 H, CH₂), 1.46 (s, 9 H, CH₃), 1.75 (m, 2 H, CH₂), 2.99 (q, ³J(H,H) = 6.16 Hz, 2 H, CH₂), 3.64 (s, 3 H, CH₃), 4.38 (q, ³J(H,H) = 5.56 Hz, 1 H, CH), 4.99 (s, 2 H, CH₂), 6.84 (s, 2 H, CH), 7.23 (t, ³J(H,H) = 5.68 Hz, 1 H, NH), 7.29 – 7.37 (m, 5 H, CH), 8.58 (s, 1 H, NH), 8.59 (s, 1 H, NH), 9.37 (brs, 1 H, NH), 10.79 (brs, 1 H,

	NH), 11.31 (brs, 1 H, NH).
¹³C-NMR	(100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 22.9 (CH ₂), 27.7 (CH ₃), 28.9, 30.5, 40.0 (alle CH ₂), 51.9 (CH ₃), 52.2 (CH), 65.1 (CH ₂), 112.9, 113.6 (beide CH), 127.7, 127.7, 128.3 (alle CH), 137.3, 156.1, 158.4, 159.7, 172.7 (alle quat. C).
FT-IR	(KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] 3312 (m), 2869 (m), 2372 (w), 2307 (w), 1734 (m), 1693 (s), 1635 (m), 1540 (s), 1457 (w), 1302 (m), 1240 (s), 1147 (s), 841 (m), 754 (m).
HR-MS	(pos. ESI): <i>m/z</i> : ber.: C ₂₇ H ₃₇ N ₆ O ₈ ⁺ (M + H ⁺) 573.267, gef.: 573.267.

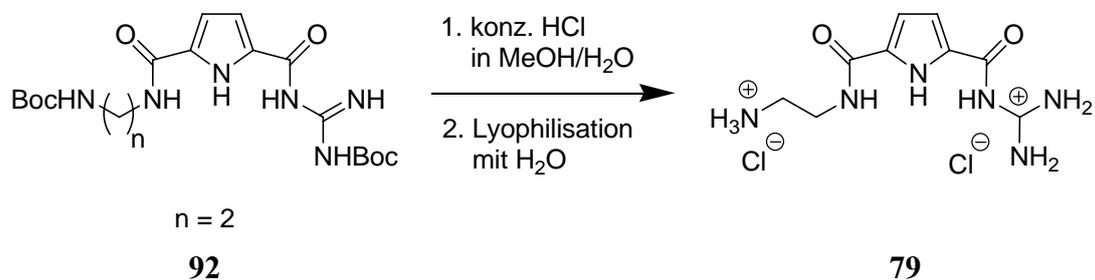
8.5.11 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskationen **79** bis **82**



Die Entschützung der Boc-Schutzgruppen wurde mit konzentrierter Salzsäure (2 ml) in Methanol (10 ml) durchgeführt. Dazu wurden die di-Boc-geschützten Biskationen **92 - 95** (0.50 mmol) in Salzsäurelösung bei Raumtemperatur für zwei Stunden gerührt. Nach destillativer Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde diese Prozedur wiederholt. Anschließend wurde der Rückstand, ein meist an der Kolbeninnenwand klebender durchsichtiger Film, zweimal mit Wasser (je 20 ml) lyophilisiert und man erhielt die Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskationen **79 - 82** als farblose Salze in Ausbeuten von 95 % bis quantitativ.

8.5.12 Darstellung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskations

79



Das Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskation **79** wurde als farbloser Feststoff in 81 mg Ausbeute (52 %) erhalten.

C₉H₁₆Cl₂N₆O₂ 311.17 g/mol.

Smp. > 210 °C (Zersetzung).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.98 (m, 2 H, CH₂), 3.50 (q, ³J(H,H) = 5.68 Hz, 2 H, CH₂), 6.92 (d, ³J(H,H) = 2.28 Hz, 1 H, CH), 7.06 (s, 1 H, NH), 7.56 (s, 1 H, CH), 8.06 (brs, 3 H, NH₃), 8.48 (brs, 2 H, NH₂), 8.67 (brs, 2 H, NH₂), 8.83 (t, ³J(H,H) = 5.04 Hz, 1 H, NH), 12.10 (s, 1 H, NH), 12.35 (s, 1 H, NH).

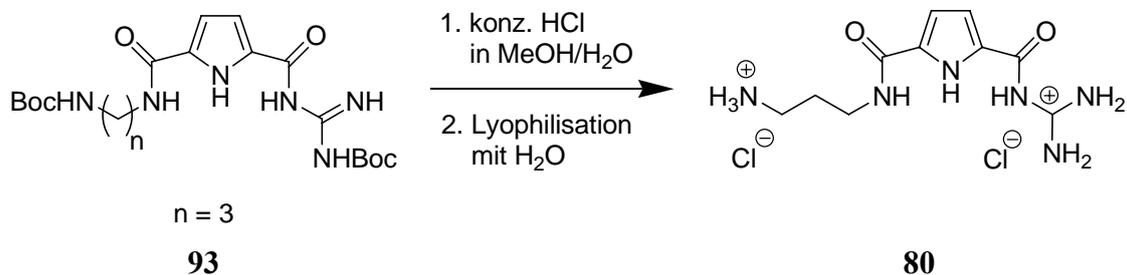
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 36.6, 38.5 (alle CH₂), 112.7, 115.9 (beide CH), 125.5, 132.5, 155.6, 159.3, 159.7 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3336 (s), 3191 (s), 3005 (m), 1697 (s), 1656 (s), 1558 (s), 1478 (m), 1295 (s), 1257 (w), 1201 (w), 1067 (w), 812 (w), 759 (m), 665 (w).

HR-MS (pos. ESI): *m/z*: ber.: C₉H₁₅N₆O₂⁺ (M + H⁺) 239.125, gef.: 239.122;
ber.: C₉H₁₄N₆NaO₂⁺ (M + Na⁺) 261.107, gef.: 261.107.

8.5.13 Darstellung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskations

80



Das Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskation **80** wurde als farbloser Feststoff in 102 mg Ausbeute (63 %) erhalten.

$C_{10}H_{18}Cl_2N_6O_2$ 325.19 g/mol.

Smp. > 250 °C (Zersetzung).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.81 (quin, $^3J(H,H) = 6.84$ Hz, $^3J(H,H) = 7.38$ Hz, 2 H, CH₂), 2.84 (quin, $^3J(H,H) = 5.56$ Hz, $^3J(H,H) = 6.68$ Hz, 2 H, CH₂), 3.31 (t, $^3J(H,H) = 6.60$ Hz, 2 H, CH₂), 6.88 (dd, $^3J(H,H) = 4.04$ Hz, $^4J(H,H) = 2.28$ Hz, 1 H, CH), 7.54 (dd, $^3J(H,H) = 4.04$ Hz, $^4J(H,H) = 2.40$ Hz, 1 H, CH), 7.94 (brs, 3 H, NH₃), 8.48 (brs, 2 H, NH₂), 8.66 (brs, 2 H, NH₂), 8.73 (t, $^3J(H,H) = 5.62$ Hz, 1 H, NH), 12.08 (s, 1 H, NH), 12.36 (s, 1 H, NH).

