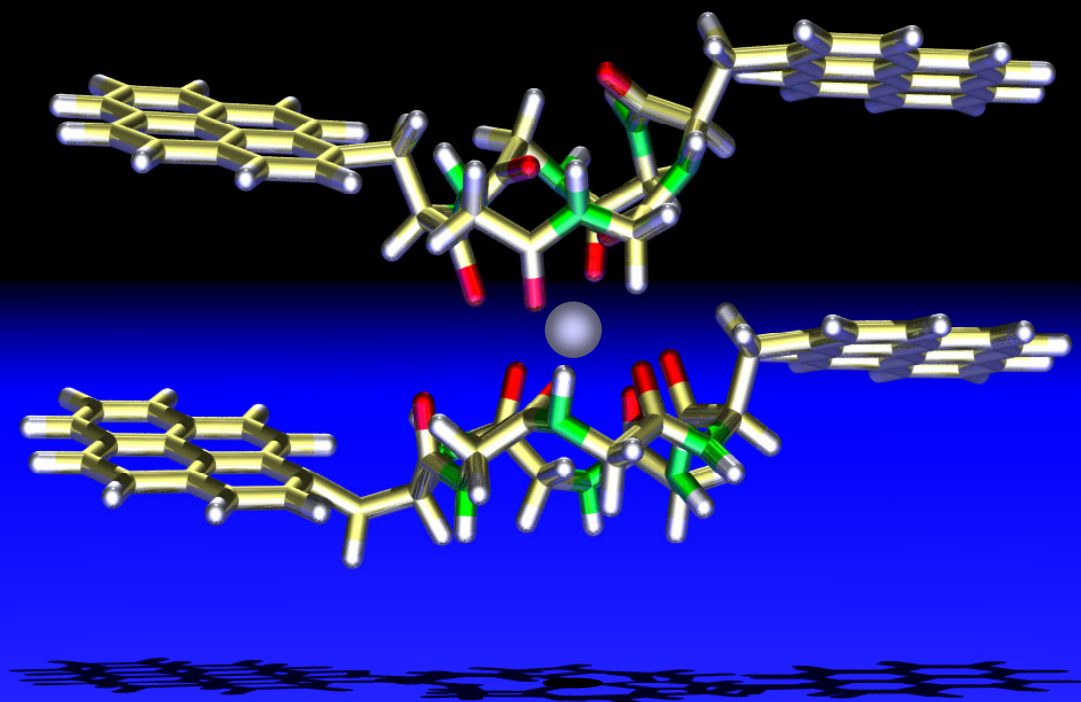


# Optisch aktive chromophorfunktionalisierte Cyclo- und Hairpinpeptide

*Synthese, Elektrochemie, Spektroskopie*



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der naturwissenschaftlichen Fakultät IV  
-Chemie und Pharmazie-  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Jörg Strauß**  
aus Cham  
2002





# Optisch aktive chromophorfunkionalisierte Cyclo- und Hairpinpeptide

*Synthese, Elektrochemie, Spektroskopie*



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der naturwissenschaftlichen Fakultät IV  
– Chemie und Pharmazie –  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Jörg Strauß**  
aus Cham  
2002



Diese Arbeit wurde angeleitet von *Prof. Dr. Jörg Daub*

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 03. Mai 2002

Das Kolloquium fand statt am: 14. Juni 2002

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. G. Schmeer (Vorsitzender)

Prof. Dr. J. Daub (Erstgutachter)

Prof. Dr. A. Merz (Zweitgutachter)

Prof. Dr. O. S. Wolfbeis

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1999 bis Dezember 2001 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg.

Mein besonderer Dank gilt

*Herrn Prof. Dr. Jörg Daub*

für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, die Förderung und das stets mit Anregungen und Diskussionen verbundene Interesse an dieser Arbeit.



Meinen Eltern  
und  
Chrissi



---

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
1.1	Einleitung	1
1.1.1	Genomics und Proteomics	1
1.1.2	Konformativ fixierte Peptide als Protein-Mimetika	2
1.1.3	Fluoreszenzuntersuchungen in der postgenomen <i>Life Science</i>	6
1.1.4	Pyren-funktionalisierte niedermolekulare Peptidsysteme	9
1.2	Problemstellung	11
<b>2</b>	<b>Synthese</b>	<b>13</b>
2.1	Stereoselektive Synthese chromophorsubstituierter Aminosäure-Monomere	13
2.1.1	Einführung	13
2.1.2	Asymmetrische Synthese von $\alpha$ -Aminosäuren	14
2.1.3	Synthese des geschützten Pyrenylalaninderivates <b>4</b>	19
2.1.4	Synthese der chromophorsubstituierten Aminosäuren <b>7</b> und <b>11</b>	23
2.1.5	Synthese selektiv geschützter chromophorsubstituierter Aminosäuren	27
2.2	Peptidsynthese in Lösung	29
2.2.1	Einführung	29
2.2.2	Prinzipien der Peptidsynthese	31
2.2.3	Kupplungsmethoden	33
2.2.4	Racemisierungsmechanismen	41
2.2.5	Darstellung chromophorsubstituierter Tri- und Tetrapeptide	43
2.2.6	Darstellung chromophorsubstituierter Penta-, Hexa- und Octapeptide	47
2.3	Festphasen-Peptidsynthese	50
2.3.1	Einführung	50
2.3.2	Festphasensynthese chromophorsubstituierter linearer Peptide	54
2.4	Hairpinpeptide	58
2.4.1	Einführung	58
2.4.2	Chromophorsubstituierte Hairpinpeptide	60
2.5	Cyclische Peptide	67
2.5.1	Einführung	67
2.5.2	Darstellung chromophorsubstituierter cyclischer Peptide	69
<b>3</b>	<b>Elektrochemie</b>	<b>77</b>
3.1	Allgemeines	77
3.2	Elektrochemische Eigenschaften monofunktionalisierter Peptidsysteme	78
3.2.1	Pyren-funktionalisierte Peptide	78
3.2.2	Phenothiazin-funktionalisiertes lineares Tripeptid <b>16a</b>	80

3.3	Elektrochemische Eigenschaften difunktionalisierter Peptidsysteme .....	82
3.3.1	Pyren-funktionalisierte Peptide.....	82
3.3.2	Pyren- und Phenothiazin-funktionalisierte Peptide.....	83
3.4	Zusammenfassung der elektrochemischen Untersuchungen .....	87
4	Absorptionsspektroskopie und Circular dichroismus .....	90
4.1	Absorptionsspektroskopie.....	90
4.1.1	Absorptionseigenschaften Pyren-funktionalisierter Peptide .....	90
4.1.2	Absorptionseigenschaften Pyren- und Phenothiazin-funktionalisierter Peptide .....	92
4.2	Circular dichroismus.....	93
4.2.1	Circular dichroismus chromophorsubstituierter cyclischer Peptide.....	94
4.2.2	Circular dichroismus chromophorsubstituierter Hairpinpeptide.....	97
4.3	Zusammenfassung der Absorptions- und CD-Untersuchungen.....	98
5	Fluoreszenzspektroskopie.....	99
5.1	Allgemeines.....	99
5.2	Fluoreszenzeigenschaften Pyren-funktionalisierter linearer Peptide .....	100
5.3	Fluoreszenzeigenschaften der Pyren-funktionalisierten Hairpinpeptide 29 und 30.....	107
5.4	Fluoreszenzeigenschaften Pyren-funktionalisierter Cyclopeptide .....	110
5.5	Fluoreszenzverhalten Pyren- und Phenothiazin-funktionalisierter Peptide .....	114
5.5.1	Photoinduzierter Elektronentransfer (PET) .....	114
5.5.2	Fluoreszenzverhalten der Peptide 21a, 31 und 35 .....	116
5.6	Zusammenfassung der Fluoreszenzuntersuchungen.....	120
6	Elektrochemilumineszenz .....	121
6.1	Allgemeines.....	121
6.2	ECL-Eigenschaften linearer Pyren- oder Phenothiazin-funktionalisierter Peptide.....	124
6.3	ECL-Verhalten Pyren-funktionalisierter Hairpinpeptide .....	129
6.4	ECL-Verhalten Pyren-funktionalisierter Cyclopeptide.....	131
6.5	ECL-Eigenschaften Pyren- und Phenothiazin-funktionalisierter Peptidsysteme.....	133
6.6	Zusammenfassung der ECL-Untersuchungen .....	137
7	Cyclische Hexapeptide zur Komplexierung von Erdalkalimetallionen .....	138
7.1	Allgemeines.....	138
7.2	Komplexierungsverhalten des cyclischen Hexapeptids 34.....	140
7.2.1	Komplexierung von Calcium(II)-Ionen .....	140
7.2.2	Komplexierung von Barium(II)-Ionen.....	147

---

<b>7.3</b>	<b>Komplexierungsverhalten des cyclischen Hexapeptids 32.....</b>	<b>149</b>
7.3.1	Komplexierung von Calcium(II)-Ionen .....	149
7.3.2	Komplexierung von Barium(II)-Ionen.....	152
<b>7.4</b>	<b>Komplexierungsverhalten des cyclischen Hexapeptids 33.....</b>	<b>154</b>
7.4.1	Komplexierung von Barium(II)-Ionen.....	154
<b>7.5</b>	<b>Zusammenfassung des Komplexierungsverhalten der cyclischen Hexapeptide</b>	
	<b>32, 33 und 34 .....</b>	<b>158</b>
<b>8</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>160</b>
<b>8.1</b>	<b>Allgemeines .....</b>	<b>160</b>
<b>8.2</b>	<b>Synthese.....</b>	<b>165</b>
8.2.1	Allgemeine Versuchsvorschriften.....	165
8.2.2	Enantioselektive Darstellung chromophorsubstituierter Aminosäuren .....	169
8.2.3	Darstellung chromophorsubstituierter Tri- und Tetrapeptide .....	180
8.2.4	Darstellung chromophorsubstituierter Penta- Hexa- und Octapeptide .....	187
8.2.5	Darstellung chromophorsubstituierter Hairpinpeptide .....	201
8.2.6	Darstellung chromophorsubstituierter Cyclopeptide .....	209
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>214</b>
<b>10</b>	<b>Formeltafel .....</b>	<b>219</b>
<b>11</b>	<b>Publikationen und Präsentationen.....</b>	<b>226</b>
<b>Anhang</b>	<b>.....</b>	<b>228</b>



A	Akzeptor		
Abb.	Abbildung	FRET	fluorescence resonance
abs.	absolut		energy transfer
Ala	Alanin	$\Phi$	Quantenausbeute
AS	Aminosäure	gef.	gefunden
ber.	berechnet	ges.	gesättigt
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl	GFP	Green Fluorescent Protein
c	Konzentration	Gly	Glycin
CA	Chemical Abstracts	h	Stunde(n)
CD	Circulardichroismus	HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- N,N,N',N'-tetramethyl- uroniumhexafluorophosphat
CIP	Kontaktionenpaar		
COD	Cyclooctadien	HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2- propanol
CT	charge transfer	HGP	Human Genome Project
CV	Cyclovoltammetrie	HOAc	Essigsäure
d	Tage	HOAt	1-Hydroxy-7-azabenztriazol
D	Donor	HOBt	1-Hydroxybenztriazol
DAP	1-Diethylamino-2-propanol	HPLC	high performance liquid chromatography
DC	Dünnschichtchromatogramm	HR	high resolution
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	I <sub>E</sub>	Excimer- / Exciplex- emissionsintensität
DIEA	Diisopropylethylamin	I <sub>M</sub>	Monomeremissionsintensität
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	IR	Infrarot-Spektroskopie/ -Spektrum
DMSO	Dimethylsulfoxid	J	Kopplungskonstante
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin	konz.	konzentriert
DNA	Desoxyribonucleinsäure	LE	local(ly) excited
DPPA	Diphenylphosphorylazid	Lit.	Literatur
DVB	Divinylbenzol	LM	Lösungsmittel
E <sub>1/2</sub>	Halbstufenpotential	Lsg.	Lösung
ECL	Elektrochemilumineszenz	M	molar
EDC	<i>N'</i> -(3-Dimethylamino- propyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimid- Hydrochlorid	MB	molecular beacon
em	Emission	min	Minuten
ESI	Elektrospray-Ionisation	MS	Massen-Spektrometrie/ -Spektrum
ET	Elektronentransfer	Nd.	Niederschlag
EtOH	Ethanol	NIR	nahes Infrarot
Eu(tfc) <sub>3</sub>	Tris[3-(trifluormethyl- hydroxy-methylen)-(+)-d- campherato]-europium	NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
ex	Anregung	NMR	Kernresonanzspektroskopie/ -spektrum
F	Fluoreszenz	NOE	Kern-Overhauser-Effekt
Fc/Fc <sup>+</sup>	Ferrocen/Ferrocenium	OBzl	Benzylester
FD	Feld-Desorption		
Fmoc	Fluorenyl-9-methoxy- carbonyl		

---

OLED	organische lichtemittierende Diode
org.	organisch/e
PE 40/60	Petrolether 40/60
PET	photoinduzierter Elektronentransfer
Ph	Phenylrest
Pheno.	Phenothiazin
Pro	Prolin
PS	Polystyrol
Pta	(10-Methyl-10 <i>H</i> -phenothiazin-3-yl)alanin
Pya	1-Pyrenylalanin
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
SEC	Spektroelektrochemie
Sdp.	Siedepunkt
sh	Schulter in opt. Spektren
SV	Squarewavevoltammetrie
Tab.	Tabelle
TBAHPF	Tetrabutylammonium-hexafluorophosphat
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
UV	Ultraviolett-Spektroskopie/-Spektrum
verd.	Verdünnt
Vis	sichtbarer Spektralbereich
X-Ray	Röntgenstrukturanalyse
Z	Benzyloxycarbonyl



# 1 Einleitung und Problemstellung

## 1.1 Einleitung

### 1.1.1 Genomics und Proteomics

Im Juni 2000 verkündeten die Leiter des *Human Genome Project (HGP)*, zusammen mit *C. Venter (Celera Genomics)* und dem damaligen US-Präsidenten *B. Clinton* die Entschlüsselung der humanen Genomsequenz.<sup>1</sup> Infolgedessen steht mit dem *HGP* eines der aufwendigsten und ehrgeizigsten Forschungsvorhaben der naturwissenschaftlichen Geschichte vor seiner Fertigstellung, wobei bis dato 90 bis 95 % aller 3.2 Milliarden Basen des menschlichen Erbguts tatsächlich dekodiert sind.<sup>2</sup> Aus der vorläufigen Auswertung des Projekts sind bereits heute erstaunliche Resultate zu verzeichnen.

Eines der bislang erhaltenen Schlüsselergebnisse stellt die ermittelte Anzahl von nur 30000-40000 Genen im Humangenom dar.<sup>3</sup> Dieser Wert ist ein Bruchteil der bisher angenommenen Zahl und gerade um ein Drittel höher als er beispielsweise für Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) beziffert wird.<sup>4</sup> Folglich ist die menschliche Komplexität, im Vergleich zu anderen Lebewesen, wohl weder auf die zelluläre DNA noch deren Gengehalt zurückzuführen. Vielmehr ist die Antwort auf diese Fragestellung auf dem Level der Genprodukte, den Proteinen, zu suchen. So sind, im Unterschied zur lange angenommenen *ein-Gen-ein-Protein-Hypothese*, verschiedene Genteile in der Lage, unterschiedliche Proteinspezies, etwa durch alternatives Spleißen,

---

<sup>1</sup> a) C. Venter et al., *Science* **2001**, 291, 1304;

b) International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* **2001**, 409, 860.

<sup>2</sup> Das *Human Genome Project (HGP)* wurde 1990 ins Leben gerufen und hat die Identifizierung aller Basenpaare und Gene des menschlichen Erbguts zum Ziel. Die letztendliche Fertigstellung dieses Vorhabens ist für 2003 geplant.

Einen Überblick zu diesem Thema liefern:

a) N. G. Cooper, *The Human Genome Project: Deciphering the Blueprint of Heredity*, Univ. Science Books, Mill Valley, **1994**;

b) R. C. Cantor, L. C. Smith, *Genomics: The Science and Technology Behind the Human Genome Project*, Wiley, New York, **1999**.

<sup>3</sup> J.-M. Claverie, *Science* **2001**, 291, 1255.

<sup>4</sup> The *Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium, *Science* **1998**, 282, 2012.

zu bilden.<sup>5</sup> Eine weitere Quelle der Komplexität weisen u.a. posttranslationale chemische Modifizierungen der Peptide auf.<sup>6</sup>

Aus diesem Grunde hat sich in den letzten Jahren, in Analogie zu *Genomics*, eine neue Disziplin, *Proteomics*, entwickelt. Das Ziel dieses Forschungsgebietes ist es, eine umfassende Beschreibung sowohl der Proteinexpression und Proteinlokalisierung als auch der Proteinaktivität, also der Proteinbiochemie, aus multidimensionaler Sicht zu erhalten.<sup>7</sup> Es ist zu erwarten, dass in nächster Zeit ein Großteil des naturwissenschaftlichen Interesses auf *Proteomics* gerichtet sein wird, um beispielsweise die molekulare Basis von Krankheiten aufzuklären und Leitstrukturen für das „drug design“ zu erhalten.<sup>8</sup>

### 1.1.2 Konformativ fixierte Peptide als Protein-Mimetika

Um ihren Beitrag zur aktuellen Genom- und Proteom-Forschung liefern zu können, erwachsen für die synthetisch organische Chemie vor allem biomimetische<sup>9</sup> Aufgaben. Dies bedeutet, dass mit Hilfe diskreter organischer Spezies funktionelle „Miniatur-Biomoleküle“ konstruiert werden sollen. Derartige Biomimetika beinhalten das, oftmals relativ kleine, aktive Zentrum des natürlichen Analogons in der korrekten Orientierung, nicht jedoch das makromolekulare Peptidrückgrat. Der Vorteil der artifiziellen Strukturen liegt in deren präziser Manipulierbarkeit, was das Studium spezifischer Eigenschaften ermöglicht.<sup>10</sup>

---

<sup>5</sup> B. Lewin, *Molekularbiologie der Gene*, Spektrum Verlag, Heidelberg, **1998**.

<sup>6</sup> a) B. Pradet-Balade, F. Boulmé, H. Beug, E. W. Müllner, J. A. Garcia-Sanz, *Trends in Biochem. Science* **2001**, *60*, 206;

b) S. Nock, P. Wagner, *Chem. Unserer Zeit* **2000**, *34*, 348.

<sup>7</sup> a) A. Pandey, M. Mann, *Nature* **2000**, *405*, 837;

b) S. Fields, *Science* **2001**, *291*, 1221;

c) A. R. Dongre, G. Opiteck, W. L. Coseand, S. A. Hefta, *Biopolymers* **2001**, *60*, 206.

<sup>8</sup> a) M. J. Cunningham, *J Pharmacol. Toxicol.* **2000**, *44*, 291;

b) G. Jimenez-Sanchez, B. Childs, D. Valle, *Nature* **2001**, *409*, 853;

c) L. Peltonen, V. McKushnick, *Science* **2001**, *291*, 1224.

<sup>9</sup> Der Begriff „Biomimetik“ wurde 1972 von R. Breslow eingeführt und beschreibt generell alle Vorgänge, in denen biochemische durch chemische Prozesse imitiert werden:

R. Breslow, *Chem. Soc. Rev.* **1972**, *1*, 553.

<sup>10</sup> a) H. Dugas, *Bioorganic Chemistry: A Chemical Approach to Enzyme Action*, Springer-Verlag, New York, **1999**;

b) P. Ball, *Nature* **2001**, *409*, 413;

Demzufolge können Protein-Mimetika hilfreich sein, um die biologische Wirksamkeit bzw. die Struktur-Wirkungs-Beziehung neuer Genprodukte zu entschlüsseln.<sup>11</sup> Zur Simulation der nativen Sekundärstruktur werden dabei neben cross-links und nichtnatürlichen Aminosäurebausteinen vor allem konformativ fixierte Peptidsysteme eingesetzt.<sup>11b</sup>

In diesem Zusammenhang haben sich insbesondere cyclische Peptide bewährt, was hauptsächlich auf deren loop-Konformation zurückzuführen ist. Dies wird umso klarer, wenn man annimmt, dass die aktive Sequenz eines Biomoleküls im natürlichen *Schlüssel-Schloss-Prinzip*,<sup>12</sup> zur optimalen molekularen Erkennung, dreidimensional vom Rezeptor umhüllt wird. Der bioaktive Teil im nativen Peptid bildet demnach eine nach außen gerichtete Schleife aus (Abbildung 1-1).<sup>13</sup> Einen weiteren Vorteil cyclischer Peptidstrukturen liefert die erhöhte Wirkungsdauer im Vergleich zu linearen Peptiden, die im Organismus leicht am C- oder N-terminalen Ende angegriffen werden.<sup>14</sup>

Es erscheint somit nicht verwunderlich, dass mittlerweile für nahezu jeden Wirkstoff auf Peptidbasis cyclische Varianten bekannt sind, deren Wirkungsprofil durch Kombination von Strukturbestimmungsmethoden und entsprechenden Biotests optimiert werden kann.<sup>15</sup>

---

c) C. Walsh, *Nature* **2001**, 409, 226.

<sup>11</sup> a) A. J. Blume, J. Beasley, N. I. Goldstein, *Biopolymers* **2000**, 55, 347;

b) A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1303;

c) T. Sasaki, M. Lieberman, *Compr. Supramol. Chem.* **1996**, 4, 193.

<sup>12</sup> E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985.

<sup>13</sup> a) H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 509;

b) H. Kessler, *J. prakt. Chem.* **1992**, 334, 549.

<sup>14</sup> a) D. F. Veber, F. W. Holly, R. F. Nutt, S. J. Bergstrand, S. F. Brady, R. Hirschmann, M. S. Glitzer, S. Saperstein, *Nature* **1979**, 280, 512;

b) R. F. Nutt, D. F. Veber, R. Saperstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 6539.

<sup>15</sup> Eine Auswahl neuerer Publikationen aus diesem Gebiet liefern:

a) P. Wipfl, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2115;

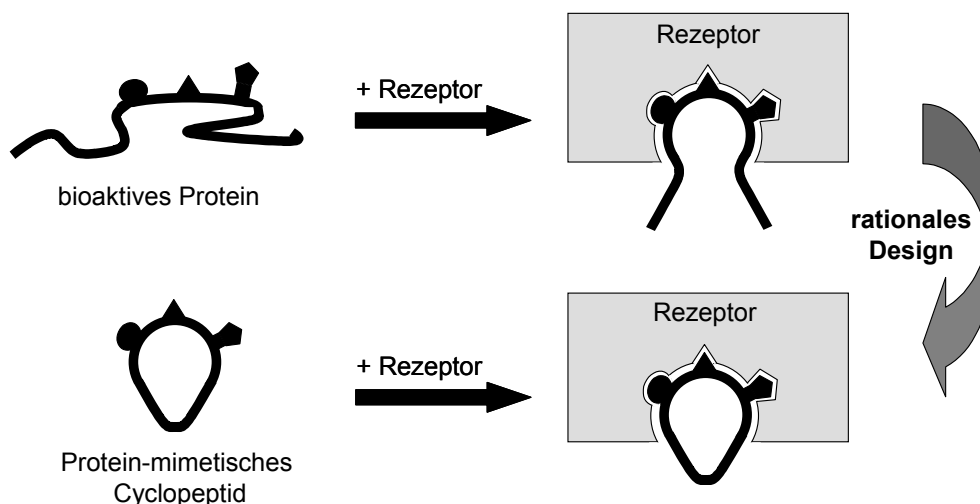
b) M. Walker, T. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5801;

c) S. Fernando-Lopez, H.-S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxon, M. R. Ghadiri, *Nature* **2001**, 412, 452;

d) F. Palmer, R. Tünnemann, D. Leipert, C. Stingel, G. Jung, V. Hoffmann, *J. Mol. Struct.* **2001**, 563-564, 153;

e) D. L. Boger, M. W. Ledebor, M. Kume, M. Searcey, Q. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11375 ;

f) J. Sanchez-Quesada, M. R. Ghadiri, H. Bayley, O. Braha, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 122, 11757.



**Abb. 1-1:** Schematische Darstellung des rationalen Designs Protein-mimetischer Cyclopeptide.

Exemplarisch seien selektive Integrin-Inhibitoren auf Cyclopeptidbasis aufgeführt und erläutert.<sup>16</sup> Die Integrine sind bedeutende Oberflächenrezeptoren, die eine entscheidende Rolle bei Zell-Matrix-Adhäsionen übernehmen und an verschiedenen biologischen Prozessen wie der Embryogenese, der Blutgerinnung, der Osteoporose und der Tumorgenese beteiligt sind. Aktive Inhibitoren für Integrine sind daher von immensem pharmakologischen Interesse. Die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) bildet ein zentrales Zellerkennungsmotiv und dient seit einiger Zeit auch als Grundlage zur Entwicklung von Inhibitoren für den  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Subtypen. Derartige  $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten unterdrücken die tumorinduzierte Angiogenese (Neubildung von Blutgefäßen). In einem intensiven strukturellen Screening von cyclischen Peptiden, die alle das RGD-Motiv enthalten, hat sich das Cyclopentapeptid cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-N(Me)Val) als superaktive Verbindung erwiesen und befindet sich derzeit in der Testphase zum Einsatz als Tumor-Therapeutikum (Abbildung 1-2).<sup>17</sup>

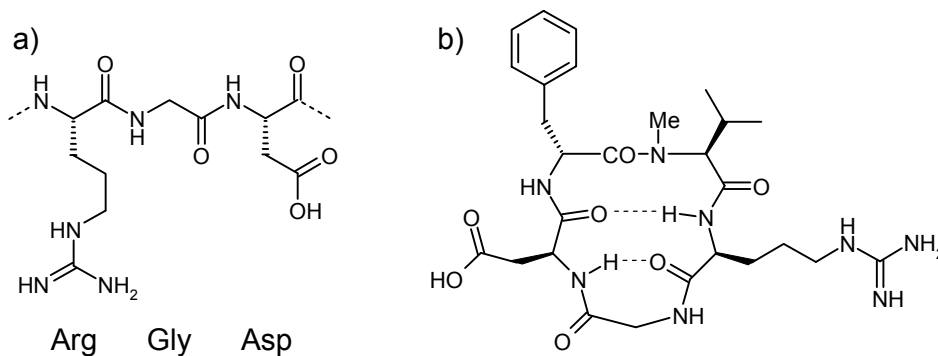
<sup>16</sup> a) B. Hu, D. Finsinger, K. Peter, Z. Guttenberg, M. Bärmann, H. Kessler, A. Escherich, L. Moroder, J. Böhm, W. Baumeister, S. Sui, E. Sackmann, *Biochemistry* **2000**, 39, 12284;

b) J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, M. Semmerich, B. Holzmann, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2586.

<sup>17</sup> a) E. Lohof, E. Planker, C. Mang, F. Burkhart, M. A. Dechanstreiter, R. Haubner, H.-J. Wester, M. Schwaiger, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2868;

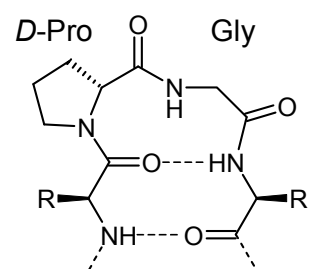
b) R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1440;

c) A. Geyer, G. Müller, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7735.



**Abb. 1-2:** a) Die RGD-Sequenz; b) Strukturformel des superaktiven  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Inhibitors cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-N(Me)Val).

Neben cyclischen sind auch acyclische Peptide mit integrierten loop-Strukturmotiven als Protein-Mimetika einsetzbar, wobei insbesondere  $\beta$ -Hairpinkonformationen Interesse erwecken.<sup>18</sup> In natürlichen Proteinen gewährleisten  $\beta$ -turns häufig den Aufbau von  $\beta$ -Faltblattstrukturen durch antiparallele Rückführung der Peptidsequenz in Haarnadelform. Derartige Strukturen sind oft an Protein-Protein- und Protein-DNA-Erkennungsprozessen beteiligt.<sup>19</sup> Durch geeignete Wahl der Aminosäuresequenz können  $\beta$ -Hairpinkonformationen auch in kurzen Peptiden realisiert bzw. imitiert und durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden.<sup>20</sup> Dabei hat sich als turn-induzierendes Segment vor allem die D-Pro-Gly-Einheit bewährt (Abbildung 1-3).<sup>20a,c</sup>



**Abb. 1-3:** Schematische Darstellung eines, durch D-Pro-Gly induzierten  $\beta$ -Hairpin-Strukturmotivs.

Aufgrund des augenscheinlichen Potentials dieser Verbindungsklasse zur Aufklärung spezieller Proteineigenschaften bzw. zum Wirkstoffdesign, sind gerade in jüngster Zeit eine Reihe von konformationsstabilen  $\beta$ -Hairpinpeptiden entwickelt worden.<sup>21</sup>

<sup>18</sup> Eine genaue Erläuterung und Einteilung von  $\beta$ -Hairpinstrukturmotiven findet sich in Kapitel 2.4 dieser Arbeit.

<sup>19</sup> J. A. Robinson, *Synlett* **2000**, 429.

<sup>20</sup> a) S. R. Raghothama, S. K. Awasthi, P. Balaram, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 137;

b) N. Carulla, C. Woodward, G. Barany, *Biochemistry* **2000**, 39, 7927;

c) F. A. Syud, H. E. Stanger, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8667.

<sup>21</sup> a) T. Scherf, R. Kasher, M. Balass, M. Fridkin, S. Fuchs, E. Katchalski-Katzir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 6629.



### 1.1.3 Fluoreszenzuntersuchungen in der post-genomen *Life Science*

Ein im Vergleich zu biomimetischen Aspekten grundsätzlicher anderer Ansatz zur Bioanalytik in der post-genomen Ära stellen Fluoreszenzuntersuchungen dar. Anwendungen der Emissionsspektroskopie haben in der *Life Science* allgemein große Bedeutung.<sup>22</sup> Die Ursache dafür liegt unter anderem an der hohen Empfindlichkeit der Methode und ihrer Vielseitigkeit, die beispielsweise Studien mit lebenden Zellen erlaubt.<sup>23</sup>

Da die Eigenfluoreszenz von Proteinen, die meist auf Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin zurückzuführen ist,<sup>24</sup> nicht ausreicht, um geeignete Emissionsuntersuchungen durchführen zu können, ist die Verwendung sogenannter Labels nötig. Größtenteils werden dazu Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die kovalent mit dem entsprechenden Biomolekül verknüpft sind. Dabei ist entscheidend, dass die biologische Aktivität des Zielmoleküls nicht verändert wird und die Emissionseigenschaften des Labels nicht von Umgebungseinflüssen abhängig sind.<sup>25</sup>

Ein großer Fortschritt in der Labelingtechnik ergab sich mit der Entdeckung des Green Fluorescent Protein (GFP). Das aus 238 Aminosäuren bestehende Protein wird aus der Qualle *Aequoria victoria* isoliert.<sup>26</sup> Nach photonischer Anregung mit Licht der

---

b) G. R. Nakamura, M. A. Starovasnik, M. E. Reynolds, H. B. Lowman, *Biochemistry* **2001**, 40, 9828;

c) S. A. Kozin, G. Bertho, A. K. Mazur, H. Rabesona, J.-P. Girault, T. Haertle, M. Takahashi, P. Debey, G. Hui Bon Hoa, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 46364;

d) V. Tugarinov, A. Zvi, R. Levy, J. Anglister, *Nature Struct. Biol.* **1999**, 6, 331;

e) A. Karlin, *Neuron* **2001**, 32, 173.

<sup>22</sup> a) J. R. Lakowicz, *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 3, Plenum Press, New York, **1992**;

b) O. S. Wolfbeis, *Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Berlin, **1993**;

c) J. J. Hill, C. A. Royer, *Methods Enzymol.* **1997**, 278, 390;

d) K. L. Holmes, L. M. Lantz, *Methods Cell. Biol.* **2001**, 63, 185.

<sup>23</sup> a) R. W. Dirks, C. Molenaar, H. J. Tanke, *Histochem. Cell. Biol.* **2001**;

b) C. Chamberlain, K. M. Hahn, *Traffic* **2000**, 1, 755;

c) B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, 281, 269;

d) T. G. Dewey, *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, **1991**.

<sup>24</sup> E. A. Parmyacor, *Luminescent Spectroscopy of Proteins*, CRC Press, Boca Raton, **1993**.

<sup>25</sup> Y. L. Wang, *Methods Cell. Biol.* **1989**, 29, 1.

<sup>26</sup> a) R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Chem.* **1998**, 67, 509;

b) K. F. Sullivan, S. A. Kay, *Green Fluorescent Proteins in Methods Cell. Biol.*, Vol. 58, Academic Press San Diego, **1999**;

Wellenlänge 395 nm, emittiert es bei 508 nm im sichtbaren Spektralbereich. Der große Vorteil dieser Verbindung ist in ihrer Verwendung als natürlicher fluoreszenter Label zu sehen, was die Verwendung eines artifiziellen organischen Farbstoffes erübrigt. Der Einsatz von GFP hat deshalb gerade die *in vivo*-Beobachtung der intrazellulären Chromosom- und Protein-Dynamik erheblich erleichtert.<sup>23b,27</sup> Um die spektralen und biophysikalischen Eigenschaften von GFP zu verbessern bzw. abzuwandeln, wurden erhebliche Anstrengungen zur Mutagenese des Originals unternommen. Die daraus resultierenden Varianten emittieren Licht verschiedener Wellenlänge, weshalb mittlerweile neben GFP auch Blue, Cyan und Yellow Fluorescent Proteins (BFP, CFP, YFP) bekannt sind.<sup>26a,28</sup> Diese neuen Komponenten ermöglichen alternative Wege zur Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Durch selektive Wahl entsprechender Mutanten können Donor-Akzeptor-Systeme geschaffen werden, die FRET- (fluorescence resonance energy transfer) Prozesse zulassen.<sup>29</sup> Die optimale Donor-Akzeptor-Zusammensetzung besteht dabei aus CFP und YFP.<sup>30</sup>

Allgemein werden FRET-induzierte Änderungen der Fluoreszenzintensität sehr häufig in bioanalytischen Studien eingesetzt, da neben der Emissionserscheinung zusätzliche Aussagen über den Abstand zwischen Donor (D) und Akzeptor (A) getroffen werden können.<sup>31</sup> Meist ist das Augenmerk in derartigen Fragestellungen auf Änderungen des relativen D-A-Abstandes bei induzierten Systemveränderungen gerichtet.

Eine perfekte Nutzung des Energietransfer-Schemas findet sich in „molecular beacons“ (MB) wieder. MB's sind Einzelstrang-Nucleotide, die eine spezielle Hairpin-Struktur aufweisen. An den beiden Enden des Stranges ist einerseits eine fluorophore Gruppe andererseits ein Quencher kovalent gebunden.<sup>32</sup> Somit dienen MB's als molekulare

c) P. M. Conn, *Green Fluorescent Protein in Methods Enzymol.*, Vol. 302, Academic Press San Diego, **1999**;

d) M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, 263, 802.

<sup>27</sup> a) A. S. Belmont, *Trends Cell. Biol.* **2001**, 11, 250;

b) A. Chiesa, E. Rapizzi, V. Tosello, P. Pinton, M. de Virgilio, K. E. Fogarty, R. Rizzuto, *Biochem. J.* **2001**, 355, 1.

<sup>28</sup> G. H. Patterson, S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain, D. W. Piston, *Biophys. J.* **1997**, 73, 2782.

<sup>29</sup> a) R. Heim, R. Y. Tsien, *Curr. Biol.* **1996**, 6, 178;

b) R. D. Mitra, C. M. Silva, D. C. Youvan, *Gene* **1996**, 173, 13;

c) B. A. Pollok, R. Heim, *Trends Cell. Biol.* **1999**, 9, 57.

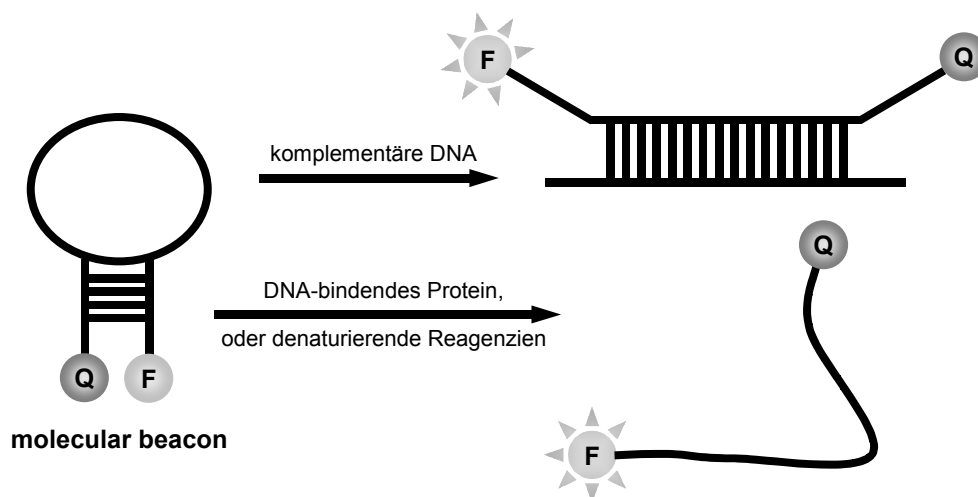
<sup>30</sup> A. Miyawaki, O. Griesbeck, R. Heim, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 2135.

<sup>31</sup> a) P. R. Selvin, *Methods Enzymol.* **1995**, 246, 300;

b) D. A. de Angelis, *Physiol. Genomics* **1999**, 1, 93.

<sup>32</sup> a) X. Fang, J. Li, J. Perlette, W. Tan, K. Wang, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 747A;

Schalter, die in der geschlossenen Hairpin-Konformation keine Fluoreszenz aufweisen, da die Fluorophor-Emission durch den Quencher mittels Energietransfer gelöscht wird. Konformative Änderungen ermöglichen die Öffnung der loop-Struktur, wodurch Fluorophor und Quencher getrennt werden. Demzufolge tritt eine mess- und quantifizierbare Lichtemission auf (Abbildung 1-4).



**Abb. 1-4:** Schematische Darstellung der Wirkungsweise von „molecular beacons“ (Q: Quencher, F: Fluorophor).

Der erste, 1996 entwickelte MB diente hauptsächlich zur spezifischen Erkennung der komplementären Nukleinsäure.<sup>33</sup> Mittlerweile wurden unterschiedliche MB's mit variierender loop-Sequenz, Größe und Fluorophor- bzw. Quencher-Gruppe entworfen. Das Anwendungsprofil dieser Sensoren kann dadurch auf RNA-Detektionen in lebenden Zellen, Genanalysen und vor allem auch auf Protein-Untersuchungen ausgeweitet werden.<sup>34</sup>

b) W. Tan, X. Fang, J. Li, X. Liu, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 1107.

<sup>33</sup> S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 303.

<sup>34</sup> a) S. Tyagi, D. Bratu, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 49;

b) X. Fang, X. Liu, S. Schuster, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2921;

c) X. Fang, J. Li, W. Tan, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3280;

d) J. Li, X. Fang, S. Schuster, W. Tan, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1091.

### 1.1.4 Pyren-funktionalisierte niedermolekulare Peptidsysteme

Durch Kombination der beiden Strategien Protein-Mimetik und Fluoreszenz-Labeling sind niedermolekulare chromophorsubstituierte Peptide zugänglich, die in verschiedenen bioanalytischen Fragestellungen nützlich sind.

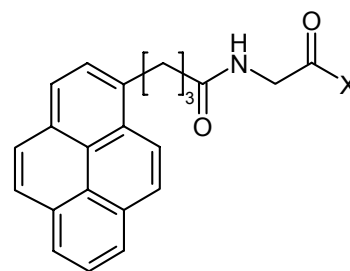
Pyren hat sich in diesem Zusammenhang als fluoreszente Substruktur ausgezeichnet, weshalb in der Vergangenheit eine Reihe verschiedener Pyren-funktionalisierter Peptide dargestellt und studiert wurden.<sup>35-39,41-43</sup>

So sind etwa Pyren-substituierte Dipeptide (Abbildung 1-5) als artifizielle Peptidasen zur photoinduzierten, ortsspezifischen Peptidbindungsspaltung in Proteinen einsetzbar.<sup>35</sup>

Dabei bildet sich ein Dipeptid/Protein-Komplex, der, nach photonischer Anregung des Chromophors, die Spaltung des Proteins am Assoziationsort induziert. Dies kann beispielsweise zur Identifikation von DNA-

Bindedomänen in Proteinen und zur Entschlüsselung spezifischer Protein-Protein-Wechselwirkungen dienen. Zudem entstehen durch die Proteinspaltung kleinere Fragmente, die leichter sequenziert und strukturell untersucht werden können.<sup>36</sup>

Aufgrund des Akzeptorcharakters von Polyaromaten liegt ein Hauptaugenmerk bei der Untersuchung Pyren-funktionalisierter Peptide auf PET- (photoinduced electron transfer) Prozessen, wobei zusätzlich eine Donorkomponente inkorporiert sein muss. Es sind sowohl PET-Studien an linearen<sup>37</sup> als auch an cyclischen<sup>38</sup> Peptidverbindungen bekannt. Neben Antworten auf rein photophysikalische Fragen können dabei auch biophysikalische Informationen erhalten werden. Exemplarisch sei die Detektion von



X = Phe, Tyr, Trp, His

**Abb. 1-5:** Pyren-substituierte Dipeptide zur ortsspezifischen Peptidbindungsspaltung in Proteinen.

<sup>35</sup> a) A. Buranaprapuk, C. V. Kumar, S. Jockusch, N. J. Turro, *Tetrahedron* **2000**, 56, 7019;

b) C. V. Kumar, A. Buranaprapuk, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4262.

<sup>36</sup> J. J. Hlavaty, T. Nowak, *Biochemistry* **1997**, 36, 15514.

<sup>37</sup> a) M. Sisido, *Adv. Photochem.* **1997**, 22, 197;

b) M. Sisido, S. Hoshino, H. Kusano, M. Kuragaki, M. Makino, H. Sasaki, T. A. Smith, K. P. Ghiggino, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 10407;

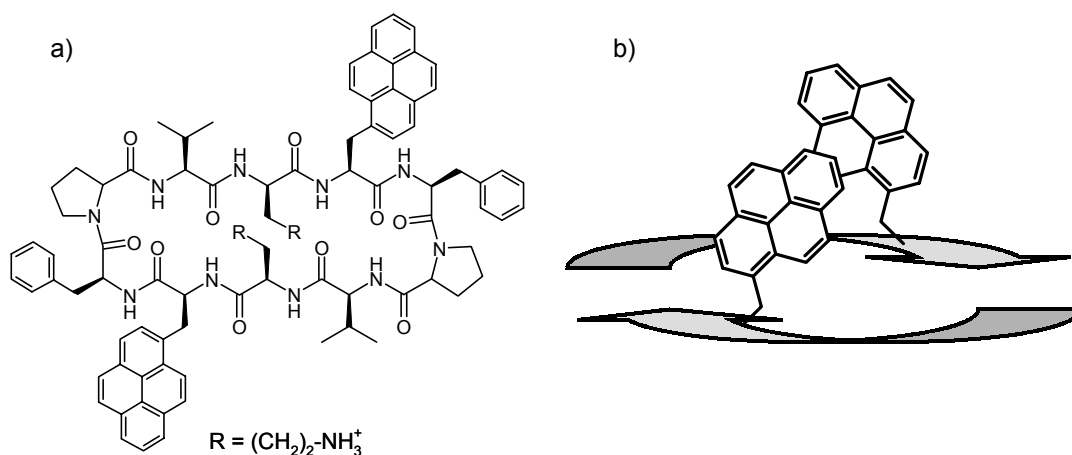
c) E. Galoppini, M. A. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2299;

d) M. A. Fox, E. Galoppini, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5277.

<sup>38</sup> H. Sasaki, M. Makino, M. Sisido, T. A. Smith, K. P. Ghiggino, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 10416.

Peptid-Assoziationen genannt, die Rückschlüsse auf natürliche Protein-Aggregationen zulässt.<sup>39</sup>

Ein großer Vorzug von Pyren-substituierten Peptiden ist in der möglichen Generierung von Excimeren zu sehen.<sup>40</sup> Ähnlich wie bei abstandsabhängigen FRET-Prozessen sind, je nach beobachteter Excimerintensität im Fluoreszenzspektrum, Rückschlüsse auf die Konformation der substituierten Verbindung möglich. Dieses Prinzip lieferte bereits wertvolle Erkenntnisse bei Untersuchungen an zweifach Pyren-funktionalisierten  $\alpha$ -helicalen,<sup>41</sup> hairpinartigen<sup>42</sup> und cyclischen<sup>43</sup> Peptiden.



**Abb. 1-6:** a) Molekulare Struktur und b) Illustration der Excimer-induzierenden  $\beta$ -Faltblatt-Konformation eines Pyren-modifizierten *Gramidicin S*-Analogons.

Beispielsweise wurden Pyren-modifizierte Analoga des cyclischen Decapeptids *Gramidicin S* synthetisiert, um anhand von Fluoreszenz- und Circular dichroismus-Spektroskopie die antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Struktur dieses biologisch aktiven Cyclopeptids beweisen zu können.<sup>43</sup> Abbildung 1-6 zeigt neben der molekularen Struktur eines dieser fluorophorderivatisierten Cyclen die Illustration der gegebenen Konformation bzw. die Excimer-induzierende Orientierung der Pyren-Einheiten.

<sup>39</sup> G. Jones II, V. Vullev, E. H. Braswell, D. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 388.

<sup>40</sup> a) T. Förster, K. Kasper, *Z. Phys. Chem. Neue Folge I* **1954**, 275;

b) F. M. Winnik, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 587.

<sup>41</sup> H. Mihara, Y. Tanaka, T. Fujimoto, N. Nishino, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 1133.

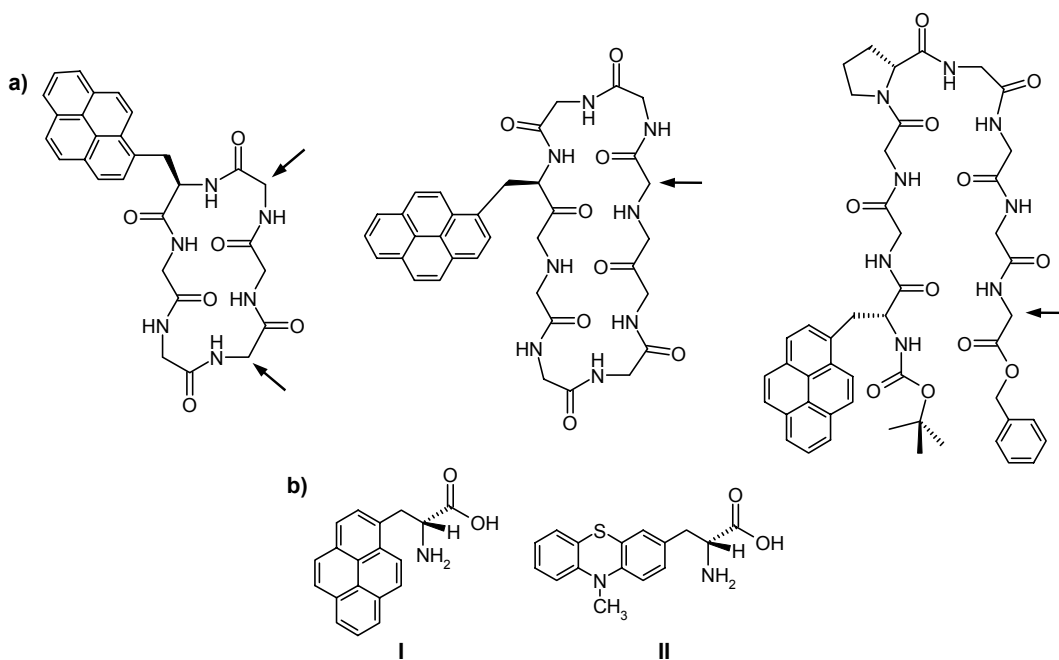
<sup>42</sup> H. Mihara, Y. Tanaka, T. Fujimoto, N. Nishino, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 1915.

<sup>43</sup> H. Mihara, J. Hayashida, H. Hasegawa, H. I. Ogawa, Y. Tanaka, T. Fujimoto, N. Nishino, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 517.

## 1.2 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, mono- und di-fluorophorfunktionalisierte Peptidsysteme mit eingeschränkter konformativer Flexibilität darzustellen und deren optische, elektrochemische sowie optoelektrochemische Eigenschaften zu untersuchen.

Im Speziellen werden cyclische Peptide mit sechs oder acht Aminosäurebausteinen und lineare Octapeptide mit  $\beta$ -Hairpinstrukturmotiv angestrebt. Als Chromophore kommen Pyren- (Akzeptor) und Phenothiazineinheiten (Donor) zum Einsatz. Diese Teilstrukturen sollen in Form von optisch aktiven *D*-Alaninderivaten in die Peptide integriert werden (Abbildung 1-7).



**Abb. 1-7:** a) Übersicht über einfach Pyren-derivatisierte Peptidsysteme. Die Pfeile kennzeichnen jeweils Glycineinheiten, die möglicherweise durch die nichtnatürlichen farbstoffsubstituierten *D*-Alaninderivate **I** bzw. **II** ersetzt werden können, um eine Zweitfunktionalisierung zu erzielen.

b) Optisch aktive Pyren-Akzeptor- (**I**) bzw. Phenothiazin-Donor-funktionalisierte (**II**) *D*-Alaninderivate.

Zur Synthese linearer Peptidspezies sollen sowohl Darstellungsmethoden in Lösung als auch Syntheseverfahren nach *Merrifield* an der Festphase getestet werden, um einen effizienten Syntheseweg für chromophorderivatisierte Peptide zu etablieren. Die Peptidcyclisierungen sollen nach verschiedenen literaturbekannten Methoden erfolgen.

Zur Charakterisierung der optischen Eigenschaften der dargestellten Produkte sollen neben der UV/Vis-Absorptionsspektroskopie vor allem Fluoreszenzmessungen herangezogen werden. Auf der Detektion und dem Studium der Strukturabhängigkeit möglicher intramolekularer Excimeremissionen in zweifach Pyren-funktionalisierten Spezies liegt dabei das Hauptaugenmerk. Ferner soll die Emissionsspektroskopie dazu herangezogen werden, um Donor-Akzeptor-Systeme bezüglich denkbaren photoinduzierten Elektronentransfer- (PET) Prozessen zu untersuchen. Die daraus erhaltenen Ergebnisse sollen soweit möglich mit Molekülgeometrie-Berechnungen verglichen und interpretiert werden.

Ob die enantio- bzw. diastereoselektiv dargestellten Peptide chiroptisches Verhalten aufweisen, ist durch Circular dichroismus-Spektroskopie zu überprüfen.

Der prinzipielle Einsatz der peptidischen Produkte in optoelektrochemischen Bauteilen wie organischen Leuchtdioden (OLED) sollte, nach Untersuchung des elektrochemischen Verhaltens mittels Cyclovoltammetrie, Squarewavevoltammetrie und UV/Vis/NIR-Spektroelektrochemie, durch Elektrochemilumineszenz- (ECL) Experimente verifizierbar sein.

Als ein weiterer Schwerpunkt wird die Untersuchung Pyren-derivatisierter cyclischer Hexapeptide hinsichtlich ihres Einsatzes als neuartige, fluoreszente Metallionensensoren angestrebt. Die Detektion der Metallkoordinierung könnte dabei im Unterschied zu bekannten Cyclopeptid-Ionophoren durch optische Spektroskopie erfolgen.

## 2 Synthese

### 2.1 Stereoselektive Synthese chromophorsubstituierter Aminosäure-Monomere

#### 2.1.1 Einführung<sup>44</sup>

$\alpha$ -Aminosäuren besitzen eine große Bedeutung in unterschiedlichsten biologischen Prozessen. Neben der Polypeptid- und Proteinbiosynthese sind in diesem Zusammenhang neuronale Signalumwandlungen und verschiedene Stoffwechsel-Vorgänge zu nennen. Dabei treten die 20 proteinogenen Aminosäuren als regelmäßige Bestandteile der tierischen und pflanzlichen Proteine auf. Die ca. 1000 derzeit bekannten nicht proteinogenen Aminosäuren sind meist am Stoffwechsel von Pflanzen oder diversen Mikroorganismen beteiligt. Neben diesen natürlich vorkommenden Aminosäuren findet eine große Zahl synthetisch hergestellter Spezies ihre Anwendung in Pharmazie, Landwirtschaft, Lebensmittelindustrie und Materialwissenschaft.

Mit Ausnahme von Glycin besitzen  $\alpha$ -Aminosäuren einen chiralen Molekülbau. Demzufolge unterscheidet man zwischen den optisch aktiven Enantiomeren und der racemischen Form, wobei nahezu alle nativen Aminosäuren *L*-Konfiguration aufweisen.

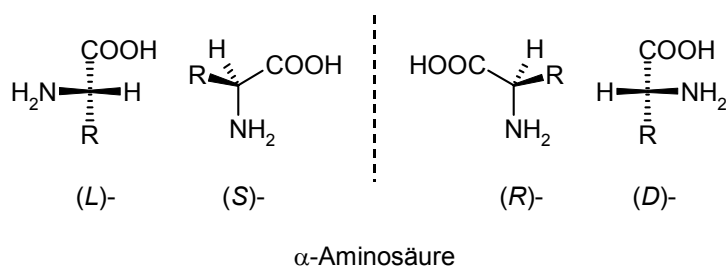
Hinsichtlich der Nomenklatur konnte sich in der Aminosäurechemie die universell anwendbare *Cahn-Ingold-Prelog'sche* Spezifikation der absoluten Konfiguration (*R/S*-Nomenklatur) bisher nicht gegen die *D/L*-Nomenklatur durchsetzen (Abbildung 2-1). Zudem wurden in der Peptid- und Proteinchemie aus formalen Gründen, anstelle des ausgeschriebenen Aminosäurenamens und der Strukturformel, Abkürzungen in Form von Dreibuchstaben-Codes eingeführt. Dabei ist die natürliche *L*-Konfiguration bereits im Symbol enthalten und nur *D*- bzw. *DL*-Aminosäuren werden besonders gekennzeichnet (z.B.: *L*-Alanin: Ala; *D*-Alanin: *D*-Ala; *DL*-Alanin: *DL*-Ala).<sup>45</sup>

---

<sup>44</sup> a) G. C. Barrett, *Chemistry and biochemistry of the amino acids*, Chapman and Hall, London, **1985**;  
b) H. D. Jakubke, H. Jeschkeit, *Aminosäuren, Peptide, Proteine*, VCH, Weinheim, **1982**;  
c) J. P. Greenstein, M. Winitz, *Chemistry of the amino acids*, John Wiley & Sons, New York, **1961**;  
d) I. Wagner, H. Musso, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 827.

<sup>45</sup> Die Nomenklatur der in dieser Arbeit verwendeten Aminosäuren wird in Kapitel 2.2.1 gesondert behandelt.





**Abb. 2-1:** Bezeichnung der absoluten Konfiguration von  $\alpha$ -Aminosäuren.

Gesonderte Regeln gelten für den Einsatz von Einbuchstabensymbolen, die vor allem in der Biochemie zur Benennung von Protein- und Polypeptidsequenzen Verwendung finden.

## 2.1.2 Asymmetrische Synthese von $\alpha$ -Aminosäuren

### 2.1.2.1 Allgemeine Verfahren<sup>46</sup>

Seit *A. Strecker* im Jahre 1850 Alanin als erste Aminosäure synthetisch darstellte, sind zahlreiche Methoden zur Gewinnung dieser Verbindungsklasse entwickelt worden. Klassische Darstellungswege sind neben der Strecker-Synthese<sup>47</sup> die Aminolyse von  $\alpha$ -Halogencarbonsäuren,<sup>48</sup> die Azlacton-Synthese nach *Erlenmeyer*<sup>49</sup> und die

- 
- <sup>46</sup> a) R. M. Williams, *Synthesis of optically active  $\alpha$ -amino acids*, Pergamon, Oxford, **1989**;  
 b) R. M. Williams in *Advances in asymmetric synthesis*, Vol. 1, Hrsg. A. Hassner, Jai Press, London, **1995**, 45;  
 c) R. O. Duthaler, *Tetrahedron* **1994**, 50, 1539;  
 d) D. Seebach, A. R. Sting, M. Hoffmann, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2880;  
 e) C. Cativiela, M. D. Diaz-de-Villegas, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 3517.
- <sup>47</sup> a) A. Strecker, *Liebigs Ann. Chem.* **1850**, 75, 27;  
 b) Th. Wieland in *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie – Band XI/2*, Hrsg. E. Müller, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1958**, 305;  
 c) G. Krüger in *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie – Band E5*, Hrsg. J. Falbe, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1985**, 534.
- <sup>48</sup> a) A. Cahours, *Liebigs Ann. Chem.* **1859**, 109, 10;  
 b) Lit. <sup>47b</sup>, 310.
- <sup>49</sup> a) E. Erlenmeyer, *Liebigs Ann. Chem.* **1893**, 275, 1;  
 b) Lit. <sup>47c</sup>, 310;  
 c) M. Crawford, W. T. Little, *J. Chem. Soc.* **1959**, 729;  
 d) E. Baltazzi, *Chem. Soc. Q. Rev.* **1955**, 9, 150;  
 e) J. M. Roper, D. P. Bauer, *Synthesis* **1983**, 1041.

Malonester-Methode.<sup>44c,50</sup> Mit diesen Verfahren sind die Aminosäuren allerdings nur in Form des Racemats zugänglich.

Da bei den vielzähligen Anwendungen von Aminosäuren jedoch meist nur ein Enantiomer von Interesse ist, sind schon aus wirtschaftlicher Sicht asymmetrische Syntheserouten vorzuziehen. In den letzten beiden Jahrzehnten wurde eine Fülle effizienter Verfahren auf diesem Forschungsgebiet ausgearbeitet (Abbildung 2-2).

Ein weit verbreiteter Darstellungsweg ist die Reaktion von Glycin-Enolat-Äquivalenten mit Elektrophilen (Abbildung 2-2: Pfad a), wozu neben Anderen auch *Schöllkopf's* Bislactimether-Synthese<sup>51</sup> und *Seebach's* Methode mit cyclischen Aminen<sup>52</sup> zählen. Nucleophile Alkylierungen von Glycin-Kation-Äquivalenten (Pfad b)<sup>53</sup> sind ebenso wie die elektrophile Aminierung von Ester-Enolaten (Pfad c)<sup>46a</sup> und die nucleophile Aminierung von  $\alpha$ -substituierten Carbonsäuren (Pfad d)<sup>46a,54</sup> weniger gängig. Dagegen haben asymmetrische Versionen der klassischen *Strecker*-Synthese (Pfad e) einige Bedeutung erlangt.<sup>55</sup> Eines der weitest verbreiteten Verfahren zur enantiomerenreinen Darstellung von  $\alpha$ -Aminosäuren stellt die asymmetrische Hydrierung von Dehydroaminosäuren (Pfad f) dar.<sup>56</sup>

Enzymatische Verfahren und verschiedene Reaktionen, die sich zu keinem der Darstellungswege in Abbildung 2-2 zählen lassen, runden die Möglichkeiten zur asymmetrischen Synthese von  $\alpha$ -Aminosäuren ab.<sup>46a</sup>

---

<sup>50</sup> a) S. P. J. Sørensen, *Z. Physiol. Chem.* **1905**, 44, 448;

b) Lit.<sup>47b</sup>, 308.

<sup>51</sup> a) U. Schöllkopf, *Tetrahedron* **1983**, 39, 2085;

b) U. Schöllkopf, *Pure & Appl. Chem.* **1983**, 55, 1799;

c) U. Schöllkopf, *Topics Curr. Chem.* **1983**, 109, 65.

<sup>52</sup> D. Seebach, R. Imwinkelried, T. Weber, *Modern Synthetic Methods* **1986**, 4, 128.

<sup>53</sup> a) D. Ben-Ishai, *Tetrahedron* **1977**, 33, 881;

b) U. Schöllkopf, S. Gruttner, R. Anderskewitz, E. Egert, M. Dyrbusch, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 717.

<sup>54</sup> a) D. A. Evans, J. A. Ellman, R. L. Dorow, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1123;

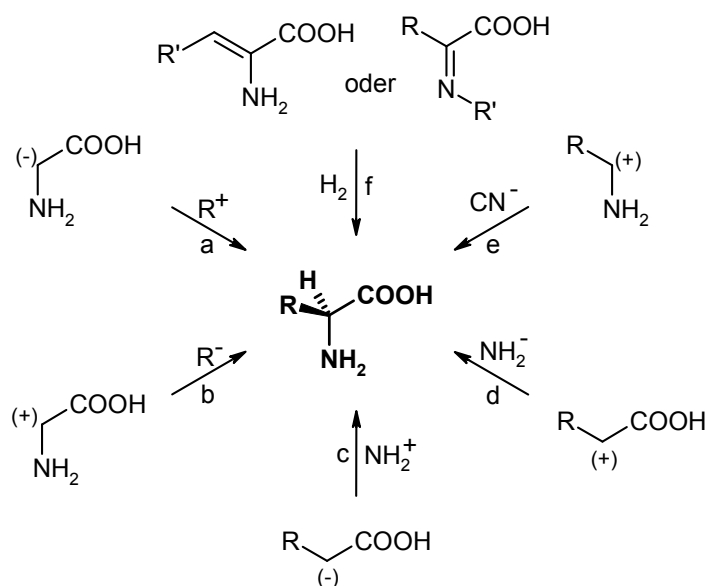
b) F. Effenberger, U. Burkhard, J. Willfahrt, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 50.

<sup>55</sup> a) K. Harada, *Nature* **1963**, 200, 1201;

b) K. Harada, T. Okawara, *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 707;

c) L. Yet, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 900.

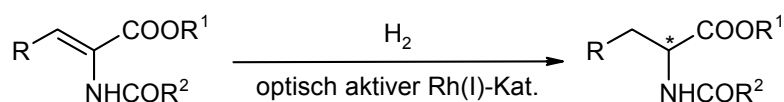
<sup>56</sup> Dieses Verfahren wird im folgenden Kapitel gesondert behandelt, da es in der vorliegenden Arbeit zur asymmetrischen Aminosäuresynthese eingesetzt wird.



**Abb. 2-2:** Überblick über Verfahren zur asymmetrischen Synthese von  $\alpha$ -Aminosäuren (die dargestellten Edukte sind als formale Synthesebausteine anzusehen).

### 2.1.2.2 Asymmetrische Hydrierung von Dehydroaminosäuren

Die effektivste und somit auch gängigste asymmetrische Hydrierung von (*Z*)- $\alpha$ -Amidoacrylsäurederivaten (Dehydroaminosäuren)<sup>57</sup> erfolgt durch Rh(I)-Katalyse unter Verwendung  $C_2$ -symmetrischer optisch aktiver Diphosphin-Liganden (Abbildung 2-3).<sup>46c,58</sup>



**Abb. 2-3:** Rh(I)-katalysierte asymmetrische Hydrierung eines  $\alpha$ -Amidoacrylsäurederivates

Die Pionierarbeit auf diesem Gebiet leisteten *W. S. Knowles*,<sup>59</sup> *L. Horner*<sup>60</sup> und *H. B. Kagan*<sup>61</sup> Ende der Sechziger und Anfang der Siebziger Jahre.

<sup>57</sup> Die Hydrierung von  $\beta$ -Iminocarbonsäuren (Abbildung 2-2: Pfad f) soll im weiteren nicht näher besprochen werden.

<sup>58</sup> a) R. Noyori, *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, **1994**;  
b) H. Takaya, T. Ohta, R. Noyori in *Catalytic Asymmetric Synthesis*, Hrsg. I. Ojima, VCH, Weinheim, **1993**;

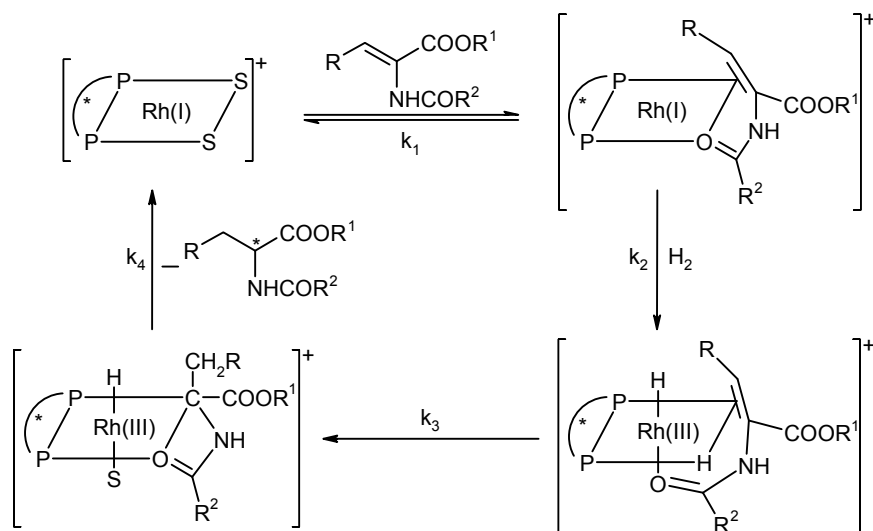
c) H. Brunner, W. Zettlmeier, *Handbook of Enantioselective Catalysis*, VCH, Weinheim, **1993**.

<sup>59</sup> a) W. S. Knowles, M. J. Sabacky, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1968**, 1445;

b) W. S. Knowles, M. J. Sabacky, B. D. Vineyard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 10.

Seither wurde eine Vielzahl optisch aktiver zweizähliger Diphosphine (z.B. DIOP, DIPAMP, CHIRAPHOS, PROPHOS, NORPHOS, BPPM, BDPP, BINAP, DUPHOS und BICP) synthetisiert und als chirale Liganden verwendet.<sup>58,62</sup>

Die Darstellung der katalytisch aktiven Rhodiumspezies erfolgt im Allgemeinen *in situ* durch Reaktion von  $[\text{RhCl}(\text{Dien})_2]$  oder  $[\text{Rh}(\text{Dien})_2]\text{Y}$  ( $\text{Y} = \text{BF}_4$  oder  $\text{ClO}_4$ ) mit einem entsprechenden Diphosphin.



**Abb. 2-4:** Mechanismus der Rh(I)-katalysierten asymmetrischen Hydrierung (S = Solvens).<sup>63</sup>

Der Mechanismus der sich daran anschließenden katalytischen Hydrierung wurde von *J. Halpern* und *J. M. Brown* aufgeklärt.<sup>64</sup> Abbildung 2-4 gibt den derzeit angenommenen Mechanismus wieder. Dabei wird in einem vorgelagerten Schritt der Coligand (Dien wie z.B. Cyclooctadien) durch zwei Solvensmoleküle (Abbildung

<sup>60</sup> L. Horner, H. Siegel, H. Büthe, *Angew. Chem.* **1968**, 80, 1034.

<sup>61</sup> W. Dumont, J.-C. Poulin, T.-P. Dang, H. B. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 8295.

<sup>62</sup> a) M. van den Berg, A. J. Minaard, E. P. Schudde, J. van Esch, A. H. M. de Vries, J. G. de Vries, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11539;

b) A. Zhang, B. Jiang, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 1761;

c) F.-Y. Zhang, W. H. Kwok, A. S. C. Chan, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 2337.

<sup>63</sup> Die durch eine gekrümmte Bindung mit Stern verbundenen Phosphoratome symbolisieren das eingesetzte optisch aktive Diphosphin.

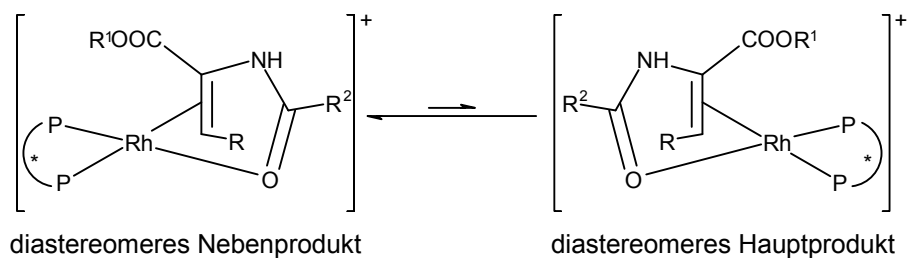
<sup>64</sup> a) A. S. C. Chan, J. J. Pluth, J. Halpern, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5952;

b) J. Halpern, *Acc. Chem. Res.* **1982**, 15, 332;

c) J. M. Brown, P. A. Chaloner, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1877;

d) J. M. Brown, P. J. Maddox, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 1276.

2-4: S) ersetzt. Die so erhaltene Rh(I)-Spezies greift die enantiofaciale Doppelbindung des Reaktionspartners von der  $C_{\alpha}si$ - bzw.  $C_{\alpha}re$ -Seite an, was die Bildung diastereomerer Intermediate bewirkt. Das thermodynamisch instabilere diastereomere Nebenprodukt (Abbildung 2-5) ist im Vergleich zum Hauptprodukt in der nachfolgenden oxidativen Addition von Wasserstoff wesentlich reaktiver. Dadurch wird die asymmetrische Bildung des späteren Reaktionsproduktes induziert.<sup>58a,65</sup>



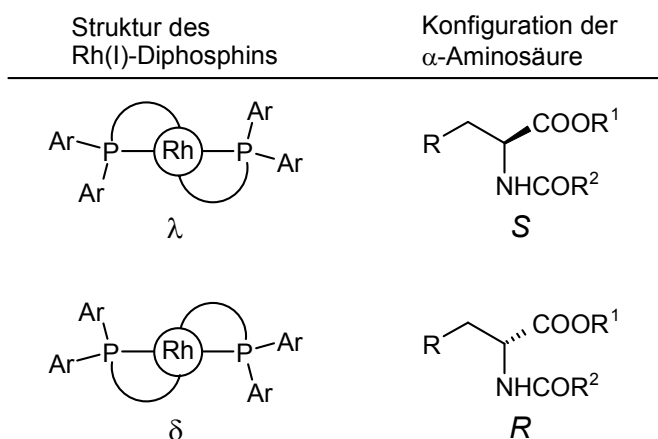
**Abb. 2-5:** Diastereomeres Haupt und Nebenprodukt des ersten Katalyseschrittes aus Abbildung 2-4. Das Gleichgewicht ist, auf Grund der schnelleren Reaktion des Nebenproduktes in der nachfolgenden oxidativen Addition von  $H_2$ , nach links verschoben.

„H“-Insertion in die olefinische Doppelbindung, Koordination eines Solvensmoleküls an das Metallzentrum und reduktive Eliminierung liefern danach das entsprechende optisch aktive Aminosäurederivat (Abbildung 2-4).

In derartigen katalytischen Hydrierungen wird die Chiralität des Diphosphin-Liganden effizient auf das Dehydroaminosäure-Substrat übertragen. Oft werden dabei Aryl-substituierte Diphosphine eingesetzt, wobei die an die Phosphoratome gebundenen Aromaten die Art der diastereomeren Zwischenstufen und Übergangszustände beeinflussen. Die asymmetrische Induktion wird von diesen aromatischen Ringen bestimmt (Abbildung 2-6). Diphosphin-Liganden die  $\lambda$ -Konfiguration aufweisen ergeben normalerweise (*S*)- $\alpha$ -Aminosäuren, wohingegen Phosphine mit  $\delta$ -Struktur *R*-Enantiomere als Hauptprodukt liefern.<sup>66</sup>

<sup>65</sup> a) J. Halpern in *Asymmetric Synthesis Vol. 5*, Hrsg. J. D. Morrison, Academic Press, Orlando, **1985**;  
b) H.-C. Gallmeier, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, **1999**.

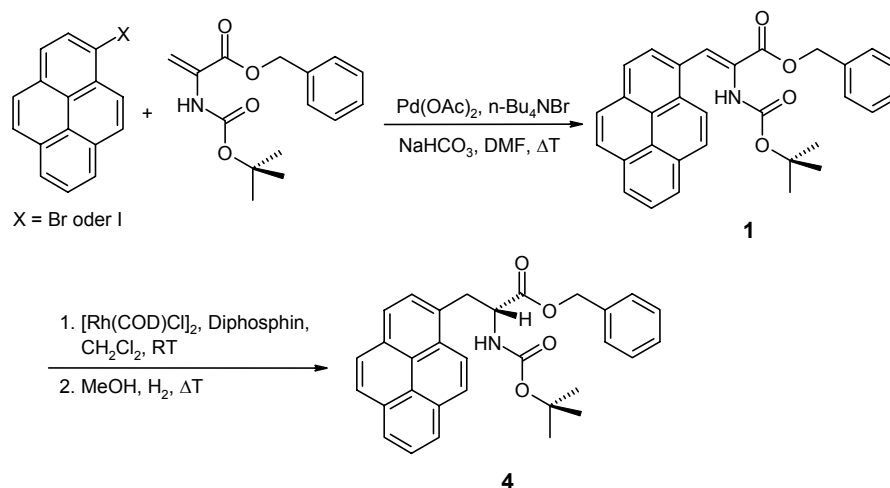
<sup>66</sup> H. B. Kagan in *Comprehensive Organometallic Chemistry Vol. 8*, Hrsg. G. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. W. Abel, Pergamon Press, Oxford, **1982**.



**Abb. 2-6:** Empirische Regel für Rh(I)-Diphosphin-katalysierte Hydrierungen von (Z)- $\alpha$ -(Acylamino)-acrylsäuren.

### 2.1.3 Synthese des geschützten Pyrenylalaninderivates **4**<sup>67</sup>

Zur Darstellung der chromophorsubstituierten artifiziellen  $\alpha$ -Aminosäuren werden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Synthesewege beschrieben und verglichen. Abbildung 2-7 zeigt die erste der beiden Reaktionssequenzen.



**Abb. 2-7:** Synthese des geschützten Pyrenylalaninderivates **4**.

Im ersten Schritt dieser Reaktion wird in einer *Heck*-Kupplung<sup>68</sup> die Pyren-derivatisierte (Z)-Dehydroaminosäure **1** hergestellt. Dabei dient zum einen 1-Brompyren<sup>69</sup> zum

<sup>67</sup> Zur Nummerierung der Verbindungen siehe Formeltafel.

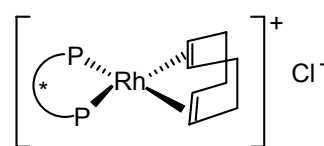
<sup>68</sup> a) I. P. Beletskaya, A. V. Cheprakov, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 3009;

b) N. J. Whitcombe, K. K. Hii, S. E. Gibson, *Tetrahedron* **2001**, 57, 7449;

anderen 1-Iodpyren<sup>69</sup> als Edukt. Der zweite Reaktionspartner wird durch Dehydratisierung eines entsprechend geschützten Serins erhalten.<sup>70</sup> Die Reaktionszeit beträgt für 1-Brompyren 48 h, für 1-Iodpyren 16 h, wobei im ersten Fall 62 %, im zweiten Fall 82 % Ausbeute erzielt werden. Die als gelber Feststoff erhaltene Dehydroaminosäure **1** wird anschließend asymmetrisch hydriert.

Die Synthese der katalytisch aktiven Rh(I)-Diphosphin-Spezies (Abbildung 2-8) erfolgt *in situ* durch Reaktion von  $[\text{Rh}(\text{COD})\text{Cl}]_2$  mit dem entsprechenden Diphosphin (Tabelle 2-1) bei Raumtemperatur in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Nach Entfernen des Lösungsmittels sowie Substrat- und Methanolzugabe werden in einem Stahlautoklaven 30 bar Wasserstoff aufgespresst. Die asymmetrische Hydrierung erfolgt innerhalb von 24 h bei einer Temperatur von 60 °C.<sup>65b</sup>

Das Produkt **4** ist in Abhängigkeit vom eingesetzten Diphosphin in unterschiedlichen Enantiomerenüberschüssen als hellgelbes Pulver zugänglich, wobei die Reaktionsausbeuten bei allen Liganden in der gleichen Größenordnung liegen (Tabelle 2-1).



**Abb. 2-8:** Katalytisch aktive Rh(I)-Spezies (eingesetzte Diphosphine, siehe Tabelle 2-1).


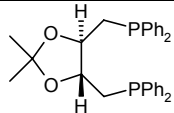
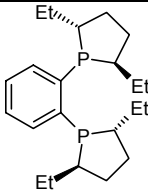
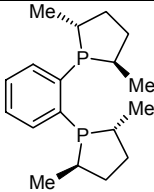
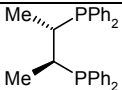
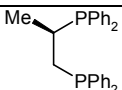
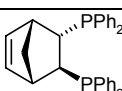
Die Diphosphine (*S,S*)-CHIRAPHOS, (*R*)-PROPHOS und (*S,S*)-NORPHOS sind an den Phosphoratomen zweifach Phenyl-substituiert und bilden mit dem Metallzentrum im aktiven Komplex einen Fünfring aus. Dies liefert mit bis zu 70 % ee die besten Enantiomerenüberschüsse. Der Einfluss der unterschiedlichen Kohlenstoffbrücken der genannten Liganden kann jedoch nicht einheitlich bewertet werden. (*R,R*)-DIOP formt mit Rh(I) einen weniger starren siebengliedrigen Chelatring, was offensichtlich eine chirale Induktion nahezu verhindert. Die sterisch sehr anspruchsvollen DUPHOS-Liganden ergeben ebenso keine zufriedenstellenden ee-Werte.

Die Bestimmung der ee-Werte erfolgt mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie unter Verwendung optisch aktiver Lanthanoiden-Shift-Reagenzien.

c) A. Ritzen, B. Basu, S. K. Chattopadhyay, F. Dossa, T. Frejd, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 503.

<sup>69</sup> 1-Brompyren wird durch *Wohl-Ziegler*-Bromierung von Pyren dargestellt. 1-Iodpyren wird daraus durch Reaktion mit *n*-BuLi und Iod erhalten. Zur genauen Reaktionsdurchführung, siehe: R. Engl, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1999**.

<sup>70</sup> A. Carlström, T. Frejd, *Synthesis* **1989**, 414-418.

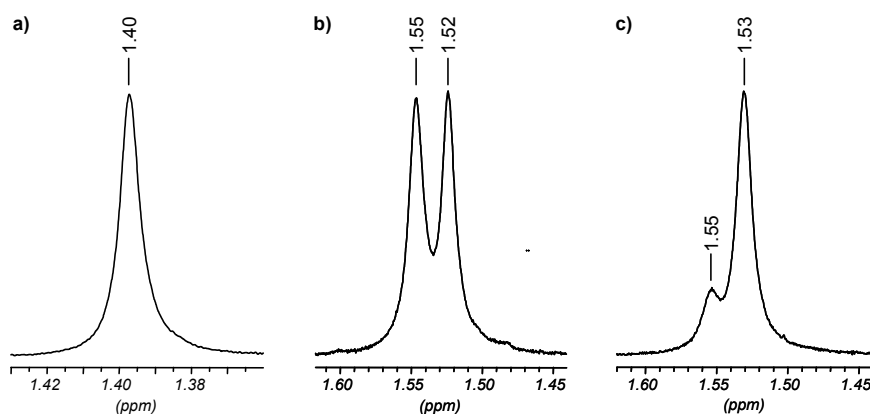
 Diphosphin-Ligand	Ausbeute (%)	Haupt-Enantiomer	Enantiomeren-Überschuss (%)
 (R,R)-DIOP	74	<i>D</i>	4
 (R,R)-Et-DUPHOS	75	<i>D</i>	10
 (R,R)-Me-DUPHOS	76	<i>D</i>	10
 (S,S)-CHIRAPHOS	83	<i>D</i>	34
 (R)-PROPHOS <sup>a</sup>	75	<i>L</i>	70
 (S,S)-NORPHOS	76	<i>D</i>	70

**Tab. 2-1:** Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse der asymmetrischen Hydrierungen von Verbindung **1** mit Rh(I)-Komplexen unterschiedlicher optisch aktiver Diphosphin-Liganden. a: Das zur Darstellung des *D*-Enantiomers von Verbindung **4** erforderliche (*S*)-PROPHOS ist nicht im Handel erhältlich. Die unterschiedlichen Enantiomerenüberschüsse bei der Verwendung von (*S,S*)-NORPHOS und (*S,S*)-CHIRAPHOS erfordern jedoch den zusätzlichen Einsatz eines ähnlichen Diphosphinliganden.



Durch Assoziation des Shift-Reagens  $\text{Eu}(\text{tfc})_3$ <sup>71</sup> mit der geschützten Aminosäure **4** entstehen diastereomere Komplexpaare, die getrennte Signale für die enantiomeren Substrate hervorrufen.<sup>72</sup>

Als Sonde dient der tert.-Butylsubstituent der Boc-Schutzgruppe. Nach Zusatz von  $\text{Eu}(\text{tfc})_3$  zur Messlösung des Racemats von **4** beobachtet man eine Tieffeldverschiebung und Aufspaltung des  $(\text{CH}_3)_3$ -Singuletts. Die Korrelation der Integralwerte der beiden Singuletts liefert den ee-Wert der entsprechenden asymmetrischen Hydrierung (Abbildung 2-10).



**Abb. 2-9:** <sup>1</sup>H-NMR-Signal der  $(\text{CH}_3)_3$ -Gruppe a) des Racemates der Verbindung **4** ohne Zusatz von  $\text{Eu}(\text{tfc})_3$ , b) des Racemates der Verbindung **4** mit Zusatz von  $\text{Eu}(\text{tfc})_3$ , c) der Verbindung **4** nach Hydrierung mit (*S,S*)-NORPHOS und Zusatz von  $\text{Eu}(\text{tfc})_3$ .

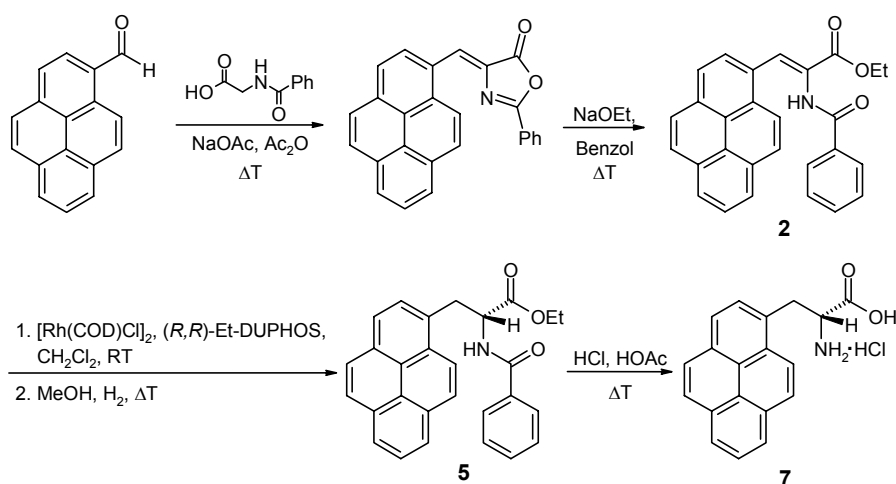
Abschließend betrachtet liefert die, in diesem Kapitel vorgestellte, Aminosäuresynthese Produkte, die gut für Peptiddarstellungen geeignet sind. Gewährleistet wird dies durch die gewählten Schutzgruppen. Nachteilig ist jedoch, dass keine zufriedenstellenden Enantiomerenüberschüsse im letzten Schritt der Produktdarstellung erzielt werden können.

<sup>71</sup>  $\text{Eu}(\text{tfc})_3$ : Tris[3-(trifluormethyl-hydroxymethylen)-(+)-d-campherato]-europium

<sup>72</sup> a) H. Friebohn, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, VCH, Weinheim, **1992**;  
 b) W. Offermann, A. Mannschreck, *Org. Magn. Reson.* **1984**, 22, 355;  
 c) T. J. Wenzel, T. C. Bettes, J. E. Sadlowski, R. E. Sievers, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5903.

### 2.1.4 Synthese der chromophorsubstituierten Aminosäuren 7 und 11

Eine Variante der *Erlenmeyer*-Synthese stellt den alternativen Weg zur Darstellung chromophorsubstituierter Aminosäuren dar. Sowohl die racemische<sup>73</sup> als auch die enantioselektive<sup>65b</sup> Darstellung der Aminosäuren 7 und 11 wurde bereits von *M. Komma*, *H.-C. Gallmeier* und *J. Strauß* beschrieben. Abbildung 2-9 zeigt die Darstellungssequenz am Beispiel des Pyrenylalanins 7.



**Abb. 2-10:** Darstellung von *D*-2-Amino-3-(1-pyrenyl)-propionsäure-Hydrochlorid (7).

Die Synthese der artifiziellen Aminosäuren 7 und 11 geht von 1-Pyrenaldehyd<sup>74</sup> bzw. 3-Formyl-10-methyl-10*H*-phenothiazin<sup>75</sup> aus. Umsetzung mit Hippursäure liefert das entsprechende Azlacton, das jeweils als leuchtend oranges Pulver in Ausbeuten von 72 % bzw. 64 % erhalten wird. Die anschließende basische Ringöffnung des Heterocyclus führt zu den Acrylsäurederivaten 2 (gelbe Nadeln, 96 % Ausbeute) und 3 (oranges Pulver, 97 % Ausbeute). Durch Hydrierung der exocyclischen Doppelbindung in Gegenwart des *in situ* erzeugten, optisch aktiven Rh(I)-Bisphosphan-Komplexes mit (*R,R*)-Et-DUPHOS<sup>76</sup> als chiraalem Liganden kann die geschützte Aminosäure 5 enantiomerenrein (> 98 % ee) in Form hellgelber Nadeln mit einer Ausbeute von 95 %

<sup>73</sup> a) M. Komma, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1999**;

b) J. Strauß, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, **1999**.

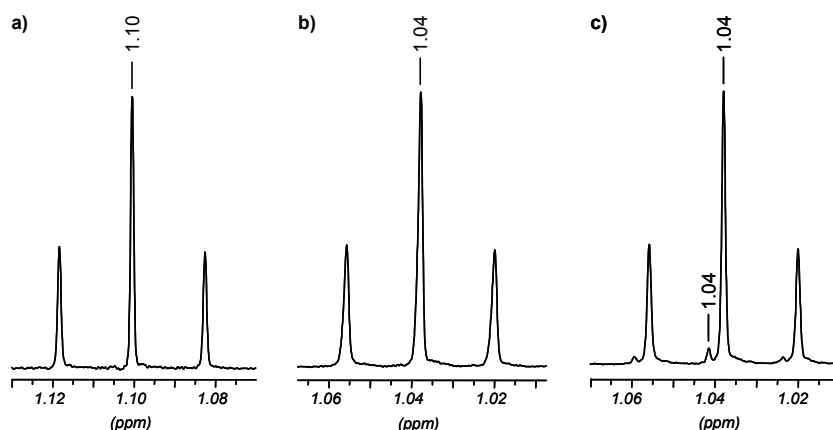
<sup>74</sup> 1-Pyrenicarboxyaldehyd [3029-19-4]; Synthese siehe: E. Beer, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1994**.

<sup>75</sup> 3-Formyl-10-methyl-10*H*-phenothiazin [4997-36-8]; Synthese siehe: H. Spreitzer, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1995**.

