

**Funktionelle ionische Schutzgruppen für die
Peptidsynthese und Reinigung**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Benjamin Wolfgang Hankeln

aus Deutschland

Basel, 2010

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag von

Prof. Dr. Helma Wennemers

Prof. Dr. Bernd Giese

Basel, den 22.06.2010

Prof. Dr. Eberhard Parlow
(Dekan)

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Helma Wennemers in der Zeit von Januar 2006 bis Mai 2010 am Department Chemie der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel durchgeführt.

Im Nebel

*Seltsam, im Nebel zu wandern!
Einsam ist jeder Busch und Stein,
Kein Baum sieht den andern,
Jeder ist allein.*

*Voll von Freunden war mir die Welt,
Als noch mein Leben licht war;
Nun, da der Nebel fällt,
Ist keiner mehr sichtbar.*

*Wahrlich, keiner ist weise,
Der nicht das Dunkel kennt,
Das unentrinnbar und leise
Von allen ihn trennt.*

*Seltsam, im Nebel zu wandern!
Leben ist Einsamsein.
Kein Mensch kennt den andern,
Jeder ist allein.*

(Hermann Hesse)

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Helma Wennemers für die Möglichkeit zur Dissertation in ihrem Arbeitskreis bedanken. Insbesondere habe ich mich sehr über die gewährte Freiheit und das in mich gesetzte Vertrauen bei der Bearbeitung des interessanten und anspruchsvollen Themas gefreut.

Prof. Dr. Bernd Giese danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei Dr. Thomas Vorherr und Dr. Fritz Dick von der Bachem AG möchte ich mich für die Zusammenarbeit im Rahmen meiner Dissertation und das entgegen gebrachte Vertrauen bedanken. Prof. Dr. Klaus Müller und Dr. Karsten Fährlich danke ich für die Hilfe bei der Untersuchung der Nicotinsäurederivate.

Ich danke allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit und die schöne Zeit, insbesondere meinen Laborkollegen Cornelius Pfumbidzai und Paolo Clerici. Danken möchte ich auch allen Studenten, die im Rahmen ihrer Praktika bei diesem Projekt mitgeholfen haben. Besonders erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang Timo Marks, Pascal Hess und Karoline Kersten. Ein großer Dank auch an Dr. Rolf Kramer für das schnelle Korrekturlesen der Arbeit und seine hilfreichen Anmerkungen.

Ein großes Dankeschön auch an alle Mitarbeiter des Instituts, die durch Ihre Arbeit in der Werkstatt, der Materialausgabe und dem Sekretariat diese Arbeit unterstützt haben. Insbesondere möchte ich mich bei Markus Hauri und Andreas Koller für Ihre freundliche Unterstützung bedanken. Dr. Heinz Nadig möchte ich für die Aufnahme zahlreicher Massenspektren und interessante Diskussionen zur Massenspektroskopie danken. Bei Markus Neuburger und Dr. Silvia Schaffner möchte ich mich für die Röntgenstrukturanalysen bedanken. Ich danke Prof. Dr. Stephan Grzesiek für die großzügige Erlaubnis, seine HPLC-MS benutzen zu dürfen.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der Universität Basel, der Bachem AG und dem Schweizerischen Nationalfonds.

Ein großer Dank an meine Familie und Freunde für die Unterstützung vor und während dieser Arbeit. Ganz besonders möchte ich mich bei Lydia Nisius für ihre Hilfe, Unterstützung, anregende Diskussionen und vor allem die schöne Zeit bedanken.

Zusammenfassung

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines ionischen *Tags*, welcher über einen basenlabilen Linker an ein in Wasser schwerlösliches Peptid auf der festen Phase gekuppelt werden kann. Die hohe Polarität des *Tags* soll die Wasserlöslichkeit des Peptids erhöhen, um dessen Reinigung mittels präparativer RP-HPLC zu ermöglichen. Die *Tags* wurden direkt an ein schwerlösliches, festphasengebundenes Modellpeptid gekuppelt. Die Löslichkeit von Peptiden mit verschiedenen *Tags* wurde experimentell bestimmt und der Einfluss des Anions untersucht. Dabei zeigte sich, dass Peptide mit einfach geladenem *Tag* besser löslich als das Modellpeptid sind. Darüber hinaus konnte ein Einfluss des Anions beobachtet werden. Ein dreifach geladenen *Tag* erhöhte die Löslichkeit des Modellpeptids so stark, dass mit der vorhandenen Substanzmenge keine gesättigte Lösung hergestellt werden konnte.

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass die Spaltung des *Tags* vom Peptid möglich ist und der ionische *Tag* einfach vom Peptid abgetrennt werden kann.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Entwicklung einer funktionellen ionischen Schutzgruppe. Der Unterschied zu dem im ersten Teil vorgestellten *Tag*-Ansatz ist, dass in diesem Fall die Schutzgruppe an die zu kuppelnde Aminosäure gebunden wird. Sie wirkt in diesem Fall tatsächlich als Schutzgruppe während der Peptidsynthese. Es wurden unterschiedliche Routen für die Synthese der Aminosäurederivate entwickelt. Die hergestellten Derivate wurden erfolgreich für die Peptidsynthese verwendet.

Darüber hinaus zeigten sie eine große Löslichkeit in Wasser. Dies ermöglicht eventuell die Peptidsynthese in wässriger Lösung. Es gelang, das mit der ionischen Schutzgruppe versehene Glycinderivat an zwei verschiedenen Harzen zu kuppeln.

Im dritte Teil wird die Synthese säurelabiler ionischer Schutzgruppen für die Seitenketten von Aminosäuren behandelt. Diese sollen während der Synthese von Peptiden mit schwierigen Sequenzen die Bildung von Aggregaten verhindern, die Löslichkeit der wachsenden Peptidkette erhöhen und so deren Synthese erleichtern. Es wurden von t-Buthylether und -ester abgeleitete ionische Schutzgruppe sowie je ein ionisches Analogon zur Boc- und der Cbz-Gruppe entwickelt. Die einzelnen Schutzgruppen konnten synthetisiert und charakterisiert werden. Erste Versuche zur Schützung verschiedener Aminosäurederivate wurden unternommen und zeigten ermutigende Ergebnisse. Die endgültige Charakterisierung der fertigen Aminosäurederivate steht noch aus.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten ionischen Verbindungen stellten erhebliche Anforderungen an die Entwicklung geeigneter Analyse- und Trennverfahren. Die Erfahrungen aus diesem Bereich werden im vierten Teil dargestellt. Diese Techniken stellten die Grundlage für alle, in den ersten drei Teilen beschriebenen, synthetischen Arbeiten dar.

Im letzten Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchung eines Nicotinsäurederivats beschrieben. Die Kupplung dieses Derivats an die feste Phase bereitete unerwartete Schwierigkeiten. Durch verschiedene Untersuchungen konnten Hinweise auf die Ursache der ungewöhnlich niedrigen Löslichkeit des gereinigten Nicotinsäurederivats erhalten werden.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Einleitung	3
1.1. Peptidchemie: Ihre Entwicklung und Bedeutung	3
1.2. Probleme bei der Synthese von Peptiden an der festen Phase	7
1.2.1. Schwierige Sequenzen	7
1.2.2. Deutung der experimentellen Ergebnisse und daraus entwickelte Lösungsansätze	9
1.3. Ökonomische und Ökologische Probleme der Peptidsynthese	13
1.3.1. Darstellung der (möglichen) Probleme	13
1.3.2. Alternative Konzepte für die Peptidsynthese	14
1.4. Peptide mit geringer Löslichkeit	17
1.4.1. Löslichkeit und Lösungsvorgänge	17
1.4.2. Schwerlösliche Peptide	25
1.4.3. Bekannte Ansätze zur Erhöhung der Löslichkeit von Peptiden	27
1.5. Ionische Flüssigkeiten	33
1.5.1. Definition und Strukturmerkmale	33
1.5.2. Eigenschaften von Ionischen Flüssigkeiten und deren gezielte Manipulation	33
1.5.3. Synthese und Reinigung von Ionischen Flüssigkeiten	36
1.5.4. Anwendung von Ionischen Flüssigkeiten	37
1.6. Dissertationsprojekt	41
II. Ergebnisse	43
2. Entwicklung von <i>Tags</i> zur Erhöhung der Löslichkeit von Peptiden	45
2.1. Konzeption des <i>Tag</i> -Ansatzes	45
2.1.1. Zielsetzung des <i>Tag</i> -Ansatzes	45
2.1.2. Allgemeines Design der funktionellen Schutzgruppe zur Erhöhung der Löslichkeit von Peptiden	45

2.2.	Synthese des basenlabilen Linkers	50
2.2.1.	Synthese des Linkers Cl-B _{red} -OH	50
2.2.2.	Selektive Oxidation des Thioethers zum Sulfon	50
2.3.	Mehrfach geladene <i>Tags</i>	53
2.4.	Kupplung der <i>Tags</i> an den basenlabilen Linker	55
2.4.1.	Synthese des mit einem einfach geladenen <i>Tag</i> versehenen Linkers	55
2.4.2.	Synthese des mit einem dreifach geladenen <i>Tag</i> versehenen Linkers	55
2.5.	Kupplung der <i>Tags</i> an H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotrityl	56
2.5.1.	Synthese des Referenzpeptids	56
2.5.2.	Kupplung der <i>Tags</i> an das festphasengebundene Peptid	56
2.6.	Bestimmung der Löslichkeit der Peptide und des Einflusses der <i>Tags</i>	63
2.6.1.	Diskussion der verschiedenen Methoden zur Quantifizierung der Löslichkeit	63
2.6.2.	Kalibrierung der HPLC	69
2.6.3.	Bestimmung der Löslichkeit verschiedener Peptide mit Hilfe der HPLC	71
2.7.	Untersuchung der Abspaltung des <i>Tags</i>	77
2.7.1.	Spaltung des Linkers durch verschiedene Basen	77
2.7.2.	Abtrennung des abgespaltenen Linkers vom Peptid	79
2.8.	Zusammenfassung und Ausblick	80
3.	Synthese von wasserlöslichen funktionellen Schutzgruppen für Aminosäuren	83
3.1.	Entwurf einer N-terminalen wasserlöslichen Schutzgruppe	83
3.1.1.	Konzeption der basenlabilen, ionischen Schutzgruppe	83
3.1.2.	Design der basenlabilen, ionischen Schutzgruppe	83
3.2.	Schützungen von Aminosäuren mit der ionischen Schutzgruppe	86
3.2.1.	Überblick	86
3.2.2.	Route 1: Kupplung des Linkers an die freie Aminosäure und anschließender Aufbau der Schutzgruppe	88
3.2.3.	Route 2: Kupplung des Linkers an die C-terminal geschützte Aminosäure und anschließender Aufbau der Schutzgruppe	101
3.2.4.	Route 3: Kupplung der ionischen, nichtoxidierten Schutzgruppe an Aminosäuren	107

3.2.5.	Route 4: Verwendung des <i>Tag</i> -Ansatzes zur Synthese geschützter Aminosäuren	114
3.2.6.	Direkte Kontrolle der Stereochemie der Aminosäurederivate	116
3.3.	Peptidkupplung	119
3.3.1.	Verwendung der mit ionischen <i>Tags</i> versehenen Peptide	119
3.3.2.	Anforderungen an das Testpeptid	120
3.3.3.	Herstellung der Testpeptide	120
3.3.4.	Kupplung von 51 (MIM-B _{ox} -Ser(tBu)-OH), 67 (Me ₃ N-B _{ox} -Ser(tBu)-OH) und 68 (DMIM-B _{ox} -Ser(tBu)-OH) an das Testpeptid 16 (H-Phe-Trp(Boc)-Ala-)	122
3.4.	Ansätze zur Peptidsynthese in Wasser	125
3.4.1.	Voruntersuchungen des Harzes und der N-terminal geschützten Aminosäurederivate	125
3.4.2.	Prinzipieller Test der Peptidkupplung in Wasser	126
3.5.	Zusammenfassung und Ausblick	128
4.	Funktionelle Schutzgruppen zur Vermeidung von Aggregation	131
4.1.	Entwurf der säurelabilen Schutzgruppen	131
4.2.	Synthese einer ionischen Schutzgruppe für Hydroxy-Gruppen	133
4.2.1.	Entwurf der Schutzgruppe für die Alkoholfunktion des Serins	133
4.2.2.	Überblick über die Syntheserouten	133
4.2.3.	Herstellung von <i>tert</i> -Butylethern	134
4.2.4.	Synthese der Alkene	136
4.2.5.	Schützung von Z-Ser-OBn mit dem Alken 84	139
4.2.6.	Nucleophile Substitution des Chlors im Serinderivat 85 durch 1-Methylimidazol (Einführung des <i>Tags</i>)	140
4.2.7.	Abspaltung der Cbz- und Benzylschutzgruppe	141
4.2.8.	Schützung der Aminogruppe des Serinderivats 87 mit Fmoc-Cl	142
4.2.9.	Synthese des Ethers ausgehend von Alkoholen	144
4.2.10.	Entwurf einer Silylschutzgruppe	145
4.3.	Synthese einer ionischen Schutzgruppe für Carbonsäuren	147
4.3.1.	Entwurf der Schutzgruppe	147
4.3.2.	Synthese der Schutzgruppe	147
4.3.3.	Veresterung der Schutzgruppe mit Z-Asp-OBn	148
4.3.4.	Entschützung des Asparaginsäurederivats 99	149
4.3.5.	Schützung des Amins des Asparaginsäurederivats 100 mit Fmoc-Cl	150

4.3.6.	Veresterung von Fmoc-Asp-OAll mit dem tertiären ionischen Alkohol 98	150
4.3.7.	Spaltung des Allylesters des Asparaginsäurederivats 102	150
4.4.	Ansätze zur Synthese einer ionischen Schutzgruppe für Amine vom Boc-Typ	152
4.4.1.	Aktivierung des ionischen Alkohols 98 als Carbonat	152
4.4.2.	Schützung von Fmoc-Lys-OH mit dem aktivierten Carbonat 103	153
4.5.	Ansätze zur Synthese einer ionischen Schutzgruppe für Amine vom Cbz-Typ	154
4.5.1.	Synthese des Phenolethers	154
4.5.2.	Herstellung der Schutzgruppe	155
4.5.3.	Aktivierung mit p-Nitrophenolchloroformat und direkte Kupplung an Fmoc-Lys-OH	156
4.6.	Zusammenfassung und Ausblick	158
5.	Analytik und Reinigung ionischer Verbindungen	161
5.1.	Analytik	161
5.2.	Reinigung	164
5.3.	Zusammenfassung und Ausblick	168
6.	Untersuchungen an Nicotinsäurederivaten	171
6.1.	Nicotinsäurederivate als Katalysator	171
6.1.1.	Nicotinsäurederivate in enzymatischen Reaktionen	171
6.1.2.	Nicotinsäurederivate als Organokatalysatoren	172
6.2.	Synthese und Untersuchung von Nicotinsäurederivaten	174
6.2.1.	Synthese der Nicotinsäurederivate	174
6.2.2.	Analyse der umkristallisierten und nicht umkristallisierten N-alkylierten Nicotinsäurederivate	175
6.2.3.	Diskussion des Ergebnisses	176
6.3.	Untersuchung des Effekt des Kristallgitters	179
6.4.	Zusammenfassung und Ausblick	181

III. Experimenteller Teil	183
7. Experimenteller Teil	185
7.1. Allgemeines	185
7.1.1. Abkürzungsverzeichnis	185
7.1.2. Geräte und Materialien	189
7.2. Synthese der Verbindungen	192
7.2.1. Wittigreaktion zur Herstellung von Alken 80	192
7.2.2. Synthese der Alkene 82 , 83 , 84 und 90	193
7.2.3. Ansatz zur Synthese der Zielverbindung 88	196
7.2.4. Durchführung der Grignardreaktionen zur Synthese der Alkohole 92 und 93	199
7.2.5. Ansatz zur Synthese einer ionischen Silylschutzgruppe	201
7.2.6. Synthese der Zielverbindung 101	202
7.2.7. Ansatz zur Synthese einer ionischen Boc-Schutzgruppe	205
7.2.8. Ansatz zur Synthese einer ionischen Z-Schutzgruppe	206
7.2.9. Synthese der mehrfach geladenen <i>Tags</i>	209
7.2.10. Synthese des Linkers, Aktivierung und Kupplung an verschiedene Aminosäurederivat	216
7.2.11. Herstellung des Glycinderivats 52	224
7.2.12. Veresterung von 34 mit Benzylbromid	226
7.2.13. Kupplung des Linkers an H-Ser(tBu)-OH	227
7.2.14. Herstellung des Linkers mit dreifach geladenen <i>Tag</i>	228
7.2.15. Herstellung des Linkers mit verschiedenen einfach geladenen <i>Tags</i> , Aktivierung und Kupplung an H-Ser(tBu)-OH	232
7.2.16. Herstellung des oxidierten Linkers 8	238
7.2.17. Herstellung des oxidierten Linkers mit einfach und dreifach geladenem <i>Tag</i>	242
7.2.18. Herstellung der geschützten Aminosäurederivate nach dem <i>Tag</i> -Ansatz	244
7.2.19. Herstellung der Nicotinsäurederivate	247
7.2.20. Peptidsynthesen an der festen Phase	249
7.2.21. Kupplung der <i>Tags</i> an festphasengebundene Peptide	254
7.2.22. Peptidsynthese in Wasser	256
7.2.23. Kupplung des N-alkylierten Nicotinsäurederivats an die feste Phase	257

7.3. Beschreibung der Experimente zur Bestimmung des Monomer - Dimer Verhältnisses	258
7.4. Beschreibung der Experimente zur Bestimmung der Löslichkeit	259
7.4.1. Herstellung der gesättigten Lösungen	259
7.4.2. Bestimmung der Löslichkeit mittels HPLC	259
7.4.3. Bestimmung der Löslichkeit nach dem gravimetrischen Ver- fahren	262
7.5. Beschreibung der Experimente zur Spaltung und Abtrennung des ba- senlabilen Linkers	265
7.5.1. Durchführung der Spaltungsexperimente	265
7.5.2. Durchführung des Experiments zur Abtrennung des Linkers	266
7.6. Daten der Kristallstrukturen	267
7.6.1. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 10	267
7.6.2. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 12	267
7.6.3. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 13 ·Br ⁻	268
7.6.4. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 14 ·PF ₆ ⁻	268
7.6.5. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 51	269
7.6.6. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 85	269
7.6.7. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 98	270
7.6.8. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 106	270
7.6.9. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 109 ·Br ⁻	271
7.6.10. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 109 ·PF ₆ ⁻	272
7.6.11. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 113	272
7.7. Ergebnisse der DSC und Thermogravimetrie	275
8. Anhang	277
8.1. Anhang A1: Definition des Quotienten q	277
8.2. Anhang A2: Abschätzung der Reinheit	280
Literaturverzeichnis	283

Teil I.

Einleitung

1. Einleitung

1.1. Peptidchemie: Ihre Entwicklung und Bedeutung

Peptide und Proteine spielen in der Natur eine Schlüsselrolle. Sie fungieren in Lebewesen unter anderem als Stützsubstanzen (z.B. Kollagen), Botenstoffe (z.B. Leu-Enkephalin) und als Katalysatoren (z.B. Carboanhydrase). 1902 erkannten F. Hoffmeister und E. Fischer unabhängig voneinander, dass Proteine aus Aminosäuren aufgebaut sind.^{1,2} Vor Entwicklung moderner Trenn- und Analysetechniken war der experimentelle Nachweis dieser Tatsache sehr mühsam. Die Proteine mussten erst isoliert und vollständig hydrolysiert werden. Dann wurden die Aminosäuren verestert und durch fraktionierende Destillation getrennt. Anschließend wurden die Ester verseift und die freien Aminosäuren anhand ihres Schmelzpunktes und der Elementaranalysen identifiziert.

Auch die Entwicklung der für die Peptidchemie extrem wichtigen Schutzgruppen geht auf E. Fischer zurück. Die von ihm eingeführte Ethoxycarbonylgruppe konnte durch Basen allerdings nicht abgespalten werden (Abb. 1.1). Statt dessen kam es zu einer Umlagerungsreaktion bei der eine Uridosäure gebildet wurde:

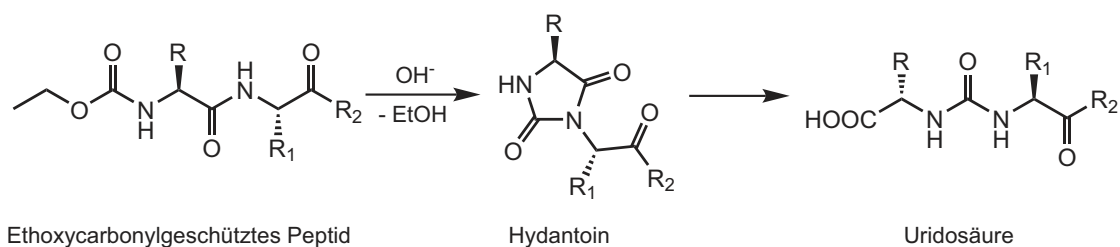


Abbildung 1.1.: Die basenkatalysierte Umlagerung der Ethoxycarbonylgruppe

Trotz allem gelang E. Fischer schon 1907 die Synthese eines Peptids mit 18 Aminosäuren.³ Erst 1931 stellten M. Bergmann und L. Zervas mit der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe die erste für die Peptidsynthese wirklich brauchbare Schutzgruppe vor.⁴ 1939 fasste O. Diels das Wissen über die Struktur und den Aufbau der Peptide und Proteine in seinem Lehrbuch „Organische Chemie“ zusammen:⁵
„Die Hoffnung, das „Eiweissproblem“ durch einen systematischen Aufbau der Poly-

peptide und durch das Studium der bei der vorsichtigen Spaltung der Proteine beobachteten Vorgänge zu lösen ist bis jetzt nicht in Erfüllung gegangen.

Ob es sich hierbei um Diketopiperazine (E. Aberhalden), Oxazoline (M. Bergmann) oder andere Ringförmige Systeme handelt, hat sich bis jetzt nicht entscheiden lassen. Hier Aufklärung zu schaffen, ist eine für den Chemiker, Physiologen und Biologen gleich wichtige Aufgabe. Denn zu den Proteinen stehen in naher Beziehung die Fermente, Toxine und Antitoxine, über die wir kaum die bescheidensten Vorstellungen haben. Für ihre Erkenntnis wird ein klarer Blick in den Bau der Eiweißstoffe eine unerlässliche Vorbedingung sein.“

1963 wurde die Peptidsynthese von B. Merrifield durch die Entwicklung der Festphasensynthese drastisch vereinfacht.^{6,7} Für seine damals vorgestellte Synthese des Tetrapeptids H-Leu-Ala-Gly-Val-OH (und darauf aufbauende Arbeiten) wurde er 1984 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Dies unterstreicht die enorme Bedeutung dieser Technik für die Wissenschaft. Sie beschleunigte die Synthese von Peptiden sehr stark und förderte so die Entwicklung der Peptidchemie ungemein. Auch in anderen Bereichen der organischen Chemie wurden durch die Festphasensynthese neue Möglichkeiten geschaffen. Als Beispiele seien neben der Peptidsynthese die Entwicklung festphasengebundener Reagenzien, die automatische Synthese großer Bibliotheken und die Split- und Mix-Technik im Bereich der kombinatorischen Chemie angeführt. Da diese Technik die Peptidsynthese revolutioniert hat, soll ihr Konzept kurz beschrieben werden (Abb. 1.1).

Die feste Phase besteht oft (z.B. bei dem von B. Merrifield beschriebenen Verfahren) aus mit 2% Divinylbenzol quervernetztem Polystyrol. Dadurch ist das Polymer nicht mehr in den verwendeten Lösungsmitteln löslich, sondern wird nur noch gequollen. Durch dieses Quellen können die Reagenzien an die Beladungsstellen diffundieren. Zudem wird die Reinigung erheblich erleichtert, da die Harzkügelchen von einem Filter oder einer Fritte zurückgehalten werden, während mit dem gewünschten Lösungsmittel gewaschen wird. Dies erlaubt den Einsatz großer Reagenzienüberschüsse und damit hohe Umsätze. Die einfache Reinigung ist darüber hinaus ein wichtiger Aspekt für die Automatisierung der Festphasensynthese.

Bei der Festphasensynthese von Peptiden wird zuerst eine am Amin geschützte Aminosäure über einen spaltbaren Linker über die Carbonsäure kovalent an die feste Phase gebunden. Dann erfolgt die Entfernung überschüssiger Reagenzien durch Waschen des Harzes. Im Anschluss wird, ähnlich wie bei der Peptidsynthese in Lösung, die Schutzgruppe am Amin abgespalten. Nach einer weiteren Reinigung durch mehrmaliges Waschen des Harzes mit den gewünschten Lösungsmitteln wird die nächste Aminosäure gekuppelt. Dies wird so lange fortgesetzt, bis die gewünschte Sequenz

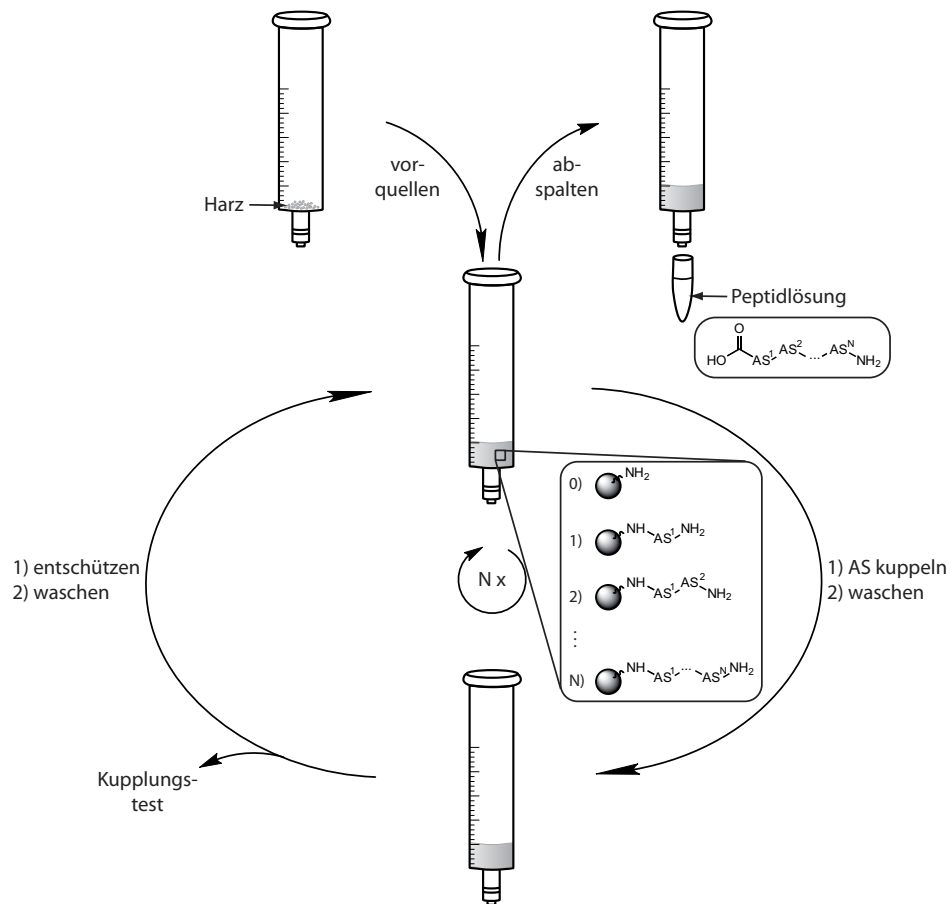


Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung der Festphasensynthese von Peptiden

synthetisiert ist. Das Peptid wird durch behandeln des Harzes mit einer Spaltlösung von der festen Phase entfernt, gereinigt und weiterverwendet.

Die hier kurz skizzierten und weitere Arbeiten zur Peptidsynthese im Allgemeinen und zur Festphasensynthese im Besonderen legten den Grundstein für die enormen Fortschritte im Bereich der Peptid- und Proteinchemie. Peptide dienen heute unter anderem als Leitstrukturen für die Entwicklung von Wirkstoffen.^{8,9} Trotz der negativen pharmakokinetischen Eigenschaften vieler Peptide wird versucht, sie in der Therapie intensiver zu nutzen.¹⁰ Auch außerhalb der Medizin werden Peptide auf Ihre Anwendbarkeit für vielfältige Aufgaben untersucht. Für den Einsatz im Bereich der Materialwissenschaften (z.B. Bildung von Nanopartikeln, künstliche Rezeptoren und Molekulare Erkennung), der Katalyse und als Modelle für Elektronentransportprozesse werden Peptide ebenfalls getestet. Die ökonomische Bedeutung von Peptiden wird durch den wirtschaftlichen Aufschwung in diesem Bereich verdeutlicht. Dies zeigt sich eindrucksvoll am Erfolg von Firmen wie beispielsweise Bachem, Novabiochem, Alltech und vielen anderen.

Trotz aller Fortschritte ergeben sich bei der Herstellung scheinbar trivialer Peptide aber auch heute noch unerwartete Probleme während der Synthese und Reinigung.

1.2. Probleme bei der Synthese von Peptiden an der festen Phase

1.2.1. Schwierige Sequenzen

Bald nach der erfolgreichen Einführung der Festphasensynthese gab es unerwartete Probleme bei der Herstellung scheinbar einfacher Sequenzen. 1967 zeigte sich bei der Synthese von Angiotensylbradykinin im Labor von B. Merrifield, dass die Kuppelungseffizienz nach der elften Aminosäure deutlich geringer wurde.⁹ Dieses Problem wurde auf zwei verschiedene Arten angegangen. B. Merrifield nahm an, dass die Quellfähigkeit des Harzes zu gering ist. Durch Verwendung eines weniger stark quervernetzten Polystyrolharzes und stärker quellender Lösungsmittel (z.B. durch Einsatz von DMF oder Mischungen davon) konnten die Probleme teilweise überwunden werden.¹¹ Nach R. Sheppard dagegen beruhten die Probleme auf der Inkompatibilität von unpolarem Trägermaterial (Polystyrol) und dem eher polaren Peptid.⁹ Er führte deshalb quervernetztes Polydimethylacrylamid als Harz ein. Dieses Polymer ist deutlich polarer als Polystyrol. Mit diesem Material gelang ihm dann auch die Synthese der bis dahin schwierigen Sequenzen.

Im Laufe der Zeit wuchs das Wissen über diese Probleme stetig an. Es stellte sich heraus, dass die Schwierigkeiten nicht immer mit den beiden oben dargestellten Ansätzen gelöst werden konnten. Mit wachsender Erfahrung in der Festphasensynthese von Peptiden zeigten sich Muster, wann Probleme bei der Synthese gehäuft auftreten oder eher unwahrscheinlich sind:¹²

- Die Probleme treten plötzlich zwischen der sechsten und zwölften Aminosäuren auf.
- Besonders häufig treten Schwierigkeiten mit Alanin, Isoleucin, Methionin und Lysin auf.
- Selten gibt es Probleme bei Prolin, Arginin und Histidin enthaltenden Sequenzen.

Die wachsende Zahl an bekanntermaßen schwierigen Sequenzen ermöglichte auch die genauere experimentelle Untersuchung des Phänomens. Damit konnte schon während der Synthese das Auftreten von Problemen erkannt werden. Es ergaben sich aber auch Hinweise, welche Prozesse an den Problemen beteiligt sind.

- Sowohl Entschützungs- als auch Acetylierungsreaktionen verlaufen deutlich langsamer.

- Das Volumen des gequollenen Harzes verringert sich um bis zu 50%.
- Die Signale im ^{13}C -NMR Spektrum sind verbreitert.
- Im IR-Spektrum zeigen sich für β -Faltblattstrukturen typische Schwingungen der Amidbindungen

Diese experimentellen Ergebnisse lassen vermuten, dass es zur Aggregation der wachsenden Peptidketten im Inneren des Harzes kommt. Dabei bilden sich entweder intra- oder intermolekulare β -Faltblattstrukturen (für eine schematische Darstellung von β -Faltblattstrukturen siehe Abb. 1.3, für eine Skizze der aufgrund von β -Faltblattstrukturen entstehenden Aggregate siehe Abb. 1.4).

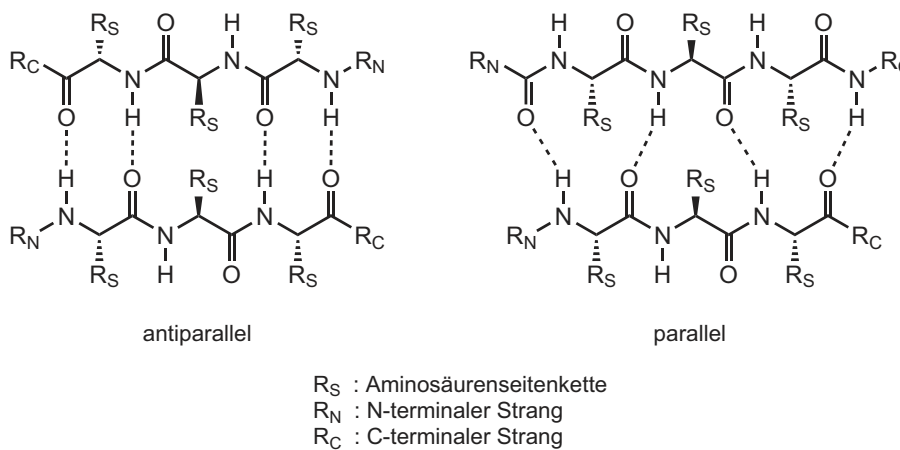


Abbildung 1.3.: Antiparallele und parallele β -Faltblattstrukturen

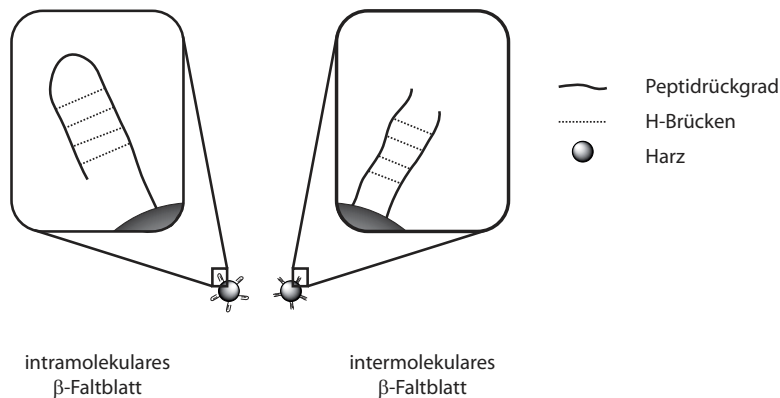


Abbildung 1.4.: Schematische Darstellung der Aggregation aufgrund von intra- und intermolekularen β -Faltblattstrukturen

Die Deutung der Ergebnisse ist allerdings unterschiedlich. Im Prinzip handelt es sich um ein „Henne und Ei“ Problem: was ist die Ursache der Probleme und was die

Folge. Die beiden verschiedenen Ansätze und die daraus resultierenden Lösungsvorschläge werden nachfolgend getrennt besprochen.

1.2.2. Deutung der experimentellen Ergebnisse und daraus entwickelte Lösungsansätze

1.2.2.1. β -Faltblattstrukturen führen zur Aggregation und damit zu einer Verringerung der Löslichkeit

Eine Gruppe von Wissenschaftlern (z.B. R. Sheppard *et al.* und M. Mutter *et al.*), nimmt als Ursache der Schwierigkeiten bei der Synthese mancher Peptide die Bildung von inter- oder intramolekularen β -Faltblattstrukturen an.^{13,14} Diese stellen stabile Strukturen dar, sind schwer löslich (ähnlich den Prionen) und erschweren die weitere Kupplung von Aminosäuren.¹⁵ Diese Forscher versuchten als Lösung des Problems die Bildung von β -Faltblättern zu verhindern. Aus dieser Betrachtung entwickelten sich sehr erfolgreiche Ansätze.

- Wenn sich Prolin im C-terminalen Bereich der Peptidkette befindet, kommt es sehr selten zu Problemen bei der weiteren Synthese. Dieses Phänomen wird mit der destabilisierenden Wirkung des Prolins auf β -Faltblattstrukturen erklärt. Prolin kann nicht beliebig in eine Peptidsequenz eingebaut werden, dies würde ein völlig anderes Molekül ergeben. Deshalb entwickelte M. Mutter die Pseudoprolin.¹⁶ Dabei handelt es sich um Oxazolidinone des Serins und Threonins. Diese Fünfringe haben eine dem Prolin ähnliche Geometrie und stören ebenso wie dieses die Bildung von β -Faltblattstrukturen. Die kommerziell erhältlichen Bausteine bestehen immer aus zwei Aminosäuren und können bequem für die Peptidsynthese verwendet werden. Ein weiterer Vorteil der Dipeptide ist, dass die Kette gleich um zwei Aminosäuren verlängert wird. Am Ende muss der Fünfring wieder zerstört werden, um das gewünschte Peptid zu erhalten. Der Ring stellt im Prinzip ein O,N-Acetal dar und ist säurelabil. Die Spaltung geschieht daher sehr effizient durch Behandlung mit TFA (Abb. 1.5)

Dieses Verfahren kann nur angewendet werden, wenn sich entweder Serin oder Threonin im C-terminalen Bereich des Peptids befindet. Ein weiterer Nachteil sind die höheren Kosten für die Bausteine, wenn man diese mit den einzelnen Aminosäuren vergleicht. Der Preis den man für eine Sache zu zahlen bereit ist, hängt von der Wichtigkeit der Sache und der Wahrscheinlichkeit des Erfolgs ab. Um die Bedeutung des Problems der Aggregation zu verdeutlichen wird daher

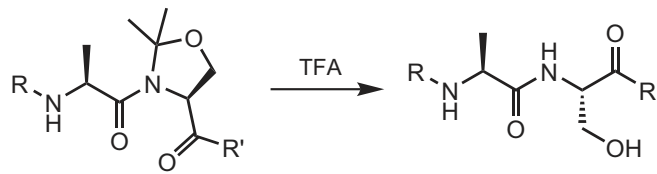


Abbildung 1.5.: Schema des Pseudoprolins am Beispiel R^1 -Ala-Ser(ψ Pro)- R^2

der konkrete Preis für die Lösung dieses Problems angegeben. Diese Preise mögen sich mit der Zeit ändern, auch kann es eine Verschiebung zwischen dem Aufwand für die einzelnen Methoden geben. Er ermöglicht jedoch eine ungefähre Einschätzung der Probleme aufgrund von schwierigen Sequenzen. Je ein mmol Fmoc-Ala-OH und Fmoc-Ser(tBu)-OH kosteten 2010 zusammen 3 €. ¹¹ Ein mmol des fertigen Synthesebausteins Fmoc-Ala-Ser($\psi^{Me,Me}$ pro)-OH kostete zum gleichen Zeitpunkt jedoch 36 €. ¹¹

- M. Mutter und Y. Kiso stellten unabhängig voneinander einen anderen Ansatz vor, der ebenfalls die Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur (β -Faltblattstruktur) verhindert. ¹⁷⁻²² Für diesen Ansatz ist es ebenfalls notwendig, dass in der Sequenz ein Serin vorhanden ist. Dieses wird als Boc-geschützte Variante eingesetzt und über die freie Hydroxyfunktion der Seitenkette mit der nachfolgenden Aminosäure verestert.

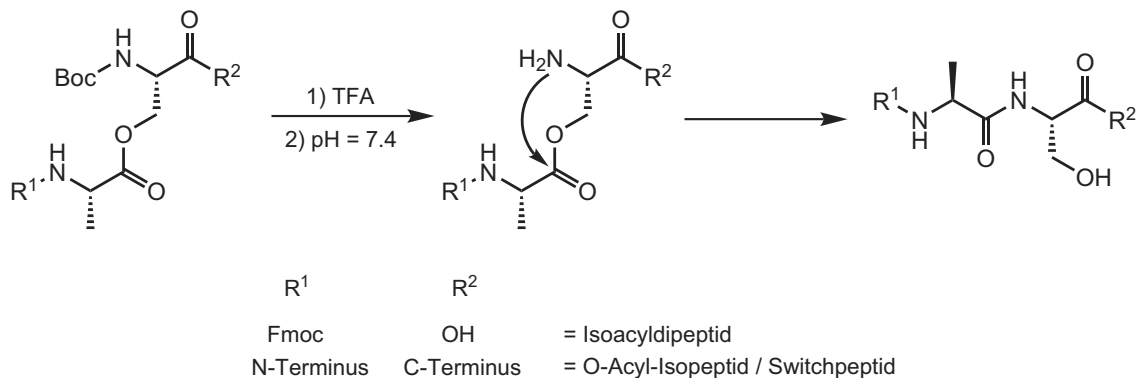


Abbildung 1.6.: Schema des O-Acyl-Isopeptid / Switchpeptid Ansatzes am Beispiel R^1 -Ala-Ser- R^2

Diese Esterbindung bietet eine größere Flexibilität, was die Bildung von stabilen Sekundärstrukturen energetisch benachteiligt. Beim Abspalten des Peptids vom Harz wird gleichzeitig die Boc-Gruppe vom Serin entfernt. Unter neutralen oder milden basischen Bedingungen lagert sich die Esterbindung zu einer Amidbindung um, wodurch das gewünschte Peptid erhalten wird. Ein Nachteil

in der Praxis ist, dass es bei der Aktivierung teilweise zum Verlust des Serinderivats kommt.²³ Der Preis für 1 mmol des Boc-Ser(Fmoc-Ala)-OH Bausteins betrug 2010 74 €.¹¹

- R. Sheppard und seine Mitarbeiter entwickelten einen anderen Ansatz um die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidketten zu verhindern. Sie schützten das Peptidrückgrat mit der N-2-hydroxy-4-methoxybenzyl (Hmb) Gruppe am Amidstickstoff. Ein Beispiel für die Anwendung dieser Schutzgruppe ist in Abbildung 1.7 dargestellt.

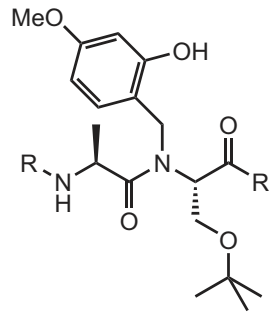


Abbildung 1.7.: Schema der Hmb-Schätzung am Beispiel von R-Ala-Ser(tBu)-R'

Durch die Hmb-Gruppe wird der Amid-Wasserstoff ersetzt. Die Ausbildung von Sekundärstrukturen wird so effektiv verhindert. Die Schutzgruppe wird nach der Synthese durch Behandlung mit TFA entfernt.^{24,25} Ein Nachteil dieser Strategie ist die manchmal geringe Effizienz bei der Kupplung der folgenden Aminosäure. Darüber hinaus ist der Preis der Synthesebausteine hoch, 2010 kostete ein mmol Fmoc-(FmocHmb)Ala-OH 269 €. Außerdem sind nur wenige derart geschützte Aminosäurederivate kommerziell erhältlich (2010 waren dies die Derivate von Alanin, Glycin, Leucin, Lysin, Phenylalanin und Valin).¹¹

1.2.2.2. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Peptide kommt es zur Bildung von β -Faltblattstrukturen

Im Gegensatz zu der Ansicht, dass die Ausbildung von β -Faltblattstrukturen der Grund für die Schwierigkeiten bei der Synthese mancher Sequenzen ist, sahen andere Wissenschaftler (z.B. B. Merrifield *et al.*) die geringe Löslichkeit der Peptide als Ursache an. Dies, so die Vermutung, führt dazu, dass sich die Aggregate zwischen den Peptidketten bilden.²⁶ Nach dieser Annahme sollten Maßnahmen, welche die Löslichkeit der Peptide auf der festen Phase erhöhen, die Bildung von β -Faltblattstrukturen vermeiden können. Da die Löslichkeit einer Substanz von vielen unterschiedlichen Parametern abhängt, wurde auch eine Vielzahl verschiedener Ansätze entwickelt:

- Verwendung polarer Harze^{14,27}
- Einsatz weniger stark quervernetzter Festphasen²⁸
- Geringere und gleichmässige Beladung der Harze²⁹
- Verwendung des dipolar aprotischen Lösungsmittels Dimethylformamid¹¹
- Zusatz von speziellen Lösungsmitteln wie Trifluorethanol, Hexafluorisopropanol oder Dimethylsulfoxid¹¹
- Beimischung chaotroper Salze wie Kaliumthiocyanat oder Lithiumchlorid²⁶
- Verwendung der 4-(3,6,9-trioxadecyl)oxabenzyl (TEGBz) Schutzgruppe für die Schützung der Seitenkette, um die Löslichkeit der wachsenden Peptidkette zu erhöhen (Abb. 1.8).³⁰

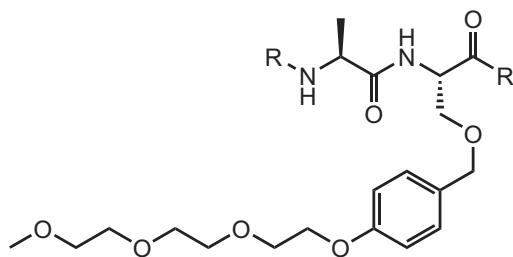


Abbildung 1.8.: Schema der Seitenketten-Schützung mit TEGBz am Beispiel von R-Ala-Ser-R'

Der letzte Ansatz kann eventuell auch verwendet werden, um die Löslichkeit von Peptiden bzw. Peptidfragmenten zu erhöhen.³⁰

Diese Auswahl zeigt, dass es schon viele verschiedene Ansätze zur Lösung des Problems der schwierigen Sequenzen gibt. Allerdings ist keiner dieser im Moment verfügbaren Lösungen allgemein anwendbar, manche haben auch spezifische Nachteile. Die Ansätze, welche auf einer Erhöhung der Löslichkeit beruhen, sind oft leicht umzusetzen, dafür aber nicht so effektiv wie die auf dem Verhindern der Aggregation beruhenden Vorschläge. Letztere sind aber im Allgemeinen teurer und stark von der Sequenz abhängig. Deshalb muss in jedem Fall individuell entschieden werden, welcher Ansatz am besten geeignet ist. Dies kann unter Umständen einen erheblichen experimentellen Aufwand erforderlich machen.

1.3. Ökonomische und Ökologische Probleme der Peptidsynthese

1.3.1. Darstellung der (möglichen) Probleme

Die Peptidsynthese an der festen Phase ist eine im Labormaßstab akzeptierte und vielseitige Technik. Im industriellen Maßstab ergeben sich jedoch Probleme, die bei kleinen Ansatzgrößen nicht besonders ins Gewicht fallen.³¹ Zum einen werden bei der Festphasensynthese die Reagenzien im großen Überschuss verwendet, um eine vollständige Reaktion in möglichst kurzer Zeit zu erreichen. Ein weiteres Problem sind die oft giftigen und als Sondermüll zu entsorgenden Reagenzien und Lösungsmittel. Insbesondere die Lösungsmittel werden in großen Mengen benötigt. Dies kann für Betriebe Probleme in drei Bereichen darstellen:

1.3.1.1. Kosten aufgrund gesetzlicher Vorschriften

Große Mengen Gefahrstoffe erhöhen die nötigen Sicherheitsmaßnahmen für Lagerung und Produktion. Giftige Stoffe erfordern aufgrund geringer Expositionsgrenzwerte umfangreiche technische und betriebliche Sicherheitsmaßnahmen (z.B. Absaugung, Verbot gewisse Stoffe zusammen zu lagern, Beschäftigungsverbote, Brandschutzvorschriften, ...). Diese stellen für die betroffenen Betriebe erhebliche Kostenfaktoren da. Aufgrund der zunehmenden Regulierung ist in Zukunft überdies mit restriktiveren Vorschriften zu rechnen, was diese Kosten noch erhöhen wird.

1.3.1.2. Mögliche Imageschäden

Die „grüne Chemie“ ist ein zunehmend wichtiger werdendes Thema für viele Betriebe. Durch publikumswirksame Kampagnen können auch ökologisch und ökonomisch korrekte Entscheidungen zu einem schweren Imageschaden führen. Dies hat für die betroffenen Betriebe zum Teil erhebliche wirtschaftliche Folgen.

Ein Beispiel dafür ist der Umgang von Presse und Öffentlichkeit mit der Shell AG, nachdem diese sich für die Versenkung der ausgedienten Ölplattform Brent Spar entschied. Eine von einer Umweltschutzorganisation entfachte, immer aggressivere Berichterstattung führte zu einem Kundenboykott und sogar zu Anschlägen auf Shell Tankstellen. Shell entschied sich aufgrund dieses öffentlichen Drucks die Plattform an Land zu entsorgen. Rückblickend musste die damals federführende Umweltschutzorganisation jedoch einräumen, dass die Vorwürfe übertrieben waren und eine Entsorgung an Land mehr ökologische Nachteile nach sich zog.³² Die Lehre aus diesem Ereignis ist, dass es am besten ist, öffentlichen Angriffen keinen Ansatzpunkt

zu geben.

Eine Orientierung an den Zielsetzungen der „grünen Chemie“ bietet eine Möglichkeit, das Risiko von Imageschäden zu verringern. Jedoch erfüllt die nach heutigen Standards durchgeführte Peptidsynthese fast keine Forderungen der „grünen Chemie“. ³³

1.3.1.3. Kosten der eingesetzten Chemikalien

Das Erfüllen von Forderungen der „grünen Chemie“ bietet nicht nur Vorteile für die Öffentlichkeitsarbeit sondern sollte sich für den betreffenden Betrieb auch wirtschaftlich rentieren. Jede Substanz, die weggeworfen wird, muss doppelt bezahlt werden: sowohl im Einkauf als auch bei der Entsorgung. Über die Verfügbarkeit von Lösungsmitteln machte man sich lange Zeit keine Gedanken. Erst der Engpass bei der Versorgung mit Acetonitril 2009 führte zu einem Umdenken. Selbst führende Händler für Laborbedarf konnten die Nachfrage nicht mehr befriedigen, und der Preis für dieses Lösungsmittel stieg stark an.

1.3.2. Alternative Konzepte für die Peptidsynthese

1.3.2.1. Verwendung weniger gefährlicher Lösungsmittel

In der konventionellen Peptidsynthese werden große Mengen potentiell gefährlicher Lösungsmittel wie DMF oder DCM verwendet. Schon seit 1975 gab es deswegen immer wieder Überlegungen, die Peptidsynthese in Wasser durchzuführen. ³⁴ Dies würde den E-Faktor nicht verändern (der E-Faktor ist eine 1994 von R. Sheldon eingeführte Maßzahl, um Prozesse hinsichtlich ihres Einflusses auf die Umwelt zu vergleichen). ³⁵ Der Wechsel zu Wasser würde jedoch die Kosten für den Kauf der Lösungsmittel reduzieren, eine deutlich reduzierte Toxizität sollte Einsparungen bei den Schutzmaßnahmen ermöglichen und die Entsorgung sollte einfacher und günstiger sein. Um tatsächlich Peptide an der festen Phase in Wasser herstellen zu können, müssen drei Bedingungen erfüllt sein:

1. Ein in Wasser ausreichend quellendes Harz

Soll die Synthese an der festen Phase erfolgen, so ist es erforderlich, ein in Wasser ausreichend quellendes Harz zu verwenden. Das von Merrifield eingeführte, quervernetzte Polystyrolharz quillt in polaren Lösungsmitteln und daher auch in Wasser nicht ausreichend gut. Da aber polare Medien für verschiedene Anwendungen von Interesse sind, wurden viele Versuche unternommen, Harze zu entwickeln, welche auch in Wasser gut quellen. Einer der ersten Ansätze

in dieser Richtung, der kommerziellen Erfolg hatte, war das Tentagel-Harz. Dieses besitzt einen Kern aus Polystyrol, an welchen Polyethylenglykolketten kovalent gebunden sind. In der Literatur sind Versuche beschrieben, in denen dieses Harz für die Peptidsynthese in Wasser eingesetzt wurde.³⁶ Sein Quellvermögen in Wasser war aber nicht ausreichend, um eine zuverlässige Peptidkupplung zu erzielen.³⁶ Inzwischen sind neue Harze entwickelt worden, welche in Wasser stärker quellen. Diese bestehen entweder aus quervernetzten Polyethylenglykolketten, die aufgrund ihrer hydrophilen Struktur deutlich stärker in Wasser quellen.³⁷ Ein anderer Ansatz ist die Verwendung von Polyacrylamid, welches durch Polyethylenglykolketten quervernetzt wurde. Diese Harze zeigen hervorragende Quelleigenschaften in Wasser. So können Proteine mit bis zu 35 kDa für Enzymreaktionen an dieser festen Phase verwendet werden.¹¹ Ob die Stabilität und Quellbarkeit in Wasser für die Peptidsynthese ausreichen, ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt.

2. In Wasser ausreichend stabile Kupplungsreagenzien und Additive

Ein Beispiel für solche Kupplungsreagenzien ist 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid, welches gut wasserlöslich ist und für die Synthese von Amidbindungen in Wasser erfolgreich eingesetzt wurde. Mit N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximide steht zudem ein wasserlösliches Reagenz als Ersatz für Hydroxybenzotriazol zur Verfügung.

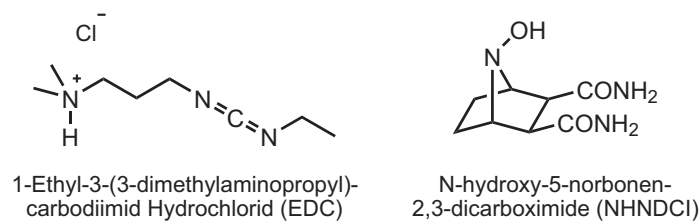


Abbildung 1.9.: Wasserlösliches Kupplungsreagenz und Additiv

3. In Wasser lösliche, geschützte Aminosäurederivate

Obwohl es in der Literatur einige Beispiele für wasserlösliche Aminosäurederivate gibt, sind die bisherigen Ansätze nicht überzeugend (Abb. 1.10). Zum Teil sind die Derivate nicht ausreichend stabil oder die Löslichkeit in Wasser ist nicht für alle Aminosäuren (insbesondere bei Seitenkettengeschützten Derivaten) ausreichend hoch. Auch das Entfernen der Schutzgruppe ist teilweise schwierig.^{34,36,38-44}

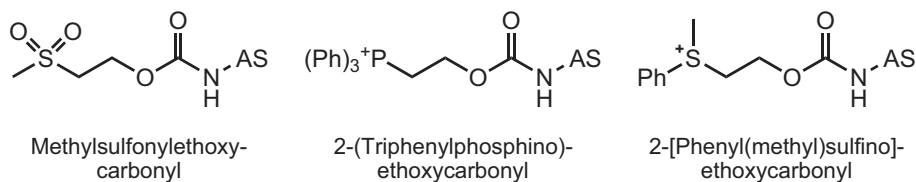


Abbildung 1.10.: Beispiele für wasserlösliche, geschützte Aminosäurederivate

1.3.2.2. Verwendung löslicher *Tags*

Mehrere Gruppen versuchten die Probleme der Festphasensynthese zu umgehen, ohne die Vorteile aufgeben zu müssen. Generell wurde dabei mit einem *Tag* gearbeitet, welcher im für die Kupplung verwendeten Lösungsmittel gut löslich war.^{45,46} Anschließend wurde das Produkt von den überschüssigen Edukten und Reagenzien durch Wechsel zu einem Lösungsmittel, in dem der *Tag* nicht löslich ist, abgetrennt. Es wurden bis jetzt vor allem drei verschiedene Arten von *Tags* eingesetzt. Zum einen wurden lösliche Polymere verwendet, auch der Einsatz von polyfluorierten Phasen ist in der Literatur dokumentiert.^{47,48} Als dritte Alternative wurden ionische *Tags* für die organische Synthese verwendet.^{49,50} Diese sind von Ionischen Flüssigkeiten (IF) abgeleitet, und werden im nächsten Abschnitt detailliert besprochen.

1.4. Peptide mit geringer Löslichkeit

1.4.1. Löslichkeit und Lösungsvorgänge

1.4.1.1. Physikalische Betrachtung von Lösungen

Das Auflösen eines Stoffes ist ein alltäglicher Vorgang, er kann leicht makroskopisch beobachtet werden. Ein vorher heterogenes Mehrstoffsystem (z.B. fester Zucker in einem Glas Tee) wandelt sich nach einer gewissen Zeit in ein homogenes Mehrstoffsystem um. Im gegebenen Beispiel ist Zucker der gelöste Stoff und Wasser das Lösungsmittel. Die Einteilung in gelösten Stoff und Lösungsmittel ist nicht fest vorgegeben, sondern hängt von den Mengenverhältnissen in der Lösung ab: der im homogenen Gemisch überwiegend vorhandene Stoff wird als Lösungsmittel bezeichnet.⁵¹ Bei einem sehr konzentrierten Sirup kann dementsprechend Zucker das Lösungsmittel und Wasser der gelöste Stoff sein.

Auf mikroskopischer Ebene stellt eine Lösung eine sehr feine Verteilung des gelösten Stoffes dar. Man bezeichnet Lösungen daher als disperse Systeme. Dabei unterscheidet man zwischen echten und kolloiden Lösungen. Die Unterscheidung erfolgt aufgrund der Größe der dispergierten Phase (= des gelösten Stoffs). In echten Lösungen ist der gelöste Stoff praktisch nicht aggregiert. Seine einzelnen Bestandteile (Moleküle, Ionen) sind molekular verteilt. Die Größe der dispergierten Teilchen ist hier durch die molekulare Dimensionen der gelösten Substanz vorgegeben, sie liegt im Bereich von ungefähr 0,1 bis 1 nm. Diese Lösungen werden auch als molekular-dispers bezeichnet.⁵¹

Sind die dispergierten Teilchen aufgrund von z.B. Aggregation größer, so bezeichnet man die Lösung als kolloiddispers oder den gelösten Stoff als Kolloid. Kolloide sind keine speziellen Stoffe, der Begriff bezeichnet nur einen bestimmten Verteilungsgrad eines beliebigen Stoffs in einem beliebigen Lösungsmittel. Dabei können die Stoffeigenschaften aber aufgrund des größeren Oberfläche / Masse Verhältnis deutlich verändert werden. Die obere Grenze von kolloiddispersen Teilchen ist nicht genau definiert. Sie schwankt zwischen 100 und 500 nm und kann im Fall von Emulsionen auch über 1 μm liegen. Diese kolloiden Lösungen sind normalerweise durch bloßen Augenschein nicht von echten Lösungen zu unterscheiden, dies gelingt aber mit einem einfachen Experiment. Kolloide Lösungen zeigen den Tyndall-Effekt.⁵¹ Wird die zu untersuchende Lösung von der Seite beleuchtet, so sieht der Beobachter in einer kolloiden Lösung den Verlauf des Lichtstrahls. Dieses Phänomen beruht auf der Streuung des einfallenden Lichts an den dispergierten Teilchen. Ein solches Verhalten kann bei echten Lösungen nicht beobachtet werden, da die Größe der dispergierten Teilchen in diesem Fall zu klein ist.

Ob und in welchem Umfang sich ein Stoff im Lösungsmittel löst, wird von der Änderung der freien Enthalpie ΔG des Vorgangs bestimmt. Wenn diese negativ ist, erfolgt die Lösung des Stoffes spontan. Ist sie positiv, so fällt der vorher gelöste Stoff aus. Dies kann z.B. durch Abkühlen der Lösung geschehen.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

In festen, polaren Substanzen bestehen starke Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Molekülen aufgrund von Coulomb oder Dipol-Dipol Wechselwirkungen. Diese müssen für den Lösungsprozess aufgebrochen werden. Bei Kristallen entspricht dieser Energiebetrag der Gitterenergie. Durch das Anlagern der Lösungsmittelmoleküle an den gelösten Stoff bilden sich neue, intermolekulare Wechselwirkungen aus. Bei diesem als Solvation bezeichneten Vorgang wird Energie frei. Ob ΔH positiv oder negativ ist, hängt von der Größe der Energiebeiträge dieser beiden Prozesse ab.

Auch ein endothermer Prozess kann freiwillig ablaufen. Dazu muss die Entropiezunahme groß genug sein, um die Zunahme der Enthalpie des Systems zu kompensieren (ein Beispiel ist Ammoniumchlorid, welches sich spontan unter Abkühlen der Umgebung löst).

Ein interessantes Phänomen tritt bei Ionenverbindungen auf. Kleine, hoch geladene Ionen können Wassermoleküle so stark koordinieren, dass die Entropieänderung beim Lösungsvorgang negativ ist ($T\Delta S$ bei 25 °C beträgt z.B. für BaSO_4 -30,6 kJ/mol, für MgCl_2 -29,0 kJ/mol und für AgF -5,8 kJ/mol).⁵¹ Trotzdem lösen sich MgCl_2 (542 g/l bei 20 °C) und AgF (2000 g/l bei 100 °C) in Wasser.⁵² In diesem Fall kompensiert die Enthalpieänderung die Abnahme der Entropie.

Da der Löslichkeit so große Bedeutung zukommt, wurde sie und die sie bestimmenden Parameter schon lange und eingehend untersucht. Aufgrund dieser umfangreichen Arbeiten ist die thermodynamische Beschreibung von Lösungen schon sehr fortgeschritten. Die statistische Thermodynamik ist in diesem Bereich viel weniger entwickelt.⁵³ Zur Zeit ist es daher noch nicht möglich, die Löslichkeit einer Substanz nur aus den Eigenschaften ihrer Moleküle und deren Wechselwirkungen ab initio zu berechnen.

1.4.1.2. Bestimmung der Löslichkeit

Grundlegende Definitionen Für die Messung der Löslichkeit ist es notwendig, diese Eigenschaft zu definieren.

Definition 1: Die Löslichkeit einer Substanz ist die Konzentration ihrer gesättigten Lösung.

Definition 2: Eine Lösung ist dann gesättigt, wenn sich die gelöste Substanz mit der ungelösten im thermodynamischen Gleichgewicht befindet.

Definition 1 bestimmt, wie die Löslichkeit experimentell bestimmt wird (nämlich durch die Messung der Konzentration der gelösten Substanz). Definition 2 verdeutlicht, dass es sich bei diesem Phänomen um ein Gleichgewicht handelt, welches auch thermodynamisch beschrieben werden kann. Das bedeutet bei der experimentellen Bestimmung aber auch, dass durch die Wahl einer ausreichend großen Wartezeit zwischen ansetzen der Lösung und Messung der Konzentration des gelösten Stoffes (im Allgemeinen 24 h) die Einstellung des Gleichgewichts sichergestellt werden muss. Außerdem ist vor der Messung der Konzentration eine Trennung des gelösten vom ungelösten Stoff notwendig. Trennungen sind stets willkürlich, so dass es in der Praxis weitere Definitionen gibt, ab welchem Verteilungsgrad eine Substanz als gelöst oder nicht gelöst gilt.

Definition 3: Es ist alles gelöst, was bei einstündiger Zentrifugation mit 100.000 g im Überstand verbleibt.

oder

Definition 4: Es gilt als gelöst, was sich bei einer Filtration mit einem Filter der Porengröße $0,45 \mu\text{m}$ im Filtrat befindet.

In der Literatur gibt es noch andere Vorschläge, die aber nicht so streng wie die bereits angeführten sind. So stellen die nach Definition 3 oder 4 bestimmten Löslichkeiten untere Grenzwerte dar. Ohne Trennung kann nicht zwischen tatsächlich gelöster und „nur“ suspendierter Substanz unterschieden werden. Bei der Konzentrationsbestimmung würden zu hohe Werte gemessen. Die so berechnete Löslichkeit würde einen unterschiedlich großen systematischen Fehler aufweisen.

Experimentelle Methoden Für die Konzentrationsbestimmung ist prinzipiell jedes quantitative Verfahren geeignet. Bei ionischen Substanzen kann es ausreichend sein, nur ein Ion quantitativ zu bestimmen. Voraussetzung ist, dass die Stöchiometrie der Verbindung eindeutig ist und keine Verunreinigungen durch andere Salze mit dem gleichen Ion vorhanden sind. Hauptsächlich werden zur Messung gravimetrische

und chromatographische Verfahren verwendet.⁵⁴⁻⁵⁷

- Gravimetrische Verfahren

Wenn die Löslichkeit hoch ist und die Substanz in ausreichender Menge zur Verfügung steht, eignen sich die gravimetrischen Verfahren am besten. Diese sind durch die direkte Bestimmung im Allgemeinen sehr schnell und einfach durchführbar. Die vorgeschlagene EU-Richtlinie beruht auf zwei verschiedenen gravimetrischen Verfahren.⁵⁷ Ist die Löslichkeit der betreffenden Substanz gering, so sind die gravimetrischen Verfahren allerdings nicht mehr sehr genau. Dies beruht auf den kleinen Massen die in diesem Fall ausgewogen werden müssen. Dies wird auch durch die Anforderung an Methoden für die Bestimmung der Löslichkeit schwerlöslicher Substanzen nach REACH deutlich. Im Rahmen von REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) wird dafür die Säulenelutionsmethode empfohlen, der Fehler sollte dabei unter **30%** liegen.

- Direkte gravimetrische Verfahren:⁵⁴ Dies sind die ältesten Verfahren zur Bestimmung der Löslichkeit. Es wird eine gesättigte Lösung der zu untersuchenden Substanz im betreffenden Lösungsmittel hergestellt. Dann wird der ungelöste Feststoff durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt. Genau abgemessene Mengen des Filtrats werden eingedampft und durch Wägen des Rückstands die gelöste Substanzmenge bestimmt. Aus dem bekannten Volumen der Lösung kann die Sättigungskonzentration (= Löslichkeit) berechnet werden. Wenn die Probe vor dem Eindampfen gewogen wurde, kann auch die Menge Substanz, welche sich in einer gewissen Menge Lösungsmittel gerade noch löst berechnet werden. Diese Angabe in g/100 ml Lösungsmittel ist bei leicht löslichen Substanzen die übliche Angabe der Löslichkeit.

Verunreinigungen können mit diesem Verfahren nicht ohne weitere Analysen erkannt werden und führen zu einem Fehler. Die gemessenen Werte sind in diesem Fall zu hoch. Wichtig ist auch, dass die Trocknung definiert erfolgt. Die Messung ist umso genauer, je härter die Bedingungen der Trocknung sind, ohne dass jedoch Zersetzung auftreten darf.

- Indirekte gravimetrische Verfahren:⁵⁸ Dieses Verfahren kann bei ioni-schen Substanzen angewendet werden. Entweder das Anion oder das Kation müssen eine schwerlösliche Verbindung bilden können (z.B. ergeben lösliche Ag^+ -Ionen bei Zusatz von Chloridionen einen Niederschlag von

schwerlöslichem Silberchlorid). Es wird eine gesättigte Lösung der zu untersuchenden Substanz hergestellt und mit dem Fällungsreagenz versetzt. Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert und nach dem Trocknen gewogen. Aus dieser Menge und der Stöchiometrie lässt sich die Menge an ursprünglich gelöstem Ion und damit die Menge der ursprünglichen Substanz in der untersuchten Lösung berechnen. Wichtig ist hierbei dass sichergestellt wird, dass das Fällungsreagenz im Überschuss eingesetzt und der Niederschlag gut gewaschen wird. Bei diesem Verfahren stören Verunreinigungen nur, wenn sie mit dem Fällungsreagenz ebenfalls einen Niederschlag bilden.⁵⁸

- Volumetrische Verfahren

Eine schnelle und sehr präzise Technik zur Bestimmung der Löslichkeit ist die Titration. Eine große Vielfalt chemischer Substanzen kann durch diese Technik erfasst und deren Konzentration bestimmt werden. Säuren (z.B. Carbon-säuren) und Basen (z.B. Amine) lassen sich durch Säure-Base Titration bestimmen. Die Konzentration vieler Metallionen kann durch komplexometrische Titrations ermittelt werden. Desweiteren gibt es noch Redox- und Fällungstitrations. Diese Techniken sind oft sensitiver als gravimetrische Verfahren.⁵⁸ Sie sind für Substanzen mit einer hohen bis geringen Löslichkeit geeignet. Liegt die Konzentration der gesättigten Lösung über der oberen Grenze des Arbeitsbereichs kann die Probenlösung verdünnt werden. Für sehr verdünnte Lösungen ist dieses Verfahren nicht mehr geeignet.

Nachteilig bei den volumetrischen Verfahren ist, dass die Probensubstanz auf die eine oder andere Art mit der zugesetzten Maßlösung reagiert. Je nach Art der Reaktion kann die Substanz nicht mehr für andere Untersuchungen verwendet werden. Da aus statistischen Gründen mehrere Proben untersucht werden müssen, ist außerdem relativ viel Substanz notwendig.

- UV/VIS photometrische Verfahren

Diese Methode ist sehr empfindlich. Insbesondere bei sehr niedriger Löslichkeit, und damit einhergehend sehr geringer Konzentration des Analyten, eignet sich speziell die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit nachgeschaltetem DAD. Voraussetzung ist, dass der Analyt im Bereich zwischen 200 und 700 nm ein ausreichend starkes Absorptionsmaximum aufweist. Die Verwendung der HPLC zur Bestimmung der Konzentration des gelösten Stoffs hat folgende Vorteile:

- Es sind nur geringe Substanzmengen erforderlich.
- Durch verdünnen hoch konzentrierter Proben ist diese Technik für einen großen Konzentrationsbereich einsetzbar.
- Die Durchführung vieler Experimente ist aufgrund der Automation sehr einfach.
- Es können auch verunreinigte Substanzen verwendet werden, falls die Verunreinigung durch die chromatographische Trennung separiert werden kann.
- Diese Technik ist unabhängig vom Lösungsmittel, in dem die Löslichkeit der Substanz untersucht werden soll.
- Solange das Anion in dem Wellenlängenbereich, der zur Quantifizierung des Analyten verwendet werden soll, keine Absorption zeigt, ist diese Technik vom Anion unabhängig. Dadurch kann der Einfluss des Anions auf die Löslichkeit untersucht werden.

Der größte Nachteil dieser Technik liegt im Aufwand für die Kalibrierung. Während durch gravimetrische Verfahren erhaltene Werte direkt und volumetrisch bestimmte durch Multiplikation mit einem bekannten Faktor die Konzentrationsbestimmung ermöglichen, ist dies bei der UV/VIS - Detektion nicht möglich. In diesem Fall muss mit der verwendeten HPLC Anlage mit dem rein vorliegenden Analyten eine Kalibrierkurve aufgenommen werden. Erst mit dieser kann dann an realen Proben die Konzentration der Substanz bestimmt werden.

Einfluss von Verunreinigungen auf die Bestimmung der Löslichkeit Wie bei den einzelnen Verfahren schon beschrieben, sind diese mehr oder weniger in der Lage Verunreinigungen zu tolerieren. Während das direkte gravimetrische Verfahren durch jede Art der Verunreinigung gestört wird, können bei ausreichend guter Trennung mittels HPLC auch Proben geringer Reinheit mit hoher Genauigkeit vermessen werden.

Neben dem störenden Einfluss auf die Bestimmung der Konzentration können Verunreinigungen aber noch einen weiteren unerwünschten Effekt haben. Insbesondere größere Mengen an Verunreinigung können die Löslichkeit der zu untersuchenden Substanz beeinflussen.⁵⁷ So wurde gezeigt, dass die Löslichkeit mancher Peptide durch Salzlösungen erhöht werden kann.^{59,60} Auch Detergenzien können schon in relativ geringer Konzentration die Löslichkeit von Stoffen stark erhöhen. Darauf beruht ihr Einsatz in Reinigungsmitteln. Bei der Bestimmung der Löslichkeit einer

schlecht in Wasser löslichen, unpolaren Substanz würden Detergenzien diese in (für die Messung) unerwünschter Art erhöhen.

Verunreinigungen können die Löslichkeit einer Substanz aber auch erniedrigen. Bei ionischen Verbindung ist der Aussalzeffekt gut dokumentiert. Da bei der Sättigungskonzentration die durch das Löslichkeitsprodukt der Ionen gegebene obere Grenze der Ionenkonzentrationen erreicht ist, führt die zusätzliche Anwesenheit des selben Ions durch die Verunreinigung zu einer scheinbar geringeren Löslichkeit der Substanz. Diese Beispiele zeigen, dass unterschiedliche Substanzen einen schwer abschätzbaren Einfluss auf die Löslichkeit haben können.

Manchmal ist es jedoch sogar wünschenswert, die Löslichkeit einer Substanz in Gegenwart der bei der Synthese auftretenden Verunreinigungen zu bestimmen. Soll zum Beispiel entschieden werden, ob eine bestimmte Substanz mittels präparativer HPLC gereinigt werden kann, so ist die thermodynamische Löslichkeit der reinen Substanz nicht der entscheidende Parameter. In diesem Fall stellt sich die Frage, wie hoch die Löslichkeit der Substanz in Gegenwart der bei der Synthese anfallenden Verunreinigungen in dem für die Trennung vorgesehenen Lösungsmittelgemisch ist.

1.4.1.3. Ansätze zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit

Schon früh war die Tatsache bekannt, dass sich ein Stoff gut in chemisch ähnlichen Substanzen löst. Diese empirische Erkenntnis ist die Grundlage des bekannten lateinischen Ausspruchs: *similia similibus solvuntur*. Nach genau diesem Prinzip wird auch heute noch vorgegangen, wenn die Löslichkeit einer Substanz gezielt verändert werden soll.^{55,56,61–63} Um die Löslichkeit von unpolaren Substanzen in Wasser zu erhöhen werden polare *Tags* kovalent an das Molekül geknüpft. Diese polaren *Tags* gehören hauptsächlich drei verschiedenen Gruppen an.

Verwendung von PEG-Ketten PEG-Ketten werden zur Erhöhung der Löslichkeit verschiedener Substanzklassen eingesetzt. PEG-Ketten erhöhen nicht nur die Löslichkeit in Wasser, sondern auch in organischen Lösungsmitteln.^{64,65}

Die PEG-Konjugate sind polarer als die freien Verbindungen, trotzdem lassen sie sich im Allgemeinen mittels DC und präparativer Flash-Chromatographie trennen. Lange PEG-Ketten stellen inhomogene Mischungen mit unterschiedlicher Kettenlänge dar, was zu einer in manchen Anwendungen unerwünschten Polydispersität führt.

Verwendung von Zuckern In einigen Fällen wurden auch Zucker als *Tag* eingesetzt. Diese sind zwar im Allgemeinen komplizierter in der Anwendung, dafür ist die Löslichkeit der entsprechenden Derivate in Wasser deutlich höher als bei Verwendung von PEG-Ketten. So wurden von T. Mitchell *et al.* Phosphinliganden mit PEG und Zucker *Tags* hergestellt und deren Wasserlöslichkeit verglichen.⁶³ Die Wasserlöslichkeit der Ethylenglykolderivate war nahezu null, während das Zuckerderivat eine Löslichkeit von 200 mM in Wasser hatte. Mit anderen Zuckerderivaten beobachteten die Autoren aber schwierig zu trennende Gemische.

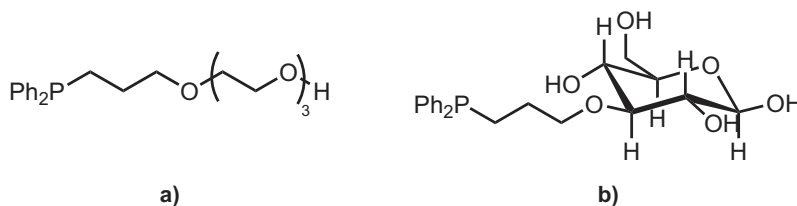


Abbildung 1.11.: Zwei modifizierte Phosphinliganden: a) mit einer Ethylenglykol-kette; b) mit einem Glukosederivat

Verwendung von Ionischen Tags Ionische *Tags* wurden bisher nicht oft zur gezielten Erhöhung der Löslichkeit in Wasser verwendet. Eine Ausnahme stellen Peptide und Proteine dar. Diese werden im nächsten Abschnitt gesondert besprochen. Eine weitere Ausnahme sind saure oder basische Wirkstoffen, die manchmal als Salz appliziert werden. Durch Säure-Base Reaktion des Wirkstoffs liegen diese in ihrer geladenen Form vor. Dadurch kann in vielen Fällen die Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit erhöht werden. Im Artikel von C. Bergstroem *et al.* wurde die Löslichkeit von 25 basischen Wirkstoffen in Abhängigkeit vom pH-Wert gemessen und graphisch dargestellt (Abb. 1.12).⁶⁶

Dabei handelt es sich aber nicht um *Tags* im engeren Wortsinn, die Ladung wird an einer funktionellen Gruppe erzeugt, die selbst Bestandteil des Wirkstoffs und für dessen Wirksamkeit notwendig ist.^{55,67-69} Der Ladungszustand dieser Verbindungen hängt aber vom pH-Wert ab, da die Ladung durch eine Säure-Base Reaktion generiert wurde.

Metallorganische Katalysatoren sind in Wasser oft schlecht löslich. Beispielsweise sollte Propen mit einem Rhodiumkatalysator in Wasser hydroformyliert werden. Dazu wurden dessen Liganden durch Einfügen von Natriumsulfonatgruppen in Wasser gut löslich gemacht (Abb. 1.13).⁷⁰

Diese Idee wurde im industriellen Maßstab umgesetzt. Die Effizienz dieses Verfah-

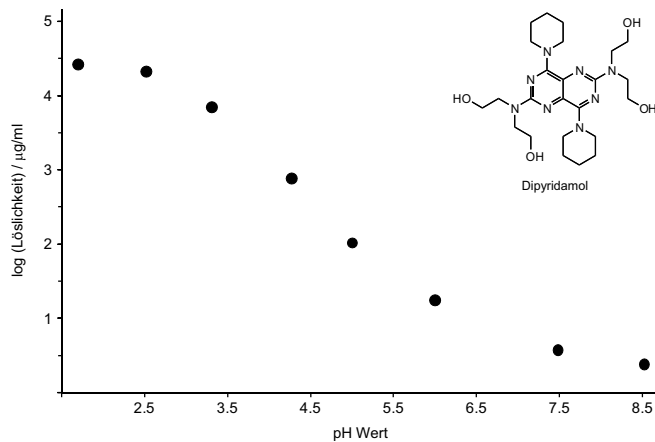


Abbildung 1.12.: Die Löslichkeit des Vasodilators Dipyridamol in Wasser in Abhängigkeit des pH-Werts⁶⁶

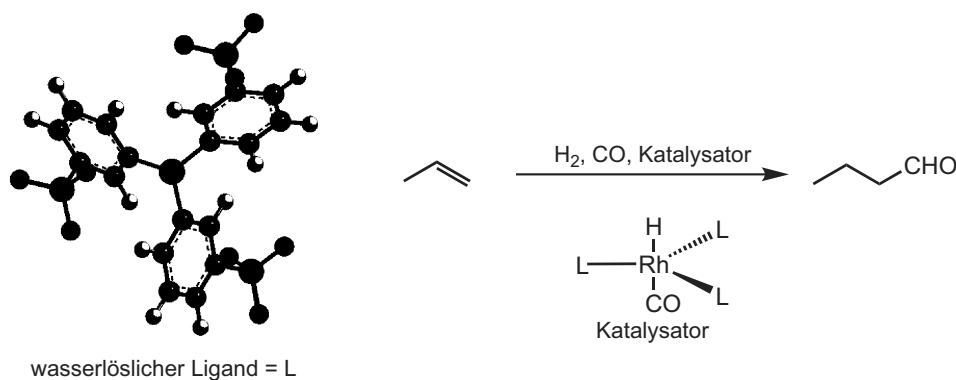


Abbildung 1.13.: Der Ruhrchemie-Rhône-Poulenc Prozess⁷⁰

rens ist enorm, bei der Produktion der ersten 2 Millionen Tonnen Butanal gingen nur 2 kg Rhodium verloren, das entspricht 0,001 ppm!⁷⁰

Die ionischen *Tags* werden auch oft eingesetzt, um spezielle Reinigungstechniken zu ermöglichen. In diesem Fall steht die Erhöhung der Löslichkeit nicht im Vordergrund, der *Tag* dient lediglich als löslicher Anker. Dieser Ansatz wird in Abschnitt 1.5.4 auf Seite 37 genauer behandelt.

1.4.2. Schwerlösliche Peptide

Viele Peptide sind ausgesprochen hydrophob und in Wasser nur schlecht löslich. Insbesondere Peptide mit vielen unpolaren Seitenketten bieten nur wenige Ansatzpunkte für eine günstige Wechselwirkung mit Wassermolekülen.⁷¹ In diesem Fall müssten also die günstigen Interaktionen zwischen den Peptidketten und den Wassermolekülen untereinander aufgebrochen werden. Sie würden dann durch weniger

starke Wechselwirkungen ersetzt. Außerdem sind Wassermoleküle in der Umgebung von hydrophoben Molekülen spezifisch orientiert. Daraus folgt auch noch ein entropischer Nachteil für diesen Prozess.

Zwischen Peptidketten kann es zudem zur Ausbildung von stabilen β -Faltblattstrukturen kommen (auch Abbildung 1.3 auf Seite 8). In diesem Fall wird der nötige Energiebetrag für das Auflösen des Feststoffs noch weiter erhöht, der Prozess wird noch ungünstiger.

Die geringe Löslichkeit stellt eine große Herausforderung für die Reinigung solcher Peptide dar, da diese im Allgemeinen durch RP-HPLC in wässrig-organischen Lösungsmittelgemischen erfolgt.⁷¹⁻⁷⁴ Ein ungefährender (ökonomischer) Grenzwert der minimal akzeptablen Löslichkeit liegt bei 5 mg Peptid / ml Lösungsmittel (Abb. 1.14).⁷⁴ Da die Kosten für die Reinigung exponentiell ansteigen, je geringer die Löslichkeit ist, kann eine zu geringe Löslichkeit die präparative Reinigung finanziell unmöglich machen.

Zudem kann die geringe Löslichkeit die Trennung an sich negativ beeinflussen, die

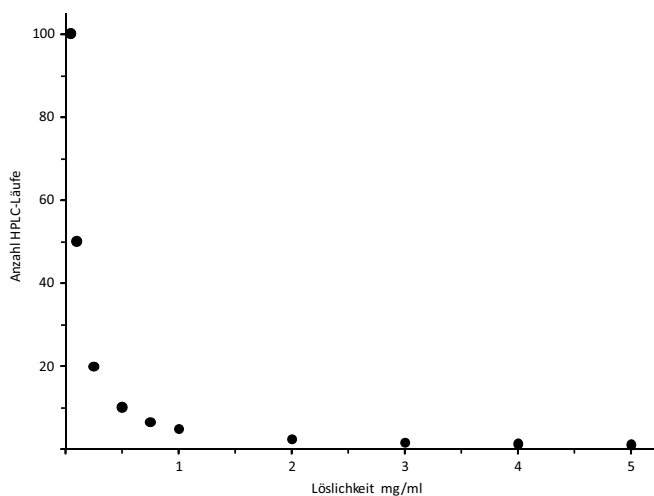


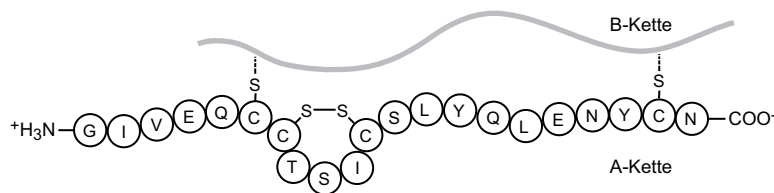
Abbildung 1.14.: Anstieg der Kosten für die Reinigung von Peptiden in Abhängigkeit der Löslichkeit (Zielmenge 5 mg Peptid) anhand der Anzahl notwendiger HPLC-Läufe

Peptide eluieren oft in breiten Banden. Diese Probleme führen dazu, dass manche Peptide nicht, oder nur unter sehr hohem Aufwand zugänglich sind. Dies wirkt sich negativ auf die weitere Forschung in dem entsprechenden Gebiet aus.⁷⁵

Ein sehr bekanntes Peptid, dessen geringe Löslichkeit eine intensivere Untersuchung der Struktur-Eigenschaftsbeziehungen behindert, ist die A-Kette des Peptidhormons Insulin. Schon kurz nach der ersten erfolgreichen Synthese zeigte sich, dass die ungünstigen physikalisch-chemischen Eigenschaften die Reinigung und Handhabung

des Peptids erheblich erschweren.^{76–78} Diese Probleme sind so groß, dass J. Mayer *et al.* 2007 feststellte: „*Ein synthetischer Zugang um Insulinanaloge mit hoher Ausbeute herzustellen ist von großer Bedeutung. Dieses Problem wird von der Gemeinschaft der Peptidchemiker anscheinend aber übersehen.*“.⁷⁹

Ein anderes Beispiel stellen Peptide und Proteine dar, welche natürlicherweise nicht



Unpolare Aminosäuren	Polare Aminosäuren	Geladene Aminosäuren
Isoleucin 2	Asparagin 2	Glutamat 2
Leucin 2	Cystein 4	
Valin 1	Glutamin 2	
	Glycin 1	
	Serin 2	
	Threonin 1	
	Tyrosin 2	
Summe: 5	Summe: 14	Summe: 2

Abbildung 1.15.: Primärstruktur der Insulin A Kette

in wässriger sondern in hydrophober Umgebung vorkommen. So gibt es Proteine, die in der Lipiddoppelschicht der Zellhülle eingelagert sind.^{80,81} Diese Membranproteine haben ausgesprochen hydrophobe Domänen und sind in Wasser unlöslich. Die Expression und Reinigung von Membranproteinen ist nicht ganz einfach. Insbesondere komplexere Systeme wie die G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind schwierig in reiner Form zu erhalten. Dies ist einer der Gründe, warum die häufig vorkommenden Membranproteine in der Proteindatenbank unterrepräsentiert sind.⁸² Um dennoch die Struktur und Funktionsweise dieser wichtigen Klasse von Biomolekülen untersuchen zu können, werden kurze Peptide verwendet, welche von den Transmembrandomänen der Membranproteine abgeleitet sind. Diese sind ebenfalls schlecht in Wasser löslich, was ihre Reinigung behindert.

1.4.3. Bekannte Ansätze zur Erhöhung der Löslichkeit von Peptiden

1.4.3.1. Einsatz temporärer Tags

1.4.3.1.1. Löslichkeitserhöhende Schutzgruppen für die Seitenkette Löslichkeitserhöhende Tags können an Schutzgruppen für Seitenkettenfunktionen angebracht werden. Die von L. Kocsis *et al.* vorgestellte, mit einer PEG-Kette modifizierte, Cbz-Schutzgruppe fällt in diese Kategorie (da sie hauptsächlich für den

Einsatz bei der Synthese schwieriger Sequenzen entwickelt wurde, ist sie dort genauer beschrieben, siehe auch Abb. 1.8 auf Seite 12).

Die Arbeitsgruppe von A. Unden stellte kürzlich verschiedene Schutzgruppen für funktionelle Gruppen in den Seitenketten vor, welche durch ionische Gruppen die Polarität der Peptide erhöht (Abb. 1.16).^{73,83}

Diese Schutzgruppen bestehen aus zwei Teilen: einem Linker und einer später ioni-

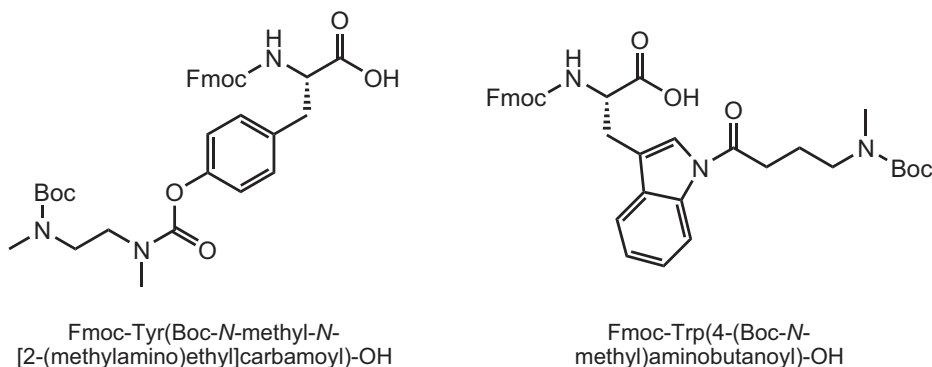


Abbildung 1.16.: Seitenkettenschutzgruppen zur Erhöhung der Löslichkeit

schon Gruppe. Der Linker hat zwei Aufgaben: Er blockiert einerseits die funktionelle Gruppe in der Seitenkette der Aminosäure. Zum anderen ist er kovalent mit dem, später ionischen, *Tag* verbunden. Unter den Bedingungen der Peptidsynthese ist er stabil, kann aber am Ende der Reinigung abgespalten werden. Der zweite Teil der Schutzgruppe ist der *Tag*. Er besteht aus einem Boc-geschützten sekundären Amin. Während der Synthese des Peptids ist er nicht geladen. Beim Abspalten des Peptids vom Harz wird auch die Boc-Gruppe in der Schutzgruppe entfernt und das Amin protoniert, dieser Vorgang ist in Abbildung 1.16 schematisch dargestellt.

Bei einem saurem pH-Wert ist das Peptid jetzt an eine polare Gruppe geknüpft. Der tatsächliche Effekt auf die Wasserlöslichkeit wurde nicht gemessen, die Autoren gehen jedoch davon aus, dass diese erhöht wird.⁸³

Ein Nachteil dieser Schutzgruppe ist die relativ schwierige Entschützung im Fall des Tyrosinderivats (Abb. 1.17).

Mit 10 Äquivalenten N-Methylmorpholin konnte die Schutzgruppe innerhalb von vier Stunden abgespalten werden.

1.4.3.1.2. Löslichkeitserhöhende Schutzgruppen für den N- oder C-Terminus

Schon seit 1984 ist bekannt, dass polykationische Peptide die Löslichkeit daran gebundener schwerlöslicher Peptide erhöhen.⁸⁴ Darauf aufbauend schlugen Englebretsen *et al.* anstatt geladener Seitenkettenschutzgruppen die Verknüpfung des

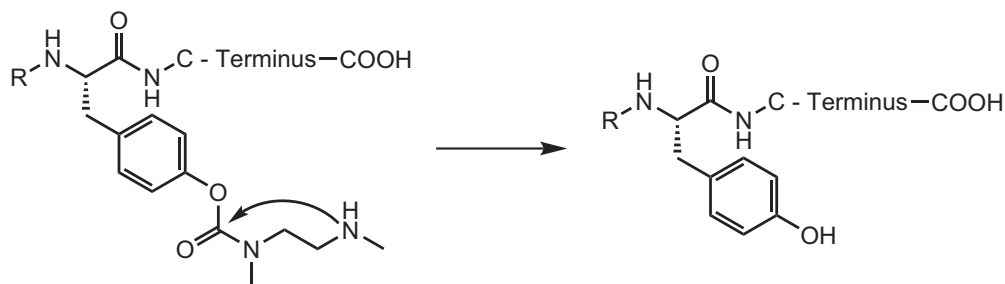


Abbildung 1.17.: Abspaltung der ionischen Schutzgruppe unter basischen Bedingungen

Tags mit dem N- oder C-terminus des schwerlöslichen Peptids vor.⁸⁵⁻⁸⁹ Es wurden verschiedene *Tags* verwendet, die jeweils über einen Linker mit dem Peptid verbunden waren (Tab. 1.1).