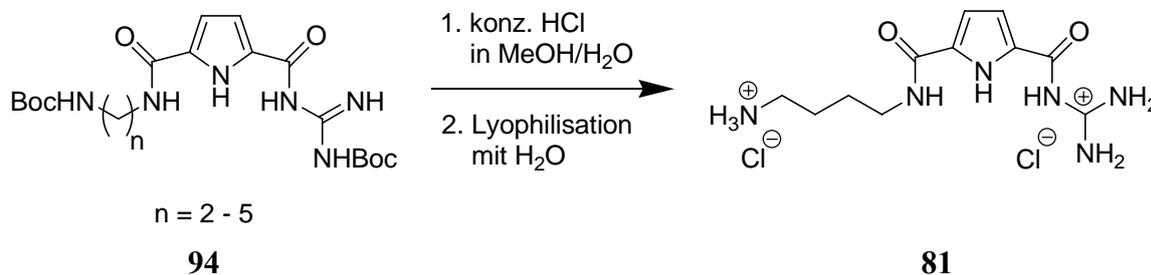
^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 27.3, 35.9, 36.8 (alle CH₂), 112.5, 116.0 (beide CH), 125.5, 132.7, 155.5, 159.3, 159.6 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3343 (s), 3164 (s), 2995 (m), 1698 (s), 1646 (s), 1560 (s), 1476 (m), 1287 (s), 1262 (w), 1199 (w), 1059 (w), 808 (w), 761 (m).

HR-MS (pos. ESI): m/z : ber.: $C_{10}H_{17}N_6O_2^+$ ($M + H^+$) 253.141, gef.: 253.140; ber.: $C_{10}H_{16}N_6NaO_2^+$ ($M + Na^+$) 275.123, gef.: 275.123.

8.5.14 Darstellung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskations

81



Das Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskation **81** wurde als farbloser Feststoff in 120 mg Ausbeute (71 %) erhalten.

$C_{11}H_{20}Cl_2N_6O_2$ 339.22 g/mol.

Smp. > 250 °C (Zersetzung).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.58 (m, 2 H, CH₂), 2.79 (m, 2 H, CH₂), 3.31 (q, $^3J(H,H) = 5.92$ Hz, 2 H, CH₂), 6.86 (dd, $^3J(H,H) = 4.04$ Hz, $^4J(H,H) = 2.40$ Hz, 1 H, CH), 7.56 (dd, $^3J(H,H) = 4.04$ Hz, $^4J(H,H) = 2.40$ Hz, 1 H, CH), 7.92 (brs, 3 H, NH₃), 8.50 (brs, 2 H, NH₂), 8.62 (t, $^3J(H,H) = 5.62$ Hz, 1 H, NH), 8.69 (brs, 2 H, NH₂), 12.12 (s, 1 H, NH), 12.34 (s, 1 H, NH).

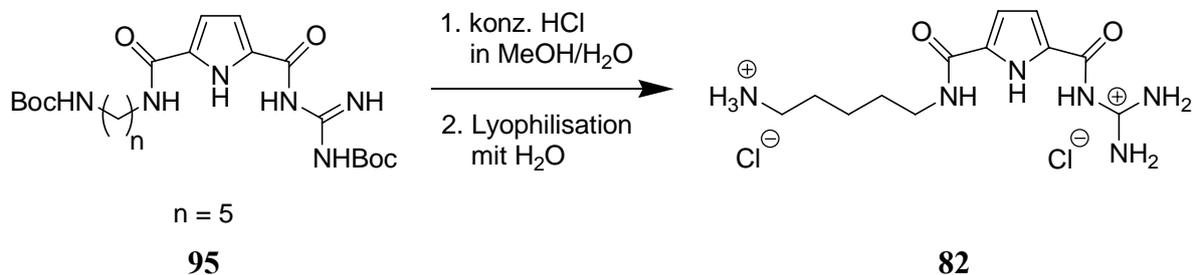
^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 24.5, 26.0, 38.0, 38.5 (alle CH₂), 112.4, 116.0 (beide CH), 125.3, 132.9, 155.6, 159.1, 159.6 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3327 (s), 3098 (s), 2931 (m), 1698 (s), 1655 (s), 1558 (s), 1476 (m), 1286 (s), 1256 (w), 1194 (w), 1063 (w), 853 (w), 751 (m), 605 (w).

HR-MS (pos. ESI): m/z : ber.: $C_{11}H_{19}N_6O_2^+$ ($M + H^+$) 267.156, gef.: 267.157;
ber.: $C_{11}H_{18}N_6NaO_2^+$ ($M + Na^+$) 289.138, gef.: 289.137.

8.5.15 Darstellung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskations

82



Das Guanidiniocarbonylpyrrol-Ammonium-Biskation **82** wurde als farbloser Feststoff in 131 mg Ausbeute (74 %) erhalten.

$C_{12}H_{22}Cl_2N_6O_2$ 353.25 g/mol.

Smp. > 205 °C (Zersetzung).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.36 (m, 2 H, CH₂), 1.51 - 1.60 (m, 4 H, 2 CH₂), 2.76 (m, 2 H, CH₂), 3.24 (q, $^3J(H,H) = 6.68$ Hz, 2 H, CH₂), 6.85 (dd, $^3J(H,H) = 4.04$ Hz, $^4J(H,H) = 2.40$ Hz, 1 H, CH), 7.51 (dd, $^3J(H,H) = 4.04$ Hz, $^4J(H,H) = 2.40$ Hz, 1 H, CH), 7.83 (brs, 3 H, NH₃), 8.44 (brs, 2 H, NH₂), 8.50 (t, $^3J(H,H) = 5.50$ Hz, 1 H, NH), 8.63 (brs, 2 H, NH₂), 12.01 (s, 1 H, NH), 12.31 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 23.2, 26.6, 28.4, 38.4, 38.6 (alle CH₂), 112.4, 115.9 (beide CH), 125.3, 132.9, 155.5, 159.0, 159.6 (alle quat. C).

FT-IR (KBr disk): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] 3363 (s), 3047 (s), 2931 (m), 1697 (s), 1626 (s), 1561 (s), 1475 (m), 1286 (s), 1286 (s), 1199 (m), 1070 (w), 853 (w), 758 (m), 598 (m).

HR-MS (pos. ESI): m/z : ber.: $C_{12}H_{21}N_6O_2^+$ ($M + H^+$) 281.172, gef.: 281.173.

8.6 Bindungsstudien via UV- und Fluoreszenz-Messungen

Probenvorbereitung

Als Standard-Lösemittelgemisch wurde 10 % DMSO in Wasser verwendet. Es wurde ein Bis-Tris-Puffer ($pK_S = 6.4$) in hochreinem Wasser verwendet. Die Pufferkonzentration betrug $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l, die Rezeptorkonzentration $7 \cdot 10^{-5}$ mol/l und die Substratkonzentration $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Die exakten Lösungen wurden so hergestellt, indem auf eine eingewogene Menge von Rezeptor bzw. Substrat die berechnete notwendige Menge Lösemittel mittels Mikroliter-Präzisions-Pipetten zugegeben wurde. Diese Methode ist genauer, als eine bestimmte Menge exakt (auf 10^{-5} g) einzuwiegen und ein bestimmtes Volumen zuzugeben, da hier die Volumenmessung eine höhere Genauigkeit als die Gewichtsbestimmung hat. Rezeptor bzw. Substrat wurde zuerst in dem DMSO-Anteil des Lösemittelgemisches gelöst. Der Wasser-Anteil, indem auch der Puffer gelöst war, wurde anschließend bis auf 50 μ l zugegeben, um Spielraum zum Einstellen des pH-Wertes zu haben. Dieser wurde mittels 1 M Salzsäurelösung bzw. 1 M Natronlauge auf pH 6.00 eingestellt. Danach wurde die Differenz des Wasser-Anteils aufgefüllt.