<sup>76</sup> M. Burk, J. Feaster, W. Nugent, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10125.

isoliert werden. Das Phenothiazin-Analogon **6** wird auf gleiche Weise in einer Ausbeute von 90 % (> 98 % ee) als gelbes Pulver dargestellt.

Die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse erfolgt hier ebenfalls  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch. Allerdings wird als optisch aktives Shift-Reagens (*R*)-(-)-1-(9-Anthryl)-2,2,2-trifluorethanol (*Pirkle's* Alkohol) verwendet.<sup>72a,77</sup> Infolge von Wasserstoffbrückenbindungen werden aus dem Alkohol und dem entsprechenden Substrat diastereomere Komplexpaare gebildet. Im Falle der geschützten Aminosäuren **5** und **6** dient die Methyl-Gruppe des Ethylesters als Sonde im  $^1\text{H}$ -NMR-Experiment. Der Zusatz des optisch aktiven Alkohols zu Messlösungen von **5** bzw. **6** führt jeweils zu einer Hochfeld-Verschiebung des Methyl-Tripletts.<sup>65b</sup> Nach Zugabe des Enantiomeren der eingesetzten Aminosäure wird eine Signalaufspaltung detektiert, was in Abbildung 2-11 exemplarisch für Verbindung **5** dargestellt ist.



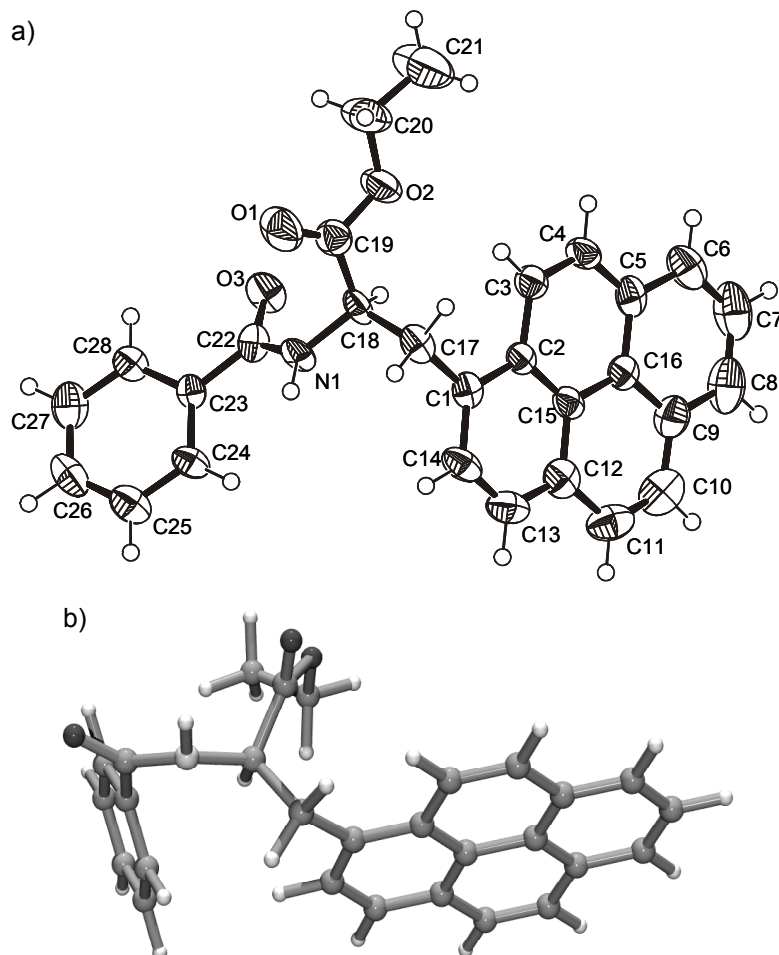
**Abb. 2-11:**  $^1\text{H}$ -NMR-Signal der  $\text{CH}_3$ -Gruppe a) der Verbindung **5** vor Zusatz von *Pirkle's* Alkohol, b) der Verbindung **5** nach Zusatz von *Pirkle's* Alkohol, c) der Verbindung **5** nach Zusatz von *Pirkle's* Alkohol sowie wenig L-Enantiomer.

Neben der Korrelation dieser  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopischen Informationen bzw. den gemessenen Drehwerten mit entsprechenden literaturbekannten Ergebnissen<sup>65b,73a</sup> ist die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Verbindungen **5** und **6** auch durch Röntgenstrukturanalyse möglich. Dabei ist die Verwendung von  $\text{Cu-K}_\alpha$ -Strahlung und die Detektion der anormalen Dispersion zielführend.<sup>78</sup> Um die Bildung von *D*-Enantiomeren bei Hydrierungen mit (*R,R*)-Et-DUPHOS zu belegen, wird das geschützte Pyrenylalanin **5** röntgenstrukturanalytisch untersucht. Durch Kristallisation

<sup>77</sup> W. H. Pirkle, D. J. Hoover in *Topics in Stereochemistry*, Vol. 13, Hrsg. N. L. Allinger, E. L. Eliel, S. H. Wilen, Wiley, New York, **1982**, 263.

<sup>78</sup> W. Massa, *Kristallstrukturbestimmung*, Teubner, Stuttgart, **1994**.

aus Ethanol werden nadelförmige gelbe Kristalle erhalten, die vermessen werden können. Verbindung **5** kristallisiert in der orthorhombischen Raumgruppe  $P2_12_12_1$  (Abbildung 2-12).<sup>79</sup>



**Abb. 2-12:** a) *ORTEP*-Plot der Verbindung **5** (Die Schwingungsellipsoiden zeigen 50 % Aufenthaltswahrscheinlichkeit an); b) semiempirisch auf PM3-Niveau berechnete Molekülgeometrie der Verbindung **5**.

Die *D*-Konfiguration am Kohlenstoff C18 des Aminosäurederivates ist in Abbildung 2-12a eindeutig erkennbar. Der erhaltene *Flack*-Parameter ist mit einem Wert von 0.2(7) (bei richtiger absoluter Konfiguration gleich Null) in einer ersten Betrachtung nicht aussagekräftig. Bei Annahme der *L*-Konfiguration werden die Güteparameter der Verfeinerung jedoch deutlich schlechter, was für die Richtigkeit der ermittelten absoluten Konfiguration spricht.

<sup>79</sup> Die genauen Messdaten und Parameter finden sich im Anhang.

Die Geometrie des Moleküls **5** wird zusätzlich mit Hilfe semiempirischer Methoden (AM1 und PM3) berechnet (Abbildung 2-12b).<sup>80</sup> Die dadurch erhaltenen Daten sollen mit der Röntgenstrukturanalyse verglichen werden. Der Vergleich zwischen der im Kristall ermittelten Struktur und den berechneten Geometrien ist dabei nur teilweise berechtigt, da im Kristall auftretende Effekte, die sich z.B. infolge spezieller Molekül-Stapelung ergeben, durch die Molekülgeometrieberechnungen nicht berücksichtigt werden.

Bei Betrachtung von Abbildung 2-12 fällt die unterschiedliche Orientierung sowohl der Ethylester- als auch der Benzoylgruppierung in der berechneten Struktur und dem *ORTEP*-Plot auf. Da die Rotationsbarrieren im ausgewählten Molekül allerdings als gering anzusehen sind, ist diese Beobachtung aus energetischer Sicht wenig aussagekräftig.

Bindung	Bindungslängen [Å]			Winkel	Winkelgrößen [°]		
	X-Ray	AM 1	PM 3		X-Ray	AM 1	PM 3
<b>C1-C17</b>	1.509(7)	1.49	1.50	<b>C1-C17-C18</b>	113.4(5)	111.94	111.96
<b>C17-C18</b>	1.548(8)	1.55	1.54	<b>C17-C18-C19</b>	111.8(5)	107.68	110.05
<b>C18-C19</b>	1.500(8)	1.53	1.53	<b>C18-C19-O1</b>	126.5(6)	123.93	126.55
<b>C19-O1</b>	1.190(8)	1.23	1.21	<b>C18-C19-O2</b>	109.8(5)	123.76	124.58
<b>C19-O2</b>	1.337(8)	1.36	1.36	<b>C19-O2-C20</b>	117.3(5)	120.57	120.06
<b>O2-C20</b>	1.435(8)	1.43	1.42	<b>O1-C19-O2</b>	123.6(6)	112.31	108.85
<b>C20-C21</b>	1.462(11)	1.51	1.52	<b>O2-C20-C21</b>	108.6(5)	111.33	111.40
<b>C18-N1</b>	1.452(6)	1.44	1.48	<b>C17-C18-N1</b>	112.0(5)	112.39	109.01
<b>N1-C22</b>	1.350(8)	1.38	1.43	<b>N1-C18-C19</b>	111.7(4)	109.60	110.94
<b>C22-O3</b>	1.233(8)	1.25	1.22	<b>C18-N1-C22</b>	120.6(5)	125.10	120.52
<b>C22-C23</b>	1.477(8)	1.49	1.49	<b>N1-C22-O3</b>	119.7(6)	118.37	116.22
				<b>N1-C22-C23</b>	116.8(6)	119.86	119.73
				<b>O3-C22-C23</b>	123.5(6)	121.75	123.91

**Tab. 2-2:** Vergleich der röntgenstrukturanalytischen Bindungsdaten von **5** mit semiempirischen Berechnungen auf AM1- und PM3-Niveau.

<sup>80</sup> Details zu den verwendeten semiempirischen Methoden finden sich im *Experimentellen Teil* (Kapitel 8) dieser Arbeit.

Bei der Analyse der erhaltenen Bindungswinkel und Bindungslängen (Tabelle 2-2) zeigt sich jedoch, dass die berechneten Geometrien zufriedenstellend mit den Röntgenstrukturdaten übereinstimmen. Die Differenzen in den Bindungslängen liegen im Bereich von 0-0.04 Å, die Bindungswinkel differieren zwischen 0-5°. Etwas deutlicher weichen nur die berechneten Werte sowohl der Winkel C18-C19-O1 bzw. O1-C19-O2 als auch der Bindungslängen C18-C19, C19-O2, C20-C21 und N1-C22 von den Röntgenstrukturdaten ab (Tabelle 2-2).

Zur letztendlichen Darstellung der freien Aminosäuren **7** und **11** müssen die Schutzgruppen der Verbindungen **5** und **6** durch Hydrolyse unter sauren Bedingungen abgespalten werden (Abbildung 2-9). Dadurch wird **7** als grünes Pulver mit einer Ausbeute von 93 % und **11** als hellbraunes Pulver mit 89 % Ausbeute erhalten.

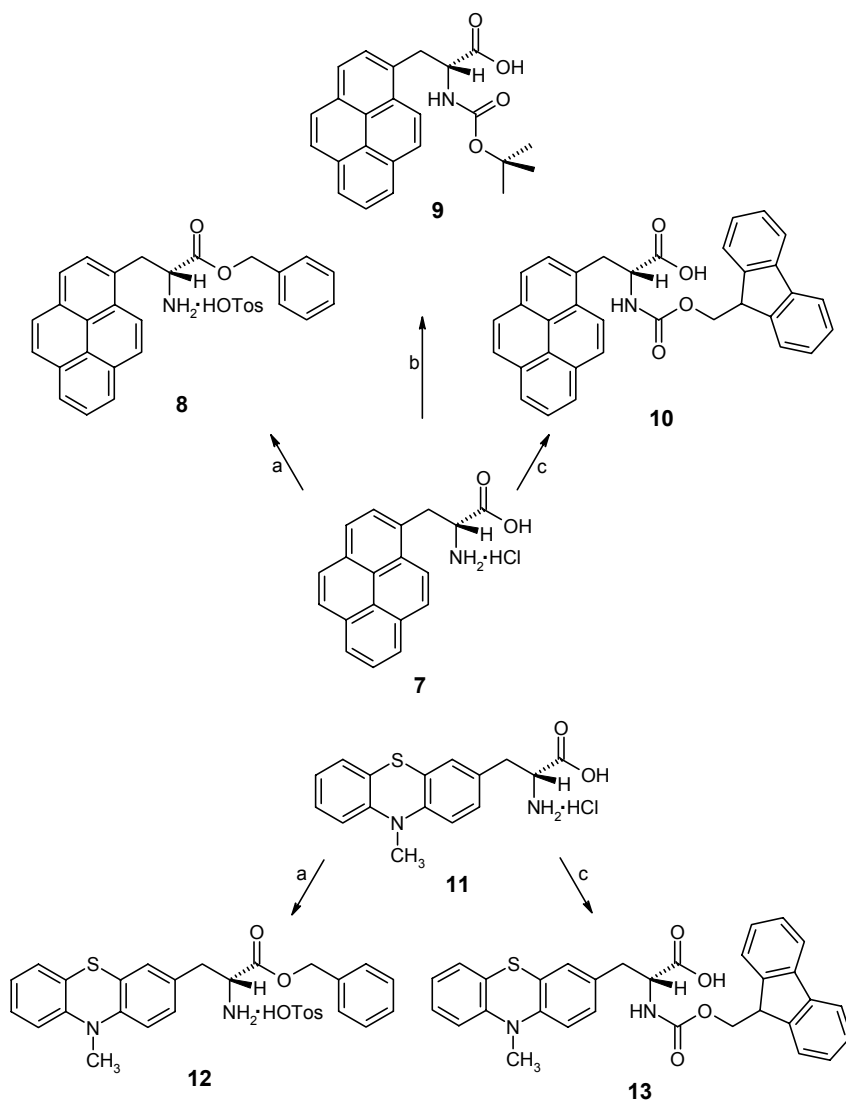
### 2.1.5 Synthese selektiv geschützter chromophorsubstituierter Aminosäuren

Um die Aminosäuren **7** und **11** in Kupplungsreaktionen zur Peptidsynthese einsetzen zu können, ist der selektive und reversible Schutz sowohl der Amino- als auch der Säurefunktion notwendig.<sup>81</sup> Als Aminoschutzgruppen kommen *tert*-Butyloxycarbonyl- (Boc) und Fluorenyl-9-methoxycarbonyl- (Fmoc) Gruppen zum Einsatz. Benzylester (OBzl) dienen als Carboxylschutzgruppen. Die Synthese der entsprechend geschützten Arylalanine **8**, **9**, **10**, **12** und **13** erfolgt nach Standardmethoden (Abbildung 2-13).<sup>82</sup>

Nach Veresterung von **7** bzw. **11** erhält man die Spezies **8** als beige-grünen Feststoff in 68 % Ausbeute, die Verbindung **12** als gelbes Öl in einer Ausbeute von 58 %. Die Boc-geschützte Aminosäure **9** entsteht, nach Reaktion von **7** mit Di-*tert*-butyldicarbonat, nahezu quantitativ als hellgelbes Pulver. Durch Fmoc-Schutz von **7** bzw. **11** kann Verbindung **10** in einer Ausbeute von 66 % als gelber Feststoff und Verbindung **13** als beiges Pulver mit 60 % Ausbeute isoliert werden.

<sup>81</sup> Die genaue Erläuterung der gewählten Schutzgruppenchemie erfolgt in Kapitel 2.2.5.

<sup>82</sup> T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, New York, 1999.



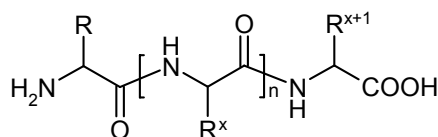
**Abb. 2-13:** Synthese der geschützten Aminosäurederivate **8**, **9**, **10**, **12** und **13**; a: p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-OH}$ , Benzol,  $\Delta$ T; b:  $\text{NEt}_3$ , Di-*tert*-butyldicarbonat,  $\text{H}_2\text{O}$ /Dioxan, RT; c:  $\text{NaHCO}_3$ , Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl-*O*-succinimid, RT.

## 2.2 Peptidsynthese in Lösung <sup>83</sup>

### 2.2.1 Einführung

Die Bezeichnung „Peptide“ geht auf *E. Fischer* zurück, der 1906 aus den Anfangsbuchstaben des Begriffs **Peptone** (Spaltprodukte des Proteinabbaus durch Pepsin) und den Endbuchstaben des Kohlenhydratbegriffs **Polysaccharide** den Namen für diese Verbindungsklasse prägte.<sup>84</sup>

Formal betrachtet handelt es sich bei Peptiden um Polymere der Aminosäuren, in denen die Einzelbausteine durch Amidbindungen (Peptidbindungen) miteinander verknüpft sind (Abbildung 2-14). Nach der Anzahl der Aminosäuren die als Monomerbausteine in einem Peptid enthalten sind, unterscheidet man zwischen Di-, Tri-, ... Nona-, Decapeptiden usw. Bei langkettigen Spezies wird die Anzahl der enthaltenen Aminosäuren in arabischen Zahlen vor das Wort Peptid gestellt (z.B. 12-Peptid statt Dodecapeptid).



**Abb. 2-14:** Strukturformel eines aus (n+2) Aminosäuren aufgebauten Peptids.

Gemäß der Anzahl der integrierten Aminosäuremonomere unterscheidet man nach entsprechenden Nomenklaturrichtlinien zwischen Peptiden und Proteinen. Oligopeptide enthalten weniger als 15 Aminosäuren. Danach folgen die Polypeptide, und ab einer Monomerenzahl von 50 ist der Begriff Proteine erlaubt.

Aufgrund der Tatsache, dass in natürlich vorkommenden Peptiden auch nichtproteinogene Bausteine (z.B. D-Aminosäuren, Hydroxycarbonsäuren u.a.), sowie nichtpeptidische Bindungen wie Disulfid-, Ester-, und Thioesterbindungen auftreten können, muss die ursprüngliche Peptiddefinition modifiziert werden. Man differenziert daher zwischen *homöomeren* Peptiden, die ausschließlich aus proteinogenen Aminosäuren bestehen, und *heteromeren* Peptiden, in denen auch proteinfremde

<sup>83</sup> Einen Überblick zu den in diesem Kapitel besprochenen Themen liefern:

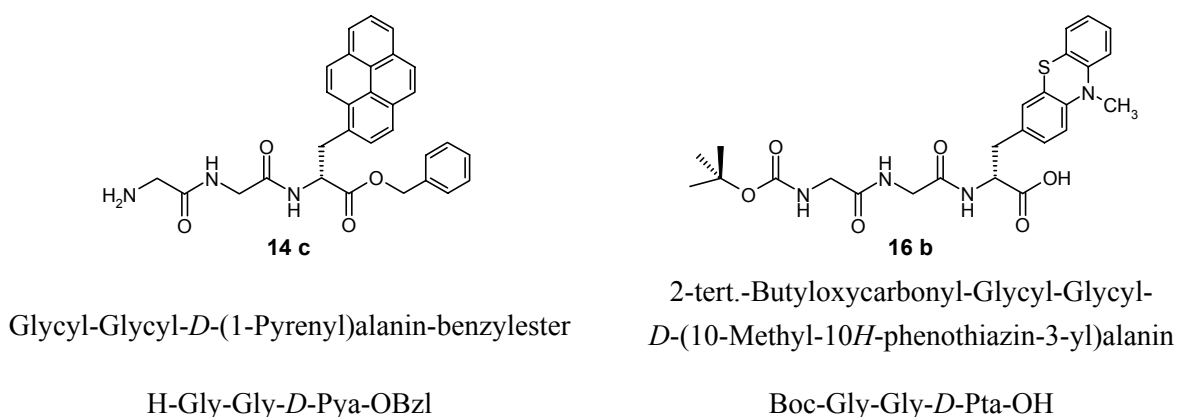
- H. D. Jakubke, *Peptide*, Spektrum, Heidelberg, **1996**;
- M. Bodanszky, *Peptide Chemistry: a practical textbook*, 2<sup>nd</sup> Ed., Springer, Berlin, **1993**;
- J. Johnes, *The Chemical Synthesis of Peptides*, Clarendon Press, Oxford, **1991**.

<sup>84</sup> E. Fischer, *Ber. Dtsch. chem. Ges.* **1906**, 39, 530.



Bausteine vorkommen. Entsprechend der Bindungsart unterscheidet man zwischen *homodeten* und *heterodeten* Peptiden, wobei erstere im Unterschied zum zweiten Typ nur Peptidbindungen enthalten.

Zur rationellen chemischen Nomenklatur betrachtet man Peptide formal als Acylaminosäuren, wobei allen Aminosäuren, deren Carboxylfunktion an einer Peptidbindung beteiligt ist, die Endung *-yl* zugeordnet wird. Zwangsläufig behält dann nur die am Carboxyterminus befindliche Aminosäure den unveränderten Namen. Vereinbarungsgemäß wird bei Verwendung der Drei-Buchstaben-Schreibweise<sup>85</sup> die N-terminale Aminosäure in der horizontal angeordneten Peptidkette stets links geschrieben, während das rechte Kettenende durch die C-terminale Aminosäure gekennzeichnet wird. Will man hervorheben, dass das Peptid in unsubstituierter Form vorliegt, kann man die Amino- bzw. Carboxylgruppe in der vereinfachten Formel durch ein zusätzliches H bzw. OH kennzeichnen. In geschützten Peptiden werden H bzw. OH durch die entsprechenden Schutzgruppen ersetzt (Abbildung 2-15).



**Abb. 2-15:** Strukturformel, rationelle Nomenklatur und Drei-Buchstaben-Schreibweise der Peptide **14c** und **16b**.<sup>86</sup>

Neben den dominierenden linearen Peptiden kommen in der Natur auch cyclische Peptide unterschiedlicher Ringgröße vor, deren Bildung man sich formal durch Knüpfung einer Peptidbindung aus der terminalen Amino- und Carboxylfunktion eines linearen Peptides vorstellen kann.

<sup>85</sup> Vergleiche Kapitel 2.1.1

<sup>86</sup> a) *D*-Pya: Drei-Buchstaben-Symbol für *D*-(1-Pyrenyl)alanin; siehe:

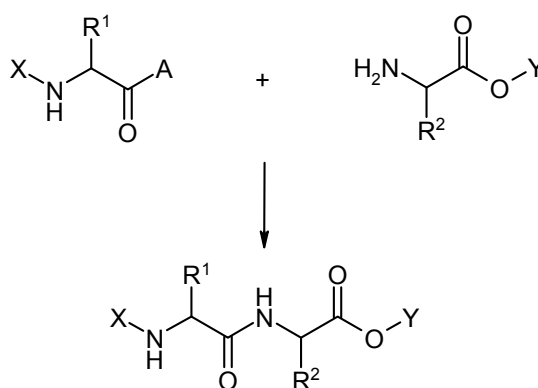
S. Egusa, M. Sisido, Y. Imanishi, *Macromolecules* **1985**, 18, 882;

b) *D*-Pta: selbstgewähltes Drei-Buchstaben-Symbol für *D*-(10-Methyl-10*H*-phenothiazin-3-yl)alanin.

Zur Kennzeichnung eines cyclischen Peptides setzt man die entsprechende Peptidsequenz in Klammern und stellt den Begriff *cyclo* voran.

## 2.2.2 Prinzipien der Peptidsynthese

Die Knüpfung einer Peptidbindung zwischen der Amino- und der Carboxylfunktion zweier Aminosäuren ist scheinbar ein einfacher chemischer Kondensationsprozess. In der Realität gelingt eine gezielte Peptidsynthese bei akzeptablen Reaktionsbedingungen allerdings nur unter bestimmten Voraussetzungen (Abbildung 2-16). Einerseits müssen alle funktionellen Gruppen, die nicht am Peptidbildungsschritt beteiligt sind, temporär und reversibel blockiert werden. Andererseits ist die Aktivierung der Carboxykomponente notwendig, um eine Reaktion unter milden Bedingungen und Vermeidung von Nebenreaktionen zu gewährleisten.

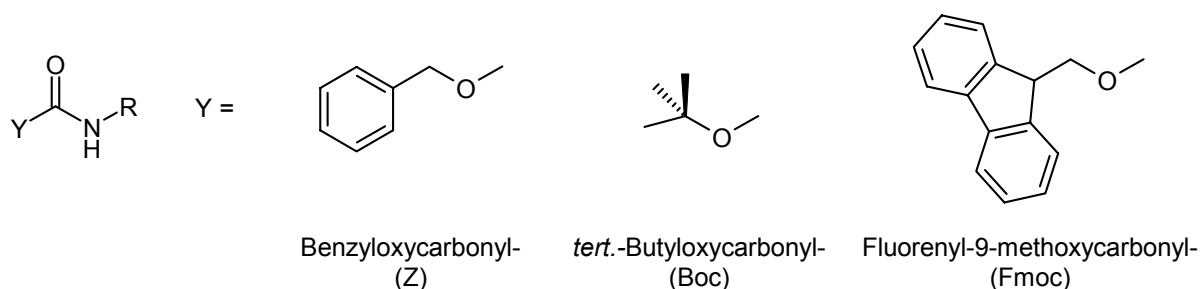


**Abb. 2-16:** Peptidsynthese unter Einsatz von geschützten Aminosäuren und Carboxylaktivierung (X: Aminoschutzgruppe, Y: Carboxylschutzgruppe, A: Aktivierungsgruppe).

### 2.2.2.1 Aminoschutzgruppen

Prinzipiell kann die  $N^\alpha$ -Aminofunktion einer Aminosäure durch Acylierung, Alkylierung und Alkyl-Acylierung reversibel blockiert werden. Darüber hinaus sind auch Schutzgruppen auf der Basis von Schwefel- und Phosphorderivaten bekannt. Am häufigsten werden allerdings Aminoschutzgruppen auf der Basis von Carbamidsäureestern verwendet, die man als Urethantyp-Schutzgruppen bezeichnet. Die wichtigsten Vertreter dieser Klasse sind die Benzyloxycarbonyl- (Z),

*tert.*-Butyloxycarbonyl- (Boc) und die Fluorenyl-9-methoxycarbonylgruppe (Fmoc) (Abbildung 2-17).



**Abb. 2-17:** Aminoschutzgruppen vom Urethantyp.

Sowohl die Z- als auch die Boc-Schutzgruppe sind säurelabile Vertreter ihrer Klasse. Gegen basische und nucleophile Reagenzien sind beide Schutzgruppen jedoch stabil. Die Boc-Gruppierung bietet darüber hinaus Schutz bei katalytischer Hydrolyse und Reduktionsreaktionen.

Im Gegensatz dazu ist die Fmoc-Gruppe basenlabil und kann bereits unter milden basischen Bedingungen abgespalten werden. Gegenüber aciden Reagenzien ist die Fmoc-Gruppe allerdings sehr stabil. Herausragende praktische Bedeutung hat diese Schutzgruppe im Einsatz bei *Merrifield*-Festphasensynthesen gewonnen. Die Fmoc-Strategie gehört heute zu den bevorzugten Synthesekonzepten auf diesem Gebiet.<sup>87</sup>

#### 2.2.2.2 Carboxylschutzgruppen

Für die reversible Blockierung der Carboxylfunktion bieten sich hauptsächlich die Ester des Methyl-, Ethyl-, Benzyl-, *tert.*-Butyl- oder Aryltyps an. Die Alkylester sind sehr stabile Schutzgruppen und werden bei RT weder durch TFA, noch durch Thiole oder Amine angegriffen. Neben der Anwendung enzymatischer Methoden erfolgt die Abspaltung dieser Schutzgruppen meist mittels alkalischer Hydrolyse. Benzylester können im Gegensatz zu anderen Estergruppen auch durch katalytische Hydrogenolyse gespalten werden, was gegenüber alkalischen Reaktionsbedingungen weniger Racemisierungsgefahr birgt.<sup>88</sup>

<sup>87</sup> Genauere Erläuterungen zu Peptidfestphasensynthesen finden sich in Kapitel 2.3.

<sup>88</sup> Genauere Erläuterungen zur Racemisierungsgefahr bei Peptidsynthesen finden sich in Kapitel 2.2.4.

## 2.2.3 Kupplungsmethoden

Wie bereits angesprochen können Carbonsäuren bei Raumtemperatur unter milden Bedingungen nicht mit Aminen zu den entsprechenden Amiden umgesetzt werden, weshalb eine Aktivierung der Carboxykomponente notwendig ist. Durch Einführung von –I- bzw. –M-Substituenten wird die Elektronendichte am Carbonyl-C- und Carbonyl-O-Atom verringert. Somit wird das elektrophile Potential dieser Gruppierung erhöht, was den Angriff der Aminokomponente begünstigt. Aus dem breiten Spektrum der in diesem Zusammenhang entwickelten Kupplungsmethoden zur Peptidsynthese werden in der vorliegenden Arbeit Varianten der Azid-, der Aktivester- und der Carbodiimid-Methode eingesetzt. Diese Verfahren sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

### 2.2.3.1 Azid-Methode

Die Azid-Methode wurde 1902 von *T. Curtius* entwickelt und zählt zu den am längsten bekannten Kupplungsverfahren. Ausgangspunkt für die Azid-Kupplung sind im Allgemeinen N<sup>α</sup>-geschützte Aminosäure- bzw. Peptidhydrazide, die aus den entsprechenden Estern durch Hydrazinolyse erhalten werden. Auf klassischem Weg wird das Hydrazid durch Zugabe von Natriumnitrit in salzsaurer Lösung in das Azid überführt (Abbildung 2-18: Pfad a). Nach Isolierung des Azids wird die Aminokomponente in einem geeigneten organischen Lösungsmittel zugesetzt.

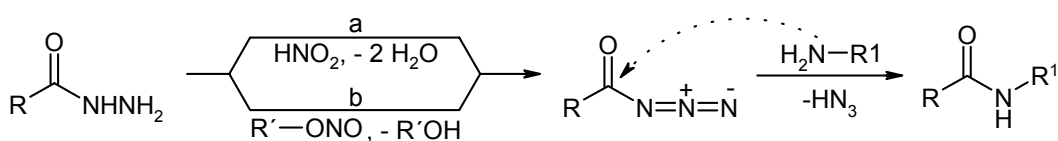


Abb. 2-18: Peptidkupplung nach der Azid-Methode.

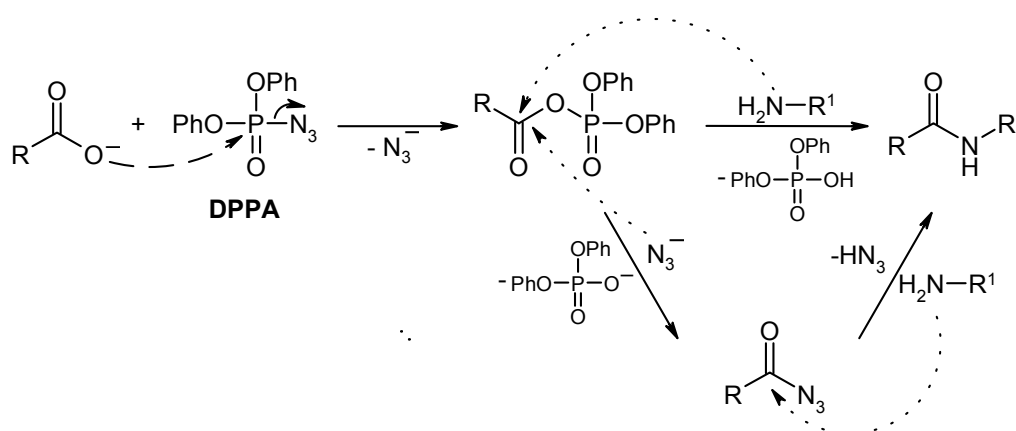
Heute wird allerdings meist die Methode von *J. Honzl* und *J. Rudinger* bevorzugt. Dabei wird das Azid durch Reaktion des Hydrazids mit einem Alkylnitrit dargestellt, was eine direkte Azidkupplung in organischen Lösungsmitteln erlaubt (Abbildung 2-18: Pfad b).<sup>89</sup>

Die Reaktionen erfolgen gewöhnlich unter Eiskühlung innerhalb mehrer Tage, da ansonsten die Gefahr von Konkurrenzreaktionen, basierend auf der *Curtius*-

<sup>89</sup> J. Honzl, J. Rudinger, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1961**, 26, 2333.

Umlagerung besteht. Trotz dieses Nachteils ist die Azid-Kupplung eine häufig verwendete Methode,<sup>90</sup> da im Verlauf der Peptiddarstellung ein geringes Racemisierungsrisiko besteht.

Die derzeit gebräuchlichste Anwendung des Azid-Verfahrens verläuft unter Verwendung von Diphenylphosphorylazid (DPPA). Mechanistisch wird in diesem Zusammenhang sowohl die Bildung des Carbonsäureazids, als auch eine Reaktionssequenz ohne Azid-Zwischenstufe diskutiert (Abbildung 2-19).<sup>91</sup> Der Einsatz von DPPA in der Peptidsynthese spielt vor allem bei Peptidcyclisierungsreaktionen eine entscheidende Rolle.<sup>92</sup>



**Abb. 2-19:** Diskutierte Mechanismen der Peptidkupplung mit DPPA.

Eine Kupplungsvariante, die die Azidmethode und die im nachfolgenden Kapitel beschriebene Aktivester-Methode vereint, stellt die Transfer-Aktivester-Kondensation dar.<sup>93</sup> Dabei wird auf herkömmliche Art und Weise ein Peptidhydrazid in ein Peptidazid überführt, das anschließend *in situ* durch Zusatz eines Additivs wie z.B. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) zum entsprechenden Aktivester reagiert. Dieser Aktivester bildet die eigentliche Kupplungskomponente. Aufgrund der schnellen und effizienten Reaktion der instabilen Peptidazide zu den stabilen Peptidaktivestern kann die Kupplungsreaktion relativ rasch, innerhalb von einigen Stunden bei Raumtemperatur,

<sup>90</sup> a) V. V. S. Babu, K. Ananda, G.-R. Vasanthakumar, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 4328;

b) M. D. Fletcher, M. M. Campbell, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 763.

<sup>91</sup> a) T. Shioiri, K. Ninomiya, S. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 6203;

b) T. Shiori, S. Yamada, *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, 22, 841.

<sup>92</sup> Genauere Erläuterungen zu Peptidcyclisierungen finden sich in Kapitel 2.5.

<sup>93</sup> a) P. Wang, R. Layfield, M. Landon, R. J. Mayer, R. Ramage, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8711;

b) P. Wang, K. T. Shaw, B. Whigham, R. Ramage, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8719.

durchgeführt werden, ohne die für Azidkupplungen typische Nebenproduktbildung befürchten zu müssen.

### 2.2.3.2 Aktivester-Methode

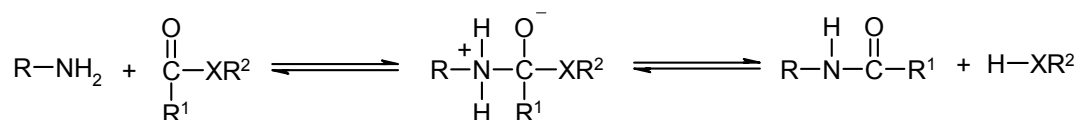
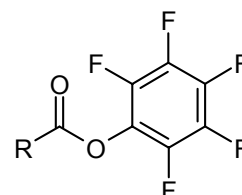


Abb. 2-20: Peptidkupplung nach der Aktivester-Methode.

Die Knüpfung der Peptidbindung durch Esteraminolyse verläuft analog zur Verseifung von Estern nach einem B<sub>Ac</sub>2-Mechanismus (Abbildung 2-20). Der nucleophile Angriff der Aminokomponente wird durch elektronenziehende Substituenten (XR<sup>2</sup>) begünstigt.

Typische Vertreter der Aktivesterklasse sind Thiophenyl-, Cyanomethyl-, 4-Nitrophenyl-, N-Hydroxysuccinimid- und der in dieser Arbeit verwendete Pentafluorphenylester (Abbildung 2-21). Zur Synthese optisch reiner halogensubstituierter Phenylester wird das Komplex-F-Verfahren angewandt.<sup>94</sup> Als Komplex-F wird dabei das Addukt aus einem Carbodiimid (z.B. EDC oder DCC) und dem entsprechenden Pentahalogenphenol bezeichnet.

Die gebräuchlichsten Aktivester in der Peptidchemie bilden die Aryltriazole 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)<sup>95</sup> und HOAt.<sup>96</sup> Diese Reagenzien ermöglichen, bedingt durch intramolekulare anchimere Effekte, hohe Produktausbeuten bei geringer Racemisierungsgefahr.



Der beim Angriff einer Aminokomponente auf einen HOAt-Aktivester gebildete 7-Ring Übergangszustand ist dabei günstiger als der entsprechende 6-Ring Zustand bei Verwendung von HOBt-Aktivestern (Abbildung 2-22).<sup>96,97</sup> Dies erklärt, dass HOAt im Vergleich zu HOBt die effektivere Spezies bezüglich Ausbeute und Racemisierung darstellt. Die Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen spiegelt sich im Falle von HOAt schon

Abb. 2-21: Pentafluorphenylester

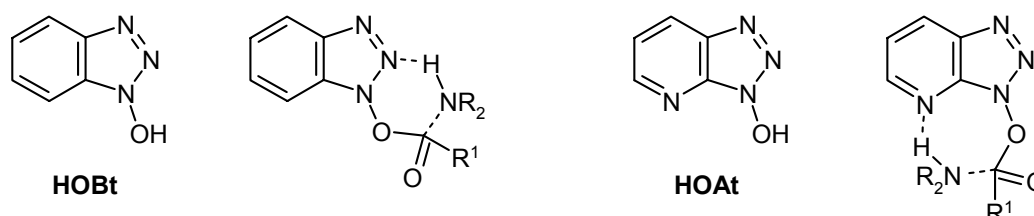
<sup>94</sup> L. Kisfaludy, M. Löw, O. Nyéki, T. Szirtes, I. Schön, *Liebigs Ann. Chem.* **1973**, 1421.

<sup>95</sup> W. König, R. Geiger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1970**, 103, 788.

<sup>96</sup> L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397.

<sup>97</sup> L. A. Carpino, H. Imazumi, B. M. Foxman, M. J. Vela, P. Henklein, A. El-Faham, J. Klose, M. Bienert, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2253.

in der Röntgenstruktur wieder. Die HOAt-Moleküle sind dabei in dimerer Form assoziiert, was auf intermolekulare H-Brücken zwischen den Hydroxylgruppen und den Aza-Stickstoffen zurückzuführen ist.<sup>98</sup> Die höhere Kupplungseffizienz von HOAt wird zudem auch durch den größeren -I-Effekt bedingt, der durch den zusätzlichen Aza-Stickstoff im HOAt hervorgerufen wird.



**Abb. 2-22:** Strukturen von HOBt, HOAt und der durch H-Brücken stabilisierten Übergangszustände beim Angriff einer Aminokomponente auf entsprechende HOBt- bzw. HOAt-Aktivester.

Von großer Bedeutung in der Peptidchemie sind Reagenzien, die eine *in situ*-Bildung von Aktivestern ermöglichen. Auf der Basis von HOBt und HOAt wurden eine Reihe von Uronium-<sup>99</sup>, Phosphonium-<sup>100</sup> und Immoniumreagenzien<sup>101</sup> entwickelt, die diese Möglichkeit bieten.<sup>102</sup> In der vorliegenden Arbeit werden TBTU<sup>103</sup> und HATU<sup>104</sup> als Kupplungskomponenten verwendet (Abbildung 2-23). Aus bereits genannten Gründen liefert das auf HOAt basierende HATU im Vergleich zu TBTU im Allgemeinen bessere Kupplungsergebnisse.<sup>105</sup>

Obwohl diese Reagenzien in der Peptidchemie häufig genutzt werden, blieb die Struktur der Salze lange Zeit unaufgeklärt. Prinzipiell können sie als Guanidinium-N-oxide (N-Form) oder als Uronium-Ionen (O-Form) vorliegen (Abbildung 2-23).

<sup>98</sup> F. Hoffmann, A. Kolbe, C. Griehl, *J. Mol. Struct.* **1999**, 476, 289.

<sup>99</sup> S. Q. Chen, J. C. Xu, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 647.

<sup>100</sup> L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201.

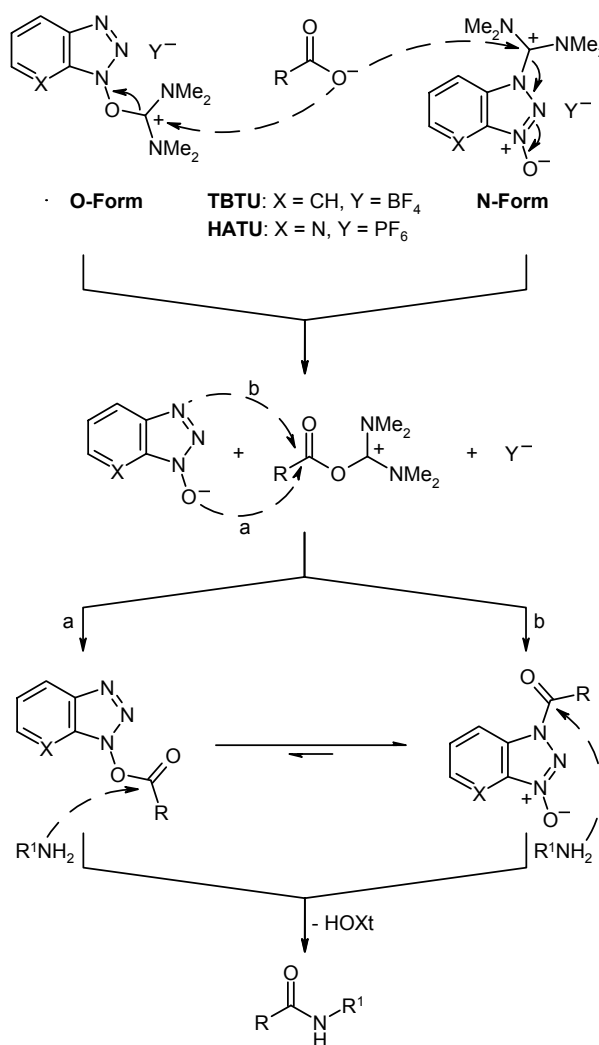
<sup>101</sup> P. Li, J.-C. Xu, *Tetrahedron* **2000**, 56, 4437.

<sup>102</sup> F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9678.

<sup>103</sup> TBTU: O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat

<sup>104</sup> HATU: O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat

<sup>105</sup> L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 3561.



**Abb. 2-23:** Postulierter Mechanismus der Peptidkupplung mittels TBTU bzw. HATU (der notwendige Basenzusatz wird im Mechanismus nicht explizit aufgeführt).

Bisher wurde in Analogie zu bekannten Phosphoniumverbindungen meist die Struktur eines Uroniumsalzes formuliert. Neuere Untersuchungen belegen jedoch, dass sowohl in Lösung als auch im kristallinen Zustand die N-Form stabiler ist.<sup>106</sup> Semiempirische Berechnungen auf PM3-Niveau bestätigen dieses Ergebnis.<sup>106a</sup> Durch geeignete Reaktionsbedingungen ist es allerdings möglich die reaktiveren Uroniumsalze zu isolieren.<sup>107</sup> Aus mechanistischer Sicht sind in jedem Fall beide Strukturen zu

<sup>106</sup> a) P. Li, J.-C. Xu, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 113;

b) L. A. Carpino, P. Henklein, B. M. Foxman, I. Abdelmoty, B. Costisella, V. Wray, T. Domke, A. El-Faham, C. Mügge, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5245.

<sup>107</sup> L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 457.



berücksichtigen. Nach eingehenden DC-, UV/Vis- und IR-Untersuchungen wurde der, in Abbildung 2-23 dargestellte, Reaktionsmechanismus der Peptidkupplung mit HATU bzw. TBTU postuliert.<sup>106a</sup>

Im basischen Milieu greift das Carboxylation der Carboxykomponente das  $\alpha$ -C-Atom des Salzes an. Die daraus resultierende instabile Zwischenstufe bildet mit den freigesetzten Aryltriazolyloxyanionen den eigentlichen Aktivester, wobei vorwiegend der Sauerstoff-Angriff (Abbildung 2-23: Pfad a) und nur geringfügig der Stickstoff-Angriff (Abbildung 2-23: Pfad b) erfolgt. Der dadurch gebildete Aryltriazolylester kann spontan in das stabilere  $N^3$ -Acylisomer umlagern (Abbildung 2-23: Pfad c). Die somit im Gleichgewicht miteinander stehenden aktiven Zwischenstufen werden durch den nucleophilen Angriff einer Aminokomponente in das gewünschte Amid bzw. Peptid überführt.

Als Basen werden in diesen Reaktionen meist sekundäre und tertiäre Amine wie Diisopropylethylamin (DIEA) oder *N*-Methylmorpholin verwendet. Im Vergleich zu diesen Spezies gewährleistet der Einsatz von Collidin einen effektiveren Schutz vor Racemisierungen.<sup>108</sup> Erwähnenswert ist ebenso, dass je nach gewähltem Reagens der äquimolare Zusatz von HOAt bzw. HOBt sowohl die Produktausbeute steigert als auch das Racemisierungsrisiko minimiert.<sup>105,109</sup>

### 2.2.3.3 Carbodiimid- und Carbodiimid-Additiv-Methode

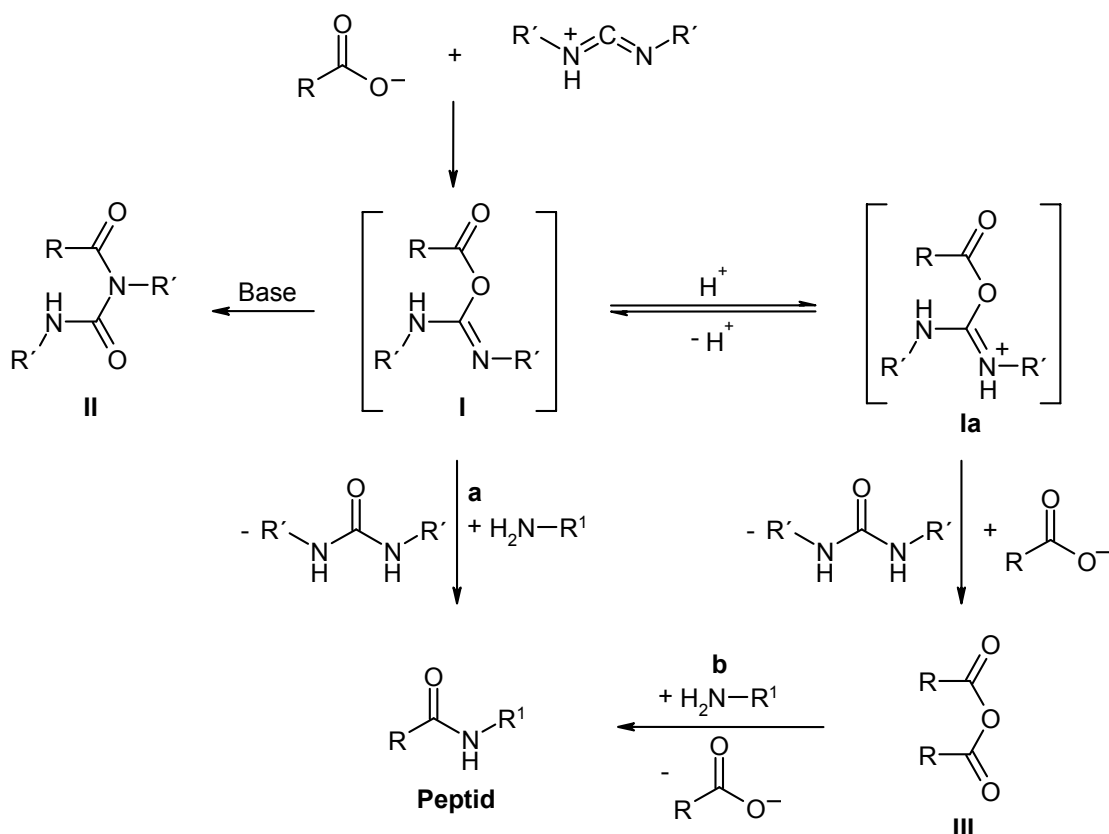
Die Eignung von Carbodiimiden zur Peptidsynthese wurde 1955 erstmals von *J. C. Sheehan* und *G. P. Hess* erkannt.<sup>110</sup> Der Vorteil dieser Reagenzien war, dass das Kupplungsadditiv zur Mischung der Carboxy- und Aminokomponente zugesetzt wurde, was erstmals die Carbonylaktivierung und die nachfolgende Peptidkupplung in einem Syntheseschritt ermöglichte. Das bereits damals genutzte *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) hat sich als Kupplungsreagens besonders bewährt und wird heute noch häufig eingesetzt.

---

<sup>108</sup> L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 695.

<sup>109</sup> L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2460.

<sup>110</sup> J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067.



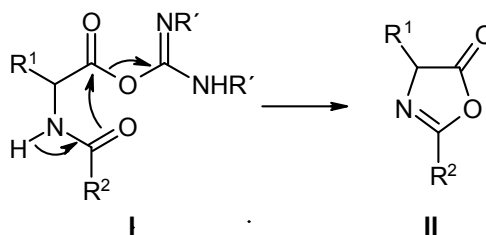
**Abb. 2-24:** Mechanismus der Peptidsynthese nach der Carbodiimid-Methode.

Aus mechanistischer Sicht addiert das Anion der Carboxykomponente an das protonierte Carbodiimid unter Ausbildung des hochreaktiven *O*-Acyllactims (Abbildung 2-24: **I**).<sup>111</sup> Dieses reagiert entweder mit dem Aminonucleophil zum geschützten Peptid (Abbildung 2-24: Pfad a), oder, über die im Gleichgewicht vorhandene Lactimform (Abbildung 2-24: **Ia**), mit einem weiteren Äquivalent Acylaminosäure zum symmetrischen Anhydrid (Abbildung 2-24: **III**). Das Anhydrid bildet mit der Aminokomponente das Peptidderivat, unter Freisetzung eines Äquivalents Acylaminosäure, (Abbildung 2-24: Pfad b). Eine unerwünschte Nebenreaktion ist die Umlagerung der Spezies **I** in ein nicht mehr aminolytisch spaltbares Acylharnstoffderivat (Abbildung 2-24: **II**). Diese *O*→*N*-Acylwanderung wird einerseits durch überschüssige Base katalysiert, andererseits genügt oft schon die Anwesenheit polarer Lösungsmittel sowie die Basizität der Aminokomponente bzw. des eingesetzten Carbodiimids.

<sup>111</sup> Zur Erläuterung des Mechanismus siehe:

- a) H. G. Khorana, *Can. J. Chem.* **1954**, 32, 227;
- b) G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 602;
- c) L. A. Carpino, A. El-Faham, *Tetrahedron* **1999**, 55, 6813.

Ein weiteres, in Abbildung 2-24 nicht aufgeführtes Nebenprodukt ist das 5(4H)-Oxazolon (Abbildung 2-25: **II**), das sich aus dem *O*-Acyllactim (Abbildung 2-25: **I**) unter Freisetzung eines dem Carbodiimid entsprechenden Harnstoffderivats bildet. Dies ist die Ursache für das permanente Racemisierungsrisiko beim Carbodiimid-Verfahren.<sup>112</sup>



**Abb. 2-25:** 5(4H)-Oxazolon-Bildung bei Carbodiimid Kupplungen.

Da die Abtrennung des, bei Reaktionen mit DCC entstehenden, *N,N'*-Dicyclohexylharnstoffs oft problematisch ist, wurde mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) ein wasserlösliches Carbodiimid entwickelt. Dadurch wird die mühelose Abtrennung der Beiprodukte ermöglicht.

Durch den Einsatz von geeigneten Additiven wurde systematisch versucht, eine Verminderung der Nebenreaktionen sowie der Racemisierung zu erreichen. Beim Carbodiimid-Additiv-Verfahren werden demnach neben der Aminokomponente zusätzliche reaktivere Nucleophile, wie *p*-Dimethylaminopyridin (DMAP),<sup>113</sup> HOBt oder HOAt zugesetzt. Diese Reagenzien reagieren sehr schnell mit dem *O*-Acyllactim zum entsprechenden *N*-Acylpyridiniumion bzw. Aktivester, die in Anwesenheit der Aminokomponente unmittelbar zum Peptidderivat umgesetzt werden.<sup>111c</sup>

<sup>112</sup> Näheres zu Racemisierungen findet sich im nachfolgenden Kapitel 2.2.4.

<sup>113</sup> B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556.

## 2.2.4 Racemisierungsmechanismen<sup>114</sup>

Wie bereits mehrfach erwähnt besteht bei allen Reaktionen an funktionellen Gruppen, die mit dem Chiralitätszentrum einer  $\alpha$ -Aminosäure oder eines Peptids verknüpft sind, ein ständiges Racemisierungsrisiko.<sup>115</sup> Freie Aminosäuren und großteils auch C-terminal geschützte Aminosäuren mit ungeschützter oder positiv geladener Aminofunktion weisen eine relativ stabile Konfiguration auf. Bei *N*-Acylaminosäuren ist das Racemisierungsrisiko allerdings deutlich erhöht.

Im Zuge des *Enolisierungsmechanismus* erfolgt die Racemisierung basenkatalysiert durch reversible Abspaltung eines Protons vom  $\alpha$ -C-Atom, wobei die Reprotonierung des intermediär gebildeten Carbanions von beiden Seiten möglich ist. Die Racemisierungsgeschwindigkeit hängt vom elektronenziehenden Effekt der Substituenten am  $\alpha$ -C-Atom sowie vom Lösungsmittel ab.

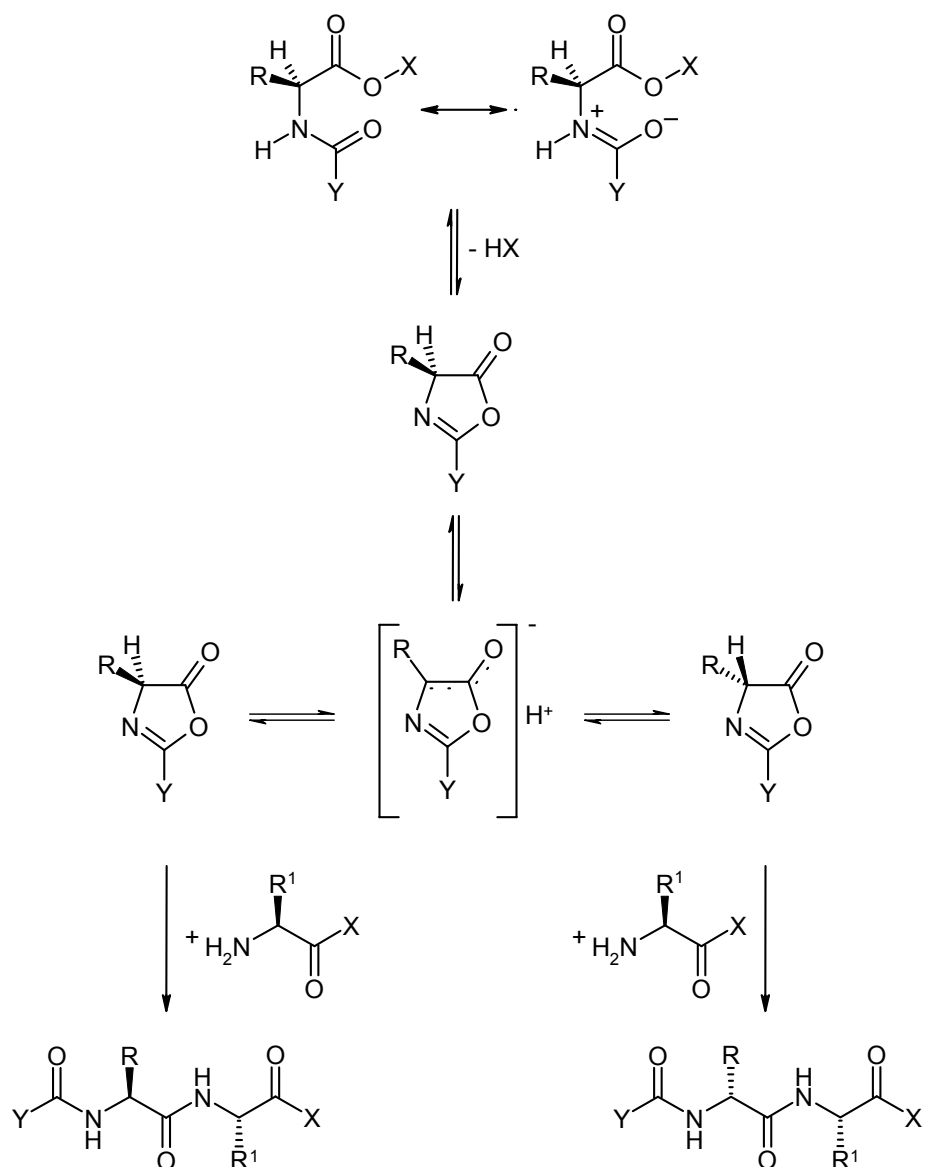
Die unter Kupplungsbedingungen auftretenden Racemisierungen werden hauptsächlich durch den *Oxazolone- (bzw. Azlactone-) Mechanismus* hervorgerufen. Aktivierte Acylaminosäuren und Peptide zyklisieren dabei zu optisch labilen 5(4H)-Oxazolonen (Abbildung 2-26).

Da durch einen mesomeren Valenzausgleich innerhalb der Carbonamidgruppierung die Nucleophilie des Carbonyl-O-Atoms verstärkt wird, begünstigen *N*-Acylreste wie Acetyl- oder Benzoylgruppen die Azlactonbildung. Aminoschutzgruppen vom Urethantyp (z.B. Boc, Fmoc) bieten hingegen einen hohen Racemisierungsschutz. Das in diesem Fall gebildete Azlacton ist konfigurationsstabil und reagiert schnell mit der Aminokomponente ab. Aus diesem Grund werden Peptide meist ausgehend von der C-terminalen Aminosäure aufgebaut. Die Aktivierung der Carboxylfunktion erfolgt dann an der neu einzuführenden Aminosäure, die aufgrund einer Urethanschutzgruppe weitgehend von Racemisierungen verschont bleibt. Bei Kettenverlängerungen vom N-terminalen Ende wäre hingegen eine racemisierungsgefährdete Aktivierung der Carboxylfunktion des zu verlängernden Oligopeptids notwendig.

---

<sup>114</sup> D. S. Kemp in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1*, Hrsg.: E. Gross, J. Meienhofer, Academic Press, New York, **1975**.

<sup>115</sup> Im Gegensatz zur exakten Definition wird der Begriff Racemisierung in der Peptidchemie auch für partielle Epimerisierungen an einem von mehreren Chiralitätszentren benutzt.



**Abb. 2-26:** Oxazolone-Racemisierungsmechanismus (X: Aminoschutzgruppe, Y: Carboxylschutzgruppe).

Der Grad der Racemisierung ist des weiteren vom Lösungsmittel und einer eventuell zugesetzten Base abhängig. So können apolare Solventien und sterisch gehinderte Basen das Racemisierungsrisiko verringern.

Ebenso spielt die Art der Aktivierungsgruppe eine wichtige Rolle. Wie bereits erwähnt bietet der Einsatz von HOBt- und in noch höherem Maße von HOAt-Aktivestern einen hohen Racemisierungsschutz. Der Nachbargruppeneffekt dieser Ester beim nucleophilen Angriff der Aminokomponente (siehe Kapitel 2.2.3.2, Abbildung 2-22) ermöglicht eine effektive Diskriminierung zwischen der Racemisierung durch Oxazolonebildung und der Aminolyse.

Der Zusatz von HOBt, oder besser HOAt, zur Kupplungsmischung verringert oft auch den Epimerisierungsgrad. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass diese Aryltriazole als schwache Säuren wirken und somit eine Deprotonierung der aktivierten Spezies am  $\alpha$ -C-Atom erschweren. Andererseits sind diese Reagenzien aber nicht acide genug um die Aminokomponente zu protonieren und dadurch den nucleophilen Angriff zu blockieren.

### 2.2.5 Darstellung chromophorsubstituierter Tri- und Tetrapeptide

Nach den vorangehend erläuterten Prinzipien der Peptidsynthese soll im Folgenden die Darstellung linearer Peptide aufgezeigt werden, die neben Glycin als monomeren Bausteinen auch artifizielle Pyren- (*D*-Pya) bzw. Phenothiazin- (*D*-Pta) substituierte Alanine beinhalten.<sup>116</sup>

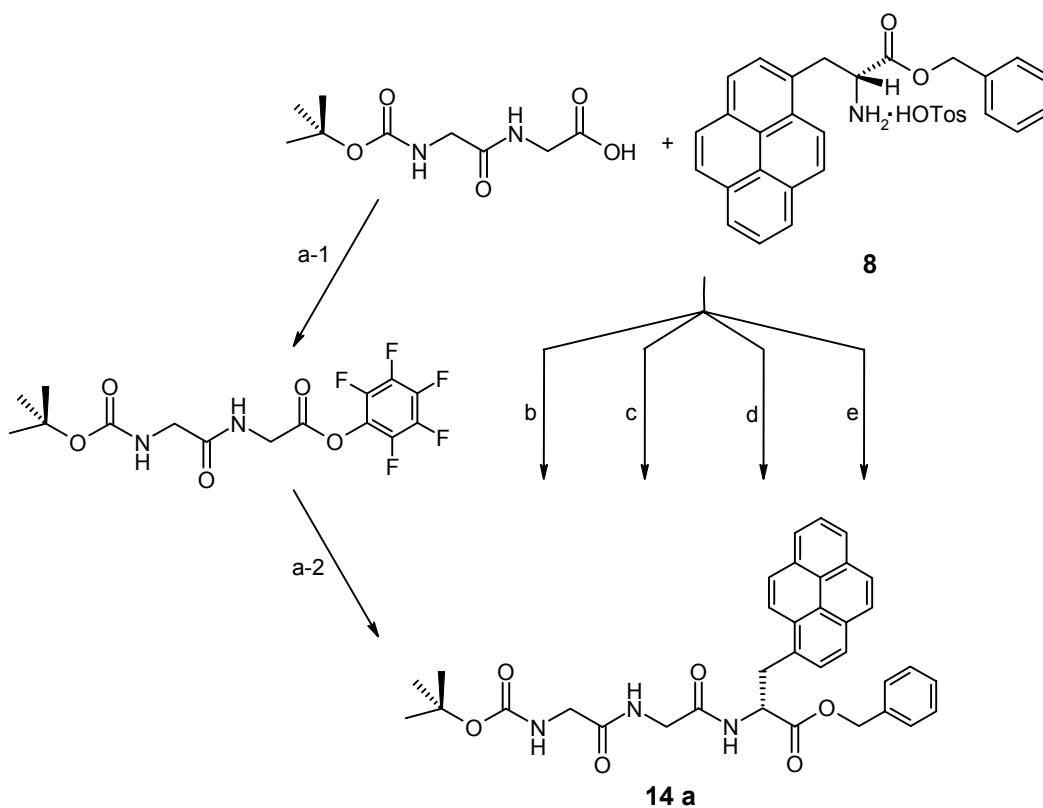
Die Synthese beginnt mit der Kupplung der geschützten chromophorsubstituierten Aminosäuren **8**, **9** oder **12** mit käuflich erworbenen, entsprechend invers geschützten, Di- oder Triglycinen. In der vorgestellten Peptidsynthese in Lösung kommen dabei die Boc-Gruppe als Aminoschutzgruppe sowie der Benzylester als Carboxylschutzgruppe zum Einsatz. Diese Schutzgruppen sind, wie bereits erwähnt, selektiv und unabhängig voneinander abspaltbar.

Anhand der Synthese des Tripeptids **14a** werden verschiedene Methoden zur Verknüpfung der Aminosäure (**8**) und des Peptidbausteins (Boc-Gly-Gly-OH) getestet. Neben der Carbodiimid-Methode mit verschiedenen Additiven wird der Einsatz eines Diglycin-Pentafluorphenolesters sowie das DPPA-Azid-Verfahren untersucht (Abbildung 2-27).

Beim Vergleich der verschiedenen Methoden zeigt sich, dass die Reaktion von Boc-Gly-Gly-OC<sub>6</sub>F<sub>5</sub> mit dem Aminosäurederivat **8** und 1-Diethylamino-2-propanol (DAP) als Base innerhalb von 2.5 h und 84 % Ausbeute ein schnelles und effizientes Verfahren zur Peptidkupplung darstellt (Abbildung 2-27: Pfad a-2). Nachteilig ist allerdings die separate Darstellung und Isolierung des Pentafluoraktivesters mittels EDC und Pentafluorphenol (Abbildung 2-27: Pfad a-1).

---

<sup>116</sup> Näheres zu den artifiziellen Aminosäuren findet sich in Kapitel 2.1.4.



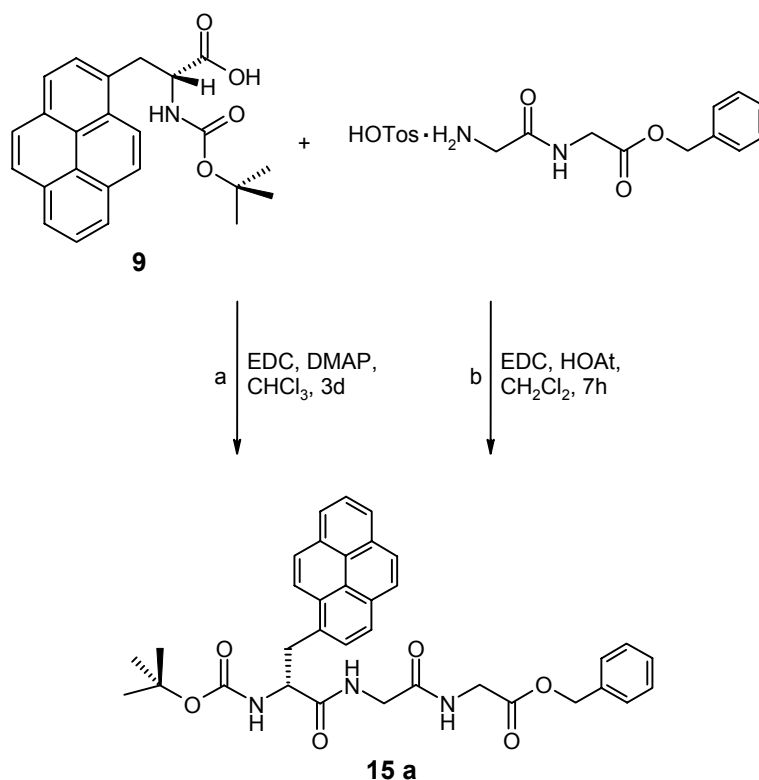
**Abb. 2-27:** Synthese des Tripeptids **14a** nach verschiedenen Synthesemethoden. a-1: EDC, C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>-OH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C; a-2: **8**, DAP, 1,4-Dioxan, RT; b: DPPA, NaHCO<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, RT; c: EDC, DMAP, CHCl<sub>3</sub>, RT; d: EDC, HOBT, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT; e: EDC, HOAt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT.

Die DPPA-Kupplung von Boc-Gly-Gly-OH und **8** benötigt eine wesentlich längere Reaktionszeit (12 h) und liefert mit 69 % eine geringere Produktausbeute (Abbildung 2-27: Pfad b). Mit EDC und DMAP kann das Tripeptid **14a** in 80 % Ausbeute erhalten werden, wobei die Reaktionszeit 3 d beträgt (Abbildung 2-27: Pfad c). EDC und HOBT ergeben 78 % Ausbeute bei einer Reaktionsdauer von 11 h (Abbildung 2-27: Pfad d). Das effektivste Verfahren stellt die Peptidkupplung mit EDC und HOAt dar (Abbildung 2-27: Pfad e). Hierbei gelingt die Darstellung des Produktes **14a** innerhalb von 7 h mit einer Ausbeute von 88 % (beiger Feststoff).

Eventuell auftretende Racemisierungen sollen bei den vorangehend beschriebenen Reaktionen mittels <sup>1</sup>H-NMR-Messungen unter Zusatz von optisch aktiven Shift-Reagenzien detektiert werden.<sup>117</sup> Nach Zusatz von (*R*)-(-)-1-(9-Anthryl)-2,2,2-trifluorethanol zur Messlösung von **14a** ergeben sich Hochfeldverschiebungen der Signale im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum. Das Singulett der Benzylester-CH<sub>2</sub>-gruppe wird beispielsweise von 5.07 ppm nach 4.93 ppm verschoben. Aufspaltungen der Signale,

<sup>117</sup> Durchführung analog der ee-Wertbestimmungen in Kapitel 2.1.4

die auf die Coexistenz zweier Peptidisomere hindeuten würden, ergeben sich jedoch nicht. Dieser Befund lässt zwei Interpretationsmöglichkeiten zu. Einerseits würde die Gegenwart nur eines Peptidisomers dieses Verhalten erklären. Andererseits ist auch eine verhinderte Assoziatbildung zwischen dem optisch aktiven Anthrylalkohol und Verbindung **14a** möglich.<sup>118</sup> Da in den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der nachfolgend besprochenen Spezies **15a** durchaus Signalaufspaltungen nach Shift-Reagens-Zusatz beobachtet werden, ist bei der Bildung des Peptids **14a** jedoch eher von hohen Enantiomerenüberschüssen (ee > 98%) auszugehen. Aufgrund des Einsatzes der Aminosäurespezies **8** in der geladenen racemisierungsstabilen Ammoniumform ist dieses Verhalten erklärbar.



**Abb. 2-28:** Synthese des Tripeptids **15a** mit EDC/DMAP (Pfad a) bzw. EDC/HOAt (Pfad b).

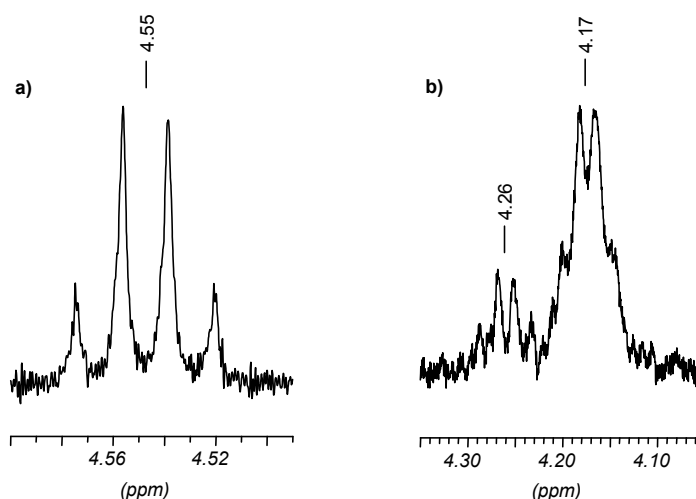
Die beiden Kupplungsmethoden, die bei der Synthese der Verbindung **14a** die höchsten Produktausbeute liefern (EDC/DMAP und EDC/HOAt), werden bei der Darstellung des Tripeptids **15a** nochmals verglichen (Abbildung 2-28).

Mit 91 % Produktausbeute (beiger Feststoff) bei einer Reaktionszeit von nur 7 h erweist sich das EDC/HOAt-Verfahren gegenüber der EDC/DMAP-Methode mit 82 %

<sup>118</sup> Kontrollexperimente mit dem entsprechenden L-Enantiomer konnten nicht durchgeführt werden.



Mit 91 % Produktausbeute (beiger Feststoff) bei einer Reaktionszeit von nur 7 h erweist sich das EDC/HOAt-Verfahren gegenüber der EDC/DMAP-Methode mit 82 % Ausbeute nach 3 d erneut als effizienter. Bei der Verwendung von EDC/DMAP hat die lange Reaktionszeit zudem einen wesentlich höheren Racemisierungsgrad zur Folge.



**Abb. 2-29:**  $^1\text{H}$ -NMR-Signal der  $\text{C}^*\text{H}$ -Gruppe a) der Verbindung **15a** vor Zusatz des Shift-Reagenzes, b) der Verbindung **15a** nach Zusatz des Shift-Reagenzes,

Nach Zusatz von (*R*)-(-)-1-(9-Anthryl)-2,2,2-trifluorethanol zur Messlösung von **15a** erfolgt im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum eine Signalaufspaltung und Hochfeldverschiebung für das Signal des Protons am chiralen Kohlenstoff (Abbildung 2-29).

Verbindung	Kupplungsmethode	Reaktionszeit	Ausbeute	ee-Wert
<b>14a</b>	Pentafluorphenolester	2.5 h	84 %	
	DPPA	12 h	69 %	
	EDC/DMAP	3 d	80 %	> 98 %
	EDC/HOBt	11 h	78 %	
	EDC/HOAt	7 h	88 %	
<b>15a</b>	EDC/DMAP	3 d	82 %	80 %
	EDC/HOAt	7 h	91 %	95 %

**Tab. 2-3:** Vergleich verschiedener Kupplungsmethoden bei der Synthese der Tripeptide **14a** und **15a**.

Nach Integralvergleich ergibt sich bei Verwendung von EDC/DMAP ein Enantiomerenüberschuß von 80 % (Abbildung 2-29), während EDC/HOAt einen ee-Wert von ca. 95 % liefert.

Die Ergebnisse hinsichtlich Reaktionszeit, Ausbeute und Racemisierung bei der Synthese der Tripeptide **14a** und **15a** sind in Tabelle 2-3 zusammengefasst.

Da sich das EDC/HOAt-Verfahren als beste Peptidkupplungsmethode erweist, erfolgen alle nachfolgend beschriebenen Peptidsynthesen auf diesem Wege.

Durch Reaktion von H-*D*-Pta-OBzl (**12**) mit Boc-Gly-Gly-OH wird somit auch das Tripeptid **16a**<sup>119</sup> in 60 % Ausbeute als oranger Feststoff synthetisiert. Das Tetrapeptid **17a** erhält man durch Kupplung von Boc-Gly-Gly-Gly-OH mit dem Alaninderivat H-*D*-Pya-OBzl (**8**) in 93 % Ausbeute als beigen Feststoff.

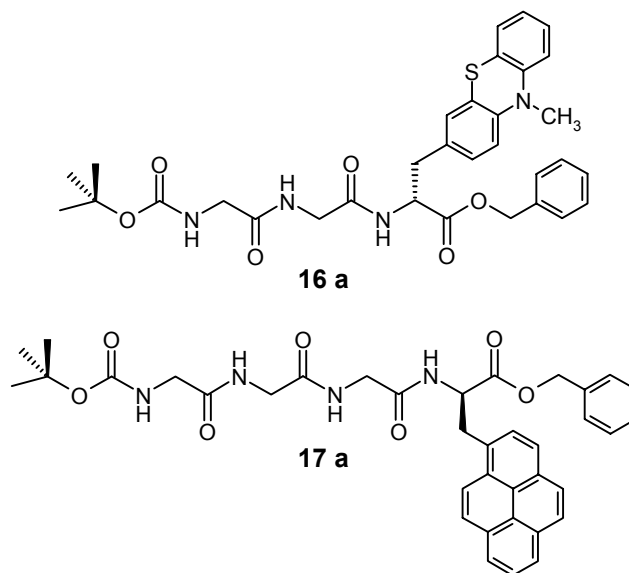


Abb. 2-30: Tripeptid **16a** und Tetrapeptid **17a**.

## 2.2.6 Darstellung chromophorsubstituierter Penta-, Hexa- und Octapeptide

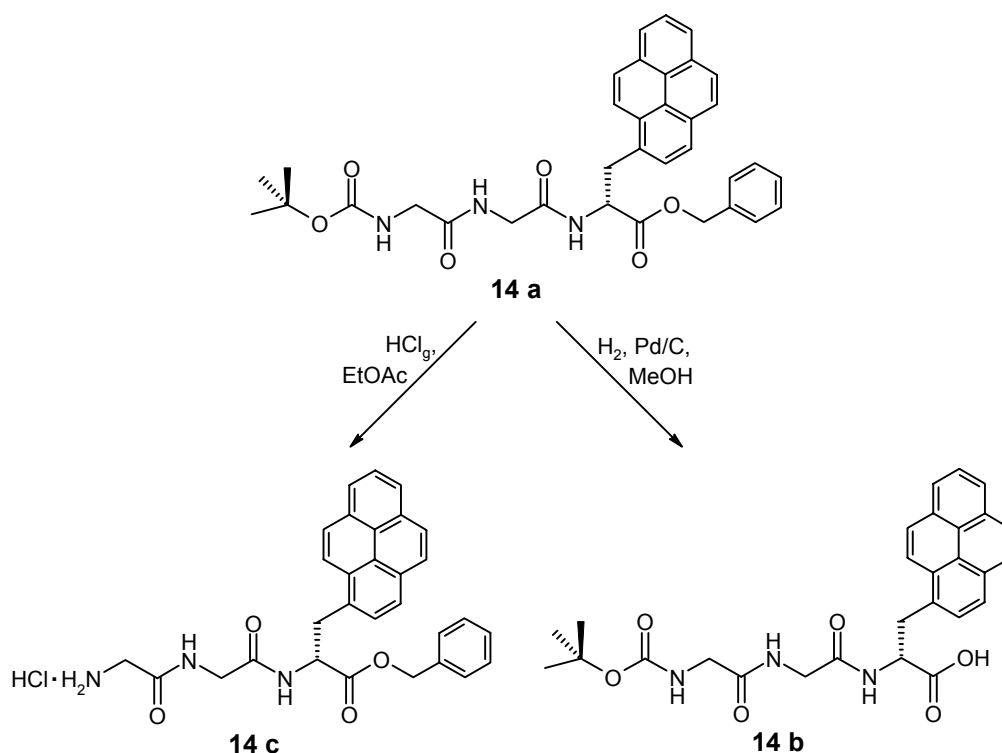
Die in diesem Kapitel vorgestellten einfach bzw. zweifach chromophorfunktionalisierten Penta-, Hexa- und Octapeptide stellen die linearen Ausgangsstufen für die später beschriebenen cyclischen Peptide dar (siehe Kapitel 2.5.2). Zudem dienen sie als Vergleichsverbindungen für, von *M. Komma*<sup>73a</sup> dargestellte, chromogenmodifizierte Dipeptide. Ziel ist es dabei, die Einflüsse der Peptidkettenlänge und -konfiguration auf optische bzw. optoelektrochemische Eigenschaften zu untersuchen.

Zur Synthese der längerkettigen linearen Peptide werden die, im vorangehend besprochenen Kapitel, dargestellten Tri- und Tetrapeptide kombiniert oder um eine weitere farbstofffunktionalisierte Aminosäureeinheit erweitert. Dazu ist allerdings zuerst

<sup>119</sup> Diese Verbindung wurde in Zusammenarbeit mit R. Hörger synthetisiert:  
R. Hörger, *Zulassungsarbeit*, Universität Regensburg, 2001.

die selektive Abspaltung der Amino- bzw. Carboxylschutzgruppe des entsprechenden Peptids notwendig. Die Abtrennung sowohl der Boc-Gruppe als auch des Benzylesters erfolgt nach Standardmethoden,<sup>82</sup> was am Beispiel der Peptide **14b** und **14c** in Abbildung 2-31 aufgezeigt ist.

Das Entschützen der Aminofunktion gelingt durch Aufnahme des Peptids **14a** in HCl-gesättigtem Ethylacetat bei RT in 92 % Ausbeute.<sup>120</sup> Durch katalytische Hydrogenolyse mittels Palladium auf Aktivkohle bei 1 bar Wasserstoffdruck in Methanol wird der Benzylester verseift, was die Verbindung **14b** in 89 % Ausbeute liefert.<sup>121</sup>



**Abb. 2-31:** Darstellung der einseitig entschützten Tripeptide **14b** und **14c**.

Die entschützten Peptide können nun mit EDC/HOAt zu den längerkettigen Zielmolekülen gekuppelt werden. Auf diese Art und Weise werden alle in Abbildung 2-32 dargestellten Spezies hergestellt. Die detaillierten Synthesevorschriften finden sich im *Experimentellen Teil* dieser Arbeit.

Bei der Analyse der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Peptide aus Abbildung 2-32 zeigt sich, dass einige Signale doppelt auftreten, wobei zwischen beiden Signalen ein meist deutlicher

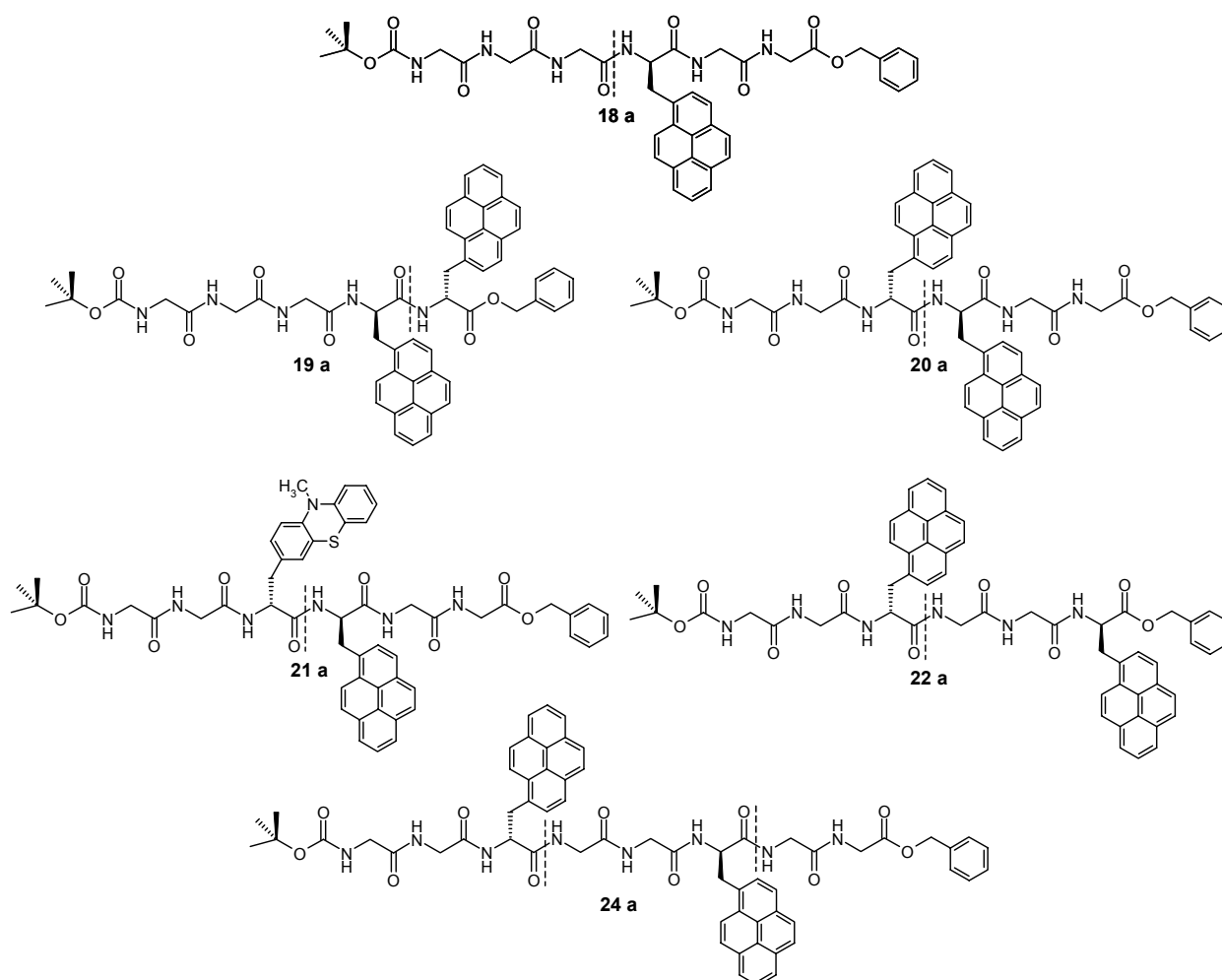
<sup>120</sup> L. Tomasic, G. P. Lorenzi, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1012.

<sup>121</sup> a) S. Gangwar, G. Pauletti, T. Siahaan, V. Stella, R. Borchardt, *J. Org. Chem.* **1997**, 5, 1356;

b) H. Nogusa, T. Yano, S. Okuno, H. Hamana, K. Inoue, *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, 1931.

Integrationsunterschied besteht. Vor allem die Signale der Boc-Protonen, sowie einige NH-, CH<sub>2</sub>-Ph- und Pyrenyl-H-Signale sind davon betroffen.

Diese Beobachtung lässt zwei Interpretationen zu. Zum einen besteht die Möglichkeit der cis/trans-Isomerie um eine Amidbindung im Molekül. Die Peptidbindungen besitzen einen hohen Doppelbindungscharakter, wodurch die Rotation um diese Bindungen gehindert sein kann. Dies wird aufgrund verschieden starker Abschirmung der Protonen im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum detektiert. Durch Messungen bei höherer Temperatur kann diese Rotationsbarriere im Allgemeinen allerdings überwunden werden, was sich durch eine Koaleszenz der Signale bei diesen Temperaturen widerspiegelt.<sup>72a</sup>



**Abb. 2-32:** Strukturformeln der Peptide **18a**, **19a**, **20a**, **21a**,<sup>119</sup> **22a**<sup>119</sup> und **24a**<sup>119</sup> (die gestrichelten Linien geben die retrosynthetischen Kupplungsstellen an).

Zum anderen besitzen die Peptide **19a**, **20a**, **21a**, **22a** und **24a** je zwei Chiralitätszentren, so dass jeweils zwei zueinander diastereomere Enantiomerenpaare

vorliegen können. Protonen von diastereomeren Verbindungen weisen häufig unterschiedliche Signallagen in  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren auf.<sup>72a</sup>

Die Entscheidung, ob es sich im Einzelfall um die Coexistenz von Rotationsisomeren, Diastereomeren oder beidem handelt, ist ohne zusätzliche Experimente nicht möglich. Eine genaue Untersuchung wird exemplarisch für das Hairpinpeptid **31** durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.2), wodurch Rückschlüsse auf die anderen Peptide möglich sind. Es sei vorweggenommen, dass die Aufspaltung der Boc-Singulets auf Rotationsisomere hindeutet, wohingegen die Separation der Pyrenyl-H-Signale eher für Diastereomere spricht. Für die NH- und CH<sub>2</sub>-Signale ist keine einheitliche Aussage möglich.<sup>122</sup>

## 2.3 Festphasen-Peptidsynthese<sup>123</sup>

### 2.3.1 Einführung

Die bisher beschriebene Peptidsynthese in Lösung ist verbunden mit einem hohen Arbeits- und Zeitaufwand. Gerade in der heutigen Zeit, in der beispielsweise durch das „*Human Genome Project*“ eine große Zahl neuer Proteinsequenzen Interesse erwecken,<sup>124</sup> ist die schnelle und effiziente Synthese von Peptiden und Proteinen allerdings unerlässlich.<sup>125</sup>

Eine erhebliche Erleichterung ergibt sich in diesem Zusammenhang mit der 1963 von R. B. Merrifield entwickelten Peptid-Festphasensynthese an polymeren Trägern.<sup>126</sup> Der Grundgedanke dieser Synthesestrategie besteht darin, eine Aminosäure mit ihrer Carboxylgruppe an ein unlösliches, filtrierbares Polymer zu knüpfen, und dann vom C-Terminus her die Peptidkette schrittweise aufzubauen.

Auf die einzelnen Schritte der, in Abbildung 2-33 prinzipiell dargestellten, Festphasen-Peptidsynthese soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

Die Festphasensynthese startet mit der Substitution des Kunstharzes durch eine geeignete Ankergruppierung (Abbildung 2-33: Schritt a). Als polymerer Träger hat sich

---

<sup>122</sup> Die detaillierte Auswertung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren findet sich im *Experimentellen Teil* dieser Arbeit.

