

Amphiphile Peptide

Anwendungen in der supramolekularen Chemie und der Katalyse

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Matthias Messerer

aus Weißenburg (i. Bay.)

Basel, 2012

Originaldokument gespeichert auf dem Dokumentenserver der Universität Basel

edoc.unibas.ch



Dieses Werk ist unter dem Vertrag „Creative Commons Namensnennung-Keine kommerzielle Nutzung-Keine Bearbeitung 2.5 Schweiz“ lizenziert. Die vollständige Lizenz kann unter **creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.5/ch** eingesehen werden.



Namensnennung-Keine kommerzielle Nutzung-Keine Bearbeitung 2.5 Schweiz

Sie dürfen:



das Werk vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen

Zu den folgenden Bedingungen:



Namensnennung. Sie müssen den Namen des Autors/Rechteinhabers in der von ihm festgelegten Weise nennen (wodurch aber nicht der Eindruck entstehen darf, Sie oder die Nutzung des Werkes durch Sie würden entlohnt).



Keine kommerzielle Nutzung. Dieses Werk darf nicht für kommerzielle Zwecke verwendet werden.



Keine Bearbeitung. Dieses Werk darf nicht bearbeitet oder in anderer Weise verändert werden.

- Im Falle einer Verbreitung müssen Sie anderen die Lizenzbedingungen, unter welche dieses Werk fällt, mitteilen. Am Einfachsten ist es, einen Link auf diese Seite einzubinden.
- Jede der vorgenannten Bedingungen kann aufgehoben werden, sofern Sie die Einwilligung des Rechteinhabers dazu erhalten.
- Diese Lizenz lässt die Urheberpersönlichkeitsrechte unberührt.

Die gesetzlichen Schranken des Urheberrechts bleiben hiervon unberührt.

Die Commons Deed ist eine Zusammenfassung des Lizenzvertrags in allgemeinverständlicher Sprache: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ch/legalcode.de>

Haftungsausschluss:

Die Commons Deed ist kein Lizenzvertrag. Sie ist lediglich ein Referenztext, der den zugrundeliegenden Lizenzvertrag übersichtlich und in allgemeinverständlicher Sprache wiedergibt. Die Deed selbst entfaltet keine juristische Wirkung und erscheint im eigentlichen Lizenzvertrag nicht. Creative Commons ist keine Rechtsanwalts-gesellschaft und leistet keine Rechtsberatung. Die Weitergabe und Verlinkung des Commons Deeds führt zu keinem Mandatsverhältnis.

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel auf Antrag von:

Prof. Dr. Helma Wennemers

Prof. Dr. Andreas Pfaltz

Basel, den 13.Dezember 2011

Prof. Dr. Martin Spiess

Dekan

Für meine Eltern

Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Helma Wennemers für ihre Unterstützung und Leitung bei dieser überaus interessanten Arbeit, die ich in ihrer Gruppe durchführen konnte, bedanken. Ihre motivierende Art und Weise hat mir sehr geholfen diese Arbeit erfolgreich abzuschliessen und mich über den gesamten Zeitraum begleitet

Bei Prof. Dr. Pfaltz bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats und bei Prof. Dr. Häussinger für den Prüfungsbeisitz.

Weiter möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Gruppe Wennemers bedanken. Es herrschte immer eine gemeinschaftliche Atmosphäre mit grosser Hilfsbereitschaft und gegenseitiger Unterstützung, die unsere gemeinsame Zeit zu etwas Besonderem machte.

Ich bedanke mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Pfaltz und der Arbeitsgruppe Meier für die Hilfestellungen und unkomplizierte Bereitschaft zur gemeinsamen Verwendung von Instrumenten. Dabei möchte ich mich auch bei Vesna Olivieri bedanken für die Hilfe und Einführung in das Elektronenmikroskop.

Ein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter der Werkstatt, der Materialausgabe und des Sekretariats und vor allem auch an Brigitte Howald.

Prof. Daniel Häussinger danke ich ausserdem für die NMR-Messungen und für die bereitwillige Hilfe bei Fragen oder seinen Anregungen.

Für finanzielle Unterstützung danke ich dem Schweizerischen Nationalfonds, dem Marie Curie Research & Training Network der Europäischen Union, der Universität Basel und der Bachem AG.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die es erst ermöglichten, dass ich diese Arbeit durchführen konnte. Danke für die grosse Unterstützung und Hilfe, die ihr mir so selbstverständlich und selbstlos zukommen liest. Euch ist diese Arbeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung	5
1. Supramolekulare Chemie.....	5
1.1 Molekulare Erkennung.....	6
1.2 Selbst-Organisation.....	7
2 Molekulare Rezeptoren.....	8
3 Kompartimentbildung und Organokatalyse.....	11
B Spezieller Teil I: Amphiphile Rezeptor-Ligand-Systeme	13
1. Zweiarmlige Peptid-Rezeptoren.....	13
2. Diketopiperazin-Rezeptoren.....	14
3. Selbst-Organisation des Diketopiperazin-Rezeptors 1 mit pegylierten Peptiden (2b-d).....	15
3.1 Bildung eines Organogels und von Vesikeln.....	15
3.2 Zielvorgaben und Aufgabenstellung.....	19
3.3 Design eines funktionalisierten Rezeptor-Ligand-Systems.....	20
3.4 Synthese der Komponenten.....	21
3.4.1 Synthese eines funktionalisierten Peptid-PEG-Konjugats (2d).....	21
3.4.2 Synthese des Diketopiperazin-Rezeptors 1	22
3.5 Untersuchungen zur Selbst-Organisation des funktionalisierten Rezeptor-Ligand-Systems.....	25
3.5.1 Spektroskopische Methoden zur Analyse der supramolekularen Aggregate: Grundlagen.....	25
3.5.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	26
3.5.3 Analyse der Selbst-Organisation des Diketopiperazin-Rezeptors 1 in Gegenwart des pegylierten Peptides (2d) durch Dynamische Lichtstreuung	27
3.5.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS).....	31
3.5.4.1 Allgemeine Beschreibung der FCS-Analysen.....	31
3.5.4.2 FCS-Analysen der Selbst-Organisation aus Rezeptor 1 und pegyliertem Ligand 2d	32
4. Zusammenfassung.....	38
5. Selbst-Organisation des Diketopiperazin-Rezeptors 1	40
5.1 Untersuchung der Selbst-Organisation des Diketopiperazin-Rezeptors 1	40

5.2 Untersuchungen zur Selbst-Organisation der Fragmenten von 1	47
5.2.1 Synthese der Fragmente des Diketopiperazin Rezeptors (1).....	48
5.2.2 Selbst-Organisation der Rezeptorfragmente in wässriger Umgebung.....	50
5.2.3 Selbst-Organisation der Rezeptorfragmente in Gegenwart von pegylierten Peptiden.....	53
5.2.3.1 Rezeptorfragment Ac-Phe-Gln(Trt)-Tyr(dye)-OMe (11).....	53
5.2.3.2 Rezeptorfragment Ac-Phe-Gln(Trt)-Tyr(O- ^t Bu)-NH ₂ (12).....	55
5.3 Zusammenfassung.....	58
5.4 Literaturverzeichnis.....	59
B Spezieller Teil II: Amphiphile Peptide als Katalysatoren.....	65
1. Organokatalytische Aldolreaktionen in Wasser.....	65
2. Entwicklung eines asymmetrischen Katalysators für Aldolreaktionen in Wasser.....	67
2.1 Synthese des Katalysators H-Pro-Pro-Asp-NH-(CH ₂) ₁₁ -CH ₃ (14b).....	69
2.2 Evaluation des asymmetrischen Katalysators 14b in organischen Lösungsmitteln.....	70
2.2.1 Katalytische Effizienz von H-Pro-Pro-Asp-NH ₂ (14a) als Vergleich	70
2.2.2 Umkehr in der Enantioselektivität des Katalysators 14b	70
2.2.3 Untersuchungen zur Konformation des Peptides 14b	73
2.3 Evaluation des asymmetrischen Katalysators 14b in wässriger Umgebung.....	77
2.3.1 Untersuchungen zur Selbst-Organisation des Katalysators in Wasser.....	77
2.3.2 Asymmetrische Aldolreaktion in einem gepuffertem System.....	80
2.3.3 Asymmetrische Aldolreaktion in Wasser.....	84
2.4 Zusammenfassung.....	86
2.5 Literaturverzeichnis.....	86
	87

C Experimenteller Teil.....	90
1. Allgemeine Bemerkungen.....	90
1.1 Geräte und Materialien.....	90
1.2 Abkürzungsverzeichnis.....	92
2. Allgemeine Protokolle für die Synthese an fester Phase.....	93
2.1 Abspaltung der Schutzgruppen.....	93
2.2 Bestimmung der Harzbeladung.....	93
2.3 Farbttests und Acetylierung.....	94
2.4 Manuelle Kupplung von Aminosäuren.....	95
2.4.1 Aktivierung mit Carbodiimiden.....	95
2.4.2 Aktivierung mit Acyl-Aminium-Salzen.....	95
2.5 Abspaltung von Harz.....	96
2.5.1 Seitenketten-geschützte Carboxamid-Peptide.....	96
2.5.2 Ungeschützte Carboxamid-Peptide.....	96
3. Synthese des Diketopiperazin-Rezeptors.....	97
3.1 Synthese des Diketopiperazins 8	97
3.1.1 Synthese von H-(4R)-Hyp-OMe.....	97
3.1.2 Synthese von Boc-(4R)-Hyp-OMe.....	97
3.1.3 Synthese von Boc-(4R)-Azp-OMe (3).....	98
3.1.4 Synthese von Boc-(4R)-Azp-OPfp (4).....	99
3.1.5 Synthese von H-(4R)-Azp-OMe (5).....	100
3.1.6 Synthese von Boc-(4R)-Azp-(4R)-Azp-OMe (6).....	101
3.1.7 Synthese von Cyclo(-(4R)-Azp-(4R)-Azp-) (7).....	102
3.1.8 Synthese des Diketopiperazins 8 (DKP).....	103
3.2 Synthese Farbstoff-markierten Tyrosin-Derivats.....	103
3.2.1 Synthese von Boc-Tyr(dye)-OMe.....	103
3.2.2 Synthese von Boc-Tyr(dye)-OH (10).....	104
3.3 Kupplung der Rezeptorarme.....	105
3.3.1 Synthese von Boc-Tyr(dye)-OH.....	105
3.3.2 Synthese von Fmoc-Gln(Trt)-Tyr(dye)-DKP	106
3.3.3 Synthese von Fmoc-Phe-Gln(Trt)-Tyr(dye)-DKP.....	107
3.3.4 Synthese von Ac-Phe-Gln(Trt)-Tyr(dye)-DKP (1).....	108
4. Synthese des Rezeptor-Fragments 11	110
4.1 Fmoc-Gln(Trt)-Tyr(dye)-OMe	110
4.2 Fmoc-Phe-Gln(Trt)-Tyr(dye)-OMe	111

4.3 Ac-Phe-Gln(Trt)-Tyr(dye)-OMe (11).....	112
5. Synthesen an fester Phase.....	113
5.1 Ac-Phe-Gln(Trt)-Tyr(OtBu)-NH ₂ (12).....	113
5.2 Synthese des pegylierten Peptids (2d).....	114
6. Katalyse.....	115
6.1 Allgemeine Vorschrift für die direkte Aldolreaktion von 4-Nitrobenzaldehyd mit Cyclohexanon in organischen Lösungsmittel	115
6.2 Allgemeine Vorschrift für die direkte Aldolreaktion von 4-Nitrobenzaldehyd mit Cyclohexanon in Wasser.....	115
6.3 Synthese des peptidischen Katalysators 14b	116
6.3.1 Synthese des Fragments 19	116
6.3.1.1 Boc-Pro-Pro-OMe	116
6.3.1.2 Boc-Pro-Pro-OH (19).....	117
6.3.2 Synthese des Fragments 16	118
6.3.2.1 Cbz-Asp(O ^t Bu)-NH(CH ₂) ₁₁ CH ₃	118
6.3.2.2 H-Asp(O ^t Bu)-NH(CH ₂) ₁₁ CH ₃ (16).....	118
6.3.3 Synthese des alkylierten Katalysators 14b	119
6.3.3.1 Boc-Pro-Pro-Asp(O ^t Bu)-NH(CH ₂) ₁₁ CH ₃	119
6.3.3.2 H-Pro-Pro-Asp-NH(CH ₂) ₁₁ CH ₃ (14b).....	120
D Anhang	122

A Einleitung

1. Supramolekulare Chemie

„Supramolekulare Chemie ist die Chemie der intermolekularen Bindung“; sie umfasst damit die Strukturen und Funktionen der Einheiten, welche aus der Assoziation einzelner molekularer Bauteile gebildet werden.¹ So wie die molekulare Chemie, die Chemie der kovalenten Bindung, sich mit den Regeln befasst, welche die Strukturen, Eigenschaften und Transformationen der Moleküle bestimmen, so beschäftigt sich die supramolekulare Chemie mit den Gesetzen der intermolekularen Kräfte und den daraus resultierenden Bindungen in Molekül-Assoziationen. Die Entwicklung supramolekularer Systeme benötigt daher neben den synthetischen Methoden der molekularen Chemie, die gleichzeitige und gezielte Errichtung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen, um damit stabile supramolekulare Einheiten aufzubauen.

Die Partner einer solchen supramolekularen Einheit werden allgemein als molekularer Rezeptor und als Substrat bezeichnet, wobei das Substrat in der Regel die kleinere Komponente darstellt, welche durch den Rezeptor gebunden wird.² Diese Terminologie spiegelt sich in ihrer Verbindung zu biologischen Rezeptoren und Substraten, für die bereits Paul Ehrlich proklamierte, dass Moleküle nicht agieren, solange sie nicht gebunden sind („Corpora non agunt nisi fixata“).³ Solche Molekül-Interaktionen bilden damit die Basis für die hoch selektiven Erkennungs-, Reaktions- und Regulationsprozesse, welche in der Natur genutzt werden und sich beispielsweise wiederfinden in der Bindung von Substraten durch Rezeptorproteine oder auch in den katalytischen Reaktionen der Enzyme.

Die Entwicklung von synthetischen, abiotischen Rezeptoren, die befähigt sind Prozesse von solch hoher Effizienz und Selektivität nachzuahmen, erfordert die exakte Manipulation der energetischen und stereochemischen Bedingungen für nicht-kovalente, intermolekulare Kräfte (Van der Waals- und Coulomb-Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken-Bindungen).

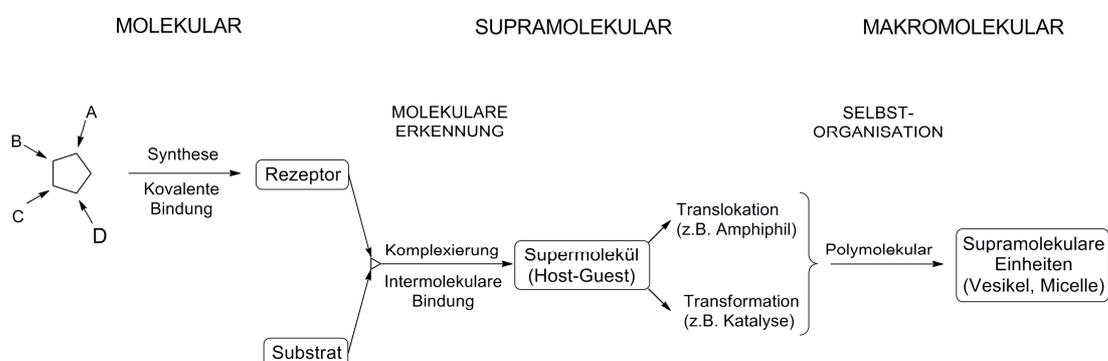


Abb. 1: Von der molekularen zur makromolekularen Chemie: Moleküle, „Supermoleküle“ und supramolekulare Einheiten.¹

1.1 Molekulare Erkennung

So entsteht mit Hilfe der klassischen molekularen Chemie ein synthetischer Rezeptor, der durch die nicht-kovalente und selektive Bindung seines Substrates zu einem „Supermolekül“ oder auch als Host-Guest-Komplex werden kann.²

Diese Komplex-Bildung beinhaltet die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen möglichen Substraten und basiert daher auf dem Prinzip der molekularen Erkennung. Somit lässt sich die molekulare Erkennung auch als ein Prozess definieren, in dem sowohl das Binden als auch die Selektion eines Substrates beinhaltet und durch den bestimmte Funktionen ausgelöst werden, womit die supramolekulare Chemie zu einer Frage von Informationsspeicherung und dem Ablesen dieser Informationen wird.^{1,4} Die Stabilität und damit auch die Selektivität des Komplexes werden bestimmt durch seine thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften, d.h. der Menge an Energie und Information, die in seinen Bestandteilen gespeichert werden kann. Diese Informationen sind sowohl in der Architektur des Rezeptors als auch in seinen Bindungsstellen (Anzahl, Art, Orientierung) enthalten und ergeben zusammen eine optimale Menge an Informationen für ein bestimmtes Substrat. Rezeptor und Substrat stellen somit Strukturen einer doppelten Komplementarität dar, die sowohl elektronische als auch sterische Aspekte umfasst und letztlich zu dem „Schlüssel-Schloss“-Prinzip, wie es 1894 durch Emil-Fischer beschrieben wurde, führt.⁵

Trägt der Rezeptor zusätzlich zu seinen Erkennungsmerkmalen auch noch funktionelle Einheiten, ist er in der Lage, eine chemische Transformation in seinem gebundenen Substrat zu induzieren, indem er dessen stereoelektronische Eigenschaften manipuliert und die Reaktionspartner in engen Kontakt zueinander bringt. Durch die Selektion und das Binden des Substrates, der anschließenden chemischen Transformation und der Freisetzung des Produktes vollendet sich der katalytische Zyklus, wie er von Enzymen bekannt ist und wie er in der supramolekularen Katalyse oder mit synthetischen Enzymen versucht wird nachzuahmen.^{6,7}

Mit der Bindung eines Substrates durch seinen Rezeptor lassen sich neben den molekularen aber auch makroskopische Prozesse beeinflussen und steuern. Dies zeigt sich in dem selektiven Transport von Ionen oder Coenzymen entgegen dem Konzentrationsgradienten in Zellkompartimenten oder der Selbstorganisation von viralen Bestandteilen zu ihrer dreidimensionalen Struktur. Eine supramolekulare Spezies stützt sich daher zuerst auf ihre Fähigkeit zur Selektion, welche es dann im Weiteren ermöglicht, höchst effiziente Transformationen oder Regulationsprozesse auszulösen.

1.2 Selbstorganisation

In der Natur erfolgt der Sprung von der molekularen zur makroskopischen Ebene durch eine hierarchische Form der Selbstorganisation. Die zusätzliche Ebene lässt sich durch die Inkorporation des anfänglichen Rezeptor-Substrat-Komplexes in eine kollektive, polymolekulare Einheit vollziehen, wie sie sich in den Doppelschichten von Zellkompartimenten oder Vesikeln wiederfindet. Hierbei muss allerdings auch zwischen den unterschiedlichen Bedingungen für die Selbstorganisation der Komponenten auf den jeweiligen Ebenen unterschieden werden.⁸

Jean-Marie Lehn, einer der Mitbegründer dieses Feldes, unterschied daher eine hierarchische Ordnung in den Begriffen ‚self-assembly‘ und ‚self-organisation‘.^{1,3} Zusammengenommen erfassen diese Bezeichnungen den gesamten Prozess, der es vorprogrammierten Molekülen erlaubt, in einer genau definierten Form zusammenzukommen, um dadurch grössere Einheiten von erst zwei- und dann dreidimensionaler Struktur aufzubauen. ‚Self-assembly‘ beschreibt darin allein Prozesse, die durch molekulare Erkennung ausgerichtet werden und aus der reversiblen, spontanen Assoziation von einer limitierten Anzahl an Komponenten entstehen.^{1,3} ‚Self-organisation‘ hingegen bezieht sich auf Prozesse von höherer Ordnung, die sowohl die Wechselwirkungen zwischen einer limitierten Anzahl an Komponenten, als auch die Integration solcher primären Einheiten in kollektive, polymolekulare Formationen umfasst.^{1,3}

Thermodynamisch betrachtet, kann der Prozess der molekularen Erkennung durch ein Rezeptor-Molekül mittels der freien Enthalpie (ΔG) des Systems charakterisiert werden, welche durch die Bindung des passenden Substrates minimiert wird. Auf der makroskopischen Ebene hingegen müssen supramolekulare Einheiten, wie Doppelschichten oder Vesikel, als zwei-phasige Systeme betrachtet werden, die wiederum durch die partiellen freien Enthalpien der Komponenten bestimmt werden. Durch die Einführung der partiellen Grössen lässt sich das chemische Potenzial einer Substanz definieren, d.h. ihr Maß, eine chemische Reaktion oder einen physikalischen Vorgang anzutreiben. In anderen Worten also, der Grad an Informationen, der auf molekulare Ebene in der Bindung von Rezeptor und Substrat gespeichert ist und inwieweit diese Informationen auf makroskopische Ebene und physikalische Prozesse vermittelt werden können.

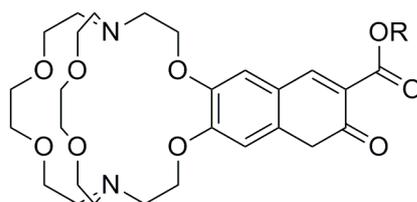
Diese Differenzierung zeigt sich auch in den unterschiedlichen Herangehensweisen, Selbst-Organisationen von höherer Ordnung durch synthetische Methoden zu erreichen. Auf der einen Seite lassen sich makroskopische Einheiten oder Strukturen durch die Phasenverschiebung von polymeren Einheiten induzieren, die Elemente mit hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften besitzen und mittels Polymerisationsreaktionen hergestellt werden und daher auf kovalenten Bindungen beruhen (sog. Blockcopolymere).⁹ Diese Bausteine sind in der Regel von hohem Molekulargewicht und ihre polymolekulare Anordnung beruht grösstenteils auf hydrophoben Wechselwirkungen, die durch den hydrophoben Effekt gesteuert werden und daher weniger selektiv ablaufen.¹⁰

Auf der anderen Seite bestehen grosse Anstrengungen eine vergleichbare Selektivität zu natürlich vorkommenden Systemen zu erreichen, indem synthetische Enzyme oder molekulare Rezeptoren entwickelt werden, die einzelne Transformationen oder die Bindung bestimmter Moleküle ermöglichen.^{7,11}

Für die synthetische Entwicklung von komplexen, makromolekularen Einheiten von höherer Ordnung ist es jedoch unablässig beide Konzepte zu vereinen, da der Bauplan für die makroskopische Form bereits in dem Supermolekül enthalten sein muss, um somit eine zielgerichtete Synthese von supramolekularen Strukturen zu ermöglichen. Der Selektionsprozess auf der Ebene der molekularen Erkennung würde dadurch einen spontanen und parallelen Aufbau von makromolekularen Einheiten mit unterschiedlicher Struktur und Funktion erlauben.

2. Molekulare Rezeptoren

Die Entwicklung molekularer, synthetischer Rezeptoren begann mit der Entdeckung der Host-Guest-Komplexe, in denen Metall-Ionen durch Kronen-Ether gebunden wurden^{1,12} und der Synthese von grösseren Host-Molekülen, die in der Lage sind kleine Substrate (z.B. Harnstoffe) über die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken Bindungen zu komplexieren.¹³⁻¹⁵ Bereits diese relativ simplen Rezeptormoleküle zeigen eine hohe Selektivität gegenüber einzelnen Molekülen oder Ionen und können über die molekulare Erkennung bzw. die Bindung ihres Substrates für die Weiterleitung von Informationen genutzt werden. Ein eindrucksvolles Beispiel stellt der Kronenether in Abbildung 2 und dessen Einsatz in der medizinischen Diagnostik dar.¹⁶



der Allgemeinheit. Die Verwendung von Kronen-Ethern beschränkt sich allerdings auf die Selektion von Metall-Ionen, weshalb es nötig ist, fortlaufend neue Rezeptoren zu entwickeln, die auch komplexere Strukturen erkennen und binden.

Bei dem Design eines künstlichen Rezeptors muss zuerst berücksichtigt werden, dass der Rezeptor und sein Substrat über eine möglichst grosse Fläche in Kontakt treten. Dies ist der Fall, wenn der Rezeptor das Substrat weitestgehend bedeckt, um so eine möglichst grosse Anzahl an nicht-kovalenten Wechselwirkungen einzugehen und damit die molekulare Grösse, Form und Architektur des Substrates bestens erfasst.¹

Dies lässt sich durch den Aufbau von Bindungstaschen erreichen und findet sich z.B. in verschiedenen Container-Molekülen wie den Cyclodextrinen oder den Cucurbiturilen wieder, die allerdings nur einfache aromatische oder aliphatische Verbindungen als Substrate erkennen und binden.^{17,18} Sie stellen damit einen unspezifischeren Ausgangspunkt für eine selektive Selbst-Organisation dar, da sich in den Rezeptoren weniger Information speichern lässt.

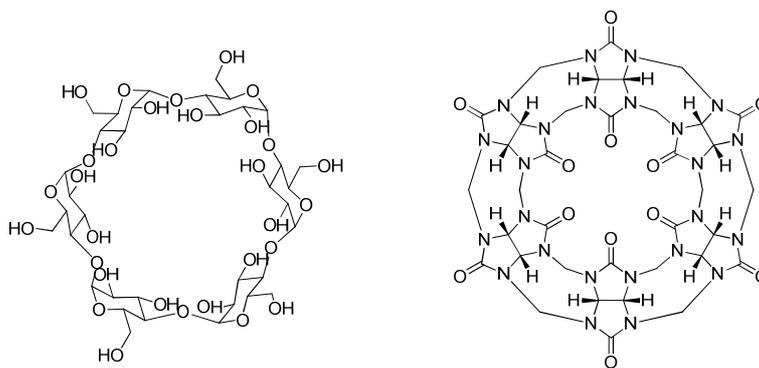


Abb. 3: α -Cyclodextrin und Cucurbituril als Beispiele für Container-Moleküle.

Dennoch besteht ein grosses Interesse an solchen Einschlussverbindungen, da sie durch die Bindung eines Gast-Moleküls kontrollierte Selbst-Organisationen ermöglichen und sich die geformten makromolekularen Einheiten auch gezielt wieder auflösen lassen^{9j}. Bislang werden diese nicht-kovalenten Wechselwirkungen meist über die Funktionalisierung von Blockcopolymeren in makromolekulare Einheiten integriert. Beispielsweise lässt sich die Amphiphilität von Polymeren beeinflussen, die aus zwei hydrophoben Blöcken bestehen und von denen ein Block über die gesamte Kettenlänge mit Cyclodextrinen funktionalisiert wurde.¹⁹ Durch die Bindung eines Gastmoleküls ändert sich die Polarität der Cyclodextrine und in Folge auch des gesamten Blockes, wodurch eine amphiphile Struktur entsteht, die für die Selbst-Organisation in Vesikel verantwortlich ist. Eine weitere Möglichkeit ergibt sich durch die Funktionalisierung der Kettenenden von Polymeren mit Container-Molekülen bzw. den entsprechenden Gast-Molekülen.²⁰ Auf diese Weise lassen sich Homopolymere, jeweils aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Block bestehend, herstellen, die erst durch die Host-Guest-Bindung ein supramolekulares Amphiphil bilden, welches dann einer

makromolekularen Selbst-Organisation zu Vesikeln unterliegt. Neben diesen Methoden, die Einschlussverbindungen für den Aufbau ihrer makromolekularen Strukturen nutzen, besteht auch noch die Möglichkeit Container-Moleküle selbst mittels kovalenter Konjugation mit einer hydrophoben, polymeren Einheit in eine amphiphile Verbindung zu überführen. Dadurch lassen sich amphiphile Strukturen aufbauen, deren hydrophile Kopfgruppe das Container-Molekül selbst darstellt.²¹ Die Selbst-Organisation in Vesikel erfolgt daher aus dem amphiphilen Charakter des Polymer-verknüpften Container-Moleküls, das sich in eine makromolekulare Form anordnet und ihre hydrophile Kopfgruppe dabei an der Oberfläche des Vesikels orientiert. Die nach aussen gerichteten Container-Moleküle können dadurch für Host-Guest-Bindungen genutzt werden, die eine Funktionalisierung des vorgeformten Vesikels ermöglichen und so etwa zur Immobilisierung der Partikel verwendet werden oder auch für eine nicht-kovalente Verknüpfung mit Vesikeln oder Kohlenhydraten.²²

Neben der Verwendung von polymeren Einheiten für den Aufbau von Vesikeln, gewinnen auch Peptide immer mehr an Bedeutung als Bausteine für makromolekulare Einheiten.²³ Auf Grund ihrer relativ einfachen Herstellung und der Diversität ihrer Strukturen, bieten sie eine ideale Plattform für die Entwicklung von Systemen, die zu spontaner Selbst-Organisation befähigt sind. Mit Verwendung von amphiphilen Peptiden, bestehend aus hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren, lassen sich Vesikel herstellen, die eine Vielzahl an weiteren Transformationen ermöglichen und sich durch Variation ihrer Seitenketten sehr einfach über externe Parameter beeinflussen lassen (z.B. Lösungsmittelveränderungen, pH-Wert, Temperatur).²⁴

Zusätzlich bieten Peptide die Fähigkeit Informationen auf molekularer Ebene zu speichern;^{23b} dies ist eine notwendige Voraussetzung für die molekulare Erkennung komplexerer Substrate und zeigt sich an n Rezeptoren, die für die Erkennung von einzelnen Di- und Tripeptiden entwickelt wurden.²⁵ Solche Rezeptoren besitzen komplexere Architekturen, wodurch sie in der Lage sind, eine grösserer Menge an Informationen zu speichern und eine sehr viel differenziertere molekulare Erkennung zeigen.

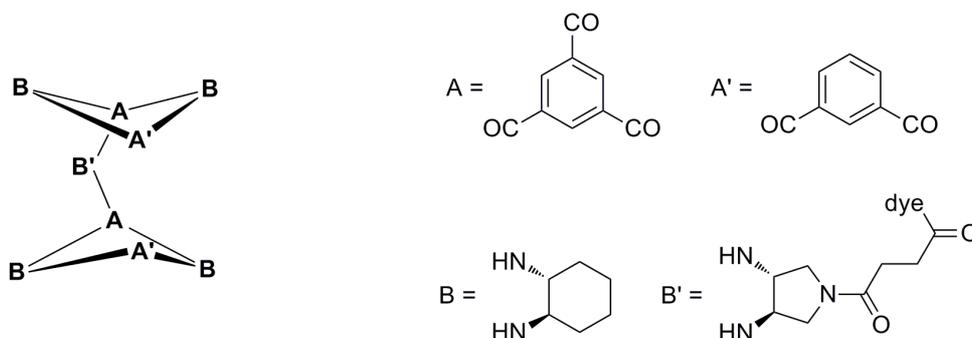


Abb. 4: Macropolycyclischer Rezeptor für die Bindung von Peptiden.²⁶

Ein Beispiel für solche Rezeptoren sind makropolyzyklische Verbindungen, deren Bindungstasche durch zwei Makrozyklen und einen zentralen, rigiden Linker aufgebaut ist, wodurch sich auch komplexere Substrate wie Peptide binden lassen (Abbildung 4). Die „zweiarmige“ Struktur solcher Rezeptoren erweist sich als ideal, um die richtige Balance zwischen einer gewissen Flexibilität und struktureller Fixierung zu finden, die für eine effektive Bindung von komplexeren Substraten benötigt wird.²⁶

Die Bindung des Substrates durch einen Rezeptor beruht auf den Informationen, die in seiner Struktur enthalten sind; das Ablesen dieses gespeicherten Inhalts kann auf der makroskopischen Ebene zu dem spontanen Prozess der Selbst-Organisation führen, wenn in dem Supermolekül Eigenschaften induziert werden, die zur Ausbildung von dreidimensionalen, makromolekularen Einheiten führen. Wie gezeigt, ergibt sich eine Möglichkeit durch die nicht-kovalente Verknüpfung von supramolekularen Partnern unterschiedlicher Löslichkeit.^{20a,b} Durch das Binden seines Substrates kann ein hydrophober Rezeptor seine Lösungseigenschaften soweit erweitern, dass in dem Supermolekül eine amphiphile Struktur entsteht, wenn die Substrat-Bindung stabil genug ist und das Substrat durch seine Grösse die hydrophoben Einflüsse aufwiegt.

In dieser Arbeit wird im ersten Teil gezeigt, wie sich eine hierarchische Selbstorganisation, ausgehend von einem peptidischen Rezeptor, über die Bindung seines pegylierten Substrats (ein Tripeptid) und dem daraus resultierenden, amphiphilen Supermolekül, zu der makroskopischen Struktur eines Vesikel ausweiten lässt (Kapitel 3). Mit der Selektion aus unterschiedlichen Substraten durch den Rezeptor, eröffnet sich erstmalig die Möglichkeit eine supramolekulare Einheit, wie sie ein Vesikel darstellt, durch den Informationsgehalt, der in einem einzigen Molekül gespeichert ist, aufzubauen. Entscheidend ist dabei der Prozess der molekularen Erkennung, aus dem sich erst eine höhere Selbst-Organisation entwickeln kann, die dadurch auch programmierbar und steuerbar gemacht wird.

3. Kompartiment-Bildung und Organokatalyse

Der Aufbau von supramolekularen Einheiten, die sich durch die spontane Selbst-Organisation von z.B. Phospholipiden oder amphiphilen Blockcopolymeren aufbauen lassen, führen in der Regel zu der Bildung von Kompartimenten, wie sie sich in Zellen oder Vesikeln wiederfinden. Die Kompartiment-Bildung stellt eines der grundlegenden Prinzipien in der Natur dar und befähigt die lebende Zelle zu ihren hoch komplexen und differenzierten Aufgaben.²⁷ Durch die Verankerung von Membranproteinen in den Doppelschichten der Zellwand können sehr spezifische Funktionen ausgelöst werden, die direkt an der Grenzschicht zwischen extra- und intrazellulärem Raum

vermitteln und damit z.B. Signaltransduktionen steuern, die sowohl bis in den Zellkern als auch nach aussen zu benachbarten Zellen geleitet werden können.

Entscheidend ist hierbei die Orientierung bzw. die Integration von reaktiven Gruppen an der Oberfläche der jeweiligen Kompartimente. Dies erlaubt es, zwischen den unterschiedlichen Bedingungen (Medium, Konzentration an Protonen, Ionen, etc.), die ausserhalb und innerhalb des Kompartimentes vorherrschen, zu vermitteln und auch kontrollierte mehrstufige Reaktionen auszulösen.²⁸ Die Selbst-Organisation von amphiphilen Molekülen in Doppelschichten oder Vesikeln stellt zwar einen gerichteten Prozess dar, dennoch mangelt es dabei an Selektionsmöglichkeiten. Um Strukturen höherer Ordnung und Funktionalität zu erreichen, müssen daher zusätzliche Kontrollinstanzen, wie die molekulare Erkennung, eingebaut werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird dieser Ansatz durch die Verwendung eines molekularen, hydrophoben Diketopiperazin-Rezeptors verfolgt, der durch die Bindung seines peptidischen Substrats neue Lösungseigenschaften entwickelt und dadurch zu selektiven Selbst-Organisationen höherer Ordnung befähigt wird. Eine weitere Möglichkeit bildet die Verwendung von amphiphilen Verbindungen, die von sich aus zur Selbst-Organisation befähigt sind und die bereits reaktive Gruppen in ihrer Architektur enthalten. Eine gerichtete Selbst-Organisation solcher Amphiphile führt durch das Arrangement der hydrophoben und hydrophilen Bestandteile zu der Lokalisation von kovalent verknüpften, reaktiven Einheiten an eben dieser Grenzfläche, so dass sich die reaktiven Zentren an der Oberfläche der gebildeten supramolekularen Einheiten integrieren lassen.

Dieser Strategie folgend, wird im zweiten Teil dieser Arbeit ein katalytisch aktives Tripeptid mit Hilfe einer Alkylierung soweit modifiziert, dass es eine amphiphile Struktur einnimmt und womit sich eine Selbst-Organisation der Moleküle erreichen lässt, so dass die katalysierte Reaktion in einem Zwei-Phasen-System erfolgt. Es wird gezeigt, dass eine derartige Kompartimentalisierung innerhalb des Reaktionsgemisches zu höheren Enantioselektivitäten führt, als sie in homogenen Systemen zu erreichen sind.

B Spezieller Teil I: Amphiphile Rezeptor-Ligand-Systeme

1. Zweiarmlige Peptid-Rezeptoren

Für die Entwicklung eines Systems, das es ermöglicht eine makromolekulare Einheit auf der Basis von selektiven nicht-kovalenten Wechselwirkungen aufzubauen, werden synthetische Rezeptoren benötigt die eine äusserst selektive und stabile intramolekulare Bindung zu ihrem Liganden ausbilden. Für eine derartige Bindung muss das Rezeptormolekül in der Lage sein, eine Bindungstasche zu bilden, die durch ihre Architektur genügend Bindungsstellen vereint, um den Liganden mit ausreichender Selektivität zu erfassen.¹ „Zweiarmlige“ Rezeptoren, die aus einem zentralen, starren Grundgerüst bestehen, das seitliche Peptid-Ketten trägt, bilden ausgezeichnete Voraussetzungen für derartige Bindungen, da sie eine hohe Diversität ermöglichen und die richtige Balance aus Präorganisation und struktureller Flexibilität finden.^{25,26} Die Verwendung von Peptid-Bausteinen in den Seitenketten eröffnet darüber hinaus, die Möglichkeit auch komplexe Substrate wie z.B. Di- oder Tripeptide zu binden.²⁹⁻³¹

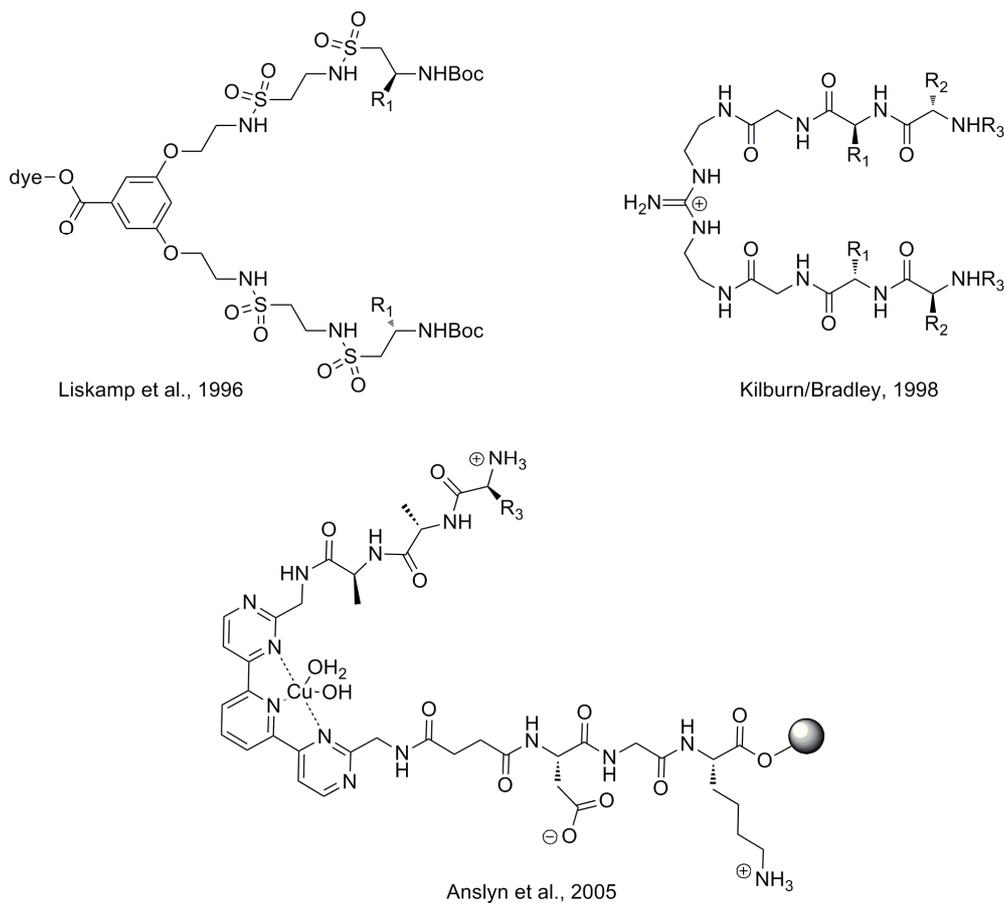


Abb. 5: Beispiele für zweiarmlige Peptid-Rezeptoren (dye = Dispers Rot 1).²⁹⁻³¹

Die Selektivität der Bindung basiert dabei auf dem Design des Rezeptors und lässt sich am besten mit kombinatorischen Ansätzen erfassen und entwickeln.³²

2. Diketopiperazin-Rezeptoren

Auf Grund der Vielzahl verschiedener Freiheitsgrade von relativ einfachen Di- und Tripeptiden ist die rationale Entwicklung von Rezeptoren für spezifische Peptidsequenzen äusserst schwierig.³² Die Verwendung kombinatorischer Methoden eröffnet allerdings relativ einfache Möglichkeiten, um passende Substrate für einen gegebenen Rezeptortyp zu identifizieren.^{26,30,31}

In unserer Gruppe wurden synthetische, zweiarmige Diketopiperazin-Rezeptoren entwickelt, die auf einem starren Diketopiperazin aus funktionalisiertem Prolin basieren und zwei seitliche Ketten aus Aminosäuren tragen, die sowohl Diversität als auch Bindungsmöglichkeiten für die selektive Bindung von komplexen Substraten, wie sie durch Tripeptide gegeben sind, bereitstellen.³³ Die Diketopiperazin-Rezeptoren vereinen in ihrer Architektur sämtliche Voraussetzungen, die für eine effiziente Rezeptor-Ligand-Bindung benötigt werden.³⁴

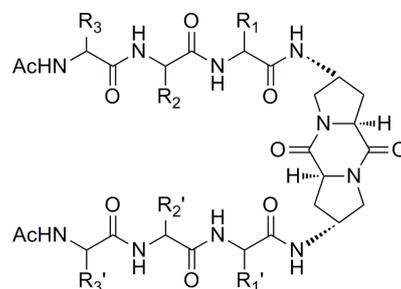


Abb. 6: Zweiarmige Diketopiperazin-Rezeptoren.³³

Die Diketopiperazin-Rezeptoren bilden durch das starre Grundgerüst mit den seitlichen Ketten aus Aminosäuren eine Bindungstasche, die es ermöglicht Tripeptide zu binden. Durch Bindungsstudien, in denen verschiedene Rezeptor-Prototypen gegen eine Bibliothek aus Tripeptiden, die an fester Phase gebunden waren und aus maximal $29^3 = 24389$ acetylierten Tripeptiden bestand, konnten einzelne Mitglieder identifiziert werden, die eine hohe Affinität zu den jeweiligen Rezeptoren aufweisen.^{33c} Die Struktur der seitlichen Rezeptorarme, die durch die Aminosäuresequenz bestimmt wird, eröffnet darüber hinaus die Fähigkeit zur selektiven Ausbildung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen (z. B. Wasserstoffbrücken, ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen), so dass sich auch eine Selektion der peptidischen Substrate erreichen lässt. Ein Beispiel für ein solch hoch

spezifisches Host-Guest-System, stellt der Diketopiperazin-Rezeptor **1** und das Tripeptid Ac-D-Val-D-Val-D-His-NH(CH₂)₅-NH-PS (**2a**) dar (Abb. 7).

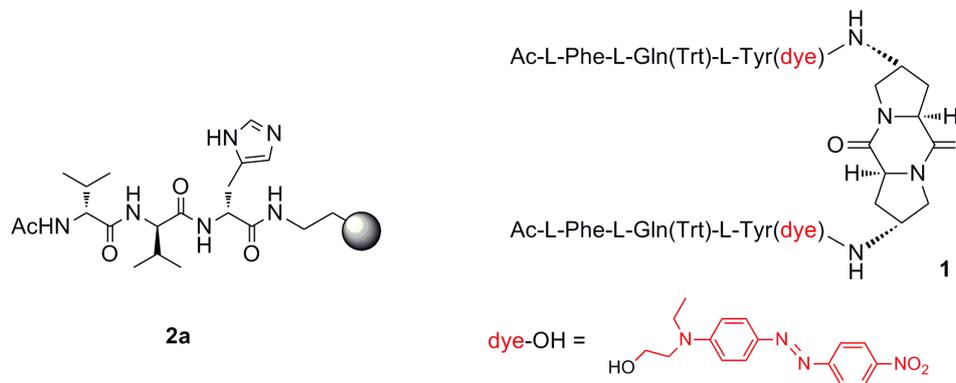


Abb. 7: Host-Guest-System aus Diketopiperazin-Rezeptor **1** und dem Peptid **2a** an fester Phase.

Dieses Rezeptor-Ligand-System zeichnet sich gegenüber den anderen untersuchten Rezeptor-Prototypen durch eine besonders hohe Bindungsspezifität aus und besitzt ausserdem eine hohe Bindungsaffinität von $\Delta G = -4.3$ kcal/mol zu dem identifiziertem Peptid **2a**.^{33c}

Die weitere Evaluation der Bindungseigenschaften des Rezeptors **1** benötigte eine lösliche Form des Peptides (**2a**). Auf Grund der schlechten Löslichkeit des Tripeptids Ac-D-Val-D-Val-D-His-NH₂ in CHCl₃, dem Lösungsmittel in dem die Bindungsstudien erfolgten, wurde versucht, die Löslichkeit durch eine Konjugation mit Polyethylenglykol (PEG) zu verbessern.³⁵ Die Einführung von PEG-Ketten an das C-terminale Ende von Peptiden lässt sich durch eigens entwickelte Polystyrolharze (TentaGel[®] PAP-NH₂) realisieren und kann mit PEG-Ketten von unterschiedlichem Molekulargewicht erfolgen.^{35d}

3. Selbst-Organisation des Diketopiperazin-Rezeptors **1** mit pegylierten Peptiden

3.1 Bildung eines Organogels und von Vesikeln

Erste Studien von M. Conza und J. Grun zeigten, dass sich mit der Einführung von PEG-Ketten die Löslichkeit des Peptides Ac-D-Val-D-Val-D-His-NH₂ deutlich verbessern lässt.^{36,37} Dafür wurde das Peptid mit PEG-Einheiten funktionalisiert, die ein Molekulargewicht von 850 g*^{mol}⁻¹ bzw. 3200 g*^{mol}⁻¹ besitzen. Die hergestellten Peptid-PEG-Konjugate **2b** und **2c** wurden anschliessend auf ihre Bindungseigenschaften zu dem Rezeptor **1** in Lösung untersucht und die gewonnenen Erkenntnisse werden hier kurz zusammengefasst.

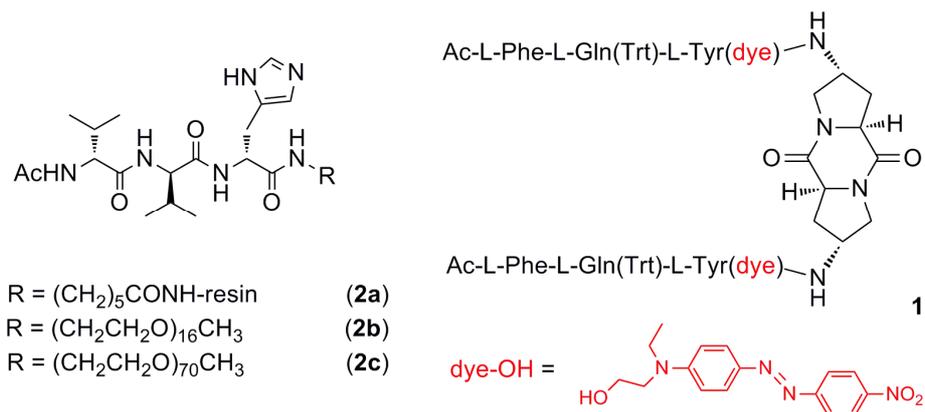


Abb. 8: Diketopiperazin-Rezeptor **1** mit den jeweiligen Peptid-Derivaten **2a-c**.