Tabelle 1.1.: Für die Solubilisierung von schwerlöslichen Peptiden verwendete *Tags*

<i>Tag</i>	Terminus	Anzahl AS des Peptids
(RGG) ₃	N-	14
G(RGG) ₃	C-	12
(KG) ₆	C-	12
G(KG) ₆	C-	32
G(KG) ₆	C-	48

Offensichtlich reichen relativ wenige positive Ladungen aus, um auch sehr lange Peptide zu solubilisieren. Der Linker kann nach der Reinigung unter milden Bedingungen abgespalten und das Peptid vom abgespaltenen Linker durch Zentrifugation getrennt werden. Im Überstand befindet sich nur der an den Linker gebundene *Tag*, der Niederschlag besteht nur aus dem Peptid. Dieser Ansatz wurde auch von der BACHEM AG aufgegriffen (Abb.1.18). Seine Nützlichkeit konnte anhand der Synthese des Peptids HCV NS5B (407-419, H-SMSYTWWTGALITP-OH) gezeigt werden.⁹⁰

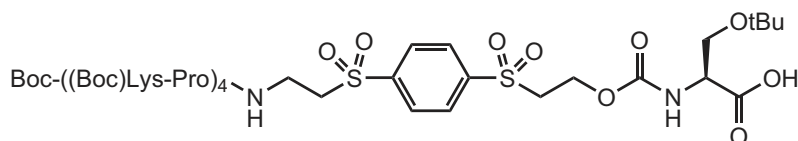


Abbildung 1.18.: Beispiel für die Verwendung einer Tetra(lysinprolin)sequenz als Löslichkeitserhöhender *Tag* an der Aminosäure Serin⁹⁰

Ein Problem ist, dass die Abspaltung des Tags offensichtlich von der Sequenz des Peptids beeinflusst wird. In einem anderen von der BACHEM AG verwendeten

Testsystem konnte der löslichkeitsverbessernde *Tag* nicht abgespalten werden, ohne das Zielpeptid zu zerstören. Zudem muss im Prinzip jede benötigte Aminosäure auf diese Art funktionalisiert werden und ein Einfügen dieses Tags ist nach der Synthese nicht mehr möglich. Außerdem ist die Synthese des *Tags* aufwendig, bei den von Englebretsen *et al.* vorgestellten *Tags* handelt es sich um Peptide mit 9 - 13 Aminosäuren, die selbst erst hergestellt werden müssen. Dass dieser Aufwand die Firma BACHEM AG nicht abschreckte, zeigt wie groß das Problem der Reinigung schwerlöslicher Peptide in der industriellen Praxis ist. Auch andere Gruppen griffen diesen Ansatz immer wieder auf. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass der *Tag* am C-Terminus einen größeren Einfluss als am N-Terminus hat.⁹¹

1.4.3.2. Einsatz permanenter *Tags*

Die Erhöhung der Löslichkeit von Membranproteinen oder davon abgeleiteten Peptiden soll sowohl für die Reinigung als auch für die experimentelle Untersuchung der Peptide erfolgen. In diesem Fall soll also der löslichkeitserhöhende *Tag* nicht nach der Reinigung abgespalten werden.⁹² Für diesen Einsatz sind die im vorhergehenden Abschnitt besprochenen Ansätze geeignet, wenn die zur Spaltung des Linkers führenden Bedingungen vermieden werden können. Ansonsten bietet sich die irreversible kovalente Verknüpfung des *Tags* mit dem Protein oder Peptid an.⁹³

J. Xiao *et al.* schlugen als einfach geladenen *Tag* das Molekül Betain vor (Abb. 1.19), dass sie durch native Ligation an das Zielprotein anfügten.⁹⁴ Sie konnten damit die Löslichkeit des bakteriellen Enzyms Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase und des HIV Inhibitorpeptides CG-T20 in Abhängigkeit des pH-Wertes erhöhen. Erstaunlich an dieser Arbeit ist, dass schon eine einzelne Ladung eine Erhöhung der Löslichkeit um einen Faktor 5 - 6 bewirkt. Der absolute Effekt ist mit + 0,4 mg/ml bzw. + 0,7 mg/ml eher gering.

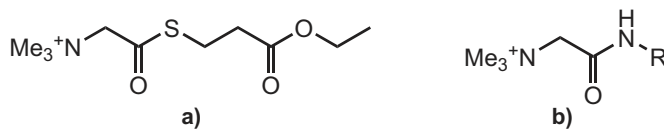


Abbildung 1.19.: Einsatz von Betain als löslichkeitserhöhender *Tag*: a) Betainthioester für die native Ligation, b) Betain an ein Peptid gebunden⁹⁴

Eine sehr gründliche Studie des Einflusses mehrfach geladener *Tags* wurde von J. Tomich *et al.* 1998 vorgestellt.⁷⁵ Dabei wurde das M2 Transmembransegment des Glycinrezeptorproteins (M2GlyR) mit verschiedenen *Tags* sowohl am C- als auch am N-Terminus modifiziert und jeweils die Löslichkeit gemessen.⁹⁵ Im Allgemeinen

ist der Effekt des *Tags* am C-Terminus des Peptids ausgeprägter, als wenn der gleich *Tag* am N-Terminus angebracht wird. Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, die bei der Untersuchung anderer Peptide mit irreversibel gebundenen *Tags* gefunden wurden.⁹³

Eine weitere Beobachtung betraf den Einfluss funktioneller Gruppen am C-Terminus. Befindet sich am C-terminalen Lysin anstatt einer freien Säure ein primäres Amid, so wird die Löslichkeit von 27,5 mM auf 56,1 mM verdoppelt.⁷⁵ Die Nettoladung des Amids ist zwar um eins angestiegen (die deprotonierte Carbonsäure zählt -1), andererseits ist eine deprotonierte Carbonsäure sehr polar und sollte selbst die Löslichkeit des Peptids erhöhen. Auch im Vergleich mit dem um ein Lysin verlängerten homologen *Tag* ist die Löslichkeit immer noch um 6,2 mM erhöht (Abb. 1.20).⁷⁵

In dieser Publikation wurde auch gezeigt, dass die Löslichkeit eines Peptids von

Peptid	Nettoladung*	Löslichkeit
M2GlyR—K—K—K—K—COO ⁻	+ 4	27,5 mM
M2GlyR—K—K—K—K—CONH ₂	+ 5	56,1 mM
M2GlyR—K—K—K—K—K—COO ⁻	+ 5	49,9 mM

* Der N-Terminus ist ebenfalls protoniert (= + 1)

Abbildung 1.20.: Einfluss des C-terminalen funktionellen Gruppen auf die Löslichkeit⁷⁵

der Sequenz abhängt. Werden die im M2GlyR-Transmembransegment vorhandenen Aminosäuren zufällig verknüpft, so ist die Löslichkeit um den Faktor 47 erhöht. Offensichtlich sind die Wechselwirkungen der Aminosäuren und die Sekundärstruktur des Peptids für dessen Löslichkeit ausschlaggebend.

Auffällig an den Daten ist zudem, dass es ab einer gewissen Anzahl Ladungen im *Tag* zu einem sprunghaften Anstieg der Löslichkeit kommt. Dafür wurde auch die Löslichkeit eines vom für die Ausbildung von Cystischer Fibrose wichtigen Membranproteins (M1CFTR) abgeleiteten Peptids (M1) untersucht. Bei diesem wurde derselbe Effekt beobachtet (Abb. 1.21).⁹⁶

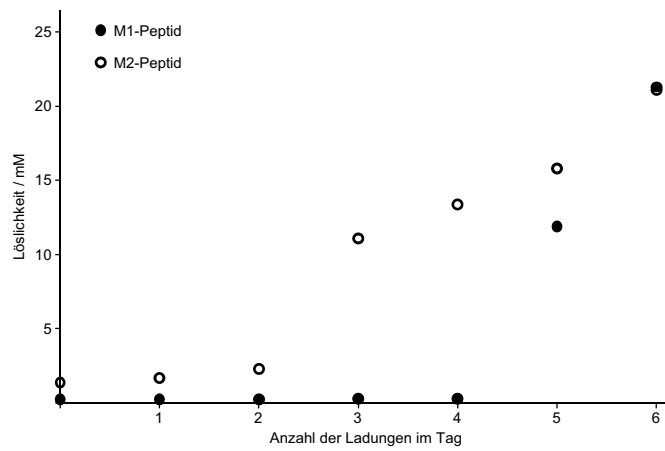


Abbildung 1.21.: Einfluss der Ladung des *Tags* auf die Löslichkeit der beiden Peptide M1 und M2⁷⁵

1.5. Ionische Flüssigkeiten

1.5.1. Definition und Strukturmerkmale

Ionische Flüssigkeiten (IF) sind eine Gruppe von Verbindungen, die in der letzten Zeit großes Forschungsinteresse auf sich gezogen hat.^{70,97} Es handelt sich dabei um ionische Substanzen mit einem Schmelzpunkt von unter 100 °C.⁹⁸ Aufgrund der Definition über den Schmelzpunkt handelt es sich dabei um eine chemisch sehr inhomogene Gruppe von Verbindungen, bei denen der molekulare Aufbau der Ionen keine Rolle für die Einordnung spielt. Meistens wird ein organisches Kation mit einem anorganischen Anion kombiniert. Die Kationen sind häufig von den vier Grundmotiven Dialkylimidazol, N-Alkylpyridin, quaternäres Amin und quaternäres Phosphin abgeleitet (Abbildung 1.22).⁹⁹

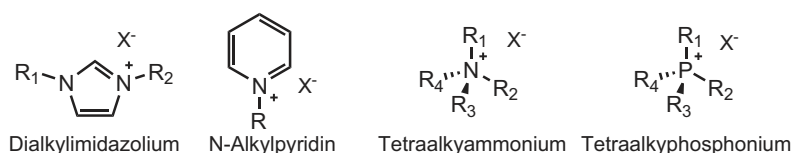


Abbildung 1.22.: Die häufigsten Grundmotive der Kationen ionischer Flüssigkeiten

Das Anion ist in Abbildung 1.22 immer mit X^- abgekürzt. Die Eigenschaften der IF sind, wie bei anorganischen Salzen auch, sowohl vom Kation als auch vom Anion abhängig. Durch die nahezu unbegrenzte Vielzahl an denkbaren Kombinationen ergibt sich eine große Vielfalt von IF.¹⁰⁰ Das Anion ist dabei ein essentieller Bestandteil, der die Eigenschaften maßgeblich beeinflusst.¹⁰¹ Der Austausch der Anionen führt immer zu einer neuen Verbindung mit teilweise deutlich unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften.¹⁰²

1.5.2. Eigenschaften von Ionischen Flüssigkeiten und deren gezielte Manipulation

1.5.2.1. Stabilität

Die Stabilität der IF gegenüber Licht ist sehr gut. Nur üblicherweise lichtempfindliche Strukturelemente des Kations oder Iodide zeigen in dieser Hinsicht eine gewisse Labilität.

Gegenüber thermischen Belastungen sind IF oft ausgesprochen widerstandsfähig. Da der Dampfdruck der ionischen Flüssigkeiten aufgrund ihres Salzcharakters im Allgemeinen nicht messbar ist, stellt der Zersetzungspunkt die obere Grenze der

thermischen Belastbarkeit dar. Dieser wird durch das Anion maßgeblich beeinflusst. Schwach koordinierende Anionen wie z.B. Bis(trifluormethylsulfonyl)imid ergeben einen höheren Zersetzungspunkt als stärker koordinierende Anionen wie z.B. Chlorid. Nucleophile Anionen können auch durch Umkehr der Bildungsreaktion die Zersetzung von ionischen Flüssigkeiten bei höheren Temperaturen bewirken.

Die ausgezeichnete Stabilität der IF gegenüber elektrochemischen Prozessen war der ursprüngliche Ansatzpunkt für das Interesse an dieser Substanzklasse.⁹⁸ Die Luftwaffe der Vereinigten Staaten von Amerika war an Elektrolyten für neue Batterien interessiert. Im Laufe der Zeit wurden dabei Salze mit immer niedrigerem Schmelzpunkt und zunehmender Wasserstabilität entwickelt. Das elektrochemische Fenster beträgt für trockenes 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat ([BMIM][BF₄]) 4,10 V (die Struktur ist in Abb. 1.23 dargestellt).⁹⁹

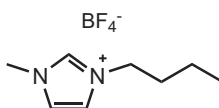


Abbildung 1.23.: Die Struktur der IF [BMIM][BF₄]

1.5.2.2. Schmelzpunkt

Der Schmelzpunkt ist für diese Gruppe von Substanzen das verbindende Merkmal. Der flüssige Zustand ist durch kurzreichende Ordnung, aber das Fehlen einer Organisation mit langer Reichweite charakterisiert.⁹⁹ Die Orientierung im Nahbereich erfolgt durch die Coulomb-Wechselwirkung zwischen den Ionen. Die inneren Freiheitsgrade (Rotation und Vibration) der Ionen bilden hierzu ein Gegengewicht, welches den Aufbau eines stabilen Kristallgitters stört. Daher sinkt der Schmelzpunkt ionischer Flüssigkeiten (bei gleichem Anion) mit steigender Kettenlänge. Ab ca. 8 Methyleneinheiten steigt der Schmelzpunkt wieder an, da dann die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Ketten zunehmen (Abb. 1.24).⁷⁰ Auch die Wahl des Anions beeinflusst den Schmelzpunkt stark. So liegt der Schmelzpunkt von 1-Ethyl-3-methylimidazolhexafluorophosphat bei 58 °C, der von 1-Ethyl-3-methylimidazoltetrafluoroborat bei -15 °C. Auch die Symmetrie des Kations kann den Schmelzpunkt beeinflussen, wobei dieser mit zunehmender Symmetrie steigt. Der Schmelzpunkt von Ionischen Flüssigkeiten beeinflusst selbst die Löslichkeit von IF in anderen Lösungsmitteln und die Löslichkeit anderer Stoffe in der IF.

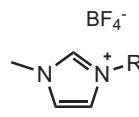
	R	Schmelzpunkt / C°
	-CH ₃	103
	-C ₂ H ₅	6
	-(CH ₂) ₃ CH ₃	-81
	-(CH ₂) ₅ CH ₃	-82
	-(CH ₂) ₇ CH ₃	-78
	-(CH ₂) ₉ CH ₃	-4

Abbildung 1.24.: Einfluss der Kettenlänge auf den Schmelzpunkt ionischer Flüssigkeiten mit dem Methylimidazolmotiv⁷⁰

1.5.2.3. Löslichkeit

Die Löslichkeit einer Substanz wird, wie schon weiter oben ausgeführt, zum einen von der Stabilität des Feststoffs bestimmt. Der zweite Faktor ist die Wechselwirkung des Lösungsmittels mit dem zu lösenden Stoff. Ionische Flüssigkeiten sind aus Ionen aufgebaut, welche im Allgemeinen energetisch günstige Wechselwirkungen mit polaren Lösungsmitteln wie Wasser eingehen. Dennoch sind nicht alle IF in Wasser löslich, es gibt sogar ausgesprochen unlösliche IF.^{103–105} Die Begründung für dieses Verhalten liegt in der von T. Köddermann *et al.* gemachten Beobachtung, dass die Wechselwirkung des Wassers hauptsächlich mit dem Anion stattfindet.¹⁰¹ Als Modellverbindungen benutzten sie 1-Ethyl-3-methylimidazoliummethylsulfat [C₂MIM][EtSO₄], eine mit Wasser vollständig mischbare IF und 1-Ethyl-3-methylimidazoliumbis(trifluormethylsulfonyl)imid [C₂MIM][NTf₂], eine mit Wasser nur sehr wenig (ca. 1,8%) mischbare IF. Sie untersuchten das in den IF gelöste Wasser mit FT-IR. Dabei konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Wechselwirkung des Wassers ausschließlich mit dem Anion erfolgt. Das erklärt, warum IF mit gleichem Kation und verschiedenen Anionen so unterschiedliche Löslichkeiten in Wasser zeigen. Gut wasserlösliche IF werden mit Anionen wie dem Chlorid, Bromid oder Trifluormethansulfonat erhalten. IF mit dem Hexafluorophosphat- oder Bis(trifluormethylsulfonyl)imidanion sind in Wasser wenig oder gar nicht löslich.

Das Kation kann die Löslichkeit ebenfalls beeinflussen. Durch den Einsatz von längeren hydrophoben Alkylketten wird die Löslichkeit von IF in Wasser reduziert.

Von der Löslichkeit in Wasser ist die Hygroskopizität der IF zu unterscheiden. Alle IF sind hygroskopisch und enthalten mehr oder weniger Wasser, auch wenn die IF in Wasser schlecht löslich ist.¹⁰¹ Die Hygroskopizität ist nicht mit der Wasserlöslichkeit korreliert.

1.5.3. Synthese und Reinigung von Ionischen Flüssigkeiten

1.5.3.1. Synthese

Die Erzeugung des Kations kann durch die Protonierung einer Base oder durch die Quaternisierung einesamins oder Phosphins erfolgen. Während die nach der ersten Methode hergestellten IF je nach pH-Wert wieder deprotoniert werden können, erzeugt die Quaternisierung eine IF, die über den ganzen pH-Bereich ionisch ist (ausreichende Stabilität gegenüber Säuren und Basen vorausgesetzt).

Die Quaternisierung erfolgt durch nucleophile Substitution von Elektrophilen mit guten Abgangsgruppen (z.B. Chlorid, Bromid, Tosylat) durch das Amin.^{106–108} Dabei gelten die üblichen Erfahrung mit nucleophilen Substitutionen, d.h. je besser die Abgangsgruppe und je besser das Nucleophil, desto schneller läuft die Reaktion ab und umso geringere Temperaturen sind für die Reaktion nötig.¹⁰⁹ So wird für Chloride eine Temperatur von 80 °C während 2-3 Tagen empfohlen, während Bromide innerhalb von 24 h bei 60 °C vollständig reagieren.⁹⁹ Diese Faustregeln gelten aber nur für einfachere Halogenalkane, kompliziertere Substrate können zu Abweichungen zwingen. Dabei sollte auch berücksichtigt werden, dass diese Reaktionen oft exotherm sind. Insbesondere mit reaktiven Verbindungen und größeren Ansätzen kann das zu einem nicht mehr kontrollierbaren Reaktionsverlauf führen. Es wurden auch alternative Methoden zur Synthese von IF entwickelt, insbesondere die erfolgreiche Verwendung von Mikrowellenöfen oder Ultraschall wurden publiziert.^{110,111} Auf die Verwendung von Lösungsmitteln kann oft verzichtet werden. Es kann auch das überschüssige Halogenalkan als Lösungsmittel dienen, in diesem Fall scheidet sich das Produkt als separate Phase ab.

1.5.3.2. Reinigung

Die Reinigung der IF bereitet teilweise immer noch Schwierigkeiten, auch kommerzielle Produkte sind oft verunreinigt. Aufgrund dieser Probleme gilt die allgemeine Regel, die Ausgangsverbindungen der Synthesen so gut wie irgend möglich zu reinigen.⁹⁹ Insbesondere Wasser und Sauerstoff sollen während der Synthese ausgeschlossen werden. Die beste Methode zur Reinigung ionischer Flüssigkeiten ist, wo immer dies möglich ist, die Kristallisation. Wasserunlösliche IF können von wasserlöslichen Verunreinigungen durch flüssig-flüssig Extraktion abgetrennt werden. Im Allgemeinen ist die Reinigung wasserlöslicher IF deutlich schwieriger, da weniger geeignete Methoden zur Verfügung stehen.^{99,112}

1.5.4. Anwendung von Ionischen Flüssigkeiten

1.5.4.1. IF als Lösungsmittel

IF haben als Lösungsmittel einen weiten Anwendungsbereich.^{99,113} Von Übergangsmetallen oder Organokatalysatoren katalysierte Reaktionen wurden in IF durchgeführt.¹¹⁴ Dabei wird der Katalysator in der ionischen Phase gelöst und die Produkte durch Waschen mit in dieser Phase nicht mischbaren Lösungsmitteln extrahiert.¹¹⁵ Die ionische Phase kann dabei auch auf einen festen Träger aufgebracht werden, was die Abtrennung des Katalysators deutlich vereinfacht und zudem kontinuierliche Prozesse ermöglicht.

Viele verschiedene organisch-chemische Reaktionen können in IF durchgeführt werden, wie zum Beispiel Diels-Alder Reaktionen, nucleophile und elektrophile Substitutionen, Friedel-Crafts Reaktionen und Veresterungen. IF eignen sich darüber hinaus für Polymerisierungsreaktionen und als Lösungsmittel für enzymatische Umsetzungen. Auch die Synthese anorganischer Verbindungen in IF wurde beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass IF Nanopartikel verschiedener Elemente stabilisieren können.^{116,117}

Es wurde untersucht, ob chirale IF als Lösungsmittel in der Lage sind, bei Reaktionen mit achiralen Reagenzien einen Enantiomerenüberschuss zu induzieren.^{108,118} Erste Versuche wurden von Seebach 1975 unternommen, dabei konnten Enantiomerenüberschüsse von 23 % erzielt werden.¹¹⁹ Lange Zeit waren die Ergebnisse eher enttäuschend, erst in jüngerer Zeit sind in diesem Bereich Fortschritte erzielt worden. So konnte z.B. die Arbeitsgruppe um P. Wasserscheid zeigen, dass sich mit chiralen ionischen Flüssigkeiten durch den Ionenpaarungseffekt deutlich höhere Enantiomerenüberschüsse (bis zu 94 % ee) erzielen lassen.^{120,121} Die BASF AG entwickelte

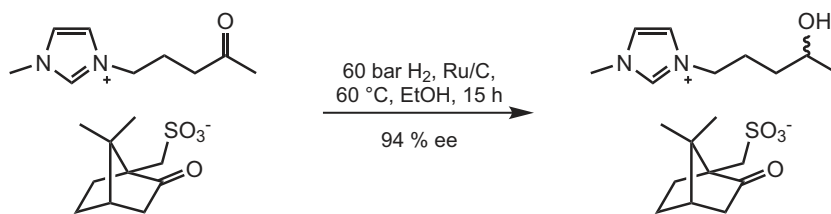


Abbildung 1.25.: Chirale Induktion durch das Lösungsmittel

aufbauend auf den Arbeiten von R. Rogers und seinen Mitarbeitern ein technisches Verfahren zur Gewinnung von Viskose aus cellulosehaltigem Material. Die Cellulose wird dabei mit einer ionischen Flüssigkeit gelöst, von anderen Bestandteilen abgetrennt und dann in einem Spinnbad ausgefällt. Aufgrund der großen Bedeutung der Cellulose als nachwachsender Rohstoff und der Viskose zur Erzeugung von Textilien

hat dieser Prozess enormes Potential.^{122–124}

1.5.4.2. IF als ionischer *Tag*

Betrachtet man die Festphasensynthese von einem etwas anderen Standpunkt, so handelt es sich bei dem Harz um einen *Tag*, der so groß ist, dass er mit bloßem Auge erkannt und **mechanisch** von den Edukten und Nebenprodukten abgetrennt werden kann. Die Festphasensynthese hat neben ihren unbestrittenen Vorteilen auch Nachteile. So werden z.B. große Mengen Lösungsmittel benötigt, die Beladung der Harze ist relativ gering, die Reaktion erfolgt nicht in Lösung und die Analytik ist auch nur eingeschränkt möglich.

Erste Versuche, diese Nachteile zu umgehen waren der Einsatz von löslichen Polymeren und perfluorierten *Tags*.^{47,48,125–134} Dabei konnten einige Fortschritte erzielt werden, aber die Beladung der löslichen Polymere war gering. Die Verwendung von perfluorierten *Tags* ist in der Zwischenzeit etwas in den Hintergrund getreten. Zum einen sind die benötigten Chemikalien teuer, zum anderen bereitet die Entsorgung zunehmend Probleme. Mit den Fortschritten im Bereich der IF wurde die Idee entwickelt, diese als ionischen *Tag* zu verwenden. Bis heute sind eine Fülle von Publikationen zu diesem Thema erschienen, im Folgenden soll nur ein kurzer Überblick über den Einsatz von ionischen *Tags* im Bereich der organischen Synthese gegeben werden.

1.5.4.2.1. IF als Ersatz der festen Phase zur Synthese kleiner Moleküle Der Erfolg im Einsatz von IF als Ersatz der festen Phase ist inzwischen sehr oft dokumentiert.¹¹⁷ In diesem Fall wird in der Literatur oft von „Task spezific ionic liquids (TSIL)“ gesprochen. Ein Beispiel ist die Synthese von 25 verschiedenen Benzodiazepinderivaten an einer ionischen Flüssigkeit (Abb. 1.26).¹³⁵ Die Aufarbeitung der Zwischenprodukte erfolgte durch einfaches waschen mit Diethylether. Die Zwischenprodukte konnten jeweils durch NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Nur die fertigen Produkte mussten durch Flash-Chromatographie gereinigt werden. Die Ausbeuten über alle Schritte betragen zwischen 61 - und 71 % (das entspricht einer Ausbeute pro Stufe von 88 - 92 %). Die IF konnte in diesem Fall auch mit 92 % Ausbeute zurückgewonnen und wieder eingesetzt werden, ohne dass im Folgenden die Ausbeute reduziert oder andere Probleme bemerkt worden wären. In der Literatur finden sich noch mehrere solcher Beispiele.^{45,50,136–140}

1.5.4.2.2. IF zum Immobilisieren von Katalysatoren Durch die kovalente Verknüpfung von Katalysatoren mit ionischen *Tags* kann deren Abtrennung und Rück-

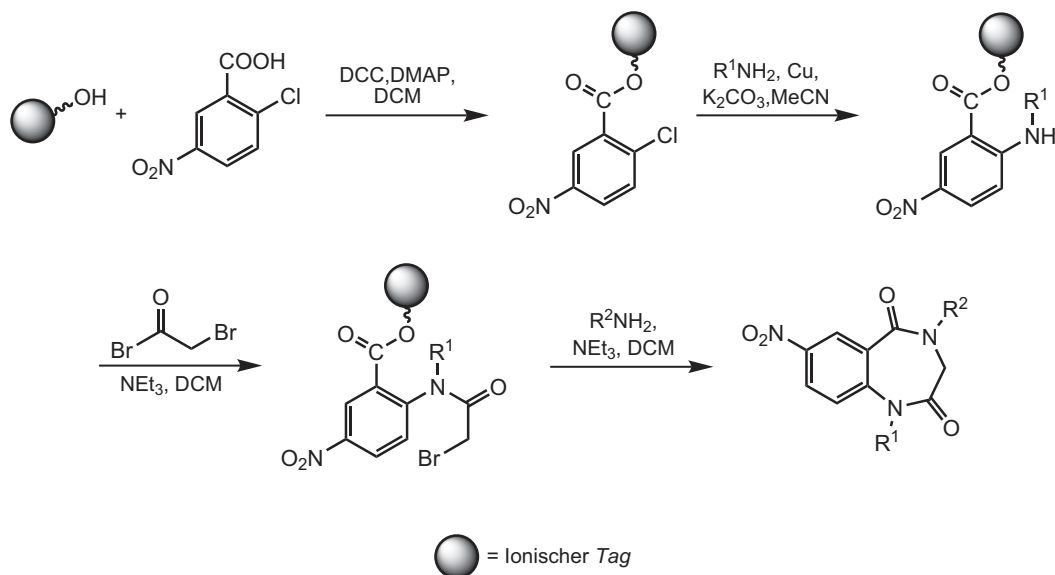


Abbildung 1.26.: Verwendung von IF als *Tag* für die Synthese von Benzodiazepinen

gewinnung am Ende der Reaktion deutlich vereinfacht werden.^{141,142} So gelang es N. Audic *et al.* und Q. Yao *et al.* unabhängig voneinander einen Metathesekatalysator mit einem ionischen *Tag* zu verknüpfen und so den Katalysator neunmal mit nur geringen Aktivitätsverlusten zu verwenden.^{143,144} Während die Produkte in Diethy-

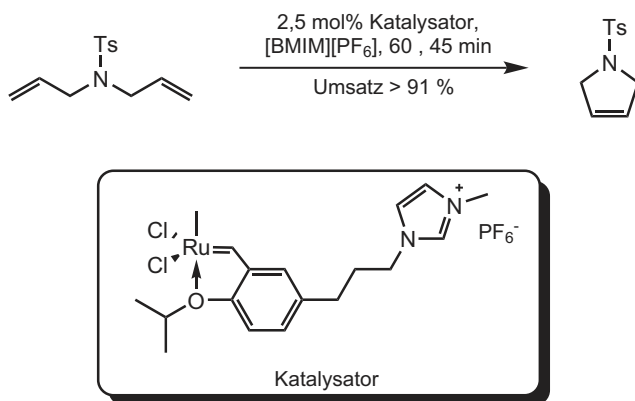


Abbildung 1.27.: Mit ionischem *Tag* versehener Metathesekatalyse für die Ringschlussmetathese

lther oder Alkanen gut löslich sind, sind die Katalysatoren darin schlecht löslich. So kann durch einfaches Waschen mit diesen Lösungsmitteln das Produkt abgetrennt werden, während der Katalysator zurückbleibt und wiederverwendet werden kann.

1.5.4.2.3. IF für die DNA Synthese Die Synthese von Oligonucleotiden erfolgt im Allgemeinen an der festen Phase. Auch in diesem Bereich wurde versucht,

durch den Einsatz von IF eine Alternative zu der üblicherweise eingesetzten CPG-Festphase zu schaffen. Dabei gelang R. Donga *et al.* die Synthese des Tetramers HO-TpTpTpT mit 57% Ausbeute über alle Schritte ohne aufwendige Reinigung der Zwischenprodukte.¹⁴⁵ Dazu wurde zuerst am 3'-Ende des Thymidins ein ionischer *Tag* eingefügt und anschließend das Tetramer aufgebaut. Die Reaktionsgemische

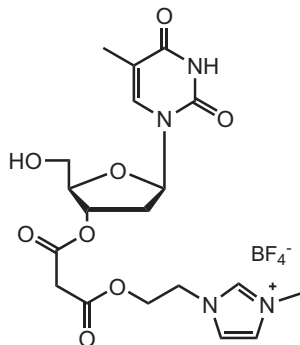


Abbildung 1.28.: Thymidin mit ionischem *Tag* für die DNA-Synthese in Lösung

wurden nach jedem Schritt nur mit einer Mischung aus Essigsäureethylester und Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet. Die Reinheit des fertigen Produkts war nach dem Ende der Synthese und dem Abspalten vom ionischen *Tag* vergleichbar mit der Reinheit des auf konventionelle Art hergestellten Tetramers.

1.5.4.2.4. IF als Ersatz der festen Phase in der Peptidchemie Auch im Bereich der Peptidsynthese wurden ionische *Tags* als Ersatz für die Festphasensynthese eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte bemerkenswerterweise ein Peptid mit 15 (zum Teil seitenkettengeschützten) Aminosäuren in hoher Ausbeute durch Fragmentkuppelungen synthetisiert werden.⁴⁹ Auch dieses sehr hydrophobe Peptid wurde effizient mit Diethylether aus der Lösung gefällt, was eine schnelle und einfache Reinigung erlaubte. In dieser Publikation wurde die erste Synthese eines mehrfach geladene *Tags* vorgestellt, der nicht von Aminosäuren sondern von IF abgeleitet ist. Ein Nachteil bei diesem Ansatz ist die Verwendung von DCC / DMAP für die Kupplung der ersten Aminosäure an den *Tag*. DMAP kann bei der Veresterung von Aminosäuren zur Racemisierung führen.

1.6. Dissertationsprojekt

In der vorliegenden Dissertation wurden funktionelle, ionische Schutzgruppen für verschiedene Zwecke entworfen und synthetisiert (Kapitel 2-5). Das 6. Kapitel befasst sich mit der Herstellung und Charakterisierung von Nicotinsäurederivaten.

Kapitel 2: Die oft zu geringe Löslichkeit der synthetisierten Peptide in wässrigen Lösungsmitteln stellt ein Problem für deren Reinigung dar. Die geringe Löslichkeit erschwert die Reinigung mittels präparativer RP-HPLC oder macht sie schlicht unmöglich.

Um die Löslichkeit von Peptiden in wässrigen Lösungsmitteln zu erhöhen sollte eine Methode entwickelt werden, die es gestattet, einen mit einem ionischen *Tag* versehenen Linker an den N-Terminus eines festphasengebundenen Peptids zu koppeln. Des Weiteren sollte eine Methode zur Messung der Löslichkeit schwer löslicher Peptide etabliert und der Effekt verschiedener ionischer *Tags* auf die Löslichkeit untersucht werden.

Eine weitere Aufgabe war es, dass Abspalten des *Tags* zu untersuchen. Dabei sollte nach milden Bedingungen gesucht werden, unter denen der Linker vollständig gespalten wird.

Kapitel 3: In der konventionellen Peptidchemie werden große Mengen potentiell gefährlicher Lösungsmittel eingesetzt. Aufgrund verschiedener Faktoren wird deren Verwendung in Zukunft vermutlich höhere Kosten verursachen. Daher wäre es ein großer ökonomischer Vorteil, wenn die Synthese der Peptide in wässrigen Lösungen durchgeführt werden könnte. Für die Peptidsynthese an der festen Phase mit wässrigen Lösungsmitteln ist eine ausreichende Löslichkeit der geschützten Aminosäurederivate in diesen Lösungsmitteln notwendig. Traditionelle Schutzgruppen wie die Fmoc- oder Boc-Gruppe sind sehr unpolar, die damit geschützten Aminosäurederivate sind daher oft nicht gut in Wasser löslich. Ionische Schutzgruppen für den N-Terminus von Aminosäuren könnten hier eine erfolgsversprechende Alternative sein. Im Rahmen dieser Arbeit sollten ionische Schutzgruppen für den N-Terminus von Aminosäuren entwickelt werden, um deren ausreichende Löslichkeit in Wasser sicherzustellen.

Die so hergestellten Derivate sollten sowohl unter konventionellen als auch mit Wasser als Lösungsmittel für Peptidkupplungen eingesetzt werden. Durch die konventionelle Kupplung an ein chirales Peptid sollte überprüft werden, ob es zur Racemisierung der Aminosäurederivate gekommen ist.

Kapitel 4: Wie in Abschnitt 1.2 auf Seite 7 der Einleitung beschrieben, gibt es immer noch Peptidsequenzen, deren chemische Synthese an der festen Phase schwierig oder unmöglich ist. Es liegen schon viele Untersuchungen zu diesem Problem und Vorschläge zu seiner Lösung vor, ein generell anwendbarer Ansatz ist allerdings bis jetzt noch nicht entwickelt worden. Aufgrund der Sequenzabhängigkeit des Problems ist es auch nicht sicher, ob eine solche allgemein einsetzbare Lösung möglich ist. Die bis jetzt in der Literatur publizierten Ergebnisse zeigen in vielen Fällen eindrucksvolle Verbesserungen. Aber alle diese Verfahren haben auch spezifische Nachteile und Einschränkungen.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten synthetische Zugänge zu Aminosäurederivaten mit ionischen funktionellen Schutzgruppen für eine Auswahl an funktionellen Gruppen proteinogener Aminosäuren gefunden werden. Neben der Rolle als Schutzgruppe sollte durch den ionischen *Tag* die Synthese von Peptiden mit schwierigen Sequenzen erleichtert werden.

Kapitel 5: Die meisten der im Rahmen dieser Arbeit herzustellenden Substanzen sind ionische Verbindungen. Substanzen mit hoher Polarität bringen zum Teil erhebliche Einschränkungen bei der Auswahl der analytischen Methoden und den Möglichkeiten zur präparativen Reinigung mit sich. Daher sollten allgemein anwendbare Methoden entwickelt werden, um eine zuverlässige und schnelle Analyse der Reaktionsgemische zu ermöglichen. Aufbauend darauf sollten Reinigungsverfahren etabliert werden, die die Gewinnung der ionischen Verbindungen im präparativen Maßstab erlauben. Diese Arbeiten und Ergebnisse sind die Grundlage zum Gelingen der Synthese ionischer Verbindungen. Die im Kapitel 5 vorgestellten Erfahrungen und Ergebnisse sind die Grundlage der in Kapitel 2, 3 und 4 vorgestellten Arbeiten.

Kapitel 6 Für den Einsatz als Organokatalysator sollte ein Nicotinsäurederivat synthetisiert werden. Dieses Derivat sollte dann an Peptide gekuppelt werden, um damit die stereoselektive Reduktion von Ketonen zu katalysieren.

Teil II.
Ergebnisse

2. Entwicklung von *Tags* zur Erhöhung der Löslichkeit von Peptiden

2.1. Konzeption des *Tag*-Ansatzes

2.1.1. Zielsetzung des *Tag*-Ansatzes

Es fehlt im Moment ein allgemeines Verfahren, um in Wasser schwerlösliche Peptide für die Reinigung mittels präparativer HPLC ausreichend zu solubilisieren. Für diese Anwendung sollte eine funktionelle Schutzgruppe mit ionischem *Tag* entworfen werden, welche die folgenden Anforderungen erfüllt:

- Der *Tag* soll am Ende der Synthese des Peptids über einen basenlabilen Linker mit dem N-Terminus verknüpft werden können.
- Es sollen einfach und mehrfach geladene *Tags* an den basenlabilen Linker gekuppelt werden können, um den Einfluss der Ladungen auf die Löslichkeit zu untersuchen.
- Der *Tag* soll die Wasserlöslichkeit des Peptids auf mehr als 5 mg/ml erhöhen.⁷⁴
- Die Löslichkeit des vollständig geschützten Peptids mit *Tag* soll ausreichend groß für Fragmentkupplungen sein.
- Nach der Reinigung soll der *Tag* unter milden basischen Bedingungen vom N-Terminus abgespalten und vom Peptid abgetrennt werden können.

2.1.2. Allgemeines Design der funktionellen Schutzgruppe zur Erhöhung der Löslichkeit von Peptiden

Die hier entworfene funktionelle Schutzgruppe besteht aus zwei Teilen. Einerseits enthält sie eine polare Gruppe (den *Tag*), andererseits einen Linker zur Verknüpfung mit dem Peptid.

Der *Tag* Die polare Gruppe soll die Löslichkeit des gesamten Konstrukts und des daran gebundenen Peptids in Wasser verbessern. In dieser Arbeit wurden von IF abgeleitete polare Gruppen untersucht. Aus 1-Methylimidazol durch Quaternisierung

hergestellte IF zeigen eine hohe Stabilität, sind sehr polar und durch die Wahl des Anions kann die Wasserlöslichkeit des *Tags* in einem weiten Bereich variiert werden. So sind Halogenide, Acetate und Methansulfonate in Wasser gut, Hexafluorophosphate oder Bis(trifluormethylsulfonyl)imide hingegen schlecht löslich.^{99,101}

Der ionische *Tag* soll eine oder mehrere positive Ladungen aufweisen. In dieser Arbeit wurde für einfach geladene *Tags* meistens das vom 1-Methylimidazol abgeleitete Motiv verwendet.

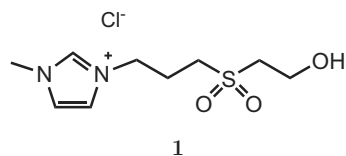


Abbildung 2.1.: Design des oxidierten Linkers mit einfach geladenem *Tag*

Zur Verbesserung der Löslichkeit größerer Peptide ist wahrscheinlich ein mehrfach geladener *Tag* nötig. Für die mehrfach geladenen *Tags* wurden die Kationen linear angeordnet.⁴⁹

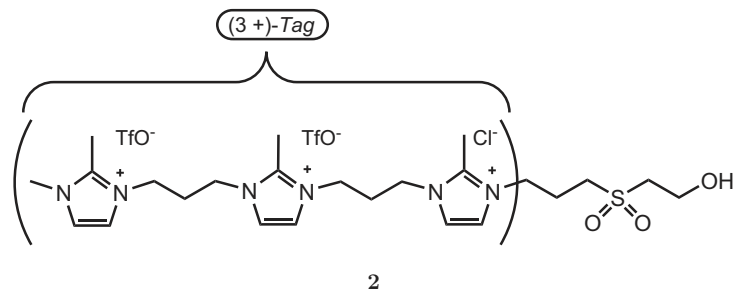


Abbildung 2.2.: Design des an den oxidierten Linker gekuppelten dreifach geladenen *Tag*

Ein solcher *Tag* kann auf unterschiedliche Weise mit dem Peptid verknüpft werden. Einerseits kann die letzte Aminosäure in der Peptidsynthese mit dem *Tag* geschützt sein, andererseits kann der *Tag* auch nach der Synthese eingeführt werden. Das Kuppeln des ionischen *Tags* nach der Synthese des Peptids bietet mehrere Vorteile:

- Es muss nicht von jeder Aminosäure das entsprechende Derivat mit dem ionischen *Tag* synthetisiert werden. Dies bedeutet bei den vielfältigen Möglichkeiten (je 21 L- und D-Isomere der proteinogenen Aminosäuren plus alle gewünschten, nicht codierten und nicht natürlichen Aminosäuren) eine erhebliche Erleichterung.

- Es besteht keine Gefahr der Racemisierung des Aminosäurederivats während der nucleophilen Substitution mit dem *Tag*. Auch können für die Peptidsynthese die bewährten Fmoc-Derivat verwendet werden.
- Wenn sich nach der Synthese an einer kleinen Probe herausstellt, dass ein neu hergestelltes Peptid in Wasser zu schlecht löslich ist um es mittels präparativer HPLC reinigen zu können, so kann der *Tag* noch nachträglich eingeführt werden. Ist der *Tag* kovalent an eine Aminosäure gekuppelt, so würde in diesem Fall die Sequenz des Peptids verändert (oder das Peptid wird bis auf die N-terminale Aminosäure neu synthetisiert und dann die entsprechenden Aminosäure mit dem ionischen *Tag* gekuppelt).
- Auch schwerlösliche Verbindungen, welche keine Aminosäuren bzw. Peptide sind, aber über ein freies Amin verfügen, können mit dieser Methode solubiliert werden.

Der Linker Durch den Linker soll der *Tag* nach der Synthese an das festphasengebundene Peptid gekuppelt und nach der Reinigung mittels RP-HPLC unter milden Bedingungen wieder abgespalten werden. Die Wahl viel auf einen basenlabiler Linker, der zwischen der polaren Gruppe und der Aminosäure eingefügt werden soll und eine ausreichende Orthogonalität zu den bei der Fmoc-Strategie oft verwendeten säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen bietet. Carbamate des Ethoxysulfons können im basischen Milieu abgespalten werden, da die Sulfongruppe die Acidität der Protonen an der benachbarten Methylengruppe erhöht.^{36,146} Diese Protonen haben im Dimethylsulfon einen pK_S -Wert von 23 und sind somit genauso sauer wie die Protonen am C-9 in Fluoren.^{109,147} Vermutlich wird analog zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe der Linker nach einem $E1_{cb}$ -Mechanismus durch eine Base eliminiert und das Anion einer Carbaminsäure freigesetzt.¹⁴⁸ Diese ist unbeständig und zerfällt entweder direkt oder nach Deprotonierung der Base irreversibel unter Freisetzung von CO_2 (Abb.2.3).

Das Sulfon kann über einen Aromaten oder eine Alkylkette mit dem ionischen *Tag* verbunden werden. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Alkylketten in diesem Fall zu einer höheren Wasserlöslichkeit führen.⁴³ So wurden Sulfone mit einer Methyl- oder Ethylgruppe in dieser Position als wasserlösliche Schutzgruppen vorgeschlagen (Abb. 1.10 auf Seite 16).^{38,43} Ohne polare Gruppe war die Wasserlöslichkeit der so geschützten Derivate nicht in allen Fällen ausreichend (z.B. im Fall des Phenylalaninderivats).⁴³ Dies zeigt, dass ein ionischer *Tag* notwendig ist.

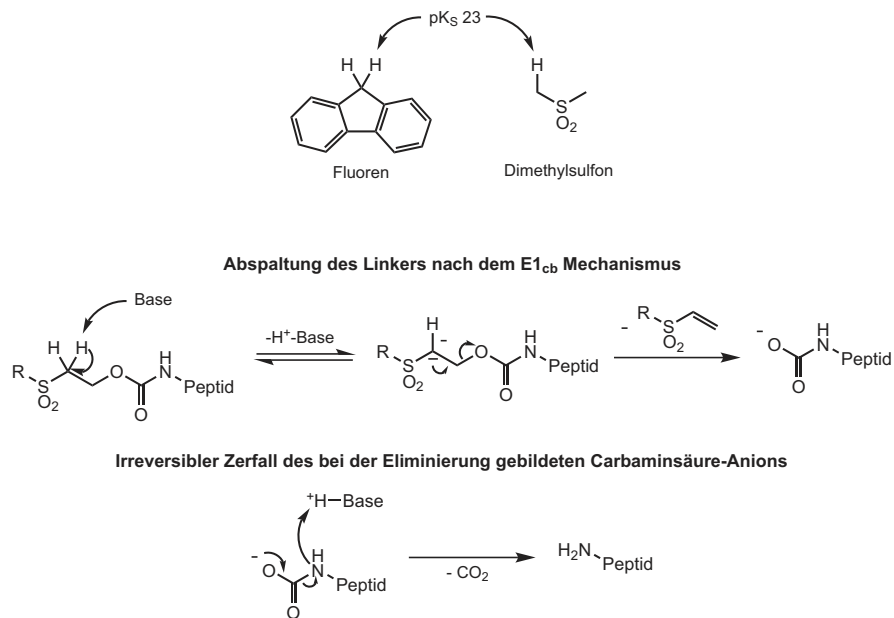


Abbildung 2.3.: Grundlage der Verwendung des Ethoxysulfonmotivs für einen basenlabilen Linker

Der Synthesepfad Die Synthese der mit dem ionischen *Tag* versehenen Schutzgruppen ist in Abbildung 2.4 skizziert. Zuerst wurde der Linker hergestellt und dann zum Sulfon oxidiert. Anschließend wurden die verschiedenen *Tags* angefügt.

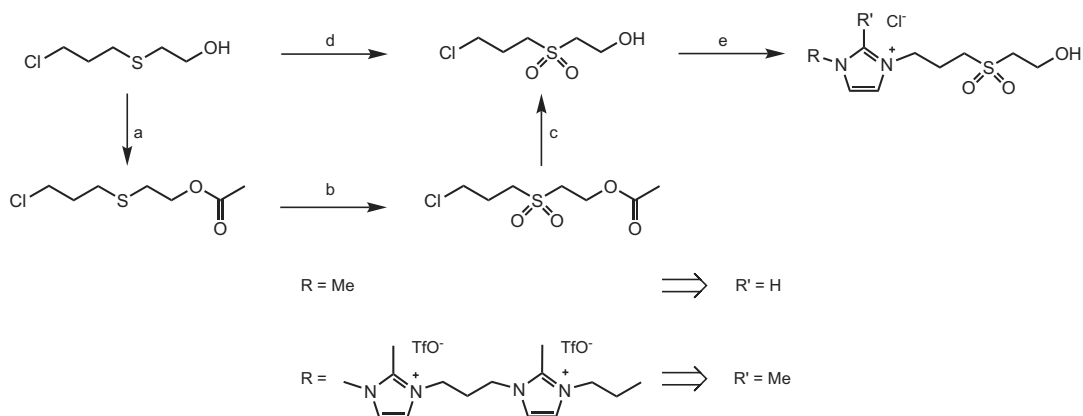


Abbildung 2.4.: Darstellung der Synthese der mit einem basenlabilen Linker versehenen *Tags*

Nomenklatur des basenlabilen Linkers und davon abgeleiteter Derivate Für die abkürzende Bezeichnung der in den Kapiteln 2 und 3 vorgestellten Verbindungen wurde eine selbst entwickelte Nomenklatur verwendet (Abb. 2.5).

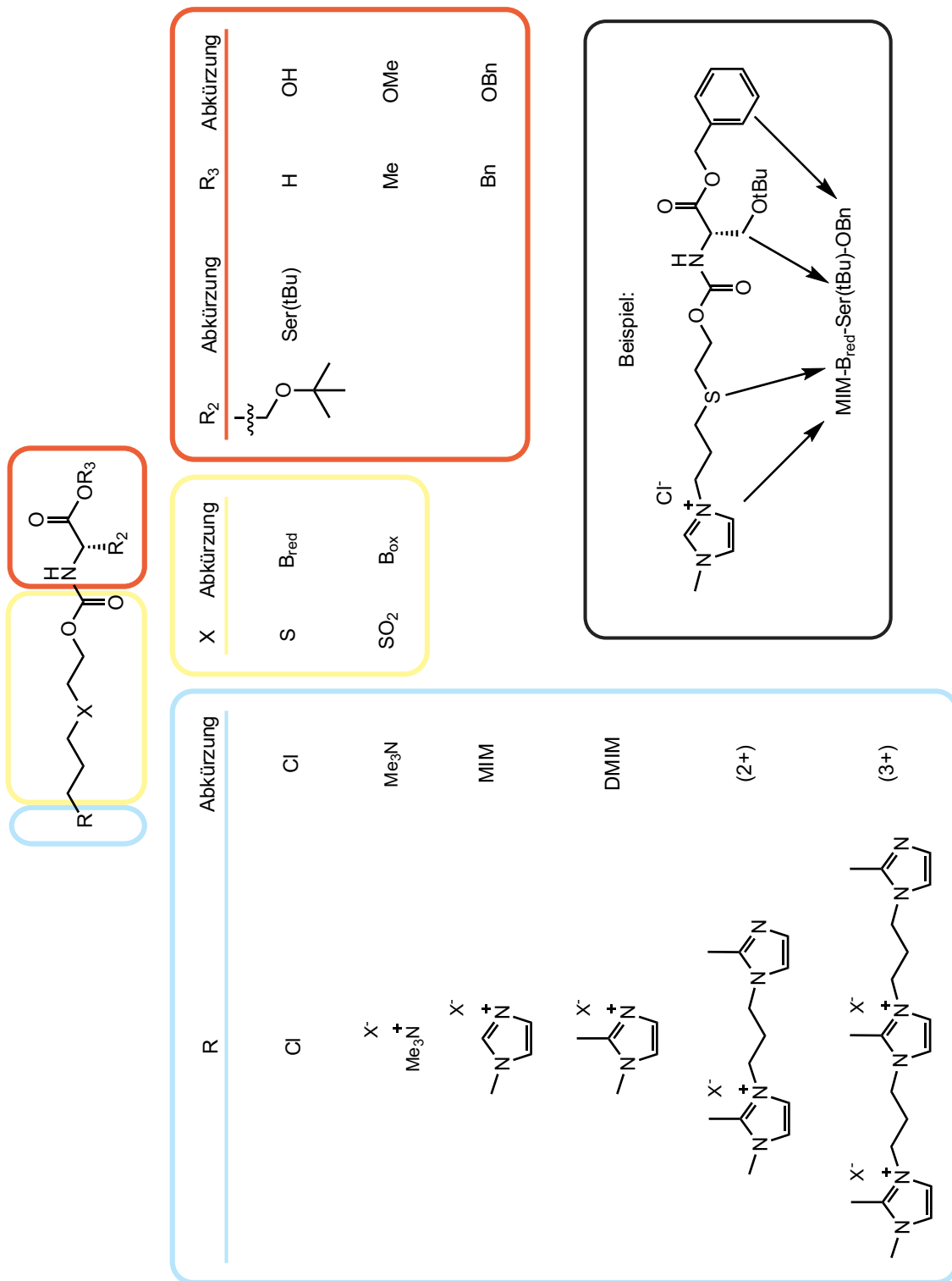


Abbildung 2.5.: Darstellung der verwendeten Nomenklatur

2.2. Synthese des basenlabilen Linkers

2.2.1. Synthese des Linkers Cl-B_{red}-OH

Zuerst wurde der Linker in der reduzierten Form hergestellt.^{149, 150} Für die Synthese des Linkers ist die Verwendung von 1-Brom-3-chlorpropan der von 1,3-Dibrompropan vorzuziehen. Zwar wäre die Reaktivität des Bromids **4** höher, was mildere Reaktionsbedingungen während der Einführung des *Tags* durch nucleophile Substitution erlauben würde. Bei Verwendung von 1,3-Dibrompropan wurde ein Gemisch aus dem gewünschten Bromderivat des Linkers **4** und dem Diol **5** erhalten. Dieses lies sich aufgrund der geringen Siedepunktsdifferenz der beiden Produkte (**4** und **5**) durch Destillation nur schwer mit ausreichender Reinheit trennen.

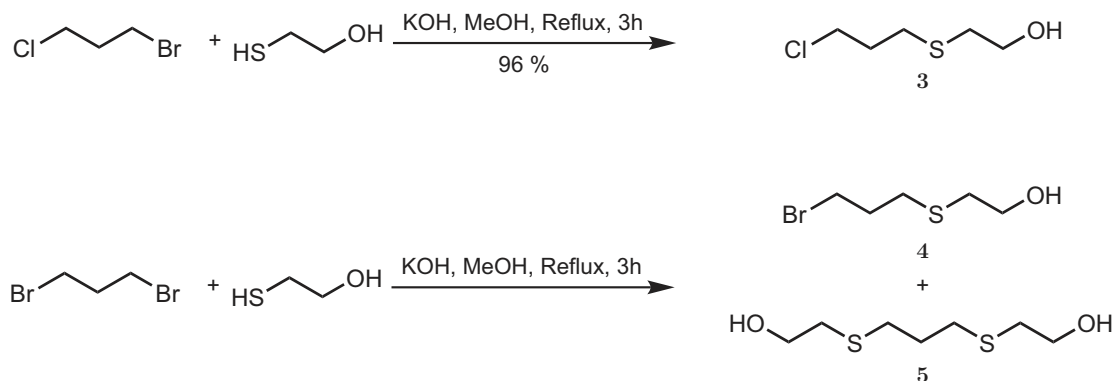


Abbildung 2.6.: Synthese des Linkers Cl-B_{red}-OH

2.2.2. Selektive Oxidation des Thioethers zum Sulfon

Der Linker **3** musste selektiv vom Thioether zum Sulfon oxidiert werden, ohne dabei den Alkohol zum Aldehyd oder zur Säure zu oxidieren. Thioether können durch Chrom(IV)-Verbindungen (+ 1,33 V als Chromat), Kaliumpermanganat (+ 1,51 V) oder Wasserstoffperoxid (+ 1,78 V) zum Sulfon oxidiert werden (in Klammern sind die Standard-Reduktionspotentiale für diese Verbindungen bei 25 °C in Wasser angegeben).¹⁵¹ Jedes dieser drei Oxidationsmittel wurde in der Literatur allerdings auch dazu verwendet, um Alkohole zu oxidieren. Das Problem bestand also darin, Bedingungen zu finden, unter denen die selektive Oxidation des Thioethers zum Sulfon möglich war.

2.2.2.1. Schützung des Alkohols, Oxidation des Thioethers und abschließende Entschützung

Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen besteht darin, die Alkohlfunktion während der Oxidationsreaktion zu schützen. Eine der am weitesten verbreiteten Varianten zur Schützung von Alkoholen ist die Veresterung mit Essigsäureanhydrid oder Essigsäurechlorid, welche auch in diesem Fall erfolgreich war (Abb. 2.7).¹⁵²

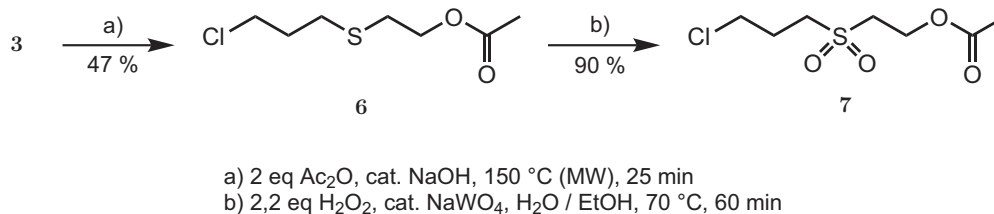


Abbildung 2.7.: Schützung des Linkers **3** durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in der Mikrowelle und anschließende Oxidation des Thioethers

Das geschützte Derivat wurde anschließend mit Wasserstoffperoxid und Natriumwolframat als Katalysator zum Sulfon oxidiert. Die Reaktion erfolgte in einem Wasser/Ethanol Lösungsmittelgemisch mit sehr guter Ausbeute (Abb. 2.7). Es konnte der Geruch von Acetaldehyd wahrgenommen werden, was darauf hindeutet, dass unter diesen Bedingungen primäre Alkohole zum Aldehyd oxidiert werden konnte. Anschließend wurde versucht, die Schutzgruppe durch Verseifen des Esters mit einer Mischung aus Natronlauge und Methanol abzuspalten. Dabei konnte in einer Ausbeute von 42% nicht der oxidierte Linker, sondern der davon abgeleitete Methylether **9** isoliert werden (Abb. 2.8). Dieser wurde durch Massen- und NMR-Spektroskopie sowie Elementaranalyse zweifelsfrei identifiziert.

Interessant ist die Tatsache, dass das sehr schwache Nucleophil Methanol oder das in sehr geringer Menge vorliegende Methanolat-Ion in der Lage ist, so effizient den Methylether zu bilden. Der Mechanismus dafür ist nicht bekannt. Im Gegensatz zum Nachbargruppeneffekt in β -Position von Thiolen oder Thioethern kann in diesem Fall der Schwefel die Reaktion nicht durch freie Elektronenpaare beschleunigen. In der Oxidationsstufe +II (Sulfon) befinden sich am Schwefel keine freien Elektronenpaare mehr. Eventuell liegt in diesem Fall ein Eliminierungs-Additionsmechanismus vor. Die Verwendung des Acetats als Schutzgruppe ermöglicht somit nicht die Herstellung des oxidierten Linkers.

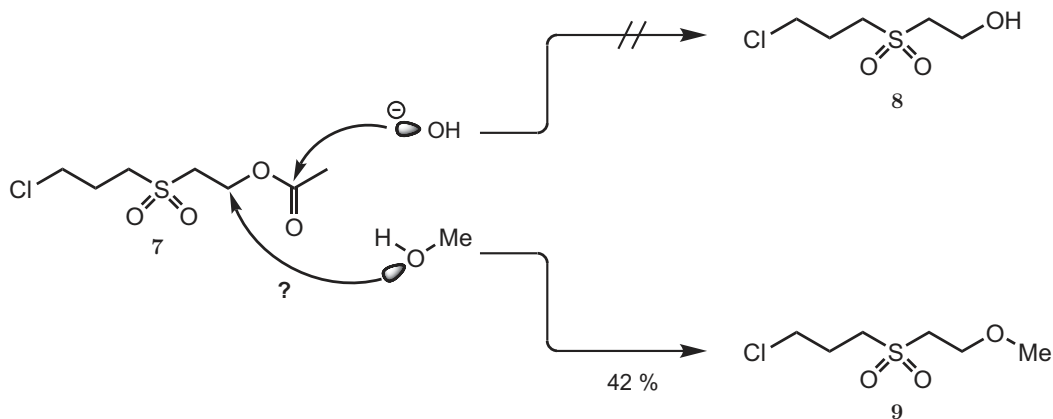


Abbildung 2.8.: Darstellung des Ergebnisses der Verseifung des geschützten oxidierten Linkers **7**

2.2.2.2. Direkte, selektive Oxidation des Thioethers zum Sulfon in Gegenwart der freien Hydroxylgruppe

Eine andere Möglichkeit stellt die direkte Oxidation ohne Schützung der Alkoholfunktion dar. In der Literatur existiert ein Beispiel, in welchem die Oxidation von Thioethern mit Hilfe von Wolframat- oder Vanadat-Katalysatoren mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Hydroxylgruppen selektiv gelang.¹⁵³ Mit dieser Methode konnte der Thioether im Linker **3** zum gewünschten Sulfon **8** oxidiert werden, allerdings mit wechselnder Ausbeute. Insbesondere die Herstellung des Katalysators aus Wolframsäure war schlecht reproduzierbar. Durch die Verwendung von Natriumwolframat und den Einsatz einer Spritzenpumpe (um die Konzentration an Wasserstoffperoxid im Reaktionsgemische niedrig zu halten) konnte die Ausbeute auf 56% gesteigert werden (Abb. 2.9).

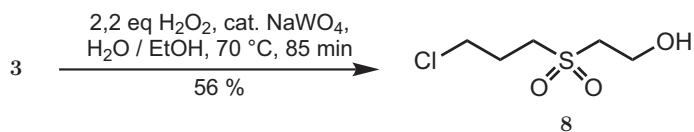


Abbildung 2.9.: Direkte Oxidation des Thioethers

2.3. Mehrfach geladene Tags

Zur Verbesserung der Löslichkeit größerer Peptide ist es wahrscheinlich notwendig, mehrfach geladene Gruppen als *Tag* zu verwenden. Die Ladungen können dabei prinzipiell linear oder verzweigt angeordnet sein. Nach anfänglichen Versuchen mit verzweigten Strukturen wurde der Fokus auf linear angeordnete, mehrfach geladene *Tags* gelegt.⁴⁹ Ein großer Vorteil der linearen Anordnung ist der schrittweise Aufbau, der es relativ einfach ermöglicht zweifach, dreifach oder auch höher geladene, polare Gruppen aufzubauen (Abb. 2.2 auf Seite 46). Entsprechend den Angaben in der Literatur wurde die Synthese von Bausteinen für zweifach und dreifach geladene *Tags* durchgeführt.⁴⁹ Dabei konnte die in der Literatur angegebene Ausbeute nicht bei jedem Schritt reproduziert werden. Insbesondere die erste Stufe ergab deutlich mehr Nebenprodukt. Durch langsames Zutropfen des gelösten 1,2-Dimethylimidazols (DMIM) mit Hilfe einer Spritzenpumpe konnte eine Ausbeute von 53% **10** erzielt werden. Daneben wurden 23% des unerwünschten Nebenproduktes **11** erhalten, welches durch Umkristallisation abgetrennt werden konnte (Abb. 2.10).

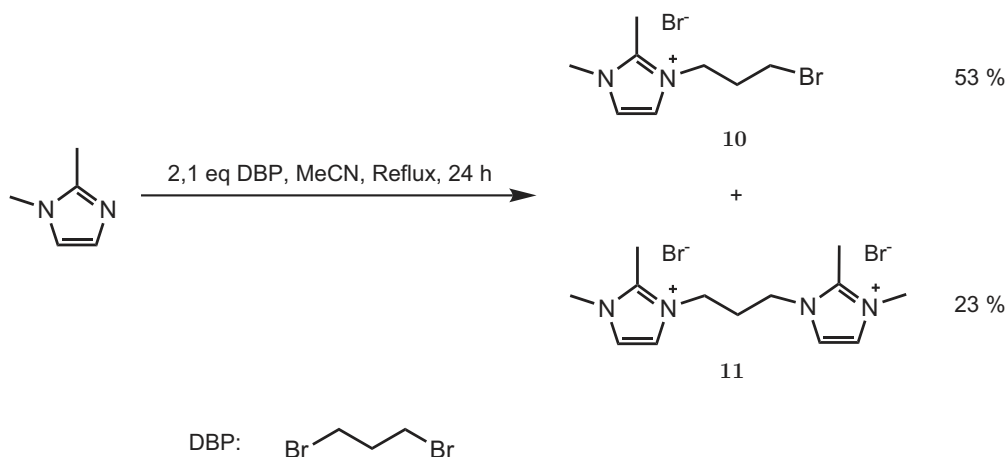


Abbildung 2.10.: Erster Schritt des linearen Aufbaus der polaren Gruppe

Die weiteren Schritte zum Aufbau mehrfach geladener *Tags* sind in Abbildung 2.11 dargestellt. Verbindung **12** ist der Ausgangspunkt für zweifach geladene *Tags*, Verbindung **15** der für dreifach geladene *Tags*. Die Produkte der einzelnen Reaktionen waren kristalline Feststoffe, welche durch Umkristallisation gereinigt werden konnten. Von den Verbindungen **10**, **11**, **12**, **13** und **14** konnten Einkristalle erhalten werden, mit denen die Strukturen der ionischen Substanzen durch Röntgenbeugungsexperimente bestätigt werden konnten. Auch für das Nebenprodukt **11** war die Aufklärung der Struktur durch Röntgenstrukturanalyse erfolgreich.

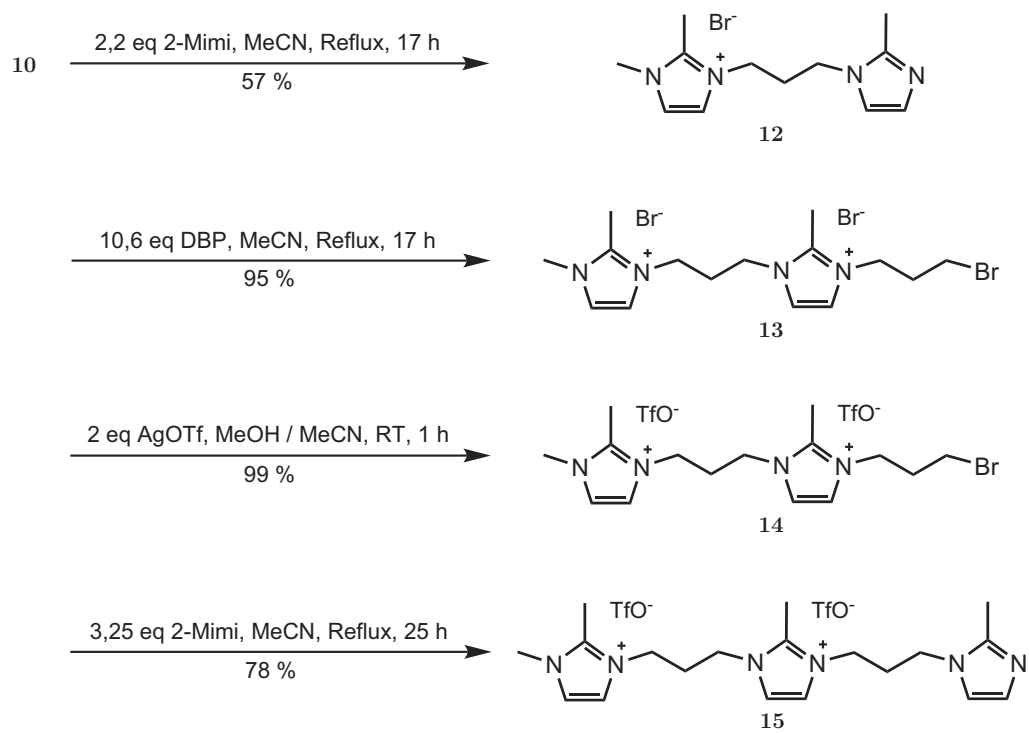


Abbildung 2.11.: Weiterer Aufbau der linearen polaren Gruppe

2.4. Kupplung der *Tags* an den basenlabilen Linker

2.4.1. Synthese des mit einem einfach geladenen *Tag* versehenen Linkers

Der oxidierte Linker **8** (Cl-B_{ox}-OH) wurde mit 1-Methylimidazol in guter Ausbeute zum gewünschten Produkt **1** umgesetzt (Abb. 2.12).¹¹¹ Da in diesem Schritt die geladene Gruppe generiert wird und die Edukte nicht geladen sind, kann der mit dem ionischen *Tag* gekuppelte Linker durch Fällen mit Diethylether in sehr reiner Form erhalten werden.

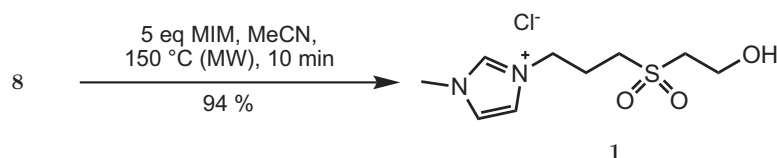


Abbildung 2.12.: Nucleophile Substitution mit 1-Methylimidazol am oxidierten Linker **8**

2.4.2. Synthese des mit einem dreifach geladenen *Tag* versehenen Linkers

Der Basutein für den dreifach geladene *Tag* (**15** (3+)) wurde mit dem oxidierten Linker **8** (Cl-B_{ox}-OH) erfolgreich zur dreifach geladenen Schutzgruppe umgesetzt (Abb. 2.13). Dies steht im Gegensatz zu den erfolglosen Versuchen mit dem nichtoxidierten Linker **3** (3.2.3.2 auf Seite 107).

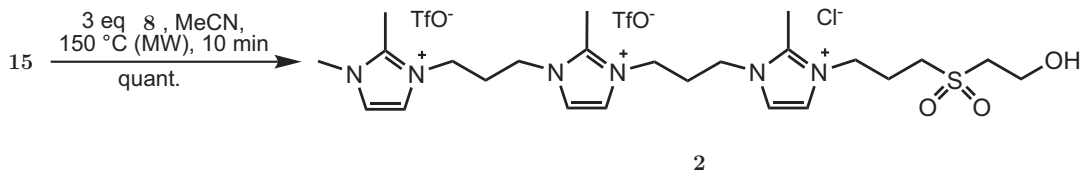


Abbildung 2.13.: Synthese der dreifach geladenen Schutzgruppe **2**

Die beiden mit einfach beziehungsweise mit dreifach geladenem *Tag* versehenen Linker standen damit für die Kupplung an den N-Terminus des Referenzpeptids zur Verfügung.

2.5. Kupplung der *Tags* an H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotriptyl

2.5.1. Synthese des Referenzpeptids

Für den *Tag*-Ansatz ist es notwendig, das fertige Peptid mit freiem N-Terminus an der festen Phase gebunden zu haben. Anders als beim Schutzgruppenansatz (Kapitel 3) wird beim *Tag*-Ansatz keine Aminosäure mehr zusätzlich eingefügt. Das Design des Referenzpeptids wird eingehend in Abschnitt 3.3 beschrieben. Die Herstellung des Testpeptids erfolgte aufbauend auf die Synthese des festphasengebundenen Peptids **16** (H-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotriptyl) (Absch. 3.3). Nach dem Entfernen der letzten Fmoc-Schutzgruppe blieb das Peptid am Harz gebunden.

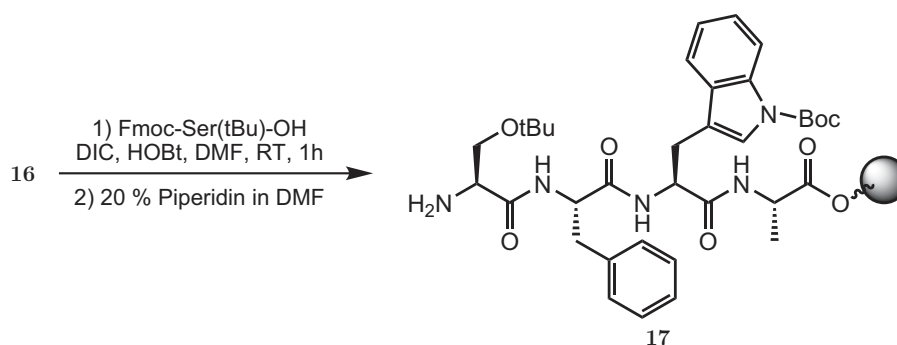


Abbildung 2.14.: Synthese des Referenzpeptids H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotriptyl **17**

2.5.2. Kupplung der *Tags* an das festphasengebundene Peptid

Die Kupplung der *Tags* über den Linker an das Referenzpeptid **17** erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde der Linker mit ionischem *Tag* mit Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat zu einem reaktiven Carbonat umgesetzt. Diese Reaktion erfolgte in Acetonitril. Durch Fällen mit kaltem Diethylether wurde das Zwischenprodukt abgetrennt. Anschließend wurde es in DMF gelöst und an das festphasengebundene Peptid **17** gekuppelt (Abb. 2.15). Dabei waren zwei Probleme zu lösen.

2.5.2.1. Problem 1: Balance von Aktivierungsreagenz und Basenstärke

Ein Problem bei der Aktivierung und Kupplung der fertigen Schutzgruppe ist die Instabilität des Zwischenprodukts. Bei der Aktivierung wird die Alkoholfunktion,

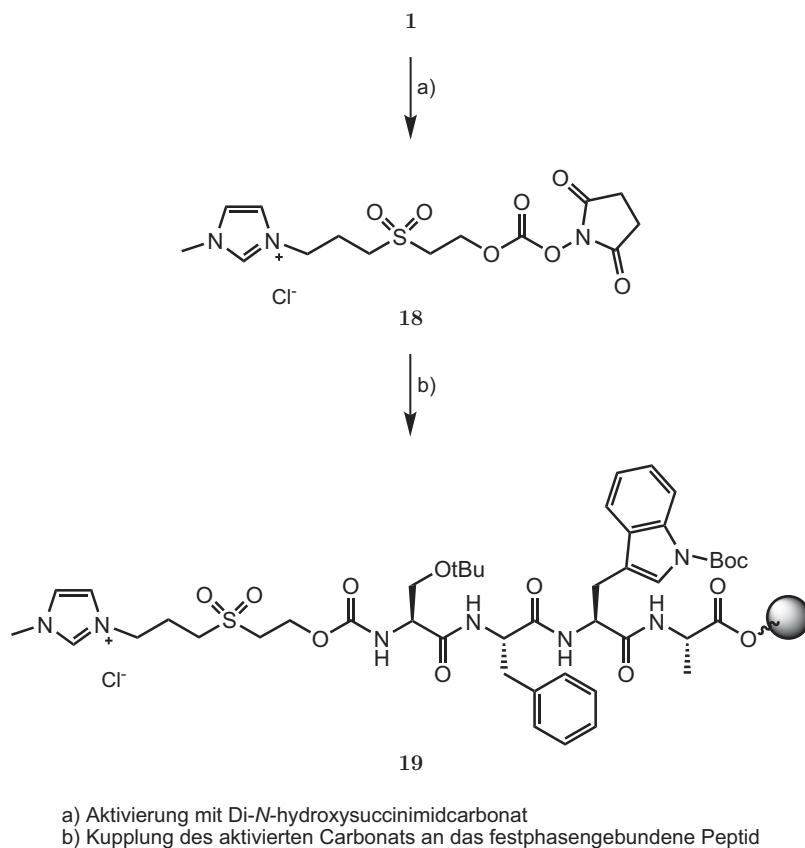


Abbildung 2.15.: Schematische Darstellung des *Tag*-Ansatzes anhand des mit einfach geladenem *Tag* versehenem Linkers und dem Referenzpeptid **17**

welche eine schlechte Abgangsgruppe ist, in eine gute Abgangsgruppe überführt. Durch die für diese Reaktion benötigten basischen Bedingungen kann es zur β -Eliminierung kommen, wodurch die Ausbeute reduziert wird (Abb. 2.16).

Der kritische Punkt bei dieser Reaktion ist die Balance zwischen der Abgangsgruppe und der Basenstärke. Wird für die Aktivierung eine Spezies verwendet, die eine sehr gute Abgangsgruppe ist, oder werden zu starke Basen verwendet, so wird die Eliminierungsreaktion begünstigt. Bei dem hier verwendeten System ist die Kombination von Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat als Aktivierungsreagenz und Pyridin als Base erfolgreich. Andere Basen wie z.B. Triethylamin führen zu deutlich mehr Eliminierungsprodukt.

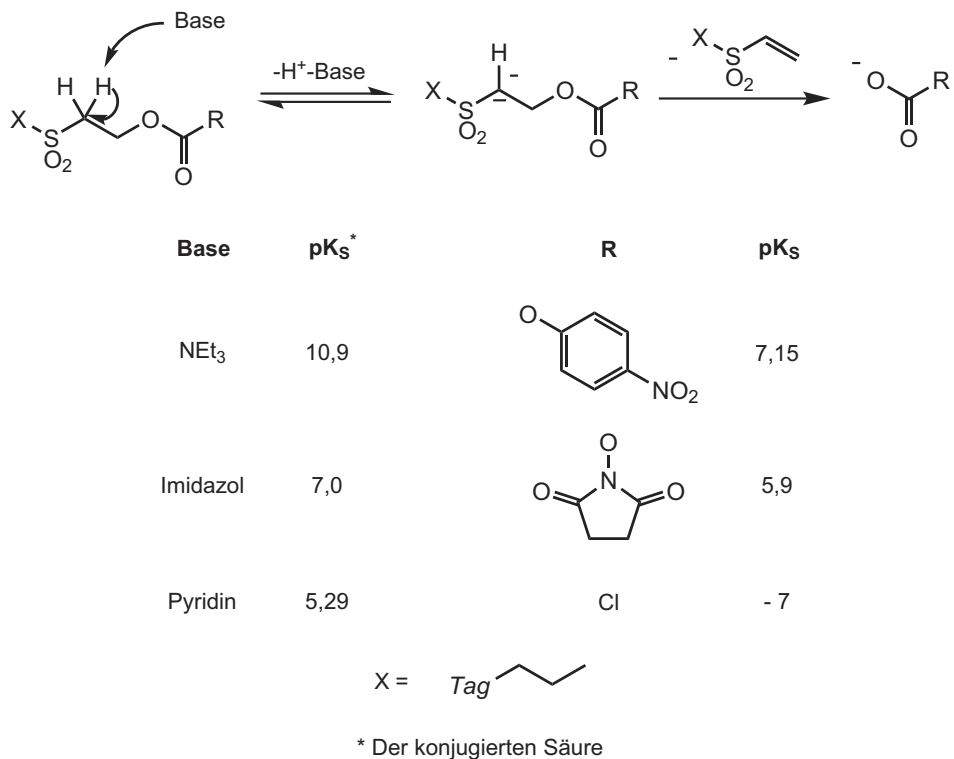
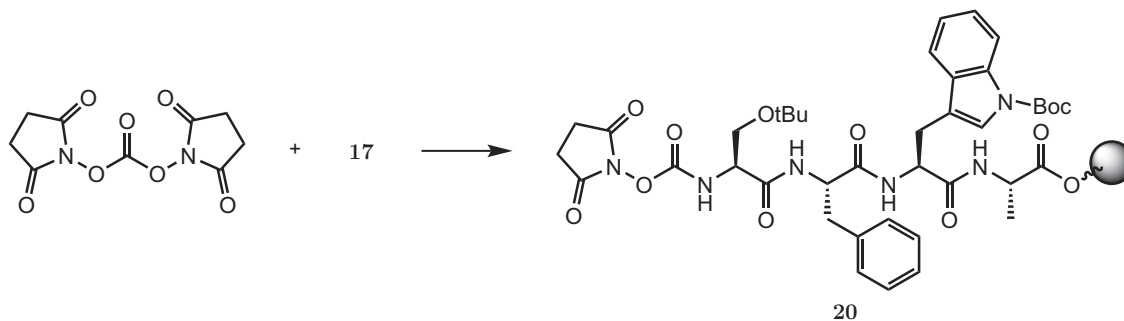


Abbildung 2.16.: Eliminierung an der aktivierten Schutzgruppe

2.5.2.2. Problem 2: Optimale Aktivierungsdauer

Durch eine einfache Etherfällung kann überschüssiges Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat nach der Aktivierung nicht ausreichend gut abgetrennt werden. Wird das Gemisch aus aktiviertem Linker und Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat zum festphasengebundenen Peptid gegeben, so reagiert bevorzugt das Aktivierungsreagenz mit dem freien Amin des Peptids (Abb. 2.17). Das bei der Reaktion gebildete Carbamat ist unter den gegebenen Bedingungen stabil und blockiert effizient die Peptidkette.

Abbildung 2.17.: Reaktion von überschüssigen Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat mit dem N-Terminus des festphasengebundenen Referenzpeptids

In Lösung wird für die Aktivierung von Alkoholen Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat im deutlichen Überschuss eingesetzt, daher kann unter den üblichen Bedingungen die Blockierung des Peptids quantitativ ablaufen. Wenn der aktivierte Alkohol an ein festphasengebundenes Peptid gekuppelt werden soll, ist es notwendig, einen Unterschuss an Aktivierungsreagenz einzusetzen und dessen vollständigen Umsatz mit dem Linker abzuwarten.

Auf der anderen Seite sollte die Aktivierung nicht zu lange dauern. Der aktivierte Linker ist unter den Reaktionsbedingungen nicht stabil und bildet langsam das Eliminierungsprodukt.

Optimierung der Aktivierungsdauer anhand einer Modellreaktion Mit dem Linker mit einfach positiv geladenem *Tag* **1** und Benzylamin wurde die optimale Dauer der Aktivierung ermittelt. Für das Experiment wurde **1** (MIM-*B_{ox}*-OH) mit Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat und Pyridin in DMF bei Raumtemperatur aktiviert. Nach 1, 2,5, 5, 10, 15, 30 und 240 min wurden jeweils Proben genommen und mit einem Überschuss Benzylamin umgesetzt (Abb. 2.18). Das Reaktionsgemisch wurde mit Hilfe der HPLC untersucht und die Intensität der UV-Signale des gewünschten Carbamats **21** verwendet, um einen qualitativen Überblick über den Verlauf der Reaktion zu erhalten.

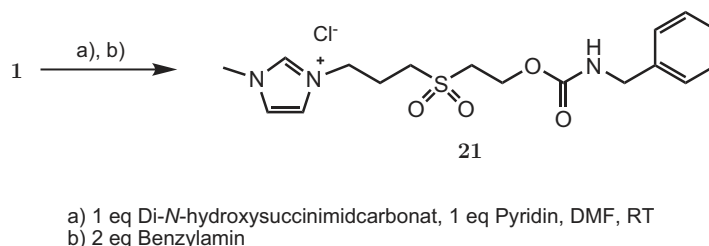


Abbildung 2.18.: Darstellung der Modellreaktion des aktivierten Linkers mit einfach geladenem *Tag* und Benzylamin

Die Bildung des Carbamats **21** erreichte nach ca. 60 min ihr Maximum (Abb. 2.19), nach 30 min war die Reaktion vermutlich noch nicht vollständig abgelaufen.

Das beim quengen im Überschuss zugesetzte Benzylamin ermöglicht den Nachweis von noch nicht umgesetztem Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat. Benzylamin reagiert bei Anwesenheit von Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat zum *N,N'*-Dibenzylharnstoff (Abb. 2.20).

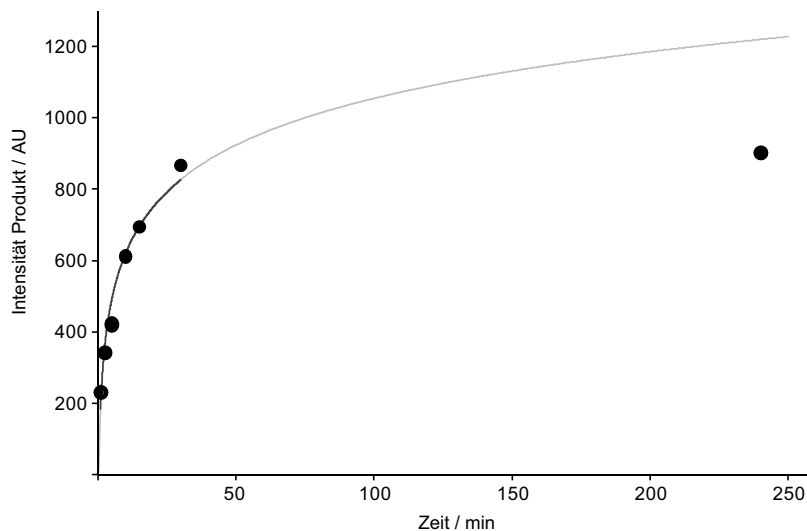


Abbildung 2.19.: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung mit MIM-B_{ox}-OH (**1**), Benzylamin und Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat

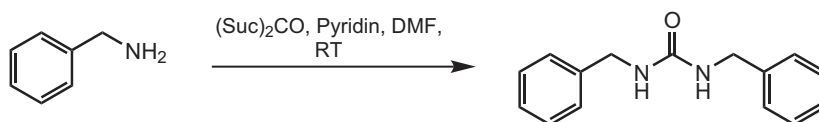


Abbildung 2.20.: Reaktion von Benzylamin mit Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat

Dieser ist leichter zu detektieren und erlaubt somit den indirekten Nachweis von noch nicht umgesetztem Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat. Wenn noch Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat vorhanden war, bedeutet dies zum einen, dass der Alkohol des Linkers noch nicht vollständig aktiviert wurde und andererseits bei der Kupplung des *Tags* an die feste Phase die Gefahr der in Abbildung 2.17 dargestellten Nebenreaktion besteht.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der gebildeten Menge des *N,N'*-Dibenzylharnstoffs, so wird klar, dass nach 30 min noch immer nicht umgesetztes Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat in der Reaktionslösung vorhanden ist (Abb. 2.21). Dies unterstützt die bei der Untersuchung der Produktbildung aufgestellte These, dass die Reaktion nach 30 min noch nicht vollständig abgelaufen ist.

Die bei der Untersuchung der Modellreaktion erhaltenen Werte können nicht direkt auf die gewünschte Reaktion übertragen werden, liefern aber einen guten Ausgangspunkt für die Optimierung der Reaktion an der festen Phase. Mit einer Aktivierungs- und Kupplungszeit von je 1 h wurden die geschützten Peptide **22** und **23** in guten

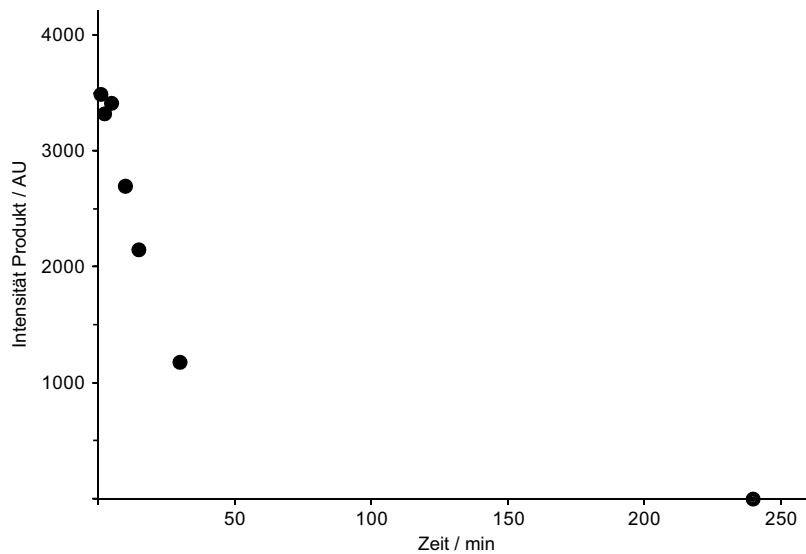
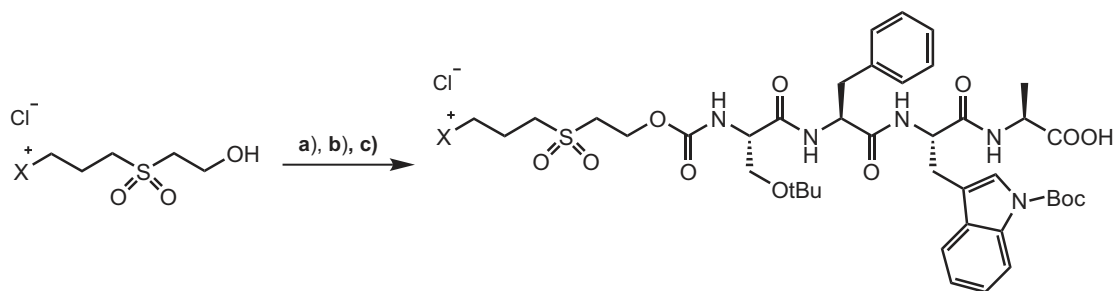


Abbildung 2.21.: Zeitlicher Verlauf der Nebenproduktbildung mit **1**, Benzylamin und Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat

Ausbeuten erhalten (Abb. 2.22).



- a) 3 eq (SucO)₂CO, 6 eq Py, MeCN, RT, 1 h
 b) 1 eq **16**(H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotriyl), 3 eq Py, DMF, RT, 1 h
 c) AcOH / TFE / DCM (1:1:3), RT, 3 * 5 min

X	Edukt	Produkt	Ausbeute
MIM	1	22	quant.
(3+)	2	23	77 %

Abbildung 2.22.: Kupplung von **1** (MIM-B_{ox}-OH) und **2** ((3+)-B_{ox}-OH) an das Referenzpeptid H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotriyl

Das Peptid **22** wurden mit NMR-Spektroskopie auf mögliche Epimere untersucht, dabei ergaben sich keine Hinweise auf die Bildung von Epimeren (Abb. 2.23). Nach dem Abspalten des *Tags* ergab sich bei der Untersuchung der Peptide **22** und **23** mit HPLC-MS kein Hinweis auf eine Epimerisierung während der Kupplung des *Tags* (Beschreibung der Methode siehe Abschnitt 3.3).

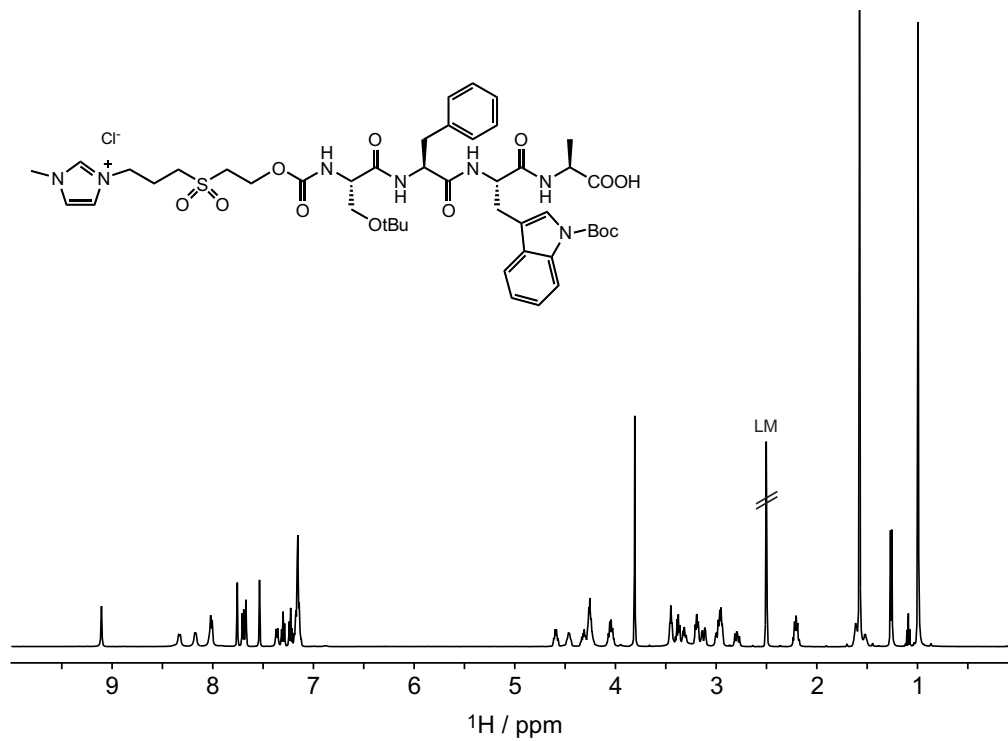


Abbildung 2.23.: NMR-Spektrum des mit einem einfach positiv geladenen *Tag* gekoppelten Testpeptids **22** (MIM- B_{ox} -Ser(*t*Bu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) ohne weitere Reinigung nach dem Abspalten von der festen Phase

2.6. Bestimmung der Löslichkeit der Peptide und des Einflusses der *Tags*

Mit dem Anfügen eines *Tags*, wie es in dem vorangehenden Abschnitt 2.5 beschrieben wurde, sollte die Löslichkeit schwerlöslicher Peptide auf über 5 mg/ml erhöht werden. Um den Einfluss der verwendeten *Tags* zu testen, wurde die Löslichkeit des Peptids H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH allein, mit verschiedenen, einfach geladenen *Tags* und mit dem dreifach geladenen *Tag* untersucht. Die Synthese der Peptide mit einfach geladenem *Tag* ist in Abschnitt 3.3 beschrieben.

Um das Erreichen dieses Ziels zu kontrollieren, muss zuerst eine Methode etabliert werden, mit der die Löslichkeit mit einer Genauigkeit von mindestens ± 1 mg/ml im Bereich von 1 - 10 mg/ml bestimmt werden kann. Wie in Abschnitt 1.4 erwähnt, gibt es mehrere Methoden, die Löslichkeit von Substanzen zu messen.