<sup>123</sup> a) P. Seneci, *Solid-phase synthesis and combinatorial technologies*, Wiley-Interscience, New York, **2000**;

b) G. B. Fields, *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 1;

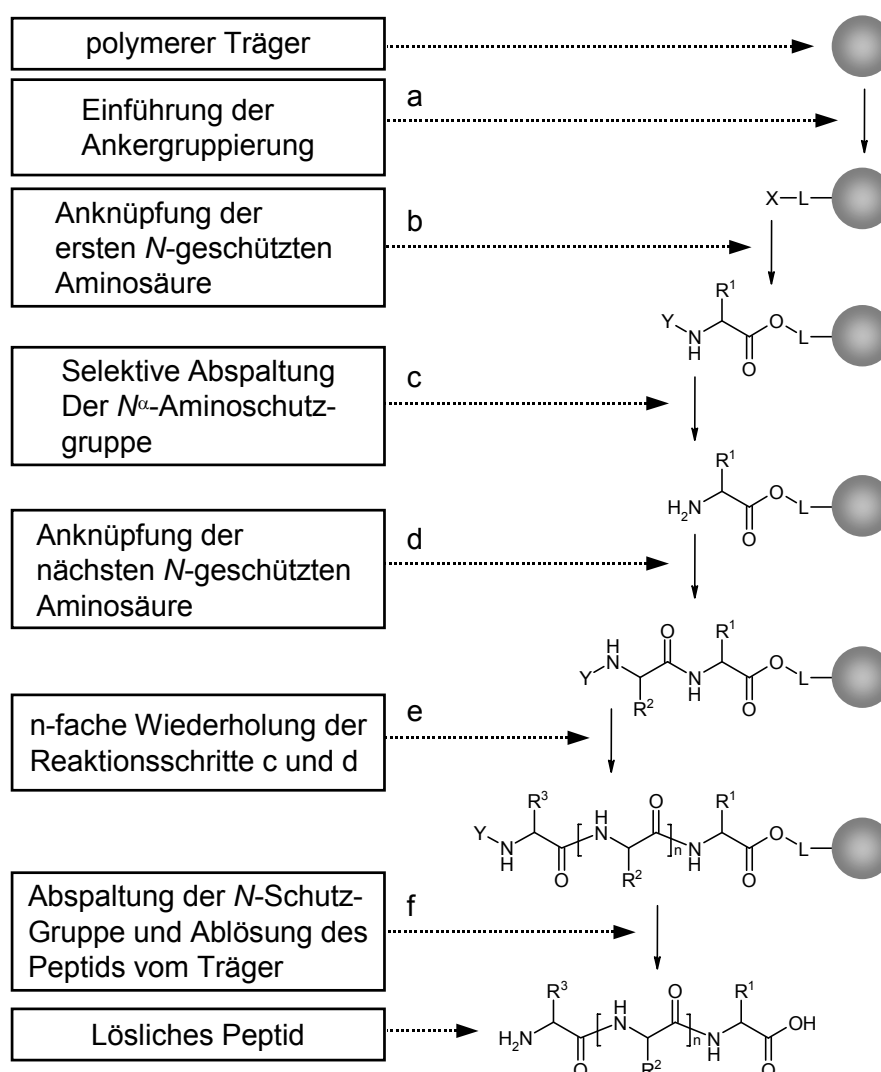
c) C. Blackburn, *Biopolymers* **1998**, 47, 311.

<sup>124</sup> Näheres zum „*Human Genome Project*“ ist in der *Einleitung* (Kapitel 1.1) dieser Arbeit zu finden.

<sup>125</sup> L. P. Miranda, F. P. Alewood, *Biopolymers* **2000**, 55, 217.

<sup>126</sup> R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.

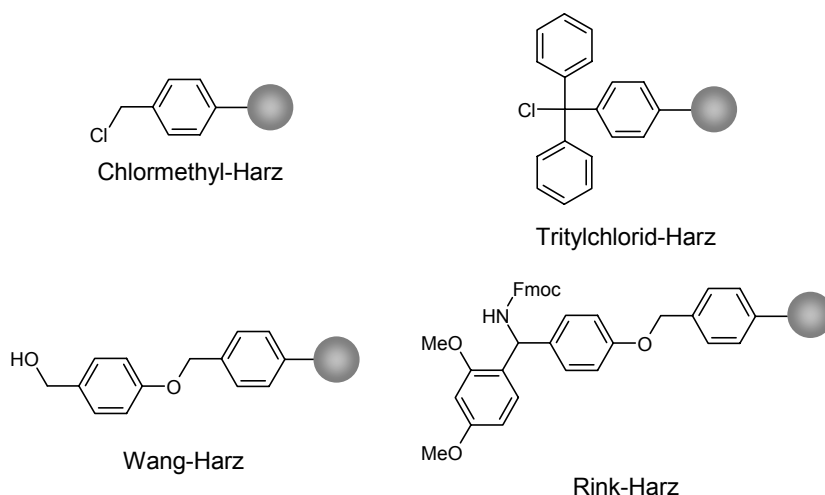
ein Copolymerisat aus Polystyrol (PS) und 1-2 % Divinylbenzol (DVB) als besonders günstig erwiesen. Die durch Perlpolymerisation erhaltenen Harzkügelchen haben im trockenen Zustand im Allgemeinen einen Durchmesser von 20-80  $\mu\text{m}$ . In den für die Peptidsynthese verwendeten Lösungsmitteln wie  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , DMF oder *N*-Methylpyrrolidon (NMP) quellen die Kügelchen, je nach Vernetzungsgrad, bis zum Sechsfachen ihres ursprünglichen Volumens auf. Somit verlaufen die Reaktionen nicht an einer statischen Trägermatrix, sondern innerhalb eines gut solvatisierten Gels, das bewegliche, für die Reagenzien zugängliche Ketten enthält.



**Abb. 2-33:** Schematischer Verlauf der Peptid-Festphasensynthese nach *Merrifield* (L = Linker bzw. Anker, X = Linker-Abgangsgruppe, Y =  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe).

Die Einführung der Anker- oder Linkergruppierung bildet die Voraussetzung für die Anknüpfung der Startamino­säure. Mehr als 50 verschiedene Linker sind derzeit bekannt. Die Chlormethylgruppe, die durch Chlormethylierung des Polystyrol/DVB-

Harzes eingeführt werden kann, stellt den klassischen Vertreter dar. Andere ausgewählte Ankergruppen mit großer praktischer Bedeutung liefern Wang-,<sup>127</sup> Rink-<sup>128</sup> oder Tritylharze<sup>129</sup> (Abbildung 2-34). Die funktionalisierten Polymere sind kommerziell erhältlich, was die eigenhändige Einführung der Linker erübrigt.



**Abb. 2-34:** Ausgewählte Ankergruppierungen an Polystyrol-Trägern.

Die Anknüpfung der ersten Aminosäure erfolgt über Ester-, Amid- und Hydrazidbindungen, wobei Esterverknüpfungen bevorzugte Anwendung finden (Abbildung 2-33: Schritt b). Das auf diesem Weg mit der ersten Aminosäure beladene Harz wird nun in ein Reaktionsgefäß überführt, worin alle nachfolgenden, sich wiederholenden Reaktionsschritte bis zur Beendigung der Synthese des gewünschten Peptids ablaufen. Das klassische Behältnis ist ein Glasreaktor mit Fritte, Absaugvorrichtung und Tubus. Dies erlaubt sowohl eine manuelle Handhabung als auch eine automatisierte Prozessführung im Synthesizer.

Die selektive Abspaltung der  $N^\alpha$ -Aminoschutzgruppe leitet den sich wiederholenden Deblockierungs/Kupplungs-Cyclus ein (Abbildung 2-33: Schritt c). Die Auswahl einer geeigneten  $N^\alpha$ -Aminoschutzgruppe ist sowohl von der Stabilität der Ankerbindung als

<sup>127</sup> a) P. A. Tempest, R. W. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7607;

b) S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328.

<sup>128</sup> a) M. A. Marx, A.-L. Grillot, C. T. Louer, K. A. Beaver, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6153;

b) H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787.

<sup>129</sup> Tritylharze werden in dieser Arbeit verwendet und im nachfolgenden Kapitel näher beschrieben.

auch von eventuell vorhandenen Schutzgruppen für Aminosäuren mit Drittfunktion<sup>130</sup> abhängig. Bevorzugte Schutzgruppen der  $\alpha$ -Amino-Funktion sind die acidolytisch abspaltbare Boc-Gruppe<sup>131</sup> und die, mittels verdünnter Piperidinlösungen entfernbare, Fmoc-Gruppe.<sup>132</sup>

Für die Kupplungsreaktion (Abbildung 2-33: Schritt d) bei Festphasen-Peptidsynthesen ist ein vollständiger Umsatz die Grundvoraussetzung für einheitliche Endprodukte. Daher wird das Kupplungsreagens im Überschuss zugesetzt. Als Kupplungsstrategien kommen meist die bereits ausführlich besprochenen Carbodiimid- und Aktivestermethoden (siehe Kapitel 2.2.3) zum Einsatz.<sup>133</sup> Die Reaktionskontrolle des Kupplungsvorganges kann durch positive Farbreaktionen an einem Aliquot des Peptidharzes erfolgen. Der Kaiser-Test (Ninhydrin-Test)<sup>134</sup> zeigt beispielsweise die Anwesenheit nicht umgesetzter  $N^\alpha$ -Aminogruppen an. Beim Einsatz von Fmoc-Aminosäurederivaten lässt sich durch Verfolgen der Absorptionsabnahme bei 300 nm der Kupplungsgrad und durch Absorptionszunahme bei 300 nm die Fmoc-Abspaltung mit Piperidin quantifizieren. Hat sich trotz mehrfacher Wiederholung der Kupplungsreaktion kein quantitativer Umsatz ergeben, bietet sich ein capping-Schritt an. Durch Acylierung, vorrangig Acetylierung mit Essigsäureanhydrid oder *N*-Acetylimidazol, wird eine Nebenproduktbildung auf späteren Kupplungsstufen verhindert. Dies gewährleistet auch eine leichte Abtrennung der modifizierten Rumpfsequenz bei der Endproduktreinigung.

Die Abspaltung des synthetisierten Peptids vom Polymerharz bildet den letzten Schritt der Festphasensynthese (Abbildung 2-33: Schritt d). Die Abtrennung von der Harzmatrix gelingt mittels Reagenzien, die in Abhängigkeit von der gewählten Schutzgruppentaktik die Ankerbindung zwischen C-terminaler Aminosäure und Träger selektiv spalten.

Die Reinigung und analytische Kontrolle des erhaltenen Peptids gelingt meist durch RP-HPLC bzw. RP-HPLC-MS-Kopplungen.

---

<sup>130</sup> In derartigen Fällen sind orthogonale Schutzgruppentaktiken notwendig, die hier nicht besprochen werden sollen. Einen Überblick liefert:

F. Albericio, *Biopolymers* **2000**, 55, 123.

<sup>131</sup> P. Alewood, D. Alewood, L. Miranda, S. Love, W. Meutermans, D. Wilson, *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 14.

<sup>132</sup> a) D. A. Wellings, E. Atherton, *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 44;

b) G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 35, 161.

<sup>133</sup> F. Albericio, L. A. Carpino, *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 104.

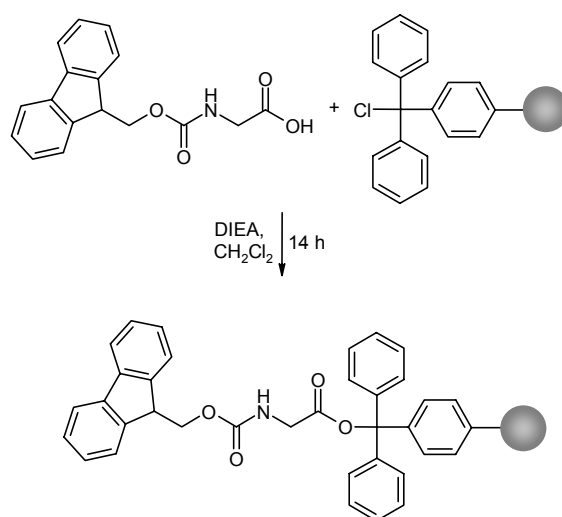
<sup>134</sup> E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595.



### 2.3.2 Festphasensynthese chromophorsubstituierter linearer Peptide

Wie bereits erwähnt ist die Festphasen-Peptidsynthese im Vergleich zur Peptidsynthese in Lösung weniger zeitaufwendig und ergibt im Allgemeinen höhere Produktausbeuten. Um dies zu verifizieren und gegebenenfalls eine derart effiziente Methode zu etablieren, sollen einige lineare Peptide auch an der Festphase synthetisiert werden.

Als polymerer Träger kommt ein mit Tritylchlorid funktionalisiertes Copolymer aus PS und DVB zum Einsatz,<sup>135,136</sup> wobei der Belegungsgrad ca. 1.5 mmol/g Harz beträgt. Dieses Tritylchlorid-Polystyrol- (TCP) Harz hat im trockenen Zustand eine Korngröße von 100-200 mesh. Vor der Anknüpfung der ersten Aminosäure wird das Harz im Lösungsmittel des ersten Reaktionsschrittes gequollen.



**Abb. 2-35:** Erstbelegung des TCP-Harzes mit Fmoc-Gly-OH.

Die Erstbelegung des TCP-Harzes erfolgt durch Reaktion des funktionalisierten Polymers mit Fmoc-Gly-OH und DIEA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bei Raumtemperatur (Abbildung 2-35).<sup>137</sup> Der Grad der Erstbelegung wird gravimetrisch durch Vergleich der Harzmasse vor und nach der Belegung unter Berücksichtigung der entsprechenden

<sup>135</sup> a) C. Chen, L. A. A. Randall, R. B. Miller, A. D. Jones, M. J. Kurth, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2661;

b) J. M. J. Fréchet, L. J. Nuyens, *Can. J. Chem.* **1976**, 54, 926.

<sup>136</sup> Das Polystyrol wird durch 1 % DVB quervernetzt.

<sup>137</sup> K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37, 513.

Molekulargewichte bestimmt.<sup>138</sup> Es ergibt sich eine Beladung von 0.6 mmol/g Harz. Das beladene Polymer wird anschließend in das Reaktionsgefäß der Festphasensynthese überführt. In der vorliegenden Arbeit werden dazu handelsübliche Kunststoffspritzen verwendet. Eingelegte Filterplättchen gewährleisten den Verbleib der festen Phase in der Spritze, während gelöste Substanzen durch Filtration entfernt werden können. Die Spritzenkanüle wird an einem Gummistopfen fixiert, der am Steigrohr eines Rotationsverdampfers angebracht ist. Durch die Rotationsbewegung wird eine ausreichende Durchmischung von Lösungsmittel und Polymerharz sichergestellt.

Um die eigentliche Peptidsynthese starten zu können, muss zuallererst die  $N^\alpha$ -Fmoc-Schutzgruppe entfernt werden. Dies gelingt mit 20 % Piperidin in NMP innerhalb von 10 min. Um einen quantitativen Umsatz zu erzielen wird das Entschützen wiederholt und anschließend intensiv mit NMP gewaschen. Im darauffolgenden Arbeitsschritt werden die Kupplungskomponenten sowie die nächste Aminosäureeinheit in NMP gelöst und in die Spritze aufgenommen. Als Kupplungsreagenzien kommen entweder Mischungen von TBTU, HOBt und DIEA, oder Gemische aus HATU, HOAt und Collidin zum Einsatz.<sup>139</sup> Bei der Anknüpfung eines Glycinrestes ist die Aktivierung mit TBTU ausreichend. Soll die Peptidsequenz allerdings um eines der chromogenen Aminosäurederivate **10** bzw. **13** erweitert werden, ist die effizientere HATU-Aktivierung vorzuziehen. Jeder Kupplungsschritt wird wiederholt, wobei die Erstkupplung 120 min und die Nachkupplung 90 min in Anspruch nimmt. Abbildung 2-36 zeigt exemplarisch die Reaktionsfolge zur Verlängerung der Peptidkette am polymeren Träger.

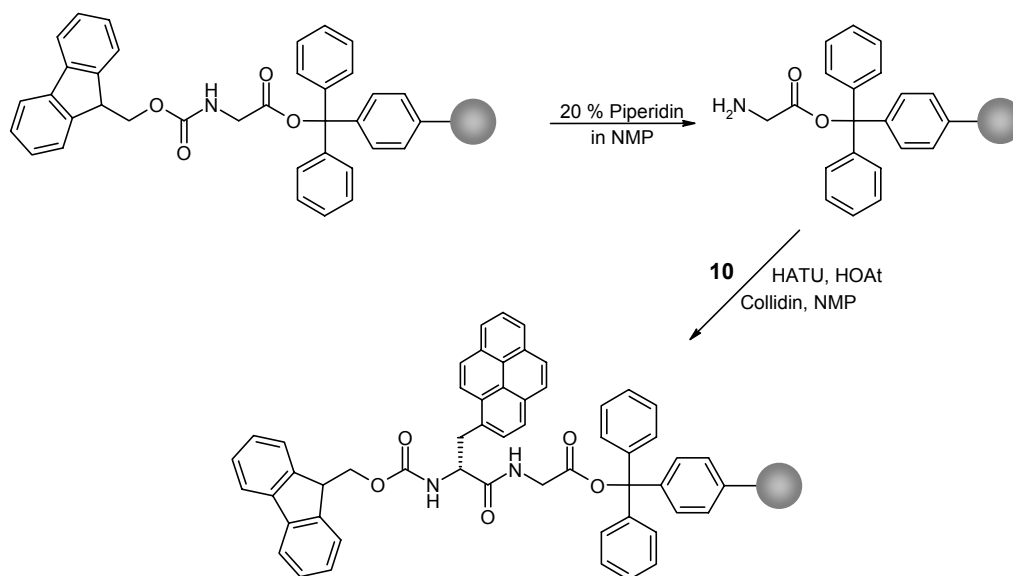
---

<sup>138</sup> Die gravimetrische Berechnungsformel findet sich im Experimentellen Teil dieser Arbeit.

<sup>139</sup> Die Kupplungsmethoden werden in Kapitel 2.2.3.2 ausführlich besprochen. Ihre Anwendung auf die Festphasensynthese wird in folgenden Literaturstellen aufgezeigt:

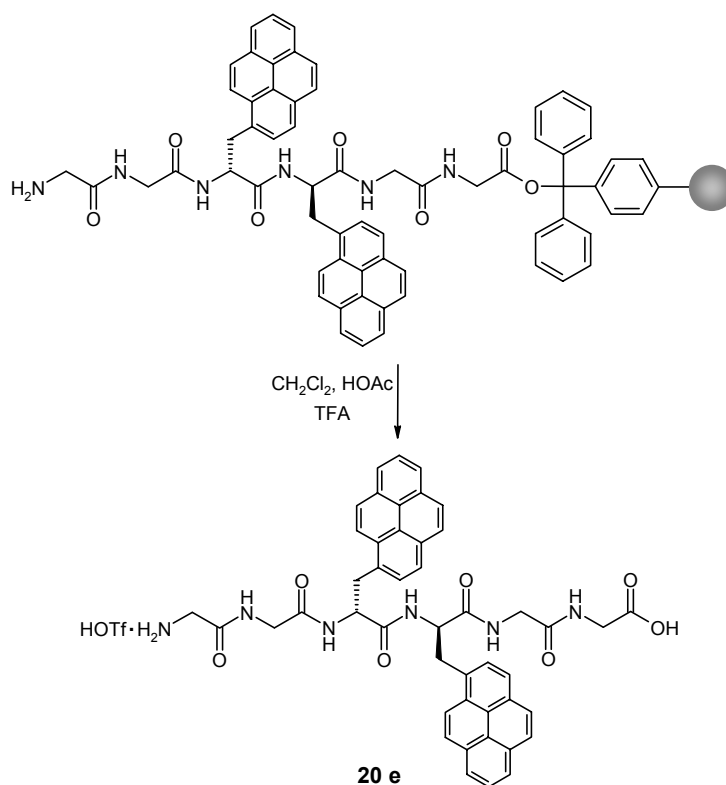
a) M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3033;

b) Lit.<sup>132b</sup>.



**Abb. 2-36:** Exemplarische Darstellung der Fmoc-Abspaltung und Peptidkettenverlängerung durch Fmoc-*D*-Pya-OH am Polymerharz.

Um die Festphasen-Peptidsynthese am polymeren Träger abzuschließen wird entweder die endständige Fmoc-Schutzgruppe abgespalten oder, um ein N-terminal geschütztes Peptid zu erhalten, eine Boc-geschützte Aminosäure eingeführt.



**Abb. 2-37:** Abspaltung des Hexapeptids **20e** vom TCP-Harz.

Das peptidbeladene Harz wird getrocknet und in einen Glaskolben überführt, in dem die Abtrennung des Peptids vom Polymer erfolgt. Dazu wird das Harz in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gequollen und anschließend eine Mischung aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , HOAc und TFA zugegeben. Da intensives Rühren erforderlich ist, um eine quantitative Ausbeute zu erzielen, wird der Abspaltungsschritt nicht in der Kunststoffspritze durchgeführt. Nach 90 min wird das Polymerharz abfiltriert und der Abspaltprozess zweimal wiederholt. Um das lineare Peptid zu erhalten, müssen die vereinigten Lösungsmittel-Säure-Gemische eingedampft werden. Dabei wird mehrmals Toluol zugegeben. Toluol bildet mit HOAc ein Azeotrop, wodurch die Aufkonzentrierung der Säure verhindert wird. Am Beispiel des Hexapeptids **20e** ist die Peptidabspaltung vom polymeren Träger dargestellt (Abbildung 2-37).

Analytische HPLC-Untersuchungen zeigen, dass die so dargestellten Peptide hinreichend rein sind (Reinheit > 90 %) und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden können.

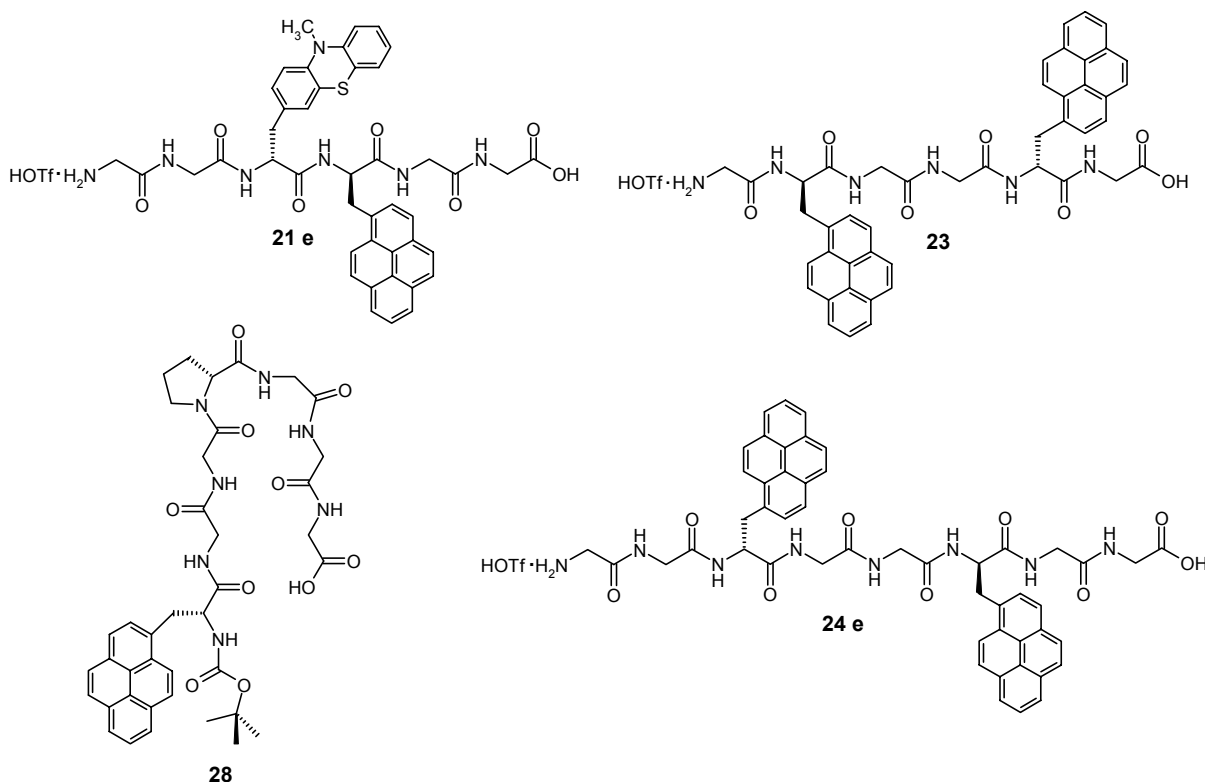


Abb. 2-38: Festphasensynthetisch dargestellte Peptide **21e**, **23**, **24e** und **28**.

Auf diesem Wege sind die chromophorsubstituierten Peptide **20e** (79 % Ausbeute, beigelber Feststoff), **21e** (67 % Ausbeute, beiger Feststoff) und **24e** (71 % Ausbeute, farbloser Feststoff) zugänglich. Die in Lösung synthetisierten analogen Spezies **20d**, **21d** und **24d** werden im Vergleich dazu in wesentlich geringeren Ausbeuten bei

erheblich höherem Zeitaufwand dargestellt. Der detaillierte Vergleich der „over-all“-Ausbeuten beider Methoden erfolgt in den nachfolgenden Kapiteln anhand vollständig charakterisierter und gereinigter Endprodukte.

Neben den sowohl an der Festphase als auch in Lösung synthetisierten Peptiden wurden die Verbindungen **23** (75 % Ausbeute, beiges Pulver) und **28** (79 % Ausbeute, beiges Pulver) nur am polymeren Träger hergestellt. Abbildung 2-38 gibt einen abschließenden Überblick über die, neben Verbindung **20e** (Abbildung 2-37), festphasensynthetisch dargestellten chromophorsubstituierten Peptide.

## 2.4 Hairpinpeptide

### 2.4.1 Einführung

$\beta$ - und  $\gamma$ -Hairpins sind in natürlichen Proteinen weit verbreitete Struktur motive. Durch sie wird die Sekundärstruktur entsprechender Spezies, aufgrund einer starken Richtungsänderung der Peptidkette in der loop-Region, entscheidend beeinflusst.<sup>140</sup> Die Richtungsänderungen werden durch turn- bzw. bend-Konformationen hervorgerufen. Derartige turn-Segmente sind im Allgemeinen aus vier ( $\beta$ -turn) seltener aus drei ( $\gamma$ -turn) Aminosäuren aufgebaut. Die im Folgenden näher besprochenen  $\beta$ -turn-Konformationen werden hauptsächlich durch die Rotationswinkel um die Positionen  $i+1$  und  $i+2$  geprägt. Aus diesem Grund erfolgte eine Einteilung der  $\beta$ -turns nach den Werten dieser Torsionswinkel (siehe Tabelle 2-4).<sup>141</sup>

Eine weitere typische Eigenheit der  $\beta$ -turn-Motive liegt in der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonylgruppe an Position  $i$  und der Amid-NH-Gruppe an Position  $i+3$ . Zudem beträgt der Abstand zwischen den Kohlenstoffen  $\alpha C_i$  und  $\alpha C_{i+3}$  idealer Weise 7 Å.<sup>142</sup>

Die am häufigsten auftretenden  $\beta$ -turn-Strukturen sind vom Typ I' oder II'. Für diese Konformationen ist die Auswahl der Aminosäuresequenz an Position  $i+1$  und  $i+2$  auf Asn-Gly und *D*-Pro-Gly beschränkt. Dies ergibt sich als Konsequenz der stereochemischen Voraussetzung, dass an der  $i+1$ -Einheit eine lokal linkshändig helikale Konformation vorliegen muss. Gerade *D*-Prolin erfüllt diese Forderung

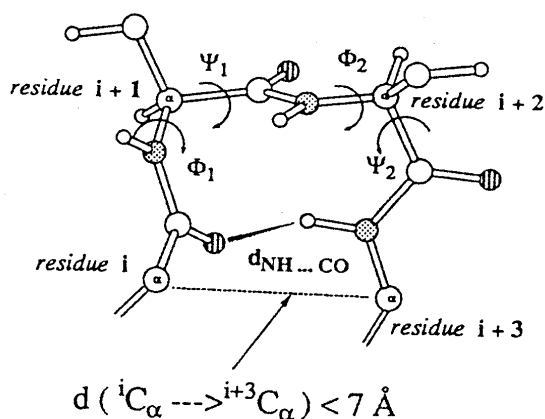
---

<sup>140</sup> B. L. Sibanda, J. M. Thornton, *Nature* **1985**, 316, 170.

<sup>141</sup> C. M. Venkatachalam, *Biopolymers* **1968**, 6, 1425.

<sup>142</sup> J. A. Robinson, *Synlett* **2000**, 429.

optimal, da aufgrund des Pyrrolidinrings der  $N-C^\alpha$ -Torsionswinkel auf  $+60 \pm 20^\circ$  festgelegt ist.<sup>143</sup>



$\beta$ -turn-Typ	$\Phi(i+1)$	$\Psi(i+1)$	$\Phi(i+2)$	$\Psi(i+2)$
I	$-60^\circ$	$-30^\circ$	$-90^\circ$	$0^\circ$
II	$-60^\circ$	$120^\circ$	$80^\circ$	$0^\circ$
III	$-60^\circ$	$-30^\circ$	$-60^\circ$	$-30^\circ$
I'	$60^\circ$	$30^\circ$	$90^\circ$	$0^\circ$
II'	$60^\circ$	$-120^\circ$	$-80^\circ$	$0^\circ$
III'	$60^\circ$	$30^\circ$	$60^\circ$	$30^\circ$
VIa1	$-60^\circ$	$120^\circ$	$-90^\circ$	$0^\circ$
VIa2	$-120^\circ$	$120^\circ$	$-60^\circ$	$0^\circ$
VIb	$-135^\circ$	$135^\circ$	$-75^\circ$	$160^\circ$
VIII	$-60^\circ$	$-30^\circ$	$-120^\circ$	$120^\circ$
IV	$-60^\circ$	$10^\circ$	$-50^\circ$	$20^\circ$

Tab. 2-4: Struktur und ideale Torsionswinkel für verschiedene  $\beta$ -turn-Typen.<sup>144</sup>

Eine andere systematische Einteilung von  $\beta$ -Hairpins trägt dem vorliegenden H-Brücken-Muster zwischen den antiparallelen  $\beta$ -Faltblattketten und der loop-Größe Rechnung. Die Klassifizierung erfolgt durch Benennung von *Hairpins*  $X:Y$  nach folgenden Kriterien.  $X$  gibt die Anzahl der Aminosäuren, die direkt am loop-Motif beteiligt sind an. Falls die beiden distalen Aminosäuren (Abbildung 2-39: a, b) untereinander zwei H-Brücken ausbilden gilt  $Y = X$ , wird nur eine H-Brücke zwischen diesen Aminosäuren ausgebildet gilt  $Y = X+2$ .<sup>145</sup> Abbildung 2-39 verdeutlicht diese Nomenklatur anhand eines  $\beta$ -Hairpins 2:2 und eines  $\beta$ -Hairpins 3:5.

Da kurze lineare Peptide in Lösung gewöhnlich sehr flexible sind, bieten Hairpin-Struktur motive aus synthetischer Sicht die Möglichkeit, derartige Moleküle konformativ deutlich zu stabilisieren. Somit können beispielsweise biologisch relevante Peptidstränge als Mimetika zu speziellen Proteinsequenzen entwickelt werden.<sup>146</sup>

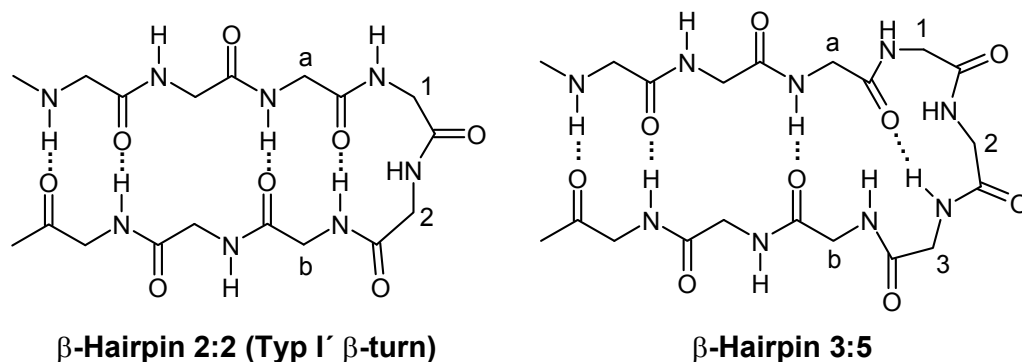
<sup>143</sup> H. E. Stanger, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4236.

<sup>144</sup> Die Abbildung wurde aus Lit.<sup>142</sup> entnommen.

<sup>145</sup> a) B. L. Sibanda, T. L. Blundell, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1989**, *206*, 759;

b) E. de Alba, M. A. Jiménez, M. Rico, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 175.

<sup>146</sup> Näheres zur Protein-Mimetik ist in der *Einleitung* (Kapitel 1.1) dieser Arbeit zu finden.



**Abb. 2-39:** Schematische Darstellung zweier β-Hairpintypen (a und b bezeichnen die durch H-Brücken verbundenen distalen Aminosäuren; die arabischen Ziffern kennzeichnen die Anzahl der loop-Aminosäuren).

## 2.4.2 Chromophorsubstituierte Hairpinpeptide

### 2.4.2.1 Darstellung

Durch eine *D*-Pro-Gly-Sequenz als zentraler Einheit von chromophorsubstituierten Octapeptiden sollen offenkettige Peptidspezies mit eingeschränkten konformativen Freiheitsgraden dargestellt werden. Die Anbindung je einer farbstofffunktionalisierten Aminosäure (**8**, **9** oder **12**) an den Enden der antiparallelen β-Faltblattketten der Verbindungen **30** und **31** eröffnet die Möglichkeit von through-space-Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren. Die Spezies **29** dient als monofunktionalisierte Vergleichssubstanz.

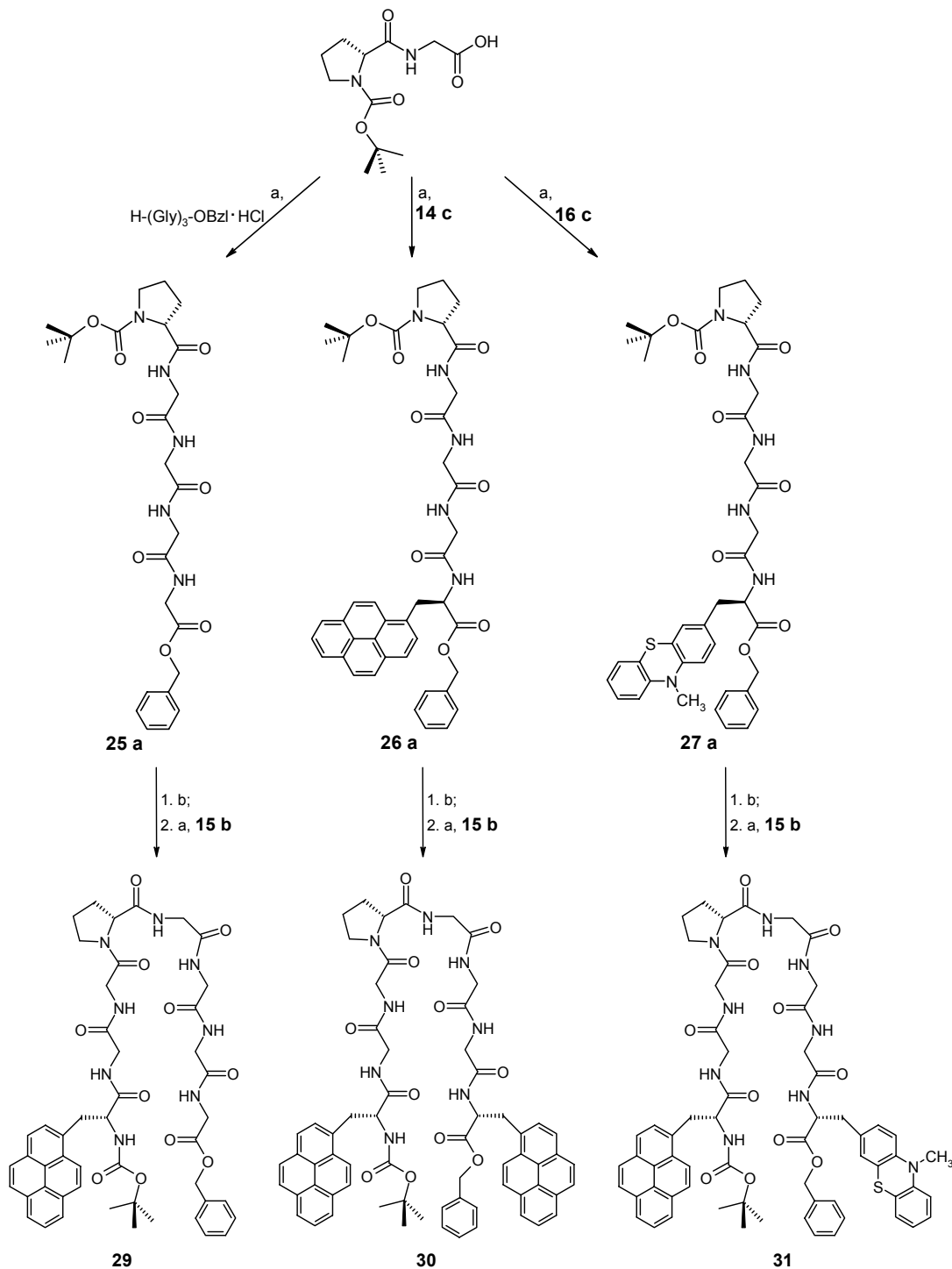
Zur Synthese der Hairpinpeptide **29**, **30** und **31** wird formal das Boc-geschützte Tripeptid **15b** über eine *D*-Pro-Gly-Brücke mit den Benzylester-geschützten Tripeptiden H-Gly-Gly-Gly-OBzl, **14c** bzw. **16c** verbunden. Sowohl das notwendige Entschützen der Tripeptide<sup>147</sup> als auch die Peptidkupplungen<sup>148</sup> erfolgen nach bereits ausführlich beschriebenen Methoden. Abbildung 2-40 gibt die Synthesesequenzen wieder.

Bei der <sup>1</sup>H-NMR-Analyse der Zwischenprodukte **25a** und **26a** fällt auf, dass die Boc-Signale in zwei Singulets aufgespalten sind, was, wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 2.2.6), die Coexistenz zweier isomerer Formen belegt. Da auch das käuflich erworbene Edukt Boc-*D*-Pro-Gly-OH, das wie Verbindung **25a** nur ein Chiralitätszentrum besitzt, dieses Verhalten zeigt, können die beiden Singulets den

<sup>147</sup> Die Verfahren zum Entschützen der Peptide sind in Kapitel 2.2.6 dargelegt.

<sup>148</sup> Es wird das EDC/HOAt-Verfahren (Kapitel 2.2.5) verwendet.

Rotationsisomeren um die N-terminale Carbamat-Bindung zugeordnet werden. Später gezeigte temperaturabhängige  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen an Verbindung **31** untermauern das Vorhandensein zweier Rotationsisomere.

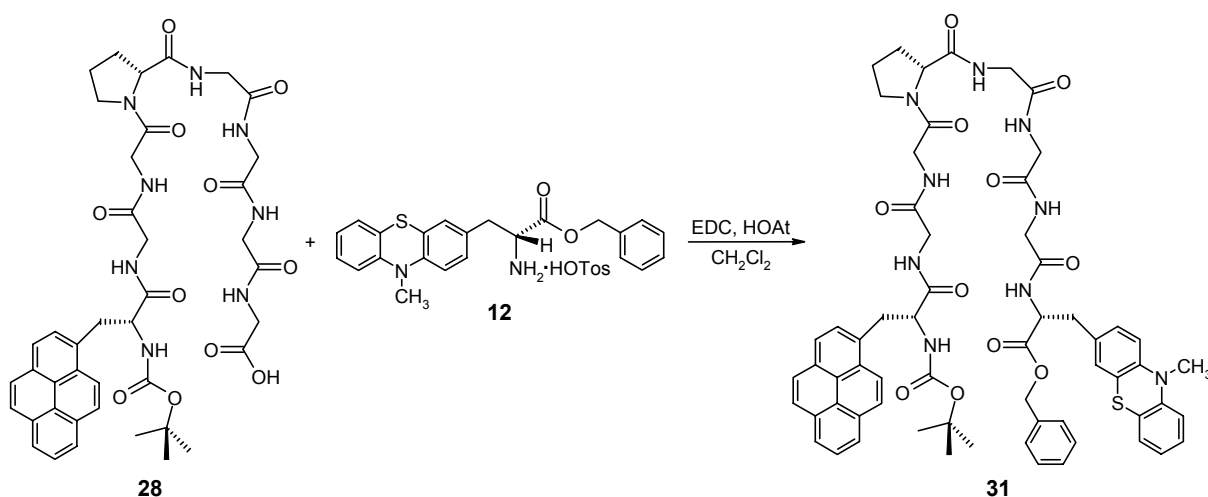


**Abb. 2-40:** Darstellung der chromophorsubstituierten Hairpinpeptide **29**, **30** und **31**.  
a: EDC, HOAt,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; b:  $\text{HCl}_g$ , EtOAc.



Die aus den Vorstufen dargestellten Octapeptide **29**, **30** und **31** werden in der dargelegten Synthese als farblose Feststoffe erhalten. Die Ausbeuten des jeweils letzten Kupplungsschrittes liegen mit 39 % für Peptid **29**, 44 % für Verbindung **30** und 31 % für **31** unter den bisher beschriebenen Peptidkupplungsausbeuten, die mit der EDC/HOAt-Methode erzielt werden. Dies kann auf den sterischen Anspruch der *D*-Prolin-Aminofunktion zurückgeführt werden, wodurch der anchimere Effekt der HOAt-Ester gehemmt wird.

Das Peptid **31** wurde neben der beschriebenen Route zudem mittels des festphasensynthetisch erhaltenen Edukts **28** dargestellt. Durch Kupplung dieser Spezies mit dem Alaninderivat **12** wird das Hairpinmolekül **31** ebenfalls als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 48 % erhalten (Abbildung 2-41).



**Abb. 2-41:** Alternative Darstellung des Hairpinpeptids **31** durch Kupplung der Edukte **28** und **12**.

Vergleicht man die beiden Darstellungswege für Spezies **31** so besticht das Festphasenverfahren gegenüber der Peptidsynthese in Lösung durch eine wesentlich höhere Gesamtausbeute bei geringerem Zeitaufwand. Nach der in Abbildung 2-41 aufgezeigten Methode erhält man das Octapeptid **31** in einer „over-all“-Ausbeute von 38 %, wohingegen das Verfahren aus Abbildung 2-40 nur 8.5 % liefert.<sup>149</sup>

<sup>149</sup> Die Ausbeuten sind auf die Eduktstoffmenge des ersten Kupplungsschrittes der jeweiligen Synthese bezogen.

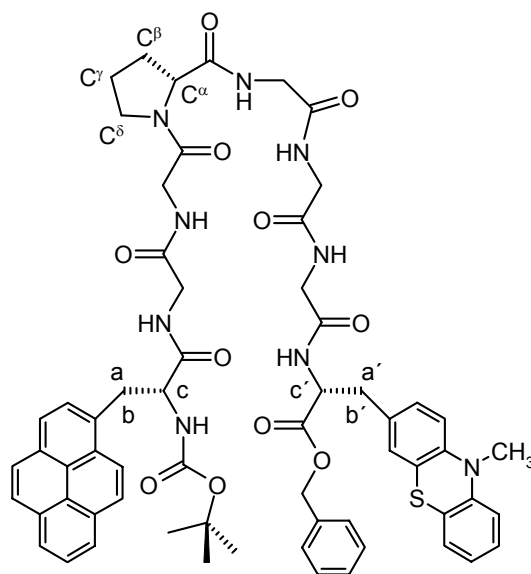
### 2.4.2.2 $^1\text{H}$ -NMR-Studien anhand des Hairpinpeptids **31**

Mit Hilfe spezieller  $^1\text{H}$ -NMR-Techniken können bei der Konformationsanalyse von Peptiden oft wertvolle strukturelle Informationen gewonnen werden. Aus diesem Grunde werden für das Hairpinpeptid **31** temperaturabhängige  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen sowie (H, H)-COSY- und NOESY- bzw. ROESY-Experimente durchgeführt.<sup>150</sup>

Aufgrund von erheblichen Signalüberlagerungen im Bereich der  $\text{CH}_2$ -Gruppen sowie im aromatischen Bereich ist eine vollständige Interpretation der Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bzw. eine einwandfreie Konformationsanalyse nicht möglich.

Im Bereich von 294 K bis 403 K in 10 K-Schritten durchgeführte temperaturabhängige Messungen erleichtern dies jedoch etwas. Die für prolinhaltige Peptide<sup>151</sup> typische Ausbildung eines Konformationsgleichgewichtes zwischen den Rotationsisomeren der entsprechenden Amidbindung (Rotationsbarriere: ca. 20 kcal/mol) wird an den Signalen der Boc-Schutzgruppe und der benzylichen  $\text{CH}_2$ -Gruppe deutlich. Bei 294 K (Abbildung 2-43 a) weisen beide Gruppierungen zwei Singulets unterschiedlicher Intensität auf, die beim Aufheizen koaleszieren. Das in Abbildung 2-43 b dargestellte Spektrum bei 383 K zeigt, dass das Boc-Signal bei dieser Temperatur nicht mehr aufgespalten ist, wohingegen das  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ -Signal noch zwei sehr eng stehende Singulets aufzeigt. Bei einer Temperatur von 403 K ist jedoch auch diese Signalkoaleszenz erreicht.

In Spektrum b wird zudem die Existenz von Diastereomeren deutlich. Das Dublett des aromatischen Protons bei 6.76 ppm weist ein Analogon bei 6.66 ppm auf, was auf einen Diastereomerenüberschuß von 60 % schließen lässt. Daneben weist das  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ -Hauptsingulett (5.05 ppm) ein zusätzliches temperaturunabhängiges Signal bei 5.03 ppm auf, was diese Aussage untermauert. Beide genannten Signale sind der *D*-Pta-Einheit der Struktur zuzuordnen, weshalb eine Racemisierung an diesem Stereozentrum wahrscheinlich erscheint. Hinweise auf



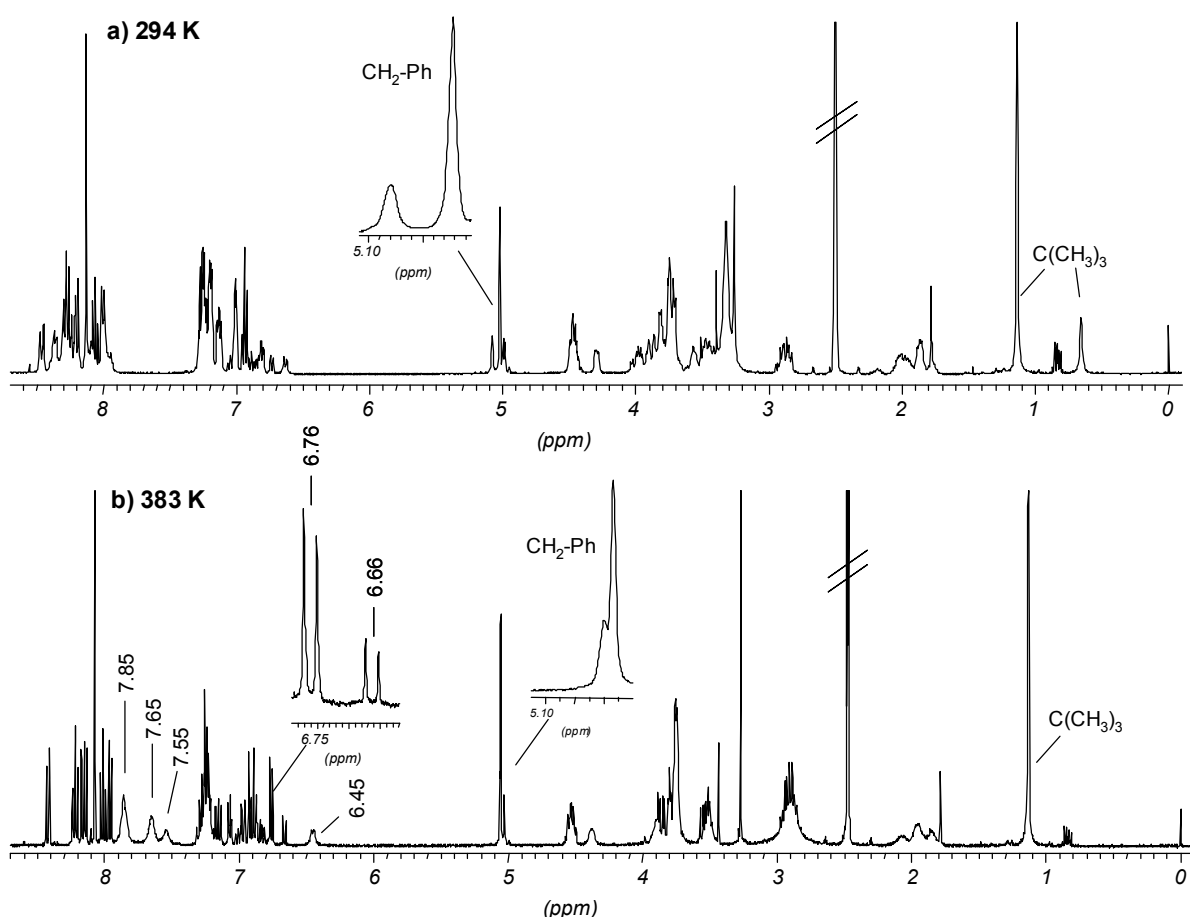
**Abb. 2-42:** Verbindung **31** mit Bezeichnung einzelner Strukturteile

<sup>150</sup> Es wird eine Produktcharge verwendet, die durch Kupplung des Heptapeptids **28** und der Aminosäure **12** erhalten wurde.

<sup>151</sup> H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 509.

Racemisierungen an den beiden anderen Stereozentren des Moleküls finden sich in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren nicht.

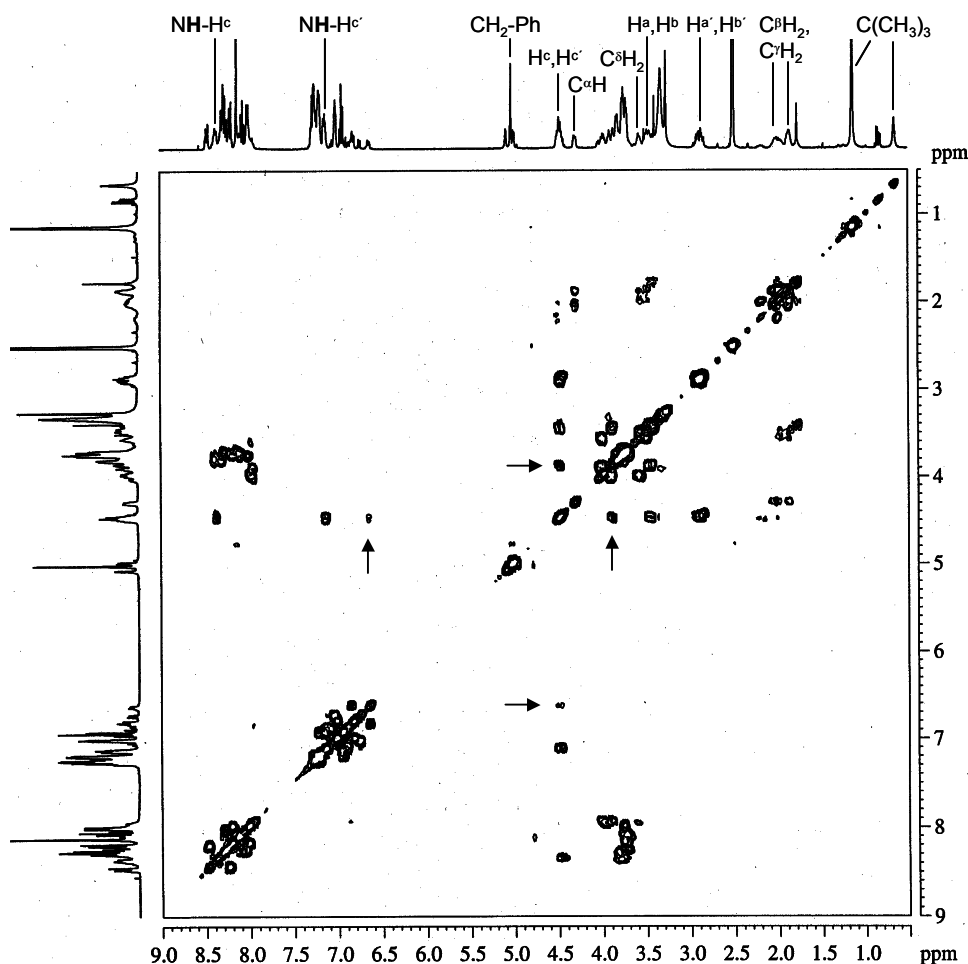
Einen wichtigen Hinweis auf die Sekundärstruktur eines Peptids erhält man aus der Orientierung der Amidbindungen, die im Allgemeinen durch intra- bzw. intermolekulare oder zum Lösungsmittel ausgebildete Wasserstoffbrückenbindungen festgelegt ist. Intermolekulare Wechselwirkungen und Brücken zum Solvens werden im Vergleich zu intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen bei Temperaturerhöhung leicht gespalten. Nimmt das Peptid in Lösung nur eine Konformation ein oder ist eine Konformation sehr dominant, so beobachtet man bei der Ausbildung intramolekularer H-Brücken einen Temperaturgradienten ( $\Delta\delta/\Delta T$ ) der beteiligten NH-Signale von  $< 2\text{--}3 \times 10^{-3}$  ppm/K in DMSO. Temperaturgradienten von über  $4 \times 10^{-3}$  ppm/K weisen auf externe NH-Orientierungen hin.<sup>151,152</sup>



**Abb. 2-43:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **31** in DMSO bei a) 294 K und b) 383 K.

<sup>152</sup> Y. A. Bara, A. Friedrich, H. Kessler, M. Molter, *Chem. Ber.* **1978**, *111*, 1045.

Im vorhandenen Fall des Peptids **31** ist der Temperaturgradient der NH-Signale bei niedrigen Temperaturen wegen Signalüberlagerungen schwer zu bestimmen. Ab einer Temperatur von 363 K kristallisieren sich allerdings drei Bereiche für die Amidprotonen heraus, wobei im ersten Multipllett (Abbildung 2-43 b: 7.85 ppm) drei Protonen und im zweiten Multipllett (Abbildung 2-43 b: 7.65 ppm) zwei Protonen zusammenfallen. Die beiden weiteren NH-Multipletts (Abbildung 2-43 b: 7.55 und 6.45 ppm) repräsentieren je ein Proton. Von 363 K bis 403 K ergeben sich für diese Signale mittlere Temperaturgradienten von  $5.22 \times 10^{-3}$  ppm/K,  $4.91 \times 10^{-3}$  ppm/K,  $4.91 \times 10^{-3}$  ppm/K und  $6.26 \times 10^{-3}$  ppm/K. Diese Werte weisen nicht auf eine Hauptkonformation in Lösung mit intramolekularen H-Brücken hin.

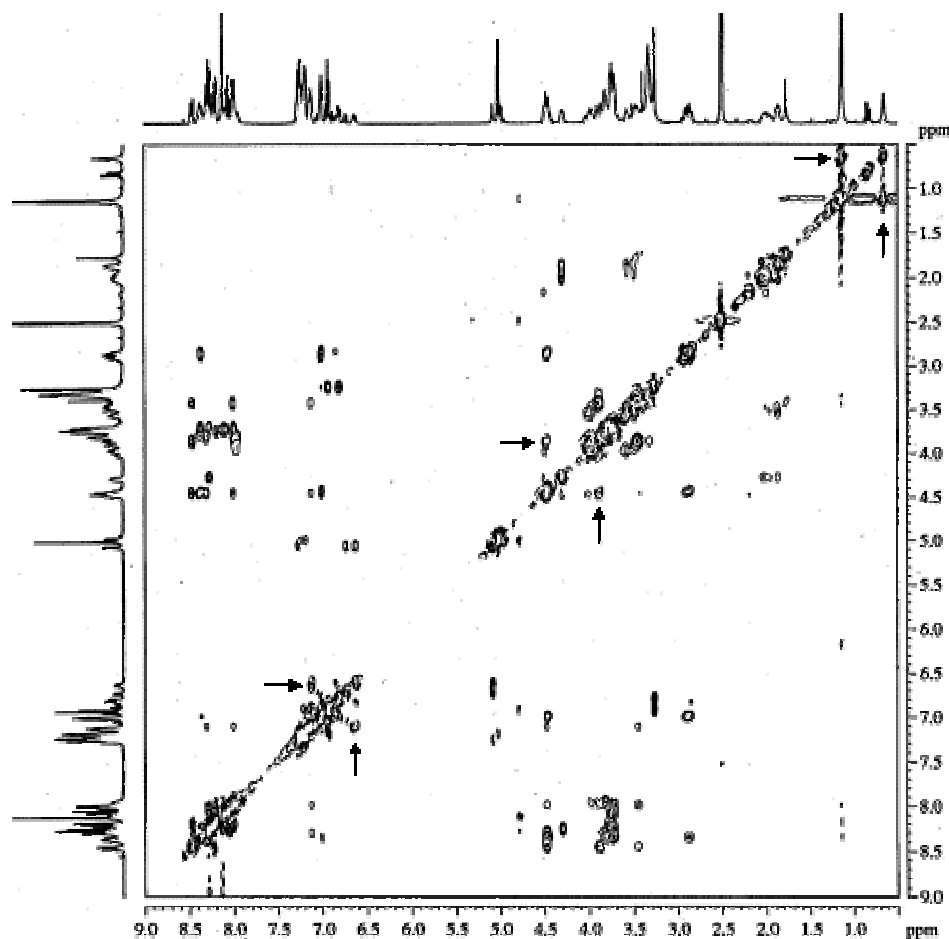


**Abb. 2-44:** (H, H)-COSY 45 der Verbindung **31** in DMSO (durch Pfeile gekennzeichnete Kreuzpeaks werden im Text diskutiert).

Durch die Aufnahme von zweidimensionalen Spektren soll einerseits die Zuordnung der Signale erleichtert werden. Zum anderen sollen ROE-Signale zwischen nicht

benachbarten Strukturteilen Hinweise auf eine möglicherweise stabilisierte Hairpinstruktur geben.

Mittels des (H, H)-COSY-Spektrums (Abbildung 2-44) können die Signale der Prolin-Protonen, sowie die Signale der Protonen  $H^c$ ,  $H^{a'}$ ,  $H^{b'}$  und  $H^{c'}$  eindeutig zugeordnet werden. Ebenso sind die Signallagen der überlagerten Protonen  $NH-CH^c$ ,  $NH-CH^{c'}$ ,  $H^a$  und  $H^b$  erkennbar (siehe Abbildung 2-44). Auffällig sind zwei zusätzliche Kreuzsignale des Multipletts bei 4.47 ppm mit Protonen bei 3.86 ppm und 6.63 ppm (Abbildung 2-44: durch Pfeile gekennzeichnet), die bei erster Betrachtung nicht schlüssig erscheinen. Im dargestellten ROESY-Spektrum (Abbildung 2-45) werden vergleichbare Signale detektiert, die positive Levels besitzen. Dies steht in Analogie zu dem konformativen Austausch der Boc-Gruppe und der benzylichen  $CH_2$ -Gruppe im ROESY-Spektrum. Die genannten Signale im COSY-Spektrum sind also vermutlich auf Rotationsisomere zurückzuführen.



**Abb. 2-45:** Phasensensitives ROESY der Verbindung **31** in DMSO (positive Levels sind mit Pfeilen gekennzeichnet).

Im ROESY-Spektrum (Abbildung 2-45) werden nur Kreuzsignale zwischen benachbarten Gruppen detektiert. Kopplungen durch den Raum zwischen nicht benachbarten Strukturteilen, die eine Hairpinkonformation oder Wasserstoffbrückenbindungen belegen würden, werden nicht beobachtet.

Abschließend ist zu bemerken, dass die, aus Fluoreszenzmessungen (siehe Kapitel 5.3 und 5.5) erhaltenen, Hinweise für eine stabilisierte Hairpinkonformation der Verbindungen **30** und **31** mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Experimenten nicht erhärtet werden können. Durch  $^1\text{H}$ -NMR-Titration einer Lösung der Verbindung **31** mit  $\text{CaCl}_2$  soll das Potential der Hairpinpeptide zur Erdalkalimetallkation-Komplexierung untersucht werden. Signalverschiebungen, die auf eine derartige Komplexierung hindeuten ergeben sich jedoch nicht. Möglicherweise wird das Metallkation vom gewählten Lösungsmittel DMSO- $d_6$  zu stark solvatisiert.

## 2.5 Cyclische Peptide

### 2.5.1 Einführung

Cyclische Peptide bilden eine große Klasse natürlich vorkommender und synthetisch dargestellter Verbindungen mit vielfältigem Wirkungsprofil. Ihre biologische Aktivität spiegelt sich in der Anwendung als Hormone, Antibiotika, Ionophore, Cancerostatika, Toxine etc. wieder.<sup>153</sup> Cyclopeptide zeigen gegenüber ihren linearen Analoga eine verminderte Flexibilität mit einer Konformationsfixierung einzelner Kettenabschnitte. Dies bietet günstige Voraussetzungen für Konformationsstudien und für das Modeling von Schlüsselstrukturelementen die sich beispielsweise aus der Sekundärstruktur langkettiger Proteine ergeben.<sup>146</sup>

Aufgrund der Möglichkeit, cyclische Peptide zu supramolekularen Nanoröhren anzuordnen, hat diese Verbindungsklasse in den letzten Jahren zusätzlich an Bedeutung gewonnen.<sup>154</sup>

---

<sup>153</sup> a) P. Wipfl, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2115;

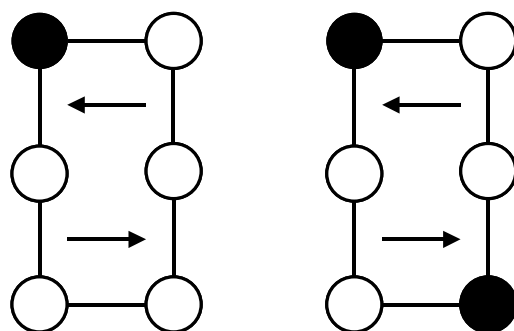
b) N. Fusetani, S. Marsunaga, H. Matsumoto, Y. Takebayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7053.

<sup>154</sup> a) M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature* **1993**, 366, 324;

b) D. Ranganathan, C. Lakshmi, V. Haridas, M. Gopikumar, *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 365;

c) D. Gauthier, P. Baillargeon, M. Drouin, Y. L. Dory, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 4771.

Bei der Synthese von homodeten Cyclopeptiden hängt die Fähigkeit des linearen Edukts zur Cyclisierung von der Kettenlänge und der Aminosäuresequenz ab. Beim Ringschluss von Hepta- und Octapeptiden ergeben sich dabei kaum Schwierigkeiten. Allerdings sind die erhaltenen Produkte relativ flexibel. Will man konformativ weniger dynamische Cyclopenta- und Cyclohexapeptide darstellen, hängt die Cyclisierungsreaktion von der Anwesenheit turn-induzierender Bausteine wie *D*-Aminosäuren, Prolinen oder flexiblen Glycinresten ab. Die Konformation der erhaltenen Cyclopeptide wird besonders von der Konfiguration der einzelnen Aminosäuren bestimmt. So ist beispielsweise bekannt, dass eine *D*-Aminosäure die *i*+1 Position der oft gebildeten  $\beta$ -Schleifen stark bevorzugt (siehe Abbildung 2-46).<sup>155</sup>



**Abb. 2-46:** Schematische Darstellung der bevorzugten  $\beta,\beta$ -Konformation cyclischer Hexapeptide mit einer bzw. zwei *D*-Aminosäuren (schwarze Kreise). Die Pfeile weisen auf die Orientierung der Wasserstoffbrückenbindungen von CO nach NH in den  $\beta$ -Schleifen hin.

Allgemein können alle zur Knüpfung einer Peptidbindung geeigneten Methoden auch zur Cyclisierung linearer Peptide eingesetzt werden. Ringschlussreaktionen verlaufen aber für gewöhnlich wesentlich langsamer, wodurch Nebenreaktionen wie Oligomerisierungen begünstigt sind.<sup>156</sup> Eine Zurückdrängung der unerwünschten intermolekularen Peptidkupplungen wird durch Cyclisierung nach dem Verdünnungsprinzip in  $10^{-4}$  bis  $10^{-3}$  molaren Lösungen erreicht. Um das, aufgrund der langen Aktivierungszeiten, nicht zu unterschätzende Racemisierungsrisiko zu unterdrücken sollten wenn möglich Glycin- oder Prolinreste als C-terminale Aminosäuren eingesetzt werden. Die derzeit am häufigsten verwendeten Cyclisierungsverfahren sind die DPPA-Methode und die Aktivesterbildung mittels

<sup>155</sup> R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1440.

<sup>156</sup> N. Izumiya, T. Kato, M. Waki, *Biopolymers* **1981**, 20, 1785.

Uronium- bzw. Guanidiniumsalzen.<sup>157</sup> Die Verwendung der HOBt- bzw. HOAt-analogen Salze liefert allerdings meist höhere Ausbeuten bei geringerer Reaktionszeit.<sup>158</sup>

Neben verschiedenster Cyclisierungsmethoden in Lösung<sup>159</sup> wurden gerade in letzter Zeit vermehrt Peptidcyclisierungen an polymeren Trägern entwickelt.<sup>160</sup> Der Vorteil dieses Prinzips ist auf die sogenannte Pseudoverdünnung zurückzuführen, wobei intramolekulare Reaktionen gegenüber intermolekularen Nebenreaktionen begünstigt sind.

## 2.5.2 Darstellung chromophorsubstituierter cyclischer Peptide

Mit den im vorangehenden Kapitel besprochenen Hairpinpeptiden wurden bereits Peptidsysteme mit eingeschränkter konformativer Flexibilität besprochen. Die Darstellung Pyren- bzw. Phenothiazin-funktionalisierter Cyclopeptide ermöglicht nun eine weitere Restriktion der Moleküldynamik. Die so erhaltenen strukturspezifischen Wechselwirkungen zwischen den Chromophoreinheiten soll die Detektion von intrinsischen Peptideigenschaften, etwa mittels optischer Spektroskopie ermöglichen.

Zu Beginn soll die Synthese des cyclischen Octapeptids cyclo-(Gly-Gly-D-Pya-Gly-Gly-D-Pya-Gly-Gly) (**36**)<sup>119</sup> näher besprochen werden. In Octapeptiden treten im Normalfall keine sequenzabhängigen Ringschlussprobleme auf, weshalb sich diese Spezies gut als Testsubstanz zur Erprobung verschiedener Cyclisierungsmethoden eignet.

---

<sup>157</sup> Eine genaue Beschreibung dieser Kupplungsverfahren findet sich in Kapitel 2.2.3.

<sup>158</sup> a) A. Ehrlich, H-U. Heyne, R. Winter, M. Beyermann, H. Haber, L. A. Carpino, M. Bienert, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8831;

b) S. Zimmer, E. Hoffmann, G. Jung, H. Kessler, *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 497;

c) A. Ehrlich, S. Rothmund, M. Brudel, M. Beyermann, L. A. Carpino, M. Bienert, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4781.

<sup>159</sup> J. N. Lambert, J. P. Mitchell, K. D. Roberts, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2001**, 471.

<sup>160</sup> a) C. Blackburn, S. A. Kates, *Methods Enzymol.* **1997**, 175;

b) G. T. Bourne, S. W. Golding, R. P. McGeary, W. D. F. Meutermans, A. Jones, G. R. Marshall, P. F. Alewood, M. L. Smyth, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7706.

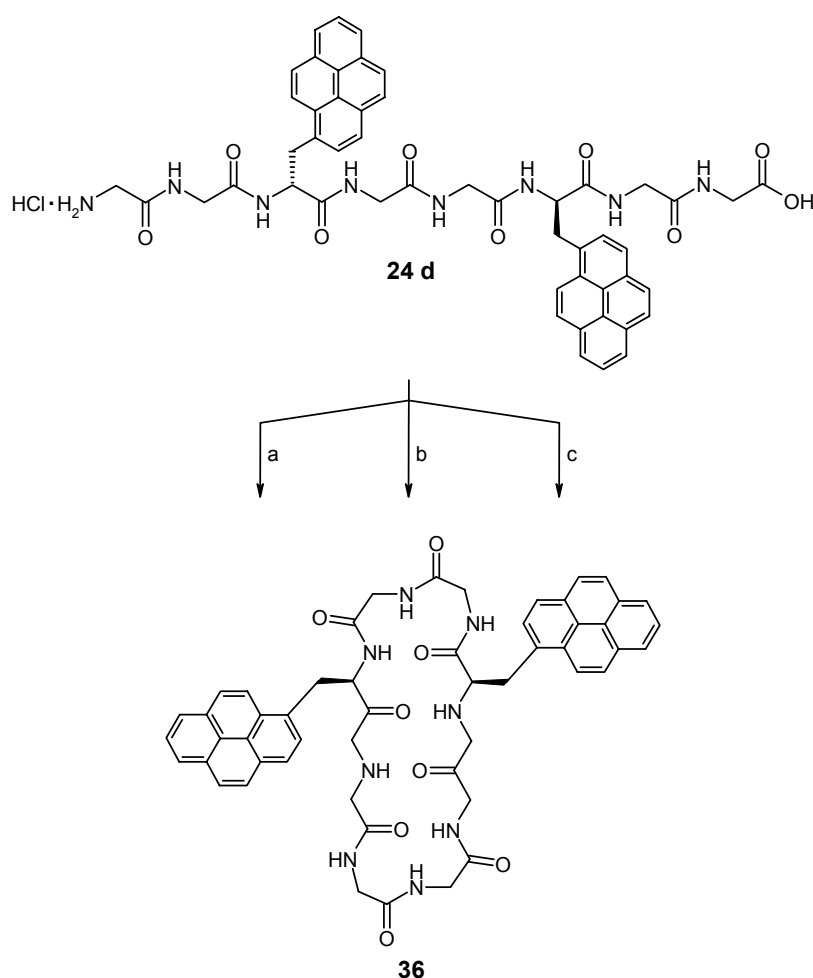


Ausgehend vom, in Lösung synthetisierten, Edukt **24d**<sup>161</sup> wird die Cyclisierungsreaktion zum Peptid **36** sowohl mit dem DPPA-Verfahren, als auch mit der TBTU/HOBt- und der HATU/HOAt-Methode durchgeführt (Abbildung 2-47).<sup>158,162</sup>

Aus Tabelle 2-5 wird ersichtlich, dass die Verwendung von HATU/HOAt mit einer Ausbeute von 58 % bei einer Reaktionszeit von 20 h am effizientesten ist.

Cyclisierungs-Methode	Reaktions-Zeit	Ausbeute
DPPA	3 d	10 %
TBTU/HOBt	24 h	38 %
HATU/HOAt	20 h	58 %

**Tab. 2-5:** Ausbeuten und Reaktionszeiten der verschiedenen Cyclisierungsmethoden bei der Synthese des cyclischen Octapeptids **36**.



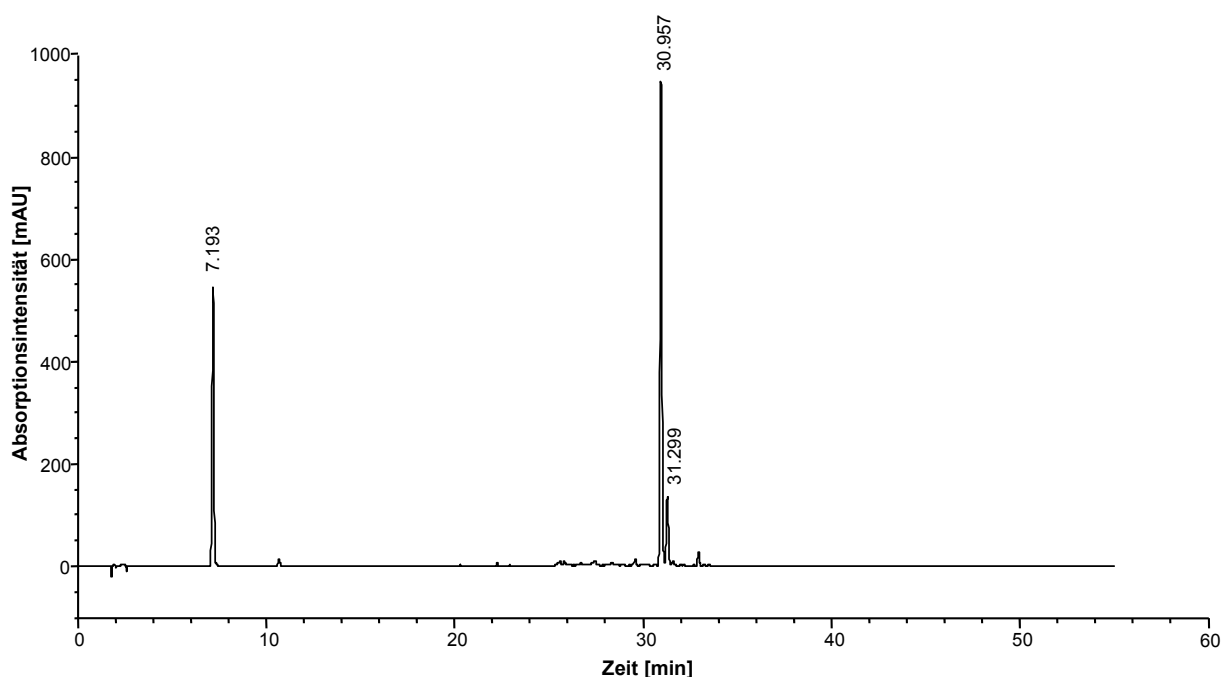
**Abb. 2-47:** Darstellung des cyclischen Octapeptids **36** nach unterschiedlichen Synthesemethoden. a: DPPA, NaHCO<sub>3</sub>, DMF<sub>abs</sub>, RT; b: TBTU, HOBt, DIEA, DMF<sub>abs</sub>, RT; c: HATU, HOAt, Collidin, RT.

<sup>161</sup> Das lineare Edukt **24d** wird im Vorfeld durch Schutzgruppenabspaltung nach üblichen Verfahren aus Verbindung **24a** bzw. **24b** hergestellt.

<sup>162</sup> D. L. Boger, M. W. Ledebor, M. Kume, M. Searcey, Q. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11375.

Das TBTU/HOBt-Verfahren liefert Verbindung **36** nach 24 h mit einer Ausbeute von 38 %. Die DPPA-Methode ist sowohl hinsichtlich der Reaktionszeit (3 d), als auch der Produktausbeute (10 %) am ineffektivsten. Bei allen Reaktionssequenzen wird das Cyclooctapeptid **36** als farbloser Feststoff erhalten.

Die Aufreinigung des Rohproduktes gelingt durch semipräparative HPLC. Abbildung 2-48 zeigt das analytische HPLC-Chromatogramm der, durch Reaktion mit TBTU/HOBt synthetisierten, Verbindung **36** vor der halbpräparativen Reinigung.



**Abb. 2-48:** Analytisches HPLC-Chromatogramm des Cyclopeptids **36** (nach dem TBTU/HOBt-Verfahren synthetisiert) vor der Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC.

Im Chromatogramm sind drei Hauptsignale zu erkennen, die mittels HPLC-MS-Kopplung bzw. durch HPLC-Vergleichsmessungen eindeutig zugeordnet werden können. Der Peak bei einer Retentionszeit von 7.193 min entspricht HOBt-Resten, das intensivitätsstärkste Signal (Retentionszeit = 30.957 min) dem Produkt **36**. Der intensitätsschwache Peak bei einer Retentionszeit von 31.299 min wird einer Spezies zugeordnet, die im Vergleich zum Hauptprodukt eine um 2 g/mol höhere molare Masse besitzt. In diesem Nebenprodukt scheint demnach eine der stilbenartigen Doppelbindungen des Pyrensubstituenten hydriert vorzuliegen. Dies kann durch teilweise Hydrierung der genannten Doppelbindungen beim hydrogenolytischen

Spalten der Benzylesterschutzgruppen im Laufe der Peptidsynthese in Lösung erklärt werden.<sup>73b,163</sup>

Die Nebenprodukte bzw. Eduktreste können durch semipräparative HPLC entfernt werden. Übliche Produktreinigungsmethoden wie Umkristallisation und Säulenchromatographie bleiben dagegen wirkungslos.

Nach erfolgter Methodenoptimierung anhand des cyclischen Octapeptids **36** können die konformativ anspruchsvolleren Cyclohexapeptide **32**, **33** und **35** nach dem HATU/HOAt-Verfahren in sehr guten Ausbeuten (> 72 %, farblose Feststoffe) dargestellt werden (Abbildung 2-49). Als Edukte dienen die in Lösung synthetisierten linearen Analoga **18d**, **20d** und **21d**.

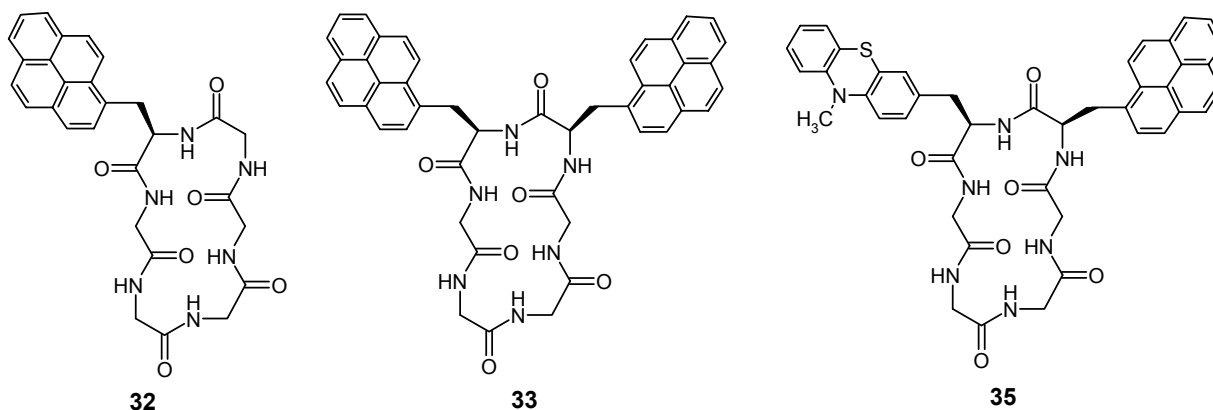


Abb. 2-49: Cyclische Hexapeptide **32**, **33** und **35**.

Im Gegensatz dazu gelingt die Cyclisierung des linearen zweifach Pyren-funktionalisierten Peptids **19d** mit keinem der aufgeführten Ringschlussverfahren (Abbildung 2-50).

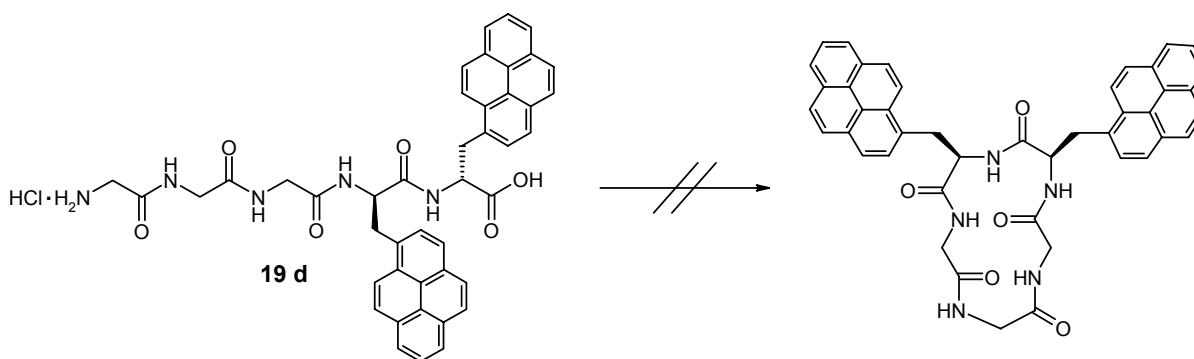
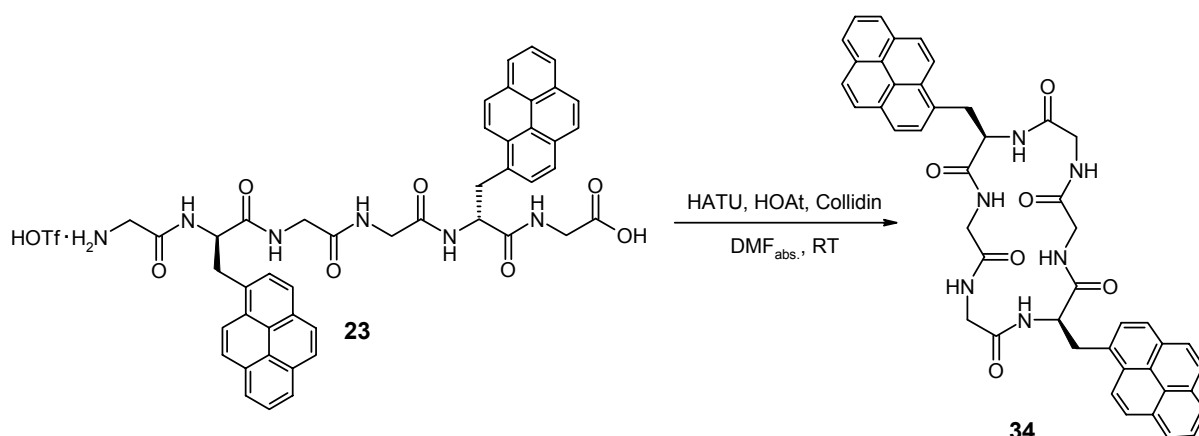


Abb. 2-50: Missglückte Cyclisierung des linearen Pentapeptids **19d**.

<sup>163</sup> A. Berg, J. Lam, P. E. Hansen, *Acta. Chem. Scand. Ser. B* **1986**, 40, 665.

Dies mag einerseits an der Kürze der Peptidsequenz, vor allem aber am sterischen Anspruch der benachbarten endständigen *D*-Pya-Reste liegen.

Die cyclischen Peptide **33**, **35** und **36** sind auch mittels der, an der Festphase dargestellten, linearen Peptide **20e**, **21e** bzw. **24e** zugänglich. Die HATU/HOAt-Cyclisierungsausbeuten unterscheiden sich, nach Festphasensynthese bzw. Darstellung in Lösung, kaum (Tabelle 2-6). Das Cyclohexapeptid **34** wird ausschließlich anhand der, auf festphasensynthetischem Wege erhaltenen, Verbindung **21** synthetisiert (80 % Ausbeute, farbloser Feststoff), was in Abbildung 2-51 festgehalten ist.



**Abb. 2-51:** Synthese des cyclischen Hexapeptids **34** nach der HATU/HOAt-Methode.

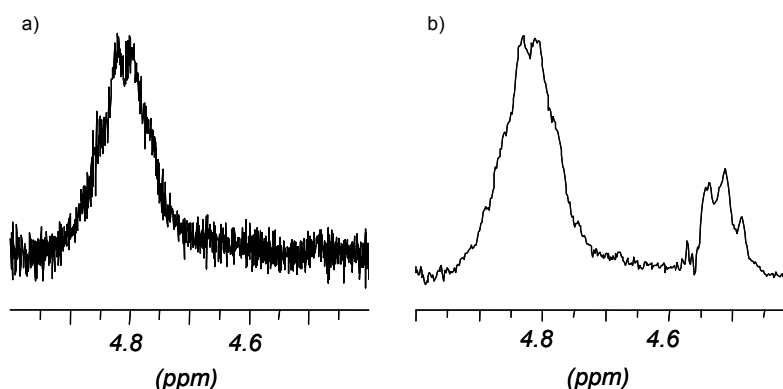
Die Verwendung der festphasensynthetisch dargestellten Edukte hat, wie bereits mehrfach erwähnt,<sup>164</sup> deutliche Vorteile gegenüber den in Lösung erhaltenen Spezies. Wie bei der Hairpinsynthese können auch bei der Darstellung der Cyclopeptide wesentlich höhere „over-all“-Ausbeuten erzielt werden (Tabelle 2-6).

Analytische HPLC-Experimente zeigen zudem, dass nach Einsatz der Festphasen-Edukte keine Nebenprodukte mit hydrierten Pyrensubstituenten auftreten.

Ein weiterer Vorzug ist, dass nach der Festphasensynthese in den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der cyclischen Peptide keine Signale diastereomerer Produkte auftreten. Dies wird am Beispiel der auf beiden Synthesewegen synthetisierten Verbindungen **33** und **35** deutlich, was exemplarisch anhand des Peptids **33** in Abbildung 2-52 gezeigt ist. Die Signale der Protonen an den zwei chiralen Zentren des Moleküls sind zu Multiplettsignalen überlagert, wobei nach Festphasensynthese nur ein, nach Synthese in Lösung jedoch zwei Multipletts erscheinen. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Cyclohexapeptids **34** werden keine Signalaufspaltungen detektiert, was auf einen

<sup>164</sup> Siehe Kapitel 2.3.2 und 2.4.2.

Diastereomerenüberschuss von  $> 98 \%$  schließen lässt. Allerdings fehlt hier der Vergleich mit der Syntheseroute in Lösung. Beim cyclischen Octapeptid **36** sind in beiden Fällen keine Signale zu sehen, die eindeutig für eine Diastereomerenbildung sprechen. Aus diesem Befund lassen sich keine zweifelsfreien Schlüsse ziehen.



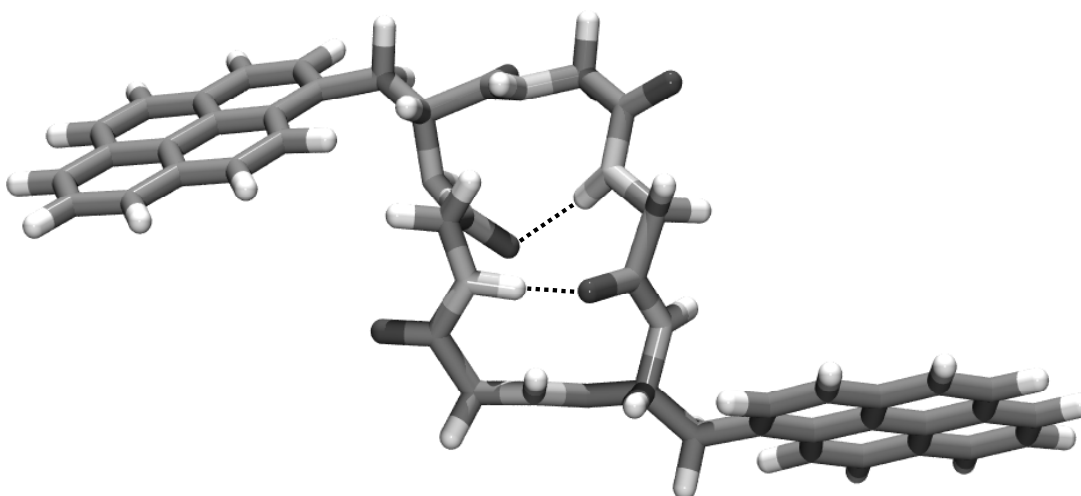
**Abb. 2-52:**  $^1\text{H}$ -NMR-Multiplettsignal der Protonen an den zwei chiralen Zentren des Cyclopeptids **33**, a) nach Festphasensynthese b) nach Synthese in Lösung (Die ungleiche Spektrenqualität ist auf unterschiedliche Substanzmengen bei der Aufnahme der Spektren zurückzuführen.).