Alle verwendeten Lösemittel wurden vor dem Titrationsexperiment entgast, indem die bereits gefüllten Küvetten mit Ultraschall behandelt wurden. Dies war insbesondere bei Lösemittelgemischen mit größerem Anteil an Dimethylsulfoxid (DMSO für die Spektroskopie) notwendig, um störende Luftblasen zu entfernen.

UV-Messungen

Die Referenzzelle wurde mit dem gleichen Lösemittel- und Puffergemisch befüllt wie die Messzelle. Die Messküvetten besitzen eine Schichtdicke von 1 cm und wurden mit 2 ml Lösung befüllt. Ein Küvetten-Rührfisch sorgte mit 850 U/min für Durchmischung. Der Hohlraumabgleich geschah bei leerem Gerät. Die Messzelle wurde auf 25 °C temperiert. Die Zugaben geschahen mittels Mikroliter-Präzisions-Pipetten (**Tab. 12**). Nach jeder Zugabe wurde eine Minute gewartet, um die Gleichgewichtseinstellung ablaufen zu lassen, bevor die Messung gestartet wurde. Von jedem Titrationsschritt wurde ein UV-Spektrum mit dem Wellenlängenbereich von 260 bis 340 nm in 0.5 nm Schritten und mit einer Messgeschwindigkeit von 400 nm/min und mittlerem Ansprechverhalten aufgenommen. Die Bandbreite wurde auf 5.0 nm eingestellt. Vor der Spektrenaufnahme wurde eine Grundlinienkorrektur

durchgeführt. Am Ende einer Titration wurde der pH-Wert überprüft, um Protonierungsreaktionen ausschließen zu können.

Lfd.	V _{ges.} μl	V(R) μl	[R] mol/l	V(S) μl	V(S) _{ges.} μl	[S] mol/l	Äquiv.
0	2000	2000	7,00E-05	0	0	0	0,00
1	2010	2000	6,97E-05	10	10	9,95E-06	0,14
2	2020	2000	6,93E-05	10	20	1,98E-05	0,29
3	2030	2000	6,90E-05	10	30	2,96E-05	0,43
4	2040	2000	6,86E-05	10	40	3,92E-05	0,57
5	2050	2000	6,83E-05	10	50	4,88E-05	0,71
6	2060	2000	6,80E-05	10	60	5,83E-05	0,86
7	2070	2000	6,76E-05	10	70	6,76E-05	1,00
8	2080	2000	6,73E-05	10	80	7,69E-05	1,14
9	2090	2000	6,70E-05	10	90	8,61E-05	1,29
10	2100	2000	6,67E-05	10	100	9,52E-05	1,43
11	2110	2000	6,64E-05	10	110	1,04E-04	1,57
12	2120	2000	6,60E-05	10	120	1,13E-04	1,71
13	2130	2000	6,57E-05	10	130	1,22E-04	1,86
14	2140	2000	6,54E-05	10	140	1,31E-04	2,00
15	2175	2000	6,44E-05	35	175	1,61E-04	2,50
16	2210	2000	6,33E-05	35	210	1,90E-04	3,00
17	2245	2000	6,24E-05	35	245	2,18E-04	3,50
18	2280	2000	6,14E-05	35	280	2,46E-04	4,00
19	2315	2000	6,05E-05	35	315	2,72E-04	4,50
20	2350	2000	5,96E-05	35	350	2,98E-04	5,00
21	2420	2000	5,79E-05	70	420	3,47E-04	6,00
22	2490	2000	5,62E-05	70	490	3,94E-04	7,00
23	2560	2000	5,47E-05	70	560	4,38E-04	8,00
24	2630	2000	5,32E-05	70	630	4,79E-04	9,00
25	2700	2000	5,19E-05	70	700	5,19E-04	10,00
26	2770	2000	5,05E-05	70	770	5,56E-04	11,00
27	2840	2000	4,93E-05	70	840	5,92E-04	12,00
28	2910	2000	4,81E-05	70	910	6,25E-04	13,00
29	2980	2000	4,70E-05	70	980	6,58E-04	14,00
30	3050	2000	4,59E-05	70	1050	6,89E-04	15,00

Tab. 12 Titrationsschritte von UV-Messungen: R = Rezeptor, S = Substrat.

Die für die Auswertung der Titrationsexperimente nötigen molaren Extinktionskoeffizienten wurde durch Messungen von Verdünnungsreihen bestimmt. Auch konnte dadurch die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes überprüft werden. Dazu wurden eine Rezeptor- bzw. eine Substratlösung vorgelegt und mit Aliquoten des Lösemittels (inklusive Puffer und eingestelltem pH-Wert) unter identischen Versuchsbedingungen titriert. (**Tab. 13**)

Lfd.	V _{ges.} μl	V(R od. S) μl	V(Lsm) μl	V(Lsm) _{ges.} μl	[R] mol/l	[S] mol/l
0	2000	2000	0	0	7,00E-05	2,00E-03
1	2100	2000	100	100	6,67E-05	1,90E-03
2	2200	2000	100	200	6,36E-05	1,82E-03
3	2300	2000	100	300	6,09E-05	1,74E-03
4	2400	2000	100	400	5,83E-05	1,67E-03
5	2500	2000	100	500	5,60E-05	1,60E-03
6	2600	2000	100	600	5,38E-05	1,54E-03
7	2700	2000	100	700	5,19E-05	1,48E-03
8	2800	2000	100	800	5,00E-05	1,43E-03
9	2900	2000	100	900	4,83E-05	1,38E-03
10	3000	2000	100	1000	4,67E-05	1,33E-03
11	3100	2000	100	1100	4,52E-05	1,29E-03
12	3200	2000	100	1200	4,38E-05	1,25E-03
13	3300	2000	100	1300	4,24E-05	1,21E-03
14	3400	2000	100	1400	4,12E-05	1,18E-03

Tab. 13 Titrationsschritte von UV-Verdünnungsexperimenten: R = Rezeptor, S = Substrat.

Die Auswertung der Spektren wurde auf zwei Weisen durchgeführt. Zum einen mit Origin

Fluoreszenz-Messungen

Die Probenvorbereitung sowie die Durchführung der Titrationen der Fluoreszenz-Messungen sind analog der UV-Messungen. Lediglich die Einstellungen unterscheiden sich. Auch gibt es bei Fluoreszenz-Messungen keine Referenzzelle. Es wurde eine synchrone Anregungsmethode verwendet, bei der die Fluoreszenz bei einer Wellenlängendifferenz von konstant 20 nm zur Emission angeregt wurde. Es wurden dabei Fluoreszenz-Spektren von 250 bis 500 nm mit einer Messgeschwindigkeit von 500 nm/min aufgenommen. Die Bandbreite für die Extinktion betrug 5 nm und für die Emission 3 nm. Das Emissionssignal wurde nach 0.2 s mit hoher Sensitivität gemessen.