2.6.1. Diskussion der verschiedenen Methoden zur Quantifizierung der Löslichkeit

2.6.1.1. Direktes Gravimetrisches Verfahren

Die Eignung dieser Methode im Hinblick auf die damit erzielbare Genauigkeit wurde getestet, indem die Löslichkeiten der Modellsubstanzen NaCl und NH₄Cl in Wasser bestimmt und mit den in der Literatur angegebenen Werten verglichen wurden. Es wurden jeweils gesättigte wässrige Lösungen hergestellt und 24 h bei 24 °C gerührt. Anschließend wurden die Lösungen filtriert und mit Pipetten vier verschiedene Volumina in je sechs tarierte Eppendorf-Cups überführt. Die vollen Vials wurden gewogen und dann das Lösungsmittel während 20 h im Speedvac abgezogen. Die Vials wurden wieder gewogen und aus den entsprechenden Differenzen die Masse des Lösungsmittels und die Masse des gelösten Stoffs berechnet. Dabei wurde für NaCl eine Löslichkeit von 36,5 g / 100 g Wasser und für NH₄Cl eine Löslichkeit von 39,0 g / 100 g Wasser gemessen. Diese Werte stimmen gut mit den Literaturwerten überein (36,3 g / 100 g bzw. 36,2 g / 100 g für NaCl und 38,8 g / 100 g und 38,9 g / 100 g für NH₄Cl).^{154,155} Als Test, ob diese Methode die eingangs geforderte Genauigkeit erreicht, wurde der experimentell erhaltene Fehler in mg/ml umgerechnet. Dieser betrug 2 - 3 mg/ml. Die Standardabweichung der einzelnen Experimente schwankte je nach Volumen zwischen 0,3 und 6,9 mg/ml. Für die Bestimmung der Löslichkeit gut löslicher Substanzen ist diese einfache Methode gut geeignet. Der auftretende Fehler und die Standardabweichung der Experimente liegen aber im Be-

reich der in dieser Arbeit zu bestimmenden Löslichkeiten. Daher ist diese Methode zur Bestimmung der Löslichkeit schwerlöslicher Substanzen nicht geeignet.

2.6.1.2. Indirektes Gravimetrisches und Volumetrisches Verfahren

Zur quantitativen Bestimmung der Löslichkeit kann in den Fällen, in denen die Verbindungen als Chloride vorliegen, die gravimetrische Bestimmung des mit Silbernitrat ausgefällten Silberchlorids verwendet werden.⁵⁸ Um ausreichend genaue Wägungen durchführen zu können ist eine Mindestmenge an ausgefallenem Silberchlorid nötig. Die untere Grenze liegt bei dieser Methode bei 0,5 mmol Silberchlorid.⁵⁸ Daraus folgt, dass für die verlässliche quantitative Bestimmung auch mindestens 0,5 mmol des Analyten in der Lösung vorhanden sein müssen.

Das Testpeptid **22** (MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) hat als Chlorid eine molare Masse von 960,5 g/mol. Es sind in der zu untersuchenden Lösung also mindestens 480 mg des Peptids **22** erforderlich.⁵⁸ Die benötigte Menge ist viel zu groß um praktikabel zu sein. Der *Tag* würde nach dieser Messung auch nicht mehr als Chlorid vorliegen, sondern als Nitrat.

Auch die volumetrische Bestimmung des Chlorids nach Vollhard ist nicht empfindlich genug.⁵⁸ Es würde eine Stoffmenge von 0,1 mmol benötigt, also immer noch 96 mg **22** für *eine* Analyse. Außerdem sind beide Methoden für die Bestimmung der Löslichkeit anderer Anionen wie Hexafluorophosphat oder Acetat ungeeignet.

2.6.1.3. Korrelation der Retentionszeit einer Verbindung mit ihrer Wasserlöslichkeit

Intuitiv scheint es einen Zusammenhang zwischen Wasserlöslichkeit und Retentionszeit in der RP-HPLC zu geben.⁹¹ Je geringer die Retentionszeit unter RP-Bedingungen ist, desto höher sollte die Löslichkeit der betreffenden Substanz in Wasser sein. Daher werden zum Teil HPLC-Chromatogramme publiziert, um die Erhöhung der Wasserlöslichkeit von Peptiden durch ionische Schutzgruppen zu demonstrieren.^{73,83} Dieses Verfahren ist aber nicht zur Bestimmung der Löslichkeit einer Substanz, auch nicht für eine qualitative Abschätzung, geeignet. Dies soll hier genauer diskutiert werden.

Quantitative Bestimmung der Löslichkeit aus der Retentionszeit einer Substanz In der Literatur konnte keine Korrelation der Retentionszeit mit einer Löslichkeitsangabe (z.B. $t_R = 3,5 \text{ min} \hat{=} \text{Löslichkeit} = 7 \text{ mg/ml}$ bei gegebener Trennsäule und Gradient) gefunden werden. Ohne eine solche Korrelation ist es nicht

möglich, die Löslichkeit einer Verbindung in Wasser mit Hilfe der Retentionszeit zu bestimmen.

Qualitative Bestimmung der Löslichkeit aus der Retentionszeit einer Substanz

Es könnte aber auch ohne exakte Korrelation zwischen der Retentionszeit und der Löslichkeit eventuell eine Aussage zur relativen Löslichkeit verschiedener Verbindungen gemacht werden. In diesem Fall müsste die Reihenfolge der Elution in der Folge abnehmender Löslichkeit in Wasser erfolgen. Um über die Retentionszeit eine qualitative Aussage bezüglich der Löslichkeit treffen zu können, ist es notwendig, dass *beide* der folgenden Voraussetzungen erfüllt sind.

1. Die Reihenfolge der Elution muss für jedes beliebige Substanzpaar immer gleich sein. Bei Wechsel des Säulenmaterials oder Änderung des Gradienten darf sich in *keinem* Fall die *Reihenfolge* der Elution ändern (die Retentionszeiten dürfen sich natürlich verschieben). Würde sich die Reihenfolge der Elution ändern würde dies bedeuten, dass die Löslichkeiten der beiden Substanzen von dem für die Messung verwendeten Säulenmaterial abhängig ist. Dies ist physikalisch unsinnig. In Beispielen zur Trennung verschiedener Substanzen mittels unterschiedlicher HPLC-Bedingungen finden sich immer wieder Beispiele, in denen sich die Elutionsreihenfolge zweier Verbindungen bei einem Wechsel der Trennbedingungen (Säulenmaterial, Gradient ...) verändert.¹⁵⁶ Ein Beispiel ist in Abbildung 2.24 zu sehen (es wurde freundlicherweise von der Firma Supelco zur Verfügung gestellt). In den hier gezeigten Fällen wäre die Löslichkeit von

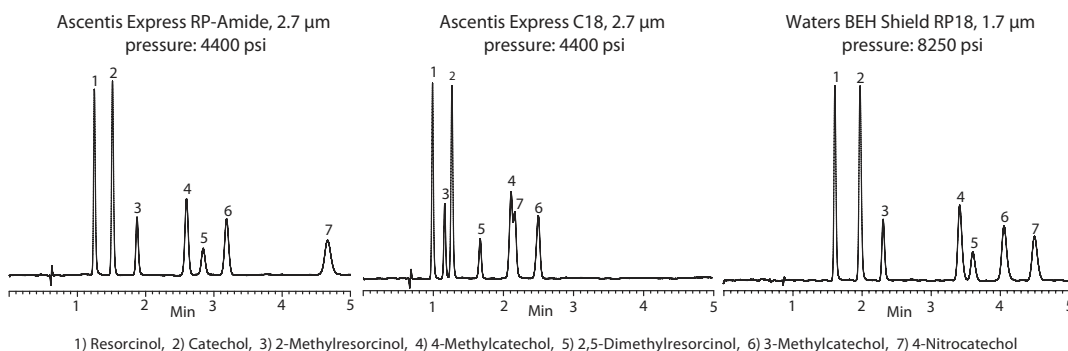


Abbildung 2.24.: Beispiele für Änderung der Elutionsreihenfolge bei Verwendung unterschiedlicher Säulenmaterialien in der HPLC (Graphic published in Supelco Analytical Catalogue 2009-2010. Supelco Analytical Co., Inc. is a member of the Sigma-Aldrich Group. © 2010 Sigma-Aldrich Co.)

Catechol bei Verwendung der Säulen Ascentis Express RP-Amide und Wa-

ters BEH Shield RP18 höher als die von 2-Methylresorcinol. Bei Verwendung der Ascentis Express C18 Säule wäre die Löslichkeit von 2-Methylresorcinol höher als die von Catechol. Da die Löslichkeit der beiden Verbindungen feststeht, beweist dieses Beispiel, dass die Retentionszeit nicht eindeutig mit der Löslichkeit in Wasser korreliert ist.

- Es müsste experimentell gesichert sein, dass eine Substanz mit einer höheren Wasserlöslichkeit vor einer Verbindung mit geringerer Wasserlöslichkeit eluiert. Dies ist aber nicht immer richtig. Ein Beispiel sind die beiden Aminosäurederivate H-Tyr(tBu)-OH (**24**) und das mit der einfach positiv geladenen Schutzgruppe geschützte Tyrosinderivat **25** (die Synthese ist in Abschn. 3.2 beschrieben).

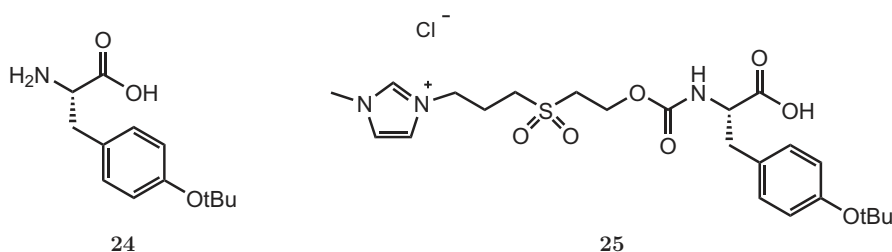


Abbildung 2.25.: Zwei Tyrosinderivate mit unterschiedlicher Löslichkeit in Wasser

Tyrosin ist die am schlechtesten in Wasser lösliche proteinogene Aminosäure (Sättigungskonzentration bei 20 °C: 2 mM).¹⁵⁴ Dagegen kann von dem mit der ionischen Schutzgruppe versehenem Tyrosinderivat **25** ohne weiteres eine 0,2 M Lösung in reinem Wasser hergestellt werden (die Löslichkeit des Tyrosinderivats **25** wird durch den *Tag* im Vergleich zum freien Tyrosin um mindestens den Faktor 100 erhöht). In der HPLC wird jedoch das weniger lösliche Aminosäurederivat H-Tyr(tBu)-OH vor dem deutlich mehr wasserlöslichen Tyrosinderivat **25** eluiert.

Die weiter unten präsentierten Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Löslichkeit verschiedener Peptiden im Vergleich mit deren Retentionszeiten legen diesen Schluss ebenfalls nahe (Tab. 2.1).

Dieses Phänomen konnte auch für die aus 21 Aminosäuren bestehende A-Kette des Insulins beobachtet werden.⁹¹ In diesem Fall war ebenfalls durch einen *Tag* die Löslichkeit des Peptids in Wasser erhöht worden. Trotz allem wurde das in Wasser nahezu unlösliche Peptid (ohne *Tag*) **vor** dem deutlich besser wasserlöslichen Peptid-*Tag* Konstrukt eluiert.⁹¹

Tabelle 2.1.: Retentionszeit des Testpeptids mit verschiedenen *Tags*

Peptid	Retentionszeit / min
26 (H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH)	6,0
22 (Mimi-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH)	6,4
27 (Me3N-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH)	6,9
28 (DMIM-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH)	7,0
23 ((3+)-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH)	4,7

Da beide Voraussetzungen zur Verwendung der Retentionszeit als qualitatives Maß der Löslichkeit nicht erfüllt werden, ist diese Methode zur Bestimmung der Löslichkeit bzw. zum Vergleich der Löslichkeit verschiedener Verbindungen, auch für die grobe Abschätzung, nicht geeignet.

Trotzdem sollen hier die Retentionszeiten der getesteten Peptide angegeben werden. Die Retentionszeiten wurden mit einer Repronil-Pur 100 BASIC-C18 Säule der Dimension $5\ \mu\text{m}\ 50 \times 3\ \text{mm}$ ermittelt und sind in Tabelle 2.1 wiedergegeben.

Aus den in Tabelle 2.1 angegebenen Daten würde man den Schluss ziehen, das nur der dreifach geladene *Tag* in der Lage ist, Löslichkeit des Peptids zu erhöhen. Alle anderen *Tags* scheinen die Löslichkeit zu reduzieren. Ein Vergleich mit den durch Bestimmung der Konzentration der Peptide in einer gesättigten Lösung mit Hilfe der HPLC erhaltenen Daten (Tab. 2.2) zeigt, dass diese Folgerung aus den Retentionszeiten der Peptide in der RP-HPLC nicht zutrifft.

2.6.1.4. Grundlagen zur Bestimmung der Löslichkeit eines Analyten mittels HPLC-UV

Eine andere Methode ist die Bestimmung der Konzentration einer gesättigten Lösung mittels HPLC-UV.¹⁵⁷ Die Bestimmung der Konzentration von gelösten Substanzen mittels HPLC wird in der Wissenschaft und Praxis in großem Umfang durchgeführt. Aufgrund seiner Empfindlichkeit eignet sich dieses Verfahren gut für kleine Analytkonzentrationen, das heißt auch für Substanzen mit geringer Löslichkeit. Es hat aufgrund der chromatographischen Trennung vor der eigentlichen Messung der UV-Absorption den Vorteil, dass damit auch reelle, also verunreinigte Proben untersucht werden können.

Um diese Methode einsetzen zu können, ist eine Kalibrierung mit der reinen Verbindung notwendig. Zur Kalibrierung der HPLC gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten.

- Externe Kalibrierung

Dabei wird der Analyt vor der eigentlichen Messung in reiner Form in einer bekannten Konzentration injiziert und der Response-Faktor (RF) bestimmt.¹⁵⁸ Besser ist es, die Kalibrierung mit mehreren Proben verschiedener Konzentrationen des Analyten durchzuführen. Dabei sollte nach Möglichkeit der gesamte zu erwartende Konzentrationsbereich abgedeckt werden. Dieses relativ einfache Verfahren hat aber einen erheblichen Nachteil, aufgrund von Fehlern, die bei der Messung mit der HPLC selbst auftreten können. Der wichtigste ist dabei die Abweichung des tatsächlichen Injektionsvolumens von dem für die Berechnung und Auswertung zugrunde gelegten, eingestellten Wert. Auch kleine Schwankungen im Injektionsvolumen führen zu einem nicht mehr abschätzbaren Fehler.¹⁵⁸ Während bei fest eingebaute Injektionsschleifen mit definiertem Volumen nur geringe Schwankungen auftreten, sind die Fehler bei variabel einstellbaren Injektoren deutlich größer. Außerdem ist der Zusammenhang zwischen dem am Gerät eingestellten und dem tatsächlichen Injektionsvolumen bei kleinen Volumina nicht immer linear.¹⁵⁸

- Interner Standard

Dabei wird der Probe vor der Messung ein interner Standard zugesetzt. Dieser sollte dem Analyten ähnlich sein, aber eine andere Retentionszeit als dieser haben. Da die hier verwendete HPLC-Anlage über einen Injektor mit variablen Injektionsvolumen verfügt, wurde zur Kalibrierung ein interner Standard verwendet. Als interner Standard wurde Salicylamid ausgewählt. Salicylamid absorbiert bei 254 nm ausreichend stark und wird basisliniengetrennt von den untersuchten Peptiden eluiert. Das Injektionsvolumen von 10 μl war bei allen Messungen gleich.

Wird die Kalibrierung bei einer Wellenlänge von 254 nm durchgeführt, so kann das Ergebnis für die Bestimmung der Konzentration des gleichen Peptids mit verschiedenen *Tags* angewendet werden, da die *Tags* und der Linker bei $\lambda = 254$ nm nicht absorbieren. Chromophore sind, wenn sie nicht konjugiert sind, in erster Näherung von der Umgebung im Molekül unabhängig.¹⁵⁷ Darauf beruht auch die Bestimmung der Protein und DNA Konzentration mittels UV-Spektroskopie.¹⁵⁹ Die in dieser Arbeit untersuchten Peptide sind alle vom Referenzpeptid **26** abgeleitet, sie unterscheiden sich nur im verwendeten *Tag*. Da der Extinktionskoeffizient der *Tags* bei $\lambda = 254$ nm vernachlässigbar ist, kann die für eines der Peptide aufgenommene Kalibriergerade im Prinzip auch für die quantitative Bestimmung der anderen Peptide verwendet werden. Es ist dabei jedoch zu beachten, dass in diesem Fall immer

Stoffmengenkonzentrationen für die Berechnung verwendet werden müssen, da sich die molaren Massen der Peptide aufgrund der unterschiedlichen *Tags* stark unterscheiden.

2.6.2. Kalibrierung der HPLC

Mit dem Peptid 26 (H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) Die erwartete Konzentration des Analyten in der gesättigten Lösung soll im Bereich der für die Kalibriergeraden verwendeten Stoffmengen liegen. Dies ist möglich, wenn für die Erstellung der Kalibriergerade ein Lösungsmittel verwendet wird, in dem sich die zu untersuchende Verbindung besser löst, als in dem für die eigentliche Bestimmung der Löslichkeit verwendeten. Die Peptide mit ionischem *Tag* weisen in Methanol eine höhere Löslichkeit als in wässrigen Lösungen auf. Mit dem Referenzpeptid **26** wurde daher die Kalibriergerade mit methanolischen Lösungen erstellt. Das Referenzpeptid **26** war selbst in Methanol so schwer löslich, dass eine Konzentration von 10 mg/ml nicht erreicht werden konnte. Daher war abzusehen, dass die Löslichkeit in wässrigen Lösungsmittelgemischen noch deutlich niedriger ist. Deswegen wurde die Kalibriergerade mit diesem Peptid nur im Konzentrationsbereich von 0,05 - 1 mg/ml erstellt (entspricht 75 nmol - 1,5 μ mol). Der interne Standard wurde jeweils vor der Messung zugesetzt. Die graphische Auswertung ist in Abbildung 2.26 zu sehen. Die mathematische Auswertung mittels linearer Regression ergab folgende Gleichung für die Kalibriergerade:

$$y = 0,58 \times x$$

$$y = \frac{\text{Signalintensität des Peptids } (\lambda = 254 \text{ nm})}{\text{Signalintensität des internen Standards } (\lambda = 254 \text{ nm})}$$

$$x = c(\mathbf{26}) \text{ in } \mu\text{mol/ml}$$

Mit dem Peptid 27 (Me₃N-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) Da der von der im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Kalibriergeraden abgedeckte Bereich deutlich kleiner als benötigt ist, wurde eine weitere Kalibriergerade mit einem löslicheren Peptid erstellt. Das Peptid **27** ist zumindest in Methanol deutlich leichter löslich als das Referenzpeptid **26**. Das Erstellen einer zweiten Kalibriergerade

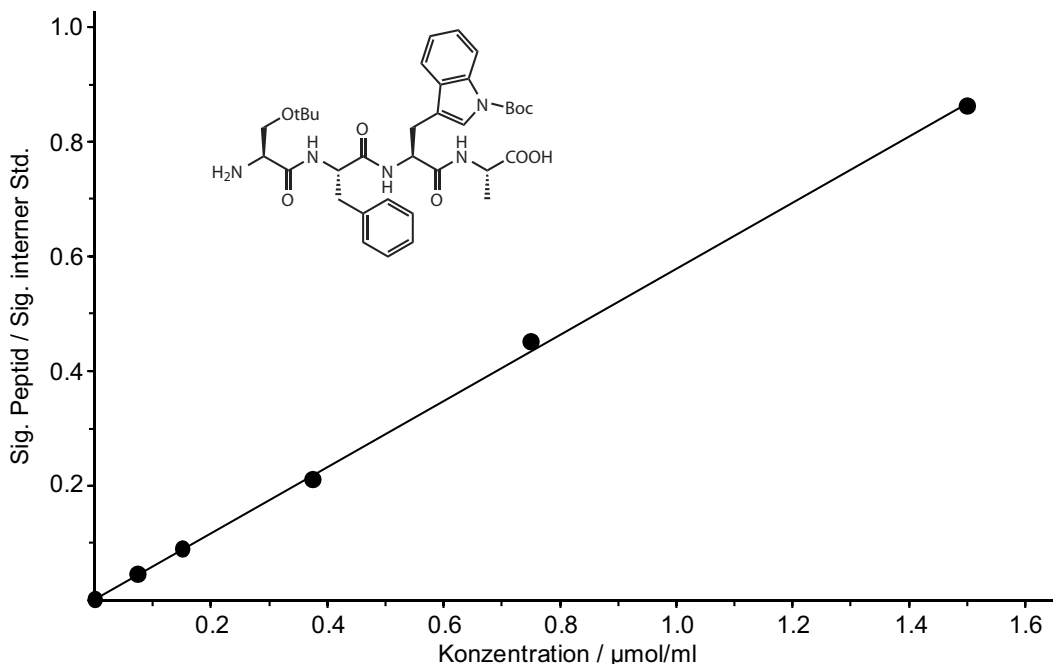


Abbildung 2.26.: Graphische Darstellung der mit dem Testpeptid **26** (H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) durch lineare Regression erhaltene Kalibriergeraden

hat einen zusätzlichen Vorteil. Es kann überprüft werden, ob die Annahme isolierter Chromophore prinzipiell zulässig ist. Würde der *Tag* oder der Linker die UV-Absorption der Chromophore bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ wesentlich beeinflussen, so sollte sich für diese Kalibriergerade eine deutlich andere Steigung als im Fall des Testpeptids **26** ergeben.

Für die Messwerte zwischen 0 und $3,2 \mu\text{mol}$ wurden zwei unabhängige Proben jeweils dreimal gemessen. Da die Proben höherer Konzentration ($6,4$ und $12,8 \mu\text{mol}$) ein größeres Gewicht bei der linearen Regression haben, wurden davon je vier unabhängige Proben jeweils dreimal vermessen. Ähnlich der Kalibrierung mit **26** wurden die erhaltenen Messwerte mittels linearer Regression ausgewertet. Die sich daraus ergebende mathematische Funktion der Kalibriergerade ist wie folgt:

$$y = 0,62 \times x + 0,11$$

$$y = \frac{\text{Signalintensität des Peptids } (\lambda = 254 \text{ nm})}{\text{Signalintensität des internen Standards } (\lambda = 254 \text{ nm})}$$

$$x = c(\mathbf{27}) \text{ in } \mu\text{mol/ml}$$

Die graphische Auswertung ist in Abbildung 2.27 gezeigt.

Der Achsenabschnitt sollte gleich null sein. Aus dem bei der linearen Regression er-

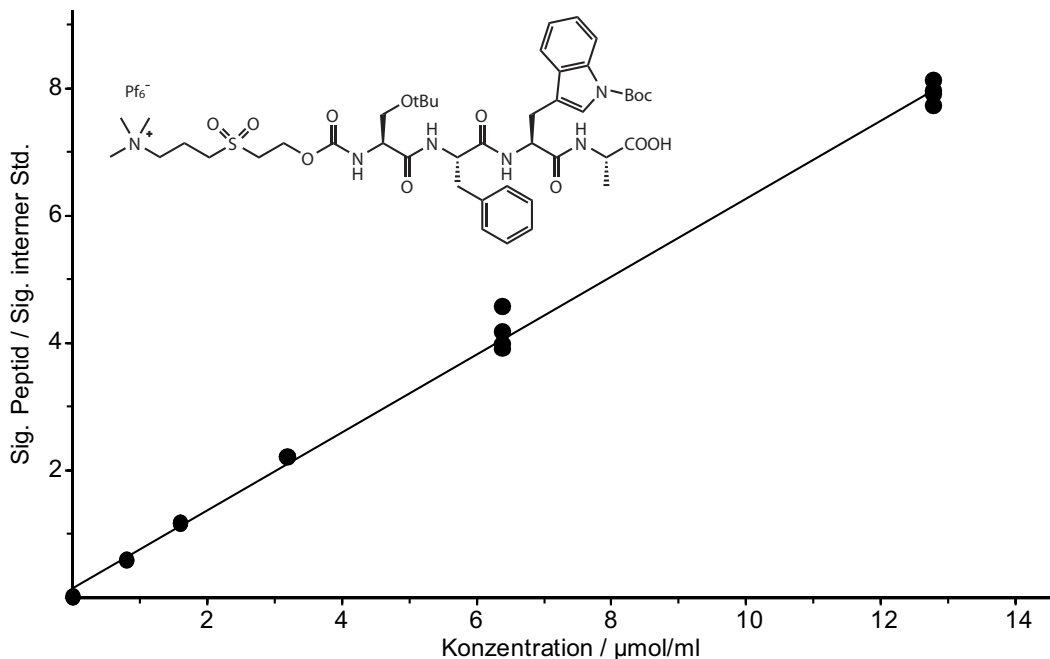


Abbildung 2.27.: Graphische Darstellung der mit dem Peptid **27** (Me₃N-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) durch lineare Regression erhaltene Kalibriergeraden

mittelten Wert des Achsenabschnitts von 0,11 ergibt sich bei einer Konzentration von 5 mg/ml ein Fehler von 3%. Dies entspricht 0,15 mg. Diese Abweichung erscheint für die Beantwortung der Frage, ob die Löslichkeit der modifizierten Peptide über oder unter der ungefähren ökonomischen Grenze von 5 mg/ml liegt, vernachlässigbar. Vergleicht man den Fehler aufgrund des Achsenabschnitts mit der laut *Verordnung (EG) Nr. 440/2008 der Kommission* zulässigen Abweichung bei Löslichkeitsbestimmungen von 15 - 30%, so ist der gemessene Fehler gering.⁵⁷ Erfreulich ist beim Vergleich der beiden Kalibriergeraden, dass die Steigung sehr gut übereinstimmt. Dies zeigt, dass die Chromophore in guter Näherung vom (nichtkonjugierten) Rest des Moleküls unabhängig sind.

2.6.3. Bestimmung der Löslichkeit verschiedener Peptide mit Hilfe der HPLC

Ermittlung der Löslichkeit des Peptids 26 (H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) Die Wahl des Lösungsmittels für die Bestimmung der Löslichkeit der Peptide

hängt von der gewünschten Anwendung ab. Da die Peptide durch den *Tag* für die Reinigung mittels RP-HPLC ausreichend löslich gemacht werden sollten, wurde hier das Lösungsmittelgemisch verwendet, welches den Anfangsbedingungen der HPLC-Methode entsprach. Dadurch sollte das Ausfallen des Peptids während der Messung verhindert werden. Mit Hilfe der Kalibriergeraden konnte die Löslichkeit verschiedener Peptide bestimmt werden. Zur Bestimmung der Löslichkeit des Referenzpeptids **26** wurden 5 mg in 0,5 ml eines Wasser/Acetonitril Gemisches (85/15 v/v) suspendiert und 24 h bei 22 ± 1 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Probe filtriert und mit dem gleichen Volumina der Stammlösung des internen Standards gemischt. Es wurden je zwei unabhängige Proben hergestellt und jede dreimal gemessen.

Die auf diese Art bestimmte Konzentration der gesättigten Lösung betrug 0,1 mg/ml, das Referenzpeptid **26** hat also tatsächlich eine niedrige Löslichkeit. Deshalb ist es hervorragend als Testsystem für die Bestimmung des Einflusses der ionischen Schutzgruppen auf die Löslichkeit geeignet. Dieses Peptid ist nur schwer mit präparativer HPLC zu reinigen. Das soll an einem fiktivem Rechenbeispiel unter der Annahme, dass die fiktiven Verunreinigungen die Löslichkeit des Peptids nicht verändern und die Ausbeute der Trenntechnik 100% beträgt gezeigt werden. Um 50 mg des Peptids **26** durch RP-HPLC zu reinigen, müssten $\frac{50 \text{ mg}}{0,1 \text{ mg / ml}} = 500 \text{ ml}$ der gesättigten Lösung injiziert werden, was offensichtlich sehr mühsam wäre.

Bestimmung des Einflusses einfach geladener Tags auf die Löslichkeit Als nächstes wurde der Einfluss der basenlabilen, einfach geladenen Schutzgruppen untersucht. Dazu wurden die Peptide **22**, **27** und **28** verwendet (Synthese Absch. 3.3 und Struktur Abb. 2.28).

Die Peptide mit dem Hexafluorophosphatanion enthielten das Epimer mit D-Serin am N-Terminus in geringen Mengen (ca. 1-5%) (Absch. 3.3). So geringe Verunreinigungen sollten die Löslichkeit aber nicht wesentlich beeinflussen.

Die Bestimmung der Löslichkeit dieser Peptide wurde analog zu der des Referenzpeptids **26** durchgeführt. Bei Peptiden mit einer hohen Löslichkeit in dem Wasser / Acetonitril Gemisch wurde solange weitere Substanz zugegeben bis eine stabile Suspension erhalten wurde. Erst wenn 24 h nach der letzten Zugabe des Peptids immer noch ungelöste Substanz vorlag, wurden Proben für die Bestimmung der Löslichkeit genommen. Die Chloride lösten sich schneller und es wurde mehr Substanz für die Herstellung der gesättigten Lösung benötigt, als im Fall der Hexafluorophosphate. Dies deutete auf eine höhere Löslichkeit der Chloride hin. Die Proben

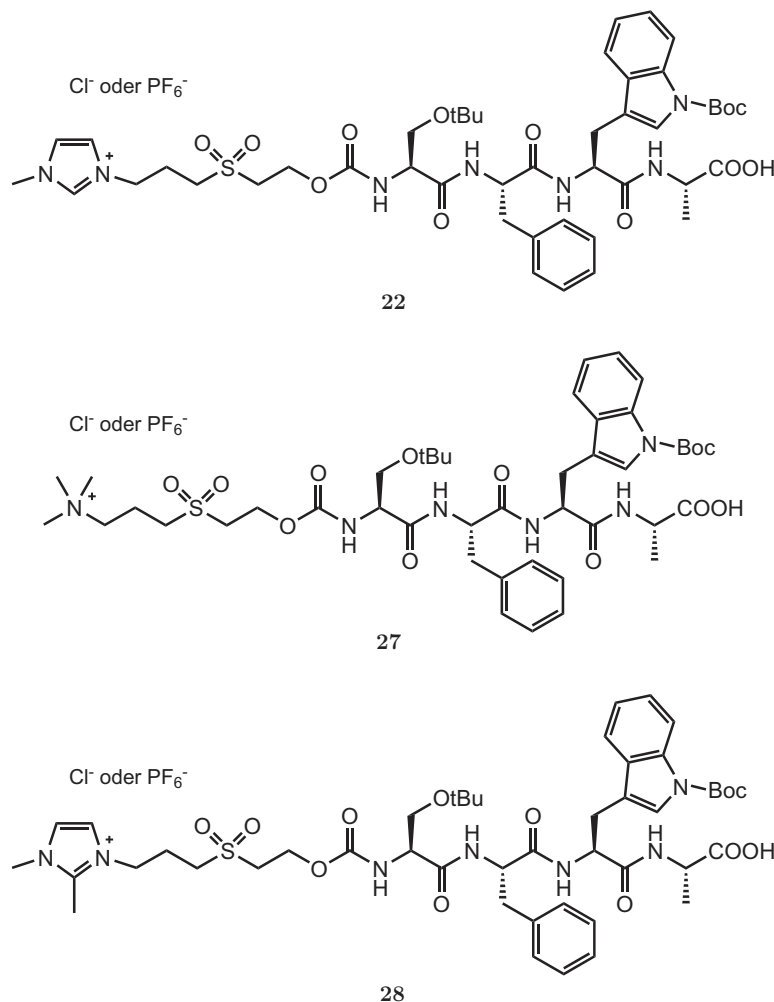


Abbildung 2.28.: Darstellung der verwendeten Testpeptide

mit hoher Peptidkonzentration wurden vor der HPLC Untersuchung verdünnt, um eine Sättigung des Detektors zu vermeiden. Die mittels HPLC bestimmten Löslichkeiten der verschiedenen Peptide werden in Tabelle 2.2 wiedergegeben. Es konnte gezeigt werden, dass die Löslichkeit des Referenzpeptids durch die einfach geladenen *Tags* erhöht wird. Der Anstieg der Löslichkeit ist für die Chloride deutlich größer als für die Hexafluorophosphate. Dieser Trend wurde erwartet. Verglichen mit dem Referenzpeptid mit freiem N-Terminus erhöhen geladene Schutzgruppen mit einem Hexafluorophosphat-Anion die Löslichkeit immerhin um den Faktor 10. Werden die ionischen *Tags* mit Chloridanion verwendet, ist dieser Effekt zum Teil bedeutend größer (bis zu einem Faktor 300). Aus diesen Daten lässt sich aber nicht sicher ableiten, dass ein bestimmter *Tag* immer einen stärkeren Einfluss auf die Löslichkeit des Referenzpeptids, als die anderen *Tags* hat. Im Gegenteil ändert sich die Reihenfolge der Löslichkeiten bei Änderung der Anionen zum Teil. Da die Messungen

Tabelle 2.2.: Untersuchung der Löslichkeit der Testpeptide **22**, **27** und **28** in Abhängigkeit des Gegenions

Peptid	Gegenion	Löslichkeit $\mu\text{mol/ml}$	Löslichkeit des Testpeptids (mg/ml)
22	PF_6^-	1,9	1,3
22	Cl^-	6,0	4,0
27	PF_6^-	1,8	1,2
27	Cl^-	22,1	15
28	PF_6^-	2,2	1,4
28	Cl^-	44,1	30

nur mit diesem Referenzpeptid mit nur drei *Tags* durchgeführt wurden, sollte die Interpretation der Daten mit größter Vorsicht erfolgen. In anderen Fällen ist es gut vorstellbar, dass sich die Ergebnisse anders darstellen.

Die Erhöhung der Löslichkeit wird wahrscheinlich nicht nur durch den *Tag* erzielt, auch der Linker dürfte einen positiven Einfluss haben. Wie in der Einleitung ausgeführt, wurden dem Linker sehr ähnliche Schutzgruppen schon zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit geschützter Aminosäurederivate verwendet.^{38,43} Der Effekt wurde von den Autoren jedoch nicht quantifiziert. Teilweise war er groß genug, um die Löslichkeit der mit dieser Schutzgruppe geschützten Aminosäurederivate für Peptidkupplungen in wässrigen Lösungen ausreichend zu erhöhen. Dabei war jedoch der Zusatz von Detergentien notwendig.⁴³

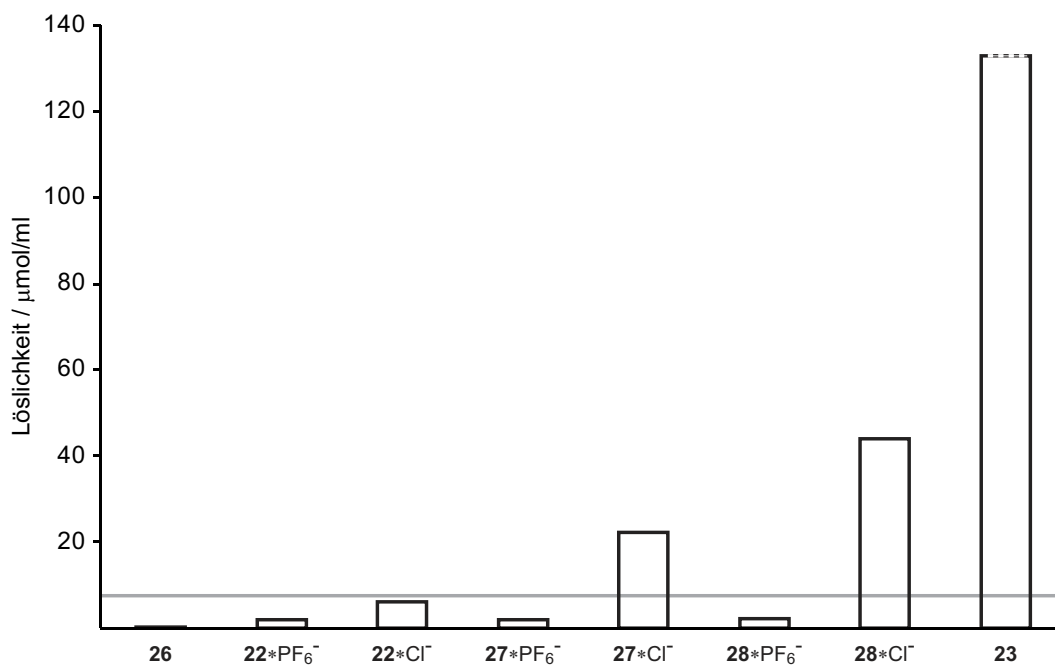
Bestimmung der Löslichkeit des Testpeptids mit dreifach geladenem *Tag* ((3+)-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) 23 Nachdem die einfach geladenen *Tags* getestet wurden, sollte zum Vergleich die Löslichkeit des Testpeptids, verknüpft mit dem dreifach geladenen *Tag*, ermittelt werden. In 3 min lösten sich 20,2 mg des Peptids mit dreifach geladenem *Tag* in 100 μl eines Wasser / Acetonitril Gemisches (85/15 v/v) klar auf. Dies zeigt, dass die Löslichkeit noch deutlich höher ist. Die so ermittelte minimale Löslichkeit beträgt 133 $\mu\text{mol/ml}$, was 88 mg/ml des Referenzpeptids entspricht.

Der ermittelte minimale Wert der Löslichkeit bedeutet also, dass die Löslichkeit des Referenzpeptids durch den dreifach geladenen *Tag* um mindestens den Faktor 880 erhöht wird. Im Vergleich zu den einfach geladenen *Tags* wird die Löslichkeit mit dem dreifach geladenen *Tag* zumindest um das drei bis 22-fache erhöht.

Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass das hier verwendete Referenzpeptid noch nicht schwerlöslich genug ist, um bei einem vernünftigen Materialeinsatz den Effekt

des dreifach geladenen *Tags* präzise zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass die Löslichkeit schwerlöslicher Peptide durch ionische *Tags* stark erhöht werden kann (Abb. 2.29). Die ökonomisch wichtige, ungefähre Grenze von 5 mg/ml wurde dabei zum Teil weit übertroffen.



26	H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH
22 * PF₆⁻	MIM-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH
22 * Cl⁻	MIM-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH
27 * PF₆⁻	Me ₃ N-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH
27 * Cl⁻	Me ₃ N-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH
28 * PF₆⁻	DMIM-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH
28 * Cl⁻	DMIM-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH
23	(3+)-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH

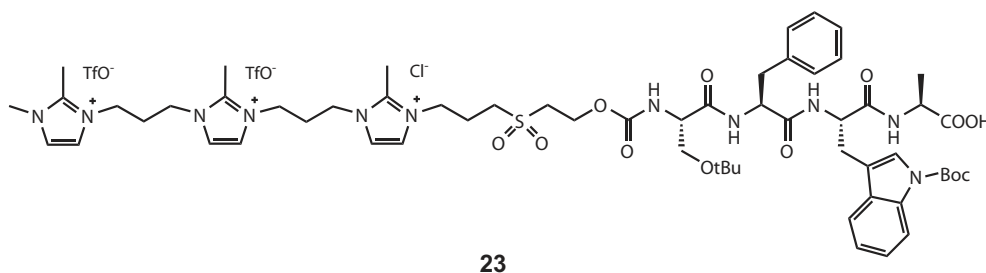


Abbildung 2.29.: Graphischer Vergleich der Löslichkeiten der verschiedenen untersuchten Peptide (die graue Linie entspricht einer Löslichkeit von 5 mg/ml bezogen auf das Referenzpeptid)

2.7. Untersuchung der Abspaltung des *Tags*

Nach der präparativen HPLC-Reinigung der Peptide mit dem *Tag* am N-Terminus soll dieser in den meisten Fällen durch Behandlung mit Basen entfernt werden. Dabei soll das gereinigte Peptid nicht beschädigt und der abgespaltene *Tag* möglichst einfach vom Peptid abgetrennt werden. Für alle in diesem Abschnitt behandelten Experimente wurde das Testpeptid **22**·Cl⁻ (MIM-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) verwendet

2.7.1. Spaltung des Linkers durch verschiedene Basen

Die Spaltung des Linkers wurde zuerst mit einer 2%igen Lösung von Piperidin in Wasser (pH = 12,35) untersucht. 1 mg des Testpeptids **22**·Cl⁻ wurde in 0,5 ml der Spallösung im Ultraschallbad gelöst und nach je 5, 10, 15, 30 und 60 min mittels HPLC-MS/UV untersucht. Die Spaltung war nach 5 min vollständig, auch im Extracted Ion Chromatogram (EIC) konnte das mit dem *Tag* verbundene Testpeptids **22**·Cl⁻ nicht mehr nachgewiesen werden.

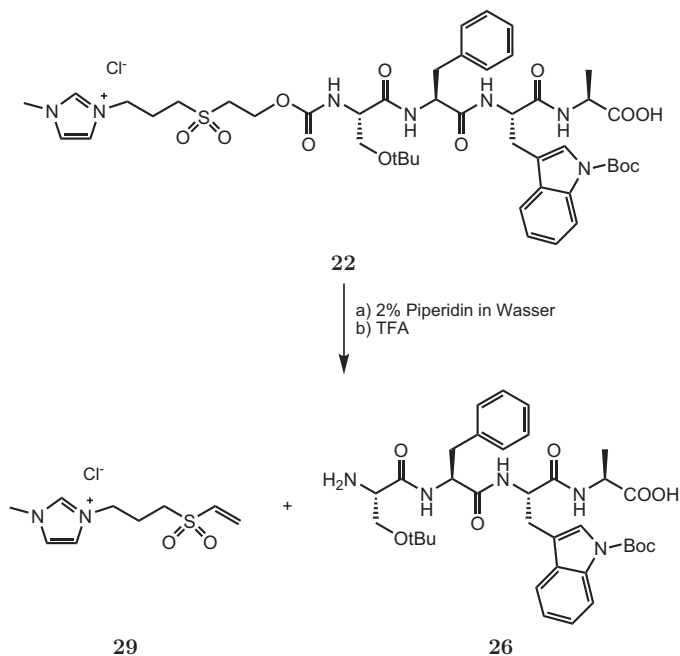


Abbildung 2.30.: Die Abspaltung des Linkers mit 2% Piperidin am Beispiel des mit einem einfach geladenem *Tag* versehenen Testpeptids **22**·Cl⁻

Anschließend wurde die Spaltung des Linkers mit 2%iger Natriumcarbonat- und 5%iger Morpholinlösung in Wasser wiederholt. Diese Lösungen sind weniger basisch

(= mildere Bedingungen) als die 2%ige Piperidinlösung, die Abspaltung der Schutzgruppe sollte mit diesen Spaltlösungen daher länger dauern. Es wurden wiederum nach 5, 10, 15, 30 und 60 min Proben genommen und durch Zugabe von Trifluoressigsäure die eventuell noch nicht vollständige Spaltung gestoppt. Bei der Untersuchung mit HPLC-MS/UV zeigte sich, dass die Spaltung langsamer ist, erst nach ca. 30 min war sie vollständig. Durch Integration bei 254 nm konnte der prozentuale Anteil der Spaltung zu jedem Zeitpunkt berechnet werden. Die graphische Auftragung der Ergebnisse ist in Abbildung 2.31 dargestellt. Die Kurven verlaufen sehr ähnlich, wie bei dem geringen Unterschied des pH-Wertes der beiden Lösungen auch zu erwarten ist.

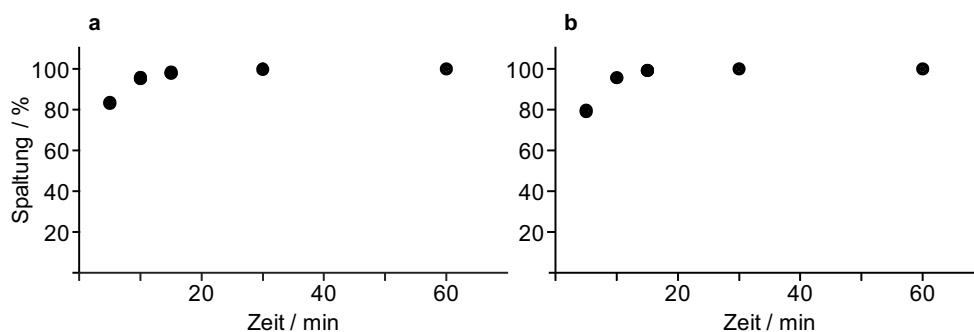


Abbildung 2.31.: Zeitlicher Verlauf der Spaltung von **22** mit 2% Natriumcarbonat (pH = 11,17) (a) und 5% Morpholin (pH = 10,92) (b) in Wasser

2.7.2. Abtrennung des abgespaltenen Linkers vom Peptid

Nach der vollständigen Spaltung des Linker mit dem *Tag* vom Peptid sollte dieser abgetrennt werden. Für die Trennung wurde versucht, die gute Wasserlöslichkeit des *Tags* zu nutzen (Abb. 2.32). Der *Tag* mit dem Linker verblieb in der wässrigen Phase, das schwerlösliche Peptid fiel aus und konnte abzentrifugiert werden. Der Niederschlag wurde dreimal im Ultraschallbad in 0,5 ml Wasser resuspendiert und anschließend wieder abzentrifugiert. Nach dem dritten Waschschrift konnte im Niederschlag mit HPLC-MS keine Spur des Linkers mehr detektiert werden. Damit konnte für das Peptid **22**·Cl⁻ gezeigt werden, dass der *Tag* nach dem abspalten im basischen durch Zentrifugation vom Peptid abgetrennt werden kann.

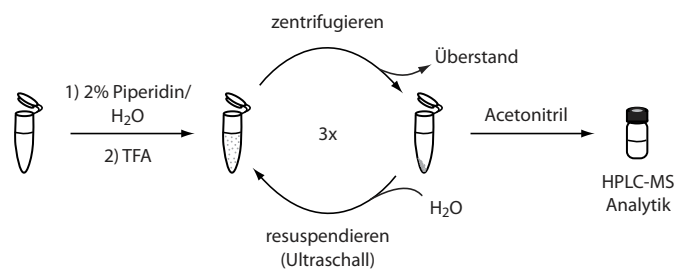


Abbildung 2.32.: Schematische Darstellung der Abspaltung und Abtrennung des *Tags* vom gereinigten Peptid

2.8. Zusammenfassung und Ausblick

Die Synthese des oxidierten Linker konnte etabliert werden, dabei konnte eine auffällige Nebenreaktion beim Einsatz des Essigsäureesters als Schutzgruppe beschrieben werden. Es gelang weiterhin, den oxidierten Linker mit einem einfach beziehungsweise dreifach geladenen ionischen *Tag* zu verknüpfen.

Durch eine sorgfällige Kombination von Aktivierungsreagenz und Base konnten die mit einem *Tag* versehenen Linker **1** (MIM- B_{ox} -OH) und **2** ((3+)- B_{ox} -OH) direkt an ein festphasengebundenes schwerlösliches Referenzpeptid gekuppelt werden. Der erfolgreiche *Tag*-Ansatz bietet zwei wichtige Vorteile. Es muss nicht jede N-terminale Aminosäure mit dem löslichkeitserhöhenden *Tag* versehen werden. Ausserdem kann der *Tag* nach der Synthese des Peptids eingefügt werden, falls sich nachträglich herausstellt, dass dieses Peptid nur wenig in Wasser löslich ist. Es gelang, ein quantitatives Verfahren zur Bestimmung der Löslichkeit von schwer löslichen Peptiden zu etablieren. Dazu wurde die HPLC mit zwei verschiedenen Peptiden kalibriert. Die Ergebnisse rechtfertigen die Annahme isolierter Chromophore in den Peptiden mit dem ionischen *Tag*. Mit der so erhaltenen Kalibriergerade wurde die Löslichkeit des Referenzpeptids sowie der Peptide mit unterschiedlichen ionischen *Tags* in einem Wasser / Acetonitril Gemisch gemessen.

Die Löslichkeit des schwerlöslichen Testpeptids wird durch einfach geladene *Tags* deutlich erhöht, falls das Anion Chlorid ist. Einfach geladene *Tags* mit dem Hexafluorophosphatanion erhöhen die Löslichkeit der Peptide um einen Faktor 10. Der dreifach geladene *Tag* erhöht die Wasserlöslichkeit des Testpeptids **23** ((3+)-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) deutlich stärker als die einfach geladenen *Tags*. Das Ziel, die Löslichkeit eines schwer löslichen Referenzpeptids auf über 5 mg/ml zu erhöhen wurde mit diesem Modell mit zwei einfach geladenen *Tags* erfüllt, der Effekt des dreifach geladenen *Tags* war bei diesem Referenzpeptid zu groß, um ihn mit dem entwickelten Verfahren zur Ermittlung der Löslichkeit genau bestimmen zu können. Die Löslichkeit bei Verwendung des dreifach geladenen *Tag* beträgt mindestens 88 mg/ml des Referenzpeptids.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Linker tatsächlich durch verdünnte wässrige Basen gespalten werden kann. Außerdem gelang es mit dem Testpeptid **22** (MIM-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) die Abtrennbarkeit des Referenzpeptids vom abgespaltenen Linker mit *Tag* durch Zentrifugation zu demonstrieren. Durch den Einsatz dieser Technik an anderen, größeren Peptiden muss nun die allgemeine Anwendbarkeit demonstriert werden. Die Ergebnisse der bisherigen Versuche sind sehr vielversprechend, so dass ein allgemein anwendbares Verfahren für die öko-

nomische Reinigung in Wasser schwerlöslicher Peptide mittels RP-HPLC möglich erscheint.

3. Synthese von wasserlöslichen funktionellen Schutzgruppen für Aminosäuren

3.1. Entwurf einer N-terminalen wasserlöslichen Schutzgruppe

3.1.1. Konzeption der basenlabilen, ionischen Schutzgruppe

Die Verwendung von Wasser für die Peptidsynthese im technischen Maßstab brächte viele ökonomische und ökologische Vorteile mit sich. Daher sind immer wieder Versuche unternommen worden, die Peptidsynthese in diesem Lösungsmittel durchzuführen (siehe Abschnitt 1.3 auf Seite 13 der Einleitung), welche allerdings bis jetzt für die Industrie nicht überzeugend waren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Aminosäurederivate mit einer ionischen Schutzgruppe am α -Amin geschützt werden. Diese funktionelle Schutzgruppe soll zum einen stabil unter den Bedingungen der Peptidsynthese sein, um eine unerwünschte Oligomerisierung zu vermeiden. Außerdem soll durch diese geladene Schutzgruppe die Wasserlöslichkeit der geschützten Aminosäurederivate für die Peptidsynthese ausreichend erhöht werden. Es sollen auch mit konventionellen (unpolaren) Schutzgruppen (z.B. *t*-Butylether oder Boc-Gruppen) an der Seitenkette geschützte Aminosäurederivate in Wasser ausreichend löslich gemacht werden. Die Schutzgruppe soll darüber hinaus stabil und lagerfähig sein.

Die so geschützten Aminosäurederivate sollten zuerst in konventionellen Lösungsmitteln auf ihre Eignung für die Peptidsynthese getestet werden. Ein weiteres Ziel ist die Kontrolle der stereochemischen Reinheit der hergestellten Verbindungen. Für diesen Zweck sollte ein Testpeptid entworfen und synthetisiert werden.

3.1.2. Design der basenlabilen, ionischen Schutzgruppe

Das Design der Schutzgruppe erfolgte analog zu dem in Abschnitt 2.1.2 auf Seite 45 beschriebenen Entwurf des ionischen *Tags* (Verbindungen **1** und **2**). In Abbildung 3.1 ist das allgemeine Zielmolekül dieses Ansatzes skizziert.

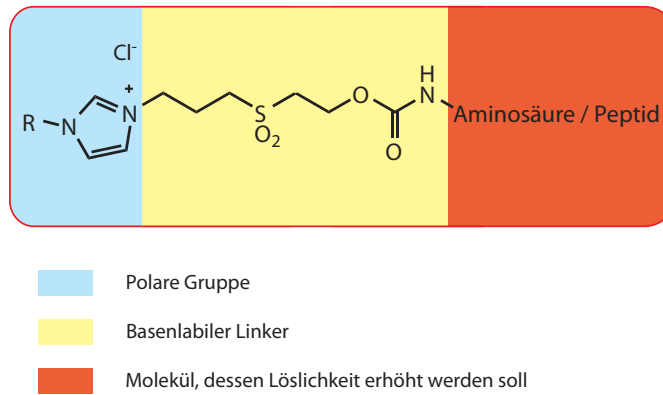


Abbildung 3.1.: Design der wasserlöslichen Schutzgruppen

Es reicht aus, wenn der ionische *Tag* für die Peptidsynthese in Wasser einfach geladen ist. Die Löslichkeit des Referenzpeptids wird durch einen einfach geladenen *Tag*, wie in Abschnitt 2.6 gezeigt wurde, deutlich erhöht. Für die kleineren und polareren Aminosäurederivate sollte also eine einfach geladene Schutzgruppe völlig ausreichend sein, auch wenn sich in den Seitenketten unpolare Schutzgruppe befinden. Abbildung 3.2 verdeutlicht den Unterschied zwischen *Tag*-Ansatz und Schutzgruppen-Ansatz.

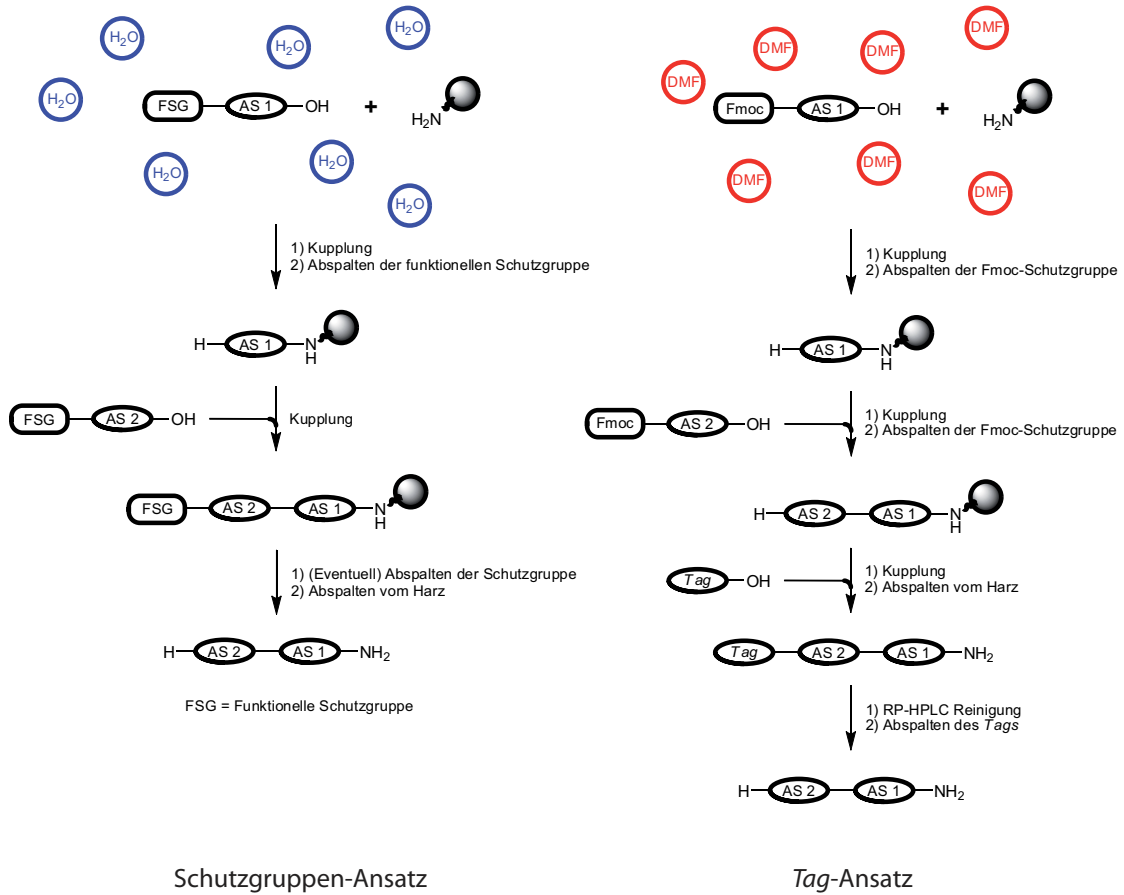


Abbildung 3.2.: Unterschied zwischen dem *Tag*-Ansatz und dem Schutzgruppen-Ansatz

3.2. Schützung von Aminosäuren mit der ionischen Schutzgruppe

3.2.1. Überblick

Bei diesem Ansatz ist das Zielmolekül ein mit der löslichkeitsverbessernden Schutzgruppe N-terminal funktionalisiertes Aminosäurederivat. Es sind verschiedene Syntheserouten möglich, die jeweils unterschiedliche Vor- und Nachteile aufweisen. Bei diesen Routen handelt sich im Grunde genommen um Variationen der gleichen Transformationen in unterschiedlicher Abfolge. Die einzelnen Schritte sind:

- Aufbau des Linkers
- Anbinden der ionischen Gruppe an den Linker
- Kupplung des Linkers an das Aminosäurederivat
- Oxidation des Linkers

Bei Verwendung von Schutzgruppen für den C-Terminus während der Synthese der Aminosäurederivate ergeben sich zusätzliche Schritte für deren Abspaltung (ggf. muss die Schutzgruppe am C-Terminus auch erst angebracht werden). Abbildung 3.3 zeigt die wichtigsten Varianten zur Herstellung des Zielmoleküls. Im folgenden Kapitel ist das Seitenkettengeschützte Serinderivat das exemplarische Zielmolekül ($R = \text{CH}_2\text{OtBu}$ in Abb. 3.3). Ergebnisse aus Experimenten mit anderen Reagenzien oder Aminosäurederivaten fließen aber auch mit in die Betrachtungen ein.

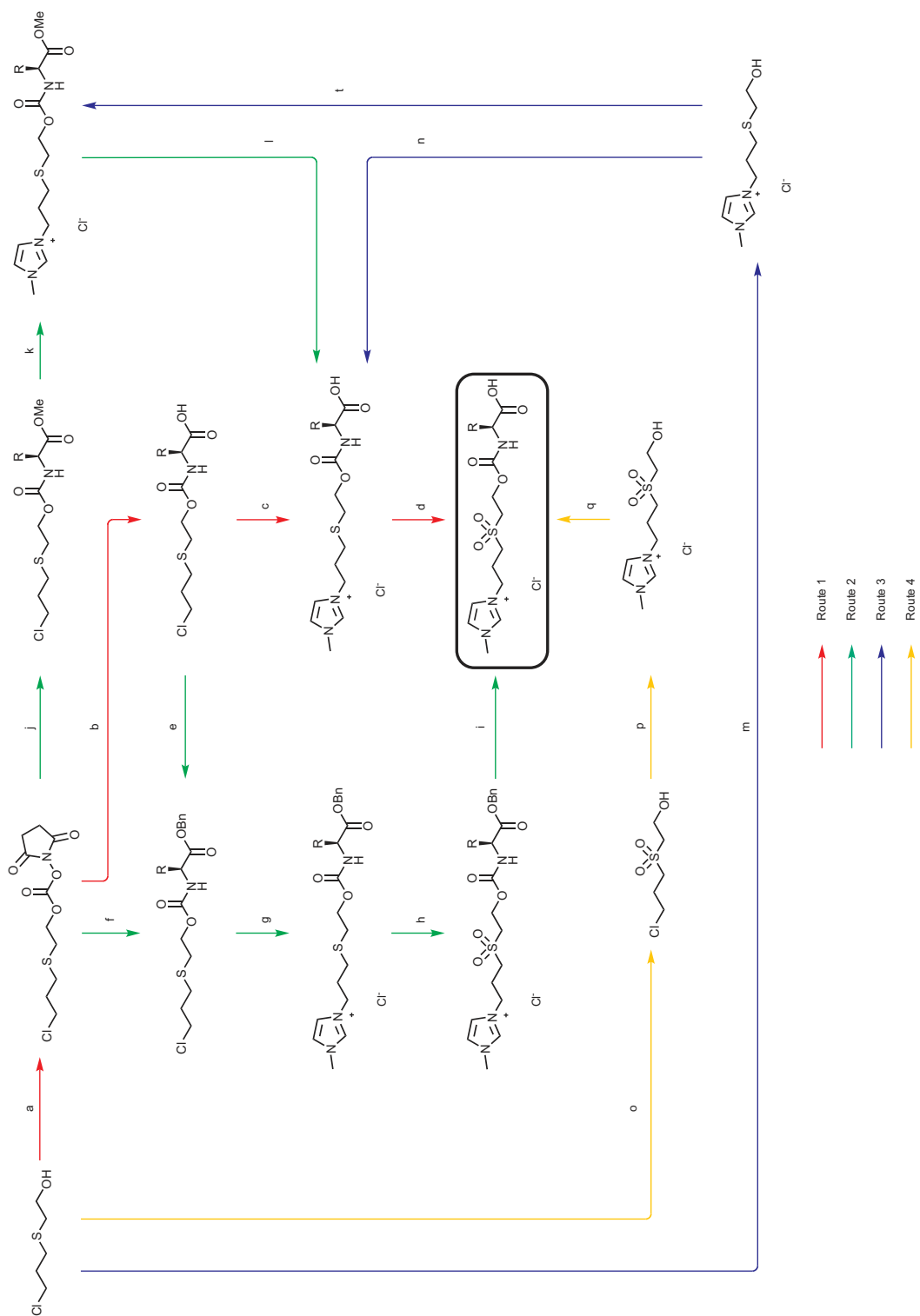


Abbildung 3.3.: Ansätze zur Synthese der wasserlöslichen Schutzgruppe mit einfach geladenem *Tag*

3.2.2. Route 1: Kupplung des Linkers an die freie Aminosäure und anschließender Aufbau der Schutzgruppe

3.2.2.1. Aktivierung des Linkers

Der Linker **3** (Synthese siehe Abschnitt 2.2.1) konnte mit Hilfe verschiedener Reagenzien in ein aktiviertes Carbonat überführt werden.¹⁶⁰ Die Ergebnisse der Reaktionen sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Die p-Nitrophenolcarbonat- und *N*-Hydroxysuccinimidcarbonat-Derivate waren hinreichend stabil, um sie mittels Säulenchromatographie zu reinigen, wobei die Ausbeuten in beiden Fällen vergleichbar war.^{146,161–164}

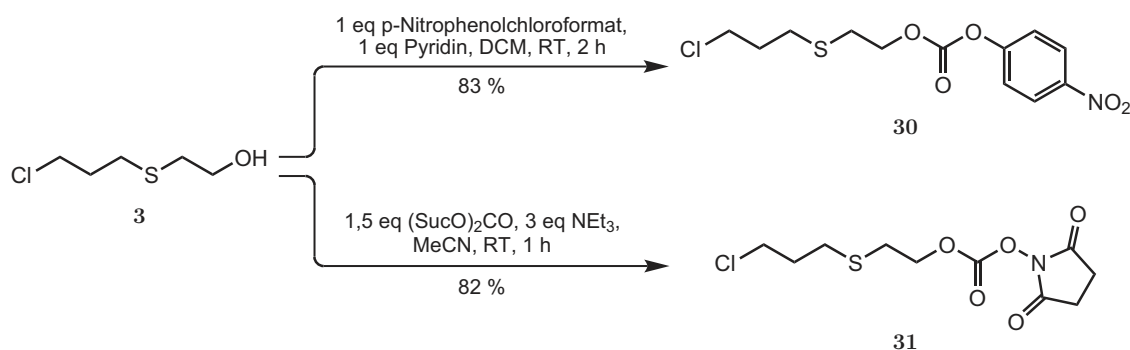


Abbildung 3.4.: Aktivierung des Linkers

3.2.2.2. Kupplung des aktivierten Linkers an verschiedene Aminosäurederivate

Die aktivierten Linker **30** und **31** wurden mit H-Phe-OBn mit sehr guter Ausbeute umgesetzt. Die Reaktion des Nitrophenolcarbonats **30** mit H-Phe-OBn war ungefähr 24 mal langsamer als die des *N*-Hydroxysuccinimidcarbonats **31**. Außerdem gelang die Abtrennung des bei der Reaktion entstehenden *N*-Hydroxysuccinimids leichter als die des p-Nitrophenols. Daher wurde für die weiteren Reaktionen nur der als *N*-Hydroxysuccinimidcarbonat aktivierte Linker **31** eingesetzt.

Nachdem die Kupplung des aktivierten Linkers **31** an H-Phe-OBn zum vollständig geschützten Aminosäurederivat **32** erfolgreich war, wurde versucht diese Reaktion auf Aminosäuren mit freier Carbonsäurefunktion übertragen. Dabei wurde auch untersucht, ob die chromatographische Reinigung des aktivierten Linkers **31**

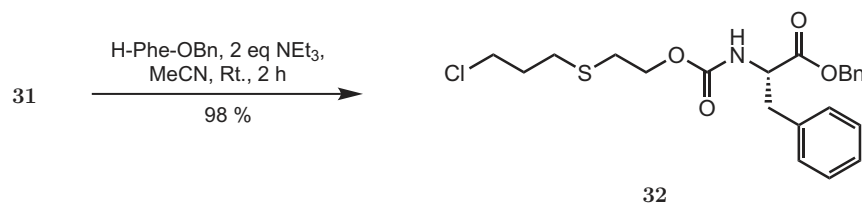


Abbildung 3.5.: Kupplung des aktivierten Linkers an H-Phe-OBn

zu einer höheren Ausbeute führt, oder ob eine Extraktion mit Dichlormethan ausreichend ist. Dazu wurde eine Probe des aktivierten Linkers **31**, nach Extraktion mit Dichlormethan, durch Säulenchromatographie gereinigt (**31 Ansatz a**). Eine andere Probe wurde nur mit Dichlormethan gegen Wasser extrahiert, getrocknet und einrotiert (**31 Ansatz b**). Der durch unterschiedliche Reinigungen erhaltene, als *N*-Hydroxysuccinimidcarbonat aktivierte Linker, wurde mit H-Ser(*t*Bu)-OH umgesetzt und das Produkt durch Chromatographie gereinigt. Dies ergab zwei Proben (*a* und *b*), deren Reinheit vergleichbar war. Aus der Ausbeute für die einzelnen Schritte wurde die Gesamtausbeute für die beiden verschiedenen Ansätze ausgehend vom Linker **3** berechnet (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1.: Ausbeute mit verschiedenen Aufarbeitungen

Reinigung	Ausbeute
Extraktion und Chromatographie (<i>a</i>)	77%
Extraktion (<i>b</i>)	74%

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die chromatographische Reinigung nicht zwingend notwendig ist. Daher wurden die in Abbildung 3.6 dargestellten Reaktionen nur mit durch Extraktion gereinigtem aktivierten Linker **31** durchgeführt. Die Aminosäurederivate **33-39** konnten mit guten Ausbeuten isoliert werden. Für jedes Derivat wurde die Aktivierung des Linkers **3** (Cl-B_{red}-OH) und die Kupplung an die Aminosäure jeweils am gleichen Tag durchgeführt, da die Stabilität des aktivierten Linkers **31** nicht zweifelsfrei feststand. Die Reinigung mittels Säulenchromatographie war möglich, es wurde jedoch ein Zusatz an Essigsäure benötigt. Diese konnte anschließend durch mehrmalige azeotrope Destillation mit Toluol vollständig entfernt werden.

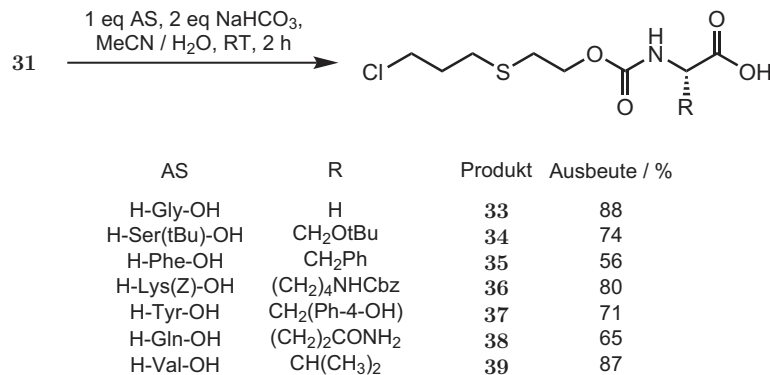


Abbildung 3.6.: Kupplung des aktivierten Linkers an verschiedene Aminosäurederivate

3.2.2.3. Nucleophile Substitution

Der nächste Schritt in dieser Route war die nucleophile Substitution des Chloratoms durch 1-Methylimidazol. Dabei wurde ein Nebenprodukt beobachtet, welches mit Hilfe von HPLC-MS Untersuchungen als Dimerisierungsprodukt identifiziert werden konnte (Abb. 3.7).

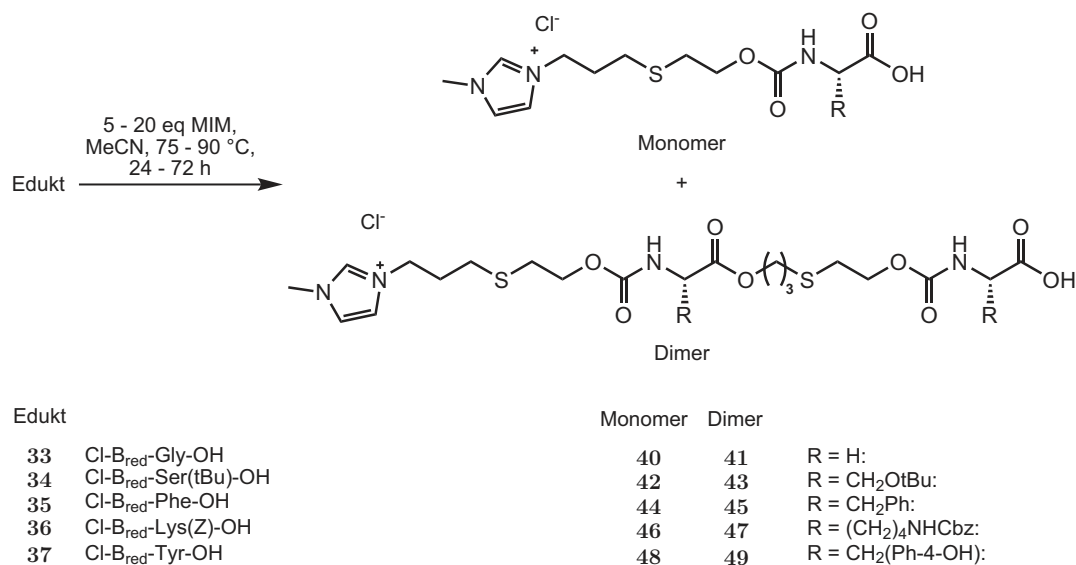


Abbildung 3.7.: Ergebnisse der direkten nucleophilen Substitution an verschiedenen Aminosäurederivaten

Bei der Bildung des Dimers fungierte das Carboxylat (durch Deprotonierung der Carbonsäure mit 1-Methylimidazol entstanden) als Nucleophil. Diese Nebenreaktion trat bei allen verwendeten Aminosäurederivaten auf. Auch ein 20-facher Überschuss an 1-Methylimidazol konnte die Dimerisierung nicht verhindern. Da die

entstehenden Produkte ionisch sind, war die säulenchromatographische Trennung mit Kieselgel nicht möglich. Um die ionischen Aminoäurederivate **40**, **42**, **44**, **46** und **48** ausreichend rein zu erhalten, wurde versucht, die unerwünschte Nebenreaktion durch Optimierung der Reaktionsbedingungen zu vermeiden.

Ansätze zur Optimierung der Reaktionsbedingungen Es wurde angenommen, dass sowohl die Bildung des gewünschten Produkts (des Monomers), als auch die Reaktion des Carboxylats mit dem Chloratom eines anderen Eduktmoleküls über einen S_N2 -Mechanismus erfolgt. Dieser Mechanismus zählt zu den am intensivsten erforschten der organischen Chemie, so dass es viele Erkenntnisse gibt, wie diese Reaktionen beeinflusst werden können.¹⁰⁹ Die unerwünschte Nebenreaktion sollte so stark zu verlangsamen, dass sie nicht mehr ins Gewicht fällt, gleichzeitig sollte die gewünschte Reaktion nicht zu stark gebremst werden. Anderenfalls wären härtere Reaktionsbedingungen nötig gewesen, um ausreichenden Umsatz in angemessener Zeit zu erzielen. Dadurch könnten Zersetzungsreaktionen auftreten oder das Produkt racemisieren.

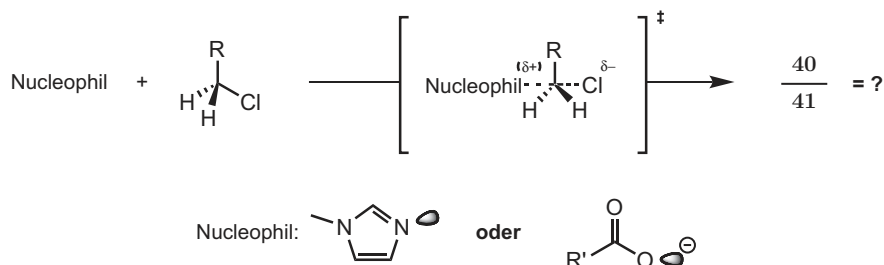


Abbildung 3.8.: Skizze des Reaktionsmechanismus der S_N2 -Reaktion welche zu dem Gemisch aus **40** und **41** führt

Im folgenden werden die Ergebnisse über den Einfluss des Lösungsmittels, der Konzentration von 1-Methylimidazol und von TMS-Cl auf das Verhältnis von monomeren zu dimeren Aminosäurederivat dargestellt. Ziel war es, den Anteil des monomeren Aminosäurederivats so weit wie möglich zu erhöhen. Als Masszahl zum Vergleich verschiedener Reaktionsbedingungen wurde der Quotient q eingeführt. Dieser ist definiert als der Quotient aus der UV-Absorbtion des monomeren Aminosäurederivats dividiert durch die UV-Absorbtion des dimeren Aminosäurederivats. Die Begründung des Quotienten ist im Anhang A1 (Absch. 8.1) dargestellt.

Verwendung von polar-protischen Lösungsmitteln als Additiv Hydroxylhaltige (polar-protische) Lösungsmittel können mit Nucleophilen teilweise Wasserstoffbrücken ausbilden. Dadurch wird die Stärke des Nucleophils reduziert. Nucleophile sind in hydroxylhaltigen Lösungsmitteln daher im Allgemeinen deutlich weniger reaktiv als in polar-aprotischen Lösungsmitteln wie DMF, DMSO oder Aceton.

Nucleophile, welche stärkere Wasserstoffbrücken ausbilden können, werden durch die Verwendung hydroxylhaltiger Lösungsmittel stärker beeinflusst.¹⁰⁹ Das negativ geladene Carboxylat kann mit hydroxylhaltigen Lösungsmitteln stärkere Wasserstoffbrücken ausbilden als das ungeladene Stickstoffatom des Methylimidazols. Durch Zusatz polar-protischer Lösungsmittel sollte das Produktverhältnis zu dem gewünschten monomeren Produkt (z.B. **40**) verschoben werden.

Der Einfluss des Lösungsmittels und der Konzentration auf das Ergebnis der Reaktion wurde mit dem Glycinderivat **33** untersucht. Dabei wurden jeweils 1 eq des Aminosäurederivats **33** mit je 5 eq 1-Methylimidazol bei 65 °C in verschiedenen Lösungsmittelgemischen umgesetzt, die Analyse erfolgte mit HPLC-UV (Abb. 3.9).

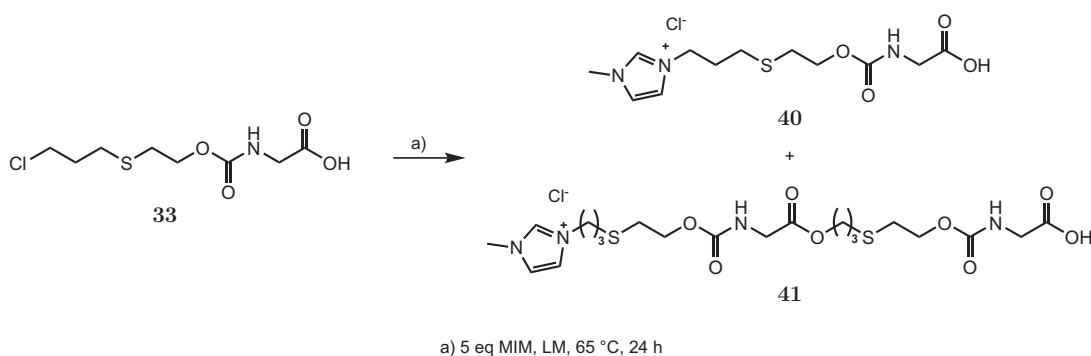


Abbildung 3.9.: Reaktion des Glycinderivats **33** mit 1-Methylimidazol

Die Ergebnisse für verschiedene Lösungsmittel sind in Tabelle 3.2 wiedergegeben. Es ist deutlich sichtbar, dass mit steigendem Anteil an polar-protischem Lösungsmittel das Monomer/Dimer-Verhältnis in die gewünschte Richtung verschoben wird.

Diese Zahlenwerte zeigen nur an, dass der Anteil des gewünschten monomeren, ionischen Glycinderivats im Reaktionsgemisch erhöht wurde. Für die Praxis stellt sich die Frage, ob sich auf diese Art ein ausreichend reines Produkt ergibt. Zur Beantwortung dieser Frage ist eine Abschätzung der Extinktionskoeffizienten des monomeren Glycinderivats **40** und des dimeren Glycinderivats **41** nötig (siehe Anhang A2).

Der mit dieser Näherung aus dem in Tabelle 3.2 angegebenen Quotienten q abgeschätzte Stoffmengenanteil des gewünschten monomeren Glycinderivats **40** beträgt im Falle des Isopropanol / Wasser Gemischs 86%, was nicht ausreichend ist.

Tabelle 3.2.: Einfluss des Lösungsmittels auf das Verhältnis **40** zu **41** (Konzentration **33** 0,2 M, 5 eq MIM, 65 °C, 24 h)

Lösungsmittel	q
iPrOH / Wasser 2:1	6,40
DMF / Wasser 2:1	2,39
Aceton / Wasser 2:1	2,35
DMF / Wasser 4:1	1,89

Verschiebung des Gleichgewichts unter Ausnutzung der Geschwindigkeitsgesetze Ein weiterer Parameter der Reaktionen nach dem S_N2 -Mechanismus variiert werden kann, ist die Konzentration der Edukte. Die Geschwindigkeitsgesetze für die Bildung des monomeren und dimeren Aminosäurederivats lauten wie folgt:

$$v(\text{Monomer}) = \frac{d[\mathbf{40}]}{dt} = k_1[\mathbf{33}][\text{MIM}] \quad (3.1)$$

$$v(\text{Dimer}) = \frac{d[\mathbf{41}]}{dt} = k_2[\mathbf{33}][\mathbf{40}] \quad (3.2)$$

Da sich die Geschwindigkeitsgesetze der beiden Reaktionen unterscheiden, kann durch Veränderung der Ausgangskonzentrationen die gewünschte Reaktion bevorzugt werden. Während der Einfluss der Konzentration des Glycinderivats **33** in beiden Gleichung gleich ist, kann durch die Erhöhung der 1-Methylimidazolkonzentration das Verhältnis der beiden Produkte in Richtung eines höheren Anteil des Monomers verschoben werden. Durch erniedrigen der Konzentration des monomeren ionischen Glycinderivats **40** sollte der gleiche Effekt eintreten.

Der Effekt der Erhöhung der Konzentration von 1-Methylimidazol wurde ebenfalls anhand des Glycinderivats **33** untersucht (schematische Darstellung siehe Abb. 3.9). Die Erhöhung der Methylimidazolkonzentration erhöht den Anteil des gewünschten monomeren Glycinderivats. Allerdings ist der Effekt geringer als der durch die Änderung der Lösungsmittels erzielte und daher ebenfalls nicht ausreichend (Tab. 3.3).

Da die angestrebte Reinheit von > 95 % durch diese Ansätze nicht erreicht werden konnte und zu dieser Zeit keine Möglichkeit bestand, das Monomer **40** vom Dimer **41** präparativ zu trennen, wurde die direkte nucleophile Substitution am C-Terminal ungeschützten Aminosäurederivaten mit 1-Methylimidazol aufgegeben.

Tabelle 3.3.: Einfluss der Menge 1-Methylimidazol auf das Verhältnis von monomeren zu dimeren Aminosäurederivat (Konzentration **33** 1 M, 65 °C, 24 h)

Lösungsmittel	eq MIM	q
DMF / Wasser 4:1	5	1,32
DMF / Wasser 4:1	10	1,62

3.2.2.4. Verwendung von TMS-Cl als temporäre Schutzgruppe

Eine Alternative zur direkten nucleophilen Substitution ist der Einsatz einer temporären Schutzgruppe für die Carbonsäurefunktion. Diese sollte einerseits ausreichend stabil sein um während der nucleophilen Substitution die Dimerisierung zu verhindern. Auf der anderen Seite sollte sie am Ende der Reaktion einfach und möglichst während der Aufarbeitung ohne zusätzliche Schritte entfernt werden können. Aufgrund dieses Anforderungsprofils bot sich die Trimethylsilylschutzgruppe (TMS) an, welche gegenüber Säuren und Basen eine nur moderate Stabilität zeigt.¹⁶⁵

Da die TMS-Gruppe nur als temporäre Schutzgruppe dienen sollte, wurde die Carbonsäure im ersten Schritt einer Eintopfreaktion geschützt (d.h. das geschützte Aminosäurederivat wurde nicht isoliert). Normalerweise wird als Base für diese Reaktion Pyridin oder Triethylamin verwendet, in diesem Fall wurde 1-Methylimidazol verwendet, um Konkurrenzreaktionen bei der nucleophilen Substitution im zweiten Schritt der Eintopfreaktion zu vermeiden. Der Einfluss der TMS-Gruppe wurde mit dem Serinderivat **34** untersucht (Abb. 3.10).

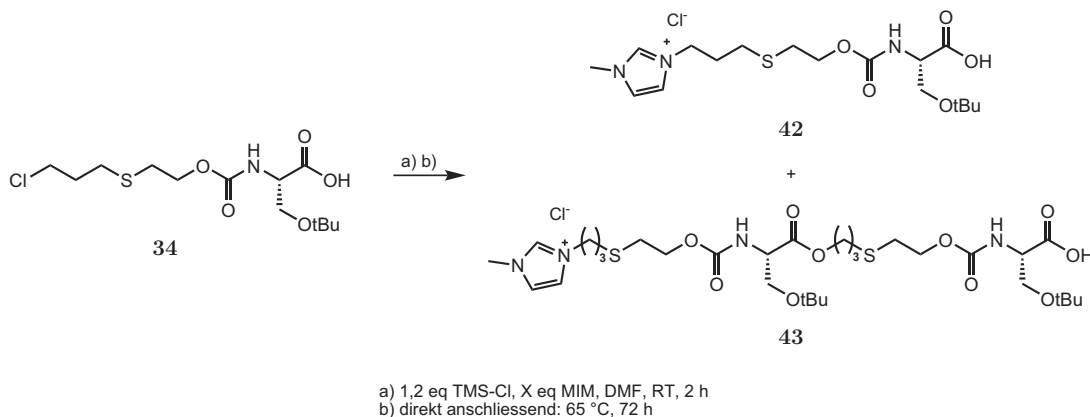


Abbildung 3.10.: Reaktion des Serinderivats **40** mit 1-Methylimidazol in Gegenwart von TMS-Cl

Abhängigkeit des Quotienten q und des Umsatzes vom Verhältnis TMS-Cl / Base Es wurden in jedem Experiment 1,2 eq TMS-Cl (bezogen auf das Serinderivat **34** (Cl-B_{red}-Ser(tBu)-OH)) verwendet und die Menge 1-Methylimidazol variiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 graphisch dargestellt.

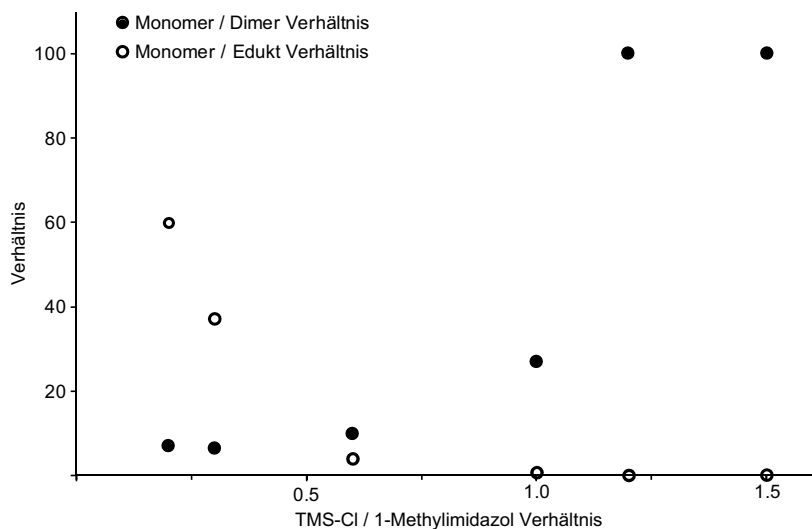


Abbildung 3.11.: Einfluss des TMS-Cl / 1-Methylimidazol Verhältnis auf die Bildung von **42** (MIM-B_{red}-Ser(tBu)-OH) und **43** (MIM-B_{red}-Ser(tBu)-B_{red}-Ser(tBu)-OH))

Die Auswertung erbrachte folgende Ergebnisse:

1. Bei einem Überschuss an TMS-Cl im Verhältnis zu 1-Methylimidazol wurde die Bildung des Dimers **43** unterdrückt. Auch nach 72 h konnte es nicht nachgewiesen werden. Die Reaktion war nach 72 h noch nicht vollständig, das Edukt **34** konnte noch nachgewiesen werden.
2. Bei einem Überschuss an TMS-Cl konnte die langsame Bildung des ionischen Serinderivats **42** beobachtet werden. Dies bedeutet, dass protoniertes 1-Methylimidazol entweder in der Lage war DMF (welches als Lösungsmittel eingesetzt wurde) zu protonieren, oder immer noch ein Nucleophil darstellte.
3. Die Menge an gebildetem Dimer **43** war indirekt proportional zu dem Verhältnis von TMS-Cl zu 1-Methylimidazol. Dies bedeutet, dass die „Schutzwirkung“ des TMS-Cl mit steigender Menge desselben zu nahm. Das steht im Widerspruch zu der Vorstellung einer kovalent gebundenen Schutzgruppe.
4. Die noch vorhandene Menge Edukt **34** ist mit dem Verhältnis von TMS-Cl zu 1-Methylimidazol direkt proportional korreliert.

Untersuchung der Art des Einflusses von TMS-Cl TMS-Cl hat eindeutig einen positiven Effekt auf das Monomer-Dimer Verhältnis. Allerdings ist die Stabilität des TMS-Esters nach den experimentellen Befunden fraglich. Aus der experimentellen Feststellung, dass der positive Effekt des TMS-Cl mit dessen Konzentration korreliert ist, ergibt sich die Frage, nach welchem Mechanismus dieser „Schutz“ erfolgt. Eine mögliche Erklärung ist eine Art Pufferwirkung des TMS-Cl, bzw. der aus ihm gebildeten Salzsäure. Die Reaktion von TMS-Cl mit Hydroxylgruppen (enthalten in Alkoholen, Carbonsäuren und Wasser) führt in jedem Fall zur Bildung von Salzsäure. Diese wird durch die zugesetzte Base neutralisiert, im oben beschriebenen Fall würde Methylimidazolhydrochlorid entstehen. Dadurch würde die Basizität des noch unprotonierten Methylimidazols herabgesetzt. Durch diese Pufferwirkung würde das Gleichgewicht der in Abbildung 3.12 dargestellten Deprotonierung des Serinderivats nach links verschoben.

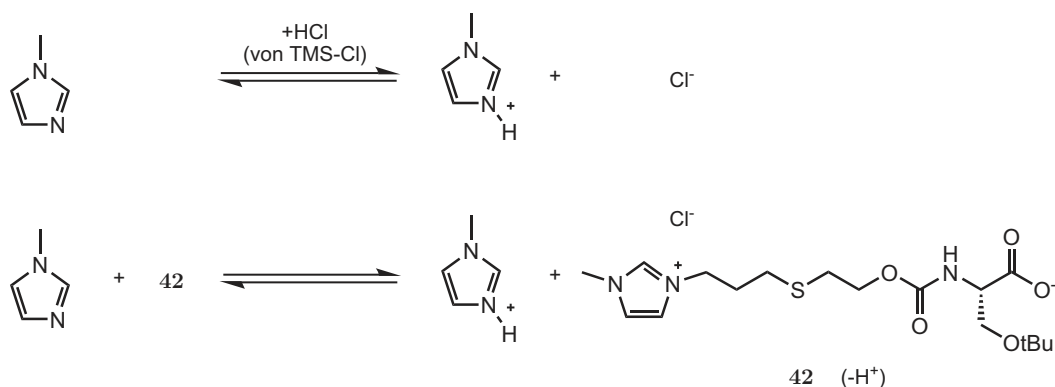


Abbildung 3.12.: Gleichgewicht zwischen protonierter und deprotonierter Form der Serinderivats **42** und der Einfluss des aus dem TMS-Cl HCl

Dadurch wäre die Konzentration des Serinderivats **42** mit deprotonierter Carbonsäure geringer, was aufgrund des für die S_N2-Reaktion gültigen Geschwindigkeitsgesetzes direkt die Geschwindigkeit der Dimerisierung verringern sollte. Dadurch würde der Quotient q erhöht. Dies ist genau das, was experimentell festgestellt wurde. Für diese Theorie sprechen zwei weitere experimentelle Befunde.

1. Betrachtet man die ¹H-NMR-Spektren von 1-Methylimidazol mit steigender Menge an zugesetzter Säure, so änderte sich die chemische Verschiebung der aromatischen Protonen des 1-Methylimidazols kontinuierlich, es wurde nur eine Spezies detektiert. Dies bedeutet, dass die Gesamtheit der Methylimidazolmoleküle durch den Zusatz an Säure beeinflusst wurde (schneller Austausch).

2. Puffersysteme auf der Basis von Imidazol sind bekannt und werden im Labor genutzt. Mit diesem System sind pH-Werte zwischen 6,0 und 7,8 in wässrigen Lösungen einstellbar.

Wenn diese Überlegungen zutreffen, so sollten andere Säuren einen ähnlichen Einfluss auf den Quotienten q haben. Um dies zu überprüfen wurde eine weitere Serie von Experimenten bei gleicher Temperatur durchgeführt. Bezogen auf das Serinderivat **34** wurden 6 eq 1-Methylimidazol eingesetzt, außerdem wurden jeweils 1,2 eq Schwefelsäure, Salzsäure, TMS-Cl oder TFA zugesetzt. Nach 24 und 72 h wurde mittels HPLC-UV das Monomer - Dimer Verhältnis bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 dargestellt.

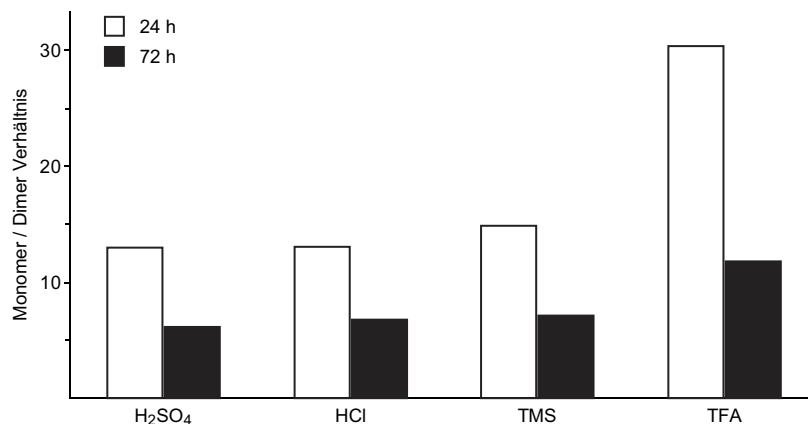


Abbildung 3.13.: Einfluss verschiedener Säuren auf den Quotienten q

Aus dieser Darstellung ist ersichtlich, dass auch andere Säuren die Reaktion in der gewünschten Richtung beeinflussen. Die Art der Säure scheint dabei zweitrangig. Nur mit TFA wird deutlich weniger Dimer gebildet. In diesem Diagramm ist zusätzlich noch die Entwicklung des Verhältnisses zwischen Monomer **42** und Dimer **43** über die Zeit wiedergegeben. Der Anteil des Dimers nimmt mit der Zeit zu. Nach 72 h ändert sich das Monomer - Dimer Verhältnis bei Verwendung von TMS-Cl nicht mehr.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Säuren einen dem TMS-Cl ähnlichen Einfluss auf die Reaktion ausüben können, wurde der Einfluss der Säurekonzentration auf das Monomer - Dimer Verhältnis untersucht. In Abbildung 3.14 sind die Ergebnisse für TFA gezeigt. Der untersuchte Konzentrationsbereich ist kleiner als im Fall von TMS-Cl, der Trend ist aber eindeutig: Je größer die zugesetzte Menge an TFA ist, desto stärker wird die Bildung des Dimers zurückgedrängt.