Der Diketopiperazin-Rezeptor **1** zeigte in diesen Studien ein äusserst interessantes Verhalten sobald er mit den pegylierten Peptiden **2b** bzw. **2c** zusammengebracht wurde:

Bei der Verwendung von unpolaren, aprotischen Lösungsmitteln wie CHCl_3 wurde in Folge des Mischens beider Komponenten **1** und **2b** ($c_1 = 0.5 \text{ mM}$, $c_{2b} = 0.25 - 5.0 \text{ mM}$) die Ausbildung eines Organogels beobachtet.³⁶ Bemerkenswerterweise erfolgte die Anordnung in einem makromolekularen Netzwerk ausschliesslich durch das Mischen von Rezeptor **1** mit dem komplementären Peptid **2b** oder **2c**. Weder der Rezeptor **1** noch die pegylierten Peptide **2b** bzw. **2c** waren für sich alleine genommen, in der Lage eine geordnete Struktur auszubilden. Auch die Kombination aus **1** mit pegylierten Peptiden, die in den Festphasen-Bindungsstudien keinerlei Affinität zeigten (z.B. $\text{Ac-D-Val-D-Val-Gly-PEG}_{750}$, $\text{Ac-Lys-Lys-Lys-PEG}_{750}$) führten nicht zu makromolekularen Strukturen wie sie durch das Organogel erkennbar wurden.³⁶ Entscheidend für die Gelbildung ist die Kombination mit der entsprechenden Peptidsequenz, so dass die Ausbildung des Host-Guest Paares eine unmittelbare makromolekulare Ausrichtung und Vernetzung der Moleküle zur Folge hat, die auf der molekularen Erkennung von Rezeptor **1** und pegyliertem Liganden **2b** bzw. **2c** beruht.

Die gewonnenen Erkenntnisse führten zu der Frage, ob eine derartige intermolekulare Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand mit anschliessender makromolekularer Anordnung auch in wässriger Umgebung erfolgen kann. Dafür wurde der Rezeptor in THF gelöst ($c = 0.3 \text{ mM}$) und mit einer wässrigen Lösung des Peptids ($c = 2 \text{ mM}$) verdünnt.³⁷ Daraufhin bildete sich spontan eine kolloidale Lösung, die an Hand der homogenen Verteilung des rot-gefärbten und hydrophoben Rezeptors (**1**) in der wässrigen Umgebung ersichtlich wurde und die Ausbildung von makromolekularen Aggregaten andeutete.

Die kolloidale Lösung wurde durch eine Kombination aus DLS-, TEM- und AFM-Untersuchungen charakterisiert, so dass die entstandenen Partikel eindeutig als Vesikel klassifiziert werden konnten.³⁷ Die DLS-Messungen zeigten die spontane Ausbildung von Partikeln durch den Rezeptor **1** und die

pegylierten Peptide **2b** bzw. **2c**. Dabei konnte für die Selbst-Organisation von Rezeptor **1** mit **2b** oder **2c** ein hydrodynamischer Radius von 50 nm bzw. 100 nm ermittelt werden. Die Zunahme des Radius lässt sich auf eine erhöhte Flächenausbreitung der PEG-Kette zurückführen, wodurch eine schwächere Krümmung der Partikeloberfläche entsteht und der Radius sich vergrößert.³⁸ Um im Weiteren die Natur und Morphologie der Aggregate zu untersuchen wurden mikroskopische Methoden herangezogen.

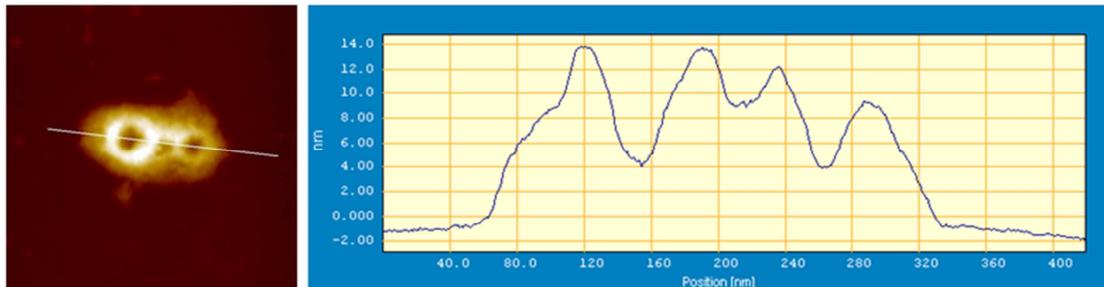


Abb. 9: AFM-Aufnahme mit entsprechendem Oberflächenprofil.³⁷

Die Aufnahmen des Atomic Force Mikroskops (AFM) sind in Abbildung 9 dargestellt. Sie zeigen für die Selbst-Organisation aus **1** und **2b** die Ausbildung von sphärischen Partikeln mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 100 nm, wohingegen das Oberflächenprofil eine Höhenausdehnung von 10 nm aufweist.³⁷ Die im AFM-Bild beobachtete ringförmige Struktur der supramolekularen Aggregate ist typisch für Vesikel.³⁹ Eine zusätzlich durchgeführte TEM-Analyse der Partikel aus **1** und **2b** bzw. **2c** stützten sowohl die gefundenen Grössenverteilungen als auch die Morphologie der Vesikel (Abb. 10).³⁷

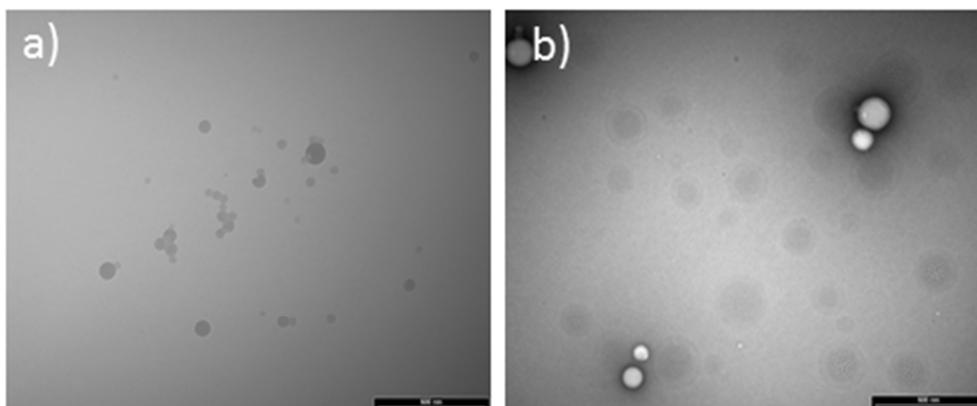


Abb. 10: a) TEM Bild der Vesikel aus **1·2b**; b) TEM Bild der Vesikel aus **1·2c** (Massstab 500 nm).³⁷

Dabei bleibt zu betonen, dass keines der durchgeführten Kontrollexperimente mit pegylierten Peptiden, deren Sequenz in den Bindungsstudien keinerlei Affinität zu Rezeptor **1** aufwies (z.B. Ac-D-Val-D-Val-Gly-PEG₁₆ bzw. Ac-Lys-Lys-Lys-PEG₁₆), zu makroskopischen Strukturen führte, wenn sie mit Rezeptor **1** gemischt wurden. Auch die Komponenten für sich alleine genommen führten nicht zur Ausbildung von geordneten makromolekularen Strukturen.

Daraus lässt sich folgern, dass erst durch die Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes die notwendige amphiphile Struktur entsteht, welche für die spontane Selbst-Organisation des Komplexes in eine Doppelschicht, respektive die Vesikel-Wand, entscheidend ist.

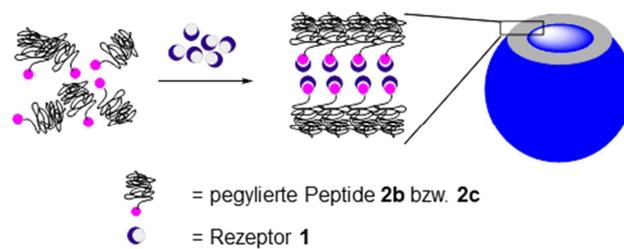


Abb. 11: Vorgeschlagenes Modell für die Selbst-Organisation von Rezeptor **1** mit den Peptiden **2b** und **2c**.

Eine mögliche Anordnung der Moleküle könnte dabei ein Abschirmen der hydrophoben Rezeptor-Struktur durch die pegylierten Peptide im Inneren der Doppelschicht bedeuten, während die wasserlöslichen PEG-Einheiten die Grenzfläche zum wässrigen Medium innerhalb und ausserhalb des Vesikels bilden (Abbildung 11).

3.2 Zielvorgaben und Aufgabenstellung

Die vorangegangenen Arbeiten von M. Conza und J. Grun zeigten eine hoch selektive Selbst-Organisation für den Rezeptor **1** in Gegenwart der pegylierten Peptide **2b** und **2c**. Die Ausbildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes hatte in Wasser die Selbst-Organisation der Komponenten in Vesikel zur Folge. Dies führte zu der Hypothese, dass durch die nicht-kovalente Bindung zwischen dem hydrophoben Rezeptor **1** und dem hydrophilen Peptid-PEG-Konjugat **2b** bzw. **2c** eine amphiphile Struktur entsteht, die es ermöglicht, eine selektive Selbst-Organisation auf der Basis von molekularer Erkennung zu vollziehen. Dem Modell aus Abb. 11 entsprechend bildet die PEG-Kette die Grenzfläche zu der wässrigen Umgebung, während der hydrophobe Rezeptor im Inneren der Vesikel-Membran vom wässrigen Milieu abgeschirmt wird.

Um diese These zu überprüfen, beschlossen wir, ein Peptid-PEG-Konjugat zu entwerfen, das an beiden Kettenenden funktionelle Gruppen trägt.

Unter der Voraussetzung, dass das System diese zusätzliche Funktionalisierung toleriert und die Selbst-Organisation in Vesikel nicht beeinträchtigt wird, würde ein solches Design tiefere Einblicke in die Zusammensetzung der Selbst-Organisation aus Rezeptor und pegyliertem Ligand eröffnen.

Die Einführung einer zusätzlichen funktionellen Einheit neben dem Tripeptid und der PEG-Kette erlaubt es ausserdem nachträgliche Modifizierungen in dem Rezeptor-Ligand-System zu etablieren, die anschliessend durch eine erfolgreiche Selbst-Organisation des Systems an der Oberfläche der Vesikel verankert werden (Abbildung 12).

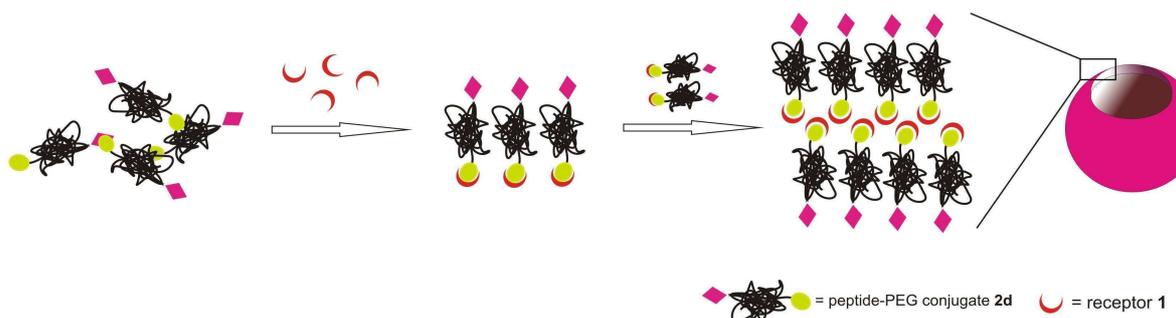


Abb. 12: Vorgeschlagenes Modell für die Selbst-Organisation eines funktionalisierten Rezeptor-Ligand-Systems.

Die Einführung bzw. Verankerung von funktionellen Gruppen an der Oberfläche eines Vesikels stellt dabei eine überaus wichtige Funktionalisierung dar, da sich damit verschiedene Anwendungsmöglichkeiten für Vesikel, wie der Transport von Wirkstoffen⁴⁰ oder als Nanoreaktoren und Sensoren⁴¹ entwickeln lassen.

3.3 Design eines funktionalisierten Rezeptor-Ligand-Systems

Das von uns entworfene Design für ein Peptid-PEG-Konjugat beruht auf einem zweifach-funktionalisierten PEG-Linker. Da es eine Synthese an fester Phase ermöglichen sollte, wählten wir ein Fmoc-geschütztes PEG-Derivat mit einer zusätzlichen Säurefunktion und einem Molekulargewicht von $750 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, welches einer Kettenlänge von elf Polyethylen-Einheiten entspricht und damit eine vergleichbare Länge zu dem Peptid-PEG-Konjugat **2b** besitzt. Um die Tolerierbarkeit von zusätzlichen funktionellen Gruppen in dem Rezeptor-Ligand-System zu untersuchen, sollte der Fluoreszenzfarbstoff Carboxyrhodamin 110 (Rhd) über die γ -Aminofunktion des Lysins eingeführt werden (Abbildung 13).

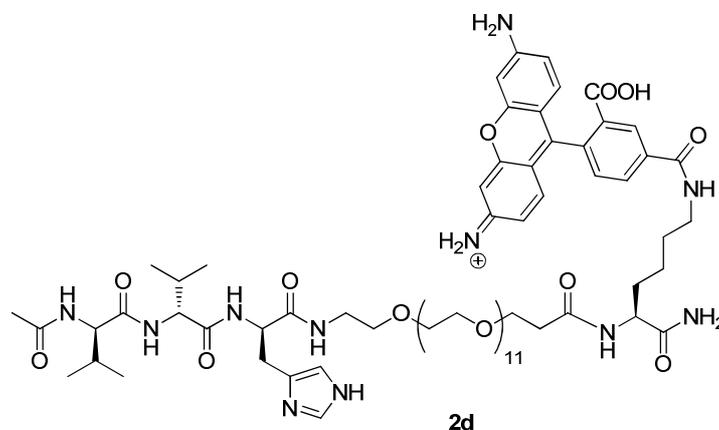


Abb. 13: Entworfenes Design für ein Fluoreszenz-markiertes Peptid-PEG-Konjugat (**2d**).

Die Synthese an fester Phase benötigt eine orthogonale Schutzgruppe für die γ -Aminofunktion des Lysins, so dass Fmoc-Lys(Alloc)-OH als Verknüpfungsstelle verwendet wird, die über den C-Terminus des PEG-Linkers eingefügt wird, während das Tripeptid Ac-D-Val-D-Val-D-His-NH₂ über den N-Terminus aufgebaut wird. So kann in einem letzten Schritt vor der Abspaltung des Peptides vom Harz der Fluoreszenzfarbstoff eingefügt werden. Auf diese Weise lassen sich sehr einfach funktionalisierte Peptid-PEG-Konjugate herstellen, die eine zusätzliche Modifizierung des Liganden und damit auch des Rezeptor-Ligand-Komplexes ermöglichen.

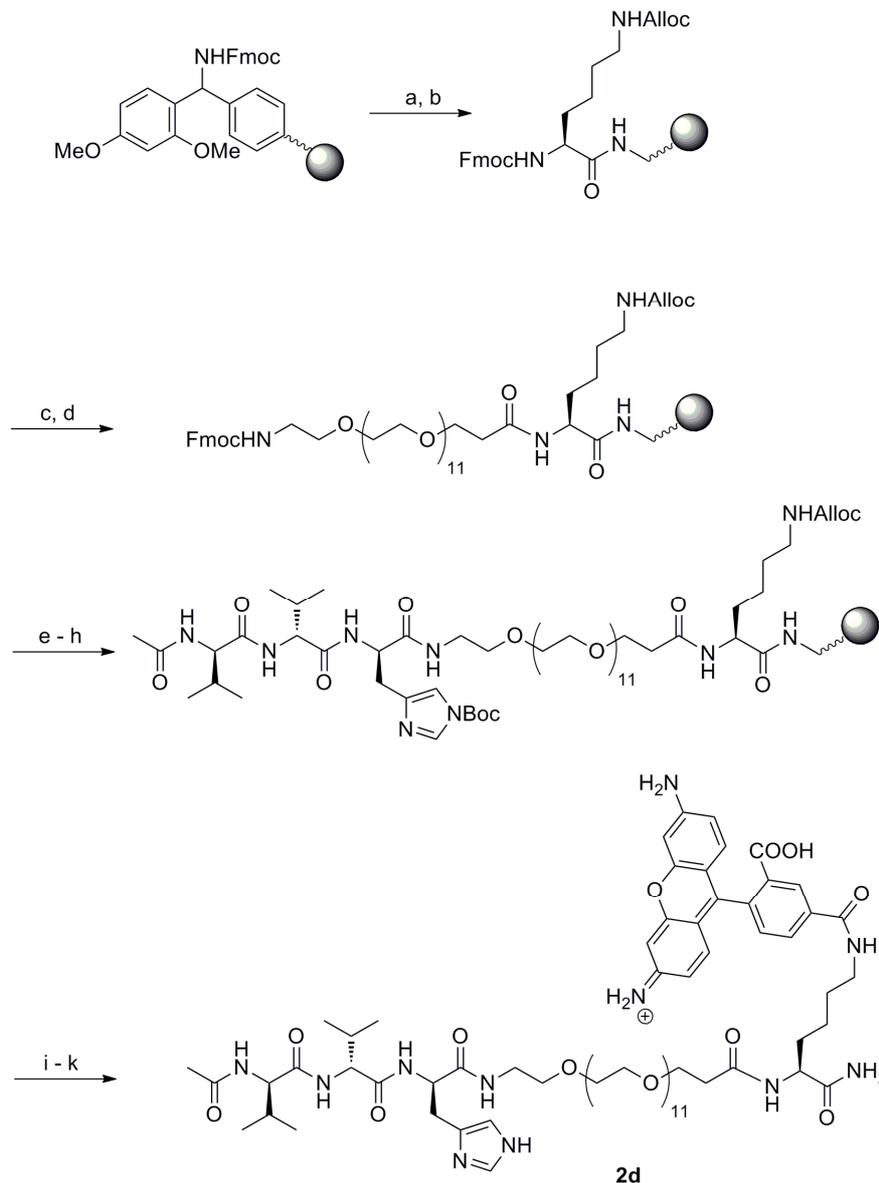
Ein entsprechendes Modell für eine derartige Selbst-Organisation von funktionalisierten Peptid-PEG-Konjugaten in Gegenwart des Rezeptors **1** ist in Abbildung 12 dargestellt.

In diesem Modell führt die Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes aus **1** und **2d** zu einer amphiphilen Struktur, die verknüpft über nicht-kovalente Wechselwirkungen eine Selbst-Organisation ihrer Komponenten in ein Vesikel zur Folge hat.

3.4 Synthese der Komponenten

3.4.1 Synthese des funktionalisierten Peptid-PEG-Konjugats (2d)

Die entworfene Synthese, basierend auf einem orthogonal geschützten Lysin-Baustein und einem bifunktionalen PEG-Linker ermöglicht eine lineare Synthese an fester Phase. Die gewünschte Carboxamid-Form des Peptids führte zur Wahl des Rinkamid-Linkers.



Schema 1. Synthese des pegylierten Peptids **2d**: a) Pip/DMF (1:4); b) Fmoc-Lys-(Alloc)-OH, DIC, HOBT, CH₂Cl₂; c) Pip/DMF (1:4); d) Fmoc-PEG-OH, HATU, *i*Pr₂NEt, DMF; e) Pip/DMF (1:4); f) Fmoc-AS-OH, HATU, *i*Pr₂NEt, DMF; g) Wiederholung von e), f) und e); h) Ac₂O, *i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂; i) Pd(PPh₃)₄, NMM, AcOH, CH₂Cl₂; j) Rhd110, DIC, HOBT, CH₂Cl₂; k) HBF₄, TFA, CH₂Cl₂.

Für die Synthese des pegylierten Peptids wurde das Rinkamid MBHA Harz, bestehend aus 4-Methylbenzhydrylamin (100-200 mesh, 1% DVB) Polystyrol mit einem Norleucin- und einem modifizierten Rinkamid-Linker, verwendet. Als erste Aminosäure wurde Fmoc-geschütztes Lysin verwendet, dessen γ -Aminofunktion die orthogonale Alloc-Schutzgruppe trägt und so eine nachträgliche Funktionalisierung des pegylierten Peptids ermöglicht.

Die Einführung des Fmoc- geschützten bifunktionalem PEG-Linkers erfolgte nach intensiver Studie über verschiedene Aktivierungsreagenzien zu der letztendlich effizientesten Methode, die eine Aktivierung der Säurefunktion mit *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU) und Hünigs Base darstellte und einen Überschuss der Base verwendete.

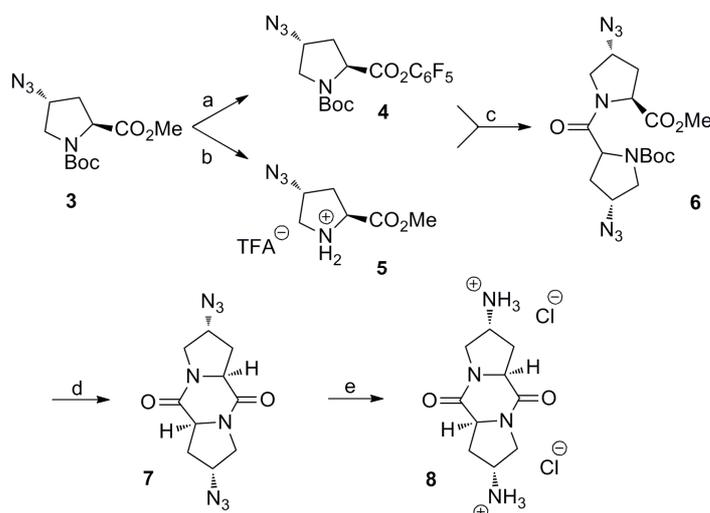
Nach anschliessender Fmoc-Abspaltung konnten die verbleibenden Aminosäuren gemäss Standardprotokollen für die Peptid-Synthese an fester Phase mit HATU als Aktivierungsreagenz gekuppelt werden. Eine finale Fmoc-Abspaltung und Acetylierung lieferte das pegylierte Tripeptid an fester Phase. Entfernen der Alloc-Schutzgruppe mittels Pd-Katalyse und *N*-Methylmorpholin (NMM) und Essigsäure lieferte das freie Amin, welches mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Carboxyrodamin 110 unter Verwendung von DIC, HOBt gekuppelt wurde. Die Behandlung des Harzes mit HBF_4 in TFA führte zur Abspaltung des Peptids vom Harz bei gleichzeitiger Entfernung der restlichen Schutzgruppen.

Das so gewonnene Peptid besitzt die zur molekularen Erkennung notwendige Ac-D-Val-D-Val-D-His-Sequenz und eine zusätzliche funktionelle Einheit, in Form des Fluoreszenzfarbstoffs, welche über eine PEG-Kette miteinander verknüpft sind. Durch Einführung des PEG-Linkers wurde das Löslichkeitsverhalten des Peptids soweit geändert, dass sowohl in organischen als auch in wässrigen Medien eine sehr gute Löslichkeit erreicht werden konnte und es nun ermöglichte die selektiven nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen dem Rezeptor und dem pegylierten Peptid-PEG-Konjugats zu untersuchen

3.4.2 Synthese des Diketopiperazin-Rezeptors (1)

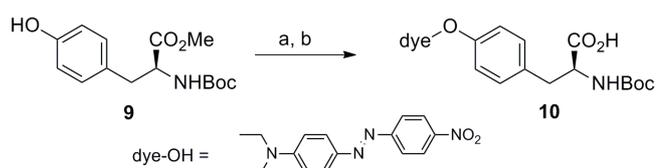
Die Synthese des Diketopiperazin-Rezeptors **1** wurde bereits publiziert und erfolgte in dieser Arbeit nach den entsprechenden Vorschriften.^{33c} Die Synthese beginnt mit dem *N*-Boc-*trans*-Azido-L-Prolin-Methylester **3**, der direkt aus kommerziell erhältlichem *N*-Boc-4-*cys*-Hydroxyprolin-Methylester durch eine $\text{S}_{\text{N}}2$ -Substitution mit NaN_3 aus dem entsprechenden Mesylat hergestellt wurde. Ein Teil des *N*-Boc-*trans*-Azido-L-Prolin-Methylester wurde anschliessend hydrolysiert und in seinen Pentafluorphenol(Pfp)-Ester (**4**) überführt, während mit dem anderen Teil das entsprechende

Trifluoroacetat(TFA)-Salz **5** gebildet wurde. Das Mischen von **4** und **5** mit Hünigs Base liefert den Vorläufer (**6**) für den Ringschluss. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe durch TFA und Zugabe von Hünigs Base führt zu dem Diketopiperazin **7**. Durch Reduktion der Azidgruppen mit Palladium auf Aktivkohle in Gegenwart von HCl wird das stabile mit Aminen funktionalisierte Diketopiperazin als Salz (**8**) gewonnen (Schema 2).



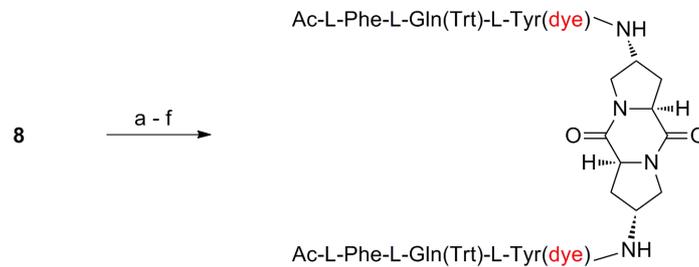
Schema 2. Synthese des Diketopiperazin-Gerüsts **8**: a) i) NaOH, MeOH, THF, H₂O; ii) C₆F₅OH, EDC, CH₂Cl₂, 47%; b) TFA, CH₂Cl₂, 77%; c) *i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂, 66%; d) i) TFA, CH₂Cl₂; ii) *i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂, 51%; e) 10% Pd/C, H₂, MeOH, HCl, 54%.

Der für die Bindungsstudien benötigte rote Azofarbstoff Dispers Rot 1 wurde mittels einer Mitsunobu-Reaktion an die phenolische Hydroxygruppe von *N*-Boc-L-Tyrosin-Methylester gekuppelt und eine anschließende alkalische Esterhydrolyse macht das Farbstoff-markierte Tyrosin Derivat **9** zugänglich.



Schema 3. Synthese von *N*-Boc-L-Tyr(dye)-OH: a) Disperse Rot 1, PPH₃, DEAD, Toluol, 21%; b) NaOH, MeOH, THF, H₂O, 95%.

Für den Aufbau der seitlichen Arme des Diketopiperazin-Rezeptors (**1**) wurde das HCl-Salz **8** durch Zugabe von Hünigs Base neutralisiert und das gewonnene Diamin konnte durch Aktivierung mit HATU und Hünigs Base mit dem Farbstoff-markierten *N*-Boc-L-Tyrosin Derivat (**10**) gekuppelt werden.



Schema 4. Synthese des Diketopiperazin-Rezeptors **1**: a) *i*Pr₂NEt, HATU, **10**, CH₂Cl₂, DMF, 66%; b) HCl, MeOH, Dioxan, quant; c) *i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂, *N*- α -Fmoc-AS, EDC; d) TAEA, CH₂Cl₂; e) Wiederholung von c) und d); f) Ac₂O, NEt₃.

Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit HCl wurden die verbleibenden Aminosäuren, gemäss einem Standardkupplungsprotokoll von *N*- α -Fmoc-geschützten Aminosäuren⁴² mit dem Kupplungsreagenz 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid (EDC) und Tris(2-aminoethyl)amin (TAEA) als Fmoc-Abspaltungsreagenz, gekuppelt. Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Triethylamin nach der letzten Fmoc-Abspaltung liefert den Diketopiperazin-Rezeptor **1**.

3.5 Untersuchungen zur Selbst-Organisation des funktionalisierten Rezeptor-Ligand-Systems

3.5.1 Spektroskopische Methoden zur Analyse der supramolekularen Aggregate: Grundlagen

Wenn Moleküle in Lösung vorliegen, zeigen sie unregelmässige, vibrierende Bewegungen. Ursache dafür ist die Wärmebewegung von Teilchen; ein in einem Lösungsmittel befindliches Teilchen erhält aus allen Raumrichtungen Kraftstösse von den umliegenden und sich bewegenden Lösungsmittelmolekülen, die sich nicht vollständig gegenseitig aufheben. Daher gerät das Teilchen in eine unregelmässige Bewegung, die abhängig von der Grösse des Teilchen ist.⁴⁵

Die durch diese Bewegung zustande kommende Lageänderung, wird auch Diffusion genannt. Auch wenn dieser Begriff nur für gewöhnliche Lösungen gedacht ist, ist es jedoch mit der Thermodynamik auch möglich, dieses Prinzip auf suspendierte Partikel anzuwenden.⁴⁴ Dies liegt an der thermodynamischen Betrachtungsweise, die prinzipiell keinen Unterschied zwischen gelösten und suspendierten Teilchen vollzieht.

Wird ein monochromatischer Lichtstrahl durch die Lösung aus suspendierten Teilchen geleitet, wird dieser durch die sich bewegenden Partikel gestreut. Im Falle eines Fluorophors lässt sich dabei Fluoreszenz-Emission nachweisen. Durch die zufällige Bewegung der Partikel unterliegt die Frequenz des gestreuten Lichtes bzw. die Fluoreszenz-Emission konstruktiven und destruktiven Interferenzen. Diese entstehen wenn derselbe Partikel das Licht von unterschiedlichen Standorten aus streut (bzw. Fluoreszenz-Emission abgibt), die er in zeitlicher Abfolge einnimmt und verursacht dabei Fluktuationen in der Intensität des gestreuten Lichtes (Doppler-Effekt) bzw. der Fluoreszenz-Emission (Abbildung 14).⁴⁴

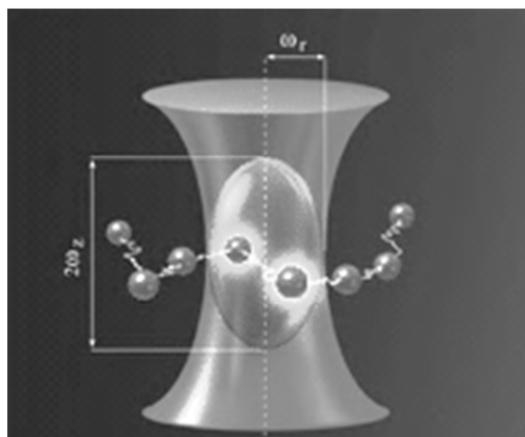


Abb. 14: Schematische Darstellung eines durch Licht angeregten Volumenelements.⁴⁵

Betrachtet man ein Volumenelement der Lösung, das durch den Lichtstrahl angeregt wird und ein Teilchen das dieses Element passiert, wird der Partikel solange gestreutes Licht abgeben (oder Fluoreszenz-Emission) bis er das Volumenelement wieder verlässt. Diese charakteristische

Durchlaufzeit, die der Partikel für den Weg durch das Volumenelement benötigt, findet sich in seinem entsprechenden Anteil an dem Fluktuationsspektrum wieder, das über einen Detektor gemessen werden kann. Dieser Anteil, den einzelne Partikel zu den Fluktuationen beitragen, lässt sich über die mathematische Bestimmung der Autokorrelationsfunktion berechnen.^{46,47} Die Autokorrelation kann dabei unter sehr geringen Änderungen der Intensität des Fluktuationsspektrums differenzieren, benötigt aber im Allgemeinen die Aufnahme einer Vielzahl an einzelnen Diffusionsprozessen, die über einen im Vergleich zu den Diffusionszeiten von Partikeln (μs -ms) sehr langen Zeitraum gemittelt werden ($>100\text{s}$).

3.5.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Bei der Analyse der Fluktuationsspektren über die Dynamische Lichtstreuung (DLS) werden die zeitabhängigen Fluktuationen des Streulichts einer kolloidalen Probe gemessen und simultan mittels einem externen Correlator in ihre Fourier-transformierte Form, die Autokorrelationsfunktion $G(t)$ überführt. Die Autokorrelation ermöglicht es, den hydrodynamischen Radius der Partikel einer Probe zu ermitteln. Die normalisierte Korrelationsfunktion ist gegeben durch:

$$G(t) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (1)$$

dabei ist $I(t)$ die Intensität des Streulichts zu einer gegebenen Zeit t und die eckigen Klammern bezeichnen einen Mittelwert über gesamt t .

Die Korrelationsfunktion ist damit abhängig von der zeitlichen Verzögerung τ , d.h. von dem Betrag um den ein identisches Intensitätssignal verschoben ist bevor die Mittelung durchgeführt wird.

3.5.3 Analyse der Selbst-Organisation des Diketopiperazin-Rezeptors **1** in Gegenwart des pegylierten Peptides (**2d**) durch Dynamische Lichtstreuung

Um die Bindungseigenschaften zwischen dem Rezeptor **1** und dem pegylierten Peptid **2d** in Wasser zu untersuchen, wurde **1** in THF gelöst (300 μM), mit einer wässrigen Lösung aus **2d** (600 μM) in einem stöchiometrischen Verhältnis gemischt und mit Wasser bis auf eine Endkonzentration von 30 μM verdünnt. Dabei wurde versucht, Verunreinigungen der Probe mit Staubpartikeln zu vermeiden, indem unter einer möglichst staubfreien Atmosphäre gearbeitet wurde und nur Wasser verwendet wurde, das zuvor über einen Membranfilter (1 μm) gefiltert wurde.

Die Lösung aus dem Diketopiperazin Rezeptor **1** und dem pegyliertem Peptid **2d** in Wasser zeigte bereits beim Mischen deutliche Zeichen für das Auftreten von makromolekularen Partikeln, die durch eine selektive Bindung zwischen Rezeptor und Ligand entstanden sind. Die gebildeten kolloidalen Partikel werden dabei durch nicht-kovalente Wechselwirkungen stabilisiert und konnten anschliessend mittels DLS-Analysen untersucht werden.

Um eine erste Aussage über die in der Lösung enthaltenen Partikel zu treffen, wurde die Lösung in eine Messküvette (1200 μl) überführt und die Streulichtintensität untersucht. Die Messung wurde bei einem Winkel von 90° zu dem einfallenden Licht und über einen Messzeitraum von 120 s aufgenommen. Die ermittelte Autokorrelationsfunktion ist in Abbildung 15 dargestellt.

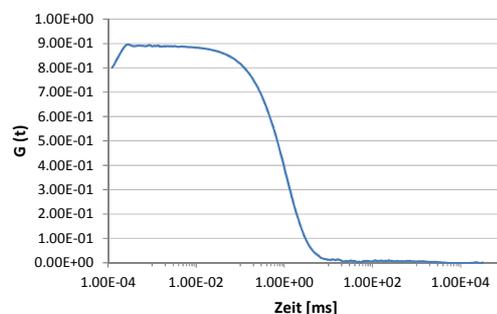


Abb. 15: Autokorrelationsfunktion der Lösung aus Rezeptor **1** und Peptid-PEG-Konjugat **2d**.

Für die anschliessende Bestimmung der Diffusionskoeffizienten, muss zuerst die Polydispersität der Lösung betrachtet werden. Die Polydispersität beschreibt die Zusammensetzung einer kolloidalen Probe aus Partikeln mit unterschiedlicher Grössenverteilung. Diese kann grob in drei Kategorien unterteilt werden: als monodispers bezeichnet man eine Probe mit einer Polydispersität von 20% oder weniger. Eine Polydispersität von 20-30% wird als mittlerer Wert betrachtet und Polydispersitäten grösser 30% werden als sehr uneinheitlich angesehen.⁴⁸

Im Falle einer monodispersen Probe reicht es aus, wiederholt durchgeführte Messungen bei einem Streuwinkel von 90° zu ermitteln und die erhaltenen Autokorrelationskurven über einen einfachen exponentiellen Abfall zu analysieren.⁴⁶

$$G^{(2)}(t) = B + \beta \exp(-2\Gamma \tau) \quad (2)$$

wobei B die Basislinie der Korrelationsfunktion bei der Zeit Unendlich bezeichnet, β steht für die Amplitude der Korrelationsfunktion zur Zeit Null und Γ für den exponentiellen Abfall.

Die DLS-Software (ALV-Correlator Software, Version 3.0 für ALV-5000/E/EPP) verwendet einen Algorithmus nach der Methode der kleinsten Quadrate, um die gemessene Korrelationsfunktion an die Gleichung 2 anzupassen und so den exponentiellen Abfall Γ der Korrelationsfunktion zu ermitteln. Der exponentielle Abfall kann anschliessend direkt in die Diffusionskonstante K_{Diff} der Partikel überführt werden mit Hilfe folgender Gleichung:

$$K_{Diff} = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (3)$$

wobei q die Magnitude des Streuvektors bezeichnet, der gegeben ist durch:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin(\Theta/2) \quad (4)$$

hierin ist n_0 der Refraktion-Index des Lösungsmittels, λ_0 ist die Wellenlänge des Lasers im Vakuum und Θ der Streuwinkel (experimentelle Parameter).

Letztlich lässt sich die Diffusionskonstante über die Stokes-Einstein-Gleichung auch als den hydrodynamischen Radius R_h einer diffundierenden Kugel definieren:

$$K_{Diff} = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (5)$$

wobei k für die Boltzmann-Konstante steht, T ist die Temperatur in Kelvin und η beschreibt die Viskosität des Solvens.

Dies zeigt den Wert von DLS-Analysen für die Untersuchung von kolloidalen Lösungen, da sich sehr schnell und effizient Aussagen über die Grössenverteilung der enthaltenen Partikel treffen lassen.

Die aus dem Diketopiperazin-Rezeptor **1** und dem pegyliertem Peptid **2d** gebildeten makromolekularen Partikel, entstehen auf Grund einer selektiven, nicht-kovalenten Bindung zwischen dem Rezeptor und seinem Liganden. Die nachgewiesenen, makromolekularen Strukturen bestätigen die Qualität unseres neu entworfenen Designs für das Peptid-PEG-Konjugat **2d**, da sich eine Selbst-Organisation der Komponenten **1** und **2d** verwirklichen lässt, die unabhängig von der neu eingeführten Funktionalisierung des Liganden durch Carboxyrhodamin ist (Abb. 16).

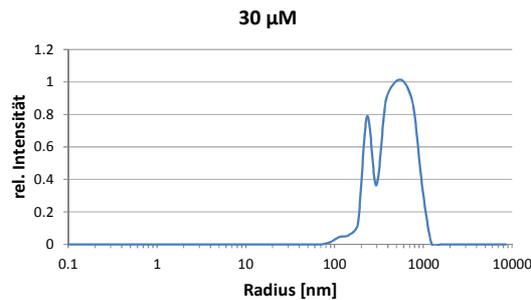


Abb. 16: Grössenverteilung der Partikel in der Suspension, die aus der Mischung von Rezeptor **1** und dem pegylierten Peptid **2d** entstanden ist.

Eine Bestimmung der Zusammensetzung der kolloidalen Lösung bei einem einzigen Streuwinkel, wie sie eben gezeigt wurde, führt allerdings nur bei monodispersen Lösungen zu einer aussagekräftigen Grössenverteilung, da Gleichung 5 nur für sehr verdünnte und nicht-interagierende Systeme angewendet werden kann.⁴⁵

Die Lösung zeigt aber das Auftreten zweier unterschiedlicher Grössenverteilungen ($R_{h1} \approx 110$ nm, $R_{h2} \approx 160$ nm), die es benötigt Fluktuationsspektren bei verschiedenen Streuwinkeln aufzunehmen und über den gesamten Winkelbereich zu mitteln.^{40, 41}

Die Polydispersität (*PD*) der Lösung errechnet sich dabei aus der relativen Standardabweichung der linearen Regression für die Diffusionskoeffizienten bei den unterschiedlichen Streuwinkeln. Um Aussagen über Proben mit hoher Polydispersität zu treffen, müssen die, über den Winkelbereich gemittelten, Diffusionskoeffizienten zusätzlich in Abhängigkeit der Konzentration vermessen und anschliessend auch über den Verdünnungsbereich gemittelt werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.⁴⁵

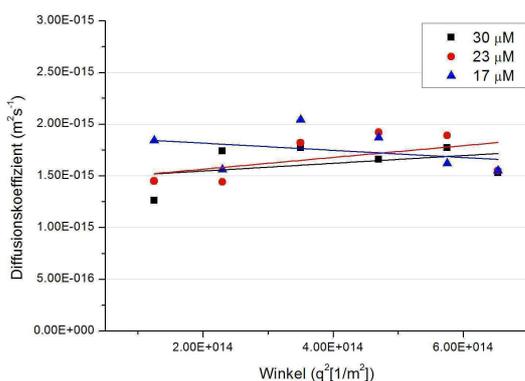
Für die kolloidale Lösung der Partikel aus Rezeptor **1** und pegyliertem Peptid **2b** mit einer Konzentration von 30 µM wurden sieben Fluktuationsspektren zwischen 30° und 150° aufgenommen, die jeweils über einen Zeitraum von 120 s gemessen wurden. Anschliessend wurde die Lösung 2Mal um den Faktor 0.75 verdünnt und jeweils die Streulichtintensität in Abhängigkeit des Winkels vermessen.

Die ermittelten Autokorrelationsfunktionen bei den jeweiligen Winkeln werden anschliessend mit einer Gleichung für einen mehrfach-exponentiellen Abfall analysiert, deren allgemeine Form sich als folgt darstellt:

$$G^{(3)}(t) = B + [\beta_1 \exp(-2\Gamma_1 t) + \beta_2 \exp(-2\Gamma_2 t)] \quad (6)$$

dabei steht B für die Basislinie der Korrelationsfunktion zur Zeit Unendlich, β bezeichnet die Amplitude der Korrelationsfunktion zur Zeit Null und Γ den exponentiellen Abfall der jeweiligen Komponenten.

Somit kann Γ_2 über Gleichung 3 in die entsprechende Diffusionskonstante überführt werden. Diese werden gegenüber q aufgetragen, über eine lineare Regression gemittelt, wodurch sich die Polydispersität (relative Standardabweichung) der kolloidalen Lösung aus Rezeptor **1** und dem pegyliertem Peptid **2d** bestimmen lässt:



$c(1/2d)$ [μM]	K_{Diff} [m^2s^{-1}]	PD [%]	R_h [nm]
30	$(1.47 \pm 0.20)\text{E-16}$	10	150 ± 17
23	$(1.45 \pm 0.21)\text{E-16}$	12	148 ± 15
17	$(1.87 \pm 0.20)\text{E-16}$	10	114 ± 13
\emptyset	$(1.63 \pm 0.86)\text{E-16}$		132 ± 46

Abb. 17: Lineare Regression der Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit des Messwinkels.

Die ermittelten Diffusionskoeffizienten zeigen bei allen drei Verdünnungen eine geringe Standardabweichung für die lineare Regression der K_{Diff} gegenüber den Messwinkeln, womit die DLS-Analysen auf eine sehr geringe Polydispersität der kolloidalen Lösung schliessen lässt. Die letzte Verdünnung zeigt allerdings eine deutliche Abweichung von dem zuvor bestimmten R_h von ca. 150 nm. Dies kann auf eine Verbesserung der PD zurückzuführen sein, die sich mit steigender Verdünnung der Partikel einstellt. Dieses Verhalten lässt sich auch an den Grössenverteilungen erkennen, die bei einem Winkel von 90° aufgenommen wurden (siehe Anhang). Die gemittelten Diffusionskonstanten für die Verdünnungsreihe ergeben einen R_h von 133 ± 46 nm für die Partikel, die sich aus der Selbst-Organisation des Diketopiperazin-Rezeptors **1** und dem pegylierten Peptid **2d** ergeben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Selbst-Organisation des Rezeptors **1** auch in Gegenwart des funktionalisierten Peptid-PEG-Konjugats (**2d**) zu stabilen Partikeln führt. Damit ist nachgewiesen, dass das Rezeptor-Ligand-System eine Modifizierung über das pegylierte Peptid erlaubt, ohne die Selbst-Organisation in eine makromolekulare Struktur negativ zu beeinflussen. Mit der Einführung des Fluorophors ergibt sich zusätzlich die Möglichkeit zur Aufnahme von Fluoreszenz-Korrelations-Spektren, die ein besseres Verständnis über die Selbst-Organisation des Systems eröffnen können.

3.5.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

3.5.4.1 Allgemeine Beschreibung der FCS-Analysen

Auch wenn die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie auf denselben physikalischen Grundlagen für die Analyse von Fluktuationsspektren beruht (vgl. 3.4.1), lassen sich durch die Messung der Intensitätsfluktuationen in der Fluoreszenz-Emission einige bedeutsame Vorteile gegenüber der Lichtstreuung erzielen.

Durch die Verwendung von exakt ausgerichteten Objektiven in Kombination mit verschiedenen Filtersystemen und Lochblenden, lässt sich der Laserstrahl sehr genau fokussieren und das Messvolumen damit um ein Vielfaches verringern gegenüber den Messmethoden, die auf der Lichtstreuung basieren. Dies ermöglicht eine sehr sensitive Analyse von Proben im unteren nanomolaren Bereich.⁴⁷ Mit der Eingrenzung des Messvolumens auf einen exakt bestimmaren Raum, bietet sich FCS besonders gut zur Untersuchung von diffusionskontrollierten, dynamischen Prozessen an, wie sie beispielsweise durch die Bindung von Substraten an einen Rezeptor gegeben sind.⁴⁹

Analog zu den Prozessen, die in der Lichtstreuung zu Intensitätsfluktuationen des Streulichts führen, erfolgen auch in der FCS, auf das Passieren des angeregten Volumenelementes durch fluoreszierende Teilchen, Fluktuationen in dem Intensitätsspektrum der Fluoreszenz-Emission (vgl. 3.4.1). Über eine Analyse der Fluktuationsspektren durch die Autokorrelationsfunktion können Aussagen zu den Diffusionszeiten der Moleküle bzw. Partikel und auch über ihre relative Anzahl getroffen werden.

Entsprechend unserem entworfenen Modell für die Selbst-Organisation des Diketopiperazin-Rezeptors **1** und dem Peptid-PEG-Konjugat **2d** wie es in Abbildung 12 dargestellt ist, lassen sich durch eine FCS-Analyse die Diffusionszeiten von dem frei in der Lösung diffundierendem pegylierten Peptid mit der Diffusionszeit des pegyliertem Peptides vergleichen, das in einer makromolekularen Einheit gebunden vorliegt. Mit FCS-Untersuchungen zu der Selbst-Organisation des Rezeptors in Gegenwart

von pegylierten Peptiden, die in den Bindungsstudien nicht durch den Rezeptor gebunden wurden, lassen sich auch Aussagen über die Selektivität des Rezeptors treffen. Zusätzlich können die FCS-Studien dazu beitragen ein besseres Verständnis über die Zusammensetzung der makromolekularen Einheiten zu erlangen, die auf die Bindung des Liganden **2d** durch den Rezeptor **1** erfolgen.