8.7 Bindungsstudien via NMR-Messungen

Alle NMR-Bindungsstudien wurden mit dem Bruker Advance 400 MHz in Wasser-DMSO_{d6}-Mischungen durchgeführt. Dazu wurden zwei Stammlösungen mit der gleichen Lösemittelzusammensetzung hergestellt: eine erhielt den Rezeptor in der Konzentration von 1.5 mmol/l und wurde vorgelegt, die andere die Substratlösung in der Konzentration von 15 mmol/l, die

zutitriert wurde. Von der vorgelegten Rezeptorlösung wurden die Shifts der Protonen verfolgt, die durch die Komplexbildung beeinflusst wurden. Aliquote des Substrates wurden schrittweise zugegeben und jeweils ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen. Dabei wurde letztendlich ein Überschuss von 20 Äquivalenten Substrat erreicht, um sicher zu gehen, die Sättigung erreicht zu haben.

Aufgrund des großen Wasseranteils wurden die Messungen mittels Wasserunterdrückung bei 298 K durchgeführt. Dazu wurde vorher ein Standard- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen, um den zu unterdrückenden Lösemittelpeak des Wassers bei etwa 4.55 ppm zu ermitteln und den D19-Wert berechnen zu können (reziproker Lösemittelpeak mal 1600).

Ausgewertet wurden dabei Protonen, die einerseits in allen Spektren zu sehen waren und weiterhin einen Shift zeigten. Mit Hilfe nichtlinearer Regression des Programms *Origin 7* konnte die Assoziationskonstante in M^{-1} berechnet werden.

Lfd.	$V_{\text{ges.}}$ μl	$V(\text{R})$ μl	$[\text{R}]$ mol/l	$V(\text{S})$ μl	$V(\text{S})_{\text{ges.}}$ μl	$[\text{S}]$ mol/l	Äquiv.
0	600	600	1,50E-03	0	0	0	0,00
1	612	600	1,47E-03	12	12	2,94E-04	0,20
2	624	600	1,44E-03	12	24	5,77E-04	0,40
3	636	600	1,42E-03	12	36	8,49E-04	0,60
4	648	600	1,39E-03	12	48	1,11E-03	0,80
5	660	600	1,36E-03	12	60	1,36E-03	1,00
6	672	600	1,34E-03	12	72	1,61E-03	1,20
7	684	600	1,32E-03	12	84	1,84E-03	1,40
8	696	600	1,29E-03	12	96	2,07E-03	1,60
9	708	600	1,27E-03	12	108	2,29E-03	1,80
10	720	600	1,25E-03	12	120	2,50E-03	2,00
11	750	600	1,20E-03	30	150	3,00E-03	2,50
12	780	600	1,15E-03	30	180	3,46E-03	3,00
13	810	600	1,11E-03	30	210	3,89E-03	3,50
14	840	600	1,07E-03	30	240	4,29E-03	4,00
15	870	600	1,03E-03	30	270	4,66E-03	4,50
16	900	600	1,00E-03	30	300	5,00E-03	5,00
17	1050	600	8,57E-04	150	450	6,43E-03	7,50
18	1200	600	7,50E-04	150	600	7,50E-03	10,00
19	1350	600	6,67E-04	150	750	8,33E-03	12,50
20	1500	600	6,00E-04	150	900	9,00E-03	15,00

Tab. 14 Titrationsschritte von NMR-Messungen: R = Rezeptor, S = Substrat.

8.8 Bindungsstudien via ITC-Messungen

Das ITC-System besteht aus zwei geldstück-großen identischen Zellen, die beide ein Fassungsvermögen von 1,4514 ml besitzen und von der Umgebung isoliert sind. Die isothermale Temperatur, bei denen die Experimente durchgeführt wurden, lag mit 25 °C etwa um 5 bis 10 °C über der Umgebungstemperatur, um einen leicht kühlenden Wärmefluss zu gewährleisten. Beide Zellen waren immer komplett gefüllt, die Referenzzelle mit hochreinem Wasser und die Messzelle mit einer Rezeptorlösung im jeweiligen wässrigen Lösemittelgemisch. Die Substratlösung wurde in 10 bis 20fach höherer Konzentration mittels einer Spritze mit integrierter Rührereinheit schrittweise zugegeben. Die Rührgeschwindigkeit wurde auf 372 U/min eingestellt, um eine gute Durchmischung und einheitliche Wärmeübertragung zu gewährleisten. Die Referenzzelle wurde fortlaufend mit einer Temperaturdifferenz von 0.01 ° über der Temperatur des isolierenden Kühlmantels geheizt. Dadurch lag immer eine konstante Spannung mit einer eingestellten Referenz-Heiz-Leistung von 15 $\mu\text{Cal/s}$ an. Für ein typisches Experiment wurden etwa 3 ml der Rezeptorlösung erst mittels Ultraschall und dann unter Vakuum entgast. Die Messzelle wurde anschließend mit 1 ml dieser Lösung gespült und anschließend komplett mit 1,4514 ml befüllt. Die Substratlösung wurde analog zur Rezeptorlösung entgast. Die Spritze wurde mit 150 μl dieser Lösung gespült und danach mit ungefähr 250 μl befüllt. Anschließend wurde die Spritze dreimal automatisiert entleert und wieder aufgezogen, um Luft einschließen zu vermeiden. Die Titration erfolgte automatisiert. Es wurden 26 Titrationsschritte mit je 10.0 μl im Abstand von 230 s injiziert. Die Injektionsdauer betrug 20 s und die Anfangs-Verzögerung 60 s. Weitere Einstellungen waren ein hohes Ansprechverhalten und schnelle Gleichgewichtseinstellung.

Für ein typisches Experiment wurden eine 0.2 mM Lösung des Rezeptors und eine 2 mM Lösung des Substrates hergestellt. Die Herstellung der Lösungen und Lösemittelgemische sowie die Einstellung der pH-Werte auf 6.00 wurden analog zu denen für UV-Messungen durchgeführt. Ein Puffer wurde in der Regel nicht verwendet. Der Gesamtüberschuss des Substrates lag letztendlich bei ungefähr zwei Äquivalenten.