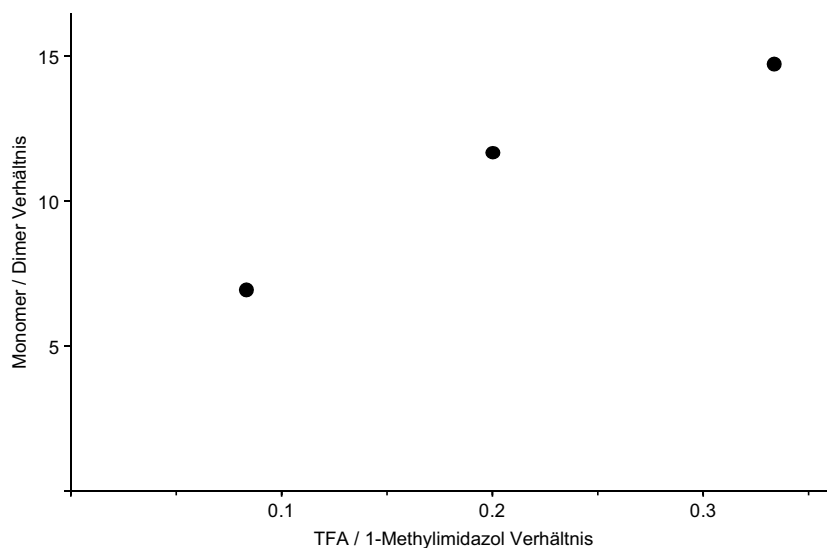


Abbildung 3.14.: Einfluss verschiedener Konzentrationen von TFA auf das Monomer - Dimer Verhältnis

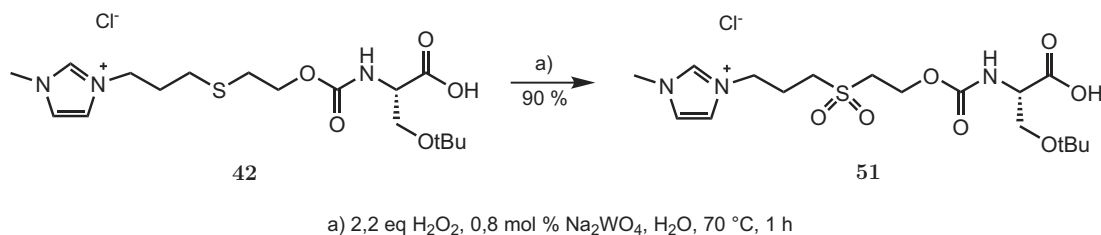
Diese Experimente zeigen, dass durch Zugabe von Säuren die Selektivität der Reaktion für die Bildung des gewünschten Monomers **42** verbessert werden kann. Dies spricht für eine Pufferwirkung der zugesetzten Säure bzw. des TMS-Cl.

Es ist jedoch bei einer Abschätzung offensichtlich, dass auf diese Art kein sehr reines Produkt erhalten werden kann (die Trennung von **42** und **43** war (noch) nicht möglich). Die Abschätzung ergab zum Beispiel, dass bei der Reaktion in DMF mit 1,2 eq TMS-Cl und 6 eq 1-Methylimidazol nach 72 Stunden nur eine maximale Reinheit von 87% erreicht werden konnte. Diese ist nicht ausreichend für die industrielle Anwendung. Hingegen genügt diese Reinheit, um Tests hinsichtlich der Möglichkeit der Oxidation und der prinzipiellen Eignung für die Peptidsynthese durchzuführen.

3.2.2.5. Oxidation des Thioethers

Die Oxidation wurde mit dem Gemisch aus den monomeren **42** und dimeren Serinderivat **43** durchgeführt.¹⁵³ Diese Reaktion entspricht der Reaktion d in Abbildung 3.3. Da die Zusammensetzung der zugrunde liegenden Mischung aus **42** und **43** nicht genau bekannt war, kann für diese Reaktion nur eine ungefähre Ausbeute angegeben werden (Abb. 3.15). Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch HPLC-MS Untersuchungen überprüft.

Der Überschuss an Wasserstoffperoxid wurde durch 30 minütiges Rühren bei 50 °C in Gegenwart von Braunstein katalytisch zersetzt. Die Analyse des erhaltenen Gemisches mit Hilfe der NMR-Spektroskopie war leider aufgrund der Linienbreite nicht

Abbildung 3.15.: Oxidation des Serinderivats **42** zum Sulfon

möglich. Dieses Problem wird durch Mn²⁺-Ionen verursacht, welche sich bei der Zersetzung des Wasserstoffperoxids bilden, oder schon im Braunstein enthalten sind. Durch Oxidation mit Ammoniumperoxodisulfat in schwefelsaurer Lösung konnten die Mn²⁺-Ionen in einer Substanzprobe qualitativ nachgewiesen werden.⁵⁸ Durch Zusatz definierter Mengen MnCl₂ zu einer Lösung des Edukts konnte eine ähnliche Linienverbreiterung erzielt werden. Die Verbreiterung der Linien in der ¹H-NMR-Spektroskopie wird durch die paramagnetische Relaxationsverstärkung der Mn²⁺-Ionen hervorgerufen und kann nur verhindert werden, indem die Mn²⁺-Ionen im Zuge der weiteren Reinigung abgetrennt werden oder das überschüssige Wasserstoffperoxid auf andere Weise entfernt wird.

Um die prinzipielle Eignung des fertigen Serinderivats **51** für die Peptidsynthese zu testen, wurde das bei der Oxidation erhaltene Gemisch des monomeren und dimeren Aminosäurederivates an ein festphasengebundenes Peptid gekuppelt. Die Kupplung war erfolgreich, die geringen Mengen Mn²⁺ wirkten sich nicht negativ aus. Man erhielt nach dem Abspalten des Peptids vom Harz eine Mischung der beiden erwarteten Peptide.

Es ist bekannt, dass Platin die Zersetzung von Wasserstoffperoxid ebenfalls katalysiert.¹⁵¹ Wie sich bei der Verwendung von Platin auf Aktivkohle zeigte, ist es jedoch weniger aktiv als Braunstein. Es war eine Temperatur von 70 °C notwendig, um Wasserstoffperoxidreste vollständig zu zersetzen. Unter diesen Bedingungen wurde jedoch die N-terminal geschützte Aminosäure decarboxyliert.^{147,166,167} Diese Reaktion trat nur zu einem geringen Maß während der Oxidationsreaktion auf, nach dem Quenchen des Wasserstoffperoxids mit Pt/C konnte dagegen nahezu vollständige Decarboxylierung beobachtet werden. Für Aminosäurederivate mit freier Carbonsäure ist diese Methode daher nicht geeignet. In diesem Fall muss das überschüssige Wasserstoffperoxid durch Festphasenextraktion (FPE, siehe auch Absch. 5.2) oder Umsetzung mit Natriumhydrogensulfit und anschließender Etherfällung entfernt werden.

Präparative Trennung mittels HPLC Die nach der Oxidation erhaltenen geschützten Serinderivate konnten nur mittels präparativer HPLC getrennt werden. Die Kapazität der Säule war dabei sehr hoch. Mit einer analytischen Säule vom Typ Reprosil-Pur 100 BASIC-C18 der Dimension 50×3 mm konnten bis zu 2 mg des Produktgemisches pro Lauf getrennt werden. Während der HPLC-Trennung kam es zu einem Austausch des Chlorids gegen ein Triflat-Ion. Das Produkt zeigt bei Untersuchung mit ^{19}F -NMR Spektroskopie ein deutliches Signal. Gleichzeitig ergab eine salpetersaure Lösung von Silbernitrat mit einer Probe des ionischen Aminosäurederivats keinen Niederschlag, was die Abwesenheit von Chlorid belegt. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, in der Literatur ist die Verwendung der präparativen HPLC zum Anionenaustausch bei Peptiden dokumentiert.¹⁶⁸ Es zeigt, dass der Austausch des Anions auch bei ionischen *Tags* während der präparativen HPLC erfolgen kann. Da Salze mit dem Triflat Anion im Allgemeinen in Wasser leicht löslich sind, sollte der Anionenaustausch für die Verwendung des Serinderivats **51** (MIM- B_{ox} -Ser(tBu)-OH) nicht hinderlich sein.

Zusammenfassend betrachtet war es über Route 1 möglich, das geschützte Serinderivat **51** zum ersten Mal in reiner Form herzustellen. Untersuchungen mit NMR-Spektroskopie und HPLC-MS zeigten die Identität und Reinheit des auf diese Art gereinigten Serinderivats **51** (MIM- B_{ox} -Ser(tBu)-OH).

Herstellung des Glycinderivats (MIM- B_{ox} -Gly-OH) Bei der direkten nucleophilen Substitution ergeben sich immer mehr oder weniger große Mengen Dimer. Erst als die FPE für die Reinigung verschiedener, ionischer Verbindungen eingesetzt wurde, konnte das Monomer vom Dimer abgetrennt werden. Somit wäre Route 1 wieder eine attraktive Möglichkeit zur Synthese der mit einer ionischen Gruppe geschützten Aminosäurederivat. In der Zwischenzeit wurden aber andere Wege zu den gewünschten geschützten Aminosäurederivaten gefunden (Abschnitte 3.2.4 und 3.2.5). Diese sind schneller und deutlich milder als der hier vorgestellte Weg. Route 1 ist prinzipiell nicht für die Herstellung der Cystein- und Methioninderivate geeignet. Die lange Reaktionsdauer und relativ hohe Temperatur bei der nucleophilen Substitution ist sind weitere Nachteile, insbesondere empfindliche Aminosäuren könnten racemisieren. Diese Punkte stellen für das Glycinderivat **52** kein Problem dar. Da Route 3 und 4 beim Glycinderivat wegen der fehlenden Retardierung der entsprechenden ionischen Glycinderivate in der FPE nicht geeignet sind, stellt Route 1 den im Moment besten Zugang zum geschützten Glycinderivat **52** dar (Abb. 3.16).

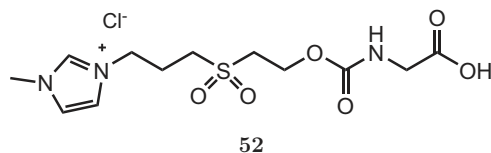


Abbildung 3.16.: Struktur des geschützten Glycinderivats MIM-B_{ox}-Gly-OH

3.2.3. Route 2: Kupplung des Linkers an die C-terminal geschützte Aminosäure und anschließender Aufbau der Schutzgruppe

Nachdem alle Versuche, die unerwünschte Dimerisierung durch Variation der Reaktionsbedingungen oder Verwendung temporärer Schutzgruppen zu vermeiden, nicht ausreichend waren, und eine einfache Trennung des Gemisches aus monomeren und dimeren Aminosäurederivat nicht möglich war, wurde ein neuer Ansatz gewählt. In diesem sollte der aktivierte Linker **31** an ein C-terminal geschütztes Aminosäurederivat gekuppelt werden, oder die im Rahmen der Route 1 hergestellten nicht ionischen Aminosäurederivat (Abb. 3.6) vor der nucleophilen Substitution am C-Terminus geschützt werden. Die verwendeten C-terminalen Schutzgruppen sollten stabiler als die TMS-Gruppe sein.

Als Schutzgruppe kommen in erster Linie Benzyl- und Methylester in Frage. Bei dieser Variante ist jedoch zu berücksichtigen, dass im Fall der kommerziell erhältlichen Methylester ein zusätzlicher Reaktionsschritt für die Entschützung notwendig wird. Da nicht alle Benzylester kommerziell erhältlich sind (unter anderem das gewünschte Serinderivat) werden bei Verwendung von Benzylestern bis zu zwei zusätzliche Schritte notwendig. Die Reaktionssequenzen für Benzylester und Methylester unterscheiden sich aufgrund der benötigten Bedingungen zur Abspaltung der Schutzgruppe (Abb. 3.3 auf Seite 87). Deswegen werden beide Wege in diesem Abschnitt getrennt behandelt.

3.2.3.1. Verwendung des Benzylesters

Die Benzylester der Aminosäuren Alanin, Arginin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Tyrosin und Valin sind kommerziell erhältlich. In diesen Fällen sind auch eventuell vorhandene funktionelle Gruppen in den Seitenketten geschützt. Diese Aminosäurederivate könnten, bis auf Lysin, dessen kommerziell erhältliches Derivat in der Seitenkette mit der Z-Schutzgruppe geschützt ist, direkt in der Route 2 (Abb. 3.3) verwendet werden.

Herstellung der Benzylester Aspartat, Glutamat, Serin und Threonin sind zwar als C-terminale Benzylester kommerziell erhältlich, die Seitenketten sind in diesen Fällen jedoch nicht geschützt. Da diese im Fall von Aspartat und Glutamat die Kupplung an das Peptid über die Seitenkette verhindern und im Fall von Serin und Threonin die Hydroxyfunktion in der Seitenkette vor der Oxidation schützen, müsste die Seitenkettenschutzgruppen erst eingefügt werden. Da die am N-Terminus geschützten Aminosäurederivate von Route 1 zur Verfügung standen, wurde versucht, deren freie Carbonsäure zu verestern, es wurde nur das Serinderivat näher untersucht. Dabei wurde der Benzylester ausgehend vom Serinderivat **34** auf zwei verschiedene Arten hergestellt.

Herstellung des Benzylesters durch nucleophile Substitution von Benzylbromid Zuerst wurde die Carbonsäure mit Cs_2CO_3 oder Triethylamin deprotoniert. Das entstandene Carboxylat sollte dann mit Benzylbromid in einer nucleophilen Substitution den gewünschten Benzylester **53** ergeben (Abb. 3.17). Dabei war die Verwendung von Triethylamin mit einer Ausbeute von 94% am erfolgreichsten (Tab. 3.4).

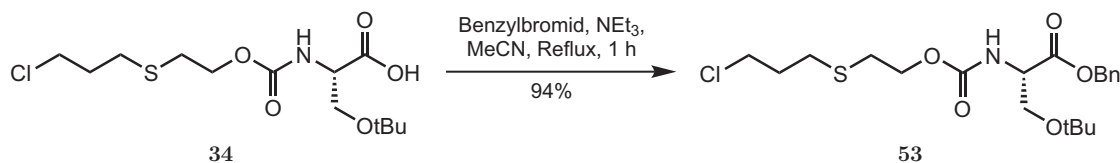
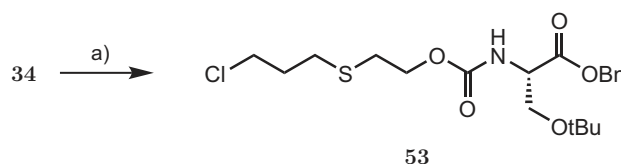


Abbildung 3.17.: Veresterung von **34** mit Benzylbromid

Tabelle 3.4.: Einfluss der Konzentration an Alkylierungsmittel und Base und deren Art auf die Herstellung des Benzylesters **53**

eq Benzylbromid	Base	eq Base	Ausbeute
1,1	Cs_2CO_3	1,6	67%
5,1	Cs_2CO_3	1,6	36%
1,1	NEt_3	1,2	73%
0,9	NEt_3	0,9	94%

Herstellung des Benzylesters durch Einsatz von Benzoylchloroformat Eine weitere Möglichkeit den Benzylester von Carbonsäuren herzustellen ist die Verwendung von Benzoylchloroformat in Gegenwart einer Base. Dabei wird als Katalysator DMAP verwendet.¹⁶⁹ Es ist bekannt, dass Aminosäuren in Gegenwart von DMAP racemisieren können. Das hier angewendete Verfahren ist speziell für die Schützung von Aminosäuren entwickelt worden.¹⁷⁰ Dabei wurde jedoch nicht das in dieser Arbeit verwendete Serinderivat getestet (Abb. 3.18).



a) 1 eq Benzoylchloroformat, 1,05 eq NEt₃, 0,1eq DMAP, DCM, 0 °C, 1 h

Abbildung 3.18.: Veresterung des Serinderivats **34** mit Benzylchloroformat

Der so erhaltene Benzylester war laut DC und HPLC-Analyse rein. Um sicherzustellen, dass bei dieser Reaktion trotz des Einsatzes von DMAP keine Racemisierung auftrat, wurde das Aminosäurerivat mittels chiraler HPLC untersucht. Der Enantiomerenüberschuss der so hergestellten Serinderivats **53** betrug nur noch 97%. Neben Histidin und Cystein ist Serin eine der Aminosäuren, die am leichtesten racemisieren. Dies dürfte der Grund für die in diesem Experiment beobachtete, teilweise Racemisierung sein.

Nucleophile Substitution am Benzylester mit 1-Methylimidazol Am als Benzylester geschützten Serinderivat **53** wurde anschließend die nucleophile Substitution mit 1-Methylimidazol durchgeführt (Reaktion g in Abbildung 3.3). Dabei wurde das gewünschte, mit einem ionischen *Tag* versehene, Serinderivat erhalten. Bei 75 °C wurde mit 1-Methylimidazol nach drei Tagen noch kein vollständiger Umsatz beobachtet. Auch mit 1,2-Dimethylimidazol (DMIM), einem stärkeren Nucleophil, war der Umsatz nach dieser Zeit noch nicht vollständig. Die Ausbeuten waren dementsprechend mit 39% und 37% auch gering (Abb. 3.19).

In Acetonitril unter Rückfluss erhielt man mit dem mehrfach geladenen *Tag* **15** ((3+)) einen höheren Umsatz. Unter diesen Bedingungen wurde allerdings wieder die Dimerisierung als Nebenreaktion beobachtet, d.h. der Benzylester war unter die-

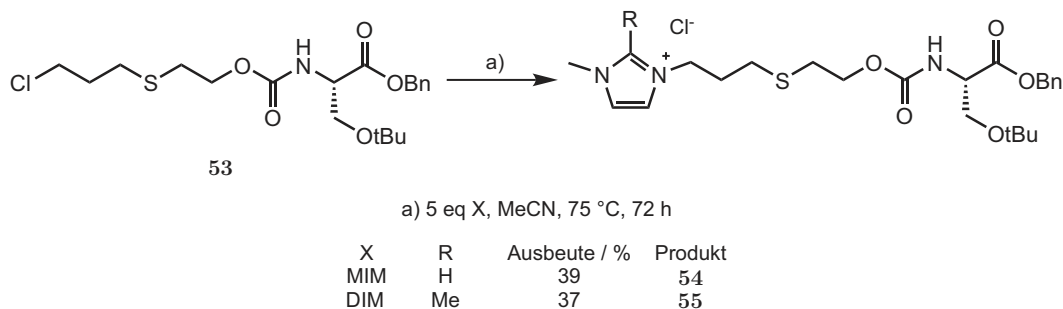


Abbildung 3.19.: Ergebnisse der nucleophilen Substitution am Benzylester unter milden Bedingungen

sen Bedingungen nicht stabil.

Mechanistische Betrachtungen zur Esterspaltung

Esterspaltungen können im sauren oder basischen Milieu durch Hydrolyse erfolgen (Route A in Abbildung 3.20). Unter den hier vorliegenden basischen Bedingungen würde je 1 eq 1-Methylimidazol und 1 eq Wasser für die Verseifung eines Estermolekül benötigt. Da es sich bei der Base auch um das in der Reaktion eingesetzte Nucleophil handelt, konnte dessen Anteil nicht reduziert werden. Um die mögliche Verseifung auszuschließen wurde die Reaktion von Anfang an unter möglichst wasserfreien Bedingungen durchgeführt. Dazu gehörte auch, dass die eingesetzten Chemikalien getrocknet wurden. Das 1-Methylimidazol wurde frisch über Natriumhydroxid destilliert. Die Reaktion wurde unter Argon als Schutzgas durchgeführt. Durch ein Experiment unter anspruchsvolleren Bedingungen wurde ein Hinweis auf den möglichen Ablauf der Esterspaltung erhalten. Bei Durchführung der Reaktion in einem Mikrowellenreaktors wurde bei 170 °C nach 10 min Reaktionsdauer eine Zunahme der Nebenreaktion beobachtet.^{111,171} Für die **Hydrolyse** des Esters würden stöchiometrische Mengen Wasser benötigt. Nachdem die Edukte wie oben beschrieben sorgfältig getrocknet wurden, erschien es zweifelhaft, dass noch immer solch große Mengen Wasser vorhanden waren.

Ester können auch durch einen anderen Mechanismus gespalten werden.^{172,173} Dabei greift das Nucleophil am α -Kohlenstoffatom des Esteralkohols an. Dabei wird wiederum ein Carboxylation gebildet. Dieses ist, wie schon durch die Experimente mit der freien Säure in Route 1 gezeigt wurde, in der Lage, mit einem Eduktmolekül zum Dimer zu reagieren. Die Spaltung durch Nucleophile wird, katalysiert durch Palladium, zur milden Spaltung von Allylestern eingesetzt. Weit weniger bekannt ist, dass Spaltungen nach diesem Mechanismus auch mit Benzyl- und Methylestern auftreten können. Diese Möglichkeit wird in Abbildung 3.20 als Route B bezeichnet.

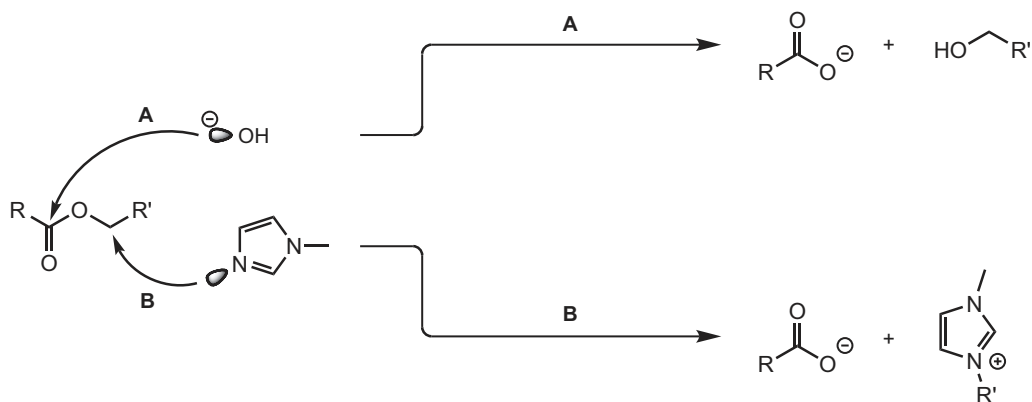


Abbildung 3.20.: Die zwei alternativen Routen zur Spaltung des Esters

Bei Esterspaltungen durch nucleophile Substitution entstehen neben dem Carboxylat auch stöchiometrische Mengen einer ionischen Verbindung. Bei Verwendung von 1-Methylimidazol als Nucleophil bildet sich im Fall von Benzylestern das 1-Benzyl-3-methylimidazoliumkation (das Gegenion ist das schon erwähnte Carboxylat). Der erfolgreiche Nachweis der entsprechenden ionischen Verbindung beim Auftreten einer Esterspaltung ist ein Hinweis auf diesen Mechanismus. Um zu testen, ob unter diesen Bedingungen eine Reaktion entsprechend Route B wirklich möglich ist, wurde eine Modellreaktion durchgeführt. Als Ester wurden Essigsäurebenzylester und Essigsäuremethylester eingesetzt. Diese sind im Gegensatz zum Serinderivat **53** (Cl-*B_{red}*-Ser(tBu)-OBn) kommerziell erhältlich. Als Nucleophil wurde 1,2-Dimethylimidazol verwendet.

Nach 10 Minuten bei 170 °C konnte das 1-Benzyl-2,3-dimethylimidazoliumkation mittels ESI nachgewiesen werden. Damit erscheint es wahrscheinlich, dass die unerwünschte Nebenreaktion auf einer Esterspaltung entsprechend Route B in Abbildung 3.20 beruht, welche unter diesen Bedingungen nicht vermieden werden kann.

Oxidation des Thioethers in den Serinderivaten 54 und 55 Der Versuch, den Benzylester **54** mit Palladium auf Aktivkohle und Wasserstoff zu spalten, war nicht erfolgreich. Vermutlich wird der Palladiumkatalysator durch den Thioether in **54** deaktiviert. Deswegen wurden die vollständig geschützte Serinderivat **54** und **55**, ähnlich wie das Serinderivat mit freier Carbonsäure **42** (MIM-*B_{red}*-Ser(tBu)-OH), zuerst mit Wasserstoffperoxid zum Sulfon oxidiert. Die dabei erhaltenen Ausbeuten waren gut (Abb. 3.21).

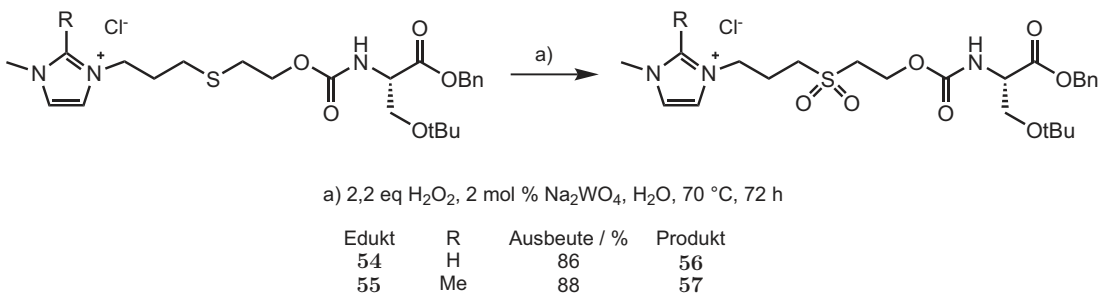


Abbildung 3.21.: Oxidation des Thioethers in den Serinderivaten **54** und **55** mit Wasserstoffperoxid

Abspalten des Benzylesters aus den vollständig geschützten Serinderivaten **56 und **57**** Um aus dem vollständig geschützten Serinderivat **56** das gewünschte Serinderivat mit freier Carbonsäure **51** zu erhalten, muss der C-Terminus entschützt werden. Eine sehr milde Variante ist die Hydrogenolyse mit Wasserstoff in Gegenwart von Palladium auf Aktivkohle. Dabei entsteht neben dem gewünschten Aminosäurederivat mit freier Carbonsäure als Nebenprodukt nur Toluol. Die Reaktion war für beide einfach geladene Derivate erfolgreich (Abb. 3.22).

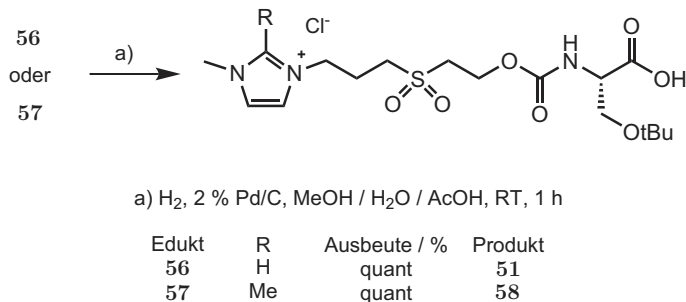


Abbildung 3.22.: Spaltung der Benzylester **56** und **57** durch Hydrogenolyse

Route 2 unter Verwendung von Benzylestern stellt eine weitere Möglichkeit, zu dem geschützten Aminosäurederivat **51** (MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-OH) zu gelangen, dar. Die unerwünschte Bildung des dimeren Aminosäurederivats konnte mit diesem Weg nicht vermieden werden, wenn ein hoher Umsatz angestrebt wurde. Jedoch konnte mit diesem System die Verwendung der FPE zum Abtrennen des Dimers etabliert werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse konnten auf andere Substanzen übertragen werden, worin der besondere Wert dieses Ansatzes liegt.

3.2.3.2. Verwendung des Methylesters

Eine Alternative zum Benzylester ist die Verwendung des Methylesters. Diese Route hat den großen Vorteil, dass die Methylester der Aminosäuren mit den gewünschten Seitenkettenschutzgruppen kommerziell verfügbar sind.

Kupplung des aktivierten Linkers an H-Ser(tBu)-OMe Im ersten Schritt dieser Route wird der Linker **3** (Cl-*B_{red}*-OH) mit Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat aktiviert (Abb. 3.4) und an den Methylester der Aminosäure gekuppelt (Abb. 3.23).

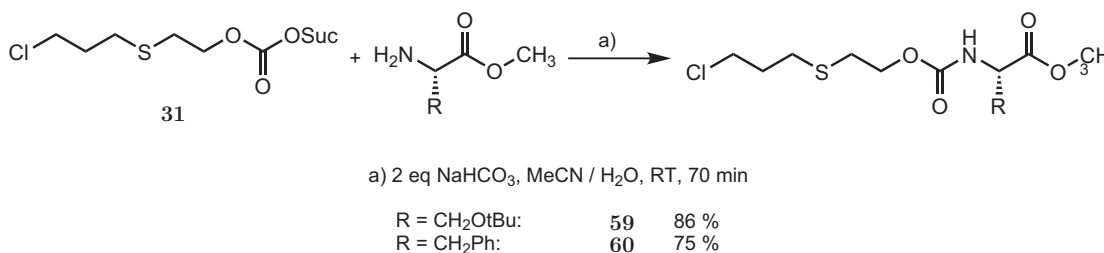


Abbildung 3.23.: Synthese der Methylester **59** und **60**

Nach der chromatographischen Reinigung der Produkte würde die nucleophile Substitution des Chlors mit 1-Methylimidazol zu den ionischen Aminosäurederivaten folgen. Wie im vorangehenden Abschnitt dargestellt, ist unter milden Reaktionsbedingungen der Umsatz zu gering ist. Unter harscheren Bedingungen kann der Methylester, analog zum Benzylester, gespalten werden. Daraus resultiert die Bildung des unerwünschten dimeren Aminosäurederivats auch bei Verwendung von Methyl- und Benzylestern als Schutzgruppe. Daher wurde die nucleophile Substitution mit 1-Methylimidazol an den Methylestern der Aminosäurederivate **59** und **60** nicht durchgeführt.

3.2.4. Route 3: Kupplung der ionischen, nichtoxidierten Schutzgruppe an Aminosäuren

Eine Alternative zur nucleophilen Substitution zur Einführung des ionischen *Tags* am Aminosäurederivat bietet die Route 3 in Abbildung 3.3. In diesem Fall wird erst der Linker mit dem *Tag* verknüpft und dieses ionische Produkt dann mit Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat aktiviert und an die freie oder C-terminal geschützte

Aminosäure gekuppelt. Anschließend erfolgt die Oxidation und eventuell die Spaltung des Esters.

Route 3 hat den Vorteil, dass die geladene Gruppe in Abwesenheit der Aminosäure an den Linker gekuppelt wird. Dadurch kann sowohl die Dimerisierung als auch die Racemisierung vollständig vermieden werden. Bei Verwendung der Aminosäurederivate mit freier Carbonsäurefunktion fallen auch die Schritte für die Veresterung und das Abspalten der C-terminalen Schutzgruppe weg.

Dieser Ansatz stellt den Übergang zum *Tag*-Ansatz dar. Erst durch die Entwicklung der FPE war es möglich, entsprechend Route 3 vorzugehen. Davor war die Abtrennung des Linkers mit dem geladenen *Tag* vom gewünschten geschützten ionischen Aminosäurederivat nicht möglich.

Kupplung des *Tags* an den nichtoxidierten Linker Der erste Schritt in Route 3 war die Kupplung des *Tags* an den Linker. Diese S_N2 -Reaktion konnte unter ähnlichen Bedingungen wie in den vorangegangenen Routen durchgeführt werden (Absch. 2.4 auf Seite 55). Jedoch ergab die Synthese im Mikrowellenreaktor in kürzerer Zeit ein saubereres Produkt. Für Vergleichszwecke wurde der Linker mit verschiedenen, einfach geladenen *Tags* verknüpft (Abb. 3.24).

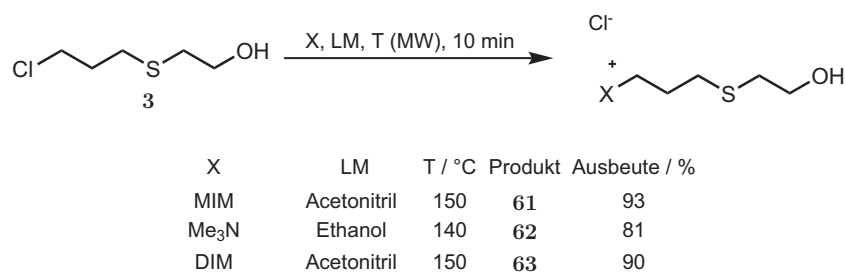


Abbildung 3.24.: Synthese der mit einem einfach geladenen *Tag* versehenen Linker **61**, **62** und **63**

Aktivierung des mit ionischen *Tag* versehenen Linkers und Kupplung an H-Ser(tBu)-OH Die einfach positiv geladenen Derivate des Linkers **61**, **62** und **63** sind, genauso wie die mit Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat aktivierten Derivate, nicht basenlabil. Der Schwefel befindet sich noch in der Oxidationsstufe -II, eine β -Eliminierung ist daher nicht möglich. Die Bedingungen und Ergebnisse der Kupplung an die freie Aminosäure sind in Abbildung 3.25 dargestellt. Die geschützten Serinderivate **65** und **66** wurden jeweils nur einmal hergestellt. Das Serinderivat **64**

wurde insgesamt viermal hergestellt, dabei wurde die Ausbeute von 42% auf 73% gesteigert. Es ist wahrscheinlich, dass die Ausbeute der geschützten Serinderivate **65** und **66** durch Optimierung der Reaktionsbedingungen und der Aufarbeitung erhöht werden könnte.

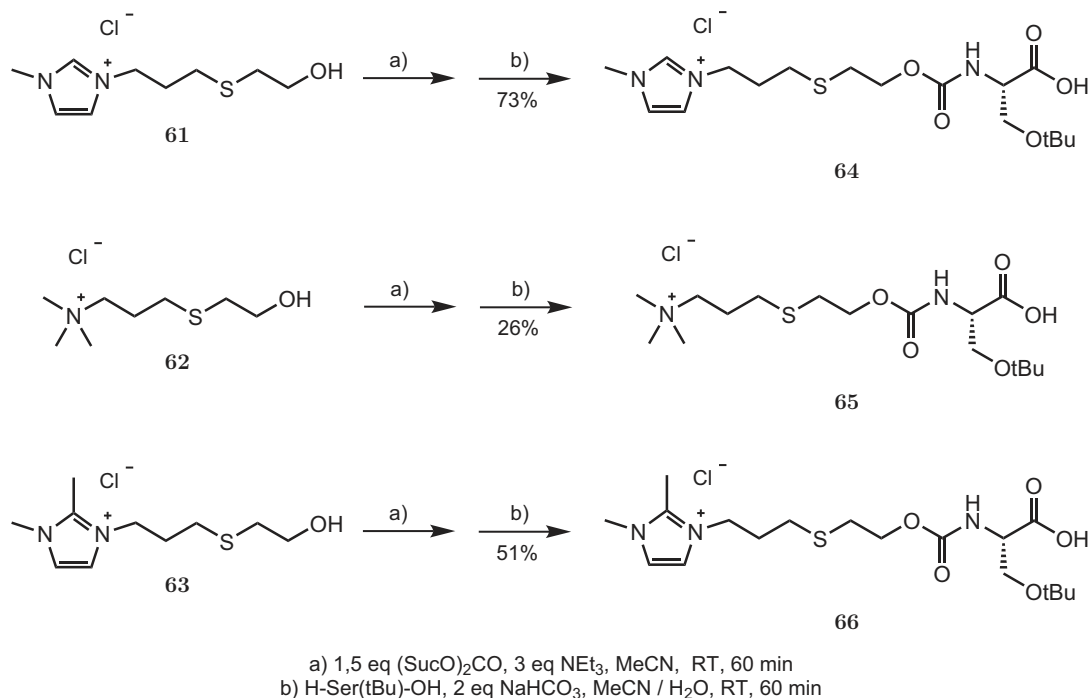
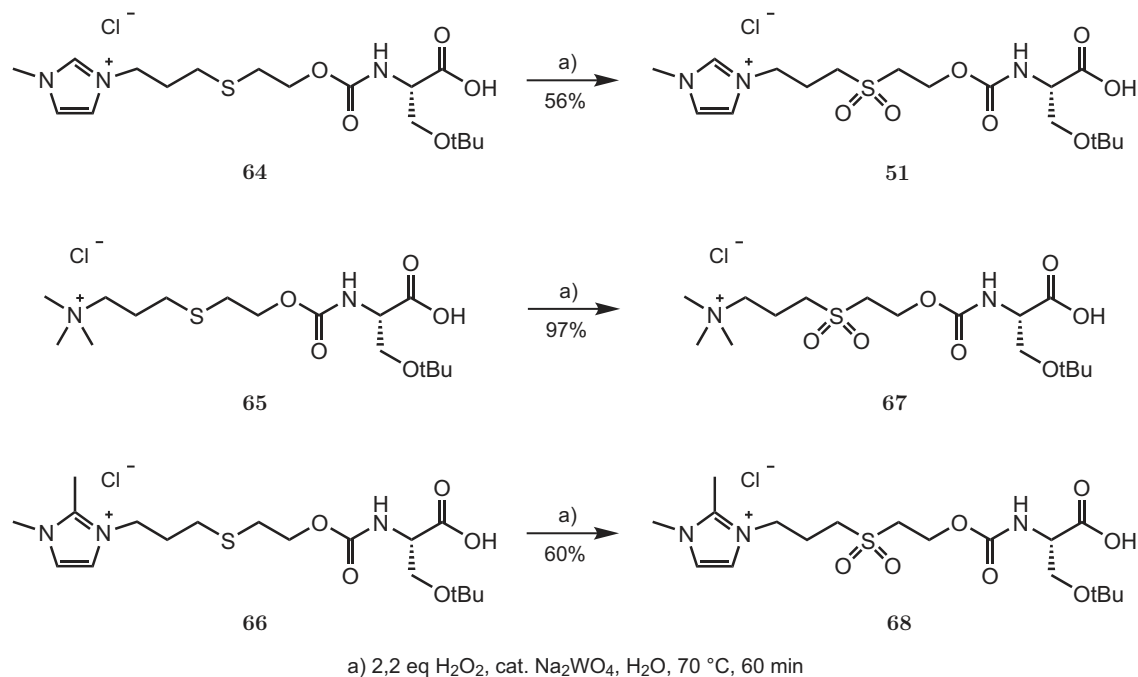


Abbildung 3.25.: Synthese der mit einer einfach geladenen Schutzgruppe geschützten Serinderivate **64**, **65** und **66**

Oxidation des Thioethers in den Serinderivaten 64, 65 und 66 zum Sulfon Der Thioether aller drei Serinderivate wurden mit Wasserstoffperoxid zum Sulfon oxidiert. In diesem Fall wurde aber, um Decarboxylierungsreaktionen zu vermeiden, das überschüssige Wasserstoffperoxid nicht zersetzt. Stattdessen wurde es durch Absorption der Aminosäurederivate an einer FPE-Kartusche und eluieren des Wasserstoffperoxids mit destilliertem Wasser abgetrennt. Diese Methode war sehr schonend, und es konnte kein Hinweis auf eine Decarboxylierung des Produkts gefunden werden. Dies ist also ein weiterer möglicher Weg, um zu dem mit einer ionischen Schutzgruppe versehenen Serinderivat **51** (MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-OH) zu gelangen.

Abbildung 3.26.: Synthese der geschützten Serinderivate **51**, **67** und **68**

3.2.4.1. Herstellung dreifach geladener Schutzgruppen

Dazu musste erst der *Tag* **15** ((3+)) mit dem Linker verbunden werden. Versuche analog zu der in Abbildung 3.24 gezeigten Reaktion gaben mit dem dreifach geladenen *Tag* **15** ((3+)) anschließender Aktivierung und Kupplung an H-Ser(tBu)-OMe nur eine geringe Ausbeute von 15%. Da angenommen wurde, dass der Umsatz der nucleophilen Substitution den limitierenden Faktor darstellte, wurde versucht, diesen Schritt zu optimieren.

Optimierung der nucleophilen Substitution durch Einsatz des Iodderivats Eine Alternative zu obigem Vorgehen ist die Verwendung des Iod- anstelle des Chlorderivats des Linkers. Dieses sollte eine deutlich höhere Reaktivität als **3** zeigen. Die Synthese des Iodderivats ausgehend von **3** gelang mit guten Ausbeuten (Abb. 3.27).

Jedoch konnte das Produkt weder destilliert noch längere Zeit gelagert werden, da das Iodderivat des Linkers (**69**) instabil ist. Das Produkt der Zersetzung konnte nicht identifiziert werden, in wässrigen Extrakten des schwerlöslichen Materials wurden durch Fällung mit salpetersaurer Silbernitratlösung Iodid-Ionen nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass unter diesen Bedingungen das Schwefelatom des

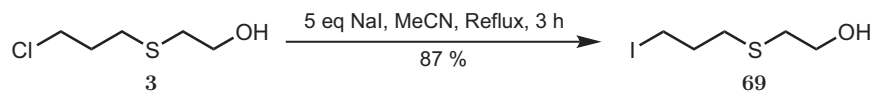


Abbildung 3.27.: Synthese von des Iodderivat des Linkers (**69** durch Finkelsteinreaktion

Thioethers in der Lage, ist nucleophil am Iod anzugreifen. Da das Produkt der Zersetzung schwer löslich war, konnte es nicht mit NMR oder MS analysiert werden, um diese Möglichkeit zu verifizieren.

Wenn das Iodderivat des Linkers (**69**) direkt in einer S_N2 Reaktion mit dem dreifach geladenen *Tag* **15** ((3+)) umgesetzt wurde, konnte der mit einem dreifach geladenem *Tag* versehene Linker **70** · I⁻ ((3+)-*B_{red}*-OH) in quantitativer Ausbeute erhalten werden (Abbildung 3.28).

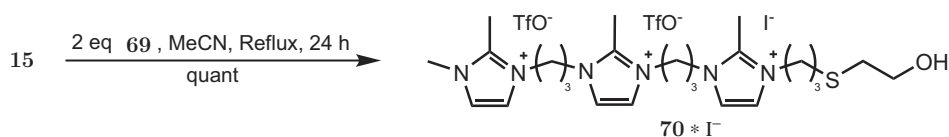
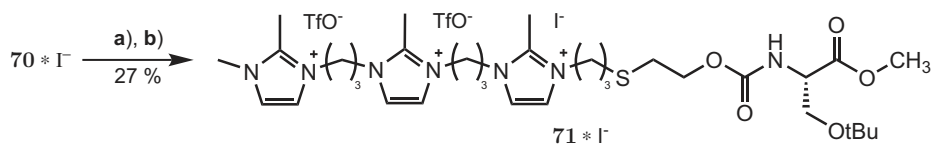


Abbildung 3.28.: Verknüpfung von **15** ((3+)) mit dem Linker **69**

Der mit dem dreifach geladenem *Tag* versehene Linker konnte mit Di-*N*-hydroxy-succinimidcarbonat aktiviert und mit H-Ser(tBu)-OMe zum vollständig geschützten Serinderivat **71** ((3+)-*B_{red}*-Ser(tBu)-OMe) umgesetzt werden. Die Ausbeute wurde dadurch auf 27% erhöht (Abb. 3.31).



- a) 1,5 eq (SucO)₂CO, 3 eq NEt₃, MeCN, RT, 1 h
b) 1 eq H-Ser(tBu)-OMe, 2 eq NaHCO₃, H₂O / MeCN, RT, 1 h

Abbildung 3.29.: Verknüpfung der dreifach geladenen Schutzgruppe **70**·I⁻ an H-Ser(tBu)-OMe

Erhöhung der Löslichkeit in Acetonitril durch Anionenaustausch Da der Linker mit dem dreifach geladenen *Tag* **70**·I⁻ in dem zur Aktivierung verwendeten

Lösungsmittel Acetonitril nur wenig löslich war, wurde versucht, seine Löslichkeit zu erhöhen. Eine Möglichkeit dazu ist der Austausch des Iodids gegen das Triflat-Anion (Abb. 3.30).

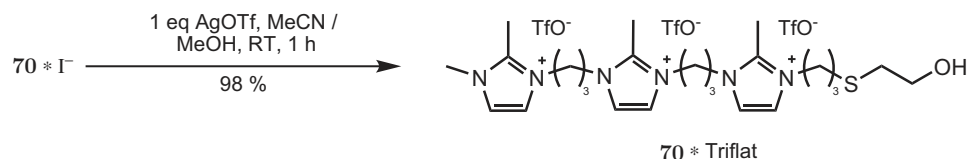
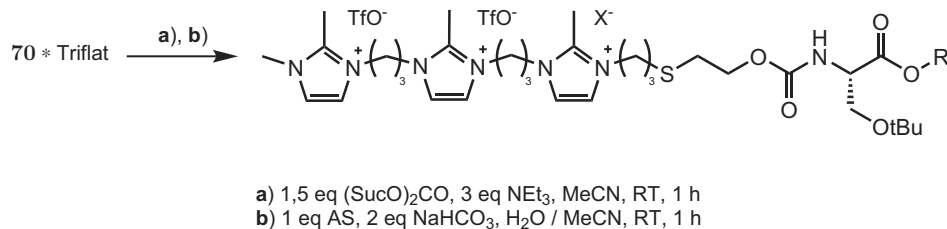


Abbildung 3.30.: Austausch des Iodids gegen Triflat in (3+)- B_{red} -OH

Nach Austausch des Iodids war die Löslichkeit in Acetonitril deutlich höher, die Ausbeute konnte jedoch dadurch nicht verbessert werden. Bei diesem Experiment zeigte sich, dass der Linker mit dem dreifach geladenen *Tag* ($70 \cdot \text{TfO}^-$) auch direkt an H-Ser(tBu)-OH gekuppelt werden kann. Die Ausbeute war in diesem Fall sogar geringfügig größer als mit dem Methylester.



AS	X	R	Produkt	Ausbeute
H-Ser(tBu)OMe	TfO ⁻	Me	71 * Triflat	19 %
H-Ser(tBu)OH	TfO ⁻	H	73 * Triflat	22 %

Abbildung 3.31.: Verknüpfung der dreifach geladenen Schutzgruppe $70 \cdot \text{TfO}^-$ an H-Ser(tBu)-OX

Der Austausch des Iodids gegen Triflat erhöht tatsächlich die Löslichkeit des Linkers mit dreifach geladenen *Tag* in Acetonitril. Leider gelang es aber dadurch nicht, die Ausbeute für die Kupplung der Schutzgruppe an die Aminosäure zu erhöhen.

Schrittweiser Aufbau des Linkers ausgehend vom mehrfach geladenen *Tag*

Eine Alternative zur Kupplung des dreifach geladenen *Tags* an ein reaktiveres Derivat des Linkers ist der stufenweise Aufbau des Linker ausgehend vom dreifach geladenen *Tag*. Der erste Schritt entspricht, ausgehend vom dreifach geladenen *Tag*

15, der in der Literatur bekannten Route zu einem vierfach geladenen *Tag*.⁴⁹ Mit dem dreifach geladenem *Tag* **15** ((3+)) wurde zuerst Verbindung **72** hergestellt. Anschließend wurde durch eine S_N2-Reaktion mit Mercaptoethanol der mit dem dreifach geladenen *Tag* gekuppelte Linker **70**·Br⁻ ((3+)-B_{red}-OH) erhalten (Abb. 3.32).

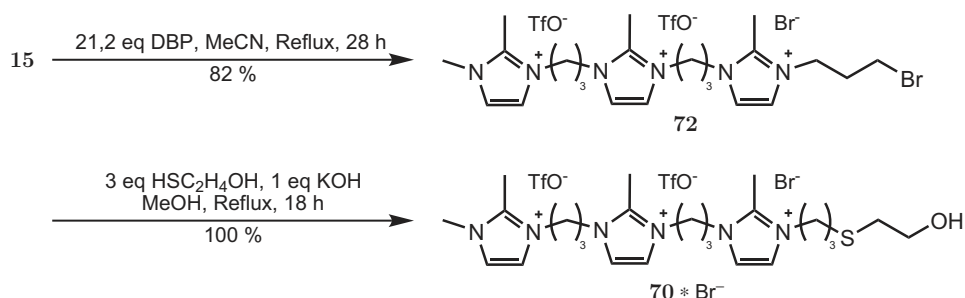


Abbildung 3.32.: Herstellung des mit dem dreifach geladenen *Tag* gekuppelten Linkers **70**·Br⁻ durch stufenweisen Aufbau, ausgehend von **15** ((3+))

Der mit dem dreifach geladenen *Tag* verbundene Linker konnte mit Di-*N*-hydroxy-succinimidcarbonat aktiviert und an das Serinderivat H-Ser(tBu)-OMe mit einer Ausbeute von 43% gekuppelt werden. Diese Variante brachte eine fast dreifach höhere Ausbeute als der ursprüngliche direkte Weg zur dreifach geladenen Schutzgruppe. Die Löslichkeit von **70**·Br⁻ in Acetonitril war, verglichen mit **70**·I⁻, deutlich höher.

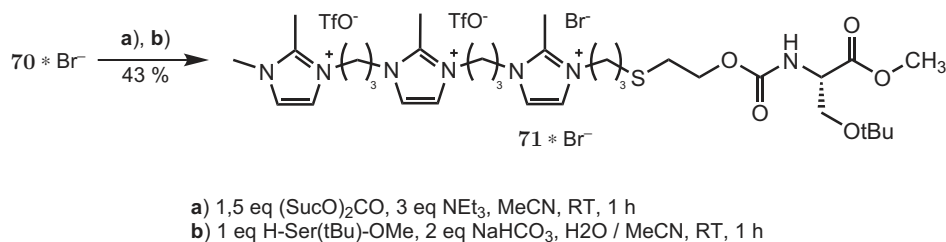


Abbildung 3.33.: Kupplung des Linkers mit dreifach geladenem *Tag* **70**·Br⁻ an H-Ser(tBu)-OMe

Da der oxidierte Linker unter basischen Bedingungen nicht stabil ist, musste der Methylester vor der Oxidation abgespalten werden. Die Verseifung erfolgte mit wässriger Natronlauge. Diese Reaktion war mit den Methylestern **71**·I⁻ ((3+)-B_{red}-Ser(tBu)-OMe) und **71**·Br⁻ erfolgreich (Abb. 3.34).

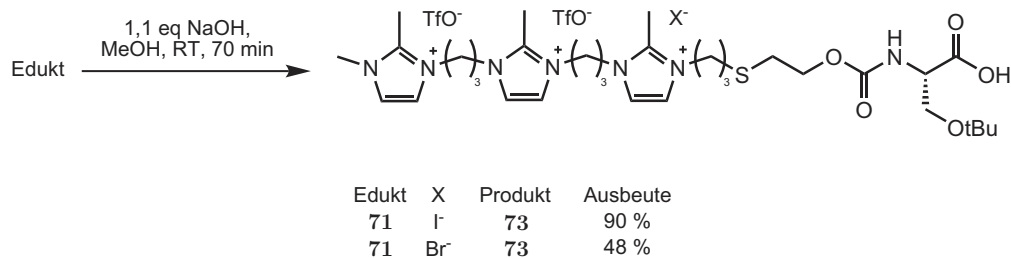


Abbildung 3.34.: Verseifung der Methyl ester **71**·I⁻ und **71**·Br⁻

Oxidation des Linkers Die Oxidation des Thioethers wurde, wie schon bei Route 1 (Absch. 3.2.2.5) mit der C-terminal freien Aminosäure besprochen, durchgeführt. Dabei trat auch in diesem Fall die Decarboxylierung als Nebenreaktion auf. Bei den mit dem dreifach geladenen *Tag* versehenen Aminosäurederivaten **73**·Triflat⁻ ((3+)-B_{red}-Ser(tBu)-OH), **73**·I⁻ und **73**·Br⁻ betrug die Decarboxylierung je nach den Bedingungen bis zu 100%. Da in der Zwischenzeit deutlich bessere Methoden für die Herstellung von dreifach geladenen Aminosäurederivaten bzw. zur Kupplung des *Tags* an Peptide entwickelt wurden (Kapitel 2 auf Seite 45), ist die Oxidationsreaktion mit den Verbindungen **73**·Triflat⁻ ((3+)-B_{red}-Ser(tBu)-OH), **73**·I⁻ und **73**·Br⁻ nicht optimiert worden.

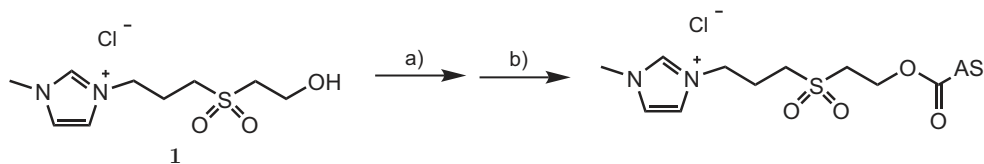
3.2.5. Route 4: Verwendung des *Tag*-Ansatzes zur Synthese geschützter Aminosäuren

3.2.5.1. Synthese der Aminosäurederivate

In Abbildung 3.3 ist mit der Route 4 ein sehr direkter Zugang zu den geschützten Aminosäurederivaten skizziert. Dieser Weg ist aufgrund seiner Einfachheit sehr interessant. Er entspricht im Prinzip dem *Tag*-Ansatz zur Erhöhung der Löslichkeit von Peptiden. Der einzige Unterschied ist, dass in diesem Fall die fertige und aktivierte Schutzgruppe statt an ein Peptid an eine Aminosäure gekuppelt wird.

Es ist notwendig eine Balance zwischen der Reaktivität des aktivierten Carbonats und der Stärke der eingesetzten Base zu finden. Dieses Problem und seine Lösung wurde schon in Abschnitt 2.5 diskutiert, die dort gezogenen Schlüsse und erzielten Ergebnisse sind auch hier gültig.

Nachdem die richtige Kombination von Base und Aktivierungsreagenz gefunden war, konnte diese Reaktion zur Herstellung der einfach geladenen Aminosäurederivate **51**, **74**, **75**, **76** und **25** verwendet werden.



a) 1,5 eq (Suco)₂CO, 3 eq Pyridin, MeCN, RT, 1 h
 b) 1 eq AS, 1,3 eq NaHCO₃, MeCN / H₂O, RT, 1 h

AS	Produkt	Ausbeute
H-Ser(tBu)-OH	51	63 %
H-Leu-OH	74	31 %
H-Pro-OH	75	34 %
H-Phe-OH	76	50 %
H-Tyr(tBu)-OH	25	27 %

Abbildung 3.35.: Direkte Kupplung von **1** an verschiedene Aminosäurederivate

Die Ausbeute an **51** betrug am Anfang nur 24% (das gleiche Verfahren wurde bei der Synthese der Aminosäurederivate **74**, **75** und **25** angewendet). Durch Optimierungsversuche konnte herausgefunden werden, dass das Edukt **1** noch zuviel Wasser enthielt. Wurde das Edukt vor der Reaktion durch Lyophilisieren getrocknet, so konnten deutlich höhere Ausbeuten erhalten werden. Diese modifizierte Variante wurde dann bei der Synthese von **76** angewendet. Dadurch wurde in diesem Fall eine Ausbeute von 50% erzielt (Abb. 3.35).

3.2.5.2. Isolierung der Aminosäurederivate

Bei der Reaktion der aktivierten Schutzgruppe mit der Aminosäure ergibt sich nach der Reaktion ein Gemisch aus der Schutzgruppe, der aktivierten Schutzgruppe, dem Zersetzungsprodukt der aktivierten Schutzgruppe unter basischen Bedingungen, der nicht umgesetzten Aminosäure und dem geschützten Aminosäurederivat (Abb. 3.36).

Die Reinigung des Gemisches ist nicht trivial. Jede der vier Verunreinigungen hat unterschiedliche Auswirkungen. Das bei der Zersetzung der Schutzgruppe entstehende ionische Alken stört nur die Analytik, insbesondere die Untersuchungen mit NMR-Spektroskopie. Dies trifft auch auf die anderen Verunreinigungen zu. Die freie Schutzgruppe könnte darüber hinaus noch je nach Bedingungen der Peptidkupplung mit der eingesetzten Aminosäure zur Bildung von Estern führen. Dadurch würde ein Teil der eingesetzten Aminosäure verbraucht. Die aktivierte Schutzgruppe könnte, je nach Bedingungen der Peptidsynthese, mit dem freien N-terminus des Peptids reagieren. Das ergäbe eine Abbruchsequenz, die nach dem Abspalten vom Harz mittels präparativer HPLC abgetrennt werden müsste. Die im Reaktionsgemisch befindliche Aminosäure könnte bei der Peptidkupplung ebenfalls mit dem freien N-terminus

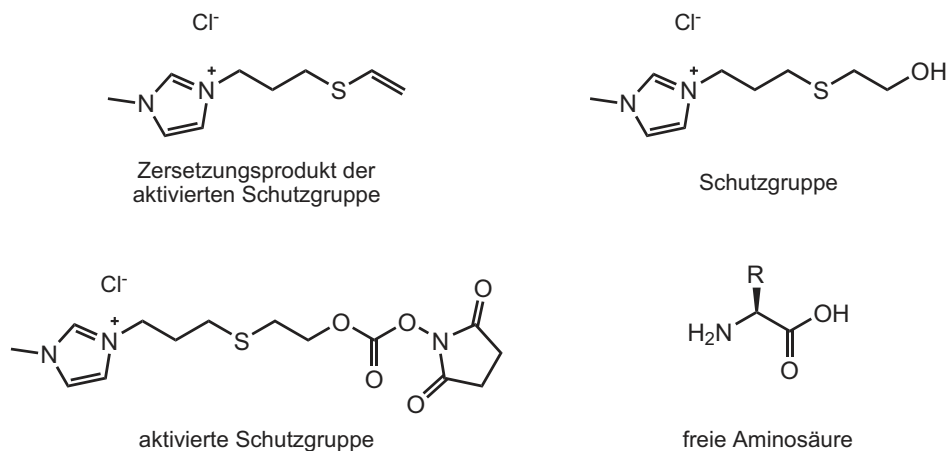


Abbildung 3.36.: Nach der Reaktion möglicherweise noch vorhandene Verunreinigungen

reagieren. Da aber in diesem Fall der N-Terminus der neuen Aminosäure nicht durch eine Schutzgruppe blockiert wäre, könnte es zu weiteren Kupplungen kommen. In Abschnitt 3.2.4 wurde die Verwendung der FPE zur Reinigung von ähnlichen Reaktionsgemischen vorgestellt. Nur wenn die FPE auch für diese Aminosäurederivate geeignet ist, kann die direkte Kupplung der aktivierten Schutzgruppe erfolgreich angewendet werden. Mit verschiedenen Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass die Reinigung mit Hilfe der FPE-MPLC gelingt. Es gibt jedoch auch Fälle, in denen die Reinigung nach dieser Methode nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. Folgende Schwierigkeiten können auftreten:

- Die Retention des geschützten Aminosäurederivats in der FPE ist zu gering. In diesem Fall kann das Aminosäurederivat prinzipiell nicht mit dieser Technik getrennt werden. Der *Tag*-Ansatz ist in diesem Fall ungeeignet. Dies trifft für das Glycinderivat zu.
- Der Unterschied in der Retentionszeit zwischen dem geschützten Aminosäurederivat und den Verunreinigungen ist im Prinzip groß genug. Die Kapazität der FPE-Kartusche ist jedoch klein. Dadurch ist die Reinigung mühsam, da in einem Lauf nur kleine Mengen getrennt werden können. Dies ist für das Prolinderivat der Fall.

3.2.6. Direkte Kontrolle der Stereochemie der Aminosäurederivate

Die in diesem Abschnitt besprochenen ionischen Verbindungen wurden hauptsächlich durch NMR und HPLC-MS Untersuchungen charakterisiert. Diese analytischen

Techniken geben allerdings keine Hinweise auf die Stereochemie der erhaltenen Aminosäurederivate. Zur Bestimmung der Stereochemie können die Röntgenstrukturanalytik, die Circular Dichroismus (CD) Spektroskopie, chirale HPLC und die Bestimmung der optischen Rotation verwendet werden. Das geschützte Serinderivat **51** (MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-OH) wurde mit Hilfe eines CD-Spektrometers untersucht. Der Effekt war aber zu klein, um eine Aussage über die Stereochemie der Aminosäurederivate zu treffen. Für die Bestimmung stereochemische Reinheit wäre in jedem Fall auch ein CD-Spektrum einer Referenzsubstanz mit bekanntem Enantiomerenüberschuss nötig.

Eine weitere Methode um Informationen über die optische Reinheit einer Substanz zu erhalten ist die chirale HPLC. Dabei werden im Allgemeinen chirale stationäre Phasen im Normalphasenmodus verwendet. Die Wechselwirkungen der beiden Enantiomere einer Substanz mit der stationären Phase können sich unterscheiden. In diesem Fall erfolgt eine Trennung der beiden optischen Antipoden. Da die Extinktionskoeffizienten der beiden Enantiomere gleich sind, kann der Enantiomerenüberschuss durch Integration der Peakflächen erhalten werden. Die in diesem Kapitel vorgestellten Substanzen sind fast alle sehr polar. Daher steht zu befürchten das sie irreversibel an die stationäre Phase binden würden. Dadurch könnten sie zum einen nicht mehr detektiert werden. Zum anderen könnten die empfindlichen und teureren chiralen HPLC-Säulen beschädigt werden. Daher wurde nur das nicht ionische Serinderivat **53** (Cl-B_{red}-Ser(tBu)-OBn) mit chiraler Normalphasen-HPLC untersucht.

Bestimmung der Stereochemie mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse Für die Bestimmung der Konfiguration mit Hilfe der Röntgenbeugung sind Einkristalle notwendig. Bei den meisten der hier vorgestellten Aminosäurederivate, welche im Allgemeinen als zähflüssige Öle erhalten wurden, gelang es nicht einen Einkristall von ausreichender Qualität zu züchten. Eine Ausnahme stellt Verbindung **51** dar. Von dieser konnte ein Einkristall erhalten werden, der für die Röntgenstrukturanalyse geeignet war. Die so bestimmte Struktur stimmt mit der erwarteten überein (Abb. 3.37).

Es kann vorkommen, dass enantiomerenreine Kristalle aus einem Racemat oder einer teilweise racemisierten Verbindung erhalten werden. Daher ist diese Kristallstruktur kein eindeutiger Beweis für die stereochemische Reinheit des mit der funktionellen Schutzgruppe verknüpften Aminosäurederivats. Die im nächsten Abschnitt beschriebenen Untersuchung über die Bildung von Epimeren bei der Kupplung die-

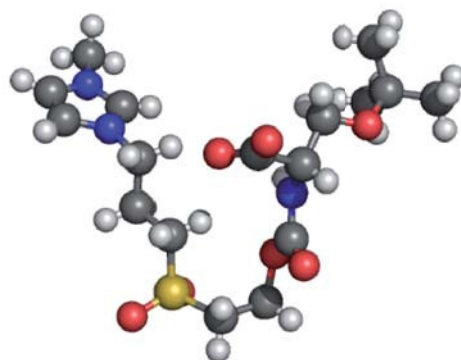


Abbildung 3.37.: Struktur des geschützten Serinderivats **51** (MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-OH) laut Kristallstrukturanalyse

ses und analog hergestellter Aminosäurederivate an ein Peptide bestätigen aber das Ergebnis der Kristallstrukturanalyse.

3.3. Peptidkupplung

Im Abschnitt 3.2 wurde die Synthese geschützter Aminosäurederivate beschrieben. Diese wurden aus verschiedenen Gründen an festphasengebundene Peptide gekuppelt.

3.3.1. Verwendung der mit ionischen *Tags* versehenen Peptide

- Zum einen sollte bewiesen werden, dass die Kupplung von Aminosäurederivate mit ionischen unter den normalen Bedingungen der Festphasenpeptidsynthese möglich ist.
- Die so erhaltenen Peptide können, falls sie sinnvoll entworfen wurden, für die Bestimmung des Einflusses des *Tags* auf die Löslichkeit verwendet werden. Die Verwendung mit ionischen Schutzgruppen geschützter Aminosäurederivate war eine Alternative, falls der *Tag*-Ansatz nicht erfolgreich gewesen wäre.
- Für die meisten der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Verbindungen ist die direkte Bestimmung der Stereochemie nicht möglich. Falls die Kupplung der Aminosäurederivate an chirale Peptide gelingt, ergibt sich eine indirekte Möglichkeit deren optische Reinheit zu überprüfen. Nach der Kupplung, dem Abspalten vom Harz und dem Entfernen der N-terminalen Schutzgruppe erhält man das vollständig entschützte Peptid. Falls die selbst hergestellten Aminosäurederivate während der Synthese oder Kupplung racemisiert sind, erhält man ein Diastereomergemisch. Dieses kann eventuell mit Hilfe der RP-HPLC getrennt werden. Die Integration der UV-Signale ermöglicht dann die Bestimmung der stereochemischen Reinheit der ursprünglich eingesetzten Aminosäurederivate. Ein Nachteil bei diesem indirekten Verfahren ist, dass nur eine Aussage möglich ist, ob ein Teil des Aminosäurederivat racemisiert ist. Die Frage bei welchem Schritt der Synthese dies geschehen ist, kann mit dieser Methode nur schwer beantwortet werden. Dazu wäre es nötig die Synthese unter Konstanthaltung *aller* Parameter, außer dem zu untersuchenden, zu wiederholen. Kann anschließend ein signifikanter Unterschied im Verhältnis der Diastereomere gefunden werden, so kann daraus geschlossen werden, dass es in diesem Schritt zur Racemisierung kam.

Am einfachsten kann mit dieser Technik die Racemisierung während der Kupplung des Aminosäurederivats festgestellt werden. Dazu wird das fertige, geschützte Aminosäurederivat aliquotiert und für die verschiedenen Kupplungsbedingungen jeweils ein Aliquot eingesetzt. Unterschiede in der Konzentration

on der entsprechenden Diastereomere zeigen eine Racemisierung während der Kupplung an.

- Die so hergestellten Peptide eignen sich auch für die Untersuchung der Abspaltung der Schutzgruppe bzw. des *Tags*.

3.3.2. Anforderungen an das Testpeptid

Aus den oben genannten Verwendungszwecken ergeben sich gewisse Anforderungen an das Testpeptid, die eine sorgfältige Planung notwendig machen.

- Die Synthese des Peptids soll einfach sein. Das vom Harz abgespaltene Peptid soll ausreichend rein sein, um eine HPLC-Trennung zu vermeiden.
- Für die Untersuchung mit HPLC-UV ist eine ausreichend hohe UV-Absorption des Peptids notwendig. Besonders vorteilhaft ist es, wenn eine oder mehrere charakteristische Chromophore im Peptid vorkommen, z.B. für Absorption bei 254 nm (Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan) oder für Absorption bei 280 nm (Tryptophan). Dies erleichtert die Identifikation mittels UV. Deutlich wichtiger ist, dass in diesem Fall die Konzentration des Peptids mit unterschiedlichen *Tags* durch die Absorption im UV bestimmt werden kann (falls der *Tag* in diesem Bereich keine Absorption aufweist).
- Die Löslichkeit des Referenzpeptids in wässrigen Lösungsmittelgemischen soll möglichst gering sein. Ist seine Löslichkeit geringer als 5 mg/ml, so stellt es eine *reale* Probe dar. Daher sollten vor allem hydrophobe oder geschützte Aminosäuren verwendet werden (z.B. Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan). Ungeschütztes Histidin, Prolin und Glycin sollten vermieden werden.
- Um die Stereochemie der Aminosäurederivate kontrollieren zu können, müssen die entsprechenden Epimere leicht und schnell getrennt werden können. Diese Untersuchung ist der wichtigste Zweck des Peptids.

3.3.3. Herstellung der Testpeptide

Die Kupplung der Aminosäurederivate erfolgte zuerst an H-Gly-Ala-2-Chlorotriptyl. Die Kupplung war erfolgreich, dass so erhaltene Peptid erfüllte aber einige der Anforderungen nicht. Das System H-Phe-Trp(Boc)-Ala-2-Chlorotriptyl erfüllte hingegen alle Anforderungen. Die Synthese war einfach und das für Testzwecke abgespaltene Peptid zeigte eine Reinheit von >95 % (Abb. 3.38). Es wurde dabei schon mit H-Ala beladenes Harz verwendet.

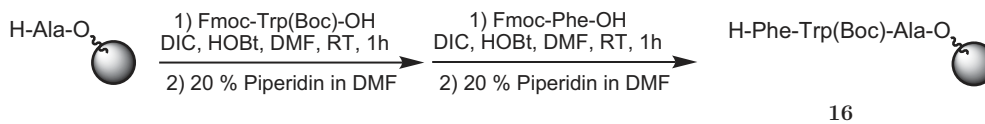


Abbildung 3.38.: Synthese des Peptides H-Phe-Trp(Boc)-Ala- an 2-Chlorotriptylharz

Die beiden Epimere H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH und H-(D)-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH konnten einfach und mit hoher stereochemischer Reinheit hergestellt werden (Abb. 3.39).

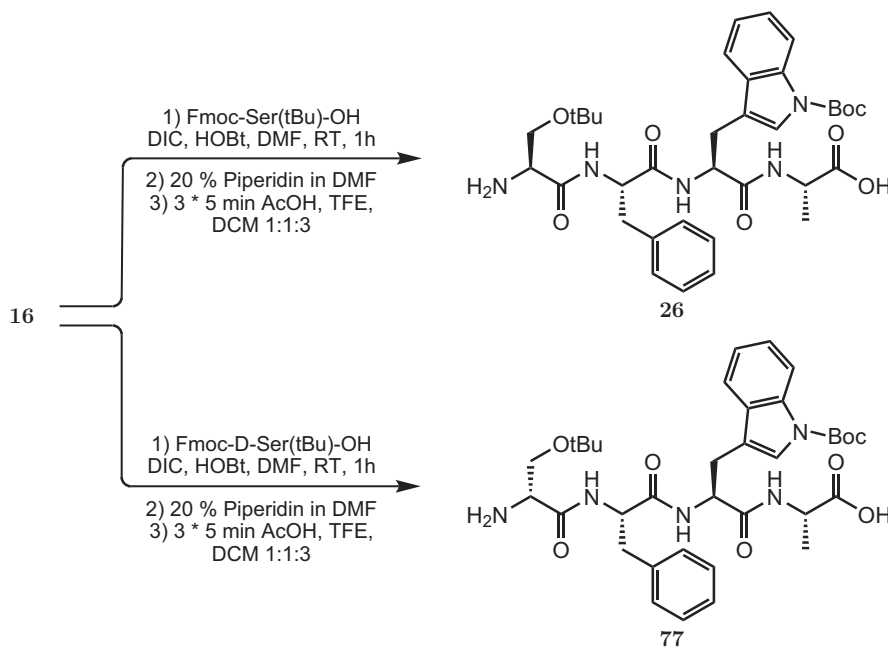


Abbildung 3.39.: Synthese der beiden Epimere H-D/L-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH

Mit einer Reprosil-Pur 100 BASIC-C18 Säule der Dimension $5\mu\text{m}$, 50×3 mm wurde mit einem speziell für die Trennung der Epimere entwickelten Gradienten eine ausreichend gute Separierung erzielt. Die Retentionszeit für **26** betrug 9,7 min, die von **77** betrug 10,2 min. Die Epimere wurde mittels UV und MS detektiert. Insbesondere das **Extracted Ion Chromatogram (EIC)** ist dafür gut geeignet. Dabei wird mit Hilfe der Software gezielt nach MS-Signalen mit vorher festgelegtem m/z gesucht. Dadurch können auch geringste Mengen an Epimer detektiert werden. Weder Verbindung **26** noch **77** waren mit dem jeweils anderen Epimer verunreinigt.

3.3.4. Kupplung von **51** (MIM- B_{ox} -Ser(tBu)-OH), **67** (Me_3N - B_{ox} -Ser(tBu)-OH) und **68** (DMIM- B_{ox} -Ser(tBu)-OH) an das Testpeptid **16** (H-Phe-Trp(Boc)-Ala-)

Die geschützten Serinderivate **51**, **67** und **68** wurden entsprechend Route 3 in Abschnitt 3.2 hergestellt und an das festphasengebundene Peptid **16** gekuppelt. Da Serinderivate relativ leicht racemisieren, wurde die Kupplung mit PyBOP und Collidin durchgeführt.¹⁷¹ Diese Reagenzien werden in der Literatur speziell für die Kupplungen empfindlicher Aminosäurederivate empfohlen.^{11,174} Die Peptide wurden unter milden Bedingungen vollständig geschützt von der festen Phase abgespalten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.40 dargestellt.

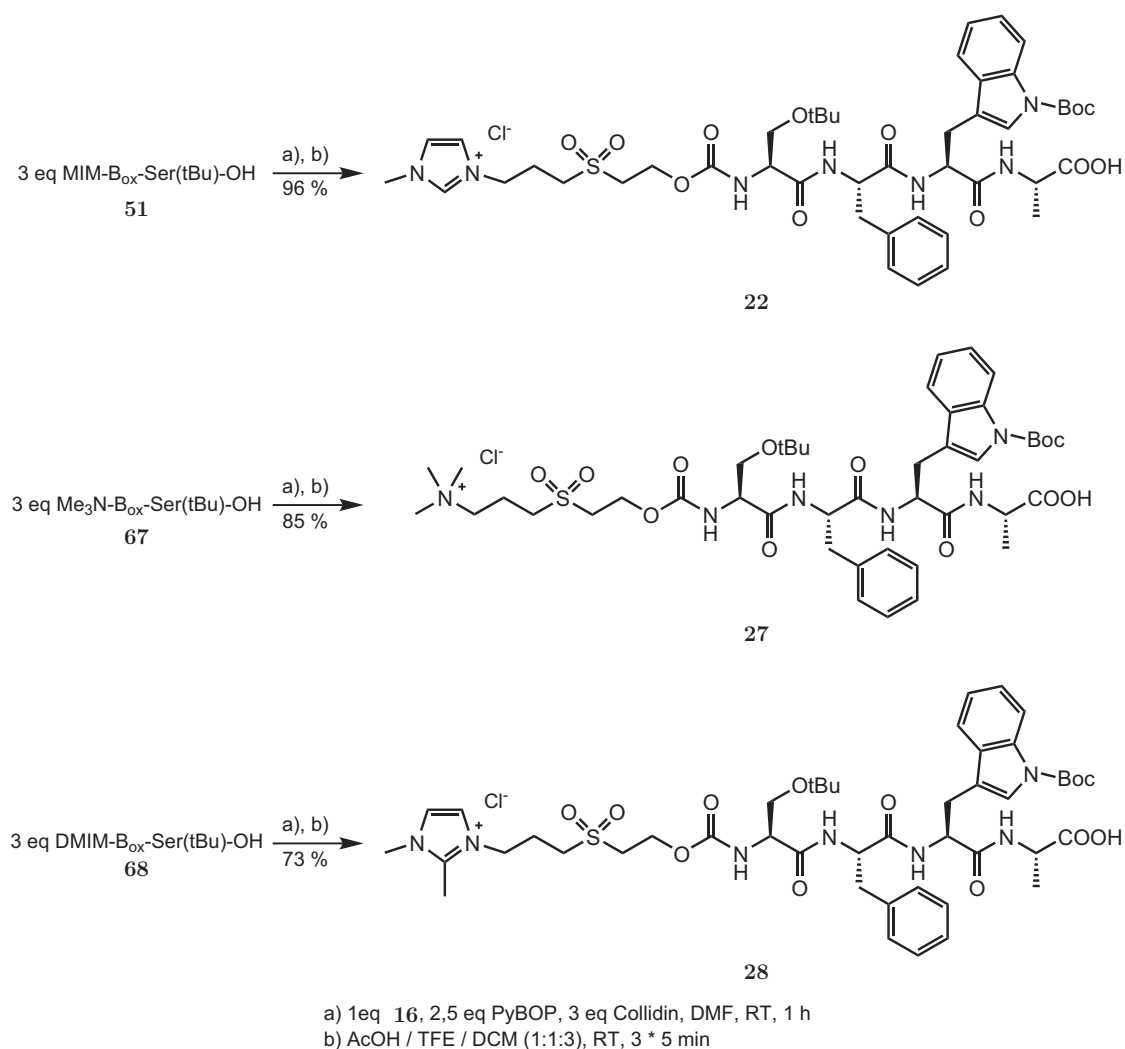


Abbildung 3.40.: Kupplung der Serinderivate **51**, **67** und **68** an das festphasengebundene Peptid **16** (H-Phe-Trp(Boc)-Ala-)

Kontrolle der Stereochemie Je 1 mg der isolierten Peptide **22**, **27** und **28** wurde nach dem Trocknen in einer 2%igen wässrigen Lösung von Piperidin gelöst. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von TFA gequencht, und die erhaltene Lösung mit Hilfe der HPLC untersucht. Unter diesen Bedingungen wurde die Schutzgruppe vollständig abgespalten. Dabei konnte die Anwesenheit des Epimers **77** (H-(D)Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) festgestellt werden. Dies bedeutet, dass entweder die Edukte während der Synthese oder der Kupplung teilweise racemisierten oder an der festen Phase eine Epimerisierung stattfand. Da die Synthese der Serinderivate **51**, **67** und **68** unter sehr milden Bedingungen durchgeführt wurde, erschien es am wahrscheinlichsten, dass die Racemisierung während der Kupplung erfolgte.

Um dies genauer zu untersuchen wurden die geschützten Serinderivate unter Verwendung von DIC an dasselbe festphasengebundene Peptid **16** gekuppelt, zusätzlich wurde HOBt als Additiv zugesetzt. Es ist bekannt, dass HOBt die Racemisierung während der Kupplung unterdrücken oder zumindest verringern kann. Die verwendeten Edukte stammten aus der gleichen Charge wie die für die vorher beschriebenen Experimente verwendeten. Somit wurde sichergestellt, dass nicht Variationen während der Synthese der Edukte **51**, **67** und **68** für eventuelle Abweichungen verantwortlich sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5.: Einfluss der Kupplungsbedingungen auf die Racemisierung der Serinderivate **51** (MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-OH), **67** (Me₃N-B_{ox}-Ser(tBu)-OH) und **68** (DMIM-B_{ox}-Ser(tBu)-OH) während der Kupplung

Edukt	Kupplungsreagenz	Anteil des Epimers 77 in %
51	PyBOP	5,2
51	DIC / HOBt	0
67	PyBOP	0,5
67	DIC / HOBt	0
68	PyBOP	0,7
68	DIC / HOBt	0

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass es nicht während der Synthese oder an der festen Phase zur Racemisierung / Epimerisierung kommt. Dies verdeutlicht, dass hier die Wahl der Kupplungsbedingungen für den Erfolg des Experiments ausschlaggebend ist.^{174,175}

Es kann jedoch noch eine weitere Eigenschaft der mit den ionischen Schutzgruppen geschützten Serinderivate festgestellt werden. Die Serinderivate **51**, **67** und **68**

waren bei der Aktivierung und Kupplung an die feste Phase empfindlicher als das Fmoc-Ser(tBu)-OH Derivat. Offensichtlich trat bei dem Fmoc-Derivat unter Standardbedingungen keine Racemisierung auf, während dies bei den neu hergestellten Serinderivaten **51**, **67** und **68** unter deutlich milderen Bedingungen (schwächere Base und spezielles Kupplungsreagenz) der Fall war.¹⁷⁴ Es ist eine bekannte Tatsache, dass mit verschiedenen Carbamaten geschützte Aminosäuren unter ansonsten gleichen Bedingungen in einem unterschiedlichen Ausmaß racemisieren können.¹⁷⁵

Austausch des Anions während der Kupplung Eine ebenfalls wichtige Feststellung ist, dass während der Kupplung mit PyBOP das Anion ausgetauscht wurde. Die geschützten Serinderivate **51**, **67** und **68** lagen zuerst als Chlorid vor. Das zur Kupplung verwendete PyBOP ist ein Salz mit einem Hexafluorophosphatanion. Nach der Abspaltung vom Harz wurde das Peptid mit Silbernitratlösung auf das Vorhandensein von Chlorid getestet, der Test war eindeutig negativ. Die Untersuchung mit ¹⁹F und ³¹P NMR-Spektroskopie ergab jedoch die Anwesenheit des Hexafluorophosphats. Aus der Untersuchung ionischer Flüssigkeiten ist bekannt, dass dieses Anion die Wasserlöslichkeit stark herabsetzt. Bei der Synthese der entsprechenden Peptide durch Kupplung der Serinderivate **51**, **67** und **68** mit DIC/HOBt an das Tripeptid **16** wurden keine anderen ionischen Verbindungen eingesetzt. Daher war die Möglichkeit des Anionenaustausches nicht gegeben. Mit Silbernitratlösung wurde trotzdem die Anwesenheit von Chlorid überprüft, das Ergebnis war eindeutig positiv. Diese Methoden stellen also einen Zugang zu den Hexafluorophosphaten und den Chloriden der Peptide **22** (MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH), **27** (Me₃N-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) und **28** (DMIM-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) dar.

3.4. Ansätze zur Peptidsynthese in Wasser

Die einfach geladenen *Tags* sind für größere und deutlich schwerer lösliche Peptide vermutlich nicht effizient genug, um die Löslichkeit für die präoperative Reinigung mit RP-HPLC ausreichend zu erhöhen (obwohl sie beim Einsatz am Referenzpeptid **26** zumindest teilweise den Anforderungen entsprachen). Sie können aber für eine andere Anwendung nützlich sein, nämlich dann, wenn die Peptidsynthese in Wasser durchgeführt werden soll. Dafür sind allerdings einige Grundvoraussetzungen notwendig (Absch. 1.3). Als Harze für erste Versuche zur Peptidsynthese in Wasser wurden Rinkamid-PEGA Harz und H-Leu-HMPB-NovaPEG Harz von Novabiochem ausgewählt. Diese Harze sind dafür bekannt, gut in Wasser zu quellen.

3.4.1. Voruntersuchungen des Harzes und der N-terminal geschützten Aminosäurederivate

Bestimmung des Trockengewichts des PEGA Harzes PEGA Harze werden schon in Ethanol vorgequollen ohne Fmoc-Schutzgruppe am Amin geliefert. Die Angabe des Herstellers zur Beladung bezieht sich auf das Trockengewicht des mit Fmoc-Nle-OH beladenen Harzes. Daher wurde zuerst die Masse des gelieferten, gequollenen Harzes mit der Trockenmasse korreliert. Dazu wurde 150 mg des vorgequollenen Harzes je dreimal in Wasser, Methanol, Acetonitril, DMF und abschließend Dichlormethan gewaschen. Das Harz wurde dann 7 Tage getrocknet und die Masse durch Wägen bestimmt. Die Trockenmasse betrug 30 mg.

Test der Aminosäurederivate auf ausreichende Löslichkeit Für die Peptidsynthese in Wasser ist es notwendig, dass die Wasserlöslichkeit der geschützten Aminosäuren ausreichend hoch ist. Die in den vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Peptidsynthesen in DMF oder Dichlormethan wurden mit einer Aminosäurekonzentration von 0,2 - 0,25 M erfolgreich durchgeführt. Eine Konzentration der Aminosäurelösung von 0,2 M wurde als minimal notwendige Konzentration für eine erfolgreich Peptidsynthese festgelegt.

Daher wurde versucht Lösungen der geschützten Aminosäuren mit dieser Konzentration in Wasser herzustellen. Tatsächlich gelang es problemlos Lösungen mit einer Konzentration von 0,2 M der geschützten Aminosäurederivate **52** (MIM-B_{ox}-Gly-OH), **74** (MIM-B_{ox}-Leu-OH), **75** (MIM-B_{ox}-Pro-OH), **76** (MIM-B_{ox}-Phe-OH) und **25** (MIM-B_{ox}-Thy(tBu)-OH) in Wasser herzustellen. Dies zeigt, dass die ionische Schutzgruppe die Wasserlöslichkeit, auch seitenkettengeschützter, Aminosäurederi-

vate ausreichend stark erhöht, um für Peptidsynthese in Wasser eingesetzt werden zu können. Im Gegensatz zu den in der Literatur bekannten Ansätzen ist bei diesen Verbindungen **kein** Zusatz von Detergenzien notwendig.

3.4.2. Prinzipieller Test der Peptidkupplung in Wasser

Um die Peptidkupplung in Wasser grundsätzlich zu testen, wurde als Modellsystem die Kupplung des geschützten Glycinderivats an PEGA und H-Leu-HMPB-NovaPEG Harze untersucht. Es wurden jeweils 30 mg (Trockenmasse) der entsprechenden Harze in Spritzen eingewogen und 15 min mit Wasser vorgequollen. Anschließend wurden Lösungen von **52** (MIM-B_{ox}-Gly-OH), dem wasserlöslichen Carbodiimid EDC und *N*-Hydroxy-5-norbonen-2,3-dicarbonensäureimid (je 5 eq bezogen auf das Harz) in Wasser aufgezogen und für 2 h gekuppelt.³⁶ Danach wurden die Harze je fünf mal mit Wasser, Methanol und DCM gewaschen.

Um zu testen, ob noch freies Amin am Harz vorhanden war, wurde anschließend versucht, Fmoc-Leu-OH in organischen Lösungsmitteln zu kuppeln. Das Produkt dieser Reaktion würde sich leicht mittels HPLC-MS detektieren lassen. Dadurch ist eine indirekte Aussage möglich, ob die Kupplung vollständig oder nur teilweise erfolgte. Nach dieser Reaktion wurden die Proben je fünf mal mit DMF und DCM gewaschen, um sicher alle Edukte und Reagenzien abzutrennen. Anschließend wurden die Harze mit einer 1:1 Mischung aus TFA und DCM behandelt. Die Spalllösungen wurden mit kaltem Diethylether versetzt und abzentrifugiert. Der Rückstand wurde mit Hilfe der HPLC-MS untersucht, dabei wurde gezielt nach Fmoc-Leu-NH (im Fall des PEGA-Harzes) und Fmoc-Leu-Leu-OH (im Fall des PEG-Harzes) gesucht. In beiden Fällen konnte nur das gewünschte Derivat, das heißt Verbindung **78** (MIM-B_{ox}-Gly-NH₂) beziehungsweise **79** (MIM-B_{ox}-Gly-Leu-OH), detektiert werden. Dies belegt, dass es mit dem geschützten Glycinderivat **52** (MIM-B_{ox}-Gly-OH) prinzipiell möglich ist, eine Peptidkupplung in Wasser durchzuführen.

Selbstverständlich sind noch viele Versuche notwendig, um die Anwendbarkeit dieser Methode genauer zu untersuchen. Das Ergebnis des Vorversuchs ist jedoch ermutigend.

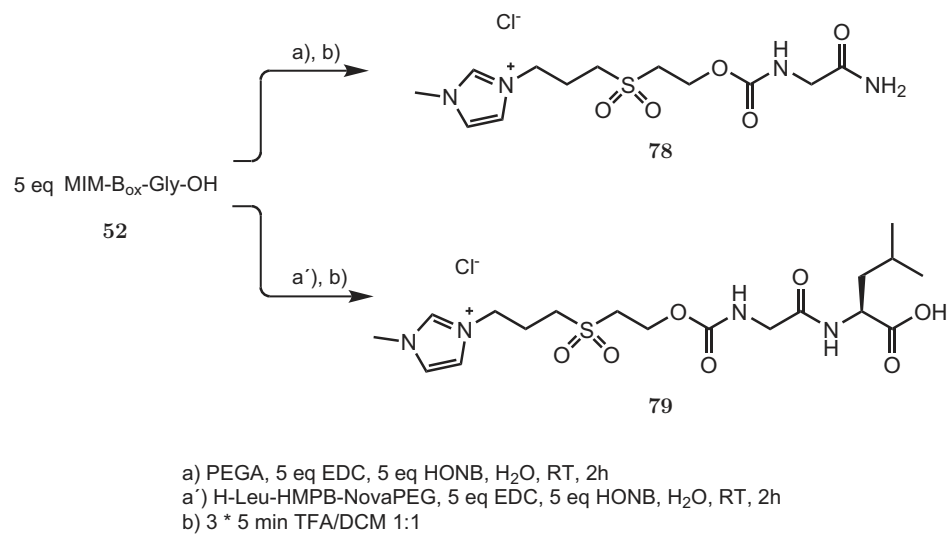


Abbildung 3.41.: Erste Versuche zur Peptidsynthese in Wasser mit dem Aminosäurederivat **52** (MIM-B_{ox}-Gly-OH)

3.5. Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte eine basenlabile, funktionelle Schutzgruppe mit ionischem *Tag* für die α -Aminofunktion von Aminosäuren hergestellt werden. Je nach Aminosäurederivat sind unterschiedliche Methoden zur Synthese entwickelt worden. Glycin kann, da in diesem Fall keine Gefahr der Racemisierung besteht, durch schrittweisen Aufbau der Schutzgruppe an der Aminosäure hergestellt werden. Für andere Aminosäurederivate wurden zwei weitere Methoden entwickelt: die Kupplung der Aminosäure mit dem in der reduzierten Form vorliegenden Linker mit ionischem *Tag* und anschließende Oxidation sowie die direkte Kupplung des an den oxidierten Linker gekoppelten ionischen *Tags* an die Aminosäure. Letztere Variante entspricht dem in Kapitel 2 vorgestellten Ansatz zum Anbringen eines ionischen *Tags* an ein fertiges Peptid. Diese Methode ist schnell und elegant, kann aber bei sehr hydrophilen oder nur gering mit hydrophoben Phasen wechselwirkenden Aminosäuren nicht oder nur beschränkt eingesetzt werden. Dies beruht auf dem zwingend notwendigen Einsatz der FPE für die Reinigung der Produkte.

Während der Synthese traten eine Reihe von unerwarteten Problemen auf. Diese konnten letztlich alle gelöst werden, jedoch war es notwendig Schritt für Schritt jedes Problem zu identifizieren und eine Lösung zu entwickeln. Nicht selten verursachte die Lösung eines Problems ein anderes, welches vorher nicht beobachtet werden konnte.

Die Wasserlöslichkeit der geschützten Aminosäurederivate **52** (MIM- B_{ox} -Gly-OH), **74** (MIM- B_{ox} -Leu-OH), **75** (MIM- B_{ox} -Pro-OH), **76** (MIM- B_{ox} -Phe-OH) und **25** (MIM- B_{ox} -Tyr(tBu)-OH) ist vermutlich ausreichend hoch für die Peptidsynthese in Wasser. Verbindung **52** (MIM- B_{ox} -Gly-OH) konnte in Wasser an zwei verschiedenen Harze gekuppelt werden, der Erfolg wurde mit HPLC-MS nachgewiesen.

Es wurde auch ein schwer lösliches Testpeptid **26** (H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH), entworfen und synthetisiert. An diesem Testpeptid konnten die Kupplungsbedingungen für die neuen Aminosäurederivate optimiert werden. Es gelang, Bedingungen zu finden, unter welchen es während der Kupplung nicht zur Racemisierung kommt. Dies zeigt, dass die Verwendung von ionischen Schutzgruppen eine Alternative zu dem in Kapitel 2 vorgestellten *Tag*-Ansatz darstellt.

Um den Nachweis antreten zu können, dass die Peptidsynthese in Wasser eine Alternative zur Verwendung von organischen Lösungsmitteln ist, müssen noch mehr verschiedene Peptide mit unterschiedlichen Aminosäurederivaten hergestellt werden. Auf dem Weg zu einer ökonomisch und ökologisch günstigeren Peptidsynthese an der festen Phase sind noch viele weitere Probleme zu lösen, wie zum Beispiel die

Entwicklung einer milden Abspalttechnik. Mögliche Lösungen für dieses Problemes könnten der Einsatz von Enzymen oder photochemische Reaktionen sein.