Tabelle 2-6 fasst die erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich der Produktausbeute und, soweit möglich, der Racemisierung zusammen.

Cyclopeptid	Edukt	Cyclisierungs- Ausbeute	„over-all“- Ausbeute <sup>149</sup>	Diastereomeren - Überschuss
<b>32</b>	<b>19d</b>	78 %	29 %	
<b>33</b>	<b>20d</b>	72 %	24 %	58 %
	<b>20e</b>	76 %	60 %	$> 95 \%$
<b>34</b>	<b>23</b>	80 %	60 %	
<b>35</b>	<b>21d</b>	72 %	20 %	69 %
	<b>21e</b>	74 %	50 %	$> 95 \%$
<b>36</b>	<b>24d</b>	58 %	13 %	
	<b>24e</b>	57 %	41 %	

**Tab. 2-6:** Cyclisierungsausbeuten, „over-all“-Ausbeuten und Diastereomerenüberschüsse bei der Darstellung cyclischer Peptide aus den entsprechenden Edukten.

Die dargestellten cyclischen Peptide beinhalten alle zumindest eine turn-induzierende *D*-Aminosäure. Gerade die cyclischen Hexapeptide **32** und **34** sollten daher neben anderen möglichen Konformationen eine Struktur mit zwei  $\beta$ -Schleifen bevorzugen, die die *D*-Pya-Einheiten jeweils an der Stelle  $i+1$  der  $\beta$ -turns beinhalten (siehe auch Abbildung 2-46).<sup>155</sup> Auf der Grundlage dieser Annahme wird eine mögliche Konformation der Verbindung cyclo-(Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly) (**34**) semiempirisch auf PM3-Niveau berechnet, wobei die  $\psi$ - und  $\phi$ -Winkel der, an den  $\beta$ -Schleifen beteiligten, Aminosäurereste festgelegt sind (Abbildung 2-53).



**Abb. 2-53:** Semiempirisch auf PM3-Niveau energieminierte mögliche  $\beta$ , $\beta$ -Konformation von cyclo-(Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly) (**34**). Die erwarteten H-Brücken sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Um Wasserstoffbrückenbindungen in einer möglicherweise ausgebildeten Vorzugskonformation des Peptids **34** detektieren zu können, werden temperaturabhängige <sup>1</sup>H-NMR-Messungen in einem Temperaturbereich von 294 K bis 393 K durchgeführt. In Analogie zum bereits diskutierten Hairpinpeptid **31**<sup>165</sup> treten jedoch auch hier nur Temperaturgradienten ( $\Delta\delta/\Delta T$ ) der NH-Protonen von  $> 4 \times 10^{-3}$  ppm/K auf. Dies spricht wiederum nicht für intramolekulare H-Brücken bzw. die Ausbildung einer diskreten Vorzugskonformation im cyclischen Peptid **34**.

Genaue konformative Studien mittels zweidimensionaler NMR-Methoden werden für die cyclischen Peptide nicht durchgeführt. Derartige Untersuchungen erscheinen,

<sup>165</sup> siehe Kapitel 2.4.2.2.

aufgrund der gegebenen Molekülsymmetrien und daraus resultierenden Signalüberlagerungen in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren, als wenig erfolgversprechend.<sup>166</sup>

---

<sup>166</sup> Nico Schmiedeberg (AK Prof. H. Kessler, TU München), persönliche Mitteilung.

## 3 Elektrochemie

### 3.1 Allgemeines

Die synthetisierten chromophorfunktionalisierten Peptide beinhalten mit Pyren und *N*-Methylphenothiazin elektrochemisch aktive Substituenten. Die Charakterisierung der elektrochemischen Eigenschaften dieser Verbindungen erfolgt durch Cyclovoltammetrie, Squarewavevoltammetrie und UV/Vis-Spektroelektrochemie.

Um die dargestellten Spezies zur Generierung von elektrochemisch induzierter Lumineszenz (ECL)<sup>167</sup> zu verwenden ist eine reversible Reduzierbarkeit bzw. Oxidierbarkeit von entscheidender Bedeutung. Die Cyclovoltammetrie (CV) erlaubt hier, neben Betrachtung der Thermodynamik und Kinetik, auch Aussagen zur Reversibilität der elektrochemischen Prozesse.<sup>168</sup>

Gegebenenfalls auftretende Wechselwirkungen zwischen elektroaktiven Substrukturen sind ebenso von Interesse. Durch Vergleich der Potentiallagen disubstituierter Systeme mit den Potentiallagen monosubstituierter Analoga kann entschieden werden, ob eine isolierte Betrachtung von Teilstrukturen zulässig ist.

Die CV-Messungen werden in speziell gereinigtem THF oder DMSO bei Konzentrationen von ca.  $10^{-3}$  M durchgeführt. Um eine ausreichende Leitfähigkeit zu gewährleisten und Migrationsströme zu verhindern, wird den Messlösungen Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat (TBAHFP) als Leitsalz beigelegt. Die Messvorrichtung besteht aus einer Dreielektrodenanordnung mit einer Platin-Arbeits- und -Gegenelektrode sowie einer Ag/AgCl-pseudo-Referenzelektrode. Die Angabe der Potentialwerte erfolgt gegen Ferrocen/Ferrocenium ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ) als internem Standard. Bei gleicher Messanordnung werden neben den CV- auch Squarewavevoltammetrie- (SV) Spektren aufgenommen, die ebenso die Lage der Oxidations- bzw. Reduktionspotentiale wiedergeben.<sup>169</sup>

Die Durchführung von UV/Vis/NIR-Spektroelektrochemie-Messungen erlaubt genauere Studien von Wechselwirkungen zwischen beteiligten Substrukturen. Dieses Verfahren ermöglicht die Detektion spektraler Änderungen einer Spezies im Laufe elektrochemischer Prozesse. Zusätzlich sind Aussagen über die Reversibilität und Einheitlichkeit der beobachteten Redoxvorgänge möglich. Die Aufnahme der

---

<sup>167</sup> ECL-Untersuchungen finden sich in Kapitel 6 dieser Arbeit.

<sup>168</sup> J. Heinze, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 823.

<sup>169</sup> J. Osteryoung, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 77.

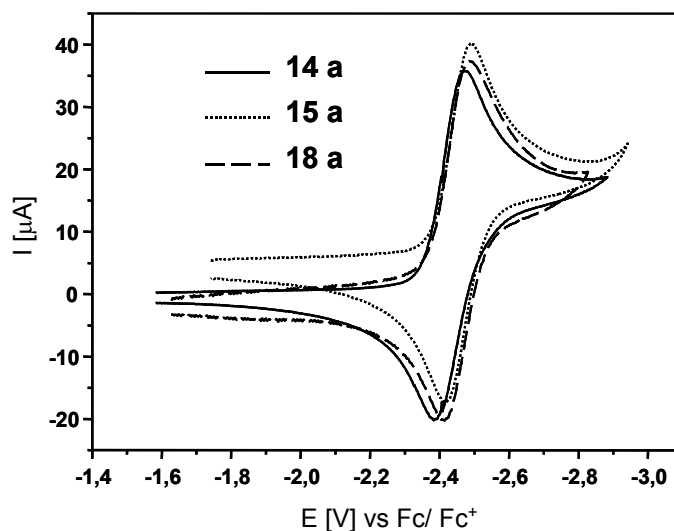


UV/Vis/NIR-Spektren erfolgt in einer Dünnschichtdreielektrodenanordnung mit einer optisch transparenten Gold-Minigrid-Arbeits Elektrode.<sup>170</sup> Die Absorptionsspektren werden nach schrittweiser Veränderung des Potentials aufgezeichnet.

Im Folgenden werden die elektrochemischen Untersuchungen an vollständig charakterisierten Carboxyl- und Amino-geschützten linearen Peptiden bzw. Hairpinpeptiden sowie an cyclischen Peptiden diskutiert.<sup>171</sup>

## 3.2 Elektrochemische Eigenschaften monofunktionalisierter Peptidsysteme

### 3.2.1 Pyren-funktionalisierte Peptide



**Abb. 3-1:** Cyclovoltammogramme von Boc-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (**14a**), Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (**15a**) und Boc-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (**18a**) in DMSO/TBAHFP; Vorschubgeschwindigkeit: 250 mV/s.

Die Cyclovoltammogramme der einfach Pyren-funktionalisierten linearen Peptide **14a**, **15a** und **18a** in DMSO sind in Abbildung 3-1 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die

<sup>170</sup> Näheres zur Messanordnung findet sich im *Experimentellen Teil* (Kapitel 8) dieser Arbeit.

<sup>171</sup> Die Aminosäuremonomere wurden bereits von M. Komma untersucht, weshalb die elektrochemischen Daten dieser Spezies ohne Diskussion in den Tabellen 3-1 und 3-2 des Kapitels 3.4 wiedergegeben werden:

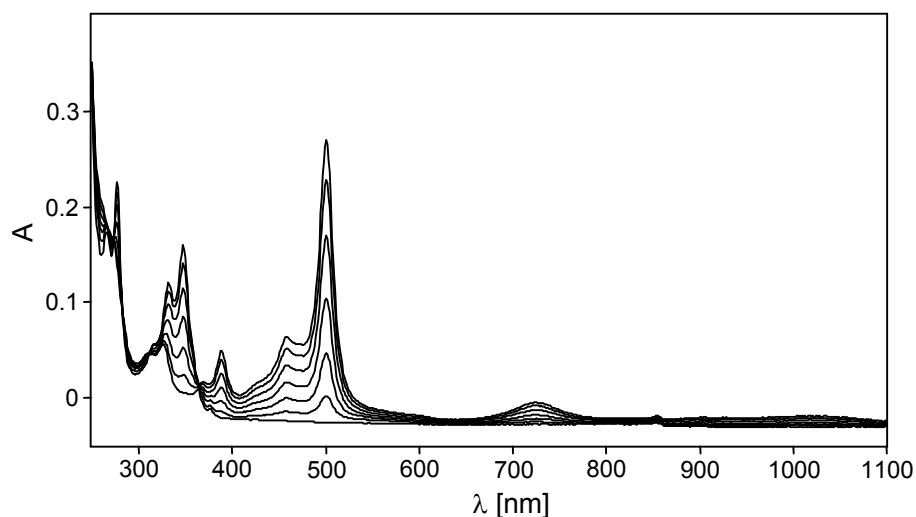
M. Komma, *Dissertation*, Universität Regensburg, 1999.

Pyrenreduktion von der jeweiligen Stellung des *D*-Pya-Restes in der Peptidsequenz nicht beeinflusst wird.

Die Reduktion der Pyrensubstrukturen erfolgt in DMSO quasireversibel bei einem Halbstufenpotential ( $E_{1/2}$ ) von -2430 mV (**14a**) bzw. -2450 mV (**15a** und **18a**) mit Peakpotentialseparationen ( $\Delta E$ ) von 86 mV (**14a**) bzw. 67 mV (**15a** und **18a**).<sup>172</sup> Die im Vergleich zum theoretischen Wert von 56 mV<sup>173</sup> erhöhten Peakpotentialseparationen stehen in Analogie zu unsubstituiertem Pyren in DMSO ( $\Delta E = 92$  mV). Das Halbstufenpotential von unsubstituiertem Pyren in DMSO liegt bei -2470 mV und belegt, dass der jeweilige Peptidbackbone der aufgeführten Peptide nur geringen Einfluss auf die Pyrenreduktion hat. Die für Pyren bekannte zweite Reduktionsstufe liegt bei allen Messungen außerhalb des Lösungsmittelfensters.

Dünnschichtexperimente über mehrere Zyklen belegen die Langzeitstabilität der reduzierten Spezies. Somit kann der elektrochemische Prozess mittels Spektroelektrochemie untersucht werden.

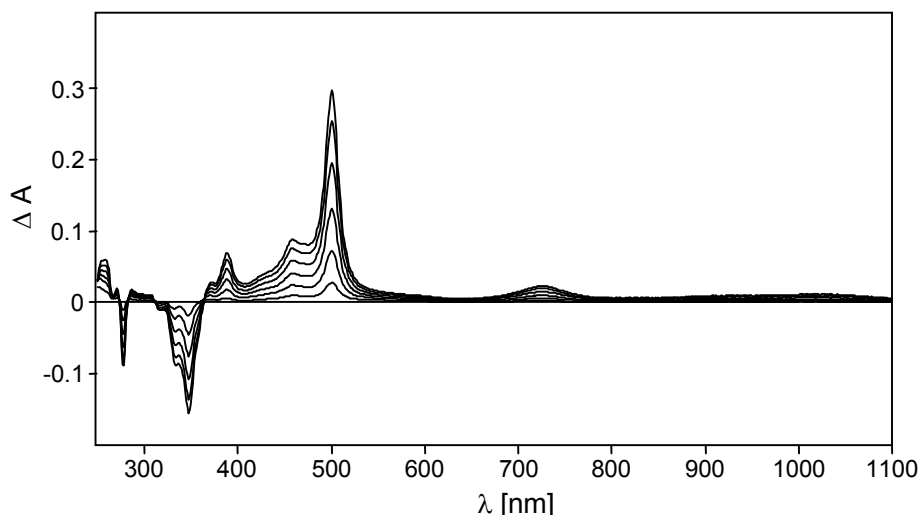
Die Pyren-derivatisierten Peptide zeigen auch bei diesen Messungen ausnahmslos identisches Verhalten. Im Vergleich zu dem Grundkörper Pyren können keine Unterschiede festgestellt werden (siehe Kapitel 3.4: Tabelle 3-1).



**Abb. 3-2:** UV/Vis/NIR-Spektroelektrochemie des Pyren-funktionalisierten  $\beta$ -Hairpinpeptids Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-OBzl (**29**) in DMSO/TBAHFP.

<sup>172</sup> Alle Pyren-monofunktionalisierten Peptide weisen sehr ähnliches CV-Verhalten auf. Dies ist in Kapitel 3.4 (Tabelle 3-1) belegt.

<sup>173</sup> C. H. Hamann, W. Vielstich, *Elektrochemie*, VCH, Weinheim, **1998**.



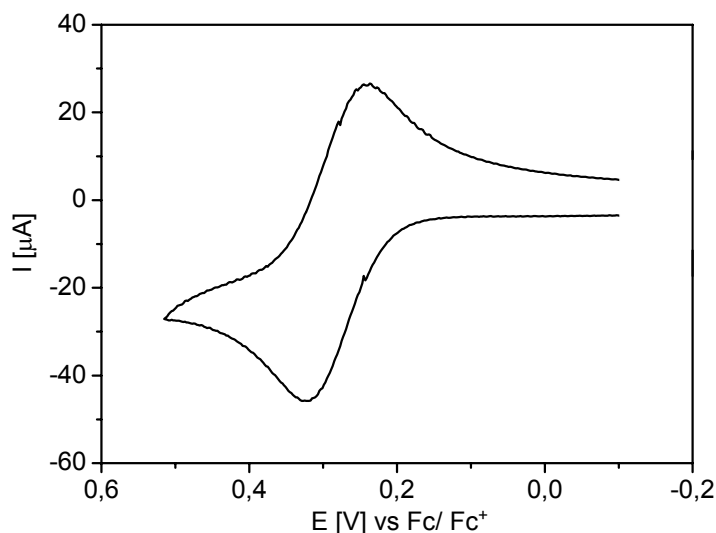
**Abb. 3-3:** UV/Vis/NIR-Differenzspektroelektrochemie des Pyren-funktionalisierten  $\beta$ -Hairpinpeptids Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-OBzl (**29**) in DMSO/TBAHFP.

Die UV/Vis/NIR-Spektroelektrochemie eines einfach Pyren-substituierten Peptidsystems ist in den Abbildungen 3-2 und 3-3 exemplarisch anhand des Hairpinpeptids **29** dargestellt. Die Reduktion verläuft einheitlich, was durch isosbestische Punkte bei 273, 312 und 364 nm dokumentiert wird. Im Laufe der elektrochemischen Reduktion nimmt die Intensität der Absorptionsbanden der Neutralverbindung bei 277, 315, 332 und 345 nm ab. Im Gegensatz dazu belegt das Herauswachsen der Banden bei 388, 459, 501 und 725 nm sowie im Bereich von 860 bis 1095 nm die Bildung des Radikalanions.

Das Ausgangsspektrum wird nach Rückoxidation zur Neutralspezies vollständig wiederhergestellt.

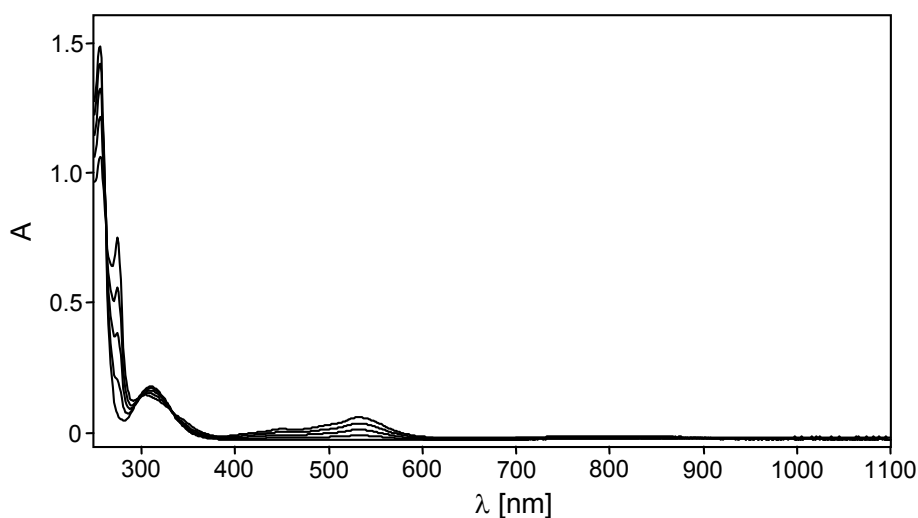
### 3.2.2 Phenothiazin-funktionalisiertes lineares Tripeptid **16a**

Das Tripeptid Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**16a**) zeigt in der cyclovoltametrischen Untersuchung einen reversiblen Prozess im oxidativen Bereich bei einem Halbstufenpotential von +280 mV (Abbildung 3-4). Gegenüber dem elektrochemisch aktiven Grundkörper *N*-Methyl-phenothiazin ( $E_{1/2} = +318$  mV,  $\Delta E = 101$  mV) ist die Oxidation um 38 mV erleichtert, was auf den schwach induktiven Effekt des Peptidrückgrads zurückgeführt werden kann. Die Peakpotentialseparation liegt für Spezies **16a** mit 87 mV etwa im Bereich des unsubstituierten *Chromophors*.

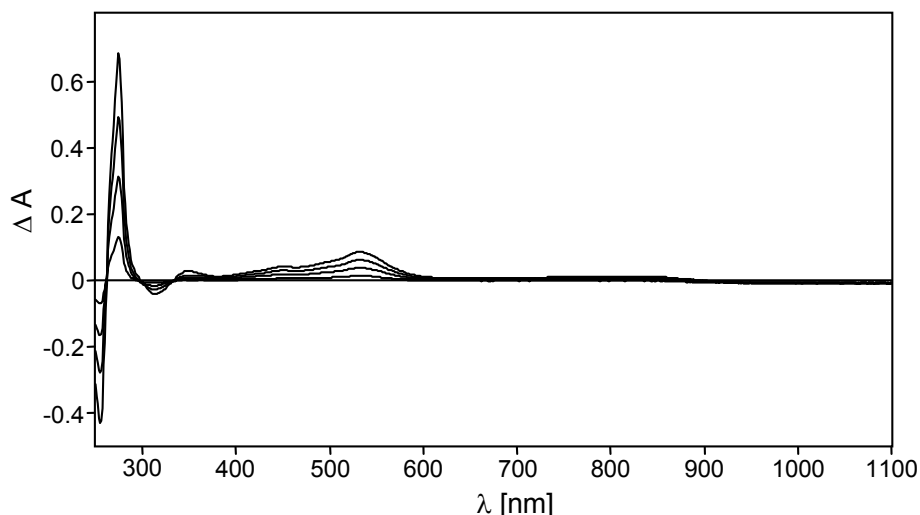


**Abb. 3-4:** Cyclovoltammogramm von Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**16a**) in DMSO/TBAHFP; Vorschubgeschwindigkeit: 250 mV/s.

Dünnschichtexperimente über mehrere Zyklen belegen die Stabilität der Oxidationsprodukte. Die UV/Vis/NIR-Spektroelektrochemie der Verbindung **16a** in DMSO liefert isosbestische Punkte bei 262, 299 und 333 nm, was die Einheitlichkeit der Oxidation belegt (Abbildung 3-5 und 3-6). Die Banden der Neutralverbindung bei 256 und 312 nm nehmen an Intensität ab, während die Absorptionsintensität der Radikalkation-Banden bei 275, 351, 446, 533 und 650-950 nm zunimmt. Das Spektrum der Neutralverbindung kann durch Rückreduktion vollständig wiederhergestellt werden.



**Abb. 3-5:** UV/Vis/NIR-Spektroelektrochemie von Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**16a**) in DMSO/TBAHFP.



**Abb. 3-6:** UV/Vis/NIR-Differenzspektroelektrochemie von Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**16a**) in DMSO/TBAHFP.

Der Vergleich mit Spektroelektrochemiedaten von *N*-Methyl-phenothiazin<sup>174</sup> bzw. des Aminosäurederivats **6**<sup>171</sup> weist für alle Verbindungen qualitativ gleiche spektrale Änderungen während des Oxidationsprozesses auf.

### 3.3 Elektrochemische Eigenschaften difunktionalisierter Peptidsysteme

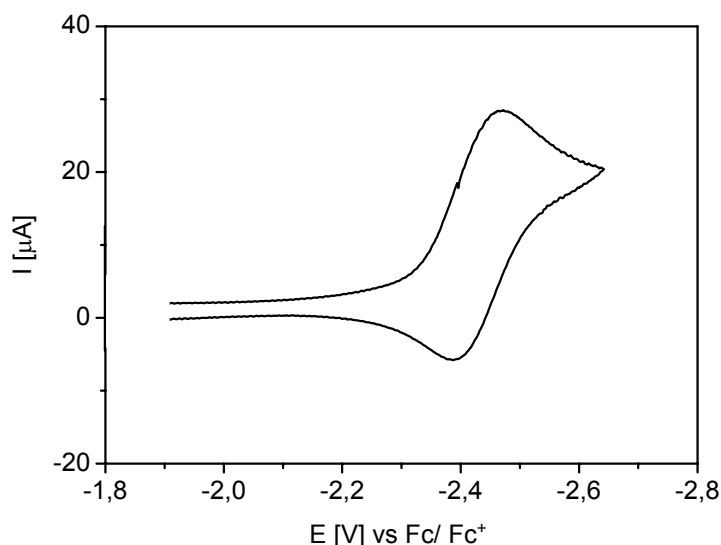
#### 3.3.1 Pyren-funktionalisierte Peptide

Die zweifach Pyren-funktionalisierten Peptide **19a**, **20a**, **22a**, **24a**, **30**, **33** und **34** zeigen in ihrem elektrochemischen Verhalten keinen Unterschied zu den monosubstituierten Peptiden (siehe Kapitel 3.4, Tabelle 3-1).<sup>175</sup> Das exemplarisch dargestellte Cyclovoltammogramm des cyclischen Hexapeptids **33** weist eine Reduktionswelle bei einem Halbstufenpotential von -2450 mV mit einer Peakpotentialseparation von 87 mV auf (Abbildung 3-7). Es wird jeweils ein Elektron pro Pyrenchromophor bei gleichem Potential übertragen, was zwei Elektronen pro Molekül entspricht. Anzeichen für eine elektronische Kopplung der Chromophoreinheiten können nicht detektiert werden.

<sup>174</sup> A. Knorr, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1995**.

<sup>175</sup> Das cyclische Octapeptid **36** wurde auf Grund seiner unzureichenden Löslichkeit nicht elektrochemisch untersucht.

Dieses Verhalten deckt sich mit verschiedenen anderen Verbindungen, die ebenfalls zwei Pyrensubstituenten beinhalten.<sup>176</sup>



**Abb. 3-7:** Cyclovoltammogramm von cyclo-(Gly-Gly-D-Pya-D-Pya-Gly-Gly) (**33**) in DMSO/TBAHFP; Vorschubgeschwindigkeit: 250 mV/s.

Die UV/Vis/NIR-Spektren der difunktionalisierten Peptide unterscheiden sich während der Pyrenreduktion nicht von denen der monofunktionalisierten Spezies (siehe Kapitel 3.4, Tabelle 3-2).<sup>177</sup> Anzeichen für Wechselwirkungen zwischen den Pyrensubstituenten treten auch hier nicht auf.

### 3.3.2 Pyren- und Phenothiazin-funktionalisierte Peptide

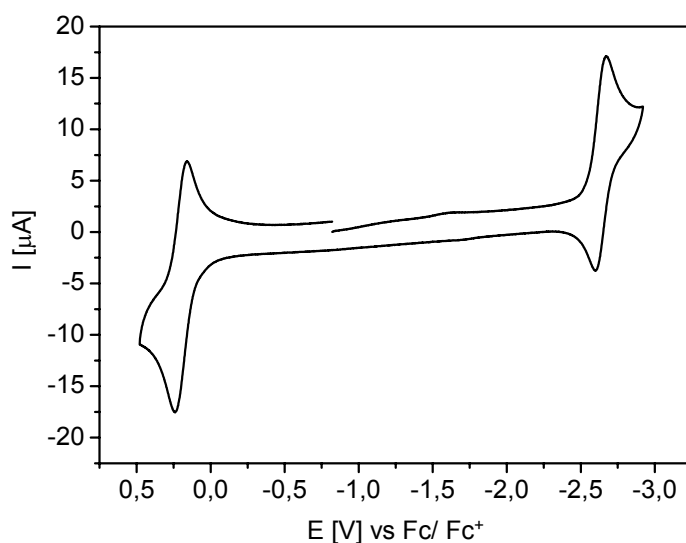
Die elektrochemische Untersuchung der Donor-Akzeptor-substituierten Peptide **31** und **35** soll Aufschluss darüber geben, ob eine Beeinflussung des Redoxverhaltens der Chromophore durch Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen zu beobachten ist.

Im Cyclovoltammogramm des Hairpinpeptids **31** in THF erkennt man die Oxidation der Phenothiazineinheit bei einem Halbstufenpotential von +240 mV (Abbildung 3-8). Des weiteren ist die erste Reduktion der Pyrensubstruktur bei -2580 mV zu beobachten. Es handelt sich jeweils um Einelektronenübertragungen.

<sup>176</sup> a) G. Beer, *Dissertation*, Universität Regensburg, **2001**;

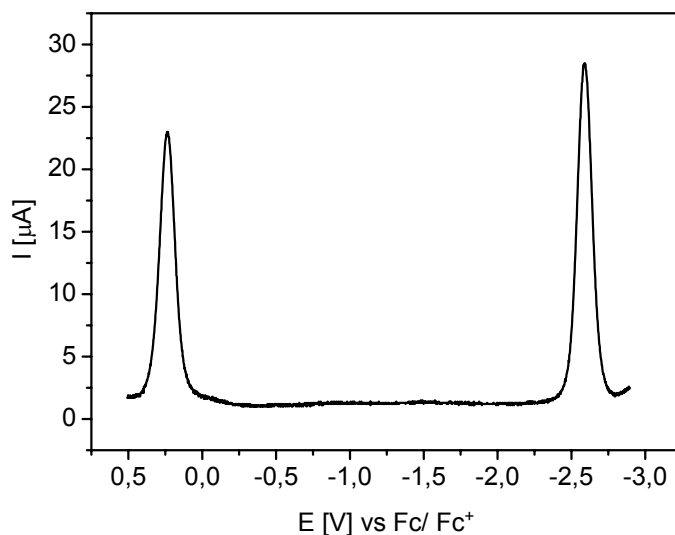
b) R. Engl, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1999**.

<sup>177</sup> Aufgrund der Analogie der mono- und disubstituierten Peptide wird von einer Abbildung der Spektroelektrochemie der zweifach pyrenfunktionalisierten Spezies abgesehen.



**Abb. 3-8:** Cyclovoltammogramm des Donor-Akzeptor-substituierten  $\beta$ -Hairpinpeptids Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**31**) in THF/TBAHFP; Vorschubgeschwindigkeit: 250 mV/s.

In Abbildung 3-9 ist mit dem Squarewave-Spektrum des Hairpinpeptids **31** eine alternative Darstellung der elektrochemischen Prozesse wiedergegeben, die allerdings CV-analoge Ergebnisse liefert.

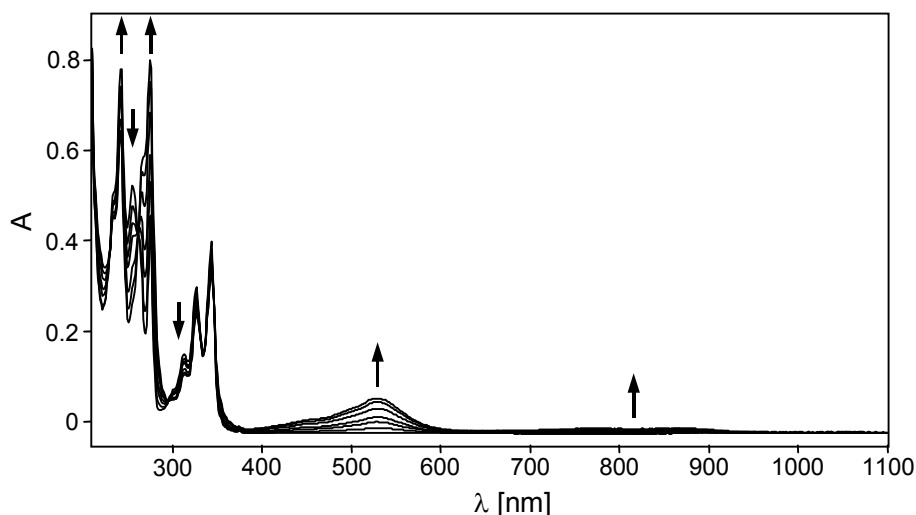


**Abb. 3-9:** Squarewavevoltammogramm des Donor-Akzeptor-substituierten  $\beta$ -Hairpinpeptids Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**31**) in THF/TBAHFP; Vorschubgeschwindigkeit: 250 mV/s.

Ein Vergleich mit den Potentiallagen der isolierten Chromophore *N*-Methylphenothiazin ( $E_{1/2} = +325 \text{ mV}$ )<sup>176</sup> und Pyren ( $E_{1/2} = -2535 \text{ mV}$ )<sup>174</sup> zeigt, dass die Oxidation im Peptid geringfügig erleichtert, die Reduktion allerdings etwas erschwert ist. Dies ist hauptsächlich auf schwache induktive Effekte des Peptidrückgrads zurückzuführen.

Man beobachtet bei Verbindung **31** sowohl für den Oxidationsprozess ( $\Delta E = 76 \text{ mV}$ ) als auch für den Reduktionsprozess ( $\Delta E = 70 \text{ mV}$ ) eine, im Vergleich zum theoretischen Wert von  $58 \text{ mV}$ , erhöhte Peakpotentialseparation. Dies ließe sich als elektronische Wechselwirkung zwischen der Donor- und Akzeptorstruktur interpretieren. Die bisher diskutierten Ergebnisse zeigen jedoch, dass bei den vorliegenden experimentellen Bedingungen auch für den Fall isoliert auftretender Chromophore ein erhöhter Wert für die Peakpotentialseparation zu beobachten ist. Eine Wechselwirkung zwischen den elektrochemisch aktiven Substrukturen ist daher unwahrscheinlich. Der Peptidbackbone der betrachteten Peptide verhält sich elektrochemisch inert.

Die UV/Vis/NIR-Spektroelektrochemie-Ergebnisse der heterofunktionalisierten Peptide decken sich vollständig mit den Daten der homofunktionalisierten Analoga. Unabhängig vom gewählten Lösungsmittel ergeben sich keine Hinweise auf elektronische Kopplungen der Subchromophore.



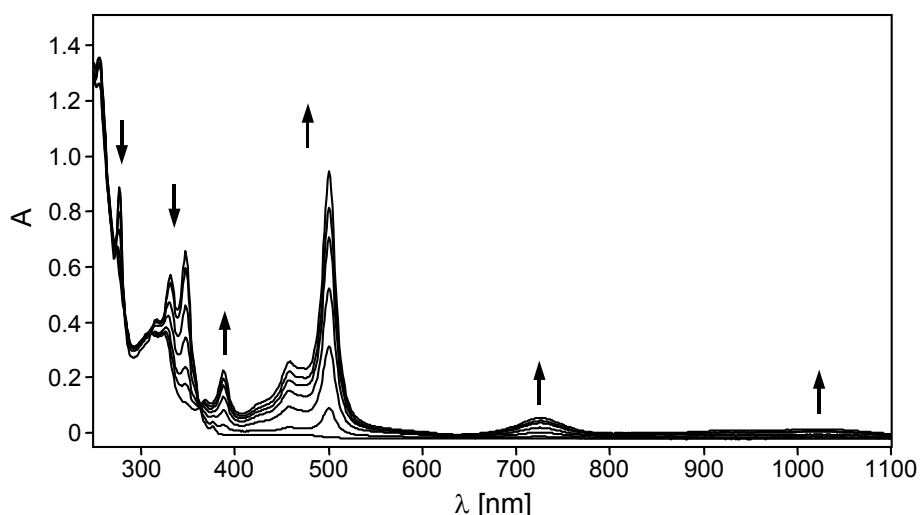
**Abb. 3-10:** UV/Vis/NIR-Spektroelektrochemie der Oxidation des Donor-Akzeptor-substituierten  $\beta$ -Hairpinpeptids Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**31**) in THF/TBAHFP.



Zur Verdeutlichung sind die UV/Vis/NIR-Spektren der Oxidation in THF (Abbildung 3-10) bzw. der Reduktion in DMSO (Abbildung 3-11) von Verbindung **31** dargestellt.<sup>178</sup>

Während des Oxidationsprozesses erfolgt der Rückgang der Neutralbanden bei 256 und 312 nm, während bei 243, 275, 446, 528 und 650-930 nm Radikalkationbanden herauswachsen. Isosbestische Punkte werden bei 262, 296 und 346 nm beobachtet. Die Absorptionscharakteristik der Pyrensubstruktur bleibt durch die Oxidation nahezu unbeeinflusst.

Im Falle der Reduktion der Pyrenteilstruktur in DMSO (Abbildung 3-11) verschwinden die Banden der Neutralverbindung bei 277, 316, 332 und 348 nm. Radikalanionbanden entstehen bei 389, 459, 502, 727 und 850-1100 nm, wobei isosbestische Punkte bei 283, 311 und 363 nm auftreten. Die Absorption der Phenothiazineinheit bei 309 nm ist anfangs nahezu vollständig von der Pyrenabsorption überdeckt. Am Ende des Reduktionsprozesses ist sie jedoch deutlich erkennbar.



**Abb. 3-11:** UV/Vis/NIR-Spektroelektrochemie der Reduktion des Donor-Akzeptor-substituierten  $\beta$ -Hairpinpeptids Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**31**) in THF/TBAHFP.

Die cyclovoltammetrischen und spektroelektrochemischen Daten des ebenfalls heterofunktionalisierten cyclischen Hexapeptids **35** weichen kaum von den diskutierten Werten des Hairpinpeptids **31** ab (siehe Kapitel 3.4, Tabelle 3-1 und 3-2).

<sup>178</sup> Auf die Abbildung der Differenzspektren wird aufgrund der beschriebenen Analogie zu den homofunktionalisierten Peptiden verzichtet.

### 3.4 Zusammenfassung der elektrochemischen Untersuchungen

Eine zusammenfassende Darstellung der erhaltenen cyclovoltammetrischen Daten ist in Tabelle 3-1 gegeben.

Substan- z	Solvens	Reduktion:		Oxidation:	
		$E_{1/2}$ [mV]	$\Delta E$ [mV]	$E_{1/2}$ [mV]	$\Delta E$ [mV]
5	THF	-2570	95		
5	DMSO	-2430	100		
6	THF			+302	138
14a	DMSO	-2430	86		
15a	DMSO	-2450	67		
16a	DMSO			+280	87
18a	DMSO	-2450	67		
19a	DMSO	-2440	89		
20a	DMSO	-2450	96		
21a	DMSO	-2460	96	+280	91
22a	DMSO	-2450	87		
24a	DMSO	-2450	76		
29	DMSO	-2430	81		
30	DMSO	-2440	82		
31	THF	-2580	70	+240	76
31	DMSO	-2460	82	+270	90
32	DMSO	-2440	82		
33	DMSO	-2450	73		
34	DMSO	-2450	87		
35	DMSO	-2430	92	+290	96

**Tab. 3-1:** Ergebnisse der cyclovoltammetrischen Messungen; Vorschubgeschwindigkeit 250 mV/s ( $E_{1/2}$ : Halbstufenpotential gegen  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ;  $\Delta E$ : Peakpotentialseparation).

In den untersuchten linearen, cyclischen und Hairpin-Peptiden bleiben die elektrochemischen Eigenschaften der zugrundeliegenden Chromophoreinheiten weitgehend erhalten. Lediglich geringe induktive bzw. mesomere Effekte des jeweiligen Peptidrückgrades auf die entsprechenden Potentiallagen sind zu beobachten.

Die Peptidgrundstruktur erweist sich in allen Fällen als elektrochemisch inert und elektronisch isolierend.

In Verbindungen mit zwei elektrochemisch aktiven Substrukturen kann keine elektronische Kopplung der Untereinheiten detektiert werden.

Die Ergebnisse der spektroeletrochemischen Messungen sind in Tabelle 3-2 gesammelt.

Substanz	elektrochem. Prozess	Solvens	Absorptionsbanden [nm]	isosbestische Punkte [nm]
16a	Oxidation	THF	256↓, 275↑, 312↓, 351↑, 446↑, 533↑, 650-950↑	262, 299, 333
18a	Reduktion	DMSO	276↓, 314↓, 331↓, 345↓, 389↑, 457↑, 500↑, 730↑, 850-1100↑	273, 313, 367
29	Reduktion	DMSO	277↓, 315↓, 332↓, 345↓, 388↑, 459↑, 501↑, 725↑, 860-1095↑	273, 312, 364
30	Reduktion	DMSO	276↓, 314↓, 332↓, 345↓, 388↑, 457↑, 503↑, 729↑, 860-1100↑	273, 312, 366
31	Reduktion	THF	275↓, 314↓, 330↓, 348↓, 385↑, 458↑, 500↑, 724↑, 850-1100↑	279, 311, 363
	Oxidation	THF	243↑, 256↓, 275↑, 312↓, 446↑, 528↑, 650-930↑	262, 296, 346
31	Reduktion	DMSO	277↓, 316↓, 332↓, 348↓, 389↑, 459↑, 502↑, 727↑, 850-1100↑	283, 311, 363
	Oxidation	DMSO	256↓, 278↑, 313↓, 448↑, 535↑, 650-950↑	263, 300, 343
32	Reduktion	DMSO	278↓, 316↓, 333↓, 348↓, 389↑, 459↑, 503↑, 732↑, 850-1100↑	274, 315, 370

33	Reduktion	DMSO	278↓, 315↓, 332↓, 348↓, 390↑, 458↑, 502↑, 731↑, 850-1100↑	274, 314, 370
34	Reduktion	DMSO	277↓, 314↓, 333↓, 347↓, 389↑, 458↑, 503↑, 729↑, 850-1100↑	273, 314, 370
35	Reduktion	DMSO	278↓, 316↓, 332↓, 348↓, 390↑, 459↑, 502↑, 728↑, 850-1100↑	284, 312, 365
	Oxidation	DMSO	257↓, 278↑, 314↓, 450↑, 537↑, 650-950↑	266, 304, 346

**Tab. 3-2:** Ergebnisse der spektroelektrochemischen Messungen (↓ = Intensitätsabnahme bzw. ↑ = Intensitätszunahme im Laufe des elektrochemischen Prozesses).

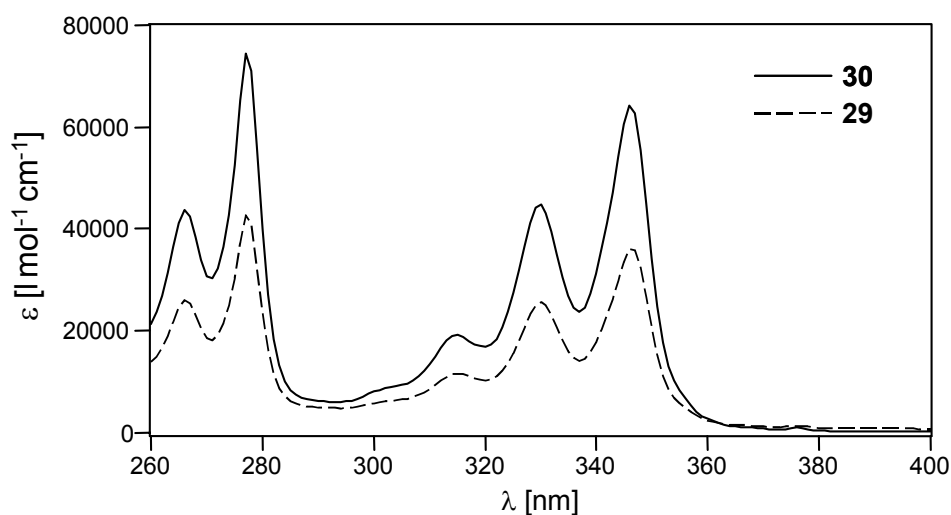
## 4 Absorptionsspektroskopie und Circular dichroismus

### 4.1 Absorptionsspektroskopie

Die UV/Vis-Absorptionsspektroskopie stellt ein geeignetes Verfahren dar, um elektronische Kopplungen zwischen chromogenen Teilstrukturen eines Moleküls im Grundzustand zu detektieren. Derartige Kopplungsphänomene sind durch das Auftreten von Banden erkennbar, die sich nicht durch eine einfache additive Überlagerung der UV/Vis-Spektren der im Molekül enthaltenen Subchromophore ergeben. Im Falle von deutlichen Bandenverschiebungen oder Bandenneubildungen ist eine isolierte Betrachtung der Untereinheiten nicht mehr möglich und die Verbindung ist als Spezies mit neuen optischen Eigenschaften anzusehen.

Wie bei den elektrochemischen Experimenten werden auch in der Absorptions- und Circular dichroismus-Spektroskopie (siehe Kapitel 4.2) nur geschützte lineare Peptide bzw. Hairpinpeptide sowie cyclische Peptide untersucht.

#### 4.1.1 Absorptionseigenschaften Pyren-funktionalisierter Peptide



**Abb. 4-1:** Absorptionsspektren der einfach bzw. zweifach Pyren-funktionalisierten  $\beta$ -Hairpinpeptide Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-OBzl (**29**) und Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (**30**) in DMSO.

Die UV/Vis-Spektren der Pyren-funktionalisierten Peptide sind durch die intensitätsstarken schwingungsaufgespaltenen Übergänge der Pyrensubstituenten

geprägt.<sup>179</sup> Aufgrund der Anbindung des Peptidrückgrats ergeben sich, im Vergleich zum unsubstituierten Chromophor, lediglich geringfügige bathochrome Verschiebungen der Absorptionsbanden. Die relativ schwache Absorption der Peptidbindungen im kurzwelligen Spektralbereich (< 250 nm) wird nicht detektiert.<sup>180</sup>

Peptide	Absorptionsbanden $\lambda_{\max}$ [nm] (lg $\epsilon$ )
<b>14 a</b>	265 (4.29), 276 (4.51), 300 (3.67), 315 (3.95), 330 (4.29), 345 (4.44)
<b>15 a</b>	266 (4.34), 278 (4.56), 301 (3.70), 315 (4.00), 330 (4.34), 346 (4.51)
<b>17 a</b>	265 (4.33), 276 (4.56), 303 (3.69), 315 (4.00), 330 (4.34), 346 (4.50)
<b>18 a</b>	265 (4.34), 277 (4.57), 301 (3.71), 316 (4.00), 330 (4.35), 347 (4.52)
<b>19 a</b>	267 (4.74), 278 (4.95), 303 (4.08), 316 (4.39), 330 (4.75), 347 (4.88)
<b>20 a</b>	267 (4.73), 278 (4.95), 303 (4.11), 316 (4.39), 330 (4.74), 347 (4.86)
<b>22 a</b>	267 (4.75), 278 (5.00), 302 (4.19), 316 (4.45), 330 (4.78), 346 (4.90)
<b>24 a</b>	267 (4.69), 278 (4.90), 303 (4.14), 316 (4.27), 330 (4.59), 347 (4.81)
<b>26 a</b>	266 (4.40), 277 (4.62), 301 (3.79), 315 (4.08), 330 (4.39), 347 (4.57)
<b>29</b>	266 (4.41), 277 (4.63), 301 (3.77), 315 (4.06), 330 (4.41), 347 (4.56)
<b>30</b>	266 (4.64), 277 (4.87), 301 (3.92), 315 (3.28), 330 (4.65), 346 (4.81)
<b>32</b>	267 (4.33), 278 (4.57), 303 (3.65), 316 (3.99), 330 (4.36), 346 (4.52)
<b>33</b>	267 (4.78), 278 (4.99), 303 (4.12), 316 (4.43), 330 (4.79), 347 (4.93)
<b>34</b>	267 (4.73), 278 (5.00), 302 (4.18), 316 (4.44), 330 (4.76), 346 (4.91)
<b>36</b>	267 (4.72), 278 (4.94), 303 (4.18), 316 (4.30), 330 (4.62), 347 (4.77)

**Tab. 4-1:** Lage und Intensität der Absorptionsbanden Pyren-funktionalisierter Peptide in DMSO.<sup>181</sup>

Disubstituierte Peptide unterscheiden sich von ihren monofunktionalisierten Analoga nur durch entsprechend höhere Extinktionskoeffizienten. Bandenverschiebungen bzw. Bandenneubildungen, die auf Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten

<sup>179</sup> a) D. A. van Dyke, B. A. Pryor, P. G. Smith, M. R. Topp, *J. Chem. Edu.* **1998**, 75, 615;

b) R. Engl, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1999**;

c) A. Knorr, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1995**.

<sup>180</sup> A. O. Doroshenko, V. T. Skripkina, E. A. Posokhov, E. N. Obukhara, V. M. Shershukov, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1997**, 33, 865.

<sup>181</sup> Um die Absorptionsspektren der einzelnen Peptide vergleichen zu können sind nur Daten aus Messungen in DMSO aufgeführt. Dies ist aufgrund fehlender signifikanter Solvenseinflüsse auf Spektrenform und -lage gerechtfertigt.

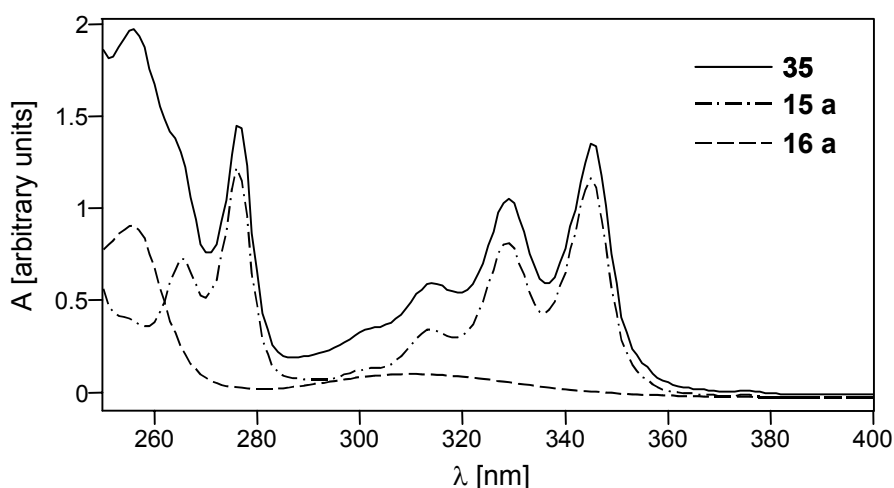
hindeuten ergeben sich dabei nicht. In Abbildung 4-1 ist dies exemplarisch anhand der UV/Vis-Spektren der einfach bzw. zweifach Pyren-substituierten Hairpinpeptide **29** und **30** illustriert.

Messungen in anderen Solventien wie THF und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  lassen keine signifikante Lösungsmittelabhängigkeit erkennen.

Die gesammelten Ergebnisse der UV/Vis-Absorptionsuntersuchungen an Pyren-substituierten Peptiden sind in Tabelle 4-1 aufgeführt.

#### 4.1.2 Absorptionseigenschaften Pyren- und Phenothiazin-funktionalisierter Peptide

Die UV/Vis-Spektren der Pyren-Phenothiazin-funktionalisierten Peptide **21a**, **31** und **35** setzten sich additiv aus den Banden der integrierten Chromophore zusammen. Abbildung 4-2 zeigt dies anhand des Donor-Akzeptor-substituierten Cyclopeptids **35** und den monofunktionalisierten linearen Tripeptiden **15a** bzw. **16a**. Die Phenothiazin-Absorptionsbande bei 310 nm ist, im Falle der cyclischen Verbindung **35** durch die intensiveren Pyrenabsorptionen überlagert, wohingegen die Phenothiazin-Absorptionsbande bei 256 nm eindeutig zu erkennen ist.



**Abb. 4-2:** Absorptionsspektren der Verbindungen Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (**15a**) Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**16a**) und cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly) (**35**) in DMSO (zur besseren Übersicht sind die Absorptionsintensitäten der Einzelverbindungen angepasst).

Somit kann in der Absorptionsspektroskopie keine elektronische Wechselwirkung der jeweiligen Substrukturen innerhalb der Peptidsysteme festgestellt werden.

Lösungsmittelabhängige Veränderungen der Bandenlage und Bandenform, wie sie für Charge-Transfer-Übergänge aus dem Grundzustand zu erwarten wären, ergeben sich ebenfalls nicht.

Tabelle 4-2 gibt die absorptionsspektroskopischen Daten der Phenothiazin- sowie der Pyren-Phenothiazin-funktionalisierten Peptide wieder.

Peptide	Absorptionsbanden $\lambda_{\max}$ [nm] (lg $\epsilon$ )
16 a	255 (4.65), 309 (3.87)
21 a	256 (4.63), 266 (4.57), 277 (4.62), 301 (3.96), 315 (4.22), 330 (4.46), 347 (4.59)
27 a	256 (4.65), 310 (3.84)
31	257 (4.63), 265 (4.58), 277 (4.64), 302 (3.96), 315 (4.21), 330 (4.47), 347 (4.58)
35	256 (4.62), 267 (4.56), 278 (4.64), 302 (3.94), 316 (4.19), 330 (4.45), 347 (4.58)

**Tab. 4-1:** Lage und Intensität der Absorptionsbanden Phenothiazin- bzw. Pyren-Phenothiazin-funktionalisierter Peptide in DMSO.

## 4.2 Circular dichroismus

Chiroptische Messverfahren stellen geeignete Werkzeuge zur Untersuchung chiraler Verbindungen dar, da sie für Enantiomere jeweils Messwerte entgegengesetzten Vorzeichens liefern. So ermöglicht die Circular dichroismus- (CD) Spektroskopie<sup>182</sup> den Einfluß der optischen Aktivität eines Moleküls auf angebundene Chromophore zu studieren.

Im Falle von Peptiden und Proteinen wird diese Methode auch zur Detektion spezieller Sekundärstruktur motive herangezogen.<sup>183</sup> Die CD-Spektren  $\alpha$ -helicaler Peptide beispielsweise zeigen charakteristische Linienformen mit einem doppelten Minimum bei 222 nm und 206 nm sowie einem Maximum bei 190 nm. Allerdings ist für derartige

<sup>182</sup> a) K. Nakanishi, N. Berowa, R. W. Woody, *Circular Dichroism*, VCH, Weinheim, **1994**;

b) G. Snatzke, *Chem. Unserer Zeit* **1981**, 79;

c) G. Snatzke, *Chem. Unserer Zeit* **1982**, 161.

<sup>183</sup> a) M. Sisido, R. Tanaka, Y. Inai, Y. Imanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6790;

b) Y. Inai, M. Sisido, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 3847;

c) S. Vuilleumier, M. Mutter, *Biopolymers* **1993**, *33*, 389.

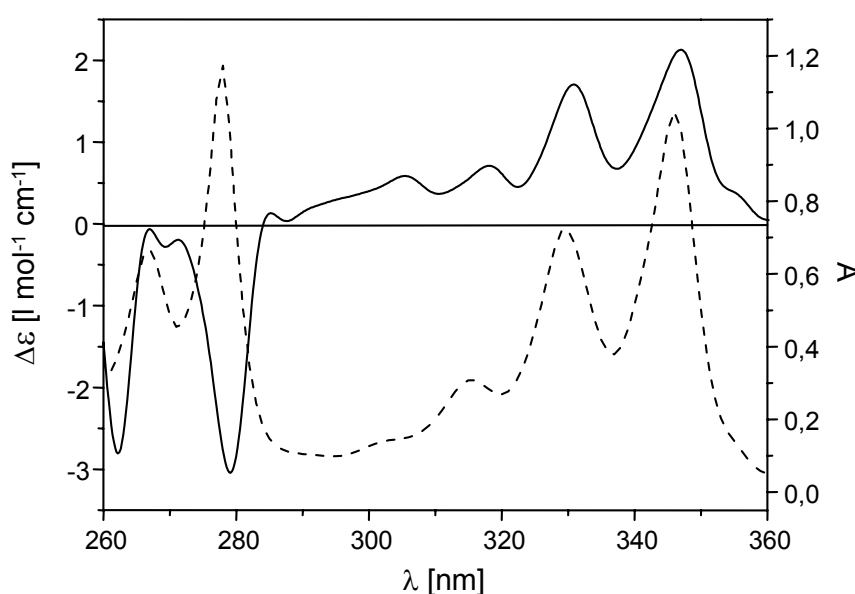


Untersuchungen die Löslichkeit der entsprechenden Spezies in Lösungsmitteln hoher optischer Transparenz (z.B. Wasser oder Trimethylphosphat) erforderlich.

Im folgenden wird mittels CD-Spektroskopie die Übertragung chiraler Information auf chromophore Teilstrukturen in cyclischen und hairpinanalogen Peptiden übergeprüft.<sup>184</sup>

Aufgrund ungenügender Löslichkeit der genannten Peptide in adäquaten Lösungsmitteln können Sekundärstrukturuntersuchungen nicht durchgeführt werden.

#### 4.2.1 Circular dichroismus chromophorsubstituierter cyclischer Peptide



**Abb. 4-3:** UV/Vis- (gestrichelt) und CD-Spektrum (durchgezogen) des cyclischen Peptids cyclo-(Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly) (**32**) in DMSO.

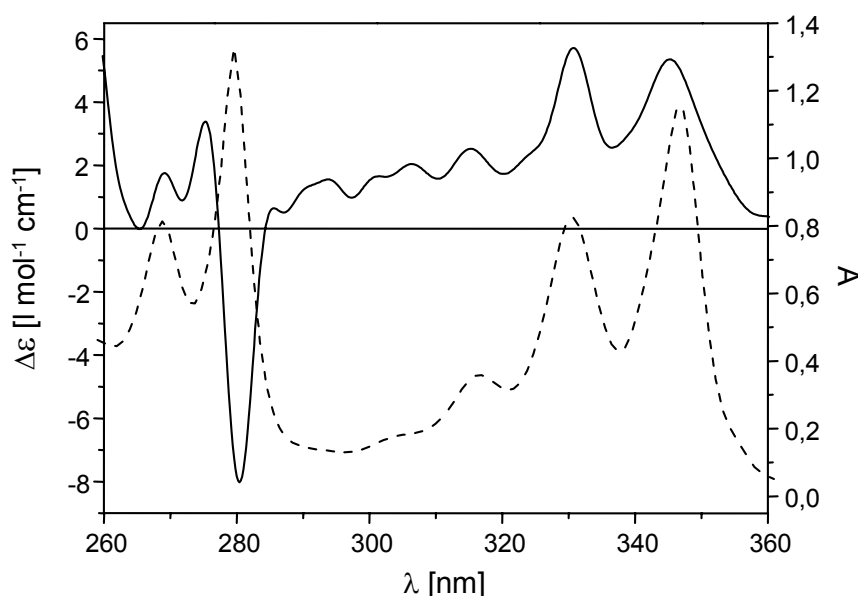
Allgemein ergeben sich in den CD-Spektren der dargestellten Peptidsysteme relativ kleine Cotton-Effekte. In manchen Fällen lässt ein daraus resultierendes geringes Signal-Rausch-Verhältniss eindeutige Interpretationen einzelner Banden nicht zu.

Abbildung 4-3 zeigt die Korrelation der Absorptions- und CD-Spektren des einfach Pyren-funktionalisierten Cyclopeptids **32** in DMSO. Die Analyse der Abbildung belegt, dass für alle in der Absorption zu beobachtenden Übergänge entsprechende CD-Banden auftreten.

<sup>184</sup> Die CD-Spektren einiger linearer Vorstufen finden sich in:  
R. Hörger, *Zulassungsarbeit*, Universität Regensburg, 2001.

Im spektralen Bereich des ersten schwingungsaufgespaltenen Pyren-Übergangs von 300 bis 360 nm treten positive CD-Effekte bei 347 nm ( $\Delta\epsilon = 2.14 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 331 nm ( $\Delta\epsilon = 1.71 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und 318 nm ( $\Delta\epsilon = 0.74 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) auf. Negative Werte ergeben sich im kürzerwelligen Bereich bei 279 nm ( $\Delta\epsilon = -3.05 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und 268 nm ( $\Delta\epsilon = -0.29 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Das ebenfalls negative Signal bei 262 nm ( $\Delta\epsilon = -2.81 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) könnte als negativer Teil eines positiven CD-Couplets angesehen werden. Im gewählten Lösungsmittel DMSO ist in diesem Spektralbereich allerdings schon ein erhebliches Rauschen vorhanden, was eine gesicherte Aussage erschwert.

Die CD-Spektren der difunktionalisierten cyclischen Hexapeptide **33**, **34** und **35** weisen im Vergleich zum monofunktionalisierten Cyclopeptid **32** qualitativ identische Kurvenverläufe auf. Deutliche CD-Couplets, die auf eine fixierte Anordnung der Chromophore zueinander schließen lassen ergeben sich dabei nicht.



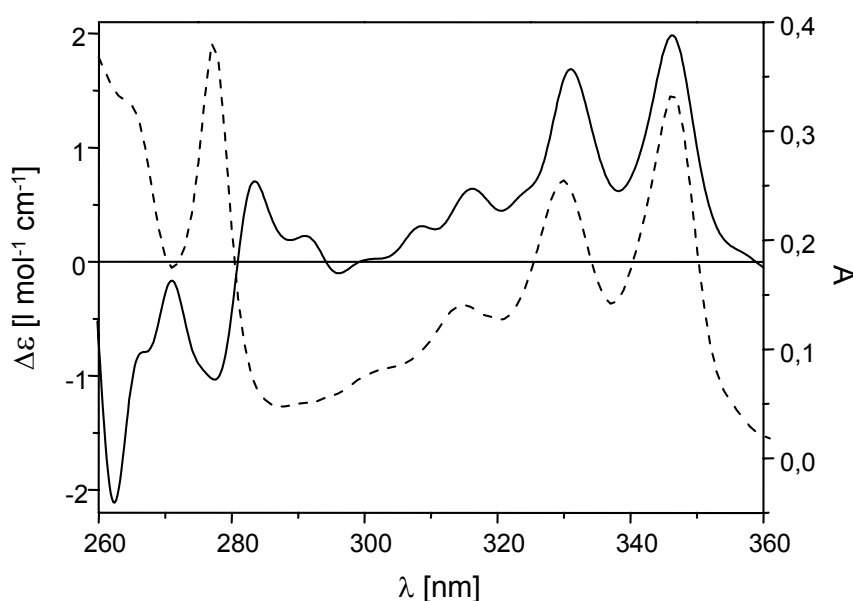
**Abb. 4-4:** UV/Vis- (gestrichelt) und CD-Spektrum (durchgezogen) des cyclischen Peptids cyclo-(Gly-Gly-D-Pya-D-Pya-Gly-Gly) (**33**) in DMSO.

Exemplarisch sind die Absorptions- und CD-Spektren der Verbindungen **33** (Abbildung 4-4) und **35** (Abbildung 4-5) abgebildet.

Im Falle des Pyren-funktionalisierten Peptids **33** sind in Analogie zum Absorptionsspektrum positive CD-Effekte bei 346 nm ( $\Delta\epsilon = 5.37 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 331 nm ( $\Delta\epsilon = 5.73 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 315 nm ( $\Delta\epsilon = 2.51 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und 269 nm

( $\Delta\epsilon = 1.79 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) sowie ein negativer Cotton-Effekt bei 281 nm ( $\Delta\epsilon = -1.79 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) erkennbar.

Das CD-Spektrum von cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly) (**35**) besitzt ebenfalls CD-Effekte bei 346 nm ( $\Delta\epsilon = 1.99 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 331 nm ( $\Delta\epsilon = 1.67 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 316 nm ( $\Delta\epsilon = 0.65 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und 277 nm ( $\Delta\epsilon = -1.04 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Den Unterschied zu den homofunktionalisierten Peptiden liefert eine intensiv negative Bande bei 262 nm ( $\Delta\epsilon = -2.10 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), die auf den Phenothiazin-Chromophor zurückzuführen ist.



**Abb. 4-5:** UV/Vis- (gestrichelt) und CD-Spektrum (durchgezogen) des cyclischen Peptids cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly) (**35**) in DMSO.

Die beiden nicht durch Abbildungen repräsentierten cyclischen Peptide **34** und **36** zeigen in ihren CD-Spektren ebenfalls für alle in der Absorption beobachteten Übergänge entsprechende CD-Banden und weisen keine CD-Couplets auf.

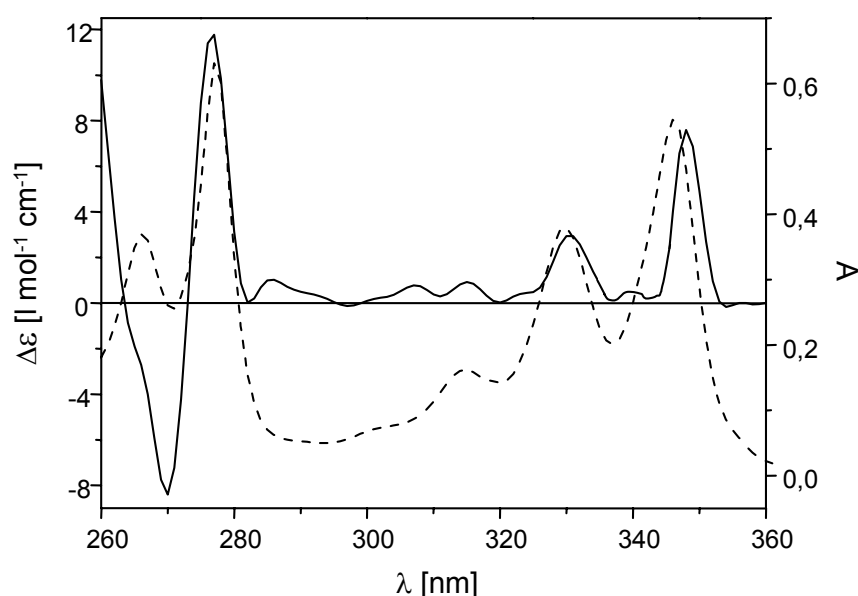
Peptid	CD-Banden $\lambda$ [nm] ( $\Delta\epsilon$ )
<b>32</b>	267 (-0.08), 279 (-3.05), 318 (0.74), 331 (1.71), 347 (2.14)
<b>33</b>	269 (1.79), 281 (-7.94), 315 (2.51), 331 (5.73), 346 (5.37)
<b>34</b>	268 (0.48), 278 (-5.42), 317 (1.75), 330 (2.54), 346 (3.97)
<b>35</b>	262 (-2.10), 277 (-1.04), 316 (0.65), 331 (1.67), 346 (1.99)
<b>36</b>	267 (0.09), 279 (-7.42), 316 (2.89), 331 (4.99), 347 (6.02)

**Tab. 4-3:** Lage und Intensität der CD-Banden cyclischer Peptide in DMSO.

Die experimentellen Daten für die CD-Aktivität aller cyclischen Peptide in DMSO sind in Tabelle 4-3 wiedergegeben.<sup>185</sup>

#### 4.2.2 Circular dichroismus chromophorsubstituierter Hairpinpeptide

In den Circular dichroismus-Spektren der Hairpinpeptide **29**, **30** und **31** kommen ebenfalls nur CD-Banden zum tragen, die Analoga in den entsprechenden Absorptionsspektren aufweisen. Allerdings sind im kurzwelligen Spektralbereich stärkere CD-Effekte zu beobachten als dies bei den beschriebenen Cyclopeptiden der Fall ist. Die Cotton-Effekte im längerwelligen Spektralbereich sind zum Teil weniger stark ausgeprägt. In Abbildung 4-6 ist das CD- sowie das Absorptionsspektrum von Verbindung **30**, als einem Vertreter der Hairpinpeptide, wiedergegeben.



**Abb. 4-6:** UV/Vis- (gestrichelt) und CD-Spektrum (durchgezogen) des Hairpinpeptids Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (**30**) in DMSO.

Wie schon bei den cyclischen Peptiden sind positive CD-Banden bei 348 nm ( $\Delta\epsilon = 7.53 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 331 nm ( $\Delta\epsilon = 2.92 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und 315 nm ( $\Delta\epsilon = 1.00 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) zu sehen. Zusätzlich ist ein positiver CD-Effekt bei 277 nm ( $\Delta\epsilon = 11.84 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und ein negatives Signal bei 270 nm ( $\Delta\epsilon = -8.29 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) zu erkennen. Die beiden letztgenannten Cotton-Effekte haben die Form eines positiven

<sup>185</sup> CD-Messungen in HFIP/MeOH als Lösungsmittel sind in Kapitel 7 dieser Arbeit aufgeführt, liefern aber hinsichtlich Strukturaufklärung und UV/Vis-CD-Korrelation keine neuen Ergebnisse.

CD-Couplets, wobei die Maxima allerdings mit der Lage der Absorptionsmaxima übereinstimmen, was den Schluss auf eine Chromophorwechselwirkung nicht zulässt. Die Hairpinpeptide **29** und **30** weisen bezüglich der Übereinstimmung der CD- und Absorptionsspektren ebenfalls keine Anomalien auf, was aus Tabelle 4-4 ersichtlich ist. Somit ist auch in den  $\beta$ -Hairpinpeptidsystemen eine diskrete konformative Orientierung der chromogenen Substituenten unwahrscheinlich.

Peptid	CD-Banden $\lambda$ [nm] ( $\Delta\epsilon$ )
<b>29</b>	265 (8.86), 279 (-7.03), 315 (0.83), 332 (2.10), 348 (3.44)
<b>30</b>	270 (-8.29), 277 (11.84), 315 (1.00), 330 (2.92), 348 (7.53)
<b>31</b>	263 (-36.38), 276 (-10.82), 312 (2.07), 329 (2.23), 346 (2.67)

**Tab. 4-4:** Lage und Intensität der CD-Banden der Hairpinpeptide in DMSO.

### 4.3 Zusammenfassung der Absorptions- und CD-Untersuchungen

Die Analyse der UV/Vis-Absorptionsspektren zeigt, dass die untersuchten Verbindungen unbeeinflusst vom jeweiligen Peptidbackbone durch das Absorptionsverhalten der angebundenen Pyren- bzw. Phenothiazinsubstituenten geprägt sind. Kopplungen der Chromophore im Grundzustand werden nicht beobachtet. Dies wird dadurch belegt, dass alle UV/Vis-Spektren additiv aus den Spektren der jeweiligen Substrukturen zusammengesetzt werden können. Verschiebungen der Absorptionsmaxima bzw. zusätzliche Absorptionen wie etwa Charge-Transfer-Banden werden ebenfalls nicht detektiert.

Aufgenommene CD-Spektren zeigen, dass die Pyren- bzw. Phenothiazinchromophore durch die jeweils benachbarten chiralen Kohlenstoffzentren beeinflusst werden. Es erfolgt eine Übertragung der Chiralität auf die kovalent gebundenen chromogenen Teilstrukturen, was sich in Form von auftretenden CD-Effekten im Spektralbereich der Chromophorabsorptionen widerspiegelt. Wechselwirkungen zwischen den chromophoren Substrukturen oder Hinweise auf eine konformativ fixierte Ausrichtung der Chromophore werden nicht gefunden.

## 5 Fluorezenzspektroskopie

### 5.1 Allgemeines<sup>186</sup>

In den vorangehenden Kapiteln wurden die dargestellten Peptidsysteme mittels elektrochemischer und absorptionsspektroskopischer Methoden hinsichtlich elektronischer Kopplung der chromogenen Teilstrukturen im Grundzustand untersucht. Die Fluoreszenzspektroskopie eröffnet dagegen die Möglichkeit Wechselwirkungen der unterschiedlichen Substrukturen einer chemischen Verbindung nach photonischer Anregung zu studieren.

Die nachfolgend besprochenen Emissionsspektren<sup>187</sup> der Peptide sind ausschließlich durch die Fluoreszenzeigenschaften der angebundenen Chromophore geprägt, was vor allem an monofunktionalisierten Spezies deutlich wird. Verbindungen mit zwei Pyrenchromophoren zeigen neben der typischen Pyren-Monomeremission aus dem LE- (local excited) Zustand häufig Pyren-Excimerbanden. Diese, zur LE-Fluoreszenz langwellig verschobene, unstrukturierte Emission resultiert aus der Generierung eines, als Excimer (excited dimer) bezeichneten, Komplexes zwischen einem im Grundzustand befindlichen und einem angeregten Pyrenmolekül.<sup>188</sup>

Bei Pyren-Phenothiazin-funktionalisierten Peptiden sind Exciplex-Bildungen bzw. photoinduzierte Ladungstransfer- (PET) Prozesse zu diskutieren.<sup>189</sup>

---

<sup>186</sup> a) J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2<sup>nd</sup> ed., Plenum Publishers, New York, **1999**;

b) B. Valeur, *Molecular Fluorescence, Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**;

c) O. S. Wolfbeis, *Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Berlin, **1993**.

<sup>187</sup> Die verwendete Messanordnung lässt die Detektion korrigierter Spektren bis zu einer Wellenlänge von 600 nm zu. Da die vermessenen Verbindungen hauptsächlich kürzerwellige Emissionen aufweisen, werden im folgenden nur korrigierte Spektren diskutiert.

<sup>188</sup> Die theoretischen Grundlagen zu Excimeremissionen werden in Kapitel 7 näher besprochen.

Literatur zu diesem Thema:

a) T. Förster, K. Kasper, *Z. phys. Chem. Neue Folge* **1954**, 275;

b) T. Förster, K. Kasper, *Z. Elektrochem.* **1955**, 59, 976;

c) J. B. Birks, *Rep. Prog. Phys.* **1975**, 38, 903;

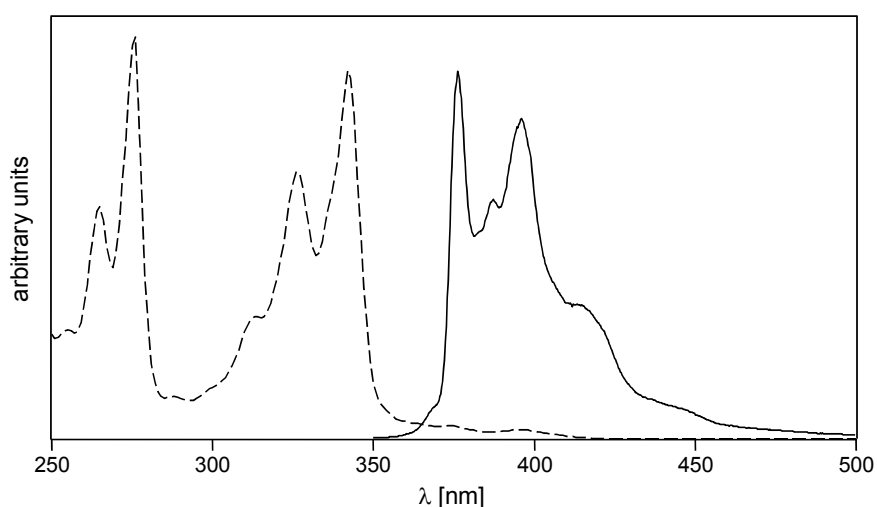
d) F. M. Winnik, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 587;

e) M. Klessinger, J. Michl, *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*, VCH, Weinheim, **1994**.

<sup>189</sup> Eine genauere Diskussion derartiger Prozesse findet sich in Kapitel 5.5 dieser Arbeit.

Anhand Pyren-funktionalisierter Peptide wurden in der Vergangenheit bereits einige Studien betreff Konformationsaufklärung<sup>190</sup> bzw. PET-Prozessen<sup>191</sup> publiziert, was den Nutzen der Chromophormodifizierung derartiger Systeme dokumentiert.

## 5.2 Fluoreszenzeigenschaften Pyren-funktionalisierter linearer Peptide



**Abb. 5-1:** UV/Vis- und Fluoreszenzspektrum des linearen Hexapeptids Boc-Gly-Gly-Gly-D-Pya-Gly-Gly-OBzl (**18a**) in CHCl<sub>3</sub> ( $\lambda_{\text{ex}} = 342 \text{ nm}$ ,  $c = 10^{-5} \text{ M}$ ).

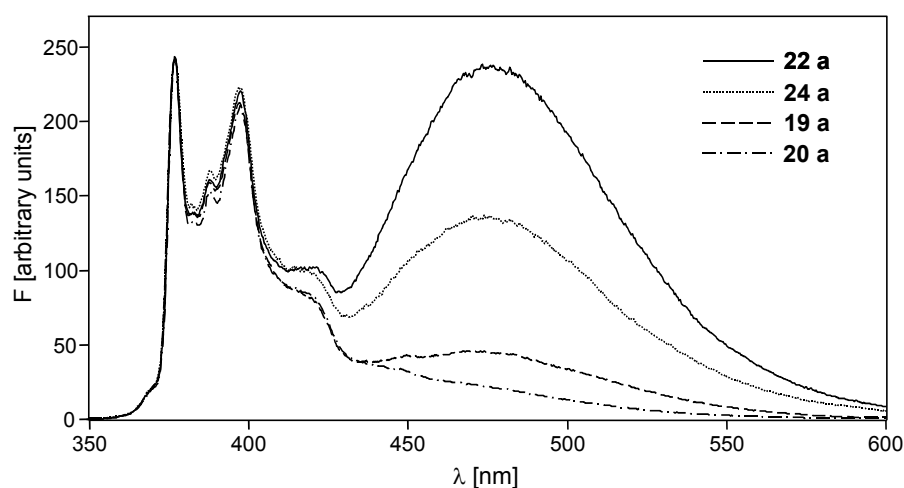
- 
- <sup>190</sup> a) G. Jones II, V. Vullev, *Org. Lett.* **2001**, 3, 2457;  
 b) G. Jones II, V. Vullev, E. H. Braswell, D. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 388;  
 c) H. Mihara, Y. Tanaka, T. Fujimoto, N. Nishino, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 1915;  
 d) H. Mihara, Y. Tanaka, T. Fujimoto, N. Nishino, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 1133;  
 e) H. Mihara, J. Hayashida, H. Hasegawa, H. I. Ogawa, T. Fujimoto, N. Nishino, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 517;  
 f) A. Buranaprapuk, C. V. Kumar, S. Jockusch, N. J. Turro, *Tetrahedron* **2000**, 56, 7019.
- <sup>191</sup> a) M. A. Fox, E. Galoppini, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5277;  
 b) E. Galoppini, M. A. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2299;  
 c) H. Sasaki, M. Makino, M. Sisido, T. A. Smith, K. P. Ghiggino, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 10416;  
 d) M. Sisido, *Adv. Photochem.* **1997**, 22, 197;  
 e) S. Isied, M. Y. Ogawa, J. F. Wishart, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 381;  
 f) M. Sisido, S. Hoshino, H. Kusano, M. Kuragaki, M. Makino, H. Sasaki, T. A. Smith, K. P. Ghiggino, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 10407.

Das lineare Hexapeptid **18a** enthält neben dem emissionspektroskopisch inaktiven Peptidgrundgerüst mit Pyren einen Fluoreszenzfarbstoff. Analog zum unsubstituierten Chromophor<sup>192</sup> zeigt es eine schwingungsaufgespaltene Emission im Bereich von 370-460 nm, die der charakteristischen Pyren-LE-Fluoreszenz zuzuordnen ist.

Abbildung 5-1 zeigt das Absorptions- und Emissionsspektrum der Verbindung in CHCl<sub>3</sub>, wobei ein Pyren-typischer Stokes-Shift<sup>192b,193</sup> von 2665 cm<sup>-1</sup> ermittelt werden kann. Solvensvariationen ergeben nur geringfügige Verschiebungen der Emissionsmaxima und haben keinen Einfluss auf die Spektralform.

Die ebenso einfach Pyren-funktionalisierten linearen Peptide **14a**, **15a**, **17a** und **26a** zeigen ein dazu analoges Verhalten, was in Tabelle 5-1 dokumentiert ist.<sup>194</sup>

Die linearen Peptide **19a**, **20a**, **22a** und **24a** beinhalten zwei Pyrenchromophore und weisen in ihren Fluoreszenzspektren neben der LE-Emission im Bereich von 370-460 nm charakteristische Pyren-Excimerbanden bei 477 nm auf (Abbildung 5-2).



**Abb. 5-2:** Normierte Fluoreszenzspektren der linearen Hexapeptide Boc-Gly-Gly-Gly-D-Pya-D-Pya-OBzl (**19a**), Boc-Gly-Gly-D-Pya-D-Pya-Gly-Gly-OBzl (**20a**), Boc-Gly-Gly-D-Pya-Gly-Gly-D-Pya-OBzl (**22a**) und des linearen Octapeptids Boc-Gly-Gly-D-Pya-Gly-Gly-D-Pya-Gly-Gly-OBzl (**24a**) in CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 1/1 ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 342 nm,  $c$  = 10<sup>-5</sup> M).

<sup>192</sup> a) S. L. Murov, *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker, New York, **1973**;

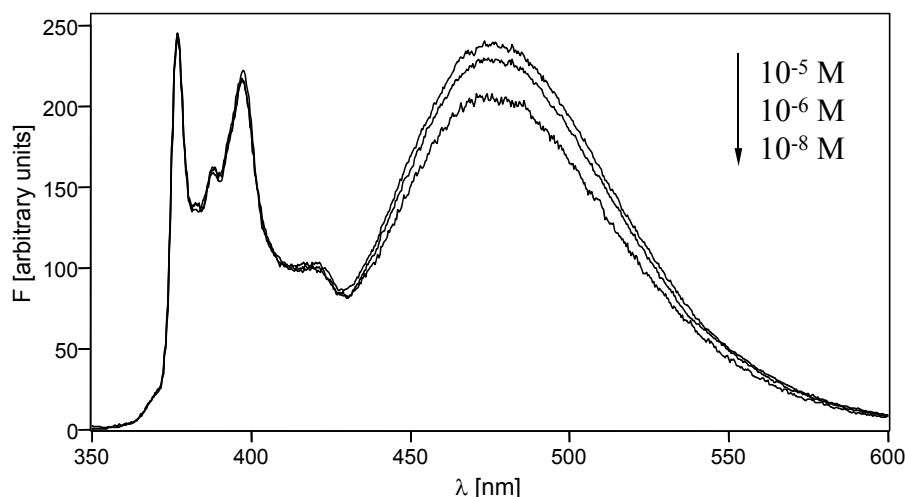
b) R. Engl, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1999**.

<sup>193</sup> J. Strauß, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, **1999**.

<sup>194</sup> Wie in den vorangehenden Kapiteln werden nur vollständig geschützte lineare Peptide emissionspektroskopisch untersucht.



Das Verhältnis von Excimer- ( $I_E$ ) zu Monomeremission ( $I_M$ ) ist in allen Fällen nahezu konzentrationsunabhängig.<sup>195</sup> Dies ist am Beispiel der Verbindung **22a** in Abbildung 5-3 dokumentiert. Die Konzentrationsunabhängigkeit der Excimeremission und das Fehlen entsprechender Banden im Falle einer einfachen Pyren-Funktionalisierung lassen auf eine hauptsächlich intramolekulare Bildung der Excimere in difunktionalisierten Peptiden schließen.



**Abb. 5-3:** Normierte Fluoreszenzspektren des linearen Hexapeptids Boc-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (**22a**) bei Konzentrationen von  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-8}$  M in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1/1$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 342$  nm).

Aus Abbildung 5-2 ist ersichtlich, dass die einzelnen Spezies unterschiedlich starke Excimerintensitäten aufweisen. Es zeigt sich, dass im Falle benachbarter *D*-Pya-Einheiten (**19a**, **20a**) geringere  $I_E/I_M$ -Verhältnisse detektiert werden als bei Peptiden, in denen die *D*-Pya-Reste durch zwei Glycinspacer getrennt sind (**22a**, **24a**). Dies soll anhand des Hexapeptids **20a** und des Octapeptids **24a** diskutiert werden.

In Bezug auf ähnliche literaturbekannte Pyren-funktionalisierte Peptide<sup>196</sup> wird für beide Spezies eine  $\alpha$ -helicale Sekundärstruktur angenommen. Es sei erwähnt, dass helicale Strukturen durch eine definierte Anzahl von Aminosäuren pro Windung ( $n$ ), eine charakteristische Windungshöhe ( $h$ ) und einen bestimmten Anstieg pro Aminosäurerest ( $d$ ) gekennzeichnet sind. Als  $\alpha$ -Helix wird eine spiralförmige

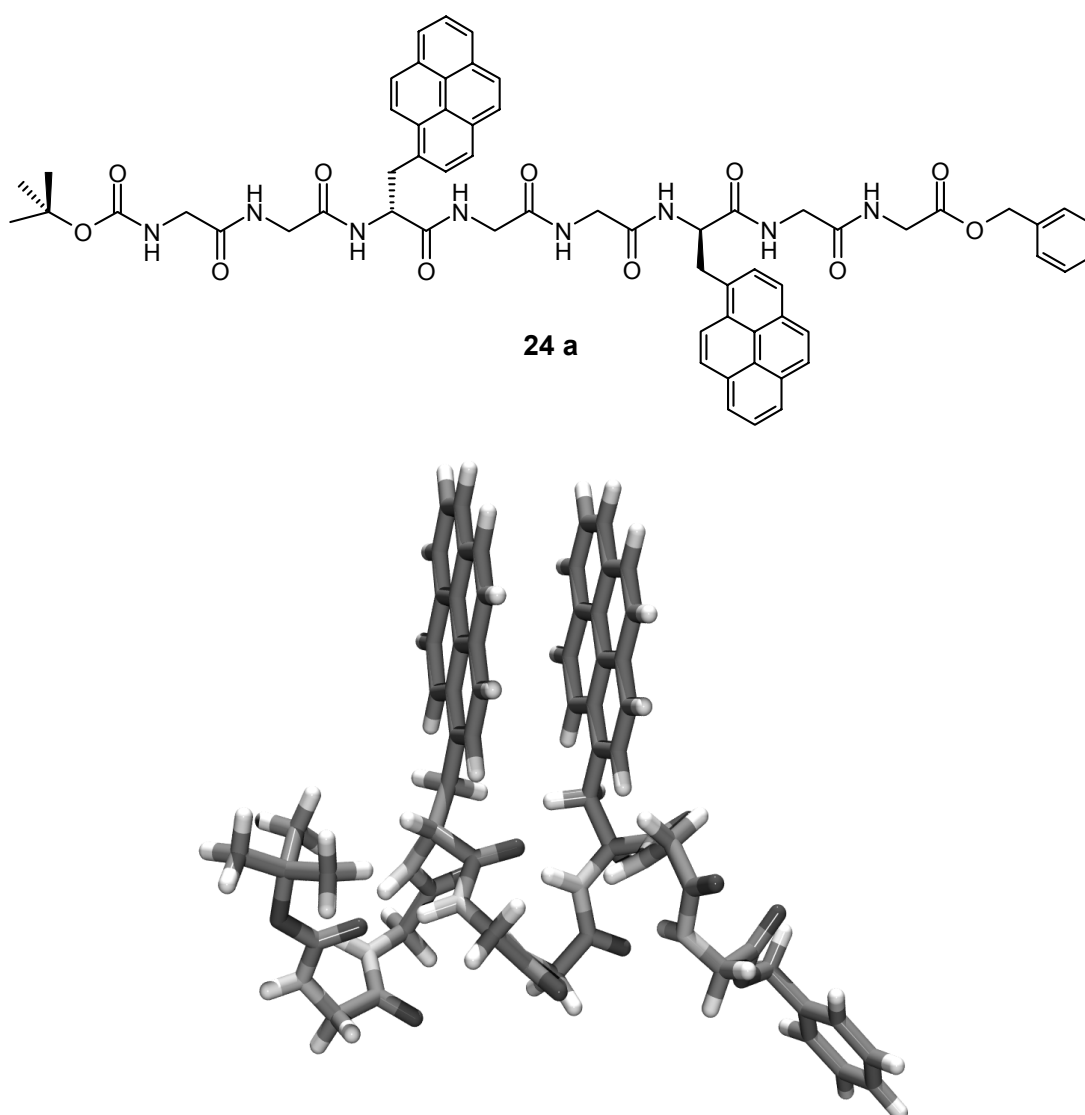
<sup>195</sup> Zur Bestimmung des  $I_E/I_M$ -Verhältnisses werden die kurzwelligste Monomeremissionsbande bei ca. 377 nm und die Excimerbande bei ca. 480 nm in Relation zueinander gesetzt.

<sup>196</sup> a) M. Sisido, *Macromolecules* **1989**, 22, 3280;

b) Y. Inai, M. Sisido, Y. Imanishi, *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, 8365.