Lfd.	V _{ges.} ml	V(R) ml	[R] mol/l	V(S) μl	V(S) _{ges.} μl	[S] mol/l	Äquiv.
0	1,4514	1,451	2,00E-04	0	0	0	0,00
1	1,4514	1,441	1,99E-04	10	10	1,38E-05	0,07
2	1,4514	1,431	1,96E-04	10	20	2,73E-05	0,14
3	1,4514	1,421	1,95E-04	10	30	4,09E-05	0,21
4	1,4514	1,411	1,93E-04	10	40	5,45E-05	0,28
5	1,4514	1,401	1,92E-04	10	50	6,81E-05	0,35
6	1,4514	1,391	1,91E-04	10	60	8,16E-05	0,43
7	1,4514	1,381	1,89E-04	10	70	9,52E-05	0,50
8	1,4514	1,371	1,88E-04	10	80	1,09E-04	0,58
9	1,4514	1,361	1,87E-04	10	90	1,22E-04	0,65
10	1,4514	1,351	1,86E-04	10	100	1,36E-04	0,73
11	1,4514	1,341	1,85E-04	10	110	1,50E-04	0,81
12	1,4514	1,331	1,83E-04	10	120	1,63E-04	0,89
13	1,4514	1,321	1,82E-04	10	130	1,77E-04	0,97
14	1,4514	1,311	1,81E-04	10	140	1,90E-04	1,05
15	1,4514	1,301	1,80E-04	10	150	2,04E-04	1,13
16	1,4514	1,291	1,79E-04	10	160	2,18E-04	1,22
17	1,4514	1,281	1,78E-04	10	170	2,31E-04	1,30
18	1,4514	1,271	1,77E-04	10	180	2,45E-04	1,39
19	1,4514	1,261	1,76E-04	10	190	2,58E-04	1,47
20	1,4514	1,251	1,75E-04	10	200	2,72E-04	1,56
21	1,4514	1,241	1,74E-04	10	210	2,86E-04	1,65
22	1,4514	1,231	1,72E-04	10	220	2,99E-04	1,73
23	1,4514	1,221	1,71E-04	10	230	3,13E-04	1,82
24	1,4514	1,211	1,70E-04	10	240	3,26E-04	1,91
25	1,4514	1,201	1,69E-04	10	250	3,40E-04	2,01
26	1,4514	1,1914	1,68E-04	10	260	3,53E-04	2,10

Tab. 15 Titrationsschritte von ITC-Messungen.

Um etwaige Wärmeentwicklungen, die nicht durch die Komplexierung hervorgerufen wurden, wie z. B. beim Verdünnen sowohl der Stammlösung als auch der Rezeptorlösung, während der Titration zu ermitteln, wurden zwei Kontrollexperimente (Verdünnungsexperimente) unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Zum einen wurde Lösemittel mit ebenfalls eingestelltem pH-Wert zur vorgelegten Stammlösung titriert, während in einem anderen Experiment die Rezeptorlösung zum Lösemittel titriert wurde. Die erhaltenen Wärmeentwicklungen wurden anschließend vom eigentlichen Experiment korrigiert. Dabei wurde die Wärmeentwicklung aus dem Verdünnungsexperiment der Rezeptorlösung linear als Konstante subtrahiert, da hier nur eine sehr geringe und konstante Wärmeentwicklung entstand. Im Gegensatz dazu wurde die Wärmeentwicklung aus dem Verdünnungsexperiment der Substratlösung als Einzelwerte vom eigentlichen Experiment subtrahiert, da hier eine stärkere Wärmeentwicklung auftrat, die im Laufe der Verdünnung sigmoid abnahm.

Zur Bestimmung der Assoziationskonstanten und der Komplexstöchiometrie wurden die Parameter unter Verwendung des Programms *Origin 7* mit einem speziellen Zusatzprogramm für ITC-Messungen an die korrigierten Wärmemengen angepasst. Dabei wurde ein für die Komplexierung entsprechendes Bindungsmodell gewählt und die detektierte Wärmemenge gegen die Zeit aufgetragen. Die berechneten Reaktionsenthalpien wurden in $\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1}$, die Entropien in $\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ und die Bindungskonstanten in M^{-1} erhalten.

9 ANHANG

9.1 Literaturverzeichnis

- [1] H.-J. Schneider, Mechanismen der molekularen Erkennung - Untersuchung an organischen Wirt-Gast-Komplexen. *Angew. Chem.* **1991**, *103*, (11), 1419-1439.
- [2] C. A. Schalley (Edt.), *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, WILEY-VCH, Weinheim, **2007**.
- [3] C. L. Hannon, E. V. Anslyn, H. Dugas (Edt.), *Bioorganic Chemistry Frontiers, Vol. III*, Springer, **1993**.
- [4] C. Schmuck, Von der molekularen Erkennung zum Design neuer Wirkstoffe: Peptiden auf den Leib geschneidert. *ChiuZ* **2001**, *35*, (6), 356 - 366.
- [5] C. Schmuck, L. Geiger, Carboxylate Binding by Guanidiniocarbonyl Pyrroles: From Self-Assembly to Peptide Receptors. *Current Organic Chemistry* **2003**, *7*, 1485-1502.
- [6] C. Schmuck, How to improve guanidinium cations for oxoanion binding in aqueous solution? The design of artificial peptide receptors. *Coordination Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3053-3067.
- [7] C. Schmuck, V. Bickert, N'-Alkylated Guanidiniocarbonyl Pyrroles: New Receptors for Amino Acid Recognition in Water. *Org. Lett.* **2003**, *5*, (24), 4579-4581.
- [8] C. Schmuck, M. Heil, Peptide binding by one-armed receptors in water: screening of a combinatorial library for binding of Val-Val-Ile-Ala. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1232-1238.
- [9] C. Schmuck, P. Wich, Sequence-Dependent Stereoselectivity in the Binding of Tetrapeptides in Water by a Flexible Artificial Receptor. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, (26), 4383-4387.
- [10] C. Schmuck, T. Rehm, K. Klein, F. Gröhn, Formation of Vesicular Structures through the Self-Assembly of a Flexible Bis-Zwitterion in Dimethyl Sulfoxide. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, (10), 1723 - 1727.
- [11] C. Schmuck, T. Rehm, L. Geiger, M. Schäfer, Synthesis and Self-Association Properties of Flexible Guanidiniocarbonylpyrrole-Carboxylate Zwitterions in DMSO: Intra- versus Intermolecular Ion Pairing. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6162-6170.
- [12] C. Schmuck, J. Dudaczek, Screening of a Combinatorial Library Reveals Peptide-Based Catalysts for Phosphorester Cleavage in Water. *Organic Letters* **2007**, *9*, (26), 5389-5392.
- [13] E. Fischer, Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985-2993.
- [14] J. D. E. Koshland, Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, (2), 98-104.