4. Funktionelle Schutzgruppen zur Vermeidung von Aggregation

4.1. Entwurf der säurelabilen Schutzgruppen

In diesem Kapitel werden funktionelle Schutzgruppen für die Seitenketten verschiedener Aminosäuren beschrieben. Der ionische *Tag* soll über einen säurelabilen Linker kovalent mit der funktionellen Gruppe der Seitenkette verbunden sein. Dieser *Tag* soll zwei Vorteile bringen:

1. Er soll die Synthese von Peptiden mit schwierigen Sequenzen erleichtern. Dieser Effekt kann auf zwei verschiedene Arten zustande kommen, abhängig davon welche Ursachen den Schwierigkeiten bei der Synthese zu Grunde liegen.
 - a) Ist die Synthese aufgrund der geringen Löslichkeit der wachsenden Peptidketten schwierig, so kann der ionische *Tag* verwendet werden, um die Löslichkeit des Peptids zu erhöhen. Aus dem Bereich der IF ist bekannt, dass deren Löslichkeit sehr stark von der Wahl des Anions abhängt. Die Löslichkeit kann durch Variation des Anions für ein gegebenes Kation von sehr gut bis zu nahezu unlöslich in Wasser eingestellt werden. In diesem Fall sollte durch die geschickte Wahl des Anions die Löslichkeit der festphasengebundenen Peptidkette im für die Peptidkupplung verwendeten Lösungsmittel ausreichend erhöht werden.
 - b) Ist die Ursache für die Probleme während der Synthese die Bildung von inter- oder intramolekularen Sekundärstrukturen in den wachsenden Peptidketten, so soll der ionische *Tag* die oft hydrophobe Umgebung der Aggregate destabilisieren. Dadurch sollte der N-terminus des Peptids wieder leichter zugänglich sein.
2. In der Festphasensynthese von Peptiden werden die polaren funktionellen Gruppen in den Seitenketten üblicherweise mit sehr unpolaren Schutzgruppen wie Boc-, *t*-Butylether- oder Cbz-Schutzgruppen blockiert. Daher sind vollständig geschützte Peptidfragmente in Wasser normalerweise sehr wenig löslich. Die ionischen Schutzgruppen sollen aufgrund ihrer großen Polarität und durch Wahl eines gut wasserlöslichen Anions die Löslichkeit von vollständig

geschützten Peptidfragmenten in wässrigen Lösungsmitteln deutlich erhöhen. Dadurch sollte deren Reinigung durch RP-HPLC erleichtert oder auch erst ermöglicht werden.

Von den 12 Aminosäuren, deren Seitenketten während der traditionellen Fmoc-Peptidsynthese geschützt werden, wurden drei als Modellaminosäuren für die verschiedenen funktionellen Gruppen in den Seitenketten ausgewählt. Als Modell für Aminosäuren mit einer Hydroxy-Gruppe wurde Serin ausgewählt.¹⁷⁶ Der Entwurf der Schutzgruppe wurde von dem für die Schützung von Hydroxylgruppen oft verwendeten *t*-Butylether abgeleitet. Aspartat diente als Modell für Aminosäuren mit einer Carbonsäurefunktion in der Seitenkette. In diesem Fall wurde der *t*-Butylester als Vorbild gewählt. Von den vier Aminosäuren mit basischer Seitenkette wurde Lysin als Modell verwendet. Für Amine sollten zwei Schutzgruppen entwickelt werden. Eine wurde von der Struktur der Boc-Gruppe abgeleitet, für die zweite diente die Cbz-Gruppe als Vorbild.

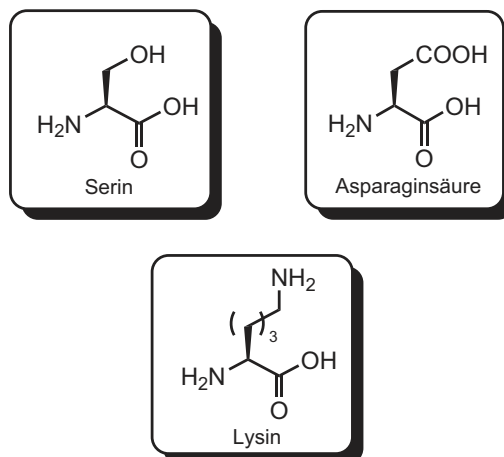


Abbildung 4.1.: Strukturen der Aminosäuren, welche als Modelle für die Seitenkettenschützung dienten

4.2. Synthese einer ionischen Schutzgruppe für Hydroxy-Gruppen

4.2.1. Entwurf der Schutzgruppe für die Alkoholfunktion des Serins

Die Verknüpfung der Schutzgruppe sollte in einer Form ähnlich eines *t*-Butylethers erfolgen. Diese sind unter den für die basische oder hydrogenolytische Spaltung üblichen Bedingungen stabil. Von starken Säuren wie z.B. TFA wird der Ether unter Rückbildung der Alkohlfunktion gespalten. Die Verknüpfung mit dem ionischen *Tag* sollte so kurz wie möglich und so lang wie nötig sein. Da nucleophile Substitutionen an Kohlenstoffatomen in α -Position zu einem quaternären Kohlenstoff sehr schwierig sind, wurde als minimale Kettenlänge zwei Methylenheiten angesehen.¹⁷⁷

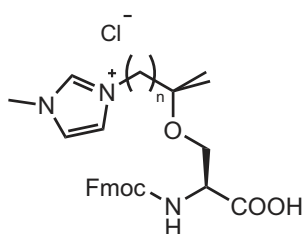


Abbildung 4.2.: Design der Schutzgruppe für Serin

4.2.2. Überblick über die Syntheserouten

Die Herstellung des gewünschten Serinderivats ist auf verschiedene Arten denkbar. Dabei gibt es verschiedene Schritte, deren Reihenfolge unterschiedlich gewählt werden kann:

- Synthese der Vorläuferverbindungen für den *tert*-Ether
- Aufbau des *tert*-Ethers
- Einführung der Ladung
- Wechsel der Schutzgruppen / Umschützung (z.B. Abspalten der Cbz- und Bn-Schutzgruppen, Einfügen der Fmoc-Gruppe)

Dabei ist der Aufbau des *tert*-Ethers der wichtigste. Falls die Einführung der Ladung wie in der Aufzählung nach der Synthese des Ethers erfolgt, hat dieser Schritt Auswirkungen auf die Wahl der Schutzgruppen und damit auf deren Wechsel (z.B. dürfte die Fmoc-Gruppe nicht mit den Bedingungen der nucleophilen Substitution

durch 1-Methylimidazol kompatibel sein). Die in dieser Arbeit untersuchten Möglichkeiten sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

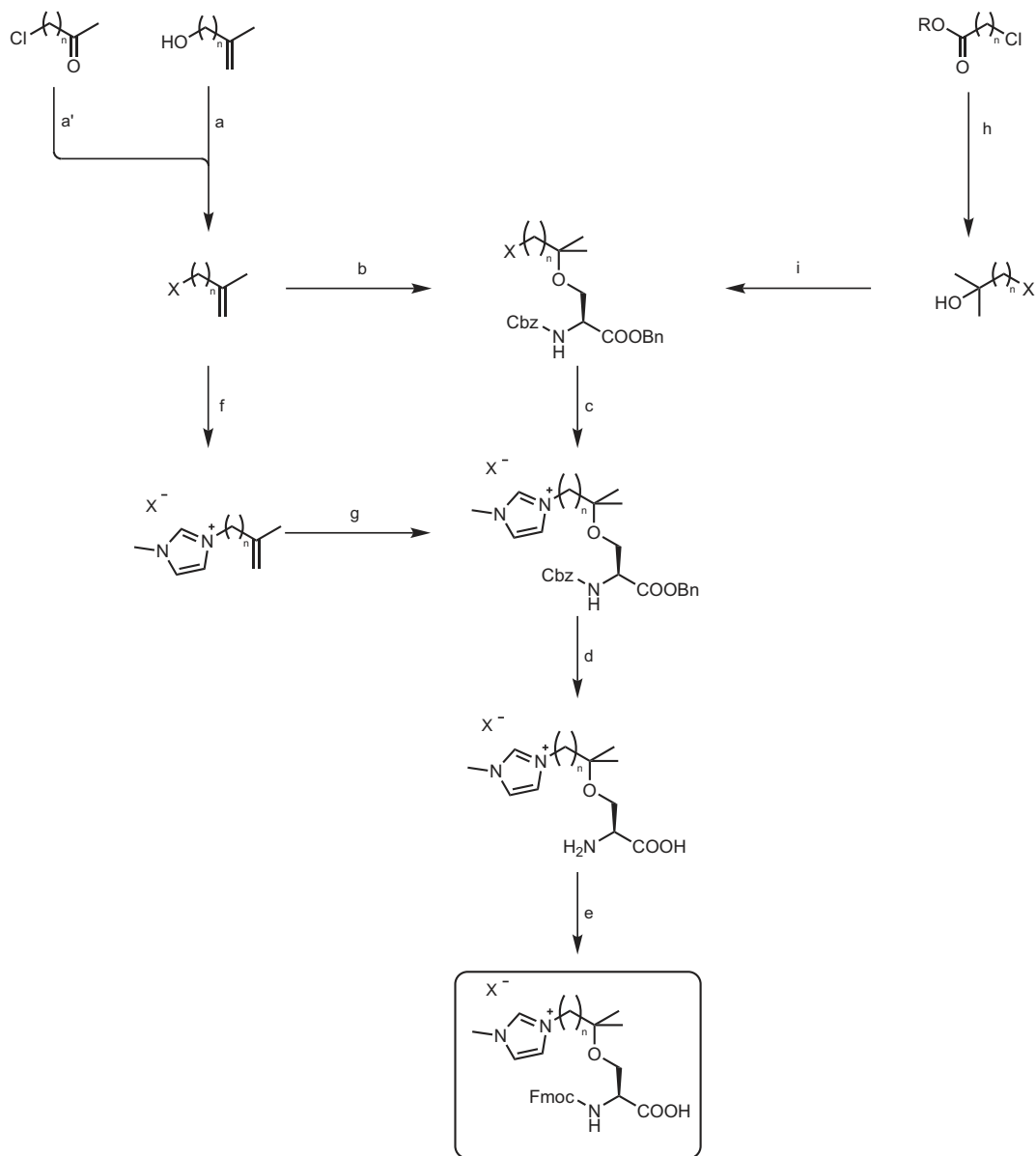


Abbildung 4.3.: Ansätze zur Synthese des gewünschten Serinderivats

4.2.3. Herstellung von *tert*-Butylethern

Da die Bildung des *tert*-Ethers der Schlüsselschritt der in 4.2.2 vorgestellten Sequenz ist, sollen die synthetischen Möglichkeiten zur Darstellung von *tert*-Ethern hier etwas ausführlicher besprochen werden.

Ausgehend von Alkenen Diese Methode ist die in Labor und Technik gebräuchlichste Variante zur Herstellung von *tert*-Butylethern.¹⁷⁶ Isobuten wird durch eine Lösung des zu verethernden Alkohols hindurchgeleitet, in diese einkondensiert oder unter Druck zur Reaktion gebracht. Als Katalysatoren können Brønsted- und Lewis-Säuren dienen, z.B. konzentrierte Schwefelsäure oder Bortrifluorid. Eine andere Möglichkeit sind Quecksilbersalze. Für dieses Verfahren werden große Mengen Isobuten benötigt, je nach Prozessführung sind druckfeste Apparate notwendig. Es gibt in der Literatur aber auch ein Beispiel, bei dem das bei Raumtemperatur flüssige Alken 2-Methyl-1-buten eingesetzt wurde.¹⁷⁸ Dabei wurde dann ein *tert*-Pentylether erhalten.

Ausgehend von Alkoholen Die Synthese von *tert*-Butylethern ausgehend von Isobuten hat einige Nachteile.^{179,180} Es gab daher immer wieder Anstrengungen eine Methode zu entwickeln, bei der tertiäre Alkohole oder ihre Derivate als Ausgangsmaterialien dienen können.^{179,180}

Theoretisch könnte diese Reaktion analog zur Williamschen Ethersynthese erfolgen. Insbesondere für die Schützung von chiralen Aminosäuren, die im Rahmen dieser Dissertation im Mittelpunkt standen, ist die Williamsche Ethersynthese nicht attraktiv. Es gibt zwei denkbare Kombinationen von Halogenid und Alkoholat. Zum einen können in den Aminosäurederivaten die Hydroxylfunktion durch ein Halogenid ersetzt werden. Diese müssten dann durch das tertiäre Alkoholat nucleophil substituiert werden. Insbesondere im Fall des Tyrosins dürfte dies nicht gelingen (Abb. 4.4).

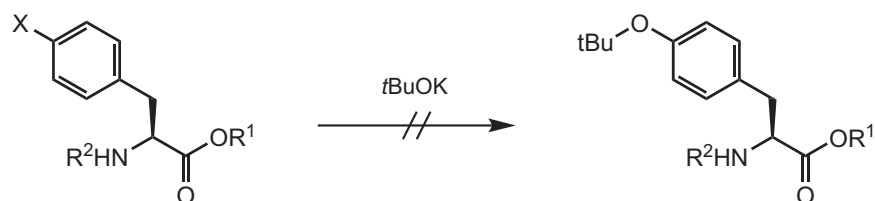


Abbildung 4.4.: Schwierigkeiten bei der Herstellung des *tert*-Ethers ausgehend vom halogenierten Aminosäurederivat

In der anderen Variante werden die Aminosäurederivate mit einer starken Base deprotoniert und dann mit den tertiären Halogeniden in einer S_N1 Reaktion umgesetzt. Dabei kann es zu Eliminierung von HX durch das stark basische Alkoholat kommen. Unter basischen Bedingungen ist das dabei gebildete Alken nicht in der Lage mit den Alkohol zu reagieren.

Ganz prinzipiell ist die Notwendigkeit eine stöchiometrische Menge einer starken Base (Alkoholat) einzusetzen ein größeres Problem. Das α -Kohlenstoffatom könnte durch die Base deprotoniert werden, was zur Racemisierung führen würde.

Die Anwendung saurer Katalysatoren ist hingegen möglich. Bei der Verwendung von *tert*-Butanol ergibt sich ein C_3 -symmetrisches Carbokation (Abb. 4.5).

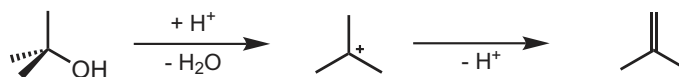


Abbildung 4.5.: Säurekatalysierte Bildung von Isobuten aus *tert*-Butanol

Eine möglicherweise eintretende Eliminierung würde immer zu Isobuten führen. Dieses ist unter den sauren Bedingungen in der Lage, zum gewünschten Ether zu reagieren. In zumindest zwei Publikationen, in denen *tert*-Butylether ausgehend von Alkoholen oder ihren Derivaten hergestellt wurden, wird die Bildung von Isobuten aus dem verwendeten *tert*-Butanol als Zwischenschritt sogar explizit angenommen.^{180,181} Es ist auch möglich, den tertiären Alkohol zuerst als Trichloracetimidat zu aktivieren, und dann mit einem primären oder sekundären Alkohol umzusetzen.¹⁸²

4.2.4. Synthese der Alkene

Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, wurde versucht, den *tert*-Ether ausgehend von Alkenen herzustellen, dies entspricht den Reaktionen b und g. Dazu wurden zuerst die entsprechenden Alkene mit verschiedenen Methoden hergestellt.

4.2.4.1. Synthese des Alkens durch Wittig-Reaktion

Die Synthese des Alkens durch eine Wittigreaktion entspricht der Reaktion a' in Abbildung 4.3. 4-Chlorbutan-2-on ist kommerziell erhältlich. Ausgehend von diesem Keton wurde versucht, durch Reaktion mit dem aus Methyltriphenylphosphinbromid und BuLi erhältlichen Wittigreagenz das Alken **80** herzustellen (Abb. 4.6).^{183,184}

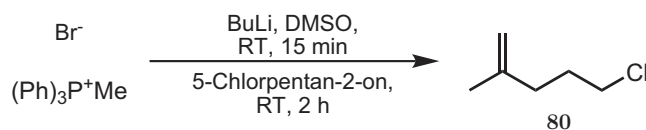


Abbildung 4.6.: Wittigreaktion zur Herstellung des Alkens

Dieser Weg war nicht erfolgreich. Zwar konnte das Alken hergestellt werden, wie

durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie gezeigt werden konnte. Es war jedoch nicht möglich, dass so hergestellte Alken durch Destillation ausreichend zu reinigen. Die Nebenprodukte konnten nur teilweise identifiziert werden. Erstaunlicherweise stellte Benzol eine häufige Verunreinigung der Proben dar. Da dies in keinem Schritt der Reaktion oder Reinigung verwendet wurde, entstand es vermutlich aus dem Phosphoniumsalz. Die Reaktion wurde mit Cyclohexanon als Kontrolle durchgeführt.¹⁸⁵ Mit diesem Edukt wurde eine Ausbeute von 86% an reinem Alken erhalten. Auch die Umsetzung des 4-Pentanonsäureethylester und die Reinigung des daraus erhaltenen Alkens gelang problemlos.¹⁸⁶

Da die Kontrollexperimente darauf hindeuteten, dass das Wittigreagenz korrekt hergestellt wurde, aber bei der Reaktion mit 5-Chlorpentan-2-on schlecht abtrennbare Nebenprodukte entstanden, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

4.2.4.2. Synthese der Alkene durch Aktivierung und nucleophile Substitution

Ein anderer Weg zum gewünschten Alken ist in Abbildung 4.3 als Reaktion a skizziert. Dabei wurde die Hydroxylgruppe des käuflichen 3-Methylbut-3-en-1-ol in eine gute Abgangsgruppe (X) umgewandelt. Falls X = Mesylat oder Tosylat ist, erfolgte die Bildung direkt durch Umsetzung des Alkohols mit dem entsprechenden Sulfonsäurechlorid.^{187,188} Wenn X = Cl war, erfolgte diese Reaktion durch nucleophile Substitution des Tosylats mit Chloridionen.

Herstellung des Mesylats und Tosylats Beide Reaktionen gelangen problemlos, die Ausbeuten waren gut (Abb. 4.7).

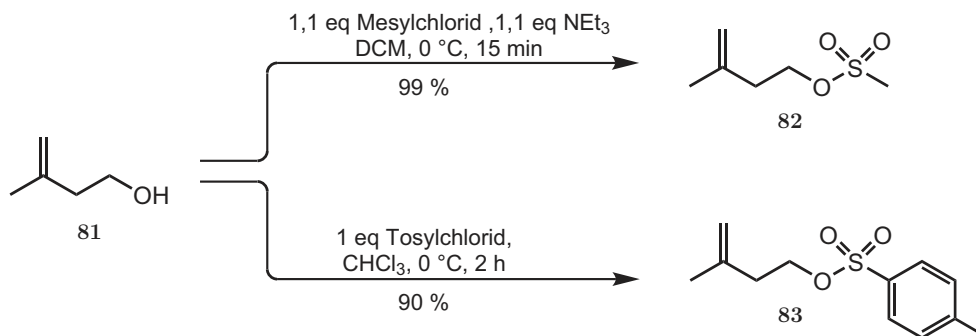


Abbildung 4.7.: Aktivierung der -OH Gruppe von 3-Methylbut-3-en-1-ol als Mesylat bzw. Tosylat

Das Mesylat hat aber zwei Nachteile. Zum einen war das Mesylat **82** bei Raum-

temperatur nicht stabil, sondern zersetzte sich im Verlauf weniger Wochen. Zum anderen reagierte das Mesylat **82** nach der Destillation explosionsartig. Dies deutet darauf hin, dass eine stabilisierende Verunreinigung durch die Reinigung abgetrennt wurde. Das Tosylat war in dieser Hinsicht weniger problematisch, es konnte durch Säulenchromatographie gereinigt werden.

Herstellung des Chlorids durch nucleophile Substitution des Tosylats 83 Da als Anion ursprünglich Chlorid gewünscht war (IF mit Chloridionen sind gut wasserlöslich), wurde versucht, die entsprechende Halogenverbindung des Alkens herzustellen. Die erfolgreichste Methode ging vom Tosylat **83** aus. Dieses wurde mit Pyridinhydrochlorid umgesetzt. Das Alken konnte direkt aus dem Reaktionsgemisch abdestilliert werden. In diesem Fall wurde auf die Verwendung eines Lösungsmittels verzichtet, da DMF ein Azeotrop mit dem Produkt bildete und DMSO sich teilweise unter Bildung eines sehr übelriechenden und nicht abzutrennenden Nebenprodukts zersetzte.

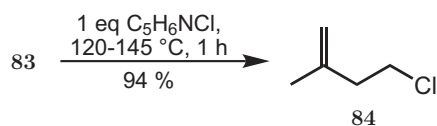
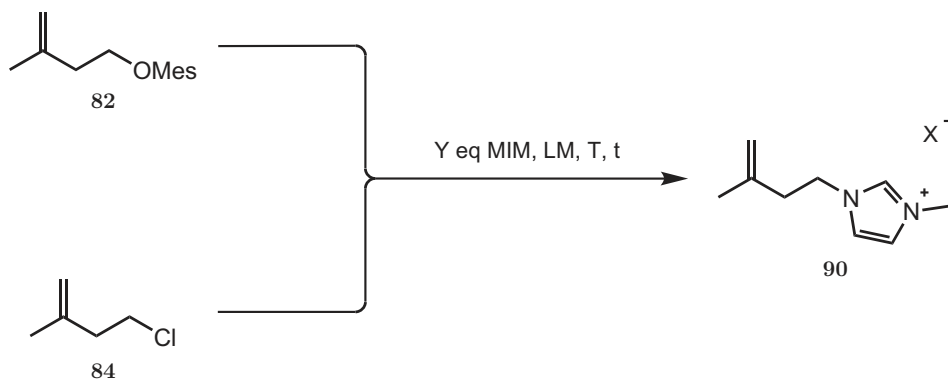


Abbildung 4.8.: Umsetzung des Tosylats mit Pyridinhydrochlorid

Da diese Reaktion in der Literatur noch nicht bekannt war, wurde getestet, ob mit diesem Ansatz auch die Synthese des dem Chlorid **84** entsprechenden Bromids möglich ist.¹⁸⁹ Die Reaktion fand tatsächlich statt, jedoch wird in diesem Fall neben dem gewünschten Bromderivat viel Eliminierungsprodukt (ca. 40%) gebildet, welches durch Destillation nur schwer abgetrennt werden konnte. Als Base fungierte vermutlich das während der Reaktion in kleinen Mengen gebildete Pyridin. Die Bildung des Eliminierungsprodukts wurde durch die Konjugation mit der schon bestehenden Doppelbindung begünstigt. Da Brom eine bessere Abgangsgruppe als Chlor ist, ist verständlich, warum in diesem Fall mehr Eliminierungsprodukt gebildet wurde. Diese Nebenreaktion könnte eventuell durch den Einsatz von Bromid-Salzen mit anderen Kationen vermieden werden. Wäre der Stickstoff des Kations vollständig quaternisiert, so wäre die Bildung von Pyridin deutlich unwahrscheinlicher.

Synthese des ionischen Alkens 90 Die Synthese des *tert*-Ethers ausgehend von einem Alken mit ionischem *Tag* entspricht den Reaktionen f und g in der Übersicht 4.3 auf Seite 134. Die nucleophile Substitution konnte sowohl am Mesylat **82**

als auch am Chlorid **84** erfolgen (Abb. 4.9). Beide Reaktionen waren erfolgreich.



Edukt	X	Y	LM	T	t	Ausbeute
82	MesO ⁻	3	LM-frei	80 °C	2 d	93 %
84	Cl ⁻	5	MeCN	Reflux	20 h	63 %

Abbildung 4.9.: Nucleophile Substitution mit 1-Methylimidazol an **82** und **84**

4.2.5. Schützung von Z-Ser-OBn mit dem Alken **84**

Das Alken **84** konnte andererseits auch direkt eingesetzt werden, um Z-Ser-OBn zu schützen. Dies entspricht der Reaktion b in der Übersicht 4.3 auf Seite 134. Für diese Reaktion wurde BF₃·Et₂O als Katalysator verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.10 dargestellt. Da die Reaktion ist aber noch nicht vollständig optimiert wurde, sollte sich die Ausbeute noch steigern lassen.

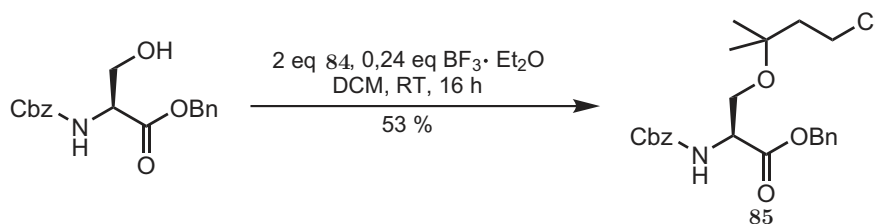


Abbildung 4.10.: Schützung von Z-Ser-OBn mit Alken **84**

Die Struktur des vollständig geschützten Serinderivats **85** wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt (Abb. 4.11). Dieser Schlüsselschritt ist also erfolgreich, es konnte keine Racemisierung festgestellt werden.

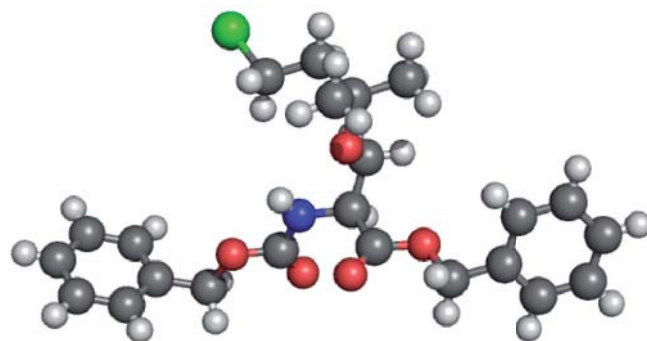


Abbildung 4.11.: Ergebnis der Kristallstrukturanalyse von des Serinderivat **85**

Das geschützte Serinderivat **85** sollte durch nucleophile Substitution am Chloratom mit beliebigen Molekülen funktionalisiert werden können. Dies ermöglicht eventuell die reversible Verknüpfung von Aminosäuren mit verschiedenen Substanzen (Farbstoffen, Katalysatoren und anderen *Tags*).

4.2.6. Nucleophile Substitution des Chlors im Serinderivat **85** durch 1-Methylimidazol (Einführung des *Tags*)

Dieser Schritt entspricht der Reaktion c in Übersicht 4.3 auf Seite 134. Die in diesem Fall gewünschte Art der Funktionalisierung ist die Substitution des Chlors durch 1-Methylimidazol. Dadurch wird in der Seitenkettenschutzgruppe eine positive Ladung eingeführt. Um die Reaktion unter möglichst milden Bedingungen durchführen zu können, wurde zur Reaktion NaI zugesetzt. Dieses reagiert in situ in einer Finkelsteinreaktion mit dem Chlorderivat und wandelt es in das deutlich reaktivere Iodderivat um. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.12 auf der nächsten Seite dargestellt. Aufgrund der Zugabe von NaI ist nicht klar, ob es sich bei dem erhaltenem geschützten Serinderivat um das Chlorid- oder das Iodidsalz handelt. Der niedrigere Wert der Ausbeute ist für ein reines Iodid, der höhere Wert für ein reines Chlorid berechnet.

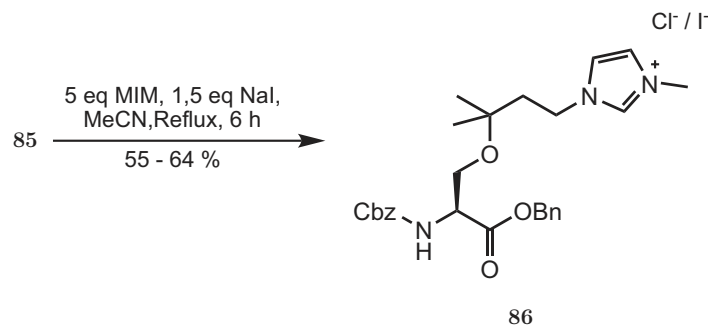


Abbildung 4.12.: Einführung der Ladung mit 1-Methylimidazol in **85**

4.2.7. Abspaltung der Cbz- und Benzylschutzgruppe

Diese Reaktion brachte unerwartete Schwierigkeiten. Die Hydrogenolyse mit H₂ und Pd / C bei Raumtemperatur war nicht erfolgreich, ebenso die Transferhydrogenolyse mit Ammoniumformiat und Pd(OH)₂ / C bei Raumtemperatur. Nur bei einer Temperatur von 90 °C in rein wässriger Lösung wurden beide Schutzgruppen vollständig abgespalten, es waren aber auch in diesem Fall 20 eq Ammoniumformiat notwendig. Die Kontrolle erfolgte in allen Fällen mit HPLC-MS. Bei diesen Versuchen wurde immer zuerst der Benzylester, dann die Cbz-Gruppe gespalten. Überschüssiges Ammoniumformiat kann normalerweise durch wässrige Extraktion vom unpolaren Produkt der Entschützung entfernt werden. Da das in diesem Fall erhaltene Serinderivat **87** sehr gut wasserlöslich ist, konnte das Ammoniumformiat auf diese Art nicht abgetrennt werden. Auch Versuche mit FPE und Chromatographie an Cellulose scheiterten. Nachdem **87** nicht rein dargestellt werden konnte, ist auch keine Ausbeuteberechnung möglich. Die Bedingungen für die Entschützung sind in Abbildung 4.13 dargestellt.

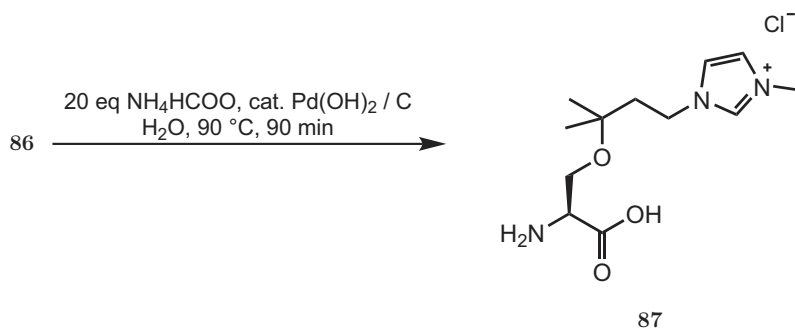


Abbildung 4.13.: Abspaltung der Cbz- und Bn- Schutzgruppe von **86**

Durch eine Modellreaktion von Ammoniumformiat mit dem in obiger Reaktionen

verwendeten $\text{Pd}(\text{OH})_2$ konnte die vermutliche Ursache für die Probleme aufgeklärt werden. Wird Ammoniumformiat in Wasser gelöst und mit $\text{Pd}(\text{OH})_2 / \text{C}$ vermischt, so setzt nach einer Induktionsperiode die Zersetzung des Ammoniumformiats ein (erkennbar an der Gasentwicklung (diese Reaktion ist die Grundlage der Transferhydrierung)). Bei Zugabe von NaI stoppt die Gasentwicklung sofort. Damit wird die Transferhydrogenolyse unmöglich. Der Grund hierfür dürfte die Bildung von sehr schwer löslichem PdI_2 sein.¹⁵¹ Da bei der nucleophilen Substitution NaI als Additiv verwendet wurde, und damit gerechnet werden muss, dass es zumindest teilweise zu einem Anionenaustausch während der Reaktion kam, ist auch das in der Hydrogenolyse eingesetzte Aminosäurederivat mit Iodid verunreinigt. Das Iodid stellt unter diesen Bedingungen ein Katalysatorgift für Palladium dar. Dies ist ein Beispiel dafür, wie das während der Reaktion kaum berücksichtigte Anion das Ergebnis stark beeinflussen kann.

Um die Probleme (hohe Temperatur, großer Überschuss an Ammoniumformiat) bei der Transferhydrogenolyse zu vermeiden, könnte eventuell das Anion im ionischen Serinderivat **86** mit Silbertrifluormethansulfonat ausgetauscht werden.

4.2.8. Schützung der Aminogruppe des Serinderivats **87** mit Fmoc-Cl

Diese Reaktion wurde mit dem durch Ammoniumformiat verunreinigten Serinderivat nach der Entschützung durchgeführt, die Ausbeute war mit nur 7% sehr klein und erfordert weitere Optimierung.

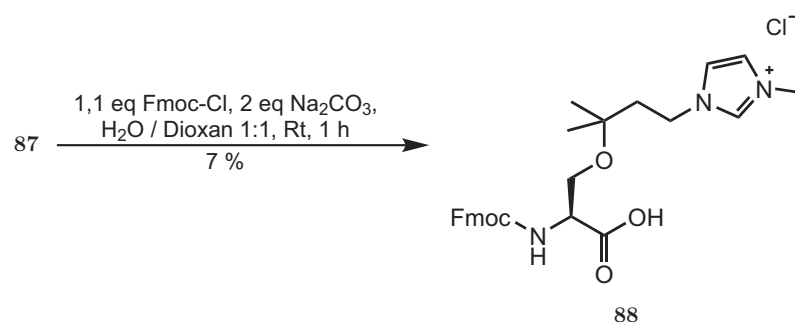


Abbildung 4.14.: Schützung von **87** mit Fmoc-Cl

Die geringe Ausbeute wurde durch das noch in der Mischung enthaltene Ammoniumformiat verursacht. In wässrigen Natriumcarbonatlösungen werden aufgrund der Protolysereaktion des Carbonations mit Wasser Hydroxidionen gebildet. Diese sind in der Lage, Ammoniumionen zu Ammoniak zu deprotonieren. Dieser kann mit dem zugesetzten Fmoc-Cl zum Carbamat reagieren (Abb. 4.15). Aufgrund des

großen Überschusses an Ammoniumformiat reagiert bevorzugt Ammoniak aus dieser Quelle mit dem Fmoc-Cl, nur ein sehr kleiner Anteil der Aminosäure wird in der gewünschten Weise umgesetzt.

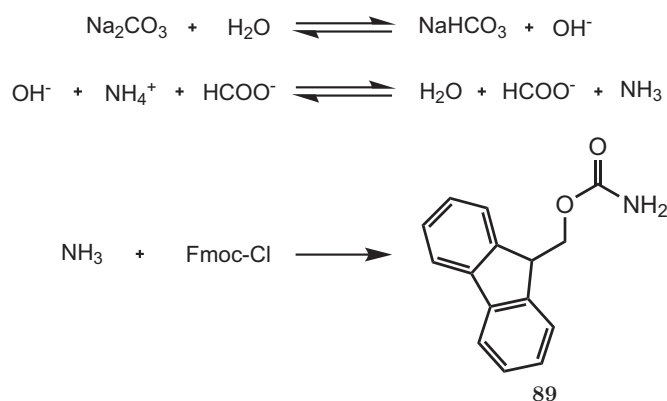


Abbildung 4.15.: Bildung von Ammoniak und dessen Reaktion mit Fmoc-Cl

Das bei dieser Reaktion gebildete Carbamat **89** konnte mittels HPLC-MS nachgewiesen werden (Abb. 4.15). Außerdem war noch viel nicht umgesetztes Edukt **87** vorhanden. Das gewünschte Fmoc geschützte Serinderivat konnte jedoch durch FPE abgetrennt werden. Auf diese Art ist es also möglich, das gewünschte Aminosäurederivat zu erhalten, allerdings mit geringer Ausbeute.

4.2.8.1. Schützung von Z-Ser-OBn mit dem ionischen Alken **90·Cl⁻**

Die Reaktion wurde analog wie die Umsetzung des Alkens **84** mit Z-Ser-OBn durchgeführt (Abb. 4.10 auf Seite 139). Mit HPLC-MS konnten nur Spuren des geschützten Serinderivats **86** detektiert werden (Abb. 4.16). Dies steht im scharfen Gegensatz zur Reaktion des nicht ionischen Alkens **84** mit Z-Ser-OBn. Auch durch Reaktion in der Mikrowelle konnte keine Steigerung des Umsatzes erzielt werden. Die genaue Analyse der ganz am Anfang in der HPLC-MS Untersuchung eluierten polaren Verbindungen erklärte dieses Ergebnis. Nach 6 h ist das Edukt **90·Cl⁻** noch vorhanden, es haben sich aber aus dem ionischen Alken **90·Cl⁻** zwei Folgeprodukte gebildet. Bei diesen Substanzen handelt es sich um den entsprechenden ionischen tertiären Alkohol und das ionische tertiäre Chlorid. Mit der Zeit verschiebt sich die Mischung immer mehr zum tertiären Chlorid, nach 6 Tagen ist weder das Edukt **90·Cl⁻** noch der Alkohol detektierbar. Die Identifikation des tertiären Chlorids wurde durch das Isotopenmuster dieses Produkts untermauert.

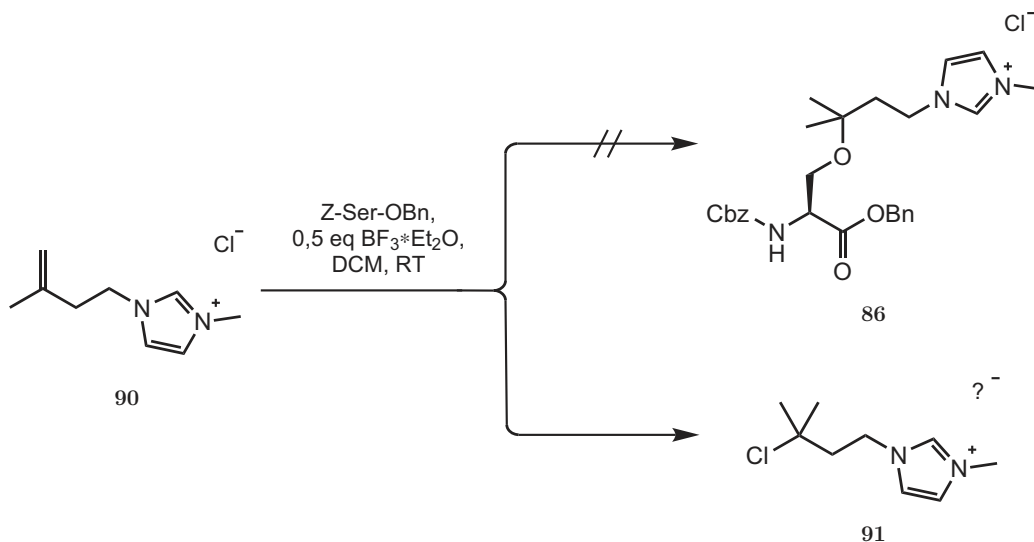


Abbildung 4.16.: Addition des Chlorid-Anions an das Alken **90**·Cl⁻

Eine analoge Reaktion mit **90**·MesO⁻ scheiterte ebenfalls. In diesem Fall wurde nur das Wasseraddukt als Nebenprodukt beobachtet.

Die Nebenreaktionen werden zum einen durch Wasser hervorgerufen, welches oft in den sehr hygroskopischen Edukten vorhanden ist. Andererseits kann auch das Chloridanion an das Alken addiert werden. Interessanterweise wurde mit dem Mesylat **90**·MesO⁻ keine Addition des Anions an das Alken beobachtet. Wenn die Reaktion unter striktem Ausschluss von Wasser mit getrocknetem Alken **90**·MesO⁻ durchgeführt würde, ergäbe sich eine gewisse Erfolgschance. In diesem Fall könnte die nucleophile Substitution mit 1-Methylimidazol in Abwesenheit der eventuell Racemisierungsempfindlichen Aminosäure stattfinden.

4.2.9. Synthese des Ethers ausgehend von Alkoholen

Diese Alternative entspricht in der Übersicht 4.3 den Reaktionen h und i.

4.2.9.1. Herstellung des tertiären Alkohols durch Grignardreaktion

Diese gelingt sowohl mit 3-Chlorpropionsäureethylester als auch 3-Brompropionsäureethylester.¹⁹⁰ Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.17 zusammengefasst. Beide Alkohole konnten durch Destillation gereinigt werden.¹⁹¹

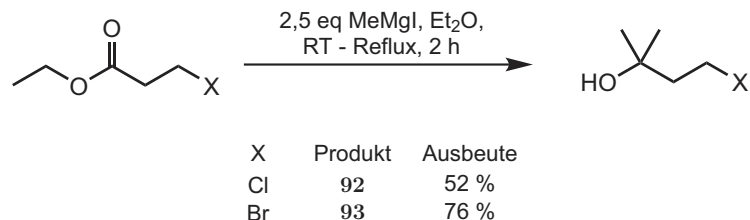


Abbildung 4.17.: Herstellung der tertiären Alkohole für die Ethersynthese

4.2.9.2. Synthese der tertiären Ether ausgehend von 92 und 93

Die Umsetzung der Alkohole **92** und **93** mit Z-Ser-OBn gelang nicht. Im Gegensatz zu der in der Literatur berichteten Beobachtung, dass eine Mischung von Schwefelsäure und Magnesiumsulfat die Bildung von *tert*-Ethern katalysierten, konnte in diesem Fall kein Umsatz festgestellt werden. Da die Synthese des *tert*-Ethers ausgehend vom Alken gelang, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

4.2.10. Entwurf einer Silylschutzgruppe

Im Bereich der Peptidchemie werden Schutzgruppen auf Silylbasis relativ selten eingesetzt. Dabei bieten diese neben einer sehr variablen Stabilität im sauren bzw. basischen Milieu auch die Möglichkeit der orthogonalen Entschützung durch Behandlung mit Fluoridionen. Daher wurde versucht, eine Silylschutzgruppe zur Schützung von Alkoholen zu entwickeln.¹⁶⁵ Ausgehend vom kommerziell erhältlichen Chlorsilan Chlor(4-chlorbutyl)dimethylsilan wurde die nucleophile Substitution am C- δ mit 1-Methylimidazol durchgeführt. Es wurde nicht versucht, das ionische Chlorsilan zu isolieren, sondern es wurde sofort mit Z-Ser-OBn weiter umgesetzt (das Überschüssige MIM wirkt in diesem Fall als Base).

Das mit der ionischen Silylschutzgruppe verknüpfte Aminosäurederivat **95** konnte nach der Reaktion mittels HPLC-MS nachgewiesen werden. Auch konnte das durch Hydrolyse des Chlorsilans entstehende Silanol **96** und das Dimerisierungsprodukt aus einem Molekül Silanol und einem Molekül Chlorsilan (Verbindung **97**) mittels HPLC-MS identifiziert werden (Abb. 4.19).

Leider gelang es nicht, **95** zu isolieren. In Gegenwart von Wasser zersetzte sich **95** zu schnell, um es durch FPE im präparativen Maßstab isolieren zu können. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da die neu hergestellte Schutzgruppe im Prinzip einer TMS- oder Dimethylethylsilyl-Schützung entspricht. Die TMS-Schutzgruppe ist eine wenig stabile Silanolbasierte Schutzgruppe und wird leicht in wässrigen Lösungen

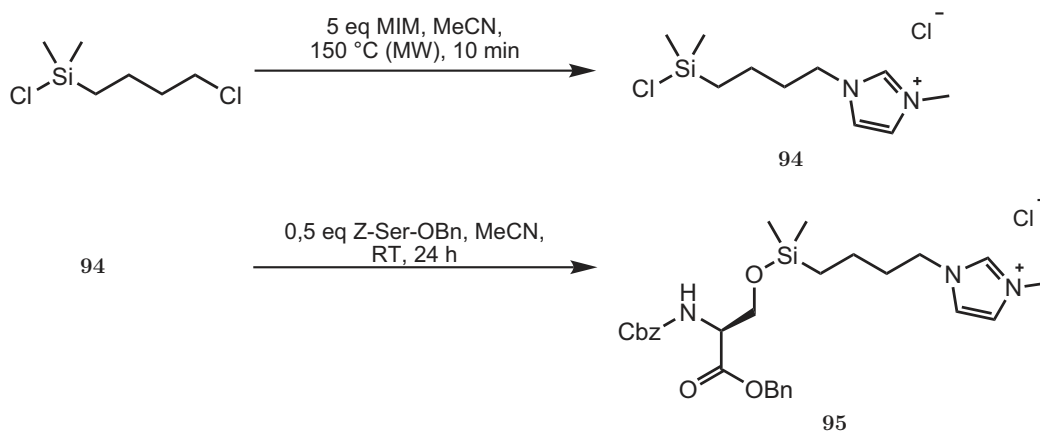
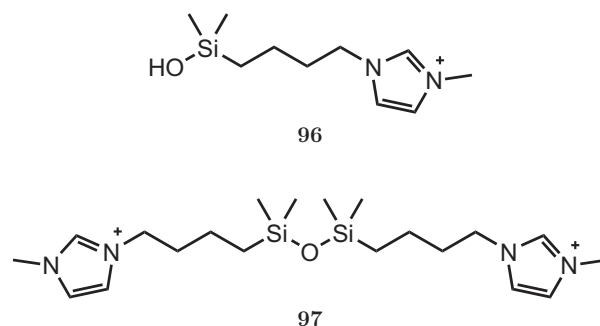


Abbildung 4.18.: Herstellung der Silylschutzgruppe und Kupplung an Z-Ser-OBn

Abbildung 4.19.: Nebenprodukte der Herstellung der Silylschutzgruppe **94**

im basischen gespalten (der Überschuss an MIM ist für die Basizität der Lösung während der Aufarbeitung verantwortlich).¹⁶⁵

Als Fazit bleibt, dass Silyl-Schutzgruppen eine interessante Orthogonalität aufweisen würden. Durch die hier durchgeführten Reaktion konnte außerdem gezeigt werden, dass das Chlorsilan die anspruchsvollen Bedingungen der nucleophilen Substitution mit 1-Methylimidazol toleriert. Dies bietet die Möglichkeit, andere Silylschutzgruppen zu entwickeln, welche einen stabileren Silylether bilden können (z.B. durch Ersatz der beiden Methylgruppen durch Phenyl- oder *tert*-Butylsubstituenten).

4.3. Synthese einer ionischen Schutzgruppe für Carbonsäuren

4.3.1. Entwurf der Schutzgruppe

Die Schützung von Carbonsäuren in der Seitenkette von Aminosäuren erfolgt oft in Form von *t*-Butylestern. Diese können prinzipiell auf die gleiche Art wie die im Abschnitt 4.2.2 beschriebenen tertiären Ether hergestellt werden. In diesem Fall bieten sich als Ausgangsmaterial der Synthese tertiäre Alkohole an. Diese sind leicht in großen Mengen durch Grignardreaktion erhältlich. Außerdem ist die Veresterung eine relativ robuste Methode (im Gegensatz zu der im Abschnitt 4.2.5 auf Seite 139 dargestellten Methode der Veretherung mit Isobuten). Die Übersicht der möglichen Syntheserouten sind in Abbildung 4.20 dargestellt.

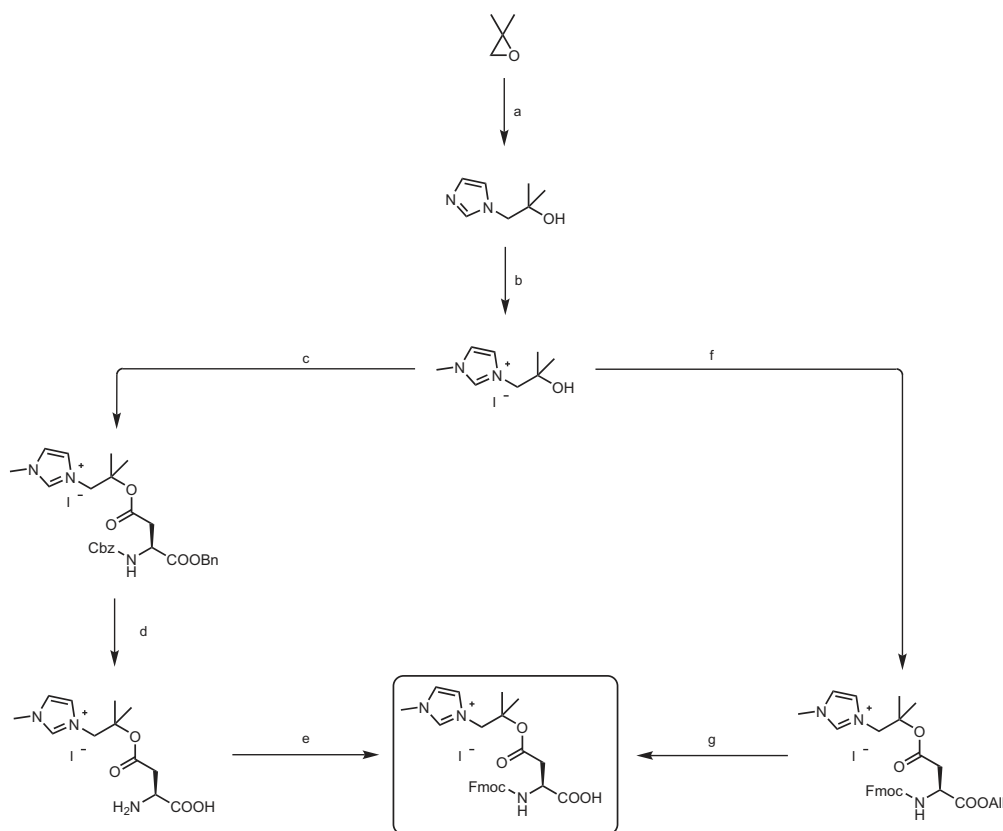


Abbildung 4.20.: Übersicht zur Schützung von Asparaginsäure mit einer ionischen Schutzgruppe

4.3.2. Synthese der Schutzgruppe

Die Synthese der tertiären Alkohole ist zum einen über die im Abschnitt 4.2.9.1 auf Seite 144 beschriebene Grignardreaktion möglich (Abb. 4.17). Daran würde sich

die nucleophile Substitution mit 1-Methylimidazol anschließen. Dabei werden aus sterischen Gründen (während der nucleophilen Substitution) mindestens zwei Methylengruppen zwischen quaternärem Kohlenstoff und der Abgangsgruppe benötigt. Ein eleganter Weg zu einem ähnlichen Derivat mit nur einer Methylengruppe wurde in der Literatur beschrieben.¹⁹² Die zwei Stufen werden als Eintopfreaktion durchgeführt, die beschriebene Verwendung von druckfesten Apparaturen ist nicht nötig. Die Reaktion kann auch bei Atmosphärendruck erfolgreich durchgeführt werden.

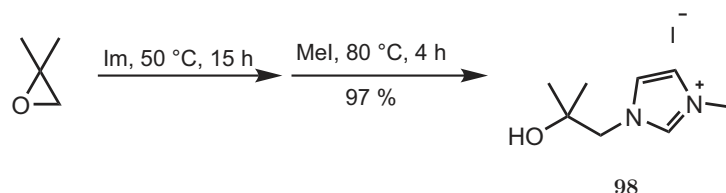


Abbildung 4.21.: Synthese des tertiären Alkohols **98**

Der Erfolg der Synthese wurde durch die Röntgenstrukturanalyse eines Einkristalles des tertiären Alkohols bestätigt (Abb. 4.22).



Abbildung 4.22.: Ergebnis der Kristallstrukturanalyse von des ionischen Alkohols **98**

4.3.3. Veresterung der Schutzgruppe mit Z-Asp-OBn

Die Veresterung des Asparaginsäurederivats mit dem ionischen Alkohol **98** wurde mit DCC durchgeführt.¹⁹³ Durch Zusatz von DMAP konnte der Umsatz auf 100 % gesteigert werden. Die Aufarbeitung muss aber noch optimiert werden.

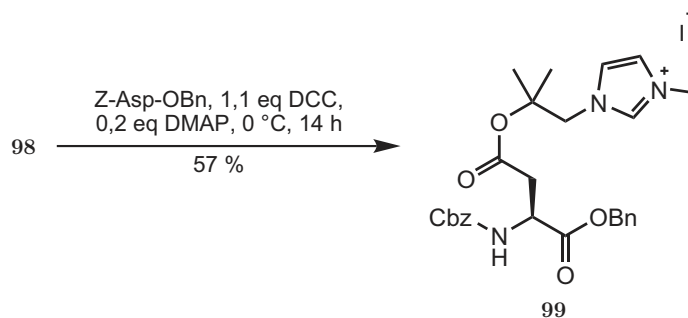


Abbildung 4.23.: Veresterung des tertiären Alkohols **98** mit Z-Asp-OBn

Trotz des laut HPLC-MS vollständigen Umsatzes, war die isolierte Ausbeute erstaunlich niedrig. Ein Teil des Produkts befand sich in der großen Mischfraktion mit dem bei der Reaktion aus dem DCC gebildeten 1,3-Dicyclohexylharnstoff. Die Verwendung anderer Carbodiimide (z.B. EDC) könnte hier Verbesserungen bringen, da in diesen Fällen andere Harnstoffe gebildet würden, die eventuell leichter abgetrennt werden können.

4.3.4. Entschützung des Asperaginsäurederivats **99**

Die Hydrogenolytische Entschützung von **99** gelang nur mit großen Mühen. Die Erklärung könnte die gleiche wie für die Probleme mit dem Serinderivat **86** sein (Abschnitt 4.2.7 auf Seite 141). Insgesamt wurde die Hydrogenolyse fünf mal angesetzt und das Edukt wieder isoliert, bis dann die Reaktion erfolgreich war. Es war sehr erstaunlich, dass bei dieser Reaktion zuerst auch refluxieren keinen Erfolg brachte. Nach mehrmaligen Versuchen war die Reaktion dann sehr schnell bei Raumtemperatur vollständig. Dies deutet darauf hin, dass zuerst das Iodid gegen Formiat oder ein anderes Anion ausgetauscht werden musste, um die Reaktion ablaufen zu lassen. Die Verwendung von Methanol als Lösungsmittel kann dabei zum Methylester führen.

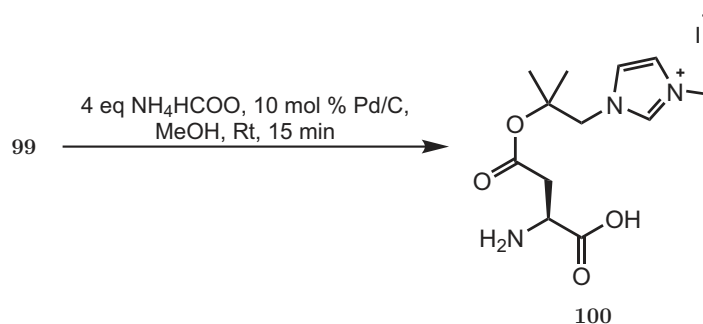


Abbildung 4.24.: Hydrogenolyse von **99** mit Pd/C und Ammoniumformiat

ren. Auch in diesem Fall konnte das überschüssige Ammoniumformiat nicht vom teilweise entschützten Aminosäurederivat abgetrennt werden, dadurch war es nicht möglich die Ausbeute zu bestimmen.

4.3.5. Schützung des Amins des Asparaginsäurederivats **100** mit Fmoc-Cl

Da das Asparaginsäurederivat **100** nicht gereinigt werden konnte, wurde das Reaktionsgemisch direkt für die Fmoc-Schützung eingesetzt. Diese wurde analog zu der beim Serinderivat besprochenen unter Schotten-Baumann Bedingungen durchgeführt. Dabei war auch in diesem Fall der Anteil des gewünschten Fmoc geschützten Asparaginsäurederivats sehr gering.

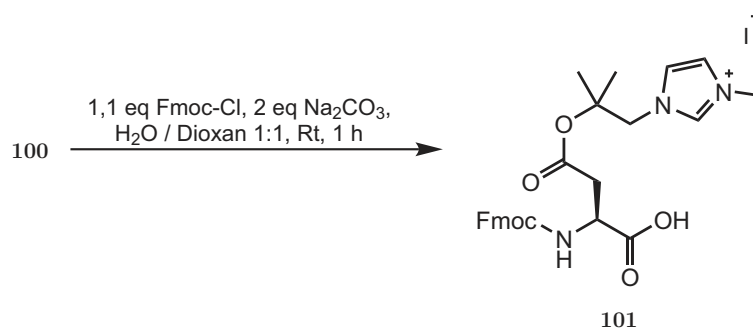


Abbildung 4.25.: Schützung von **100** mit Fmoc-Cl

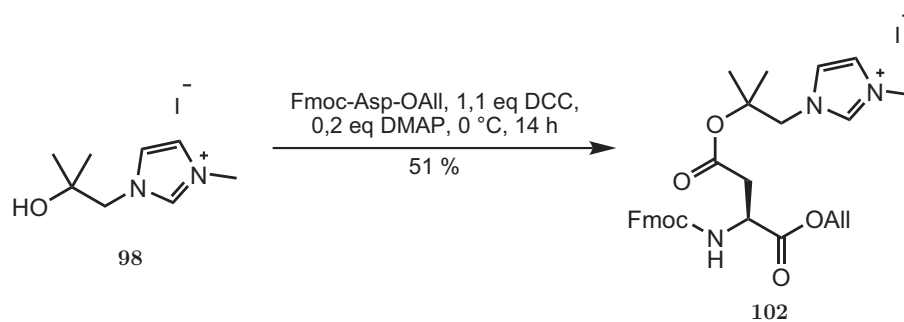
Da die Transferhydrogenolyse von **99** noch sehr viel schwieriger als die des Serinderivats **86** war, wurde die Syntheseroute umgestellt.

4.3.6. Veresterung von Fmoc-Asp-OAll mit dem tertiären ionischen Alkohol **98**

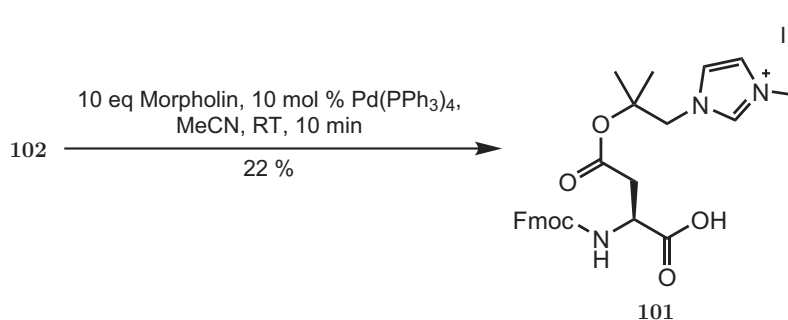
Diese Reaktion wurde analog zur Veresterung von Z-Asp-OBn durchgeführt. Auch in diesem Fall war der Umsatz laut HPLC-MS vollständig, die Ausbeute war wiederum nur durchschnittlich.

4.3.7. Spaltung des Allylesters des Asparaginsäurederivats **102**

Diese Reaktion konnte mit Hilfe von Pd(PPh₃)₄ und Morpholin erfolgreich durchgeführt werden. Die Entfernung des Allylesters erfolgt sehr schnell, nach 10 min ist die

Abbildung 4.26.: Veresterung von Fmoc-Asp-OAll mit **98**

Reaktion laut HPLC-MS beendet. Dabei tritt die Spaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch das im Überschuss eingesetzte Morpholin als Konkurrenzreaktion auf. Durch Quenchen mit TFA wurde versucht diese zu unterdrücken. Die Ergebnisse sind bis jetzt noch nicht zufriedenstellend.

Abbildung 4.27.: Katalytische Allylesterspaltung von **102**

Diese Reaktion kann sicherlich noch weiter optimiert werden. Ein Ansatz wäre die Optimierung des Quenchens (sicherstellen, dass alles Morpholin neutralisiert ist) oder durch andere, nichtbasische Nucleophile bei der Spaltung des Allylesters geschehen.¹⁷³ Das für diese Zwecke getestete Benzolmethylsulfinat entfernte zwar nicht die Fmoc-Schutzgruppe, aber der Umsatz war nicht vollständig. Außerdem bildete sich ein unbekanntes, nur schwer abzutrennendes Nebenprodukt. Eventuell sind die in der Literatur empfohlenen Sulfinsäuren oder Dimedon in diesem Fall besser geeignet.

4.4. Ansätze zur Synthese einer ionischen Schutzgruppe für Amine vom Boc-Typ

In Abbildung 4.28 wird die Herstellung einer von der Boc-Gruppe abgeleiteten Schutzgruppe skizziert.^{192,194} Diese Schutzgruppe sollte durch starke Säuren irreversibel gespalten werden. Als Ausgangspunkt wurde der tertiäre Alkohol **98** verwendet. Die Synthese dieses ionischen Alkohols wurde in Abschnitt 4.3.2 beschrieben. Dieser ionische, tertiäre Alkohol wurde gewählt, da in diesem Fall der Linker zwischen dem tertiären Alkohol und der ionischen Gruppe so klein wie möglich ist.¹⁵⁰

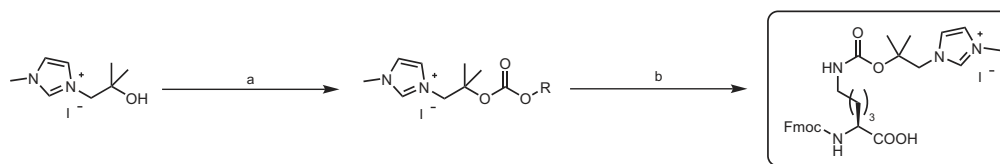


Abbildung 4.28.: Übersicht über die Schützung von Lysin mit einer ionischen Schutzgruppe

4.4.1. Aktivierung des ionischen Alkohols **98** als Carbonat

Die Aktivierung wurde mit p-Nitrochloroformat vorgenommen. Die Verwendung von Di-*N*-hydroxysuccinimidcarbonat war in der Literatur nicht erfolgreich.¹⁶⁴ Aus tertiären Alkoholen sind mit Phosgen die entsprechenden Chloroformate zugänglich.^{195,196} Die Verwendung von Phosgen ist in diesem Fall aber schwierig. Phosgen ist ein sehr giftiges Gas. Im Chemikalienhandel sind daher Lösungen von Phosgen in verschiedenen inerten Lösungsmitteln verfügbar, um den Umgang mit gasförmigen Phosgen zu vermeiden. Der ionische tertiäre Alkohol **98** ist in den für Phosgenlösungen üblichen Lösungsmitteln (aufgrund des ionischen Motivs) nicht löslich, und Phosgen ist in den Lösungsmitteln in denen sich **98** gut löst instabil (z.B. Wasser) oder nicht als Lösung in diesen Lösungsmitteln (z.B. Dichlormethan) erhältlich. Also müsste in diesem Fall mit gasförmigem Phosgen gearbeitet werden. Wegen der hohen Giftigkeit des Phosgens, sollte diese Möglichkeit als letzter Ausweg angesehen werden, falls andere Methoden nicht zum Ziel führen.

Die als Carbonat aktivierte Schutzgruppe **103** ist in Acetonitril mindestens mehrere Stunden stabil und kann gut mit HPLC-MS detektiert werden. Bei -20 °C scheint die aktivierte Schutzgruppe **103** mindestens für eine Woche stabil zu sein.

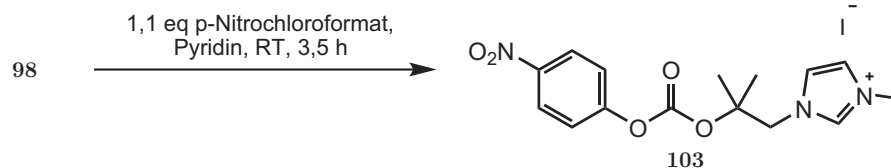


Abbildung 4.29.: Aktivierung des ionischen Alkohols **98** mit p-Nitrochloroformat

4.4.2. Schützung von Fmoc-Lys-OH mit dem aktivierten Carbonat **103**

Der aktivierte Alkohol **103** aus der vorherigen Reaktion kann direkt für die Schützung des freien Amins von Fmoc-Lys-OH verwendet werden. Die Reaktion wurde bisher nur im 0,1 mmol Maßstab (bezogen auf den Alkohol **98**) durchgeführt, um die prinzipielle Möglichkeit der Umsetzung zu testen. Die Reaktion war erfolgreich, das mit der ionischen Schutzgruppe in der Seitenkette geschützte Fmoc-Lysinderivat konnte mit Hilfe der HPLC-MS identifiziert werden, die Umsetzung war nach 4 h vollständig. Die Retentionszeit bei der Untersuchung mittels HPLC-MS deutet darauf hin, dass es möglich ist, das fertige Fmoc-Lysinderivat **104** durch FPE zu reinigen.

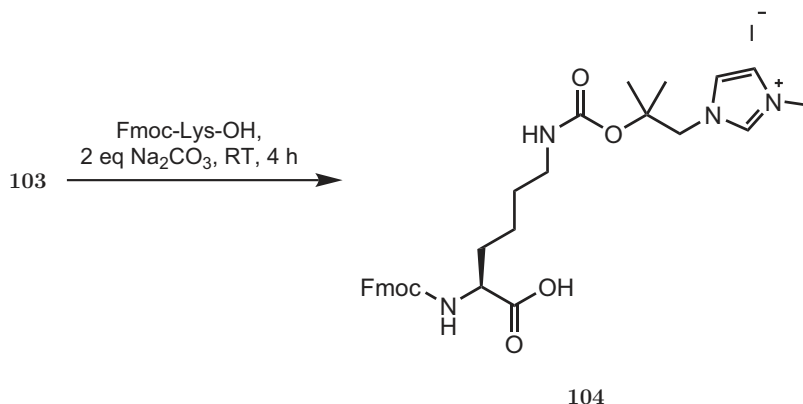


Abbildung 4.30.: Kupplung der als Carbonat aktivierten ionischen Boc-Schutzgruppe an Fmoc-Lys-OH

Damit ist der Zugang zu den gewünschten, mit ionischen Boc-artigen Schutzgruppen geschützten Aminosäurederivaten im Prinzip erarbeitet. Es müssen noch die Reaktionsbedingungen und die Aufarbeitung optimiert werden. Von den im kleinen Maßstab erhaltenen experimentellen Ergebnissen sind keine schwerwiegenden Probleme zu erwarten.

4.5. Ansätze zur Synthese einer ionischen Schutzgruppe für Amine vom Cbz-Typ

Eine anderes Grundmotiv für die Schützung von Aminfunktionen ist die Z- oder Cbz-Gruppe. Diese ist normalerweise gegen Säuren stabil und wird durch Hydrogenolyse abgespalten. Um die Säurelabilität zu erhöhen kann die Verknüpfung des ionischen *Tags* über einen Phenolether in para-Position erfolgen. Diese Gruppe ist ein starker Elektronendonator und stabilisiert die Bildung eines benzylichen Kations. Dadurch wird die Spaltung durch Säuren (welche über kationische Übergangszustände führt) erleichtert. Dieses Motiv ist an den Wang Linker angelehnt.¹⁹⁷ Die Route zur Schutzgruppe, inklusive Aktivierung und Kupplung an die Aminosäure ist in Abbildung 4.31 skizziert.

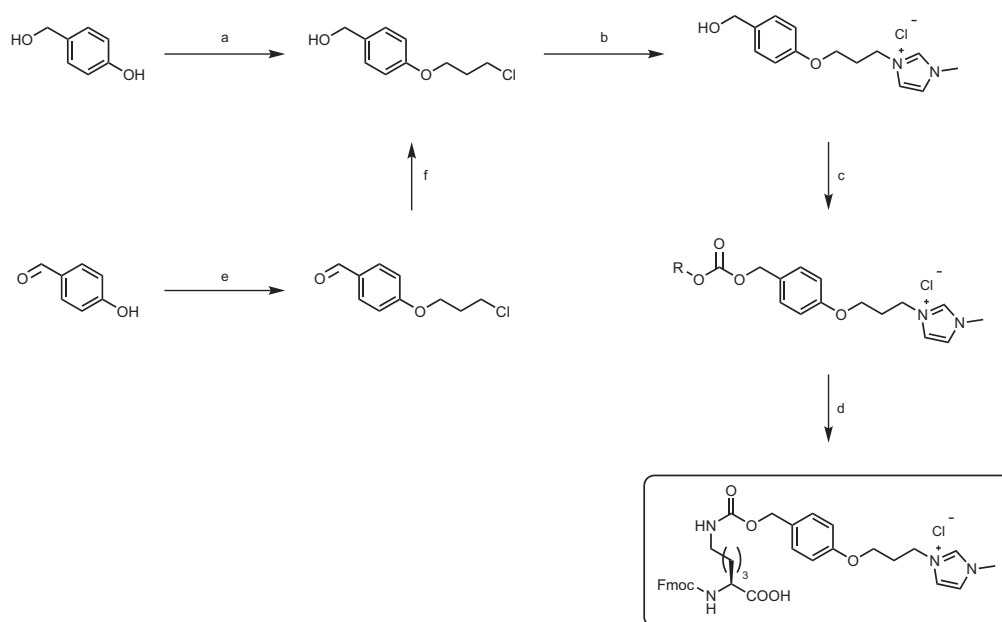
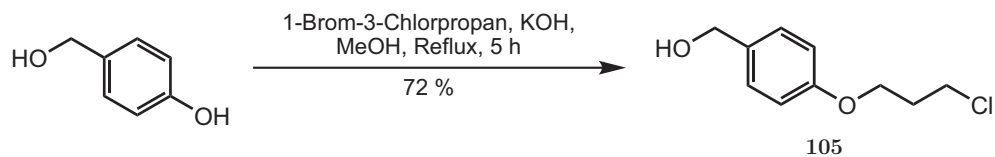


Abbildung 4.31.: Übersicht über die Schützung von Lysin mit einer von der Cbz-Gruppe und dem Wang Linker abgeleiteten ionischen Schutzgruppe

4.5.1. Synthese des Phenolethers

Der Phenolether ist gut aus kommerziell erhältlichen p-Hydroxybenzylalkohol und 1-Brom-3-Chlorpropan zugänglich (Abb. 4.32).^{198,199}

Die Reaktionssequenz e und f in Übersicht 4.31 ist möglich, sie ist aber mühsamer und ergibt eine geringere Gesamtausbeute. Daher wird dieser Ansatz nicht weiter

Abbildung 4.32.: Synthese des Phenoethers **105**

diskutiert.

4.5.2. Herstellung der Schutzgruppe

Durch nucleophile Substitution mit 1-Methylimidazol am Phenoether **105** wird die fertige Schutzgruppe erhalten.

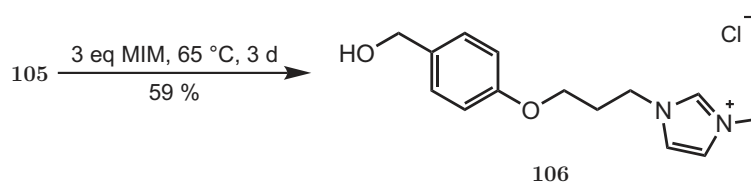


Abbildung 4.33.: Einführung des ionischen *Tags* durch nucleophile Substitution des Chloratoms durch 1-Methylimidazol im Phenylether **105**

Die ionische Schutzgruppe **106** kann in kristalliner Form erhalten werden, die Röntgenkristallstruktur beweist den Erfolg der Synthese.

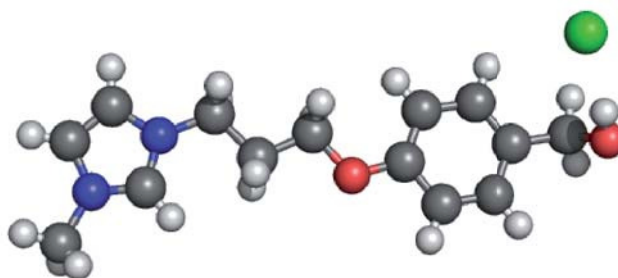


Abbildung 4.34.: Ergebnis der Kristallstrukturanalyse der ionischen Schutzgruppe **106**

4.5.3. Aktivierung mit p-Nitrophenolchloroformat und direkte Kupplung an Fmoc-Lys-OH

Die Aktivierung erfolgte analog zu der des ionischen tertiären Alkohols **98**. Dabei ist die Wahl des Lösungsmittels schwierig. Pyridin ist das offensichtlich für die Reaktion am besten geeignete Lösungsmittel. Die ionische Schutzgruppe **106** ist darin jedoch nicht gut löslich. Auf der anderen Seite kann die ionische Schutzgruppe **106** in DMF gelöst werden. Dieses Lösungsmittel ist für die Aktivierung mit dem Chloroformat nicht geeignet. Es gelang trotz allem, die ionische Schutzgruppe **106** in Pyridin mit p-Nitrochloroformat zumindest teilweise zur Reaktion zu bringen (Abb. 4.35).

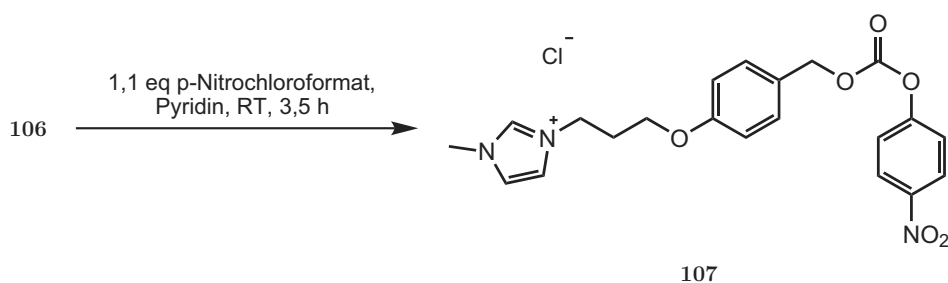


Abbildung 4.35.: Aktivierung der ionischen Schutzgruppe **106** mit p-Nitrochloroformat

Mit HPLC-MS konnte die aktivierte ionische Schutzgruppe nachgewiesen werden. Die Ausbeute beim Fällen mit Diethylether ist gering. Dabei wird auch ein Teil des aktivierten Carbonats zersetzt (Kontrolle mit HPLC-MS). Dies liegt zumindest teilweise an im Ether gelöstem Wasser. Die als p-Nitrophenolcarbonat aktivierte Schutzgruppe ist bei -20 °C nicht stabil, es fand teilweise Zersetzung statt (Kontrolle mit HPLC-MS). Die aktivierte Schutzgruppe konnte mit der freien Aminogruppe von Fmoc-Lys-OH zur Reaktion gebracht werden (Abb. 4.36). Der Umsatz war innerhalb von vier Stunden vollständig (Kontrolle mit HPLC-MS, im EIC konnte keine Spur des aktivierten Zwischenprodukts mehr gefunden werden).

Da die in dieser Reaktion verwendeten Mengen (Aktivierung von 0,1 mmol der ionischen Schutzgruppe **106**) sehr gering waren, wurde das Produkt nicht isoliert. Die Ergebnisse der Aktivierung und Kupplung lassen vermuten, dass hiermit ein Zugang zu dem mit der ionischen Schutzgruppe in der Seitenkette geschützten Fmoc-Lysinderivat gefunden ist. Andererseits sind für die Synthese von **108** noch viele Optimierungsmöglichkeiten gegeben.

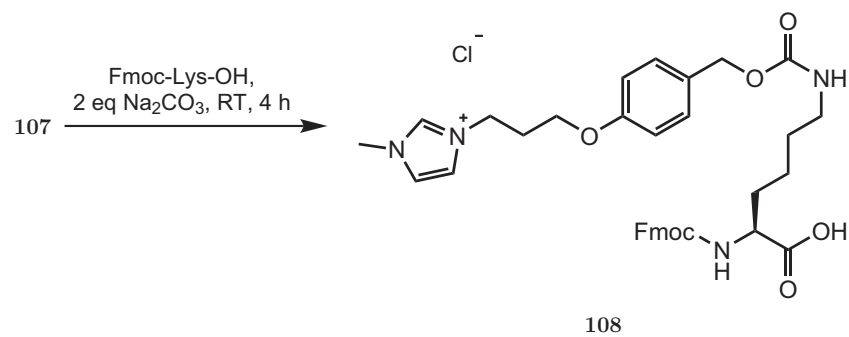


Abbildung 4.36.: Kupplung von der als Carbonat aktivierten Schutzgruppe **107** an Fmoc-Lys-OH

4.6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Herstellung der in der Seitenkette geschützten Aminosäurederivate von Serin, Aspartat und Lysin ist möglich. Die Ausgangsverbindungen für alle gewünschten Schutzgruppen konnten in ausreichend großen Mengen mit im Allgemeinen guten Ausbeuten hergestellt werden. Diese Verbindungen sind gut charakterisiert und stellen einen soliden Ausgangspunkt für weitere Arbeiten in diesem Gebiet dar.

Um 4-Chlor-2-methylbut-1-en **84** herzustellen wurde eine neue, einfache und sehr milde Technik zur Synthese von chlororganischen Verbindungen ausgehend von Alkoholen entwickelt.

Es gelang, die Schutzgruppen an die ausgewählten Modellaminosäuren zu kuppeln. Dabei wurde ein säurelabiler Linker eingeführt, der vielseitige Funktionalisierungen ermöglicht. Dieser ist orthogonal zur in der Peptidchemie üblichen Fmoc-Strategie. Außerdem konnte in allen Fällen die gewünschte Zielverbindung nachgewiesen werden.

Obwohl wichtige Ziele erreicht wurden, fehlen oft noch die letzten Schritte für die Synthese der Zielverbindungen in größeren Mengen. Die gereinigten, sowohl Fmoc als auch mit den entsprechenden ionischen Schutzgruppen geschützten Derivate sind für eine eingehende Charakterisierung notwendig. Erst dann kann der Effekt der ionischen Schutzgruppen durch Untersuchung ihres Einflusses auf die Ausbeuten und Reinheit der mit ihnen hergestellten Peptide bestimmt werden. Daran anschließend wäre die Bestimmung des Einflusses der ionischen Schutzgruppen auf die Löslichkeit der Peptide und der zur Abspaltung der Schutzgruppen nötigen Bedingungen möglich.

Es ist bis jetzt noch nicht ganz klar, ob die nucleophile Substitution von Tosylaten mit Pyridinsalzen eine allgemeine Methode zur Herstellung von Halogenderivaten aus den den Tosylaten zugrunde liegenden Alkoholen darstellt. Die bei dieser Reaktion manchmal auftretende Eliminierung dürfte durch das in geringen Mengen gebildete Pyridin erfolgen. Ob quaternisierte Pyridinderivate hier einen Vorteil bringen (der Stickstoff ist in diesem Fall vollständig blockiert) und einen Zugang zu labilen Brom- und eventuell Iodderivaten ermöglichen bedarf weiterer Untersuchungen. Auch der Einsatz von festphasengebundenen Reagenzien auf ionischer Basis könnte hier Vorteile bringen, die Regeneration sollte an der festen Phase relativ leicht durch Waschen mit wässrigen Säurelösungen möglich sein.

Generell können viele der in diesem Kapitel vorgestellten Reaktionen noch hinsichtlich der Ausbeute optimiert werden. Dies trifft insbesondere auf die Veretherung von Z-Ser-OBn mit dem Alken **84**, die Aufarbeitung der nucleophilen Substitution

am Serinderivat **85**, der Spaltung des Allylesters in im Fmoc geschützten Asparaginsäurderivat **102** sowie die Aktivierung und Kupplung der ionischen Alkohole **98** und **106** zu. Hier sollten mit einfachen Mitteln große Fortschritte möglich sein, da gezeigt wurde, dass all diese Reaktionen prinzipiell möglich sind. Auch die Ursachen der Probleme wurden identifiziert, aus Zeitgründen konnten die Lösungsansätze jedoch nicht mehr in Angriff genommen werden.

Ein sehr erfreuliches Resultat war die Stabilität der Cl-Si Bindung während der nucleophilen Substitution mit 1-Methylimidazol. Leider war das Motiv der Schutzgruppe nicht optimal gewählt. In diesem Fall war die Schutzgruppe von der TMS-Gruppe abgeleitet, diese ist jedoch die instabilste Silylschutzgruppe. Durch eine Variation der Substituenten am Silicium sollte es möglich sein, die Stabilität der O-Si Bindung in den geschützten Aminosäurederivaten zu erhöhen. Dies würde den Zugang zu einer Vielzahl verschiedener Schutzgruppen und Linker ermöglichen, die eine gewisse Orthogonalität gegenüber Säuren und Basen bieten.

5. Analytik und Reinigung ionischer Verbindungen

5.1. Analytik

Ionische Verbindungen stellen den organischen Chemiker immer wieder vor große Herausforderungen. Die normalerweise in der organischen Chemie synthetisierten Substanzen sind relativ unpolar und gut in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, jedoch schlecht in Wasser löslich. Für diese Moleküle steht eine Vielzahl verschiedener, bewährter Untersuchungstechniken zur Verfügung. Im Laufe der Jahre wurden sehr wirkungsvolle und vielseitige Trenntechniken entwickelt. Insbesondere die chromatographischen Verfahren ermöglichen die schnelle und effiziente Untersuchung kleinster Mengen komplexer Gemische. Die Dünnschichtchromatographie ist ein Paradebeispiel für eine einfache aber sehr effiziente Methode, die für die verschiedensten Anwendungen abgewandelt werden kann. Unpolare Moleküle sind nicht hygroskopisch, ihre Untersuchung mittels Elementaranalyse im Allgemeinen problemlos.^{157,200}

Im Rahmen dieser Arbeit wurden viele verschiedene ionische Verbindungen hergestellt. Für die Kontrolle der Reaktionen und die präparative Trennung waren manche der üblichen Techniken nicht oder nur eingeschränkt geeignet.^{112,201,202} Daher war es zuerst notwendig, geeignete Methoden zur Analytik der Reaktionsgemische zu entwickeln. Ohne die dadurch erhaltenen Informationen wäre die Identifikation von auftretenden Nebenprodukten, die darauf basierende Optimierung der Reaktionsbedingungen und die Entwicklung und Kontrolle von Reinigungsverfahren nicht möglich gewesen. Auch wenn viele der hier beschriebenen analytischen Techniken zur Charakterisierung von Reinsubstanzen verwendet werden, wird die Analytik wegen ihrer überragenden Bedeutung bei der Entwicklung der Reinigungsverfahren hier zuerst dargestellt.

Kristallstrukturanalyse Dies ist generell eine der vielseitigsten Analysetechniken, dies trifft auch in Bezug auf IF und andere polare Substanzen zu. Mit dieser Technik kann direkt die Konnektivität des Kations sowie die Stöchiometrie und Art der Anionen bestimmt werden. Das Problem liegt im Züchten der Kristalle, da viele der Verbindungen als Öl erhalten werden. Deren Kristallisation ist schwierig und nicht immer erfolgreich. Wenn Einkristalle ausreichender Qualität erhalten wurden,

konnten mit dieser Technik einige sehr überraschende Beobachtungen an den hergestellten Substanzen gemacht werden (siehe auch Kapitel 6 auf Seite 171).

Massenspektroskopie (MS) Ionische Verbindungen können sehr gut mittels ESI-MS detektiert werden. Dies ist daher auch eine der in dieser Arbeit am häufigsten angewendeten Methoden. Der Grund für die gute Detektion liegt in der permanenten Ladung des zu untersuchenden Moleküls und ihrer im Allgemeinen hohen Löslichkeit in Wasser/Acetonitril Gemischen.

Ionische Verbindungen lassen sich jedoch nicht mit MS-Methoden untersuchen, bei welchen die Probe vorher verdampft werden muss. Dies ist z.B. bei FAB oder EI-Techniken der Fall. Die Verwendung von MALDI sollte prinzipiell geeignet sein, es liegen aber dazu keine Erfahrungen mit IF vor.

NMR-Spektroskopie Die NMR spektroskopischen Untersuchungen werden von der ionischen Natur der zu untersuchenden Verbindungen nicht beeinflusst. Die schwierige Reinigung der Substanzen führt zu einem indirekten Problem für die NMR-Spektroskopie: die verunreinigten Proben ergeben sehr komplizierte Spektren. Die große Hygroskopizität vieler IF führt außerdem zu starken Wassersignalen wodurch die Empfindlichkeit der Messungen etwas reduziert wird. Durch Lyophilisieren mit D₂O kann dieses Problem reduziert werden. Einige ionische Verbindungen sind nur in hydroxylhaltigen Lösungsmitteln (Deuteriumoxid, Methanol) löslich. In diesen Fällen ist es nicht möglich, austauschbare Protonen zu detektieren.²⁰³

Elementaranalyse Da fast alle IF schwer zu reinigen und stark hygroskopisch sind, konnte nur in seltenen Fällen eine sinnvolle Elementaranalyse von ionischen Verbindungen erhalten werden. Dies traf auch auf Substanzen mit sauberem NMR-Spektrum und ESI-MS-Signal zu.

UV-Spektroskopie Kationen mit dem Methylimidazolmotiv können gut bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert werden. Die Detektion von Kationen mit einem Tetraalkylammoniummotiv ist mittels UV-Spektroskopie nicht möglich. Wasser, welches aufgrund der Hygroskopizität der Proben aufgenommen wird, stört bei $\lambda > 200$ nm nicht.

Chromatographische Methoden Für die analytische Anwendung kommen vor allem DC, GC und HPLC in Frage.

Dünnschichtchromatographie (DC) Diese Methode ist für ionische Verbindungen nur eingeschränkt verwendbar. Die zu Beginn dieser Arbeit hergestellten, kleinen und hochpolaren Verbindungen zeigten mit üblichen Eluenten einen R_f -Wert = 0 oder schmierten sehr stark, was den Einsatz der DC unmöglich machte. Die aus der Kupplung dieser kleinen, sehr polaren Moleküle an größere, unpolare Aminosäurederivate entstehenden Produkte können zum Teil mit gutem Erfolg mittels DC getrennt werden.

Gaschromatographie (GC) Aufgrund des im Allgemeinen nicht messbaren Dampfdrucks von IF ist diese Methode nicht für die Untersuchung dieser Substanzen geeignet.⁹⁹

Hochdruck Flüssigkeitschromatographie HPLC Da die IF auf Normalphasenmaterial bei der DC manchmal vollständig retardiert werden, ist diese Methode für IF nicht empfehlenswert. Einerseits sind die Trennsäulen teuer, falls diese also durch die IF blockiert wird, entsteht ein größerer Schaden. Zum anderen können IF Kieselgel auflösen, was die Säule beschädigen und eventuell zu einem Verstopfen von Leitungen nach der Säule führen kann.¹¹²

Reversed Phase (RP) Chromatographie ist teilweise geeignet, um IF zu untersuchen.²⁰¹ Verfügt das Kation selbst über ausreichend große und hydrophobe Bereiche, so können die IF getrennt werden. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Ionenpaarreagenzien. Bei diesen werden hydrophobe Anionen zur mobilen Phase der HPLC zugesetzt. Die mit dem polaren Kation entstehenden Ionenpaare sind deutlich hydrophober und zeigen oft eine höhere Retention an der C-18 Phase.

Kleine, hochpolare Moleküle lassen sich mit RP-HPLC nur eingeschränkt untersuchen. Für größere Moleküle mit ausreichend großen unpolaren Bereichen ist dies die Technik der Wahl.

5.2. Reinigung

Destillation Destillation von IF ist aufgrund ihres normalerweise nicht messbar kleinen Dampfdrucks im Regelfall nicht möglich.

Extraktion Diese Methode ist je nach Art der Verunreinigungen gut für die Reinigung von IF geeignet. Insbesondere in Wasser schlecht lösliche IF werden oft so gereinigt. In dieser Arbeit wurden ionische Verbindungen mit einer ausgeprägten Wasserlöslichkeit hergestellt. Diese Moleküle haben oft auch einen relativ unpolaren Rest (z.B. Aminosäurederivate mit Schutzgruppen in der Seitenkette). Daher zeigen sie in beiden Phasen eine gewisse Löslichkeit, eine effiziente Trennung ist so oft nicht möglich. Ein weiteres Problem ist die teilweise Wirkung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Verbindungen als Detergenz. In diesem Fall bilden sich stabile Emulsionen und die Ausbeute wird deutlich reduziert. Daher wurde diese Technik in der klassischen flüssig-flüssig Variante für die Aufarbeitung der Reaktionsgemische mit polaren Produkten nicht eingesetzt.

Kristallisation Diese Technik war, wenn es gelang ein kristallines Produkt zu erhalten, sehr effizient. Leider war das nur in wenigen Fällen möglich (siehe z.B. mehrfach geladener *Tag* und die Nicotinsäurederivate). Insbesondere die Ergebnisse bei den Nicotinsäurederivaten zeigen ein sehr schwer zu erkennendes Risiko der Umkristallisation auf. Es kann dabei zu Umwandlungen der Substanzen kommen, welche mit NMR und ESI-MS nicht detektiert werden können (Kapitel 6 auf Seite 171).

Fällen mit kaltem Diethylether Diese Methode stellt eine allgemeine und sehr effiziente Methode dar, um in Diethylether lösliche, unpolare Verbindungen (Edukte) von den polaren Produkten abzutrennen. Da sich die ionischen Verbindungen oft als Öl abschieden, erfolgte die Abtrennung der Etherphase durch Zentrifugation und anschließendem abdekantieren des Überstandes.

Säulenchromatographie mit Kieselgel Manche Verbindungen, die in der DC einen R_f von 0 zeigen, können trotzdem von Kieselgel eluiert werden. In Abhängigkeit der Verbindung gelingt dies entweder gar nicht, oder nur mit geringer Ausbeute oder relativ gut. Es ist jedoch dabei zu beachten dass IF das Kieselgel teilweise auflösen.¹¹² Diese ist dann in den IF kolloidal gelöst und kann gegebenenfalls nur schwer abgetrennt werden. Da diese Methode immer wieder sehr speziell angepasst werden muss, wurde sie zur Trennung ionischer Verbindungen nicht eingesetzt.

(Semi-)Präparative HPLC Diese Methode ist dann geeignet, wenn die Trennung mittels analytischer RP-HPLC ausreichend gut ist. Dies konnte in zumindest einigen Fällen gezeigt werden. Erstaunlich ist in diesem Zusammenhang die hohe Kapazität des Reprosil C18 Basic Säulenmaterials für ionische Verbindungen. Dieses RP-Material stellt eine extrem unpolare stationäre Phase dar. Rational würde erwartet, dass die Kapazität und Selektivität bei dieser Kombination gering ist. Die Wechselwirkung erfolgt in diesem Fall durch den hydrophoben Teil des Moleküls. Insbesondere bei den Aminosäurederivaten ist es daher notwendig, einen sauren Puffer zu verwenden, um die Carbonsäure zu protonieren.

Bei der Verwendung der präparativen HPLC ist zu berücksichtigen, dass diese Methode (je nach verwendeten Puffer) zu einem Anionenaustausch führt. Dies kann problematisch sein, falls die zu trennende Substanz mit dem Anion des Puffers deutlich schlechter löslich ist. Ist das Verhältnis Puffer / Substanz zu gering, kann es sein, dass der Anionenaustausch unvollständig erfolgt und am Ende ein Produktgemisch mit verschiedenen Anionen erhalten wird.

Festphasenextraktion Diese Technik ist eigentlich dazu gedacht, niedrig konzentrierte Analyte vor einer Messung aufzukonzentrieren (z.B. Anreicherung von Pestiziden in Wasser für die Rückstandsanalytik). Erstaunlicherweise ist diese Technik auch zur präparativen Trennung von ionischen Verbindungen geeignet. Voraussetzung ist, dass die Verbindungen ausreichend von dem C-18 Säulenmaterial absorbiert werden.

In der einfachsten Form wird die präparative FPE wie eine normale analytische FPE durchgeführt. Dabei wird zuerst die Kartusche durch Spülen mit Methanol und anschließend deionisiertem Wasser aktiviert. Das zu reinigende Produktgemisch wurde zuerst durch Fällung mit Diethylether von überschüssigen 1-Methylimidazol bzw. 1,2-Dimethylimidazol und nicht umgesetztem Edukt abgetrennt. Ausreichend wasserlösliche Produkte wurden nach dem Entfernen des Diethylethers mit Wasser auf die FPE-Kartusche aufgetragen. Anschließend wurde mit Wasser die erste Fraktion eluiert. Durch Eluation mit einer 1:1 (v/v) Mischung von Acetonitril/Wasser wurde die zweite Fraktion gewonnen. Je nach Polarität befindet sich das Produkt in einer der beiden Phasen. Die Kontrolle erfolgt am besten mit HPLC-MS. Auch in Wasser unlösliche Verbindungen lassen sich so trennen, wenn sie vorher aus einer Lösung von Acetonitril auf Cellulosepulver aufgezogen wurden. In Abbildung 5.1 auf der nächsten Seite ist dieser Aufbau gezeigt. Obwohl vom Hersteller empfohlen wird, die Kartuschen nur einmal zu verwenden, konnten diese im Allgemeinen wiederverwendet werden.