Kettenanordnung mit den spezifischen Parametern  $n = 3.6$ ,  $h = 0.54$  nm und  $d = 0.15$  nm bezeichnet, wobei durch intramolekulare H-Brücken aus 13 Atomen bestehende Ringe gebildet werden. Die korrekte Nomenklatur lautet demnach  $\alpha(3.6_{13})$ -Helix.<sup>197</sup>

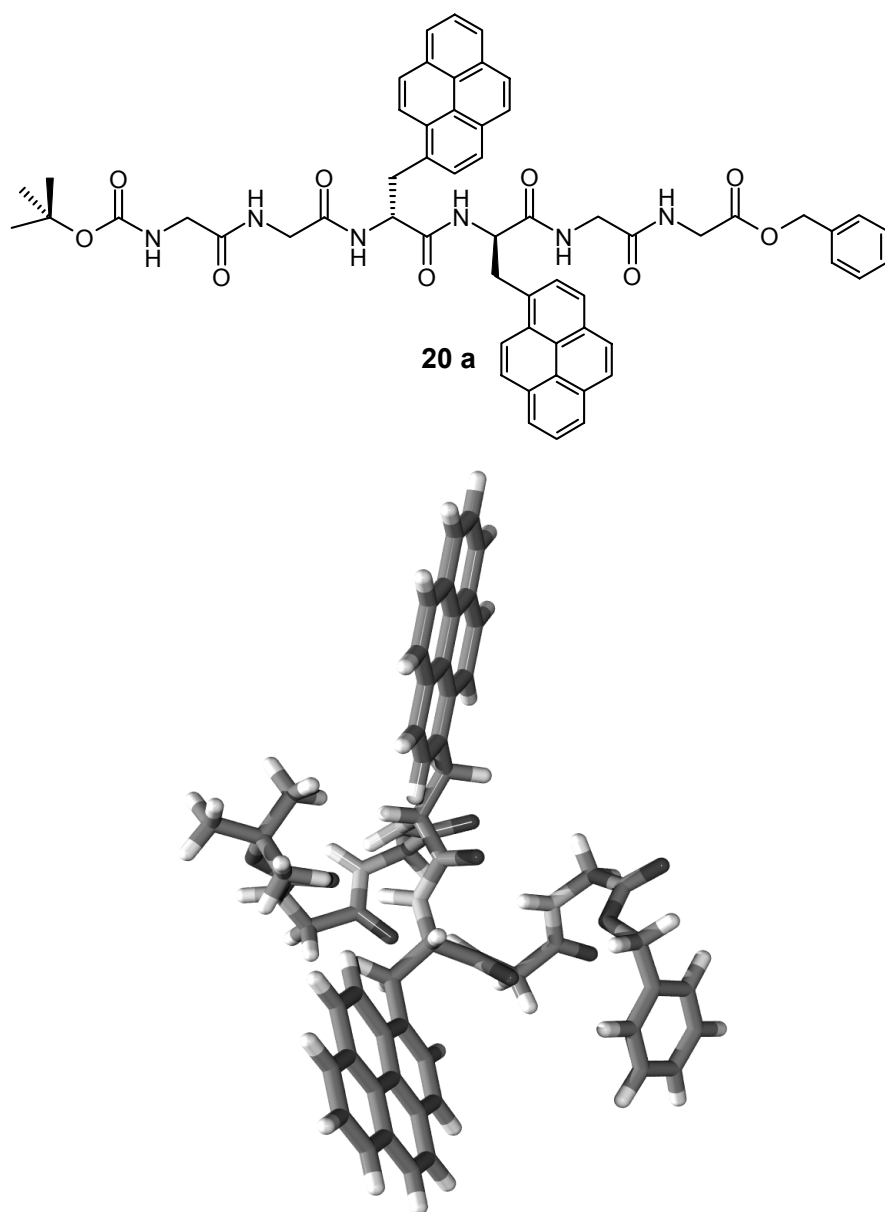
Die Abbildungen 5-4 und 5-5 zeigen semiempirisch auf PM3-Niveau energieminierte Konformationen der Peptide **24a** und **20a** unter den genannten Voraussetzungen.



**Abb. 5-4:** Valenzstruktur und eine semiempirisch auf PM3-Niveau energieminierte Excimer-Konformation des linearen Octapeptids **24a** unter Voraussetzung einer  $\alpha$ -helicalen Peptidsekundärstruktur.

<sup>197</sup> H. D. Jakubke, *Peptide*, Spektrum, Heidelberg, 1996.

Im Octapeptid **24a** stellen die *D*-Pya-Einheiten den Beginn und das Ende einer Helixwindung dar, weshalb die Chromophore grundsätzlich gleiche räumliche Ausrichtung besitzen und in der dargestellten Excimer-Struktur einen Abstand von 4.4 Å aufweisen.<sup>198</sup>



**Abb. 5-4:** Valenzstruktur und eine semiempirisch auf PM3-Niveau energieminierte Konformation des linearen Hexapeptids **20a** unter Voraussetzung einer  $\alpha$ -helicalen Peptidsekundärstruktur.

<sup>198</sup> Der Pyren-Pyren-Abstand wird für dynamische Excimere im Allgemeinen auf 3-4 Å festgelegt. Näheres dazu findet sich in Kapitel 7.2.1 dieser Arbeit.

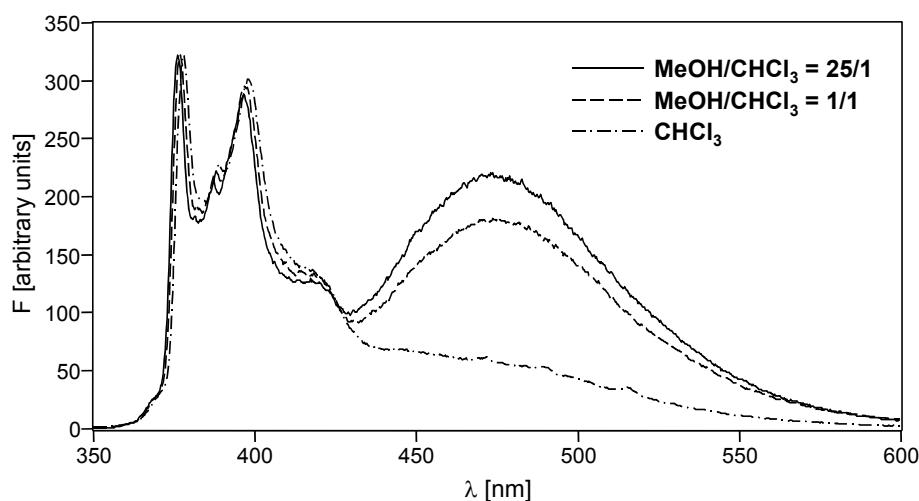
Im Hexapeptid **20a** sind die *D*-Pya-Reste hingegen direkt benachbart und weisen in unterschiedliche Richtungen. Zur Generierung von Excimeren ist somit wohl eine energetisch ungünstigere Zufallsknäuel-Konformation notwendig.

Obwohl die gezeigten Konformationsberechnungen natürlich nur idealisierte Modelle darstellen, können sie dennoch zur Erläuterung der intensiveren Excimeremission der Verbindung **24a** gegenüber des Hexapeptids **20a** herangezogen werden. In der Realität ist jedoch nicht von einer Vorzugskonformation sondern von einer Vielzahl energetisch ähnlicher, ineinander umwandelbarer Sekundärstrukturen auszugehen.<sup>199</sup>

Die Spezies **19a** und **22a** zeigen im Vergleich zu ihren längerkettigen Analoga **20a** und **24a** jeweils intensivere Excimeremissionen (Abbildung 5-2). Im Falle von endständigen *D*-Pya-Resten scheinen demnach konformative Restriktionen der entsprechenden Peptidsequenz weniger stark ins Gewicht zu fallen.

Bei allen vier Vertretern der zweifach Pyren-funktionalisierten linearen Peptide steigt der Excimeranteil der Fluoreszenz mit zunehmender Solvenspolarität, was exemplarisch für Spezies **24a** in Abbildung 2-6 dargestellt ist.

Dieser Effekt ist auf eine erhöhte  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung der Pyrensubstrukturen in polaren Lösungsmitteln zurückzuführen, wobei Konformationen, die zur Ausbildung von Excimeren führen, stabilisiert erscheinen.<sup>190e</sup>



**Abb. 5-6:** Normierte Fluoreszenzspektren des linearen Peptids Boc-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (**24a**) in CHCl<sub>3</sub>, MeOH/CHCl<sub>3</sub> = 1/1 und MeOH/CHCl<sub>3</sub> = 25/1 ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 342 nm,  $c$  = 10<sup>-5</sup> M).

<sup>199</sup> Dies wird durch <sup>1</sup>H-NMR-Untersuchungen in den Kapiteln 2.4.2.2 und 2.5.2 dieser Arbeit untermauert.

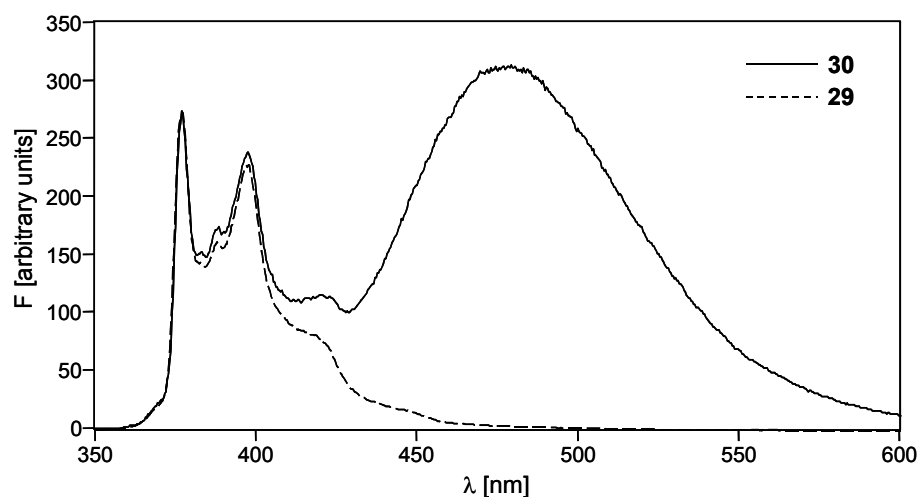
Die experimentellen Daten der Fluoreszenzspektren aller linearen Pyren-funktionalisierten Peptide sind in Tabelle 5-1 festgehalten.

Peptid	Solvens	$\lambda_{em}$ [nm]	$I_E/I_M$
<b>14a</b>	CHCl <sub>3</sub>	377, 387, 399, 420, 446	0
<b>15a</b>	CHCl <sub>3</sub>	376, 390, 399, 419, 445	0
<b>17a</b>	CHCl <sub>3</sub>	377, 388, 398, 419, 446	0
<b>18a</b>	CHCl <sub>3</sub>	376, 387, 396, 417, 445	0
<b>19a</b>	CHCl <sub>3</sub>	376, 388, 397, 418, 476	0.07
<b>19a</b>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH = 1/1	376, 389, 400, 419, 478	0.18
<b>19a</b>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH = 1/25	376, 389, 399, 418, 477	0.25
<b>20a</b>	CHCl <sub>3</sub>	377, 387, 398, 419, 476	0.02
<b>20a</b>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH = 1/1	378, 388, 398, 419, 477	0.09
<b>20a</b>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH = 1/25	378, 388, 399, 419, 477	0.17
<b>22a</b>	CHCl <sub>3</sub>	378, 390, 398, 419, 477	0.26
<b>22a</b>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH = 1/1	377, 388, 397, 420, 477	0.94
<b>22a</b>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH = 1/25	377, 388, 397, 421, 480	1.41
<b>24a</b>	CHCl <sub>3</sub>	378, 389, 398, 420, 479	0.18
<b>24a</b>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH = 1/1	377, 388, 398, 419, 475	0.56
<b>24a</b>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH = 1/25	376, 387, 397, 420, 475	0.69
<b>26</b>	CHCl <sub>3</sub>	377, 387, 398, 429, 446	0

**Tab. 5-1:** Experimentelle Daten der Fluoreszenzspektren linearer Pyren-funktionalisierter Peptide ( $\lambda_{ex} = 342$  nm,  $c = 10^{-5}$  M).

### 5.3 Fluoreszenzeigenschaften der Pyren-funktionalisierten Hairpinpeptide **29** und **30**

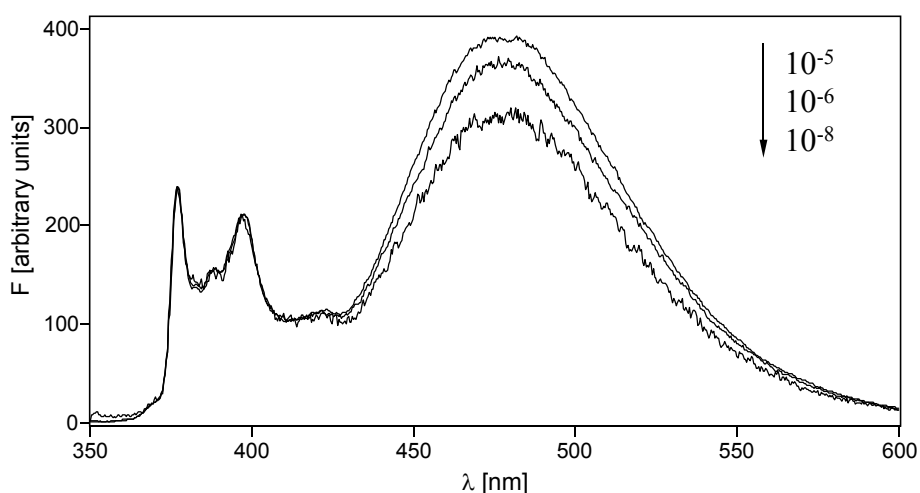
Abbildung 5-7 zeigt die Fluoreszenzspektren der Pyren-derivatisierten Hairpinpeptide **29** und **30**. Beide Spezies weisen im erwarteten Spektralbereich von 370-460 nm LE-Emission des Chromophors auf.



**Abb. 5-7:** Normierte Fluoreszenzspektren der  $\beta$ -Hairpinpeptide Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-OBzl (**29**) und Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (**30**) in MeOH/CHCl<sub>3</sub> = 1/1 ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 342 nm,  $c$  = 10<sup>-5</sup> M).

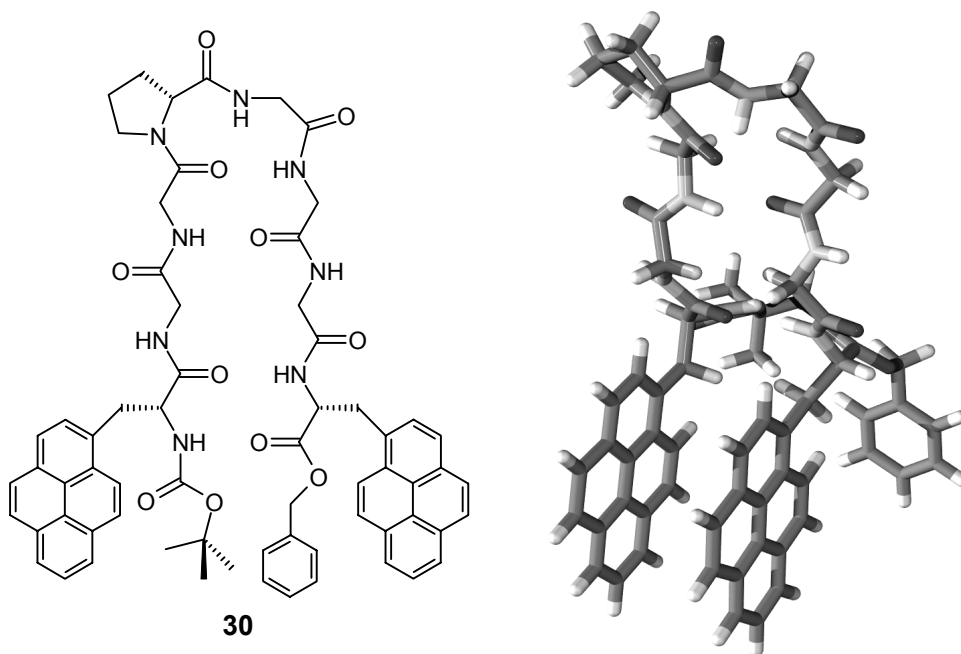
Im Gegensatz zur monofunktionalisierten Verbindung **29** wird im Spektrum des difunktionalisierten Peptids **30** zusätzlich eine intensive Excimerbande bei 477 nm detektiert.

Das Verhältnis der Excimerintensität zur Intensität der Monomerfluoreszenz ( $I_E/I_M$ ) ist dabei nahezu konzentrationsunabhängig (Abbildung 5-8). Diese Tatsache und der Vergleich mit dem Emissionsspektrum der Spezies **29** ergeben, wie im Falle der linearen Peptide, die Ausbildung von intramolekularen Excimeren. Dies deckt sich mit Beobachtungen, die an literaturbekannten hairpinartigen Spezies ermittelt wurden.<sup>190d</sup>



**Abb. 5-8:** Normierte Fluoreszenzspektren des  $\beta$ -Hairpinpeptids Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (**30**) bei Konzentrationen von  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-8}$  M in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1/1$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 342$  nm).

Molekülgeometrie-Berechnungen belegen, dass für Verbindung **30** eine reguläre  $\beta$ -Hairpinkonformation<sup>200</sup> des Peptidbackbones durchaus mit der Generierung von Pyren-Excimeren in Einklang zu bringen ist (Abbildung 5-9).

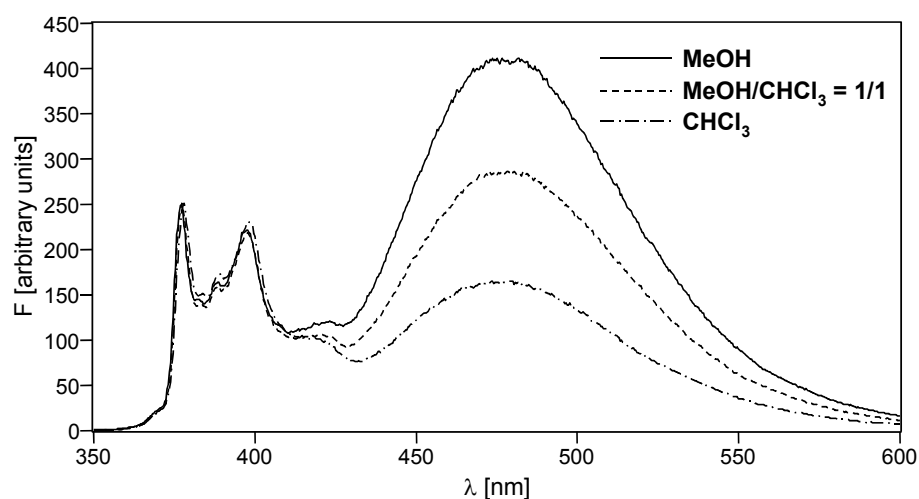


**Abb. 5-9:** Valenzstruktur und eine semiempirisch auf PM3-Niveau energieminimierte Excimer-Konformation des Hairpinpeptids **30** unter Voraussetzung einer  $\beta$ -turn-Struktur des Peptidrückgrats.

<sup>200</sup> Zur Beschreibung von  $\beta$ -Hairpinkonformationen siehe Kapitel 2.4.1 dieser Arbeit.

Neben dem loop-Strukturmotiv des Hairpinpeptids wird die Excimeremission offensichtlich durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den Pyren-Teilstrukturen gewährleistet.

Dies wird durch die Lösungsmittelabhängigkeit des  $I_E/I_M$ -Verhältnisses untermauert. In polaren Solventien steigt die Excimerintensität im Vergleich zu weniger polaren Lösungsmitteln stark an (Abbildung 5-10), was die Folge einer stärkeren Chromophor-Assoziation in polaren Lösungsmitteln zu sein scheint.



**Abb. 5-10:** Normierte Fluoreszenzspektren des Hairpinpeptids Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (**30**) in CHCl<sub>3</sub>, MeOH/CHCl<sub>3</sub> = 1/1 und MeOH ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 342 nm,  $c$  = 10<sup>-5</sup> M).

Die ermittelten Fluoreszenzdaten der Hairpinpeptide **29** und **30** sind in Tabelle 5-2 wiedergegeben.

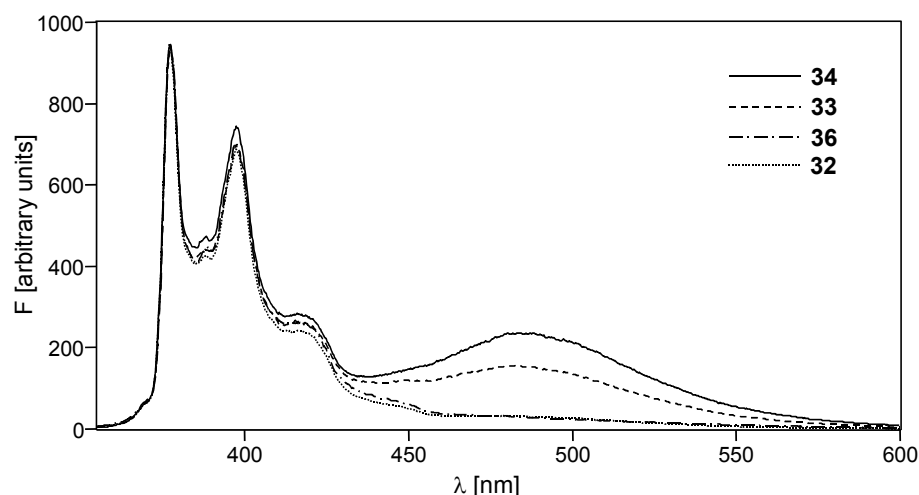
Peptid	Solvens	$\lambda_{\text{em}}$ [nm]	$I_E/I_M$
<b>29</b>	CHCl <sub>3</sub>	377, 388, 397, 420, 447	0
<b>30</b>	CHCl <sub>3</sub>	378, 389, 399, 421, 477	0.65
<b>30</b>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH = 1/1	378, 389, 398, 421, 478	1.14
<b>30</b>	MeOH	376, 387, 397, 420, 481	2.29

**Tab. 5-2:** Experimentelle Daten der Fluoreszenzspektren Pyren-funktionalisierter Hairpinpeptide ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 342 nm,  $c$  = 10<sup>-5</sup> M).



## 5.4 Fluoreszenzeigenschaften Pyren-funktionalisierter Cyclopeptide

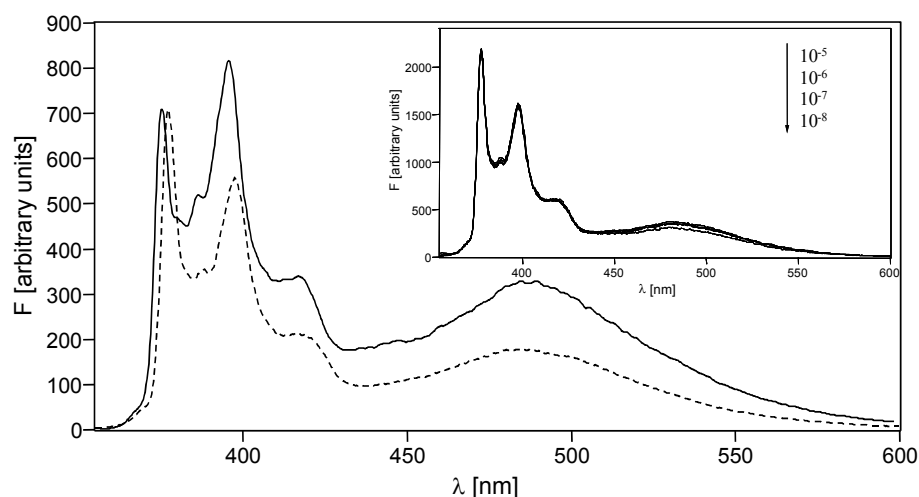
Die Untersuchung des Emissionsverhaltens der Pyren-derivatisierten cyclischen Peptide **32**, **33**, **34** und **36** ergibt ähnliche Ergebnisse, wie sie bei den vorangehend besprochenen Peptidsystemen erhalten wurden (Abbildung 5-11).



**Abb. 5-11:** Normierte Fluoreszenzspektren der cyclischen Peptide cyclo-(Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly) (**32**), cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pya-*D*-Pya-Gly-Gly) (**33**), cyclo-(Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly) (**34**) und cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly) (**36**) in DMSO ( $\lambda_{\text{ex}} = 346 \text{ nm}$ ,  $c = 10^{-5} \text{ M}$ ).

Das monofunktionalisierte Cyclohexapeptid **32** weist wie alle anderen Cyclopeptide Pyren-Monomerfluoreszenz im Bereich von 370-460 nm auf. Im längerwelligen Spektralbereich ist, im Unterschied zu monofunktionalisierten linearen Peptiden, eine sehr intensitätsschwache Excimerbande zu erkennen. Diese Emission ist auf intermolekulare Chromophor-Wechselwirkungen zurückzuführen. Die Fluoreszenzspektren der difunktionalisierten cyclischen Hexapeptide **33** und **34** hingegen zeigen in DMSO bei 484 nm eine wesentlich intensivere Excimeremission. Das  $I_{\text{E}}/I_{\text{M}}$ -Verhältnis dieser Verbindungen ist im Bereich von  $10^{-5} \text{ M}$  bis  $10^{-8} \text{ M}$  nahezu konzentrationsunabhängig, was eine hauptsächlich intramolekulare Excimerbildung nachweist (Abbildung 5-12: Inset). Aufgrund der Unlöslichkeit der cyclischen Peptide in geeigneten Lösungsmitteln ist ein intensiver Solvensvergleich von polaren und weniger polaren Solventien schwierig. Abbildung 5-12 zeigt jedoch exemplarisch an Spezies **34**, dass in einer Mischung aus 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol und MeOH (HFIP/MeOH) intensivere Excimeremissionen auftreten, als dies in DMSO der Fall ist.

Ebenso ist im Vergleich zu DMSO eine hypsochrome Verschiebung der einzelnen Emissionsbanden um ca. 5 nm zu verzeichnen. Das Intensitätsverhältnis der ersten und dritten Monomeremissionsbande ( $I_1/I_3$ ) zeigt im HFIP/MeOH-Gemisch einen erhöhten  $I_3$ -Wert. Dieses Verhalten lassen beispielsweise auch literaturbekannte Pyren-funktionalisierte Cyclopeptide in wässrigen Lösungen erkennen.<sup>190e</sup>



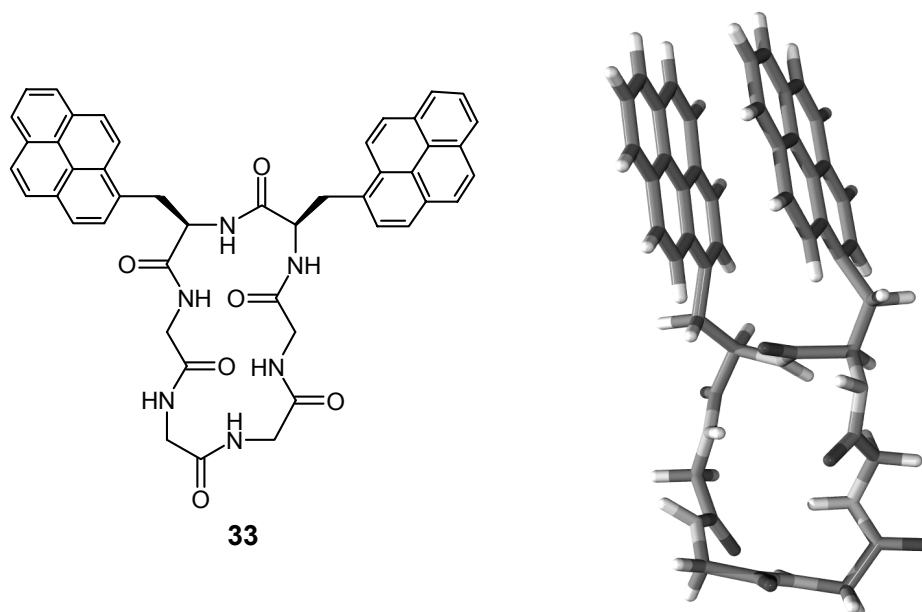
**Abb. 5-12:** Normierte Fluoreszenzspektren des cyclischen Hexapeptids cyclo-(Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly) (**34**) in DMSO (durchgezogene Linie,  $\lambda_{ex} = 346$  nm,  $c = 10^{-5}$  M) und HFIP/MeOH = 4/1 (gestrichelte Linie,  $\lambda_{ex} = 339$  nm,  $c = 10^{-5}$  M).

Inset: Normierte Fluoreszenzspektren von **34** bei Konzentrationen von  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  M in DMSO ( $\lambda_{ex} = 346$  nm).

Wie in Kapitel 2.5.2 besprochen, ist bei den cyclischen Hexapeptiden nicht von der Ausbildung spezieller Vorzugskonformationen auszugehen. Dennoch sollen für die cyclischen Hexapeptide **33** und **34** anhand von Molekülgeometrieberechnungen mögliche Sekundärstrukturen ermittelt werden, die beobachtete Excimer-Generierungen illustrieren und verifizieren.

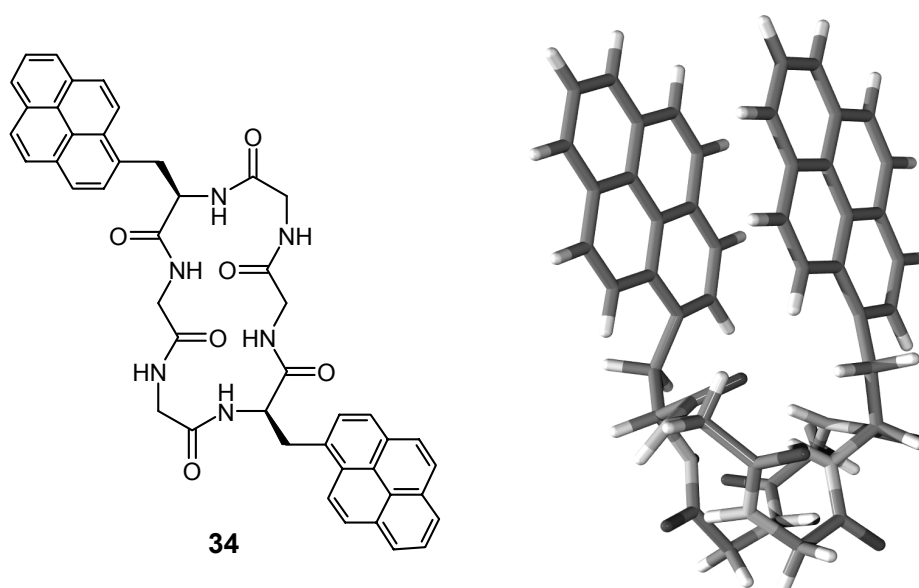
Abbildung 5-13 belegt, dass im Falle des Peptids **33** eine parallele Anordnung der Pyrensubchromophore mit einem Abstand von 3.27 Å möglich ist. Dabei erinnert die Konformation des Peptidbackbones an eine energiegünstige Struktur mit zwei  $\beta$ -turn-Motiven.<sup>201</sup>

<sup>201</sup> Vergleiche mit Abbildung 2-53 (Kapitel 2.5.2).



**Abb. 5-13:** Valenzstruktur und eine semiempirisch auf PM3-Niveau energieminierte Excimer-Konformation des Cyclopeptids **33** unter Voraussetzung von zwei  $\beta$ -turn-Motiven im Peptid.

Um in der Spezies **34** ein intramolekulares Excimer zu ermöglichen, ist bei einem angenommenen fixierten Mindestabstand der Pyren-Teilstrukturen von 4.00 Å hingegen eine stark gefaltete Zufallsknäuel-Struktur des cyclischen Peptidrückgrats zu erwarten (Abbildung 5-14).



**Abb. 5-14:** Valenzstruktur und eine semiempirisch auf PM3-Niveau energieminierte Excimer-Konformation des Cyclopeptids **34**.

Im Unterschied zu den bisher diskutierten zweifach Pyren-funktionalisierten cyclischen Hexapeptiden **33** und **34** zeigt das entsprechende Cyclooctapeptid **36** keine Excimerbande im Fluoreszenzspektrum (Abbildung 5-11). Anscheinend reicht in dieser Verbindung die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung der Pyrensubstituenten nicht aus um zumindest kurzzeitig eine Konformation zu stabilisieren, die eine dementsprechend gepaarte Anordnung der Chromophore gewährleistet.

In Tabelle 5-3 sind die Fluoreszenzdaten der untersuchten cyclischen Peptide festgehalten.

Peptid	Solvens	$\lambda_{em}$ [nm]	$I_E/I_M$
<b>32</b>	DMSO	377, 388, 399, 419, 448	0.02
<b>32</b>	HFIP/MeOH = 4/1	376, 386, 395, 418, 446	0.10
<b>33</b>	DMSO	377, 388, 398, 419, 483	0.15
<b>33</b>	HFIP/MeOH = 4/1	376, 386, 396, 419, 479	1.04
<b>34</b>	DMSO	378, 389, 397, 418, 487	0.25
<b>34</b>	HFIP/MeOH = 4/1	375, 386, 396, 418, 487	0.46
<b>36</b>	DMSO	377, 388, 398, 420, 447	0.02

**Tab. 5-1:** Experimentelle Daten der Fluoreszenzspektren cyclischer Pyren-funktionalisierter Peptide ( $\lambda_{ex}(\text{DMSO}) = 346 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex}(\text{HFIP/MeOH}) = 339 \text{ nm}$ ,  $c = 10^{-5} \text{ M}$ ).

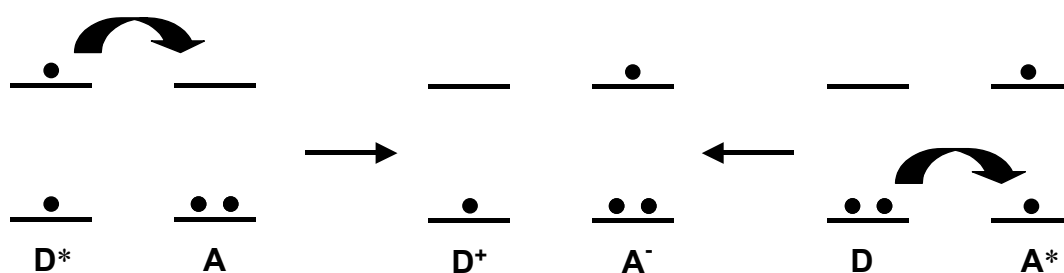
## 5.5 Fluoreszenzverhalten Pyren- und Phenothiazin-funktionalisierter Peptide

### 5.5.1 Photoinduzierter Elektronentransfer (PET)<sup>202</sup>

Zwei verschiedene Moleküle können, analog zu Excimerbildungen, Komplexe mit einer definierten Stöchiometrie liefern. Ist die Komplexbildung bereits im Grundzustand präsent und führt des weiteren zu CT- (charge transfer) Absorptionen, spricht man von CT- oder Donor-Akzeptor-Komplexen. Ist die Stabilität des Komplexes allerdings auf den angeregten Zustand beschränkt, wird er als Exciplex (excited complex) bezeichnet. Wie Excimeremissionen zeichnen sich auch Exciplexe häufig durch bathochrom verschobene unstrukturierte Emissionsbanden aus.

Im Unterschied zu Excimeren kommt es dabei allerdings zum photoinduzierten Elektronentransfer (PET). Als PET bezeichnet man allgemein den Übergang eines Elektrons von einem Donor zu einem Akzeptor, wenn vorher entweder der Donor oder der Akzeptor durch Aufnahme eines Photons vom Grund- in einen elektronisch angeregten Zustand überführt wurde.

Ein Molekül ist im angeregten Zustand sowohl ein stärkerer Elektronendonator als auch ein stärkerer Elektronenakzeptor als im Grundzustand. Der PET kann somit sowohl nach Anregung einer Donor- als auch einer Akzeptorstruktur ablaufen (Abbildung 5-15).



**Abb. 5-15:** Vereinfachte Darstellung des photoinduzierten Elektronentransfers nach Anregung des Donors bzw. Akzeptors.

<sup>202</sup> a) M. A. Fox, M. Chanon, *Photoinduced Electron Transfer (Part A-D)*, Elsevier, Amsterdam, **1988**;  
 b) *Photoinduced Electron Transfer I-V in Top. Curr. Chem.*, Springer Verlag, Berlin, **1990**, 156, **1990**, 158, **1991**, 159, **1992**, 163, **1994**, 168;  
 c) G. J. Karvanos, *Fundamentals of Photoinduced Electron Transfer*, VCH, Weinheim, **1993**.

Die Elektronenübertragung führt zu teilweise oder vollständigem Quenchen der Fluoreszenz der angeregten Struktureinheit. Zusätzlich treten häufig duale Fluoreszenz<sup>203</sup> oder photochemische Folgereaktionen<sup>204</sup> auf.

Verknüpft man einen Donor und einen Akzeptor mit einem elektronisch inerten Spacer, kann ein intramolekularer PET auftreten, der im wesentlichen analog dem intermolekularen Fall beschrieben wird. Aus diesem Grund werden in derartigen Systemen ebenfalls Exciplexemissionen diskutiert, was der ursprünglichen Definition eines angeregten Komplexes zwischen unverbrücktem Donor und Akzeptor eigentlich nicht entspricht.

Gerade in der Natur kommt dem PET eine bedeutende Rolle zu, da beispielsweise die Photosynthese letztendlich auf derartigen Prozessen beruht. Daher wurden in der Vergangenheit intensive Untersuchungen bezüglich des Elektronentransfers in Proteinen,<sup>205</sup> Protein-Protein-Komplexen,<sup>206</sup> artifiziellen Photosynthesystemen<sup>207</sup> und Peptiden<sup>191</sup> durchgeführt.

Im Folgenden sollen die Fluoreszenzeigenschaften der Donor-Akzeptor-substituierten Peptide **21a**, **31** und **35**, sowie ein möglicher photoinduzierter Elektronentransfer in diesen Systemen, diskutiert werden. Dabei wird der jeweilige Peptidbackbone als elektronisch inerte Brücke zwischen den Chromophoren angesehen. Beeinflussungen des PET durch ein elektrisches Feld, das die gerichteten Dipolmomente der Aminosäuren in einer  $\alpha$ -Helix erzeugen können,<sup>191a,b,208</sup> sind in den beschriebenen Peptiden, die keine Vorzugskonformation besitzen, vernachlässigbar.

---

<sup>203</sup> a) W. Rettig, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 969;

b) W. Rettig, *Top. Curr. Chem.* **1994**, 169, 254.

<sup>204</sup> F. D. Saeva, *Top. Curr. Chem.* **1990**, 156, 59.

<sup>205</sup> a) H. B. Gray, J. R. Winkler, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 537;

b) R. Langen, I.-J. Chang, J. P. Germanas, J. H. Richards, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Science* **1995**, 268, 1733.

<sup>206</sup> J. M. Nocek, J. S. Zhou, S. De Forest, S. Priyadarshi, D. N. Beratan, J. N. Onuchi, B. M. Hoffman, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2459.

<sup>207</sup> a) M. R. Wasielewski, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 435;

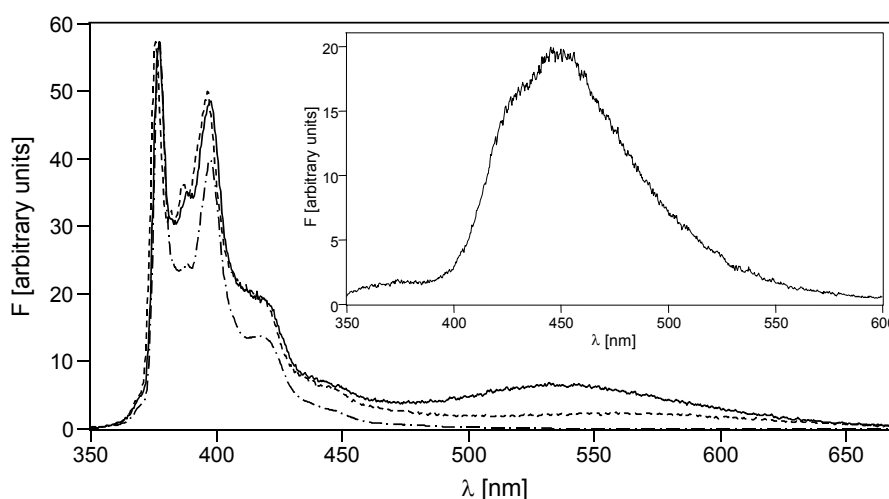
b) D. Gust, T. A. Moore, A. L. Moore, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 198;

c) D. Kuciauskas, P. A. Liddell, S.-C. Hung, S. Lin, S. Stone, G. Seely, A. L. Moore, T. A. Moore, D. Gust, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 429.

<sup>208</sup> P. Piotrowiak, *Chem. Soc. Rev.* **1999**, 28, 143.

### 5.5.2 Fluoreszenzverhalten der Peptide **21a**, **31** und **35**

Im Emissionsspektrum des Phenothiazin- (Donor) und Pyren- (Akzeptor) funktionalisierten Hairpinpeptids **31** tritt neben der üblichen intensiven Pyren-Monomeremission (370-440 nm) eine unstrukturierte, bathochrom verschobene Exciplexbande auf. Die Fluoreszenzspektren des Phenothiazin-substituierten Tripeptids **16a** (Abbildung 5-16: Inset) und des Pyren-derivatisierten Hairpinpeptids **29** (Abbildung 5-7) belegen, dass das Emissionsverhalten von Verbindung **31** nicht durch Addition der Teilstrukturemissionen erklärt werden kann (Abbildung 5-16). Auch eine Mischung der Spezies **16a** und **29** weist keine derartige Exciplexbande auf.



**Abb. 5-16:** Normierte Fluoreszenzspektren des  $\beta$ -Hairpinpeptids Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**31**) in CHCl<sub>3</sub> (—,  $\lambda_{\text{ex}}$  = 342 nm,  $c$  = 10<sup>-5</sup> M), MeOH (-----,  $\lambda_{\text{ex}}$  = 342 nm,  $c$  = 10<sup>-5</sup> M) und DMSO (—·—,  $\lambda_{\text{ex}}$  = 346 nm,  $c$  = 10<sup>-5</sup> M).

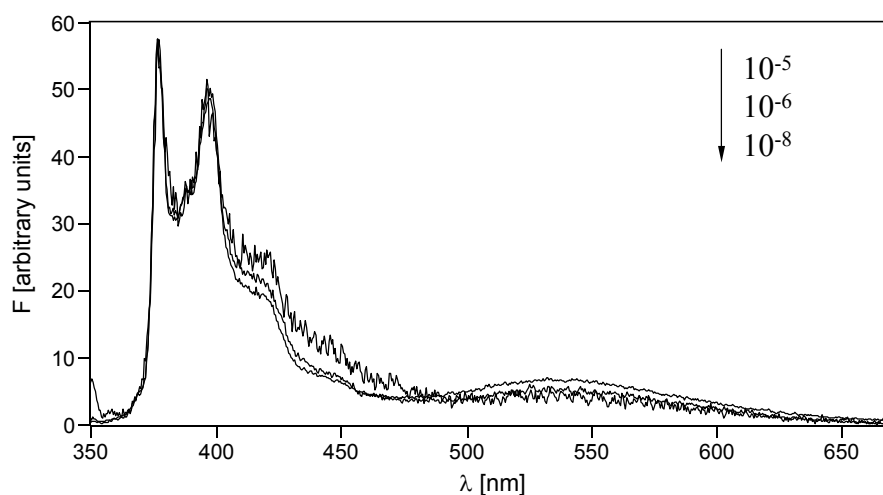
Inset: Fluoreszenzspektrum des linearen Tripeptids Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**16a**) in CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 2/1 ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 342 nm,  $c$  = 10<sup>-5</sup> M).

Die Exciplexemission von Verbindung **31** ist positiv solvatochrom. In weniger polarem CHCl<sub>3</sub> liegt das Emissionsmaximum dieser Bande bei 538 nm. In polarerem MeOH ergibt sich ein Wert von 568 nm, der allerdings mit einer geringeren Exciplexintensität einhergeht. Die Solvatochromie der Exciplexemission deutet beim Übergang von CHCl<sub>3</sub> zu MeOH auf eine Stabilisierung des Exciplexes von 982 cm<sup>-1</sup> hin. In DMSO ist keine Exciplexbande erkennbar. Die geringe Intensität der Exciplexbanden in polaren Solventien kann möglicherweise durch einen CIP- (contact ionpair) Charakter des

angeregten Komplexes erklärt werden, der kaum noch emittierende Eigenschaften aufweist.<sup>209</sup>

Abbildung 5-17 zeigt die Konzentrationsunabhängigkeit der Exciplexemission des Hairpinpeptids **31** in  $\text{CHCl}_3$ , was die Ausbildung eines intramolekularen Exciplexes belegt.

Die dargestellten Beobachtungen decken sich mit literaturbekannten Untersuchungen hinsichtlich des PET in verschiedenen Peptidsystemen.<sup>191</sup>



**Abb. 5-17:** Normierte Fluoreszenzspektren des  $\beta$ -Hairpinpeptids Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**31**) bei Konzentrationen von  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-8}$  M in  $\text{CHCl}_3$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 342$  nm).

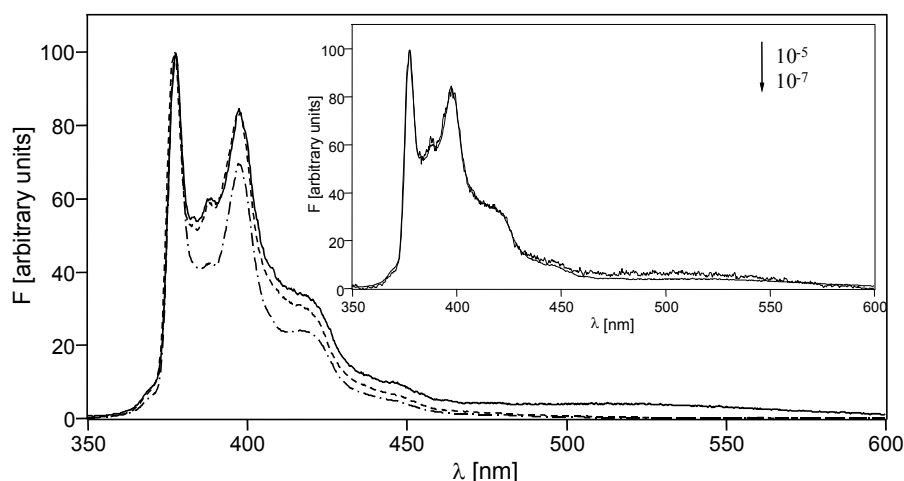
Durch die Bestimmung relativer Quantenausbeuten können weitere Hinweise für einen PET erhalten werden. Die relativen Quantenausbeuten des Hairpinpeptids **31** in Bezug auf das Pyren-monofunktionalisierte Hairpinpeptid **29** in  $\text{CHCl}_3$  ( $\Phi_{\text{F, rel}} = 0.16$ )<sup>210</sup> bzw. DMSO ( $\Phi_{\text{F, rel}} = 0.15$ ) demonstrieren, dass Elektronentransfer-Quenchprozesse die hauptsächliche Deaktivierung des angeregten Zustands der Spezies **31** bewirken.

Das lineare Hexapeptid **21a** weist eine konzentrationsunabhängige und somit intramolekulare Exciplexemission in  $\text{CHCl}_3$  bei 524 nm auf, die jedoch weniger intensiv ist als im Falle der Verbindung **31**. In den stärker polaren Solventien MeOH und DMSO ist keine langwellige Emissionsbande zu detektieren, was vermutlich auf einen CIP-Zustand zurückgeführt werden kann (Abbildung 5-18).

<sup>209</sup> G. J. Karvanos, *Top. Curr. Chem.* **1990**, 156, 21.

<sup>210</sup> Der Fehler der  $\Phi_{\text{F, rel}}$ -Werte, der hauptsächlich auf die Unsicherheit bei der Extinktionsbestimmung der hochverdünnten Lösungen zurückzuführen ist, kann auf etwa 10 % abgeschätzt werden.

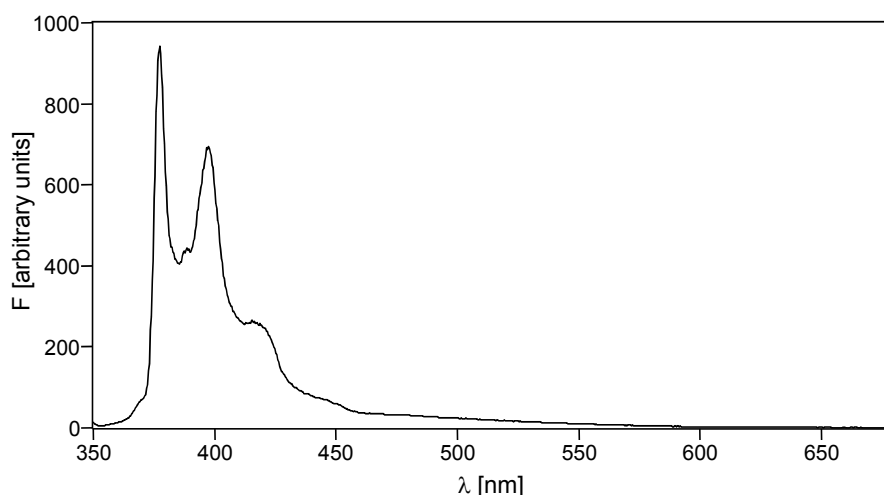




**Abb. 5-18:** Normierte Fluoreszenzspektren des linearen Hexapeptids Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (**21a**) in CHCl<sub>3</sub> (—,  $\lambda_{\text{ex}} = 342$  nm,  $c = 10^{-5}$  M), MeOH (-----,  $\lambda_{\text{ex}} = 342$  nm,  $c = 10^{-5}$  M) und DMSO (— · —,  $\lambda_{\text{ex}} = 346$  nm,  $c = 10^{-5}$  M).

Inset: Normierte Fluoreszenzspektren des linearen Hexapeptids Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (**21a**) bei Konzentrationen von  $10^{-5}$  M und  $10^{-7}$  M in CHCl<sub>3</sub> ( $\lambda_{\text{ex}} = 342$  nm).

Die relativen Quantenausbeuten der Spezies **21a** in CHCl<sub>3</sub> ( $\Phi_{\text{F, rel}} = 0.13$ ) und DMSO ( $\Phi_{\text{F, rel}} = 0.11$ ) in Bezug auf Boc-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (**18a**) bewegen sich im Bereich der relativen Quantenausbeuten des Hairpinpeptids **31** und weisen ebenfalls auf Elektronentransfer-Quenchprozesse hin (Tabelle 5-4).



**Abb. 5-19:** Fluoreszenzspektrum des cyclischen Hexapeptids cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly) (**35**) in DMSO ( $\lambda_{\text{ex}} = 346$  nm,  $c = 10^{-5}$  M).

Das cyclische Peptid **35** zeigt in DMSO keine Exciplexemission (Abbildung 5-19). Studien in anderen Lösungsmitteln sind aufgrund der Unlöslichkeit der Verbindung nicht möglich.

Die relative Quantenausbeute ( $\Phi_{F, \text{rel}} = 0.49$ ) ist auf das Pyren-funktionalisierte Hexapeptid **32** bezogen und weist auf ein Elektronentransfer-Quenchen hin, was im Vergleich zu den beiden anderen Donor-Akzeptor-substituierten Peptiden **21a** und **31** allerdings eine geringere Effizienz besitzt.

Tabelle 5-4 fasst die Fluoreszenzergebnisse für die Donor-Akzeptor-substituierten Peptide zusammen.

Peptid	Solvens	$\lambda_{\text{em}}$ [nm]	$I_E/I_M$ <sup>a)</sup>	$\Phi_{F, \text{rel}}$ <sup>b)</sup>	Vergleichs-Peptid
<b>21a</b>	CHCl <sub>3</sub>	378, 388, 398, 419, 448, 524	0.04	0.13	<b>18a</b>
<b>21a</b>	MeOH	378, 387, 397, 418, 447	0	---	---
<b>21a</b>	DMSO	376, 386, 398, 420, 448	0	0.11	<b>18a</b>
<b>31</b>	CHCl <sub>3</sub>	377, 389, 398, 419, 446, 538	0.11	0.16	<b>29</b>
<b>31</b>	MeOH	376, 388, 397, 418, 445, 568	0.04	---	---
<b>31</b>	DMSO	378, 388, 399, 418, 446	0	0.15	<b>29</b>
<b>35</b>	DMSO	377, 389, 397, 418, 446	0	0.49	<b>32</b>

**Tab. 5-4:** Experimentelle Daten der Fluoreszenzspektren Pyren-Phenothiazin-funktionalisierter Peptide ( $\lambda_{\text{ex}}(\text{CHCl}_3) = 342 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}(\text{MeOH}) = 342 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}(\text{DMSO}) = 346 \text{ nm}$ ,  $c = 10^{-5} \text{ M}$ ). a) Als  $I_E/I_M$  wird hier das Intensitätsverhältnis der Exciplexbande zur  $I_1$ -Pyren-Bande bezeichnet. b) Die relativen Quantenausbeuten ( $\Phi_{F, \text{rel}}$ ) werden in Bezug auf die angegebenen Vergleichspeptide ermittelt.

## 5.6 Zusammenfassung der Fluoreszenzuntersuchungen

Die mit einem Pyrensubstituenten funktionalisierten Peptide weisen charakteristische Pyren-LE-Fluoreszenz auf. Nur im Falle des cyclischen Hexapeptids **32** kann zudem eine intensitätsschwache intermolekulare Excimerbande beobachtet werden.

Difunktionalisierte Pyren-Peptidsysteme sind dagegen grundsätzlich zur Generierung intramolekularer Excimere befähigt, wodurch through-space-Wechselwirkungen der Chromophore emissionsspektroskopisch detektierbar sind. Das  $I_E/I_M$ -Verhältnis ist dabei u. a. von der jeweiligen Aminosäuresequenz abhängig, die eine unterschiedliche Orientierung der Pyren-Einheiten bedingt. Daneben ist eine erhebliche Solvensabhängigkeit der Excimerintensität zu verzeichnen.

Intramolekulare PET-Prozesse bzw. Exciplexemissionen treten bei den Donor-Akzeptor-funktionalisierten Peptiden **21a**, **31** und **35** auf und belegen through-space-Wechselwirkungen zwischen den chromophoren Einheiten. Dies kann einerseits durch positiv solvatochrome Exciplexbanden, andererseits durch die Messung relativer Quantenausbeuten verifiziert werden.

Direkte Einflüsse des jeweiligen Peptidrückrats auf die Emissionseigenschaften der angebundenen Chromophore werden bei keiner der durchgeführten Untersuchungen festgestellt.

## 6 Elektrochemilumineszenz

### 6.1 Allgemeines<sup>211</sup>

Als Elektrochemilumineszenz (ECL) wird allgemein die Generierung einer lichtemittierenden Spezies durch homogenen Elektronentransfer zwischen elektrochemisch erzeugten Radikationen in Lösung bezeichnet. ECL-Messungen bieten die Möglichkeit, molekulare Systeme auf ihren Einsatz in optischen Devices wie beispielsweise OLEDs zu testen.<sup>212</sup> Gerade in den letzten Jahren wurde der Einsatz der ECL zudem auf analytische Fragestellungen wie Einzelmolekül-<sup>213</sup> und Metallionenerkennung<sup>214</sup> sowie Entwicklung von Biosensoren<sup>211e,215</sup> ausgeweitet.

Abbildung 6-1 zeigt eine prinzipielle Darstellung des ECL-Phänomens. Nach elektrochemischer Oxidation einer Donor- (D) Komponente zum Radikalkation bzw. Reduktion eines Akzeptors (A) zum Radikalanion, rekombinieren die geladenen Radikalspezies in einer diffusionskontrollierten Reaktion zu den entsprechenden Neutralverbindungen. Grundsätzlich ist dabei die Bildung eines angeregten

---

<sup>211</sup> a) L. R. Faulkner, R. S. Glass in *Chemical and Biological Generation of Excited States*, Academic Press, New York, **1982**;

b) L. R. Faulkner, A. J. Bard, *Electroanalytical Chemistry Vol. 10*, Dekker, New York, **1977**;

c) A. W. Knight, *Trends Anal. Chem.* **1999**, 18, 47;

d) R. N. Armstrong, R. M. Wightman, E. M. Gross, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, 52, 391;

e) K. A. Fährnich, M. Pravda, G. G. Guilbault, *Talanta* **2001**, 54, 531.

<sup>212</sup> a) J. D. Anderson, E. M. McDonald, P. A. Lee, M. L. Anderson, E. L. Ritchie, H. K. Hall, T. Hopkins, E. A. Mash, J. Wang, A. Padias, S. Thayumanavan, S. Barlow, S. R. Marder, G. E. Jabbour, S. Shaheen, B. Kippelen, N. Peyghambarin, R. M. Wightman, N. R. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9646;

b) K. Kelnhofer, A. Knorr, Y.-H. Tak, H. Bässler, J. Daub, *Acta. Polym.* **1997**, 48, 188;

c) J. Daub, K. Kelnhofer, J. Gareis, A. Knorr, M. Kollmannsberger, Y.-H. Tak, H. Bässler, *Polym. Prepr.* **1997**, 38, 339;

d) K. Kelnhofer, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1997**;

e) R. Engl, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1999**.

<sup>213</sup> a) R. G. Maus, R. M. Wightman, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 3993;

b) F.-R. F. Fan, D. Cliffel, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2941;

c) A. J. Bard, F.-R. F. Fan, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 572.

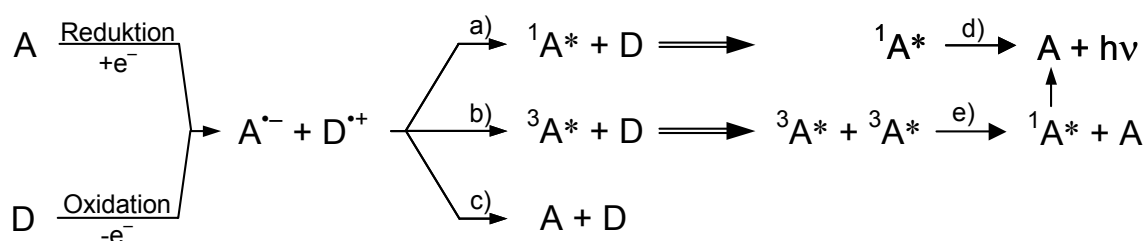
<sup>214</sup> a) R. Y. Lai, M. Chiba, N. Kitamura, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 551;

b) B. High, D. Bruce, M. M. Richter, *Anal. Chim. Acta.* **2001**, 449, 17;

<sup>215</sup> E. S. Jin, B. J. Norris, P. Pantano, *Electroanalysis* **2001**, 13, 1287.

Singulettzustandes (Abbildung 6-1: Pfad a), eines angeregten Triplettzustandes (Abbildung 6-1: Pfad b) oder die Rekombination in den neutralen Grundzustand beider Spezies (Abbildung 6-1: Pfad c) möglich. Untersuchungen anhand der Marcus-Theorie belegen jedoch, dass die angeregten Zustände gegenüber der Rekombination in den Grundzustand bevorzugt sind.<sup>216</sup> Aus statistischen Gründen entstehen dabei angeregte Singulett- und Triplettzustände im Verhältnis 1:3.

Die Emission kann beim ECL-Prozess direkt aus dem primär generierten Singulettzustand (Singulett-Route, Abbildung 6-1: Pfad d) oder nach Triplett-Triplett-Annihilierung (Triplett-Route, Abbildung 6-1: Pfad e) erfolgen.



**Abb. 6-1:** Prinzip der Elektrochemilumineszenz (ECL); a) Singulett-Generierung, b) Triplett-Generierung, c) Rekombination in den Grundzustand, d) Emission (Singulett-Route), e) Triplett-Triplett-Annihilierung (Triplett-Route).

Um abzuschätzen, ob die elektrochemisch eingebrachte Energie ausreicht den angeregten Singulettzustand direkt zu populieren, kann die folgende thermodynamische Beziehung herangezogen werden:

$$-\Delta H = -\Delta G_{\text{ea}} - T\Delta S \geq \Delta H_{\text{exc}} \quad \text{mit: } -\Delta G_{\text{ea}} = e \cdot (E_{1/2}^{\text{ox}} - E_{1/2}^{\text{red}})$$

$$T\Delta S \approx 0.1 \text{ eV}$$

Bei einer direkten Besetzung des Singulettzustands, muss die berechnete Energie  $-\Delta H$  mindestens so groß sein wie die, aus dem Emissionsspektrum bestimmte, Energie des emittierenden Singulettzustands  $\Delta H_{\text{exc}}$ .<sup>216,217</sup>  $\Delta G_{\text{ea}}$  kann aus den Halbstufenpotentialen

<sup>216</sup> R. A. Marcus, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 438, 251.

<sup>217</sup> L. R. Faulkner, H. Tachikawa, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 691.

der cyclovoltammetrischen Untersuchungen entnommen werden.<sup>218</sup> Der Entropieterm  $T\Delta S$  wird empirisch auf 0.1 eV abgeschätzt.<sup>219</sup>

Neben der Emission aus dem Singulettzustand wird bei ECL-Experimenten häufig auch eine Excimer- bzw. Exciplexbande beobachtet.<sup>220</sup>

Die Bildung eines Excimers  $^1(A_2)^*$  ist hier entweder durch Elektronentransfer oder als alternatives Produkt der Triplett-Triplett-Annihilierung (Abbildung 6-1: Pfad e) möglich. Aufgrund dieser zusätzlichen mechanistischen Route erklärt sich auch der im Vergleich zum Fluoreszenzspektrum oft erhöhte Excimeranteil in ECL-Spektren. Die Generierung von Exciplexen  $^1(A^+D^-)^*$  kann bei ECL-Messungen über ein solvatisiertes Ionenpaar erfolgen, das direkt aus den Radikationen entsteht. Die Bildung dieses Ionenpaares ist aufgrund der coulombschen Anziehung der gegensätzlich geladenen Radikationen begünstigt. Exciplexe ergeben allerdings im Allgemeinen weniger effiziente ECL-Prozesse, als dies bei direkten Singulettmissionen der Fall ist.<sup>211d</sup>

Allgemein werden ECL-Systeme danach unterschieden, ob Donor und Akzeptor in einer Verbindung kovalent miteinander verbunden sind (einheitliche Systeme) oder als separate Komponenten vorliegen (gemischte Systeme).

Im Rahmen der nachfolgend beschriebenen ECL-Messungen werden sowohl einheitliche als auch gemischte Systeme studiert. Soweit Pyren-Phenothiazin-substituierte Peptide vorliegen werden diese als einheitliche Systeme untersucht, wobei durch elektrochemische Pyren-Reduktion bzw. Phenothiazin-Oxidation die entsprechenden Radikationen erzeugt werden. Bei Verbindungen die nur eine Pyren-Funktionalisierung aufweisen wird die Phenothiazin-Aminosäure **6** als Donorkomponente zugegeben. Respektive werden Phenothiazin-funktionalisierte Peptide mit der Pyren-Aminosäure **5** versetzt.

Zur experimentellen Detektion der ECL-Emission wird eine Wechselstrommethode angewandt. Die Messzelle weist eine Dreielektrodenanordnung aus Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode auf.<sup>221</sup> Die Radikationen werden nacheinander an der Arbeitselektrode durch wechselweises Anlegen eines oxidativen bzw. reduktiven Potentials generiert, wobei die Potentiallagen aus cyclovoltammetrischen Messungen<sup>222</sup>

---

<sup>218</sup> Siehe Kapitel 3 dieser Arbeit.

<sup>219</sup> S. K. Lee, Y. Zu, A. Herrmann, Y. Geerts, K. Müllen, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3513.

<sup>220</sup> Nähere Erläuterungen zu den Begriffen Excimer bzw. Exciplex finden sich in den Kapitel 5 und 7 dieser Arbeit.

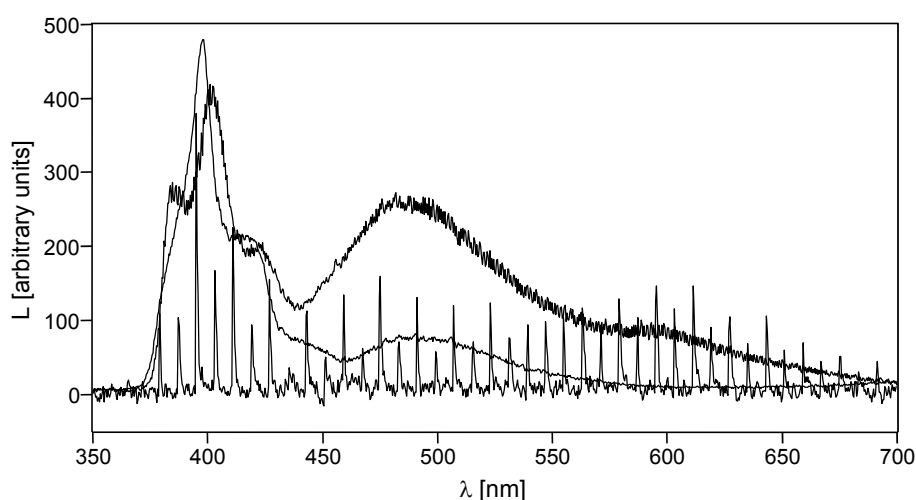
<sup>221</sup> S. Hien, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1997**.

<sup>222</sup> siehe Kapitel 3 dieser Arbeit.

entnommen werden. Radikalanionen und -kationen treffen durch Diffusion aufeinander und rekombinieren. Um gleichbleibende Bedingungen zu gewährleisten werden alle Messungen in DMSO bei einer Konzentration von ca.  $10^{-3}$  M in Gegenwart von TBAHFP (0.1 M) als Leitsalz durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgt jeweils bei höchster Detektorempfindlichkeit und einer Scan-Geschwindigkeit von 240 nm/min.<sup>223</sup>

## 6.2 ECL-Eigenschaften linearer Pyren- oder Phenothiazin-funktionalisierter Peptide

Die exemplarisch untersuchten einfach Pyren-funktionalisierten linearen Peptide **14a**, **15a** und **18a** stellen elektrochemisch aktive Akzeptorkomponenten dar. Nach Zusatz der Donor-Aminosäure **6** weisen all diese Spezies sehr ähnliche ECL-Eigenschaften auf (Abbildungen 6-2, 6-3 und 6-4).



**Abb. 6-2:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346$  nm) und ECL (raue Kurve: Schaltfrequenz 50 ms; scharfe Peaks: Schaltfrequenz 2 s) des Gemisches von Boc-Gly-Gly-D-Pya-OBzl (**14a**) und **6** in DMSO ( $c = 10^{-3}$  M).

Am Beispiel des linearen Tripeptids **14a** (Abbildung 6-2) zeigt sich, dass im ECL-Spektrum unabhängig von der Schaltfrequenz (Potentialwechsel nach 50 ms bzw. 2 s) sowohl eine Pyren-Monomeremission im Spektralbereich von 370 bis 440 nm als auch

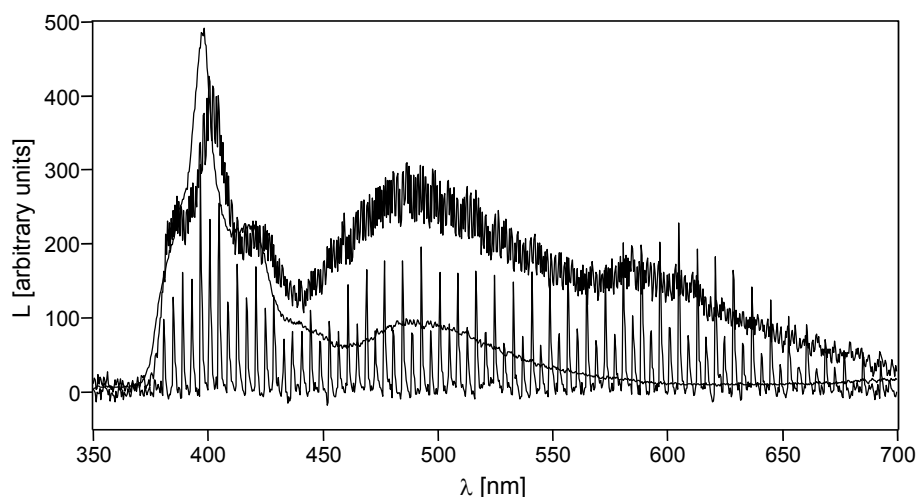
<sup>223</sup> Durch gleichbleibende Messbedingungen bei Aufnahme aller ECL-Spektren ist die Abschätzung der jeweiligen ECL-Aktivität anhand der detektierten Lumineszenzintensität zumindest qualitativ möglich.

eine Pyren-Excimeremission bei 487 nm sowie eine Exciplexemission bei 585 nm auftritt.<sup>224</sup> Im Photolumineszenzspektrum des Gemisches fehlt bei gleicher Konzentration die Exciplexbande. Dies ist, wie bereits vermerkt, auf fehlende coulombsche Anziehungskräfte im Photolumineszenzexperiment zurückzuführen.

Aufgrund der stark unterschiedlichen Quantenausbeuten der verschiedenen Chromophorstrukturen ( $\Phi_{\text{Pyren}} \gg \Phi_{\text{Phenothiazin}}$ ) kommt es in allen Spektren zu einer Überlagerung der lokalen Phenothiazinemission durch die Pyrenlumineszenz.

Die geringfügig langwellige Verschiebung des Emissionsmaximums bei ECL-Messungen im Vergleich zu Fluoreszenzuntersuchungen<sup>224</sup> kann durch Leitsalzeffekte und eine erhöhte Analytkonzentration erklärt werden.

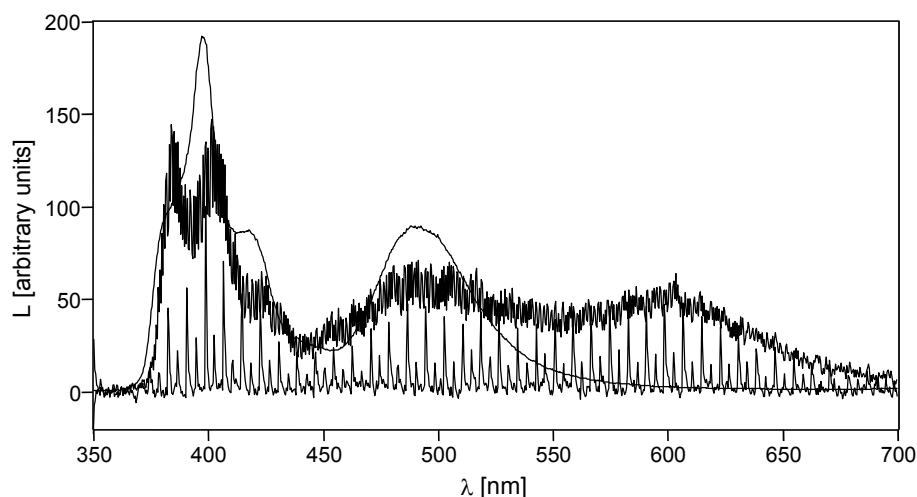
Die Abbildungen 6-3 und 6-4 geben entsprechend analoge Verhältnisse für die linearen Peptide **15a** und **18a** wieder.



**Abb. 6-3:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346$  nm) und ECL (raue Kurve: Schaltfrequenz 50 ms; scharfe Peaks: Schaltfrequenz 1 s) des Gemisches von Boc-D-Pya-Gly-Gly-OBzl (**15a**) und **6** in DMSO ( $c = 10^{-3}$  M).

<sup>224</sup> Ein Vergleich mit Fluoreszenzmessungen und Literaturangaben (siehe Kapitel 5) erlaubt die Zuordnung von LE- (370-440 nm), Excimer- ( $\approx 480$  nm) und Exciplexemissionen ( $> 570$  nm).





**Abb. 6-4:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346 \text{ nm}$ ) und ECL (raue Kurve: Schaltfrequenz 50 ms; scharfe Peaks: Schaltfrequenz 2 s) des Gemisches von Boc-Gly-Gly-Gly-D-Pya-Gly-Gly-OBzl (**18a**) und **6** in DMSO ( $c = 10^{-3} \text{ M}$ ).

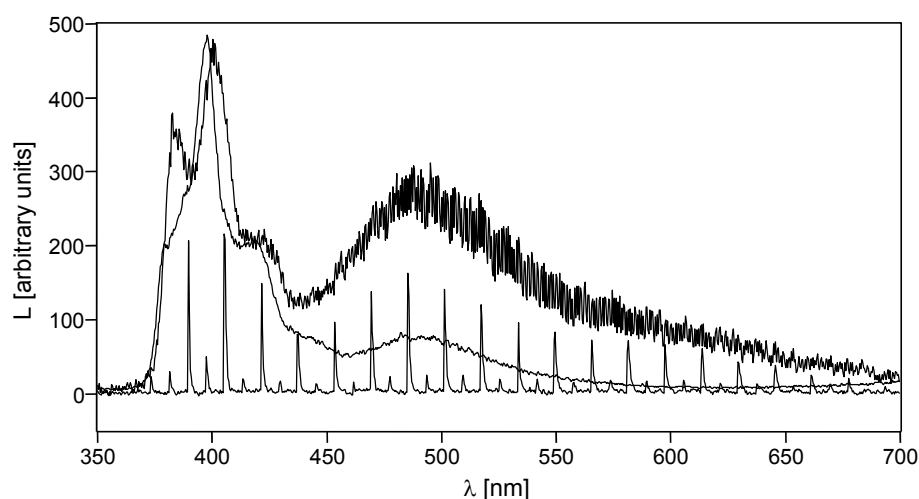
Die bisher aufgeführten ECL-Spektren zeichnen sich bei niedrigen Schaltfrequenzen von 1 s bzw. 2 s durch einen strukturierten Kurvenverlauf mit alternierenden Peakintensitäten aus. Die intensiveren Signale werden immer bei positivem Potential, also im Zuge der Oxidation bzw. Radikalkationengenerierung detektiert. Dies wird im Allgemeinen durch eine erhöhte Lebensdauer der Radikalanionen im Vergleich zu den Radikalkationen erklärt.<sup>212c,225</sup> Infolgedessen stehen gebildeten Radikalkationen mehr Radikalanionen zur Rekombination zur Verfügung als im umgekehrten Fall, was intensivere Peaks bedingt. Es sei jedoch vermerkt, dass diese Gegebenheiten nur für ungerührte Lösungen gelten. Sobald die Gemische während den ECL-Messungen durchmischt werden sind gleiche Signalintensitäten bei positivem und negativem Potential zu verzeichnen. Dies mag daran liegen, dass durch Rühren die Diffusionskontrolle des ECL-Prozesses beeinflusst bzw. aufgehoben wird, was den entsprechenden Radikalionlebenszeiten weniger Bedeutung zukommen lässt.

Nach energetischer Betrachtung ist es in keinem der beschriebenen Fälle möglich den Singulett-Zustand direkt durch die eingebrachte elektrochemische Energie zu populieren. Das Maximum der LE-Emissionen liegt bei ca. 400 nm, was einer Energie von 3.09 eV entspricht. Die elektrochemisch generierte Energie der Pyren-Phenothiazin-Systeme beträgt 2.74-2.78 eV. Die erhaltenen LE-Emissionen erfolgen daher wohl nach Triplett-Triplett-Annihilierungen. Sowohl die Excimeremissionen bei

<sup>225</sup> O. Köthe, *Dissertation*, Universität Regensburg, 1999.

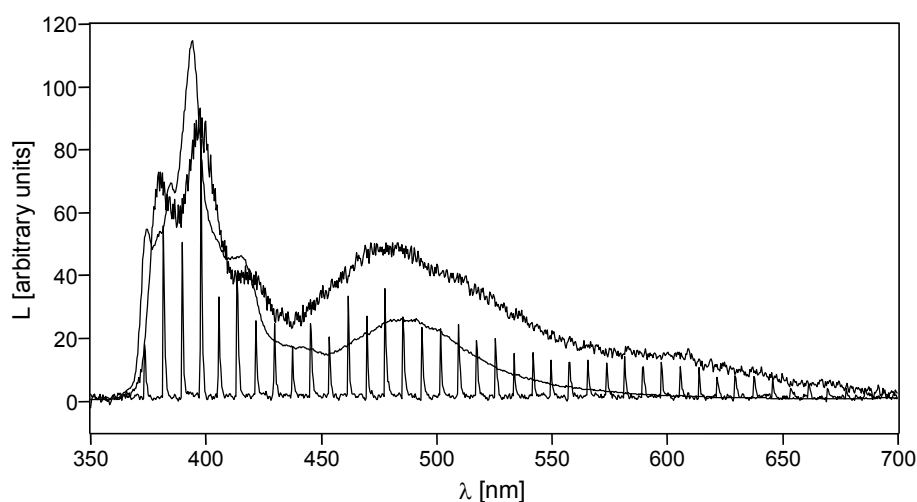
ca. 485 nm (2.55 eV) als auch die Exciplexemissionen bei ca. 590 nm (2.10 eV) können allerdings direkt erzeugt werden (Tabelle 6-1).

Das zweifach Pyren-funktionalisierte Hexapeptid **20a** zeigt ähnliches ECL-Verhalten wie die bereits diskutierten monosubstituierten Spezies (Abbildung 6-5). Die Exciplexemission ist weniger stark ausgeprägt, bei einer Schaltdauer von 2 s allerdings eindeutig zu erkennen. Die Excimeremission des linearen Hexapeptids **20a** ist bei den hohen Analytkonzentrationen des ECL-Experiments im Unterschied zu Fluoreszenzmessungen<sup>224</sup> hauptsächlich auf intermolekulare Wechselwirkungen zurückzuführen. Dies wird vor allem durch die ECL-Spektren der Spezies **14a**, **15a** und **18a** untermauert, die trotz Monofunktionalisierung sowohl Excimer- als auch Exciplexbanden aufweisen.



**Abb. 6-5:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346$  nm) und ECL (raue Kurve: Schaltfrequenz 50 ms; scharfe Peaks: Schaltfrequenz 2 s) des Gemisches von Boc-Gly-Gly-*D*-Pya-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (**20a**) und **6** in DMSO ( $c = 10^{-3}$  M).

Im Unterschied zu den bisher beschriebenen Pyren-derivatisierten Peptiden beinhaltet das Tripeptid **16a** mit Phenothiazin eine oxidierbare Donorteilstruktur. Um ECL zu gewährleisten wird deshalb die reduzierbare Aminosäure **5** zugesetzt. Die erhaltene ECL-Aktivität unterscheidet sich allerdings nicht von den Pyren-funktionalisierten Peptiden (Abbildung 6-6).



**Abb. 6-6:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346 \text{ nm}$ ) und ECL (raue Kurve: Schaltfrequenz 50 ms; scharfe Peaks: Schaltfrequenz 1 s) des Gemisches von Boc-Gly-Gly-D-Pta-OBzl (**16a**) und **5** in DMSO ( $c = 10^{-3} \text{ M}$ ).

ECL-System	Emission	$\lambda_{\text{ECL}} [\text{nm}]$	$\Delta H_{\text{exc}} [\text{eV}]$	$\Delta G_{\text{ea}} [\text{eV}]$	$\Delta H [\text{eV}]$
<b>14a + 6</b>	LE <sup>a</sup>	401, 423	3.10, 2.93		
	Excimer	487	2.54	2.74	2.64
	Exciplex	599	2.07		
<b>15a + 6</b>	LE	402, 423	3.08, 2.93		
	Excimer	489	2.53	2.78	2.68
	Exciplex	590	2.10		
<b>16a + 5</b>	LE	398, 419	3.11, 2.96		
	Excimer	481	2.57	2.74	2.64
	Exciplex	590	2.12		
<b>18a + 6</b>	LE	402, 425	3.08, 2.92		
	Excimer	495	2.50	2.77	2.67
	Exciplex	601	2.06		
<b>20a + 6</b>	LE	401, 422	3.10, 2.94		
	Excimer	490	2.53	2.77	2.67
	Exciplex	580	2.14		

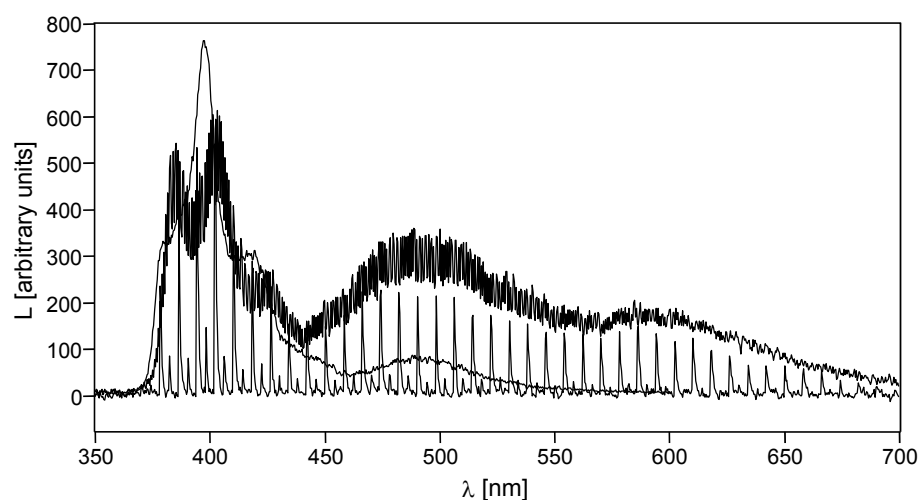
**Tab. 6-1:** Energetische Daten der ECL-Experimente an linearen Peptiden (a: Es wird jeweils die intensivste und die langwelligste LE-Emissionsbande angegeben).

Die bislang aufgeführten ECL-Ergebnisse belegen, dass der jeweilige Peptidbackbone keinen Einfluss auf die ECL-Eigenschaften der unterschiedlichen Peptidspezies hat und

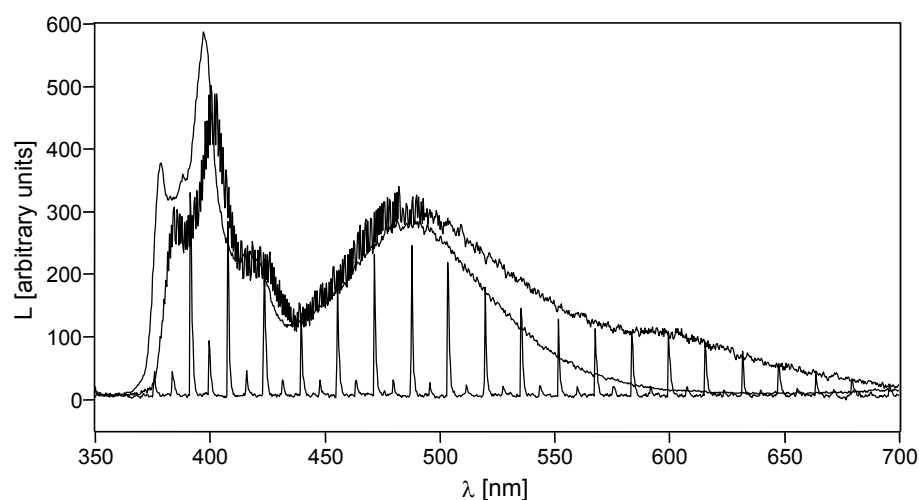
als elektrochemisch inert betrachtet werden kann. Dies steht in Übereinstimmung mit entsprechenden elektrochemischen Messungen.<sup>218</sup>

Die energetischen Daten und einzelnen Emissionswellenlängen der ECL-Untersuchungen an linearen Peptiden sind in Tabelle 6-1 zusammengefasst.

### 6.3 ECL-Verhalten Pyren-funktionalisierter Hairpinpeptide



**Abb. 6-7:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346$  nm) und ECL (raue Kurve: Schaltfrequenz 50 ms; scharfe Peaks: Schaltfrequenz 1 s) des Gemisches von Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-OBzl (**29**) und **6** in DMSO ( $c = 10^{-3}$  M).



**Abb. 6-8:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346$  nm) und ECL (raue Kurve: Schaltfrequenz 50 ms; scharfe Peaks: Schaltfrequenz 2 s) des Gemisches von Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (**30**) und **6** in DMSO ( $c = 10^{-3}$  M).

Die ECL-Eigenschaften der Pyren-funktionalisierten Hairpinpeptide **29** und **30** unterscheiden sich nicht von den im vorangehenden Kapitel besprochenen linearen Peptiden (Abbildung 6-7 und 6-8).

Auffällig ist jedoch, dass die Intensität der Excimeremission der difunktionalisierten Spezies **30** (Abbildung 6-8) vor allem in der Photolumineszenz erheblich höher ist als im Falle des monofunktionalisierten Peptids **29**. Während bei Verbindung **29** nur eine intermolekulare Excimerbildung möglich ist, könnten intramolekulare Excimeranteile bei Peptid **30** dieses Verhalten erklären.

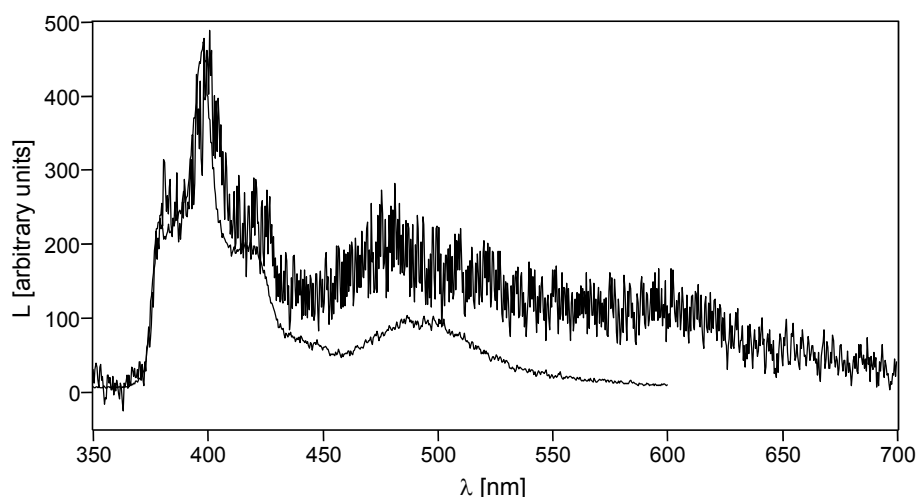
Die gesammelten Ergebnisse der ECL-Experimente an Pyren-funktionalisierten Hairpinpeptiden sind in Tabelle 6-2 wiedergegeben. Es zeigt sich, dass auch bei den Hairpinpeptidstrukturen die elektrochemisch eingebrachte Energie nicht ausreicht, um den LE-Zustand (Singulett-Spezies) direkt zu populieren. Der Energieaufwand für die direkte Generierung der Excimer- und Exciplexemission liegt allerdings im Rahmen der elektrochemischen Energie (Tabelle 6-2).

ECL-System	Emission	$\lambda_{\text{ECL}}$ [nm]	$\Delta H_{\text{exc}}$ [eV]	$\Delta G_{\text{ea}}$ [eV]	$\Delta H$ [eV]
<b>29 + 6</b>	LE <sup>a</sup>	402, 424	3.08, 2.92		
	Excimer	492	2.52	2.78	2.68
	Exciplex	591	2.10		
<b>30 + 6</b>	LE	402, 423	3.08, 2.93		
	Excimer	488	2.54	2.76	2.66
	Exciplex	598	2.07		

**Tab. 6-2:** Energetische Daten der ECL-Experimente an Hairpinpeptiden (a: Es wird jeweils die intensivste und die langwelligste LE-Emissionsbande angegeben).

## 6.4 ECL-Verhalten Pyren-funktionalisierter Cyclopeptide

Das ECL-Verhalten des mit nur einer Pyreneinheit substituierten cyclischen Hexapeptids **32** weicht deutlich von dem der bislang untersuchten Peptidsystemen ab (Abbildung 6-9).



**Abb. 6-9:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346$  nm) und ECL (raue Kurve: Schaltfrequenz 25 ms) des Gemisches von cyclo-(Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly) (**32**) und **6** in DMSO ( $c = 10^{-3}$  M).