- [15] J.-M. Lehn, Cryptates: Inclusion Complexes of Macropolycyclic Receptor Molecules. *Pure Appl. Chem.* **1978**, *50*, 871-892.
- [16] J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **1995**.
- [17] F. Vögtle, *Supramolekulare Chemie*, Teubner, Stuttgart, **1992**.
- [18] J. M. Lehn, Supramolekulare Chemie - Moleküle, Übermoleküle und molekulare Funktionseinheiten (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* **1988**, *1*, 91-116.
- [19] P. A. Gale, S. E. García-Garrido, J. Garric, Anion receptors based on organic frameworks: highlights from 2005 and 2006. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 151-190.
- [20] P. Blondeau, M. Segura, R. Pérez-Fernández, J. d. Mendoza, Molecular recognition of oxoanions based on guanidinium receptors. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 198-210.
- [21] K. A. Schug, W. Lindner, Noncovalent Binding between Guanidinium and Anionic Groups: Focus on Biological- and Synthetic-Based Arginine/Guanidinium Interactions with Phosph[on]ate and Sulf[on]ate Residues. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 67-113.
- [22] M. D. Best, S. L. Tobey, E. V. Anslyn, Abiotic guanidinium containing receptors for anionic species. *Coordination Chem. Rev.* **2003**, *240*, (1-2), 3-15.
- [23] G. Müller, J. Riede, F. P. Schmidtchen, Wirt-Gast-Bindung von Oxoanionen an Guanidinium-Ankergruppen. *Angew. Chem.* **1988**, *100*, (11), 1574-1575.
- [24] W. L. Jorgensen, J. Pranata, Importance of Secondary Interactions in Triply Hydrogen Bonded Complexes: Guanine-Cytosine vs Uracil-2,6-Diaminopyridine. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, (5), 2008-2010.
- [25] M. Berger, F. P. Schmidtchen, Zwitterionic Guanidinium Compounds Serve as Electroneutral Anion Hosts. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, (43), 9986-9993.
- [26] B. R. Linton, M. S. Goodman, E. Fan, S. A. v. Arman, A. D. Hamilton, Thermodynamic Aspects of Dicarboxylate Recognition by Simple Artificial Receptors. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, (22), 7313-7319.
- [27] R. P. Dixon, S. J. Geib, A. D. Hamilton, Molecular Recognition: Bis-Acylguanidiniums Provide a Simple Family of Receptors for Phosphodiesteres. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, (1), 365-366.
- [28] M. C. Grossel, D. A. S. Merckel, M. G. Hutchings, The effect of preorganisation on the solid state behaviour of simple "aromatic-cored" bis(guanidinium) sulfates. *CrystEngComm* **2003**, *5*, (16), 77-81.
- [29] A. Metzger, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, Ein synthetischer Citrat-selektiver Rezeptor. *Angew. Chem.* **1997**, *109*, (8), 911-914.
- [30] T. Zielinski, J. Jurczak, Thioamides versus amides in anion binding. *Tetrahedron* **2005**, *61*, (16), 4081-4089.
- [31] P. A. Gale, S. Camiolo, G. J. Tizzard, C. P. Chapman, M. E. Light, S. J. Coles, M. B. Hursthouse, 2-Amidopyrroles and 2,5-Diamidopyrroles as Simple Anion Binding Agents. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, (23), 7849-7853.
- [32] H.-J. Lee, Y.-S. Choi, K.-B. Lee, J. Park, C.-J. Yoon, Hydrogen Bonding Abilities of Thioamide. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, (30), 7010-7017.
- [33] C. Schmuck, Carboxylate Binding by 2-(Guanidiniocarbonyl)pyrrole Receptors in Aqueous Solvents: Improving the Binding Properties of Guanidinium Cations through Additional Hydrogen Bonds. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, (4), 709 - 718.

- [34] C. Schmuck, Side chain selective binding of N-acetyl-a-amino acid carboxylates by a 2-(guanidiniocarbonyl)pyrrole receptor in aqueous solvents. *Chem. Comm.* **1999**, 843-844.
- [35] V. Bickert, *N, N'-disubstituierte Guanidiniocarbonylpyrrole als Bausteine für Peptidrezeptoren*, Diplomarbeit, Universität Würzburg, **2003**.
- [36] C. Schmuck, M. Heil, One-Armed Artificial Receptors for the Binding of Polar Tetrapeptides in Water: Probing the Substrate Selectivity of a Combinatorial Receptor Library. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1339-1348.
- [37] V. L. Healy, I. A. Lessard, D. I. Roper, J. R. Knox, C. T. Walsh, Vancomycin resistance in enterococci: reprogramming of the D-Ala-D-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthe. *Chem. & Biol.* **2000**, *7*, (5), 109-119.
- [38] B. K. Hubbard, C. T. Walsh, Der Aufbau von Vancomycin: so macht es die Natur. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, (7), 752-789.
- [39] D. H. Williams, B. Bardsley, Die Vancomycin-Antibiotica und der Kampf gegen resistente Bakterien. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, (9), 1264-1286.
- [40] K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, Chemie, Biologie und medizinische Anwendungen der Glycopeptid-Antibiotika. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2230-2287.
- [41] C. Schmuck, U. Machon, 2-(Guanidiniocarbonyl)furans as a New Class of Potential Anion Hosts: Synthesis and First Binding Studies. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, (19), 4385-4392.
- [42] C. Schmuck, U. Machon, Amino Acid Binding by 2-(Guanidiniocarbonyl)pyridines in Aqueous Solvents: A Comparative Binding Study Correlating Complex Stability with Stereoelectronic Factors. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1109-1118.
- [43] J. W. Steed, D. R. Turner, K. J. Wallace, *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*, Wiley, **2007**.
- [44] P. R. Andrews, D. J. Craik, J. L. Martin, Functional Group Contributions to Drug-Receptor Interactions. *J. Med. Chem.* **1987**, *27*, 1648-1657.
- [45] P. I. Kitov, D. R. Bundle, On the Nature of the Multivalency Effect: A Thermodynamic Model. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, (52), 16271-16284.
- [46] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, Polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen: Auswirkungen auf das Design und die Verwendung multivalenter Liganden und Inhibitoren. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, (20), 2908-2953.
- [47] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, Influencing Receptor-Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- [48] J. D. Badjic, A. Nelson, S. J. Cantrill, W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, Multivalency and Cooperativity in Supramolecular Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 723-732.
- [49] L. J. Prins, D. N. Reinhoudt, P. Timmerman, Nichtkovalente Synthese mit Wasserstoffbrücken. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, (13), 2446-2492.
- [50] D. J. Cram, Präorganisation - von Solventien zu Sphäranden. *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 1041-1060.
- [51] E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, Wechselwirkungen mit aromatischen Ringen in chemischen und biologischen Erkennungsprozessen. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, (11), 1244-1287.

- [52] D. H. Williams, E. Stephens, D. P. O'Brien, M. Zhou, Ligandeninduzierte Bewegungseinschränkung mit Stärkung nichtkovalenter Wechselwirkungen in Rezeptoren und Enzymen: Quelle für Bindungsenergie und katalytische Wirkung. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, (48), 6760-6782.
- [53] C. Jolicoeur, P. R. Philip, Enthalpy–Entropy Compensation for Micellization and Other Hydrophobic Interactions in Aqueous Solutions. *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, (10), 1834-1839.
- [54] K. N. Houk, A. G. Leach, X. Zhang, Bindungsaffinitäten von Wirt-Gast-, Protein-Ligand- und Protein-Übergangszustands-Komplexen. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, (40), 5020-5046.
- [55] D. H. Williams, M. S. Westwell, Aspects of weak interactions. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 57-63.
- [56] P. A. Gale, Anion and ion-pair receptor chemistry: highlights from 2000 and 2001. *Coordination Chem. Rev.* **2003**, *240*, (1-2), 191-221.
- [57] R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, Fluorogenic and Chromogenic Chemosensors and Reagents for Anions. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, (11), 4419-4476.
- [58] J. L. Sessler, S. Camiolo, P. A. Gale, Pyrrolic and polypyrrolic anion binding agents. *Coordination Chem. Rev.* **2003**, *240*, 17-55.
- [59] K. Bowman-James, Alfred Werner Revisited: The Coordination Chemistry of Anions. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 671-678.
- [60] S. Kubik, C. Reyheller, S. Stüwe, Recognition of Anions by Synthetic Receptors in Aqueous Solution. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2005**, *52*, 137-187.
- [61] L. Fabbrizzi, V. Amendola, M. Bonizzoni, D. Esteban-Gómez, M. Licchelli, F. Sancenón, A. Taglietti, Some guidelines for the design of anion receptors. *Coordination Chemistry Reviews* **2006**, *250*, 1451-1470.
- [62] U. S. Schubert, H. Hofmeier, Combination of orthogonal supramolecular interactions in polymeric architectures. *Chem. Commun.* **2005**, 2423-2432.
- [63] B. Bosnich, J. D. Crowley, Molecular Recognition: Use of Metal-Containing Molecular Clefts for Supramolecular Self-Assembly and Host–Guest Formation. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 2015-2025.
- [64] R. Custelcean, B. A. Moyer, V. S. Bryantsev, B. P. Hay, Anion Coordination in Metal-Organic Frameworks Functionalized with Urea Hydrogen-Bonding Groups. *Crystal Growth & Design* **2006**, *6*, (2), 555-563.
- [65] A. Terrón, J. J. Fiol, A. García-Raso, M. Barceló-Oliver, V. Moreno, Biological recognition patterns implicated by the formation and stability of ternary metal ion complexes of low-molecular-weight formed with amino acid/peptides and nucleobases/nucleosides. *Coordination Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1973-1986.
- [66] G. A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, Oxford, **1997**.
- [67] J. L. Cook, C. A. Hunter, C. M. R. Low, A. Perez-Velasco, J. G. Vinter, Solvent Effects on Hydrogen Bonding. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, (20), 3780-3783.
- [68] C. A. Hunter, Meldola Lecture. The role of aromatic interactions in molecular recognition. *Chem. Soc. Rev.* **1994**, *23*, 101-109.
- [69] A. S. Woods, The Mighty Arginine, the Stable Quaternary Amines, the Powerful Aromatics, and the Aggressive Phosphate: Their Role in the Noncovalent Minuet. *Journal of Proteome Research* **2004**, *3*, 478-484.
- [70] J. C. Ma, D. A. Dougherty, The Cation- π Interaction. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303-1324.