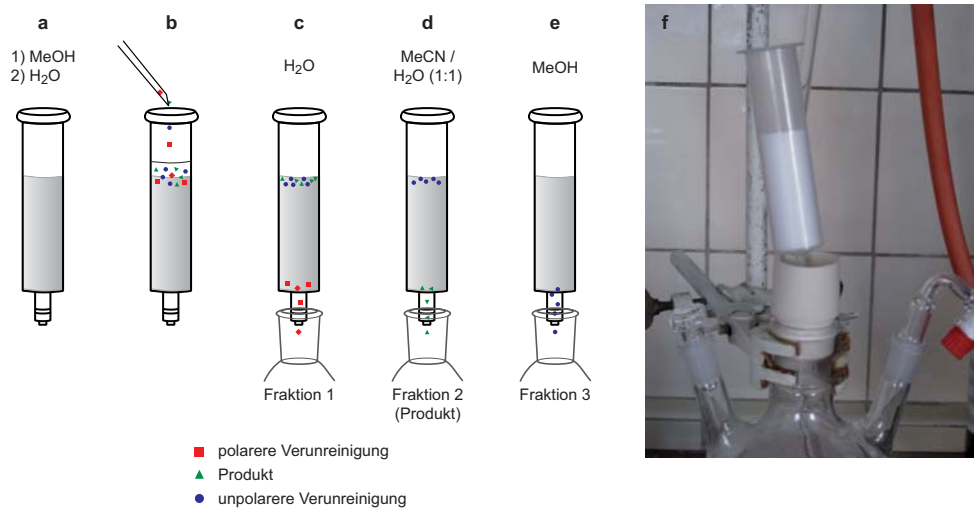


Abbildung 5.1.: Aufbau der FPE für die Extraktion in wenigen (2-3) Fraktionen: a) Konditionieren der Kartusche; b) Beladen der Kartusche mit der Probe; c) Eluieren mit reinem Wasser, die polarere Verunreinigung wird abgetrennt; d) Eluieren des Produkts; e) Regenerieren der Kartusche, unpolarere Verunreinigungen werden eluiert

Je nach Trennleistung kann es nötig sein, die Größe der einzelnen Fraktion zu verändern, mehrere Fraktionen zu sammeln, andere Eluentenmischungen zu verwenden oder die Trennung mit Hilfe von UV-Spektroskopie zu überwachen. Die FPE Kartuschen lassen sich gut in eine Mitteldruckchromatographieanlage (MPLC) integrieren, wenn sie mit einem Stopfen verschlossen werden. Die Zufuhr des Lösungsmittels erfolgt dann durch eine Kanüle, welche durch den Stopfen gestochen wird. Dabei handelt es sich im Prinzip um Umkehrphasen Chromatographie, die MPLC bietet in dieser Anordnung zwei Vorteile. Zum einen ist eine kontinuierliche Analyse des Eluats durch den integrierten UV-Detektor möglich. Der zweite Vorteil liegt in der automatischen Sammlung auch kleinerer Fraktionen mit variabler Größe. Durch die Steuerungseinrichtung der Anlage können auch je nach UV-Absorptionsintensität die Fraktionen automatisch gewechselt werden. Diese Variante ist in Abbildung 5.2 dargestellt.



Abbildung 5.2.: Kombination der FPE mit der MPLC. Gut ist die Cellulose über der Fritte der Kartusche zu erkennen. Die Cellulose wurde zum auftragen des in diesem Fall in Wasser nur wenig löslichen Produkts verwendet.

5.3. Zusammenfassung und Ausblick

Zu Beginn dieser Arbeit war eines der Hauptprobleme verlässliche Methoden für die Analytik der Reaktionsmischungen mit ionischen Produkten zu entwickeln. Durch den Einsatz von ESI-MS und Ausarbeiten der Bedingungen für die RP-HPLC konnte dieses Problem größtenteils gelöst werden. Jedoch ist es immer noch nicht ohne weiteres möglich, kleine und hochpolare Substanzen mittels RP-HPLC ausreichend zu trennen. In jedem Fall war die Detektion der Produkte möglich, auch wenn sie mit dem Injektionspeak eluierten. Im weiteren Verlauf änderten sich die analytischen Anforderungen immer mehr, der unpolare Teil der Zielmoleküle wurde größer und machte die Untersuchung mit RP-HPLC deutlich einfacher. Auch waren manche der zum Schluss hergestellten Moleküle so unpolar, so dass ihre Trennung mittels DC gelang. Da jedoch die HPLC-MS gegenüber der DC hinsichtlich Identifikation und Charakterisierung deutlich überlegen ist, ist diese Methode immer noch das Mittel der Wahl für die Reaktionskontrolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurden immer wieder seltene oder bis jetzt nicht beschriebene Nebenreaktionen beobachtet. Ohne den massiven Einsatz der HPLC-MS wäre es nicht möglich gewesen, diese Prozesse aufzuklären und geeignete Lösungsansätze zu entwickeln.

Mit den Erkenntnissen aus der analytischen RP-HPLC wurde die Trennung in den präparativen Maßstab übertragen. Selbst analytische Säulen zeigten eine außergewöhnlich große Kapazität für die Reinigung mancher dieser Verbindungen (wobei jedoch eine ausreichend große Retentionszeit Voraussetzung ist). Dabei konnte auch ein Nachteil der ionischen Natur der Produkte identifiziert werden, während der RP-HPLC Reinigung wurde das Anion ausgetauscht.

Aus den bei den Versuchen zur präparativen HPLC gewonnenen Erkenntnissen wurde die präparative Reinigung vieler der in Kapitel 2, 3 und 4 vorgestellten Produkte mittels FPE entwickelt. Dieses Ergebnis war zu Beginn etwas überraschend, da diese Technik eigentlich für die Anreicherung von in Spuren vorkommenden Analyten entwickelt wurde. Bis auf wenige Ausnahmen gelang es mit dieser Technik die Produkte im präparativen Maßstab zu reinigen. Dabei waren die Einfachheit der Durchführung (es wurden nur zwei oder drei Fraktionen gewonnen, was für die Trennung in vielen Fällen völlig ausreichte) und die milden Bedingungen große Vorteile. Durch Kombination dieser Technik mit einer MPLC-Anlage konnte die Leistungsfähigkeit noch erhöht werden.

Die Analyse und präparative Trennung kleiner, hochpolarer Moleküle war immer schwierig. Insbesondere die Trennung im präparativen Maßstab wäre für die Lösung mancher Probleme im Bereich der säurelabilen Schutzgruppen von großer Be-

deutung (siehe auch 4.2 auf Seite 133). Eine Möglichkeit bietet hier vielleicht die Trennung mit Cellulose als stationärer Phase. Dafür sind aber systematische Untersuchungen an verschiedenen Analyten notwendig. Teilweise konnten gute Ergebnisse erzielt werden, in anderen Fällen kam es aus noch unbekanntem Gründen zu völligen Fehlschlägen. Ein anderer möglicher Ansatz zur Vereinfachung der Analytik kleiner ionischer Substanzen ist die Verwendung von Ionenpaarreagenzien für die HPLC. Dazu liegen bis jetzt noch keine Erkenntnisse vor.

Ein Gebiet, welches auch noch systematisch bearbeitet werden sollte, ist die Bestimmung der Kapazität der FPE-Kartuschen. Diese ist offensichtlich substanzabhängig, für weitergehende Arbeiten mit polaren Verbindungen wäre die Kenntnis dieses Parameters sehr hilfreich, um unnötige Verluste bei der Reinigung zu vermeiden.

6. Untersuchungen an Nicotinsäurederivaten

6.1. Nicotinsäurederivate als Katalysator

6.1.1. Nicotinsäurederivate in enzymatischen Reaktionen

Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) ist ein in der Natur häufig für Reduktionen und Oxidationen durch Dehydrogenasen verwendeter Cofaktor.²⁰⁴ Bei diesen Redoxreaktionen handelt es sich zum Beispiel um die stereoselektive Reduktion von Ketonen beziehungsweise die Oxidation chiraler Alkohole. Für diese Reaktionen muss der Cofaktor in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden, daher ist ein effizientes Regenerationssystem essentiell.

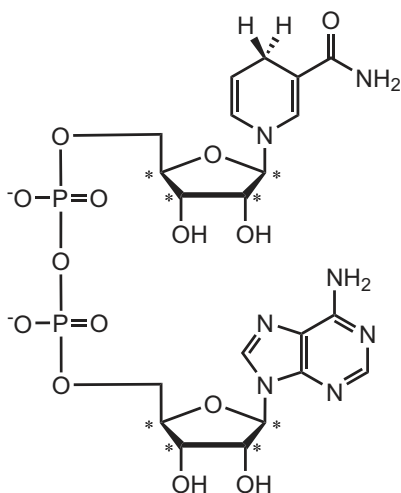


Abbildung 6.1.: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) in der reduzierten Form, chirale Kohlenstoffatome sind mit einem Stern markiert

Wie aus Abbildung 6.1 ersichtlich, ist der Cofaktor aufgrund der Riboseeinheiten chiral. Auch das für die Katalyse notwendige Enzym stellt eine chirale Umgebung dar. Durch die Kombination der beiden Partner wird die chirale Information auf das Substrat übertragen.

6.1.2. Nicotinsäurederivate als Organokatalysatoren

Die große biologische Bedeutung des Cofaktors NADH veranlasste viele Arbeitsgruppen sich mit dieser Verbindung zu beschäftigen. Allgemein laufen die Reduktions- und Oxidationsreaktionen des NADH nach dem in Abbildung 6.2 gezeigten Schema ab.

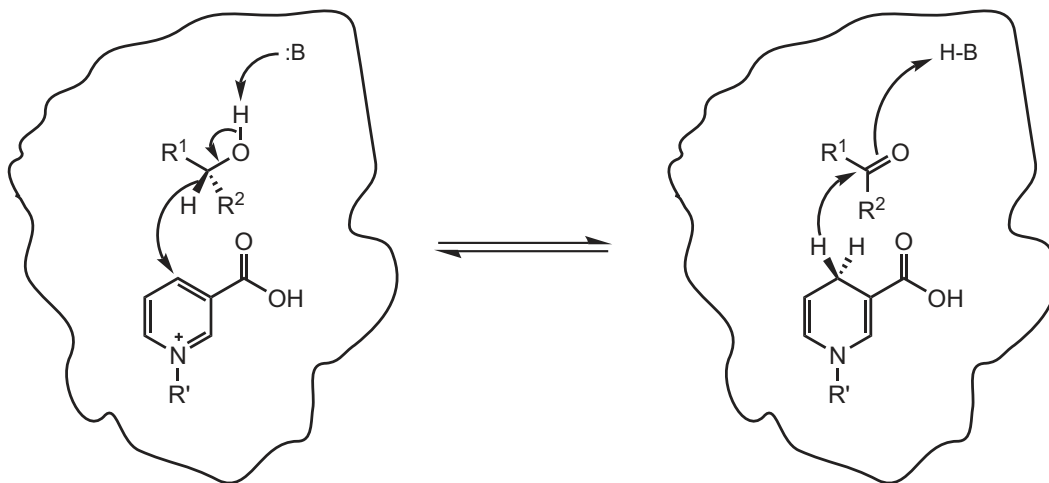


Abbildung 6.2.: Mechanismus der stereoselektiven Reduktion und Oxidation von NADH und dem Substrat

Während zuerst die Aufklärung der Funktion und Mechanismen der Katalyse eine große Rolle spielten, wurde in den letzten Jahren immer wieder versucht Enzymmimetika herzustellen.

Am Ende des 20. Jahrhunderts wurde die Aufmerksamkeit der Chemiker auf das Gebiet der Organokatalyse gelenkt. Unter anderem wurden verschiedene Coenzyme auf ihre Verwendbarkeit als Organokatalysatoren untersucht.^{205–209} Ein großer Durchbruch ist dabei noch nicht erzielt worden, in Einzelfällen wurden aber schon sehr beeindruckende Aktivitäten und Selektivitäten beobachtet. Im Allgemeinen wurde versucht, dass achirale Coenzym kovalent an chirale Moleküle zu knüpfen. Dadurch sollte eine stereoselektive Reaktion ermöglicht werden. So konnte z.B. mit einem Konstrukt aus einem alkylierten Nicotinsäurederivat und verschiedenen Aminosäuren eine stereoselektive Reduktion von Ketonen erzielt werden (Abb. 6.3). Dabei waren der Enantiomerenüberschuss noch nicht besonders hoch (33% ee, 99% Ausbeute), es konnte aber gezeigt werden, dass die Aminosäure einen Einfluss auf die Reaktivität und Selektivität der Reaktion hat (Abb. 6.4).²¹⁰

Da die Amidbindung der Nicotinsäure relativ leicht durch Basen gespalten werden kann, ermöglicht dies eventuell die Verwendung von Nicotinsäurederivaten als *Tag*,

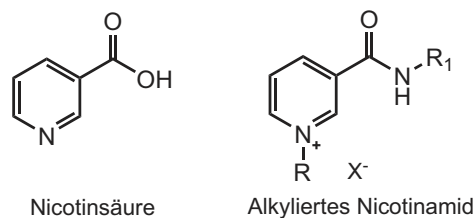


Abbildung 6.3.: Die freie Nicotinsäure und ihr N-Alkylierungsprodukt an ein Amin (Peptid) gekuppelt

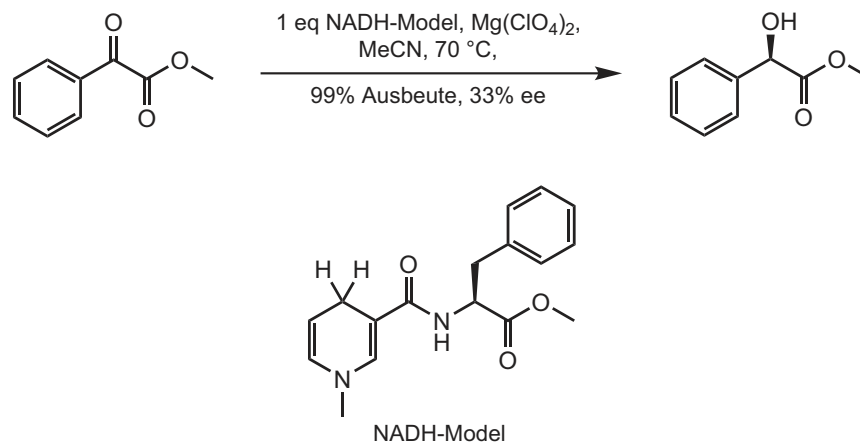


Abbildung 6.4.: Reduktion von Phenylglyoxylsäuremethylester mit einem NADH-Model zu R(-)-Mandelsäuremethylester²¹⁰

um die Löslichkeit von schwerlöslichen Peptiden in Wasser zu erhöhen oder einzelne Aminosäuren für die Peptidsynthese in Wasser ausreichend löslich zu machen.

6.2. Synthese und Untersuchung von Nicotinsäurederivaten

6.2.1. Synthese der Nicotinsäurederivate

Um Nicotinsäure für die Organokatalyse oder als ionischen *Tag* an Peptide kuppeln zu können, musste erst ein geeignetes N-Alkylderivat synthetisiert werden.^{211,212} Als Startmaterial bot sich die Nicotinsäure an, die freie Carbonsäure könnte dann für die Acylierungsreaktion mit dem Peptid verwendet werden.

Die Synthese des Nicotinsäurederivats **109** erfolgte mit guter Ausbeute (Abb. 6.5). Diese Verbindung ist gut in DMF löslich und lässt sich aus Methanol und Wasser umkristallisieren.

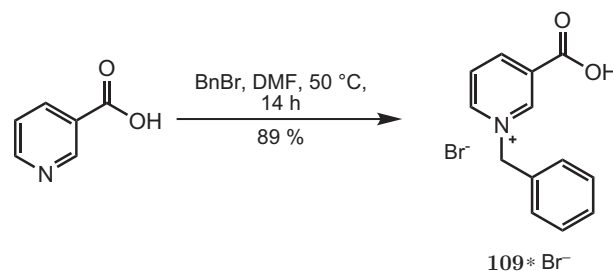


Abbildung 6.5.: Synthese des Nicotinsäurederivats **109·Br⁻**

Bei den anschließenden Versuchen, das Nicotinsäurederivat **109·Br⁻** an ein festphasengebundenes Peptid zu kuppeln, gelang es nicht mehr, das Nicotinsäurederivat in DMF zu lösen. In der Regel erfolgt die Kupplung von Säuren an Amine an der festen Phase in DMF oder Dichlormethan unter Zusatz von Kupplungsreagenzien. Dazu ist eine ausreichende Löslichkeit der zu kuppelnden Säure in dem verwendeten Lösungsmittel notwendig. Das sich das Nicotinsäurederivat **109·Br⁻** in DMF nicht ausreichend löste, überraschte, da es in einer homogenen Reaktion in DMF gebildet wurde. Während der Reaktion und nach dem Abkühlen blieb das Nicotinsäurederivat **109** im DMF gelöst, es gab keinerlei Niederschlag oder Trübung. Die Konzentration der Lösung betrug dabei ca. 0,56 M, wie aus der eingesetzten Stoffmenge und der Lösungsmittelmenge berechnet werden kann. Solch eine Löslichkeit in DMF sollte ausreichend für die Kupplung an das Peptid sein.

Um die Löslichkeit in DMF zu erhöhen, wurde auf das Wissen über IF zurückgegriffen. Eine gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln kann durch die Kombination des organischen Kations mit dem Hexafluorophosphatanion erreicht werden. Daher wurde die Anionenmetathese mit KPF₆ in Wasser durchgeführt (Abb. 6.6).

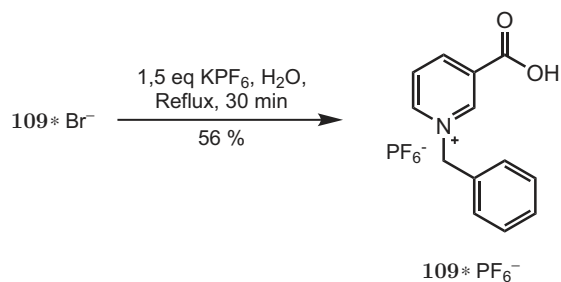


Abbildung 6.6.: Anionenaustausch am Nicotinsäurederivat **109**

Das Nicotinsäurederivat mit dem Hexafluorophosphatanion ($109 \cdot \text{PF}_6^-$) ist erstaunlicherweise auch nicht ausreichend in DMF löslich, um für die Kupplung an festphasengebundene Peptide verwendet werden zu können. Da dies im Hinblick auf die ursprüngliche Synthese des Nicotinsäurederivats in einer homogenen Lösung in DMF sehr überraschend ist, wurden die erhaltenen Nicotinsäurederivate genauer untersucht.

6.2.2. Analyse der umkristallisierten und nicht umkristallisierten N-alkylierten Nicotinsäurederivate

Das direkt nach der Reaktion erhaltene Produkt $109 \cdot \text{Br}^-$ war laut Elementaranalyse und Differential Scanning Calorimetry (DSC) eine reine Substanz.²⁰⁰ Der Schmelzpunkt betrug $175,1 \text{ }^\circ\text{C}$, die Schmelzenthalpie $85,1 \text{ J/g}$. Der mittels Thermogravimetrie bestimmte Zersetzungspunkt lag bei ca. $190 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sowohl $109 \cdot \text{Br}^-$ als auch $109 \cdot \text{PF}_6^-$ konnten in kristalliner Form erhalten werden. Die zum Umkristallisieren verwendete Lösung war stark sauer ($\text{pH} < 1$) und mit Silbernitrat konnten Bromid-Ionen nachgewiesen werden. Bei der Röntgenstrukturanalyse wurde festgestellt, dass eine andere chemische Spezies als erwartet auskristallisierte. Je die Hälfte der Kationen wandelte sich in ein Betain um. Dadurch liegen im Kristallgitter zwei verschiedene Spezies vor: eine 1:1 Mischung des erwarteten Nicotinsäurederivats mit einem Bromidion vermischt mit dem Betain.

Das Nicotinsäuresalz mit dem Hexafluorophosphat zeigte dieselbe Anordnung im Kristallgitter.

Der mittels DSC ermittelte Schmelzpunkt des durch umkristallisieren erhaltenen Nicotinsäurederivats $109 \cdot \text{Br}^-_{Umk}$ lag bei $195,6 \text{ }^\circ\text{C}$. Da sich die Substanz während des Schmelzens zu zersetzen begann, konnte die Schmelzenthalpie nicht exakt bestimmt werden. Die Schmelzenthalpie des umkristallisierten Nicotinsäurederivats liegt aber

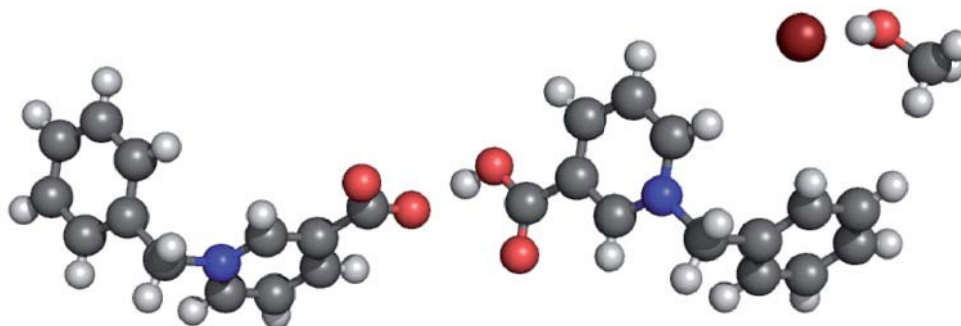


Abbildung 6.7.: Ergebnis der Kristallstrukturanalyse des umkristallisierten Nicotinsäurederivats $109 \cdot \text{Br}^-_{Umk}$

über der des nicht umkristallisierten Produktes. Dies deutet darauf hin, dass das Kristallgitter der sich nach dem Umkristallisieren gebildeten Substanz stabiler ist als die des nicht umkristallisierten Nicotinsäurederivats. Das würde auch die geringere Löslichkeit des umkristallisierten N-alkylierten Nicotinsäurederivats erklären. Sowohl NMR- als auch Massenspektroskopie gaben vor und nach dem umkristallisieren sehr ähnliche Ergebnisse, anhand dieser Daten konnte kein Unterschied zwischen den Nicotinsäurederivaten festgestellt werden.

6.2.3. Diskussion des Ergebnisses

Das direkt aus der Reaktion erhaltene Nicotinsäurederivat $109 \cdot \text{Br}^-$ ist eine ausreichend reine Substanz. Diese Form des Nicotinsäurederivats **109** ist in DMF löslich und kann für Kupplungen an Peptide verwendet werden. Durch die Umkristallisation findet eine Stoffumwandlung statt. Die neu gebildete Spezies $109 \cdot \text{Br}^-_{Umk}$ hat zwar das selbe Kation, das Verhältnis bzw. die Natur des Anions hat sich aber verändert (Abb. 6.7).

Auffallend ist die exakte 1:1 Stöchiometrie des unveränderten Nicotinsäuresalzes und dem Betain in der umkristallisierten Substanz. Diese neue Substanz hat neben einer anderen stofflichen Zusammensetzung auch einen anderen Schmelzpunkt. Außerdem wird das Lösungsverhalten auffallend verändert. Das umkristallisierte N-alkylierte Nicotinsäurederivat ist in DMF praktisch nicht mehr löslich, und damit für Kupplungen an Peptide nicht geeignet.

Die Kupplung des nicht umkristallisierten Nicotinsäurederivats an ein festphasenge-

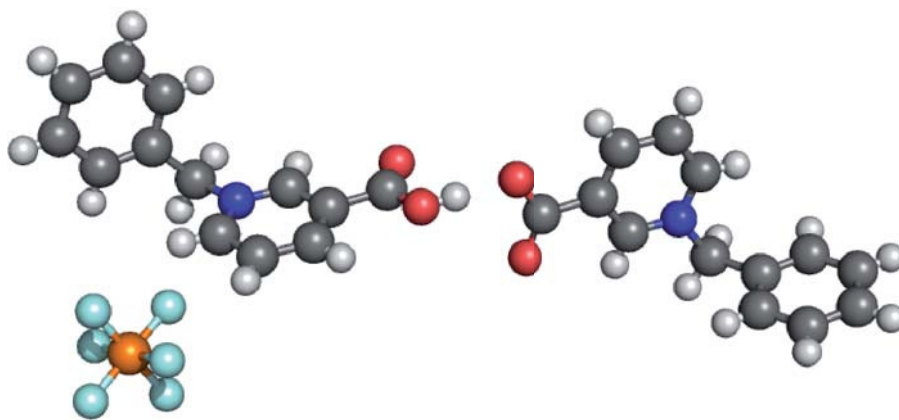


Abbildung 6.8.: Ergebnis der Kristallstrukturanalyse des umkristallisierten Nicotinsäurederivats nach dem Anionenaustausch $109 \cdot \text{PF}_6^-$ *Umk*

bundenen Peptid war erfolgreich. Mittels HPLC-MS wurde das gewünschte Peptid mit der N-terminal gekuppelten Nicotinsäure nachgewiesen, das Rohprodukt enthält aber noch Verunreinigungen (Abb. .

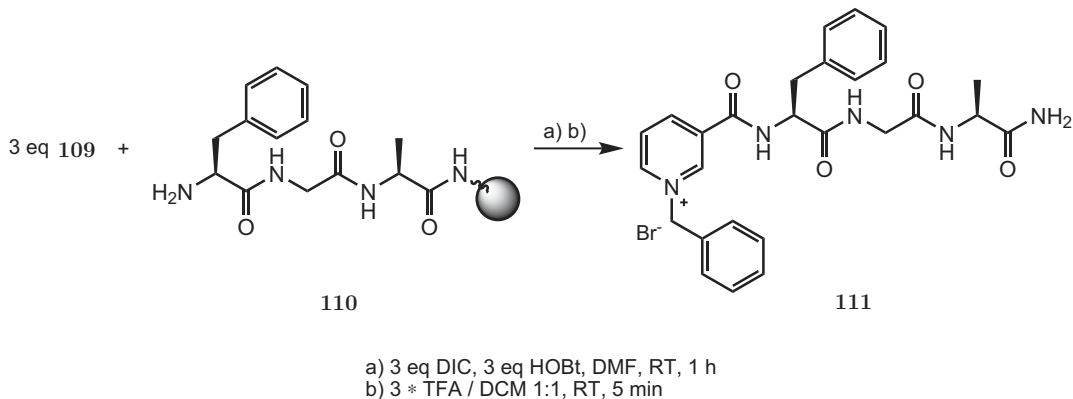


Abbildung 6.9.: Kupplung des Nicotinsäurederivat **109** an ein Peptid

Damit ist das Problem vom Standpunkt der Kupplung von Nicotinsäurederivaten an Peptide zumindest vorläufig gelöst. Es zeigte sich dabei, dass die Analytik ausschließlich mit NMR und MS für ionische Verbindungen manchmal nicht ausreichend ist. Die hier beobachtete Stoffumwandlung bietet ein Beispiel für den Einfluss des Anions auf die Eigenschaften der ionischen Verbindungen. Der Austausch des Bromids gegen ein Carboxylation in der umkristallisierten Nicotinsäurederivat beeinflusst so-

wohl deren Schmelzpunkt als auch ihre Löslichkeit.

Beschreibt man diese Reaktion mit einer exakten, ausgeglichenen Reaktionsgleichung, so fällt etwas sehr erstaunliches auf:

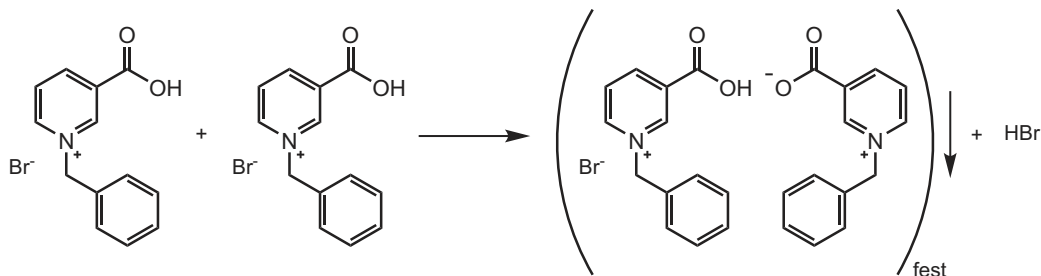


Abbildung 6.10.: Brutto-Reaktionsgleichung für die Bildung des umkristallisierten Nicotinsäurederivats

Bei der Umwandlung handelt es sich im Prinzip um eine Säure-Base Reaktion. Die im Allgemeinen als mittelstarke bis schwache Säure angesehene Carbonsäurefunktion protoniert ein Bromidion. Dieses ist aber eine sehr schwache Base. Der pK_S -Wert von Essigsäure als Beispiel einer Carbonsäure liegt bei 4,74, der von Bromwasserstoffsäure liegt bei -9.¹⁰⁹ Dies ist ein Unterschied von mehr als 13 logarithmischen Einheiten. Ein weiteres auffälliges Merkmal ist, dass die Umwandlung genau bis zu einer Stöchiometrie von 1:1 geht. Dies würde bedeuten, dass das Nicotinsäurederivat scheinbar die selbe Säurestärke wie Bromwasserstoffsäure besitzt.

Die Aussage der Umwandlungsgleichung ist also, dass die relativ gesehen schwache Carbonsäure die sehr schwache Base Bromid protoniert und dabei die viel stärkere Säure Bromwasserstoff bildet.

Man könnte versuchen, den starken Anstieg der scheinbaren Acidität mit der positive Ladung des alkylierten Nicotinsäurerings zu erklären. Solch eine positive Ladung sollte das sich bei der Deprotonierung bildende Anion stabilisieren, somit also die Acidität erhöhen. Dies wurde auch für Carbonsäuren, welche an eine Methylimidazolokation gebunden waren, festgestellt. In diesen Fällen war die Acidität aber nur um ca 3,5 logarithmische Einheiten erhöht.¹⁰⁷ Der in diesem Fall beobachtete Anstieg der scheinbaren Acidität aufgrund des einfach positiv geladenen Heterozyclus ist sehr erstaunlich.

6.3. Untersuchung des Effekt des Kristallgitters

Um dieses Phänomen genauer zu analysieren, wurde eine Modellverbindung synthetisiert. Dazu wurde erst *m*-Bromtoluolsäure hergestellt und dann mit Pyridin zur ionischen Modellverbindung **113** umgesetzt. (Abb. 6.11).²¹³

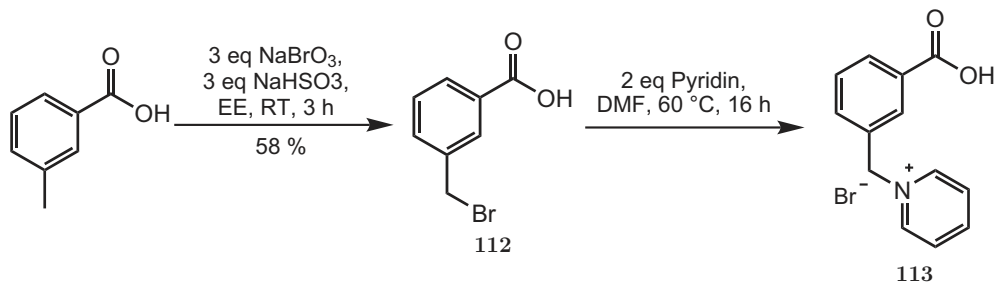


Abbildung 6.11.: Synthese der zum Nicotinsäurederivat analogen Modellverbindung **113**

Diese Modellverbindung ist dem Nicotinsäurederivat **109** sehr ähnlich. Der einzige Unterschied liegt darin, dass die positive Ladung sich nicht mehr im selben Ring wie die Carbonsäure befindet. Die Modellverbindung **113** wurde aus MeOH kristallisiert. Auch in diesem Fall konnte mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse die Struktur und Stöchiometrie bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die Carbonsäure nicht deprotoniert wurde und es lag eine 1:1 Stöchiometrie zwischen Kation und Bromid vor.

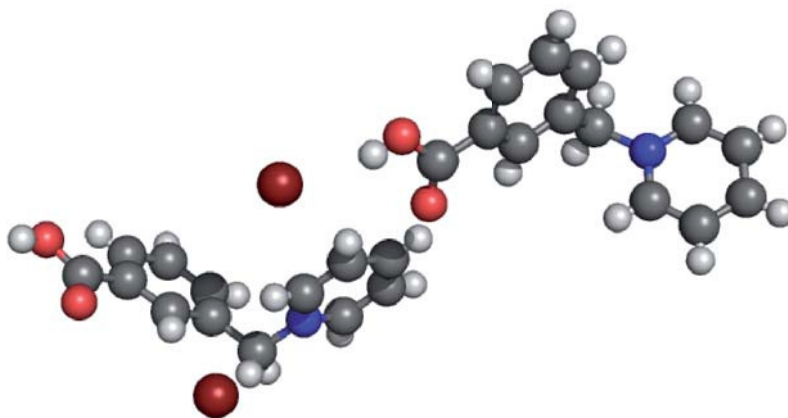


Abbildung 6.12.: Ergebnis der Kristallstrukturanalyse der Modellverbindung **113**

Die Struktur des Nicotinsäurederivats **109** ist der Modellverbindung sehr ähnlich. Auch wenn die einzelnen Strukturelemente miteinander verglichen werden, ergibt sich

eine große Ähnlichkeit, was Bindungslängen und Winkel betrifft. Der markanteste Unterschied ist die unterschiedliche Anordnung der aromatischen Ringe aufgrund der Rotation um die Einfachbindungen zwischen ihnen. Die ähnliche Geometrie legt nahe, dass beide Verbindungen im jeweils anderen Kristallgitter Platz finden würden.

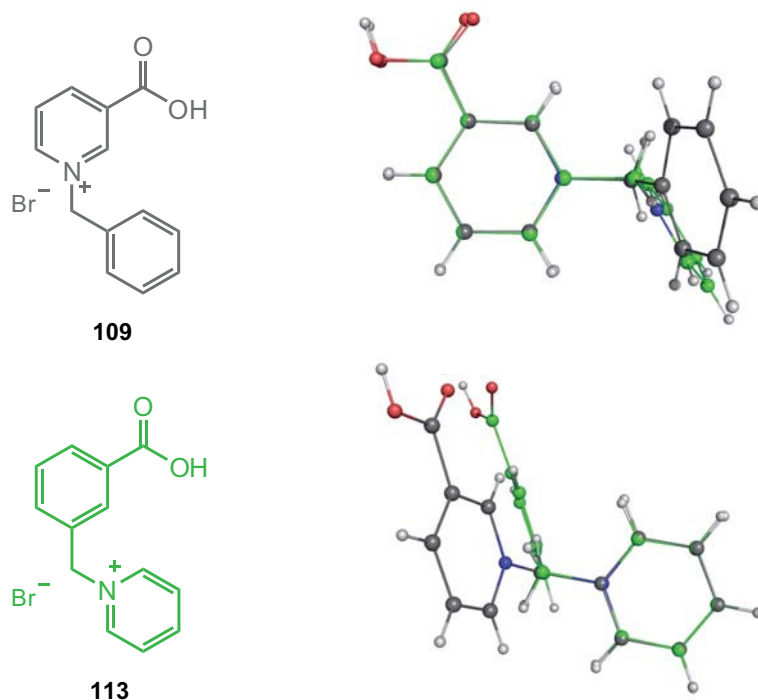


Abbildung 6.13.: Vergleich der Kristallstrukturanalyse des Nicotinsäurederivats $109 \cdot \text{Br}^-$ und der Modellverbindung **113** durch Überlagerung der aromatischen Ringe mit dem Programm PyMOL

Der Vergleich der Geometrie des Nicotinsäurederivats mit der Modellverbindung deutet darauf hin, dass neben der Stabilität des Kristallgitters der zur Carbonsäure konjugierte Heterocyclus Anteil an der erstaunlichen, scheinbaren Acidität hat. Wäre mit der Modellverbindung die gleiche Stöchiometrie wie im Falle der umkristallisierten Verbindung $109 \cdot \text{Br}^-$ gefunden worden, so hätte man den Schluss ziehen können, dass die Stabilität des Kristallgitters für die hohe scheinbare Acidität verantwortlich ist.

6.4. Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde das N-alkylierte Nicotinsäurederivat **109** synthetisiert. Die Kupplung dieses Nicotinsäurederivats an Peptide brachte unerwartete Probleme: während das nicht umkristallisierte Nicotinsäurederivat durchaus an ein festphasengebundenes Peptid gekuppelt werden konnte, war das umkristallisierte Nicotinsäurederivat **109** dafür in DMF zu wenig löslich. Dies stand in einem scharfen Gegensatz zu dem bei der Synthese des Nicotinsäurederivats **109** in DMF gemachten Beobachtung, welche in homogener Lösung erfolgte.

Durch Untersuchung des nicht umkristallisierten und des umkristallisierten Nicotinsäurederivats **109** mit DSC konnte der Nachweis erbracht werden, dass es sich um zwei verschiedene Verbindungen handelt. Diese zeigen sehr ähnliche NMR- oder ESI-MS-Spektren, was die Unterscheidung erschwert. Dies bedeutet, dass es während der Umkristallisation zu einer Stoffumwandlung kam. Während das direkt nach der Reaktion aus der DMF-Lösung erhaltene Nicotinsäurederivat durch Elementaranalyse charakterisiert wurde, konnte vom umkristallisierten Nicotinsäurederivat eine Einkristall-Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden. Diese ergab, dass sich eine Mischverbindung mit teilweise deprotonierter und teilweise protonierter Nicotinsäure gebildet hatte. Damit konnte die Frage beantwortet werden, warum das primär erhaltene N-alkylierte Nicotinsäurederivat in DMF löslich ist und an Peptide gekuppelt werden kann, während das mit dem umkristallisierten Nicotinsäurederivat nicht mehr möglich ist.

Dieses Beispiel zeigte sehr eindrucksvoll, welche Probleme bei der Charakterisierung von ionischen Verbindungen auftreten können. Außerdem wurde der besondere Wert der Röntgenstrukturanalyse für die Untersuchung von ionischen Verbindungen demonstriert.

Die Stoffumwandlung während der Umkristallisation stellt ein überraschendes Phänomen dar. Die Bildung dieser neuen Substanz geht mit der Protonierung von Bromidionen einher, welche sehr schwache Basen sind. Die Protonen kommen offensichtlich von der eher mäßig starken Nicotinsäure. Es ergab sich durch die exakte 1:1 Stöchiometrie ein schweibarere pK_S -Wert von -9, was einer Änderung um 14 Größenordnungen bedeutet. Dadurch ergibt sich die Frage wie dieser überraschende Anstieg der scheinbaren Säurestärke erklärt werden kann. Es ist zwar in der Literatur dokumentiert, dass positive Ladungen in der Nähe von Carbonsäuren deren Acidität erhöhen, die dabei normalerweise beobachteten Änderungen von ca. 3 pK_S Einheiten sind aber deutlich kleiner als die in dem Fall des N-alkylierten Nicotinsäurederivats **109** beobachtete Änderung um 14 pK_S Einheiten.¹⁰⁷

Um zu untersuchen, ob Kristallpackungseffekte bei diesem Phänomen dominieren, wurde ein dem Nicotinsäurederivat **109** analoges Benzoessäurederivat **113** als Modellverbindung hergestellt und davon ein Einkristall gezüchtet. Es gelang die Röntgenstrukturanalyse an einem Einkristall dieser Modellverbindung durchzuführen. Obwohl die Geometrie der Modellverbindung und des N-alkylierten Nicotinsäurederivats sehr ähnlich ist, was den Platzbedarf und die Bindungswinkel angeht, ist bei der Modellverbindung keine analoge Stoffumwandlung zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass Kristallpackungseffekte nicht die einzige Triebkraft für dieses faszinierende Phänomen sind.

Teil III.

Experimenteller Teil

7. Experimenteller Teil

7.1. Allgemeines

7.1.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs	absolut
Absch.	Abschnitt
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
Ala	Alanin
AS	beliebige Aminosäure
Asp	Aspartat
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
tBu	<i>tert</i> -Butyl
BuLi	n-Butyllithium
bzw.	beziehungsweise
Cbz	Carbobenzoxy (Schutzgruppe)
°C	Grad Celsius
d	Tag
d	Duplett (NMR)
DAD	Dioden Array Detector
DBP	Dibrompropan
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMIM	1,2-Dimethylimidazol
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EDC	N'-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid
ϵ	Extinktionskoeffizient
ee	Enantiomerenüberschuss
EI	Electron Impact Ionisation
EIC	Extracted Ion Chromatogramm
eq	Gleichung
ESI	Electrospray Ionisation
Et	Ethyl
EE	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FAB	Fast Atom Bombardment Ionisation
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FPE	Festphasenextraktion
FT-IR	Fouriertransform-Infrarotspektroskopie
g	Gramm
GC	Gaschromatograph / Gaschromatographie
ges.	gesättigt
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
h	Stunde
Hmb	2-Hydroxy-4-methoxybenzyl
HOBT	Hydroxybentzotriazol
HONB	<i>N</i> -Hydroxy-5-norbonen-2,3-dicarbonsäureimid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HV	Hochvakuum
IF	Ionische Flüssigkeit
Im	Imidazol
iPrOH	Isopropanol
IS	Interner Standard
<i>J</i>	Kopplungskonstante
k	Geschwindigkeitskonstante
LM	Lösungsmittel
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin
M	Molar

m	milli (10^{-3})
m	multipllett (NMR)
m/z	Verhältniss von Masse zu Ladung
M ⁺	Molekülion
mAU	milli arbitrary units
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MIM	1-Methylimidazol
2-MIM	2-Methylimidazol
min	Minute
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
MS	Massenspektrometrie
MsCl	Methansulfonylchlorid
MW	Mikrowelle
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NP	Normalphase
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
Pd(OH) ₂ /C	Palladium(II)hydroxid auf Aktivkohle (Pearlmans Katalysator)
PEG	Polyethylenglykol
PPh ₃	Triphenylphosphin
ppm	parts per million
Pr	Propyl
Pro	Prolin
PS	Polystyrol
Pt/C	Platin auf Aktivkohle
PyBOP	Benzotriazolyl-1-oxy-tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
quant.	quantitativ
RF	Response Factor
R _f	Retentionsfaktor (DC)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Ser	Serin
(SucO) ₂ CO	Di-(<i>N</i> -hydroxysuccinimid)carbonat
t	Zeit
t	triplett (NMR)

TEGBz	4-(3,6,9-Trioxadecyl)oxybenzylalkohol
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TMS-	Trimethylsilyl
TMS	Tetramethylsilan (NMR)
t_R	Retentionszeit
Trp	Tryptophan
TsCl	p-Toluolsulfonsäurechlorid
TSIL	Task Specific Ionic Liquid
Ts-OH	p-Toluolsulfonsäure
Tyr	Tyrosin
μ	mikro (10^{-6})
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VIS	Visible (sichtbar)
Z	Carbobenzy (alternative Bezeichnung Cbz)

7.1.2. Geräte und Materialien

Analytik Für die Aufnahme der NMR-Spektren wurden ein Bruker DPX 500 Spektrometer (^1H , ^{13}C , ^31P) mit BBI-Probenkopf und Z-Gradient sowie ein Bruker DPX 400 Spektrometer (^1H , ^{13}C , ^{19}F) mit QNP-Probenkopf verwendet. Die chemische Verschiebung ist in ppm angegeben. Als Referenz für die ^1H und ^{13}C -Spektren wurde entweder das Lösungsmittelsignal oder als interner Standard TMS bzw. in Wasser DSS verwendet. Alle Spektren wurden mit dem Programm xwinNMR aufgenommen und mit der Software MestreNova ausgewertet.

ESI-Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT LCQ, Bruker Esquire 3000 oder Bruker Daltonics Micro TOF aufgenommen. Für die Aufnahme von EI-Massenspektren wurde ein Hewlett Packard 5970 A Detektor oder ein Finnigan MAT95Q Spektrometer verwendet. FAB Spektren wurden mit einem Finnigan MAT 8400 Spektrometer aufgenommen.

Elementaranalysen wurden von Herrn W. Kirsch mit einem Perkin Elmer 240 Analyser angefertigt. Angegeben ist der Mittelwert zweier unabhängiger Messungen.

IR-Spektren wurden mit einem Perkin Elmer FT-IR 1600 und einem FT-IR RX 1 Geräts des selben Herstellers aufgenommen.

Die Röntgenstrukturanalysen wurden von Frau Dr. Sylvia Schaffner und Herrn Markus Neuburger durchgeführt.

Trennungen Für GC-Analysen kam ein Hewlett Packard 5890 Series II Gaschromatograph mit einer semipolaren Säule (25 m * 0,2 mm, 5% PheMeSi) von Machery & Nagel zum Einsatz. Die Detektion erfolgte durch MS.

RP-HPLC Analysen wurden mit einem Agilent 1100 oder einem Shimadzu Gerät durchgeführt. Zur Detektion wurde in beiden Fällen ein DAD-Detektor eingesetzt, die Agilent-HPLC verfügte zudem über einen MS-Detektor. Als Trennsäule wurde im Allgemeinen eine ReproSil Pur 100 BASIC-C18 Säule der Dimension 5 μm (50 \times 3 mm) verwendet. Als Laufmittel wurden Wasser mit 0,1% TFA (A) und Acetonitril mit 0,1% TFA (B) eingesetzt. Zur Trennung wurde folgender Gradient verwendet (7.1a): 15% B zu 85% B in 10 min, 85% B zu 15% B in 30 s, 15% B für 4,5 min. Für den Racemisierungstest wurde folgender Gradient verwendet (7.1b): 20% B zu 60% B in 15 min, 60% B zu 20% B in 30 s, 20% B für 4,5 min.

NP-HPLC Analysen wurden mit einer Shimadzu Gerät mit DAD-Detektor durchgeführt. Als Trennsäule wurde eine Chirapak-Säule verwendet.

Für Trennungen mittels MPLC wurde ein Gerät der Firma Büchi (C-600 Serie) mit UV Detektor und Fraktionssammler verwendet. Als Laufmittel wurden Wasser (A) und Acetonitril (B) mit den Gradienten 1 oder 2 eingesetzt. Gradient 1 (7.2a): 100%

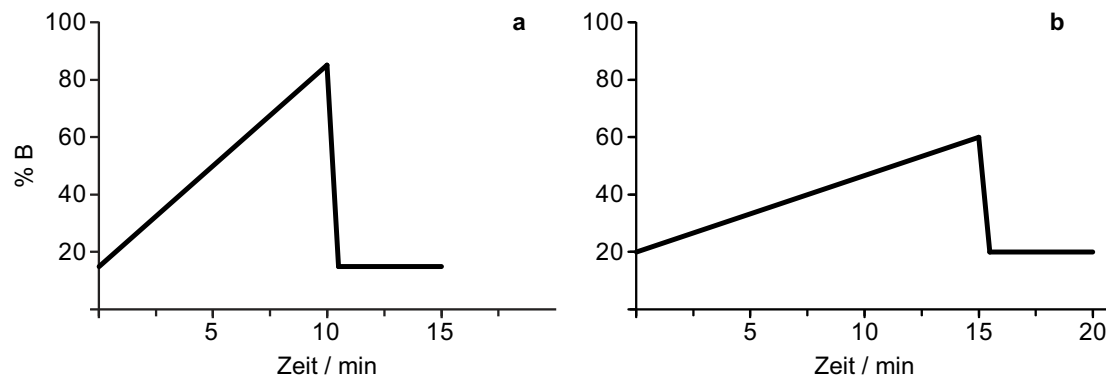


Abbildung 7.1.: Gradienten für die Trennung mit RP-HPLC (a) und den Racemisierungstest (b)

B für 7 min, 100% B zu 50% B in 20 min, 0% B für 8 min. Gradient 2 (7.2b): 100% B für 15 min, 100% B zu 50% B in 20 min, 0% B für 10 min.

Für die FPE wurden C-18 Sep Pak Kartuschen von Waters verwendet. Die präpre-

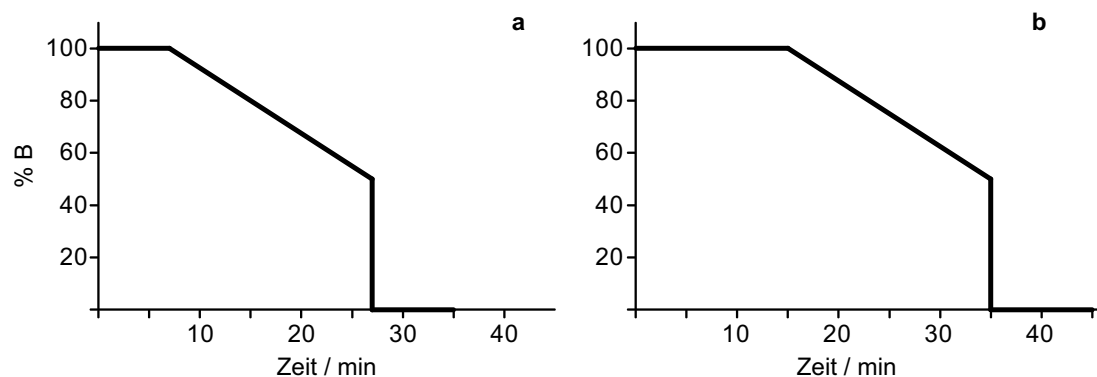


Abbildung 7.2.: Gradienten 1 (a) und 2 (b) für die Trennung mit der MPLC

parative Trennung mittels Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel 60 (Korngröße 40-63 μm) von Merck durchgeführt. Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten verwendet. Die Verbindungen wurden mittels UV (254 nm), bedampfen mit I₂ oder mit KMnO₄ Tauchbädern detektiert.

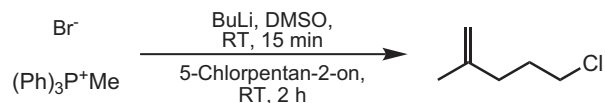
Chemikalien Alle Chemikalien für die Synthesen wurden von Fluka, Sigma, Aldrich, Acros und VWR in hoher Reinheit bezogen. Soweit nicht anders angegeben, wurden sie ohne weitere Reinigung direkt eingesetzt. Aminosäuren und Harze für die Festphasensynthese wurden von Novabiochem und Bachem bezogen. Absolute Lösungsmittel wurden von Fluka (puriss absolut, über Molsieb) geliefert. Die technischen Lösungsmittel für die präparative Säulenchromatographie und analytische

Dünnschichtchromatographie wurden vor der Verwendung destilliert.

7.2. Synthese der Verbindungen

7.2.1. Wittigreaktion zur Herstellung von Alken **80**

Synthese von 5-Chlor-2-methylpent-1-en **80**



22 ml (55 mmol, 1 eq) BuLi Lsg (c=2,5M) in Hexan wurden in einem Dreihalskolben zu 25 ml DMSO zugetropft. Anschliessend wurde auf 80 °C erwärmt, bis die Gasentwicklung beendet war (45 min). Mit Eiswasser wurde auf 0 °C gekühlt und 9,82 g (30 mmol, 1 eq) (Ph)₃PMeBr (gelöst in 30 ml DMSO) zugetropft. Nach 10 min rühren wurden 3,4 ml (30 mmol, 1 eq) 5-Chlor-2-pentanon zugetropft. Die Mischung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt auf 60 °C erwärmt und noch 1 h gerührt. Dann wurde alles auf 100 ml Wasser gegossen. Die wässrige Phase wurde mit 4 * 30 ml Pentan extrahiert. Die organische Phase wurde noch einmal mit 30 ml wässrige Phase gewaschen und anschliessend über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt **80** bei 40 °C (80 mbar) destilliert.

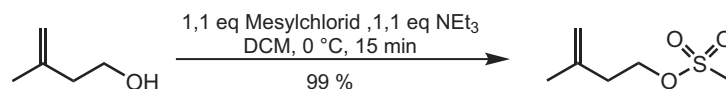
$R_f = 0,87$ (Pentan, KMnO₄)

¹H-NMR (400 MHz, LM, 25 °C): δ (ppm) = 4.80 - 4.70 (m, 2H), 3.55 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.20 - 2.15 (m, 2H), 1.74 (s, 3H).

MS (EI, pos.): $\frac{m}{z} = 118$ [M]⁺; berechnet für C₆H₁₁Cl $\frac{m}{z} = 118$.

7.2.2. Synthese der Alkene 82, 83, 84 und 90

Synthese von 3-Methylbut-3-enyl-1-methansulfonat **82**

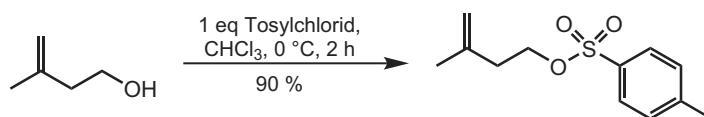


8,1 ml (80 mmol, 1 eq) 3-Methylbut-3-en-1-ol und 6,8 ml (88 mmol, 1,1 eq) MsCl wurden in 300 ml DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 12,2 ml NEt_3 zugetropft. Anschließend wurde die Lösung noch 15 min bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde je 3× mit 50 ml H_2O , 1 M HCl, ges. NaHCO_3 und ges. NaCl Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt ist ausreichend rein für die nachfolgenden Reaktionen. Bei der Destillation zersetzt sich das Produkt unter Umständen explosionsartig. Ausbeute: 13,00 g (99 % der Theorie) einer klaren Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH-d_4 , 25 °C): δ (ppm) = 4.87 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 4.33 (t, $J = 6.7$, 2H), 3.05 (s, 3H), 2.46 (t, $J = 6.7$, 2H), 1.78 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, MeOH-d_4 , 25 °C): δ (ppm) = 142.07, 113.49, 69.64, 38.05, 37.16, 22.43.

Synthese von 3-Methylbut-3-enyl-4-methylbenzolsulfonat **83**



10 ml (100 mmol, 1,2 eq) 3-Methylbut-3-en-1-ol und 15,9 g (83 mmol, 1 eq) wurden in 30 ml CHCl_3 gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wurden 13,4 ml (166 mmol, 2 eq) Pyridin zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch noch 3 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde auf eine Mischung von 60 g Eis und 20 ml konz. HCl gegossen. Die organische Phase wurde noch dreimal mit je 40 ml ges. NaCl Lösung extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und es wurden 17,92 g (90 % der Theorie) einer gelblichen Flüssigkeit erhalten. Diese konnte direkt für weitere Reaktionen eingesetzt werden. Für die Elementaranalyse war dieses Produkt noch nicht sauber genug und

wurde daher mit Pentan/EE 9:1 gesäult.

R_f : 0,44 (Pentan/EE 9:1, UV).

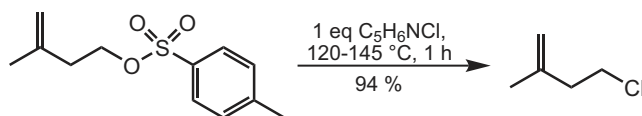
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 7.80 (d, $J = 8.3$, 2H), 7.36 (d, $J = 8.1$, 2H), 4.80 (s, 1H), 4.69 (s, 1H), 4.13 (t, $J = 6.8$, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.36 (t, $J = 6.7$, 2H), 1.67 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 144.81, 140.11, 133.03, 129.85, 127.86, 113.09, 68.56, 36.71, 22.29, 21.62.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 263,0714$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NaO}_3\text{S}$ $\frac{m}{z} = 263,0718$.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{S}$: C, 59,98; H, 6,71; N, 0,00: gefunden C, 60,02; H, 6,69; N, 0,00.

Synthese von 4-Chlor-2-methylbut-1-en **84**



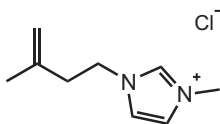
35 g (146 mmol, 1 eq) **83** wurden mit 16,83 g (146 mmol, 1 eq) auf 120 - 145 °C erhitzt. Das entstehende Produkt wurde direkt aus dem Reaktionsgemisch destilliert. Es wurden 14,32 g (94 % der Theorie) einer klaren Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 4.86 (s, 1H), 4.78 (s, 1H), 3.62 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.49 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.76 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 141.9, 112.9, 42.7, 40.8, 22.2.

GC-MS (EI): $\frac{m}{z} = 104,1$ $[\text{M}]^+$ berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{Cl}$ $\frac{m}{z} = 104,0$.

Synthese von 3-Methyl-1-(3-methylbut-3-enyl)-imidazoliumchlorid **90***Cl



3,0 g (28,7 mmol, 1 eq) Verbindung **84** sowie 11,78 g (143 mmol, 5 eq) 1-Methylimidazol

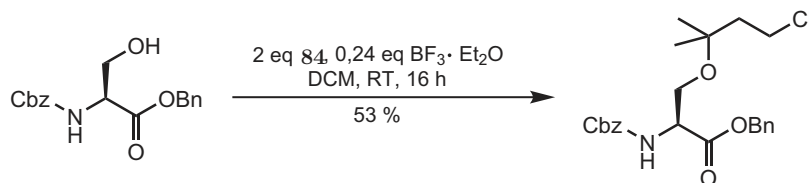
wurden in 14,6 ml Acetonitril gelöst und 20 h refluxiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0,5 ml MeOH gelöst. Das Produkt wurde drei mal mit Diethylether gefällt, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Es wurden 3,35 g (63 % der Theorie) eines gelben Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 10.38 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 4.83 (s, 1H), 4.69 (s, 1H), 4.49 (t, $J = 7.0$, 2H), 4.09 (s, 3H), 2.63 (t, $J = 7.0$, 2H), 1.82 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 139.9, 123.4, 122.1, 114.4, 50.2, 47.9, 38.2, 36.5, 22.1.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 151,1291$ $[\text{M-Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_2$ $\frac{m}{z} = 151,1230$.

7.2.3. Ansatz zur Synthese der Zielverbindung 88

Synthese von Z-Ser(t-Cl)-OBn 85

5,0 g (15,2 mmol, 1 eq) der geschützten Aminosäure Z-Ser-OBn wurden mit 3,18 g (30,4 mmol, 2 eq) **84** in 4,9 ml DCM gelöst und 0,45 ml (3,64 mmol, 0,24 eq) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ zugegeben. die Mischung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit 10 ml ges. NaHCO_3 Lsg. gequenchet und mit 3×20 ml EE extrahiert. Die organische Phase wurde einmal mit 50 ml ges. NaCl Lsg. extrahiert und über MgSO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wurde mit Pentan / EE (5:1) über Kiesegel gesäult. Es wurden 3,52 g (53 % der Theorie) eines klaren Feststoffs erhalten.

R_f : 0,39 (Pentan/EE, 5:1, UV)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 7.42 - 7.28 (m, 10H), 5.59 (d, $J = 8.6$, 1H), 5.29 - 5.07 (m, 4H), 4.53 (d, $J = 8.6$, 1H), 3.79 (d, $J = 8.7$, 1H), 3.56 (d, $J = 8.6$, 1H), 3.46 - 3.25 (m, 2H), 1.96 - 1.75 (m, 2H), 1.05 (d, $J = 18.5$, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 170.3, 156.0, 136.2, 135.3, 128.6, 128.6, 128.6, 128.5, 128.2, 128.2, 74.6, 67.3, 67.1, 61.9, 54.5, 44.0, 39.9, 25.2, 24.7.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 456,1552$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{ClNNaO}_5$ $\frac{m}{z} = 456,1554$.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{NO}_5\text{Cl}$: C, 63,66; H, 6,50; N, 3,23: gefunden C, 63,67; H, 6,45; N, 3,07.

Synthese von Z-Ser(t-MIM)-OBn 86



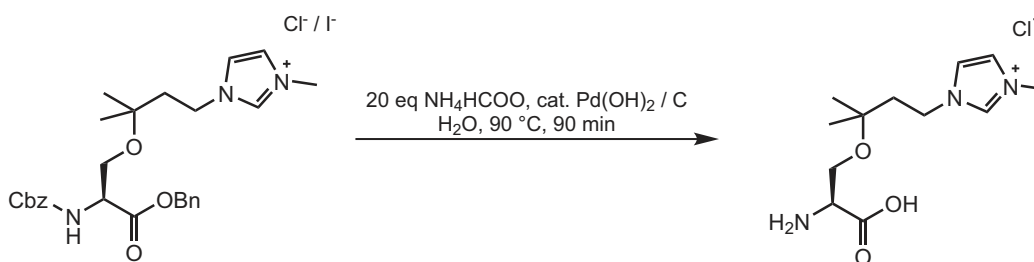
712 mg (1,64 mmol, 1 eq) **85** wurden mit 651 μl (8,20 mmol, 5 q) 1-Methylimidazol und 369 mg (2,46 mmol, 1,5 eq) NaI in 820 μl Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde 5 h refluxiert und anschließen abkühlen lassen. Nach dem Abkühlen wurde drei mal mit Et_2O gefällt. Der Niederschlag wurde in ca. 2 ml Acetonitril gelöst und mit Cellulosepulver versetzt. Nach dem Lyophilisieren wurden aus dem erhaltenen Feststoff mittels FPE 545 mg (64 % der Theorie bezogen auf das Chloridsalz) Produkt als braunes Öl isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , 25 $^\circ\text{C}$): δ (ppm) = 9.13 - 8.98 (m, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.36 (s, 10H), 5.19 - 5.11 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.36 - 4.27 (m, 1H), 4.15 - 4.05 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.68 - 3.48 (m, 2H), 1.98 - 1.86 (m, 2H), 1.12 (s, 3H), 1.08 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6 , 25 $^\circ\text{C}$): δ (ppm) = 170.3, 156.1, 136.8, 136.5, 135.8, 128.4, 128.1, 127.9, 127.9, 123.4, 122.3, 73.8, 66.1, 65.7, 61.3, 54.7, 44.7, 35.7, 24.5.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 480,2506$ $[\text{M-Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_5$ $\frac{m}{z} = 480,2493$.

Synthese von 87



396 mg (0,65 mmol, 1 eq) **86** wurden in 1 ml Wasser gelöst. Dazu wurden 822 mg (13 mmol, 20 eq) Ammoniumformiat und 21 mg (0,13 mmol, 20 mol%) Pd(OH)_2 gegeben. Die Lösung wurde 5 h auf 90 $^\circ\text{C}$ aufgeheizt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung lyophilisiert, das überschüssige Ammoniumformiat konnte nicht abgetrennt

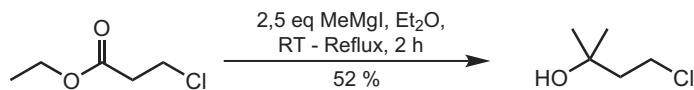
werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.49 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 4.25 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 3.93 - 3.75 (m, 6H), 2.17 - 2.02 (m, 2H), 1.23 (d, J = 5.9 Hz, 6H).

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 256,1645 $[\text{M-Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3$ $\frac{m}{z}$ = 256,1656.

7.2.4. Durchführung der Grignardreaktionen zur Synthese der Alkohole 92 und 93

Synthese von 4-Chlor-2-methyl-2-butanol 92

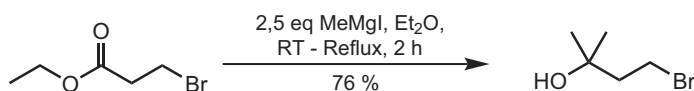


3,64 g (0,15 mol, 1 eq) Magnesiumspäne wurden mit 20 ml Diethylether überschichtet und die Grignardreaktion durch Zugabe von 0,5 ml (0,01 mol, 0,07 eq) Methyljodid gestartet. Nach Anspringen der Reaktion wurden 8,84 ml (0,14 mol, 0,93 eq) Methyljodid (gelöst in 30 ml Diethylether) zu getropft. Im Wasserbad wurde noch 35 min auf 40 °C erhitzt, bis sich die Magnesiumspäne gelöst hatten. Zu dieser Lösung wurden 6,4 ml (57 mmol, 0,4 eq) 3-Chlorpropionsäureethylester in 7 ml Diethylether getropft. Nach der Zugabe wurde noch 2 h bei 40 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 30 g zerstoßenes Eis gegeben und der Niederschlag in ges. Ammoniumchloridlösung aufgelöst (ca. 40 ml). Die etherische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit je 10 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und bei 0,3 mbar / 30 °C destilliert. Es wurden 3,53 g (52 % der Theorie) einer klaren Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 3.60 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.16 (s, 1H), 1.94 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.21 (s, 6H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 70.5, 46.1, 40.6, 29.5.

Synthese von 4-Brom-2-methylbutan-2-ol 93



6,08 g (0,25 mol, 1 eq) Magnesiumspäne wurden mit 25 ml Diethylether überschichtet und die Grignardreaktion durch Zugabe von 0,5 ml (0,01 mol, 0,07 eq) Methyljodid gestartet. Nach Anspringen der Reaktion wurden 15,6 ml (0,24 mol, 0,93 eq) Methyljodid (gelöst in 63 ml Diethylether) zu getropft. Im Wasserbad wurde noch 60 min auf 40 °C erhitzt, bis sich die Magnesiumspäne gelöst hatten. Zu dieser Lösung wurden 10,9 ml (0,1 mmol, 0,4 eq) 3-Brompropionsäureethylester in 11 ml Diethylether getropft. Nach der Zugabe wurde noch 2 h bei 40 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 70 g zerstoßenes Eis gekippt und der Niederschlag

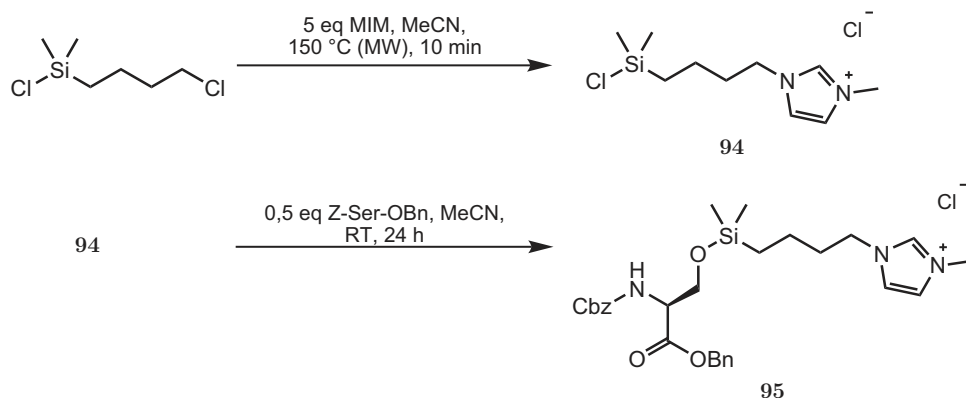
mit ges. Ammoniumchloridlösung aufgelöst (ca. 100 ml). Die etherische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit je 20 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und bei 0,3 mbar / 40 °C destilliert. Es wurden 12,67 g (76 % der Theorie) einer klaren Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_2Cl_2 , 25 °C): δ (ppm) = 3.54 - 3.45 (m, 2H), 2.11 - 2.02 (m, 3H), 1.22 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_2Cl_2 , 25 °C): δ (ppm) = 71.4, 47.3, 29.5, 29.0.

GC-MS (EI): $\frac{m}{z} = 149$ $[\text{M-OH}]^+$ berechnet für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OBr}$ $\frac{m}{z} = 149$.

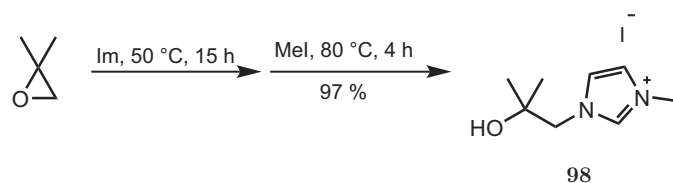
7.2.5. Ansatz zur Synthese einer ionischen Silylschutzgruppe

Synthese von 95

360 μl (2 mmol, 1 eq) Chlor(4-chlorbutyl)dimethylsilan wurden mit 793 μl (10 mmol, 5 eq) Methylimidazol in 0,5 ml Acetonitril gelöst und 10 min bei 150 $^\circ\text{C}$ in der Mikrowelle gerührt. Zu dieser Lösung wurden 329 mg (1 mmol, 0,5 eq) Z-Ser-OBn gegeben und 24 h gerührt. Die Lösung wurde mit HPLC-MS untersucht (Ergebnis siehe unten). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 10 ml Wasser und 585 μl (7 mmol) konz. HCl versetzt und erneut mit HPLC-MS untersucht. Das Produkt konnte nicht mehr detektiert werden. Das gleiche Ergebnis erhält man bei Verwendung von reinem Wasser.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 524,2587$ $[\text{M}-\text{Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}$ $\frac{m}{z} = 524,2575$.

7.2.6. Synthese der Zielverbindung 101

Synthese von 1-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-3-methyl-imidazoliumiodid **98**

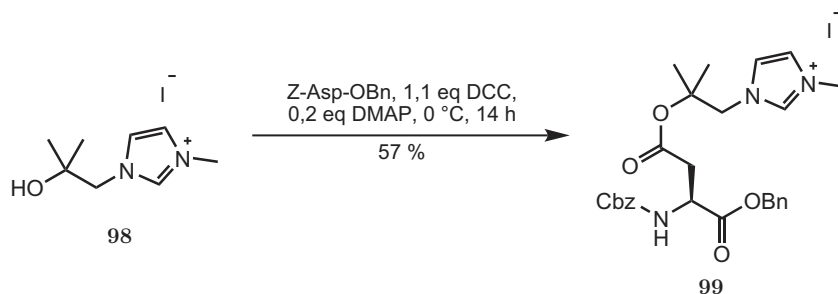
1,00 g (13,9 mmol, 1 eq) 2,2-Dimethyloxiran wurden mit 944 mg (13,9 mmol, 1 eq) Imidazol 15 h bei 50 °C gerührt. Dann wurden 863 μl Methyljodid zugegeben und noch einmal 4 h bei 80 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde dreimal mit Diethylether gefällt und das Produkt am HV getrocknet. Es wurden 3,81 g (97 % der Theorie) eines gelben Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.46 - 7.38 (m, 2H), 4.14 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 1.19 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 123.8, 123.1, 69.7, 59.2, 36.1, 25.6.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 155,2 $[\text{M-I}]^+$; berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$ $\frac{m}{z}$ = 155,1.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{IN}_2\text{O}$: C, 34,06; H, 5,36; N, 9,93: gefunden C, 34,02; H, 5,33; N, 9,99.

Synthese von **99**

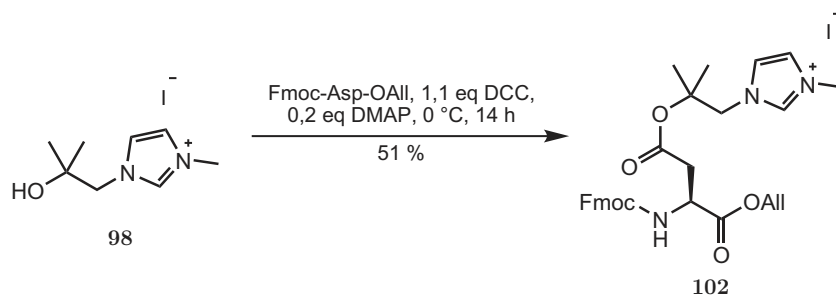
663 mg (2,35 mmol, 1 eq) **98** und 840 mg (2,35 mmol, 1 eq) Z-Asp-OBn wurden in 11 ml Dichlormethan gelöst und auf 0° C gekühlt. Dann wurden 533 mg (2,59 mmol, 1,1 eq) DCC und 57 mg (0,47 mmol, 0,2 eq) DMAP zugegeben und 14 h gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und die Lösung mit Cellulose versetzt und einrotiert.

Aus diesem Feststoff wurde das Produkt durch FPE extrahiert. Es wurden 0,84 g (57 % der Theorie) eines farblosen, hygroscopischen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 8.98 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.35 - 7.23 (m, 10H), 5.08 (s, 2H), 4.98 (s, 2H), 4.50 - 4.39 (m, 1H), 4.15 - 4.08 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 2.86 - 2.79 (m, 1H), 2.68 - 2.60 (m, 1H), 1.34 - 1.28 (m, 6H).

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 494,2285$ $[\text{M-I}]^+$; berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_6$ $\frac{m}{z} = 494,2286$.

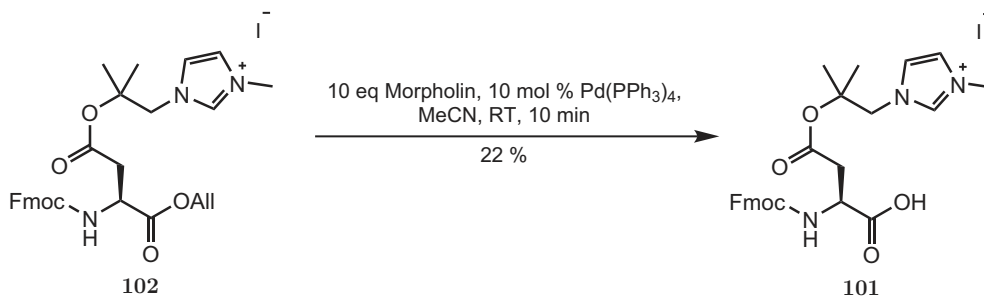
Synthese von **102**



620 mg (2,20 mmol, 1 eq) Fmoc-Asp-OAll und 869 mg (2,20 mmol, 1 eq) **98** wurden in 11 ml DCM gelöst und 15 min im Eisbad gekühlt. Dann wurden 502 mg (2,4 mmol, 1 eq) DCC und 54 mg (0,44 mmol, 0,2 eq) DMAP zugegeben und 14 h gerührt. Anschließend wurde Cellulose zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Aus dem Rückstand wurden mittels FPE 743 mg (51 % der Theorie) eines weißen Feststoffs isoliert.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 532,2447$ $[\text{M-I}]^+$; berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_5$ $\frac{m}{z} = 532,2442$.

Synthese von **101**

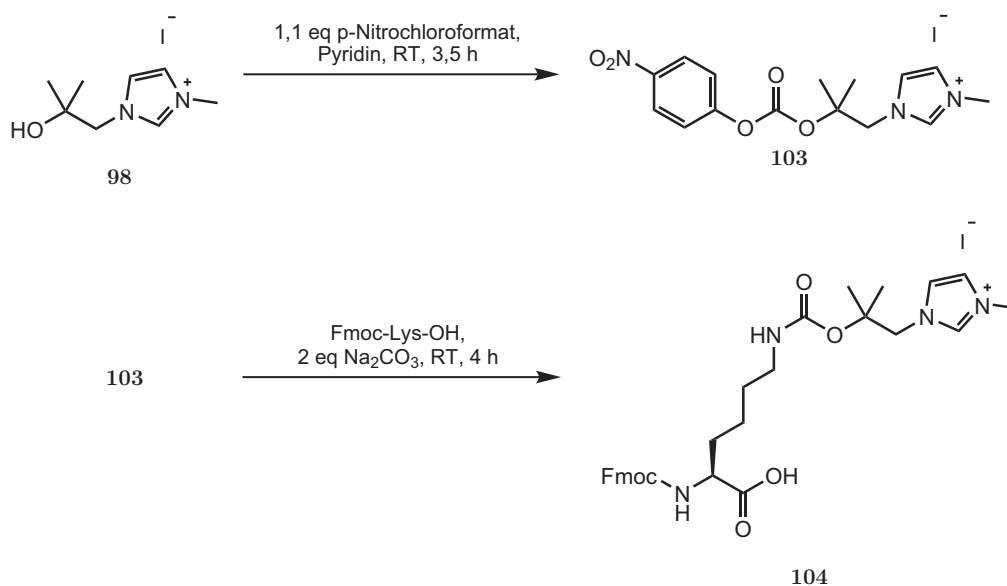


138 mg (0,21 mmol, 1 eq) **102** wurden unter Argon in 1 ml Acetonitril gelöst und dann 24 mg (21 μmol , 0,1 eq) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium und 184 μl (2,1

mmol, 10 eq) Morpholin zugegeben. Nach 11 min wurden 162 μl TFA zugegeben und die Lösung mit Cellulose versetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt aus dem Rückstand mittels FPE extrahiert. Es wurden 28,2 mg (22 % der Theorie) eines farblosen Feststoffs isoliert.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 492,2127$ [M-I]⁺; berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_6$ $\frac{m}{z} = 492,2129$.

7.2.7. Ansatz zur Synthese einer ionischen Boc-Schutzgruppe

Synthese der Verbindungen 103 und 104

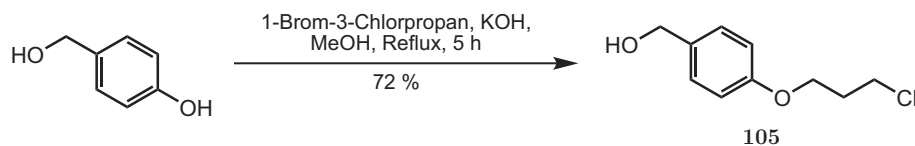
28 mg (0,1 mmol, 1 eq) **98** wurden in 400 μ l trockenem Pyridin gelöst, mit 22 mg (0,11 mmol, 1,1 eq) p-Nitrochloroformat versetzt und 3,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit HPLC-MS untersucht. Nach der Reaktion wurde das Produkt mit kaltem Diethylether gefällt und die Etherphase entfernt. Das Produkt wurde eine Woche bei - 20 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine erneute Kontrolle des Produkts mit HPLC-MS. Das Produkt wurde in 500 μ l Acetonitril/Wasser (1:1) gelöst und 37 mg (0,1 mmol, 1 eq) Fmoc-Lys-OH sowie 27 mg (0,25 mmol, 2,5 eq) Natrimucarbonat zugegeben. Nach 4 h wurde das Reaktionsgemisch mit HPLC untersucht.

MS (ESI, pos.)(**103**): $\frac{m}{z} = 320,1239$ [M-I]⁺; berechnet für C₁₅H₁₈N₃O₅ $\frac{m}{z} = 320,1241$.

MS (ESI, pos.)(**104**): $\frac{m}{z} = 549,2702$ [M-I]⁺; berechnet für C₃₀H₃₇N₄O₆ $\frac{m}{z} = 549,2708$.

7.2.8. Ansatz zur Synthese einer ionischen Z-Schutzgruppe

Synthese von (4-(3-Chlorpropoxy)phenyl)methanol **105**



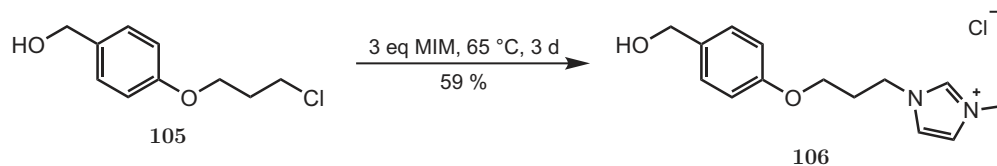
11,50 g (92,6 mmol, 1 eq) 4-(Hydroxymethyl)phenol, 9,1 ml (92,6 mmol, 1 eq) 1-Brom-3-chlorpropan und 6,12 g (92,6 mmol, 1 eq) KOH wurden in 80 ml Methanol gelöst und 5 h refluxiert. Nachdem die Umsetzung laut DC beendet war, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 50 ml Wasser und 30 ml EE aufgenommen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit je 30 ml EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 ml ges. NaCl Lsg. gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand mit Pentan/EE 5:1 gesäult. Es wurden 13,40 g eines farblosen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.27 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.60 (s, 2H), 4.11 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.74 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.23 (p, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.80 (s, 1H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 158.3, 133.4, 128.7, 114.6, 65.0, 64.3, 41.5, 32.2.

MS (EI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 200,1 [M]⁺; berechnet für C₁₀H₁₃ClO₂ $\frac{m}{z}$ = 200,1.

Synthese der ionischen Cbz-Gruppe **106**



201 mg (1 mmol, 1 eq) (4-(3-Chlorpropoxy)phenyl)methanol **105** wurden mit 238 μl (3 mmol, 3 eq) 1-Methylimidazol gemischt und 3 Tage bei 65 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in Methanol aufgenommen und mit Die-

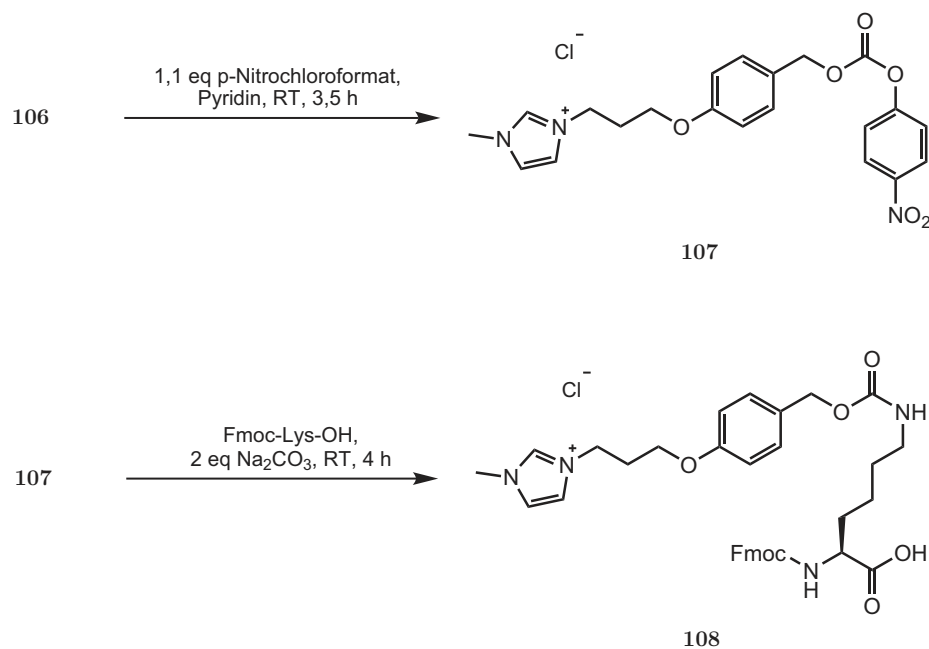
thylether gefällt. Es wurden 167 mg (59 % der Theorie) bräunlicher Kristalle isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH, 25 °C): δ (ppm) = 7.67 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.87 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 4.52 (s, 3H), 4.45 (t, J = 6.9 Hz, 3H), 4.06 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 3.91 (s, 4H), 2.41 - 2.33 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 159.2, 135.3, 129.7, 124.9, 123.9, 115.3, 65.6, 64.8, 36.5, 30.7.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 247,1458 $[\text{M-Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ $\frac{m}{z}$ = 247,1441.

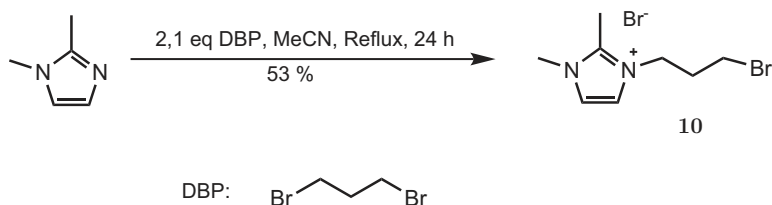
Synthese von 107 und 108



28 mg (0,1 mmol, 1 eq) **106** wurden in 400 μl trockenem Pyridin gelöst, mit 22 mg (0,11 mmol, 1,1 eq) p-Nitrochloroformat versetzt und 3,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit HPLC-MS untersucht. Nach der Reaktion wurde das Produkt mit kaltem Diethylether gefällt und die Etherphase entfernt. Das Produkt wurde eine Woche bei -20 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine erneute Kontrolle des Produkt mit HPLC-MS. Das Produkt wurde in 500 μl Acetonitril/Wasser (1:1) gelöst und 37 mg (0,1 mmol, 1 eq) Fmoc-Lys-OH sowie 27 mg (0,25 mmol, 2,5 eq) Natrimucarbonat zugegeben. Nach 4 h wurde das Reaktionsgemisch mit HPLC untersucht.

MS (ESI, pos.)(**107**): $\frac{m}{z} = 412,1509$ [M-Cl]⁺; berechnet für C₂₂H₂₄N₃O₅ $\frac{m}{z} = 412,1503$.

MS (ESI, pos.)(**108**): $\frac{m}{z} = 641,2986$ [M-Cl]⁺; berechnet für C₃₇H₄₃N₄O₆ $\frac{m}{z} = 641,2970$.

7.2.9. Synthese der mehrfach geladenen *Tags*Synthese von 10

12,5 ml (123 mmol, 2,1 eq) 1,3-Dibromopropan wurden in 25 ml Acetonitril gelöst und refluxiert. Zu dieser Lösung wurden 5,56 g (59 mmol, 1 eq) 1,2-Dimethylimidazol gelöst in 10 ml Acetonitril langsam zu getropft und 21 h refluxiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand mit 40 ml trockenem Acetonitril versetzt. Die Suspension wurde 1 h im Ultraschallbad behandelt, dann abfiltriert und der Rückstand viermal mit 10 ml Acetonitril gewaschen. Das Filtrat wurde einrotiert und am HV getrocknet. Es wurden 9,29 g (53 % der Theorie) eines farblosen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.40 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.30 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.30 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.47 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.62 (s, 3H), 2.42 - 2.33 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 147.3, 125.1, 123.4, 48.9, 37.3, 34.1, 32.2, 11.7.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 217,0343$ $[\text{M-Br}]^+$; berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{BrN}_2$ $\frac{m}{z} = 217,0335$.

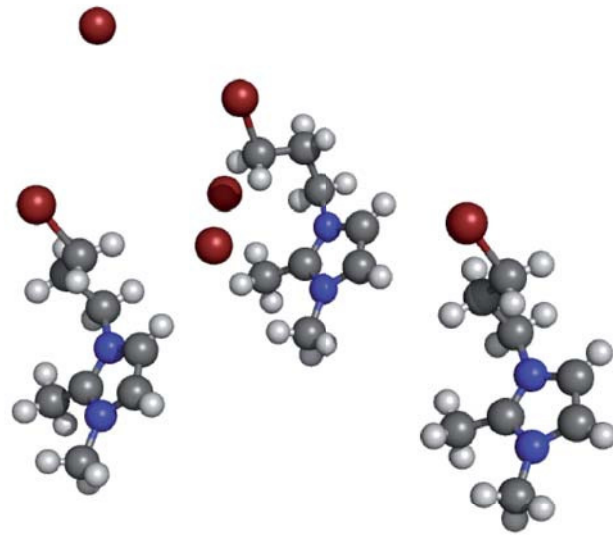


Abbildung 7.3.: Ergebniss der Kristallstrukturanalyse des Produkts **10**

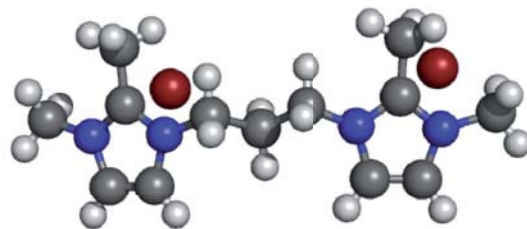
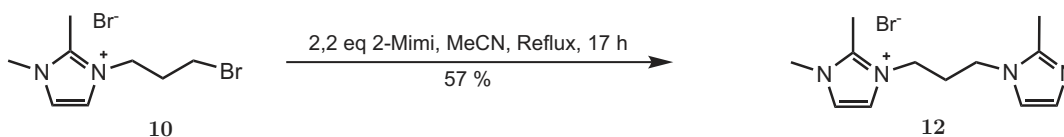


Abbildung 7.4.: Ergebniss der Kristallstrukturanalyse des Nebenprodukts

Synthese von 12



16,37 g (55 mmol, 1 eq) **10** wurden in 150 ml Acetonitril gelöst und 9,91 g (121 mmol, 2,2 eq) 2-Methylimidazol zugegeben. Die Mischung wurde 24 h refluxiert und dann das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde je viermal mit 30 ml Diethylether und 30 ml Tetrahydrofuran extrahiert. Der Rückstand wurde im Vakuum getrocknet, in 120 ml Wasser gelöst und mit Kaliumcarbonat auf pH 11 eingestellt. Die Lösung wurde 30 min gerührt und dann lyophilisiert. Der Feststoff wurde portionsweise mit 100 ml Acetonitril extrahiert und die Extrakte jeweils abfiltriert und einrotiert. Es wurden 9,40 g (57 % der Theorie) eines farblosen Feststoffs isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.25 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.12 (s, 2H), 7.01 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 4.10 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.05 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.45 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.30 - 2.21 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 145.1, 122.5, 122.1, 120.5, 120.3, 118.7, 45.0, 43.4, 34.6, 29.0, 10.7, 8.8.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 219,1601 $[\text{M-Br}]^+$; berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_4$ $\frac{m}{z}$ = 219,1604.

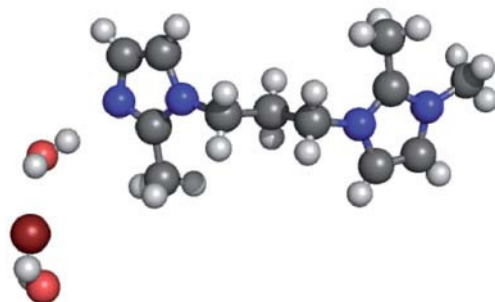
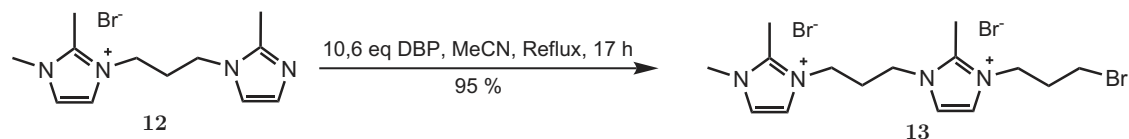


Abbildung 7.5.: Ergebniss der Kristallstrukturanalyse des Produkts **12**

Synthese von **13**



4,51 g (15,1 mmol, 1 eq) **12** und 16,5 ml (162 mmol, 10,7 eq) 1,3-Dibrompropan wurden in 150 ml Acetonitril gelöst und 50 h refluxiert. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand viermal mit 30 ml Diethylether gewaschen und am HV getrocknet. Es wurden 7,15 g (95 % der Theorie) eines farblosen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.40 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 4.24 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 4.21 - 4.14 (m, 4H), 3.69 (s, 3H), 3.40 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.59 (s, 3H),

2.52 (s, 3H), 2.35 - 2.26 (m, 4H).

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 144.6, 144.4, 122.6, 121.6, 121.0, 120.4, 46.4, 44.9, 44.8, 34.7, 31.3, 29.5, 28.9, 9.2, 9.0.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 339,1161$ $[\text{M}-2\text{Br}-\text{H}]^+$; berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{BrN}_4$ $\frac{m}{z} = 339,1179$.