Die Auswertung der Daten wurde gemäss publizierten Methoden durchgeführt⁵¹ und steht im Einklang zu der gängigen Theorie.⁴⁷ Die Analyse der Autokorrelationsfunktion der einzelnen Komponenten wurde mit Hilfe einer nicht-linearen Methode der kleinsten Quadrate durchgeführt und erfolgte mittels der kommerziellen Software (LSM510/Confocor2 Software-Paket, Zeiss AG), die folgende Exponential-Funktion an die Autokorrelationskurve anpasst:

$$G(t) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + R^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \cdot \left(1 - T_{eq} + T_{eq} \cdot e^{-t/\tau_T}\right) \quad (7)$$

wobei N und τ_D die Anzahl und die Diffusionszeit der fluoreszierenden Partikel bezeichnet. τ ist die zeitliche Verzögerung und R steht für das Verhältniss von ω_z zu ω_{xy} und entspricht der Dimension des Gaussian-Volumen-Elements des Laserstrahls in der axialen und der radialen Ebene. Der Anteil und die Lebensdauer des Triplet-Zustandes sind als T_{eq} und τ_T bezeichnet. Die Dimension des Laserstrahls und der translationale Diffusionskoeffizient K_{Diff} stehen folgendermassen im Zusammenhang:

$$\tau_D = \frac{\omega_{xy}^2}{4K_{Diff}} \quad (8)$$

Letztlich lässt sich K_{Diff} mittels Gleichung 5 in den hydrodynamischen Radius der in der Probe enthaltenen Partikel überführen.⁵¹

3.5.4.2 FCS-Analysen der Selbst-Organisation aus Rezeptor 1 und pegyliertem Ligand 2d

Wie zuvor erwähnt lassen sich mit FCS kleinste Messvolumina realisieren, die im Femtoliterbereich liegen und daher eine nanomolare Konzentration des Fluorophors voraussetzen, um beste Messergebnisse zu erzielen.⁴⁹ Ausserdem benötigen FCS-Analysen eine möglichst geringe Hintergrund-Fluoreszenz, so dass überschüssige, fluoreszierende Moleküle aus der Probe entfernt werden müssen. Dies ist auch der Fall für das vorliegende Rezeptor-Substrat-System aus dem Diketopiperazin-Rezeptor **1** und dem pegylierten Peptid **2d**. Unter den getesteten Trennverfahren der Kolloid-Chemie (Grössenausschluss-Chromatographie, Dialyse, Ultrafiltration,...), stellte sich die

Kombination aus Zentrifugieren der kolloidalen Partikel und anschliessendem Waschen des Niederschlags mit Wasser heraus.⁵⁰

Dafür wurden der Diketopiperazin-Rezeptor **1** und das Peptid-PEG-Konjugat **2d** in THF/Wasser (1:1) gemischt ($c = 1 \text{ mM}$) und anschliessend mit der 30fachen Menge an Wasser verdünnt. Die kolloidale Lösung wurde für 10 min bei 1800 g zentrifugiert, der gewonnene Niederschlag mit Wasser gewaschen ($2 \times 500 \mu\text{l}$), von überstehender Lösung dekantiert und in einem möglichst geringen Volumen an Wasser suspendiert ($20 - 50 \mu\text{l}$). Damit lässt sich die erforderliche Anzahl an Partikeln pro Volumen für FCS-Analysen erreichen bei der gleichzeitigen Entfernung von überschüssigem Peptid-PEG-Konjugat, welches nicht in einer makromolekularen Struktur gebunden ist.

Voranehend an die Analysen des Rezeptor-Ligand-Systems aus **1** und **2d** wurde die Diffusionszeit für das frei diffundierende Peptid-PEG-Konjugat **2d** bestimmt. Dafür wurden $5-10 \mu\text{l}$ einer wässrigen Lösung aus **2d** (500 nM) auf einem Objektträger in der x-y-Achse des Strahlengangs positioniert und in zehn aufeinander folgenden Messungen für jeweils 30 s mit dem Laser ($\lambda_{\text{Exc.}} = 514 \text{ nm}$) angeregt. Das über den Gesamtzeitraum gemittelte Fluktuationsspektrum ist in Abb. 18 dargestellt (rot).

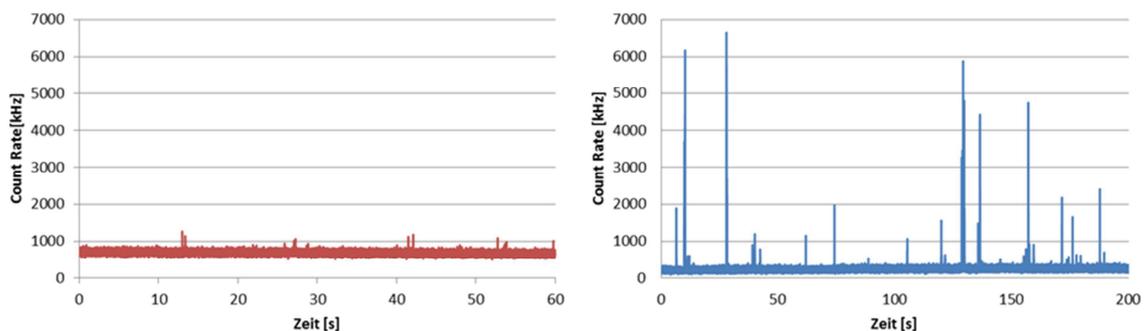


Abb.18: Intensitätsprofil für das Peptid-PEG-Konjugat **2d** (rot) und für die Selbst-Organisation aus **1** und **2d** (blau).

Die Konzentration wurde dabei so gewählt, dass eine ausreichende Fluoreszenz-Emission, hier als *Count-Rate* (CR) dargestellt, von grösser 100 kHz den Detektor erreicht. Gleichzeitig lässt sich bei dieser Konzentration die Verteilung der Triplett-Zustände (10%) beschränken und der entsprechende Formfaktor ($R = 6$) für das konfokale Detektionsvolumen wird eingehalten.⁵¹ Die Diffusionszeit der frei diffundierenden molekularen Spezies **2d** betrug hierbei $45 \mu\text{s}$.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die gebildeten Aggregate aus der Selbst-Organisation des Rezeptors **1** in Gegenwart des Liganden **2d** untersucht (10 Messungen für jeweils 30s). Das aufgenommene Fluktuationsspektrum ist in Abb. 19 dargestellt (blau). Die gebildeten Aggregate finden sich als stark ausgeprägten Intensitätssignalen wieder, die eine CR von bis zu 6000 kHz

erreichen und entstehen, wenn ein Partikel aus gebündeltem Peptid-PEG-Konjugat (**2d**) das konfokale Volumen passiert.

Die Autokorrelationskurven, die sich aus dem Intensitätsprofil erhalten lassen, wurden mit Hilfe der mitgelieferten Software bestmöglich an Gleichung 7 angepasst, um so ihren exponentiellen Abfall und die entsprechende Diffusionszeit zu bestimmen (Abb. 19).⁵²

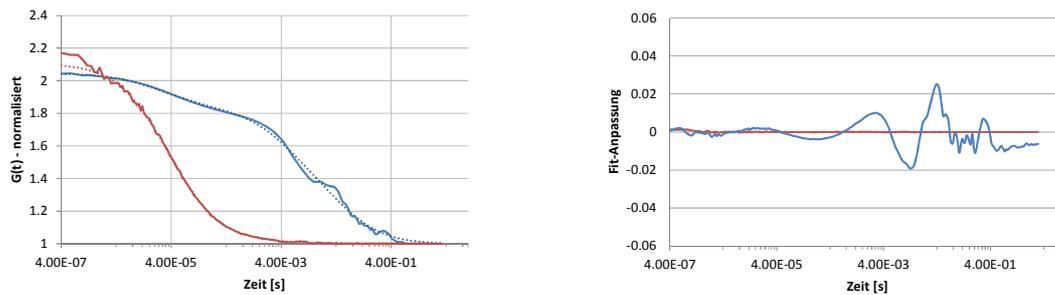


Abb. 19: Normalisierte Autokorrelationsfunktionen von frei diffundierendem Peptid **2d** (rot) und der gebildeten Partikel aus **1** und **2d** (blau) mit der jeweiligen relativen Abweichung der angepassten Funktion von der gemessenen. Die gestrichelten Linien bezeichnen die angepassten Funktionen.

Bei der Betrachtung der Autokorrelationsfunktionen lässt sich erkennen, dass das Peptid-PEG-Konjugat **2d** in Gegenwart des Rezeptors **1** (blau) eine deutlich längere t_{Diff} aufweist, als dies für die frei gelöste Form der Fall ist (rot). Die Wendepunkte der Exponential-Funktion geben dabei die charakteristische t_{Diff} für die vorliegenden Teilchen (Molekül oder Partikel) an.

Probe	CR	CPM ^a	N ^b	F ₁ [%]	F ₂ [%]	F ₃ [%]
				$\tau_{D,1}$ [ms]	$\tau_{D,2}$ [ms]	$\tau_{D,3}$ [ms]
2d	690	10	61	100	-	-
				0.045	-	-
1/2d	240	90	2.5	17 ± 37	41 ± 30	42 ± 21
				0.045	5.4 ± 1.3	51 ± 25

^a CPM, counts-per-molecule. ^b N, Anzahl der Moleküle/Partikel im Detektionsvolumen. ^c F_n, Anteil der Moleküle/Partikel mit einer bestimmten Diffusionszeit.

Tab. 1: Parameter für die exponentielle Kurvenanpassung.

Die beiden Experimente verdeutlichen sehr anschaulich die Steigerung der Diffusionszeiten, die auf die Beimischung des Rezeptors **1** zu dem Peptid-PEG-Konjugat **2d** erfolgt. Die t_{Diff} für **2d**, das in der Lösung frei diffundiert liegt bei 45 μ s, während in Gegenwart des Rezeptors **1** eine t_{Diff} von 5400 μ s

erreicht wird. Diese Steigerung der t_{Diff} ist eine Folge auf die Ausbildung von Partikel die sich in Gegenwart des Rezeptors **1** vollzieht. Damit lässt sich die Selbst-Organisation des Rezeptor-Ligand-Systems aus **1** und **2d** in eine makromolekulare Struktur nachweisen, die sich auch mit funktionalisierten Peptid-PEG-Konjugaten vollziehen lässt. Ausserdem deuten die Experimente auf eine Ausrichtung der hydrophilen PEG-Kette zu dem wässrigen Medium hin, da Carboxyrhodamin eine wasserlösliche Verbindung darstellt und sich bevorzugt an der Grenzfläche zu dem wässrigen Medium orientiert. Das Kontrollexperiment, in dem Carboxyrhodamin in Gegenwart des Peptid-PEG-Konjugats in Wasser gelöst wurde, zeigt keine Veränderungen der Diffusionszeiten. Das Auftreten von Aggregaten mit einer t_{Diff} von 51000 μ s ist höchstwahrscheinlich auf die Aggregation der Komponenten zurückzuführen, die beim Zentrifugieren der kolloidalen Lösung entstanden sind.

Mit dem Ziel die Selektivität der Selbst-Organisation des Rezeptor-Ligand-Systems aus **1** und **2d** zu testen, wurden analog zu den oben beschriebenen Experimenten auch Versuche durchgeführt, die eine Selbst-Organisation des Rezeptors in Gegenwart eines Peptides untersucht, das in den Bindungsstudien nicht durch **1** gebunden wurde. Ein solches Testpeptid stellt die Verbindung Ac-D-Pro-Val-D-Gln(Trt)-PEG₁₄-Lys(Rhd)-NH₂ (**2f**) dar. Das Seitenketten-geschützte Peptid-PEG-Konjugat zeigte in den vorangegangenen Bindungsstudien keine Affinität zu **1** und wurde daher auf die Ausbildung von makromolekularen Partikeln in Gegenwart des Rezeptors **1** untersucht. Die ermittelten Autokorrelationsfunktionen aus den FCS-Daten sind in Abbildung 20 dargestellt.

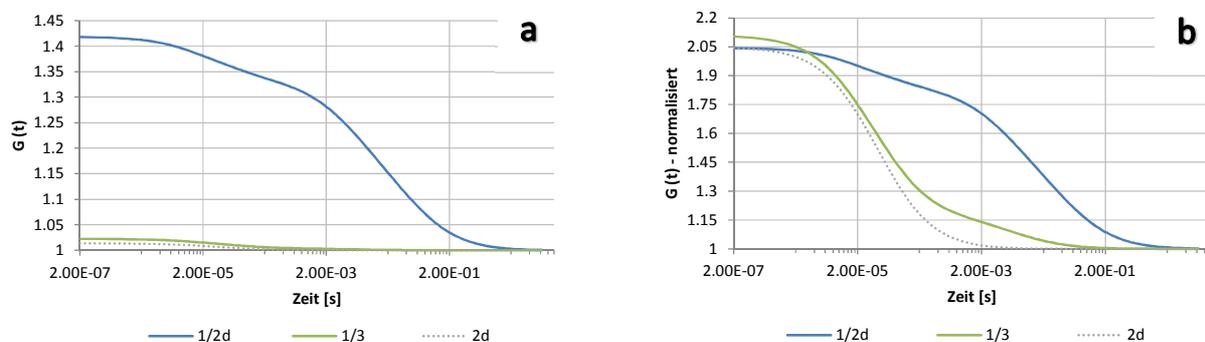


Abb. 20: Exponentielle Kurvenanpassung für die gemessene Autokorrelationsfunktion (a) der Partikel aus Rezeptor **1** und pegyliertem Peptid **2d** bzw. **2f** und für die normierte Autokorrelationsfunktion (b).

Die Autokorrelationsfunktion der Messdaten (Abb. 20a) zeigt einen deutlichen Unterschied in der Amplitude der Exponentialfunktion für das Peptid **2d** in Gegenwart von **1**, die auf eine deutlich verringerte Anzahl an Teilchen pro Volumen zurückzuführen ist.^{47,49,51} Dies zeigt sich auch bei der Betrachtung der normalisierten Autokorrelationsfunktion für die untersuchten pegylierten Peptide

2d und **2f**. Im Vergleich zu der Referenzfunktion des frei gelösten Peptides **2d**, wird erkennbar, dass nur die Gegenwart des komplementären Peptides **2d** zu der Ausbildung einer makromolekularen Struktur mit einer höheren t_{Diff} führt. Das Testpeptid **2f** hingegen weist keine Veränderung der t_{Diff} auf. Dieses Kontrollexperiment zeigt, dass allein die Verwendung von **2d** mit dem Tripeptid Ac-D-Val-D-Val-D-His-R eine nicht-kovalente Bindung zu dem Rezeptor **1** ausbilden kann und damit für die Selbst-Organisation in eine makromolekulare Struktur verantwortlich ist. Damit verdeutlicht sich die Selektivität des Prozesses, in dem der Rezeptor **1** zur Selektion seines Liganden aus zwei Peptid-PEG-Konjugaten auswählt.

Die ermittelten Parameter der exponentiellen Kurvenanpassung heben diese Gegensätze hervor. Mit dem Peptid-PEG-Konjugat **2d** entstehen Partikel mit einem R_h von ca. 130 nm, die etwa die Hälfte des vorhandenen pegylierten Peptides vereint, während das Testpeptid zu einem Grossteil in seiner gelösten Form vorliegt. Das Auftreten von Partikeln mit einem Radius von über 1 μm kann auf die Bildung von Aggregaten zurückzuführen sein, die sich während des Zentrifugierens bilden und sich nicht vollständig durch die Ultraschallbehandlung auflösen lassen.

	Komponente I (freies Peptid)		Komponente II		Komponente III	
Partikel (Anzahl*)	K_{Diff} [ms], Fraktion [%]	R_h [nm]	K_{Diff} [ms], Fraktion [%]	R_h [nm]	K_{Diff} [ms], Fraktion [%]	R_h [nm]
1·2d (2.5)	0.045 53 ± 39	-	4.0 ± 1.7 56 ± 33	130 ± 50	456 ± 230 1 ± 10	1500 ± 500
1·2f (49)	0.045 84 ± 13	-	7.1 ± 3.8 16 ± 13	230 ± 100	-	-
2d (83)	0.045 100	-	-	-	-	-

*Anzahl der Moleküle/Partikel im konfokalen Detektionsvolumen

Tab. 2: Parameter für die exponentielle Kurvenanpassung der Autokorrelationsfunktionen.

Ein zusätzlicher Nachweis für die Selektivität der Selbst-Organisation des Rezeptors **1** und dem pegyliertem Peptid **2d** konnte durch die Analyse der LSM-Bildern erbracht werden, die zusammen mit den FCS-Daten aufgenommen wurden (Abb. 21).

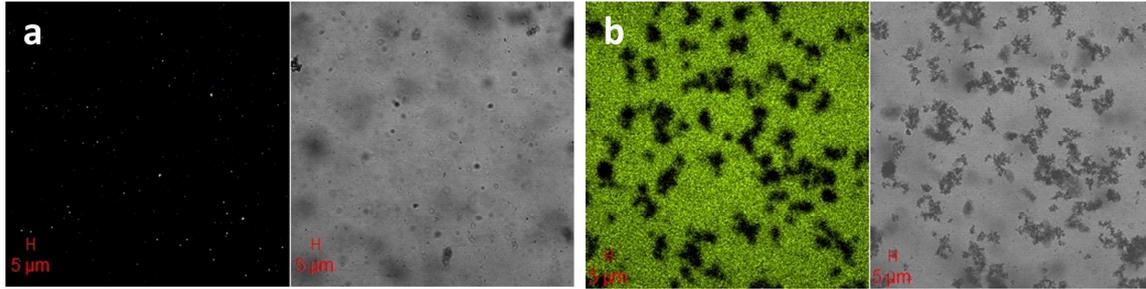


Abb. 21: a) LSM-Bilder der durch die Selbst-Organisation von Rezeptor **1** und Peptid-PEG-Konjugat **2d** entstandenen Vesikel. b) LSM-Bilder des aggregierten Rezeptors **1**.

Diese zeigen ausschliesslich für die Selbstorganisation von Rezeptor **1** und dem pegyliertem Peptid **2d** das Erscheinen von fluoreszierenden Signalen (Abb. 21a). Dabei sind einzelne, am Detektor registrierte Photonen durch jeweils ein Pixel wiedergeben, so dass auch kleine Partikel (<500 nm) als einzelne Punkte erscheinen und damit die fluoreszierenden Vesikel wiedergeben. Im Vergleich zu **1/2d** erscheinen für die Mischung aus **1** mit dem nicht-bindenden pegyliertem Peptid (**2f**) ausschliesslich grosse Aggregate, die sich gegen den fluoreszierenden Hintergrund als dunkle Flecken abheben. Innerhalb dieser Felder lässt sich keine Fluoreszenz erkennen, da sie ausschliesslich aus aggregiertem Rezeptor bestehen; der gefärbte Hintergrund ist durch in der Lösung frei verteiltes Peptid entstanden (Abb. 21b).

Für eine weitere Untersuchung der Morphologie der gebildeten Partikel wurden mikroskopischen Analysen verwendet. Die TEM-Aufnahmen zeigen sphärische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm. Die Partikel weisen hierin einen deutlichen Elektronenkontrast zu der Umgebung auf, der durch eine stabile Partikelwand entsteht und die Ausbildung von Vesikeln andeutet (Abb. 22).^{39,53}

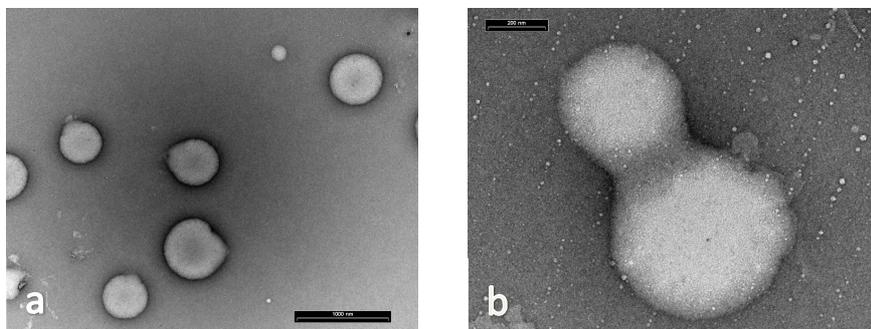


Abb. 22: a) TEM-Bild der Vesikel aus Rezeptor **1** und pegyliertem Peptid **2d** (Massstab: 1000 nm). b) TEM-Bild fusionierender Vesikel (Massstab: 200 nm).

Bemerkenswerterweise, war es ebenfalls möglich, die Aufnahme von zwei Vesikeln zu erlangen, welche sich in sehr engem Kontakt zueinander befinden. Sie erscheinen dabei über ihre Membran hin miteinander zu verschmelzen und geben so einen möglichen Hinweis auf ihre Fähigkeit zur Fusion, die durch die nicht-kovalente Verknüpfung der Komponenten entsteht.

3.5.5 Zusammenfassung

In dem ersten Teil dieser Arbeit wurde unser Konzept für eine Vesikelbildung durch selektive nicht-kovalente Wechselwirkungen so erweitert, dass auch funktionalisierte Peptid-PEG-Konjugate für die ursprüngliche Bindung mit dem Rezeptor genutzt werden können. Durch die Modifizierung des Peptid-PEG-Konjugats mit einer zusätzlichen funktionellen Einheit lassen sich neue Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Selbst-Organisation aus Rezeptor **1** und dem Peptid-PEG-Konjugat **2d** treffen. Darüberhinaus werden die eingeführten funktionellen Gruppen durch die Selbst-Organisation an der Oberfläche des Vesikels verankert, womit sich direkte Modifikationen einer supramolekularen Struktur erreichen lassen (Abb. 23).

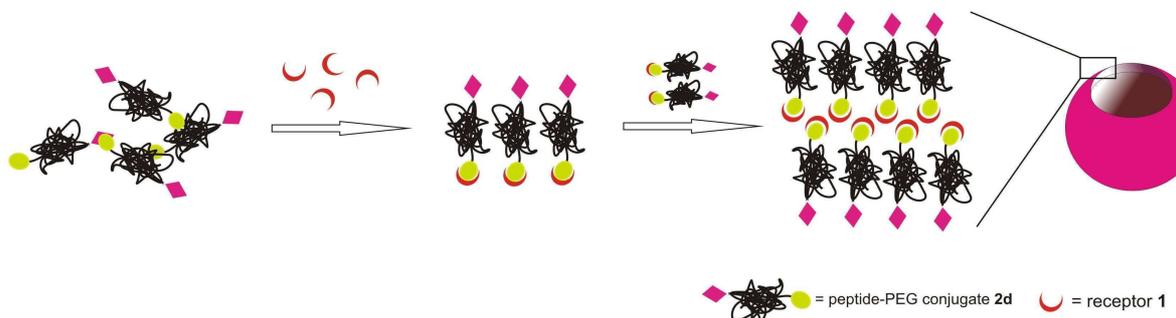


Abb. 23: Vorgeschlagenes Modell für die Selbst-Organisation eines funktionalisierten Rezeptor-Ligand-Systems.

Das Design des Peptid-PEG-Konjugats (**2d**) basiert auf einer bifunktionalisierten PEG-Kette die einerseits das für die molekulare Erkennung durch den Rezeptor **1** erforderliche Tripeptid Ac-D-Val-D-Val-D-His-R und andererseits einen Lysin-Baustein, der eine Modifizierung des Liganden und dadurch auch des Rezeptor-Ligand-Komplexes ermöglicht. Die Evaluierung der Selbst-Organisation des funktionalisierten Rezeptor-Ligand-Komplexes in Wasser zeigte, dass eine Modifizierung der Peptid-PEG-Einheit mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Carboxyrhodamin durch das System toleriert wird und keine nachteiligen Auswirkungen auf die Selbst-Organisation des Rezeptor-Ligand-Komplexes in ein Vesikel besitzt. Die verwendeten Analyse-Methoden aus FCS und DLS zeigten weiter, dass mit der Rezeptor-Ligand-Bindung eine höchst selektive Selbst-Organisation entsteht, die auch zur Selektion

zwischen Peptid-PEG-Einheiten von komplementärer bzw. nicht-komplementärer Struktur befähigt ist. Mit dem entworfenen Design des Peptid-PEG-Konjugats liess sich auch das vorgeschlagene Modell für die Selbst-Organisation des Systems bestätigen, da der Fluorophor an dem Kettenende der PEG-Einheit verankert ist, die nicht für die molekulare Erkennung des Tripeptids durch den Rezeptor **1** genutzt wird und er keine Einschränkungen auf die Selbst-Organisation des Systems zeigte.

Die analytischen Daten legen eine Ausrichtung des Fluoreszenz-Farbstoffs in Richtung des wässrigen Milieus nahe, wodurch eine Anordnung des Fluorophors an der Oberfläche der Vesikel-Membran entsteht. Dies stellt eine überaus interessante Methode für die Funktionalisierung einer makromolekularen Struktur dar, die sich erst durch die Ausbildung von selektiven Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand aufbauen lässt (Abb. 23).

4. Selbst-Organisation des Diketopiperazin-Rezeptors (1)

Eine Möglichkeit Selbst-Organisationsprozesse einzuleiten, entsteht oftmals durch den amphiphilen Charakter der beteiligten Komponenten. So gibt es eine Vielzahl an amphiphilen Peptiden, die je nach ihrer Architektur unterschiedliche Bestandteile für ihre hydrophoben und hydrophilen Regionen enthalten.²³ Zum einen gibt es amphiphile Moleküle, die ausschliesslich aus Aminosäuren aufgebaut sind und sowohl geladene als auch hydrophobe Reste besitzen.²⁴ Des Weiteren existieren amphiphile Peptide deren hydrophobe Elemente nicht aus Aminosäuren bestehen, sondern durch die Konjugation mit Alkylketten oder Phospholipiden entstehen⁵⁴ und letztlich gibt es ebenfalls Block-Copolymere, die Peptidsequenzen mit synthetischen Polymeren verknüpfen.⁵⁵ Sehr viel weniger bekannt ist die Selbst-Ordnung bei Molekülen, die keinen expliziten amphiphilen Charakter aufweisen. So konnten z. B. bei Untersuchungen über Amyloid-Fibrillen Peptidsequenzen identifiziert werden, die sich durch die Ausbildung von β -Faltblattstrukturen zu makroskopischen Fibrillen zusammen lagern.⁵⁶

4.1 Untersuchung der Selbst-Organisation des hydrophoben Diketopiperazin-Rezeptors (1)

Die Seitenketten des Diketopiperazin-Rezeptors **1** bestehen aus rein hydrophoben Aminosäuren und tragen zusätzlich einen aromatischen Diazofarbstoff, verknüpft über die Hydroxygruppe des Tyrosins.

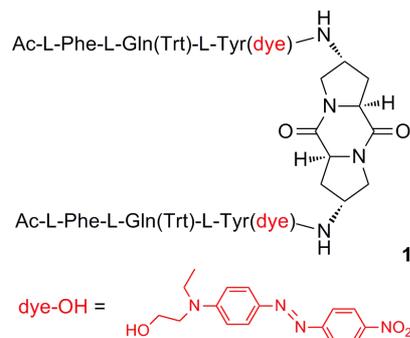


Abb. 24: Struktur des Diketopiperazin Rezeptors **1**.

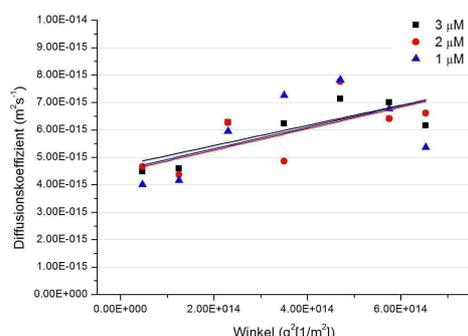
Die Trityl-Schutzgruppe der Glutaminseitenkette bringt zusätzliche aromatische Gruppen in das Molekül, so dass insgesamt nur eine gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln wie CHCl_3 , MeOH oder THF erreicht wird. Wird eine frisch hergestellte Lösung des Rezeptors **1** in THF oder MeOH mit Wasser verdünnt, beginnt daher nach kurzer Zeit ein roter Feststoff auszufallen.

Allerdings konnte beobachtet werden, dass Stammlösungen des Rezeptors (**1**) in THF, die über einen längeren Zeitraum (1-2 Wochen) aufbewahrt wurden, ein anderes Verhalten in der Selbst-

Organisation mit pegylierten Peptiden entwickelten; die entstandenen Partikel zeigten einen kleineren Radius (siehe Anhang). Eine genauere Untersuchung der Selbst-Organisation mit den entsprechenden Kontrollexperimenten zeigte, dass Stammlösungen des Rezeptors (1), die für längere Zeit aufbewahrt worden waren, auch eine Selbst-Aggregation des Rezeptors ermöglichen, die in Wasser zur Ausbildung von Partikeln führt. In diesem Fall, benötigt **1** nicht die Gegenwart seines pegylierten Liganden, um eine makromolekulare Struktur einzunehmen. Dies lässt auf eine Aggregation oder eine intermolekulare Ausrichtung der Moleküle schließen, die sich bereits in der THF-Lösung vollzieht. Dennoch liessen sich diese Aggregate nicht eindeutig nachweisen, da die beteiligten intermolekularen Kräfte in organischen Lösungsmitteln zu schwach sind, um sie über NMR-spektroskopische Methoden nachzuweisen. Auch die Untersuchungen mittels UV-Vis-Spektroskopie, Massenspektrometrie und HPLC-Chromatographie lieferten keine eindeutigen Befunde (siehe Anhang).

Daher wurde versucht, die auf die Verdünnung mit Wasser erfolgte Partikel-Bildung des Diketopiperazin-Rezeptors über makromolekulare Analysen-Methoden zu charakterisieren. Dabei wurden ähnliche spektroskopische und mikroskopische Methoden verwendet wie bereits bei der Charakterisierung der Vesikel, die durch den Host-Guest-Komplex geformt werden. Für die DLS-Untersuchungen wurde die über mehrere Tage gelagerte Rezeptor-Stammlösung ($c = 300 \mu\text{M}$) mit Wasser verdünnt, so dass eine finale Rezeptorkonzentration von $3 \mu\text{M}$ erreicht wurde. Auch bei dieser geringen Konzentration liess sich bereits ein ausreichendes Messsignal aufnehmen (input count rate $> 200 \text{ kHz}$), um die Zusammensetzung der kolloidalen Lösung zu bestimmen.

Im Vergleich zu den Partikeln die durch das Host-Guest-System (**1·2d**) gebildet werden, bilden sich schon bei einer viel geringeren Konzentration eine ausreichende Menge an Partikeln, um sie über ihrer Streulichtintensität zu charakterisieren. Die Messung der Diffusionskoeffizienten K_{Diff} über den gesamten Winkelbereich ist bei drei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt worden und in Abbildung 25 dargestellt.



$c(\text{Rez})$ [μM]	K_{Diff} [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]	PD [%]	R_h [nm]	$\langle R_h \rangle^a$ [nm]
3	$(4.70 \pm 1.0)\text{E-15}$	16	46 ± 8	
2	$(4.48 \pm 1.2)\text{E-15}$	20	48 ± 10	
1	$(4.54 \pm 1.4)\text{E-15}$	23	49 ± 13	48 ± 1

^a über Konzentrationen gemittelter R_h

Abb. 25: Lineare Regression der Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit des Messwinkels.

Die einzelnen Lösungen besitzen allerdings etwas höhere Polydispersitäten (*PD*) als die Partikel des Host-Guest-Systems (**1·2d**) und ergeben einen über die Konzentrationen gemittelten R_h von 48 ± 1 nm für die Hauptfraktion der enthaltenen Partikel (vgl. Abbildung 18).⁵⁷ Im Verlauf der Verdünnungen steigt die *PD* der Lösung leicht an und auch die Grössenverteilung nimmt leicht zu. Dies kann auf eine zunehmende Aggregation oder auch Fusion der Partikel zurückzuführen sein, die allerdings sehr viel weniger stark ausgeprägt ist, als dies bei den Vesikeln aus **1** und **2d** der Fall ist. Die Grössenverteilungen der einzelnen Lösungen sind in Abbildung 26 dargestellt und zeigen zusätzlich zu den Partikeln mit einem R_h um 50 nm, eine zweite, kleinere Spezies an Partikeln.

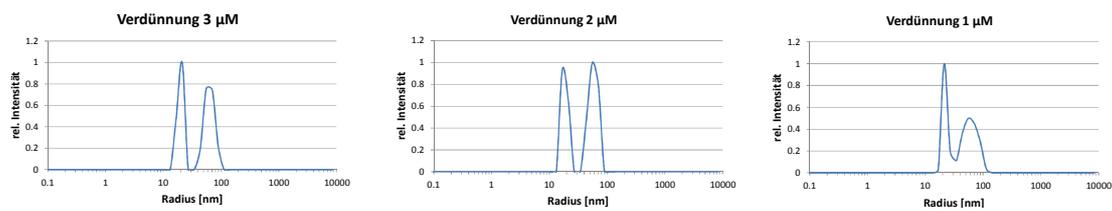


Abb. 26: Grössen-Verteilungsfunktion der aus Rezeptor **1** gebildeten Partikel in Abhängigkeit des Molekulargewichtes und der relativen Streuintensität bei 90° .

Die kleinere Spezies besitzt einen R_h um 20 nm und liegt damit eher im Bereich von micellaren Systemen.⁵⁸ Die relativen Grössenverteilungen der beiden Fraktionen bleibt allerdings über den gesamten Konzentrationsbereich konstant, womit sich zeigt, dass die gebildeten Partikel eine hohe Stabilität besitzen und sie weniger zu Aggregation neigen als die Partikel aus Rezeptor und den Peptiden **2a-d** (siehe Anhang).

Die Morphologie der Aggregate wurde mittels TEM und AFM Messungen untersucht. Die Probenpräparation erfolgte bei Konzentrationen von ca. $10 \mu\text{M}$. Die TEM-Bilder verdeutlichen die Unterschiede der beiden Spezies, die mit DLS gefunden wurden, sehr anschaulich (Abb. 27).

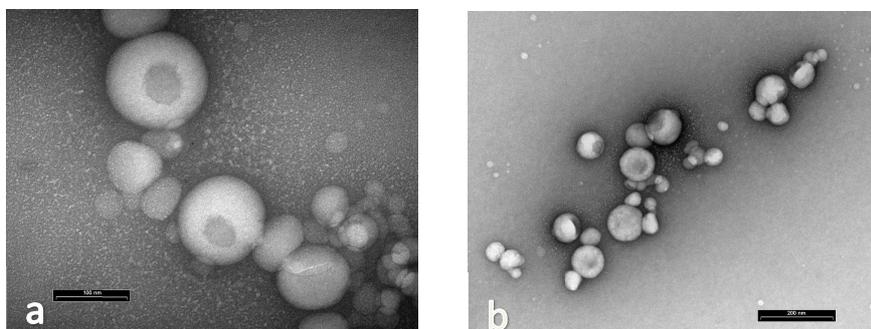


Abb. 27: TEM-Bild der Partikel aus Rezeptor **1** bei unterschiedlicher Vergrößerung. Massstab: (a) 100 nm; (b) 200 nm).

Die kleineren Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 50 nm besitzen einen sehr geringen Elektronenkontrast, der auf eine geringe Dichte der Partikelwände hindeutet und im Zusammenhang mit dem Durchmesser auf die Bildung von Micellen schliessen lässt. Die grösseren Aggregate, deren Durchmesser etwa 100 nm beträgt, erscheinen bei der Betrachtung durch das TEM mit unterschiedlichem Elektronenkontrast von der Peripherie zum Inneren des Partikels hin. Diese ringförmige Struktur ist ein typisches Merkmal von harten, kollabierten Vesikeln.³⁹ Der Elektronenstrahl erliegt einer Phasenverschiebung beim Durchlaufen von Proben mit unterschiedlicher Dichte.⁵⁰ Ein hartes Vesikel, das beim Trocknen seine ursprüngliche Form nicht gänzlich verliert, erscheint, im Gegenteil zu weichen, deformierten Vesikeln, unter dem TEM in einer ringförmigen Struktur, da der Elektronenstrahl durch das dünne Innere weniger beeinflusst wird als durch die dicht gepackte Peripherie eines harten Vesikels.^{39,50} Die Aufnahmen des AFM bestätigen diese Merkmale zusätzlich (Abbildung 28).

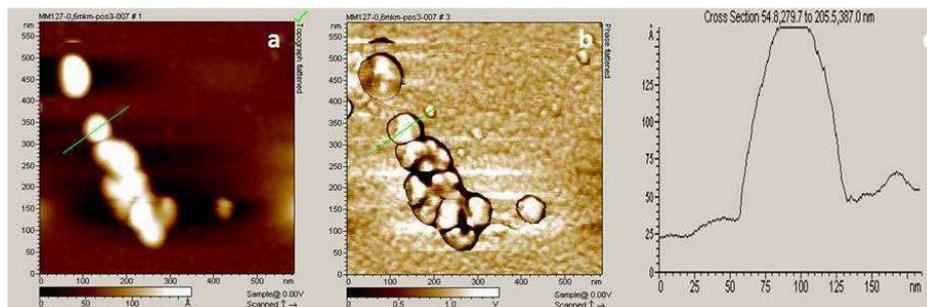


Abb. 28: Darstellung des Phasen- und Oberflächenprofils der AFM-Aufnahmen mit dem entsprechenden Höhenbild.

Die AFM-Bilder zeigen sowohl in der Phasen- als auch in der Oberflächendarstellung die Ausbildung sphärischer Partikel mit einem mittleren Radius von 80 – 100 nm und einem Höhenprofil von etwa 10 nm. Das Verhältnis von Durchmesser zur Höhenausdehnung spricht zusätzlich für die Ausbildung von harten Vesikeln, die in ihrer starren Form eine Volumenzunahme von der Peripherie zum Zentrum aufweisen³⁹ und zeigen dadurch ihren Gegensatz zu den weichen Vesikeln wie sie durch das Host-Guest-System aus **1** und **2b** gebildet werden (vgl. Abb. 9).

Einen endgültigen Beweis für die Ausbildung von Vesikeln mit einem Wasservolumen, das von der Doppelschicht umschlossen ist, kann letztlich durch Experimente erbracht werden, die das Einschliessen bzw. den Transport von fluoreszierenden Farbstoffen im Inneren eines Vesikels umfassen.^{22,24,53} Die sogenannten Einschluss-Experimente erfordern die Vesikel-Bildung in einer konzentrierten Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes mit dem anschliessenden Abtrennen von überschüssigem Fluorophor, der nicht im Inneren eines Vesikels gefangen ist. Im Fall der Diketopiperazin-Rezeptor-Vesikel wurde der THF-Stammlösung Carboxyrhodamin 110 (Rhd)

beigemischt und die Vesikel-Bildung durch Zugabe von Wasser eingeleitet. Ein Teil des Fluorophors wird dabei von den sich bildenden Vesikeln umschlossen und somit im Inneren gefangen. Die überschüssige Lösung mit gelöstem, freiem Fluorophor wurde durch mehrmaliges Zentrifugieren und Waschen des Niederschlags mit Wasser entfernt.⁵⁰ Anschliessend wurden die im Niederschlag enthaltenen Vesikel in möglichst wenig Wasser suspendiert und die kolloidale Lösung mittels FCS untersucht.⁴⁷⁻⁴⁹ Die im Inneren der Vesikel eingeschlossenen fluoreszierenden Moleküle weisen dadurch eine andere Diffusionszeit auf als die, die in der wässrigen Umgebung frei diffundieren können; also nicht von Vesikeln eingeschlossen sind.

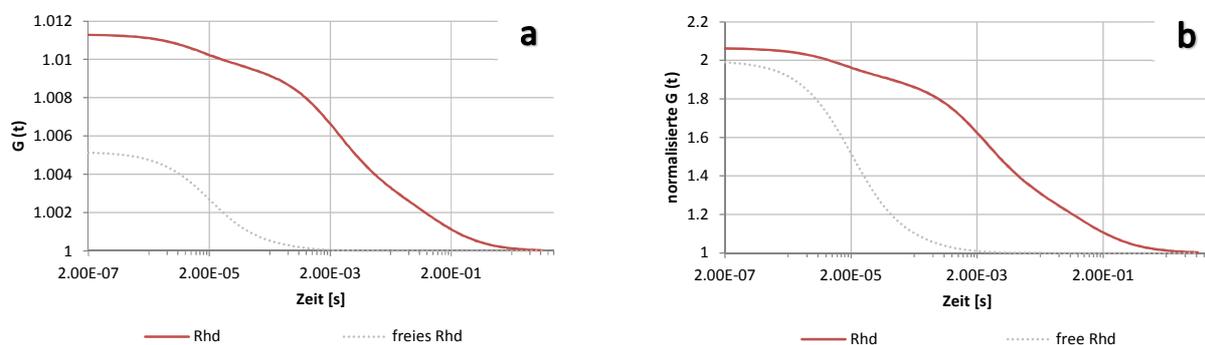


Abb. 29: Exponentielle Kurvenanpassung für die (a) gemessene Autokorrelationsfunktion der mit Carboxyrhodamin beladenen Teilchen aus Rezeptor **1** und für die (b) normierte Autokorrelationsfunktion.

Der Graph in Abbildung 29 zeigt die exponentielle Kurvenanpassung der Autokorrelationsfunktion für die Rhd-beladenen Vesikel des Diketopiperazin-Rezeptors **1** (rot). Zum Vergleich sind jeweils die Kurven für frei gelöstes Carboxyrhodamin (gestrichelte Linie) mit abgebildet. Die Autokorrelationsfunktion für die Rhd-beladenen Partikel besitzt eine deutlich höhere Amplitude, die auf eine geringere Anzahl an Teilchen pro Volumen im Vergleich zu frei gelöstem Rhd zurückzuführen ist und auf die Ausbildung von Aggregaten bzw. Partikeln hindeutet.

	Komponente I (freier Fluorophor)		Komponente II		Komponente III	
Verbindung (Anzahl*)	t_{Diff} [ms], Fraktion [%]	Radius [nm]	t_{Diff} [ms], Fraktion [%]	Radius [nm]	t_{Diff} [ms], Fraktion [%]	Radius [nm]
1 (120)	0.035 22 ± 23	-	2.3 ± 1.7 58 ± 17	74 ± 17	122 ± 51 20 ± 12	400 ± 160
Rhd, frei (193)	0.035 100	-	-	-	-	-

*Anzahl der Moleküle/Partikel im konfokalem Detektionsvolumen

Tab. 3: Parameter für die exponentielle Kurvenanpassung der Autokorrelationsfunktionen.

Anhand der Parameter für die exponentielle Kurvenanpassung lässt sich ablesen, dass die Probe trotz des Waschens immer noch viel frei gelöstes Rhodamin enthält. Zusätzlich sind in der Lösungen aber auch Partikel mit einer Diffusionszeit von 2.3 ms verteilt, welche einem hydrodynamischen Radius von 74 nm entspricht und damit einer Grössenverteilung entspricht, die den DLS-Messungen vergleichbar ist. Zusätzlich lassen sich aber auch Partikel mit einer t_{Diff} von 122 ms auf (Tab. 3). Solch grosse Partikel können durch Aggregation der Partikel⁵¹ und würde auf eine verringerte Stabilität der beladenen Vesikel zurückzuführen sein, die durch das Zentrifugieren vermehrt in grösseren Aggregaten zusammengelagert vorliegen. Es war ebenfalls möglich TEM-Analysen solch aggregierter Vesikel durchzuführen; diese zeigen sphärische Partikel, die in Aggregaten mit einem Durchmesser zwischen 1 und 5 μm vorliegen (Abb. 30).

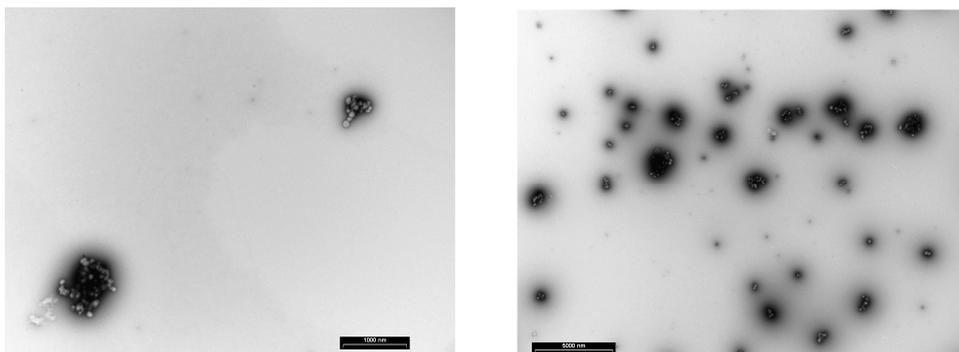


Abb. 30: TEM-Bilder der aggregierten Vesikel aus Rezeptor **1** (Massstab 1 bzw. 5 μm).

Dennoch veranschaulichen diese Experimente die Fähigkeit des Diketopiperazin Rezeptors **1** transportfähige Vesikel zu bilden. Zu betonen bleibt allerdings, dass dies nur ermöglicht wird durch Verwendung „gealterter Stammlösungen des Rezeptors“ in THF. Für frisch hergestellte Lösungen zeigt sich diese Form der Selbst-Organisation nicht, da **1** unter diesen Umständen eine Selbst-

Aggregation zeigt, die nicht zu geordneten Strukturen führt. Dies lässt vermuten, dass sich die Rezeptormoleküle bereits im organischen Lösungsmittel mit der Zeit in einer gewissen Orientierung zueinander ausrichten und somit bereits eine Art von Präorganisation in der Stammlösung stattfindet.

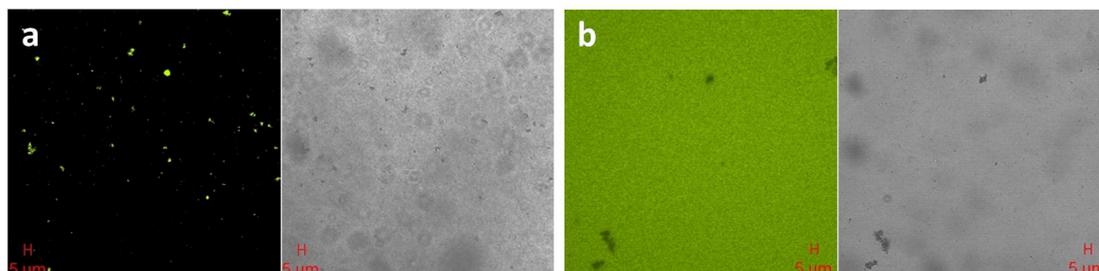


Abb. 31: (a) LSM-Aufnahmen der Diketopiperazin-Vesikel mit eingeschlossenem Rhodamin. (b) LSM-Aufnahmen des gebildeten Niederschlags aus Rezeptor, der entsteht wenn eine frisch hergestellte Lösung in THF verwendet wird. Massstab: 5 µm.

Dieser Unterschied kann anhand der LSM-Aufnahmen sehr eindrucksvoll veranschaulicht werden. Die Fluoreszenz-Bilder zeigen für die Selbst-Organisation von Rezeptor **1** aus einer „gealterten“ Stammlösung, sowohl einzelne als auch zusammengelagerte Partikel mit einem sehr deutlichen Fluoreszenz-Kontrast. Dieser Kontrast entsteht durch gebündeltes Carboxyrhodamin im Inneren der Vesikel, welche allerdings auch in grösseren Aggregaten vorliegen, so dass sie sogar in den Lichtbildern als einzelne, schwarze Punkte zu erkennen sind (Abbildung 31a). Im Gegenteil dazu kann Rezeptor **1** aus einer frisch hergestellten Stammlösung keine geordneten Wechselwirkungen ausbilden, so dass beim Mischen mit Wasser keine strukturierten Formen entstehen und die Rezeptormoleküle zufällige Aggregate bilden, während das wasserlösliche Carboxyrhodamin in der Lösung frei verteilt bleibt. Dies lässt sich sehr schön an den Fluoreszenz-Bildern erkennen, in denen sich die aggregierten, ungefärbten Teilchen gegen den fluoreszierenden Hintergrund abheben (Abbildung 31b).

Wie in diesem Kapitel gezeigt wurde, ist der Diketopiperazin-Rezeptor (**1**) unter bestimmten Umständen auch in der Lage für sich alleine genommen Vesikel zu bilden. Im Gegensatz zu den Vesikeln, die mit dem Host-Guest-System aus Rezeptor **1** und pegyliertem Liganden **2d** entstehen ($R_h = 120$ nm), ergibt die Selbst-Organisation aus **1** sehr viel kleinere Vesikel ($R_h = 50$ nm), die allerdings eine höhere Stabilität und eine geringere Mobilität aufweisen. Um die Selbst-Organisation des Diketopiperazin-Rezeptors weiter zu untersuchen, wurden Fragmente des Rezeptors hergestellt und auf ihr Verhalten in wässriger Umgebung getestet.