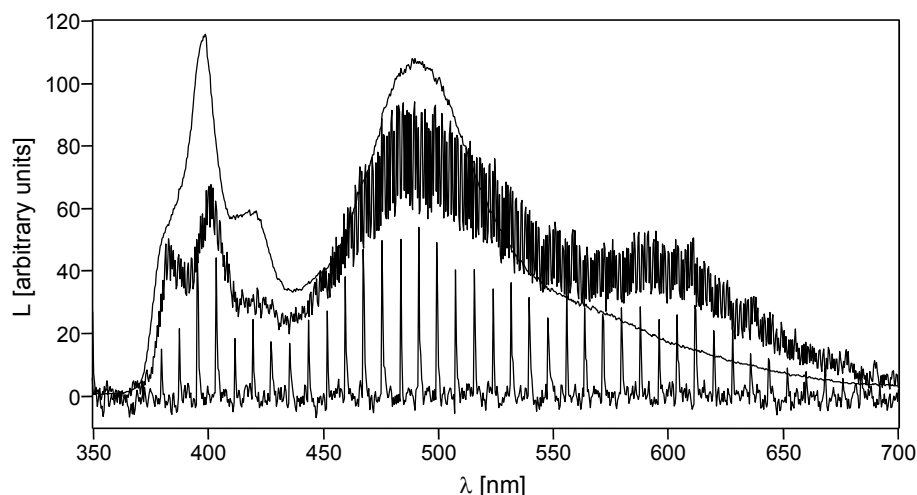
Bei einem Gemisch der Verbindung **32** als Akzeptor- und **6** als Donorkomponente stellt sich nur bei hohen Schaltfrequenzen von 25 ms eine relativ intensitätsschwache ECL-Aktivität ein.<sup>226</sup> Bei Schaltdauern von 1 s oder 2 s ist dagegen keinerlei Lumineszenz während des ECL-Experiments zu verzeichnen. Dies deutet auf eine geringe Stabilität der gebildeten Radikationen hin. Die Kurvenform sowohl des ECL- als auch des Photolumineszenzspektrums gibt allerdings den gewohnten Verlauf wieder. Die Ursache für das spezielle ECL-Verhalten des Cyclopeptids **32** konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Im Gegensatz dazu weisen die zweifach Pyren-funktionalisierten cyclischen Hexapeptide **33** und **34** eine stärkere ECL-Aktivität auf (Abbildung 6-10 und 6-11).

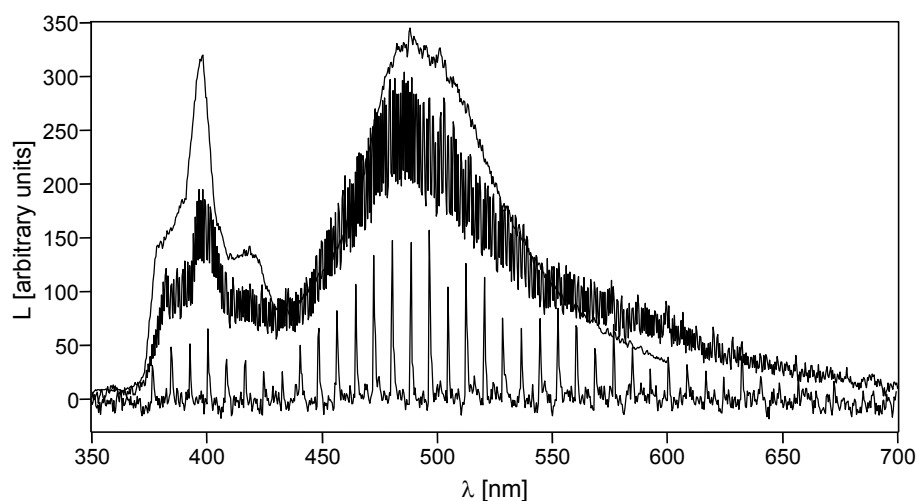
Im Falle des Cyclopeptids **33** mit direkt benachbarten Pyrensubstituenten ergibt sich eine etwas intensivere Exciplexemission als im Falle des Cyclopeptids **34**. Die

<sup>226</sup> Der Vergleich von ECL-Aktivitäten setzt gleichbleibende Messbedingungen voraus. Aus diesem Grunde werden alle ECL-Spektren in DMSO bei gleicher Konzentration ( $10^{-3}$  M) und höchster Detektorempfindlichkeit aufgenommen.

Photolumineszenzspektren der entsprechenden Mischungen mit der Phenothiazinaminosäure **6** zeigen wiederum deutliche LE- und Excimeremission, während keine zum ECL-Experiment analoge Exciplexbande detektiert wird.



**Abb. 6-10:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346 \text{ nm}$ ) und ECL (raue Kurve: Schaltfrequenz 50 ms; scharfe Peaks: Schaltfrequenz 1 s) des Gemisches von cyclo-(Gly-Gly-D-Pya-D-Pya-Gly-Gly) (**33**) und **6** in DMSO ( $c = 10^{-3} \text{ M}$ ).



**Abb. 6-11:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346 \text{ nm}$ ) und ECL (raue Kurve: Schaltfrequenz 50 ms; scharfe Peaks: Schaltfrequenz 1 s) des Gemisches von cyclo-(Gly-D-Pya-Gly-Gly--D-Pya-Gly) (**34**) und **6** in DMSO ( $c = 10^{-3} \text{ M}$ ).

Im Gegensatz zur unmittelbaren Populierung der Excimer- und Exciplexemissionen ist die direkte Bildung der emittierenden Singulett-Spezies bei keinem der cyclischen Peptide mittels der eingebrachten elektrochemischen Energie möglich. Dies lässt sich aus Tabelle 6-3 entnehmen, in der alle entsprechenden Messwerte aufgeführt sind.

ECL-System	Emission	$\lambda_{\text{ECL}}$ [nm]	$\Delta H_{\text{exc}}$ [eV]	$\Delta G_{\text{ea}}$ [eV]	$\Delta H$ [eV]
<b>32 + 6</b>	LE <sup>a</sup>	400, 422	3.10, 2.94		
	Excimer	481	2.57	2.76	2.66
	Exciplex	598	2.07		
<b>33 + 6</b>	LE	401, 423	3.10, 2.93		
	Excimer	493	2.51	2.79	2.69
	Exciplex	594	2.09		
<b>34 + 6</b>	LE	399, 419	3.11, 2.96		
	Excimer	486	2.55	2.79	2.69
	Exciplex	592	2.09		

**Tab. 6-3:** Energetische Daten der ECL-Experimente an cyclischen Hexapeptiden<sup>227</sup> (a: Es wird jeweils die intensivste und die langwelligste LE-Emissionsbande angegeben).

## 6.5 ECL-Eigenschaften Pyren- und Phenothiazin-funktionalisierter Peptidsysteme

Die Peptide **21a**, **31** und **35** enthalten mit Pyren sowohl eine reduzierbare Akzeptorteilstruktur als auch mit Phenothiazin einen oxidierbaren Donorsubchromophor, weshalb sie als einheitliche ECL-Systeme anzusehen sind. Diese Spezies sollten demnach ohne Zusatz weiterer elektrochemisch aktiver Komponenten elektrochemilumineszent sein.

Gerade das lineare Hexapeptid **21a** und das cyclische Hexapeptid **35**, in denen die Chromophorgruppierungen an direkt benachbarten Aminosäureeinheiten angeknüpft sind, weisen ein, zu bisher untersuchten Peptiden, unterschiedliches ECL-Verhalten auf.

Die Abbildungen 6-12 und 6-13 zeigen, dass die ECL-Spektren in beiden Fällen durch Exciplexemissionen geprägt sind, wobei insgesamt geringe Lumineszenzintensitäten auftreten.<sup>228</sup> Die Photolumineszenzspektren der ECL-Lösungen lassen dagegen nur

<sup>227</sup> Aufgrund der ungenügenden Löslichkeit des cyclischen Octapeptids **36** wird diese Verbindung nicht auf seine ECL-Aktivität untersucht.

<sup>228</sup> Dieses Verhalten wird bei anderen Pyren-Phenothiazin-substituierten Verbindungen unterschiedlicher Molekülklassen ebenfalls beobachtet:

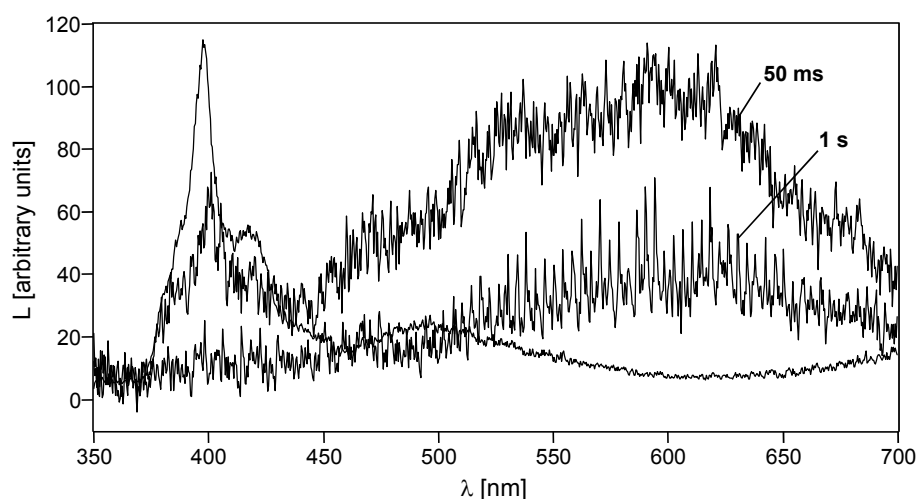
a) Lit. <sup>212e</sup>;

b) G. Beer, *Dissertation*, Universität Regensburg, **2001**;

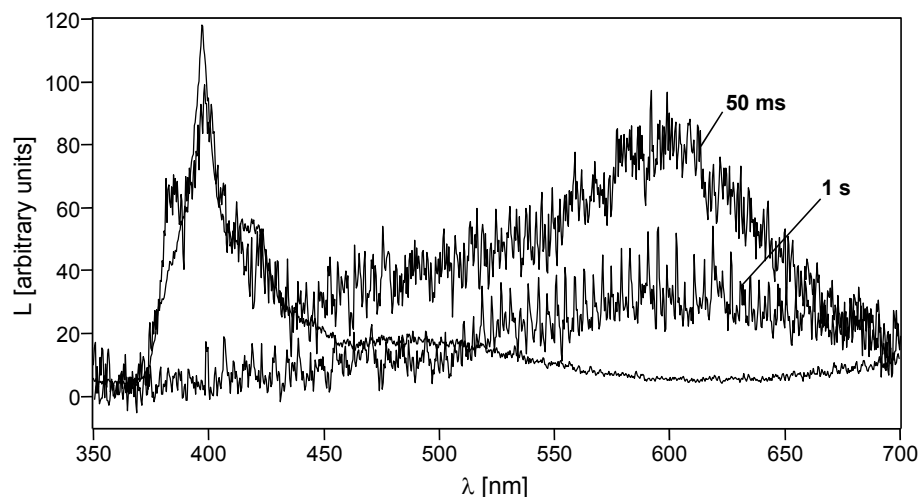
c) M. Komma, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1999**.



übliche Pyren-LE- und Pyren-Excimeremissionen erkennen. Bei einer Potentialwechselfrequenz von 50 ms ist in den ECL-Spektren neben der Exciplexbande jeweils auch eine Pyren-Monomeremission zu verzeichnen. Bei einer Schaltfrequenz von 1 s hebt sich die Emission nur noch gering vom Grundrauschen ab und es kann keine Pyren-LE-Emission mehr detektiert werden. Dies deutet auf eine verminderte Radikalionstabilität im Vergleich zu anderen Peptidsystemen hin. Eventuell beeinflusst der benachbarte Chromophor die Lebenszeit der jeweils gebildeten Radikationen. Zudem reicht die elektrochemisch eingebrachte Energie von 2.73 eV (**21a**) bzw. 2.72 eV (**35**) reicht nicht aus um die entsprechenden LE-Emissionen bei ca. 400 nm (3.09 eV) direkt zu generieren. Eine unmittelbare Populierung der Exciplexemission bei 592 nm (2.09 eV, **21a**) bzw. 597 nm (2.08 eV, **35**) ist dagegen möglich. Dies mag das Intensitätsverhältnis der LE- und Exciplexemission teilweise rechtfertigen. Das differierende ECL-Verhalten dieser Spezies im Vergleich zu anderen Peptiden ist ohne weitere Untersuchungen jedoch schwierig zu begründen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der diskutierten Verbindungen und dem hohen Potentialunterschied der Pyrenreduktion und der Phenothiazinoxidation sind wünschenswerte Messungen in anderen Solventien allerdings ausgeschlossen. Die apparativen Gegebenheiten ermöglichen zudem keine konzentrationsabhängigen Experimente.

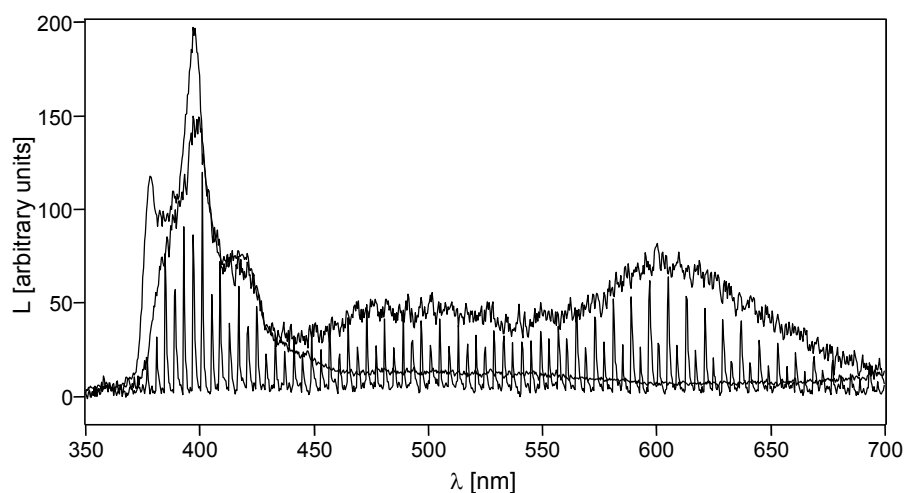


**Abb. 6-12:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346 \text{ nm}$ ) und ECL von Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (**21a**) bei einer Schaltfrequenz von 50 ms bzw. 1 s in DMSO ( $c = 10^{-3} \text{ M}$ ).



**Abb. 6-13:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346$  nm) und ECL von cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly) (**35**) bei einer Schaltfrequenz von 50 ms bzw. 1 s in DMSO ( $c = 10^{-3}$  M).

Das Donor-Akzeptor-substituierte Hairpinpeptid **31** hingegen zeigt eine Elektrochemilumineszenz, die stark an die gemischten ECL-Systeme der vorangehenden Kapitel erinnert (Abbildung 6-14). Die Exciplexemission ist auch bei dieser Spezies relativ intensiv. Die Pyren-Monomer- und Excimeremission ist jedoch eindeutig erkennbar und eine adäquate Elektrochemilumineszenz ist nicht auf hohe Potentialwechselfrequenzen von 25 ms oder 50 ms beschränkt.



**Abb. 6-8:** Photolumineszenz (glatte Kurve,  $\lambda_{\text{ex}} = 346$  nm) und ECL (raue Kurve: Schaltfrequenz 25 ms; scharfe Peaks: Schaltfrequenz 1 s) von Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (**31**) in DMSO ( $c = 10^{-3}$  M).

Aufgrund des Hexapeptidspacers zwischen den Chromophoreinheiten in Verbindung **31** ist eine gegenseitige Beeinflussung der Teilstrukturen im Zuge der ECL-Messung somit anscheinend unterbunden.

Wie in allen bisher aufgeführten ECL-Untersuchungen reicht auch hier die elektrochemische Energie von 2.79 eV nicht aus um die Pyren-LE-Emission bei 398 nm (3.11 eV) direkt zu gewährleisten. Excimer- (492 nm, 2.52 eV) und Exciplexemission (604 nm, 2.05 eV) können dagegen direkt populierte werden.

ECL-System	Emission	$\lambda_{\text{ECL}}$ [nm]	$\Delta H_{\text{exc}}$ [eV]	$\Delta G_{\text{ea}}$ [eV]	$\Delta H$ [eV]
<b>21a</b>	LE <sup>a</sup>	401, 423	3.10, 2.93		
	Excimer	474	2.61	2.73	2.63
	Exciplex	592	2.09		
<b>31</b>	LE	398, 419	3.11, 2.96		
	Excimer	492	2.52	2.79	2.69
	Exciplex	604	2.05		
<b>35</b>	LE	398, 422	3.11, 2.94		
	Excimer	476	2.60	2.72	2.62
	Exciplex	597	2.08		

**Tab. 6-4:** Energetische Daten der ECL-Experimente an cyclischen Hexapeptiden<sup>229</sup> (a: Es wird jeweils die intensivste und die langwelligste LE-Emissionsbande angegeben).

Die experimentell ermittelten Werte bezüglich der Elektrochemilumineszenz der Donor-Akzeptor-substituierten Peptide sind in Tabelle 6-4 festgehalten.

<sup>229</sup> Aufgrund der ungenügenden Löslichkeit des cyclischen Octapeptids **36** wird diese Verbindung nicht auf seine ECL-Aktivität hin untersucht.

## 6.6 Zusammenfassung der ECL-Untersuchungen

Die durchgeführten ECL-Messungen zeigen, dass alle untersuchten chromophorderivatisierten Peptide zur Emission elektrochemisch generierter Lumineszenz befähigt sind. Dazu werden Pyren-funktionalisierte Spezies mit der Phenothiazin-Aminosäure **6** und Phenothiazin-funktionalisierte Peptide mit der Pyren-Aminosäure **5** versetzt. Bei einheitlichen Systemen, die sowohl Donor- als auch Akzeptor-Teilstrukturen beinhalten, kann auf einen Zusatz weiterer elektrochemisch aktiver Komponenten verzichtet werden.

Die elektrochemisch generierte Lumineszenz unterscheidet sich deutlich von den Photolumineszenzspektren der ECL-Lösungen, da neben Pyren-Monomer- und Excimerbanden in den ECL-Spektren auch Exciplexemissionen auftreten. Die Studien an monosubstituierten Peptidsystemen (**14a**, **15a**, **16a**, **18a**, **29** und **32**) belegen, dass sowohl Excimer- als auch Exciplexemissionen hauptsächlich auf intermolekulare Prozesse zurückzuführen sind, was im Unterschied zu Fluoreszenzuntersuchungen<sup>224</sup> steht. Einfach bzw. zweifach Pyren-funktionalisierte Verbindungen ergeben grundsätzlich gleiches ECL-Verhalten. Ebenso kann kein Einfluss der verschiedenen Peptidbackbones auf die Elektrochemilumineszenz der untersuchten Peptide festgestellt werden.

Die einheitlichen ECL-Systeme **21a** und **35** beinhalten benachbarte Pyren- und Phenothiazin-Teilstrukturen und weisen eine wenig intensive elektrochemisch erzeugte Lumineszenz auf, die von der Exciplexemission geprägt wird. Eine Beeinflussung der Radikationenstabilität durch den jeweils benachbarten Subchromophor ist hierbei wahrscheinlich, da die ECL-Aktivität mit fallender Potentialschaltfrequenz sinkt.

Das ebenso Donor-Akzeptor-derivatisierte Hairpinpeptid **31** liefert hingegen eine deutlich intensivere Elektrochemilumineszenz, die an gemischte ECL-Peptidsysteme erinnert.

Die eingebrachte elektrochemische Energie reicht bei keinem der untersuchten Fälle aus um den emittierenden Pyre-LE-Zustand (Singulett-Zustand) direkt zu populieren, weshalb der beobachteten Pyren-Monomeremission vermutlich Triplett-Triplett-Annihilierungsmechanismen zugrunde liegen. Die Excimer- und Exciplexemissionen hingegen können unmittelbar durch die elektrochemische Energie erzeugt werden.

## 7 Cyclische Hexapeptide zur Komplexierung von Erdalkalimetallionen

### 7.1 Allgemeines

Cyclische Peptide besitzen neben der bereits beschriebenen biologischen Wirksamkeit,<sup>230</sup> vor allem ein großes Anwendungspotential für molekulare Erkennungsprozesse. In einer Vielzahl von Publikationen sind sowohl Anionen-<sup>231</sup> und Kationenkomplexierungen<sup>232</sup> als auch, zum Teil enantioselektive, Wechselwirkungen mit Aminosäuren<sup>233</sup> beschrieben. Daraus ergibt sich die Verwendung cyclischer Peptide als chirale Selektoren in der Kapillarelektrophorese,<sup>234</sup> für Ion-selektive Elektroden<sup>235</sup> oder für das Studium molekularer Ionentransportvorgänge durch spezielle Membranen.<sup>236</sup> Ein klassischer Vertreter der letztgenannten Ionophore ist das Valinomycin. Dieses Dodecadepsipeptid bildet mit Kaliumkationen einen 1:1-Komplex und induziert den  $K^+$ -Transport durch biologische sowie künstliche Membranen.<sup>237</sup>

---

<sup>230</sup> Siehe Kapitel 2.5.1 dieser Arbeit.

<sup>231</sup> a) S. Kubik, R. Goddard, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2722;

b) S. Kubik, R. Goddard, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9475.

<sup>232</sup> a) S. Kimura, E. Ozeki, Y. Imanishi, *Biopolymers* **1989**, *28*, 1235;

b) N. Nishino, T. Shiroishi, T. Muraoka, T. Fujimoto, *Chem. Lett.* **1992**, 665;

c) C. Garcia-Echeverria, F. Albericio, E. Giralt, M. Pons, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11663;

d) D. J. Freeman, G. Pattenden, A. F. Drake, G. Siligardi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 1129;

e) P. Comba, R. Cusack, D. P. Fairlie, L. R. Gahan, G. R. Hanson, U. Kazmaier, A. Ramlow, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 6721;

f) L. Grondahl, N. Sokolenko, G. Abbenante, D. P. Fairlie, G. R. Hanson, L. R. Gahan, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 1227.

<sup>233</sup> a) D. Leipert, D. Nopper, M. Bauser, G. Gauglitz, G. Jung, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3503;

b) I. McEwen, *Biopolymers* **1993**, *33*, 933;

c) B. Bartman, C. M. Deber, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1028.

<sup>234</sup> M. Chiari, V. Desperati, E. Manera, R. Longhi, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4967.

<sup>235</sup> a) N. Nishino, T. Shiroishi, T. Muraoka, T. Fujimoto, *Chem. Lett.* **1992**, 665;

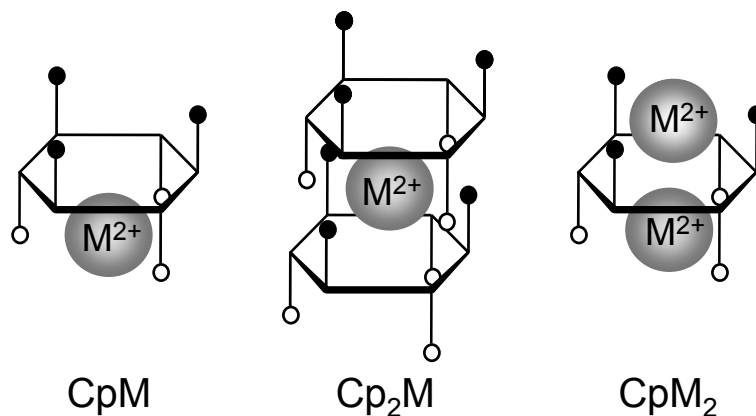
b) L. A. R. Pioda, V. Stankova, W. Simon, *Anal. Lett.* **1969**, *2*, 665.

<sup>236</sup> a) H. Kataoka, T. Hanawa, T. Katagi, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 570;

b) S. Kimura, Y. Imanishi, *Biopolymers* **1984**, *23*, 563.

<sup>237</sup> H. D. Jakubke, *Peptide*, Spektrum, Heidelberg, **1996**.

Im Falle einer Erdalkalimetallionenkomplexierung durch cyclische Hexapeptide sind drei unterschiedliche Komplexierungsformen bekannt. Diese sind in Abbildung 7-1 schematisch dargestellt. Neben der Bildung gewöhnlicher 1:1-Komplexe wird auch das Auftreten von 2:1- und 1:2-Systemen beobachtet. Dabei ist das Metallkation in der Regel von jeweils drei Carbonylgruppen der beteiligten Peptideinheiten koordiniert. Die Metall-Sauerstoff-Abstände bewegen sich im Allgemeinen zwischen 2.0-2.5 Å.<sup>238</sup>



**Abb. 7-1:** Schematische Darstellung möglicher Komplexierungsformen zwischen Cyclohexapeptiden (Cp) und Erdalkalimetallkationen (M) (Der Sechseck symbolisiert ein cyclisches Hexapeptid mit schwarzen bzw. weißen Kreisen als Carbonylgruppen).

Cyclopeptid-Kation-Komplexe wurden bisher ausschließlich durch NMR-, CD- und Raman-Spektroskopie nachgewiesen.<sup>239</sup>

Im Unterschied dazu soll im Folgenden anhand der cyclischen Hexapeptide **32**, **33** und **34**, die Möglichkeit studiert werden, Cyclopeptid-Erdalkalimetallion-Komplexe mittels UV/Vis-Absorptions- und Emissionsspektroskopie zu detektieren. Dies kann durch die Pyren-Funktionalisierung der Peptidsysteme gewährleistet werden.

Pyren-derivatisierte Verbindungen werden häufig zur molekularen Erkennung von Metallkationen eingesetzt, wobei meist ein sich veränderndes Intensitätsverhältnis von Excimer- zu LE-Emission ( $I_E/I_M$ ) im Zuge der Komplexierung hilfreich ist. Normalerweise sinkt dabei in mehrfach Pyren-substituierten Systemen das

<sup>238</sup> a) K. Hori, J. N. Kushick, H. Weinstein, *Biopolymers* **1988**, 27, 1865;

b) K. I. Varughese, S. Aimoto, G. Kartha, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, 27, 118;

c) C.-H. Niu, V. Madison, L. G. Pease, E. R. Blout, *Biopolymers* **1978**, 17, 2747.

<sup>239</sup> a) P. Xie, M. Diem, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 429;

b) E. Ozeki, S. Kimura, Y. Imanishi, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, 34, 111.

$I_E/I_M$ -Verhältnis, da durch die Koordination des Metallions die konformative Freiheit und somit die Excimergenerierung im Molekül eingeschränkt ist.<sup>240</sup>

Zur Untersuchung der Komplexbildungstendenz der genannten Pyren-funktionalisierten Cyclohexapeptide werden Fluoreszenz-, UV/Vis-Absorptions- und CD-Titrations mit Lösungen wasserfreier Magnesium-, Calcium- und Bariumperchlorate durchgeführt. Als Solvens kommt ein Gemisch aus HFIP/MeOH<sup>241</sup> (4/1) zum Einsatz. Die Cyclopeptidkonzentrationen betragen ca.  $10^{-4}$  M, wohingegen die zuzugebenden Metallsalz-Lösungen wesentlich konzentrierter sind (ca.  $10^{-2}$  M), um Verdünnungseffekte zu vermeiden.

## 7.2 Komplexierungsverhalten des cyclischen Hexapeptids 34

### 7.2.1 Komplexierung von Calcium(II)-Ionen

Im Laufe der Fluoreszenzuntersuchungen wurde bereits vermerkt, dass in den Emissionsspektren des zweifach Pyren-funktionalisierten cyclischen Hexapeptids **34** sowohl LE- als auch intramolekulare Excimerbanden detektiert werden.<sup>242</sup>

Der schrittweise Zusatz einer Calciumperchloratlösung zur Messlösung des Cyclopeptids bewirkt in der Fluoreszenz eine erhebliche Erhöhung des  $I_E/I_M$ -Verhältnisses (Tabelle 7-1, Kapitel 7.5). In Abbildung 7-2 ist deutlich zu erkennen, dass bei Ca(II)-Zugabe die Intensität der Pyren-Monomeremission im Spektralbereich von 370-430 nm abnimmt, während die Pyren-Excimerintensität bei 482 nm steigt. Zudem zeigt sich, dass die Excimeremission des freien Peptids ein Maximum bei 487 nm besitzt, während das Excimermaximum nach Ca(II)-Zugabe um 5 nm hypsochrom verschoben auftritt. Die Erklärung dieser Beobachtung erfolgt später (Abbildung 7-7).

---

<sup>240</sup> a) J.-S. Yang, C.-S. Lin, C.-Y. Hwang, *Org. Lett.* **2001**, 3, 889;

b) C. Monahan, J. Bien, B. Smith, *Chem. Commun.* **1998**, 431;

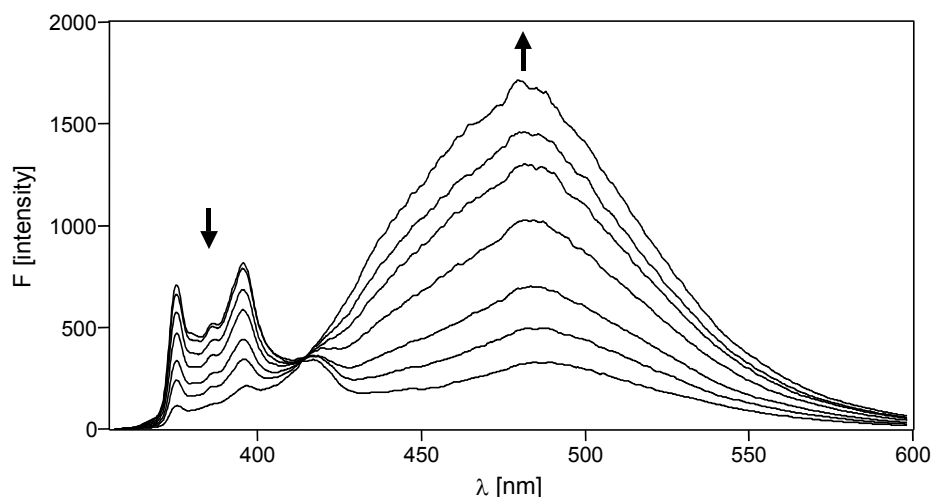
c) I. Aoki, H. Kawabata, K. Nakashima, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1771;

d) S. Nishizawa, M. Watanabe, T. Uchida, N. Teramae, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 141;

e) Y. Suzuki, T. Morozumi, H. Nakamura, M. Shimomura, T. Hayashita, R. A. Bartsh, *J. Phys. Chem.* **1998**, 102, 7910.

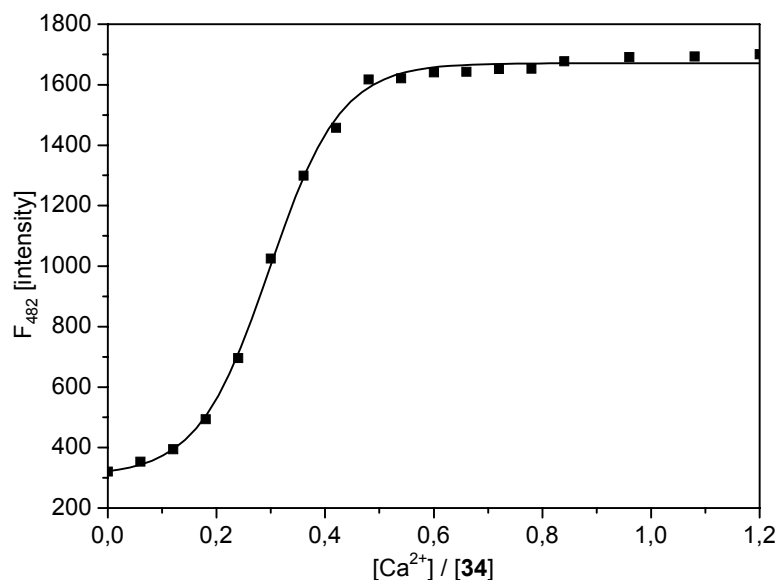
<sup>241</sup> HFIP = 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol

<sup>242</sup> siehe Kapitel 5.4 dieser Arbeit.



**Abb. 7-2:** Fluoreszenzspektren von cyclo-(Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly) (**34**) nach Zusatz von 0.00, 0.12, 0.24, 0.30, 0.36, 0.42 und 0.60 Äquivalenten  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  in HFIP/MeOH = 4/1 ( $\lambda_{\text{ex}} = 339 \text{ nm}$ ,  $c = 10^{-4} \text{ M}$ ).

Beobachtet man während der  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ -Zugabe die Intensitätsänderung im Bereich der Excimeremission (Abbildung 7-3) so fällt ein sigmoidaler Kurvenverlauf auf, wobei ab einem Kationen- zu Cyclopeptidkonzentrationsverhältnis ( $[\text{Ca}^{2+}]/[\mathbf{34}]$ ) von 0.2 der dynamische Anstieg beginnt. Hat die  $\text{Ca}(\text{II})$ -Konzentration schließlich die Hälfte der Cyclopeptidkonzentration erreicht, bleibt ein weiterer Calciumzusatz wirkungslos.



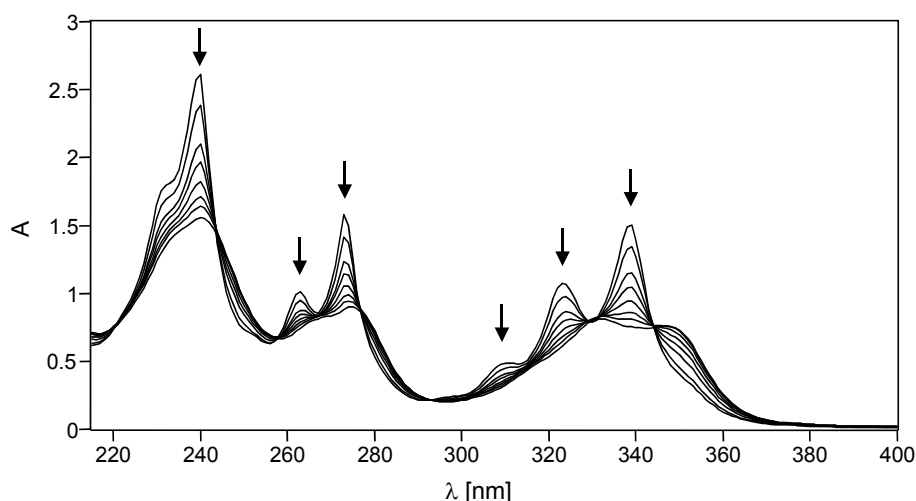
**Abb. 7-3:** Sigmoidaler Fit der Emissionsintensitätsänderung bei 482 nm während der Titration des Cyclopeptids **34** mit  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ .



Letztendlich löst die Ca(II)-Addition eine Steigerung des  $I_E/I_M$ -Verhältnisses von 0.6 auf 14.9 aus, wobei ein isoemissiver Punkt bei 414 nm (Abbildung 7-2) auf einen einheitlichen Koordinationsprozess hindeutet.

Neben dem Fluoreszenzverhalten werden durch Calciumkationenzusatz auch die Absorptionseigenschaften der Spezies **34** verändert.

Die typischen Pyrenabsorptionsbanden<sup>243</sup> werden im Zuge der Titration breiter, intensitätsschwächer und bathochrom verschoben (Abbildung 7-4). Während im freien Peptid drei schwingungsaufgespaltene Absorptionsbereiche bei 339 nm ( $\lg \epsilon = 4.65$ ), 273 nm ( $\lg \epsilon = 4.67$ ) und 240 nm ( $\lg \epsilon = 4.89$ ) auftreten, sind die einzelnen Übergänge nach  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ -Addition weniger feinstrukturiert und werden bei 347 nm ( $\lg \epsilon = 4.37$ ), 274 nm ( $\lg \epsilon = 4.44$ ) und 241 nm ( $\lg \epsilon = 4.68$ ) detektiert.<sup>244</sup> Isosbestische Punkte treten bei 220 nm, 244 nm, 258 nm, 277 nm, 293 nm und 344 nm auf.



**Abb. 7-4:** UV/Vis-Absorptionsspektren von  $\text{cyclo}-(\text{Gly}-D\text{-Pya-Gly-Gly}-D\text{-Pya-Gly})$  (**34**) nach Zusatz von 0.00, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.40 und 0.80 Äquivalenten  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  in HFIP/MeOH = 4/1 ( $c = 10^{-4}$  M).

Dies steht in Übereinstimmung mit der Ausbildung von Pyren-Dimeren im Grundzustand, nach Ca(II)-Kationenzusatz.<sup>245</sup>

<sup>243</sup> siehe Kapitel 4.1.1 dieser Arbeit.

<sup>244</sup> Für die drei schwingungsaufgespaltenen Übergänge wird jeweils die Wellenlänge und der logarithmische molare Extinktionskoeffizient der langwelligsten Absorption angegeben.

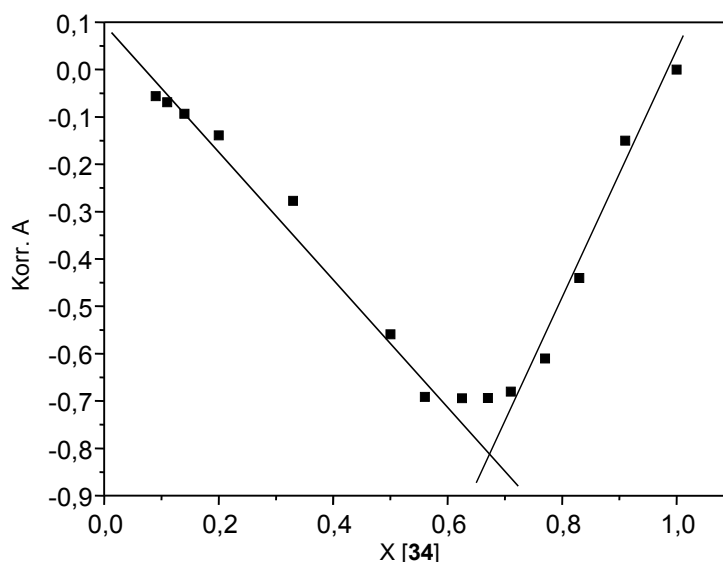
<sup>245</sup> a) H. Mihara, J. Hayashida, H. Hasegawa, H. I. Ogawa, T. Fujimoto, N. Nishino, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 517;

b) A. Yamauchi, T. Hayashita, A. Kato, S. Nishizawa, M. Watanabe, N. Teramae, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5841.

In Analogie zur Fluoreszenztitration tritt in den UV/Vis-Spektren nach Erreichen des molaren Verhältnisses von **34** zu  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  gleich 2:1 keine weitere Änderung mehr auf.

Die Pyrensonden ermöglichen aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften eine Beschreibung der Stöchiometrie und Struktur der Komplexe zwischen  $\text{Ca}(\text{II})$ -Kationen und dem cyclische Hexapeptid **34**. Im Gegensatz zu den meisten bisher bekannten pyrenmodifizierten Metall-Sensoren<sup>240</sup> nimmt das  $I_E/I_M$ -Verhältnis der Fluoreszenz des Cyclopeptides bei Metallionenzusatz zu und führt beinahe zur vollständigen Löschung der Pyren-Monomeremission (Tabelle 7-1, Abbildung 7-2). Dieser Befund und die durch UV/Vis-Messungen belegte Ausbildung von Pyren-Dimeren im Grundzustand (Abbildung 7-4) zeigen, dass die Pyreneinheiten im Komplex sowohl im angeregten, als auch im Grundzustand nahezu parallel und übereinander angeordnet sein müssen.

Aus den Absorptionsdaten lässt sich nach der Methode der kontinuierlichen Variation zudem ein Job-Plot erstellen, der auf die dominierende Komplex-Stöchiometrie schließen lässt.<sup>246</sup> Dabei wird der Molenbruch (X) des cyclischen Peptids gegen die korrigierte Absorption (korr. A) aufgetragen. Idealerweise ergeben sich daraus parabelförmige Kurven deren Maxima bzw. Minima auf die Komplex-Zusammensetzung hindeuten. Maxima bei 0.33, 0.5, bzw. 0.67 belegen die Ausbildung von 1:2-, 1:1- bzw. 2:1-Komplexen.



**Abb. 7-5:** Job-Plot für die Bildung des Komplexes aus Cyclopeptid **34** und  $\text{Ca}(\text{II})$ -Ionen.

<sup>246</sup> D. C. Harris, *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*, Vieweg Verlag, Braunschweig, 1998.

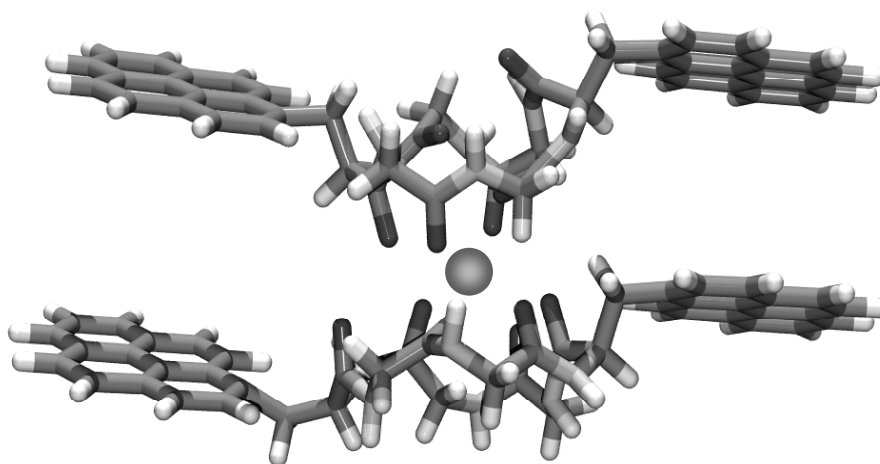
In Abbildung 7-5 ist der Job-Plot für die Ca(II)-Komplexierung durch das cyclische Peptid **34** wiedergegeben, dessen Minimum auf einen Molenbruch von ca. 0.67 abgeschätzt wird. Daraus lässt sich eine 2:1-Stöchiometrie des Cyclopeptid-Ca(II)-Komplexes folgern.

Folglich bildet das cyclische Hexapeptid **34** mit Ca(II)-Kationen einen 2:1-Sandwich-Komplex aus, wobei die Pyren-Teilstrukturen der beiden am Komplex beteiligten Cyclopeptidmoleküle direkt übereinander liegen.

Dadurch erklärt sich auch, dass nach einem Cyclopeptid-Metall-Verhältnis von 2:1 keine weitere Emissions- oder Absorptionsänderung mehr auftritt.

Die Komplexbildungskonstante (K) wird für diesen Komplex numerisch auf  $1 \times 10^5 \text{ l}^2 \text{ mol}^{-2}$  bestimmt (Tabelle 7-1).<sup>247</sup>

Aufgrund der erhaltenen Erkenntnisse kann durch semiempirische Molekülgeometrie-Berechnungen auf PM3-Niveau eine energieminierte Struktur für den  $(\mathbf{34})_2\text{Ca(II)}$ -Komplex ermittelt (Abbildung 7-6) werden.



**Abb. 7-6:** Mögliche, semiempirisch auf PM3-Niveau energieminierte, Pyren-Dimerstruktur des  $(\mathbf{34})_2\text{Ca(II)}$ -Komplexes.

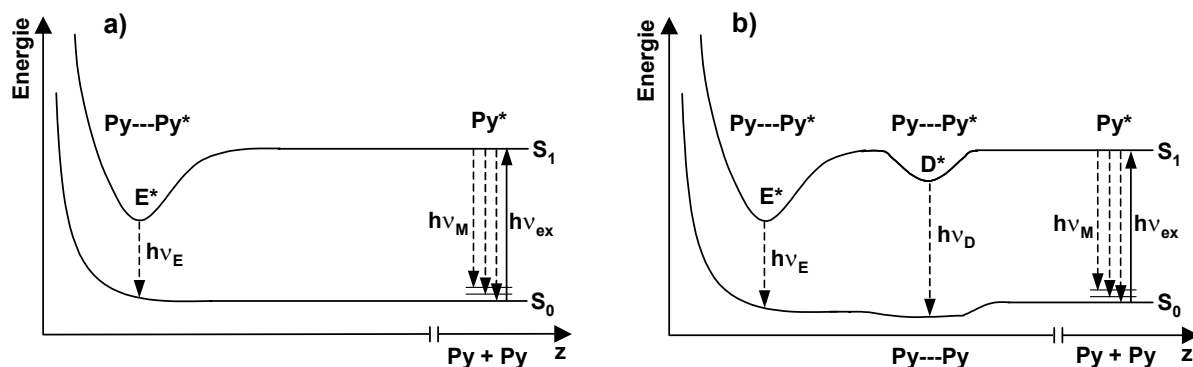
Anhand dieser Berechnung ergeben sich im Komplex Abstände der Pyrensubstrukturen von 6.3 Å bzw. 7.4 Å. Diese Werte sind in einer ersten Betrachtung nicht mit der Generierung gewöhnlicher Excimere in Einklang zu bringen. Nach *J. B. Birks* handelt

<sup>247</sup> Zur numerischen Bestimmung von Komplexbildungskonstanten wird das Softwareprogramm HypNMR verwendet. Der einzurechnende Fehler beträgt ca. 15 %.

Nähere Informationen zu HypNMR liefert:

L. Alderighi, A. Bianchi, L. Biondi, L. Calabi, M. De Miranda, P. Gans, S. Ghelli, P. Losi, L. Paleari, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 2741.

es sich bei dynamischen Excimeren um im angeregten Zustand assoziierte Dimere, die im Grundzustand dissoziieren. Jedes Excimer wird dabei aus einem elektronisch angeregten Pyren und einem Pyren-Molekül im Grundzustand geformt.<sup>248</sup> Die beteiligten Pyreneinheiten müssen während der Lichtabsorption einen Mindestabstand von 10 Å besitzen, um die Generierung eines LE-Zustands zu gewährleisten. Im assoziierten Excimer nehmen die Chromophore üblicherweise einen Abstand von ca. 4 Å ein. Das Energieschema für die Bildung derartiger dynamischer Excimere ist in Abbildung 7-7a dargestellt. Im Falle von Pyren-Grundzustandsdimeren sind die Chromophor-Teilstrukturen bei der Lichtabsorption allerdings nicht dissoziiert, was ein angeregtes Grundzustandsdimer ergibt, das eine der Excimeremission sehr ähnliche Fluoreszenzbande liefert. Aus diesem Grunde spricht man in solchen Fällen von statischen Excimeren.<sup>249</sup> Abbildung 7-7b stellt dieses Verhalten schematisch dar. Wegen der Grundzustandsassoziation zeigt die  $S_0$ -Energiehyperfläche im Bereich von ca. 5 Å bis 10 Å ein Minimum. Die  $S_1$ -Energiehyperfläche weist zwei Minima auf, wobei das tiefere bei ca. 4 Å einem dynamischen Excimer ( $E^*$ ) entspricht. Das Minimum bei einem etwas größeren Pyren-Pyren-Abstand ist dem statischen Excimer ( $D^*$ ) zugehörig.



**Abb. 7-7:** Schematische Darstellung der Potentialenergiehyperflächen für die Pyren-Excimerbildung a) ohne Pyren-Grundzustandsassoziation und b) mit Pyren-Grundzustandsassoziation (Py: Pyren,  $E^*$ : dynamisches Excimer,  $D^*$ : statisches Excimer, M: Monomer, z: Py-Py-Abstand).<sup>250</sup>

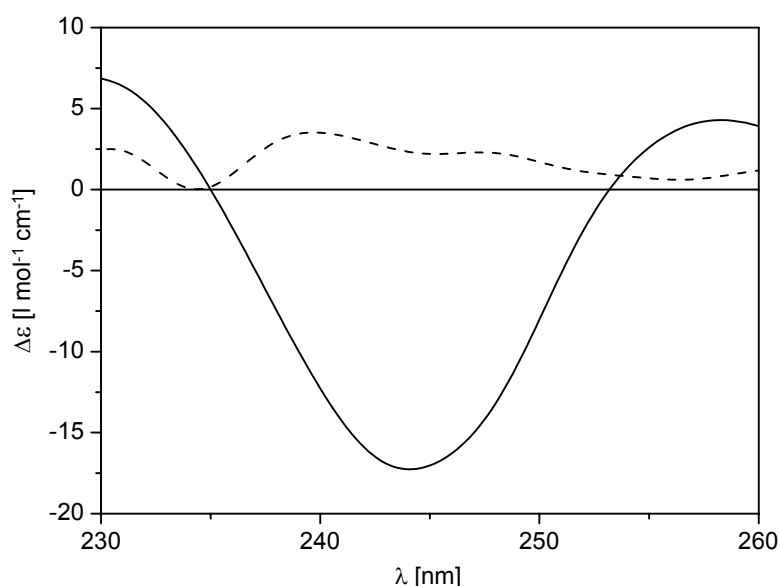
Im  $(34)_2\text{Ca(II)}$ -Komplex ist demnach von der Ausbildung statischer Excimere auszugehen. Dadurch erklärt sich zudem der hypsochrome Shift des Excimermaximums

<sup>248</sup> J. B. Birks, *Rep. Prog. Phys.* **1975**, 38, 903.

<sup>249</sup> F. M. Winnik, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 587.

<sup>250</sup> Die Vorlage für Abbildung 7-7 stammt aus Lit.<sup>249</sup>.

im Zuge der Fluoreszenztitration von Spezies **34** mit Ca(II)-Kationen (Abbildung 7-2), da die D\*-Emission im Allgemeinen etwas energiereicher als die E\*-Emission ist. Neben den bereits beschriebenen Detektionsmethoden kann die Komplexbildung zwischen Verbindung **34** und Ca(II)-Ionen auch mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen werden. Aufgrund der relativ schwachen CD-Signale des Peptids **34** ist eine titrimetrische Verfolgung der Komplexierung allerdings schwierig. Vergleicht man jedoch die CD-Spektren vor und nach der Zugabe von 0.6 Äquivalenten Ca(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> tritt ein deutlicher Unterschied auf, da der Komplex einen intensiven negativen Cotton-Effekt bei 244 nm aufweist (Abbildung 7-8). CD-Änderungen in diesem Spektralbereich sind typisch für das Auftreten von Cyclopeptid-Metallkation-Komplexen.<sup>239</sup>



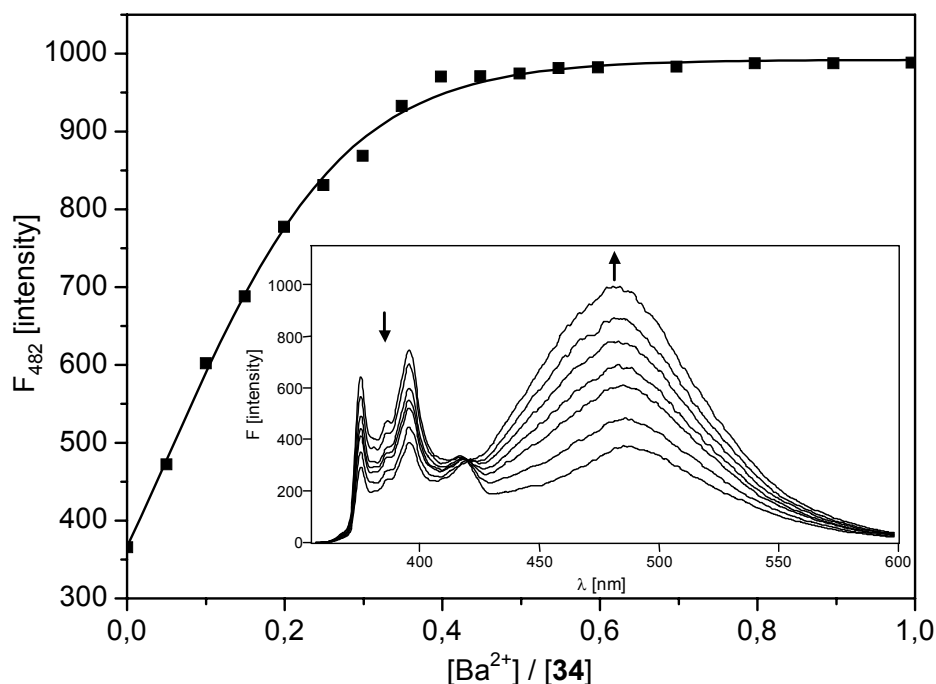
**Abb. 7-8:** Ausschnitt aus den Circular dichroismus-Spektren von cyclo-(Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly) (**34**) ohne Metallkationenzusatz (gestrichelte Linie) und nach Zugabe von 0.6 Äquivalenten Ca(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (durchgezogene Linie).

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Einflüssen von Calcium(II)-Ionen auf das Fluoreszenz-, Absorptions- und CD-Verhalten der Spezies **34**, bewirkt eine Zugabe von Magnesium(II)-Ionen bei keiner der spektroskopischen Methoden eine Änderung. Eine Ca(II)-analoge Komplexierung von Mg(II)-Kationen durch das Cyclohexapeptid tritt demnach nicht auf. Bekanntermaßen hängt die Komplexstabilität und damit auch die Komplexbildung entscheidend von der Kationengröße ab.<sup>239a</sup> Demnach scheint der Ionenradius des Mg(II)-Ions von 0.72 Å (bei der Koordinationszahl sechs), anders als

der Ionenradius des Ca(II)-Ions (1.00 Å), zu klein, um einen Sandwich-Komplex mit dem Peptid **34** zu ermöglichen.

### 7.2.2 Komplexierung von Barium(II)-Ionen

Sukzessives Beifügen einer Ba(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Lösung zur Messlösung des cyclischen Hexapeptids **34** hat grundsätzlich den gleichen Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten des Peptids wie ein Ca(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Zusatz. Abbildung 7-9 (Inset) zeigt, dass während der Ba(II)-Zugabe die Intensität der Pyren-Monomeremission im Spektralbereich von 370-430 nm abnimmt, während die Excimeremissionsintensität bei 482 nm wächst. Zudem tritt ein isoemissiver Punkt bei 420 nm auf.



**Abb. 7-9:** Sigmoidaler Fit der Emissionsintensitätsänderung bei 482 nm während der Titration von cyclo-(Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly) (**34**) mit Ba(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

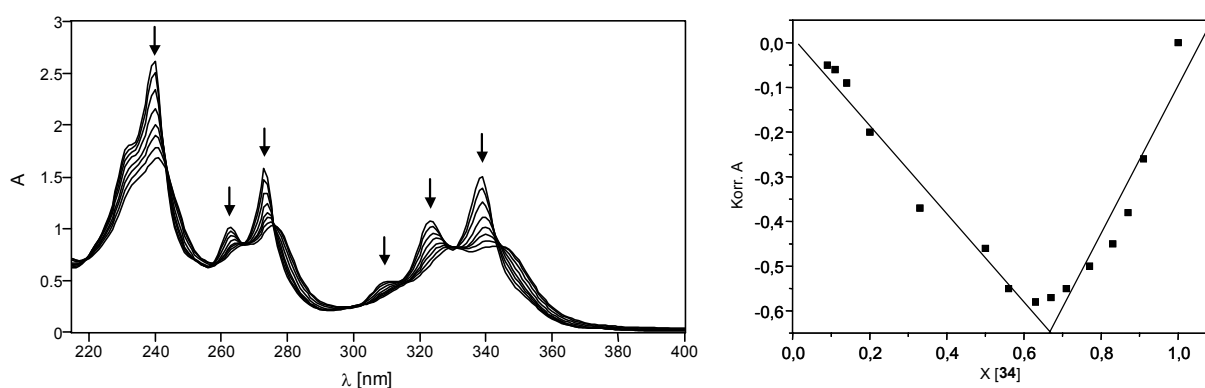
Inset: Fluoreszenzspektren von **34** nach Zusatz von 0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30 und 0.60 Äquivalenten Ba(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> in HFIP/MeOH = 4/1 ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 339 nm,  $c$  = 10<sup>-4</sup> M).

Nach einem [Ba<sup>2+</sup>]/[**34**]-Verhältnis von 0.5 bleibt ein weiterer Ba(II)-Zusatz ohne Wirkung auf das Fluoreszenzverhalten. Allerdings ist im Unterschied zur Ca(II)-Titration bei niedrigen Barium(II)-Konzentrationen keine Induktionsperiode erkennbar. Diese Tatsache und ein hoher Wert für die Komplexbildungskonstante von

$K([\mathbf{34}]_2\text{Ba(II)}) = 5 \times 10^7 \text{ l}^2\text{mol}^{-2}$  sprechen für stabilere Barium(II)- als Calcium(II)-Komplexe der Verbindung **34** (Tabelle 7-1, Kapitel 7.5).

Aufgrund des größeren Kationenradius von  $\text{Ba}^{2+}$  bei oktaedrischer Koordination (1.35 Å) im Vergleich zu  $\text{Ca}^{2+}$  (1.00 Å) und damit geringeren konformativen Spannungen im  $[\mathbf{34}]_2\text{Ba(II)}$ -Komplex ist dieses Verhalten durchaus schlüssig. Daraus sollte sich allerdings auch ein größerer Abstand zwischen den Cyclopeptideinheiten ergeben, was die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen der Pyreneinheiten vermindert und somit den geringeren Einfluss der Ba(II)-Komplexierung auf das  $I_E/I_M$ -Verhältnis im Zuge der Fluoreszenztitration (Abbildung 7-9: Inset) erklärt.<sup>251</sup>

Das in Analogie zu  $[\mathbf{34}]_2\text{Ca(II)}$  auch zwischen dem Cyclopeptid **34** und Ba(II)-Ionen ein 2:1-Sandwichkomplex gebildet wird, belegt eine UV/Vis-Titration und der daraus erstellte Job-Plot, dessen Maximum bei  $X[\mathbf{34}] \approx 0.67$  lokalisiert ist (Abbildung 7-10).



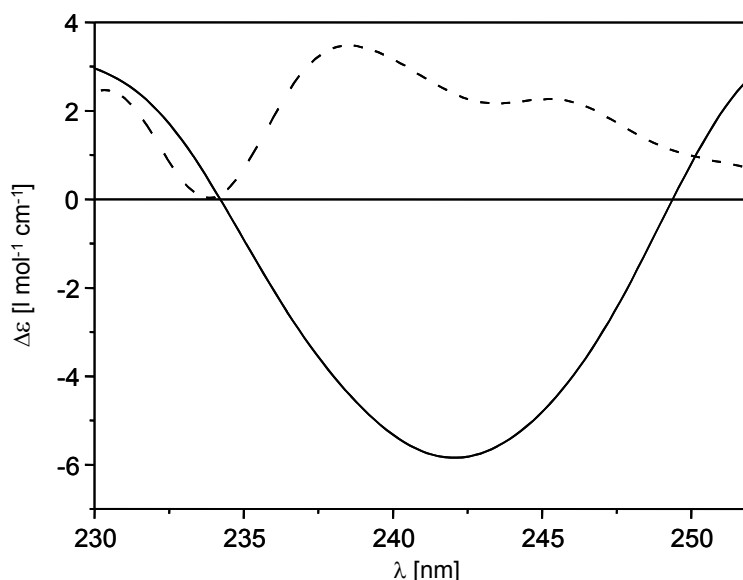
**Abb. 7-10:** links: UV/Vis-Absorptionsspektren des cyclischen Hexapeptids cyclo-(Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly) (**34**) nach Zusatz von 0.00, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 und 0.80 Äquivalenten  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$  in HFIP/MeOH = 4/1 ( $c = 10^{-4} \text{ M}$ ).  
rechts: Job-Plot für die Bildung des  $[\mathbf{34}]_2\text{Ba(II)}$ -Komplexes.

Ebenso wie die Ca(II)-Zugabe bewirkt das Zufügen von Ba(II)-Ionen zu einer Lösung des Peptids **34** eine Intensitätsverringern und Rotverschiebung der Absorptionsbanden.

Der Komplex weist drei schwingungsaufgespaltene Absorptionsbereiche bei 346 nm ( $\lg \epsilon = 4.43$ ), 277 nm ( $\lg \epsilon = 4.52$ ) und 241 nm ( $\lg \epsilon = 4.72$ ) auf.<sup>244</sup> Isosbestische Punkte erscheinen im Zuge der Titration bei 230 nm, 244 nm, 257 nm, 276 nm, 300 nm und 343 nm.

<sup>251</sup> Siehe dazu auch Tabelle 7-1 in Kapitel 7.5.

Der  $[\mathbf{34}]_2\text{Ba(II)}$ -Komplex zeigt ähnliche CD-Eigenschaften wie der  $[\mathbf{34}]_2\text{Ca(II)}$ -Komplex und ergibt einen deutlichen Cotton-Effekt bei 242 nm (Abbildung 7-11). Diese Komplexbande ist jedoch weniger intensiv als bei der entsprechenden Ca(II)-Komplexierung.



**Abb. 7-11:** Ausschnitt aus den CD-Spektren des cyclischen Hexapeptids cyclo-(Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly) (**34**) ohne Metallkationenzusatz (gestrichelte Linie) und nach Zugabe von 0.6 Äquivalenten  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$  (durchgezogene Linie).

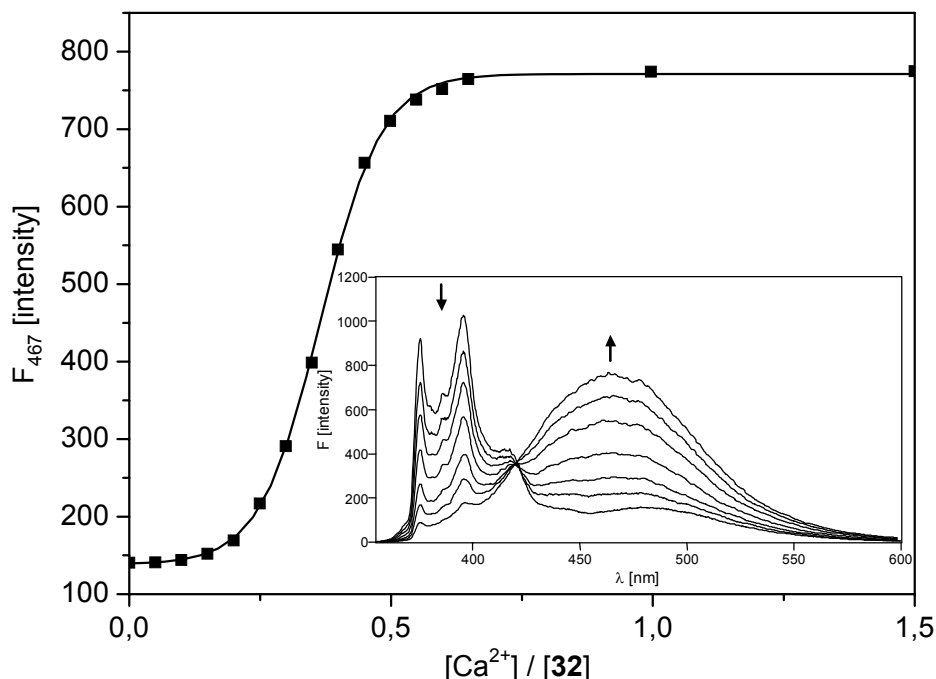
## 7.3 Komplexierungsverhalten des cyclischen Hexapeptids **32**

### 7.3.1 Komplexierung von Calcium(II)-Ionen

Das einfach Pyren-substituierte cyclische Hexapeptid **32** dient als monofunktionalisierte Vergleichsverbindung zum difunktionalisierten Cyclopeptid **34**. Prinzipiell hat der Zusatz von Ca(II)-Ionen auf die Fluoreszenzspektren der beiden Spezies den gleichen Effekt, der bei Verbindung **32** allerdings weniger stark ausgeprägt ist. Abbildung 7-12 zeigt jedoch einen analogen sigmoidalen Kurvenverlauf der Excimerintensitätszunahme bei 467 nm mit einer Induktionsperiode bis zum molaren Verhältnis von 0.2 des Kations zum Cyclopeptid **32**. Ab dem Verhältnis  $[\text{Ca}^{2+}]/[\mathbf{32}] = 0.5$  ist eine Sättigung erkennbar. Das letztendlich erreichte maximale  $I_E/I_M$ -Verhältnis beträgt 9.1 (Tabelle 7-1, Kapitel 7.5). Auffällig ist, dass bereits das Ausgangsemissionsspektrum des freien Cyclopeptids **32**, im Lösungsmittelgemisch HFIP/MeOH (4/1) bei einer Konzentration von  $10^{-4}\text{M}$  neben der Pyren-LE-Emission



(370-430 nm) deutlich eine Excimerbande bei 484 nm aufweist. Diese Bande kann auf dynamische intermolekulare Excimere zurückgeführt werden und ist in DMSO erheblich intensitätsschwächer.<sup>252</sup>



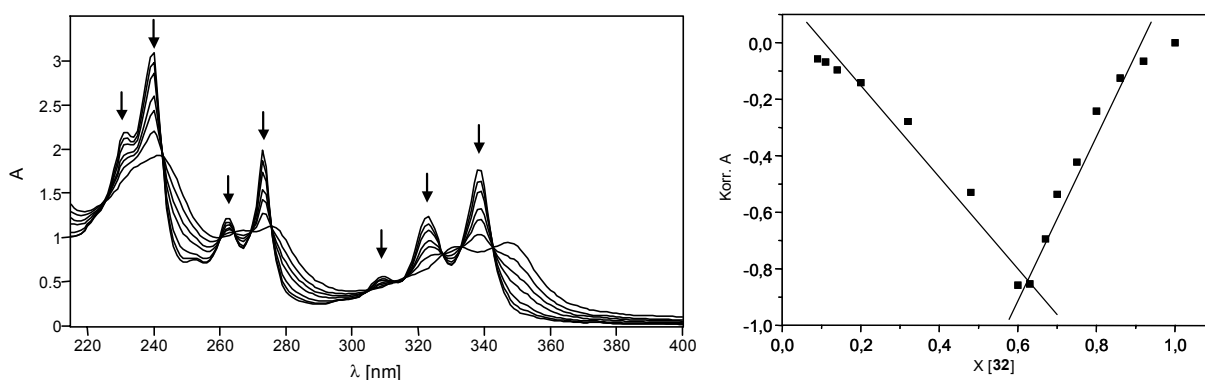
**Abb. 7-12:** Sigmoidaler Fit der Emissionsintensitätsänderung bei 467 nm während der Titration von cyclo-(Gly-Gly-Gly-D-Pya-Gly-Gly) (**32**) mit  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ .

Inset: Fluoreszenzspektren von **32** nach Zusatz von 0.00, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 und 0.65 Äquivalenten  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  in HFIP/MeOH = 4/1 ( $\lambda_{\text{ex}} = 339 \text{ nm}$ ,  $c = 10^{-4} \text{ M}$ ).

Diese intermolekulare Excimeremission tritt im freien Peptids bei 484 nm auf, wohingegen die „excited dimer“-Emission des Komplexes hypsochrom verschoben bei 467 nm erscheint (Abbildung 7-12: Inset). Ein derartiges Verhalten lässt, wie bereits beschrieben (Abbildung 7-7), eine statische Excimeremission des Assoziats vermuten.<sup>248</sup> Das im Komplex zwischen Cyclopeptid **32** und  $\text{Ca}(\text{II})$ -Kationen Grundzustandsdimere ausgebildet werden wird anhand einer UV/Vis-Titration belegt (Abbildung 7-13). Entsprechend den bereits aufgeführten Erdalkalimetallkomplexierungen durch cyclische Hexapeptide weist Verbindung **32** vor  $\text{Ca}(\text{II})$ -Zugabe drei Absorptionsbereiche mit den jeweils langwelligsten Banden bei 338 nm ( $\lg \epsilon = 4.39$ ), 273 nm ( $\lg \epsilon = 4.44$ ) und 240 nm ( $\lg \epsilon = 4.63$ ) auf. Im Laufe der Komplexbildung werden die Absorptionsbereiche bathochrom verschoben, was zu

<sup>252</sup> Siehe Kapitel 5.4 dieser Arbeit.

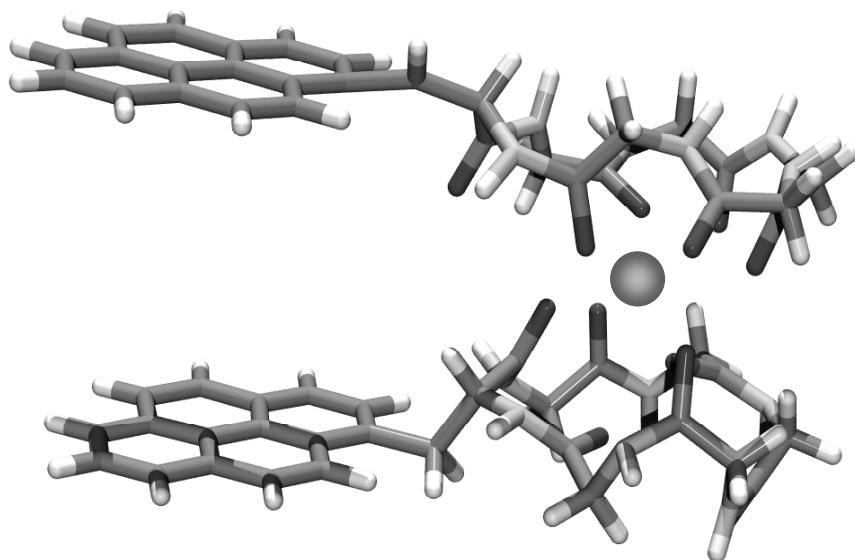
weniger intensiven Übergängen bei 348 nm ( $\lg \varepsilon = 4.14$ ), 276 nm ( $\lg \varepsilon = 4.21$ ) und 242 nm ( $\lg \varepsilon = 4.45$ ) führt.<sup>244</sup> Die isosbestischen Punkte des Prozesses werden bei 343 nm, 333 nm, 327 nm, 316 nm, 313 nm, 305 nm, 276 nm, 270 nm, 264 nm, 260 nm, 243 nm und 226 nm detektiert. Die 2:1-Komplexstöchiometrie wird mittels eines Job-Plots bestimmt (Abbildung 7-13). Im Unterschied zu bereits gezeigten Job-Plots (Abbildung 7-5 und 7-10) weicht der Kurvenverlauf hier mehr von der idealen Parabelform ab, ermöglicht aber trotzdem die Festlegung des Maximums bei einem Molenbruch von  $0.6 < X[\mathbf{32}] > 0.7$ . Die Komplexstabilität bewegt sich im Bereich des  $[\mathbf{34}]_2\text{Ca(II)}$ -Komplexes, was durch die Komplexbildungskonstante  $K([\mathbf{32}]_2\text{Ca(II)}) = 3 \times 10^5 \text{ l}^2\text{mol}^{-2}$  ersichtlich ist.



**Abb. 7-13:** links: UV/Vis-Absorptionsspektren des cyclischen Hexapeptids cyclo-(Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly) (**32**) nach Zusatz von 0.00, 0.10, 0.20, 0.25, 0.30, 0.40 und 0.70 Äquivalenten  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  in  $\text{HFIP}/\text{MeOH} = 4/1$  ( $c = 10^{-4} \text{ M}$ ).  
rechts: Job-Plot für die Bildung des  $[\mathbf{32}]_2\text{Ca(II)}$ -Komplexes.

Durch die Funktionalisierung des cyclischen Hexapeptids **32** mit nur einem Pyren-Substituenten und der beobachteten Analogie zu Verbindung **34** im Komplexierungsverhalten kann letzten Endes die Ausbildung von Sandwichkomplexen zwischen Cyclopeptiden und Erdalkalimetallkationen bewiesen werden. Die Pyren-Substrukturen der beteiligten Peptide sind dabei größtenteils parallel übereinander angeordnet. Das gilt sowohl für den UV/Vis-spektroskopisch untersuchten Grundzustand als auch für den fluorimetrisch studierten angeregten Zustand.

In Abbildung 7-14 ist eine semiempirisch auf PM3-Niveau energieminierte mögliche Konformation des Cyclopeptids **32** wiedergegeben, die dieses Verhalten illustriert. Bei Kohlenstoff-Calcium(II)-Abständen von 2.1-2.5 Å ergibt sich eine Pyren-Pyren-Distanz von 7.4 Å im  $[\mathbf{32}]_2\text{Ca(II)}$ -Komplex, was in Übereinstimmung mit dem  $[\mathbf{34}]_2\text{Ca(II)}$ -Komplex steht (Abbildung 7-6).



**Abb. 7-14:** Mögliche, semiempirisch auf PM3-Niveau energieminimierte, Pyren-Dimerstruktur des  $(\mathbf{32})_2\text{Ca(II)}$ -Komplexes.

Im Unterschied zu den Erdalkalimetallkomplexen der Spezies **34** weist der Sandwich-Komplex  $[\mathbf{32}]_2\text{Ca(II)}$  keinerlei CD-Aktivität auf. Die geringen CD-Effekte des freien Peptids werden durch die Calcium(II)-Zugabe nahezu vollständig gelöscht. Eine Erklärung dieses Verhaltens könnte sein, dass sich die Chiralität der beiden Peptide im Komplex nahezu aufhebt, wenn eine pseudo-meso-Form ausgebildet wird.

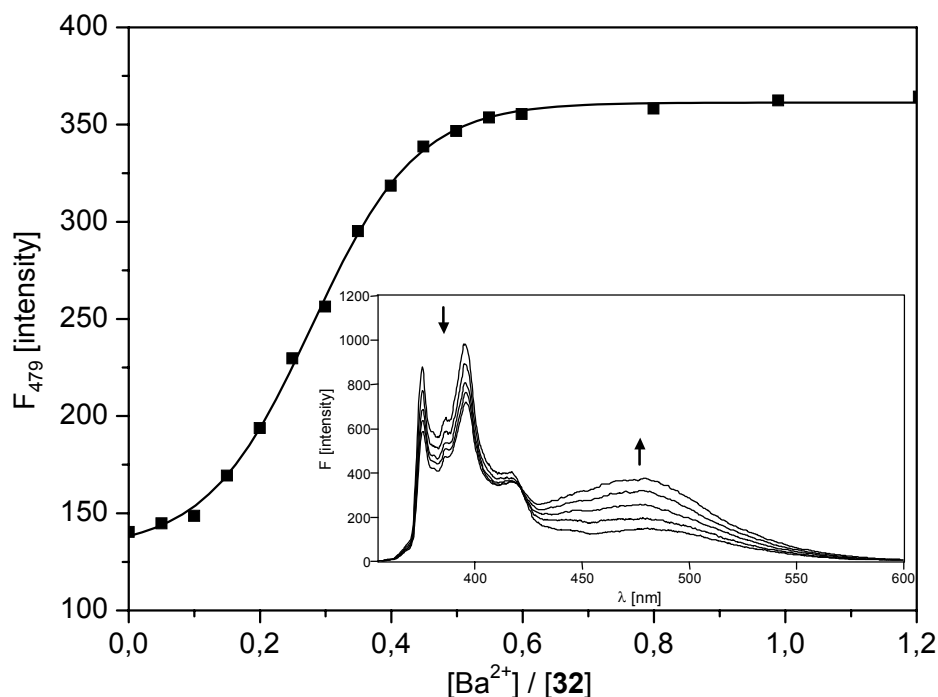
Ebenso wie Verbindung **34** bildet das Cyclopeptid **32** keine 2:1-Sandwichkomplexe mit Magnesium(II)-Ionen aus, was wiederum auf den zu geringen Kationenradius von  $\text{Mg}^{2+}$  zurückgeführt wird.

### 7.3.2 Komplexierung von Barium(II)-Ionen

Die Zugabe von  $\text{Ba(II)}$ -Kationen zur Messlösung des Peptids **32** bewirkt auch eine Erhöhung des  $I_E/I_M$ -Verhältnisses in der Fluoreszenzspektroskopie (Abbildung 7-15). Die Änderung von  $I_E/I_M = 0.1$  im freien Peptid auf  $I_E/I_M = 0.7$  ist allerdings der geringste beobachtete Anstieg. Wie bereits erwähnt,<sup>253</sup> kann dies wohl auf den größeren  $\text{Ba(II)}$ -Ionenradius im Vergleich zum  $\text{Ca(II)}$ -Ionenradius zurückgeführt werden. Der daraus resultierende größere Abstand zwischen den Peptiden im Komplex kann die Wechselwirkungen zwischen den Pyreneinheiten schwächen, was eine Pyren-LE-Emission (370-430 nm) im Vergleich zur „excited dimer“-Emission bei 479 nm

<sup>253</sup> Siehe Kapitel 7.2.2 dieser Arbeit.

begünstigt. Abbildung 7-15 (Inset) zeigt die im vorangehenden Kapitel bereits diskutierte Verschiebung des langwelligeren Emissionsmaximums von 484 nm im freien Peptid auf 479 nm im Komplex. Der isoemissive Punkt des Prozesses liegt bei 422 nm.



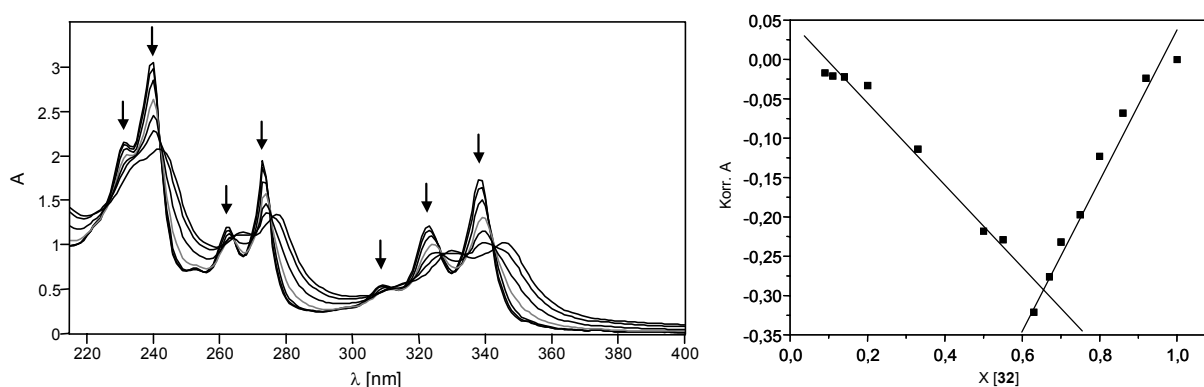
**Abb. 7-15:** Sigmoidaler Fit der Emissionsintensitätsänderung bei 479 nm während der Titration von cyclo-(Gly-Gly-Gly-D-Pya-Gly-Gly) (**32**) mit Ba(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

Inset: Fluoreszenzspektren von **32** nach Zusatz von 0.00, 0.20, 0.30, 0.40 und 0.60 Äquivalenten Ba(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> in HFIP/MeOH = 4/1 ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 339 nm,  $c$  = 10<sup>-4</sup> M).

Die beobachtete Emissionsintensitätsänderung bei 479 nm weist bei der Fluoreszenztitration einen sigmoidalen Kurvenverlauf auf (Abbildung 7-15).

Der Barium(II)-Komplex der Spezies **32** ist nicht wie im Falle von Verbindung **34** stabiler als das Calcium(II)-Analogon (Tabelle 7-1, Kapitel 7.5), sondern bewegt sich mit einer Komplexbildungskonstante von  $K([\mathbf{32}]_2\text{Ba(II)}) = 4 \times 10^5 \text{ l}^2\text{mol}^{-2}$  im ähnlichen Stabilitätsbereich. Da in den Komplexen des Cyclopeptids **32** nur ein Pyren-Dimer ausgebildet wird, sind die konformativen Restriktionen in diesen Systemen geringer, weshalb die Kationengröße auf die Komplexstabilität offensichtlich einen unbedeutenderen Einfluss besitzt als dies bei Verbindung **34** der Fall ist.

Die UV/Vis-Titration von Cyclopeptid **32** mit Ba(II)-Ionen (Abbildung 7-16) liefert charakteristische Banden für Pyren-Grundzustandsdimere bei 346 nm ( $\lg \epsilon = 4.19$ ), 277 nm ( $\lg \epsilon = 4.31$ ) und 242 nm ( $\lg \epsilon = 4.50$ ). Isosbestische Punkte treten bei 343 nm, 327 nm, 316 nm, 312 nm, 306 nm, 276 nm, 264 nm, 242 nm und 226 nm auf.



**Abb. 7-16:** links: UV/Vis-Absorptionsspektren des cyclischen Hexapeptids cyclo-(Gly-Gly-Gly-D-Pya-Gly-Gly) (**32**) nach Zusatz von 0.00, 0.10, 0.20, 0.25, 0.30, 0.40 und 1.00 Äquivalenten Ba(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> in HFIP/MeOH = 4/1 ( $c = 10^{-4}$  M). rechts: Job-Plot für die Bildung des [32]<sub>2</sub>Ba(II)-Komplexes.

Der in Abbildung 7-16 wiedergegebene Job-Plot für den [32]<sub>2</sub>Ba(II)-Komplex belegt mit seinem Maximum bei einem Molenbruch von  $X [32] \approx 0.67$  eine 2:1-Komplexstöchiometrie.

Wie [32]<sub>2</sub>Ca(II) zeigt auch der Sandwichkomplex [32]<sub>2</sub>Ba(II) keine CD-Aktivität.

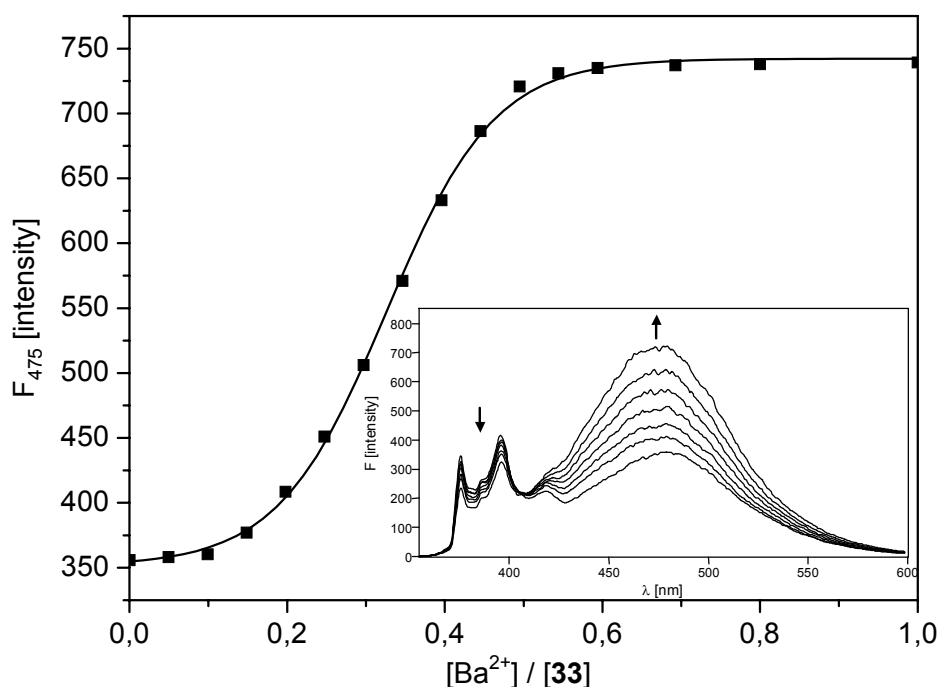
## 7.4 Komplexierungsverhalten des cyclischen Hexapeptids **33**

### 7.4.1 Komplexierung von Barium(II)-Ionen

Im Unterschied zu den bereits besprochenen cyclischen Hexapeptiden **32** und **34**, wird das Fluoreszenz-, UV/Vis-Absorptions- und CD-Verhalten des zweifach Pyren-substituiereten Cyclohexapeptids **33** nur durch Zusatz von Ba(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, nicht aber durch Zugabe von Ca(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> beeinflusst. Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> bewirkt ebenfalls keine Änderung. Aufgrund der benachbarten Pyrenylalanin-Reste scheint die konformative Freiheit in Verbindung **33** so eingeschränkt, dass die Ausbildung von 2:1-Sandwichkomplexen nur mit den relativ großen Barium(II)-Kationen möglich ist.

Die Addition von Ba(II)-Ionen zu Verbindung **33** bewirkt in der Fluoreszenz die Abnahme der Intensität der Pyren-Monomerfluoreszenz (370-430 nm) und die Intensitätszunahme der Excimeremission bei 475 nm (Abbildung 7-17: Inset). Der isoemissive Punkt des Koordinationsprozesses ist bei 407 nm zu erkennen. Verfolgt man die Intensitätsänderung bei 475 nm, so ergibt sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf

mit Induktionsperiode und einem Sättigungsbereich, der bei einem Konzentrationsverhältnis von  $[\text{Ba}^{2+}]/[\mathbf{33}] \approx 0.5$  beginnt (Abbildung 7-17).

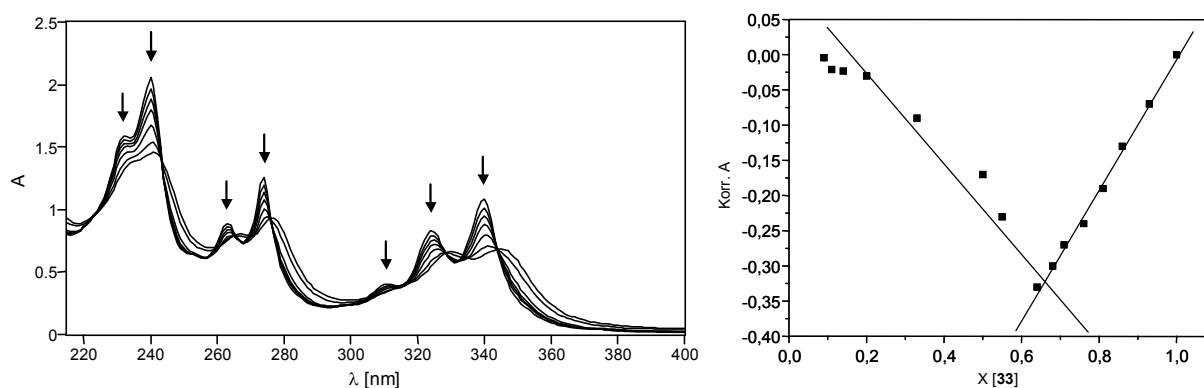


**Abb. 7-17:** Sigmoidaler Fit der Emissionsintensitätsänderung bei 467 nm während der Titration von cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pya-*D*-Pya-Gly-Gly) (**33**) mit  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ .

Inset: Fluoreszenzspektren von **33** nach Zusatz von 0,00, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40 und 0,50 Äquivalenten  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$  in HFIP/MeOH = 4/1 ( $\lambda_{\text{ex}} = 339 \text{ nm}$ ,  $c = 10^{-4} \text{ M}$ ).