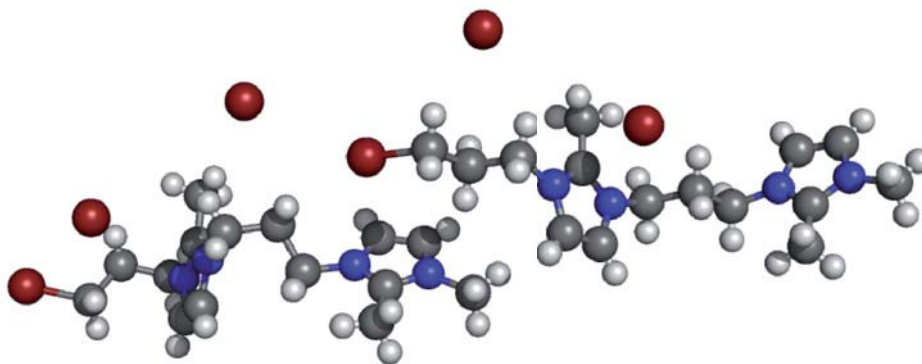
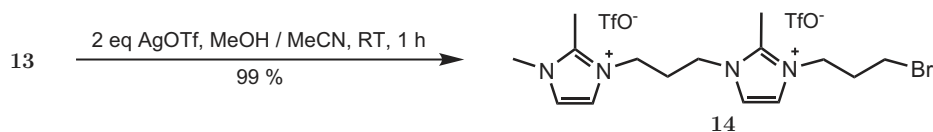


Abbildung 7.6.: Ergebnis der Kristallstrukturanalyse des Produkts **13**

Synthese von **14**



3,19 g (6,38 mmol, 1 eq) **13** wurden in 18 ml Methanol und 60 ml Acetonitril gelöst und gerührt. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von 3,27 g (12,8 mmol, 2 eq) Silbertriflat in 20 ml Acetonitril gegeben und eine Stunde gerührt. Die Lösung wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Kristallisation erfolgte bei 4 °C. Es wurden 4,01 g (99 % der Theorie) eines farblosen Feststoffs erhalten.

^1H -NMR (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.48 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.32 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.25 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H), 3.78 (s, 3H), 3.48 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.67

(s, 3H), 2.60 (s, 3H), 2.43 - 2.33 (m, 4H).

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 147.3, 147.1, 125.3, 124.3, 123.7, 123.1, 57.1, 49.1, 47.6, 47.5, 37.4, 34.0, 32.1, 31.6, 11.8, 11.5.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 339,1156 $[\text{M}-2\text{TfO}-\text{H}]^+$; berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{BrN}_4$ $\frac{m}{z}$ = 339,1179.

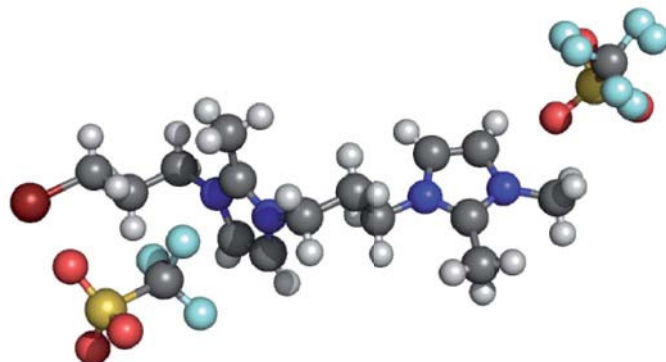
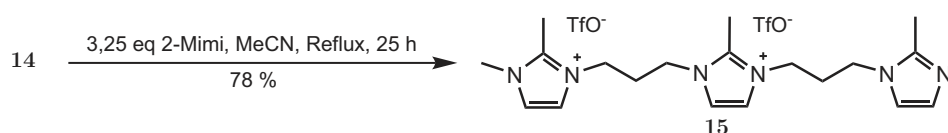


Abbildung 7.7.: Ergebniss der Kristallstrukturanalyse des Produkts **14**

Synthese von **15**



14,88 g (23,3 mmol, 1 eq) **14** wurden in 80 ml Acetonitril gelöst und eine Lösung von 6,2 g (75,6 mmol, 3,2 eq) 2-Methylimidazol in 50 ml Acetonitril sowie 290 ml Acetonitril zugegeben. Diese Lösung wurde drei Tage refluxiert und dann abkühlen lassen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand mit Diethylether, THF und nochmals Diethylether gewaschen. Reste der Waschflüssigkeiten wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in 200 ml Wasser gelöst und mit Kaliumcarbonat auf pH 11 gebracht. Die Lösung wurde lyophilisiert, der Rückstand mit 100 ml Acetonitril extrahiert und abfiltriert. Das Filtrat wurde bis zur Trockene eingedampft. Es wurden 12,29 g (78 % der Theorie) eines farblosen

Feststoffs erhalten.

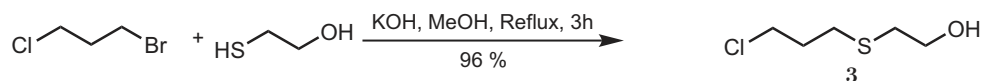
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.40 (s, 2H), 7.39 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 4.28 - 4.14 (m, 6H), 4.08 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 2.60 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.40 - 2.28 (m, 7H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 148.6, 147.3, 146.8, 128.7, 125.3, 123.8, 123.7, 123.0, 122.6, 48.2, 47.5, 47.5, 45.5, 37.3, 31.8, 31.6, 14.3, 11.5.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 341,2425$ [M-2TfO-H] $^+$; berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_6$ $\frac{m}{z} = 341,2448$.

7.2.10. Synthese des Linker, Aktivierung und Kupplung an verschiedene Aminosäurederivat

Synthese von 3



9,8 ml (100 mmol, 1 eq) 1-Brom-3-chloropropan wurden in 20 ml MeOH gelöst und unter Rückfluss erhitzt. Dann wurde eine Lösung von 6,6 g (100 mmol, 1 eq) KOH und 7,0 ml Mercaptoethanol (100 mmol, 1eq) in 40 ml MeOH zugetropft. Nach 3 h wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 80 ml Wasser/DCM (1:1) aufgenommen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit 3 mal 30 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Es wurden 14,83 g (96 % der Theorie) eines farblosen Öls gewonnen. Bei nicht ausreichender Reinheit konnte dieses Produkt durch Destillation gereinigt werden (Sdp. 93 °C bei 0,15 mbar).

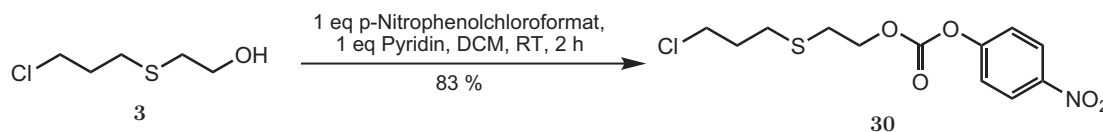
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO, 25 °C): δ (ppm) = 3.76 (dd, $J = 8.4, 4.5$ Hz, 1H), 3.71 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.53 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.62 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.56 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.99 - 1.92 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO, 25 °C): δ (ppm) = 60.8, 43.9, 33.7, 32.0, 28.3.

GC-MS (EI): $\frac{m}{z} = 154,0$ $[\text{M}]^+$ berechnet für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{ClOS}$ $\frac{m}{z} = 154,0$.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{ClOS}$: C, 38,83; H, 6,96; N, 0,00: gefunden C, 38,62; H, 7,03; N, 0,0.

Synthese von 30



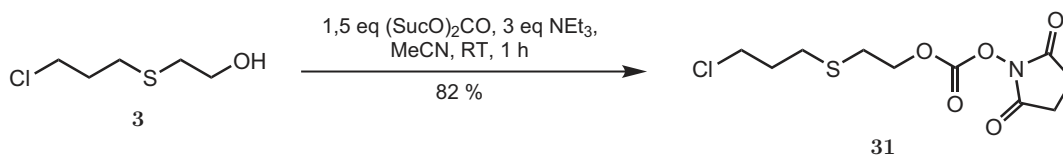
3,87 g (25 mmol, 1 eq) **3** (Cl-*B_r*-ed-OH) wurden mit 5,04 g (25 mmol, 1 eq) p-Nitrophenolchloroformat in 50 ml DCM gelöst und mit 2,0 ml (25 mmol, 1 eq)

Pyridin versetzt und 2 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde drei mal mit 1 N HCl und drei mal mit ges. NaCl Lsg. extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie mit EE / Pentan 1:5 gereinigt. Es wurden 6,63 g (83 % der Theorie) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, LM, 25 °C): δ (ppm) = 8.30 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.36 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.69 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.86 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.67 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.02 - 1.91 (m, 2H).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO, 25 °C): δ (ppm) = 156.0, 152.7, 146.0, 126.2, 123.4, 68.6, 44.7, 32.7, 30.1, 29.1.

Synthese von 31



2,22 g (14,4 mmol, 1 eq) **3** wurden in 54 ml Acetonitril gelöst und 5,36 g (20,9 mmol, 1,5 eq) (SucO)₂CO sowie 6,0 ml (43,1 mmol, 3 eq) NEt₃ zugegeben. Nach 1 h rühren wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 75 ml DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde drei mal mit 45 ml ges. NaHCO₃ Lsg. und einmal mit ges. NaCl Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der Rückstand durch Säulenchromatographie mit EE/Pentan 1:1 gereinigt. Es wurden 3,46 g (82 % der Theorie) eines Öls gewonnen.

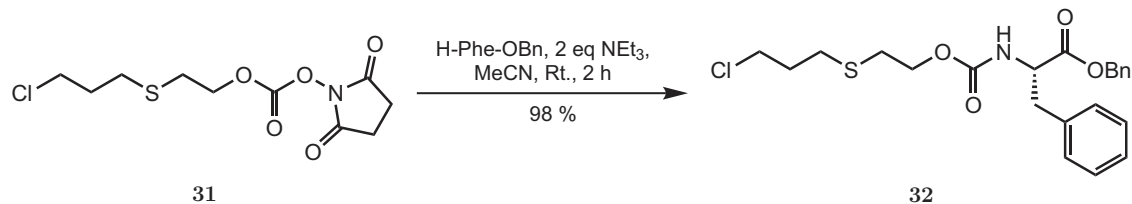
R_f: 0,62 (EE/Pentan 1:1, Iod)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 4.45 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.66 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.89 - 2.82 (m, 6H), 2.75 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.10 - 2.01 (m, 2H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 168.7, 151.5, 70.0, 43.3, 32.1, 29.9, 29.5, 25.5.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 318,0169$ $[M+Na]^+$; berechnet für $C_{10}H_{14}ClNNaO_5S$ $\frac{m}{z} = 318,0179$.

Synthese von **32**



415 mg (1,27 mmol, 1 eq) **31** wurden in 5 ml Acetonitril gelöst und 370 mg (1,27 mmol, 1 eq) H-Phe-OBn sowie 354 μ l (2,54 mmol, 2 eq) NEt_3 zugegeben und 1 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der Rückstand mit DCM aus der mit Schwefelsäure angesäuerten wässrigen Phase extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und abfiltriert. Der nach dem Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer im Kolben verbleibende Rückstand wurde mit EE/Pentan 1:3 durch Säulenchromatographie getrennt. Es wurden 542 mg eines farblosen Öls erhalten.

R_f : 0,74 (EE/Pentan 1:3, UV)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 7.39 - 7.32 (m, 3H), 7.31 - 7.26 (m, 2H), 7.26 - 7.18 (m, 3H), 7.14 - 6.97 (m, 2H), 5.32 - 5.15 (m, 1H), 5.15 - 5.06 (m, 2H), 4.73 - 4.60 (m, 1H), 4.19 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.62 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.17 2.96 (m, 2H), 2.75 - 2.57 (m, 4H), 2.07 - 1.92 (m, 2H).

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 171.4, 155.5, 135.6, 135.1, 129.4, 128.7, 128.65, 128.6, 127.2, 67.3, 64.2, 54.8, 43.4, 38.2, 32.2, 30.8, 29.3.

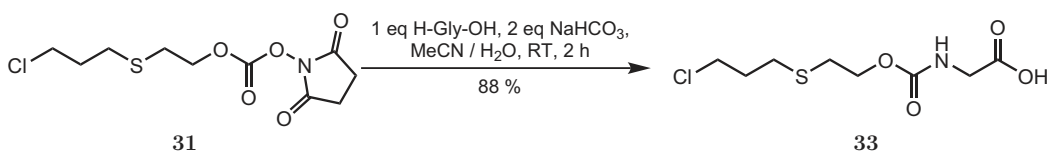
MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 458,1$ $[M+Na]^+$; berechnet für $C_{22}H_{26}ClNNaO_4S$ $\frac{m}{z} = 458,1$.

Allgemeines Protokoll für die Kupplung der Verbindung **31** an Aminosäuren

1 eq **3**, 1,5 eq (SucO)₂CO und 3 eq NEt₃ wurden 1 h in Acetonitril (ca. 0,25 mM, bezogen auf **3**) gerührt, bis die Reaktion vollständig war (Kontrolle mit DC: EE/Pentan 1:1). Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und mit ges. NaHCO₃ Lsg. und ges. NaCl Lsg. gewaschen und über MgSO₄ getrocknet.

Das Öl wurde in Acetonitril gelöst und 1 eq der jeweiligen Aminosäure sowie 2 eq NaHCO₃ und Wasser zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h gerührt und dann das Acetonitril am Rotationsverdampfer abgezogen. Der pH-Wert der wässrigen Phase wurde auf 9-10 eingestellt und diese dreimal mit DCM extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit HCl auf pH 1 eingestellt und dreimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl Lsg. gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Der nach dem Abziehen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wurde mit EE/Pentan 2:3, 1% AcOH an Kieselgel chromatographiert. Die Produktfraktionen wurden mit Hexan mehrmals koevaporiert, um die Essigsäure als Azeotrop zu entfernen.

Synthese von **33**



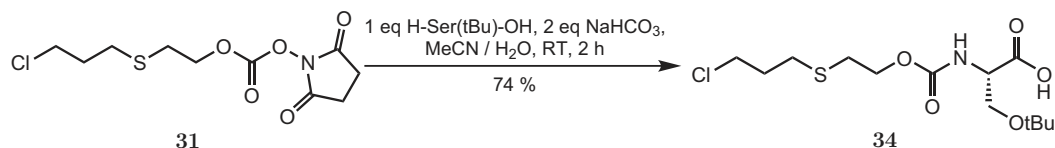
Ansatzgrösse 10 mmol, Ausbeute 2,26 g (88 % der Theorie) farblose Nadeln.

R_f: 0,3 (EE/Pentan 1:5, 1% AcOH, Iod)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.22 (s, 1H), 4.26 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.04 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.66 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.81 - 2.67 (m, 4H), 2.10 - 1.97 (m, 2H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 173.6, 156.2, 64.5, 43.4, 42.3, 32.2, 30.7, 29.3.

Elementaranalyse: berechnet für C₈H₁₄ClNO₄S : C, 37,57; H, 5,52; N, 5,48: gefunden C, 37,78; H, 5,41; N, 5,60.

Synthese von 34

Ansatzgrösse 11 mmol, Ausbeute 2,68 g (74 % der Theorie) farbloses Öl.

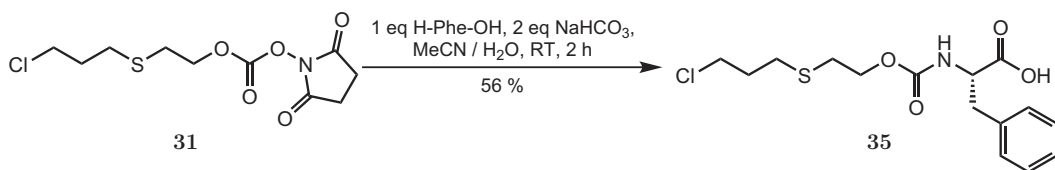
R_f : 0,42 (EE/Pentan 1:3, 1% AcOH)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 9.89 (s, 1H), 5.62 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.36 - 4.13 (m, 2H), 3.89 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H), 3.65 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.59 (dd, $J = 9.0, 3.8$ Hz, 1H), 2.80 m 2.64 (m, 4H), 2.05 (p, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.17 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 175.5, 156.2, 74.1, 64.5, 61.8, 54.4, 43.5, 32.3, 30.9, 29.4, 27.4.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 364,0947$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{ClNaNO}_5\text{S}$ $\frac{m}{z} = 364,0961$.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{ClNO}_5\text{S}$: C, 45,67; H, 7,08; N, 4,10: gefunden C, 45,65; H, 6,85; N, 4,30.

Synthese von 35

Ansatzgrösse 10 mmol, Ausbeute 2,05 g (56 % der Theorie) gelbliches Öl.

R_f : 0,47 (EE/Pentan 1:1, 1% AcOH, UV)

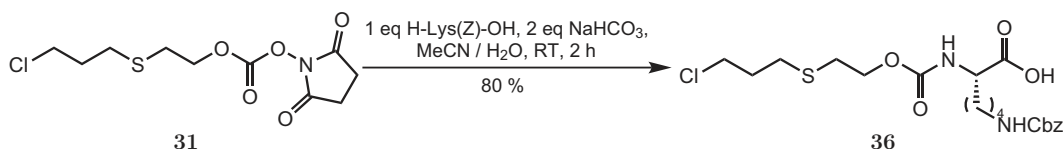
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 7.39 - 7.23 (m, 3H), 7.23 - 7.13 (m, 2H), 5.14 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.68 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.21 (t, $J = 6.7$ Hz,

2H), 3.64 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.21 (dd, $J = 14.0, 5.3$ Hz, 1H), 3.11 (dd, $J = 14.0, 6.4$ Hz, 1H), 2.80 - 2.57 (m, 4H), 2.07 - 1.97 (m, 2H).

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 176.1, 155.8, 135.5, 129.5, 128.9, 127.5, 64.5, 54.6, 43.5, 37.9, 32.3, 30.9, 29.4.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 368,2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{ClNNaO}_4\text{S}$ $\frac{m}{z} = 368,1$.

Synthese von 36



Ansatzgrösse 6,7 mmol, Ausbeute 3,1 g (80 % der Theorie) farbloses Öl.

R_f : 0,37 (EE/Pentan 1:3, 1% AcOH, Iod oder UV)

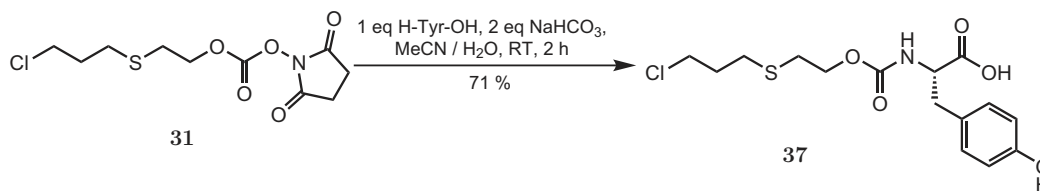
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 7.39 - 7.30 (m 2H), 7.29 - 7.23 (m, 2H), 7.20 - 7.14 (m, 1H), 5.54 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.93 (s, 1H), 4.35 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.23 (dd, $J = 14.9, 8.2$ Hz, 2H), 3.64 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.28 - 3.07 (m, 2H), 2.71 (dt, $J = 13.5, 6.8$ Hz, 4H), 2.07 - 1.97 (m, 2H), 1.95 - 1.67 (m, 2H), 1.60 - 1.33 (m, 4H).

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 137.9, 129.0, 128.6, 128.2, 125.3, 66.9, 64.3, 60.0, 43.4, 40.4, 32.2, 30.8, 29.2, 21.5.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 483,13$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{NaO}_6\text{S}$ $\frac{m}{z} = 483,13$.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}$: C, 52,11; H, 6,34; N, 6,08: gefunden C, 51,81; H, 6,23; N, 6,07.

Synthese von 37



Ansatzgrösse 10 mmol, Ausbeute 2,74 g (71 % der Theorie) farbloses Öl.

R_f : 0,42 (EE/Pentan 1:5, 1% AcOH, Iod oder UV)

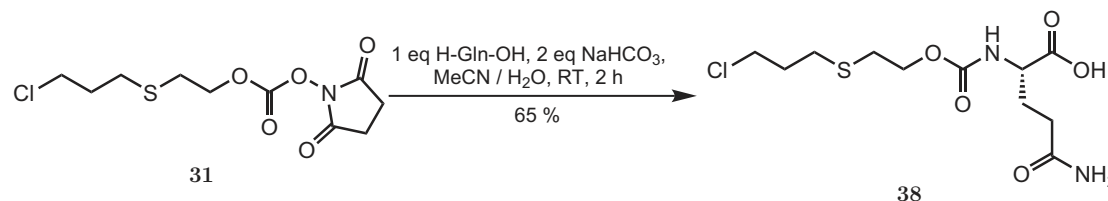
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 7.02 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.74 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 5.23 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.22 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.64 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.17 - 2.99 (m, 2H), 2.79 - 2.65 (m, 4H), 2.09 - 1.98 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 154.9, 130.6, 128.2, 115.7, 64.4, 54.6, 43.4, 37.0, 32.1, 31.0, 30.8, 29.2.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 384,05$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{ClNNaO}_5\text{S}$ $\frac{m}{z} = 384,06$.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{ClNO}_5\text{S}$: C, 49,79; H, 5,57; N, 3,87: gefunden C, 49,77; H, 5,45; N, 3,85.

Synthese von 38



Ansatzgrösse 10 mmol, Ausbeute 3,00 g (65 % der Theorie) farbloses Öl.

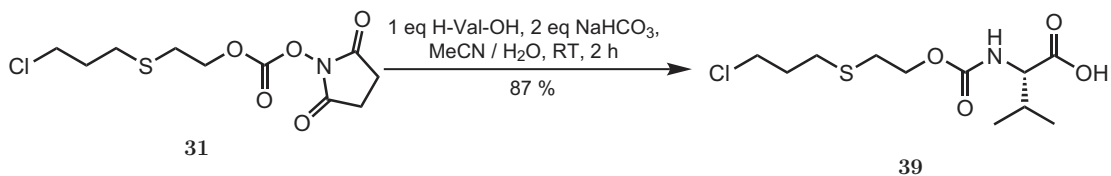
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO, 25 °C): δ (ppm) = 12.62 (s, 1H), 7.47 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.07 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.90 (dd, $J = 13.0, 8.6$ Hz, 1H), 3.71 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.77 - 2.62 (m, 4H), 2.13 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.01 - 1.89 (m, 3H), 1.78 - 1.60 (m, 1H).

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 173.7, 173.5, 155.9, 63.3, 53.5, 43.9, 31.9, 31.3, 29.9, 28.3, 26.6.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 349,0574$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{NaO}_5\text{S}$ $\frac{m}{z} = 349,0601$.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$: C, 40,43; H, 5,86; N, 8,57; gefunden C, 39,94; H, 5,57; N, 8,44.

Synthese von 39



Ansatzgrösse 10 mmol, Ausbeute 2,75 g (87 % der Theorie) farblose Nadeln.

R_f : 0,6 (EE/Pentan 1:3, 1% AcOH, Iod)

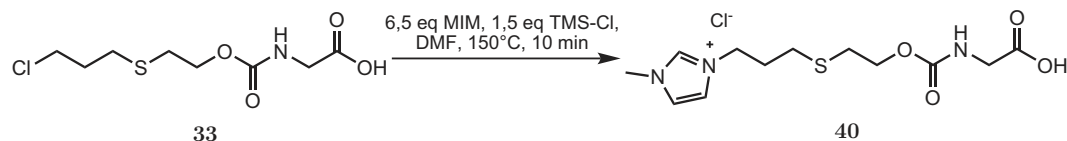
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 5.23 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.37 - 4.28 (m, 1H), 4.24 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.66 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.81 - 2.62 (m, 4H), 2.29 - 2.21 (m, 1H), 2.05 (p, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.02 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 176.5, 156.2, 64.3, 58.8, 43.4, 32.2, 31.0, 30.8, 29.3, 19.0, 17.4.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 320,06$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{ClNNaO}_4\text{S}$ $\frac{m}{z} = 320,07$.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{ClNO}_4\text{S}$: C, 44,36; H, 6,77; N, 4,70; gefunden C, 44,76; H, 6,70; N, 4,98.

7.2.11. Herstellung des Glycinderivats 52

Synthese von 40

452 mg (1,77 mmol, 1 eq) **33** wurden in einem MW-Vial in 0,5 ml Acetonitril gelöst und dann 911 μl (11,5 mmol, 6,5 eq) 1-MIM und 335 μl (2,65 mmol, 1,5 eq) TMS-Cl zugegeben. Die Reaktion wurde in 10 min bei 150 °C durchgeführt, anschließend wurde das Produkt aus dem Reaktionsgemisch mit Diethylether gefällt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt und anschließend das Produkt im Vakuum getrocknet. Das Reaktionsgemisch wurde mittels FPE gereinigt, nach Lyophilisation wurden 799 mg (quant.) eines leicht bräunlichen Öls erhalten.

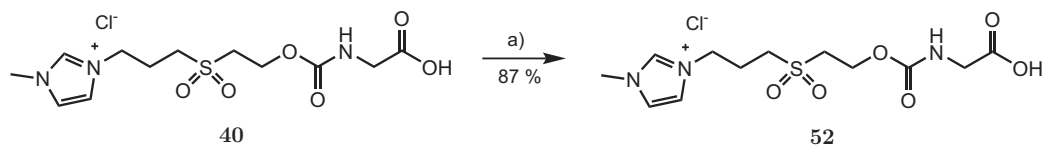
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 8.77 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 4.33 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.23 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.73 (s, 2H), 2.83 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.69 - 2.42 (m, 2H), 2.35 - 2.02 (m, 2H).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH-d_4 , 25 °C): δ (ppm) = 8.98 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 4.35 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 4.19 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.78 (s, 2H), 2.77 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.64 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.23 - 2.15 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 176.8, 158.3, 136.1, 122.9, 119.4, 64.1, 47.9, 43.7, 35.4, 30.0, 28.8, 27.6.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, MeOH-d_4 , 25 °C): δ (ppm) = 174.1, 159.0, 138.2, 125.1, 123.8, 65.5, 43.4, 36.6, 35.8, 31.6, 30.8, 29.3.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 302,1156$ $[\text{M-Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $\frac{m}{z} = 302,1169$.

Synthese von 52

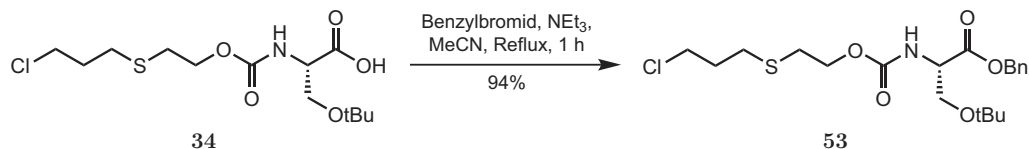
a) 2,2 eq H_2O_2 , cat. Na_2WO_4 , H_2O , 70 °C, 75 min

777,5 mg **40** wurden in 9,2 ml Wasser gelöst und mit 15 mg Na₂WO₄ sowie 259 μ l 30%ige Wasserstoffperoxidlösung versetzt und bei 70 °C gerührt. Nach 30 min wurden nochmals 259 μ l 30%ige Wasserstoffperoxidlösung zugesetzt und weitere 45 min gerührt. Mittels HPLC-MS wurde die Vollständigkeit der Reaktion überprüft. Danach wurde abkühlen lassen, dass überschüssige Wasserstoffperoxid mit NaHSO₃ zersetzt, die Lösung lyophilisiert. Der erhaltene Feststoff wurde mit Acetonitril extrahiert und erneut lyophilisiert. Es wurden 737 mg (87 % der Theorie)

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, 25 °C): δ (ppm) = 9.01 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 4.52 - 4.39 (m, 4H), 3.95 (s, 3H), 3.85 (s, 2H), 3.53 - 3.44 (m, 2H), 3.33 - 3.26 (m, 2H), 2.48 - 2.38 (m, 2H).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-d₄, 25 °C): δ (ppm) = 173.6, 158.1, 138.4, 124.6, 121.0, 59.8, 53.7, 51.7, 43.1, 36.7, 36.3, 24.0.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 334,103 [M-Cl]⁺; berechnet für C₁₂H₂₀N₃O₆S $\frac{m}{z}$ = 334,107.

7.2.12. Veresterung von **34** mit BenzylbromidSynthese von **53**

50 μl (0,421 mmol, 1 eq) Benzylbromid wurden in 2 ml Acetonitril vorgelegt und zum Rückfluss erhitzt. 154 mg **34** und 60 μl NEt_3 wurden in 5 ml Acetonitril gelöst und dann zugetropft und 1 h refluxiert. Nach dem abkühlen wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Öl in 20 ml EE aufgenommen. Die organische Phase wurde drei mal mit 15 ml 1 N Schwefelsäure, drei mal mit 15 ml ges. NaHCO_3 Lsg. und mit ges. NaCl Lsg. gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösung wurde abfiltriert, eingengt und mit EE / Pentan 1:3 durch Chromatographie gereinigt. Man erhielt 183 mg (94 % der Theorie) eines farblosen Öls.

R_f : 0,51 (EE / Pentan 1:3, Iod)

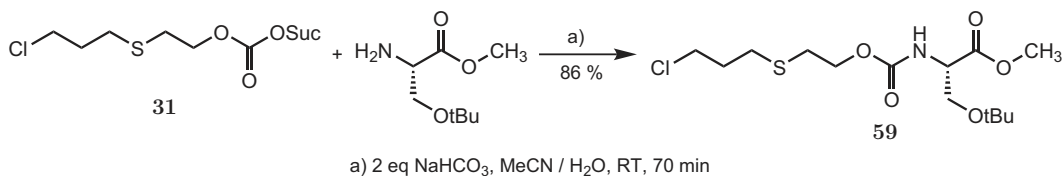
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 7.44 - 7.28 (m, 5H), 5.60 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 5.26 - 5.12 (m, 2H), 4.48 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.29 - 4.08 (m, 2H), 3.84 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 3.65 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.57 (dd, J = 8.9, 3.1 Hz, 1H), 2.79 - 2.67 (m, 4H), 2.09 - 1.87 (m, 2H), 1.08 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 170.5, 156.0, 135.5, 128.5, 128.3, 128.2, 73.4, 67.1, 64.2, 62.0, 54.6, 43.4, 32.2, 30.8, 29.3, 27.2.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 454,1433 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{ClNNO}_5\text{S}$ $\frac{m}{z}$ = 454,1431.

Elementaranalyse: Berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{ClNO}_5\text{S}$: C, 55,61; H, 7,00; N, 3,24; gefunden C, 55,84; H, 6,97; N, 3,11;

7.2.13. Kupplung des Linkers an H-Ser(tBu)-OH

Synthese von 59

3,53 g (11,9 mmol, 1 eq) **31** (Cl-*B_{red}*-OCOSuc) wurden in 135 ml Acetonitril gelöst und 2,25 g (11,9 mmol, 1 eq) H-Ser(tBu)-OMe·HCl sowie 140 ml Wasser und 2,03 g (23,8 mmol, 2 eq) NaHCO₃ zugegeben. Die Suspension wurde 1 1/4 h bei RT gerührt und das Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt. Die wässrige Suspension wurde drei mal mit je 50 ml EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Eluent aus EE / Pentan 1:3 gereinigt. Es wurden 3,62 g (86% der Theorie) des gewünschten Produkts erhalten.

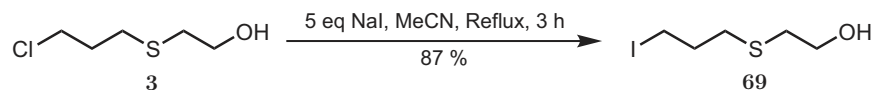
R_f : 0,45 (EE / Pentan 1:3, Iod)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.47 - 4.40 (m, 1H), 4.24 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.82 (dd, *J* = 9.0 Hz, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.66 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.57 (dd, *J* = 9.0 Hz, *J* = 3.2 Hz, 1H), 2.80 - 2.67 (m, 4H), 2.11 - 1.98 (m, 2H), 1.13 (s, 9H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 171.3, 156.2, 73.7, 64.4, 62.2, 54.8, 52.6, 43.6, 32.4, 31.0, 29.5, 27.5.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 378,1114 [M+Na]⁺; berechnet für C₁₄H₂₆ClNNaO₅S $\frac{m}{z}$ = 378,1118.

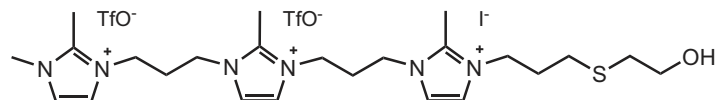
Elementaranalyse: Berechnet für C₁₄H₂₆ClNO₅S: C, 47,25; H, 7,36; N, 3,94; gefunden C, 47,21; H, 7,30; N, 3,71;

7.2.14. Herstellung des Linkers mit dreifach geladenen *Tag*Synthese von 69

1,85 g (12 mmol, 1 eq) **3** wurden mit 8,96 g (60 mmol, 5 eq) NaI in 50 ml Acetonitril gelöst und 3 h refluxiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen und der Rückstand in 40 ml Wasser und 50 ml DCM gelöst. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit je 50 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel dann im Vakuum abgezogen. Es wurden 2,58 g eines farblosen Öls erhalten. Das Produkt kann nicht ohne Zersetzung destilliert werden. Die Verbindung ist bei Raumtemperatur nicht stabil.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 3.76 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 3.31 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.75 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.66 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.21 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 2.17 - 2.03 (m, 2H).

GC-MS (EI): $\frac{m}{z}$ = 246 [M]⁺ berechnet für C₅H₁₁IOS $\frac{m}{z}$ = 246.

Synthese von 70

640 mg (1 mmol, 1 eq) **70** wurden mit 492 mg (2 mmol, 2 eq) **69** in 1 ml Acetonitril gelöst und 24 h refluxiert. Das Produkt wurde dreimal mit Diethylether gefällt und im Vakuum getrocknet. Es wurden 908 mg eines gelben Öls erhalten.

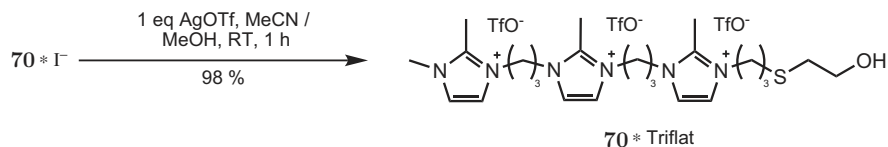
¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 7.55 - 7.43 (m, 4H), 7.40 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 4.40 - 4.19 (m, 9H), 3.81 - 3.68 (m, 5H), 2.77 - 2.56 (m, 13H), 2.47 - 2.29 (m, 4H), 2.21 - 2.09 (m, 2H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 147.2, 147.1, 146.9, 125.3, 124.2, 123.9, 123.6, 123.1, 121.0, 62.9, 49.5, 47.7, 47.6, 47.5, 37.4, 36.0, 31.6, 31.1, 30.3,

11.8, 11.6, 3.6.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 737,0982$ [M-TfO]⁺; berechnet für C₂₅H₄₁FIN₆O₄S $\frac{m}{z} = 737,1622$.

Synthese von 70·Triflat



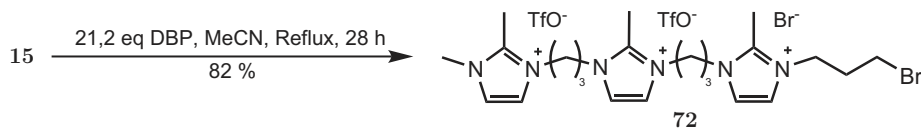
1,06 g (1,2 mmol, 1 eq) **70·I⁻** wurden in 12 ml Acetonitril gelöst. Dazu wurde eine Lösung von 307 mg (1,2 mmol, 1eq) Silbertrifluormethansulfonat in 1,8 ml Acetonitril gegeben und 1 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung 1 h unter Rückfluss erhitzt und dann abkühlen lassen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat lyophilisiert. Es wurden 1,07 g eines gelben Öls (98 % der Theorie) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 7.51 - 7.42 (m, 4H), 7.39 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 4.37 - 4.18 (m, 10H), 3.81 - 3.71 (m, 5H), 2.79 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.75 - 2.57 (m, 11H), 2.45 - 2.29 (m, 4H), 2.23 - 2.11 (m, 2H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 143.7, 143.5, 143.4, 121.8, 120.7, 120.4, 120.1, 119.5, 117.5, 59.1, 55.3, 45.9, 44.1, 44.0, 43.9, 33.8, 32.9, 28.0, 27.6, 27.1, 8.1, 8.1, 7.9.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 759,22$ [M-TfO]⁺; berechnet für C₂₆H₄₁F₆N₆O₇S₃ $\frac{m}{z} = 759,21$.

Synthese von 72



2,07 g (3,24 mmol, 1 eq) **15** und 7,0 ml (68,6 mmol, 21,2 eq) 1,3-Dibrompropan wurden in 45 ml Acetonitril gelöst und 28 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum abgezogen.

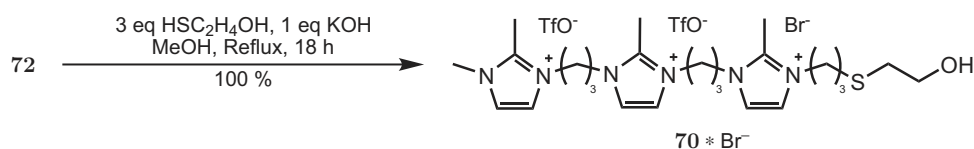
Der Rückstand wurde dreimal mit je 20 ml THF und zweimal mit je 20 ml Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde am HV getrocknet und 2,11 g (82 % der Theorie) eines farblosen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.51 - 7.43 (m, 4H), 7.39 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.32 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 4.30 - 4.21 (m, 8H), 3.77 (s, 3H), 3.48 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.67 (s, 3H), 2.64 (s, 3H), 2.60 (s, 3H), 2.46 - 2.31 (m, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 144.5, 144.4, 122.6, 121.6, 121.2, 121.0, 120.3, 118.3, 46.4, 44.9, 44.8, 44.7, 34.6, 31.2, 29.4, 28.8, 28.7, 9.0, 8.9, 8.8.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 461,2068 $[\text{M}-2\text{TfO}-\text{Br}-2\text{H}]^+$; berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{BrN}_6$ $\frac{m}{z}$ = 461,2023.

Synthese von **70**·Br⁻



2,05 g (2,43 mmol, 1 eq) **72** wurden in 5 ml MeOH gelöst. Dazu wurde eine Lösung von 513 μl (7,29 mmol, 3 eq) Mercaptoethanol und 160 mg (2,43 mmol, 1 eq) KOH in 5 ml MeOH gegeben und 16 h unter Rückfluss erhitzt. Das Produkt wurde durch Fällung mit Diethylether abgetrennt, die Etherfällung wurde noch zweimal wiederholt. Das Produkt wurde am HV getrocknet und 2,04 g (100 % der Theorie) eines braunen Öls erhalten.

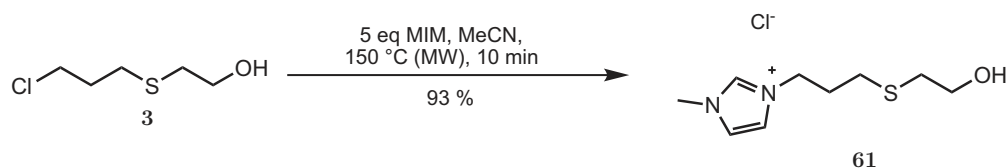
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.49 (s, 3H), 7.47 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 4.32 - 4.23 (m, 10H), 3.80 (s, 3H), 3.74 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.74 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.70 - 2.58 (m, 11H), 2.45 - 2.35 (m, 4H), 2.15 (p, J = 7.0 Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 143.6, 143.5, 143.3, 121.7, 120.7, 120.3, 120.1, 120.0, 119.5, 117.5, 59.3, 45.9, 44.1, 43.9, 43.9, 33.8, 32.4, 28.0, 27.9, 27.5, 26.7, 8.1, 8.1, 7.9.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 687,2$ [M - 2 TfO - Br + 2 TFA]⁺; berechnet für C₂₈H₄₁F₆N₆O₅S
 $\frac{m}{z} = 687,3$.

7.2.15. Herstellung des Linkers mit verschiedenen einfach geladenen Tags, Aktivierung und Kupplung an H-Ser(tBu)-OH

Synthese von **61**



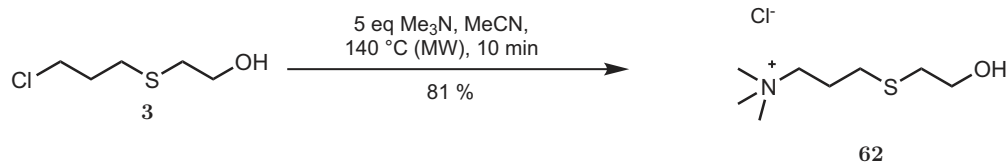
569 mg (3,7 mmol, 1 eq) **3** wurden in einem MW-Vial in 736 μl Acetonitril gelöst, dann wurden 1,5 ml (18,4 mmol, 5 eq) 1-Methylimidazol zugegeben und 10 min auf 150 °C erhitzt. Das Produkt wurde durch dreimaliges Fällern mit Diethylether gereinigt, in Acetonitril gelöst und lyophilisiert. Es wurden 817 mg (93 % der Theorie) eines schwach gelblichen Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 9.43 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 5.25 - 4.95 (m, 1H), 4.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.57 - 3.50 (m, 2H), 2.59 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.52 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.08 (p, $J = 7.1$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 136.8, 123.6, 122.3, 60.7, 47.7, 35.7, 33.5, 29.5, 27.6.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 201,1$ $[\text{M-Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{OS}$ $\frac{m}{z} = 201,1$.

Synthese von **62**



464 mg (3 mmol, 1eq) **3** wurden mit 1,5 ml einer 4,2 M Lösung NMe_3 in EtOH in einem MW-Vial gemischt. Das Gemisch wurde 10 min auf 140 °C erhitzt. Das Produkt wurde durch dreimaliges Fällern mit Diethylether abgetrennt und lyophilisiert. Es wurden 520 mg (81 % der Theorie) eines gelben Öls erhalten.

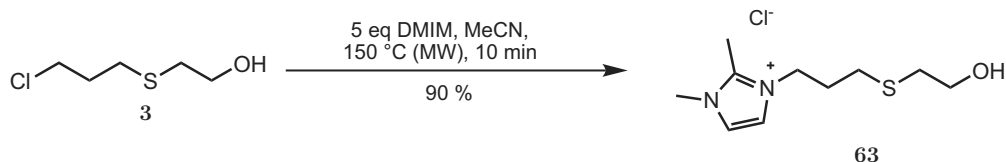
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 3.75 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.49 - 3.40 (m, 2H), 3.13 (s, 9H), 2.75 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.67 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.17 - 2.04

(m, 2H).

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 68.0, 62.9, 55.7, 55.6, 55.5, 36.1, 30.3, 25.3.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 178,129 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{NOS}$ $\frac{m}{z}$ = 178,126.

Synthese von **63**



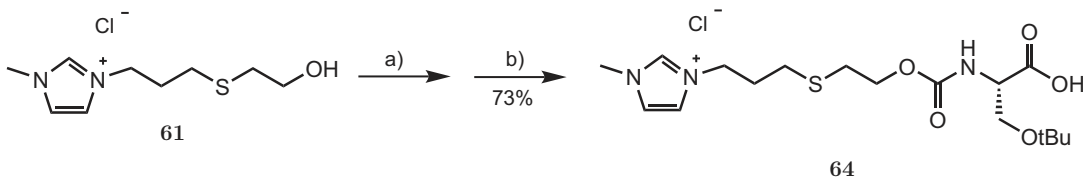
420 mg (2,7 mmol, 1 eq) **3** wurden mit 1,3 g (13,6 mmol, 5 eq) 1,2-Dimethylimidazol in einem MW-Vial in 0,5 ml Acetonitril gelöst. Das Gemisch wurde 10 min auf 150 °C erhitzt, nach dem Abkühlen wurde das Produkt durch dreimaliges Fällern mit Diethylether gereinigt und dann lyophilisiert. Es wurden 610 mg (90 % der Theorie) eines gelben Öls erhalten.

^1H -NMR (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.30 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 4.15 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.64 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.64 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.57 - 2.48 (m, 5H), 2.03 (p, J = 7.0 Hz, 2H).

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 144.4, 122.3, 120.6, 60.2, 46.6, 34.6, 33.3, 28.5, 27.5, 8.9.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 215,1238 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$; berechnet für CHNO $\frac{m}{z}$ = 215,1213.

Synthese von **64**



a) 1,5 eq $(\text{SucO})_2\text{CO}$, 3 eq NEt_3 , MeCN, RT, 60 min
b) H-Ser(tBu)-OH, 2 eq NaHCO_3 , MeCN / H_2O , RT, 60 min

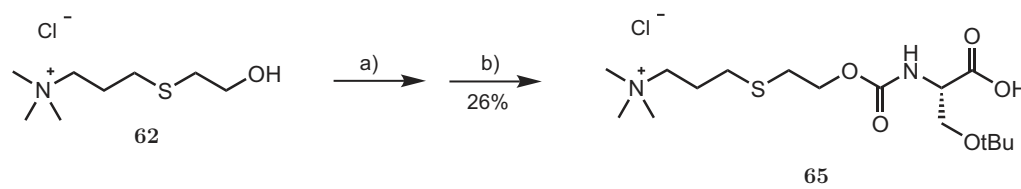
321 mg (1,35 mmol, 1 eq) **61** wurden in 13,5 ml Acetonitril gelöst, dann wurden 521 mg (2,03 mmol, 1,5 eq) (SucO)₂CO und 566 μ l NEt₃ zugegeben und 1 h gerührt. Das Zwischenprodukt wurde durch zweimaliges Fällern mit Diethylether gereinigt. Der restliche Diethylether wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 27 ml Acetonitril/Wasser (1:1) gelöst. Zu dieser Lösung wurden sofort 218 mg (1,35 mmol, 1 eq) H-Ser(tBu)OH und 227 mg (2,7 mmol, 2 eq) NaHCO₃ gegeben und 1 h gerührt. Das Acetonitril wurde im Vakuum abgezogen und das Produkt durch FPE gereinigt. Es wurden 418 mg (73 % der Theorie) eines gelben Öls erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 8.76 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 4.32 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.21 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.11 - 4.03 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.80 - 3.59 (m, 2H), 2.82 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.62 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.24 - 2.01 (m, 2H), 1.19 (s, 9H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 176.8, 157.7, 136.1, 123.7, 122.2, 74.7, 63.9, 62.3, 57.2, 47.9, 35.6, 30.1, 28.8, 27.5, 26.5.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 388,196 [M-Cl]⁺; berechnet für C₁₇H₃₀N₃O₅S $\frac{m}{z}$ = 388,190.

Synthese von **65**



a) 1,5 eq (SucO)₂CO, 3 eq NEt₃, MeCN, RT, 60 min
 b) H-Ser(tBu)-OH, 2 eq NaHCO₃, MeCN / H₂O, RT, 60 min

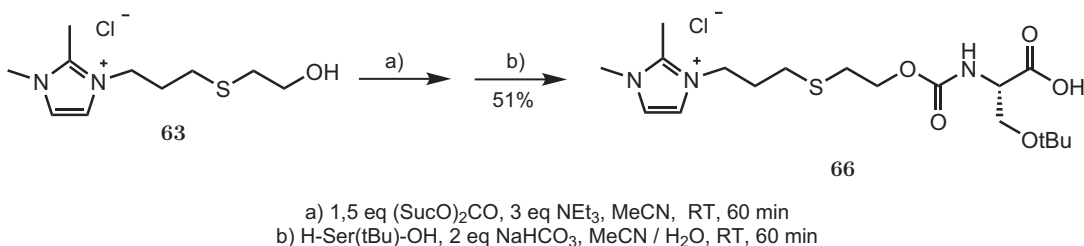
504 mg (2,4 mmol, 1 eq) **62** wurden in 24 ml Acetonitril gelöst, dann wurden 907 mg (3,54 mmol, 1,5 eq) (SucO)₂CO und 985 μ l NEt₃ zugegeben und 1 h gerührt. Das Zwischenprodukt wurde durch zweimaliges Fällern mit Diethylether gereinigt. Der restliche Diethylether wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 48 ml Acetonitril/Wasser (1:1) gelöst. Zu dieser Lösung wurden sofort 380 mg (2,4 mmol, 1 eq) H-Ser(tBu)OH und 396 mg (4,8 mmol, 2 eq) NaHCO₃ gegeben und 1 h gerührt. Das Acetonitril wurde im Vakuum abgezogen und das Produkt durch FPE gereinigt. Es wurden 251 mg (26 % der Theorie) eines gelben Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 4.43 - 4.15 (m, 2H), 4.13 - 4.04 (m, 1H), 3.80 - 3.56 (m, 2H), 3.48 - 3.39 (m, 2H), 3.13 (s, 9H), 2.85 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.70 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.17 - 1.99 (m, 2H), 1.19 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 160.5, 77.5, 68.1, 66.7, 65.0, 59.9, 55.7, 55.7, 55.6, 32.9, 30.5, 29.2, 25.3.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 365,22$ $[\text{M-Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ $\frac{m}{z} = 365,21$.

Synthese von **66**



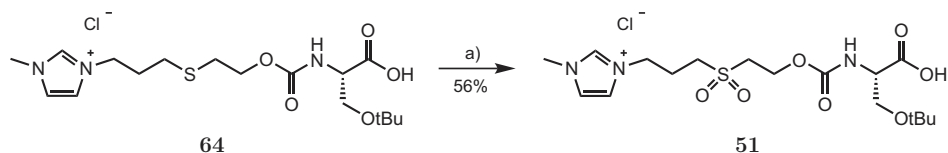
576 mg (2,3 mmol, 1 eq) **63** wurden in 23 ml Acetonitril gelöst, dann wurden 883 mg (3,45 mmol, 1,5 eq) $(\text{SucO})_2\text{CO}$ und 960 μl NEt_3 zugegeben und 1 h gerührt. Das Zwischenprodukt wurde durch zweimaliges Fällern mit Diethylether gereinigt. Der restliche Diethylether wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 46 ml Acetonitril/Wasser (1:1) gelöst. Zu dieser Lösung wurden sofort 371 mg (2,3 mmol, 1 eq) H-Ser(tBu)OH und 386 mg (4,6 mmol, 2 eq) NaHCO_3 gegeben und 1 h gerührt. Das Acetonitril wurde im Vakuum abgezogen und das Produkt durch FPE gereinigt. Es wurden 513 mg (51 % der Theorie) eines gelben Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.29 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 4.14 (t, $J = 6.7$ Hz, 4H), 3.98 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 3.70 - 3.46 (m, 5H), 2.73 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.67 - 2.49 (m, 5H), 2.03 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.09 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 176.7, 157.7, 144.4, 122.3, 120.6, 74.7, 63.9, 62.3, 57.2, 46.5, 34.5, 30.1, 28.4, 27.6, 26.5, 8.8.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 402,21$ $[\text{M-Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ $\frac{m}{z} = 402,21$.

Synthese von **51**



a) 2,2 eq H₂O₂, cat. Na₂WO₄, H₂O, 70 °C, 60 min

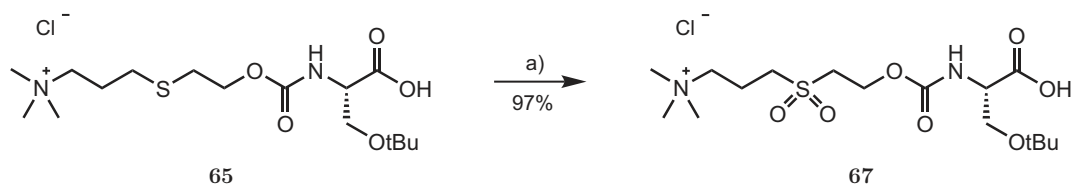
367 mg (0,87 mmol, 1 eq) **64** wurden in 3,5 ml Wasser gelöst. Dazu wurden 5 mg (17 μmol, 2 mol%) Natriumwolframat und 98 μl 30 %ige Wasserstoffperoxidlösung gegeben. Das Gemisch wurde auf 70 °C erhitzt, nach 30 min wurden nochmals 98 μl Wasserstoffperoxidlösung zugegeben und weitere 45 min gerührt. Die Reaktion wurde mit HPLC-MS kontrolliert, es wurde festgestellt, dass die Umsetzung vollständig war. Die Lösung wurde abkühlen lassen und das Produkt mittels FPE isoliert. Es wurden 223 mg (56 % der Theorie) eines farblosen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 8.79 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 4.62 m 4.44 (m, 2H), 4.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.13 - 4.03 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.78 - 3.58 (m, 4H), 3.36 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.52 - 2.37 (m, 2H), 1.19 (s, 9H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 179.4, 159.5, 139.0, 126.6, 124.9, 77.5, 65.0, 60.8, 60.1, 55.0, 52.7, 50.1, 38.5, 29.2, 24.7.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 420,1812 [M-Cl]⁺; berechnet für C₁₇H₃₀N₃O₇S $\frac{m}{z}$ = 420,1804.

Synthese von **67**



a) 2,2 eq H₂O₂, cat. Na₂WO₄, H₂O, 70 °C, 60 min

241 mg (0,6 mmol, 1 eq) **65** wurden in 2,4 ml Wasser gelöst. Dazu wurden 4 mg (12 μmol, 2 mol%) Natriumwolframat und 68 μl Wasserstoffperoxid 30 %ig gegeben. Das Gemisch wurde auf 70 °C erhitzt, nach 30 min wurden nochmals 68 μl Wasserstoffperoxid 30 %ig zugegeben und weitere 50 min gerührt. Die Reaktion wurde mit HPLC-MS kontrolliert, es wurde festgestellt, dass die Umsetzung vollständig erfolgte. Die Lösung wurde abkühlen lassen und das Produkt mittels FPE isoliert.

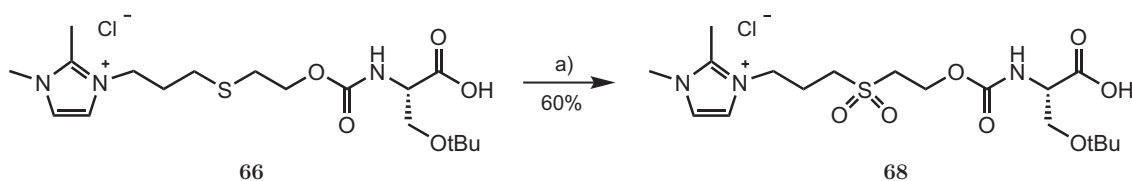
Es wurden 251 mg (97 % der Theorie) eines farblosen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 4.64 - 4.44 (m, 2H), 4.11 - 4.04 (m, 1H), 3.80 - 3.60 (m, 4H), 3.58 - 3.50 (m, 2H), 3.41 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.17 (s, 9H), 2.46 - 2.28 (m, 2H), 1.19 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 179.3, 159.5, 77.5, 66.8, 65.0, 60.8, 60.0, 55.7, 55.6, 55.6, 55.0, 52.7, 29.2, 18.3.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 397,1991$ $[\text{M-Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ $\frac{m}{z} = 397,2008$.

Synthese von **68**



a) 2,2 eq H_2O_2 , cat. Na_2WO_4 , H_2O , 70 °C, 60 min

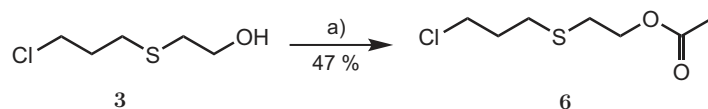
494 mg (1,13 mmol, 1 eq) **65** wurden in 4,5 ml Wasser gelöst. Dazu wurden 7 mg (22 μmol , 2 mol%) Natriumwolframat und 85 μl 30 %ige Wasserstoffperoxidlösung gegeben. Das Gemisch wurde auf 70 °C erhitzt, nach 30 min und 50 min wurden jeweils nochmals 85 μl Wasserstoffperoxidlösung zugegeben und weitere 20 min gerührt. Die Reaktion wurde mit HPLC-MS kontrolliert, es wurde festgestellt, dass die Umsetzung vollständig erfolgte. Die Lösung wurde abkühlen lassen und das Produkt mittels FPE isoliert. Es wurden 321 mg (60 % der Theorie) eines farblosen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.41 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 4.60 - 4.46 (m, 2H), 4.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.12 - 4.02 (m, 1H), 3.79 - 3.72 (m, 4H), 3.69 - 3.59 (m, 3H), 3.38 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.45 - 2.32 (m, 2H), 1.19 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 179.4, 159.5, 147.4, 125.3, 123.4, 77.5, 65.0, 60.8, 60.1, 55.0, 52.7, 48.7, 37.4, 29.2, 24.1, 11.6.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 434,1962$ $[\text{M-Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ $\frac{m}{z} = 434,1955$.

7.2.16. Herstellung des oxidierten Linkers 8

Synthese von 6

a) 2 eq Ac₂O, cat. NaOH, 150 °C (MW), 25 min

5,65 g (36,4 mmol, 1 eq) **3** wurden in einem MW-Vial mit 6,9 ml (72,8 mmol, 2 eq) Essigsäureanhydrid und 182 mg (4,6 mmol, 12,5 mol%) NaOH gemischt und anschließend 25 min auf 150 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 20 ml DCM in einen Scheidetrichter überführt und mit 30 ml ges. NaHCO₃ Lsg. überschichtet. Nach Ende der Gasentwicklung wurde pH 7-8 mit Natronlauge eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit je 30 ml DMC extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 30 ml ges. NaHCO₃ Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel mit EE/Pentan 1:9 gereinigt. Es wurden 3,39 g (47 % der Theorie) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

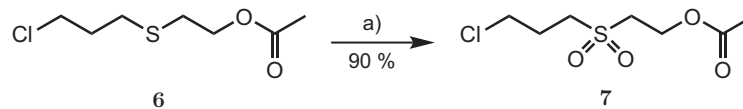
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 4.14 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.71 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.02 (s, 3H), 2.01 - 1.93 (m, 2H).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 170.1, 63.0, 43.8, 31.9, 29.5, 28.3, 20.6.

GC-MS (EI): $\frac{m}{z} = 136$ [M-AcOH]⁺ berechnet für C₅H₉ClS $\frac{m}{z} = 136$.

Elementaranalyse: berechnet für C₇H₁₃ClO₂S: C, 42,74; H, 6,66; N, 0,00: gefunden C, 42,60; H, 6,64; N, 0.

Synthese von 7



a) 2,2 eq H₂O₂, cat. NaWO₄, H₂O / EtOH, 70 °C, 60 min

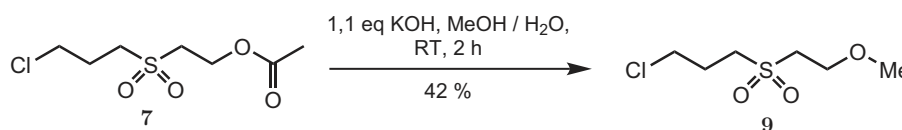
2,59 g (13,2 mmol, 1 eq) **6** wurden in 5 ml EtOH gelöst und auf 70 °C erhitzt. 434 mg (1,32 mmol, 0,1 eq) Natriumwolframat wurden in 0,5 ml Wasser gelöst und zur ethanolischen Lösung gegeben. Dann wurde sofort und nochmals nach 15 min und 30 min je 1 ml 30 %ige Wasserstoffperoxidlösung zugesetzt. Nach der Reaktion wurde das EtOH am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 20 ml Wasser/DCM (1:1) gelöst. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit je 10 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organische Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden 3,02 g (90 % der Theorie) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 4.35 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.77 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.54 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.33 - 3.24 (m, 2H), 2.23 - 2.10 (m, 2H), 2.04 (s, 3H).

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 251,01 [M+Na]⁺; berechnet für C₇H₁₃ClNaO₄S $\frac{m}{z}$ = 251,01.

Elementaranalyse: berechnet für C₇H₁₃ClO₄S: C, 36,76; H, 5,73; N, 0,00: gefunden C, 36,70; H, 5,72; N, 0.

Synthese von 9



2,52 g (11 mmol, 1 eq) **7** wurden in 50 ml MeOH gelöst. Dazu wurde eine Lösung von 485 mg KOH (12 mmol, 1,1 eq) in 5 ml Wasser gegeben. Die Mischung wurde 2 h gerührt und dann das MeOH am Rotationsverdampfer abgezogen. Die wässrige Lsg. wurde mit 10 ml 2 N HCl versetzt und dann dreimal mit je 10 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organische Phasen wurden mit 10 ml ges. NaHCO₃ Lsg. gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt durch Säulenchromatographie mit EE/Pentan 2:1 gereinigt. Es wurden 860

mg (42 % der Theorie) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

R_f : 0,34 (EE/Pentan 2:1)

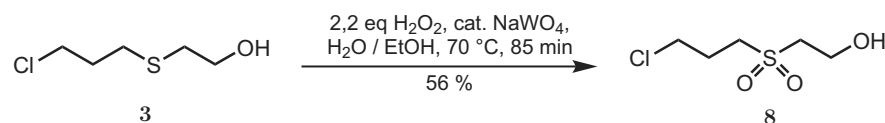
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 3.75 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.69 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.41 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.28 (s, 3H), 3.26 - 3.18 (m, 2H), 2.22 - 2.08 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 65.5, 58.1, 52.3, 51.1, 43.5, 24.7.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 223,0171 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{ClNaO}_3\text{S}$ $\frac{m}{z}$ = 223,0172.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{ClO}_3\text{S}$: C, 35,91; H, 6,53; N, 0,00: gefunden C, 36,05; H, 6,53; N, 0.

Synthese von 8



6,14 g (39,7 mmol, 1 eq) **3** wurden in einem Kolben vorgelegt. Dazu wurde eine Lösung von 131 mg (0,39 mmol, 1 mol%) Natriumwolframat in 15 ml Wasser (pH 4-5, mit Eisessig eingestellt) gegeben und auf 70 °C erhitzt. 8,9 ml (87,3 mmol, 2,2 eq) 30% ige Wasserstoffperoxidlösung wurden mit 9 ml Wasser verdünnt und zugetropft. Nachdem die Reaktion vollständig war, wurde das überschüssige Wasserstoffperoxid mit Natriumhydrogensulfit gequench und die wässrige Phase viermal mit je 25 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organische Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden 4,17 g (56 % der Theorie) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 5.14 (s, 1H), 3.85 - 3.71 (m, 4H), 3.31 - 3.21 (m, 4H), 2.22 - 2.10 (m, 2H).

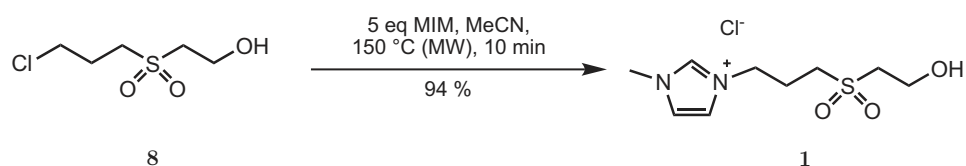
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 55.1, 55.1, 51.3, 43.6, 24.8.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 209,0016$ $[M+Na]^+$; berechnet für $C_5H_{11}ClNaO_3S$ $\frac{m}{z} = 209,0015$.

Elementaranalyse: berechnet für $C_5H_{11}ClO_3S$: C, 32,17; H, 5,94; N, 0,00: gefunden C, 32,18; H, 5,90; N, 0.

7.2.17. Herstellung des oxidierten Linkers mit einfach und dreifach geladenem Tag

Synthese von **1**



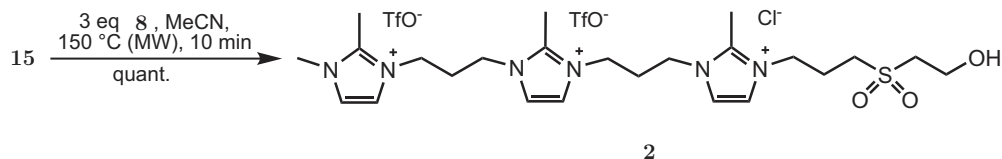
335 mg (1,79 mmol, 1 eq) **8** wurden in einem MW-Vial in 360 μl Acetonitril gelöst, dazu wurden 712 μl (8,97 mmol, 5 eq) 1-Methylimidazol gegeben. Das Gemisch wurde 10 min auf 150 °C erhitzt und das Produkt durch viermaliges Fällern mit Diethylether gereinigt. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und lyophilisiert. Es wurden 453 mg eines gelben Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 9.32 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 5.52 - 5.39 (m, 1H), 4.32 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.77 (q, J = 5.4 Hz, 2H), 3.28 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.24 - 3.15 (m, 2H), 2.35 - 2.21 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 137.0, 123.7, 122.3, 55.0, 54.7, 50.5, 47.2, 35.8, 22.7.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 233,0976 $[\text{M-Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $\frac{m}{z}$ = 233,0954.

Synthese von **2**



356 mg (0,56 mmol, 1 eq) **15** wurden in einem MW-Vial in 200 μl Acetonitril suspendiert und 314 mg (1,68 mmol, 3 eq) **8** zugegeben. Das Gemisch wurde 10 min auf 150 °C aufgeheizt und das Produkt anschließend durch Fällern mit Diethylether abgetrennt. Das Produkt wurde noch zweimal gefällt und dann im Vakuum getrocknet, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Es wurden 475 mg (quant.) eines sehr hygroskopischen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 7.53 - 7.44 (m, 4H), 7.39 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 4.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.31 - 4.20 (m, 8H), 4.05 (dd, $J = 11.8, 6.6$ Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.50 - 3.42 (m, 3H), 3.38 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.68 - 2.58 (m, 9H), 2.46 - 2.34 (m, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O , 25 °C): δ (ppm) = 144.5, 144.4, 122.6, 121.5, 121.2, 121.1, 120.9, 120.4, 118.4, 54.9, 54.8, 50.5, 46.2, 44.9, 44.8, 34.6, 28.9, 28.8, 21.4, 9.0, 8.8.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 491,2778$ $[\text{M-Cl-2TfO-2H}]^+$; berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}$ $\frac{m}{z} = 491,2799$.

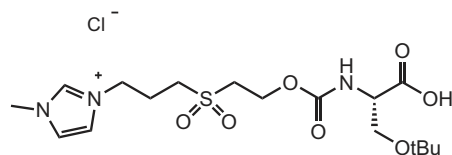
7.2.18. Herstellung der geschützten Aminosäurederivate nach dem *Tag*-Ansatz

Allgemeines Protokoll für die Kupplung der Verbindung **31** an Aminosäuren

1 eq **3**, 1,5 eq (SucO)₂CO und 3 eq Pyridin wurden 2,5 h in Acetonitril (ca. 0,25 mM, bezogen auf **3**) gerührt. Das Produkt wurde mit Diethylether gefällt.

Das Öl wurde in Acetonitril (ca. 0,25 mM, bezogen auf **3**) gelöst und 1 eq der jeweiligen Aminosäure sowie 2 eq NaHCO₃ und Wasser (gleiche Menge wie Acetonitril) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h gerührt und dann das Acetonitril am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Produkt wurde durch FPE aus der wässrigen Phase gewonnen.

Synthese von **51** über den *Tag*-Ansatz



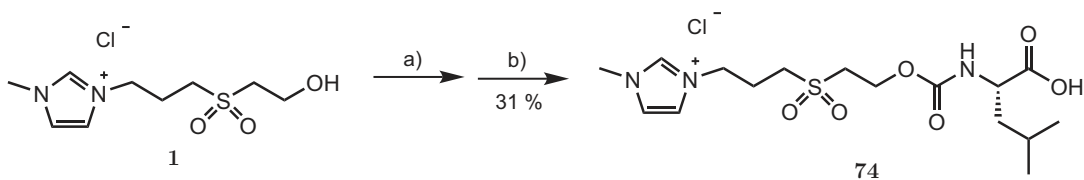
Ansatzgrösse 0,52 mmol, Ausbeute 150 mg (63 % der Theorie) weißer Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, 25 °C): δ (ppm) = 7.69 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 4.66 - 4.58 (m, 1H), 4.52 - 4.36 (m, 2H), 4.33 - 4.22 (m, 1H), 4.13 - 4.07 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.78 - 3.64 (m, 2H), 3.57 - 3.36 (m, 2H), 3.29 - 3.07 (m, 2H), 2.47 - 2.30 (m, 2H), 1.17 (s, 9H).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-d₄, 25 °C): δ (ppm) = 177.0, 157.2, 125.2, 123.6, 74.2, 64.0, 59.6, 58.6, 53.9, 51.6, 36.6, 27.8, 27.7, 24.1.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 420,1793 [M-Cl]⁺; berechnet für C₁₇H₃₀N₃O₇S $\frac{m}{z}$ = 420,1804.

Synthese von **74**



a) 1,5 eq (SucO)₂CO, 3 eq Pyridin, MeCN, RT, 1 h
 b) 1 eq H-Leu-OH, 1,3 eq NaHCO₃, MeCN / H₂O, RT, 1 h

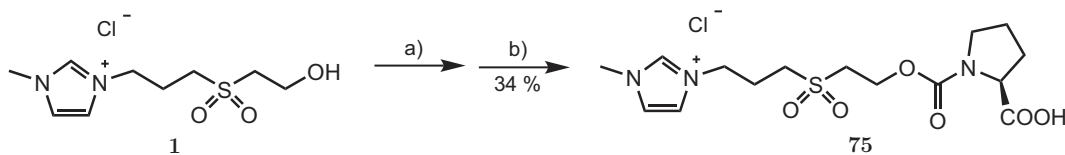
Ansatzgrösse 0,6 mmol, Ausbeute 78 mg (31 % der Theorie) weißer Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, 25 °C): δ (ppm) = 7.69 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 4.67 - 4.59 (m, 1H), 4.50 - 4.32 (m, 2H), 4.24 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.06 (dd, *J* = 10.4, 3.9 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.56 - 3.42 (m, 1H), 3.42 - 3.13 (m, 4H), 2.38 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.80 - 1.45 (m, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-d₄, 25 °C): δ (ppm) = 180.5, 157.4, 125.2, 123.7, 59.6, 56.6, 54.0, 51.7, 43.3, 36.6, 26.2, 24.1, 23.8, 22.0.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 390,1704 [M-Cl]⁺; berechnet für C₁₆H₂₈N₃O₆S $\frac{m}{z}$ = 390,1693.

Synthese von **75**



a) 1,5 eq (SucO)₂CO, 3 eq Pyridin, MeCN, RT, 1 h
 b) 1 eq H-Pro-OH, 1,3 eq NaHCO₃, MeCN / H₂O, RT, 1 h

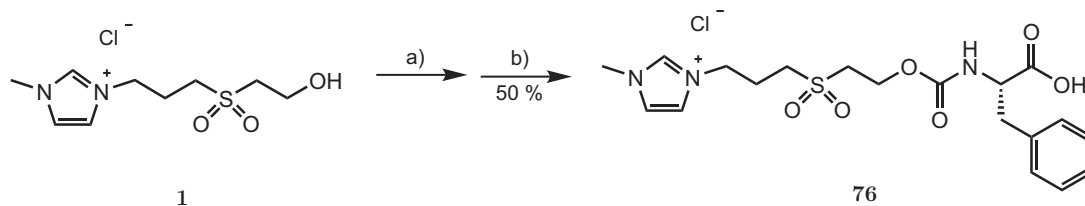
Ansatzgrösse 0,5 mmol, Ausbeute 70 mg (34 % der Theorie) weißer Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, 25 °C): δ (ppm) = 7.74 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 4.66 - 4.59 (m, 1H), 4.51 - 4.38 (m, 2H), 4.30 - 4.23 (m, 1H), 4.14 (dd, *J* = 8.5, 3.6 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.62 - 3.53 (m, 1H), 3.50 - 3.40 (m, 3H), 3.31 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 3.20 (dd, *J* = 8.8, 6.2 Hz, 2H), 2.44 - 2.32 (m, 2H), 2.29 - 2.19 (m, 1H), 2.11 - 2.01 (m, 1H), 2.00 - 1.90 (m, 1H), 1.90 - 1.80 (m, 1H).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-d₄, 25 °C): δ (ppm) = 180.3, 155.9, 125.0, 123.7, 63.1, 60.7, 54.3, 51.5, 36.5, 32.8, 24.5, 23.5.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 374,1399$ $[M-Cl]^+$; berechnet für $C_{15}H_{24}N_3O_6S$ $\frac{m}{z} = 374,1380$.

Synthese von **76**

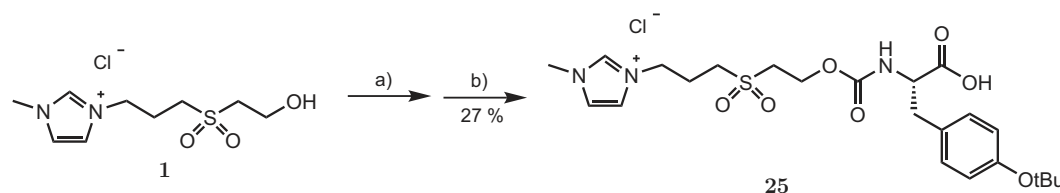


a) 1,5 eq (SucO)₂CO, 3 eq Pyridin, MeCN, RT, 1 h
b) 1 eq H-Phe-OH, 1,3 eq NaHCO₃, MeCN / H₂O, RT, 1 h

Ansatzgrösse 0,56 mmol, Ausbeute 129 mg (50 % der Theorie) weißer Feststoff.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 390,1704$ $[M-Cl]^+$; berechnet für $C_{16}H_{28}N_3O_6S$ $\frac{m}{z} = 390,1693$.

Synthese von **25**



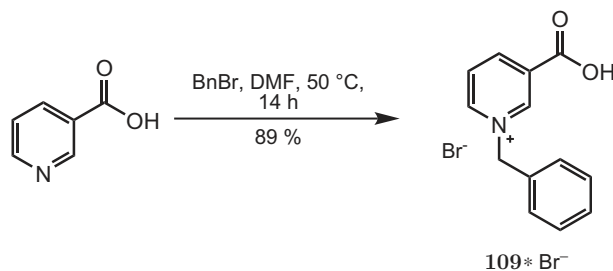
a) 1,5 eq (SucO)₂CO, 3 eq Pyridin, MeCN, RT, 1 h
b) 1 eq H-Tyr(tBu)-OH, 1,3 eq NaHCO₃, MeCN / H₂O, RT, 1 h

Ansatzgrösse 0,87 mmol, Ausbeute 118 mg (27 % der Theorie) weißer Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, 25 °C): δ (ppm) = 7.63 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.15 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.59 - 4.47 (m, 1H), 4.44 - 4.28 (m, 2H), 4.28 - 4.04 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.52 - 3.32 (m, 2H), 3.22 - 3.07 (m, 3H), 2.99 - 2.75 (m, 1H), 2.40 - 2.27 (m, 2H), 1.30 (s, 9H).

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 496,2115$ $[M-Cl]^+$; berechnet für $C_{23}H_{34}N_3O_7S$ $\frac{m}{z} = 496,2112$.

7.2.19. Herstellung der Nicotinsäurederivate

Synthese von 109

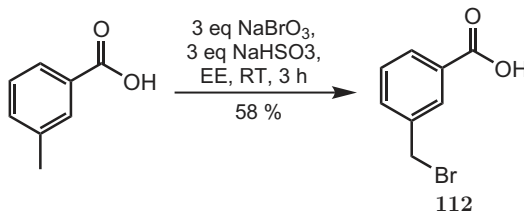
6,16 g (50 mmol, 1 eq) Nicotinsäure und 5,9 ml (50 mmol, 1 eq) Benzylbromid wurden in 90 ml DMF gelöst und 14 h auf 50 °C erhitzt. Das DMF wurde abdestilliert, beim Abkühlen kristallisierte das Produkt aus. Es wurden 13,07 g (89 % der Theorie) eines schmutzig weißen Feststoffs isoliert. Das Produkt kann nicht umkristallisiert werden, ohne dass eine Stoffumwandlung eintritt.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 9.36 (s, 1H), 9.01 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 8.95 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.14 (dd, J = 7.8, 6.4 Hz, 1H), 7.51 (s, 5H), 5.89 (s, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-d₄, 25 °C): δ (ppm) = 165.9, 146.0, 145.7, 145.3, 134.6, 132.3, 129.9, 129.5, 129.0, 128.2, 64.8.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 214,0860 [M-Br]⁺; berechnet für C₁₃H₁₂NO₂ $\frac{m}{z}$ = 214,0863.

Elementaranalyse: Berechnet für C₁₃H₁₂BrNO₂: C, 53,08; H, 4,11; N, 4,76: gefunden C, 52,95; H, 4,13; N, 4,73;

Synthese von m-Bromtoluolsäure 112

6,33 g (46,5 mmol, 1 eq) m-Toluolsäure wurden in EE gelöst und eine Lösung von

21,05 g (134 mmol, 3 eq) Natriumbromat in Wasser zugegeben. Anschließend wurde innerhalb von 20 min eine Lsg. von 14,52 g (134 mmol, 3 eq) Natriumhydrogensulfit in 140 ml Wasser zugegeben. Nach 3 h wurde die Mischung mit Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit Diethylether extrahiert, die vereinigten organische Phasen zweimal mit einer Natriumthiosulfatlösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal aus Hexan/EE 2:1 umkristallisiert. Es wurden 5,80 g (58 % der Theorie) des Produkts als weiße Kristalle erhalten.

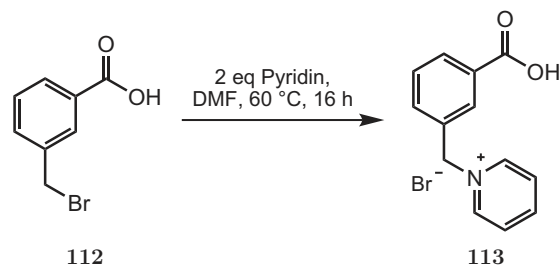
R_f : 0,21 (Pentan/EE 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO, 25 °C): δ (ppm) = 13.13 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 7.54 - 7.48 (m, 1H), 4.81 (s, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO, 25 °C): δ (ppm) = 166.8, 138.6, 133.6, 131.1, 130.0, 129.0, 129.0, 33.5.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 214,9691$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; berechnet für $\text{C}_8\text{H}_8\text{BrO}_2$ $\frac{m}{z} = 214,9708$.

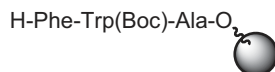
Synthese von 113



200 mg (0,93 mmol, 1 eq) m-Bromtoluolsäure wurden in 1 ml DMF gelöst und mit 150 μl Pyridin versetzt. Die Mischung wurde 16 h auf 50 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Produkt durch Fällern mit Diethylether gereinigt. Der Rückstand wurde am Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde aus Methanol kristallisiert. Auf eine Bestimmung der Ausbeute und anderer Parameter wurde verzichtet, da von dieser Substanz nur die Kristallstruktur von Interesse war.

7.2.20. Peptidsynthesen an der festen Phase

Synthese des Peptids H-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotrytyl **16**



Für die Peptidsynthese an der festen Phase wurde 1 g (0,95 mmol, 1 eq) H-Ala-Chlorotrytylharz in einer 10 ml Spritze 15 min in DMF gequollen. Anschließend wurden die Peptidkupplungen mit jeweils 3 eq Aminosäure, 3 eq HOBt und 5 eq DIC gelöst in 4 ml abs. DMF durchgeführt. Die Kupplungsdauer betrug jeweils 1 h. Nach jeder Kupplung wurde das Harz 5 mal mit DMF gewaschen, mittels Kaisertest die Vollständigkeit der Reaktion überprüft und dann zweimal für 5 min mit je 4 ml einer 20%igen Lsg. von Piperidin in DMF die Fmoc-Gruppe abgespalten. Das Harz wurde danach je 5 mal mit DMF und DCM gewaschen. Das Harz wurde nach dem Abspalten der letzten Fmoc-Gruppe am Hochvakuum getrocknet.

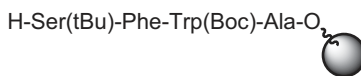
Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen wurde ein Teil des Peptids mit einer Lösung aus DCM/AcOH/TFE 3:1:1 vom Harz abgespalten. Die unten angegebenen analytischen Daten beziehen sich auf diese Probe.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 8.53 - 8.35 (m, 2H), 8.04 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.33 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.29 - 7.12 (m, 6H), 4.74 - 4.66 (m, 1H), 4.22 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 3.60 (dd, J = 8.2, 4.6 Hz, 1H), 3.10 (dd, J = 14.7, 4.6 Hz, 1H), 3.04 - 2.88 (m, 2H), 2.69 - 2.58 (m, 1H), 1.60 (s, 9H), 1.31 (d, J = 7.3 Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 174.3, 170.9, 149.5, 130.8, 129.8, 128.7, 127.0, 124.8, 124.7, 122.8, 120.0, 116.6, 115.1, 83.9, 65.4, 55.5, 52.4, 48.2, 28.2, 17.8, 15.6.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 523,2581 $[\text{M}+\text{H}]^+$; berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_6$ $\frac{m}{z}$ = 523,2581.

Synthese des Peptids H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotrytyl **26**

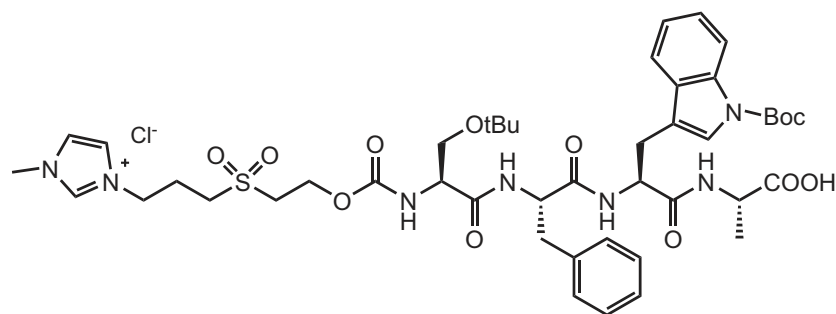


Für die Peptidsynthese an der festen Phase wurden 30 mg (29 μmol , 1 eq) H-Phe-

Trp(Boc)-Ala-Chlorotritylharz **16** in einer 1 ml Spritze 15 min in DMF gequollen. Anschließend wurde die Peptidkupplung mit 3 eq Aminosäure, 3 eq HOBt und 5 eq DIC gelöst in 4 ml abs. DMF durchgeführt. Die Kupplungsdauer betrug 1 h. Nach der Kupplung wurde das Harz 5 mal mit DMF gewaschen, mittels Kaisertest die Vollständigkeit der Reaktion überprüft und dann zweimal für 5 min mit je 4 ml einer 20%igen Lsg. von Piperidin in DMF die Fmoc-Gruppe abgespalten. Das Harz wurde danach je 5 mal mit DMF und DCM gewaschen. Das Harz wurde nach dem Abspalten der Fmoc-Gruppe und waschen mit DMF und DCM am Hochvakuum getrocknet. Die Synthese des D-Epimers erfolgte auf die gleiche Art und Weise. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen wurde ein Teil des Peptids mit einer Lösung aus DCM/AcOH/TFE 3:1:1 von einer Probe des Harzes abgespalten. Die unten angegebenen analytischen Daten beziehen sich auf diese Probe.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 666,3509$ $[M+H]^+$; berechnet für $C_{35}H_{48}N_5O_8$ $\frac{m}{z} = 666,3503$.

Synthese des Peptids MIM-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH **22**



Für die Peptidsynthese an der festen Phase wurden 55 mg (52 μ mol, 1 eq) H-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotritylharz **16** in einer 1 ml Spritze 15 min in DCM gequollen. Anschliessend wurden die Peptidkupplungen mit jeweils 3 eq Aminosäure, 3 eq HOBt und 3 eq DIC gelöst in 0,5 ml abs. DCM durchgeführt. Die Kupplungsdauer betrug 1 h. Nach der Kupplung wurde das Harz je 5 mal mit DMF und DCM gewaschen und mittels Kaisertest die Vollständigkeit der Reaktion überprüft.

Das Peptid wurde mit einer Lösung aus DCM / AcOH / TFE 3 : 1 : 1 vom Harz abgespalten, und durch fällen mit Diethylether gereinigt. Es wurden 48 mg (96 % der Theorie) eines weissen Feststoffs erhalten. Die unten angeführten analytischen Daten beziehen sich auf diese Probe.

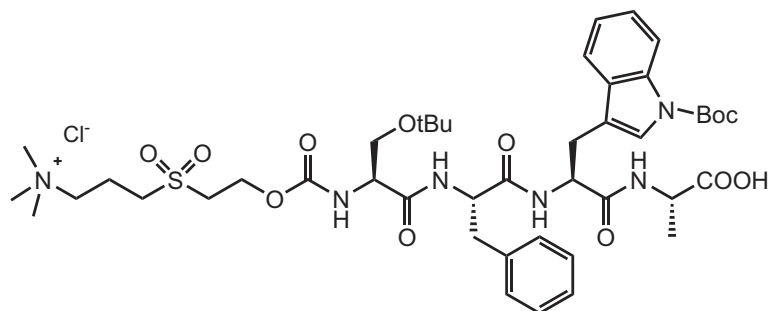
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO, 25 °C): δ (ppm) = 9.11 (s, 1H), 8.33 (d, $J = 7.3$ Hz,

1H), 8.17 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.75 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.72 - 7.64 (m, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.36 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.30 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.28 - 7.09 (m, 6H), 4.59 (dd, $J = 13.3, 8.3$ Hz, 1H), 4.46 (dd, $J = 12.4, 8.4$ Hz, 1H), 4.37 - 4.19 (m, 4H), 4.12 - 3.95 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.45 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.39 - 3.36 (m, 1H), 3.34 - 3.28 (m, 1H), 3.24 - 3.16 (m, 2H), 3.12 (dd, $J = 14.8, 4.6$ Hz, 1H), 3.02 - 2.92 (m, 3H), 2.83 - 2.76 (m, 1H), 2.26 - 2.14 (m, 2H), 1.58 (s, 9H), 1.26 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.99 (s, 9H).

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO, 25 °C): δ (ppm) = 173.8, 169.9, 169.2, 148.9, 137.3, 136.8, 130.2, 129.1, 127.7, 124.1, 123.6, 122.2, 122.0, 119.3, 116.2, 83.2, 72.8, 52.3, 47.0, 35.6, 27.5, 26.9, 22.3, 22.1, 17.8.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 924,43$ $[\text{M}-\text{Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_{45}\text{H}_{62}\text{N}_7\text{O}_{12}\text{S}$ $\frac{m}{z} = 924,42$.

Synthese des Peptids Me₃N-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH **27**



Für die Peptidsynthese an der festen Phase wurden 86 mg (81 μmol , 1 eq) H-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotriethylharz **16** in einer 1 ml Spritze 15 min in DCM gequollen. Anschliessend wurden die Peptidkupplungen mit jeweils 3 eq Aminosäure, 3 eq HOBT und 3 eq DIC gelöst in 0,5 ml abs. DCM durchgeführt. Die Kupplungsdauer betrug 1 h. Nach der Kupplung wurde das Harz je 5 mal mit DMF und DCM gewaschen und mittels Kaisertest die Vollständigkeit der Reaktion überprüft.

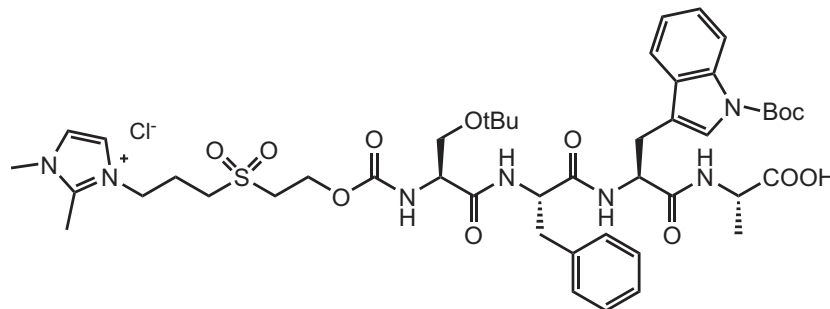
Das Peptid wurde mit einer Lösung aus DCM / AcOH / TFE 3 : 1 : 1 vom Harz abgespalten, und durch fällen mit Diethylether gereinigt. Es wurden 52 mg (69 % der Theorie) eines weissen Feststoffs erhalten. Die unten angeführten analytischen Daten beziehen sich auf diese Probe.

^1H -NMR (500 MHz, DMSO, 25 °C): δ (ppm) = 8.09 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.27 - 7.11 (m, 6H), 4.68

(dd, $J = 8.4, 5.3$ Hz, 1H), 4.62 - 4.54 (m, 2H), 4.37 - 4.30 (m, 1H), 4.26 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.09 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 3.54 - 3.37 (m, 6H), 3.29 - 3.19 (m, 3H), 3.12 (s, 10H), 2.89 (dd, $J = 14.0, 9.0$ Hz, 1H), 2.35 - 2.22 (m, 2H), 1.78 (dd, $J = 11.0, 5.4$ Hz, 1H), 1.64 (s, 9H), 1.37 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.06 (s, 9H).

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 901,44$ [M-Cl]⁺; berechnet für C₄₄H₆₅N₆O₁₂S $\frac{m}{z} = 901,44$.

Synthese des Peptids Dimi-Box-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotrityl **28**



Für die Peptidsynthese an der festen Phase wurden 108 mg (0,1 μ mol, 1 eq) H-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotritylharz **16** in einer 1 ml Spritze 15 min in DCM gequollen. Anschliessend wurden die Peptidkupplungen mit jeweils 3 eq Aminosäure, 3 eq HOBt und 3 eq DIC gelöst in 0,5 ml abs. DCM durchgeführt. Die Kupplungsdauer betrug 1 h. Nach der Kupplung wurde das Harz je 5 mal mit DMF und DCM gewaschen und mittels Kaisertest die Vollständigkeit der Reaktion überprüft.

Das Peptid wurde mit einer Lösung aus DCM / AcOH / TFE 3 : 1 : 1 vom Harz abgespalten, und durch fällen mit Diethylether gereinigt. Es wurden 67 mg (67 % der Theorie) eines weissen Feststoffs erhalten. Die unten angeführten analytischen Daten beziehen sich auf diese Probe.

¹H-NMR (500 MHz, MeOD-d₄, 25 °C): δ (ppm) = 8.07 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.35 - 7.09 (m, 7H), 4.68 (dd, $J = 8.2, 5.4$ Hz, 1H), 4.63 - 4.50 (m, 2H), 4.41 - 4.19 (m, 4H), 4.09 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.57 - 3.35 (m, 4H), 3.34 - 3.25 (m, 1H), 3.21 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.16 - 3.02 (m, 3H), 2.89 (dd, $J = 14.0, 8.9$ Hz, 1H), 2.57 (s, 3H), 2.34 - 2.22 (m, 2H), 1.66 (s, 9H), 1.36 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.05 (s, 9H).

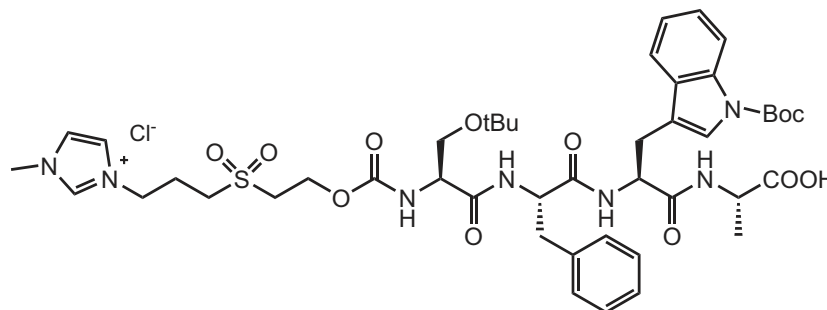
¹³C-NMR (126 MHz, MeOD-d₄, 25 °C): δ (ppm) = 173.0, 146.3, 138.2, 130.4, 129.5, 125.4, 123.3, 122.1, 116.1, 74.9, 59.4, 56.0, 54.6, 35.4, 28.4, 27.6, 23.7, 18.6,

9.5.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 938,44$ $[\text{M-Cl}]^+$; berechnet für $\text{C}_{46}\text{H}_{64}\text{N}_7\text{O}_{12}\text{S}$ $\frac{m}{z} = 938,43$.

7.2.21. Kupplung der *Tags* an festphasengebundene Peptide

Synthese des Peptids MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotrityl **22** nach dem *Tag*-Ansatz



102 mg (0,38 mmol, 4 eq) **1** wurden in 3,8 ml abs. Acetonitril suspendiert und mit 73 mg (0,29 mmol, 3 eq) Di-(*N*-hydroxysuccinimid)carbonat und 46 μ l Pyridin gemischt und 45 min geschüttelt. Das Zwischenprodukt wurde durch Fällen mit Diethylether abgetrennt und in 250 μ l abs. DMF aufgenommen. Für die Kupplung an das Testpeptid an der festen Phase wurden 100 mg (95 μ mol, 1 eq) H-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotritylharz **16** in einer 1 ml Spritze 15 min in DCM gequollen. Anschließend wurde der *Tag* während 3,5 h auf das Peptid gekuppelt. Nach der Kupplung wurde das Harz je 5 mal mit DMF und DCM gewaschen und mittels Kaisertest die Vollständigkeit der Reaktion überprüft.