4.2 Untersuchungen zur Selbst-Organisation von Fragmenten des Diketopiperazin-Rezeptors

Sollte der Diketopiperazin-Rezeptor in der Lage sein, in THF-Lösungen eine bestimmte räumliche Orientierung der Moleküle zu erreichen, so dass eine Art von Aggregation stattfindet, müssen intermolekulare Kräfte für ein solches Arrangement zuständig sein;

Um den Einfluss der zwei-armigen Struktur des Rezeptors (**1**) auf die Selbst-Organisation in Wasser zu untersuchen wurden nur die seitlichen Arme des Rezeptors synthetisiert. Um weiter den Einfluss des Dispers Rot Farbstoffes auf die Ausbildung von Partikel zu bestimmen, wurde ebenfalls das Tripeptid **12** hergestellt (Abbildung 32).

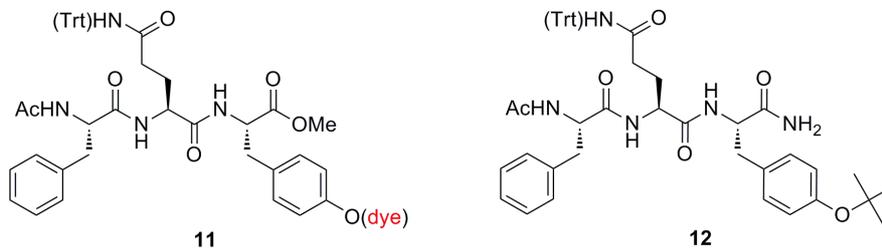


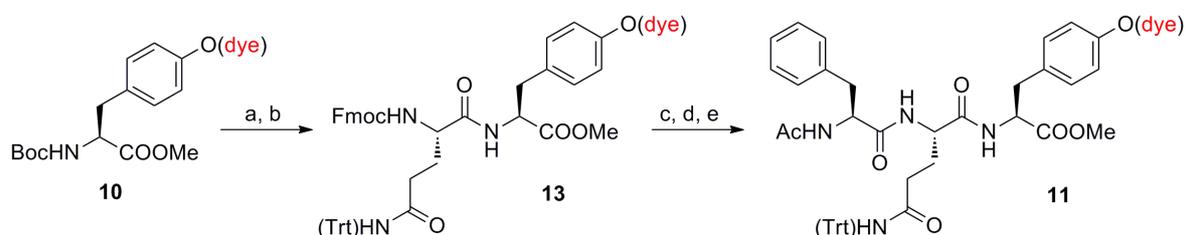
Abb. 32: Struktur der Diketopiperazin-Fragmente **11** und **12** (dye = Dispers Rot).

Während Fragment **11** den Farbstoff Dispers Rot enthält, ist dieser in dem Fragment **12** durch eine *tert*-Butyl-Gruppe ersetzt. Mit den beiden Fragmenten **11** und **12** sollte also nicht nur der Einfluss des verknüpfenden Diketopiperazins sondern auch der des Farbstoffes aufgeklärt werden.

Um diese Einflüsse zu testen, wurden die beiden Fragmente auf ihre Selbst-Organisation in Wasser untersucht, die durch das Verdünnen von Lösungen der Fragmente in THF mit Wasser erfolgen sollte. Anschliessend wurde auch eine mögliche Selbst-Organisation der Fragmente in Gegenwart von pegylierten Peptiden untersucht.

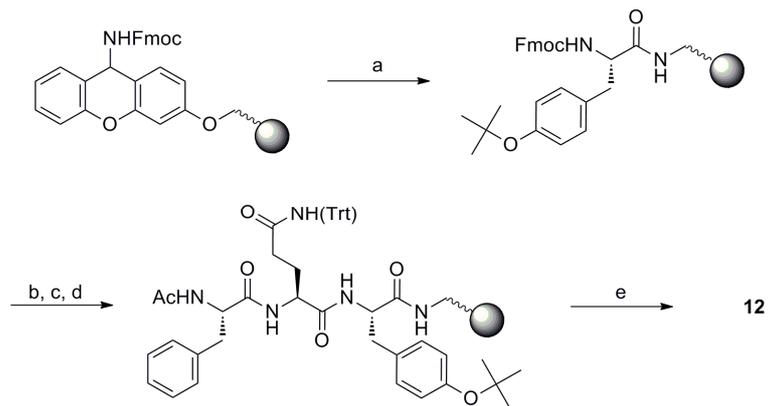
4.2.1 Synthese der Fragmente des Diketopiperazin-Rezeptors (1)

Die Herstellung des Rezeptorarmes **11** erfolgte in Lösung und beginnt mit dem Farbstoff-markiertem Lysin-Baustein **10**, welcher bereits über eine Mitsunobu-Reaktion mit Dispers Rot verknüpft wurde (Schema 3). Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte durch Behandlung mit 3N HCl in Dioxan, so dass *N*- α -Fmoc-*N*- δ -Trityl-Glutamin durch die Zugabe von Hünigs Base und EDC an das freie Amin von **10** gekuppelt werden konnte. Das Entschützen der α -Aminofunktion von **13** mit TAEA ermöglichte die Kupplung mit *N*- α -Fmoc-Phenylalanin bei vorheriger Aktivierung der Säurefunktion mit EDC und Hünigs Base. Die darauffolgende Behandlung mit TAEA und abschliessende Acetylierung mit Acetanhydrid und Hünigs Base führt zu dem Seitenketten-geschützten Rezeptorfragment **11** (Schema 5).



Schema 5. Synthese des Rezeptorfragmentes **11**: a) 3N HCl in Dioxan; b) Fmoc-Gln(Trt)-OH, EDC, *i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂, 61%; c) TAEA, CH₂Cl₂; d) Fmoc-Phe-OH, EDC, *i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂, 20%, e) Ac₂O, *i*Pr₂NEt, 90%.

Für die Herstellung des Seitenketten-geschützten Rezeptorfragmentes **12** wurde eine Synthese an fester Phase gewählt und dafür mit dem äusserst Säure-labilem SieberAmid-Harz gearbeitet. Nach dem Entschützen der Fmoc-Aminofunktion des SieberAmid-Linkers mit 20% Piperidin in DMF wurde das Harz mit der ersten Aminosäure, *N*- α -Fmoc-*O*-*tert*-Butyl-Tyrosin, beladen, indem sie mit DIC und HOBt aktiviert wurde (Schema 6). Die restlichen Aminosäuren wurden gemäss dem Standardprotokoll für SPPS von Fmoc-geschützten Aminosäuren gekuppelt. Dabei wurde HATU als Aktivierungsreagenz verwendet und 20% Piperidin in DMF zum Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe. Der *N*-Terminus wurde mit Acetanhydrid und Hünigs Base acetyliert und das Peptid **12** wurde unter Beibehaltung der Seitenketten-Schutzgruppen durch 1% TFA in CH₂Cl₂ abgespalten. Nach der Reinigung durch präparative HPLC wurde das Rezeptorfragment **12** in hoher Reinheit und mit einer Ausbeute von 54% erhalten (Schema 6).



Schema 6. Synthese des Rezeptorfragmentes **12**: a) i) Pip/DMF (1:4); ii) Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, DIC, HOBt, DMF; b) i) Pip/DMF (1:4); ii) Fmoc-Gln(Trt)-OH, HATU, *i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂; c) i) Pip/DMF (1:4); ii) Fmco-Phe-OH, HATU, *i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂; d) i) Pip/DMF (1:4); ii) Ac₂O, *i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂; e) 1% TFA in CH₂Cl₂.

Die synthetisierten Rezeptorfragmente **11** und **12** besitzen analog dem Diketopiperazin-Rezeptor **1** einen acetylierten *N*-Terminus und unterscheiden sich nur durch ihren *C*-Terminus. Im Weiteren sollten die Eigenschaften der Fragmente auf ihre Selbst-Organisation in wässriger Umgebung untersucht werden.

4.2.2 Selbst-Organisation der Rezeptorfragmente in wässriger Umgebung

Die Rezeptorfragmente **11** und **12** besitzen wie der Diketopiperazin-Rezeptor (**1**) eine sehr gute Löslichkeit in THF, so dass die Experimente wie zuvor mit Rezeptor **1** durchgeführt wurden. Dafür wurden Stammlösungen der Verbindungen mit einer Konzentration von 1.0 mM in THF verwendet, die mit entsprechenden Volumina an Wasser verdünnt wurden, um sie anschliessend auf die Ausbildung von makroskopischen Strukturen zu untersuchen. Beim Verdünnen der konzentrierten THF-Lösungen von **11** und **12** mit Wasser bildeten sich wie zuvor mit Rezeptor **1** beobachtet, kolloidale Lösungen. Diese wurden zunächst mit Lichtstreuungsexperimenten untersucht.

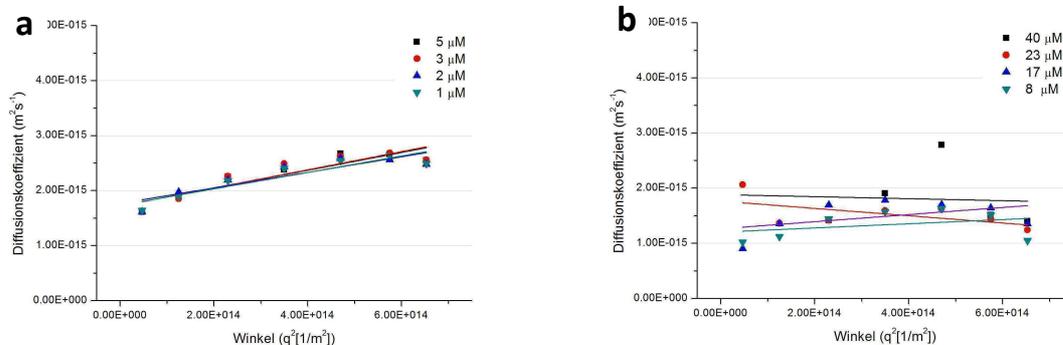


Abb. 33: DLS-Bestimmung der Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit des Streuwinkels für Rezeptorfragment **11** (a) und **12** (b).

Während die Lösung aus dem Rezeptorfragment **11** wie der ursprüngliche Rezeptor **1** bereits bei einer Konzentration von 5 μM eine ausreichende Streulichtintensität lieferte, mussten für die Verbindung **12** zehnmal höhere Konzentrationen verwendet werden, um eine vergleichbare Signalstärke zu erreichen. Das deutet darauf hin, dass durch den fehlenden Dispers Rot-Farbstoff sehr viel mehr Moleküle für den Aufbau der Partikel benötigt werden.

Während die aus **11** geformten Partikel eine sehr homogene Verteilung besitzen, wie sich an den Graphen mit gleicher Steigung und Achsenabschnitte zeigt (Abb. 33a), streuen die einzelnen Diffusionskoeffizienten für die Partikel aus **12** über einen weiten Bereich (Abb. 33b). Dies lässt sich auch an den unterschiedlichen Polydispersitäten der kolloidalen Lösungen erkennen. Für die Partikel, gebildet aus Fragment **11** lassen sich sehr ähnliche Diffusionskonstanten für die verschiedenen Verdünnungen bestimmen, so dass sich ein sehr guter mittlerer R_h von 121 nm für die Partikel ergibt und auf die geringe Polydispersität der Lösung zurückzuführen ist.

Rezeptorfragment 11				Rezeptorfragment 12			
c [μM]	K_{Diff} [m^2s^{-1}]	PD [%]	R_h [nm]	c [μM]	K_{Diff} [m^2s^{-1}]	PD [%]	R_h [nm]
5	$(1.72 \pm 0.37)\text{E-15}$	16	124 ± 16	40	$(1.89 \pm 0.52)\text{E-15}$	29	114 ± 24
3	$(1.72 \pm 0.38)\text{E-15}$	17	124 ± 17	23	$(1.76 \pm 0.17)\text{E-15}$	16	122 ± 10
2	$(1.77 \pm 0.34)\text{E-15}$	15	122 ± 15	17	$(1.26 \pm 0.22)\text{E-15}$	19	170 ± 25
1	$(1.73 \pm 0.34)\text{E-15}$	15	123 ± 15	8	$(1.20 \pm 0.20)\text{E-15}$	18	179 ± 16
\emptyset	$(1.78 \pm 0.03)\text{E-15}$		121 ± 2	\emptyset	$(1.04 \pm 0.16)\text{E-15}$		206 ± 27

Tab. 4: Parameter der linearen Regression für die Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit der Konzentration.

Die aus der Verbindung **12** entstandenen Teilchen weisen im Gegenteil dazu eine höhere *PD* auf und zeigen bei niedrigeren Konzentrationen sogar eine andere Grössenverteilung an. Während die gebildeten Partikel aus dem Rezeptorfragment **11** eine konstante Grössenverteilung aufweisen (gleiche Achsenabschnitte, Abb. 33a), zeigt die kolloidale Lösung aus **12** ein weniger stabiles Verhalten; die gebildeten Partikel aus **12** zeigen zu Beginn eine einzige Grössenverteilung zwischen 114 und 122 nm (Tab. 4), die allerdings im Verdünnungsverlauf weiter ansteigt und zu Partikel mit einem R_h von zwischen 170 und 180 nm führt. Dies deutet auf eine geringere Stabilität der Partikel, die aus der Selbst-Organisation von **12** entstehen. Dies äusserte sich ebenfalls in einer erschwerten Handhabung der kolloidalen Lösung aus dem Rezeptorfragment **12**, welche teilweise keinerlei Messungen zulies, da die Partikel bereits auf das Einstrahlen des Lasers Veränderungen zeigten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Dispers Rot-Farbstoff einen deutlichen Einfluss auf die Ausbildung der Partikel hat, indem er die gebildeten Strukturen durch zusätzliche Wechselwirkungen stabilisiert. Nichtsdestotrotz konnten aber auch TEM-Bilder der entstandenen Partikel aufgenommen werden. Die TEM-Bilder aus Abbildung 34 zeigen exemplarische Aufnahmen der Teilchen, die entstehen, wenn Lösungen aus Rezeptorfragment **11** (Abb. 34a) bzw. **12** (Abb. 34b) in THF mit Wasser vermischt werden. Sie zeigen jeweils sphärische Partikel mit einem Durchmesser von über 200 nm und stützen damit die gefundenen Grössenverteilungen der DLS-Messungen.

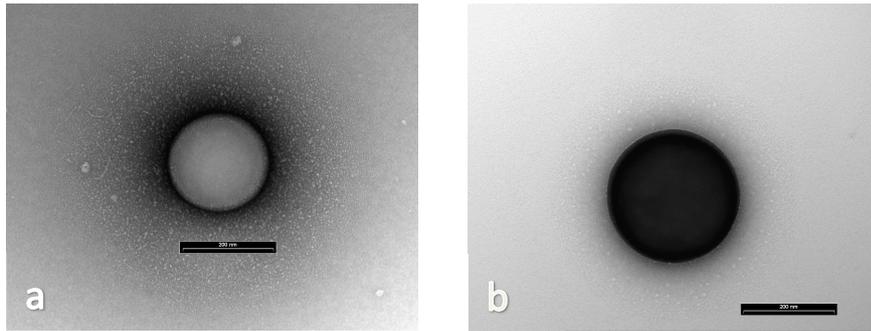


Abb. 34: (a) TEM-Bilder der Partikel, gebildet aus Rezeptorfragment **11**. (b) TEM-Aufnahme der Partikel aus Verbindung **12** (Massstab: 200 nm).

Im Gegensatz zu den Diketopiperazin-Vesikeln besitzen die Teilchen einen homogenen Elektronenkontrast und weniger eine ringförmige Struktur (vgl. Abb. 27), was typisch für weiche, verformte Vesikel ist.³⁹ Während die Partikel aus Rezeptorfragment **11** einen schwächeren Elektronenkontrast zur Umgebung besitzen, ist aus Verbindung **12** ein sehr stark gefärbtes Teilchen entstanden. Dies ist bei weichen Vesikeln ein deutliches Anzeichen für eine unterschiedlich dicht gepackte Doppelschicht der Membran.^{39,50} Zusammen mit den benötigten höheren Konzentrationen in den DLS-Versuchen lässt sich folgern, dass hier beim Aufbau der Vesikel-Wand sehr viel mehr Moleküle beteiligt sind als bei dem Rezeptorfragment mit Dispers Rot (**11**).

Da die Rezeptorfragmente **11** und **12** bereits ihre Fähigkeit zur Selbst-Organisation in wässriger Umgebung bewiesen haben, ergibt sich die Frage, ob diese reduzierten Strukturen auch in der Lage wären intermolekulare Wechselwirkungen zu dem komplementären Peptid **2d** aufzubauen. In den Versuchen an der Festphase zur Identifizierung der Peptidsequenz, die durch den Diketopiperazin-Rezeptor **1** erkannt und gebunden wird, war die zweiarmige Struktur essentiell für die Ausbildung des Host-Guest Komplexes.^{33a} Versuche zur molekularen Erkennung zwischen Rezeptorfragmenten **11** und **12** zu dem pegyliertem Peptid **2d**, sollten klären ob diese Notwendigkeit auch für die Selbst-Organisation in wässriger Umgebung besteht.

4.2.3 Selbstorganisation der Rezeptorfragmente mit pegylierten Peptiden

4.2.3.1 Rezeptorfragment Ac-Phe-Gln(Trt)-Tyr(dye)-OMe (**11**)

Das Rezeptorfragment Ac-Phe-Gln(Trt)-Tyr(dye)-OMe, enthält den Dispers Rot-Farbstoff und stellt damit eine Kopie des Rezeptorarmes des Diketopiperazin-Rezeptors **1** dar. In den DLS-Experimenten zeigte das Fragment bereits die Fähigkeit, für sich alleine Vesikel zu bilden. Für die folgenden Tests zur molekularen Erkennung des ursprünglichen Substrats (**2d**) des Rezeptors **1** wurden die Fragmente **11** und **12** in THF gelöst, mit einer wässrigen Lösung des pegylierten Peptids **2d** gemischt anschliessend durch die Zugabe von Wasser auf die Ausbildung von makromolekularen Strukturen getestet. Die verwendeten Versuchsreihen bestehen aus der Mischung des Fragmentes **11** mit dem Peptid **2d**, das durch Rezeptor **1** gebunden wird und einem zweiten Kontrollexperiment in dem ein Peptid verwendet wurde, das nicht durch **1** erkannt wird; das Peptid-PEG-Konjugat Ac-D-Pro-Val-D-Gln(Trt)-PEG₁₄-Lys(Rhd)-NH₂ (**2f**) wurde in den Versuchen zur Selbst-Organisation mit **1** nicht gebunden und kann ausserdem durch seine Seitenketten-Schutzgruppe vermehrt hydrophobe Wechselwirkungen eingehen, womit sich auch nicht-selektive Wechselwirkungen testen lassen. Ein letztes Kontrollexperiment besteht aus der Mischung zwischen Fragment **11** und dem Carboxyrhodamin-Farbstoff (Rhd) alleine. Die zu Beginn hergestellten THF/Wasser-Mischungen (20 µl, 1mM) der einzelnen Komponenten wurden anschliessend mit der 25fachen Menge an Wasser verdünnt, womit sich die Vesikel-Bildung einleiten lässt. Die entstandenen kolloidalen Lösungen wurden zentrifugiert und die sedimentierten Partikel mit Wasser gewaschen, um überschüssiges Fluorophor zu entfernen.⁵⁰ Nach zweimaligem Waschen wurde der Niederschlag in möglichst wenig Wasser aufgenommen und die kolloidale Lösung mittels FCS untersucht.

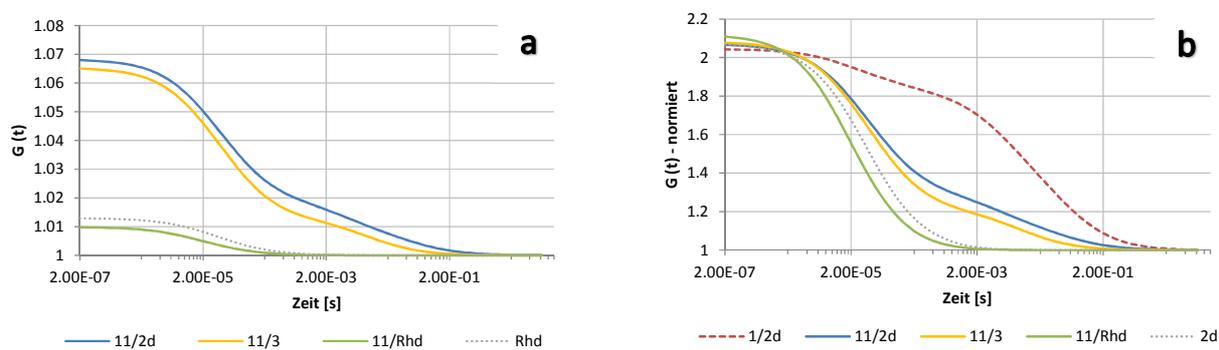


Abb. 35: Exponentielle Kurvenanpassung für die Autokorrelationsfunktion (a) der Versuchsreihe für das Rezeptorfragment **11** und ihre normierte Autokorrelationsfunktion (b).

Die aufgenommenen Autokorrelationsfunktionen zeigen für die Selbst-Organisation zwischen dem Rezeptorfragment **11** und dem pegylierten Peptid **2d** (selektive Bindung an Rezeptor **1**) bzw. **2f** (nicht selektive Bindung an **1**) Kurven, die in ihrem Verlauf sehr ähnlich aussehen und durch die leichte Schulter auf mehrere Komponenten in der Lösung hinweisen.^{47,49} Die Verwendung von Rhodamin in Kombination mit **11** zeigt lediglich eine Kurve, ähnlich der Referenzfunktion von frei gelöstem Farbstoff, so dass bereits gesagt werden kann, dass nur mit den Peptiden eine Form der Interaktion stattfindet und sich eine kolloidale Lösung bildet (Abb. 35). Die Betrachtung der normierten Autokorrelationsfunktionen zeigt zusätzlich den Vergleich zur der Selbst-Organisation zwischen dem Diketopiperazin-Rezeptor **1** und seinem Gast-Molekül **2d** (gestrichelte, rote Linie). Hierbei verdeutlicht sich der Unterschied zu der funktionierenden Selbst-Organisation durch molekulare Erkennung: Während mit dem Diketopiperazin-Rezeptor ein Grossteil der pegylierten Peptide in einem supramolekularen Ensemble strukturiert sind, wird mit dem Rezeptorfragment **11** nur ein Bruchteil der Liganden gebunden und dadurch in eine makroskopische Struktur eingefügt. Die Mischung von Carboxyrhodamin mit dem Fragment **11** führt zu keiner übergeordneten Struktur.

	Komponente I (freier Fluorophor)		Komponente II		Komponente III	
Sample (Anzahl*)	t _{Diff} [ms], Fraktion [%]	Radius [nm]	t _{Diff} [ms], Fraktion [%]	Radius [nm]	t _{Diff} [ms], Fraktion [%]	Radius [nm]
11/2d (16)	0.045 33 ± 43	-	4.3 ± 1.7 47 ± 8	140 ± 50	50 ± 18 23 ± 17	
11/2f (17)	0.045 79 ± 22	-	10.0 ± 12.0 21 ± 22	320 ± 300	-	-
11/Rhd (114)	0.030 10 ± 29	-	0.025 90 ± 29	-	-	-
1·2d (2.5)	0.045 73 ± 39	-	4.0 ± 1.7 26 ± 33	130 ± 50	456 ± 230 1 ± 10	1500 ± 500

*Durchschnittliche Anzahl der Teilchen im Messvolumen

Tab. 5: Parameter der exponentiellen Kurvenanpassung für die Autokorrelationsfunktion.

Bei der Betrachtung der Parameter für die exponentiellen Kurvenanpassungen zeigt sich allerdings, dass aus der Kombination von **11** und pegyliertem Peptid (**2d**) ein Teil der Moleküle sich zu Partikeln zusammenlagert, die einen hydrodynamischen Radius von ca. 140 nm besitzen. Dies deutet auf sehr ähnliche Partikel wie sie sich auch durch die Selbst-Organisation aus dem Diketopiperazin-Rezeptor **1**

und dem pegyliertem Peptid **2d** bilden. Allerdings entstehen mit dem Fragment **11** sehr viel weniger Partikel, so dass ein Grossteil des Liganden (**2d**) in frei gelöster Form vorliegt. Die Mischung mit dem Testpeptid (**2f**) führt dagegen zu einer Lösung aus sehr viel weniger Partikeln mit längeren Diffusionszeiten und ist dadurch schwer einzuordnen.

Zusammengenommen lässt sich sagen, dass auch das Rezeptorfragment **11** eine gewisse Affinität zu dem pegyliertem Peptid (**2d**) besitzt und damit Partikel oder Aggregate gebildet werden, die jedoch im Vergleich zu den aus **1** und **2d** entstandenen Vesikeln eine geringere Stabilität besitzen. Die Beobachtung, dass beim Mischen von **11** und **2f** ebenfalls Partikel gebildet werden, zeigt, dass die Bindung des Fragmentes **11** an Tripeptide weniger spezifisch für das pegylierte Peptid **2d** erfolgt als dies für den Rezeptor **1** der Fall ist. Diese Experimente zeigen, dass die grössere Komplexität und rigidere Struktur für die spezifischen Bindung gegenüber dem Peptid **2d** und für eine höhere Stabilität der Vesikel verantwortlich ist.

Da mit dem Dispers Rot-Farbstoff eine sehr hydrophobe Struktur in dem Fragment **11** enthalten ist, die Einfluss auf die Aggregation der Komponenten nehmen kann, wurde mit dem Rezeptorfragment **12** untersucht, inwieweit sich der Farbstoff auf die Selbst-Organisation mit pegylierten Peptiden auswirkt.

4.2.3.2 Rezeptorfragment Ac-Phe-Gln(Trt)-Tyr(O^tBu)-NH₂ (**12**)

In dem Diketopiperazin-Rezeptor (**1**) sollten die seitlichen Arme mögliche Bindungsstellen liefern, die für die molekulare Erkennung von Peptiden benötigt werden.³³ Durch die Verwendung des pegylierten Substrats (**2d**) war es möglich mit **1** in Wasser Vesikel zu bilden, die auf der molekularen Erkennung beruhen und durch selektive nicht-kovalente Wechselwirkungen entstehen. Analoge Versuche mit dem Rezeptorarm alleine zeigen einen starken Verlust an Selektivität und Stabilität, aber auch die inhärente Fähigkeit des Rezeptorarmes zur molekularen Erkennung des komplementären Peptides **2d**. Da sowohl der Diketopiperazin-Rezeptor als auch die Fragmente in der Lage sind auch alleine makromolekulare Strukturen zu bilden, scheinen neben den selektiven Wechselwirkungen zwischen den komplementären Peptidstrukturen auch hydrophobe Wechselwirkungen für diese Selbst-Organisation eine Rolle zu spielen. Mit der Verwendung des Rezeptorfragments **12**, einem einfachen Seitenketten-geschütztem Tripeptid, sollen die beiden unterschiedlichen Einflüsse weiter untersucht werden. Dabei wurden erneut Mischungen aus Rezeptorfragment **12** mit dem komplementären Peptid (**2d**), dem Testpeptid (**2f**), das nicht durch den Rezeptor **1** gebunden wird und Rhodamin alleine hergestellt. Die Mischungen der Komponenten

in einer THF/Wasser (1:1)-Lösung wurden durch Zugabe des 25fachen Volumens an Wasser, auf die Ausbildung von Partikeln getestet.

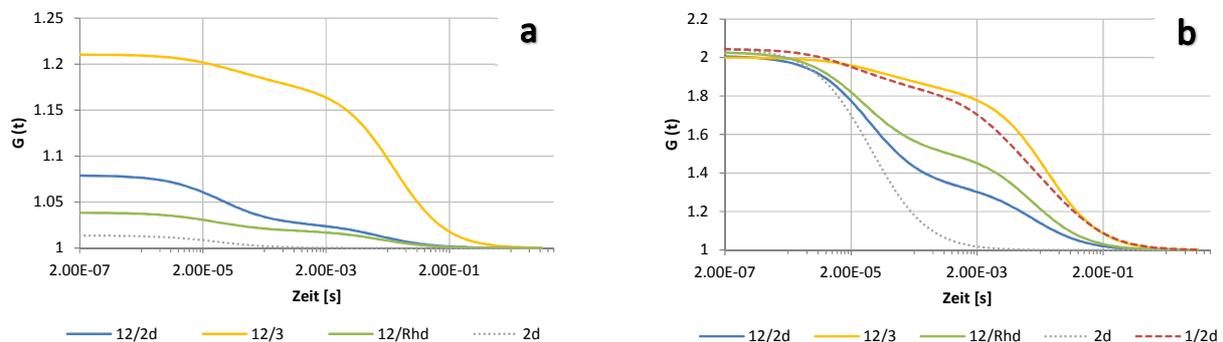


Abb. 36: Exponentielle Kurvenanpassung für die Autokorrelationsfunktion (a) der Versuchsreihe für das Rezeptorfragment **12** und ihre normierte Autokorrelationsfunktion (b).

Interessanterweise, ergibt sich hier ein vollständig anderes Verhalten für die Wechselwirkung zwischen Rezeptor-Arm und dem potentiellen Gast-Molekül. Die Autokorrelationsfunktion für die Mischung aus **12** mit dem Testpeptid (**2f**) zeigt die stärkste Amplitude, besitzt also im Vergleich weniger Teilchen pro Volumen;^{47,49} dies zeigt, dass ein Grossteil der fluoreszierenden Moleküle in einer Einheit gebunden vorliegen. Die Kurven von **12** und dem Peptid **2d** (selektive Bindung an Rezeptor **1**) bzw. dem Farbstoff alleine verlaufen sehr ähnlich und zeigen allein Unterschiede in der Anzahl beteiligter Teilchen, nicht aber in den Diffusionszeiten der beteiligten Partikel (Tab. 5). Die normierten Funktionen verdeutlichen die Menge und Grössenverteilung der Partikel aus **12** und **2f** im Vergleich zu der Selbst-Organisation aus Diketopiperazin-Rezeptor **1** und pegyliertem Peptid **2d**, welche sehr viel kleinere Partikel hervorbrachte. Die beiden Kurven (orange, rot; Abb. 37) besitzen im frühen Kurvenverlauf eine geringe Steigung, entstanden durch die langsamen Diffusionszeiten grosser Partikel, und weisen nur einen geringen Unterschied in der Lage der Wendepunkte auf. Die Kurven für das komplementäre Peptid (**2d**) und Rhodamin hingegen folgen zu Beginn eher dem Verlauf frei gelösten Peptides bzw. Fluorophors und zeigen erst spät das Auftreten von Partikeln mit relativ hohen Diffusionszeiten, wie sich auch in den Parametern der exponentiellen Kurvenanpassung sehen lässt.

	Komponente I (freier Fluorophor)		Komponente II		Komponente III	
Sample (Anzahl*)	t_{Diff} [ms], Fraktion [%]	Radius [nm]	t_{Diff} [ms], Fraktion [%]	Radius [nm]	t_{Diff} [ms], Fraktion [%]	Radius [nm]
12/2d (16)	0.045 67 ± 8	-	15.0 ± 4.7 33 ± 8	490 ± 150		
12/2f (17)	0.045 17 ± 12	-	26.0 ± 1.2 83 ± 12	840 ± 40	-	-
12/Rhd (114)	0.035 50 ± 25	-	14.9 ± 8 50 ± 25	470 ± 280	-	-
1-2d (2.5)	0.045 73 ± 39	-	4.0 ± 1.7 26 ± 33	130 ± 50	456 ± 230	1500 ± 500

*Durchschnittliche Anzahl der Moleküle/Partikel im Messvolumen

Tab. 6: Parameter der exponentiellen Kurvenanpassung für die Autokorrelationsfunktionen.

Sowohl in den Versuchen mit dem komplementären Peptid (**2d**) als auch mit Rhodamin zeigen die Proben das Auftreten sehr grosser Partikel mit einem hydrodynamischen Radius von knapp 500 nm. Überraschenderweise zeigen sich hier keine Unterschiede in der Grössenverteilung, so dass vermutet werden kann, dass hierbei hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen zur Aggregation beider Komponenten führen. Die Mischung aus dem Fragment **12** und dem Testpeptid (**2f**), zeigt eine fast vollständige Anordnung des pegylierten Peptides in eine makromolekulare Struktur ($R_h = 800$ nm). Da dieses Peptid zusätzliche aromatische Gruppen (Trt-Schutzgruppe) in das System einbringt unterliegt die Selbst-Organisation einem noch stärkeren hydrophoben Effekt, der ebenfalls für eine Aggregation der Moleküle verantwortlich ist. Zusammen zeigen diese Versuchsreihen, dass die Selektivität der ursprünglichen Rezeptor-Ligand-Bindung völlig verloren geht und sich durch die Verwendung des Fragmentes **11** nur mehr unspezifische Aggregate bilden lassen.

4.3 Zusammenfassung

Die Struktur des zwei-armigen Rezeptors **1** mit dem starren Diketopiperazin-Grundgerüst, den peptidischen Armen und dem Dispers Rot-Farbstoff ist in der Lage, sowohl das Peptid-PEG-Konjugat Ac-D-Val-D-Val-D-His-PEG zu binden als auch die modifizierte Version Ac-D-Val-D-Val-D-His-PEG-Lys(Rhd) und in Wasser eine hierarchische Selbstorganisation von dem Rezeptor-Ligand Komplex hin zu einem makromolekularem Vesikel zu vollziehen. Dieser Prozess läuft selektiv ab und erfolgt nicht mit anderen pegylierten Peptiden, die nicht von **1** gebunden werden.

Unabhängig von diesem „programmierten“ Aufbau kann sich der Rezeptor **1** auch alleine in einer alternativen Vesikel-Struktur arrangieren. Dafür benötigt er nur Zeit, um bereits in der THF-Lösung eine bestimmte Präorganisation zu vollziehen, die dann beim Verdünnen mit Wasser zu einer stabilen makromolekularen Anordnung führt.

Die geformten Partikel wurden mit Hilfe von DLS- und TEM-Messungen charakterisiert und durch Einschluss-Versuche wurde ihre vesikuläre Struktur nachgewiesen. Um mehr über die verschiedenen Triebkräfte und strukturellen Voraussetzungen für diese Form der Selbst-Organisation zu erfahren, wurde der Rezeptorarm mit und ohne Dispers Rot synthetisiert und auf seine Fähigkeit zur Selbst-Organisation getestet. Dabei zeigte sich, dass diese Fragmente beim Verdünnen mit Wasser ebenfalls in der Lage sind, makroskopische Strukturen auszubilden, die aber im Vergleich zu den Diketopiperazin-Vesikeln geringere Stabilitäten aufweisen. Besonders das Fragment **12** ohne Dispers Rot zeigte in den DLS-Analysen eine instabile makromolekulare Struktur. So lässt sich folgern, dass der hydrophobe Farbstoff durchaus an der Ausbildung von intermolekularen Wechselwirkungen beteiligt ist und in wässriger Umgebung stabilisierend auf die angeordneten Strukturen wirkt.

Inwieweit diese Erkenntnisse auf die molekulare Erkennung des pegylierten Liganden **2d** übertragbar sind, sollte durch Untersuchungen zu möglichen Host-Guest-Komplexen geklärt werden. Dafür wurden frisch hergestellte Lösungen der Fragmente mit dem Ligand (**2d**), dem Testpeptid (**2f**) oder Carboxyrhodamin gemischt und dann auf die Ausbildung makromolekularer Strukturen getestet. Die Versuche zeigten, dass das Fragment **11** mit Dispers Rot nur noch bedingt zur Bindung des Substrates (**2d**) fähig ist und die Vesikel-Bildung dadurch sehr eingeschränkt wird. Trotzdem konnten Partikel mit ähnlichen Diffusionszeiten wie mit dem Diketopiperazin-Rezeptor (**1**) nachgewiesen werden und auch die Versuche mit dem Testpeptid **2f** zeigten das Auftreten von Partikeln. Dadurch lässt sich sagen, dass die Selektivität der Rezeptor-Ligand-Bindung verloren geht bei der Verwendung des einzelnen Rezeptorarmes. Dies zeigt sich noch deutlicher bei der Verwendung des Fragments **12** ohne Dispers Rot, das die stabilste makromolekulare Struktur mit dem Testpeptid (**2f**) einging. Dennoch zeigt sich, dass die grundlegende Architektur von der Wechselwirkung zwischen einem hydrophoben Peptid und einem zweitem pegylierten Peptid zur Ausbildung von makromolekularen Strukturen führen können.

4.4 Literaturverzeichnis

- [1] (a) Lehn, J.-M., 'Supramolecular chemistry – scope and perspectives molecules, supermolecules, and molecular devices (Nobel Lecture)', *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 89–112. (b) Cram, D. J., 'The design of molecular hosts, guests, and their complexes (Nobel Lecture)', *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 1009–1020. (c) Pedersen, C. J., 'The discovery of crown ethers (Nobel Lecture)', *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 1021–1027.
- [2] (a) J.-M. Lehn, *Pure Appl. Chem.* **1978**, 50, 871-873. (b) J.-M. Lehn, J. Simon, J. Wagner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1973**, 12, 578-579. (c) J.-M. Lehn, *Struct. Bonding* (Berlin), **1973**, 16, 1. (c) E. P. Kyba, R. C. Helgeson, K. Madan, G. W. Gokel, T. L. Tarnowski, S. S. Moore, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 2564–2571.
- [3] P. Karrer, *J. Chem. Educ.* **1958**, 35, 392-396.
- [4] (a) J.-M. Lehn, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 4763–4768. (b) J.-M. Lehn, *Proc. Indian Acad. Sci.* **1994**, 106, 915-922
- [5] E. Fischer, *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.* **1894**, 27, 2985-2988.
- [6] J. Meeuwissen, J. N. H. Reek, *Nature Chem.* **2010**, 2, 615-621.
- [7] (a) R. Breslow, *Artificial Enzymes* (1st Ed.), Wiley, **2005**. (b) R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 146-153. (c) J. Rebek, *Acc. Chem. Res.* **1984**, 17, 258-264. (c) J. Rebek, *Acc. Chem. Res.* **1984**, 17, 258-264.
- [8] (a) G. M. Whitesides, B. Grzybowski, *Science* **2002**, 295, 2418–2421. (b) J. S. Lindsey, *New J. Chem.* **1991**, 15, 153–180.
- [9] (a) T. B. Schuster, A. Mantion, W. Meier, *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 14583-14590. (b) C. Dittrich, W. Meier, *Macromol. Biosci.* **2010**, 10, 1406-1415. (c) S. Egli, B. Fischer, S. Hartmann, P. Hunziker, W. Meier, P. Rigler, *Macromol. Symp.* **2010**, 296, 278-285. (d) S. Egli, H. Schlaad, N. Bruns, W. Meier, *Polymers (Basel, Switz.)* **2011**, 3, 252-280. (f) W. Meier, N. Bruns, *Chimia* **2010**, 64, 660-661. (g) R. Nehring, C. G. Palivan, O. Casse, P. Tanner, J. Tuxen, W. Meier, *Langmuir* **2009**, 25, 1122-1130. (h) T. B. Schuster, D. d. B. Ouboter, N. Bruns, W. Meier, *Small* **2011**, 7, 2158-2162. (i) P. Tanner, P. Baumann, R. Enea, O. Onaca, C. Palivan, W. Meier, *Acc. Chem. Res.*, ACS ASAP. (j) P. Broz, S. Driamov, J. Ziegler, N. Ben-Haim, S. Marsch, W. Meier, P. Hunziker, *Nano Lett.* **2006**, 6, 2349-2353.
- [10] (a) S. Burke, H. Shen, A. Eisenberg, *Macromol. Symp.* **2001**, 175, 273-283. (b) B. M. Discher, D. A. Hammer, F. S. Bates, D. E. Discher, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, 5, 125-131. (c) B. M. Discher, Y.-Y. Won, D. S. Ege, J. C. M. Lee, F. S. Bates, D. E. Discher, D. A. Hammer, *Science* **1999**, 284, 1143-1146. (d) D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science* **2002**, 297, 967-973. (e) H. Shen, A. Eisenberg, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 3310-3312. (f) P. L. Soo, A. Eisenberg,

- J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2004**, *42*, 923-938. (g) L. Zhang, A. Eisenberg, *Science* **1995**, *268*, 1728-1731.
- [11] J. Lubkoll, H. Wennemers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 6841-6844.
- [12] (a) G. W. Gokel, *Crown Ethers*, Royal Society of Chemistry: Cambridge, **1990**. (b) B. P. Hay, R. D. Hancock, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *212*, 61-78. (c) D. J. Cram, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 1039-1134. (d) F. M. Menger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 4818-4822.
- [13] (a) T. W. Bell, D. L. Beckles, P. J. Cragg, J. Liu, J. Maioriello, A. T. Papoulis, V. J. Santora, *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition* (Hrsg.: A. W. Czarnik), ACS Books, Washington, DC, **1993**, S. 85-103. (b) T. W. Bell, J. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3673-3674. (c) T. W. Bell, Z. Hou, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1601-1603.
- [14] (a) V. Hegde, C.-Y. Hung, P. Madhukar, R. Cunningham, T. Hopfner, R. P. Thummel, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 872-878. (b) V. Hegde, P. Madhukar, J. D. Madura, R. P. Thummel, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4549-4550.
- [15] M. Crego, J. J. Marugin, C. Raposo, M. J. Sanz, V. Alcazar, M. C. Caballero, J. R. Moran, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4185-4188.
- [16] J. E. Trend, C. A. Kipke, M. Rossmann, M. Yafuso, S. L. Patil, U.S. Patent 5, 474, 743, **1993**. [16]
- [17] (a) J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle, *Comprehensive Supramolecular Chemistry* (1 ed.), Pergamon: Oxford, **1996**, Vol. 3. (b) J. Szejtli, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 1743-1753. (c) E. M. M. Del Valle, *Process Biochemistry*, **2004**, *39*, 1033-1046.
- [18] (a) J. Kim, I.-S. Jung, S.-Y. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 540-541. (b) A. I. Day, R. J. Blanch, A. P. Arnold, S. Lorenzo, G. R. Lewis, I. Dance, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 275-277. (c) S. M. Liu, P. Y. Zavalij, I. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16798-16799. (d) K. Kim, N. Selvapalam, Y. H. Ko, K. M. Park, D. Kim, J. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 267-279. (e) K. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 96-107.
- [19] (a) S. Y. Cho, H. R. Allcock, *Macromolecules* **2009**, *42*, 4484-4487.
- [20] Für Übersichtsartikel siehe: (a) G. Chen, M. Jiang, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2254-2266. (b) X. Zhang, C. Wang, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 94-101. (c) S. K. Yang, A. V. Ambade, M. Weck, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 129-137. Für Beispiele siehe: (a) Q. Yan, J. Yuan, Z. Cai, Y. Kang, Y. Yin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9268-9270. (b) D. Xie, M. Jiang, G. Zhang, D. Chen, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3346-3353. (c) B. Song, G. Wu, Z. Wang, X. Zhang, *Langmuir*, **2009**, *25*, 13306-13310. (d) S. K. Yang, A. V. Ambade, M. Weck, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1637-1645. (e) K. Wang, D.-S. Guo, X. Wang, Y. Liu, *ACS Nano* **2011**, *4*, 2880-2894.
- [21] Für Übersichtsartikel siehe: (a) J. Voskuhl, B. J. Ravoo, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 495-505. (b) C. M. Paleos, D. Tsiourvas, Z. Sideratou, *ChemBioChem*. **2011**, *12*, 510-521. (c) S. Egli, H. Schlaad, N. Bruns, W. Meier, *Polymers*, **2011**, *3*, 252-280.

- [22] (a) M. Guo, M. Jiang, G. Zhang, *Langmuir*, **2008**, *24*, 10583-10586. (b) J. Voskuhl, T. Fenske, M. C. A. Stuart, B. Wibbeling, C. Schmuck, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8300-8306. (c) C. W. Lim, O. Crespo-Biel, M. C. A. Stuart, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, B. J. Ravoo, *PNAS* **2007**, *104*, 6986-6991. (d) D. Kim, E. Kim, J. Kim, K. M. Park, K. Baek, M. Jung, Y. H. Ko, W. Sung, H. S. Kim, J. H. Suh, C. G. Park, O. S. Na, D.-K Lee, K. E. Lee, S. S. Han, K. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3471-3474. (e) E. Kim, D. Kim, H. Jung, J. Lee, S. Paul, N. Selvapalam, Y. Yang, N. Lim, C. G. Park, K. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1-5.
- [23] Für Übersichtsartikel siehe: (a) I. W. Hamley, *Soft Matter* **2011**, *7*, 4122-4138. (b) S. Cavalli, F. Albericio, A. Kros, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 241-263. (c) D. W. P. M. Löwik, J. C. M. van Hest, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 234-245.
- [24] (a) T. B. Schuster, D. de Bruyn Ouboter, N. Bruns, W. Meier, *Small*, **2011**, *7*, 2158-2162. (b) S. S. Santoso, S. Vauthey, S. Zhang, *Curr. Opin. Colloid In.* **2002**, *7*, 262-266. (c) E. P. Holowka, D. J. Pochan, T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12423-12428. (d) E. G. Bellomo, M. D. Wyrsta, L. Pakstis, D. J. Pochan, T. J. Deming, *Nat. Mat.* **2004**, *3*, 244-248. (e) H. Iatrou, H. Frielinghaus, S. Hanski, N. Ferderigos, J. Ruokolainen, O. Ikkala, D. Richter, J. Mays, N. Hadjichristidis, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2173-2181. (f) C. Schatz, S. Louguet, J.-F. Le Meins, S. Lecommandoux, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2572-2575.
- [25] (a) C. Schmuck, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3053-3067. (b) A. S. M. Ressurreição, R. Delatouche, C. Gennari, U. Piarulli, *Eur. J. Org. Chem* **2011**, 217-228.
- [26] (a) W. C. Still, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 155-163. (b) W. C. Still, *Allured*, **1997**, pp. 223-229. (c) H. Wennemers, S. S. Yoon, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1108-1109. (d) S. S. Yoon, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 823-824. (e) S. S. Yoon, W. C. Still, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 567-578.
- [27] (a) P. Mitchell, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *95*, 1-20. (b) J. Ovàdi, P. A. Srere, *Int. Rev. Cytol.* **2000**, *192*, 255.
- [28] N. T. S. Phan, C. S. Gill, J. V. Nguyen, Z. J. Zhang, C. W. Jones, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2209-2212.
- [29] (a) A. T. Wright, E. V. Anslyn, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 14. (b) A. T. Wright, E. V. Anslyn, J. T. McDevitt, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17405.
- [30] (a) C. Gennari, H. P. Nestler, B. Salom, W. C. Still, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1765. (b) D. W. P. M. Löwik, M. D. Weingarten, M. Broekema, A. J. Brouwet, W. C. Still, R. M. J. Liskamp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1846. (c) D. W. P. M. Löwik, S. J. E. Mulders, Y. Cheng, Y. Shao, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8253.
- [31] (a) M. Bonnat, M. Bradley, J. D. Kilburn, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5409. (b) M. Davies, M. Bonnat, F. Guillier, J. D. Kilburn, M. Bradley, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8696. (c) T. Fessmann, J.