- [71] D. A. Dougherty, The Cation- π Interaction in Chemistry and Biology: A New View of Benzene, Phe, Tyr and Trp. *Science* **1996**, 271, 163-168.
- [72] Biacore, www.biacore.com/lifesciences. *Biacore* **2007**.
- [73] M. Heil, *Synthese und Screening einer Kombinatorischen Rezeptorbibliothek für biologisch relevante Tetrapeptide*, Dissertation, Universität Würzburg, **2004**.
- [74] M. Schwegmann, *Eine Molekulare Fliegenfalle zur Erkennung von biologisch relevanter (poly)-anionischen Substraten*, Dissertation, Universität Würzburg, **2005**.
- [75] K. A. Connors, *Binding Constants – The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley, **1987**.
- [76] J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **2000**.
- [77] W. B. Person, A Criterion for Reliability of Formation Constants of Weak Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 167-170.
- [78] D. A. Deranleau, Theory of the Measurement of Weak Molecular Complexes. I. General Considerations. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 4044-4049.
- [79] C. S. Wilcox, H.-J. Schneider, H. Dürr (Edt.), *Design, Synthesis, and Evaluation of an Efficacious Functional Group Dyad. Methods and Limitations in the Use of NMR for Measuring Host-Guest Interactions*, VCH, Weinheim, **1991**.
- [80] G. Weber, B. Pullman, M. Weissbluth (Edt.), *Molecular Biophysics*, New York, **1965**.
- [81] F. H. Frimmel, M. U. Kumke, Der spektrale Absorptionskoeffizient zur Bestimmung der organischen Abwasserbelastung. *Wiener Mitteilungen* **1999**, 156, 1-24.
- [82] Y.-H. Li, L.-M. Chan, L. Tyer, R. T. Moody, C. M. Hirnel, D. M. Hercules, Study of Solvent Effects on the Fluorescence of 1-(Dimethylamino)-5-naphthalenesulfonic Acid and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, (11), 3118-3126.
- [83] MicroCal, *ITC Tutorial Guide*, MicroCal, LLC, Northhampton, **2004**.
- [84] F. P. Schmidtchen, C. A. Schalley (Edt.), *Isothermal Titration Calorimetry in Supramolecular Chemistry in Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, WILEY-VCH, Weinheim, **2007**.
- [85] R. N. Goldberg, N. Kishore, R. M. Lennen, Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2002**, 31, (2), 231-370.
- [86] P. Job, Etude Spectrographique de la Formation des Complexes en Solution et de leur Stabilité. *Compt. Rend.* **1925**, 180, 928-930.
- [87] L. Geiger, *The Versatile use of Guanidiniocarbonylpyrroles: From Self-Assembly to Peptide Recognition*, Dissertation, Universität Würzburg, **2004**.
- [88] C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm, U. Machon, A Facile and Efficient Multi-Gram Synthesis of *N*-Protected 5-(Guanidiniocarbonyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic Acids. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**.
- [89] W. F. Huffman, R. F. Hall, J. A. Grant, K. G. Holden, Nuclear Analogues of β -Lactam Antibiotics. Total Synthesis of Bisnorisopenicillins from Antibacterially Active Monocyclic β -Lactam Precursors. *J. Med. Chem.* **1978**, 21, (413), 413-415.
- [90] C. Schmuck, Highly Stable Self-Association of 5-(Guanidiniocarbonyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylate in DMSO – The Importance of Electrostatic Interactions. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, (9), 2397-2403.

- [91] C. Gros, B. Labouesse, Study of the Dansylation Reaction of Amino Acids, Peptides and Proteins. *European J. Biochem.* **1969**, 7, (4), 463-470.
- [92] T. Kálai, É. Hideg, I. Vass, K. Hideg, Double (Fluorescent and Spin) Sensors for Detection of Reactive Oxygen Species in the Thylakoid Membrane. *Free Radical Biology & Medicine* **1998**, 24, (4), 649-652.
- [93] T. Rehm, *Bausteine für Supramolekulare Polymere in Wasser*, Diplomarbeit, Universität Würzburg, **2004**.
- [94] T. Rehm, *A Guide to Supramolecular Assemblies in Polar Solutions*, Dissertation, Universität Würzburg, **2008**.
- [95] K. Feichtinger, H. L. Sings, T. J. Baker, K. Matthews, M. Goodman, Triurethane-Protected Guanidines and Triflyldiurethane-Protected Guanidines: New Reagents for Guanidinylation Reactions. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 8432-8439.
- [96] M. Goodman, M. Tomioka, C. J. Creighton, C. W. Zapf, A Novel Traceless Resin-Bound Guanidinylation Reagent for Secondary Amines To Prepare N,N-Disubstituted Guanidines. *Org. Lett.* **2001**, 3, (8), 1133-1136.
- [97] M. S. Egbertson, J. J. Cook, B. Bednar, J. D. Prugh, R. A. Bednar, S. L. Gaul, R. J. Gould, G. D. Hartman, C. F. Homnick, M. A. Holahan, L. A. Libby, J. Joseph J. Lynch, R. J. Lynch, G. R. Sitko, M. T. Stranieri, L. M. Vassallo, Non-Peptide GPIIb/IIIa Inhibitors. 20. Centrally Constrained Thienothiophene α -Sulfonamides Are Potent, Long Acting in Vivo Inhibitors of Platelet Aggregation. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2409-2421.
- [98] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, second ed., John Wiley & Sons, New Jersey, **1995**.
- [99] K. A. Connors, *Binding Constants in The Measurement of Molecular Complex*, Wiley, New York, **1987**.
- [100] L. Fielding, Determination of Association Constants (K_a) from Solution NMR Data. *Tetrahedron* **2000**, 56, 6151-6170.
- [101] F. Würthner, S. Yao, T. Debaerdemaeker, R. Wortmann, Dimerization of Merocyanine Dyes. Structural and Energetic Characterization of Dipolar Dye Aggregates and Implications for Nonlinear Optical Materials. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, (32), 9431-9447.
- [102] A. Molina, J. J. Vaquero, J. L. García-Navio, J. Alvarez-Builla, M. M. Rodrigo, O. Castano, J. L. d. Andres, Azonia Derivatives of the γ -Carboline System. A new class of DNA Intercalators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, (13), 1453-1456.
- [103] F. Mohamadi, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W. C. Still, MacroModel- An Integrated Software System for Modeling Organic and Bioorganic Molecules Using Molecular Mechanics. *Journal of Computational Chemistry* **1990**, 11, (4), 440-467.
- [104] K. L. Mardis, Can Configuration Entropy Losses Be Predicted from the Binding Affinities of Hydrogen-Bonded Complexes with Varying Numbers of Single Bonds? *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, (2), 971-975.
- [105] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed., Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York, **1999**.
- [106] J. C. Andre, M. Bouchy, M. Niclaude, Quantitative studies of the synchronous excitation methode in Spectrofluorimetry: Application to tracer concentration measurements in Hydrology. *Anal. Chim. Acta* **1977**, 92, (2), 369-378.