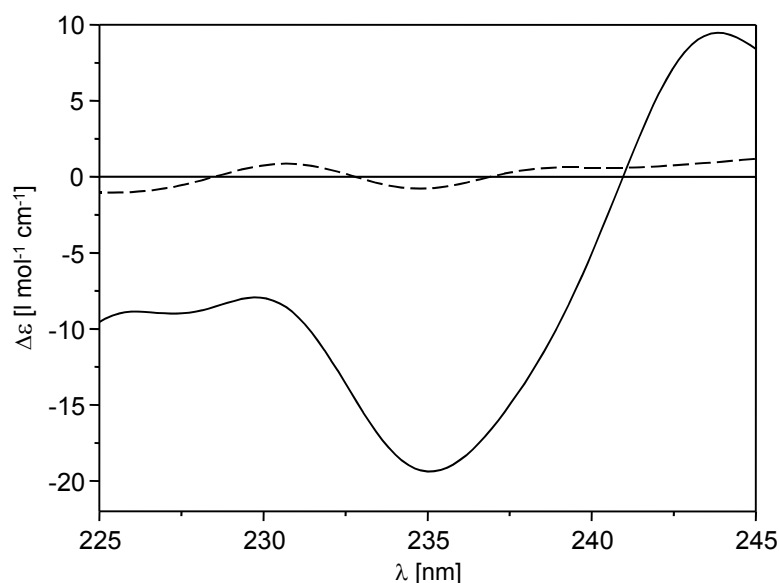
Die UV/Vis-Absorptionstitration nimmt den erwarteten Verlauf und deutet, durch eine Rotverschiebung und Intensitätsabnahme der einzelnen Übergänge, auf die Ausbildung von Grundzustandsdimeren zwischen den Pyreneinheiten der Peptidliganden hin (Abbildung 7-18).<sup>245</sup> Das freie Peptid zeigt typisches Pyren-Absorptionsverhalten mit schwingungsaufgespaltenen Übergängen bei 340 nm ( $\lg \epsilon = 4.41$ ), 274 nm ( $\lg \epsilon = 4.47$ ) und 240 nm ( $\lg \epsilon = 4.68$ ) hin.<sup>244</sup> Nach vollzogener Komplexierung treten die Übergänge bei 345 nm ( $\lg \epsilon = 4.21$ ), 277 nm ( $\lg \epsilon = 4.34$ ) und 241 nm ( $\lg \epsilon = 4.54$ ) auf. Isosbestische Punkte werden bei 344 nm, 334 nm, 328 nm, 316 nm, 305 nm, 276 nm, 270 nm, 265 nm, 260 nm, 243 nm und 223 nm beobachtet.

Der aus den UV/Vis-Absorptionsdaten erstellte Job-Plot für den  $[\mathbf{33}]_2\text{Ba}(\text{II})$ -Komplex belegt die 2:1-Komplexstöchiometrie (Abbildung 7-18), da das Kurvenmaximum bei einem Molenbruch von  $X[\mathbf{33}] \approx 0.67$  liegt.



**Abb. 7-18:** links: UV/Vis-Absorptionsspektren des cyclischen Hexapeptids cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pya-*D*-Pya-Gly-Gly) (**33**) nach Zusatz von 0.00, 0.10, 0.20, 0.25, 0.30, 0.40 und 1.00 Äquivalenten Ba(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> in HFIP/MeOH = 4/1 (*c* = 10<sup>-4</sup> M).  
rechts: Job-Plot für die Bildung des [33]<sub>2</sub>Ba(II)-Komplexes.

Die Komplexstabilität ist nicht so hoch wie die von [34]<sub>2</sub>Ba(II) und bewegt sich mit einer Komplexbildungskonstante von  $K([33]_2\text{Ba(II)}) = 7 \times 10^5 \text{ l}^2\text{mol}^{-2}$  eher im Bereich der aufgeführten Cyclopeptid-Calcium(II)-Komplexe (Tabelle 7-1, Kapitel 7.5). Dies ist möglicherweise eine Folge des sterischen Anspruchs von Verbindung **33**.

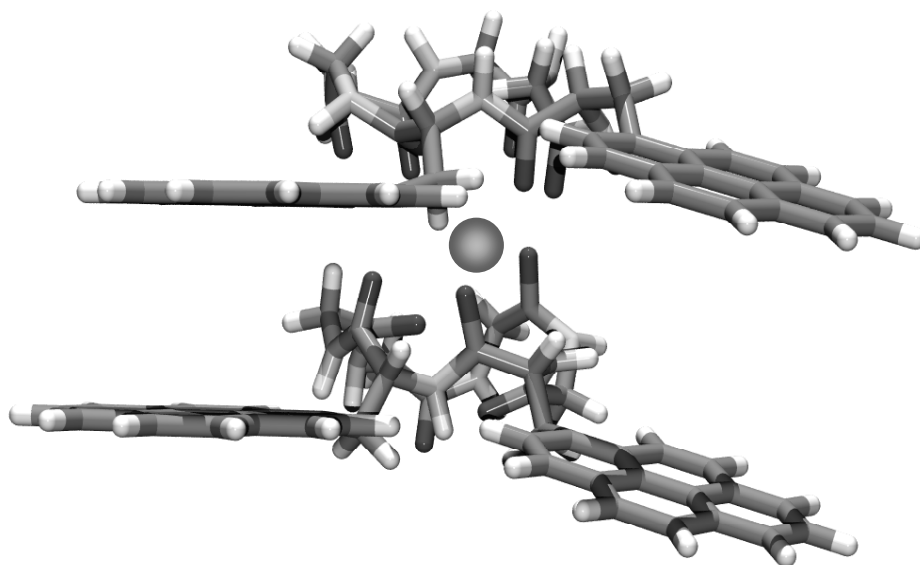


**Abb. 7-19:** Ausschnitt aus den CD-Spektren des cyclischen Hexapeptids cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pya-*D*-Pya-Gly-Gly) (**33**) ohne Metallkationenzusatz (gestrichelte Linie) und nach Zugabe von 0.6 Äquivalenten Ba(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (durchgezogene Linie).

Die relativ schwache CD-Aktivität des Peptids **33** wird durch die Koordination von Ba<sup>2+</sup>-Ionen verstärkt, was hauptsächlich durch einen intensiven negativen CD-Effekt

bei 235 nm dokumentiert ist (Abbildung 7-19). Dies steht in Übereinstimmung mit dem CD-Verhalten der Spezies **34** (siehe Kapitel 7.2.2).

Abbildung 7-20 gibt eine mögliche, semiempirisch auf PM3-Niveau energieminierte, Konformation des Sandwichkomplexes  $[\mathbf{33}]_2\text{Ba(II)}$  wieder. Die Pyren-Teilstrukturen der beteiligten Cyclopeptidmoleküle sind als Grundzustandsdimere parallel zueinander angeordnet, wobei Abständen von 5.4 Å bzw. 7.4 Å auftreten.



**Abb. 7-20:** Mögliche, semiempirisch auf PM3-Niveau energieminierte, Pyren-Dimerstruktur des  $(\mathbf{33})_2\text{Ba(II)}$ -Komplexes.



## 7.5 Zusammenfassung des Komplexierungsverhalten der cyclischen Hexapeptide **32**, **33** und **34**

Die Pyren-funktionalisierten cyclischen Hexapeptide **32**, **33** und **34** bilden 2:1-Sandwichkomplexe mit Erdalkalimetallkationen.

Die jeweilige Komplexbildung bzw. -Stabilität hängt sowohl vom Kationenradius der Erdalkalimetalle als auch vom sterischen bzw. konformativen Anspruch der Cyclopeptide ab. So formen die Spezies **32** und **34** 2:1-Komplexe mit Ca(II)- und Ba(II)-Ionen, während Verbindung **33** nur mit den größeren Ba(II)-Kationen Sandwichkomplexe bildet. Die relative kleinen Magnesium(II)-Kationen werden von keinem der Cyclopeptide auf diese Weise koordiniert.

Die Detektion der Komplexbildung erfolgt mittels Fluoreszenz-, UV/Vis-Absorptions- und CD-Spektroskopie.

In den Fluoreszenzspektren der cyclischen Peptide führt die Zugabe von entsprechenden Erdalkalimetallperchloraten zur Erhöhung des  $I_E/I_M$ -Verhältnisses. Die einzelnen Übergänge der UV/Vis-Absorption werden breiter, bathochrom verschoben und verlieren an Intensität. Dies ist ein eindeutiger Hinweis auf die Ausbildung von Grundzustandsdimeren zwischen den am Komplex beteiligten Pyren-Einheiten. Job-Plots belegen die 2:1-Stöchiometrie der Cyclopeptid-Erdalkalimetall-Komplexe. Die fluorimetrisch und UV/Vis-spektroskopisch erhaltenen Ergebnisse ergeben, dass die Pyren-Teilstrukturen in den Sandwichkomplexen sowohl im angeregten, als auch im Grundzustand nahezu parallel übereinander angeordnet sein müssen.

Die freien cyclischen Hexapeptide zeigen im gewählten Lösungsmittelgemisch HFIP/MeOH (4/1) geringe CD-Aktivität. Die Verbindungen **33** und **34** weisen in komplexierter Form intensive negative CD-Effekte im spektralen Bereich von 235 nm bis 245 nm auf. Im Gegensatz dazu verliert die monofunktionalisierte Spezies **32** ihre CD-Aktivität durch Erdalkalimetallkomplexierung vollends.

Die experimentell erhaltenen Daten der verschiedenen Komplexierungsstudien sind in Tabelle 7-1 zusammengefasst.

Peptidsystem	$\lambda_{\text{em}}$ [nm] <sup>a</sup>	$I_{\text{E}}/I_{\text{M}}$	$\lambda_{\text{max}}$ [nm] (lg $\epsilon$ )	$K$ [l <sup>2</sup> mol <sup>-2</sup> ]	$\lambda_{\text{CD}}$ [nm] <sup>b</sup>
<b>32</b>	375, 386, 396, 484	0.1	231 (4.48), 240 (4.63), 253 (4.02), 263 (4.23), 273 (4.44), 309 (3.89), 323 (4.24), 338 (4.39)		
<b>32 + Ca<sup>2+</sup></b>	375, 386, 396, 467	9.1	242 (4.45), 267 (4.20), 276 (4.21), 332 (4.10), 348 (4.14)	$3 \times 10^5$	---
<b>32 + Ba<sup>2+</sup></b>	375, 387, 395, 479	0.7	242 (4.50), 267 (4.24), 277 (4.31), 330 (4.15), 346 (4.19)	$4 \times 10^5$	---
<b>33</b>	376, 389, 396, 480	1.0	232 (4.57), 240 (4.68), 263 (4.32), 274 (4.47), 310 (3.97), 324 (4.29), 340 (4.41)		
<b>33 + Ba<sup>2+</sup></b>	376, 389, 396, 475	3.0	241 (4.54), 266 (4.28), 277 (4.34), 330 (4.20), 345 (4.21)	$7 \times 10^5$	235
<b>34</b>	375, 386, 396, 487	0.6	232 (4.72), 240 (4.89), 263 (4.47), 273 (4.67), 309 (4.16), 323 (4.50), 339 (4.65)		
<b>34 + Ca<sup>2+</sup></b>	375, 386, 396, 482	14.9	241 (4.68), 268 (4.40), 274 (4.44), 332 (4.39), 347 (4.37)	$1 \times 10^5$	244
<b>34 + Ba<sup>2+</sup></b>	375, 387, 396, 482	3.4	241 (4.72), 267 (4.44), 277 (4.52), 331 (4.42), 346 (4.43)	$5 \times 10^7$	242

**Tab. 7-1:** Experimentelle Daten der Komplexierungsuntersuchungen cyclischer Pyren-funktionalisierter Peptide ( $c = 10^{-4}$  M; a:  $\lambda_{\text{ex}} = 339$  nm; b: es werden nur die Maxima der negativen Cottoneffekte der gebildeten Komplexe aufgeführt).

## 8 Experimenteller Teil

### 8.1 Allgemeines

#### 8.1.1 Spektroskopie

##### IR-Spektren

Bio-Rad FT-IR-Spektrometer FTS 155.

##### NMR-Spektren

- Bruker AC-250 ( $^1\text{H}$ : 250.1 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 62.9 MHz), Messtemperatur: 24 °C.
- Bruker ARX-400 ( $^1\text{H}$ : 400.1 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100.6 MHz), Messtemperatur: 21 °C.

Die chemischen Verschiebungen sind in  $\delta$ -Werten (ppm) relativ zu TMS als internem Standard angegeben. Die Auswertung erfolgt soweit möglich nach erster Ordnung.

Angabemodus: Chemische Verschiebung (Multiplizität, Anzahl der Protonen, Kopplungskonstante, Zuordnung).

Abkürzungen: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, p = pseudo-.

Genauigkeit der Angabe: chemische Verschiebung i.d.R. 0.01 ppm;  
Kopplungskonstante: 0.1 Hz.

Bei jedem Spektrum ist das verwendete Lösungsmittel vermerkt.

Bei Verbindungen mit zwei oder drei Chiralitätszentren werden die chemischen Verschiebungen der Signale von diastereomeren Nebenprodukten, soweit auswertbar, in Klammern angegeben. Die Signale von auftretenden Rotationsisomeren werden, soweit auswertbar, in eckigen Klammern aufgeführt.

Die Bestimmung von Enantiomerenüberschüssen erfolgt mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie nach Zusatz von chiralen Shift-Reagentien wie (-)-2,2,2-Trifluor-1-(9-anthryl)ethanol (*Pirkle's* Alkohol) oder Tris-[3-(trifluormethyl-hydroxymethylen)-d-camphorato]-europium ( $\text{Eu}(\text{tfc})_3$ ).

##### UV/Vis-Spektren

Perkin-Elmer Lambda 9 UV/Vis/NIR-Spektrophotometer.

Verwendet werden 1 cm-Quarzküvetten der Firma Hellma sowie Uvasol-Lösungsmittel der Firmen Acros und Aldrich.

### Fluoreszenzspektroskopie

F-4500 Hitachi Fluoreszenz-Spektrophotometer.

Verwendet werden 1 cm-Quarzküvetten der Firma Hellma und Uvasol-Lösungsmittel der Firmen Acros und Aldrich. Soweit nicht anders angegeben, wird jeweils bei der langwelligsten Absorptionsbande angeregt. Die Konzentration der Messlösung wird im Einzelnen vermerkt.

### Circulardichroismus-Spektren

Jasco J-710 Spektropolarimeter.

Verwendet werden 1 cm-Quarz-Rundküvetten der Firma Hellma sowie Uvasol-Lösungsmittel der Firmen Acros und Aldrich.

### Polarimetrie

Perkin-Elmer PE 241 Polarimeter.

Die Länge der Messküvette beträgt 10 cm. Verwendet werden Uvasol-Lösungsmittel der Firmen Acros und Aldrich. In der Regel wird die Messung mit Licht der Wellenlänge 589 nm durchgeführt.

Angabemodus:  $[\alpha]_D^{20}$  in  $\left[ \frac{^\circ \cdot ml}{g \cdot dm} \right]$ , c in  $\left[ \frac{g}{100 ml} \right]$

### Massenspektren

- Varian CH-5 (EI)
- Finnigan MAT 95 (CI; FAB und FD)
- Finnigan MAT TSQ 7000 (ESI)

Bei FAB dient Xenon als Ionisationsgas. Die Matrix ist jeweils aufgeführt.

## 8.1.2 Analytik

### Schmelzpunkte

- Mikroskop-Heiztisch Reichert Thermovar.

Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

### Elementaranalysen

Mikroanalytisches Labor des Fachbereichs Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg.

## HPLC

- Analytische HPLC: LC-System HP1090M mit DA-Detektor, Chromatographiesäule: Phenomenex Luna C18 (3  $\mu$ m, 15 mm, 4.6 mm); Die analytischen Retentionszeiten werden bei einem Fluss von 1 ml/min ermittelt.
- Semipräparative HPLC: LC-System Knauer HPLC Pump K-1001 mit UV-Detektor K-2600, Chromatographiesäule: Phenomenex Luna C18 (10  $\mu$ m, 250 mm, 21.2 mm); Die Preparationen werden bei einem Fluss von 10 ml/min durchgeführt.
- HPLC-MS: LC-System Agilent 1100 mit MS-Detektor Finnigan MAT TSQ 7000 (ESI); Chromatographiesäule: Phenomenex Luna C18 (3  $\mu$ m, 15 mm, 4.6 mm). Die analytischen Retentionszeiten werden bei einem Fluss von 1 ml/min ermittelt.

Als Eluenten kommen bei allen drei Methoden Gradienten aus Acetonitril und Wasser zum Einsatz, die 0.075 % TFA enthalten.

## 8.1.3 Synthese

### Säulenchromatographie

Kieselgel Merck Geduran SI 60.

### Dünnschichtchromatographie

Aluminiumfolien Merck 60 F<sub>254</sub> Kieselgel, Schichtdicke 0.2 mm.

### Lösungsmittel

Reinigung und Trocknung nach den üblichen Verfahren.<sup>254</sup>

Wenn nicht anders vermerkt, werden handelsübliche Qualitäten eingesetzt.

---

<sup>254</sup> a) Autorenkollektiv, *Organikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 17. Auflage, Berlin, 1988;

b) S. Hünig, G. Märkl, J. Sauer, *Einführung in die apparativen und spektroskopischen Methoden in der Organischen Chemie*, Regensburg, Würzburg, 1990.

## 8.1.4 Elektrochemie

### Cyclovoltammetrie und Squarewavevoltammetrie

Die Durchführung der cyclovoltammetrischen und squarewavevoltammetrischen Messungen erfolgt in speziell gereinigten Lösungsmitteln. Die Konzentration der untersuchten Lösungen beträgt etwa  $10^{-3}$  M. Um eine ausreichende Leitfähigkeit der Lösung zu gewährleisten und um Migrationsströme zu vermeiden, wird Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat (TBAHFP) in einer Konzentration von 0.1 M als Leitsalz zugesetzt. Die Messung erfolgt in einer Zelle mit Dreielektrodenanordnung, wobei die Meßwerte gegen Ferrocenium/Ferrocen ( $\text{Fc}^+/\text{Fc}$ ) als internem Standard geeicht werden.

- Elektrochemiesystem EG & G INSTRUMENTS 283A.
- Ungeteilte Meßzelle mit polierter Pt-Scheibenelektrode als Arbeitselektrode, mit großflächigem, erst vernickeltem, dann vergoldetem V2A-Stahlblech als Gegenelektrode und mit Ag/AgCl-Pseudoreferenzelektrode (interne Eichung gegen Ferrocen).
- Lösungsmittel und Leitsalz Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat (TBAHFP) wie in Lit.<sup>255</sup> beschrieben.

### UV/VIS/NIR-Spektroelektrochemie

- UV/VIS/NIR-Spektrophotometer Perkin-Elmer Lambda 9.
- Potentiostat/Galvanostat Amel 2053.
- Spektroelektrochemische Quarz-Messzelle mit Minigrid-Goldnetz als transparente Arbeitselektrode.<sup>255,256</sup>

### Elektrochemilumineszenz-Messungen

Hitachi F-4500 Fluoreszenz-Spektrophotometer. ECL-Zelle und Messanordnung wie in Lit.<sup>257</sup> beschrieben.

Die Durchführung der ECL-Messungen erfolgt in speziell gereinigten Lösungsmitteln. Die Konzentration der untersuchten Lösungen beträgt etwa  $10^{-3}$  M. Um eine ausreichende Leitfähigkeit der Lösung zu gewährleisten und um Migrationsströme zu

---

<sup>255</sup> a) J. Salbeck, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1988**;

b) J. Salbeck, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, 340, 169.

<sup>256</sup> J. Salbeck, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2169.

<sup>257</sup> S. Hien, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1995**.

vermeiden, wird Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat (TBAHFP) in einer Konzentration von 0.1 M als Leitsalz zugesetzt.

### 8.1.5 Quantenchemische Berechnungen

Alle Molekülgeometrieberechnungen werden mit dem Programm Spartan<sup>258</sup> durchgeführt. Nach Voroptimierung durch Kraftfeldrechnung (MMFF) werden die entsprechenden Energieminima auf semiempirischem Niveau mittels AM1<sup>259</sup>- bzw. PM3<sup>260</sup>-Rechnungen ermittelt. Eventuell vorgenommene Geometrie-Restriktionen sind im Einzelnen vermerkt.

### 8.1.6 Layout

Diese Arbeit ist mit Microsoft WORD 2000 für WINDOWS editiert und gesetzt.

Formelzeichnungen werden mit ISIS/Draw 2.2 entworfen.

Graphische Zeichnungen werden mit Microsoft PowerPoint 2000 für WINDOWS angefertigt.

---

<sup>258</sup> Wavefunction Inc., 18401 Von Karmann Ave., Suite 370, Irvine, CA 92612.

<sup>259</sup> M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.

<sup>260</sup> J. J. P. Stewart, *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 209.

## 8.2 Synthese

### 8.2.1 Allgemeine Versuchsvorschriften

#### 8.2.1.1 Standard-Peptidkupplung AV1<sup>261</sup>

In einem ausgeheizten Rundkolben werden unter Stickstoffatmosphäre und Eiskühlung äquimolare Mengen an Boc-geschützter und Bzl-geschützter Kupplungskomponente mit 2.5 eq. EDC und 5 eq. HOAt in absolutem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> suspendiert. Die Reaktionsmischung wird im Eisbad gerührt und über Nacht auf RT erwärmt. Nach 16 h wird der Ansatz mit CHCl<sub>3</sub> auf doppeltes Volumen verdünnt und je dreimal mit 1 M HCl-Lösung, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser extrahiert. Die org. Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und einrotiert. Die weitere Reinigung des Produktes erfolgt durch Säulenchromatographie.

#### 8.2.1.2 Benzylester (Bzl) –Abspaltung AV2<sup>262</sup>

Das an der Carboxylfunktion geschützte Peptid wird unter N<sub>2</sub>-Schutz je nach Löslichkeit in absolutem MeOH (20 ml/mmol Peptid) oder DMF (20 ml/mmol Peptid) gelöst und mit Palladium auf Aktivkohle (Pd-C, 160 mg/mmol Peptid) versetzt. Mittels Hydrierballon wird der Ansatz unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre gesetzt und 2 – 24 h bei RT gerührt, wobei das Ende der Reaktion durch DC-Kontrolle ermittelt wird. Zur Abtrennung des Katalysators wird Kieselgur zugegeben und filtriert. Das Lösungsmittel wird über eine Kühlfalle abgezogen. Der erhaltene Feststoff wird in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und bis zur beginnenden Trübung mit PE 40/60 versetzt. Die vollständige Fällung erfolgt über Nacht im Kühlschrank. Das entschützte Peptid wird abgesaugt und im ÖV getrocknet. Das Produkt wird in der Regel ohne weitere Reinigung und Charakterisierung umgesetzt.

---

<sup>261</sup> a) D. L. Boger, M. W. Ledeboer, M. Kume, M. Searcey, Q. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11375;

b) L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *J. Org. Chem.* **1995**, *11*, 3561.

<sup>262</sup> S. Gangwar, G. Pauletti, T. Siahaan, V. Stella, R. Borchardt, *J. Org. Chem.* **1997**, *5*, 1356.



### 8.2.1.3 Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl (Boc) -Schutzgruppe AV3<sup>263</sup>

Das Boc-geschützte Peptid wird unter Eiskühlung in HCl-gesättigtem EtOAc (80 ml/mmol Peptid) gelöst und 15 min gerührt. Anschließend wird das Eisbad entfernt und solange bei RT gerührt bis kein Edukt mehr vorliegt (DC-Kontrolle). Während der Reaktion beginnt das Produkt im Normalfall als Feststoff auszufallen. Zur vollständigen Fällung wird der Ansatz nach beendeter Reaktion mit PE 40/60 auf dreifaches Volumen verdünnt. Der Niederschlag wird abgesaugt und intensiv mit eiskaltem EtOAc gewaschen. Zur weiteren Reinigung wird das Produkt in wenig siedendem MeOH gelöst und bis zur beginnenden Trübung mit PE 40/60 versetzt. Nach Abkühlung auf RT und vervollständigter Fällung im Eisbad wird das entschützte Peptid abgesaugt und am ÖV getrocknet. Das Produkt wird in der Regel ohne weitere Reinigung und Charakterisierung umgesetzt.

### 8.2.1.4 Festphasensynthese von Peptiden nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie AV4<sup>264</sup>

- **Kupplung von Fmoc-geschütztem Glycin an Tritylchlorid-Polystyrol (TCP)-Harz<sup>265</sup>**

1 g TCP-Harz (maximale Belegung ca. 1 mmol/g Harz)<sup>266</sup> wird mit 535 mg (1.80 mmol) Fmoc-Gly-OH und 470  $\mu$ l (349 mg, 2.70 mmol) DIEA in 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> suspendiert. Nach 5 min werden weitere 1.10 ml (816 mg, 6.31 mmol) DIEA zugesetzt und 12 h bei RT gerührt. Anschließend wird 1 ml MeOH zugegeben und weitere 60 min gerührt. Danach wird das Harz abgesaugt und nacheinander mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, NMP und MeOH intensiv gewaschen. Nach Trocknen am ÖV wird der Belegungsgrad gravimetrisch nach folgender Formel bestimmt:

---

<sup>263</sup> a) L. Tomasic, G. P. Lorenzi, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1012;

b) D. L. Boger, J. Zhou, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 10, 1597.

<sup>264</sup> a) M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3033;

b) G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 161.

<sup>265</sup> K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37, 513.

<sup>266</sup> Das Harz besitzt eine Korngröße von 100-200 mesh.

$$N = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 1000}{(MG_{\text{Fmoc-Gly-OH}} - MG_{\text{HCl}}) \cdot m_2}$$

N = Harzbelegung [mmol/g]

$MG_{\text{Fmoc-Gly-OH}} = 297.31 \text{ g/mol}$

$MG_{\text{HCl}} = 36.46 \text{ g/mol}$

$m_2$  = Harzgewicht nach der Belegung

$m_1$  = Harzgewicht vor der Belegung

### • Peptid-Festphasensynthese

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe der harzgebundenen Aminosäure bzw. des harzgebundenen Peptids und die Kupplung einer weiteren Fmoc-Aminosäure erfolgt nach folgendem Schema:

	Operation	Reagentien (15 ml / g Harz)	Zeit [min]	Anzahl
1	Quellung	NMP	30	1
2	Entschützen	20 % Piperidin in NMP	10	1
3	Waschen	NMP	1	1
4	Entschützen	20 % Piperidin in NMP	20	1
5	Waschen	NMP	1	10
6	Kuppeln	Fmoc-AS, TBTU, HOBt, DIEA, NMP oder Fmoc-AS, HATU, HOAt, Collidin, NMP	120	1
7	Waschen	NMP	1	3
8	Kuppeln	Fmoc-AS, TBTU, HOBt, DIEA, NMP oder Fmoc-AS, HATU, HOAt, Collidin, NMP	90	1
9	Waschen	NMP	1	5
10	Waschen	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	1	5
11	Trocknen	ÖV		

Die Schritte 10 und 11 erfolgen nur, wenn die Peptid-Festphasensynthese für mehrere Tage unterbrochen wird oder beendet ist.

Die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren erfolgt entweder mit TBTU oder HATU nach folgender Methode:<sup>267</sup>

Je 3 eq. Fmoc-Aminosäure, 3 eq. Kupplungsreagens (TBTU bzw. HATU), 3 eq. Additiv (HOBt bzw. HOAt) und 8.4 eq. DIEA (bei TBTU) bzw. 30 eq. Collidin (bei HATU) werden in NMP gelöst, zum N-terminal entschützten Peptidyl-Harz gegeben und 120 bzw. 90 min geschüttelt.

- **Peptidabspaltung vom TCP-Harz**<sup>268</sup>

Das peptidbeladene TCP-Harz wird 30 min in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gequollen. Anschließend wird eine Mischung aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/HOAc/TFA = 4/1/1 (15 ml / g Harz) zugegeben und 90 min geschüttelt. Die Peptidabspaltung wird noch zweimal wiederholt und die vereinigten Filtrate unter mehrmaliger Zugabe von Toluol am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der erhaltene Feststoff wird in einer Mischung von MeOH/PE 40/60 = 1/1 suspendiert, intensiv im Ultraschallbad behandelt und abgesaugt. Das Produkt wird in der Regel ohne weitere Reinigung und Charakterisierung umgesetzt.

#### 8.2.1.5 Standard-Peptidcyclisierung AV5<sup>261a, 269</sup>

Das vollständig entschützte lineare Peptid wird unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in einer Konzentration von  $7 \cdot 10^{-4}$  M in DMF gelöst, mit 1.5 eq. HATU, 1.5 eq. HOAt sowie 10 eq. Collidin versetzt und 20 h bei RT gerührt. Danach wird die Reaktion abgebrochen und das Lösungsmittel bei 50 °C über eine Kühlfalle abgezogen. Der zurückbleibende Rückstand wird in MeOH aufgeschlämmt, intensiv im Ultraschallbad behandelt und abgesaugt. Die Reinigung des Produktes erfolgt mittels semipräparativer HPLC.

---

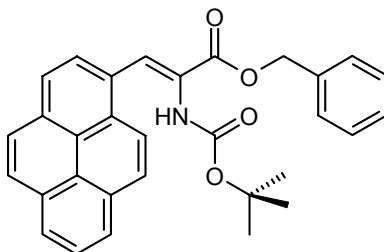
<sup>267</sup> Die Peptid-Festphasensynthesen werden in handelsüblichen 10 ml Einmalspritzen der Firma Braun mit eingelegten Filterplättchen der Firma Vetter durchgeführt.

<sup>268</sup> Zur besseren Durchmischung wird die Peptidabspaltung in einem Rundkolben mit Magnetrührfisch durchgeführt.

<sup>269</sup> A. Ehrlich, H.-U. Heyne, R. Winter, M. Beyermann, H. Haber, L. A. Carpino, M. Bienert, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8831.

## 8.2.2 Enantioselektive Darstellung chromophorsubstituierter Aminosäuren

### 8.2.2.1 2-tert.-Butoxycarbonylamino-3-(1-pyrenyl)-acrylsäurebenzylester (1)



Synthese nach Lit.<sup>270</sup>

170 mg (0.518 mmol) 1-Iodpyren<sup>271</sup> bzw. 144 mg (0.518 mmol) 1-Brompyren,<sup>271</sup> 200 mg (0.721 mmol) 2-tert.-Butoxycarbonylamino-acrylsäurebenzylester,<sup>272</sup> 110 mg (1.30 mmol) NaHCO<sub>3</sub> und 168 mg (0.520 mmol) Bu<sub>4</sub>NBr werden unter N<sub>2</sub>-Schutz in 7 ml absolutem DMF gelöst. Im Dunklen werden 3.50 mg (0.016 mmol) Pd(OAc)<sub>2</sub> zugefügt. Der Reaktionsansatz wird 20 h (1-Iodpyren-Ansatz) bzw. 48 h (1-Brompyren-Ansatz) bei 85 °C gerührt und anschließend mit 25 ml H<sub>2</sub>O versetzt. Nach dreimaliger Extraktion mit je 15 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> werden die vereinigten org. Phasen mit 20 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und einrotiert. Der erhaltene Rückstand wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc (1/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>31</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub>** (477.56 g/mol)

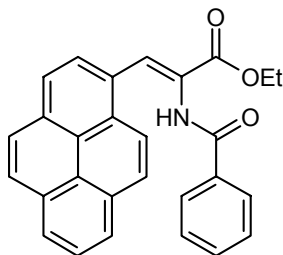
**Ausbeute:** 1-Iodpyren-Ansatz: 203 mg (0.425 mmol, 82 %) gelber Feststoff, 1-Brompyren-Ansatz: 153 mg (0.321 mmol, 62 %) gelber Feststoff; **Schmp.:** 156-157 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ in ppm): 8.23-7.99 (m, 10H, 9 Pyrenyl-H, CH), 7.52-7.36 (m, 5H, Phenyl-H), 6.25 (s (b), 1H, NH), 5.39 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 1.22 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) **IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3450, 3308, 3040, 2979, 2942, 2869, 1700, 1634, 1491, 1392, 1307, 1286, 1240, 1168, 1066, 967, 838, 753, 702 cm<sup>-1</sup>; **MS** (CI, NH<sub>3</sub>) m/z (%): 477.4 (100, M<sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 77.97, H 5.70, N 2.93; gef. C 77.77, H 5.71, N 2.90.

<sup>270</sup> A. Carlström, T. Frejd, *Acta Chem. Scand.* **1992**, 46, 163.

<sup>271</sup> Synthese nach: R. Engl, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1999**.

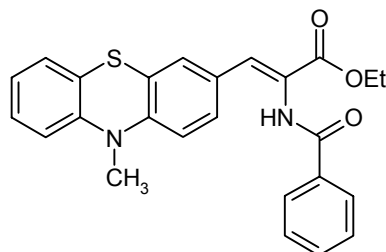
<sup>272</sup> Synthese nach: A. Carlström, T. Frejd, *Synthesis* **1989**, 414-418.

### 8.2.2.2 2-Benzoylamino-3-(1-pyrenyl)-acrylsäureethylester (2)



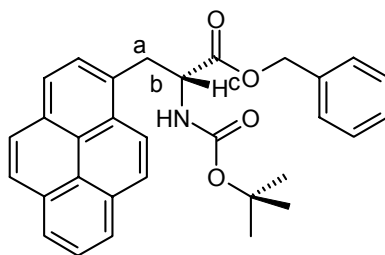
Synthese sowie Analytik analog Lit.<sup>273</sup>

### 8.2.2.3 2-Benzoylamino-3-(10-methyl-10-*H*-3-phenothiazinyl)-acrylsäureethylester (3)



Synthese sowie Analytik analog Lit.<sup>274</sup>

### 8.2.2.4 *D*-2-tert.-Butoxycarbonylamino-3-(1-pyrenyl)-propionsäurebenzylester (4)



Synthese in Anlehnung an Lit.<sup>273, 275</sup>

<sup>273</sup> H.-C. Gallmeier, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, **1999**.

<sup>274</sup> M. Komma, *Dissertation*, Universität Regensburg, **1999**.

<sup>275</sup> H. Brunner, W. Pieronczyk, B. Schoenhammer, K. Streng, I. Bernal, J. Korp, *Chem. Ber.* **1981**, 3, 1137.

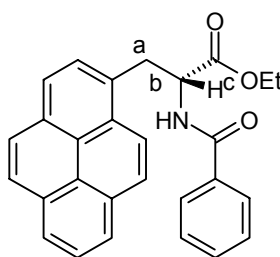
7.95 mg (17.2  $\mu\text{mol}$ ) (*S,S*)-NORPHOS und 4.13 mg (8.39  $\mu\text{mol}$ )  $[\text{Rh}(\text{COD})\text{Cl}]_2$ <sup>276</sup> werden unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre 15 min in 5 ml absolutem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der verbleibende orange Feststoff mit 107 mg (0.224 mmol) 2-tert.-Butoxycarbonylamino-3-(1-pyrenyl)-acrylsäurebenzylester (**1**) und 15 ml absolutem MeOH versetzt. Die Suspension wird 24 h in einem Autoklaven bei 30 bar Wasserstoffdruck und 60°C gerührt.<sup>277</sup> Danach wird das Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand aus EtOH umkristallisiert.

**C<sub>31</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub>** (479.58 g/mol)

**Ausbeute:** 82 mg (0.17 mmol, 76 %, 70 % ee) hellgelbes Pulver; **Schmp.:** 115-116 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +70.1$  ( $c = 0.19$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  in ppm): 8.30 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.20-7.97 (m, 7H, Pyrenyl-H), 7.71 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, Pyrenyl-H), 7.21-6.99 (m, 5H, Phenyl-H), 5.12 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, NH), 5.01 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4.93-4.85 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 3.91-3.76 (m, 2H, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>), 1.40 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3428, 3370, 3040, 2877, 2837, 1727, 1708, 1684, 1529, 1279, 1245, 1169, 1017, 847, 697 \text{ cm}^{-1}$ ; **MS** (EI, 70 eV)  $m/z$  (%): 479.4 (9, M<sup>+</sup>) 215.1 (100, Py-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 77.64, H 6.09, N 2.92; gef. C 77.27, H 6.07, N 2.91.

#### 8.2.2.5 *D*-2-Benzoylamino-3-(1-pyrenyl)-propionsäureethylester (**5**)



Synthese in Anlehnung an Lit.<sup>273, 278</sup>

<sup>276</sup> Synthese nach: J. J. Eisch, R. B. King, *Organometallic Syntheses (Transition-Metal Compounds, Vol. 1)*, Academic Press, London, New York, **1965**.

<sup>277</sup> Alle Hydrierungen werden in 250-ml Stahlautoklaven der Firma Roth mit Manometer und Glaseinsatz durchgeführt.

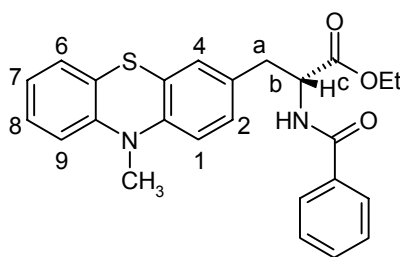
<sup>278</sup> M. Burk, J. Feaster, W. Nugent, R. Harlow, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10125.

9.92 mg (27.4  $\mu\text{mol}$ ) (*R,R*)-Et-DUPHOS und 6.39 mg (13.0  $\mu\text{mol}$ )  $[\text{Rh}(\text{COD})\text{Cl}]_2$ <sup>276</sup> werden unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre 15 min in 10 ml absolutem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der verbleibende orange Feststoff mit 1.00 g (2.38 mmol) 2-Benzoylamino-3-(1-pyrenyl)-acrylsäureethylester (**2**) und 45 ml absolutem MeOH versetzt. Die Suspension wird 24 h in einem Autoklaven bei 50 bar Wasserstoffdruck und 60°C gerührt. Danach wird das Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand aus EtOH umkristallisiert.

$\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{NO}_3$  (421.50 g/mol)

**Ausbeute:** 951 mg (2.26 mmol, 95 %, 98 % ee) hellgelbe Nadeln; **Schmp.:** 184-185 °C; **Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +154.0$  ( $c = 0.07$  MeOH);  **$^1\text{H-NMR}$**   $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 25°C, TMS,  $\delta$  in ppm):  $\delta = 8.41$  (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.23-7.95 (m, 7 H, Pyrenyl-H), 7.83 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, Pyrenyl-H), 7.74-7.30 (m, 5H, Phenyl-H), 6.70 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, NH), 5.37-5.28 (m, 1H,  $\text{H}^c$ ), 4.26-3.83 (m, 4H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_3$ ,  $\text{H}^a$ ,  $\text{H}^b$ ), 1.10 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3755, 3429, 2950, 1750, 1639, 1524, 1480, 1266, 1181, 1107, 845, 697$   $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (EI, 70 eV)  $m/z$  (%): 421.2 (7,  $\text{M}^{+}$ ) 215.1 (100,  $\text{Py-CH}_2^{+}$ ); **Elementaranalyse:** ber. C 79.79, H 5.50, N 3.32; gef. C 79.57, H 5.66, N 3.41.

#### 8.2.2.6 *D*-2-Benzoylamino-3-(10-methyl-10-*H*-3-phenothiazinyl)-propionsäureethylester (**6**)



Synthese in Anlehnung an Lit.<sup>273, 278</sup>

Durchführung analog 1.3.1.5

Ansatzgröße:

**3:** 1.00 g (2.32 mmol)

(*R,R*)-Et-DUPHOS: 4.24 mg (11.7  $\mu\text{mol}$ )

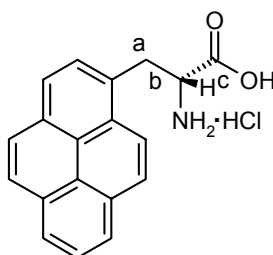
$[\text{Rh}(\text{COD})\text{Cl}]_2$ : 2.73 mg (5.55  $\mu\text{mol}$ )

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub><sub>abs.</sub>: 5 ml  
 MeOH<sub>abs.</sub>: 50 ml

**C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S** (432.55 g/mol)

**Ausbeute:** 908 mg (2.10 mmol, 90 %, 98 % ee) gelber Feststoff; **Schmp.:** 47-48 °C;  
**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +51.5$  ( $c = 0.09$  DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS,  $\delta$  in ppm):  $\delta = 7.79$ -7.39 (m, 5H, Phenyl-H), 7.70-6.72 (m, 7H, Phenothiazinyl-H), 6.58 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz, NH), 5.07-4.96 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 4.28-4.18 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.35 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.20 (dd, 1H,  $J = 13.8$  Hz,  $J = 5.7$  Hz, H<sup>a</sup>), 3.14 (dd, 1H,  $J = 13.8$  Hz,  $J = 4.9$  Hz, H<sup>b</sup>), 1.33 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3338, 3062, 2978, 2935, 1740, 1646, 1532, 1466, 1447, 1374, 1334, 1257, 1210, 1145, 1100, 1029, 853, 697$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (EI, 70 eV)  $m/z$  (%): 432.2 (42, M<sup>+</sup>) 226.1 (100, C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>NS-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 69.42, H 5.59, N 6.48; gef. C 69.22, H 5.58, N 6.45.

### 8.2.2.7 *D*-2-Amino-3-(1-pyrenyl)-propionsäure-Hydrochlorid (7)



CA:  $\alpha$ -Amino-(*R*)-1-pyrenpropanoic acid

[96037-95-5]

Synthese in Anlehnung an Lit.<sup>273, 279</sup>

In einem Rundkolben werden 13.9 g (32.9 mmol) *D*-2-Benzoylamino-3-(1-pyrenyl)-propionsäureethylester (**5**) in einer Mischung aus 1030 ml HCl<sub>konz.</sub> und 2060 ml Eisessig suspendiert. Der Ansatz wird über Nacht unter Rückfluss bei 100 °C gerührt. Die Lösung wird einrotiert, zur Reinigung des zurückbleibenden Feststoffes in 300 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> suspendiert und 5 min geschallt. Das hinreichend reine Produkt wird abgesaugt und im ÖV getrocknet.

<sup>279</sup> a) Jörg Strauß, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, 1999;

b) S. Egusa, M. Sisido, Y. Imanishi, *Macromolecules* **1985**, 18, 882.

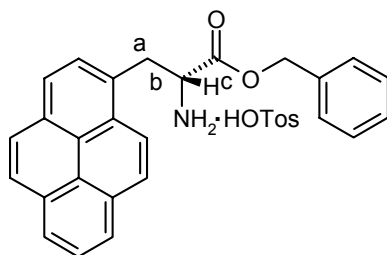


**C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>Cl** (325.79 g/mol)

**Ausbeute:** 10.0 g (30.7 mmol; 93 %) grüner Feststoff; **Schmp.:** 253-255 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -71.8$  ( $c = 0.08$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> + 3 Tr. DCl, TMS,  $\delta$  in ppm):  $\delta = 8.44$  (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, H-10), 8.36-8.06 (m, 7H, Pyrenyl-H), 8.00 (d, 1H, Pyrenyl-H), 4.16 (dd, 1H,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 6.4$  Hz, H<sup>c</sup>), 4.02 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 6.4$  Hz, H<sup>a</sup>), 3.80 (dd, 1H,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 8.4$  Hz, H<sup>b</sup>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3441, 2932, 1739, 1625, 1503, 1463, 1267, 1186, 1105, 952, 844, 713$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, Glycerin/DMSO)  $m/z$  (%): 290.2 (9, MH<sup>+</sup>) 246.4 (100, [MH-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>).

#### 8.2.2.8 D-2-Amino-3-(1-pyrenyl)-propionsäurebenzylester-Tosylat (8)



Synthese nach Lit.<sup>280</sup>

6.40 g (19.6 mmol) *D*-2-Amino-3-(1-pyrenyl)-propionsäure-Hydrochlorid (7), 6.08 g (32.0 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat und 57.2 ml (555 mmol) Benzylalkohol werden in 500 ml Benzol suspendiert. Der Reaktionsansatz wird bei 110 °C unter Rückfluss 18 h gerührt. Mit Hilfe eines Wasserabscheiders wird das während der Reaktion entstehende H<sub>2</sub>O abgetrennt. Nach Abkühlen auf RT wird der Ansatz auf 300 ml eingengt und anschließend mit 700 ml Petrolether versetzt. Der dabei ausfallende Feststoff wird abgesaugt und aus Benzol umkristallisiert.

**C<sub>33</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub>S** (551.66 g/mol)

**Ausbeute:** 7.37 g (13.4 mmol; 68 %) beige-grüner Feststoff; **Schmp.:** 82-84 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -53.5$  ( $c = 0.07$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm):  $\delta = 8.59$  (bs, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 8.36-8.08 (m, 8H, Pyrenyl-H), 7.90 (d, 1H,

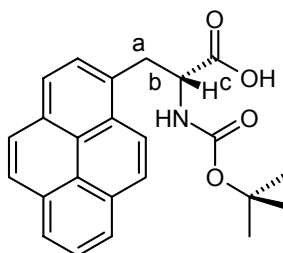
<sup>280</sup> a) M. A. Williams, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1993**, 1151;

b) K. Deal, M. J. Welch, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3986;

c) H. Nakamura, M. Fujiwara, Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7529.

$J = 7.9$  Hz; Pyrenyl-H), 7.51-6.78 (m, 9H, Aryl-H), 5.01 (d, 1H,  $J = 12.3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 4.86 (d, 1H,  $J = 12.3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 4.49 (m, 1H,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 6.3$  Hz;  $\text{H}^c$ ), 3.94 (dd, 1H,  $J = 6.3$  Hz,  $J = 13.9$  Hz,  $\text{H}^a$ ), 3.81 (dd, 1H,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 13.9$  Hz;  $\text{H}^b$ ); 2.29 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3432, 3058, 3023, 2950, 1751, 1650, 1605, 1528, 1457, 1399, 1285, 1216, 1168, 1139, 1107, 1039, 1013, 945, 849, 817, 752, 684$   $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} + 1\%$  AcOH)  $m/z$  (%): 380.2 (100,  $\text{MH}^+$ ); **Elementaranalyse:** ber. C 71.85, H 5.30, N 2.54; gef. C 71.30, H 5.27, N 2.51.

### 8.2.2.9 *D*-2-tert.-Butoxycarbonylamino-3-(1-pyrenyl)-propionsäure (9)



CA:  $\alpha$ -[[[(1,1-Dimethylethoxy)carbonyl]amino]-1-(*R*)-pyrenepropanoic acid  
[126613-96-5]

Synthese nach Lit.<sup>274, 281</sup>

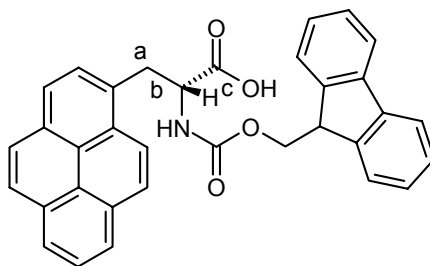
Bei 0 °C suspendiert man 2.00 g (6.13 mmol) *D*-2-Amino-3-(1-pyrenyl)-propionsäure-Hydrochlorid (7) in 140 ml einer 1:1-Mischung aus  $\text{H}_2\text{O}$  und Dioxan. Durch Zusatz von 11.5 ml (8.28 g, 81.8 mmol) Triethylamin wird die Aminosäure gelöst und mit 1.94 ml (1.97 g, 9.03 mmol) Di-tert.-butyldicarbonat versetzt. Das Eisbad wird entfernt und der Ansatz 12 h bei RT gerührt. Nach Abrotieren des Dioxans wird die Reaktionsmischung mit Wasser auf doppeltes Volumen verdünnt und durch Zugabe einer gesättigten Citronensäure-Lösung angesäuert. Dabei fällt ein voluminöser Niederschlag aus, der durch Zusatz von 100 ml EtOAc gelöst wird. Die wässrige Phase des Gemisches wird zweimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden dreimal mit Wasser ausgeschüttelt, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und einrotiert. Der erhaltene ölige Rückstand wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (9/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>** (389.56 g/mol)

<sup>281</sup> H. Mihara, Y. Tanaka, T. Fujimoto, N. Nishino, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 1133.

**Ausbeute:** 2.32 g (5.96 mmol, 97 %) hellgelber Feststoff; **Schmp.:** 127-128 °C; **Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +86.5$  ( $c = 0.10$  in DMSO);  **$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS,  $\delta$  in ppm): 8.48 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.27-8.00 (m, 8H, Pyrenyl-H), 6.70 (d, 1H,  $J = 7.1$  Hz, NH), 4.33-4.25 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 3.97 (dd, 1H,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 8.7$  Hz, H<sup>a</sup>), 3.52 (dd, 1H,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 8.7$  Hz, H<sup>b</sup>), 1.23 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3448, 3056, 2985, 2941, 1716, 1679, 1664, 1635, 1585, 1545, 1520, 1461, 1403, 1359, 1169, 1063, 846, 684\text{ cm}^{-1}$ ; **MS** (CI, NH<sub>3</sub>)  $m/z$  (%): 389.3 (100, M<sup>+</sup>).

#### 8.2.2.10 *D*-2-(Fluoren-9-yl-methoxycarbonylamino)-3-(1-pyrenyl)-propionsäure (10)



Synthese nach Lit.<sup>282</sup>

In einem 1:1-Gemisch aus Dioxan und H<sub>2</sub>O werden 1.00 g (3.07 mmol) *D*-2-Amino-3-(1-pyrenyl)-propionsäure-Hydrochlorid (**7**) und 520 mg (6.19 mmol) NaHCO<sub>3</sub> suspendiert. Nach Zusatz von 1.04 g (3.08 mmol) Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl-*O*-succinimid wird 20 h bei RT gerührt. Im Anschluss daran wird die Reaktionsmischung mit HCl<sub>konz</sub> auf pH 1 angesäuert und dreimal mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Die org. Phase wird nacheinander je zweimal mit 0.1 M HCl und H<sub>2</sub>O extrahiert, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und einrotiert. Der zurückbleibende Feststoff wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (6/1) als Laufmittel gereinigt.

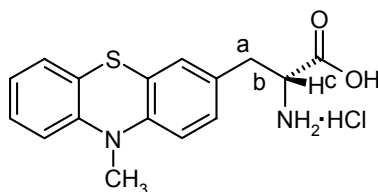
**C<sub>34</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>** (511.58 g/mol)

**Ausbeute:** 1.04 g (2.03 mmol, 66 %) gelber Feststoff; **Schmp.:** 228-230 °C; **Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +58.8$  ( $c = 0.05$  in DMSO);  **$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS,  $\delta$  in ppm): 8.52 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.28-8.01 (m, 7H, Pyrenyl-H), 7.83 (d,

<sup>282</sup> J.-M. Soleilhac, F. Cornille, L. Martin, C. Lenoir, M.-C. Fournie-Zaluski, B. Roques, *Anal. Biochem.* **1996**, 241, 120-127.

1H,  $J = 7.5$  Hz, Pyrenyl-H), 7.69 (d, 1H,  $J = 7.1$  Hz, NH), 7.54-7.11 (m, 8H, Aryl-H), 4.40-4.31 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 4.11-3.99 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>, CH, H<sup>a</sup>), 3.53 (dd, 1H,  $J = 13.7$  Hz,  $J = 9.7$  Hz, H<sup>b</sup>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3427, 3043, 1721, 1646, 1531, 1453, 1266, 1050, 938, 846, 740$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (EI, 70 eV)  $m/z$  (%): 511.0 (5, M<sup>+</sup>) 215.0 (20, Py-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 165.2 (100, C<sub>13</sub>H<sub>9</sub><sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 79.83, H 4.93, N 2.74; gef. C 79.84, H 4.90, N 2.72.

#### 8.2.2.11 *D*-2-Amino-3-(10-methyl-10-*H*-3-phenothiazinyl)-propionsäure-Hydrochlorid (11)



Synthese in Anlehnung an Lit.<sup>273, 279</sup>

Durchführung analog 1.3.1.7

Ansatzgröße:

**6:** 2.68 g (6.20 mmol)

HCl<sub>konz.</sub>: 190 ml

HOAc<sub>konz.</sub>: 390 ml

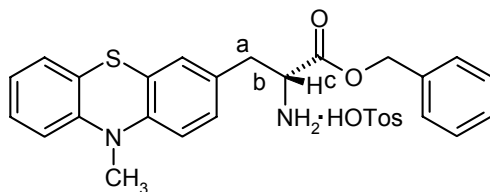
**C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>SCl** (336.84 g/mol)

**Ausbeute:** 1.86 g (5.52 mmol, 89 %); hellbrauner Feststoff; **Schmp.:** 212-214 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -42.9$  ( $c = 0.12$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 13.82 (s (b), 1H, COOH), 8.34 (s (b), 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.35-6.55 (m, 7H, Phenothiazinyl-H), 4.14 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 3.34 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.15-2.82 (m, 2H, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>);

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3432, 2930, 1724, 1634, 1582, 1470, 1405, 1334, 1260, 1138, 815, 750$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, Glycerin/DMSO)  $m/z$  (%): 601.3 (4, [MH-HCl]<sup>+</sup>), 301.1 (100, MH<sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 57.05, H 5.09, N 8.32; gef. C 57.23, H 5.02, N 8.21.

### 8.2.2.12 *D*-2-Amino-3-(10-methyl-10-*H*-3-phenothiazinyl)-propionsäurebenzylester-Tosylat (12)



Synthese nach Lit.<sup>280</sup>

Durchführung analog 1.3.1.8

Ansatzgröße:

**11:** 1.30 g (3.81 mmol)

p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat: 0.79 mg (4.61 mmol)

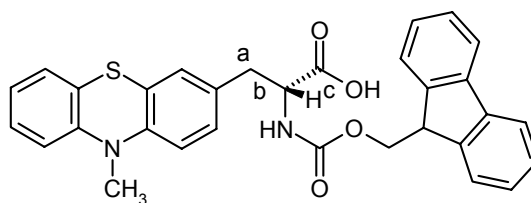
Benzylalkohol: 7.44 ml (7.81 g, 72.1 mmol)

Benzol: 50 ml

Trotz mehrmaliger Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1) konnte die ölige Spezies nicht vollständig gereinigt werden. Das Produkt wird deshalb ohne weitere Reinigung und Charakterisierung umgesetzt und nach der nächsten Umsetzung (siehe 8.2.3.7) gereinigt.

**C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>** (562.71 g/mol)

**Ausbeute:** 1.25 g (2.22 mmol, 58 %) gelbes Öl;

**8.2.2.13 D-2-(Fluoren-9-yl-methoxycarbonylamino)-3-(10-methyl-10-H-3-phenothiazinyl)-propionsäure (13)**

Synthese in Anlehnung an Lit.<sup>273, 282</sup>

Durchführung analog 1.3.1.10

Ansatzgröße:

**6:** 1.20 g (3.56 mmol)

NaHCO<sub>3</sub>: 600 mg (7.14 mmol)

Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl-*O*-succinimid: 1.20 g (3.56 mmol)

Dioxan/H<sub>2</sub>O (1/1): 60 ml

Zur Reinigung wird das Produkt an Kieselgel säulenchromatographiert (Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10/1).

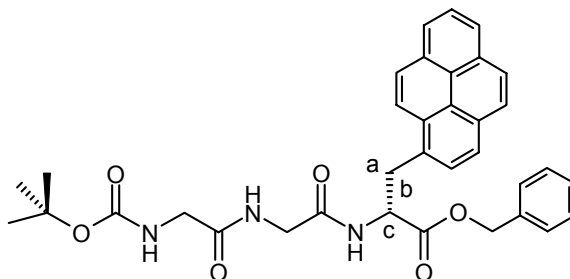
**C<sub>31</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S** (522.62 g/mol)

**Ausbeute:** 1.12 g (2.14 mmol, 60 %) beiger Feststoff; **Schmp.:** 206-208 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -27.1$  ( $c = 0.07$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 7.87 (d, 2H,  $J = 7.5$  Hz, Phenothiazinyl-H), 7.62-6.74 (m, 14H, 5 Phenothiazinyl-H, 8 Aryl-H, NH), 4.28 (dd, 1H,  $J = 8.9$  Hz,  $J = 6.1$  Hz, CH), 4.18-4.04 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 4.00-3.91 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 3.23 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.04 (dd, 1H,  $J = 13.1$  Hz,  $J = 9.1$  Hz, H<sup>a</sup>), 2.82 (dd, 1H,  $J = 13.1$  Hz,  $J = 7.9$  Hz, H<sup>b</sup>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3426, 3064, 2965, 2932, 1704, 1693, 1571, 1547, 1526, 1466, 1443, 1333, 1258, 1142, 1046, 742$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH + 1 % NH<sub>4</sub>OH)  $m/z$  (%): 1043.5 (11, [2M - H<sup>+</sup>]<sup>-</sup>) 521.2 (100, [M - H<sup>+</sup>]<sup>-</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 71.24, H 5.01, N 5.36; gef. C 71.76, H 4.91, N 4.94.

## 8.2.3 Darstellung chromophorsubstituierter Tri- und Tetrapeptide

### 8.2.3.1 Boc-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (14a)



Durchführung analog **AV1**

Ansatz:

**8:** 600 mg (1.09 mmol)

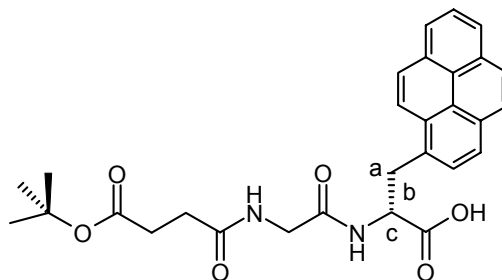
Boc-Gly-Gly-OH: 251 mg (1.09 mmol)

Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/PE 40-60/MeOH (9/5/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>** (593.68 g/mol)

**Ausbeute:** 567 mg (0.955 mmol, 88 %) beiger Feststoff; **Schmp.:** 144-145 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -20.0$  ( $c = 0.04$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.63 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, NH), 8.37-8.05 (m, 8H, Pyrenyl-H), 7.96 (t, 1H,  $J = 5.6$  Hz, NH), 7.92 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, Pyrenyl-H), 7.22-6.98 (m, 6H, Phenyl-H, NH), 5.03 (d, 1H,  $J = 12.7$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.94 (d, 1H,  $J = 12.7$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.84-4.79 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 3.89-3.56 (m, 6H, N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>), 1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3312, 3041, 2977, 2936, 1725, 1693, 1643, 1533, 1453, 1400, 1369, 1274, 1251, 1222, 1178, 1050, 1026, 984, 844, 751, 694, 624$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, Glycerin/DMSO)  $m/z$  (%): 1187.1 (2, (2M)H<sup>+</sup>), 594.3 (13, MH<sup>+</sup>), 538.2 (26, (M - C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)H<sup>+</sup>), 494.3 (17, (M - C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>OCO)H<sup>+</sup>), 215.2 (100, Py-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>); **HRMS** (FAB, Glycerin/MeOH): ber. 594.6873 (MH<sup>+</sup>), gef. 594.2604 (MH<sup>+</sup>).

8.2.3.2 Boc-Gly-Gly-*D*-Pya-OH (14b)

Durchführung analog AV2

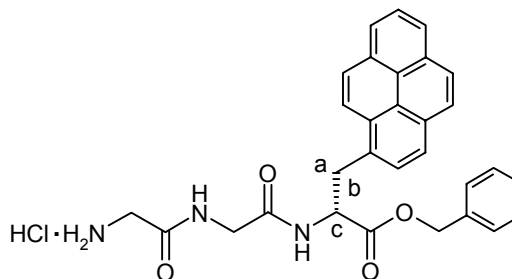
Ansatz:

**14a:** 800 mg (1.35 mmol)

**C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>** (503.55 g/mol)

**Ausbeute:** 605 mg (1.20 mmol, 89 %) farblores Pulver; **Schmp.:** 140-141 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +24.0$  ( $c = 0.08$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.42-8.38 (m, 1H, NH), 8.40 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.32-8.04 (m, 7H, Pyrenyl-H), 7.96 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, Pyrenyl-H), 7.89 (t, 1H,  $J = 5.2$  Hz, NH), 6.98 (t, 1H,  $J = 5.6$  Hz, NH), 4.74-4.65 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 3.92-3.52 (m, 6H, 2 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>), 1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3405, 3047, 2978, 2933, 1683, 1658, 1541, 1531, 1458, 1398, 1370, 1281, 1251, 1168, 848, 682$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH + 1 % NH<sub>4</sub>OH)  $m/z$  (%): 1005.6 (23, [2M - H<sup>+</sup>]) 502.2 (100, [M - H<sup>+</sup>]); **Elementaranalyse:** ber. C 66.79, H 5.80, N 8.34; gef. C 66.88, H 5.95, N 8.11.

8.2.3.3 H-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl · HCl (14c)

Durchführung analog AV3

Ansatz:

**14a:** 600 mg (1.01 mmol)

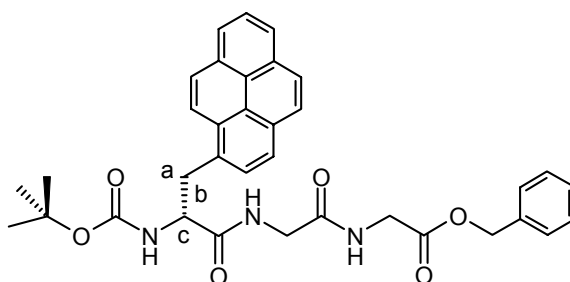


**C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Cl** (530.02 g/mol)

**Ausbeute:** 490 mg (0.924 mmol, 92 %) beiges Pulver; **Schmp.:** 221-223 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +86.5$  ( $c = 0.10$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.86 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, NH), 8.58 (t, 1H,  $J = 5.6$  Hz, NH), 8.38-8.06 (m, 11H, 8 Pyrenyl-H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.94 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, Pyrenyl-H), 7.23-7.02 (m, 5H, Phenyl-H), 5.04 (d, 1H,  $J = 12.5$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.96 (d, 1H,  $J = 12.5$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.84-4.79 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 3.97-3.52 (m, 6H, 2 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3348, 3308, 3238, 3043, 2947, 1743, 1690, 1665, 1636, 1535, 1499, 1459, 1392, 1270, 1245, 1193, 1118, 1004, 904, 846, 752, 698$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH + 1 % AcOH)  $m/z$  (%): 494.2 (100, MH<sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 67.98, H 5.32, N 7.93; gef. C 67.91, H 5.35, N 7.97.

#### 8.2.3.4 Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (15a)



Durchführung analog **AV1**

Ansatz:

**9:** 2.00 g (5.13 mmol)

H-Gly-Gly-OBzl · HOTos: 2.02 g (5.13 mmol)

Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9/1) als Laufmittel gereinigt.

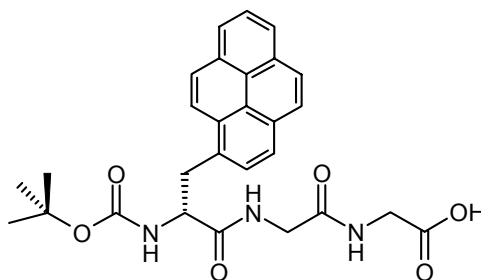
**C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>** (593.68 g/mol)

**Ausbeute:** 2.78 g (4.48 mmol, 91 %, 95 % ee) hellbeiger Feststoff; **Schmp.:** 86-88 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +40.3$  ( $c = 0.11$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.46 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.36 (t, 1H,  $J = 5.2$  Hz, NH), 8.35-7.99 (m, 9H, 8 Pyrenyl-H, NH), 7.40-7.29 (m, 5H, Phenyl-H), 7.16 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, NH), 5.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.51-4.42 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 3.96-3.71 (m, 5H, 2 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>), 3.45 (dd, 1H,  $J = 14.1$  Hz,  $J = 10.1$  Hz, H<sup>b</sup>), 1.15 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3318, 3043, 2977, 2936, 1750, 1662, 1526, 1457, 1392, 1367, 1249, 1174, 1024, 847, 753,$

699  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (FD,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  $m/z$  (%): 593.5 (100,  $\text{M}^{+}$ ); **Elementaranalyse**: ber. C 70.81, H 5.94, N 7.08; gef. C 70.57, H 6.22, N 7.04.

#### 8.2.3.5 Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-OH (15b)



Durchführung analog **AV2**

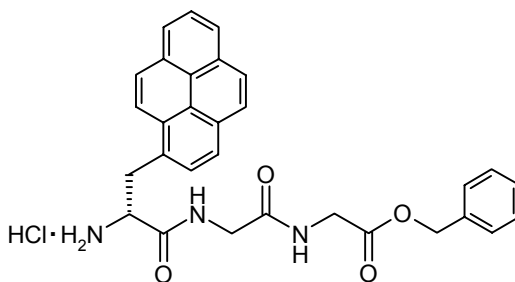
Ansatz:

**15a**: 100 mg (0.168 mmol)

**C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>** (503.55 g/mol)

**Ausbeute**: 72.0 mg (0.143 mmol, 85 %) farbloses Pulver.

#### 8.2.3.6 H-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl · HCl (15c)



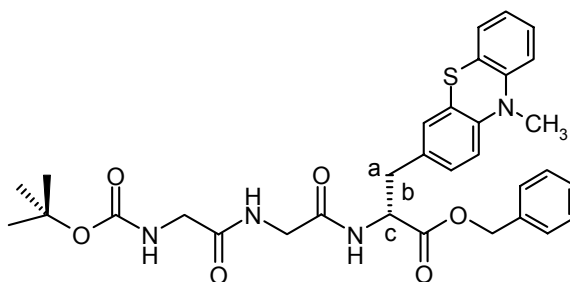
Durchführung analog **AV3**

Ansatz:

**15a**: 1.80 g (3.03 mmol)

**C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Cl** (530.02 g/mol)

**Ausbeute**: 1.58 g (3.00 mmol, 99 %) beiges Pulver.

8.2.3.7 Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl (16a)<sup>283</sup>

Durchführung analog AV1

Ansatz:

**12:** 1.15 g (2.04 mmol)

Boc-Gly-Gly-OH: 0.48 g (2.04 mmol)

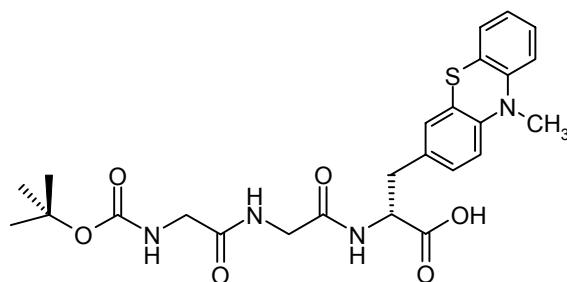
Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (10/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S** (604.72 g/mol)

**Ausbeute:** 738 mg (1.22 mmol; 60 %) oranger Feststoff; **Schmp.:** 68-69 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +16.2$  ( $c = 0.04$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.37 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, NH), 7.99 (t, 1H,  $J = 5.6$  Hz, NH), 7.33-6.81 (m, 13H, Phenothiazinyl-H, Phenyl-H, NH), 5.03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.51-4.42 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 3.72 (pt, 2H,  $J = 6.0$  Hz, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3.56 (pd, 2H,  $J = 6.0$  Hz, N-CH<sub>2</sub>-CO) 3.28 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.98-2.81 (m, 2H, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>), 1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3403, 3065, 3025, 2976, 2932, 1741, 1662, 1527, 1507, 1467, 1391, 1368, 1335, 1256, 1169, 1050, 1027, 947, 750, 699$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, Glycerin/DMSO)  $m/z$  (%): 605.2 (60, MH<sup>+</sup>), 226.1 (100, C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>NS-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 63.56, H 6.00, N 9.26; gef. C 63.29, H 6.02, N 9.20.

<sup>283</sup> Die Verbindung wurde in Zusammenarbeit mit R. Hörger synthetisiert:  
Rolf Hörger, *Zulassungsarbeit*, Universität Regensburg, 2001.

**8.2.3.8 Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-OH (16b)**<sup>283</sup>

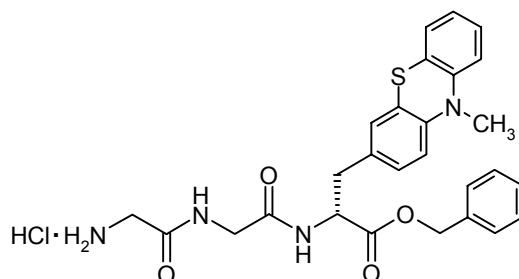
Durchführung analog **AV2**

Ansatz:

**16a**: 352 mg (0.582 mmol)

**C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S** (514.60 g/mol)

**Ausbeute**: 255 mg (0.496 mmol, 85 %) lila Pulver.

**8.2.3.9 H-Gly-Gly-*D*-Pta-OBzl · HCl (16c)**

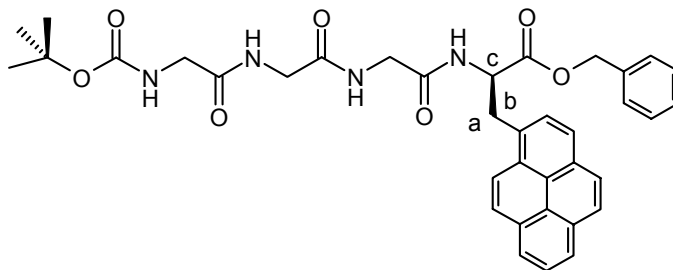
Durchführung analog **AV3**

Ansatz:

**16a**: 177 mg (0.293 mmol)

**C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>SCI** (541.07 g/mol)

**Ausbeute**: 121 mg (0.224 mmol, 76 %) farbloses Pulver.

8.2.3.10 Boc-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (17a)

Durchführung analog **AV1**

Ansatz:

**8:** 200 mg (0.362 mmol)

Boc-Gly-Gly-Gly-OH: 99 mg (0.362 mmol)

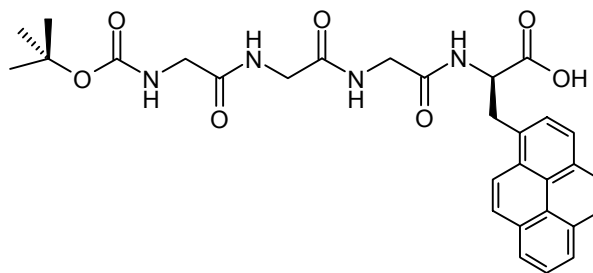
Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>37</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>** (650.73 g/mol)

**Ausbeute:** 220 mg (0.338 mmol, 93 %) farbloser Feststoff; **Schmp.:** 103-104 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +12.2$  ( $c = 0.07$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.61 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, NH), 8.37-8.05 (m, 10H, 8 Pyrenyl-H, 2 NH), 7.92 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, Pyrenyl-H), 7.25-6.98 (m, 6H, Phenyl-H, NH), 5.03 (d, 1H,  $J = 12.7$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.94 (d, 1H,  $J = 12.7$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.83-4.74 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 3.89-3.63 (m, 8H, 3 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>), 1.34 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3337, 3286, 3065, 2978, 2933, 1758, 1713, 1680, 1648, 1548, 1457, 1430, 1370, 1265, 1214, 1172, 1048, 1033, 850, 747, 693$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, NBA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $m/z$  (%): 651.5 (47, MH<sup>+</sup>), 215.2 (100, Py-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 68.29, H 5.89, N 8.61; gef. C 67.87, H 6.03, N 8.89.

### 8.2.3.11 Boc-Gly-Gly-*D*-Pya-OH (17b)



Durchführung analog **AV2**

Ansatz:

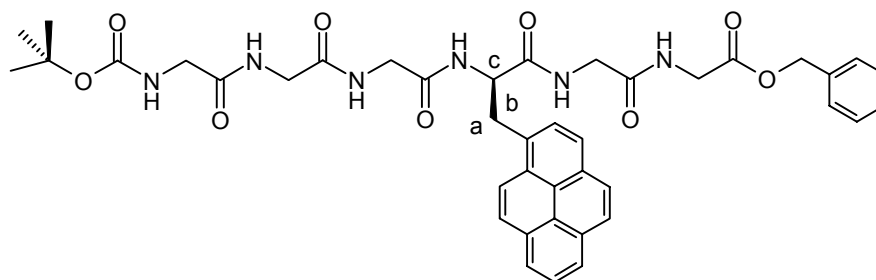
**17a**: 150 mg (0.231 mmol)

$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_7$  (560.61 g/mol)

**Ausbeute**: 100 mg (0.178 mmol, 77 %) beiges Pulver.

## 8.2.4 Darstellung chromophorsubstituierter Penta- Hexa- und Octapeptide

### 8.2.4.1 Boc-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (18a)



Durchführung analog **AV1**

Ansatz:

**15c**: 450 mg (0.849 mmol)

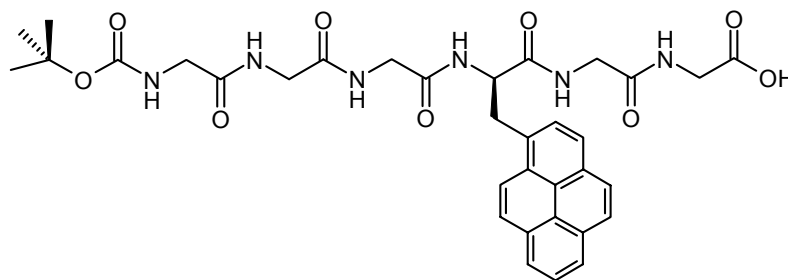
Boc-Gly-Gly-Gly-OH: 245 mg (0.847 mmol)

Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (9/1) als Laufmittel gereinigt.

$\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_9$  (764.84 g/mol)

**Ausbeute:** 398 mg (0.520 mmol, 61 %) farbloser Feststoff; **Schmp.:** 213-215 °C; **Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +11.5$  ( $c = 0.04$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS,  $\delta$  in ppm): 8.48 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.44 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz, NH), 8.35-7.96 (m, 12H, 8 Pyrenyl-H, 4 NH), 7.39-7.32 (m, 5H, Phenyl-H), 6.98 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz, NH), 5.14 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.85-4.77 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 3.95-3.47 (m, 12H, N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>), 1.34 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3300, 3046, 2977, 2935, 1749, 1697, 1635, 1518, 1433, 1401, 1367, 1245, 1179, 1024, 848, 698$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, Glycerin/MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $m/z$  (%): 765.6 (3, MH<sup>+</sup>), 665.6 (13, (M - C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>OCO)H<sup>+</sup>), 215.2 (100, Py-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>); **HRMS** (FAB, Glycerin/MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): ber. 765.8479, gef. 765.3239.

#### 8.2.4.2 Boc-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-OH (18b)



Durchführung analog **AV2**

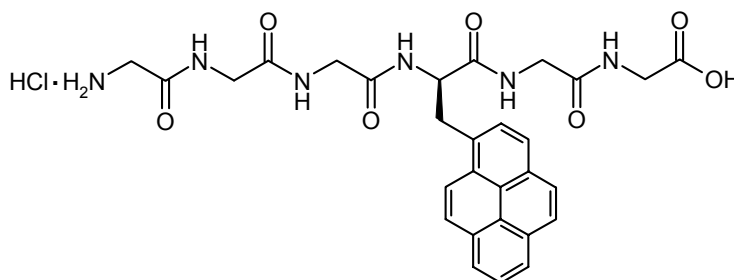
Ansatz:

**18a:** 200 mg (0.261 mmol)

**C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>** (674.71 g/mol)

**Ausbeute:** 147 mg (0.218 mmol, 83 %) beiges Pulver.

#### 8.2.4.3 H-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-OH · HCl (18d)



Durchführung analog **AV3**

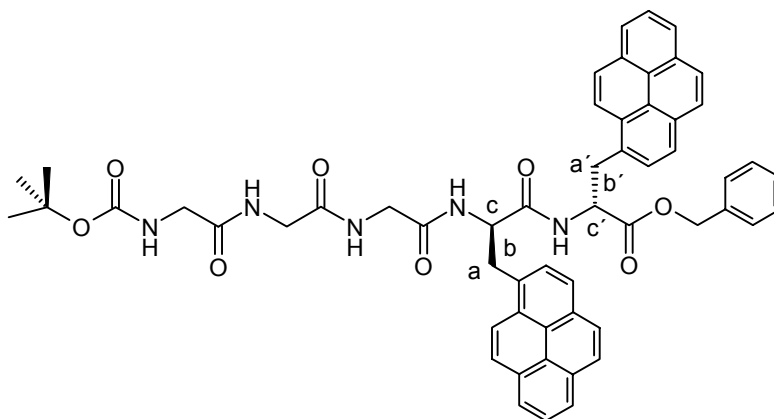
Ansatz:

**18b**: 147 mg (0.218 mmol)

**C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Cl** (611.05 g/mol)

**Ausbeute**: 112 mg (0.183 mmol, 84 %) hellbraunes Pulver.

#### 8.2.4.4 Boc-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-*D*-Pya-OBzl (**19a**)



Durchführung analog **AV1**

Ansatz:

**8**: 23.0 mg (0.042 mmol)

**17b**: 23.4 mg (0.042 mmol)

Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (12/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>56</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>** (922.05 g/mol)

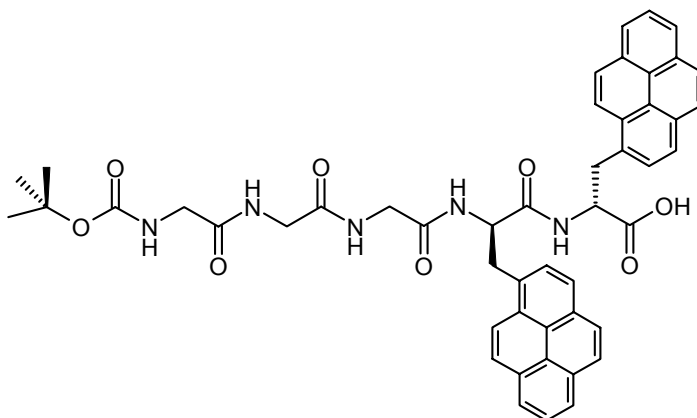
**Ausbeute**: 19.3 mg (0.021 mmol, 50 %, 61 % de) beiger Feststoff; **Schmp.**: 134-135 °C; **Drehwert**:  $[\alpha]_D^{20} = -32.0$  ( $c = 0.06$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR**<sup>284</sup> (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 9.03 (8.95) [8.89 (8.82)] (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, NH), 8.31-7.98 (m, 19H, 17 Pyrenyl-H, 2 NH), 7.73 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, Pyrenyl-H), 7.24-7.09 (m, 5H, Phenyl-H), 7.00-6.96 (m, 2H, NH), 5.09 (4.97) (d, 1H,  $J = 12.4$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 5.03 (4.86) (d, 1H,  $J = 12.4$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.91-4.76 (m, 2H, H<sup>c</sup>, H<sup>c'</sup>), 3.75-3.45 (m, 10H, N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>, H<sup>a'</sup>, H<sup>b'</sup>), 1.32 [1.33] (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr)**:  $\tilde{\nu}$  3426, 3296,

<sup>284</sup> Die Zuordnung der Signale in Klammern zu Rotationsisomeren (eckige Klammern) bzw. Diastereomeren (runde Klammern) wurde durch temperaturabhängige <sup>1</sup>H-NMR-Experimente verifiziert.



3043, 2973, 2935, 1741, 1720, 1654, 1544, 1526, 1461, 1371, 1268, 1243, 1170, 1030, 846, 697, 675  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (FAB, Glycerin/DMSO)  $m/z$  (%): 922.3 (3,  $\text{MH}^+$ ), 822.3 (9,  $(\text{M} - \text{C}(\text{CH}_3)_3\text{OCO})\text{H}^+$ ), 215.2 (100,  $\text{Py-CH}_2^+$ ); **Elementaranalyse**: ber. C 72.95; H 5.58, N 7.60, gef. C 73.41; H 5.67, N 7.05.

#### 8.2.4.5 Boc-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-*D*-Pya-OH (19b)



Durchführung analog **AV2**

Ansatz:

**19a**: 100 mg (0.108 mmol)

**C<sub>49</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>** (831.93 g/mol)

**Ausbeute**: 70.0 mg (0.084 mmol, 78 %) beiges Pulver.

NC(=O)NCC(=O)NCC(=O)N[C@@H](Cc1ccc2ccccc2cc1)C(=O)N[C@H](Cc3ccc4ccccc4cc3)C(=O)O.Cl

**Ausbeute:** 28.6 mg (0.037 mmol, 98 %) beiges Pulver.

[illegible]

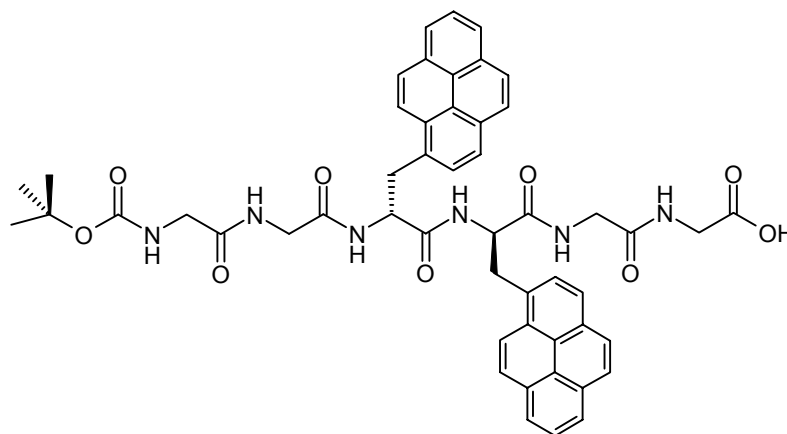
Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>58</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>** (979.10 g/mol)

**Ausbeute:** 396 mg (0.404 mmol, 56 %) grüngelber Feststoff; **Schmp.:** 121-122 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +50.6$  ( $c = 0.08$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.57-7.73 (m, 23H, 18 Pyrenyl-H, 5 NH), 7.39-7.30 (m, 5H, Phenyl-H), 6.99 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz, NH), 5.13 [5.14] (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.88-4.68 (m, 2H, H<sup>c</sup>, H<sup>c'</sup>), 3.96-3.50 (m, 12H, 4 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>, H<sup>a'</sup>, H<sup>b'</sup>), 1.35 [1.38] (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3427, 3046, 2973, 2933, 1747, 1656, 1640, 1543, 1525, 1460, 1441, 1400, 1370, 1265, 1243, 1176, 1063, 1039, 848, 703$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH + 1 % AcOH)  $m/z$  (%): 540.1 (100, MNa<sub>2</sub><sup>2+</sup>), 518.1 (45, MH<sub>2</sub><sup>2+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 71.15, H 5.56, N 8.58; gef. C 71.31, H 5.48, N 8.55.

#### 8.2.4.8 Boc-Gly-Gly-*D*-Pya-*D*-Pya-Gly-Gly-OH (20b)



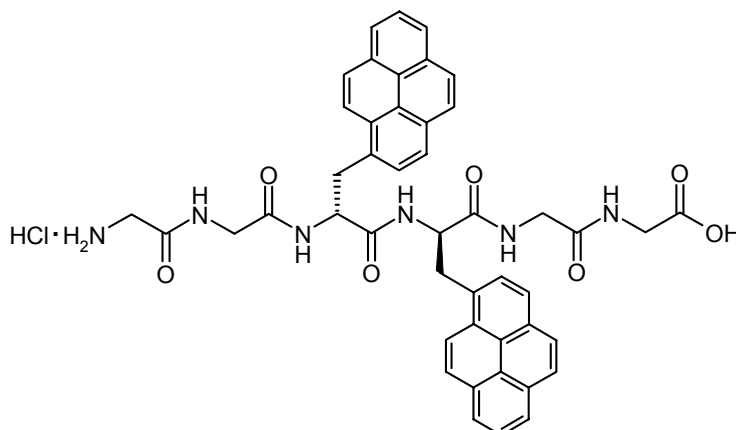
Durchführung analog AV2

Ansatz:

**20a:** 340 mg (0.347 mmol)

**C<sub>51</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>** (888.98 g/mol)

**Ausbeute:** 294 mg (0.331 mmol, 95%) beiges Pulver.

**8.2.4.9 H-Gly-Gly-D-Pya-D-Pya-Gly-Gly-OH · HCl (20d)**

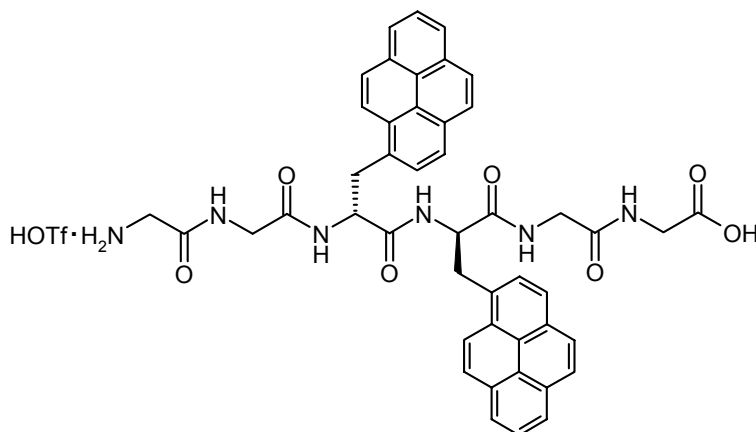
Durchführung analog **AV3**

Ansatz:

**20b**: 70.0 mg (0.079 mmol)

**C<sub>46</sub>H<sub>41</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Cl** (825.32 g/mol)

**Ausbeute**: 52.0 mg (0.063 mmol, 80 %) beiges Pulver.

**8.2.4.10 H-Gly-Gly-D-Pya-D-Pya-Gly-Gly-OH · HOTf (20e)**

Durchführung analog **AV4**

Erstbelegung:

Fmoc-Gly-TCP: 0.6 mmol/g Harz

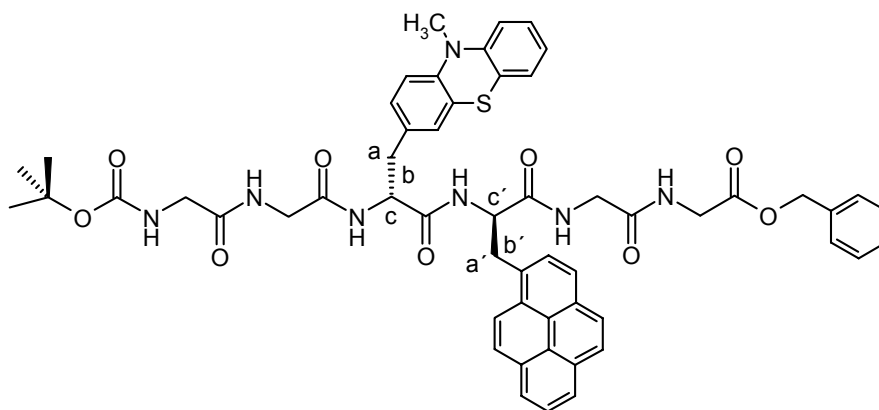
Peptidsynthese-Ansatz:

Fmoc-Gly-TCP - Harz: 215 mg (0.129 mmol)

**C<sub>48</sub>H<sub>41</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>F<sub>3</sub>** (902.88 g/mol)

**Ausbeute:** 92.0 mg (0.102 mmol, 79 %) beigelgelbes Pulver.

#### 8.2.4.11 Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (**21a**)<sup>283</sup>



Durchführung analog **AV1**

Ansatz:

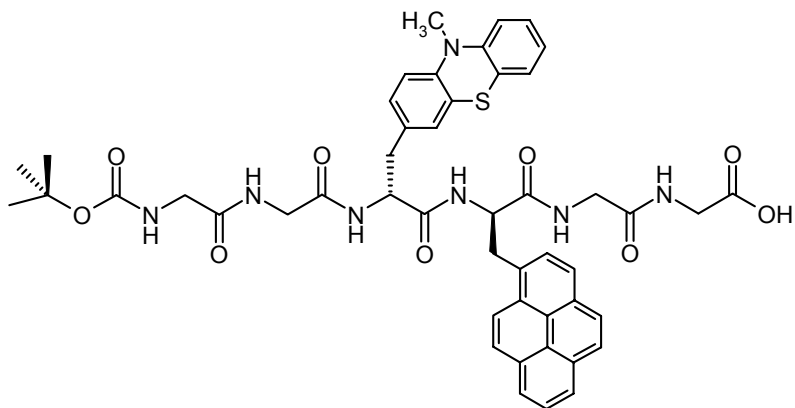
**16b:** 200 mg (0.389 mmol)

**15c:** 206 mg (0.389 mmol)

Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>55</sub>H<sub>55</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S** (988.13 g/mol)

**Ausbeute:** 150 mg (0.294 mmol, 75 %, 80 % de) oranger Feststoff; **Schmp.:** 113-114 °C; **Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +30.3$  ( $c = 0.21$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.59 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, NH), 8.48 (8.57) (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.46-8.42 (m, 1H, NH), 8.38-7.74 (m, 12H, 8 Pyrenyl-H, 4 NH), 7.39-7.32 (m, 5H, Phenyl-H), 7.28-6.81 (m, 7H, Phenothiazinyl-H), 5.13 [5.15] (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.89-4.75 (m, 1H, H<sup>c'</sup>), 4.52-4.34 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 3.96-3.44 (m, 12H, 4 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>, H<sup>a'</sup>, H<sup>b'</sup>), 3.29 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1.38 [1.36] (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3428, 3404, 3289, 3045, 2970, 2931, 1749, 1634, 1522, 1465, 1443, 1334, 1255, 1178, 1031, 948, 848, 748, 698$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, Glycerin/DMSO)  $m/z$  (%): 989.1 (100, MH<sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 66.85, H 5.61, N 9.92; gef. C 66.73, H 5.70, N 9.79.