- D. Kilburn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1993. (d) T. Braxmeier, M. Demarcus, T. Fessmann, S. McAteer, J. D. Kilburn, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1889. (e) E. Botana, S. Ongeri, R. Arienzo, M. Demarcus, J. G. Frey, U. Piarulli, D. Potenza, J. D. Kilburn, C. Gennari, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4625. (f) R. Arienzo, J. D. Kilburn, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 711. (g) E. Botana, S. Ongeri, M. Demarcus, J. G. Frey, U. Piarulli, D. Potenza, C. Gennari, J. D. Kilburn, *Chem. Commun.* **2001**, 1358. (h) K. B. Jensen, T. M. Braxmeier, M. Demarcus, J. G. Frey, J. D. Kilburn, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1300. (i) J. Shepherd, T. Gale, K.B. Jensen, J. D. Kilburn, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 713.
- [32] Für Übersichtsartikel über den Einsatz kombinatorischer Chemie siehe: (a) N. Srinivasan, J.D. Kilburn, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 305. (b) B. Linton, A.D. Hamilton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 307. (c) Y.R. DeMiguel, J.M.K. Sanders, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 417. (d) W.C. Still, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 155.
- [33] (a) M. Conza, H. Wennemers, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2696-2698. (b) M. Conza, H. Wennemers, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2003**, 866-867. (c) H. Wennemers, M. Conza, M. Nold, P. Krattiger, *Chem.--Eur. J.* **2001**, *7*, 3342-3347.
- [34] (a) Y. Cheng, T. Suenaga, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1813-1814; (b) D. W. P. M. Löwik, M. D. Weingarten, M. Broekema, A. J. Brouwet, W. C. Still, R. M. J. Liskamp, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1947-1950; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1846-1850.
- [35] (a) M. J. Joralemon, S. McRae, T. Emrick, *Chemical Communications* **2010**, *46*, 1377-1393. (b) M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 459-476. (c) F. M. Veronese, *Biomaterials* **2001**, *22*, 405-417. (d) J. Grun, J. D. Revell, M. Conza, H. Wennemers, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6197-6201.
- [36] M. Conza, Dissertation, Universität Basel (CH), **2002**.
- [37] J. Grun, Dissertation, Universität Basel (CH), **2007**.
- [38] P. J. Photos, L. Bacakova, B. Discher, F. S. Bates, D. E. Discher, *J. Controlled Release*, **2003**, *90*, 323-333.
- [39] (a) M. Yang, W. Wang, F. Yuan, X. Zhang, J. Li, F. Liang, B. He, B. Minch, G. Wegner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15107-15111. (b) T. Rehm, V. Stepanenko, X. Zhang, F. Wurthner, F. Grohn, K. Klein, C. Schmuck, *Organic Letters* **2008**, *10*, 1469-1472.
- [40] (a) P. Broz, S. M. Benito, C. Saw, P. Burger, H. Heider, M. Pfisterer, S. Marsch, W. Meier P. Hunziker, *J. Controlled Release* **2005**, *102*, 475-488. (b) F. Ahmed, R. I. Pakunlu, A. Brannan, F. Bates, T. Minko and D. E. Discher, *J. Controlled Release* **2006**, *116*, 150-158. (c) I. F. Uchegbu, *Expert Opin. Drug Delivery* **2006**, *3*, 629-640. (d) K. K. Upadhyay, A. N. Bhatt, A. K. Mishra, B. S. Dwarakanath, S. Jain, C. Schatz, J.-F. Le Meins, A. Farooque, G. Chandraiah, A. K. Jain, A. Misra and S. Lecommandoux, *Biomaterials* **2010**, *31*, 2882-2892.

- [41] (a) M. Grzelakowski, O. Onaca, P. Rigler, M. Kumar, W. Meier, *Small* **2009**, *5*, 2545-2548. (b) K. Renggli, P. Baumann, K. Langowska, O. Onaca, N. Bruns and W. Meier, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *accepted*; (c) C. Nardin, S. Thoeni, J. Widmer, M. Winterhalter and W. Meier, *Chem. Commun. (Cambridge)* **2000**, 1433-1434; (d) F. Axthelm, O. Casse, W. H. Koppenol, T. Nauser, W. Meier and C. G. Palivan, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 8211-8217; (e) C. De Vocht, A. Ranquin, R. Willaert, J. A. Van Ginderachter, T. Vanhaecke, V. Rogiers, W. Versees, P. Van Gelder and J. Steyaert, *J. Controlled Release* **2009**, *137*, 246-254; (f) S. F. M. van Dongen, M. Nallani, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte and J. C. M. van Hest, *Chem.--Eur. J.* **2009**, *15*, 1107-1114; (g) O. Onaca, D. W. Hughes, V. Balasubramanian, M. Grzelakowski, W. Meier and C. G. Palivan, *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 531-538; (h) P. Broz, S. Driamov, J. Ziegler, N. Ben-Haim, S. Marsch, W. Meier and P. Hunziker, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2349-2353.
- [42] (a) M. Beyermann, M. Bienert, H. Niedrich, L. A. Carpino, D. Sadat-Aalee, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 721-728. (b) L. A. Carpino, D. Sadat-Aalee, M. Beyermann, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1673-1675.
- [43] (a) A. Einstein, *Ann. Phys. (Leipzig)*, **1905**, *17*, 549–560. (b) M. von Smoluchowski, *Ann. Phys. (Leipzig)*, **1906**, *21*, 756–780. (c) J. Renn, *Ann. Phys. (Leipzig)*, **2005**, *14*, 23 – 37. (c) T. Franosch, M. Grimm, M. Belushkin, F. M. Mor, G. Foffi, L. Forro, S. Jeney, *Nature* **2011**, *478*, 85-88.
- [44] (a) P. W. Atkins, *Kurzlehrbuch der Physikalischen Chemie* (3. Aufl.), S. 671-674, Weinheim: Wiley-VCH, (2001). (b) A. Einstein, *Investigations on the Theory of Brownian Movement*, Dover, New York, (1956).
- [45] M. Hink (University of Amsterdam): *Fluorescence fluctuation spectroscopy*, unter: <http://home.medewerker.uva.nl/m.a.hink/page1.html>, (abgerufen am 28.11.2011).
- [46] B. Chu, *Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice* (1. Aufl.), Academic Press, Boston, (1991).
- [47] (a) P. Schwille, F.-J. Meyer-Almes, R. Rigler, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1878-1886. (b) R. Rigler, Z. Foldes-Papp, F.-J. Meyer-Almes, C. Sammet, M. Volcker, A. J. Schnetz, *Biotechnol.* **1998**, *63*, 97-109. (c) D. Magde, E. Elson, W. Webb, *Phys. Rev. Lett.* **1972**, *29*, 705-715. E. Elson, D. Magde, *Biopolymers*, **1974**, *13*, 1-27. (d) D. Magde, E. Elson, W. Webb, *Biopolymers*, **1974**, *13*, 29-61.
- [48] P. Atkins, J. De Paula, *Physical Chemistry*, (9. Aufl.), Oxford, University Press, (2010).
- [49] P. Schwille, E. Haustein, *Spektroskopie* **2009**, *94*, 1-33.
- [50] G. Hamasaka, T. Muto, Y. Uozumi, *Ang. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4876-4878.
- [51] P. Rigler, W. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 367-373.
- [52] Carl Zeiss, Application Manual: LSM510-Confocor2 – FCS, **2001**.

- [53] L. Reimer, H. Kohl, *Transmission Electron Microscopy – Physics of Image Formation* (5th Ed.), New York: Springer, **2008**.
- [54] (a) J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Science* **2001**, *294*, 1684-1686. (b) V. Marchi- Artzner, B. Lorz, U. Hellerer, M. Kantlehner, H. Kessler, E. Sackmann, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1095-1098.
- [55] (a) A. P. Nowak, V. Breedveld, L. Pakstis, B. Ozbas, D. J. Pine, D. Pochnan, T. J. Deming, *Nature* **2002**, *417*, 424-428. (b) H. Robson Marsden, A. V. Korobko, E. N. M. van Leeuwen, E. M. Pouget, S. J. Veen, N. A. J. M. Sommerdijk, A. Kros, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9386-9393.
- [56] M. López de la Paz, K. Goldie, J. Zurdo, E. Lacroix, C. M. Dobson, A. Hoenger, L. Serrano, *PNAS*, **2002**, *99*, 16052-16057.
- [57] Dies stellt einen schwierigen Gegensatz zu den Befunden von J. Grun dar; in ihren Arbeiten gab sie einen R_h von 50 nm für die Selbst-Organisation des Diketopiperazin-Rezeptors **1** in Gegenwart des pegylierten Peptides **2b** an.
- [58] (a) T. Kato, T. Seimiya, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 3159–3167. (b) P. H. Nelson, G. C. Rutledge, T. A. Hatton, *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 10777-10781.

B Spezieller Teil II: Amphiphile Peptide als Katalysatoren

Wie im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt wurde, lässt sich die molekulare Erkennung dazu verwenden Selbst-Organisationen höherer Ordnung in Wasser zu entwickeln, die auf der selektiven Bindung zwischen einem Rezeptor und seinem Substrat basieren.

Eine der stärksten Triebkräfte für solche Selbst-Organisationen sind amphiphile Eigenschaften der beteiligten chemischen Komponenten;¹ einfache Peptide bieten durch die Diversität, sowohl ihrer Strukturen als auch ihrer Reaktivitäten, eine ideale Grundlage für die Kombination von Selbst-Organisation und Katalyse. Einerseits sind bereits einfache Tripeptide in der Lage, stereoselektive Reaktionen organokatalytisch zu steuern² und andererseits bieten Peptide ideale Bausteine, um strukturelle Voraussetzungen für amphiphile Eigenschaften zu schaffen.³ So können schon kurze Peptide eine wohl definierte Sekundärstruktur einnehmen und ihr Lösungsverhalten lässt sich sehr leicht durch die Konjugation mit Polymeren oder Alkylketten beeinflussen.^{4,5}

1. Organokatalytische Aldolreaktionen in Wasser

In der Natur werden chemische Transformationen in der Regel durch katalytisch aktive Enzyme geregelt und umgesetzt. Die Aldolasen stellen dabei eine essentielle Enzymklasse dar, die sowohl in der Glycolyse, der Gluconeogenese als auch an dem Calvin-Zyklus beteiligt sind.⁶ Die katalysierten Aldolreaktionen sind nicht nur in der Natur von Bedeutung, sondern auch eine für den synthetischen Chemiker wichtige Transformation. Daher besteht ein überaus grosses Interesse, die in der Natur vorgegebenen katalytischen Selektivitäten und Aktivitäten auch durch die Verwendung von synthetischen, kleinen Molekülen zu erreichen. Während in rein organischen Lösungsmitteln durchgeführte Aldolreaktionen mit einer Vielzahl an Katalysatoren durchgeführt werden können,⁷ benötigt die Verwendung eines wässrigen Reaktionsmediums ohne organische Lösungsmittel Katalysatoren, die kompatibel zu den Bedingungen in Wasser sind.

Seit der Wiederentdeckung von Prolin als Organokatalysator für Aldolreaktionen konnte gezeigt werden, dass mit Prolin in organischen Lösungsmitteln sehr gute Enantioselektivitäten und Diastereoselektivitäten erreicht werden können; wenn auch hohe Katalysatorbeladungen und lange Reaktionszeiten benötigt wurden.⁸ Die Einführung von Wasser als Reaktionsmedium führte allerdings zu dem Verlust der Selektivität von Prolin. Erst mit der Verwendung von substituierten Prolin-Derivaten konnten Hayashi und Barbas zur gleichen Zeit hohe Enantioselektivitäten für Aldolreaktionen in Wasser beschreiben.^{9,10} Dabei werden die Aldolreaktionen in einer Emulsion aus

Wasser und den organischen Reagenzien durchgeführt, die einen hydrophoben Charakter der eingesetzten Katalysatoren voraussetzt, um eine entsprechende Löslichkeit des Katalysators in der organischen Phase zu erzielen.¹¹

Darauf folgte eine Vielzahl an verschiedensten Katalysatoren, die sich strukturell von Prolin ableiten und mit denen sich hohe Stereoselektivitäten erreichen lassen.^{11,12}

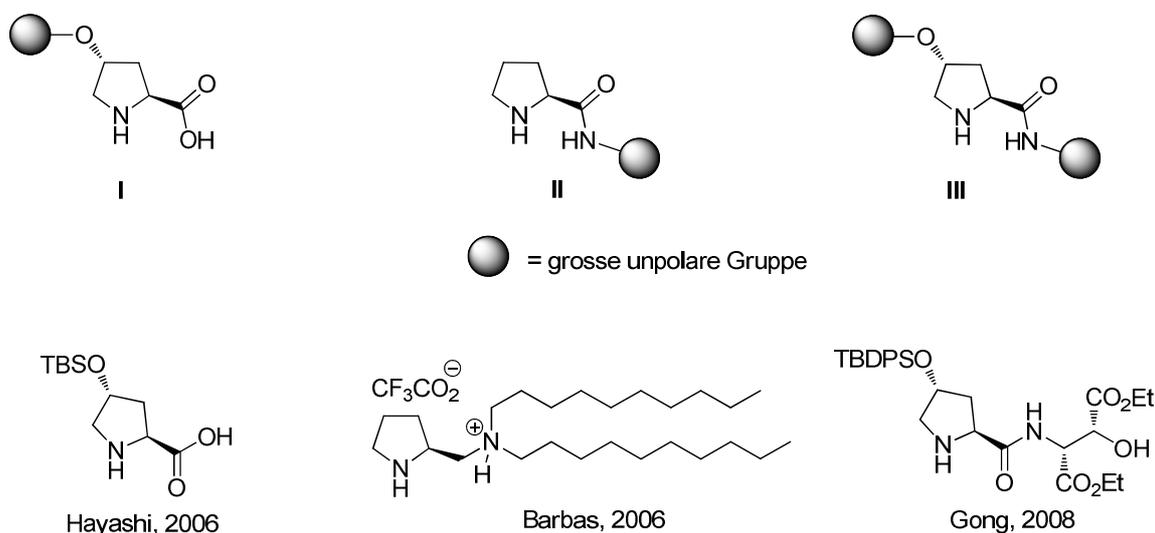


Abb. 1: Beispiele für Prolin-basierte Katalysatoren, die Wasser-kompatibel sind.⁹⁻¹³

Die entwickelten Organokatalysatoren lassen sich generell in drei Klassen unterteilen und tragen unterschiedliche Substituenten für die enthaltenen apolaren Gruppen, welche über die Säurefunktion von Prolin oder über eine Hydroxygruppe an C-4 eingeführt werden.¹²

Neben der Verwendung von substituierten Prolin-Derivaten finden sich auch einzelne Aminosäuren und kurze Peptide, mit denen sich relativ gute Stereoselektivitäten für Aldolreaktionen in Wasser erreichen lassen. Während aliphatische Aminosäuren wie L-Valin und L-Leucin nur moderate Stereoselektivitäten in der Reaktion von Cyclohexanon mit 4-Nitrobenzaldehyd induzieren können, lassen sich bereits mit L-Tryptophan deutliche Unterschiede in der Enantioselektivität erkennen.¹⁴

Weitere Beispiele zeigen einen erkennbaren Einfluss von Peptidbindungen, in denen es erst mit Peptiden gelingt gute Stereoselektivitäten in Wasser zu erreichen; in einer wässrigen Umgebung führen einzelne Aminosäuren wie L-Alanin oder L-Valin zu racemischen Produkten in der Reaktion von Cyclohexanon mit 4-Nitrobenzaldehyd, während die Verwendung der entsprechenden Di- und Tripeptide erst die gewünschten Stereoselektivitäten mit sich bringt.¹⁵

Um hohe Enantioselektivitäten zu erreichen, wurden allerdings organische Lösungsmittel zugesetzt und ausserdem benötigt die katalysierte Kondensation lange Reaktionszeiten (1-4 d) und hohe Katalysatorbeladungen (30 mol%).¹⁵ Ein weiteres Beispiel für Peptide als Katalysatoren in der

Aldolreaktion in Wasser ist das Dipeptid L-Pro-L-Trp, welches sich als effizienter Katalysator für cyclische Ketone und verschiedene Aldehyde zeigt; allerdings müssen hier der Reaktion Additive (NMM/SDS oder DABCO/PEG400) zugesetzt werden, um hohe Stereoselektivitäten zu erreichen.¹⁶

Die geringe Zahl an Beispielen für Peptide als Katalysatoren in einem wässrigen System zeigt, dass die Entwicklung von effizienten Katalysatoren keine triviale Aufgabe darstellt. Dabei ist gerade die Verwendung von peptidischen Bausteinen als Katalysatoren für Aldolreaktionen in Wasser ein überaus interessantes System, wenn man dadurch Erkenntnisse über den Ursprung der Homochiralität erlangen kann oder auch die evolutionäre Entwicklung der Enzyme aus der Gruppe der Aldolasen in Betracht zieht.

Mit dem Ziel die oben erwähnten Nachteile der hohen Katalysatorbeladungen und langen Reaktionszeiten zu überwinden, beschlossen wir das von uns entwickelte katalytisch aktive Peptid H-L-Pro-L-Pro-L-Asp-NH₂ (**14a**), welches sich als äusserst effizient für Aldolreaktionen in organischen Lösungsmitteln gezeigt hatte,^{18,19} auf seine Übertragung in eine wässrige Umgebung zu untersuchen.

2. Entwicklung eines asymmetrischen Katalysators für Aldolreaktionen in Wasser

Wie bereits beschrieben können Aminosäuren und Aminosäuren-Derivate als effiziente Katalysatoren für Aldolreaktionen verwendet werden. Dennoch ist das rationale Design eines peptidischen Katalysators keine triviale Aufgabe, da die vielen Freiheitsgrade kurzer Peptide eine Voraussage ihrer räumlichen Struktur und damit auch ihrer katalytischen Aktivität als äusserst schwierig gestalten.²⁰ Mit der Entwicklung kombinatorischer Methoden, die eine Identifizierung von katalytisch aktiven Peptiden aus einer kombinatorischen Bibliothek ermöglichen, lässt sich die Suche nach Katalysatoren um vieles vereinfachen.²¹ Eine dieser Methoden stellt die „Katalysator-Substrat-Co-Immobilisierung“ dar, mit der es uns gelang das Tripeptid H-L-Pro-L-Pro-L-Asp-NH₂ (**14a**) als effizienten Katalysator für Aldolreaktionen in organischen Lösungsmitteln zu etablieren.¹⁸

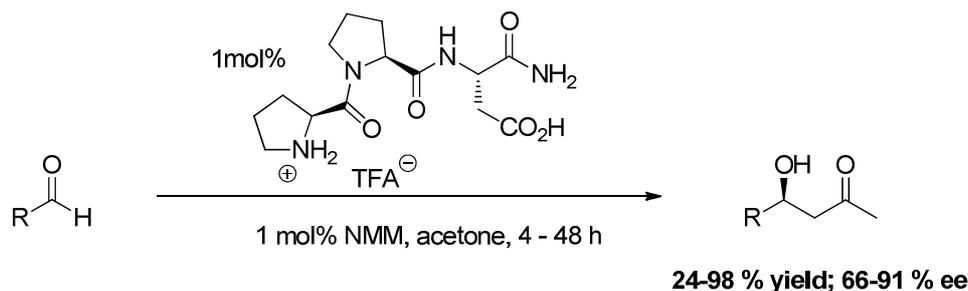


Abb. 2: Aldolreaktionen, katalysiert durch H- Pro-Pro-Asp-NH₂ (**14a**)

Das Peptid **14a** stellt dabei einen überaus aktiven und selektiven Katalysator dar, der es ermöglicht mit nur 1 mol% Beladung die Aldolreaktion zwischen Aceton und verschiedenen Aldehyden durchzuführen (Abbildung 2).¹⁸ Dies zeigt eine enorme Verbesserung gegenüber Prolin-katalysierten Reaktionen und verdeutlicht den Zusammenhang zwischen erhöhter Komplexität und gesteigerter Aktivität, der sich durch die räumliche Orientierung des sekundären Amins und der Säurefunktion von **14a** ergibt.^{19b,c} Zusätzlich lässt sich die Aktivität von **14a** steigern, indem eine Triethylglykol-Kette über den C-Terminus des Peptides eingefügt wird und die Löslichkeit des Peptides damit erheblich verbessert wird.^{19a} Damit kann die Katalysator-Beladung bis auf 0.5 mol% reduziert werden, ohne die Effizienz der Katalyse zu beeinträchtigen.^{19a} Darüber hinaus zeigte eine intensive Studie über die erforderliche Orientierung der funktionellen Gruppen von **14a**, die für eine hohe katalytische Aktivität notwendig ist, dass der C-Terminus weitere Funktionalisierungen ermöglicht ohne die Aktivität oder Selektivität des Katalysators signifikant zu mindern.^{19b}

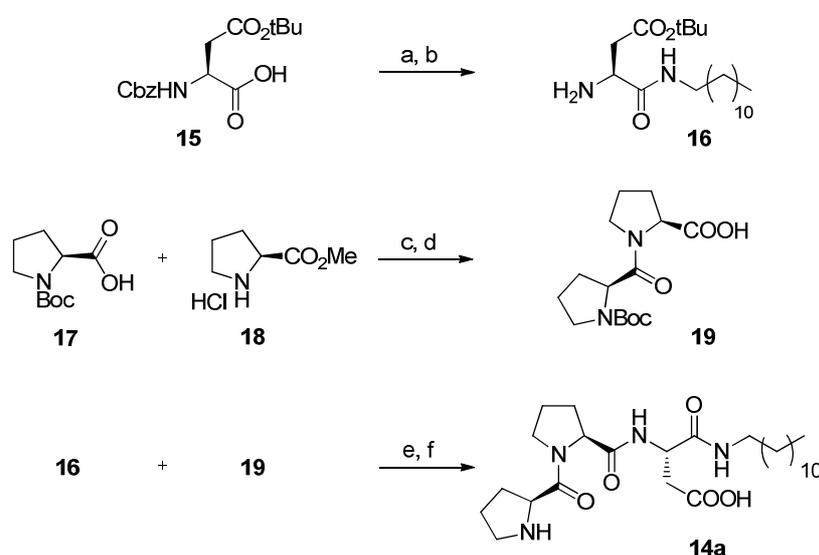
Unter diesen Voraussetzungen entwickelten wir ein neues Design des Katalysators (**14a**), mit dem Ziel über eine Alkylierung des C-Terminus mit Dodecylamin eine amphiphile Struktur zu schaffen; diese wiederum sollte die Möglichkeit eröffnen, Reaktionen in einer breiten Auswahl an organischen Lösungsmitteln als auch in wässriger Umgebung durchzuführen.



Abb. 3: Einführung einer Alkylkette über den C-Terminus von **14a** um amphiphile Eigenschaften zu erzeugen (X = Schutzgruppe).

2.1 Synthese des alkylierten Katalysators H-Pro-Pro-Asp-NH-(CH₂)₁₁-CH₃ (**14b**)

Die Fragment-basierte Synthese des alkylierten Katalysators **14b** beginnt mit dem kommerziell erhältlichen Cbz-Asp(O-*t*Bu)-OH (**15**), das durch eine Kupplung mit EDC als Aktivierungsreagenz in Lösung mit Dodecylamin unter Zugabe von Hünigs Base umgesetzt wurde. Die Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe erfolgte durch eine katalytische Transferhydrogenierung mit Palladium an Kohle mit Ammoniumformiat und das erste Fragment **16** konnte in sehr guten Ausbeuten isoliert werden. Die Herstellung des zweiten Fragmentes **19** wurde durch eine Kupplung mit EDC als Aktivierungsreagenz von Boc-Pro-OH mit H-Pro-OMe und Hünigs Base und anschließender alkalischen Esterhydrolyse vollzogen.



Schema 1. Synthese des alkylierten Peptides **14b**: a) CH₃(CH₂)₁₁NH₂, EDC, *i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂, 90%; b) Pd/C, NH₄⁺HCO₃⁻, MeOH, 95%; c) EDC, *i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂, 86%; d) NaOH, H₂O, MeOH, quant.; e) EDC, *i*Pr₂NEt, CH₂Cl₂, 80%; f) i) TFA, Et₃SiH, CH₂Cl₂, 70%; ii) VariPureTM IPE.

Der letzte Schritt in der Synthese des Peptides **14b** erfolgte durch die Kupplungsreaktion der beiden Fragmente Boc-Pro-Pro-OH (**19**) und H-Asp(O-*t*Bu)-NH(CH₂)₁₁-CH₃ (**16**) unter Verwendung von EDC als Kupplungsreagenz und der anschließenden Abspaltung aller säurelabilen Schutzgruppen mit TFA. Das erhaltene TFA-Salz ist stark hygroskopisch und wurde daher über eine Ionenaustauschsäule (VariPureTM IPE) eluiert und das entsalzte Peptid konnte mit freien Amino- und Säuregruppen isoliert werden.

2.2 Evaluation des asymmetrischen Katalysators **14b** in organischen Lösungsmitteln

2.2.1 Katalytische Effizienz von H-Pro-Pro-Asp-NH₂ (**14a**) als Vergleich

Unserem Design entsprechend konnte für das alkylierte Peptid **14b** eine stark verbesserte Löslichkeit beobachtet werden, wie sich auch im direkten Vergleich mit H-Pro-Pro-Asp-NH₂ (**14a**) zeigte. Um zu prüfen inwieweit sich die Alkylierung von **14a** auf die katalytische Aktivität auswirkt, wurde **14b** als Katalysator in der Aldolreaktion zwischen Aceton und 4-Nitrobenzaldehyd getestet.

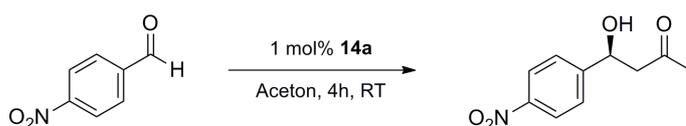


Abb. 4: Aldolreaktion zwischen Aceton und 4-Nitrobenzaldehyd, katalysiert durch **14a**.

Die Reaktion stellt dabei eine gut untersuchte Testreaktion dar, die sich als guten Masstab für die Evaluierung der katalytischen Aktivität einer Verbindung heranziehen lässt. Sie erfolgte daher unter den identischen Bedingungen, die bereits zuvor für **14a** optimiert wurden.¹⁸ Bei der Verwendung von **14a** erfolgt die Reaktion in einem heterogenen System, da **14a** eine geringere Löslichkeit aufweist und teilweise als Feststoff vorliegt. Das Peptid **14b** hingegen zeigt eine stark verbesserte Löslichkeit, so dass die Reaktion in einer homogenen Lösung ablaufen kann und durch die erhöhte Katalysatorkonzentration schneller erfolgt. Das Produkt konnte folglich nach 3 h mit einer Ausbeute von 93% und mit einem Enantiomerenüberschuss von 76% isoliert werden, womit sich durch **14b** vergleichbare Ergebnisse erzielen lassen wie mit **14a**.^{18,19} Dies zeigt, dass die katalytischen Eigenschaften des Peptides durch die Einführung der Alkyl-Kette keiner Einschränkung unterliegen und sich einzig die Löslichkeit bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit verändert.

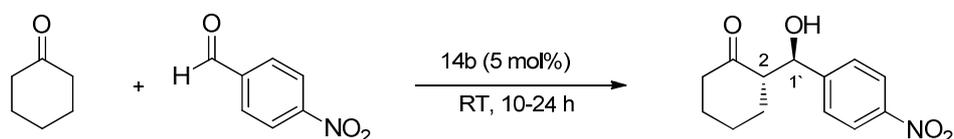
Die geringe Löslichkeit von **14a** schränkte in den vorangegangenen Arbeiten eine umfassende Untersuchung über den Einfluss des Lösungsmittels auf die Stereoselektivität des Katalysators (**14a**) ein. Mit den verbesserten Lösungseigenschaften des alkylierten Peptids **14b** konnte jetzt eine intensivere Studie in einer Vielzahl an Lösungsmitteln erfolgen.

2.2.1 Umkehr in der Enantioselektivität des Katalysators **14b**

Für die Evaluierung der katalytischen Eigenschaften des Peptids **14b** in verschiedenen Lösungsmitteln, wurde die Aldolreaktion zwischen Cyclohexanon und 4-Nitrobenzaldehyd

untersucht. Dies ist eine etablierte Testreaktion für die Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen für eine Reihe auf chiralen Aminen basierender Organokatalysatoren.²² Die sehr gute Löslichkeit von **14a** ermöglicht es demzufolge, die Reaktion in einer breiten Auswahl an organischen Lösungsmitteln zu testen. In allen Lösungsmitteln konnte eine hohe katalytischen Aktivität und ein guter Umsatz zum Aldolreaktionsprodukt erreicht werden. Dabei wurde das Aldolprodukt allgemein in einem Verhältnis von 1:2 für das *anti*-Stereoisomer erhalten und das unabhängig von dem Solvens. Im Gegensatz zu diesen eher niedrigen Diastereoselektivitäten stellten sich die Enantioselektivitäten als umso überraschender dar: es erfolgt eine Umkehr der Selektivität auf den Wechsel des Lösungsmittels (Tabelle 1).

Tab. 1: Aldolreaktion zwischen Cyclohexanon (14 eq.) und 4-Nitrobenzaldehyd, katalysiert durch Peptid **14b** in verschiedenen Lösungsmitteln.



Eintrag	Solvens	Umsatz (%) ^a	Verhältnis <i>syn/anti</i> ^b	ee (%) ^c	Abs. Konf. ^d
1	DMSO	quant.	1:3	50	(<i>R,S</i>)
2	DMF	quant.	1:2	31	(<i>R,S</i>)
3	THF	quant.	1:1.5	<5	(<i>R,S</i>)
4	MeOH	50	1:2.5	63	(<i>R,S</i>)
5	EtOH	quant.	1:2	42	(<i>R,S</i>)
6	<i>i</i> -PrOH	quant.	1:1.5	26	(<i>R,S</i>)
7	<i>t</i> -BuOH	quant.	1:1.5	15	(<i>R,S</i>)
8	CH ₂ Cl ₂	quant.	1:1.5	6	(<i>R,S</i>)
9	<i>n</i> -Hexan	quant.	1:1.5	21	(<i>S,R</i>)
10	MeOH-H ₂ O (1:1)	50	1:1.5	26	(<i>S,R</i>)
11	DMSO-H ₂ O (1:1)	quant.	1:1.5	61	(<i>S,R</i>)
12	CH ₂ Cl ₂ -H ₂ O (1:1)	50	1:1.5	52	(<i>S,R</i>)
13	<i>n</i> -Hexan-H ₂ O (1:1)	50	1:2	59	(<i>S,R</i>)

^a Umsätze wurden an Hand von TLC-Analysen abgeschätzt.

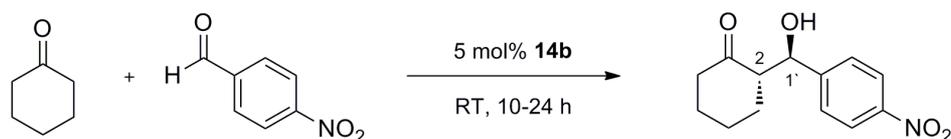
^b Bestimmung erfolgte durch ¹H-NMR Spektroskopie der Reaktionsmischung.

^c Bestimmung erfolgte durch chirale HPLC-Analyse.

^d Absolute Konfiguration: (*R,S*) steht für (*2R,1'S*) und (*S,R*) steht für (*2S,1'R*).

Während das (2*R*,1'*S*) konfigurierte Aldolprodukt hauptsächlich in Lösungsmitteln wie DMSO, MeOH und DMF gebildet wird (Tab. 1, Einträge 1-8), führt die Verwendung des unpolaren Solvens *n*-Hexan zu dem entgegengesetzten Enantiomer mit einer (2*S*,1'*R*)-Konfiguration (Tab. 1, Eintrag 9). Das Stereoisomer mit dieser Konfiguration wird auch in den Lösungsmittelgemischen aus Wasser mit DMSO bzw. MeOH bevorzugt (Tab. 1, Einträge 10,11). Die höchsten Enantioselektivitäten des (2*R*,1'*S*) konfigurierten Aldolproduktes von 63% ee wurden dabei in reinem MeOH beobachtet (Tab. 1, Eintrag 4), wohingegen die höchsten Enantioselektivitäten von 61% ee des spiegelbildlichen Produktes mit einer (2*S*,1'*R*)-Konfiguration in einer 1:1-Mischung aus DMSO und Wasser erzielt wurden (Tab. 1, Eintrag 11). Um ein besseres Verständnis für dieses ungewöhnliche Verhalten des Katalysators **14b** zu erlangen, wurde die Aldolreaktion in reinem DMSO bzw. MeOH und in verschiedenen Mischungen mit Wasser durchgeführt (Tab. 2). Diese Experimente bestätigten, dass sich die Zusammensetzung des Lösungsmittels entscheidend auf die Enantioselektivität von **14b** auswirkt. Durch die Beimischung von lediglich 2.5% Wasser zu DMSO erfolgt eine Umkehr der Enantioselektivität (Tab. 2, Einträge 1,2). Zunehmende Anteile an Wasser führen zu einer weiteren Steigerung der ee-Werte bis zu einem maximalen Wert von 69% ee bei einem 10%igem Anteil von Wasser (Tab. 2, Eintrag 4). Dementsprechend erfolgt auf die Zugabe von Wasser zu MeOH eine bevorzugte Bildung des entgegengesetzten Enantiomers des Aldolproduktes (Tab. 2, Einträge 6-9). Die Beimischung von Wasser zu MeOH bzw. DMSO bewirkte ausserdem eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit.²³

Tab. 2: Durch das Peptid **14b** katalysierte Aldolreaktion zwischen Cyclohexanon (11eq.) und 4-Nitrobenzaldehyd.



Eintrag	Solvens	Zeit (h)	Ausbeute (%) ^a	Verhältnis <i>syn/anti</i> ^b	ee (%) ^c	Abs. Konf. ^d
1	DMSO	72	98	1:3.5	55	(<i>R,S</i>)
2	DMSO + 2.5% H ₂ O	3	96	1:1.5	42	(<i>S,R</i>)
3	DMSO + 5% H ₂ O	3	93	1:1.5	46	(<i>S,R</i>)
4	DMSO + 10% H ₂ O	3	95	1:2.0	69	(<i>S,R</i>)
5	DMSO + 50% H ₂ O	3	99	1:2.5	63	(<i>S,R</i>)
6	MeOH	66	93	1:2.5	58	(<i>R,S</i>)
7	MeOH + 2.5% H ₂ O	48	94	1:1.5	9	(<i>S,R</i>)
8	MeOH + 5% H ₂ O	48	97	1:1.5	20	(<i>S,R</i>)
9	MeOH + 10% H ₂ O	48	97	1:1.5	20	(<i>S,R</i>)

^a Isolierte Ausbeuten

^b Bestimmung erfolgte mittels ¹H-NMR Spektroskopie

^c Bestimmung erfolgte durch chirale HPLC-Analyse

^d Absolute Konfiguration: (*R,S*) steht für (*2R,1'S*) und (*S,R*) steht für (*2S,1'R*).

2.2.2 Untersuchungen zur Konformation des Peptides **14b**

Ein solcher Wechsel in der Enantioselektivität eines gegebenen Katalysators durch einfache Änderungen des Lösungsmittelsystems ist sehr ungewöhnlich.²⁴ Es legt nahe, dass die Konformation des peptidischen Katalysators sich in den jeweiligen Lösungsmitteln deutlich unterscheidet und daher zu spiegelbildlichen Produkten führt. Vorangegangene Studien über das Peptid **14a** und strukturell ähnlichen Peptiden zeigten, dass diese vorzugsweise eine gekrümmte Konformation einnehmen und veranlassten uns zu CD-spektroskopischen Aufnahmen. Um ein besseres Verständnis der konformellen Änderungen von **14b** in den verschiedenen Lösungsmitteln zu erhalten, wurden CD-Spektren in MeOH, Wasser und in MeOH/Wasser-Mischungen aufgenommen. Die Spektren von **14a** weisen deutliche konformelle Unterschiede in MeOH gegenüber Wasser auf: Während ein weniger ausgeprägtes Maximum bei $\lambda = 211$ nm im Spektrum von **14b** in MeOH zu beobachten war, ist ein

deutliches Minimum bei $\lambda = 201$ nm charakteristisch für **14b** in Wasser. Die Wasser-Mischungen führen dagegen zu gemittelten Kurven aus beiden Extremen (Abbildung 4).

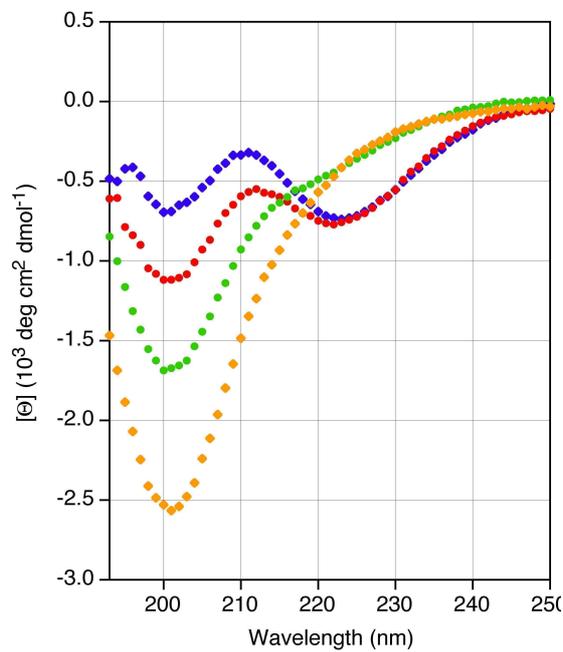


Abb. 4: CD-Spektren des Peptides **14b** in Wasser (orange), MeOH (blau), 10% Wasser in MeOH (rot) und 50% Wasser in MeOH (grün).

Auf Grund der hohen Eigenabsorption von DMSO konnten leider keine CD-Spektren der Verbindung **14b** in DMSO und seiner Mischungen mit Wasser aufgenommen werden. Um trotzdem eine Einsicht in die Konformationsänderungen des Peptides **14b** auch in diesem Lösungsmittel zu erlangen, wurden zusätzliche NMR-Spektren in reinem DMSO-d₆ und in DMSO-d₆ mit einem 10%igem Anteil an D₂O aufgenommen (Abbildung 5,6).

allerdings die Signale der H_α-Protonen zum Teil; dennoch lässt sich an Hand des Nebenisomers ein *cis:trans*-Verhältnis der Prolin-Peptidbindungen von 1:2 bestimmen. Mit der Zugabe von D₂O zu der Probe ändert sich das *cis:trans*-Verhältnis der Konformere auf 1:1. Das zeigt, dass das Peptid **14b** auch in DMSO unterschiedliche Konformationen einnimmt und sich dieses Verhältnis durch die Beimischung von Wasser bzw. D₂O beeinflussen lässt.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sich die Enantioselektivität des Katalysators H-Pro-Pro-Asp-NH(CH₂)₁₁-CH₃ (**14b**) durch einen Wechsel des Solvens umkehren lässt. Ein solcher Wechsel in der Enantioselektivität eines Katalysators durch einfache Veränderungen des Lösungsmittels ist sehr selten zu finden.²⁴ Unter den wenigen Beispielen in der Literatur, die einen derartigen Wechsel beschreiben finden sich lediglich Beobachtungen, in den eine Umkehr der Enantioselektivität auf einen Austausch des Metallzentrums bzw. des Gegenions eines Katalysators zurückzuführen sind oder auch auf die Zugabe von unterschiedliche Basen als Additiven.²⁵⁻²⁷

Die Konformationsuntersuchungen deuten darauf hin, dass ein Konformationswechsel von einer gekrümmten Form zu einer zweiten von entgegengesetzter Helicität für den Wechsel der Enantioselektivität verantwortlich ist. Ein derartiger Konformationswechsel lässt sich nicht so einfach erzielen und demonstriert die Bedeutung von Peptiden in der asymmetrischen Katalyse.²⁸ Im Falle des Peptides **14b** ist der Konformationswandel in den verschiedenen Solvent-Systemen wahrscheinlich auf den bekannten lösungsmittelabhängigen Wechsel von Oligoprolinen zwischen Polyprolin II und Polyprolin I Helices zurückzuführen.^{29,30} Diese beschriebene Abhängigkeit der Konformation und der Stereoselektivität des Katalysators (**14b**) stellt ein höchst interessantes Verhalten dar, das sich in dieser Form nur bei Peptiden finden lässt und spiegelt ihre zentrale Bedeutung in der Natur wieder. Die starke Beeinflussung durch das vorhandene Wasser ist auf die Konformation des Peptides zurückzuführen und die verbesserte Löslichkeit in Folge der Alkylierung. Inwieweit die Alkylierung auch zu der Entwicklung von amphiphilen Eigenschaften führt und ob sich diese auch für eine makromolekulare Anordnung nutzen lassen, sollte im letzten Teil diese Arbeit geklärt werden.

2.3 Evaluation des Katalysators 14b in wässriger Umgebung

Der amphiphile Charakter einer Verbindung führt unter den richtigen Bedingungen zu einer Selbst-Organisation der einzelnen Bestandteile, die versuchen unvorteilhafte Wechselwirkungen zu minimieren und so hoch strukturierte Formen mit unterschiedlichsten Funktionen hervorbringen.³ Indem hydrophobe Molekül-Bestandteile vor dem wässrigen Milieu abgeschirmt werden, lassen sich von der Umgebung abgetrennte Räume schaffen, die in Micellen oder Vesikeln umschlossen werden.³¹ Eine solche Bildung von einzelnen Kompartimenten ist ein grundlegendes Prinzip in der Natur und findet sich z.B. in der Ausbildung von einzelnen Zellkompartimenten wieder. Besitzt das amphiphile Molekül ausserdem reaktive Gruppen lässt sich die Funktion der Kompartiment-Bildung mit dem der Katalyse kombinieren und es entsteht die Möglichkeit Reaktionen in einer verdichteten, abgetrennten Umgebung durchzuführen.³²

2.3.1 Untersuchungen zur Selbst-Organisation von 14b in Wasser

Die Löslichkeit des katalytisch aktiven Peptides H-Pro-Pro-Asp-NH(CH₂)₁₁-CH₃ (**14b**) in organischen Lösungsmitteln wurde durch die Alkylierung stark verbessert. Sie ermöglichte eine gute Löslichkeit sowohl in polaren als auch in unpolaren Lösungsmitteln. In Wasser hingegen sollte sich die Löslichkeit verschlechtern, so dass die Ausbildung von makromolekularen Strukturen erfolgt. Um den amphiphilen Charakter des Katalysators zu untersuchen, wurden Stammlösungen aus **14b** in THF und MeOH (1.5 mM) hergestellt und mit der 10fachen Menge an Wasser verdünnt, um so eine makromolekulare Anordnung der Peptide zu erwirken. Erst ab einer Konzentration von grösser 50 µM konnte eine ausreichende Signalintensität für reproduzierbare DLS-Messungen erlangt werden, die für eine Charakterisierung der kolloidalen Lösung und der entstandenen Partikel herangezogen wurden. Für die Messungen wurde wiederholt das Streulicht der kolloidalen Lösungen bei einem Streuwinkel von 90° und über einen Messzeitraum von 120 s aufgenommen. Die mathematisch ermittelten Zeit-Korrelationsfunktionen enthalten Aussagen über die Diffusionskonstanten der enthaltenen Partikel, die wiederum einen hydrodynamischen Radius (R_n) und eine Grössenverteilung der beteiligten Komponenten ergeben.³³

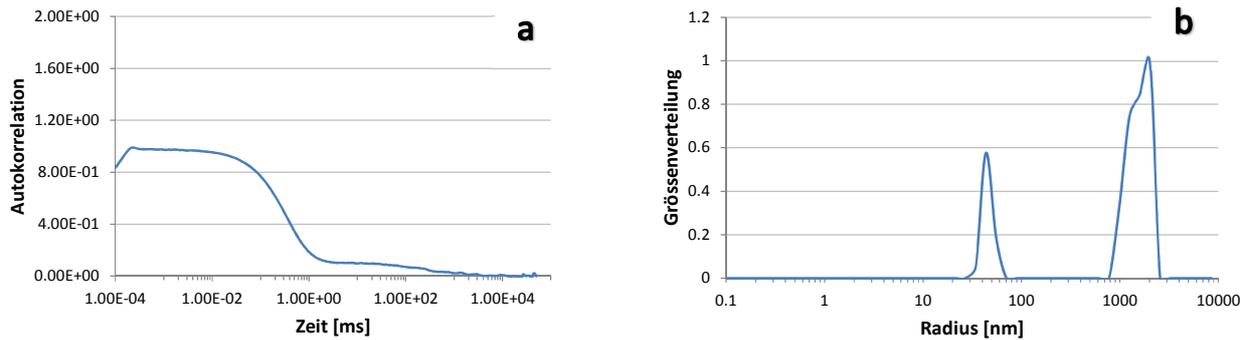


Abb. 7: a) Autokorrelationskurve der Partikel aus **14b** in THF/H₂O (1:9) mit b) der entsprechenden Grössenverteilungsfunktion.

Bei der Verwendung von THF als Lösungsvermittler mit Wasser, entstand eine kolloidale Lösung aus **14b**, deren Korrelationsfunktion eine Summe aus zwei unterschiedlichen Partikeln darstellt. Die Autokorrelationskurve zeigt zwei unterscheidbare Steigungen in ihrem exponentiellen Abfall, in dem die grössere Komponente allerdings einen geringen Anteil ausmacht (Abbildung 7a). Die entsprechende Grössenverteilung gibt den relativen Anteil der unterschiedlichen Partikel wieder und ordnet beiden einen mittleren Radius zu.³⁴ Dabei entstanden in der THF/Wasser-Mischung zum einen Partikel im Nanometerbereich ($R_h = 40$ nm) und ausserdem grössere Aggregate mit einem Radius über 1 μm . Dies zeigt, dass Peptid **14b** in Wasser makromolekulare Partikel bilden kann, die aber keine homoge Verteilung besitzen. In einer zweiten Versuchsreihe wurde **14b** in MeOH gelöst und mit einem Überschuss an Wasser verdünnt.

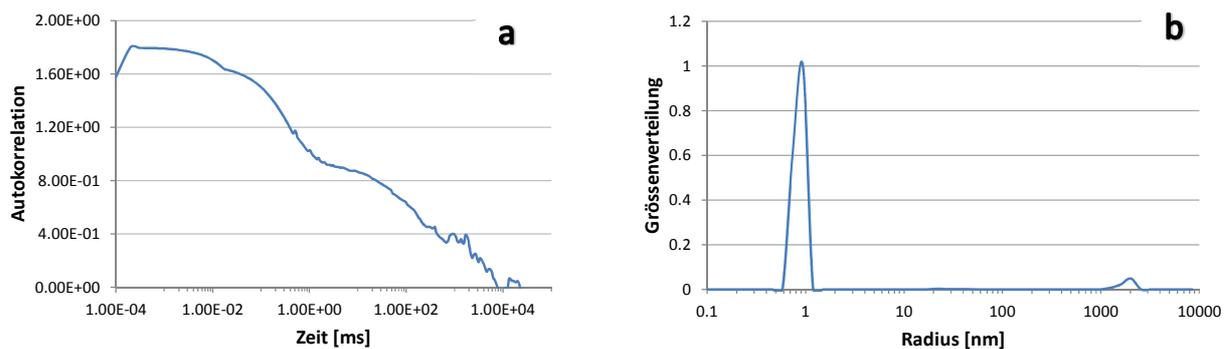


Abb. 8: a) Autokorrelationskurve der Partikel aus **14b** in MeOH/H₂O (1:9) mit b) der entsprechenden Grössenverteilungsfunktion.

Die kolloidale Lösung aus **14b** in dem MeOH/Wasser-Gemisch zeigte allerdings auch eine polydisperse Verteilung der Partikel. Die Autokorrelationskurve besitzt ebenfalls eine Schulter, die auf Diffusionskonstanten von sehr grossen und sehr kleinen Partikeln hindeutet.³⁴ Wie sich in der

Größenverteilungsfunktion erkennen lässt, besteht die Hauptfraktion aus sehr kleinen Teilchen ($R_h = 1 \text{ nm}$), die sich im Größenbereich von Micellen befinden, während ein geringer Anteil in aggregierter Form vorliegt und einen Radius grösser $1 \mu\text{m}$ besitzt.

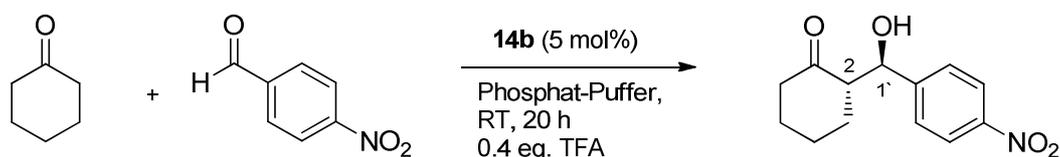
Die Experimente zeigen, dass der Rezeptor **14b** eine amphiphile Struktur besitzt, die es in Wasser ermöglicht Micellen auszubilden. Die DLS-Analysen bestätigen daher die Qualität des entwickelten Designs für einen amphiphilen Katalysator.