- [107] J. C. Andre, M. Bouchy, M. L. Viriot, Synchronous excitation methode for increasing sensitivity in Fluorimetry: The limitations caused by Raman and Rayleigh scatter. *Anal. Chim. Acta* **1979**, *105*, 297-310.
- [108] A. Ababou, J. E. Ladbury, Survey of the year 2005: literature on applications of isothermal titration calorimetry. *J. Mol. Recognition* **2007**, *20*, 4-14.
- [109] J. L. Sessler, D. E. Gross, W.-S. Cho, V. M. Lynch, F. P. Schmidtchen, G. W. Bates, M. E. Light, P. A. Gale, Calix[4]pyrrole as a Chloride Anion Receptor: Solvent and Counteraction Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12281-12288.
- [110] M. Berger, F. P. Schmidtchen, Die Erkennung von Sulfationen durch Guanidinium-Rezeptoren ist entropiebestimmt. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, (19), 2840-2842.
- [111] T. Wyttenbach, D. Liu, M. T. Bowers, Hydration of small peptides. *International Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *240*, 221-232.
- [112] M. Haj-Zaroubi, N. W. Mitzel, F. P. Schmidtchen, Rationales Design molekularer Wirte für Anionen durch Feinabstimmung energetischer Einflüsse. *Angew. Chem.* **2002**, *114*, (1), 111-114.
- [113] F. P. Schmidtchen, Surprises in the Energetics of Host-Guest Anion Binding to Calix[4]pyrrole. *Org. Lett.* **2002**, *4*, (3), 431-434.
- [114] C. Schmuck, V. Bickert, Oxoanion Binding by Flexible Guanidiniocarbonyl Pyrrole-Ammonium Biscations in Water. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6832-6839.
- [115] M. A. Hossain, H.-J. Schneider, Flexibility, Association Constants, and Salt Effects in Organic Ion Pairs: How Single Bonds Affect Molecular Recognition. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, (4), 1284-1290.
- [116] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 4. ed., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, **1991**.
- [117] J. W. Harbuck, H. Rapoport, Facile Introduction of Ester Groups into the Pyrrole Nucleus via Trichloroacetylation and Alcoholysis. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3618-3621.
- [118] L. Noss, P. A. Liddell, A. L. Moore, T. A. Moore, D. Gust, *J. Phys. Chem. B* **1997**, (101), 458-465.
- [119] L.-h. Zhang, G. S. Kauffman, J. A. Pesti, J. Yin, Rearrangement of *N* α -Protected *L*-Asparagines with Iodosobenzene Diacetate. A Practical Route to β -Amino-*L*-alanine Derivatives. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6918-6920.
- [120] B. Aebischer, P. Frey, H.-P. Haerter, P. L. Herrling, W. Mueller, Synthesis and NMDA Antagonistic Properties of the Enantiomers of 4-(3-Phosphonopropyl)piperazine-2-carboxylic Acid (CPP) and of the Unsaturated Analogue (E)-4-(3-Phosphonoprop-2-enyl)piperazine-2-carboxylic Acid (CPP-ene). *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 1043-1051.

9.2 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström	K _{Ass}	Assoziations-, Bindungskonstante
Äquiv.	Äquivalente	K _{Diss}	Dissoziationskonstante
Abb.	Abbildung	L	Liter
abs.	absolutiert	Leu	Leucin (L)
Ala	Alanin (A)	Lsm	Lösemittel
Asp	Asparaginsäure (D)	Lys	Lysin (K)
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)amino- tris(hydroxymethyl)methan)	M	molar
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	mbar	Millibar
Bn	Benzyl	Me	Methyl
°C	Grad Celsius	mol	Mol
CBS	Carboxylat-Bindungsstelle	MS	Massenspektrometrie
Cbz	Benzyloxycarbonyl	m/z	Masse pro Ladung
CIS	complexation induced shift	m	Meter
Dns	5-Dimethylaminonaphtalen-1- sulfonyl	NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
DC	Dünnschichtchromatographie	NMR	Kernresonanzspektroskopie
DCM	Dichlormethan	PIDA	Jodbenzol-diacetat
DIAD	Diisopropyldicarboxylat	Ph	Phenyl
DIC	<i>N, N</i> -Diisopropylcarbodiimid	Phe	Phenylalanin (F)
DIPEA	<i>N, N</i> -Diisopropylethylamin	pK _s	Säurekonstante
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin	ppm	parts per million
DMF	<i>N, N'</i> -Dimethylformamid	PyBOP	Benzotriazol-(1-yl-oxo)-tripyrroli- dinophosphonium-hexafluoro- phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid	quant.	quantitativ
EE	Essigester	R	Rest
eq	Äquivalent(e)	R _f	Retentionsfaktor
Et	Ethyl	s	Sekunde
Fmoc	9 <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl	Sdp.	Siedepunkt
FT-IR	Fourier-Transformation- Infrarotspektroskopie	Ser	Serin (S)
g	Gramm	Smp.	Schmelzpunkt
ges.	gesättigt	Tab.	Tabelle
Glu	Glutaminsäure (E)	<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
HCTU	5-Chloro-1-[bis(dimethylamino) methylene]-1 <i>H</i> -benzotriazolium- 3-oxid-hexafluorophosphat	Tf	Trifluormethansulfonsäure
Hz	Hertz	TFA	Trifluoressigsäure
IR	Infrarotspektroskopie	THF	Tetrahydrofuran
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie	TNP	Trinitrophenol, Pikrinsäure
J	Joule	Trp	Tryptophan (W)
K	Kelvin	Tyr	Tyrosin (Y)
		UV	Ultraviolett-Spektroskopie
		Val	Valin (V)
		verd.	verdünnt