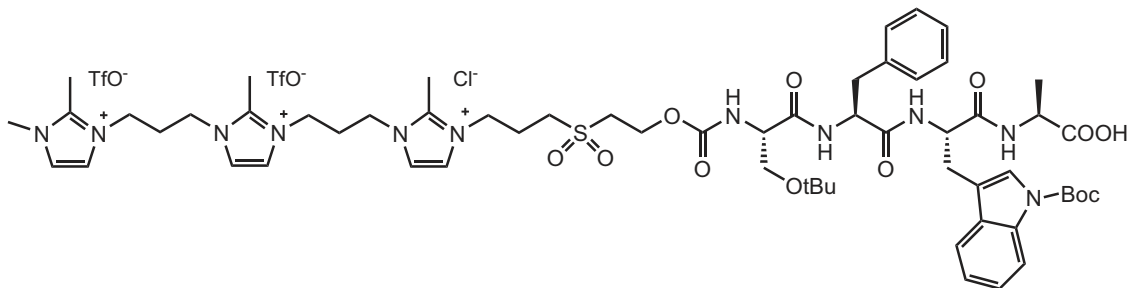
Das Peptid wurde mit einer Lösung aus DCM/AcOH/TFE 3:1:1 vom Harz abgespalten und durch Fällen mit Diethylether gereinigt. Es wurden 47 mg (84 % der Theorie) eines weißen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 9.10 (s, 1H), 8.33 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.75 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.74 - 7.64 (m, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.36 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.30 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.23 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.21 - 7.07 (m, 5H), 4.64 - 4.56 (m, 1H), 4.51 - 4.43 (m, 1H), 4.36 - 4.21 (m, 4H), 4.10 - 3.96 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.45 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.42 - 3.35 (m, 1H), 3.35 - 3.28 (m, 1H), 3.23 - 3.16 (m, 2H), 3.12 (dd, J = 14.8, 4.6 Hz, 1H), 3.03 - 2.91 (m, 3H), 2.84 - 2.74 (m, 1H), 2.28 - 2.15 (m, 2H), 1.58 (s, 9H), 1.26 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 0.99 (s, 9H).

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 924,42 [M-Cl]⁺; berechnet für C₄₅H₆₂N₇O₁₂S $\frac{m}{z}$ = 924,42.

Synthese des Peptids 3+-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotrityl **23**

nach dem *Tag*-Ansatz



429 mg (0,51 mmol, 4 eq) **1** wurden in 5 ml abs. Acetonitril suspendiert, mit 98 mg (0,38 mmol, 3 eq) Di-(*N*-hydroxysuccinimid)carbonat und 62 μ l Pyridin gemischt und 1 h geschüttelt. Das Zwischenprodukt wurde durch Fällen mit Diethylether abgetrennt und in 500 μ l DMF und 100 μ l MeOH aufgenommen. Für die Kupplung an das Testpeptid an der festen Phase wurden 210 mg (0,13 mmol, 1 eq) H-Phe-Trp(Boc)-Ala-Chlorotriptylharz **16** in einer 1 ml Spritze 15 min in DCM gequollen. Anschließend wurde der *Tag* während 3,5 h auf das Peptid gekuppelt. Nach der Kupplung wurde das Harz je 5 mal mit DMF und DCM gewaschen und mittels Kaisertest die Vollständigkeit der Reaktion überprüft.

Das Peptid wurde mit einer Lösung aus DCM/AcOH/TFE 3:1:1 vom Harz abgespalten und durch Fällen mit Diethylether gereinigt. Es wurden 117 mg (77 % der Theorie) eines weißen Feststoffs erhalten.

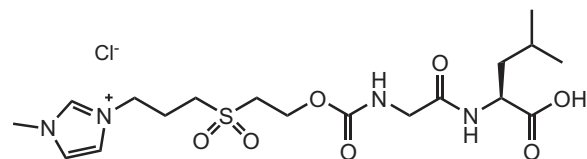
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD- d_4 , 25 °C): δ (ppm) = 8.07 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.62 - 7.52 (m, 6H), 7.48 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.26 - 7.12 (m, 7H), 4.65 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 4.56 (dd, J = 8.9, 5.0 Hz, 2H), 4.33 - 4.24 (m, 10H), 4.22 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.08 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.41 - 3.32 (m, 3H), 3.25 (dd, J = 12.3, 5.6 Hz, 3H), 3.16 - 3.04 (m, 3H), 2.93 - 2.84 (m, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.67 (s, 3H), 2.65 (s, 3H), 2.41 - 2.27 (m, 6H), 1.82 - 1.75 (m, 1H), 1.64 (s, 9H), 1.36 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 1.06 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, MeOD- d_4 , 25 °C): δ (ppm) = 172.5, 146.3, 138.2, 130.3, 129.5, 127.8, 125.5, 123.9, 122.6, 122.0, 74.9, 66.9, 56.1, 49.3, 49.1, 49.0, 48.8, 48.6, 46.3, 35.4, 30.5, 30.4, 28.4, 27.6, 23.7, 23.0, 18.5, 15.4, 9.9, 9.6.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z}$ = 591,81 [M-2TfO-Cl-H] $^{2+}$; berechnet für C₆₀H₈₅N₁₁O₁₂S $\frac{m}{z}$ = 591,80.

7.2.22. Peptidsynthese in Wasser

Synthese des Peptids MIM-B_{ox}-Gly-Leu-OH 79

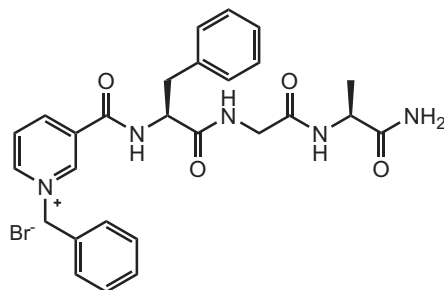


Für die Peptidsynthese an der festen Phase wurden 30 mg (16 μ mol, 1 eq) H-Leu-PEG Harz in einer 1 ml Spritze 15 min in Wasser gequollen. Anschließend wurde die Peptidkupplung mit jeweils 5 eq Aminosäure, 5 eq NHNDCl und 5 eq EDC gelöst in 325 μ l Wasser durchgeführt. Die Kupplungsdauer betrug 2,3 h. Nach der Kupplung wurde das Harz je 5 mal mit Wasser, MeOH und DCM gewaschen. Da der Kaisertest mit dem PEG-Harz nicht zuverlässig war, wurde eine Testkupplung mit Fmoc-Leu-OH durchgeführt (5 eq Aminosäure, 5 eq HOBt und 5 eq DIC gelöst in 325 μ l abs. DMF, Kupplungsdauer 30 min).

Das Peptid wurde mit einer Lösung aus DCM/TFA 1:1 vom Harz abgespalten und durch Fällen mit Diethylether gereinigt. Das dem Fmoc-Leu-Leu-OH entsprechende Signal konnte nicht detektiert werden.

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 447,1943$ [M-Cl]⁺; berechnet für C₁₈H₃₁N₄O₇S $\frac{m}{z} = 447,1908$.

7.2.23. Kupplung des N-alkylierten Nicotinsäurederivats an die feste Phase

Synthese von 111

125 mg (0,43 mmol, 3 eq) **109** wurden in 1 ml abs. DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 65 mg (0,43 mmol, 3 eq) HOBT und 88 μ l (0,57 mmol, 4 eq) DIC zugegeben. Die Lösung wurde 1 h bei RT mit 200 mg (0,14 mmol, 1 eq) Rinkamid-Harz mit dem darauf befindlichen Peptid H-Phe-Gly-Ala- inkubiert. Das Harz wurde je fünf mal mit DMF und DCM gewaschen und dann das Peptid durch dreimalige behandeln mit TFA/DCM 1:1 abgespalten. Das rohe Peptid wurde dreimal mit Diethylether gefällt und das Produkt mit HPLC-MS untersucht.

t_R : 2,0 min

MS (ESI, pos.): $\frac{m}{z} = 488,21$ [M-Br]⁺; berechnet für C₂₇H₃₀N₅O₄ $\frac{m}{z} = 488,23$.

7.3. Beschreibung der Experimente zur Bestimmung des Monomer - Dimer Verhältnisses

Die Reaktionen wurden im 0,1 mmol Maßstab durchgeführt und der Einfluss verschiedener Parameter mit Hilfe von HPLC-MS und HPLC-UV untersucht. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 210 nm aufgenommen, da sowohl die unpolaren Aminosäurederivate als auch die monomeren und dimeren ionischen Aminosäurederivate bei dieser Wellenlänge einen ausreichend großen Absorptionskoeffizienten aufweisen.

Die Temperatur betrug jeweils 65 °C, die Proben wurden im Thermoshaker bei 900 - 1100 U/min inkubiert. Proben wurden nach den angegebenen Zeiten genommen und mit Acetonitril verdünnt und sofort gemessen.

7.4. Beschreibung der Experimente zur Bestimmung der Löslichkeit

Dazu mussten zuerst gesättigte Lösungen der zu untersuchenden Substanzen hergestellt werden. Diese wurden dann entweder gravimetrisch oder mittels HPLC ausgewertet.

7.4.1. Herstellung der gesättigten Lösungen

Von der zur untersuchenden Substanz wurde eine gesättigte Lösung hergestellt. Dazu wurde die Substanz in dem bei den Experimenten angegebenen Lösungsmittel dispergiert und 24 h bei der bei den einzelnen Experimenten angegebenen Temperatur gerührt. Wenn nach 24 h eine klare Lösung erhalten wurde, so wurde diese mit einer zusätzlichen Menge der zu untersuchenden Substanz versetzt und wiederum 24 h gerührt. Dies wurde solange wiederholt, bis nach der 24 h dauernden Equilibrierungsphase eine deutlich getrübe Lösung erhalten wurde. Die Suspension wurde filtriert, das Filtrat stellt die gesättigte Lösung dar.

7.4.2. Bestimmung der Löslichkeit mittels HPLC

7.4.2.1. Kalibrierung der HPLC

Allgemeine Beschreibung der Durchführung Von der zu untersuchenden Substanz wurde eine Stammlösung in Methanol hergestellt. Von dieser wurden jeweils entsprechende Aliquots entnommen und mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel zur gewünschten Konzentration verdünnt. 50 μl der so hergestellten Lösung wurden mit 50 μl einer Stammlösung von Salicylamid (98,8 mg in 100 ml Acetonitril) versetzt und jeweils 10 μl der so erhaltenen Lösung injiziert. Jede Lösung wurde mindestens dreimal gemessen.

Kalibrierung der HPLC mit 26 (H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) In Tabelle 7.1 sind die Ergebnisse für die Kalibrierung mit Verbindung **26** beschrieben. Von jeder Konzentration wurde eine Probe hergestellt und drei mal gemessen. Die angegebenen Werte für das Verhältniss der Signalintensitäten von Peptid und internen Standard sind der Mittelwert der drei Messungen.

Durch lineare Regression dieser Daten (mit Hilfe des Programms Excel) wurde folgende Kalibriergerade erhalten:

$$y = 0,58 \times x$$

$$y = \frac{\text{Signalintensität des Peptids (bei 254 nm)}}{\text{Signalintensität des internen Standards (bei 254 nm)}}$$

$$x = c(\mathbf{26}) \text{ in } \mu\text{mol/ml}$$

Stoffmengenkonzentration / μM	SigInt Peptid / SigInt IS
0,08	0,044
0,15	0,088
0,38	0,209
0,75	0,450
1,50	0,708

Tabelle 7.1.: Ergebnisse der Kalibrierung mit Verbindung **26** (H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) (SigInt = Signalintensität in mAu)

Kalibrierung der HPLC mit **27** (Me₃N-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH)

In Tabelle 7.2 sind die Ergebnisse für die Kalibrierung mit Verbindung **27** beschrieben. Von den Konzentration 0,80 μM , 1,60 μM und 3,20 μM wurden jeweils zwei unabhängige Proben hergestellt und jede drei mal gemessen. Von den Konzentrationen 6,40 μM und 12,80 μM wurden jeweils vier unabhängige Proben hergestellt und jede dieser Proben drei mal gemessen. Die angegebenen Werte für das Verhältniss der Signalintensitäten von Peptid und internen Standard sind der Mittelwert der durchgeführten Messungen.

Durch lineare Regression dieser Daten (mit Hilfe des Programms Excel) wurde folgende Kalibriergerade erhalten:

$$y = 0,62 \times x + 0,11$$

$$y = \frac{\text{Signalintensität des Peptids (bei 254 nm)}}{\text{Signalintensität des internen Standards (bei 254 nm)}}$$

$$x = c(\mathbf{27}) \text{ in } \mu\text{mol/ml}$$

Stoffmengenkonzentration / μM	SigInt Peptid / SigInt IS
0,80	0,57
1,60	1,16
3,20	2,21
6,40	3,99
12,80	8,01

Tabelle 7.2.: Ergebnisse der Kalibrierung mit Verbindung **27** ($\text{Me}_3\text{N-B}_{ox}\text{-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH}$) (SigInt = Signalintensität in mAu)

7.4.2.2. Bestimmung der Löslichkeit mittels HPLC

Allgemeine Beschreibung der Durchführung Dieses Verfahren wurde für die Bestimmung der Löslichkeit der Peptide mit löslichkeitserhöhendem *Tag* im Wasser/Acetonitril (85/15 v/v) Gemisch verwendet. Die gesättigten Lösungen wurden bei 22 ± 1 °C in einem thermostatisiertem Raum hergestellt.

50 μl der gesättigten Lösung wurden mit 50 μl einer Stammlösung von Salicylamid (98,8 mg in 100 ml Acetonitril) versetzt und jeweils 10 μl der so erhaltenen Lösung injiziert. Jede Lösung einer zu untersuchenden Substanz wurde mindestens dreimal gemessen.

Bestimmung der Löslichkeit von Verbindung 26 ($\text{H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH}$) mittels HPLC SigInt Verhältniss (Peptid/Interner Standard) **26**: 0,058
Mit Kalibriergerade ermittelte Löslichkeit: 0,10 $\mu\text{mol/ml}$

Bestimmung der Löslichkeit von Verbindung $22\cdot\text{PF}_6^-$ ($\text{MIM-B}_{ox}\text{-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH}$) mittels HPLC SigInt Verhältniss (Peptid/Interner Standard) **$22\cdot\text{PF}_6^-$** : 1,1
Mit Kalibriergerade ermittelte Löslichkeit: 1,89 $\mu\text{mol/ml}$

Bestimmung der Löslichkeit von Verbindung $22\cdot\text{Cl}^-$ ($\text{MIM-B}_{ox}\text{-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH}$) mittels HPLC SigInt Verhältniss (Peptid/Interner Standard) **$22\cdot\text{Cl}^-$** : 3,8
Mit Kalibriergerade ermittelte Löslichkeit: 6,00 $\mu\text{mol/ml}$

Bestimmung der Löslichkeit von Verbindung 27·PF₆⁻ (Me₃N-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) mittels HPLC SigInt Verhältniss (Peptid/Interner Standard) 27·PF₆⁻: 1,06

Mit Kalibriergerade ermittelte Löslichkeit: 1,83 μmol/ml

Bestimmung der Löslichkeit von Verbindung 27·Cl₆⁻ (Me₃N-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) mittels HPLC SigInt Verhältniss (Peptid/Interner Standard) 27·Cl⁻: 13,8

Mit Kalibriergerade ermittelte Löslichkeit: 22,1 μmol/ml

Bestimmung der Löslichkeit von Verbindung 28·PF₆⁻ (Dimi-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) mittels HPLC SigInt Verhältniss (Peptid/Interner Standard) 28·PF₆⁻: 1,25

Mit Kalibriergerade ermittelte Löslichkeit: 2,16 μmol/ml

Bestimmung der Löslichkeit von Verbindung 28·Cl₆⁻ (Dimi-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) mittels HPLC SigInt Verhältniss (Peptid/Interner Standard) 28·Cl⁻: 27,42

Mit Kalibriergerade ermittelte Löslichkeit: 44,04 μmol/ml

7.4.3. Bestimmung der Löslichkeit nach dem gravimetrischen Verfahren

7.4.3.1. Allgemeine Beschreibung der Durchführung

Dieses Verfahren wurde für die Bestimmung der Löslichkeit von NaCl und NH₄Cl in deionisiertem Wasser verwendet. Die gesättigten Lösungen wurden bei RT (24 °C) hergestellt.

Ein definierte Volumen der gesättigten Lösung wurde in ein tarierten Eppendorfcup pipettiert. Das Gefäß wurde gewogen und das Lösungsmittel im Speedvac abgezogen. Die trockene Substanz wurde 24 h bei 30 °C im Speedvac getrocknet. Die Gefäße wurden sofort verschlossen, auf RT abkühlen lassen und gewogen.

7.4.3.2. Bestimmung der Löslichkeit von NaCl nach dem gravimetrischen Verfahren

NaCl	Masse / g			Volumen μl	Masse / g		Löslichkeit g/100g
	leer	voll	trocken		Substanz	Wasser	
1	0.9591	1.0204	0.9756	50	0.0165	0.0448	36.8304
2	0.9587	1.0154	0.9738	50	0.0151	0.0416	36.2981
3	0.9618	1.0213	0.9779	50	0.0161	0.0434	37.0968
4	0.9684	1.0283	0.9845	50	0.0161	0.0438	36.7580
5	0.9514	1.0112	0.9676	50	0.0162	0.0436	37.1560
6	0.9603	1.0193	0.9764	50	0.0161	0.0429	37.5291
7	0.9533	1.0741	0.9860	100	0.0327	0.0881	37.1169
8	0.9529	1.0758	0.9858	100	0.0329	0.0900	36.5556
9	0.9661	1.0845	0.9980	100	0.0319	0.0865	36.8786
10	0.9572	1.0777	0.9896	100	0.0324	0.0881	36.7764
11	0.9749	1.0969	1.0076	100	0.0327	0.0893	36.6181
12	0.9639	1.0812	0.9953	100	0.0314	0.0859	36.5541
13	0.9817	1.2712	1.0593	250	0.0776	0.2119	36.6210
14	0.9574	1.2348	1.0318	250	0.0744	0.2030	36.6502
15	0.9593	1.2439	1.0357	250	0.0764	0.2082	36.6955
16	0.9860	1.2689	1.0620	250	0.0760	0.2069	36.7327
17	0.9583	1.2435	1.0348	250	0.0765	0.2087	36.6555
18	0.9768	1.2612	1.0531	250	0.0763	0.2081	36.6651
19	0.9692	1.5390	1.1216	500	0.1524	0.4174	36.5117
20	0.9766	1.5448	1.1285	500	0.1519	0.4163	36.4881
21	0.9601	1.5317	1.1130	500	0.1529	0.4187	36.5178
22	0.9793	1.5501	1.1322	500	0.1529	0.4179	36.5877
23	0.9538	1.5241	1.1055	500	0.1517	0.4186	36.2398
24	0.9772	1.4827	1.1127	500	0.1355	0.3700	36.6216

Abbildung 7.8.: Ergebnisse der Löslichkeitsexperimente mit NaCl

7.4.3.3. Bestimmung der Löslichkeit von NH_4Cl nach dem gravimetrischen Verfahren

NH_4Cl	Masse / g			Volumen μl	Masse / g		Löslichkeit g/100g
	leer	voll	trocken		Substanz	Wasser	
1	0.9834	1.0358	0.9978	50	0.0144	0.0380	37.8947
2	0.9537	1.0079	0.9686	50	0.0149	0.0393	37.9135
3	0.9632	1.0177	0.9784	50	0.0152	0.0393	38.6768
4	0.9611	1.0154	0.9761	50	0.0150	0.0393	38.1679
5	0.9600	1.0146	0.9753	50	0.0153	0.0393	38.9313
6	0.9613	1.0137	0.9759	50	0.0146	0.0378	38.6243
7	0.9545	1.0610	0.9842	100	0.0297	0.0768	38.6719
8	0.9835	1.0927	1.0140	100	0.0305	0.0787	38.7548
9	0.9557	1.0655	0.9864	100	0.0307	0.0791	38.8116
10	0.9598	1.0694	0.9906	100	0.0308	0.0788	39.0863
11	0.9602	1.0698	0.9908	100	0.0306	0.0790	38.7342
12	0.9564	1.0661	0.9871	100	0.0307	0.0790	38.8608
13	0.9862	1.2315	1.0549	250	0.0687	0.1766	38.9015
14	0.9777	1.2229	1.0460	250	0.0683	0.1769	38.6094
15	0.9556	1.2008	1.0241	250	0.0685	0.1767	38.7663
16	0.9580	1.2031	1.0267	250	0.0687	0.1764	38.9456
17	0.9685	1.2139	1.0373	250	0.0688	0.1766	38.9581
18	0.9693	1.2133	1.0377	250	0.0684	0.1756	38.9522
19	0.9551	1.4386	1.0906	500	0.1355	0.3480	38.9368
20	0.9597	1.4479	1.0966	500	0.1369	0.3513	38.9695
21	0.9610	1.4359	1.0940	500	0.1330	0.3419	38.9003
22	0.9636	1.4396	1.0971	500	0.1335	0.3425	38.9781
23	0.9698	1.4502	1.1045	500	0.1347	0.3457	38.9644
24	0.9602	1.4481	1.0970	500	0.1368	0.3511	38.9633

Abbildung 7.9.: Ergebnisse der Löslichkeitsexperimente mit NH_4Cl

7.5. Beschreibung der Experimente zur Spaltung und Abtrennung des basenlabilen Linkers

7.5.1. Durchführung der Spaltungsexperimente

Eine definierte Menge (1-3 mg) der Verbindung **22** (MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH·Cl⁻) wurden in einem 1 ml Vial eingewogen und mit 0,5 ml der spezifizierten Spaltlösung versetzt. Nach der angegebenen Zeit wurde 100 μ l entnommen, diese mit 10 μ l TFA gequench und mit 490 μ l Acetonitril verdünnt. Mit jeder Probe wurden mindestens drei Messungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Integration der Signale von gespaltenen und ungespaltenen Peptid. Wenn zu einem gegebenen Zeitpunkt die Spaltung vollständig war, wurden die späteren Zeitpunkte nicht mehr ausgewertet.

Spaltung mit 2% Piperidin in Wasser pH-Wert der Lösung: 12,35

Tabelle 7.3.: Spaltung von Verbindung **22** (MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) mit 2% Piperidin in Wasser

Zeit /min	Spaltung /%
5	100

Spaltung mit 2% Natriumcarbonat in Wasser pH-Wert der Lösung: 11,17

Tabelle 7.4.: Spaltung von Verbindung **22** (MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) mit 2% Natriumcarbonat in Wasser

Zeit /min	Spaltung /%
5	83,4
10	95,4
15	98,0
30	100

Spaltung mit 5% Morpholin in Wasser pH-Wert der Lösung: 10,92Tabelle 7.5.: Spaltung des Linkers von Peptid **22** (MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH) mit 5% Morpholin in Wasser

Zeit /min	Spaltung /%
5	79,8
10	95,5
15	99,2
30	100

7.5.2. Durchführung des Experiments zur Abtrennung des Linkers

4,8 mg der Verbindung **22** (MIM-B_{ox}-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH·Cl⁻) wurden in 500 μ l einer 2%igen Lösung von Piperiden in Wasser für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Danach wurde durch die Spaltung durch Zugabe von 20 μ l TFA gequenchet und der Niederschlag 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und der Rückstand mit 500 μ l deionisiertem Wasser für 5 min im Ultraschallbad resuspendiert. Der Niederschlag wurde wiederum für 3 min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem dritten Waschschrift wurde der Rückstand 4 Tage bei 30 °C im Speedvac getrocknet. Man erhielt 3,3 mg der Verbindung **26** (H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH·TFA⁻) (4,23 μ mol, 86% Ausbeute der Theorie). Die Vollständigkeit der Spaltung und die Identität der Verbindung **26** (H-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Ala-OH·TFA⁻) wurde durch Untersuchung mit HPLC-MS nachgewiesen. Es konnten keine Spuren des abgespaltenen Linkers detektiert werden.

Da eine einfache Tischzentrifuge mit geringer Drehzahl und kleinem Rotor verwendet wurde, war die Festigkeit des Niederschlagpellets nicht sehr groß. Dies hatte zur Folge das im Überstand immer etwas ungelöstes (vermutlich Peptid) suspendiert war. Dies bietet eine Möglichkeit zur Optimierung der Ausbeute.

7.6. Daten der Kristallstrukturen

7.6.1. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 10

Formel: $C_8H_{14}Br_2N_2$, $M = 298,02$, $F(000) = 1752$, farblose Plättchen, Größe $0,10 \cdot 0,28 \cdot 0,35 \text{ mm}^3$, monoklin, Raumgruppe Cc , $Z = 12$, $a = 23,4205(12) \text{ \AA}$, $b = 12,5571(6) \text{ \AA}$, $c = 12,8248(7) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 116,251(2)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 3382,7(3) \text{ \AA}^3$, $D_{calc.} = 1,755 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. Der Kristall wurde mit einem Nonius KappaCCD Diffraktometer bei 123 K gemessen, das mit einem Graphit-Monochromator ausgestattet war. Es wurde monochrome Mo K_α -Strahlung mit $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$, $\theta_{max} = 32,654^\circ$ verwendet. Minimale/maximale Transmission 0,11/0,49, $\mu = 7,145 \text{ mm}^{-1}$. Die Messung und Integration wurde mit dem Programmpaket COLLECT durchgeführt. Von insgesamt 38609 Reflektionen waren 11562 unabhängig (Vermischung $r = 0,050$). Von diesen Reflektionen wurden 8957 als beobachtet angesehen ($I > 2,0\sigma(I)$) und für die Verfeinerung von 326 Parametern verwendet. Die Struktur wurde durch direkten Methoden mit dem Programm SIR92 gelöst. Alle nicht-Wasserstoffatome wurden mit Hilfe der Methode der geringsten Fehlerquadrate in der Software CRYSTALS verfeinert. $R = 0,0284$ (beobachtete Daten), $wR = 0,0482$ (Gesamtmenge der Daten), $GOF = 1,0523$. Die minimale/maximale Restelektronendichte betrug $-1,27/1,24 \text{ e \AA}^{-3}$. Um die Optimierung zu vervollständigen wurde die polynomische Gewichtung nach Chebychev verwendet. Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Mercury angefertigt.

7.6.2. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 12

Formel: $C_{12}H_{23}BrN_4O_2$, $M = 335,24$, $F(000) = 348$, farblose Plättchen, Größe $0,06 \cdot 0,17 \cdot 0,28 \text{ mm}^3$, monoklin, Raumgruppe Pc , $Z = 2$, $a = 7,2476(9) \text{ \AA}$, $b = 7,9102(10) \text{ \AA}$, $c = 13,5979(17) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 97,070(3)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 773,64(17) \text{ \AA}^3$, $D_{calc.} = 1,439 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. Der Kristall wurde mit einem Nonius KappaCCD Diffraktometer bei 123 K gemessen, das mit einem Graphit-Monochromator ausgestattet war. Es wurde monochrome Mo K_α -Strahlung mit $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$, $\theta_{max} = 40,019^\circ$ verwendet. Minimale/maximale Transmission 0,64/0,85, $\mu = 2,662 \text{ mm}^{-1}$. Die Messung und Integration wurde mit dem Programmpaket COLLECT durchgeführt. Von insgesamt 18584 Reflektionen waren 7200 unabhängig (Vermischung $r = 0,039$). Von diesen Reflektionen wurden 5923 als beobachtet angesehen ($I > 2,0\sigma(I)$) und für die Verfeinerung von 173 Parametern verwendet. Die Struktur wurde durch direkten Methoden mit dem Programm SIR92 gelöst. Alle nicht-Wasserstoffatome wurden mit Hilfe der Methode der geringsten Fehlerquadrate in der Software CRYSTALS verfeinert. $R = 0,0273$ (beobachtete Daten), $wR = 0,0380$ (Gesamtmenge der Daten), $GOF =$

1,0671. Die minimale/maximale Restelektronendichte betrug $-0,47/0,64 \text{ e \AA}^{-3}$. Um die Optimierung zu vervollständigen wurde die polynomische Gewichtung nach Chebychev verwendet. Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Mercury angefertigt.

7.6.3. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 13·Br⁻

Formel: C₁₅H₂₅Br₃N₄, M = 501,10, F(000) = 1984, farblose Nadeln, Größe 0,07 · 0,07 · 0,35 mm³, orthorhombisch, Raumgruppe P 2₁ 2₁ 2₁, Z = 8, a = 7,1393(3) Å, b = 11,3757(5) Å, c = 46,6824(19) Å, α = 90°, β = 90°, γ = 90°, V = 3791,3(3) Å³, D_{calc.} = 1,756 Mg · m⁻³. Der Kristall wurde mit einem Nonius KappaCCD Diffraktometer bei 123 K gemessen, das mit einem Graphit-Monochromator ausgestattet war. Es wurde monochrome Mo K_α-Strahlung mit λ = 0,71073 Å, θ_{max} = 28,765° verwendet. Minimale/maximale Transmission 0,64/0,64, μ = 6,387 mm⁻¹. Die Messung und Integration wurde mit dem Programmpaket COLLECT durchgeführt. Von insgesamt 55812 Reflektionen waren 9786 unabhängig (Vermischung r = 0,049). Von diesen Reflektionen wurden 8230 als beobachtet angesehen (I > 2,0σ(I)) und für die Verfeinerung von 398 Parametern verwendet. Die Struktur wurde durch direkten Methoden mit dem Programm SIR92 gelöst. Alle nicht-Wasserstoffatome wurden mit Hilfe der Methode der geringsten Fehlerquadrate in der Software CRYSTALS verfeinert. R = 0,0237 (beobachtete Daten), wR = 0,0284 (Gesamtmenge der Daten), GOF = 1,0941. Die minimale/maximale Restelektronendichte betrug $-0,51/0,61 \text{ e \AA}^{-3}$. Um die Optimierung zu vervollständigen wurde die polynomische Gewichtung nach Chebychev verwendet. Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Mercury angefertigt.

7.6.4. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 14·PF₆⁻

Formel: C₁₇H₂₅BrF₆N₄O₆S₂, M = 639,45, F(000) = 1296, farblose Nadeln, Größe 0,01 · 0,11 · 0,60 mm³, monoklin, Raumgruppe P 2₁ c, Z = 4, a = 24,853(5) Å, b = 7,0026(14) Å, c = 14,875(3) Å, α = 90°, β = 99,46(3)°, γ = 90°, V = 2553,5(9) Å³, D_{calc.} = 1,663 Mg · m⁻³. Der Kristall wurde mit einem Stoe IPDS Diffraktometer bei 173(2) K gemessen, das mit einem Graphit-Monochromator ausgestattet war. Es wurde monochrome Mo K_α-Strahlung mit λ = 0,71073 Å, θ_{max} = 27,50° verwendet. Minimale/maximale Transmission ?/?, μ = 1,857 mm⁻¹. Die Messung und Integration wurde mit dem Programmpaket Stoe IPDS durchgeführt. Von insgesamt 61989 Reflektionen waren 5847 unabhängig (Vermischung r = 0,1917). Von diesen Reflektionen wurden 5847 als beobachtet angesehen (I > 2,0σ(I)) und für die Verfeinerung

von 356 Parametern verwendet. Die Struktur wurde durch direkten Methoden mit dem Programm SHELXS-97 gelöst. Alle nicht-Wasserstoffatome wurden mit Hilfe der Methode der geringsten Fehlerquadrate in der Software SHELXS-97 verfeinert. $R = 0,0475$ (beobachtete Daten), $wR = 0,1231$ (Gesamtmenge der Daten), $GOF = 1,123$. Die minimale/maximale Restelektronendichte betrug $-0,724/0,858 \text{ e } \text{Å}^{-3}$. Um die Optimierung zu vervollständigen wurde die polynomische Gewichtung nach Chebychev verwendet. Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Mercury angefertigt.

7.6.5. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 51

Formel: $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$, $M = 451,54$, $F(000) = 968$, farblose Plättchen, Größe $0,01 \cdot 0,09 \cdot 0,23 \text{ mm}^3$, monoklin, Raumgruppe $P 2_1$, $Z = 4$, $a = 5,5415(3) \text{ Å}$, $b = 37,770(3) \text{ Å}$, $c = 10,7434(7) \text{ Å}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 93,133(3)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 2245,3(3) \text{ Å}^3$, $D_{calc.} = 1,336 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. Der Kristall wurde mit einem Area Diffraktometer bei 123 K gemessen, das mit einem Graphit-Monochromator ausgestattet war. Es wurde monochrome Mo K_α -Strahlung mit $\lambda = 0,71073 \text{ Å}$, $\theta_{max} = 28,282^\circ$ verwendet. Minimale/maximale Transmission $0,98/1,00$, $\mu = 0,192 \text{ mm}^{-1}$. Die Messung und Integration wurde mit dem Programmpaket Apex2 durchgeführt. Von insgesamt 27037 Reflektionen waren 10938 unabhängig (Vermischung $r = 0,049$). Von diesen Reflektionen wurden 7240 als beobachtet angesehen ($I > 2,0\sigma(I)$) und für die Verfeinerung von 588 Parametern verwendet. Die Struktur wurde durch direkten Methoden mit dem Programm SIR92 gelöst. Alle nicht-Wasserstoffatome wurden mit Hilfe der Methode der geringsten Fehlerquadrate in der Software CRYSTALS verfeinert. $R = 0,0514$ (beobachtete Daten), $wR = 0,0701$ (Gesamtmenge der Daten), $GOF = 1,1734$. Die minimale/maximale Restelektronendichte betrug $-0,39/0,33 \text{ e } \text{Å}^{-3}$. Um die Optimierung zu vervollständigen wurde die polynomische Gewichtung nach Chebychev verwendet. Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Mercury angefertigt.

7.6.6. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 85

Formel: $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{ClNO}_5$, $M = 433,93$, $F(000) = 460$, farblose Plättchen, Größe $0,04 \cdot 0,13 \cdot 0,21 \text{ mm}^3$, monoklin, Raumgruppe $P 2_1$, $Z = 2$, $a = 12,1248(10) \text{ Å}$, $b = 8,3628(7) \text{ Å}$, $c = 12,3684(10) \text{ Å}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 114,590(5)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 1140,38(17) \text{ Å}^3$, $D_{calc.} = 1,264 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. Der Kristall wurde mit einem Area Diffraktometer bei 123 K gemessen, das mit einem Graphit-Monochromator ausgestattet war. Es wurde monochrome Mo K_α -Strahlung mit $\lambda = 0,71073 \text{ Å}$, $\theta_{max} = 31,570^\circ$ verwendet.

Minimale/maximale Transmission 0,97/0,99, $\mu = 0,200 \text{ mm}^{-1}$. Die Messung und Integration wurde mit dem Programmpaket Apex2 durchgeführt. Von insgesamt 23745 Reflektionen waren 7615 unabhängig (Vermischung $r = 0,044$). Von diesen Reflektionen wurden 4076 als beobachtet angesehen ($I > 2,0\sigma(I)$) und für die Verfeinerung von 272 Parametern verwendet. Die Struktur wurde durch direkten Methoden mit dem Programm SIR92 gelöst. Alle nicht-Wasserstoffatome wurden mit Hilfe der Methode der geringsten Fehlerquadrate in der Software CRYSTALS verfeinert. $R = 0,0359$ (beobachtete Daten), $wR = 0,0973$ (Gesamtmenge der Daten), $GOF = 0,9978$. Die minimale/maximale Restelektronendichte betrug $-0,25/0,21 \text{ e \AA}^{-3}$. Um die Optimierung zu vervollständigen wurde die polynomische Gewichtung nach Chebychev verwendet. Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Mercury angefertigt.

7.6.7. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 98

Formel: $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{IN}_2\text{O}$, $M = 282,12$, $F(000) = 1104$, farblose Plättchen, Größe $0,18 \cdot 0,28 \cdot 0,30 \text{ mm}^3$, orthorhombisch, Raumgruppe Pbc_a , $Z = 8$, $a = 12,5060(2) \text{ \AA}$, $b = 10,8262(2) \text{ \AA}$, $c = 17,3603(3) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 2350,45(7) \text{ \AA}^3$, $D_{calc.} = 1,594 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. Der Kristall wurde mit einem Nonius KappaCCD Diffraktometer bei 173 K gemessen, das mit einem Graphit-Monochromator ausgestattet war. Es wurde monochrome $\text{Mo } K_\alpha$ -Strahlung mit $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$, $\theta_{max} = 32,025^\circ$ verwendet. Minimale/maximale Transmission $0,47/0,62$, $\mu = 2,690 \text{ mm}^{-1}$. Die Messung und Integration wurde mit dem Programmpaket COLLECT durchgeführt. Von insgesamt 28236 Reflektionen waren 4089 unabhängig (Vermischung $r = 0,067$). Von diesen Reflektionen wurden 4064 als beobachtet angesehen ($I > 2,0\sigma(I)$) und für die Verfeinerung von 109 Parametern verwendet. Die Struktur wurde durch direkten Methoden mit dem Programm SIR92 gelöst. Alle nicht-Wasserstoffatome wurden mit Hilfe der Methode der geringsten Fehlerquadrate in der Software CRYSTALS verfeinert. $R = 0,0287$ (beobachtete Daten), $wR = 0,0905$ (Gesamtmenge der Daten), $GOF = 0,9278$. Die minimale/maximale Restelektronendichte betrug $-1,07/1,54 \text{ e \AA}^{-3}$. Um die Optimierung zu vervollständigen wurde die polynomische Gewichtung nach Chebychev verwendet. Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Mercury angefertigt.

7.6.8. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 106

Formel: $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_2$, $M = 282,77$, $F(000) = 1200$, farblose Plättchen, Größe $0,10 \cdot 0,21 \cdot 0,34 \text{ mm}^3$, orthorhombisch, Raumgruppe Pcn_b , $Z = 8$, $a = 13,4818(2) \text{ \AA}$,

$b = 14,3375(2) \text{ \AA}$, $c = 14,5029(2) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 2803,34(7) \text{ \AA}^3$, $D_{calc.} = 1,340 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. Der Kristall wurde mit einem Nonius KappaCCD Diffraktometer bei 173 K gemessen, das mit einem Graphit-Monochromator ausgestattet war. Es wurde monochrome Mo K_α -Strahlung mit $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$, $\theta_{max} = 27,909^\circ$ verwendet. Minimale/maximale Transmission 0,94/0,97, $\mu = 0,273 \text{ mm}^{-1}$. Die Messung und Integration wurde mit dem Programmpaket COLLECT durchgeführt. Von insgesamt 23709 Reflektionen waren 3355 unabhängig (Vermischung $r = 0,037$). Von diesen Reflektionen wurden 2055 als beobachtet angesehen ($I > 3,0\sigma(I)$) und für die Verfeinerung von 172 Parametern verwendet. Die Struktur wurde durch direkten Methoden mit dem Programm SIR92 gelöst. Alle nicht-Wasserstoffatome wurden mit Hilfe der Methode der geringsten Fehlerquadrate in der Software CRYSTALS verfeinert. $R = 0,0275$ (beobachtete Daten), $wR = 0,0508$ (Gesamtmenge der Daten), $GOF = 1,1020$. Die minimale/maximale Restelektronendichte betrug $-0,20/0,21 \text{ e \AA}^{-3}$. Um die Optimierung zu vervollständigen wurde die polynomische Gewichtung nach Chebychev verwendet. Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Mercury angefertigt.

7.6.9. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 109·Br⁻

Formel: $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_5$, $M = 539,43$, $F(000) = 556$, farblose Plättchen, Größe $0,06 \cdot 0,10 \cdot 0,26 \text{ mm}^3$, triklin, Raumgruppe P -1, $Z = 2$, $a = 7,36410(10) \text{ \AA}$, $b = 12,1800(2) \text{ \AA}$, $c = 14,2579(2) \text{ \AA}$, $\alpha = 80,7785(6)^\circ$, $\beta = 80,4615(6)^\circ$, $\gamma = 87,1097(6)^\circ$, $V = 1244,50(3) \text{ \AA}^3$, $D_{calc.} = 1,439 \text{ Mg} \cdot \text{m}^{-3}$. Der Kristall wurde mit einem Nonius KappaCCD Diffraktometer bei 173 K gemessen, das mit einem Graphit-Monochromator ausgestattet war. Es wurde monochrome Mo K_α -Strahlung mit $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$, $\theta_{max} = 27,931^\circ$ verwendet. Minimale/maximale Transmission 0,84/0,90, $\mu = 1,692 \text{ mm}^{-1}$. Die Messung und Integration wurde mit dem Programmpaket COLLECT durchgeführt. Von insgesamt 11815 Reflektionen waren 5970 unabhängig (Vermischung $r = 0,021$). Von diesen Reflektionen wurden 4663 als beobachtet angesehen ($I > 3,0\sigma(I)$) und für die Verfeinerung von 316 Parametern verwendet. Die Struktur wurde durch direkten Methoden mit dem Programm SIR92 gelöst. Alle nicht-Wasserstoffatome wurden mit Hilfe der Methode der geringsten Fehlerquadrate in der Software CRYSTALS verfeinert. $R = 0,0251$ (beobachtete Daten), $wR = 0,0370$ (Gesamtmenge der Daten), $GOF = 1,0929$. Die minimale/maximale Restelektronendichte betrug $-0,36/0,27 \text{ e \AA}^{-3}$. Um die Optimierung zu vervollständigen wurde die polynomische Gewichtung nach Chebychev verwendet. Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Mercury angefertigt.

7.6.10. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 109·PF₆⁻

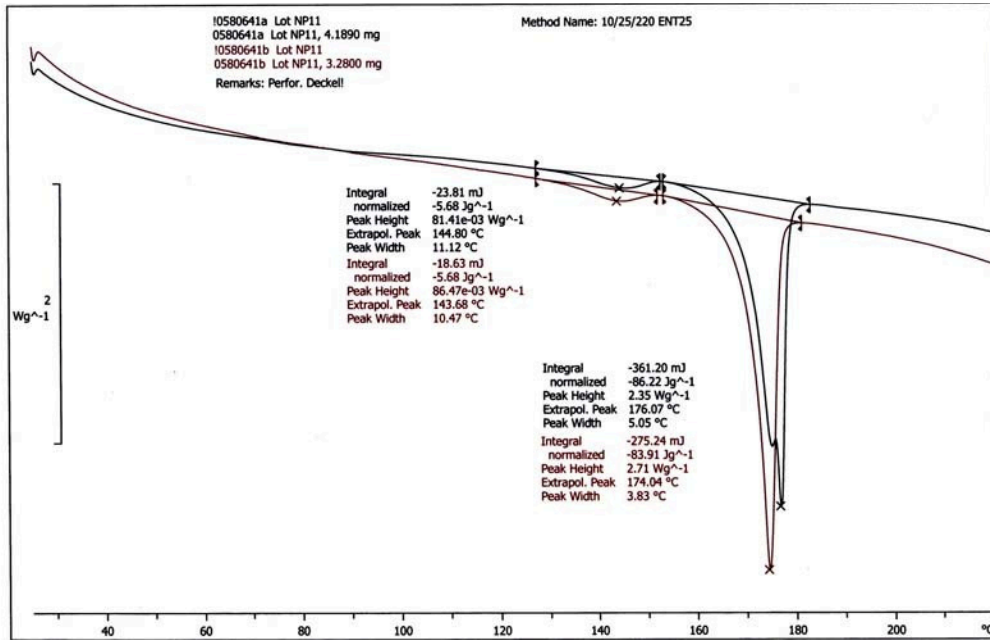
Formel: C₂₆H₂₃F₆N₂O₄P, M = 572,44, F(000) = 1176, farblose Plättchen, Größe 0,17 · 0,29 · 0,56 mm³, monoklin, Raumgruppe P 2₁/n, Z = 4, a = 8,3739(2) Å, b = 26,4168(7) Å, c = 11,4831(3) Å, α = 90°, β = 97,9301(12)°, γ = 90°, V = 2515,90(11) Å³, D_{calc.} = 1,511 Mg · m⁻³. Der Kristall wurde mit einem Nonius KappaCCD Diffraktometer bei 173 K gemessen, das mit einem Graphit-Monochromator ausgestattet war. Es wurde monochrome Mo K_α-Strahlung mit λ = 0,71073 Å, θ_{max} = 27,453° verwendet. Minimale/maximale Transmission 0,95/0,97, μ = 0,191 mm⁻¹. Die Messung und Integration wurde mit dem Programmpaket COLLECT durchgeführt. Von insgesamt 17531 Reflektionen waren 5739 unabhängig (Vermischung r = 0,047). Von diesen Reflektionen wurden 3984 als beobachtet angesehen (I > 1,0σ(I)) und für die Verfeinerung von 352 Parametern verwendet. Die Struktur wurde durch direkten Methoden mit dem Programm SIR92 gelöst. Alle nicht-Wasserstoffatome wurden mit Hilfe der Methode der geringsten Fehlerquadrate in der Software CRYSTALS verfeinert. R = 0,0530 (beobachtete Daten), wR = 0,0874 (Gesamtmenge der Daten), GOF = 1,0817. Die minimale/maximale Restelektronendichte betrug -0,46/0,70 e Å⁻³. Um die Optimierung zu vervollständigen wurde die polynomische Gewichtung nach Chebychev verwendet. Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Mercury angefertigt.

7.6.11. Daten für die Kristallstruktur von Verbindung 113

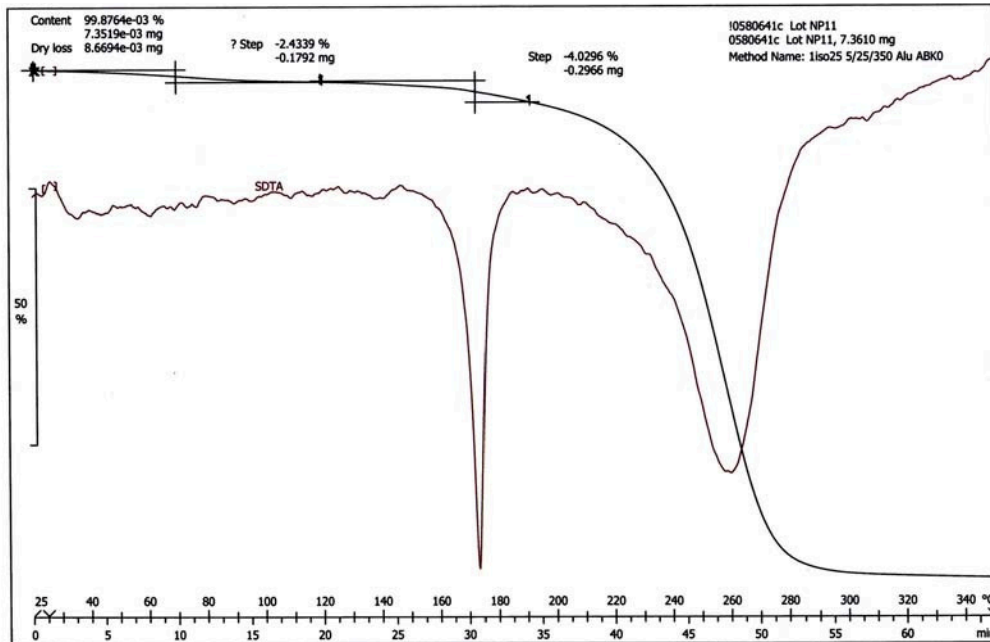
Formel: C₁₃H₁₂BrNO₂, M = 294,15, F(000) = 592, farblose Nadeln, Größe 0,05 · 0,18 · 0,42 mm³, triklin, Raumgruppe P -1, Z = 4, a = 7,4563(3) Å, b = 12,6306(5) Å, c = 12,8709(5) Å, α = 95,917(2)°, β = 90,052(2)°, γ = 94,221(2)°, V = 1202,38(8) Å³, D_{calc.} = 1,625 Mg · m⁻³. Der Kristall wurde mit einem Area Diffraktometer bei 123 K gemessen, das mit einem Graphit-Monochromator ausgestattet war. Es wurde monochrome Mo K_α-Strahlung mit λ = 0,71073 Å, θ_{max} = 38,694° verwendet. Minimale/maximale Transmission 0,54/0,84, μ = 3,407 mm⁻¹. Die Messung und Integration wurde mit dem Programmpaket COLLECT durchgeführt. Von insgesamt 83348 Reflektionen waren 13551 unabhängig (Vermischung r = 0,031). Von diesen Reflektionen wurden 9609 als beobachtet angesehen (I > 2,0σ(I)) und für die Verfeinerung von 307 Parametern verwendet. Die Struktur wurde durch direkten Methoden mit dem Programm SIR97 gelöst. Alle nicht-Wasserstoffatome wurden mit Hilfe der Methode der geringsten Fehlerquadrate in der Software CRYSTALS verfeinert. R = 0,0225 (beobachtete Daten), wR = 0,0394 (Gesamtmenge der Daten), GOF = 1,0391. Die minimale/maximale Restelektronendichte betrug -0,24/0,62 e Å⁻³. Um

die Optimierung zu vervollständigen wurde die polynomische Gewichtung nach Chebychev verwendet. Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Mercury angefertigt.

7.7. Ergebnisse der DSC und Thermogravimetrie

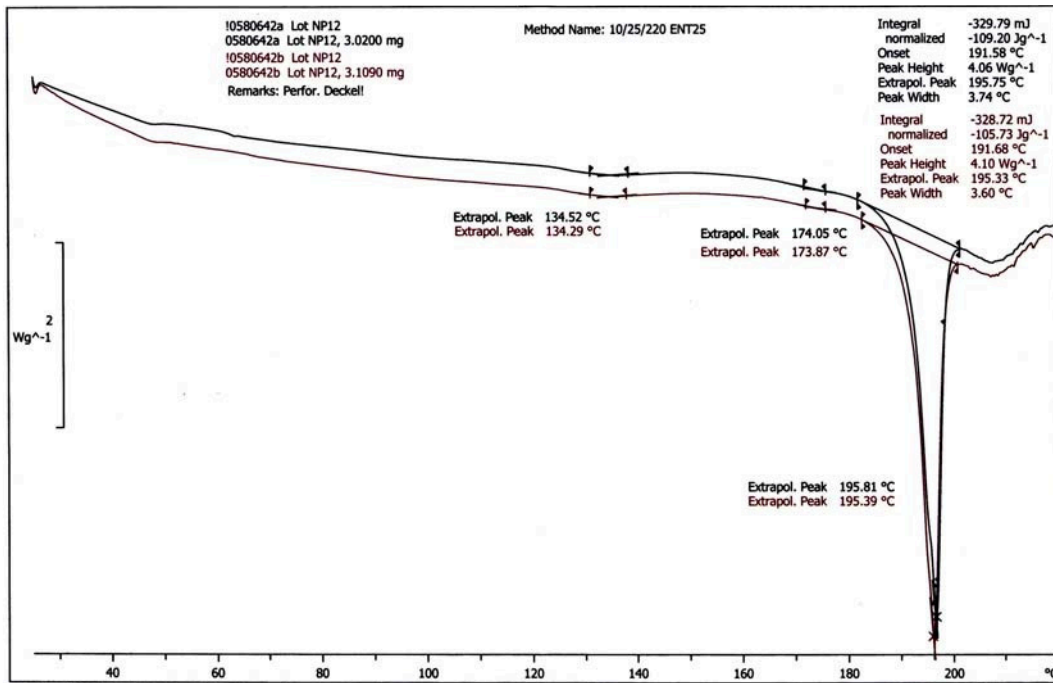


a)

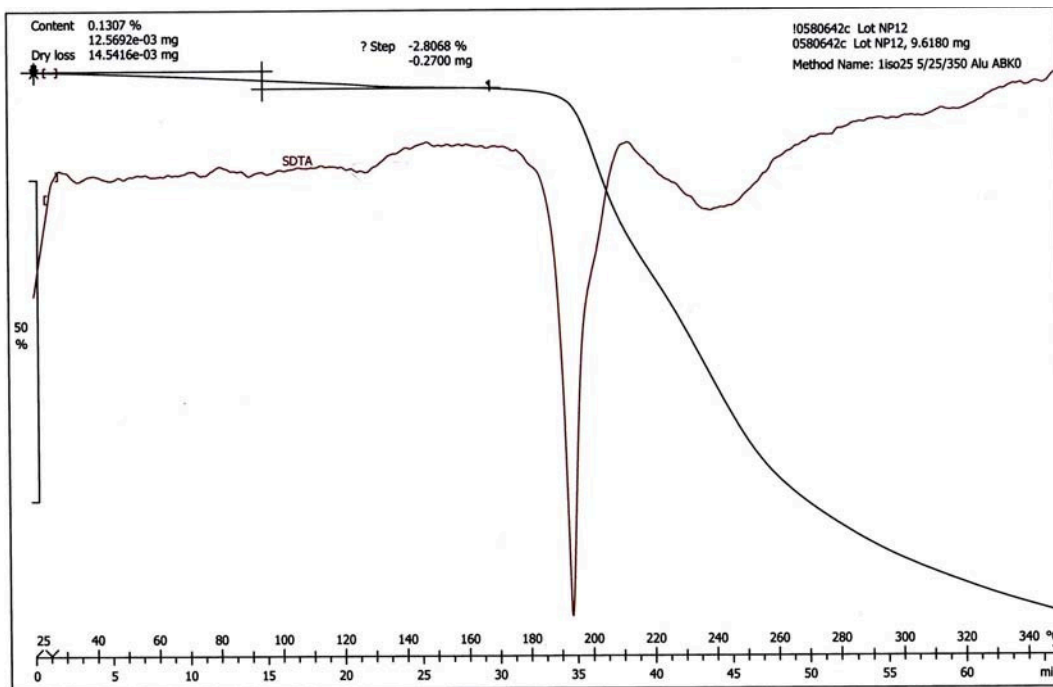


b)

Abbildung 7.10.: Ergebnis der a) DSC und b) Thermogravimetrie Experimente mit dem nicht umkristallisierten Nicotinsäurederivat 109



a)



b)

Abbildung 7.11.: Ergebnis der a) DSC und b) Thermogravimetrie Experimente mit dem umkristallisierten Nicotinsäurederivat 109

8. Anhang

8.1. Anhang A1: Definition des Quotienten q

Beschreibung des Auswerteverfahrens Für die halb-quantitative Bestimmung des Verhältnisses von monomerem zu dimerem Aminosäurederivat wurde HPLC-UV verwendet. Die Linearität des UV-Signals ist im Vergleich zum MS-Signal deutlich größer. Erst durch nahezu vollständige Absorbtion des Lichts wird der Detektor gesättigt. In dieser Arbeit war eine Kalibrierung des Systems aufgrund der fehlenden Reinsubstanzen nicht möglich. Dennoch können halb-quantitative Aussagen über den Einfluss verschiedener Parameter gemacht werden, indem das Verhältnis der beiden Signalintensitäten herangezogen wird. Die Begründung, warum trotz fehlender Kalibrierung halb-quantitative Aussagen möglich sind, basiert auf dem Lambert-Beerschen Gesetz:¹⁵⁷

$$-\lg(I/I_0) = \epsilon cl \quad (8.1)$$

mit ϵ = Extinktionskoeffizient, $-\lg(I/I_0)$ = Absorbtion, c = Konzentration und l = Schichtdicke.

Die HPLC gibt mit Hilfe des DAD direkt die Absorbtion an. Damit folgt aus Gleichung 8.1:

$$A = \epsilon cl \quad (8.2)$$

In Worten ausgedrückt bedeutet dies, dass die gemessenen Absorbtionen der monomeren und dimeren Aminosäurederivate über eine Gerätekonstante ($= l$) und eine Stoffkonstante ($= \epsilon$) den jeweiligen Konzentrationen direkt proportional sind. ϵ ist für keines der beiden Aminosäurederivate bekannt, sodass keine Aussage über ihre absolute Konzentration möglich ist. Dies ist aber für die Beantwortung der Frage, ob das Produktverhältnis durch Variation der Reaktionsparameter hin zu mehr

monomerem Aminosäurederivat verschoben wird, nicht nötig. Den Zusammenhang zwischen der UV-Absorption von monomerem und dimerem Aminosäurederivat und deren jeweiliger Konzentration wird durch die Gleichungen 8.3 und 8.4 wiedergegeben.

$$A(\textit{Monomer}) = \epsilon_{\textit{Monomer}}c(\textit{Monomer})l \quad (8.3)$$

$$A(\textit{Dimer}) = \epsilon_{\textit{Dimer}}c(\textit{Dimer})l \quad (8.4)$$

Dividiert man Gleichung 8.3 durch Gleichung 8.4 und fasst man das konstante Verhältnis der Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\textit{Monomer}}/\epsilon_{\textit{Dimer}}$ als $1/k$ zusammen erhält man Gleichung 8.5.

$$\frac{c(\textit{Monomer})}{c(\textit{Dimer})} = k \frac{A(\textit{Monomer})}{A(\textit{Dimer})} \quad (8.5)$$

Der Faktor k ist für alle Reaktionsbedingungen gleich (er ist eine von den beiden betrachteten Stoffen abhängige Konstante). Der durch Division der beiden Gleichungen 8.3 und 8.4 erhaltenen Quotient $q = \frac{A(\textit{Monomer})}{A(\textit{Dimer})}$ ist ein relatives Maß für den Anteil des Monomers im Reaktionsgemisch (unter gegebenen Reaktionsbedingungen). Vergleicht man den unter gewissen Reaktionsbedingungen erhaltenen Quotienten mit dem unter anderen Bedingungen erhalten, so ist eine halb-quantitative Aussage möglich. Ein größerer Wert des Quotienten zeigt, dass der Anteil des gewünschten monomeren Aminosäurederivats unter diesen Reaktionsbedingungen größer ist.

Maximaler Grenzwert des Quotienten q Als oberes Limit für q wurde ein Grenzwert von 100 festgelegt. Um die maximal mit dieser Methode bestimmbare Reinheit zu berechnen, wird die Annahme gemacht, dass $\epsilon(\textit{Monomer}) \approx \epsilon(\textit{Dimer})$ gilt (siehe Anhang A2 8.2). Wird der Quotient aus der Absorption von monomerem und dimerem Aminosäurederivat auf ganze Zahlen gerundet, so ist der höchste Wert, der richtig gerundet werden würde, $100,4 / 1 = 100$ (der auf ganze Zahlen gerundete Wert von $100,5 / 1 = 101$, er würde nach der Festlegung der willkürlichen Grenze aber gleich 100 gesetzt d.h. nicht mehr richtig wiedergegeben). Dieser Wert entspricht, unter der Annahme, dass die Extinktionskoeffizienten der monomeren und dimeren Aminosäurederivate ähnlich sind, einem Stoffmengenanteil des gewünschten Monomers von 99%. Dieser Wert stellt die untere mögliche Grenze des Stoffmengenanteils

dar (siehe Anhang A2 8.2). Mit zunehmender Abweichung der beiden Extinktionskoeffizienten würde die Reinheit noch darüber liegen. Diese Aussage ist aber für alle praktischen Zwecke präzise genug, größere Zahlenwerte des Quotienten müssen nicht mehr berücksichtigt werden, da in diesem Fall das gewünschte Ziel ebenfalls erreicht wäre. Ein weiterer Grund für einen oberen Grenzwert ist, dass im bestmöglichen Fall, wenn überhaupt kein Dimer mehr gebildet werden wird, die mathematische Auswertung versagen würde. In diesem Fall würde Gleichung 8.6 gelten.

$$\text{Verhältnis der Absorbtionen von Monomer zu Dimer} = \frac{A(\textit{Monomer})}{A(\textit{Dimer})} = \frac{x}{0} = n.d. \quad (8.6)$$

Also gerade im Fall der totalen Unterdrückung der Nebenreaktion könnte keine sinnvolle mathematische Aussage mehr getroffen werden oder eine Graphik die Zusammenhänge verdeutlichen. Deswegen wird auch in Fällen wo nur das Monomer im Chromatogramm nachgewiesen wurde, der Quotient gleich 100 gesetzt.

8.2. Anhang A2: Abschätzung der Reinheit

Annahme isolierter Chromophore Isolierte Chromophore können in erster Näherung als unabhängig voneinander betrachtet werden. In diesem Fall wird die Absorption der einzelnen Chromophore bei einer gewissen Wellenlänge addiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung beruht auf diesem Konzept.¹⁵⁹ Aus der Sequenz ist die Anzahl der Tryptophan Einheiten pro Protein bekannt. Des weiteren ist der Extinktionskoeffizient des Tryptophans bekannt. Aus der gemessenen Absorption kann dann die Konzentration des Proteins berechnet werden.¹⁵⁹

Abschätzung der Extinktionskoeffizienten der monomeren und dimeren ionischen Aminosäurederivate Aus den in den monomeren und dimeren Aminosäurederivaten vorhandenen Chromophoren kann deren Extinktionskoeffizient unter der Annahme isolierter Chromophore nach der Inkrementmethode abgeschätzt werden.¹⁵⁷ Die Abschätzung wird für eine Wellenlänge von 210 nm vorgenommen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren Methylimidazol-, Ester-, Carbamat- und freie Carbonsäuregruppen. Sowohl im Monomer als auch im Dimer sind das Methylimidazol- und eine freie Säure identische Chromophore. Das dimere Aminosäurederivat besitzt zusätzlich eine Ester- und eine Carbamatgruppe. Daraus folgt unter der Annahme isolierter Chromophore das $\epsilon(\text{Monomer}) < \epsilon(\text{Dimer})$. Da die Ester- und Carbamatfunktion bei 210 nm keine besonders starke Absorption im Vergleich zum Methylimidazolmotiv zeigen, ergibt sich aus dem gesagten in einer ersten Näherung $\epsilon(\text{Monomer}) \approx \epsilon(\text{Dimer})$.

Für Aminosäure mit bei der verwendeten Wellenlänge stark absorbierenden Funktionen in der Seitenkette ist diese Näherung nicht mehr gültig (z.B. Phenylalanin). In diesem Fall würde im monomeren Aminosäurederivat zwei intensiv absorbierende Chromophore vorhanden (je ein Methylimidazol- und Phenylring) während im Dimer drei stark absorbierende Chromophore vorhanden sind (je ein Methylimidazol- und zwei Phenylringe), d.h. $\epsilon(\text{Monomer}) \ll \epsilon(\text{Dimer})$.

Abschätzung der Reinheit mit Hilfe der geschätzten Extinktionskoeffizienten

Kann das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten der monomeren und dimeren Aminosäurederivate mit ausreichender Genauigkeit abgeschätzt werden, so kann damit die Reinheit des Produktgemisches ermittelt werden, es gilt Gleichung 8.7:

$$\frac{c(\textit{Monomer})}{c(\textit{Dimer})} \approx \frac{A(\textit{Monomer})}{A(\textit{Dimer})} \quad (8.7)$$

Die molare Reinheit (entspricht dem Stoffmengenanteil) des gewünschten monomeren Aminosäurederivats in Prozent wird dann durch Gleichung 8.8 ausgedrückt.

$$\text{Prozentualer Anteil Monomer} = \frac{A(\textit{Monomer})}{A(\textit{Monomer}) + A(\textit{Dimer})} \times 100\% \quad (8.8)$$

Der so erhaltene Wert stellt die untere Grenze des Stoffmengenanteils dar, der tatsächliche Wert ist umso größer je unterschiedlicher die Extinktionskoeffizienten sind. Dies folgt aus der exakten Betrachtung der obigen Näherung und anschließender Grenzwertbetrachtung.

Für den Zusammenhang zwischen den beobachteten Absorbtionen des Monomers und Dimers und deren Konzentrationen folgt aus dem Lambert-Beerschen Gesetz exakt:

$$\frac{A(\textit{Monomer})}{A(\textit{Dimer})} = \frac{c(\textit{Monomer}) \times \epsilon(\textit{Monomer})}{c(\textit{Dimer}) \times \epsilon(\textit{Dimer})} \quad (8.9)$$

Daraus ergibt sich die Konzentration c des Dimers in der Lösung zu:

$$c(\textit{Dimer}) = \frac{\epsilon(\textit{Monomer})}{\epsilon(\textit{Dimer})} \times \frac{c(\textit{Monomer}) \times A(\textit{Dimer})}{A(\textit{Monomer})} \quad (8.10)$$

Für ein gegebenes Volumen berechnet sich die Stoffmenge aus der Konzentration nach folgender Gleichung:

$$n = c \times V \quad (8.11)$$

Mit dieser Gleichung folgt für die Stoffmenge des Dimers:

$$n(Dimer) = \frac{\epsilon(Monomer)}{\epsilon(Dimer)} \times \frac{n(Monomer) \times A(Dimer)}{A(Monomer)} \quad (8.12)$$

Berechnet man nun den Stoffmengenanteil x des Monomers am Produktgemisch nach folgender Formel:

$$x(Monomer) = \frac{n(Monomer)}{n(Monomer) + n(Dimer)} \quad (8.13)$$

so ergibt sich die Gleichung für den Stoffmengenanteil des Monomers in Abhängigkeit des Verhältnisses der Extinktionskoeffizienten von Monomer und Dimer:

$$x(Monomer) = \frac{n(Monomer)}{n(Monomer) + \frac{\epsilon(Monomer)}{\epsilon(Dimer)} \times \frac{n(Monomer) \times A(Dimer)}{A(Monomer)}} \times 100\% \quad (8.14)$$

Für den Fall, dass der Extinktionskoeffizient des Dimers deutlich größer als der des Monomers ist, geht der Nenner des Bruchs gegen die Stoffmenge des Monomers und der Stoffmengenanteil des Monomers daher gegen 100%.

Literaturverzeichnis

- [1] F. Hofmeister, *Naturwiss. Rundschau* **1902**, *17*, 529–545.
- [2] E. Fischer, *Chem. Ztg.* **1902**, *26*, 93.
- [3] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, *40*, 1754–1767.
- [4] L. Zervas, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1931**, *64*, 2289–2296.
- [5] O. Diels, *Einführung in die organische Chemie*, Verlagsbuchhandlung von J.J. Weber, **1939**.
- [6] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*(14), 2149–2154.
- [7] R. B. Merrifield, A. E. Bach, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*(25), 4808–4816.
- [8] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, **2002**.
- [9] (Hrsg.: B. Gutte), *Peptides: Synthesis, Structure and Applications*, (Hrsg.: B. Gutte), Academic Press, **1995**.
- [10] R. Preusentanz, O. Pando, L. Wessjohann, *Nachrichten aus der Chemie* **2010**, *58*, 526 – 532.
- [11] Novabiochem Catalog, **2010**.
- [12] I. Coin, M. Beyermann, M. Bienert, *Nat. Protocols* **2007**, *2*(12), 3247–3256.
- [13] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. Logan, R. Sheppard, B. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 537.
- [14] M. Quibell, T. Johnson, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, (Hrsg.: W. Chan, P. White), Oxford University Press, **2000**.
- [15] M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. W. Wiltzius, H. T. McFarlane, A. O. Madsen, C. Riek, D. Eisenberg, *Nature* **2007**, *447*(7143), 453–457.

- [16] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*(39), 9218–9227.
- [17] M. Mutter, A. Chandravarkar, C. Boyat, J. Lopez, S. D. Santos, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Patiny, L. Saucède, G. Tuchscherer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*(32), 4172–4178.
- [18] Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *ChemComm* **2004**, (1), 124–125.
- [19] Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*(31), 5965–5968.
- [20] Y. Sohma, Y. Hayashi, M. Skwarczynski, Y. Hamada, M. Sasaki, T. Kimura, Y. Kiso, *Peptide Science* **2004**, *76*(4), 344–356.
- [21] L. A. Carpino, E. Krause, C. D. Sferdean, M. Schümann, H. Fabian, M. Biebert, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*(40), 7519–7523.
- [22] S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Saucède, P. Tella, G. Tuchscherer, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(34), 11888–11889.
- [23] A. Taniguchi, T. Yoshiya, N. Abe, F. Fukao, Y. Sohma, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Journal of Peptide Science* **2007**, *13*(12), 868–874.
- [24] M. Quibell, W. G. Turnell, T. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*(14), 2237–2238.
- [25] K. Wahlström, O. Planstedt, A. Undén, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*(24), 3921–3924.
- [26] B. Merrifield, *Peptides*, (Hrsg.: B. Gutte), Academic Press, **1995**.
- [27] R. Sheppard, *Peptides 1971*, (Hrsg.: H. Nesvadba), North-Holland Publ. Amsterdam, **1972**.
- [28] B. Merrifield, *Recent Progress in Hormone Research*, (Hrsg.: G. Pincus), Academic Press, **1967**.
- [29] S. Kent, B. Merrifield, *Peptides 1980*, (Hrsg.: K. Brunsfeld), Scriptor Copenhagen, **1981**.
- [30] L. Kocsis, T. Bruckdorfer, G. Orosz, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 7015–7017.

- [31] M. Baerns, A. Behr, A. Brehm, J. Gmehling, H. Hofmann, U. Onken, A. Renken, *Technische Chemie*, WILEY-VCH, **2006**.
- [32] D. Freudenberg, in *Modul 3: Krisen und Risikokommunikation*.
- [33] G. Rothenberg, *Catalysis*, WILEY-VCH, **2008**.
- [34] G. I. Tesser, I. C. Balvert-Geers, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1975**, 7(4), 295–305.
- [35] R. Sheldon, *Chemtech* **1994**, 24, 38.
- [36] K. Hojo, M. Maeda, K. Kawasaki, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45(50), 9293–9295.
- [37] Novabiochem Letters 2 / 08, **2008**.
- [38] H. Kunz, *Chem. Ber.* **1976**, 109(11), 3693–3706.
- [39] H. Kunz, *Chem. Ber.* **1976**, 109(8), 2670–2683.
- [40] H. Kunz, S. Birnbach, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25(33), 3567–3570.
- [41] H. Kunz, G. Schaumlöffel, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 1985(9), 1784–1793.
- [42] K. Hojo, M. Maeda, K. Kawasaki, *Tetrahedron* **2004**, 60(8), 1875–1886.
- [43] K. Hojo, M. Maeda, T. J. Smith, E. Kita, F. Yamaguchi, S. Yamamoto, K. Kawasaki, *Chemical and pharmaceutical bulletin* **2004**, 52(4), 422–427.
- [44] K. Hojo, M. Maeda, Y. Takahara, S. Yamamoto, K. Kawasaki, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44(14), 2849–2851.
- [45] J. Fraga-Dubreuil, J. P. Bazureau, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42(35), 6097–6100.
- [46] W. Miao, T.-H. Chan, *J. Org. Chem.* **2005**, 70(8), 3251–3255.
- [47] D. J. Gravert, K. D. Janda, *Chem. Rev.* **1997**, 97(2), 489–510.
- [48] M. Mizuno, K. Goto, T. Miura, T. Matsuura, T. Inazu, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45(17), 3425–3428.
- [49] X. He, T. H. Chan, *Org. Lett.* **2007**, 9(14), 2681–2684.
- [50] M. de Kort, A. W. Tuin, S. Kuiper, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, R. C. Buijsman, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45(10), 2171–2175.
- [51] H. K. H.P. Latscha, *Anorganische Chemie*, Springer, **1996**.

- [52] M. K. Darmstadt, *Chemikalien Reagenzien*, **2002**.
- [53] W. Moore, *Grundlagen der Physikalischen Chemie*, Walter de Gruyter, **1990**.
- [54] J. Alsenz, M. Kansy, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*(7), 546 – 567.
- [55] A. Avdeef, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*(7), 568 – 590.
- [56] J. Dressman, C. Reppas, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*(7), 531 – 532.
- [57] S. Dimas, VERORDNUNG (EG) Nr. 440/2008 DER KOMMISSION, Amtsblatt der Europäischen Union, **2008**.
- [58] P. D. J. Strähle, *Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum*, S.Hirzel Verlag Stuttgart, **1990**.
- [59] K. Inouye, K. Kuzuya, B. Tonomura, *J Biochem* **1998**, *123*(5), 847–852.
- [60] I. M. Lampreia, S. R. Magalhães, S. I. Rodrigues, Ângela F.S.S. Mendonça, *The Journal of Chemical Thermodynamics* **2006**, *38*(3), 240 – 244.
- [61] L. S. Nielsen, F. Sløk, H. Bundgaard, *Int. J. Pharm.* **1994**, *102*(1-3), 231 – 239.
- [62] D. Cabaret, R. Kazandjan, M. Wakselman, *Carbohydrate Research* **1986**, *149*(2), 464–470.
- [63] T. N. Mitchell, K. Heesche-Wagner, *Journal of Organometallic Chemistry* **1992**, *436*(1), 43–53.
- [64] J. Grun, J. D. Revell, M. Conza, H. Wennemers, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*(18), 6197 – 6201.
- [65] F. M. Veronese, *Biomaterials* **2001**, *22*(5), 405 – 417.
- [66] C. A. Bergström, K. Luthman, P. Artursson, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, *22*(5), 387–398.
- [67] A. T. M. Serajuddin, M. Rosoff, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1984**, *73*(9), 1203–1208.
- [68] A. T. Serajuddin, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*(7), 603 – 616.

- [69] V. J. Stella, K. W. Nti-Addae, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*(7), 677 – 694.
- [70] P. Dyson, in *Sommerschule Green Chemistry Villars 2009*.
- [71] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, E. Grell, *Journal of Chromatography A* **1995**, *711*(1), 181–186.
- [72] L. E. Fisher, D. M. Engelman, *Analytical Biochemistry* **2001**, *293*(1), 102–108.
- [73] K. Wahlström, A. Undén, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*(24), 2976–2978.
- [74] D. Scanlon, *HPLC of Peptides and Proteins*, (Hrsg.: M.-I. Aguilar), Humana Press, **2004**.
- [75] J. M. Tomich, D. Wallace, K. Henderson, K. E. Mitchell, G. Radke, R. Brandt, C. A. Ambler, A. J. Scott, J. Grantham, L. Sullivan, T. Iwamoto, *Biophysical Journal* **1998**, *74*(1), 256–267.
- [76] B. Marglin, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*(21), 5051–5052.
- [77] Q.-x. Hua, M. A. Weiss, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*(20), 21449–21460.
- [78] M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. R. Sawaya, J. S. Wall, D. Eisenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2009**, *106*(45), 18990–18995.
- [79] J. P. Mayer, F. Zhang, R. D. DiMarchi, *Peptide Science* **2007**, *88*(5), 687–713.
- [80] G. L. Reddy, T. Iwamoto, J. M. Tomich, M. Montal, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*(20), 14608–14615.
- [81] L. Nisius, Phd thesis, University of Basel, **2009**.
- [82] J. J. Lacapere, E. Pebay-Peyroula, J. M. Neumann, C. Etchebest, *Trends Biochem Sci* **2007**, *32*(6), 259–270, DOI 10.1016/j.tibs.2007.04.001.
- [83] K. Wahlström, O. Planstedt, A. Undén, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*(23), 3779–3781.
- [84] J. Smith, R. Derbyshire, E. Cook, L. Dunthorne, J. Viney, S. Brewer, H. Sassenfeld, L. Bell, *Gene* **1984**, *32*(3), 321–327.
- [85] C. T. Choma, G. T. Robillard, D. R. Englebretsen, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*(16), 2417–2420.

- [86] D. R. Englebretsen, P. F. Alewood, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37(46), 8431–8434.
- [87] D. R. Englebretsen, C. T. Choma, G. T. Robillard, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39(27), 4929–4932.
- [88] D. R. Englebretsen, G. T. Robillard, *Tetrahedron* **1999**, 55(21), 6623–6634.
- [89] E. C. Johnson, S. B. Kent, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48(10), 1795–1799.
- [90] F. Dick, M. Mergler, G. Loidl, R. Schönleber, T. Vorherr, Purification of sparingly soluble peptides by temporary solubilization, Poster.
- [91] M. A. Hossain, A. Belgi, F. Lin, S. Zhang, F. Shabanpoor, L. Chan, C. Belyea, H.-T. Truong, A. R. Blair, S. Andrikopoulos, G. W. Tregear, J. D. Wade, *Bioconjugate Chemistry* **2009**, 20(7), 1390–1396.
- [92] R. Bessalle, H. Haas, A. Gorla, I. Shalit, M. Fridkin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, 36(2), 313–317.
- [93] A. Kato, K. Maki, T. Ebina, K. Kuwajima, K. Soda, Y. Kuroda, *Biopolymers* **2007**, 85(1), 12–18.
- [94] J. Xiao, A. Burn, T. J. Tolbert, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, 19(6), 1113–1118.
- [95] D. P. Wallace, J. M. Tomich, T. Iwamoto, K. Henderson, J. J. Grantham, L. P. Sullivan, *Am J Physiol Cell Physiol* **1997**, 272(5), C1672–1679.
- [96] M. Oblatt-Montal, G. L. Reddy, T. Iwamoto, J. M. Tomich, M. Montal, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1994**, 91(4), 1495–1499.
- [97] N. Kimizuka, T. Nakashima, *Langmuir* **2001**, 17(22), 6759–6761.
- [98] J. S. Wilkes, *Green Chemistry* **2002**, 4(2), 73–80.
- [99] T. Wasserscheid, Peter und Welton, *Ionic Liquids in Synthesis*, Wiley VCH GmbH, **2008**, 2nd Edition.
- [100] Z. Du, Y.-L. Yu, J.-H. Wang, *Chemistry - A European Journal* **2007**, 13(7), 2130–2137.
- [101] T. Köddermann, C. Wertz, A. Heintz, R. Ludwig, *Angew. Chem.* **2006**, 118(22), 3780–3785.

- [102] K. Fukumoto, H. Ohno, *Angew. Chem.* **2007**, *119*(11), 1884–1887.
- [103] K. E. Gutowski, G. A. Broker, H. D. Willauer, J. G. Huddleston, R. P. Swatloski, J. D. Holbrey, R. D. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*(22), 6632–6633.
- [104] A. E. Visser, R. P. Swatloski, R. D. Rogers, *Green Chemistry* **2000**, *2*(1), 1–4.
- [105] A. E. Visser, R. P. Swatloski, W. M. Reichert, J. H. D. Jr., R. D. Rogers, R. Mayton, S. Sheff, A. Wierzbicki, *ChemComm* **2001**, (1), 135–136.
- [106] N. Gathergood, M. T. Garcia, P. J. Scammells, *Green Chemistry* **2004**, *6*(3), 166–175.
- [107] Z. Fei, D. Zhao, T. J. Geldbach, R. Scopelliti, P. J. Dyson, *Chemistry - A European Journal* **2004**, *10*(19), 4886–4893.
- [108] F. Guillen, D. Brégeon, J.-C. Plaquevent, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*(8), 1245–1248.
- [109] A. Streitwieser, C. Heathcock, E. Kosower, *Organische Chemie*, VCH-Verlagsgesellschaft, **1994**.
- [110] V. V. Namboodiri, R. S. Varma, *Org. Lett.* **2002**, *4*(18), 3161–3163.
- [111] M. Deetlefs, K. R. Seddon, *Green Chemistry* **2003**, *5*(2), 181–186.
- [112] P. Nockemann, K. Binnemans, K. Driesen, *Chemical Physics Letters* **2005**, *415*(1-3), 131–136.
- [113] S. Toma, M. Meccaroni, R. Scaronebesta, *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, *2009*(3), 321–327.
- [114] C. Baleizao, B. Gigante, H. Garcia, A. Corma, *Green Chemistry* **2002**, *4*(3), 272–274.
- [115] T.-P. Loh, L.-C. Feng, H.-Y. Yang, J.-Y. Yang, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*(48), 8741–8743.
- [116] A. Taubert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*(40), 5380–5382.
- [117] S.-g. Lee, *ChemComm* **2006**, (10), 1049–1063.

- [118] K. Bica, P. Gaertner, *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 2008(19), 3235–3250.
- [119] D. Seebach, H. A. Oei, *Angew. Chem. Int. Ed. in English* **1975**, 14(9), 634–636.
- [120] P. Schulz, N. Müller, A. Bösmann, P. Wasserscheid, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46(8), 1293–1295.
- [121] K. Schneiders, A. Bösmann, P. Schulz, P. Wasserscheid, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2009**, 351(3), 432–440.
- [122] R. P. Swatloski, S. K. Spear, J. D. Holbrey, R. D. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124(18), 4974–4975.
- [123] S. Zhu, Y. Wu, Q. Chen, Z. Yu, C. Wang, S. Jin, Y. Ding, G. Wu, *Green Chemistry* **2006**, 8(4), 325–327.
- [124] J. Vitz, T. Erdmenger, C. Haensch, U. S. Schubert, *Green Chemistry* **2009**, 11(3), 417–424.
- [125] M. Mutter, H. Hagenmaier, E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Ed. in English* **1971**, 10(11), 811–812.
- [126] P. H. Toy, K. D. Janda, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33(8), 546–554.
- [127] I. T. Horvath, J. Rabai, *Science* **1994**, 266(5182), 72–75.
- [128] A. Studer, S. Hadida, R. Ferritto, S.-Y. Kim, P. Jeger, P. Wipf, D. P. Curran, *Science* **1997**, 275(5301), 823–826.
- [129] I. Horvath, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31(10), 641–650.
- [130] M. Wende, R. Meier, J. A. Gladysz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123(46), 11490–11491.
- [131] T. Miura, Y. Hirose, M. Ohmae, T. Inazu, *Org. Lett.* **2001**, 3(24), 3947–3950.
- [132] M. Wende, J. A. Gladysz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(19), 5861–5872.
- [133] T. Miura, K. Goto, D. Hosaka, T. Inazu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42(18), 2047–2051.
- [134] M. Mizuno, K. Goto, T. Miura, D. Hosaka, T. Inazu, *ChemComm* **2003**, (8), 972–973.

- [135] H. Xie, C. Lu, G. Yang, Z. Chen, *Synthesis* **2009**, 2009(02), 205–210.
- [136] W. Miao, T. H. Chan, *Org. Lett.* **2003**, 5(26), 5003–5005.
- [137] J. Fraga-Dubreuil, J. P. Bazureau, *Tetrahedron* **2003**, 59(32), 6121–6130.
- [138] S. T. Handy, M. Okello, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44(46), 8399–8402.
- [139] S. Anjaiah, S. Chandrasekhar, R. Grée, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45(3), 569–571.
- [140] J. C. Legeay, J. Y. Goujon, J. J. Vanden Eynde, L. Toupet, J. P. Bazureau, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2006**, 8(6), 829–833.
- [141] T. J. Geldbach, P. J. Dyson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(26), 8114–8115.
- [142] C. Baleizão, B. Gigante, H. Garcia, A. Corma, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44(36), 6813–6816.
- [143] N. Audic, H. Clavier, M. Mauduit, J.-C. Guillemin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(31), 9248–9249.
- [144] Q. Yao, Y. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42(29), 3395–3398.
- [145] R. A. Donga, S. M. Khaliq-Uz-Zaman, T.-H. Chan, M. J. Damha, *J. Org. Chem.* **2006**, 71(20), 7907–7910.
- [146] J. W. Hojfeldt, K. V. Gothelf, *J. Org. Chem.* **2006**, 71(25), 9556–9559.
- [147] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, 37(22), 3404–3409.
- [148] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, Spektrum Akademischer Verlag, **2003**.
- [149] H. Gilman, L. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, 67(10), 1847–1848.
- [150] A. S. Hernandez, J. C. Hodges, *J. Org. Chem.* **1997**, 62(10), 3153–3157.
- [151] N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter, **1995**.
- [152] N. Deka, A.-M. Mariotte, A. Boumendjel, *Green Chemistry* **2001**, 3(5), 263–264.
- [153] H. S. Schultz, H. B. Freyermuth, S. R. Buc, *J. Org. Chem.* **1963**, 28(4), 1140–1142.

- [155] (Hrsg.: C. Hodgman), *Handbook of Chemistry and Physics*, (Hrsg.: C. Hodgman), The Chemical Rubber Publishing Co, **1960**.
- [154] (Hrsg.: E. Lax), *Taschenbuch für Chemiker und Physiker*, (Hrsg.: E. Lax), Springer-Verlag, **1967**.
- [156] Supelco, *Chromatography Products for Analysis and Purification*, **2009**.
- [157] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, **2005**.
- [158] K. Cammann, *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, **2001**.
- [159] S. Gill, P. Hippel, *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 319–326.
- [160] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976 – 980.
- [161] J. E. Shields, F. H. Carpenter, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*(14), 3066–3070.
- [162] T. Iimori, T. Shibazaki, S. Ikegami, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*(13), 2267–2270.
- [163] R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*(2), 296–300.
- [164] A. K. Ghosh, T. T. Doung, S. P. McKee, W. J. Thompson, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*(20), 2781–2784.
- [165] E. J. Corey, A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*(17), 6190–6191.
- [166] S. K. Adeniyi-Jones, M. L. Karnovsky, *J Clin Invest* **1981**, *68*(2), 365–373.
- [167] G. L. Hug, M. Bonifacì, K.-D. Asmus, D. A. Armstrong, *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*(28), 6674–6682.
- [168] S. Roux, E. Zekri, B. Rousseau, M. Paternostre, J. Cintrat, N. Fay, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 354–359.
- [169] S. Kim, Y. C. Kim, J. I. Lee, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*(32), 3365–3368.
- [170] S. Kim, J. I. Lee, Y. C. Kim, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*(5), 560–565.
- [171] M. Stenberg, G. Marko-Varga, R. Öste, *Food Chemistry* **2001**, *74*(2), 217–224.
- [172] P. Müller, B. Siegfried, *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*(4), 987–994.

- [173] L. Sharma, M. K. Nayak, A. K. Chakraborti, *Tetrahedron* **1999**, *55*(31), 9595–9600.
- [174] A. Di Fenza, M. Tancredi, C. Galoppini, P. Rovero, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*(46), 8529–8532.
- [175] E. Atherton, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 336–337.
- [176] F. M. Callahan, G. W. Anderson, R. Paul, J. E. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*(2), 201–207.
- [177] A. Westerlund, J.-L. Gras, R. Carlson, *Tetrahedron* **2001**, *57*(27), 5879–5883.
- [178] B. Figadère, X. Franck, A. Cavé, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*(37), 5893–5894.
- [179] G. Bartoli, M. Bosco, M. Locatelli, E. Marcantoni, P. Melchiorre, L. Sambri, *Org. Lett.* **2005**, *7*(3), 427–430.
- [180] D. F. Taber, D. A. Gerstenhaber, X. Zhao, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*(18), 3065–3066.
- [181] S. W. Wright, D. L. Hageman, A. S. Wright, L. D. McClure, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*(42), 7345–7348.
- [182] A. Armstrong, I. Brackenridge, R. F. W. Jackson, J. M. Kirk, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*(20), 2483–2486.
- [183] R. Greenwald, M. Chaykovsky, E. J. Corey, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*(4), 1128–1129.
- [184] Y. Fall, C. Vitale, A. Mouriño, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*(38), 7337–7340.
- [185] R. u. D. G. u. F. E. u. H. W. u. M. P. u. P. D. u. S. K. Becker, Heinz und Beckert, *Organikum*, WILEY-VCH, **2001**.
- [186] P. H. Mazzocchi, P. Wilson, F. Khachik, L. Klingler, S. Minamikawa, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*(18), 2981–2989.
- [187] L. A. Paquette, D. R. Sauer, D. G. Cleary, M. A. Kinsella, C. M. Blackwell, L. G. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*(19), 7375–7387.
- [188] V. J. Davisson, A. B. Woodside, T. R. Neal, K. E. Stremmer, M. Muehlbacher, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*(25), 4768–4779.
- [189] W. F. Berkowitz, Y. Wu, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*(5), 1536–1539.

- [190] C. A. Grob, A. Waldner, *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*(6), 1854–1865.
- [191] G. A. Olah, J. M. Bollinger, J. Brinich, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*(25), 6988–6992.
- [192] P. L. Arnold, M. Rodden, K. M. Davis, A. C. Scarisbrick, A. J. Blake, C. Wilson, *ChemComm* **2004**, (14), 1612–1613.
- [193] D. R. Sliskovic, J. A. Picard, P. M. O'Brien, P. Liao, W. H. Roark, B. D. Roth, M. A. Anderson, S. B. Mueller, T. M. A. Bocan, R. F. Bousley, K. L. Hamelehle, R. Homan, J. F. Reindel, R. L. Stanfield, D. Turluck, B. R. Krause, *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*(5), 682–690.
- [194] G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*(23), 6180–6183.
- [195] H. Babad, A. G. Zeiler, *Chem. Rev.* **1973**, *73*(1), 75–91.
- [196] M. Matzner, R. P. Kurkijy, R. J. Cotter, *Chem. Rev.* **1964**, *64*(6), 645–687.
- [197] S.-S. Wang, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*(20), 3258–3261.
- [198] G.-s. Lu, S. Mojsov, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*(17), 3433–3436.
- [199] P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*(49), 6147–6150.
- [200] R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto, M. Valcárcel, M. Widmer, *Analytical Chemistry*, WILEY-VCH, **2004**.
- [201] P. Stepnowski, A. Müller, P. Behrend, J. Ranke, J. Hoffmann, B. Jastorff, *Journal of Chromatography A* **2003**, *993*(1-2), 173–178.
- [202] P. Stepnowski, *International Journal of Molecular Sciences* **2006**, *7*(11), 497–509.
- [203] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, WILEY-VCH, **1999**.
- [204] G. Jeromin, M. Bertau, *Bioorganikum: Praktikum der Biokatalyse*, WILEY-VCH, **2005**.
- [205] I. Tabushi, Y. Kuroda, M. Yamada, H. Higashimura, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*(19), 5545–5546.

- [206] B. Imperiali, R. S. Roy, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*(6), 1891–1894.
- [207] R. Roy, B. Imperiali, *Protein Eng.* **1997**, *10*(6), 691–698.
- [208] M. A. Shogren-Knaak, B. Imperiali, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*(9), 1993–2002.
- [209] B. Imperiali, K. McDonnell, M. Shogren-Knaak, *Implementation and Redesign of Catalytic Function in Biopolymers* **1999**, 1–38.
- [210] R. Saito, S. Naruse, K. Takano, K. Fukuda, A. Katoh, Y. Inoue, *Org. Lett.* **2006**, *8*(10), 2067–2070.
- [211] **2005**.
- [212] D. Norris, R. Stewart, *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 1687–1695.
- [213] D. J. Combs, R. S. Lokey, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*(15), 2679–2682.

An meiner Hochschulausbildung waren die folgenden Dozenten beteiligt:

Universität Siegen:

Prof. Dr. H. J. Butt, Prof. Dr. K. H. Drexhage, Prof. Dr. H. Haeuseler, Prof. Dr. W. Maurer, Prof. Dr. W. Plass, Prof. Dr. B. Wenclawiak, Prof. Dr. M. Schmittel, Prof. Dr. H. Günther, Prof. Dr. W. H. E. Schwarz, Prof. Dr. G. H. Graf, Prof. Dr. D. Knöfel, Prof. Dr. F. Schneider, PD Dr. C. Zander, Prof. Dr. W. Hasenpusch, Prof. Dr. H. J. Deiseroth, Prof. Dr. H. Immels

Universität Regensburg:

Prof. Dr. W. Kunz, Prof. Dr. F. Kees, Prof. Dr. C. Steinem, Prof. Dr. S. Modrow, Prof. Dr. J. Daub, Prof. Dr. A. Geyer, Prof. Dr. B. König, Prof. Dr. O. Reiser, Prof. Dr. A. Buschauer, PD Dr. G. Bernhard, Prof. Dr. Dr. E. Haen, Prof. Dr. E. Angerer, Dr. Haase, Dr. C. Cabrele, Prof. Dr. S. Dove, Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer, PD Dr. W. Gronwald, Prof. Dr. O. Wolfbeis, Prof. Dr. E. Brunner,

University of Notre Dame:

Prof. Dr. O. Wiest, Prof. Dr. S. C. Basu

Universität Basel:

Prof. Dr. H. Wennemers, Prof. Dr. Wirz, Prof. Dr. K. Müller, Prof. Dr. H. Huber