2.3.2 Asymmetrische Aldolreaktion in einem gepufferten System

Für die Evaluation der katalytischen Aktivität des alkylierten Peptids **14b** wurde erneut die Reaktion zwischen Cyclohexanon und 4-Nitrobenzaldehyd gewählt. Die Verwendung von reinem Wasser als Lösungsmittel führt in Gegenwart von Cyclohexanon, zu der Ausbildung eines Zwei-Phasen-Gemisches. Durch die Beimischung des amphiphilen Peptides **14b** bildet sich eine milchige Emulsion, die eine stark verzögerte Phasentrennung zeigt. Der Einfluss den eine Emulsion auf die Stereoselektivität des Katalysators besitzt, wurde in der Reaktion zwischen Cyclohexanon und 4-Nitrobenzaldehyd untersucht.

In Anlehnung an bereits optimierte Bedingungen für das Peptid H-Pro-Pro-Asp-NH₂ (**14**) in gekreuzten Aldolreaktionen¹⁸ wurde bei einer Konzentration von 130 μ M und mit einer 5%igen Katalysatorbeladung gearbeitet. Da die Reaktion in einem Zwei-Phasen-System stattfindet, wurde zu Beginn die Zusammensetzung der Emulsion untersucht und verschiedene Equivalente an Cyclohexanon verwendet. Die Aldolreaktion wird zur Vermeidung unerwünschter Reaktionen in leicht saurem bzw. neutralem Medium durchgeführt, um die Bildung möglicher Nebenprodukte zu vermeiden, so dass zu Beginn ein neutraler Phosphatpuffer als Lösungsmittel verwendet wurde.³⁴

Tab. 3: Aldolreaktion zwischen Cyclohexanon und 4-Nitrobenzaldehyd, katalysiert durch Peptid **14b** in Phosphat-Puffer.



Eintrag	cHexanon (eq.)	Umsatz ^a (%)	Verhältnis <i>anti:syn</i> ^b	ee ^b (%)
1	7	70	8:1	40
2	9.5	70	7:1	56
3	12	80	6:1	66
4	14.5	90	6:1	72
5	17	quant.	10:1	75
6	19	70	12:1	77
7	22	60	11:1	80
8	24	50	12:1	82

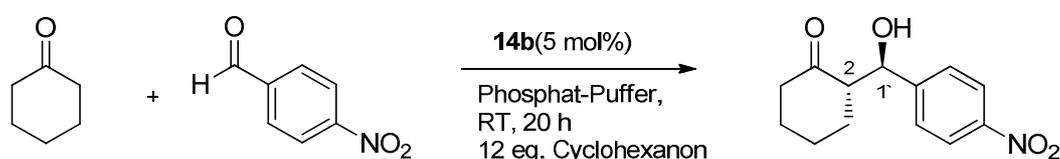
^a Umsätze wurden an Hand von TLC-Analysen abgeschätzt.

^b Bestimmung erfolgte durch chirale HPLC-Analyse.

Sowohl die Diastereoselektivität als auch die Enantioselektivität des Peptides **14a** zeigt eine deutliche Abhängigkeit von den verwendeten Äquivalenten an Cyclohexanon. Da der Reaktionspartner gleichzeitig einen Teil des Lösungsmittels darstellt und sich damit direkt auf die Zusammensetzung der Emulsion auswirkt, ergeben sich hier erste Einschränkungen. Eine zu geringe Menge an Cyclohexanon führt nicht mehr zur Ausbildung einer stabilen Emulsion, die sich negativ auf die Stereoselektivität des Katalysators auswirkt. Die Verwendung von höheren Anteilen an Cyclohexanon erzielt zwar Verbesserungen in der Selektivität des Katalysators, bedingt allerdings gleichzeitig schlechtere Ausbeuten, so dass im Weiteren ein 7:3 -Verhältnis von Wasser zu Cyclohexanon verwendet wurde (Tabelle 3, Eintrag 5). Die Zugabe von Säure als Additiv ist notwendig um einen allgemeinen Basen-katalysierten Mechanismus der Aldoreaktion zu unterdrücken.³⁶

Im Folgenden wurde die Menge an TFA untersucht, die einen starken Einfluss auf die Stereoselektivität der Reaktion zeigen kann (Tabelle 4).^{23c}

Tab. 4: Aldolreaktion zwischen Cyclohexanon (12 eq.) und 4-Nitrobenzaldehyd, katalysiert durch Peptid **14a** in Phosphat-Puffer.



Eintrag	TFA (eq.)	Umsatz ^a (%)	Verhältnis <i>anti:syn</i> ^b	ee ^b (%)
1	-	quant.	16:1	49
2	0.1	quant.	17:1	54
3	0.2	quant.	19:1	60
4	0.4	quant.	19:1	65
5	0.45	quant.	14:1	67
6	0.55	30	16:1	67
7	0.6	20	8:1	52

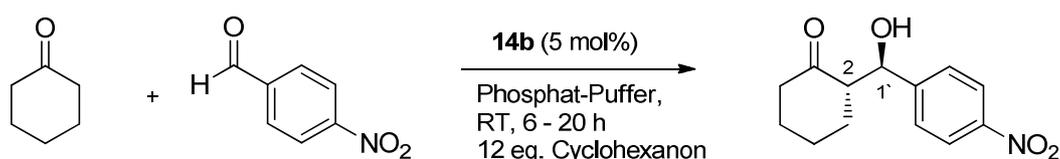
^a Umsätze wurden an Hand von TLC-Analysen abgeschätzt.

^b Bestimmung erfolgte durch chirale HPLC-Analyse.

Verwendet man TFA als Additiv lässt sich eine leichte Verbesserung der Selektivität des Peptides **14b** erkennen. Während die Reaktion ohne TFA einen Enantiomerenüberschuss von 49% ee erzielt (Tab. 4, Eintrag 1), erfolgt auf die Beimischung von TFA eine Verbesserung der Enantioselektivität auf 67% ee (Tab. 4, Eintrag 5). Die Diastereoselektivität zeigt hingegen nur unwesentliche Verbesserungen, bis durch die Zugabe von 0.55 eq. TFA die Pufferkapazität erreicht ist und sowohl die Umsätze als auch die Selektivität des Katalysators negativ beeinflusst werden (Tab. 4, Eintrag 6).

Allerdings ergibt sich durch Zugabe eines sauren Additivs die Möglichkeit Einfluss auf die Selektivität des Katalysators (**14b**) zu nehmen, so dass im Weiteren verschiedene Säuren als Additive getestet wurden (Tabelle 5).

Tab. 5: Aldolreaktion zwischen Cyclohexanon (12 eq.) und 4-Nitrobenzaldehyd, katalysiert durch Peptid **14b** in Phosphat-Puffer.



Eintrag	Additiv (eq.)	Zeit (h)	Umsatz ^a (%)	Verhältnis <i>anti:syn</i> ^b	ee ^b (%)
1	0.25 C ₆ H ₅ OH	6	quant.	18:1	14
2	0.25 AcOH	6	40	25:1	39
3	0.25 Tol-SO ₃ H	6	40	14:1	46
4	0.25 TCA	20	quant.	18:1	68
5	0.50 TCA	20	20	13:1	75
6	0.13 CF ₃ -SO ₃ H	20	quant.	7:1	70
7	0.25 CF ₃ -SO ₃ H	20	60	16:1	63
8	0.05 Sc(OTf) ₃	20	60	24:1	70
9	0.10 Sc(OTf) ₃	20	60	32:1	76

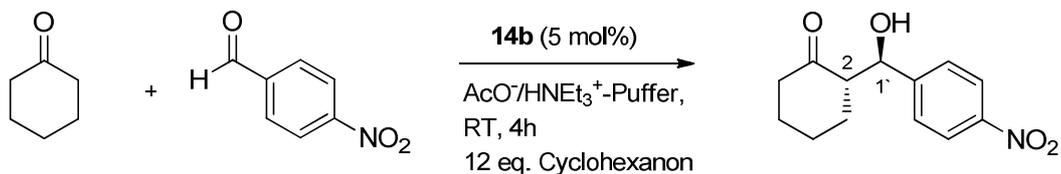
^a Umsätze wurden an Hand von TLC-Analysen abgeschätzt.

^b Bestimmung erfolgte durch chirale HPLC-Analyse.

Die Zugabe der verschiedenen sauren Additive wirkt sich im Allgemeinen positiv auf die Selektivität des Katalysators (**14b**) aus. Allein die schwach sauren Verbindungen wie Phenol und Essigsäure (Tab. 5, Eintrag 1,2) bringen niedrigere ee-Werte im Vergleich zu der Reaktion ohne Additiv (49% ee). Interessanterweise führt die Zugabe von Phenol zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung, so dass ein

vollständiger Umsatz bereits nach 6h erreicht wird. Erneut zeigen alle Additive einen Zusammenhang zwischen Konzentration und der Selektivität des Katalysators (**14b**).

Tab. 6: Aldolreaktion zwischen Cyclohexanon (12 eq.) und 4-Nitrobenzaldehyd, katalysiert durch Peptid **14b** in AcO⁻/HNEt₃⁺-Puffer.



Eintrag	c(Puffer) (mol/l)	Additiv (eq.)	Umsatz ^a (%)	Verhältnis <i>anti:syn</i> ^b	ee ^b (%)
1	1	-	quant.	99:1	45
2	0.5	-	90	99:1	42
3	0.25	-	75	82:1	43
4	0.125	-	60	82:1	43
5	1	0.05 TFA	quant.	52:1	40
6	1	0.25 TFA	60	24:1	56
7	1	0.50 TFA	60	31:1	62
8	1	0.75 TFA	60	37:1	64
9	0.5	0.25 TFA	quant. ^c	99:1	63

^a Umsätze wurden an Hand von TLC-Analysen abgeschätzt.

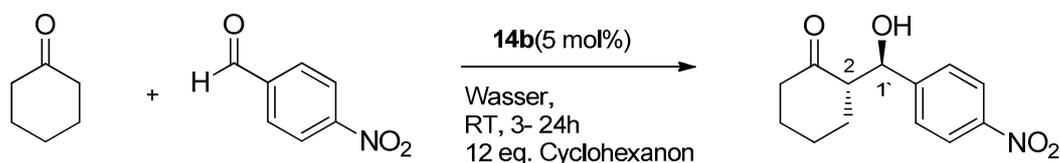
^b Bestimmung erfolgte durch chirale HPLC-Analyse.

^c Reaktion benötigte für einen quantitativen Umsatz 5.5 h

Sehr gute Diastereoselektivitäten konnten in einem Puffer aus Essigsäure und Triethylamin erzielt werden und in dem sich auch eine Steigerung der Aktivität beobachten lies. Mit dem 1M AcO⁻/HNEt₃⁺-Puffer verläuft die Reaktion binnen 4h zu vollständigem Umsatz und mit ausgezeichneter Diastereoselektivität von 99:1 ab (Tab. 6, Eintrag 1). Eine Verringerung der Pufferkonzentration wirkt sich negativ auf die Umsätze und auch auf die Diastereoselektivität von **14b** aus. Die Enantioselektivität der Reaktion zeigt allerdings keinerlei Beeinflussung durch den Puffer. Mit der Zugabe des Additivs TFA kann wiederum eine Verbesserung der Enantioselektivität erzielt werden, so dass bereits nach 5 h ein vollständiger Umsatz erreicht wird. Wiederum führt die Zugabe von TFA zu Verbesserung der Enantioelektivität. Im weiteren sollte der Einfluss von Salzen auf eine wässrige Emulsion untersucht werden.

2.3.3 Asymmetrische Aldolreaktion in Wasser

Tab. 7: Aldolreaktion zwischen Cyclohexanon (12 eq.) und 4-Nitrobenzaldehyd, katalysiert durch Peptid **14b** in Wasser.



Eintrag	Additiv (eq.)	Zeit (h)	Umsatz ^a (%)	Verhältnis <i>anti:syn</i> ^b	ee ^b (%)
1	0.05 NaTFA	9	70	42:1	64
2	0.75 NaTFA	9	50	22:1	80
3	0.05 NaTFA	24	quant.	2:1	80
4	0.75 NaTFA	24	quant.	2:1	78
5	0.05 pTsO/Py	24	quant.	49:1	78
6	0.50 pTsO/Py	24	quant.	35:1	76
7	0.05 C ₁₁ CO ₂ Na	3	quant.	49:1	-7
8	0.05 C ₁₁ CO ₂ Na	3	quant.	32:1	-19

^a Umsätze wurden an Hand von TLC-Analysen abgeschätzt.

^b Bestimmung erfolgte durch chirale HPLC-Analyse

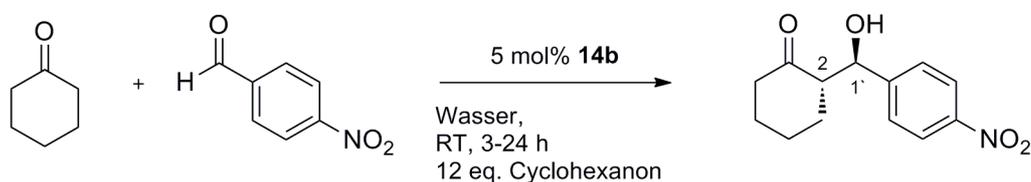
^c Isolierte Ausbeute; es konnten zusätzlich 10% des Eliminierungsproduktes

Dieser Zusammenhang aus der Ionenstärke des Puffers und der Selektivitätssteigerung mittels TFA führte zu der Annahme, dass sich mit der die Zugabe von neutralen, stark koordinierenden Salzen bei der gleichzeitigen Verwendung von reinem Wasser als Medium beide Effekte kombinieren lassen. Tatsächlich weisen erste Versuche mit dem Natrium-TFA-Salz eine starke Verbesserung der Enantioselektivität auf. Hierbei zeigt die Zugabe von 0.75 eq. des TFA-Salzes nach 9h bereits einen 50%igen Umsatz und einen ee-Wert von 80% (Tab. 7, Eintrag 2). Erneut wirkt sich eine erhöhte Konzentration des Salzes negativ auf die Aktivität von **14b** aus und dennoch lässt sich nach 24 h in beiden Fällen ein vergleichbarer ee-Wert um 80% erreichen (Tab.7, Eintrag 3,4). Dabei sinkt die Stereoselektivität während der letzten Stunden, bis ein voller Umsatz erreicht wird, allerdings merklich ab und deutet damit auf eine mögliche Retroaldolreaktion hin. Die Zugabe alternativer Salze führte zu keinen weiteren Verbesserungen, so dass exemplarisch die Verwendung von pTsO/Py genannt wird, welche eine Erhöhung der Diastereoselektivität erbringt, ohne jedoch im Vergleich zu

dem Na-TFA-Salz die ee-Werte signifikant zu verbessern. Bemerkenswert ist jedoch die Zugabe von Na-Laureat, durch die sich wieder eine Umkehr in der Enantioselectivität beobachten lässt. Hierbei bildet sich erneut das entgegengesetzte Enantiomer (vgl. Kap. 1.3) und führt gleichzeitig zu einer deutlichen Reaktionsbeschleunigung. Die Reaktion erfolgt hier bereits nach 3 h mit einem vollständigen Umsatz, wenn auch mit geringer Enantioselectivität.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Säuren allgemein einen positiven Effekt auf die Selektivität des Peptides **14b** auswirken. Daher wurden weitere Säuren getestet, die hydrophobe Gruppen besitzen.

Tab. 8: Aldolreaktion zwischen Cyclohexanon (7 eq.) und 4-Nitrobenzaldehyd, katalysiert durch Peptid **14b** in Wasser.



Eintrag	Additiv (eq.)	Zeit (h)	Umsatz ^a (%)	Verhältnis <i>anti:syn</i> ^b	ee ^b (%)
1	0.25 TFA	20	40	2:1	31
2	0.25 NaTFA	24	quant.	2:1	55
3	0.05 Benzoessäure	20	quant.	2:1	66
4	0.25 Benzoessäure	20	quant.	2:1	76
5	0.05 Anthracen-9-säure	20	quant.	3:1	49
6	0.25 Anthracen-9-säure	20	85 ^c	2:1	91

^a Umsätze wurden an Hand von TLC-Analysen abgeschätzt.

^b Bestimmung erfolgte durch chirale HPLC-Analyse.

^c Isolierte Ausbeute; es konnten zusätzlich 10% des Eliminierungsproduktes isoliert werden

Mit der Verwendung von aromatischen Säuren lassen sich Enantioselectivitäten von über 90% ee erzielen (Tab 8, Eintrag 6).

2.4 Zusammenfassung

Das von uns entwickelte Tripeptid H-Pro-Pro-Asp-NH₂ (**14a**), welches sich als effizienter Katalysator für Aldolreaktionen in organischen Lösungsmitteln verwenden lässt, wurde durch die Einführung einer Alkylkette soweit modifiziert, dass es eine gute Löslichkeit in einer Reihe an organischen Lösungsmitteln ermöglicht. Das alkylierte Tripeptid H-Pro-Pro-Asp-NH-(CH₂)₁₁-CH₃ (**14b**) wurde auf seine katalytische Aktivität in der Aldolreaktion zwischen Cyclohexanon und 4-Nitrobenzaldehyd in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht.

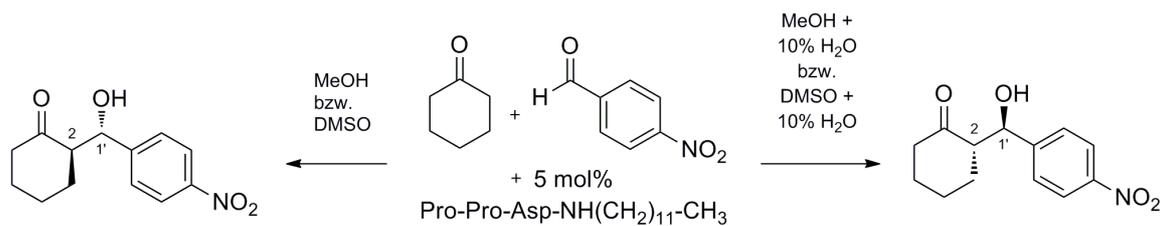


Abb. 9: Durch **14b** katalysierte Aldolreaktion zwischen Cyclohexanon und 4-Nitrobenzaldehyd in verschiedenen Lösungsmitteln.³⁷

Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit der Enantioselektivität des Katalysators von dem Lösungsmittel. Durch die Zugabe von Wasser zu den reinen Lösungsmitteln, wie DMSO oder MeOH erfolgte ein Wechsel in der Enantioselektivität des Katalysators.

Die Einführung der Alkylkette führte ausserdem zu einer amphiphilen Struktur, die in Wasser die Ausbildung von makromolekularen Strukturen aus **14b** zur Folge hatte. Diese amphiphile Struktur ermöglichte es in der Aldolreaktion von Cyclohexanon und 4-Nitrobenzaldehyd in Wasser eine hohe katalytischen Aktivität und Selektivität zu erreichen. Durch die Zugabe von hydrophoben, aromatischen Säuren, konnten Enantiomerenüberschüsse von über 90% erzielt werden.

2.5 Literaturverzeichnis

- [1] S. Cavalli, F. Albericio, A. Kros, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 241-263.
- [2] (a) Wiesner, M.; Revell, J. D.; Wennemers, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1871-1874. (b) Wiesner, M.; Neuburger, M.; Wennemers, H. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10103-10109. (c) Wiesner, M.; Wennemers, H. *Synthesis* **2010**, 1568-1571. (d) Wiesner, M.; Revell, J. D.; Tonazzi, S.; Wennemers, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5610-5611.
- [3] (a) I. W. Hamley, *Soft Matter* **2011**, *7*, 4122-4138. (b) S. S. Santoso, S. Vauthey, S. Zhang, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2002**, *7*, 262-266.
- [4] D. A. Brown, E. London, *J. Membr. Biol.* **1998**, *164*, 103 – 114. (b) T. P. W. McMullen, R. N. A. H. Lewis, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, *8*, 459 – 468. (c) L. J. Pike, *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 1597 – 1598. (d) S. R. Shaikh, M. A. Edidin, *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *144*, 1–3.
- [5] P. Forns, J. L. Lauer-Fields, S. Gao, G. B. Fields, *Biopolymers*, **2000**, *54*, 531-546. (b) Y.-C. Yu, M. Tirrell, G. B. Fields, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9979-9987.
- [6] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Fundamentals of Biochemistry* (2nd Ed.), Wiley, **2005**.
- [7] (a) A. Berkessel, H. Gröger, *Asymmetric Organocatalysis: From Biomimetic Concepts to Applications in Asymmetric Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**. (b) P. I. Dalko, *Enantioselective Organocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**. (c) B. List, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5413 – 5883. (d) K. N. Houk, B. List, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 487–487
- [8] (a) B. List, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2395-2396. (b) K. Sakthivel, W. Notz, T. Bui, C. F. Barbas III, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5260-5267.
- [9] Y. Hayashi, T. Sumiya, J. Takahashi, H. Gotoh, T. Urushima, M. Shoji, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 958–961.
- [10] N. Mase, Y. Nakai, N. Ohara, H. Yoda, K. Takabe, F. Tanaka, C. F. Barbas, III, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 734–735.
- [11] N. Mase, C. F. Barbas III, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 4043-4050.
- [12] (a) M. Gruttadauria, F. Giacalone, R. Noto, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 33-57. (b) F. Giacalone, M. Gruttadauria, P. L. Meo, S. Riela, R. Noto, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2747-2760.
- [13] J.-F. Zhao, L. He, J. Jiang, Z. Tang, L.-F. Cun and L.-Z. Gong, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3372–3375.
- [14] Z. Jiang, Z. Liang, X. Wu, Y. Lu, *Chem. Commun.* **2006**, *26*, 2801-2803.
- [15] P. Dzedzic, W. Zou, J. Hafren, A. Córdova, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 38-40.
- [16] M. Lei, L. Shi, G. Li, S. Chen, W. Fang, Z. Ge, T. Cheng, R. Li, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7892-7898.

- [17] M. Mauksch, S. Wie, M. Freund, A. Zamfir, S. B. Tsogoeva, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2010**, *40*, 79–91.
- [18] (a) P. Krattiger, R. Kovàsy, J. D. Revell, S. Ivan, H. Wennemers, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1101; (b) P. Krattiger, R. Kovàsy, J. D. Revell, H. Wennemers, *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*, 1158.
- [19] (a) J. D. Revell, D. Gantenbein, P. Krattiger, H. Wennemers, *Biopolymers* **2006**, *84*, 105-113; (b) J. D. Revell, H. Wennemers, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8420-8424; (c) J. D. Revell, H. Wennemers, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1046-1052; (d) C. Aprile, F. Giacalone, M. Gruttadauria, A. M. Marculescu, R. Noto, J. D. Revell, H. Wennemers, *Green Chem.* **2007**, *9*, 1328-1334.
- [20] (a) H. J. Martin, B. List, *Synlett* 2003, 1901; (b) J. Kofoed, J. Nielsen, J.-L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, *13*, 2445; (d) S. B. Tsogoeva, D. Wei, *Tetrahedron: Asymmetry* 2005, *16*, 1947; (e) F. Tanaka, R. Fuller, C. F. Barbas, III. *Biochemistry* 2005, *44*, 7583; (g) K. Akagawa, S. Sakamoto, K. Kudo, *Tetrahedron Lett.* 2005, *46*, 8185; (h) R. Dodda, C.-G. Zhao, *Synlett* 2007, 1605.
- [21] (a) J. D. Revell, H. Wennemers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 269; (b) A. Berkessel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 409; (c) M. H. Fonseca, B. List, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 319
- [22] Für einen aktuellen Review, siehe: B. M. Trost, C. S. Brindle, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1600-1632.
- [23] Für weitere Beispiele zur Erhöhung der Reaktionsrate durch Wasser, siehe: (a) A. I. Nyberg, A. Usano, P. M. Pihko, *Synlett* **2004**, 1891-1896; (b) H. Torii, M. Nakadai, K. Ishihara, S. Saito, H. Yamamoto, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 1983-1986; (c) P. M. Pihko, K. M. Laurikainen, A. Usano, A. I. Nyberg, J. A. Kaavi, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 317-328; (d) D. Gryko, W. J. Saletta, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2148-2153; (e) N. Zotova, A. Franzke, A. Armstrong, D. G. Blackmond, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15100-15101.
- [24] Für ein weiteres Beispiel siehe: F.-C. Wu, C.-S. Da, Z.-X. Du, Q.-P. Guo, W.-P. Li, L. Yi, Y.-N. Jia, X. Ma, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4812-4818.
- [25] (a) T. Inagaki, A. Ito, J.-i. Ito, H. Nishiyama, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 9384-9387; (b) H. Y. Kim, H.-J. Shih, W. E. Knabe, K. Oh, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7420-7423; (c) A. Frölander, C. Moberg, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1371-1374; (d) A. B. Zaitsev, H. Adolfsson, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5129-5132.
- [26] C. P. Butts, E. Filali, G. C. Lloyd-Jones, P.-O. Norrby, D. A. Sale, Y. Schramm, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9945-9957.
- [27] (a) D. G. Blackmond, A. Moran, M. Hughes, A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7598-7599; (b) M. Furegati, A. J. Rippert, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3947-3950.

- [28] Für einen Review über Peptide in der asymmetrischen Katalyse, siehe: D. E. A. Colby, S. M. Mennen, Y. Xu, S. J. Miller, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2007**, *107*, 5759-5812.
- [29] (a) M. Kuemin, J. Engel, H. Wennemers, *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 596-600; (b) M. Kuemin, S. Schweizer, C. Ochsenfeld, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15474-15482.
- [30] Für einen Review, siehe: F. Rabanal, M. D. Ludevid, M. Pons, E. Giralt, *Biopolymers* **1993**, *33*, 1019-1028.
- [31] D. Chandler, *Nature* **2005**, *437*, 640-647.
- [32] (a) R. Breslow and D. Rideout, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 7816-7818. (b) S. Otto, J. B. F. N. Engberts, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2809-2820.
- [33] B. Chu, *Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice* (1. Aufl.), Academic Press, Boston, (1991).
- [34] A. Córdova, W. Notz, C. F. Barbas, *Chem. Commun.* **2002**, *24*, 3024-3025.
- [35] Y.-Q. Fu, Y.-J. An, W.-M. Liu, Z.-C. Li, G. Zhang, J.-C. Tao, *Catal. Lett.* **2008**, *124*, 397-404.
- [36] A. P. Brogan, T. J. Dickerson, K. D. Janda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8100-8102.
- [37] M. Messerer, H. Wennemers, *Synlett* **2011**, *4*, 499-502.

C Experimenteller Teil

1. Allgemeine Bemerkungen

1.1 Geräte und Materialien

Nuclear Magnetic Resonance (NMR). NMR-Spektren wurden auf einem Bruker DPX 500, einem DPX 400 und einem av250 Spektrometer aufgenommen. Chemische Verschiebungen werden in ppm angegeben, für ^1H und ^{13}C -Spektren diente TMS oder das Lösungsmittelsignal als Referenz. Alle Spektren wurden nach erster Ordnung interpretiert und die Kopplungskonstanten (J) sind in Hertz (Hz) angegeben. Alle Lösungsmittel wurden von Cambridge Isotope Laboratories, Inc. bezogen.

Massenspektrometrie (MS). Finnigan MAT LCQ und Bruker esquire 3000plus Geräte wurden für die Elektrosprayionisation (ESI) Massenspektrometrie verwendet. Für MALDI-TOF MS Spektren wurde ein Applied Biosystems Voyager-DE PRO Gerät verwendet. Hochaufgelöste Massen wurden auf einem Bruker FTMS 4.7T BioAPEX II Instrument gemessen (MS Service UNI-Fribourg).

High Performance Liquid Chromatographie (HPLC). HPLC-Analysen wurden an einem Shimadzu SCL10A mit einem Dioden Array Detektor SPD-M10A durchgeführt und mit einer LiChrospher 100 RP-18e $5\mu\text{m}$ (250mm x 4mm) Säule von Merck oder einer Reprosil 100 RP-18e $5\mu\text{m}$ (150mm x 10mm) von Waters getrennt. Für die präparative Aufreinigung mittels HPLC wurde eine LiChrospher 100 RP-18e $5\mu\text{m}$ (250mm x 10mm) Säule verwendet; HPLC Lösung B bezeichnet 0.1% TFA in H_2O während der fehlende Anteil entsprechend aus Lösung A: CH_3CN besteht.

UV-Spektroskopie. Die CD-Spektren wurden mit einem Applied Biophysics Chirascan Spektrometer oder einem Aviv[®] Circular Dichroism Spektrometer Model 62A DC gemessen. UV-Vis Spektren wurden auf einem Perkin-Elmer Spektrometer (Lambda Bio 40) aufgenommen.

Dynamic Light Scattering (DLS). Dynamic Light Scattering Messungen wurden an einem ALV DLS/SLS-5022F Kompakt Goniometer System von der ALV-Laser Vertriebs GmbH vorgenommen, das mit einem ALV/CGS-8F Goniometer, einem ALV-5000-EPP Multiplen-Tau-Digital-Korrelator, einer ALC Korrelator Software 3.0 und einem 1145P-3083 He-Ne-Laser von JDS Uniphase (22 mW, 633 nm) verbunden war und bei Streulicht-Winkeln zwischen 30° und 150° gemessen hat. Quartz Kuvetten wurden von Hellma bezogen.

Transmission Electron Microscopy (TEM). TEM-Analysen wurden in dem Mikroskopie-Zentrum (Pharmazentrum) der Universität Basel durchgeführt. Die Analysen wurden an einem Philips EM 400 erstellt, das bei 80kV arbeitet und mit einer Megaview II Charge-Coupled-Device Kamera (CCD) ausgestattet ist und mittels einer Morgagni 268D Kontroll- und Bildverarbeitungssoftware gesteuert wird. Die Proben wurden auf glow discharged, parlodion coated, 150 mesh copper grids aufgetragen, mit Wasser gewaschen, abgetupft, an der Luft getrocknet und mit Uranylacetat gefärbt.

Atomic Force Microscopy (AFM). Die Analysen wurden an einem Pico SPM LE Molecular Imaging Gerät mit silicon cantilevers ($C = 10\text{-}130\text{ N/m}$, Nanosensors) durchgeführt. Non-contact mode wurde angewendet um die Oberflächentopographie der Vesikel in getrocknetem Zustand zu vermessen. Die Vesikel wurden aus wässriger Lösung auf gesäubertes Mica aufgetragen und an der Luft getrocknet.

Laser scanning microscopy (LSM) und Fluorescence correlation spectroscopy (FCS). LSM und FCS wurde an einem inverted confocal fluorescence laser scanning microscope LSM 510 META/Confocor2 (Zeiss, Germany) durchgeführt, das einen Argon Laser (for 405, 458, 477, 488 und 514 nm) und zwei Helium-Neon Laser (543 und 633 nm) als Lichtquelle verwendet. Hierfür wurden 15 μL der Probe auf die Glass-Oberfläche eines Objektträgers (Huber & Co. AG, Switzerland) aufgetragen, der in der xy-Ebene des Mikroskops platziert wurde. Der Anregungs-Laserstrahl und die Fluoreszenz-Emission durchlaufen dasselbe Objektiv. Das Fluoreszenz-Signal wurde mittels hoch-sensiblen avalanche photo dioden aufgenommen. Fluorescence intensity fluctuations wurden mittels Gleichungen für eine Autokorrelationsfunktion prozessiert. Die Evaluation der FCS Daten erfolgte, wie bereits beschrieben.¹

Lösungsmittel für Extraktionen und die Säulenchromatographie wurden vor dem Einsatz destilliert. Wasser für spektroskopische Messungen und die HPLC wurde über ein Barnstead Ultrapure Water System filtriert bzw. von Aldrich bezogen. Alle verwendeten Chemikalien entsprachen hoher Qualität, wurden von Fluka, Aldrich, Iris Biotech und Acros bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die Harze für die Festphasen Synthese wurden von Novabiochem (Merck Biosciences) bezogen. Die Aminosäuren wurden von Bachem bezogen. Reaktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie auf Merck Kieselgel 60 F_{254} – Platten verfolgt. Die Verbindungen wurden mittels UV (254 nm) oder durch Anfärben mit KMnO_4 bzw. Ninhydrin detektiert. Flashchromatographien wurden mit Fluka oder Merck Kieselgel 60, Korngrösse 40-63 μm durchgeführt.

KMnO₄-Dip: 9 g KMnO_4 , 60 g K_2CO_3 , 15 ml 5% NaOH und 900 ml H_2O

Ninhydrin-Dip: 0.6 g Ninhydrin, 200 ml Butanol und 6 ml 99% AcOH

CAM-Dip: 2.5 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, 75 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ und 500 ml 10% H_2SO_4

α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix: 10 mg α -Cyano-4-hydroxycinnamic in 1:1 (v/v) Mischung Wasser/Acetonitril mit 0.3% TFA (1 ml)

2,6-Dihydroxyacetophenone matrix: 1) Eine kleine Menge 2,6-Dihydroxyacetophenone in 1:1 (v/v) Mischung aus H_2O /Acetonitril (1 ml). 2) 92 mg Ammonium tartrate in H_2O (1 ml). 3) 600 μl **1** vermischt mit 300 μl **2**

Na-Phosphat Puffer 0.1 M, pH 5.5: 90 g NaH_2PO_4 , 32.7 g Na_2HPO_4 und 500 ml H_2O .

¹ P. Riegler, W. Meier, JACS, **2006**, 128, 367-373

1.2 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström ($1\text{Å} = 10^{-10}\text{ m}$)	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
abs	absolut	HRMS	high resolution Massenspektroskopie
Ac	Acetyl	HV	Hochvakuum
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid	Hyp	4-Hydroxyprolin
AcOH	Essigsäure	<i>J</i>	Kopplungskonstante
Amp	4-Aminoprolin	K	Gleichgewichtskonstante
Azp	4-Azidoprolin	k	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	kJ	Kilojoule (10^3 J)
Boc ₂ O	<i>tert</i> -Butyloxycarbonylanhydrid	λ	Wellenlänge
Bn	Benzoyl	M	Molar (mol/L)
°C	Grad Celsius	M ⁺	Molekülkation
CD	Zirkulardichroismus	m	milli (10^{-3})
d	Duplett (NMR)	μ	micro (10^{-6})
Δ	Unterschied	MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
δ	chemische Verschiebung	Me	Methyl
DC	Dünnschicht Chromatographie	MHz	Megahertz
ΔH°	Änderung der Enthalpie unter Standard Bedingungen	min	Minute(n)
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat	MsCl	Methansulfonylchlorid
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin	m/z	Masse/Ladung
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	n	nano (10^{-9})
DMSO	Dimethylsulfoxid	NaN ₃	Natriumazid
DNA	2'-Deoxyribonucleinsäure	NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
ε	Extinktionskoeffizient	NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
E _a	Aktivierungsenergie	NMR	Nuclear Magnetic Resonanz
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid-hydrochlorid	Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
eq	Äquivalent	Pfp	Pentafluorophenol
ESI-MS	Elektronsprayionisation Massenspektroskopie	PPI	Polyprolin Form I
EtOAc	Essigsäureethylester	PPII	Polyprolin Form II
EXSI	Exchange spectroscopy	PPh ₃	Triphenylphosphin
Flp	4-Fluoroprolin	ppm	parts per million
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl	Rf	Retentionsfaktor (DC)
g	Gramm	Pro	Prolin
ges.	gesättigt	quant.	quantitative
h	Stunde(n)	RT	Raumtemperatur
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat	s	Singulett (NMR)
HCTU	2-(6-Chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate	t	Triplett (NMR)
		t _R	Retentionszeit HPLC
		Θ	mittlere molare Elliptizität
		TFA	2,2,2-Trifluoressigsäure
		TFE	Trifluorethanol
		THF	Tetrahydrofuran
		TMS	Tetramethylsilan

2. Allgemeine Protokolle für die Synthese an fester Phase

2.1 Abspaltung von Schutzgruppen (Fmoc bzw. Alloc)

Fmoc-Abspaltung: Das Harz wurde für 15 min in CH₂Cl₂ quellen gelassen und 2 Mal mit DMF gewaschen. Das Harz wurde 3 Mal für 10 min mit Pip/DMF (1:4) behandelt und abwechselnd mit CH₂Cl₂ und DMF gewaschen.

Alloc-Abspaltung: Das Harz wurde sorgfältig gewaschen (DMF, CH₂Cl₂) und am Hochvakuum getrocknet. In einem 10 ml Schlenk-Kolben wurden 0.05 eq. Pd(PPh₃)₄ abgewogen und durch mehrmaliges Evaporieren und Spülen mit N₂ getrocknet. Ein Lösungsmittelgemisch aus CH₂Cl₂/AcOH/NMM (38:2:1) wurde entgast und zu dem Katalysator gegeben. Das Harz wurde in abs. CH₂Cl₂ quellen gelassen, eine Ar-Atmosphäre angelegt und mit der Reaktionslösung versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde für 1 h bei RT geschüttelt, abfiltriert und mit einer frischen Reaktionslösung versehen. Diese Abfolge wurde insgesamt 3 Mal wiederholt, bis die entsprechenden Farbtests positiv verliefen. Anschliessend wurde das Harz gewaschen (DMF, CH₂Cl₂, 1% iPr₂NEt in DMF, 1% Et₂NCSSH in DMF) und getrocknet.

2.2 Bestimmung der Harzbeladung

Bestimmung der Harzbeladung: Eine Probe (ca. 3 mg) des Peptid-beladenen Harzes wurde mit DMF (4x) und CH₂Cl₂ (4x) gewaschen, in ein Eppendorf-Tube eingewogen und am Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Harz wurde mit 500 µl Pip/DMF (1:4) versetzt und für 30 min bei RT geschüttelt. Die Reaktionsmischung wurde mit 3 ml DMF verdünnt und ihre Absorption bei 301 nm (ε= 7800) gegen einen Leerwert aus 500 µl Pip/DMF (1:4) und 3 ml DMF vermessen.

$$L_{301} = \frac{E \cdot V}{\epsilon \cdot m}$$

E = Extinktion

ε = Extinktionskoeffizient (ε= 7800)

m = Masse an eingewogenem Harz (in mg)

V = Volumen (3.5 ml)

- Es wurde mit Beladungen zwischen 0.2 und 0.3 mmol/g gearbeitet.

2.3 Farbtest und Acetylierung

Acetylierung: Nach dem Filtrieren der Reaktionslösung wurde das Harz mit DMF (4x), CH₂Cl₂ (4x) und DMF (4x) gewaschen. Ein 20facher molarer Überschuss von Ac₂O und iPr₂NEt wurde in DMF gelöst und auf das Harz gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei RT geschüttelt und anschliessend von Harz gewaschen (DMF, CH₂Cl₂).

Farb-Test (TNBS): Einige wenige Harz-Kügelchen wurden in ein Eppendorf-Tube platziert, mit 1 – 2 Tropfen der jeweiligen Lösungen versetzt und gemischt. Die Reaktionsmischung wurde für 10 min bei RT stehen gelassen und anschliessend unter dem Mikroskop untersucht. Bei leichter Gelb- oder Orange-Färbung wurde die Kupplung mit einem halbierten Ansatz wiederholt. Farblose Harz-Kugeln zeigen eine vollständige Kupplung an.

- Lösung 1: 10% iPr₂NEt in DMF
- Lösung 2: 1 M wässrige TNBS-Lösung

Farb-Test (Kaiser): Einige wenige Harz-Kügelchen wurden in ein Eppendorf-Tube platziert, mit 1 – 2 Tropfen der einzelnen Lösungen versetzt und gemischt. Das Reaktionsgefäss wurde für 5 min bei 100 °C geschüttelt und die Harz-Kügelchen unter dem Mikroskop analysiert. Bei leichter Blau-Färbung wurde die Kupplungsreaktion mit einem halbiertem Ansatz wiederholt. Farblose oder leicht gelbliche Lösung bzw. Harz-Kugeln zeigen eine vollständige Kupplung an.

- Lösung 1: 5 g Ninhydrin in 100 ml EtOH
- Lösung 2: 80 g Phenol in 20 ml Ethanol
- Lösung 3: 2 ml 0.001 M wässriger KCN-Lösung in 98 ml Pyridin

2.4 Manuelle Kupplung von Aminosäuren

2.4.1 Aktivierung mit Carbodiimiden

Aktivierung und Kupplung mit DIC/HOBt: Nach dem Entschützen der Aminofunktion auf dem Harz wurde das Harz sorgfältig gewaschen (DMF, CH₂Cl₂, DMF) und mittels Farb-Test kontrolliert. In einem getrocknetem 10 ml Kolben wurde die Aminocarbonsäure (3 eq.) vorgelegt und in abs. DMF oder DMF/CH₂Cl₂ (1:1) gelöst. Es wurde ein N₂-Strom über die Lösung geleitet und HOBt (3eq.) zugegeben. Die Lösung wurde bei RT gerührt bis kein Feststoff mehr zu erkennen war und mit DIC (3eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 10 min bei RT gerührt und anschliessend auf das Harz gegeben. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Farb-Tests überwacht und bis max. 12 h ausgeweitet.

- Bei der Verwendung von Fmoc-His(Trt)-OH wurde die Aktivierungszeit auf 5 min reduziert, da der Aktivester dieser Verbindung zur Oxazolone-Bildung und damit zur Racemisierung neigt, die durch den Stickstoff des Imidazolringes katalysiert wird.
- Die Kupplung von Carboxyrhodamin 110 (2 eq.) erfolgte mittels dieses Protokolls.

2.4.2 Aktivierung mit Acyl-Aminium Salzen

Aktivierung und Kupplung mit HATU/iPr₂NEt: Nach dem Entschützen der Aminofunktion auf dem Harz wurde das Harz sorgfältig gewaschen (DMF, CH₂Cl₂, DMF) und mittels Farb-Test kontrolliert. In einem ausgeheiztem 10 ml Kolben wurde die Aminocarbonsäure (3 eq.) vorgelegt, in abs. DMF gelöst und unter eine N₂-Atmosphäre gesetzt. Die Lösung wurde mit HATU (3 eq.) versetzt und mit iPr₂NEt (3 eq.) gemischt. Die Reaktionsmischung wurde zwischen 3 und 8 min bei RT gerührt, bevor sie auf das Harz gegeben wurde. Das Harz wurde bei RT geschüttelt, nach 20 min mit zusätzlichen 25% iPr₂NEt versetzt und weitere 60 bis 90 min bei RT geschüttelt.

- Die Aktivierungszeit wurde bei der Verwendung von Fmoc-His(Trt)-OH auf 3 min minimiert.
- Alternativ wurden nach diesem Protokoll auch Aktivierungen mittels PyBOP, HCTU und DEPT durchgeführt.

2.5 Abspaltung der Peptide vom Harz

2.5.1 Seitenketten-geschützte Carboxamid-Peptide

Abspaltung von geschützten Carboxamid-Peptiden (SieberAmid): Das Harz wurde für 20 min in CH_2Cl_2 quellen gelassen und filtriert. Eine Lösung aus 1% TFA in CH_2Cl_2 wurde zu dem Harz gegeben und für 2 min bei RT geschüttelt. Die Lösung wurde durch Anlegen eines N_2 -Stromes abgenutscht und in eine Lösung aus 10% Pyridin in MeOH gegeben. Die Schritte wurden bis zu 10 Mal wiederholt und adsorbiertes Peptid durch abwechselndes Spülen mit MeOH und CH_2Cl_2 vom Harz gewaschen. Die Waschlösungen wurden vereinigt, am Vakuum von leicht flüchtigen Bestandteilen getrennt und in einem Minimum an MeOH aufgenommen. Die Lösung wurde tropfenweise bei 0°C auf einen 10fachen Überschuss an Wasser gegeben und für 10 min gekühlt. Das Präzipitat wurde zentrifugiert, von überstehender Lösung abdekantiert und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde in wenig MeOH aufgenommen und mittels HPLC-Methoden gereinigt.

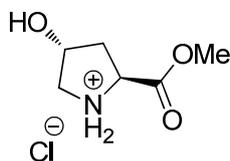
2.5.2 Ungeschützte Carboxamid-Peptide

Abspaltung von ungeschützten Carboxamid-Peptiden (RinkAmid MBHA): Das Harz wurde für 20 min in CH_2Cl_2 quellen gelassen und filtriert. Eine frisch hergestellte Lösung aus $\text{HBF}_4\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (2 mmol), Thioanisol (2 mmol) und einer Spatelspitze Phenol in TFA (2 ml) wurde auf das Harz gegeben und bei RT geschüttelt. Nach 90 min wurde die Lösung abgenutscht, das Harz mit TFA (2x) gewaschen und die vereinigten Lösungsmittelportionen wurden unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde mit wenig MeOH verdünnt und bei 0°C in das 10-15fache Volumen an Et_2O getropft. Die Suspension wurde für 10 min bei 0°C gekühlt und anschliessend zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde dekantiert und das Präzipitat mit Et_2O gewaschen bis kein Scavenger-Geruch mehr wahrnehmbar war. Das Rohprodukt wurde in wenig MeOH aufgenommen und mittels HPLC-Methoden gereinigt.

3. Synthese des Diketopiperazin-Rezeptors

3.1 Synthese des Diketopiperazins 8

3.1.1 Synthese von H-(4R)-Hyp-OMe



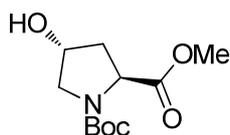
In einem Dreihalskolben wurden 20 g (152.5 mmol, 1 eq.) H-(4R)-Hyp-OH in 250 ml MeOH suspendiert und auf 0 °C gekühlt. In einen Zeitraum von 45 min wurden über einen Tropftrichter 22.3 ml (306.0 mmol, 2 eq.) SOCl₂ zugegeben, wobei eine starke Gasentwicklung erkennbar wurde. Die entstandene Suspension wurde für 2.5 h bei 0 °C und weitere 5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene graue Rückstand aus EtOH (200 ml) umkristallisiert, um 23.3 g (84%) H-(4R)-Hyp-OMe als farblosen Feststoff zu erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD, 25 °C): δ/ppm = 4.67 (s, 3H, -CO₂CH₃), 4.62-4.58 (m, 2H; H_α, H_γ), 3.43 (dd, *J* = 4.0 Hz, 12.8 Hz, 1H; H_δ), 3.33-3.29 (m, 1H; H_δ), 2.42-2.36 (m, 1H; H_β), 2.24-2.16 (dd, *J* = 4.8 Hz, 10.8 Hz, 1H; H_β).

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD, 25 °C): δ/ppm = 170.6, 69.8, 58.6, 54.3, 37.1.

MS (ESI): *m/z* (%) = 146.0 (100), 159.9 (31), 291.0 (1), gerechnet für C₅H₉NO₃.

3.1.2 Synthese von Boc-(4R)-Hyp-OMe



Unter einer Ar-Atmosphäre wurden 23.3 g (128.0 mmol, 1 eq.) H-(4R)-Hyp-OMe in 250 ml CH₂Cl₂ suspendiert, mit 37.2 ml (280.0 mmol, 2.2 eq.) Et₃N versetzt und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 33.6 g (154.0 mmol, 1.2 eq.) Boc₂O gegeben und die Mischung für 30 min bei 0 °C und weiteren 10 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde mit CH₂Cl₂ (150 ml) verdünnt und mit aq. 1 N

HCl-Lösung (200 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit H₂O (150 ml), ges. NaHCO₃ (200 ml) und ges. NaCl-Lösung(200 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Solvens bei vermindertem Druck entfernt, um 32.0 g (93%) Boc-(4*R*)-Hyp-OMe zu erhalten.

R_f = 0.56 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1, Ninhydrin).

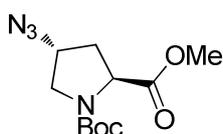
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Amidbindung) im Verhältnis 1:2 in CDCl₃

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ/ppm = (Hauptkonformer) 4.41-4.31 (m, 1H; H_γ), 4.33 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H; H_α), 4.67 (s, 3H, -CO₂CH₃), 3.57-3.34 (m, 2H; H_δ), 2.23-1.95 (m, 2H; H_β), 1.34 (s, 9H; -*t*Bu). (Separierte Signale des Nebenkonformers) = 1.39 (s, 9H; -*t*Bu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 174.1, 154.4, 80.7, 69.40, 58.4, 55.0, 52.4, 39.4, 28.7. (Nebenkonformer) = 173.9, 155.0, 80.6, 70.1, 57.9, 55.0, 52.6, 38.7, 28.6.

MS (ESI): *m/z* (%) = 268.1 [M+Na]⁺ (19), 513.3 [2M+Na]⁺ (100), 527.2 [M+K]⁺ (41), gerechnet für C₁₁H₁₉NO₅.

3.1.3 Synthese von Boc-(4*R*)-Azp-OMe (**3**)



Unter einer Ar-Atmosphäre wurden 38.7 g (147.5 mmol, 1.25 eq.) PPh₃ in 250 ml Toluol suspendiert und mit 9.2 ml (142.0 mmol, 1.2 eq.) MsOH versetzt. Zu der Mischung wurden tropfenweise 0.24 ml (47.2 mmol, 0.4 eq.) Et₃N gegeben, die entstandene blass gelbe Lösung wurde mit Boc-(4*R*)-Hyp-OMe versetzt auf 0 °C gekühlt. Mit einer Spritze wurden portionsweise 32.0 ml (165.0 mmol, 1.4 eq.) DIAD zugegeben, das Eisbad wurde entfernt und die Suspension wurde für weitere 5 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf RT abgekühlt, mit 100 ml CH₂Cl₂ verdünnt, in einen Scheidetrichter überführt und mit ges. NaHCO₃ Lösung (200 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (2 x 50 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Öl wurde in 250 ml DMF aufgenommen, mit 39.1 g (409.0 mmol, 3.4 eq.) NaN₃ versetzt und für 11.5 h bei 80 °C unter

Rückfluss erhitzt. Die braune Suspension wurde auf RT abgekühlt, das Lösungsmittel über einen Liebigkühler abdestilliert und der Rückstand in 200 ml Et₂O aufgenommen. Die Mischung wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (150 ml) gewaschen, die wässrige Phase wurde mit Et₂O (2 x 75 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der braune, ölige Rückstand wurde mit Pentan (200 ml) verdünnt, das farblose Präzipitat wurde abgetrennt und die Lösung mit Et₂O (3 x 50 ml) gewaschen. Das Pentan wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbliebene ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt, um 25.8 g (80%) Boc-(4*R*)-Azp-OMe als gelbes Öl zu erhalten.

R_f = 0.50 (Hex/EE, 2:1, Ninhydrin).

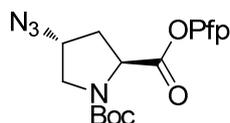
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Amidbindung) im Verhältnis 1:2 in CDCl₃

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.27 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H; H_α), 4.17-4.12 (m, 1H; H_γ), 3.69-3.63 (m, 4H; -OCH₃, H_δ), 3.58-3.51 (m, 1H; H_δ), 2.33-2.22 (m, 1H; H_β), 2.15-2.09 (m, 1H; H_β), 1.36 (s, 9H; *t*Bu). (Separierte Signale des Nebenkongomers) = 4.36 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_α), 3.44-3.40 (m, 1H; H_δ), 1.41(s, 9H; *t*Bu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 172.9, 153.3, 80.6, 58.7, 57.7, 52.1, 51.2, 36.2, 28.1. (Nebenkongomer) = 172.7, 153.9, 80.6, 59.2, 57.3, 52.3, 51.3, 35.3, 28.3.

MS (ESI): *m/z* (%) = 293.5[M+Na]⁺ (1), gerechnet für C₁₁H₁₈N₄O₄.

3.1.4 Synthese von Boc-(4*R*)-Azp-OPfp (**4**)



12.9 g (47.7 mmol, 1 eq.) Boc-(4*R*)-Azp-OMe wurden in 90 ml THF/MeOH (1:1) aufgenommen und mit einer Lösung aus 2.2 g (85.9 mmol, 1.8 eq.) NaOH in 13.4 ml H₂O versetzt. Die Mischung wurde für 2.5 h bei RT gerührt, mit aq. 1 M HCl Lösung auf einen pH-Wert von drei eingestellt (ca. 50 ml) und mit CH₂Cl₂ (100 ml) verdünnt. Die Phasen wurden getrennt und die organische Schicht wurde mit H₂O (60 ml) und ges. NaCl-Lösung (60 ml) gewaschen. Die leicht flüchtigen Anteile wurden bei

vermindertem Druck entfernt und der ölige Rückstand wurde in 90 ml CH₂Cl₂ aufgenommen. Die Mischung wurde mit kristallinem 9.6 g (52.5 mmol, 1.1 eq.) Pfp-OH versetzt und unter einer Ar-Atmosphäre wurden 13.7 g (71.6 mmol, 1.5 eq.) EDC zugegeben. Die Suspension wurde für 17 h bei RT gerührt, mit aq. 1 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert nahe drei gebracht und mit CH₂Cl₂ (20 ml) verdünnt. Die Phasen wurden getrennt, der wässrige Anteil wurde mit CH₂Cl₂ (2 x 10 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte wurden mit H₂O (20 ml) und ges. NaCl-Lösung (20 ml) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Flüchtige Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt und 9.5 g (47%) Boc-(4R)-Azp-OPfp konnten als hellbraunes Öl isoliert werden.

R_f = 0.55 (Hex/EE, 3:1, Ninhydrin).

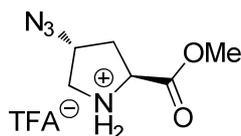
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Amidbindung) im Verhältnis 1:2 in CDCl₃

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.68 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H; H α), 4.28-4.23 (m, 1H; H γ), 3.77-3.67 (m, 4H; -OCH₃, H δ), 3.57-3.51 (m, 1H; H δ), 2.59-2.47 (m, 1H; H β), 2.40-2.32 (m, 1H; H β), 1.44 (s, 9H; *t*Bu). (Separierte Signale des Nebenkonformers) = 4.71 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H α), 1.47(s, 9H; *t*Bu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 168.7, 153.6, 142.7, 140.2, 139.6, 137.0, 81.8, 59.0, 57.7, 51.7, 37.1, 28.4, 25.9. (Nebenkonformer) = 169.0, 154.3, 82.2, 59.7, 57.6, 51.8, 35.8, 28.6.

MS (ESI): *m/z* (%) = 445.4[M+Na]⁺ (1), gerechnet für C₁₆H₁₅F₅N₄O₄.

3.1.5 Synthese von H-(4R)-Azp-OMe (5)



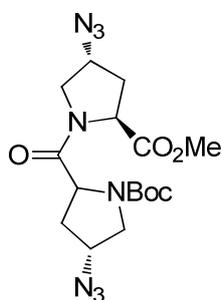
12.9 g (47.7 mmol) Boc-(4R)-Azp-OMe wurden in 36 ml CH₂Cl₂ gelöst und vorsichtig mit 12 ml TFA versetzt. Nach 3 h Rühren bei RT wurde die tiefgelbe Lösung zur Trockne eingengt. Der ölige Rückstand wurde in wenig MeOH aufgenommen und aus Et₂O gefällt. Der isolierte und getrocknete, farblose Feststoff machte 10.5 g (77%) aus.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ/ppm = 4.59 (t, J = 8.0 Hz, 1H; H_α), 4.51-4.48 (m, 1H; H_γ), 3.81 (s, 3H; $-\text{OCH}_3$), 3.77-3.67 (m, 1H; H_δ), 3.57-3.49 (m, 1H; H_δ), 2.54-2.48 (m, 1H; H_β), 2.43-2.36 (m, 1H; H_β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ/ppm = 168.9, 59.9, 58.8, 54.2, 51.4, 35.0.

MS (ESI): m/z (%) = 171.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 202.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (40), gerechnet für $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$.

3.1.6 Synthese von Boc-(4R)-Azp-(4R)-Azp-OMe (6)



6.4 g (22.5 mmol, 1 eq.) H-(4R)-Azp-OMe wurden in 10 ml CH_2Cl_2 suspendiert und mit 7.7 ml (45.0, 2 eq.) $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ basisch gemacht. Die Mischung wurde tropfenweise mit einer Lösung aus 9.5 g (22.5 mmol, 1 eq.) Boc-(4R)-Azp-OPfp in 10 ml CH_2Cl_2 versetzt und im N_2 -Strom auf wenige ml eingeeengt. Die viscose Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt, mit wenig CH_2Cl_2 verdünnt und durch die Zugabe von ca. 15 g Amberlite IR-120H auf einen sauren pH-Wert gebracht. Das Harz wurde abfiltriert, mit CH_2Cl_2 (3 x 5 ml) gewaschen und die vereinigten Lösungsmittelportionen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck aufkonzentriert, um 14.8 g Rohprodukt zu erhalten. Eine säulenchromatographische Aufreinigung (Hex/EE; 1:3 auf 1:2) lieferte 6.1 g (66%) eines farblosen Öls.

R_f = 0.38 (Hex/EE, 1:3, Ninhydrin).

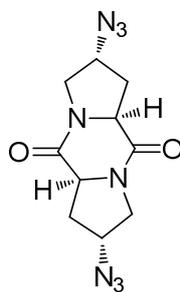
Die NMR-Spektren zeigen zwei Konformere (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Amidbindung) im Verhältnis 1:1.5 in CDCl_3

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ/ppm (Hauptkonformer) = 4.65-4.23 (m, 4H; H_α , H_γ), 4.00-3.45 (m, 7H; $-\text{OCH}_3$, H_δ), 2.34-2.14 (m, 4H; H_β , 1.44 (s, 9H; *t*Bu). (Separierte Signale des Nebenkongformers) = 4.47 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H_α), 1.41 (s, 9H; *t*Bu).

^{13}C -NMR (125.6 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ/ppm = 171.8, 171.6, 170.8, 170.7, 153.9, 153.1, 80.5, 80.1, 59.6, 59.3, 59.2, 58.7, 57.5, 57.5, 56.3, 56.0, 52.3, 52.3, 51.5, 51.4, 51.3, 51.2, 35.4, 34.7, 34.0, 33.9, 28.1.

MS (ESI): m/z (%) = 431.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), gerechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_8\text{O}_5$.

3.1.7 Synthese von Cyclo-(-(4R)-Azp-(4R)-Azp-) (**7**)



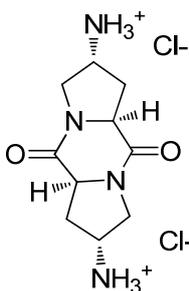
6.1 g (14.9 mmol) Boc-(4R)-Azp-(4R)-Azp-OMe wurden 35 ml CH_2Cl_2 gelöst, auf 0 °C gekühlt und portionsweise mit 12 ml TFA versetzt, wobei sich die Lösung unmittelbar tieforange färbte und Gas freigesetzt wurde. Die Mischung wurde für 2.5 h bei RT gerührt und unter vermindertem Druck von ihren leicht flüchtigen Bestandteilen befreit. Der ölige Rückstand wurde in 55 ml THF aufgenommen, mit 12.7 ml (74.3 mmol) $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die gelbe Mischung wurde mit ca. 40 ml aq. 1 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert um 2 eingestellt und mit CH_2Cl_2 (60 ml) verdünnt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Schicht wurde mit CH_2Cl_2 (2 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O (50 ml) und ges. NaCl-Lösung (50 ml) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt, um einen farblosen Feststoff mit bräunlichen Verunreinigungen zu erhalten. Eine Umkristallisation aus ca. 80 ml Ethylacetat lieferte 2.1 g (51%) Cyclo-(-(4R)-Azp-(4R)-Azp-) in Form langer nadelförmiger Kristalle.

R_f = 0.21 (Hex/EE, 1:6, Ninhydrin).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ/ppm = 4.43-4.36 (dd, J = 10.3 Hz, 6.7 Hz, 2H; H_α), 4.34-4.25 (t, J = 6.7 Hz, 5.0 Hz, 1.6 Hz, 2H; H_γ), 3.66-3.58 (dd, J = 4.8 Hz, 12.8 Hz, 2H, H_δ), 3.53 (t, J = 12.8 Hz, 2H; H_δ), 2.40 – 2.31 (dd, J = 6.8 Hz, 12.8 Hz, 2H; H_β), 2.26 – 2.16 (ddd, J = 5.0 Hz, 10.4 Hz, 14.0 Hz, 2H; H_β).

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ/ppm = 166.5, 58.8, 58.7, 50.7, 33.9.

3.1.8 Synthese des Diketopiperazins **8** (DKP)



In einem 250 ml Druckgefäß wurden 1.2 g (4.35 mmol, 1eq.) Cyclo-(-(4*R*)-Azp-(4*R*)-Azp-) vorgelegt, in 15 ml MeOH gelöst und mit 0.35 ml rauchender HCl versetzt. Die Suspension wurde zusätzlich mit THF (6 ml) verdünnt und zu der resultierenden hellgelben Lösung wurden 120 mg 10 % Pd in Aktivkohle gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde mit Ar geflutet und in einer H₂-Druckkammer bei 3 bar über Nacht geschüttelt. Die schwarze Suspension wurde über eine Glasfilternutsche (Por. 3) filtriert, der Filterkuchen mit zusätzlichem MeOH (3 x 5 ml) gewaschen und die vereinigten Lösungsmittelportionen wurden unter vermindertem Druck eingeeengt, um 700.6 mg (54%) eines farblosen Feststoffs zu erhalten.

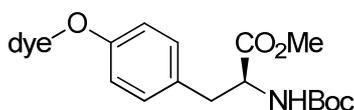
¹H-NMR (400 MHz, DMSO, 25 °C): δ/ppm = 8.62 (s, 9H, -NH₃), 4.81 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H; H α), 3.95-3.79 (m, 4H; H γ , H δ), 3.78-3.67 (dd, *J* = 12.9 Hz, 6.3 Hz, 2H; H δ), 3.67-3.54 (m, 2H; H β), 3.54-3.46 (dd, *J* = 12.9 Hz, 2.2 Hz, 2H; H β).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO, 25 °C): δ/ppm = 165.4, 58.0, 48.6, 48.0, 31.3.

MS (ESI): *m/z* (%) = 297.2 [M+H]⁺ (100), gerechnet für C₁₀H₁₈Cl₂N₄O₂.

3.2 Synthese Farbstoff-markierten Tyrosin-Derivats

3.2.1 Synthese von Boc-Tyr(dye)-OMe



1.5 g (5.08 mmol, 1 eq.) Boc-Tyr-OMe wurden vorgelegt und mit 1.6 g (5.08 mmol, 1 eq.) Dispers Rot 1 in 80 ml wasserfreiem Tol gelöst. Die Mischung wurde mit 1.33 g (5.08 mmol, 1 eq.) PPh₃ versetzt

und mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Über eine Spritze wurden langsam 1.48 ml (7.62 mmol, 1.5 eq.) DIAD zugegeben und für 20 min bei 0 °C und über Nacht bei RT gerührt. Die tiefrote Suspension wurde unter vermindertem Druck eingengt, der Rückstand in Et₂O aufgenommen, über eine Glasfilternutsche filtriert und im Vakuum von ihren leichtflüchtigen Bestandteilen getrennt. Eine säulenchromatographische Aufreinigung (90 g SiO₂, Hex/EE 2:1 + 0.5 % Et₂NMe) lieferte 634.0 mg (21%) eines roten Feststoffes.

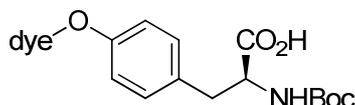
R_f = 0.33 (Hex/EE, 2:1, Ninhydrin).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ/ppm = 8.20 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, dye-H_{ar}), 7.96-7.86 (m, *J* = 9.0 Hz, *J* = 6.6 Hz, 4H; dye-H_{ar}), 7.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Tyr-H_{ar}), 6.86-6.76 (m, 4H; Tyr-H_{ar}, dye-H_{ar}), 5.00-4.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H; -NH), 4.59-4.48 (m, 1H; H_α), 4.16 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, OCH₂), 3.89-3.81 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H; NCH₂), 3.70 (s, 3H; CO₂Me), 3.61 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H; CH₃CH₂), 3.03 (dt, *J* = 13.0, 6.9 Hz, 2H; H_β), 1.41 (s, 9H; ^tBu), 1.34 – 1.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H; CH₂CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ/ppm = 157.2, 151.6, 144.2, 130.8, 126.7, 125.1, 123.0, 114.9, 111.8, 77.7, 77.4, 77.1, 65.7, 52.6, 50.3, 46.6, 28.7, 12.7.

MS (ESI): *m/z* (%) = 380 (27), 536 (45), 592 [M+H]⁺ (100), gerechnet für C₃₁H₃₇N₅O₇.

3.2.2 Synthese von Boc-Tyr(dye)-OH (**10**)



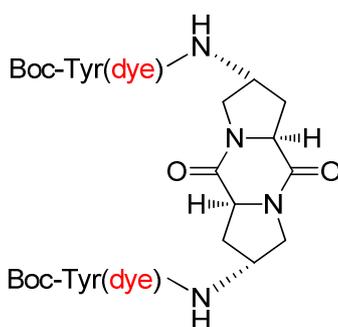
630.0 mg (1.06 mmol, 1eq.) Boc-Tyr(dye)-OMe wurden in 2 ml THF/MeOH (1:1) suspendiert und mit einer Lösung aus 76.6 mg (1.91 mmol, 1.8 eq.) NaOH in 0.75 ml H₂O versetzt und mit einer zusätzlichen Portion THF (0.5 ml) verdünnt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt, mit 1M HCl-Lösung (2 ml) auf einen sauren pH-Wert eingestellt und mit CH₂Cl₂ (120 ml) verdünnt. Die organische Lösung wurde mit H₂O (2 x 50 ml) gewaschen und die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (2 x 25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit ges. NaCl-Lösung (50 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt, um 582.0 mg (95%) eines tiefroten Feststoffes zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ/ppm = 8.30 (d, J = 8.7 Hz, 2H; dye- H_{ar}), 7.95-7.85 (m, 4H; dye- H_{ar}), 7.09 (d, J = 8.3 Hz, 2H, Tyr- H_{ar}), 6.86-6.75 (m, 4H; Tyr- H_{ar} , dye- H_{ar}), 4.96 (d, J = 7.7 Hz, 1H; NH), 4.54 (d, J = 6.2 Hz, 1H; $\text{H}\alpha$), 4.15 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH_2), 3.82 (t, J = 5.6 Hz, 2H; NCH_2), 3.59 (q, J = 6.9 Hz, 2H; CH_3CH_2), 3.19 – 2.94 (m, 2H; $\text{H}\beta$), 1.50-1.19 (m, 12H; ^tBu , CH_2CH_3).

MS (ESI): m/z (%) = 578 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), gerechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_7$.

3.3 Kupplung der Rezeptorarme

3.3.1 Synthese von Boc-Tyr(dye)-DKP



In einem 10 ml Rundkolben wurden 970.0 mg (1.68 mmol, 4 eq.) Boc-Tyr(dye)-OH und 638.5 mg (1.68 mmol, 4 eq.) HATU vorgelegt, in 4 ml abs. $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (1:1) suspendiert und mit 350 μl (2.10 mmol, 5 eq.) $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ versetzt. Die Mischung wurde für 8 min bei RT gerührt und mit einer Lösung aus 124.8 mg (0.42 mmol, 1eq.) DKP zusammen mit 210 μl (1.12 mmol, 3 eq.) $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ in abs. CH_2Cl_2 (2 ml) versetzt. Die tiefrote Suspension wurde im N_2 -Strom eingeeengt, nach 20 min Rühren bei RT mit weiteren 140 μl (0.84 mmol, 2 eq.) $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ versetzt. Die Mischung wurde über Nacht gerührt, mit CH_2Cl_2 (5 ml) verdünnt und mit 10 ml aq. Na_2PO_4 -Puffer (pH = 7.6) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (3 x 10 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Portionen wurden mit 0.5 M NaOH-Lösung (15 ml) und ges. NaCl-Lösung (15 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum von ihren flüchtigen Bestandteilen getrennt. Eine säulenchromatographische Trennung (CH_2Cl_2 + 2 % MeOH + 0.5 % Et_2NMe auf 3 % MeOH) lieferte 369.5 mg (66%) eines roten Feststoffes. Wenn nötig, kann der Reinheitsgrad durch eine Fällung aus Et_2O erhöht werden.

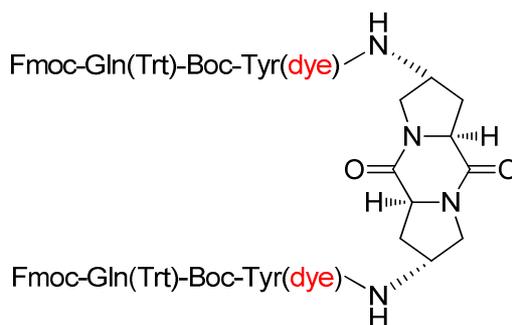
R_f = 0.30 (CH_2Cl_2 + 3 % MeOH + 0.5 % Et_2NMe).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ/ppm = 8.29 (d, J = 9.0 Hz, 4H; dye- H_{ar}), 7.88 (dd, J = 9.1 Hz, J = 5.8 Hz, 8H; dye- H_{ar}), 7.07 (dd, J = 8.4 Hz, J = 6.0 Hz, 4H; Tyr- H_{ar}), 6.85-6.72 (m, 8H; Tyr- H_{ar} , dye- H_{ar}), 5.23 (m, 2H; NH), 4.33 (bs, 2H; Tyr- H_{α}), 4.25-4.04 (m, 8H; OCH_2 , H_{α} , H_{γ}), 3.87-3.71 (m, 6H; NCH_2 , H_{δ}), 3.64-3.24 (m, 6H; OCH_2 , H_{δ}), 3.01-2.81 (m, 4H; Tyr- H_{β}), 2.56-1.94 (m, 4H; H_{β}), 1.6 (s, 9H; ^tBu), 1.3-1.19 (m, 3H; CH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ/ppm = 171.7, 166.1, 157.1, 151.7, 147.8, 144.1, 130.8, 126.7, 125.1, 123.0, 115.0, 111.8, 65.8, 59.4, 58.9, 55.9, 51.8, 50.2, 47.9, 46.5, 37.9, 33.9, 28.6, 12.7.

MS (ESI): m/z (%) = 1366 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), gerechnet für $\text{C}_{70}\text{H}_{82}\text{N}_{14}\text{O}_{14}$.

3.3.2 Synthese von Fmoc-Gln(Trt)-Tyr(dye)-DKP



267.6 mg (0.20 mmol, 1 eq.) Boc-Tyr(dye)-DKP wurden in 2 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) gelöst und die tiefrote Lösung wurde mit 4 M HCl in Dioxan (5 ml) versetzt, wobei ein sofortiger Farbumschlag nach violett erfolgte. Die Mischung wurde für 1 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und es konnte ein tief violetter Feststoff gewonnen werden. In einem getrocknetem 10 ml Rundkolben wurden 486.7 mg (0.80 mmol, 4 eq.) Fmoc-Gln(Trt)-OH und 303.0 mg (0.80 mmol, 4 eq.) HATU vorgelegt und in einem Gemisch aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2:1) suspendiert, mit 136 μl (0.80 mmol, 4 eq.) $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ versetzt und für 8 min bei RT gerührt. Die so aktivierte Reaktionslösung wurde zu dem DKP-Vorläufer, gelöst in abs. CH_2Cl_2 (2.5 ml) und 103 μl (0.60 mmol, 3 eq.) $i\text{Pr}_2\text{NEt}$, gegeben und im N_2 -Strom konzentriert. Die viskose Mischung wurde für 1 h bei RT gerührt mit CH_2Cl_2 (25 ml) verdünnt und zwei Mal mit 15 ml aq. Na_2PO_4 -Puffer (pH = 7.6) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (2 x 20 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte wurden mit ges. NaCl-Lösung (25 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Eine säulenchromatographische Trennung (100g SiO_2 , CH_2Cl_2 + 2 % MeOH + 0.5 % Et_2NMe auf 3 % MeOH) lieferte 452.6 mg eines roten Feststoffes. Der Rückstand wurde erneut in 6 ml CH_2Cl_2 gelöst und

unter starkem Rühren in 80 ml Et₂O getropft, wodurch sich ein Präzipitat ausfällen lies, welches abdekantiert und getrocknet wurde. Es konnten 383.0 mg (82%) eines dunkelroten Feststoffes isoliert werden.

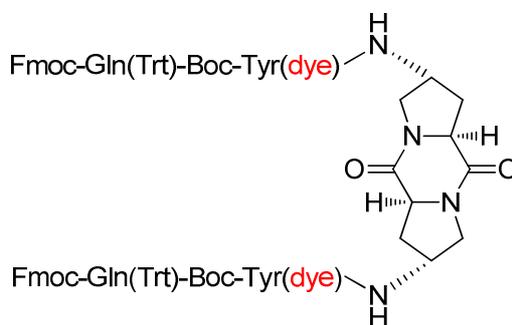
R_f = 0.25 (CH₂Cl₂ + 1 % MeOH + 0.5 % Et₂NMe).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ/ppm = 8.30 (d, *J* = 9.1 Hz, 4H; dye-H_{ar}), 7.93 – 7.79 (m, 8H; dye-H_{ar}), 7.75 – 7.65 (d, *J* = 7.8 Hz, 4H; Fmoc), 7.60 – 7.30 (m, 8H, Fmoc), 7.30 – 7.07 (m, 34H; Fmoc, Trt), 7.07 – 6.81 (m, 4H; Tyr-H_{ar}), 6.80 – 6.41 (m, 8H; Tyr-H_{ar}, dye-H_{ar}), 4.56 – 4.39 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H; Tyr-H_α), 4.23 (bs, 1H; H_α), 4.18 (d, *J* = 4.0 Hz, 4H; Fmoc), 4.13 – 3.94 (m, 6H; H_γ, Gln-H_α, Fmoc), 3.92 – 3.67 (m, 6H, H_δ, OCH₂), 3.62 – 3.49 (m, 6H; H_δ, NCH₂), 3.42 (q, *J* = 7.6 Hz, 4H; CH₂CH₃), 3.07 – 2.67 (m, 4H; Tyr-H_β), 2.51 – 2.30 (m, 4H; Gln-H_γ), 2.27 – 2.06 (m, 4H; H_β), 1.99 – 1.51 (m, 4H; Gln-H_β), 1.28 – 1.04 (m, 3H; CH₃CH₂).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ/ppm = 166.11, 157.95, 157.13, 151.65, 147.77, 144.11, 130.83, 126.67, 125.08, 123.01, 114.99, 111.82, 65.75, 60.80, 58.90, 53.84, 50.21, 47.92, 46.53, 28.68, 21.46, 14.60, 12.70.

MS (MALDI): *m/z* (%) = 1883 [M-2Fmoc]⁺ (60), 2106 [M-Fmoc]⁺ (100), 2350 [M+Na]⁺ (88), gerechnet für C₁₃₈H₁₃₀N₁₈O₁₈.

3.3.3 Synthese von Fmoc-Phe-Gln(Trt)-Tyr(dye)-DKP



In einem 10 ml Rundkolben wurden 130 mg (0.056 mmol, 1 eq.) Fmoc-Gln(Trt)-Tyr(dye)-DKP vorgelegt und in CH₂Cl₂ (4 ml) gelöst. Die Mischung wurde mit 420 µl (2.78 mmol, 50 eq.) TAEA versetzt und bei RT gerührt. Nach 0.5 h hatte sich ein Niederschlag aus der tiefroten Lösung abgeschieden. Die Suspension wurde weitere 10 min bei RT gerührt, mit CH₂Cl₂ (15 ml) verdünnt und

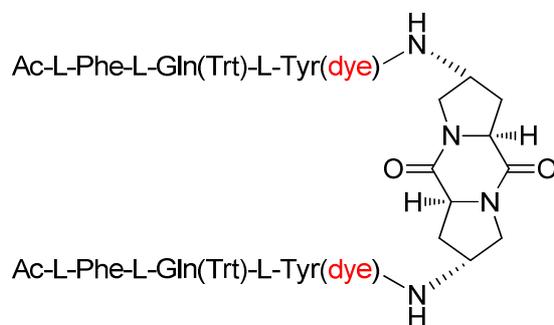
dreimal mit 10 ml Na₂PO₄-Puffer (pH = 7.6) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (2 x 20 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte wurden mit ges. NaCl-Lösung (20 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert. In einem zweiten Rundkolben wurden 92.7 mg (0.224 mmol, 4 eq.) HCTU vorgelegt, in 0.2 ml abs. DMF gelöst und mit 86.8 mg (0.224 mmol, 4 eq.) Fmoc-Phe-OH versetzt. Die Mischung wurde durch die Zugabe von 480 µl (0.280 mmol, 5 eq.) iPr₂NEt in 0.6 ml abs. CH₂Cl₂ auf einen basischen pH-Wert gebracht, mit einem CaCl₂-Rohr verschlossen und für 10 min bei RT gerührt. Die aktivierte Reaktionslösung wurde zu dem DKP-Vorläufer, suspendiert in abs. CH₂Cl₂ (0.2 ml), gegeben und unter einer Ar-Atmosphäre über Nacht bei RT gerührt. Die tiefrote Mischung wurde mit CH₂Cl₂ (15 ml) verdünnt, dreimalig mit 10 ml Na₂PO₄-Puffer (pH = 7.6) gewaschen und die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (2 x 15 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit ges. NaCl-Lösung (10 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Nach einer säulenchromatographische Trennung (20 g SiO₂, 19 cm x 2 cm; CH₂Cl₂ + 0.5 % MeOH + 1 % Et₂NMe mit Gradient auf 2 % MeOH) konnten 107 mg (73%) eines roten Feststoffes isoliert werden.

R_f = 0.24 (CH₂Cl₂ + 0.5 % MeOH + 1 % Et₂NMe).

Analytische HPLC: t_R = 19.3 min (68 %), 20.7 min (27 %); Gradient: 100 % CH₂Cl₂ auf CH₂Cl₂ + 3.5 % MeOH in 15 min und 15 min bei konstantem Verhältnis; Flussrate: 1 ml/min.

MS (MALDI): m/z (%) = 2645 [M+Na]⁺ (90), 2662 [M+K]⁺ (100), gerechnet für C₁₅₆H₁₄₈N₂₀O₂₀.

3.3.4 Synthese von Ac-Phe-Gln(Trt)-Tyr(dye)-DKP (**1**)



In einem 10 ml Rundkolben wurden 100 mg (0.038 mmol, 1 eq.) DKP-Vorläufer in 4 ml CH₂Cl₂ suspendiert und durch die Zugabe von 0.2 ml MeOH vollständig in Lösung gebracht. Die Mischung

wurde mit 284.5 μl (1.91 mmol, 50 eq.) TAEA versetzt und für 1.5 h bei RT gerührt, wobei sich ein Präzipitat bildete. Die Suspension wurde mit CH_2Cl_2 (10 ml) verdünnt, zweimal mit 5 ml Na_2PO_4 -Puffer (pH = 7.6) gewaschen und die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (2 x 10 ml) rückextrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit ges. NaCl-Lösung (10 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum von ihren leicht flüchtigen Bestandteilen befreit. Der verbliebene Rückstand wurde in 4 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst, mit 20 μl (0.114 mmol, 3 eq.) iPr_2NEt versetzt und mit 11 μl (0.114 mmol, 3 eq.) Ac_2O gemischt. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei RT gerührt, mit CH_2Cl_2 (10 ml) verdünnt und mit H_2O (2 x 5 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (2 x 5 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (10 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt, um 110 mg eines stark verunreinigten Rohproduktes zu erhalten. Eine säulenchromatographische Trennung (50 g SiO_2 ; 30cm x 3 cm; 4 % MeOH in CH_2Cl_2 + 0.5 % Et_2NMe auf 5 % MeOH) lieferte 53.2 mg (62%) eines roten Feststoffes.

$R_f = 0.20$ (CH_2Cl_2 + 4 % MeOH + 0.5 % Et_2NMe).

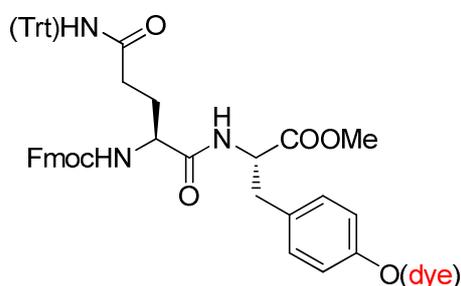
Analytische HPLC: $t_R = 8.5$ min (88 %); Gradient: 3.5 % MeOH in CH_2Cl_2 auf 6 % MeOH in 15 min; Flussrate: 1 ml/min; Nucleosil.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta/\text{ppm} = 8.28$ (d, $J = 8.9$ Hz, 4H; dye- H_{ar}), 7.86 (d, $J = 9.2$ Hz, 4H; dye- H_{ar}), 7.82 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H; dye- H_{ar}), 7.39 – 7.01 (m, 44H; Phe- H_{ar} , Tyr- H_{ar} , Trt), 6.72 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H; Tyr- H_{ar}), 6.70 (d, $J = 9.2$ Hz, 4H; dye- H_{ar}), 4.66 – 4.35 (m, 6H, Tyr- H_{α} , H_{α} , H_{γ}), 4.14 (dd, $J = 5.2, 10.0$ Hz; 2H; Phe- H_{α}), 3.97 (t, $J = 5.6$ Hz, 4H; OCH_2), 3.88 (dd, $J = 4.0, 6.8$ Hz, 2H; Gln- H_{α}), 3.69 – 3.55 (m, 6H, H_{δ} , NCH_2), 3.51 – 3.44 (m, 6H; H_{δ} , CH_2CH_3), 3.29 (dd, $J = 3.6, 14.4$ Hz, 4H; Tyr- H_{β}), 2.93 (dd, $J = 4.4, 14.0$ Hz, 4H; Phe- H_{β}), 2.80 (dd, $J = 3.2, 14.0$ Hz, 4H; Tyr- H_{β}), 2.59 (dd, $J = 4.0, 14.8$ Hz, 4H; Phe- H_{β}), 2.34 – 2.13 (m, 4H; H_{β}), 1.86 – 1.62 (m, 8H; Gln- H_{γ} , Gln- H_{β}), 1.65 (s, 3H; OCH_3), 1.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H; CH_2CH_3).

MS (MALDI): m/z (%) = 2263 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (15), 2286 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), 2302 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (84), gerechnet für $\text{C}_{130}\text{H}_{132}\text{N}_{20}\text{O}_{18}$.

4. Synthese des Rezeptor-Fragments 11

4.1 Fmoc-Gln(Trt)-Tyr(dye)-OMe



In einem 25 ml Rundkolben wurden 440.0 mg (0.74 mmol, 1 eq.) Boc-Tyr(dye)-OMe in abs. CH₂Cl₂ (1 ml) gelöst und unter starkem Rühren mit 4 N HCl in Dioxan (3 ml) versetzt, wobei sich die Lösung sofort von Rot nach Dunkelviolett färbte. Die Mischung wurde für 0.5 h bei RT gerührt und im Vakuum von ihren leicht flüchtigen Bestandteilen getrennt. Der dunkelviolette Rückstand wurde in abs. CH₂Cl₂ (3 ml) aufgenommen, durch die Zugabe von 140 µl (0.82 mmol, 1.1 eq.) iPr₂NEt in Lösung gebracht und mit 445.1 mg (0.73 mmol, 0.98 eq.) Fmoc-Gln(Trt)-OH versetzt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, mit 171.1 (0.89 mmol, 1.2 eq.) EDC vermischt und für 20 min im Eisbad gerührt. Nach weiteren 20 h Rühren bei RT wurde die Reaktionsmischung mit CH₂Cl₂ (10 ml) verdünnt und mit H₂O (2 x 5 ml) gewaschen. Die wässrige Schicht wurde mit CH₂Cl₂ (2 x 3 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (5 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Der rote Rückstand (845 mg) wurde durch eine säulenchromatographische Trennung (40 g SiO₂; Hex/EE, 1:1) gereinigt und es konnten 577 mg (72%) eines roten Feststoffes isoliert werden.

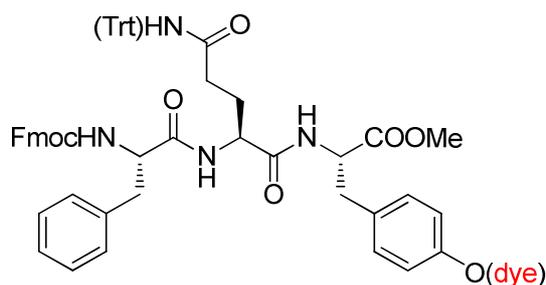
R_f = 0.32 (Hex/EE, 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ/ppm = 8.32 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, dye-H_{ar}), 7.96 – 7.83 (m, 4H, dye-H_{ar}), 7.74 (d, *J* = 7.6 Hz, H, Fmoc), 7.62 – 7.51 (m, NH), 7.38 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, Fmoc), 7.33 – 7.12 (m, 19H, Trt, Fmoc), 6.93 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Tyr-H_{ar}), 6.77 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, dye-H_{ar}), 6.69 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Tyr-H_{ar}), 4.63 (q, *J* = 5.6 Hz, 1H Tyr-H_α), 4.33 (m, 2H, Fmoc), 4.12 – 4.02 (m, Gln-H_α, CH₂O), 3.76 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂N), 3.66 (s, 3H, OMe), 3.56 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₃CH₂), 2.98 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H, Phe-H_β), 2.83 (m, 2H, Gln-H_β), 2.04 (s, 2H, Gln-H_γ), 1.30 – 1.20 (m, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ/ppm = 172.9, 171.5, 156.9, 156.6, 155.5, 151.8, 150.1, 145.0, 143.1, 129.4, 127.0, 126.1, 125.1, 124.2, 120.9, 114.3, 111.7, 80.7, 67.4, 66.4, 58.8, 58.3, 56.7, 47.4, 27.7, 12.9.

MS (ESI): *m/z* (%) = 1084 [M]⁺ (100), 949 (9), gerechnet für C₆₅H₆₁N₇O₉.

4.2 Fmoc-Phe-Gln(Trt)-Tyr(dye)-OMe



In einem 35 ml Rundkolben wurden 490 mg (0.45 mmol, 1 eq.) Fmoc- Gln(Trt)-Tyr(dye)-OMe in abs. CH_2Cl_2 (9 ml) gelöst, mit TAEA (3.4 ml, 22.6 mmol, 50 eq.) versetzt und bei RT gerührt. Nach 30 min wurde die Reaktionslösung mit CH_2Cl_2 (10 ml) verdünnt, in einen Scheidetrichter überführt und mit Phosphat-Puffer (2 x 15 ml, pH = 5.5) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (2 x 8 ml) extrahiert und der Extrakt mit übrigen organischen Anteilen vereinigt. Die vereinigten Extrakte wurden mit ges. NaCl-Lösung (10 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, unter vermindertem Druck eingeeengt und der rote Rückstand im Vakuum getrocknet. Der tiefrote Feststoff wurde in abs. CH_2Cl_2 (3 ml) aufgenommen, mit 172.0 mg (0.44 mmol, 0.98 eq.) Fmoc-Phe-OH versetzt und bei RT gerührt, bis kein Feststoff mehr erkennbar war. Die Lösung wurde mit einem CaCl_2 -Rohr verschlossen und auf 0°C gekühlt, mit 104.0 mg (0.54 mmol, 1.2 eq.) EDC und $7.7 \mu\text{l}$ *i*- Pr_2NEt (0.05 mmol, 0.1 eq.) gemischt und für 1 h bei gleicher Temperatur gerührt. Man liess die Reaktionsmischung auf RT erwärmen und über Nacht weiterrühren. Anschliessend wurde die Suspension mit CH_2Cl_2 (5 ml) verdünnt, in einen Scheidetrichter überführt und mit H_2O (5 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (2 x 8 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte wurden mit ges. NaCl-Lösung (6 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt, um 840 mg eines leicht verunreinigten Produktes zu erhalten. Eine säulenchromatographische Reinigung (60 g SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat (von 1:1 auf 1:1.5) mit 0.5% Et_2NMe) lieferte 220.0 mg (40%) eines roten Feststoffes.

$R_f = 0.18$ (Hex/EE, 1:1, 0.5% Et_2NMe).

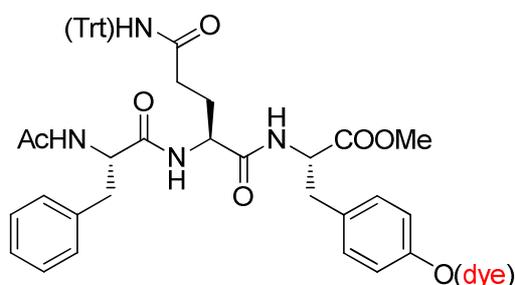
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta/\text{ppm} = 8.31$ (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, dye- H_{ar}), 7.93 (d, $J = 7.0$ Hz, 4H, dye- H_{ar}), 7.74 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, Fmoc), 7.38 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, Fmoc), $7.32 - 7.12$ (m, 21H, Phe- H_{ar} , Trt, Fmoc), 7.08 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, Phe- H_{ar}), 6.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H, Phe- H_{ar} , Tyr- H_{ar}), 6.78 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H, dye- H_{ar}), 6.71 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Tyr- H_{ar}), $4.44 - 4.21$ (m, 3H, Tyr- H_α , Phe- H_α , Gln- H_α), $4.12 - 4.01$ (m, 4H, Fmoc, CH_2O), 3.78 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2N), 3.65 (s, 3H, OMe), 3.57 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_3CH_2), 3.12

– 2.87 (m, 4H, Phe-H β , Tyr-H β), 2.54 – 2.38 (m, 2H, Gln-H β), 2.20 – 2.14 (m, 2H, Gln-H γ), 1.28 – 1.26 (m, 3H, CH $_3$).

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl $_3$, 25 °C): δ /ppm = 172.7, 172.2, 157.9, 151.7, 147.8, 144.8, 144.1, 141.7, 130.7, 129.7, 129.1, 129.0, 128.4, 128.1, 127.5, 126.7, 125.1, 123.0, 120.4, 114.9, 111.8, 77.8, 77.6, 71.1, 67.4, 65.6, 52.7, 50.2, 47.5, 46.5, 33.8, 22.4, 12.7.

MS (MALDI): m/z (%) = 1231 [M+H] $^+$ (100), 1253 [M+Na] $^+$ (62), 1269 [M+K] $^+$ (39), gerechnet für C $_{74}$ H $_{70}$ N $_8$ O $_{10}$.

4.3 Ac-Phe-Gln(Trt)-Tyr(dye)-OMe (11)



In einem 10 ml Rundkolben wurden 50.0 mg Fmoc-Phe-Gln(Trt)-Tyr(dye)-OMe (0.036 mmol, 1 eq.) in CH $_2$ Cl $_2$ /MeOH (95:5, 5 ml) gelöst und tropfenweise mit 270 μ l TAEA (1.82 mmol, 50 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei RT gerührt. Anschliessend wurde die Suspension mit CH $_2$ Cl $_2$ (5 ml) verdünnt, in einen Scheidetrichter überführt und mit Phosphat-Puffer (2 x 5 ml, pH = 5.5) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH $_2$ Cl $_2$ (4 ml) extrahiert, die organischen Anteile wurden vereinigt, mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO $_4$ getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Der tiefrote Rückstand wurde in abs. CH $_2$ Cl $_2$ (4 ml) aufgenommen und mit 37 μ l *i*-Pr $_2$ NET (0.22 mmol, 6 eq.) und 20 μ l Ac $_2$ O (0.22 mmol, 6 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde im N $_2$ -Strom eingengt und für 2h bei RT gerührt. Die viskose Lösung wurde mit CH $_2$ Cl $_2$ (10 ml) verdünnt, in einen Scheidetrichter überführt und mit Phosphat-Puffer (5 ml), 0.5 M NaOH (2 x 5 ml) und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Lösung wurde über MgSO $_4$ getrocknet und im Vakuum von ihren leichtflüchtigen Bestandteilen getrennt. Eine präparative Dünnschichtchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:10) lieferte 17.4 mg (46%) des Produktes; es konnten ausserdem 18.0 mg (50%) der nicht-acetylierten Verbindung isoliert werden.

$R_f = 0.17$ (Hex/EE, 1:10, 0.5% Et₂NMe).

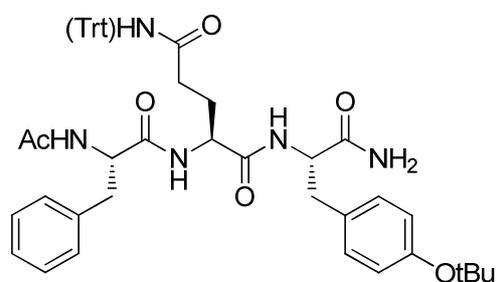
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ /ppm = 8.24 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, dye-H_{ar}), 7.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H, dye-H_{ar}), 7.25 – 7.07 (m, 17H, Phe-H_{ar}, Trt), 7.03 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H, Phe-H_{ar}), 6.97 – 6.86 (m, 3H, Tyr-H_{ar}, Phe-H_{ar}), 6.75 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, dye-H_{ar}), 6.67 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Tyr-H_{ar}), 4.52 (m, 1H, Phe-H α), 4.45 – 4.38 (m, 1H, Tyr-H α), 4.20 (dd, $J = 12.7, 6.8$ Hz, 1H, Gln-H α), 4.04 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH₂CH₂N), 3.74 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH₂CH₂O), 3.70 (s, 3H, CH₃O), 3.46 – 3.41 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.03 – 2.94 (m, 2H, Phe-H β), 2.84 – 2.78 (m, 2H, Tyr-H β), 2.38 – 2.26 (m, 2H, Gln-H β), 1.96 – 1.82 (m, 5H, Gln-H γ , CH₃CONH), 1.20 (t, $J = 7$ Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ /ppm = 157.4, 156.8, 151.3, 147.4, 144.4, 143.7, 143.6, 136.5, 130.4, 129.1, 128.7, 128.6, 128.0, 127.2, 127.0, 126.29, 125.5, 124.7, 122.6, 114.4, 111.4, 77.2, 70.8, 65.3, 58.5, 52.3, 52.2, 49.8, 47.8, 46.1, 37.7, 29.4, 24.8, 23.0, 14.3, 12.1, 1.3.

MS (MALDI): m/z (%) = 1052 [M+H]⁺ (23), 1074 [M+Na]⁺ (100), 1090 [M+K]⁺ (74), gerechnet für C₆₁H₆₂N₈O₉.

5. Synthesen an fester Phase

5.1 Ac-Phe-Gln(Trt)-Tyr(O^tBu)-NH₂ (**12**)



Die Synthese erfolgte an fester Phase mit SieberAmid Harz; Ausbeute: 54 %

Analytische HPLC (Reposil Gold): $t_R = 22.3$ min; Gradient: 15% ACN in H₂O (Lsg. B) auf 90% ACN in 30 min bei 50°C und einer Flussrate von 1 ml/min.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ /ppm = 7.40 – 6.91 (m, 22H, Phe-H_{ar}, Tyr-H_{ar}, Trt), 6.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Tyr-H_{ar}), 5.61 – 5.47 (m, 1H, NH), 5.36 (s, 1H, NH), 4.68 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H, Phe-H α), 4.15 (s, 1H, Tyr-H α), 4.02 (s, 1H, Gln-H α), 3.45 (dd, $J = 13.5, 3.5$ Hz, 1H, Phe-H β), 3.13 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, Phe-H β), 2.80 (t, $J = 13.3$ Hz, 1H, Tyr-H β), 2.52 (t, $J = 12.0$ Hz, 1H, Tyr-H β), 2.23 – 1.79 (m, 4H, Gln-H β , Gln-H γ), 1.62 (s), 1.51 (s, 3H, CH₃CONH), 1.29 (s), 1.18 (s, 9H, tBu).

6. Katalyse

6.1 Allgemeine Vorschrift für die direkte Aldolreaktion von 4-Nitrobenzaldehyd mit Cyclohexanon in organischen Lösungsmittel

The reactions were performed in 1.5 ml glass vials with screw caps that were agitated in a thermomixer (700 rpm). The catalyst **14b** (3.5 mg, 0.007 mmol, 0.05 eq.) and 4-nitrobenzaldehyde (20.0 mg, 0.13 mmol, 1 eq.) were placed in a glass vial and mixed with cyclohexanone (150 μ l, 1.45 mmol, 11 eq.). The addition of the specified solvent (350 μ l) resulted in a clear solution after 1 min of agitation. The reaction mixture was agitated until full conversion (3-48h, monitored by TLC-analysis: 20% EtOAc in cyclohexane), diluted with CH_2Cl_2 (3 ml) and quenched with a half saturated solution of NH_4Cl (2 ml). The layers were separated, extracted with CH_2Cl_2 (3 x 2 ml) and the combined organic phases were washed with sat. NaCl (3 ml) and dried over MgSO_4 . The filtrate was concentrated in vacuo and purified by flash chromatography on silica gel (5.6 g, 25% EtOAc in cyclohexane) to afford the aldol product as a colourless liquid that crystallized in long needles upon standing. The enantiomeric excess (ee) and the diastereomeric excess (de) were determined by chiral-phase HPLC analysis and by ^1H NMR analysis, respectively. Assignment of the stereoisomers was performed by comparison with published data² and chromatographic data obtained after separating the diastereoisomers.

6.2 Allgemeine Vorschrift für die direkte Aldolreaktion von 4-Nitrobenzaldehyd mit Cyclohexanon in Wasser

Die Reaktionen wurden in 1.5 ml Glasgefäßen mit Schraubverschluss durchgeführt und in einem Thermoschüttler (1800 rpm) vermischt. Der Katalysator (3.5 mg, 0.007 mmol, 0.05 eq.) wurde zusammen mit 4-Nitrobenzaldehyd (20.0 mg, 0.13 mmol, 1 eq.) vorgelegt, mit Cyclohexanon (100 μ l, 0.10 mmol, 7.5 eq.) versetzt und gut durchmischt. Entsprechend den Versuchen wurden Additive zugesetzt und die Reaktionsmischung als Emulsion für den angegebenen Zeitraum bei 1800 rpm geschüttelt oder bis ein vollständiger Umsatz erreicht wurde (4-30 h, an Hand von TLC-Analysen überprüft, 20% EtOAc in Cyclohexan). Anschliessend wurde die Reaktionsmischung mit CH_2Cl_2 (3ml) verdünnt und mit einer halb gesättigten Lösung aus NH_4Cl (2 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und mit CH_2Cl_2 (2 x 2ml) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte wurden mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Filtrat wurde

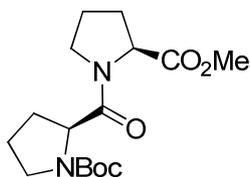
² (a) Mase, N.; Nakai, Y.; Ohara, N.; Yoda, H. Takabe, K.; Tanaka, F.; Barbas, III C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 734-735. (b) Tzeng, Z. H.; Chen, H. Y.; Reddy, R. J.; Huang, C. T.; Chen, K. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2879-2888.

unter vermindertem Druck eingengt und mittels Säulenchromatographie gereinigt, um das Aldolprodukt als farblose Flüssigkeit zu erhalten. Der Enantiomerenüberschuss und der Diastereomerenüberschuss wurden mittels Chiral-Phasen HPLC-Analyse bzw. mittels $^1\text{H-NMR}$ -Analyse ermittelt. Die Zuordnung der Stereoisomere erfolgte an Hand publizierter Daten und der chromatographischen Daten, die erhalten wurden nachdem die Diastereomere getrennt wurden.

6.3. Synthese des peptidischen Katalysators 14b

6.3.1 Synthese des Fragments 19

6.3.1.1 Boc-Pro-Pro-OMe



To a solution of H-Pro-OMe (1.65 g, 12.8 mmol, 1 eq.) in dry CH_2Cl_2 (40 ml) was added Boc-Pro-OH (2.69 g, 12.5 mmol, 0.98 eq.). The yellow solution was cooled to 0°C and $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (128 μl , 1.27 mmol, 0.1 eq.) was added followed by EDC-HCl (2.93 g, 15.31 mmol, 1.2 eq.). The flask was closed with a CaCl_2 -tube and the turbid solution was stirred for one hour at 0°C and overnight at rt, by which time the solution had become clear again. Removal of the solvent gave 7.3 g of the crude product that was dissolved in 15 ml CH_2Cl_2 , washed once with H_2O (5 ml) and then with 1 M HCl (5 ml) and an additional portion of water (5 ml). The organic phase was washed with sat. aq. NaHCO_3 (8 ml), sat. aq. NaCl (5 ml) solution and dried over MgSO_4 . Removal of the solvent under reduced pressure yielded 3.58 g of an amber colored oil (11.0 mmol, 86%):

TLC Hex/EtOAc (1:3), $R_f = 0.29$;

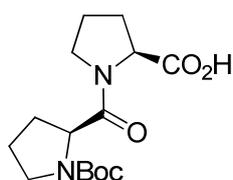
s-cis/s-trans Conformers around the Pro-Pro amide bond are observed in a ratio of 1 : 0.75 in the ^1H and ^{13}C NMR spectra in CDCl_3 .

Major Isomer: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.58 (dd, $J = 4.0$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H, $\text{H}_\alpha\text{Pro}$), 4.49 (dd, $J = 3.2$, $J = 8.4$ Hz, 1H, $\text{H}_\alpha\text{Pro}$), 3.79 – 3.35 (m, 4H, H_βPro), 3.69 (s, 3H, OMe), 2.18 – 1.83 (m, 8H, H_βPro , $\text{H}_\gamma\text{Pro}$), 1.44 (s, 9H, O^tBu).

^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 168.6, 166.8, 154.7, 81.2, 60.9, 60.1, 51.9, 46.8, 46.6, 30.9, 28.8, 24.0, 23.7.

MS (ESI) m/z (%) = 349 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), 675 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (20), calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$.

6.3.1.2 Boc-Pro-Pro-OH (**19**)



The dipeptide **3** (3.58 g, 11.0 mmol, 1eq) was dissolved in a mixture of THF/MeOH (1:1, 20 ml). An aqueous solution of NaOH (5 ml, 0.79 g, 19.8 mmol, 1.8 eq) was slowly added to the peptide whereupon an increase of the reaction temperature was observed. The solution was stirred at rt for 2.5 h. The organic solvents were removed under reduced pressure and the aqueous phase was acidified to pH 2 by dropwise addition of conc. HCl (ca. 2 ml). The aqueous solution was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 10 ml) and the combined organic layers were washed with H_2O (10 ml), sat. aq. NaCl (10 ml) and dried over MgSO_4 . After removal of the solvent a clear oil was obtained which solidified upon drying (2.84 g, 9.1 mmol, 83%):

s-cis/s-trans Conformers around the Pro-Pro amide bond are observed in a ratio of 1 : 0.75 in the ^1H and ^{13}C NMR spectra in CDCl_3 .

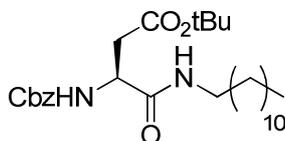
Major isomer: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.63 (dd, $J = 2.8$ Hz, $J = 8.0$ Hz, 1H, $\text{H}_\alpha\text{Pro}$), 4.48 (dd, $J = 3.6$, $J = 8.0$ Hz, 1H, $\text{H}_\alpha\text{Pro}$), 3.75 (dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 9.6$, 1H, $\text{H}_\delta\text{Pro}$), 3.58 – 3.36 (m, 3H, $\text{H}_\delta\text{Pro}$), 2.32 – 1.80 (m, 8H, H_βPro , $\text{H}_\gamma\text{Pro}$), 1.44 (s, 9H, O^tBu).

^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 174.3, 173.7, 155.1, 80.3, 60.1, 58.2, 47.6, 47.4, 30.5, 29.7, 28.9, 25.4, 24.6.

MS (ESI) m/z (%) = 335 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), 647 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (30), 213 $[\text{M}-\text{Boc}]^+$ (30), calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$.

6.3.2 Synthese des Fragments 16

6.3.2.1 Cbz-Asp(O^tBu)-NH(CH₂)₁₁CH₃



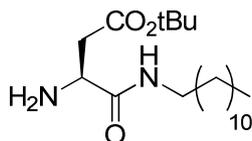
Cbz-Asp(O^tBu)-OH (3.50 g, 10.83 mmol, 1 eq.) and dodecylamine (1.97 g, 12.13 mmol, 0.98 eq.) were dissolved in CH₂Cl₂, the flask was closed with a CaCl₂ tube and cooled with an ice bath. *i*Pr₂NEt (40 μl) was added and the mixture was vigorously stirred while EDC·HCl (2.12 g, 11.05 mmol, 1.2 eq.) was added. The resulting suspension was stirred at 0°C for one hour and overnight at rt. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was taken up in EtOAc (30 ml). The organic phase was washed with H₂O (20 ml) and the aqueous phase was extracted with EtOAc (10 ml). The combined organic layers were washed with 0.1 M HCl (20 ml), sat. NaHCO₃ (15 ml), sat. NaCl (15 ml) and dried over MgSO₄. Removal of the solvent yielded **5** as a colorless solid (4.86 g, 9.91 mmol, 90%):

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.35 (s, 4H, Cbz), 6.48 (s, 1H, Asp-NH), 5.98 (d, *J* = 7.2 Hz, NHCH₂), 5.12 (s, 2H, Cbz), 4.47 (s, 1H, H_αAsp), 3.21 (dt, *J* = 6.8 Hz, *J* = 6.4 Hz, NHCH₂CH₂), 2.89 (dd, *J* = 4.0 Hz, *J* = 16.8 Hz, 1H, H_βAsp), 2.61 (dd, *J* = 6.8 Hz, *J* = 16.8 Hz, 1H, H_βAsp), 1.43 (s, 11H, ^tBu, CH₂CH₃), 1.25 (s, 18H, 9xCH₂), 0.87 (t, *J* = 6.0 Hz, CH₃).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 171.7, 170.6, 136.5, 129.0, 128.7, 128.5, 82.2, 67.6, 51.5, 40.1, 37.9, 32.3, 30.1, 29.7, 28.4, 27.2, 23.1, 21.5, 14.6.

MS (ESI) *m/z* (%) = 677 (100), 514 [M+Na]⁺ (82), 492 [M+H]⁺ (6), calcd for C₂₈H₄₆N₂O₅.

6.3.2.2 H-Asp(O^tBu)-NH(CH₂)₁₁CH₃ (**16**)



Under a nitrogen atmosphere, MeOH (10 ml) was added to 10% (w/w) Pd/C (490 mg) followed by Peptide **5** (4.86 g, 9.91 mmol, 1eq.). The suspension was stirred vigorously and ammonium formate (5.00 g, 79.3 mmol, 8 eq.) was added, whereupon the mixture evolved a gas. The mixture was stirred at rt for 3 h, filtered through a glass funnel and the filtrate was washed with additional MeOH (3 x 15

ml). The solvent was removed under reduced pressure to obtain an amber colored oil. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (40 ml), washed with sat. NaHCO₃ (20 ml) and H₂O (2 x 20 ml). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 15 ml) and the combined organic extracts were washed with sat. NaCl (20 ml) and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure to obtain a colorless, sticky solid (3.37 g, 9.45 mmol, 95%):

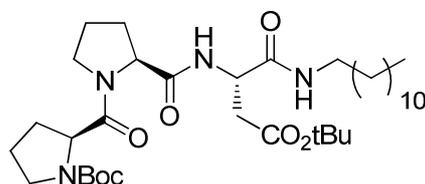
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 3.63 (dd, *J* = 4.0 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1H, H_αAsp), 3.21 (dt, *J* = 5.2 Hz, *J* = 7.6 Hz, NHCH₂CH₂), 2.84 (dd, *J* = 4.0 Hz, *J* = 16.8 Hz, 1H, H_βAsp), 2.47 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 16.8 Hz, 1H, H_βAsp), 1.43 (s, 11H, ^tBu, CH₂CH₃), 1.24 (s, 18H, 9xCH₂), 0.87 (t, *J* = 6.4 Hz, CH₃).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 173.7, 171.8, 81.5, 41.1, 39.7, 32.3, 30.0, 29.8, 28.5, 27.4, 23.1, 14.5.

MS (ESI) *m/z* (%) = 736 [2M+Na]⁺ (100), 379 [M+Na]⁺ (40), 357 [M+H]⁺ (10), calcd for C₂₀H₄₀N₂O₅.

6.3.3 Synthese des alkylierten Katalysators **14b**

6.3.3.1 Boc-Pro-Pro-Asp(O^tBu)-NH(CH₂)₁₁CH₃



The alkylated amino acid **6** (2.46 g, 6.89 mmol, 0.98 eq.) was dissolved in CH₂Cl₂ (25 ml) and dipeptide **4** (2.20 g, 7.03 mmol, 1 eq.) was added. The solution was cooled to 0°C, EDC·HCl (1.62 g, 8.44 mmol, 1.2 eq.) and iPr₂NEt (24 μl, 0.14 mmol, 0.02 eq.) were added and the resulting suspension was stirred at 0°C for 1 h and for another 15 h at rt. The reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ (10 ml), washed with H₂O (15 ml) and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 10 ml). The combined organic extracts were washed with 0.1 M HCl (20 ml), H₂O (15 ml), sat. aq. NaHCO₃ (15 ml), sat. aq. NaCl (15 ml) and dried over MgSO₄. All volatiles were removed under reduced pressure to yield 3.60 g of the crude product. The oily residue was subjected to a column chromatography (cyclohexane:EtOAc, 1:5) to yield **7** (2.74 g, 4.20 mmol, 61%) as a colorless solid:

s-cis/s-trans Conformers around the Pro-Pro amide bond (1 : 0.10) and around the Asp(OtBu) carbamate bond are observed in the ¹H and ¹³C NMR spectra in CDCl₃.

Major isomer: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.50 (t, $J = 11.2$ Hz, 1H, CONH), 6.96 (m, 1H, CONH), 4.74 – 4.18 (m, 3H, $\text{H}_\alpha\text{Pro}$, $\text{H}_\alpha\text{Pro}$, $\text{H}_\alpha\text{Asp}$), 3.73 – 3.45 (m, 4H, H_βPro)

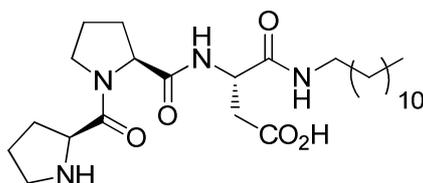
3.25 – 3.09 (m, 2H, NHCH_2CH_2), 2.89 (dd, $J = 5.6$ Hz, $J = 16.4$ Hz, 1H, H_βAsp), 2.63 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 16.8$ Hz, 1H, H_βAsp), 2.28 – 1.80 (m, 8H, H_βPro , $\text{H}_\gamma\text{Pro}$), 1.52 – 1.34 (m, 20H, $2\times^t\text{Bu}$, CH_2CH_3), 1.32 – 1.16 (s, 18H, $9\times\text{CH}_2$), 0.85 (t, $J = 6.8$ Hz, CH_3).

Minor isomer: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.87 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, CONH), 4.64 (d, $J = 8$ Hz, 1H, $\text{H}_\alpha\text{Pro}$), 4.55 – 4.39 (m, 1H, $\text{H}_\alpha\text{Asp}$), 4.32 (d, $J = 8$ Hz, 1H, $\text{H}_\alpha\text{Pro}$), 3.73 – 3.45 (m, 4H, H_βPro), 3.25 – 3.09 (m, 2H, NHCH_2CH_2), 3.06 (dd, $J = 4.0$ Hz, $J = 17.2$ Hz, 1H, H_βAsp), 2.44 (dd, $J = 5.6$ Hz, $J = 17.2$ Hz, 1H, H_βAsp), 2.28 – 1.80 (m, 8H, H_βPro , $\text{H}_\gamma\text{Pro}$), 1.52 – 1.34 (m, 20H, $2\times^t\text{Bu}$, CH_2CH_3), 1.32 – 1.16 (s, 18H, $9\times\text{CH}_2$), 0.85 (t, $J = 6.8$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 173.2, 171.5, 170.3, 155.0, 81.7, 80.4, 62.0, 59.5, 58.2, 49.8, 47.6, 47.2, 40.3, 37.0, 32.3, 30.0, 29.7, 29.1, 28.8, 28.4, 27.3, 25.8, 24.8, 24.1, 23.1, 14.6.

MS (ESI) m/z (%) = 674 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), 1325 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (26), calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_7$.

6.3.3.2 H-Pro-Pro-Asp-NH(CH₂)₁₁CH₃ (**1a**)



Under a nitrogen atmosphere, tripeptide **7** (2.63 g, 4.05 mmol, 1eq.) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (4.5 ml) and Et_3SiH (1.62 ml, 10.13 mmol, 2.5 eq.) was added dropwise, followed by TFA (4 ml, 52.60 mmol, 13 eq.) whereupon the solution evolved a gas. The mixture was stirred at rt for 5 h and the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in MeOH (1 ml) and subjected to an ion-exchange column chromatography. The column was washed with additional MeOH (5 x 2 ml) and the combined portions were concentrated under reduced pressure. The concentrated solution was added dropwise to a 100 fold excess of Et_2O at 0°C under rapid stirring which caused the immediate formation of a precipitate. The solvent was decanted and the precipitate was dried under reduced pressure to yield **1a** (1.90 g, 3.85 mmol, 95%) as a colorless solid:

s-cis/s-trans Conformers around the Pro-Pro amide bond are observed in a ratio 1 : 0.10 in the ^1H and ^{13}C NMR spectra in CDCl_3 .

Major isomer: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.14 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, CONH), 7.89 (m, 1H, CONH), 6.97 (m, 1H, CONH), 4.74 – 4.52 (m, 3H, $\text{H}_\alpha\text{Pro}$, $\text{H}_\alpha\text{Pro}$, $\text{H}_\alpha\text{Asp}$), 3.72 – 3.38 (m, 4H, $\text{H}_\delta\text{Pro}$), 3.28 – 3.10 (m, 2H, NHCH_2CH_2), 2.88 – 2.66 (m, 2H, H_βAsp), 2.52 – 1.88 (m, 8H, H_βPro , $\text{H}_\gamma\text{Pro}$), 1.50 – 1.40 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.32 – 1.20 (m, 18H, $9\times\text{CH}_2$), 0.87 (t, $J = 6.4$ Hz, CH_3).

Minor isomer: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, CONH), 7.64 (m, 1H, CONH), 6.72 (m, 1H, CONH), 4.92 (dd, $J = 4.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H, $\text{H}_\alpha\text{Pro}$), 4.47 (d, $J = 8$ Hz, 1H, $\text{H}_\alpha\text{Asp}$), 4.26 (m, 1H, $\text{H}_\alpha\text{Pro}$), 3.72 – 3.38 (m, 4H, $\text{H}_\delta\text{Pro}$), 3.28 – 3.10 (m, 2H, NHCH_2CH_2), 2.88 – 2.66 (m, 2H, H_βAsp), 2.52 – 1.88 (m, 8H, H_βPro , $\text{H}_\gamma\text{Pro}$), 1.50 – 1.40 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.32 – 1.20 (m, 18H, $9\times\text{CH}_2$), 0.87 (t, $J = 6.4$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 174.1, 172.1, 171.0, 168.1, 61.0, 59.2, 50.5, 47.9, 40.3, 32.3, 30.1, 29.8, 27.3, 25.5, 25.0, 23.1, 14.5.

MS (ESI) m/z (%) = 495 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), 517 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (15), 1013 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (17), calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_5$.

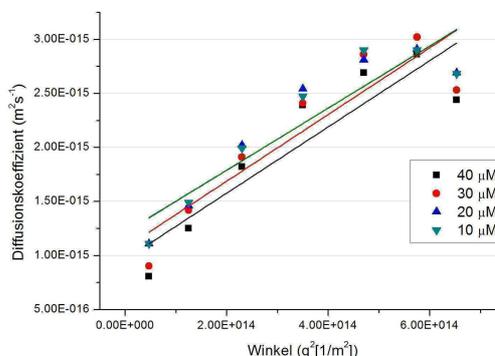
D Anhang

1. Dynamische Lichtstreuung

1.1 Beispiel für DLS-Analysen von Vesikeln die aus DPPC bestehen

Beispiel für Lipid-Vesikel aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) erläutert. Bei allen Arbeiten wurde sorgfältig darauf geachtet eine möglichst geringe Belastung der Probe durch Staubpartikel zu gewährleisten; diese führen zu verfälschten Ergebnissen, da sie Durchmesser zwischen 1 und 2 μm zeigen können. Für die Probe wurde DPPC in CHCl_3 gelöst, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der organische Film oberhalb der Phasen-Übergangstemperatur (40-50°C) von DPPC in Wasser (über Membranfilter von 1 μm gefiltert) suspendiert. Durch eine Ultraschallbehandlung wurden die gelösten Stoffe in kolloidale Partikel zerkleinert und auf eine Konzentration von 40 μM verdünnt:

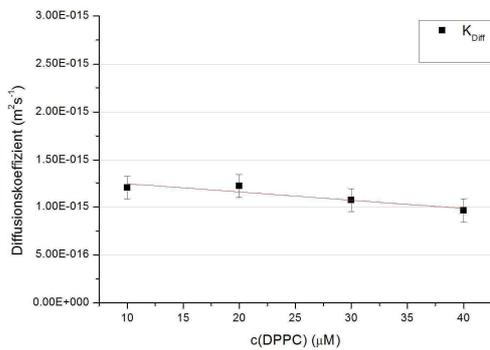
Die Probe wurde in eine Messküvette überführt (1200 μl) und die Intensität des Streulichts in 20er Schritten zwischen 30° und 150° gemessen. Die Messdauer pro Winkel betrug 120s. Anschliessend wurde die Probe bis zu 4 Mal verdünnt und dabei jeweils ihre Lichtstreuung in Abhängigkeit des Winkels bestimmt.



c(DPPC) [μM]	K_{Diff} [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]	PD [%]	R_h [nm]
40	$(1.1 \pm 0.26) \text{E}-15$	34	217 ± 65
30	$(1.2 \pm 0.21) \text{E}-15$	30	194 ± 55
20	$(1.2 \pm 0.21) \text{E}-15$	30	169 ± 42
10	$(1.2 \pm 0.21) \text{E}-15$	30	169 ± 42

Abb. 1: Lineare Regression der Diffusionskonstanten für DPPC in Abhängigkeit des Streuwinkels.

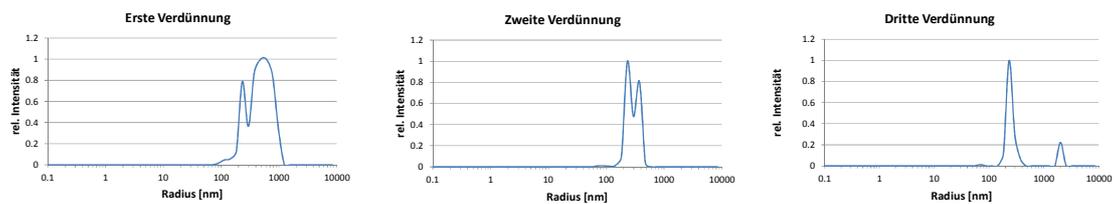
Da grössere Partikel das Licht stärker streuen, weisen die einzelnen Diffusionskonstanten einer polydispersen Probe eine starke Abhängigkeit von dem Streuwinkel auf. Dies führt zu einem relativ grossen Fehler in der Bestimmung des hydrodynamischen Radius. Daher werden die über den Winkelbereich gemittelten Diffusionskonstanten, die weniger Fehler-belastet sind, verwendet und durch eine lineare Regression über den Konzentrationsbereich gemittelt, so dass sich ein genauerer Durchschnittswert für R_h bilden lässt.



K_{Diff}	R_h
$[m^2s^{-1}]$	$[nm]$
$(1.33 \pm 0.07)E-15$	162 ± 8

Abb.2: Lineare Regression der K_{Diff} von DPPC über den Konzentrationsbereich.

1.2 Größenverteilung der Partikel aus der Selbst-Organisation von 1 und 2d bei 90°



1.3 Größenverteilung der Partikel aus den Fragmenten des Diketopiperazin Rezeptors

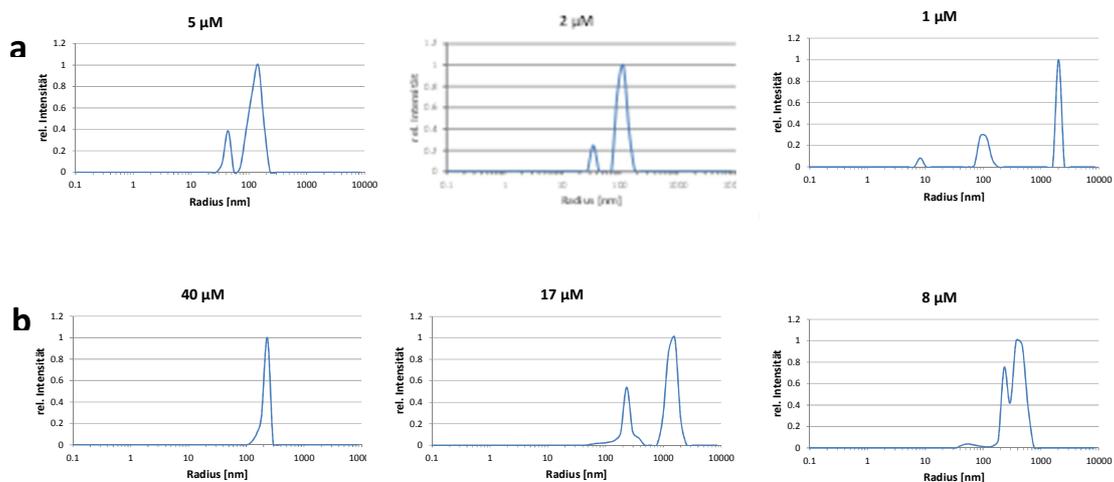
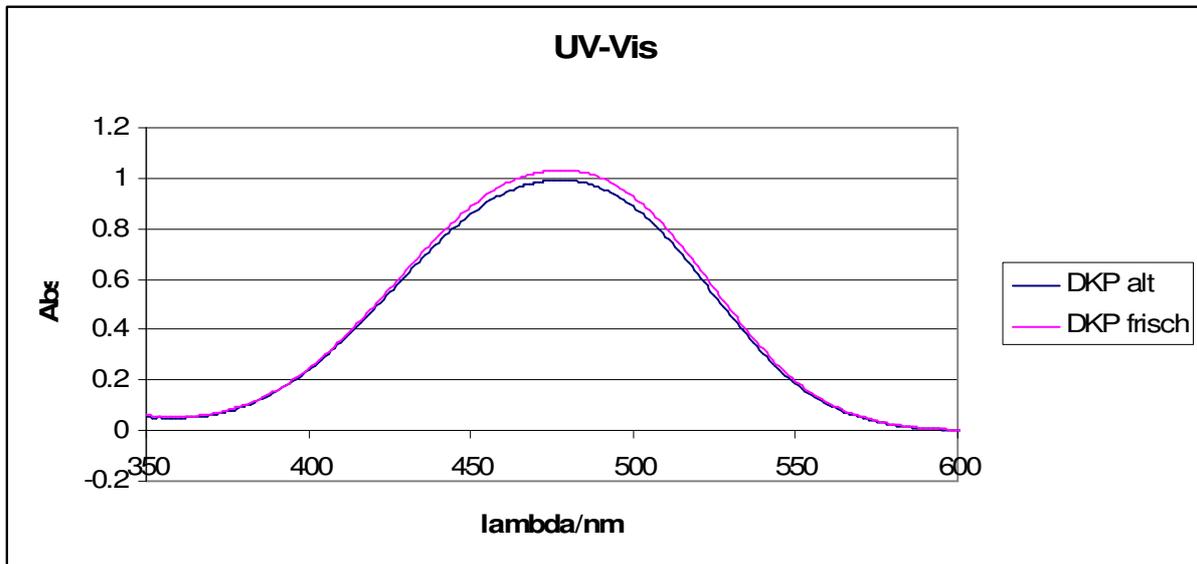


Abb.3: Größen-Verteilungsfunktion der Partikel des Rezeptorfragmentes **11** (a) und **12** (b) in Abhängigkeit der relativen Streuintensität und des Molekulargewichtes.

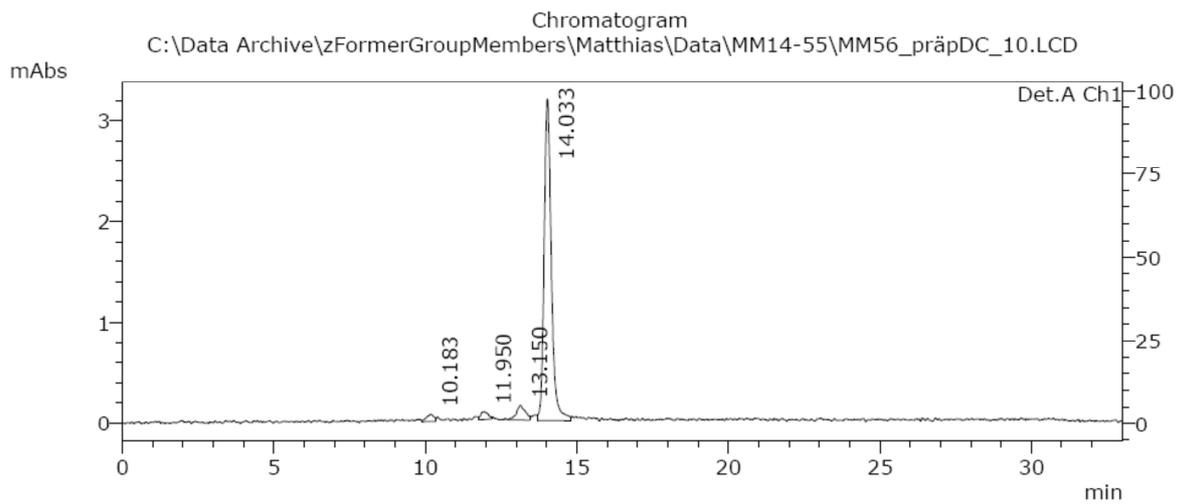
2. Untersuchungen zur Selbst-Aggregation des Rezeptors in THF

2.1. UV-Vis-Spektren des Diketopiperazin-Rezeptors in THF

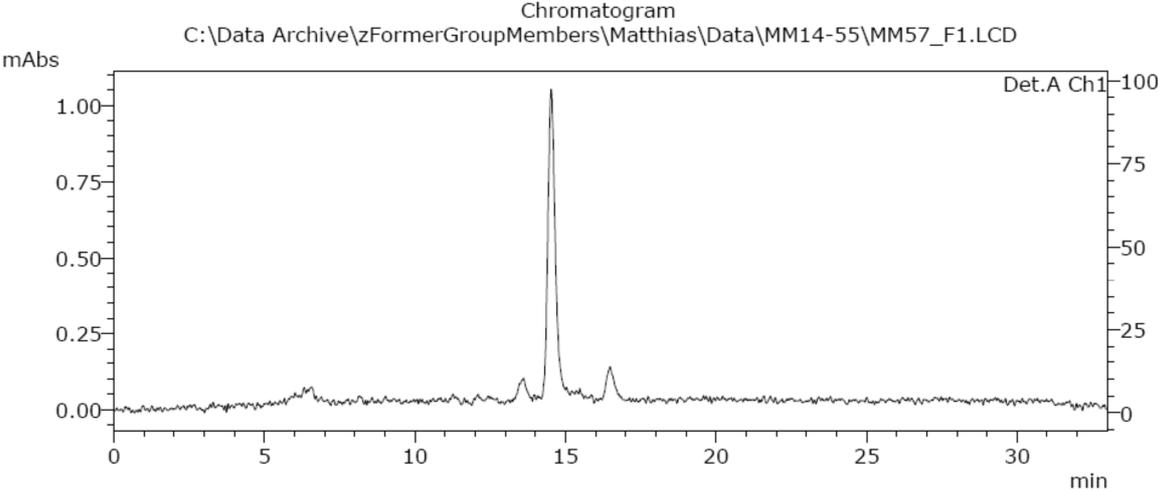


2.2. HPLC-Chromatogram

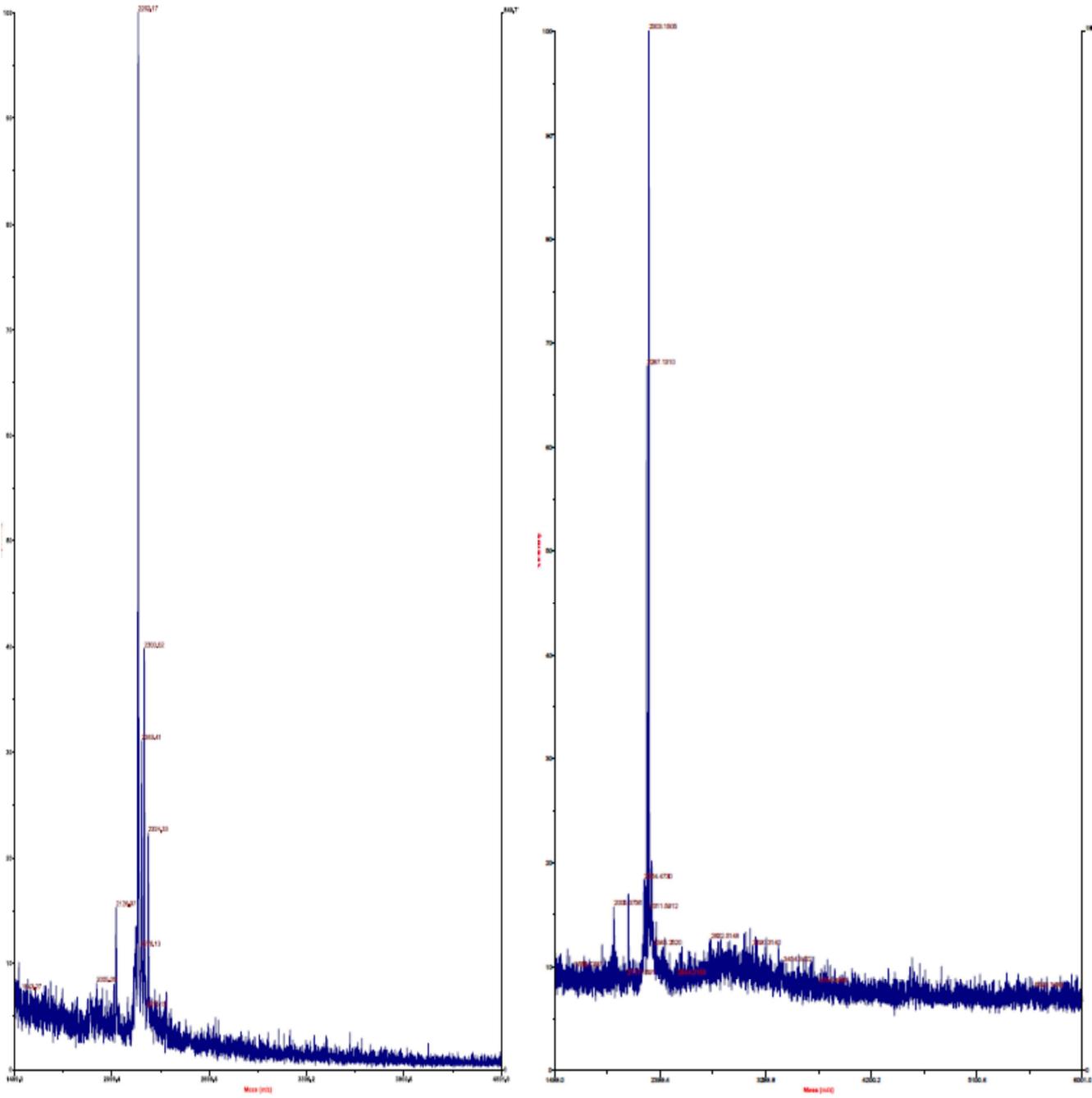
DKP-frisch: DCM/MeOH 2.5-5%, 33min



DKP-alt: DCM/MeOH 2.5-5%, 33min



2.3 Massenspektrometrie



MALDI-TOF: DKP alt gegen neu

3. Fluorescence Correlation spectroscopy

1 Vergleich der unterschiedlichen Selbstorganisationsprozesse

Der Diketopiperazin-Rezeptor **1** zeigt in seiner Fähigkeit zur Selbst-Organisation ein höchst interessantes Verhalten; er ist sehr leicht löslich in organischen Lösungsmitteln und besitzt ausserdem in CHCl_3 die Fähigkeit mit dem Tripeptid Ac-D-Val-D-Val-D-His-R eine selektive nicht-kovalente Bindung mit einer Affinität von $\Delta G = -3.9 \text{ kcal/mol}$ einzugehen. Die Selektivität dieser Bindung bleibt auch in Wasser erhalten, wenn eine pegylierte Version des Peptides (**2b-d**) verwendet wird. Eine frisch hergestellte Lösung aus Rezeptor **1** und den pegylierten Peptiden führt zu der Ausbildung von makromolekularen Partikeln, die auf der selektiven Rezeptor-Ligand-Bindung basieren. Dabei bildet sich vermutlich ein anfänglicher Host-Guest-Komplex, der den hydrophoben Rezeptor in Lösung hält und für die Ausbildung der makroskopischen Struktur des Vesikels verantwortlich ist.

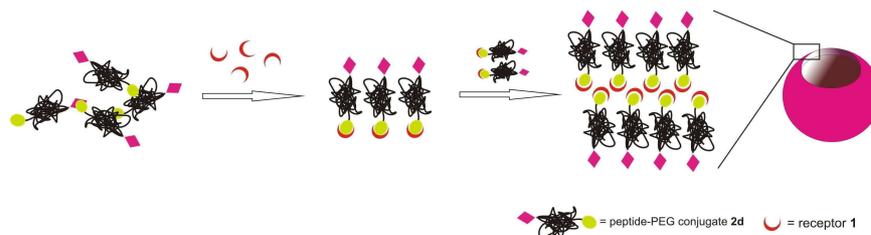


Abb. 36: Vorgeschlagenes Model der Selbst-Organisation aus Rezeptor **1** und pegyliertem Peptid **2d**.

Da dieser Komplex auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen beruht, die zwar durch den hydrophoben Effekt stabilisiert werden, ist die entstandene Formation dennoch sehr sensibel gegenüber äusseren Einflüssen (pH-Wert, Temperatur). Nichtsdestotrotz scheint das pegylierte Peptid die Rezeptormoleküle auszurichten und die Grenzfläche zum wässrigen Medium zu bilden, so dass eine stabile und auch flexible Struktur entsteht. Über die PEG-Kette lassen sich ausserdem zusätzliche funktionelle Gruppen, wie z.B. ein Fluorophor, an der Oberfläche des Vesikels verankern, wodurch sich die Eigenschaften und Funktion der makromolekularen Struktur sehr leicht tunen lassen sollten. Diese „bottom-up“ Strategie ist durch die Selektivität der ursprünglichen Rezeptor-Ligand Bindung mit neuartigen Steuerungs- und Selektionsfähigkeiten versehen, welche eine zusätzliche Hierarchie in die sonst nicht selektive Selbst-Organisation von üblichen Amphiphilen einbringt, in der lediglich hydrophobe Teile mit hydrophoben und hydrophile Komponenten mit hydrophilen zusammenlagern. Diese Selektion der richtigen Peptidsequenz, die nötig ist um den hydrophoben Rezeptor zu binden und seine Strukturen von der wässrigen Umgebung abzusichern, geht allerdings beim Altern der Rezeptorstammlösung verloren. Wenn diese THF-Lösung über längeren Zeitraum gelagert wird, ist

der Rezeptor auch in der Lage mit sich selbst zu aggregieren und so ohne die Hilfe des pegylierten Peptides in Wasser vesikuläre Strukturen auszubilden. Die Beimischung des pegylierten Peptides bringt unter diesen Umständen lediglich eine erhöhte Stabilität, doch kann diese auch mit anderen hydrophoben Aminosäuren erreicht werden.

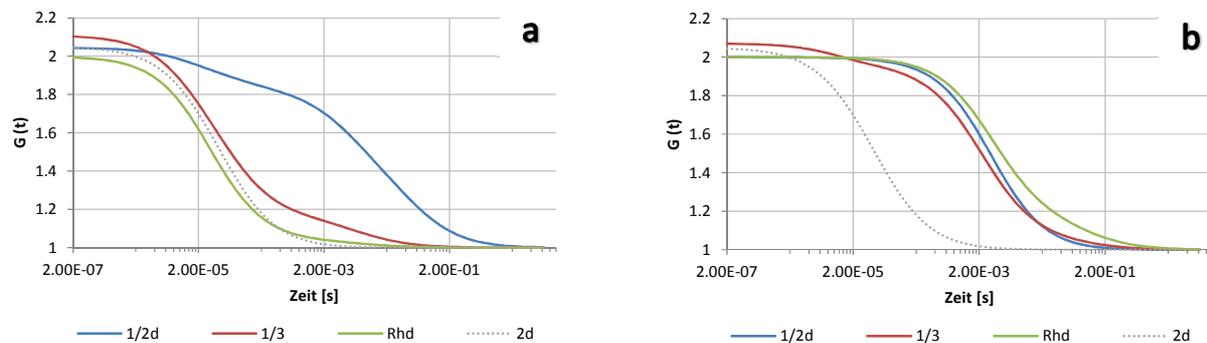


Abb. 37: Exponentielle Kurvenanpassung für die normierten Autokorrelationsfunktionen (a) zwischen pegylierten Peptiden **2d** bzw. **3** oder Rhodamin und dem Diketopiperazin Rezeptor **1** aus (a) frischer Lösung und aus (b) gealterter Lösung.

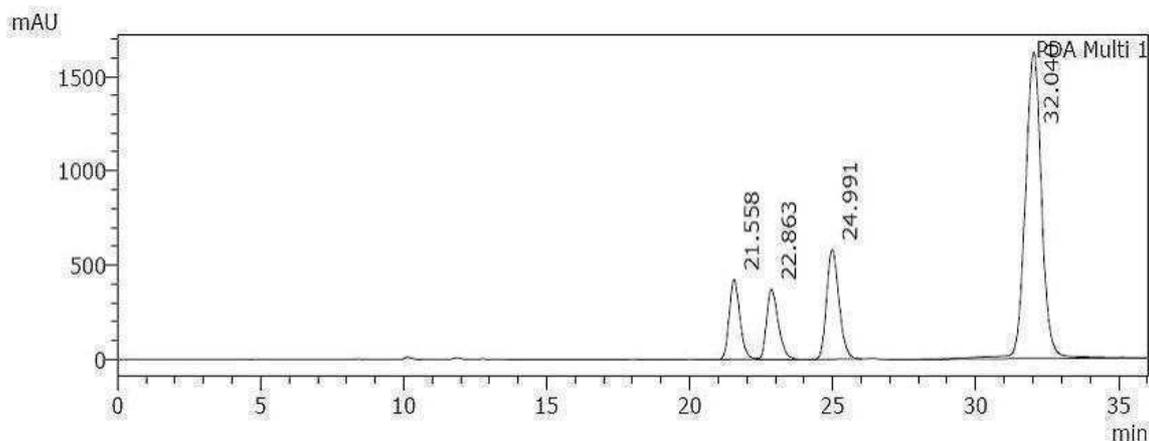
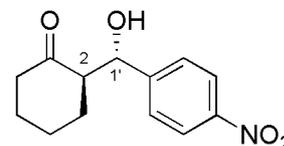
Die Autokorrelationsfunktionen aus Abbildung 37 zeigen das Verhalten von frisch gelöstem Diketopiperazin-Rezeptor (**1**) in Kombination mit möglichen Liganden. Einzig die Verbindung mit dem komplementären Peptid (**2d**) führt zur Ausbildung von Vesikeln (Abb. 37a). Eine gealterte Rezeptorlösung führt hingegen auch bei der Zugabe von nur Fluorophor zu makromolekularen Strukturen. Hierbei lassen sich für die pegylierten Peptide **2d** und **3** in Verbindung mit dem Rezeptor **1** keine Unterschiede mehr in den Diffusionszeiten erkennen (Abb. 37b). Das heisst, der Rezeptor benötigt keinen solubilisierenden Partner mehr und ist durch eine spezielle Ausrichtung seiner Molekülgruppen in der Lage sich alleine in eine stabile makromolekulare Struktur anzuordnen. Die Grössenverteilung bleibt dabei, unabhängig von der zweiten Komponente (Peptid oder Fluorophor), sehr ähnlich und befindet sich innerhalb eines hydrodynamischen Radius von 70-90 nm. Diese liegt dennoch deutlich unter der für eine Selbst-Organisation aus Rezeptor und Ligand gemeinsam ($R_h = 170$ nm) und könnte bedeuten, dass der Diketopiperazin-Rezeptor **1** unabhängig von der zweiten Komponente ein Vesikel bildet und das pegylierte Peptid bzw. der Fluorophor wird lediglich im Inneren des Vesikels eingeschlossen.

Direkte Aldolreaktion in DMSO (Table 2, entry 1):

(2*R*, 1'*S*)-2-[Hydroxy(4-nitrophenyl)methyl]cyclohexanone

HPLC analysis Chiracel AD-H (iPrOH/hexanes=20:80, 0.5 ml/min, 254 nm), $t_R = 32.0$ min (major isomer).

1 (21.6 min, 10%, (2*R*,1'*R*)); **2** (22.9 min, 10%, (2*S*,1'*S*)); **3** (25.0

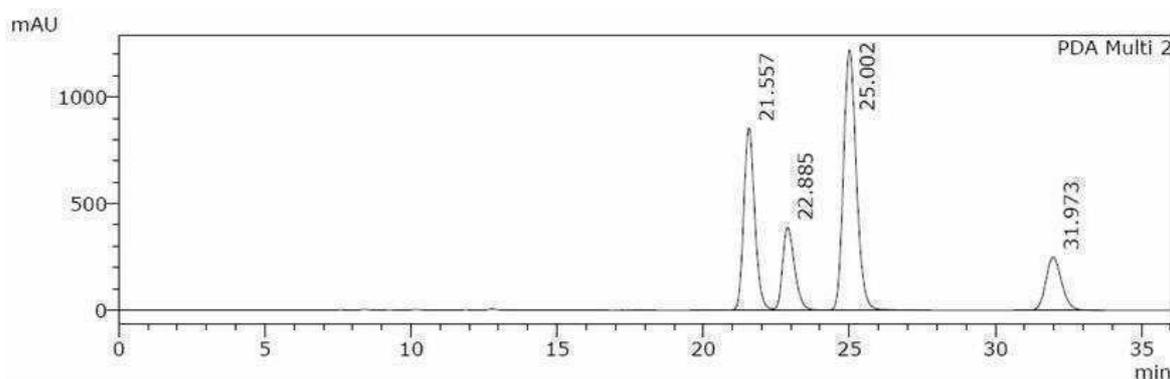
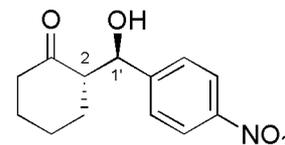


min, 17%, (2*S*,1'*R*)); **3** (32.0 min, 63%, (2*R*,1'*S*)).

Direkte Aldolreaktion in DMSO + 10% H₂O (Table 1, entry 4):

(2*S*, 1'*R*)-2-[Hydroxy(4-nitrophenyl)methyl]cyclohexanone

HPLC analysis Chiracel AD-H (iPrOH/hexanes=20:80, 0.5 ml/min, 254 nm), $t_R = 25.0$ min (major isomer).



1 (21.6 min, 28%, (2*R*,1'*R*)); **2** (22.9 min, 14%, (2*S*,1'*S*)); **3** (25.0 min, 47%, (2*S*,1'*R*)); **3** (32.0 min, 12%, (2*R*,1'*S*)).