8.2.4.12 Boc-Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly-OH (21b)

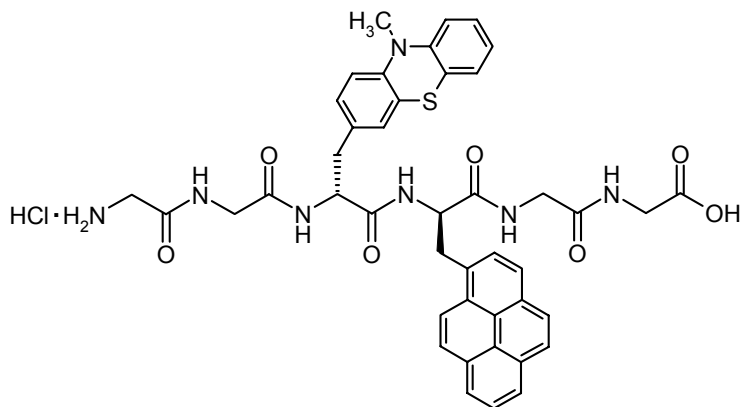
Durchführung analog **AV2**

Ansatz:

**21a**: 190 mg (0.192 mmol)

**C<sub>48</sub>H<sub>49</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S** (900.02 g/mol)

**Ausbeute**: 154 mg (0.171 mmol, 89%) hellbraunes Pulver.

8.2.4.13 H-Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly-OH · HCl (21d)

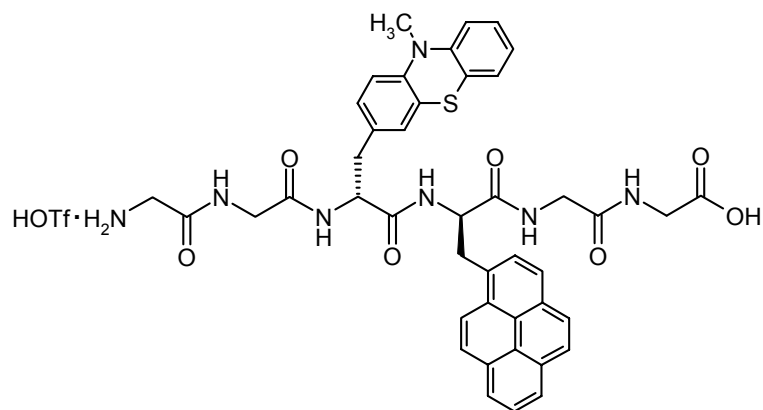
Durchführung analog **AV3**

Ansatz:

**21b**: 165 mg (0.183 mmol)

**C<sub>43</sub>H<sub>42</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>SCl** (836.37 g/mol)

**Ausbeute**: 126 mg (0.150 mmol, 82 %) hellbraunes Pulver.

8.2.4.14 H-Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly-OH · HOTf (21e)

Durchführung analog AV4

Erstbelegung:

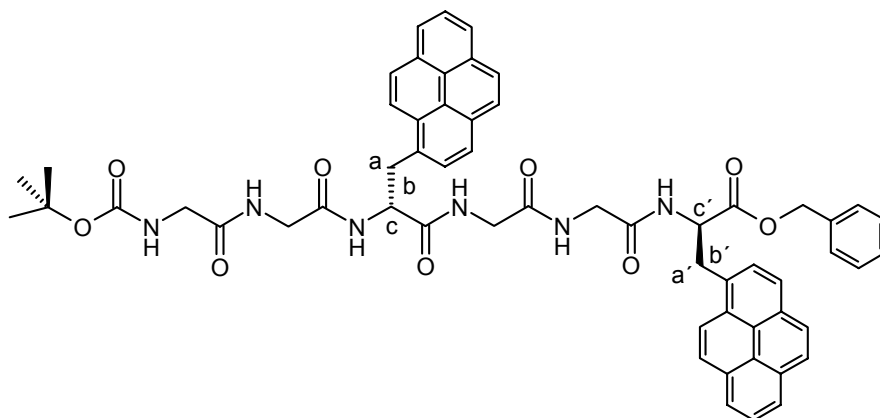
Fmoc-Gly-TCP: 0.6 mmol/g Harz

Peptidsynthese-Ansatz:

Fmoc-Gly-TCP - Harz: 265 mg (0.154 mmol)

$C_{45}H_{41}N_7O_9SF_3$  (912.92 g/mol)

**Ausbeute:** 94.0 mg (0.103 mmol, 67 %) beiges Pulver.

8.2.4.15 Boc-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (22a)<sup>283</sup>

Durchführung analog AV1

Ansatz:

**14b:** 293 mg (0.582 mmol)

**14c:** 288 mg (0.582 mmol)

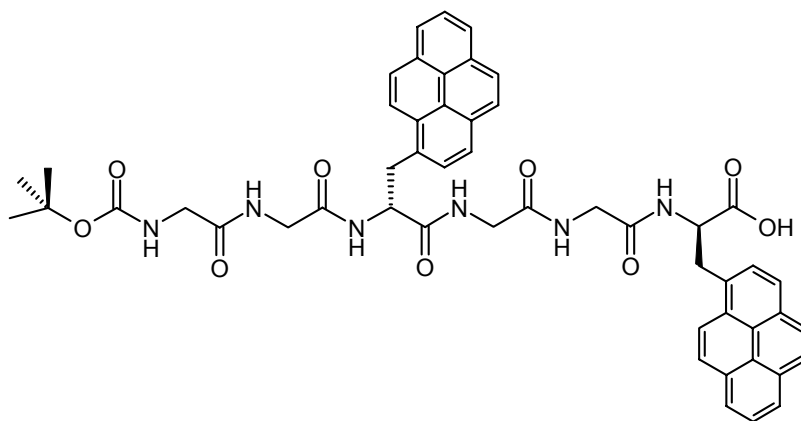
Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>58</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>** (979.10 g/mol)

**Ausbeute:** 352 mg (0.360 mmol, 62 %) farbloses Pulver; **Schmp.:** 211-215 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +13.8$  ( $c = 0.04$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.68 (d, 1H,  $J = 7.63$  Hz, NH), 8.47 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.45-8.42 (m, 1H, NH), 8.36 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz, Pyrenyl-H), 8.30-8.03 (m, 16H, 13 Pyrenyl-H, 3 NH), 7.95 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, Pyrenyl-H), 7.93 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, Pyrenyl-H), 7.84 (t, 1H,  $J = 5.24$  Hz, NH), 7.21-6.96 (m, 6H, Phenyl-H, NH), 5.01 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.94 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.83-4.78 (m, 2H, H<sup>c</sup>, H<sup>c'</sup>), 3.92-3.48 (m, 12H, 4 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>a'</sup>, H<sup>b</sup>, H<sup>b'</sup>), 1.35 [1.38] (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3426, 3401, 3293, 3045, 2973, 2935, 1742, 1655, 1636, 1522, 1440, 1247, 1171, 847, 698, 583$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH + 1 % AcOH)  $m/z$  (%): 1001.1 (100, MNa<sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 71.15, H 5.56, N 8.58; gef. C 70.95, H 5.81, N 8.52.

#### 8.2.4.16 Boc-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-OH (22b)<sup>283</sup>



Durchführung analog **AV2**

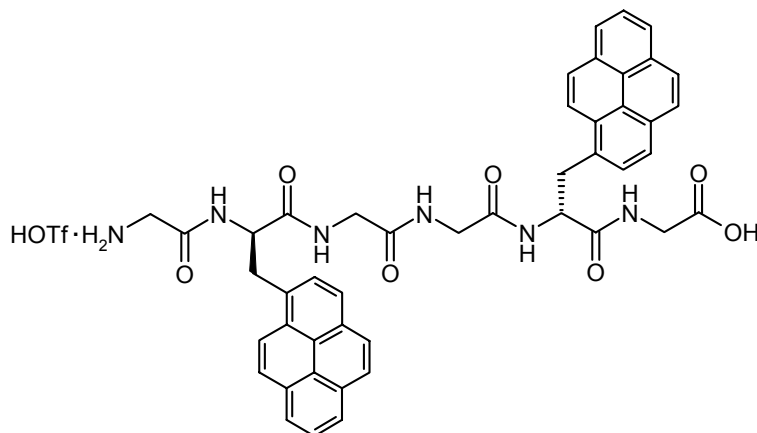
Ansatz:

**22a:** 20.0 mg (0.020 mmol)

**C<sub>51</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>** (888.98 g/mol)

**Ausbeute:** 17.0 mg (0.019 mmol, 94%) farbloser Feststoff.



8.2.4.17 Boc-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-OBzl (23)

Durchführung analog **AV4**

Erstbelegung:

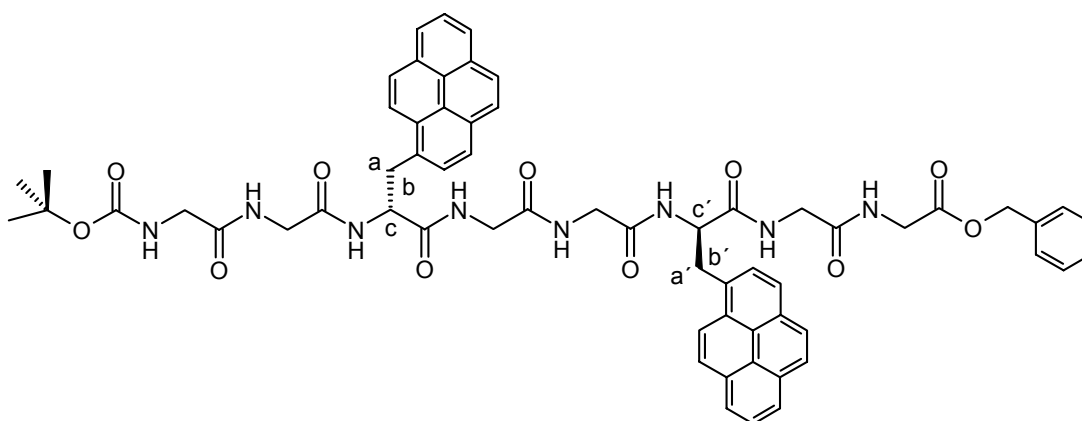
Fmoc-Gly-TCP: 0.6 mmol/g Harz

Peptidsynthese-Ansatz:

Fmoc-Gly-TCP - Harz: 245 mg (0.147 mmol)

$\text{C}_{48}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_9\text{F}_3$  (902.88 g/mol)

**Ausbeute:** 99.0 mg (0.110 mmol, 75 %) beiges Pulver.

8.2.4.18 Boc-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-OBzl (24a)<sup>283</sup>

Durchführung analog **AV1**

Ansatz:

**22b:** 246 mg (0.277 mmol)

H-Gly-Gly-OBzl · HOTos: 109 mg (0.277 mmol)

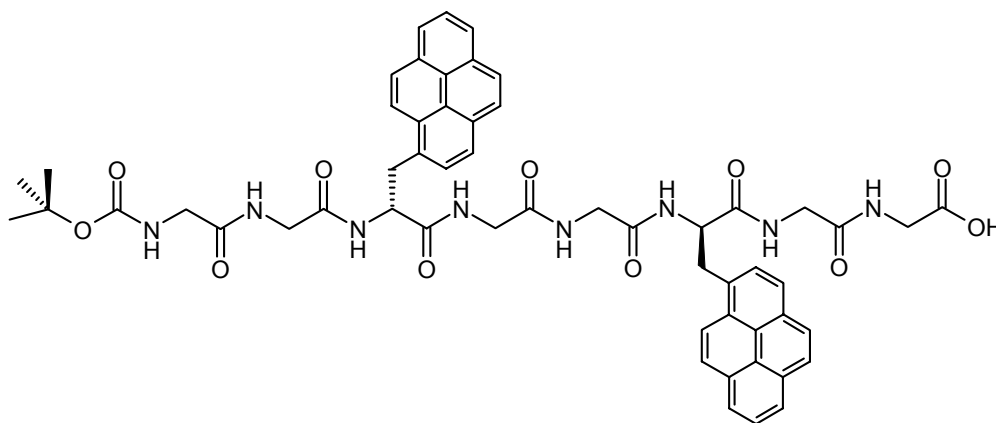
Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (6/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>62</sub>H<sub>60</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>** (1093.20 g/mol)

**Ausbeute:** 225 mg (0.206 mmol, 74 %) farbloses Pulver; **Schmp.:** 231-235 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +39.0$  ( $c = 0.02$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.51-8.44 (m, 2H, NH), 8.49 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.41-8.32 (m, 3H, NH), 8.28-8.00 (m, 16H, 15 Pyrenyl-H, 1 NH), 7.96 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Pyrenyl-H), 7.94 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, Pyrenyl-H), 7.83 (t, 1H,  $J = 5.6$  Hz, NH), 7.37-7.31 (m, 5H, Phenyl-H), 6.96 (t, 1H,  $J = 5.6$  Hz, NH), 5.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.89-4.75 (m, 2H, H<sup>c</sup>, H<sup>c'</sup>), 3.93-3.44 (m, 16H, 6 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>a'</sup>, H<sup>b</sup>, H<sup>b'</sup>), 1.35 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3401, 3294, 3046, 2975, 2932, 1746, 1660, 1636, 1519, 1439, 1369, 1247, 1180, 1029, 847, 699, 611$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH + 1 % AcOH)  $m/z$  (%): 1132 (16, MK<sup>+</sup>), 1116 (100, MNa<sup>+</sup>), 1093 (2, MH<sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 68.12, H 5.53, N 10.25; gef. C 67.42, H 6.03, N 9.77.

#### 8.2.4.19 Boc-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-OH (24b)<sup>283</sup>



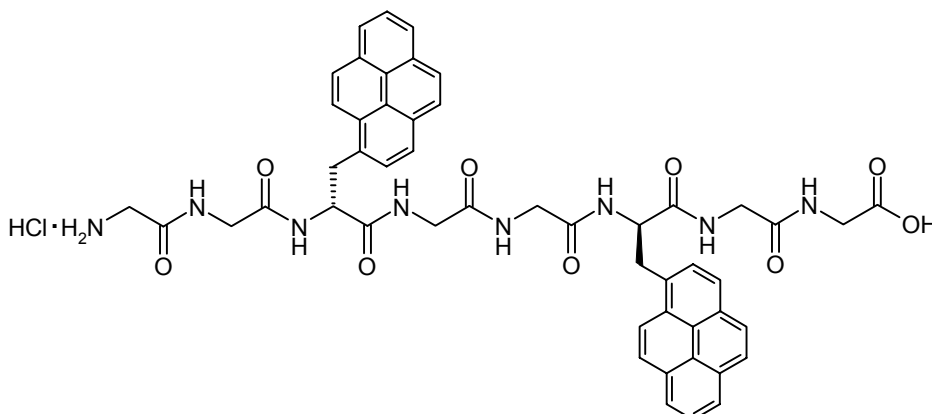
Durchführung analog **AV2**

Ansatz:

**24a:** 210 mg (0.192 mmol)

**C<sub>55</sub>H<sub>54</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>** (1003.08 g/mol)

**Ausbeute:** 165 mg (0.164 mmol; 86 %) farbloser Feststoff.

8.2.4.20 H-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-OH · HCl (24d)<sup>283</sup>

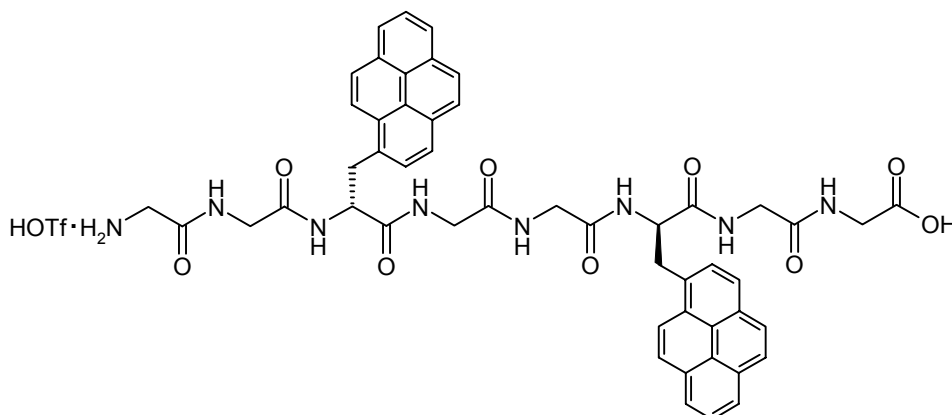
Durchführung analog AV3

Ansatz:

**24b:** 165 mg (0.164 mmol)

**C<sub>50</sub>H<sub>47</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Cl** (939.42 g/mol)

**Ausbeute:** 123 mg (0.129 mmol; 79 %) farbloses Pulver.

8.2.4.21 H-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-OH · HOTf (24e)

Durchführung analog AV4

Erstbelegung:

Fmoc-Gly-TCP: 0.6 mmol/g Harz

Peptidsynthese-Ansatz:

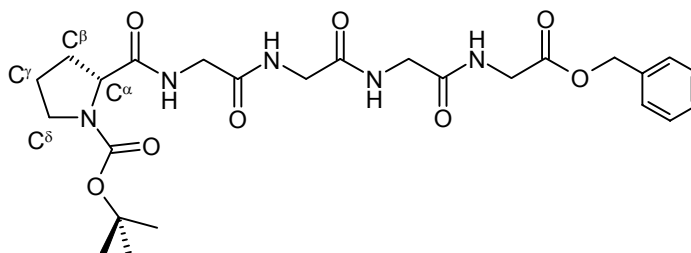
Fmoc-Gly-TCP - Harz: 230 mg (0.138 mmol)

**C<sub>52</sub>H<sub>47</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>F<sub>3</sub>** (1016.99 g/mol)

**Ausbeute:** 99.0 mg (0.110 mmol, 71 %) farbloses Pulver.

## 8.2.5 Darstellung chromophorsubstituierter Hairpinpeptide

### 8.2.5.1 Boc-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-OBzl (25a)



Durchführung analog **AV1**

Ansatz:

Boc-*D*-Pro-Gly-OH: 339 mg (1.25 mmol)

H-Gly-Gly-Gly-OBzl · HCl: 389 mg (1.23 mmol)

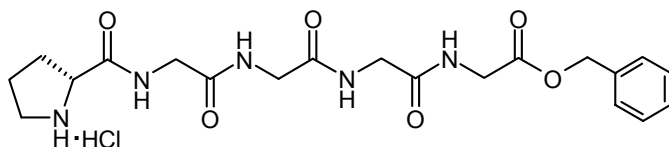
Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (6/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>** (533.58 g/mol)

**Ausbeute:** 490 mg (0.918 mmol, 75 %) farbloser Feststoff; **Schmp.:** 109-111 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +17.7$  ( $c = 0.10$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.33-7.98 (m, 4H, NH), 7.39-7.32 (m, 5H, Phenyl-H), 5.13 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.13-4.06 (m, 1H, C <sup>$\alpha$</sup> H), 3.91 (d, 2H,  $J = 6.0$  Hz, N-CH<sub>2</sub>-CO), 3.86-3.63 (m, 6H, 3 N-CH<sub>2</sub>-CO), 3.37-3.24 (m, 2H, C <sup>$\delta$</sup> H<sub>2</sub>), 2.19-1.68 (m, 4H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>2</sub>, C <sup>$\gamma$</sup> H<sub>2</sub>), 1.32 [1.38] (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sup>285</sup>; **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3309, 3074, 2978, 2936, 1750, 1664, 1532, 1456, 1408, 1370, 1246, 1189, 1170, 1130, 1031, 971, 918, 742, 699$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH + 1 % AcOH)  $m/z$  (%): 572.1 (32, MK<sup>+</sup>), 556.2 (100, MNa<sup>+</sup>), 534.1 (6, MH<sup>+</sup>).

<sup>285</sup> Die C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Gruppe ergibt im Spektrum zwei Singuletts die den Rotationsisomeren um die N-terminale Carbamat-Bindung zugeordnet werden können. Es sind die chemischen Verschiebungen beider Rotationsisomere angegeben (intensitätsschwächeres Signal in eckigen Klammern), wobei zur Integration beide Signale zusammengefasst werden.

8.2.5.2 H-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-OBzl · HCl (25c)

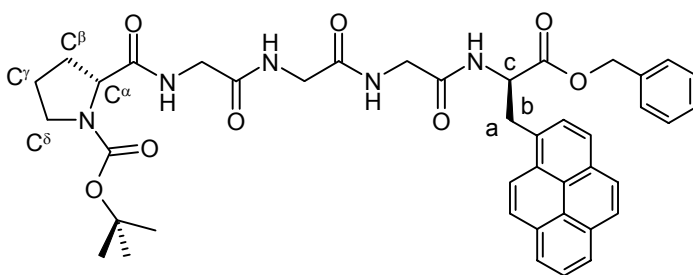
Durchführung analog **AV3**

Ansatz:

**25a**: 270 mg (0.506 mmol)

$C_{20}H_{28}N_5O_6Cl$  (469.92 g/mol)

**Ausbeute**: 168 mg (0.358 mmol, 71 %) farbloses Pulver.

8.2.5.3 Boc-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (26a)

Durchführung analog **AV1**

Ansatz:

Boc-*D*-Pro-Gly-OH: 52.0 mg (0.190 mmol)

**14c**: 100 mg (0.189 mmol)

Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit  $CH_2Cl_2/MeOH$  (9/1) als Laufmittel gereinigt.

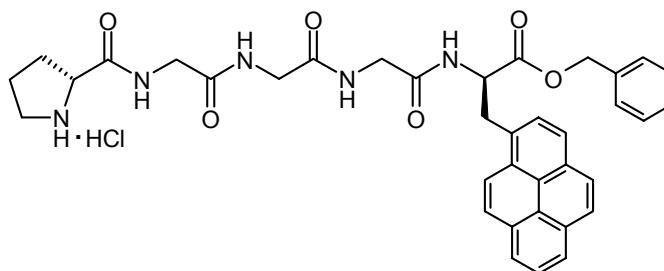
$C_{42}H_{45}N_5O_8$  (747.85 g/mol)

**Ausbeute**: 111 mg (0.148 mmol, 79 %) farbloser Feststoff; **Schmp.**: 99-100 °C;

**Drehwert**:  $[\alpha]_D^{20} = +18.9$  ( $c = 0.05$  in DMSO);  **$^1H$ -NMR** (250 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS,  $\delta$  in ppm): 8.64-8.60 (m, 1H, NH), 8.37-8.00 (m, 11H, 8 Pyrenyl-H, 3 NH), 7.92 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, Pyrenyl-H), 7.25-7.00 (m, 5H, Phenyl-H), 5.03 (d, 1H,  $J = 12.7$  Hz,  $CH_2$ -Ph), 4.94 (d, 1H,  $J = 12.7$  Hz,  $CH_2$ -Ph), 4.83-4.74 (m, 1H,  $H^c$ ), 4.12-4.05 (m, 1H,  $C^\alpha H$ ), 3.89-3.57 (m, 8H, 3 N- $CH_2$ -CO,  $H^a$ ,  $H^b$ ), 3.39-3.18 (m, 2H,  $C^\delta H_2$ ), 2.15-1.65 (m,

4H, C<sup>β</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>), 1.31 [1.36] (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sup>285</sup>; **IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3317, 3046, 2977, 2935, 1743, 1688, 1663, 1543, 1529, 1458, 1405, 1243, 1169, 1131, 1029, 849, 699 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH + 1 % AcOH) m/z (%): 786.2 (14, MK<sup>+</sup>), 770.2 (34, MNa<sup>+</sup>), 748.3 (22, MH<sup>+</sup>), 648.2 (100, (M - C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>OCO)H<sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 67.45, H 6.07, N 9.36; gef. C 67.36, H 6.10, N 9.04.

#### 8.2.5.4 H-D-Pro-Gly-Gly-Gly-D-Pya-OBzl · HCl (26c)



Durchführung analog **AV3**

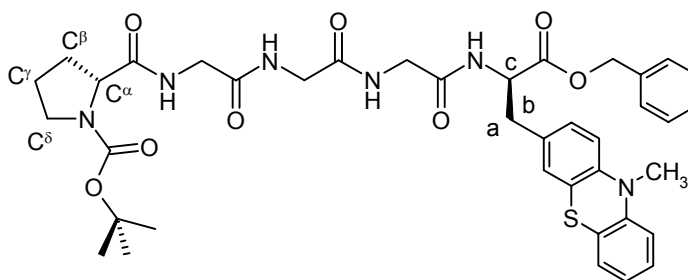
Ansatz:

**26a:** 95.0 mg (0.127 mmol)

**C<sub>37</sub>H<sub>38</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Cl** (684.19 g/mol)

**Ausbeute:** 70.0 mg (0.102 mmol, 81 %) farbloses Pulver.

#### 8.2.5.5 Boc-D-Pro-Gly-Gly-Gly-D-Pta-OBzl (27a)



Durchführung analog **AV1**

Ansatz:

Boc-D-Pro-Gly-OH: 56.0 mg (0.206 mmol)

**16c:** 110 mg (0.203 mmol)

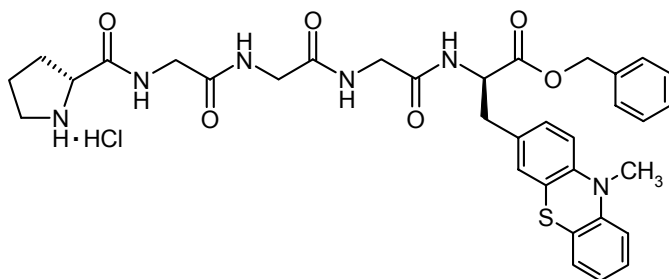
Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>39</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S** (758.90 g/mol)

**Ausbeute:** 108 mg (0.142 mmol, 69 %) hellroter Feststoff; **Schmp.:** 76-77 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +8.8$  ( $c = 0.03$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.10-7.97 (m, 2H, 2 NH), 7.68-7.59 (m, 1H, NH), 7.50-7.43 (m, 1H, NH), 7.29-7.05 (m, 10H, Phenyl-H, 5 Phenothiazinyl-H), 6.95 (dd, 1H,  $J = 8.1$  Hz,  $J = 9.1$  Hz, Phenothiazinyl-H), 6.86 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Phenothiazinyl-H), 5.09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.69-4.60 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 4.26-4.18 (m, 1H, C <sup>$\alpha$</sup> H), 3.98-3.72 (m, 8H, 3 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>), 3.50-3.41 (m, 2H, C <sup>$\delta$</sup> H<sub>2</sub>), 3.36 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.22-1.80 (m, 4H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>2</sub>, C <sup>$\gamma$</sup> H<sub>2</sub>), 1.42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3315, 3068, 2976, 2935, 1743, 1663, 1543, 1530, 1467, 1443, 1407, 1335, 1257, 1167, 1138, 1031, 751, 699$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, Glycerin/MeOH)  $m/z$  (%): 759.5 (16, MH<sup>+</sup>), 659.5 (27, (M - C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>OCO)H<sup>+</sup>), 226.2 (100, C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>NS-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>); **HRMS** (EI, 70 eV): ber. 758.8956, gef. 758.3168.

#### 8.2.5.6 H-D-Pro-Gly-Gly-Gly-D-Pta-O-Bzl · HCl (27c)



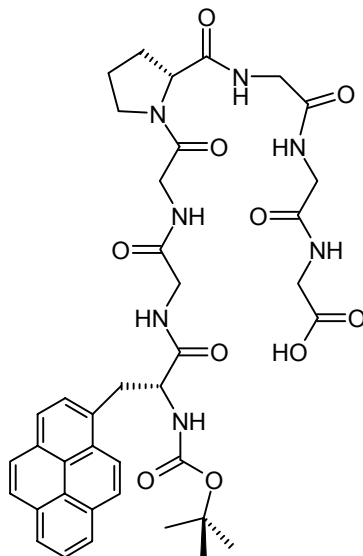
Durchführung analog **AV3**

Ansatz:

**27a:** 60.0 mg (0.079 mmol)

**C<sub>34</sub>H<sub>39</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>SCI** (695.24 g/mol)

**Ausbeute:** 48.0 mg (0.069 mmol, 87 %) farbloses Pulver.

8.2.5.7 Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-OH (28)

Durchführung analog AV4

Erstbelegung:

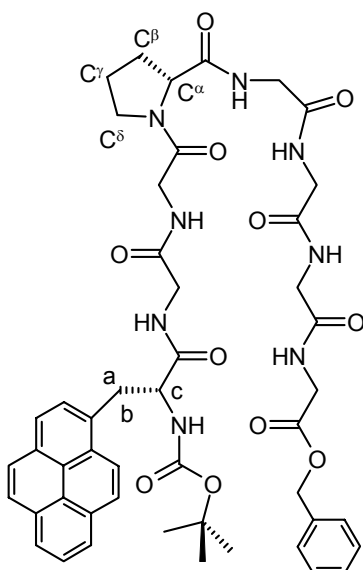
Fmoc-Gly-TCP: 0.6 mmol/g Harz

Peptidsynthese-Ansatz:

Fmoc-Gly-TCP - Harz: 400 mg (0.240 mmol)

$\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{N}_7\text{O}_{10}$  (771.83 g/mol)

**Ausbeute:** 147 mg (0.190 mmol, 79 %) beiges Pulver.

8.2.5.8 Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-OBzl (29)



Durchführung analog **AV1**

Ansatz:

**15b**: 106 mg (0.211 mmol)

**25c**: 100 mg (0.213 mmol)

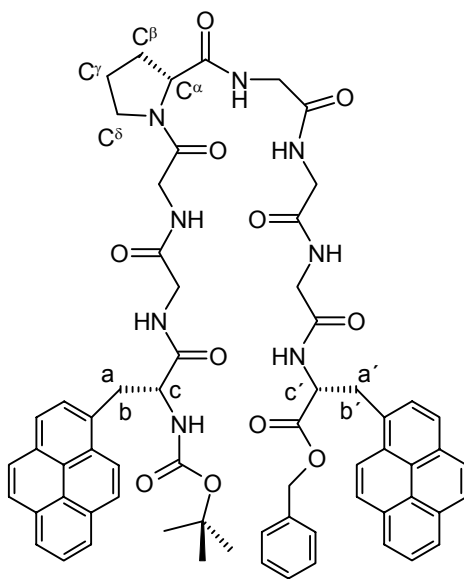
Das Produkt wird mittels Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>48</sub>H<sub>54</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>** (919.00 g/mol)

**Ausbeute**: 75.0 mg (0.082 mmol, 39 %) farbloser Feststoff; **Schmp.**: 200-202 °C;

**Drehwert**:  $[\alpha]_D^{20} = +33.0$  ( $c = 0.09$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.47 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.33-8.05 (m, 11H, 7 Pyrenyl-H, 4 NH), 8.02-7.93 (m, 3H, 1 Pyrenyl-H, 2 NH), 7.38-7.30 (m, 5H, Phenyl-H), 7.14 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, NH), 5.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.51-4.44 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 4.31-4.28 (m, 1H, C <sup>$\alpha$</sup> H), 3.92-3.32 (m, 16H, 6 N-CH<sub>2</sub>-CO, C <sup>$\delta$</sup> H<sub>2</sub>, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>), 2.07-1.84 (m, 4H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>2</sub>, C <sup>$\gamma$</sup> H<sub>2</sub>), 1.14 (0.64)<sup>285</sup> (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr)**:  $\tilde{\nu} = 3394, 3317, 3078, 2973, 2937, 1746, 1655, 1547, 1456, 1418, 1367, 1255, 1198, 1169, 1102, 1028, 846, 806, 749, 694$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH + 1 % AcOH)  $m/z$  (%): 957.3 (34, MK<sup>+</sup>), 941.3 (100, MNa<sup>+</sup>), 919.4 (6, MH<sup>+</sup>); **Elementaranalyse**: ber. C 62.73, H 5.92, N 12.19; gef. C 61.92, H 6.02, N 11.74.

#### 8.2.5.9 Boc-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pro-Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-OBzl (30)



Durchführung analog **AV1**

Ansatz:

**15b:** 51.0 mg (0.101 mmol)

**26c:** 70.0 mg (0.102 mmol)

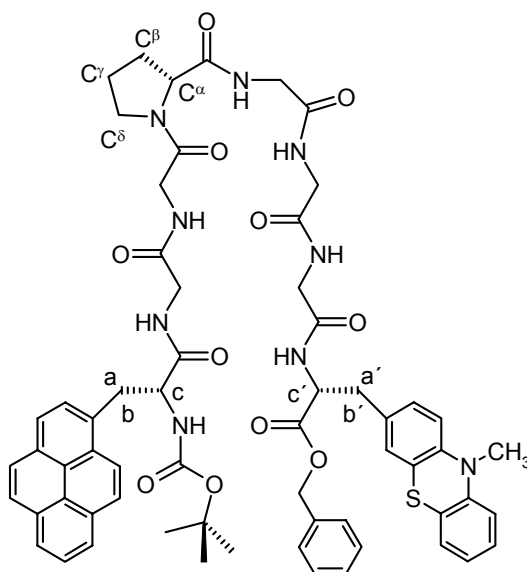
Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>65</sub>H<sub>64</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>** (1133.27 g/mol)

**Ausbeute:** 50.0 mg (0.044 mmol, 44 %) farbloser Feststoff; **Schmp.:** 160-162 °C;

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +25.3$  ( $c = 0.04$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.66-8.62 (m, 1H, NH), 8.45 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.36-7.98 (m, 20H, 16 Pyrenyl-H, 4 NH), 7.95-7.92 (m, 1H, NH), 7.91 (d, 1H,  $J = 8.03$  Hz, Pyrenyl-H), 7.22-7.18 (m, 1H, NH), 7.16-6.98 (m, 5H, Phenyl-H), 5.01 (d, 1H,  $J = 12.1$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.93 (d, 1H,  $J = 12.1$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.81-4.75 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 4.50-4.44 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 4.30-4.26 (m, 1H, C <sup>$\alpha$</sup> H), 3.91-3.42 (m, 16H, 5 N-CH<sub>2</sub>-CO, C <sup>$\delta$</sup> H<sub>2</sub>, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>, H<sup>a'</sup>, H<sup>b'</sup>), 2.03-1.82 (m, 4H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>2</sub>, C <sup>$\gamma$</sup> H<sub>2</sub>), 1.13 [0.64]<sup>285</sup> (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3402, 3318, 3046, 2976, 2936, 1744, 1660, 1542, 1530, 1457, 1369, 1244, 1169, 1102, 848, 699$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, Glycerin/DMSO)  $m/z$  (%): 1133.3 (4, MH<sup>+</sup>), 1033.3 (100, (M - C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>OCO)H<sup>+</sup>); **Elementaranalyse:** ber. C 68.89, H 5.69, N 9.89; gef. C 68.97, H 5.35, N 9.89.

#### 8.2.5.10 Boc-D-Pya-Gly-Gly-D-Pro-Gly-Gly-Gly-D-Pta-OBzl (31)



Durchführung analog AV1

Ansatz:

a) **15b**: 34.5 mg (0.069 mmol)

**26c**: 48.0 mg (0.069 mmol)

b) **28**: 140 mg (0.181 mmol)

**12**: 105 mg (0.187 mmol)

Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9/1) als Laufmittel gereinigt.

**C<sub>62</sub>H<sub>65</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>S** (1144.32 g/mol)

**Ausbeute**: a) 24.2 mg (0.021 mmol, 31 %), b) 98.0 mg (0.086 mmol, 48 %) farbloser Feststoff; **Schmp.**: 148-149 °C; **Drehwert**:  $[\alpha]_D^{20} = +15.9$  ( $c = 0.06$  in DMSO);

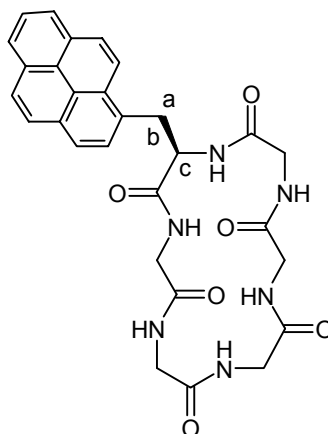
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm):<sup>286</sup> 8.46 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.41-8.35 (m, 3H, 3 NH), 8.35-7.95 (m, 11H, 8 Pyrenyl-H, 3 NH), 7.28-6.61 (m, 13H, Phenyl-H, Phenothiazinyl-H, 1 NH), 5.02 [5.08] (5.00) (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.50-4.42 (m, 2H, H<sup>c</sup>, H<sup>c'</sup>), 4.31-4.27 (m, 1H, C <sup>$\alpha$</sup> H), 4.05-3.40 (m, 14H, 5 N-CH<sub>2</sub>-CO, C <sup>$\delta$</sup> H<sub>2</sub>, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>), 3.26 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.97-2.81 (m, 2H, H<sup>a'</sup>, H<sup>b'</sup>) 2.06-1.84 (m, 4H, C <sup>$\beta$</sup> H<sub>2</sub>, C <sup>$\gamma$</sup> H<sub>2</sub>), 1.13 [0.65] (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **IR (KBr)**:  $\tilde{\nu} = 3406, 3320, 3074, 2982, 2940, 2890, 1743, 1660, 1544, 1528, 1466, 1446, 1335, 1255, 1168, 1028, 849, 751, 695$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH + 1 % AcOH)  $m/z$  (%): 1166.3 (35, MNa<sup>+</sup>), 1144.4 (100, MH<sup>+</sup>), 1044.4 (20, (M - C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>OCO)H<sup>+</sup>); **Elementaranalyse**: ber. C 65.08, H 5.73, N 9.45; gef. C 64.76, H 5.89, N 11.17.

---

<sup>286</sup> Die <sup>1</sup>H-NMR-Auswertung erfolgt mit dem Produkt des Ansatzes a). Näheres dazu ist in Kapitel 2.4.2.2 (Abbildungen 2-43 bis 2-45) zu finden.

## 8.2.6 Darstellung chromophorsubstituierter Cyclopeptide

### 8.2.6.1 cyclo-(Gly-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly) (32)



Durchführung analog **AV5**

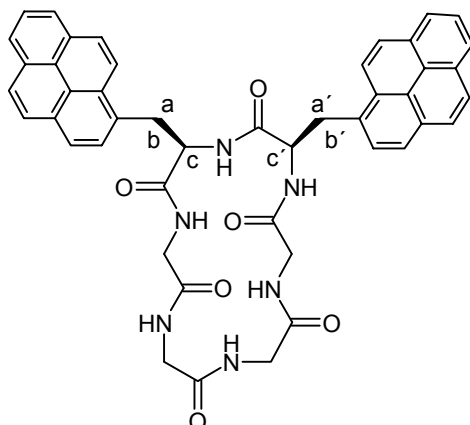
Ansatz:

**18d**: 30.0 mg (0.049 mmol)

**C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>** (556.58 g/mol)

**Ausbeute**: 21.0 mg (0.038 mmol, 78 %) farbloser Feststoff; **Schmp.**: >300°C;

**Drehwert**:  $[\alpha]_D^{20} = +35.0$  ( $c = 0.02$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO- $d_6$ , TMS,  $\delta$  in ppm): 8.50 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, NH), 8.42 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.44-8.37 (m, 2H, NH), 8.32-8.04 (m, 8H, 7 Pyrenyl-H, NH), 7.98-7.93 (m, 1H, NH), 7.95 (d, 1H,  $J = 7.93$  Hz, Pyrenyl-H), 7.85 (t, 1H,  $J = 5.0$  Hz, NH), 4.65-4.56 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 4.02-3.57 (m, 12H, 5 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>); **IR (KBr)**:  $\tilde{\nu} = 3343, 3295, 3090, 3041, 2932, 1679, 1654, 1565, 1546, 1532, 1463, 1423, 1381, 1247, 1111, 1027, 842, 676$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, Glycerin/DMSO)  $m/z$  (%): 557.3 (8, MH<sup>+</sup>), 215.1 (100, Py-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>); **HRMS** (FAB, Glycerin/DMSO): ber. 557.5859, gef. 557.2149.

8.2.6.2 cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pya-*D*-Pya-Gly-Gly) (33)

Durchführung analog **AV5**

Ansatz:

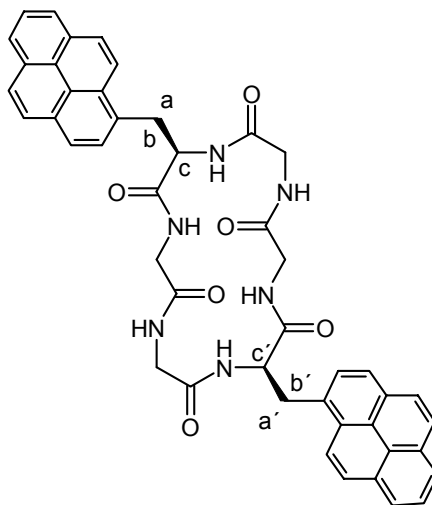
a) **20d**: 50.0 mg (0.061 mmol)

b) **20e**: 80.0 mg (0.089 mmol)

**C<sub>46</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>** (770.84 g/mol)

**Ausbeute:** a) 33.4 mg (0.043 mmol, 72 %, 58 % de), b) 52.4 mg (0.068 mmol, 76 %, >95 % de) beiger Feststoff; **Schmp.:** >300 °C; **Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +45.5$  (c = 0.02 in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, δ in ppm):<sup>287</sup> 8.61-8.45 (m, 3H, 1 Pyrenyl-H, 2 NH), 8.35-8.00 (m, 17H, 16 Pyrenyl-H, NH), 7.89 (d, 1H, J = 8.7 Hz, Pyrenyl-H), 7.86 (t, 1H, J = 5.4 Hz, NH), 7.56 (d, 1H, J = 7.9 Hz, NH), 7.17 (d, 1H, J = 7.9 Hz, NH), 4.78-4.67 (m, 2H, H<sup>c</sup>, H<sup>c'</sup>), 4.08-3.60 (m, 12H, 4 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>, H<sup>a'</sup>, H<sup>b'</sup>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3297, 3046, 2977, 2935, 1657, 1462, 1433, 1405, 1268, 1241, 1030, 846, 755, 681 cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, Glycerin/DMSO) m/z (%): 771.4 (3, MH<sup>+</sup>), 215.2 (100, Py-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>); **HRMS** (FAB, Glycerin/DMSO): ber. 771.8523, gef. 771.2936.

<sup>287</sup> Die <sup>1</sup>H-NMR-Auswertung erfolgt mit dem Produkt des Ansatzes b).

8.2.6.3 cyclo-(Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly) (34)

Durchführung analog **AV5**

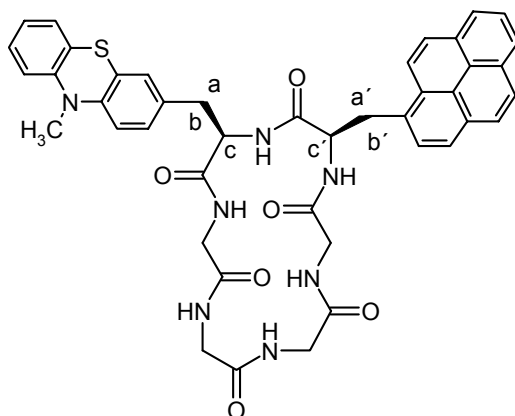
Ansatz:

**23**: 95.0 mg (0.105 mmol)

**C<sub>46</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>** (770.84 g/mol)

**Ausbeute**: 65.0 mg (0.843 mmol, 80 %), farbloser Feststoff; **Schmp.**: >300 °C;

**Drehwert**:  $[\alpha]_D^{20} = +55.6$  ( $c = 0.04$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm): 8.51 (t, 1H,  $J = 6.5$  Hz, NH), 8.46-8.36 (m, 2H, NH), 8.40 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.32-7.93 (m, 18H, 16 Pyrenyl-H, 2 NH), 7.94 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, Pyrenyl-H), 7.78 (t, 1H,  $J = 5.0$  Hz, NH), 4.91-4.74 (m, 2H, H<sup>c</sup>, H<sup>c'</sup>), 3.95-3.49 (m, 12H, 4 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>, H<sup>a'</sup>, H<sup>b'</sup>); **IR (KBr)**:  $\tilde{\nu} = 3350, 3046, 2937, 1663, 1531, 1424, 1340, 1268, 1242, 1186, 1029, 845, 757, 771, 682$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, Glycerin/DMSO)  $m/z$  (%): 771.5 (2, MH<sup>+</sup>), 215.2 (100, Py-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>); **Elementaranalyse**: ber. C 71.68, H 4.97, N 10.90, gef. C 71.48; H 5.18, N 10.79.

8.2.6.4 cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pta-*D*-Pya-Gly-Gly) (35)

Durchführung analog AV5

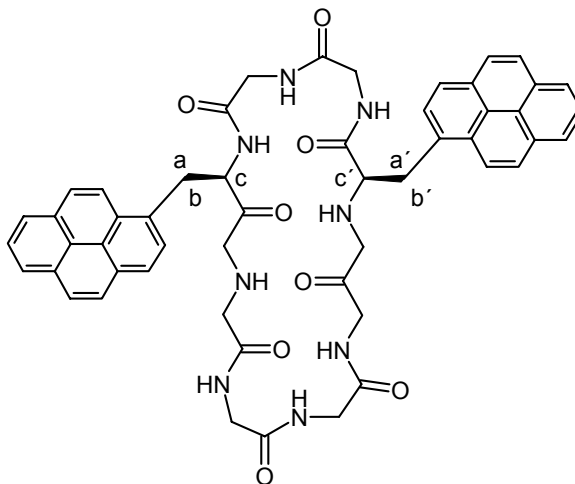
Ansatz:

a) **21d**: 35.0 mg (0.042 mmol)

b) **21e**: 43.0 mg (0.050 mmol)

**C<sub>43</sub>H<sub>39</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S** (781.89 g/mol)

**Ausbeute:** a) 23.6 mg (0.030 mmol, 72 %, 69 % de), b) 29.1 mg (0.037 mmol, 74 %, >95 % de) beiger Feststoff; **Schmp.:** 249-250 °C; **Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +15.1$  ( $c = 0.05$  in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$  in ppm):<sup>287</sup> 8.62-8.50 (m, 2H, NH), 8.46 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Pyrenyl-H), 8.36-7.98 (m, 11H, 8 Pyrenyl-H, 3 NH), 7.80-7.71 (m, 1H, NH), 7.31-6.82 (m, 7H, Phenothiazinyl-H), 4.81-4.72 (m, 1H, H<sup>c'</sup>), 4.52-4.35 (m, 1H, H<sup>c</sup>), 4.00-3.47 (m, 12H, 4 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>, H<sup>a'</sup>, H<sup>b'</sup>), 3.28 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu} = 3428, 2972, 2933, 2864, 1657, 1606, 1584, 1527, 1473, 1415, 1263, 1173, 900, 842, 751, 670$  cm<sup>-1</sup>; **MS** (CI, CH<sub>4</sub>)  $m/z$  (%): 781.5 (100, M<sup>+</sup>); **HRMS** (CI, CH<sub>4</sub>): ber. 771.8920, gef. 781.7097.

8.2.6.5 cyclo-(Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly-*D*-Pya-Gly-Gly) (36)<sup>283</sup>

Durchführung analog **AV5**

Ansatz:

a) **24d**: 60.0 mg (0.068 mmol)

b) **24e**: 44.0 mg (0.049 mmol)

**C<sub>50</sub>H<sub>44</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>** (884.95 g/mol)

**Ausbeute:** a) 34.9 mg (0.039 mmol, 58 %), b) 28.5 mg (0.032 mmol; 57 %) farbloser Feststoff; **Schmp.:** >300 °C; **Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +30.3$  (c = 0.01 in DMSO); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, δ in ppm):<sup>287</sup> 8.48-8.44 (m, 2H, NH), 8.31-8.02 (m, 22H, 18 Pyrenyl-H, 4 NH), 7.74-7.66 (m, 2H, NH), 4.90-4.76 (m, 2H, H<sup>c</sup>, H<sup>c'</sup>), 4.04-3.52 (m, 16H, 6 N-CH<sub>2</sub>-CO, H<sup>a</sup>, H<sup>b</sup>, H<sup>a'</sup>, H<sup>b'</sup>); **IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3337, 3045, 2987, 2934, 2858, 1663, 1547, 1530, 1462, 1422, 1407, 1331, 1269, 1241, 1109, 1029, 847, 677 cm<sup>-1</sup>; **MS** (FAB, Glycerin/DMSO) m/z (%): 885.4 (12, MH<sup>+</sup>), 215.1 (100, Py-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>); **HRMS** (FAB, Glycerin/DMSO): ber. 885.9561, gef. 885.3337.



## 9 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese und Charakterisierung optisch aktiver fluorophorfunktionalisierter linearer, cyclischer und  $\beta$ -hairpinanaloger Oligopeptide vorgestellt.

Als essentielle Synthesebausteine dienen nichtnatürliche Pyren- (Akzeptor) bzw. Phenothiazin- (Donor) derivatisierte *D*-Alaninderivate. Zur Darstellung dieser monomeren Einheiten werden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Im ersten Verfahren kann die jeweilige Chromophorstruktur als Halogenid in einer *Heck*-Kupplung mit der dehydratisierten Form eines geschützten Serins verknüpft werden. Die Pyren-funktionalisierte  $\alpha$ -Aminosäure **4** wird anschließend durch asymmetrische Hydrierung erhalten. Trotz des Einsatzes einer Vielzahl optisch aktiver Diphosphin-Liganden wird bei der enantioselektiven Rh-katalysierten Hydrierung nur ein Enantiomerenüberschuss von ca. 70 % erzielt. Beim zweiten Syntheseweg handelt es sich um eine Variante der *Erlenmeyer'schen* Azlactonsynthese, die nach asymmetrischer Hydrierung der entsprechenden Dehydroaminosäuren **2** und **3** die gewünschten chromophorsubstituierten  $\alpha$ -Aminosäuren **5** und **6** in guten Ausbeuten bei ee-Werten von über 98 % liefert. Die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse erfolgt mittels  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopischer Methoden unter Einsatz chiraler shift-Reagenzien. Durch röntgenstrukturanalytische Untersuchung der Spezies **5** kann die absolute Konfiguration der erhaltenen *D*-Alaninderivate verifiziert werden. Abspaltung der angebundenen Schutzgruppen und anschließendes selektives Schützen mit Boc-, Fmoc- oder Benzylestereinheiten führt zu den artifiziellen Aminosäuren **8**, **9**, **10**, **12** und **13**, die als monomere Bausteine für nachfolgende Peptidsynthesen geeignet sind.

Die Peptiddarstellung in Lösung startet mit der Kombination von einseitig geschützten nichtnatürlichen Aminosäuren und entsprechend invers geschützten Glycin-Dimeren bzw. -Trimeren. Dazu werden verschiedene Kupplungsstrategien aus dem Bereich der Azid-, Aktivester- und Carbodiimid-Additiv-Verfahren getestet. Die EDC/HOAt-Methode ergibt dabei im Allgemeinen die höchste Produktausbeute bei kürzester Reaktionszeit und geringstem Racemisierungsrisiko. Auf diesem Wege sind folglich monofunktionalisierte lineare Tri- und Tetrapeptide (**14a**, **15a**, **16a** und **17a**) zugänglich. Diese Verbindungen können nach selektivem Entschützen zu langkettigeren linearen Peptiden (**18a**, **19a**, **20a**, **21a**, **22a** und **24a**) verknüpft werden.

Sowohl die  $\beta$ -Hairpinpeptid-Vorstufen **25a**, **26a** und **27a** als auch die  $\beta$ -Hairpinpeptide **29**, **30** und **31**, sind auf analoge Weise darstellbar. Exemplarisch wird die Pyren- und Phenothiazin-funktionalisierte Verbindung **31**  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch untersucht, wobei neben temperaturabhängigen Messungen zweidimensionale Methoden wie (H, H)-COSY- und ROESY-Experimente durchgeführt werden. Die Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen bzw. einer diskreten Vorzugskonformation kann jedoch nicht beobachtet werden.

Um einen möglichst effizienten Zugang zu den gewünschten Peptiden zu erhalten, wird neben der Darstellung in Lösung eine geeignete Festphasensynthese nach *Merrifield* entwickelt. Dazu werden die offenkettigen Peptide **20e**, **21e**, **23** und **28** an einem Tritylchlorid-Polystyrol- (TCP) Harz synthetisiert. Dies gelingt nach der Fmoc-Strategie unter Einsatz von TBTU/HOBt/DIEA bzw. HATU/HOAt/Collidin als Kupplungskomponenten. Verglichen mit Darstellungsmethoden in Lösung erweist sich die Peptidsynthese am polymeren Träger als weniger zeitaufwendig und gewährleistet höhere Produktausbeuten, weniger Nebenprodukte sowie einen besseren Racemisierungsschutz.

Zur Peptidcyclisierung vollständig geschützter linearer Peptidsysteme werden DPPA-, TBTU/HOBt- und HATU/HOAt-Verfahren erprobt. Die zufriedenstellendste Methode bietet die Verwendung von HATU und HOAt. Auf diese Weise ist die Synthese der cyclischen Hexapeptide **32**, **33**, **34** und **35** sowie des cyclischen Octapeptids **36** möglich. Die Cyclisierung des linearen Pentapeptids **19d**, das endständig zwei benachbarte Pyrenylalanin-Reste beinhaltet, schlägt jedoch fehl, was hauptsächlich auf sterische Aspekte zurückzuführen ist. Spezielle Vorzugskonformationen der gebildeten Cyclopeptide erscheinen aufgrund  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopischer Untersuchungen an Verbindung **34** als nicht wahrscheinlich.

Die elektrochemischen Eigenschaften der dargestellten Peptide werden durch Cyclovoltammetrie, Squarewavevoltammetrie und UV/Vis/NIR-Spektroelektrochemie charakterisiert. In allen Untersuchungen erweisen sich die verschiedenen Peptidbackbonestrukturen als elektrochemisch inert, weshalb die beobachtete Redoxaktivität ausschließlich von den zugrundeliegenden Chromophoreinheiten geprägt ist. Es können lediglich geringe induktive bzw. mesomere Effekte auf die Farbstoffsubstituenten im Vergleich zu deren unsubstituierten Analoga beobachtet werden. Elektronische Kopplungen der chromophoren Teilstrukturen in zweifach funktionalisierten Verbindungen sind nicht detektierbar.

Die Analyse der UV/Vis-Absorptionsspektren zeigt, dass das jeweilige Peptidrückgrat der untersuchten Verbindungen keinen Einfluss auf das Absorptionsverhalten der angebundenen Pyren- bzw. Phenothiazinsubstituenten hat. Alle UV/Vis-Spektren setzen sich additiv aus den Spektren der jeweiligen Substrukturen zusammen, weshalb Kopplungen der Chromophore im Grundzustand ausgeschlossen werden können.

Aufgenommene CD-Spektren weisen intensitätsschwache Cotton-Effekte auf, die im Spektralbereich der Chromophorabsorptionen lokalisiert sind, was eine Übertragung der Peptidchiralität auf die kovalent gebundenen chromogenen Untereinheiten belegt. Wechselwirkungen zwischen den Substrukturen oder Hinweise auf eine konformativ fixierte Ausrichtung der Chromophore werden nicht gefunden.

Das Fluoreszenzverhalten der synthetisierten Peptidsysteme ist durch die Emission der integrierten Pyrensubstituenten geprägt. Monofunktionalisierte Spezies zeigen typische Pyren-Monomerbanden. Im Gegensatz dazu weisen die zweifach Pyren-derivatisierten linearen Peptide **19a**, **20a**, **22a** und **24a** neben der LE-Fluoreszenz intramolekulare Excimeremissionen auf. Die Excimerintensität ist bei benachbarten Pyreneinheiten (vgl. Verbindungen **19a** und **20a**) deutlich geringer als im Falle eines Diglycinspacers zwischen den chromophoren Gruppen (vgl. Verbindungen **22a** und **24a**). Unter Voraussetzung einer  $\alpha$ -helicalen Peptidkonformation kann dieses Verhalten durch semiempirische Molekülgeometrieberechnungen auf PM3-Niveau gestützt und auf die räumliche Ausrichtung der Pyreneinheiten in den verschiedenen Verbindungen zurückgeführt werden. Aufgrund wachsender  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den Pyrenchromophoren steigt die Intensität der Excimerbanden mit zunehmender Solvenspolarität.

Das  $\beta$ -Hairpinpeptid **30** beinhaltet ebenfalls zwei Pyrensubstituenten, die an beiden Enden der Peptidsequenz lokalisiert sind. Intramolekulare Excimerbanden die im Fluoreszenzspektrum dieser Spezies detektiert werden, belegen im Unterschied zu  $^1\text{H}$ -NMR-Experimenten zumindest die zeitweise Generierung eines loop-Strukturmotivs im Peptidbackbone, was die Interaktion der Farbstoffteilstrukturen ermöglicht. Entsprechende quantenchemische Berechnungen untermauern dieses Ergebnis.

In den Fluoreszenzspektren der cyclischen zweifach Pyren-funktionalisierten Hexapeptide **33** und **34** treten, im Unterschied zum Cyclooctapeptid **36**, ebenfalls intramolekulare Excimeremissionen auf. Im Falle der Verbindung **33** ist dies bei einer

Peptidkonformation mit zwei  $\beta$ -turn-ähnlichen loop-Sequenzen möglich, wohingegen für Verbindung **34** eine Zufallsknäuel-Sekundärstruktur wahrscheinlich erscheint.

Anhand von linearen (vgl. Verbindung **21a**),  $\beta$ -Hairpin-konformativen (vgl. Verbindung **31**) und cyclischen (vgl. Verbindung **35**) Donor-Akzeptor-substituierten Peptidsystemen können photoinduzierte Elektronentransfer- (PET) Prozesse beobachtet werden. Am deutlichsten wird dies anhand des Fluoreszenzspektrums der Spezies **31**, das neben Pyren-Monomerbanden eine positiv solvatochrome Exciplexemission aufweist, deren Intensität mit steigender Lösungsmittelpolarität abnimmt. Dieses PET-typische Emissionsverhalten weist, in geringerem Maße, auch Verbindung **21a** auf. Vergleichbare solvensabhängige Messungen sind für das Cyclopeptid **35** aufgrund ungenügender Löslichkeit nicht möglich. Die relativen Quantenausbeuten bezüglich analogen, ausschließlich Akzeptor-substituierten Peptiden deuten jedoch auf PET-Prozesse in allen drei Verbindungen hin.

Elektrochemilumineszenz- (ECL) Messungen zeigen, dass die dargestellten chromophorderivatisierten Peptide zur Emission elektrochemisch generierter Lumineszenz befähigt sind. Die Elektrochemilumineszenz der jeweiligen Messlösungen unterscheidet sich deutlich von deren Photolumineszenzspektren, da neben Pyren-LE- und Excimerbanden in den ECL-Spektren auch Exciplexemissionen auftreten. Die Studien an gemischten ECL-Systemen (**14a+6**, **15a+6**, **16a+5**, **18a+6**, **29+6** und **32+6**) belegen, dass hauptsächlich intermolekulare Wechselwirkungen zu den langwellig verschobenen Excimer- und Exciplexbanden führen. Das ECL-Verhalten von rein Pyren-funktionalisierten Verbindungen ist unabhängig von der Chromophoranzahl. Ein Einfluss der verschiedenen Peptidgrundstrukturen auf die ECL-Charakteristik der untersuchten Peptide kann zudem nicht festgestellt werden.

Die einheitlichen ECL-Systeme **21a** und **35** beinhalten benachbarte Pyren- und Phenothiazin-Teilstrukturen und weisen eine wenig intensive elektrochemisch erzeugte Lumineszenz auf, die von der Exciplexemission geprägt ist. Niedrige Potentialschaltfrequenzen haben eine sinkende ECL-Aktivität zur Folge, weshalb eine Beeinflussung der Radikationenstabilität durch den jeweils benachbarten Subchromophor als wahrscheinlich erscheint. Im ebenso Donor-Akzeptor-funktionalisierten Hairpinpeptid **31** sind die chromogenen Teilstrukturen durch einen Hexapeptid-Spacer getrennt, was eine deutlich intensivere ECL-Aktivität bedingt, die an gemischte ECL-Systeme erinnert.

Im Gegensatz zu den Excimer- und Exciplexemissionen kann der emittierende Pyren-LE-Zustand (Singulett-Zustand) in keinem der untersuchten Fälle durch die eingebrachte elektrochemische Energie direkt populiert werden. Daher liegen den beobachteten Pyren-Monomeremissionen vermutlich Triplett-Triplett-Annihilierungsmechanismen zugrunde.

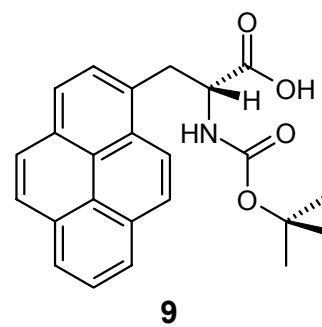
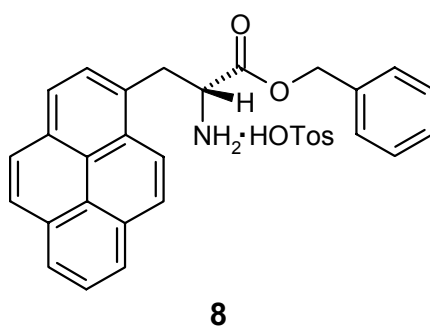
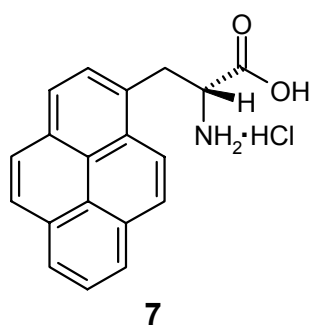
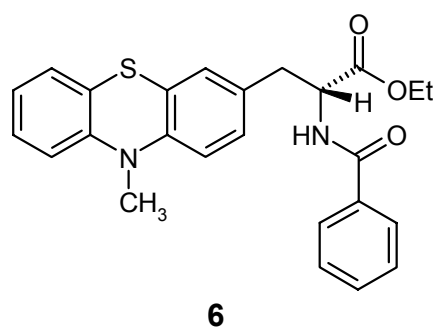
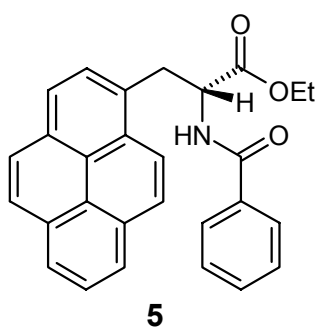
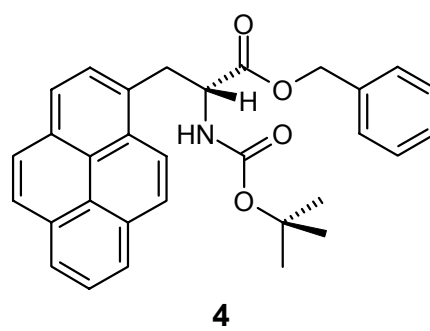
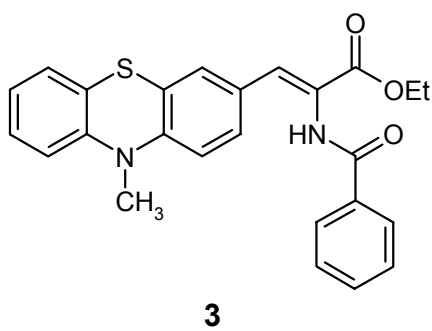
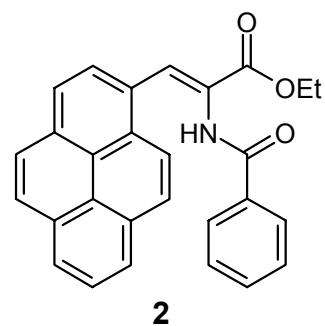
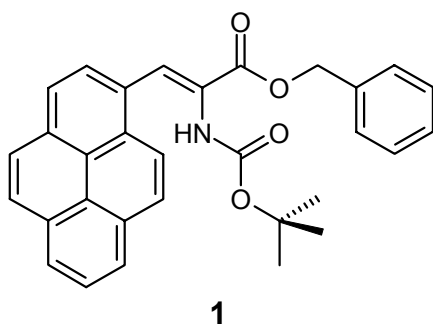
Die Pyren-funktionalisierten cyclischen Hexapeptide **32**, **33** und **34** können als neuartige optische Sensoren zur Erdalkalimetallkationen-Erkennung eingesetzt werden. Die jeweilige Komplexbildung bzw. -stabilität hängt dabei sowohl vom konformativen Anspruch der Cyclopeptide als auch vom Kationenradius der Erdalkalimetalle ab. So formen die Spezies **32** und **34** 2:1-Sandwichkomplexe mit Ca(II)- und Ba(II)-Ionen, während Verbindung **33** nur mit den größeren Ba(II)-Kationen derartige Komplexe bildet. Die relativ kleinen Magnesium(II)-Kationen werden von keinem der Cyclopeptide auf diese Weise koordiniert.

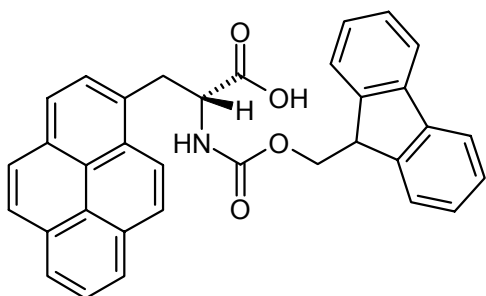
Die Detektion der Assoziationen ist mittels Fluoreszenz-, UV/Vis-Absorptions- und CD-Spektroskopie möglich. Bei Fluoreszenztitrationen führt die Zugabe von entsprechenden Erdalkalimetallperchloraten zu Messlösungen der cyclischen Peptide zur Erhöhung des Intensitätsverhältnisses von Excimer- zu LE-Emission ( $I_E/I_M$ ).

In analogen UV/Vis-Absorptionsmessungen werden die einzelnen Übergänge breiter, bathochrom verschoben und verlieren an Intensität. Dies beweist die Ausbildung von Grundzustandsdimeren zwischen den Pyren-Einheiten der am Komplex beteiligten Cyclopeptide. Aus den UV/Vis-Absorptionsdaten erstellte Job-Plots belegen die 2:1-Stöchiometrie der Cyclopeptid-Erdalkalimetall-Komplexe. Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Pyren-Teilstrukturen in den gebildeten Sandwichkomplexen sowohl im angeregten als auch im Grundzustand nahezu parallel übereinander angeordnet sein müssen, was zur Generierung statischer Excimere führt. Dies wird anhand von semiempirischen Molekülgeometrieberechnungen auf PM3-Niveau untermauert.

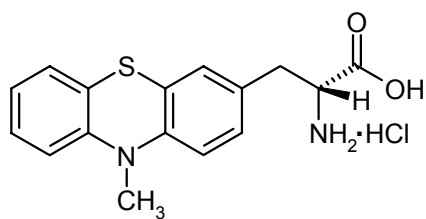
Die freien cyclischen Hexapeptide zeigen im gewählten Lösungsmittelgemisch HFIP/MeOH (4/1) geringe CD-Aktivität. Im Gegensatz zur monofunktionalisierten Spezies **32**, die ihre CD-Aktivität durch Erdalkalimetallkomplexierung verliert, weisen die Verbindungen **33** und **34** in komplexierter Form intensiv negative Cotton-Effekte im kurzwelligen Spektralbereich auf.

## 10 Formeltafel

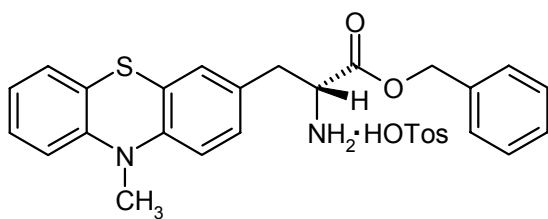




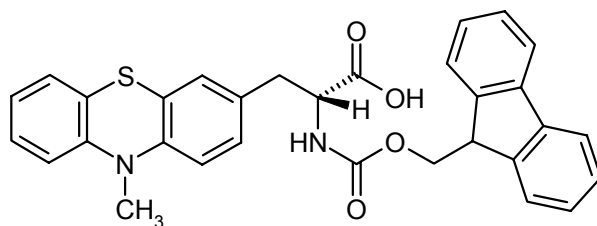
10



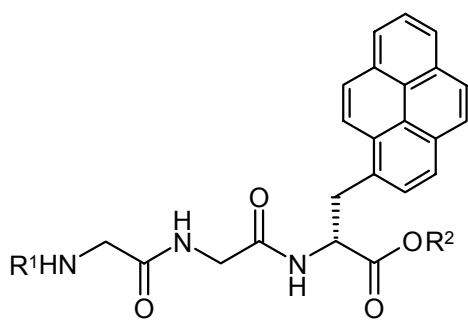
11



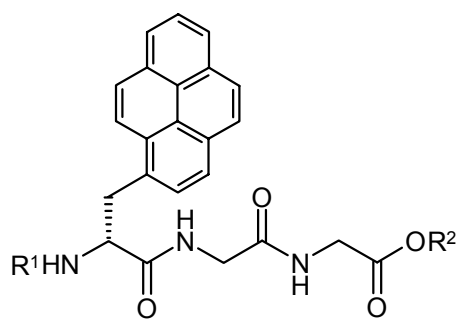
12



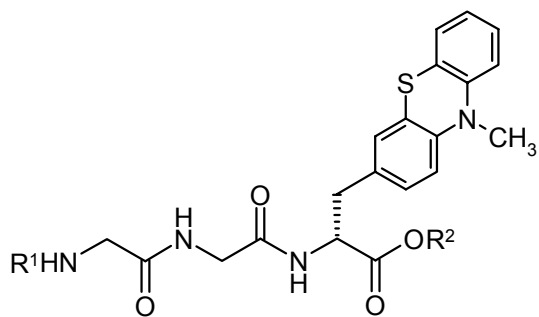
13



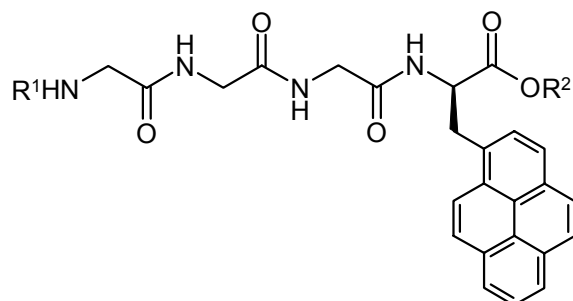
14 a, b, c



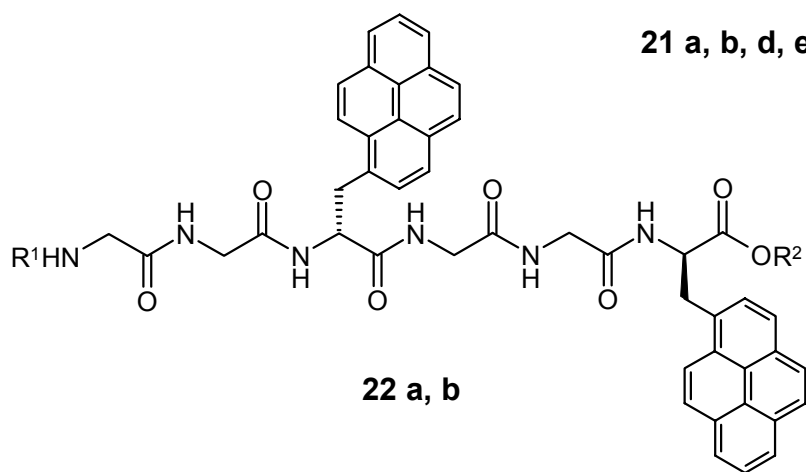
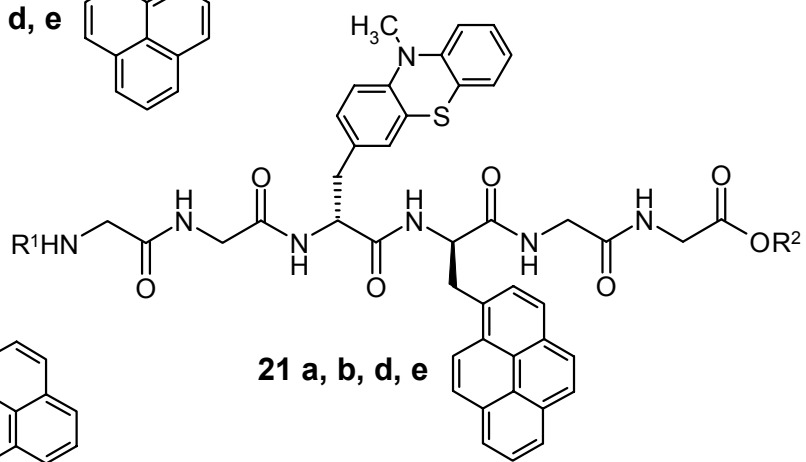
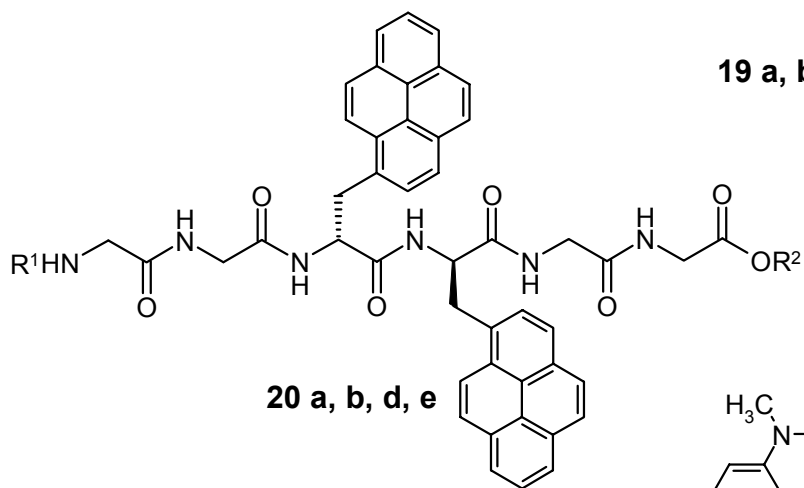
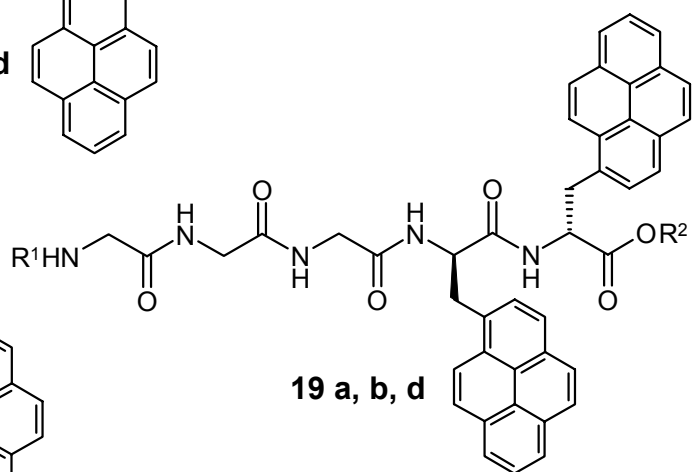
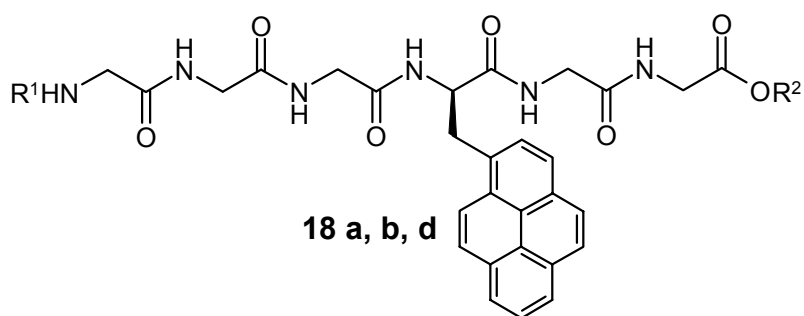
15 a, b, c



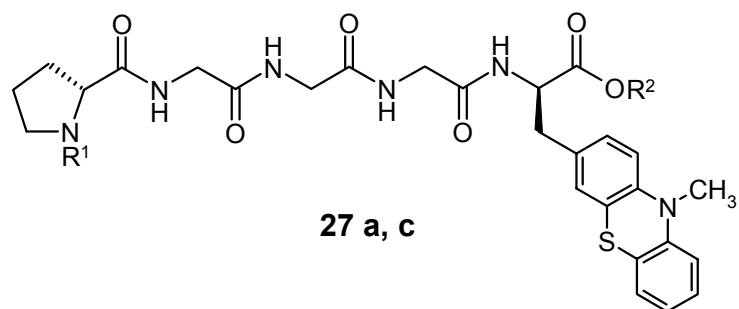
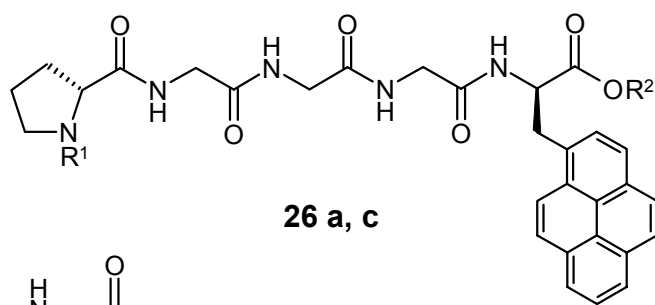
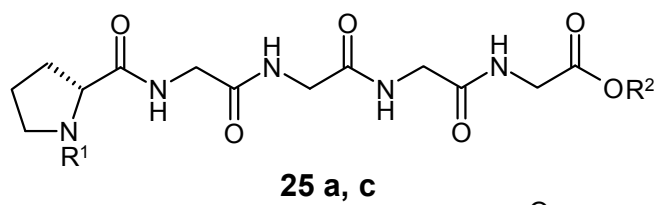
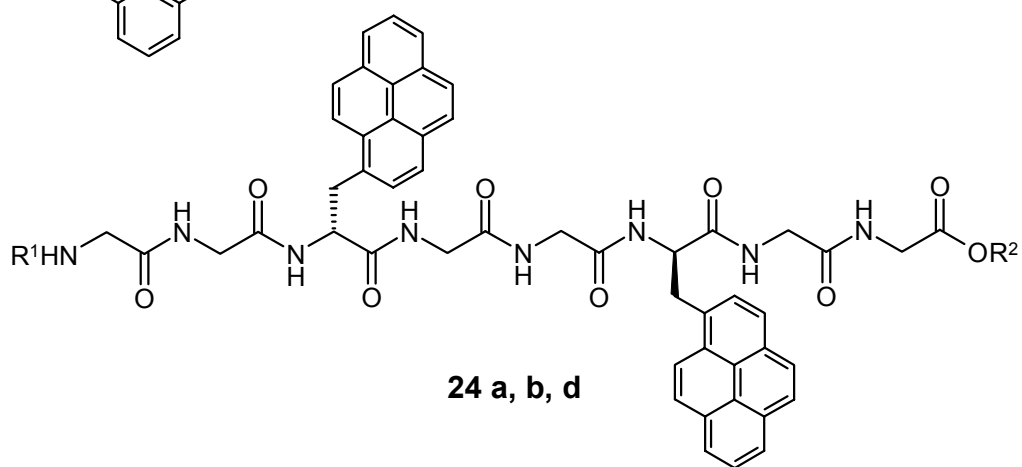
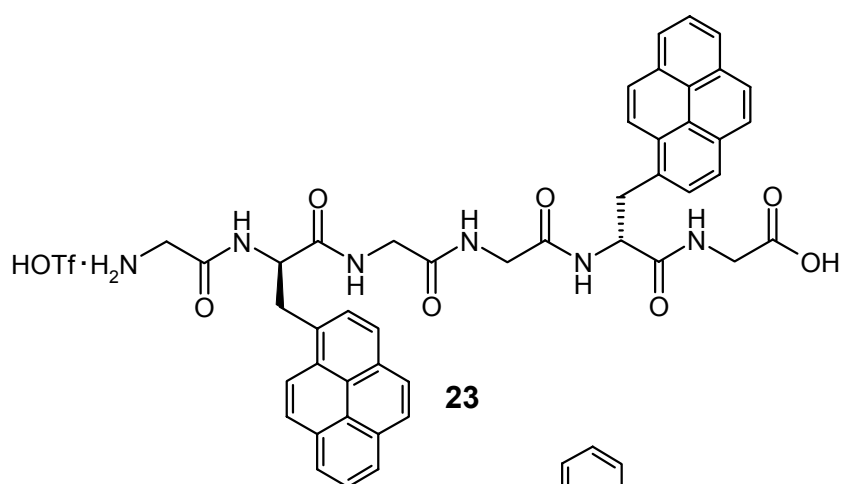
16 a, b, c

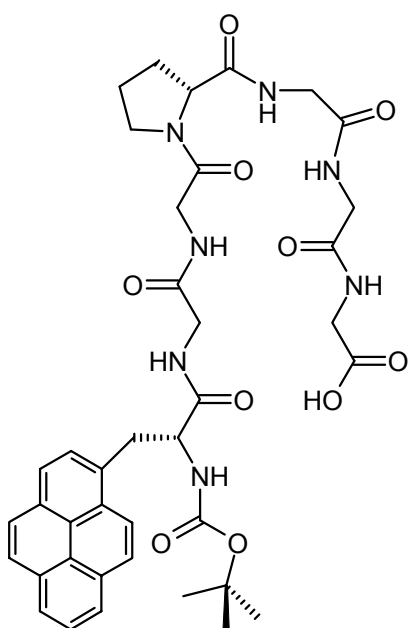
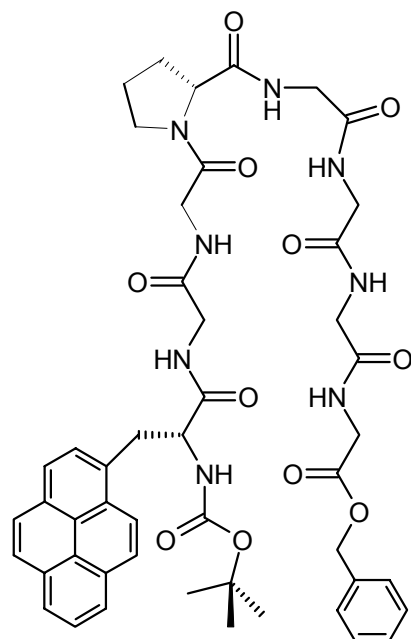
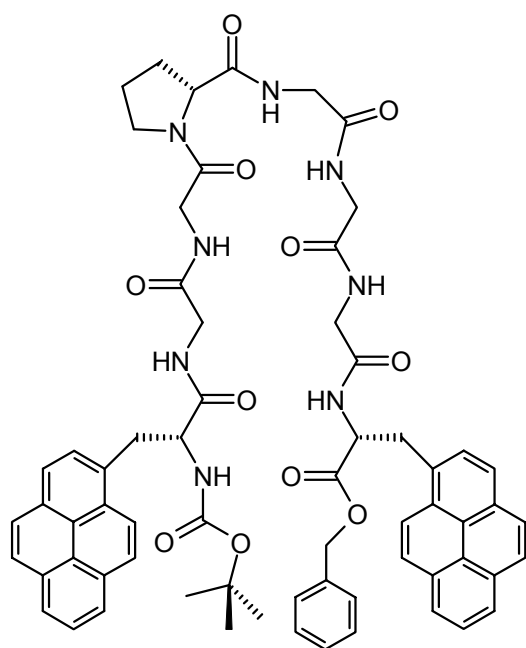
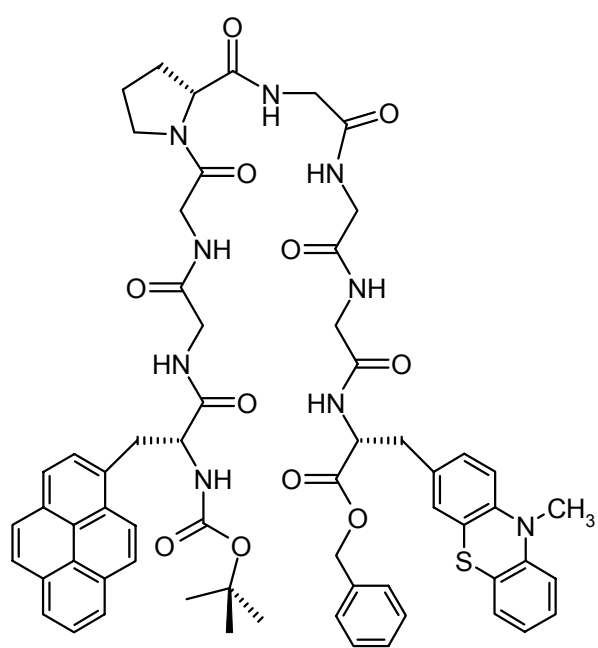


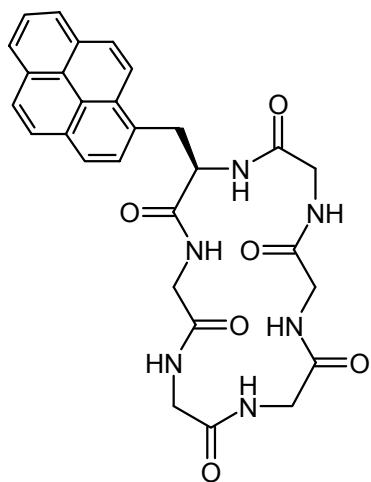
17 a, b



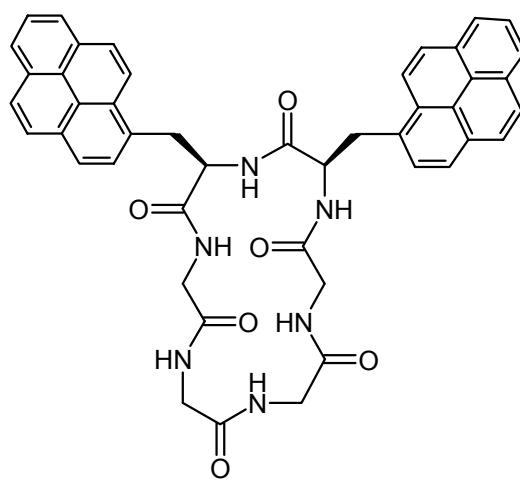




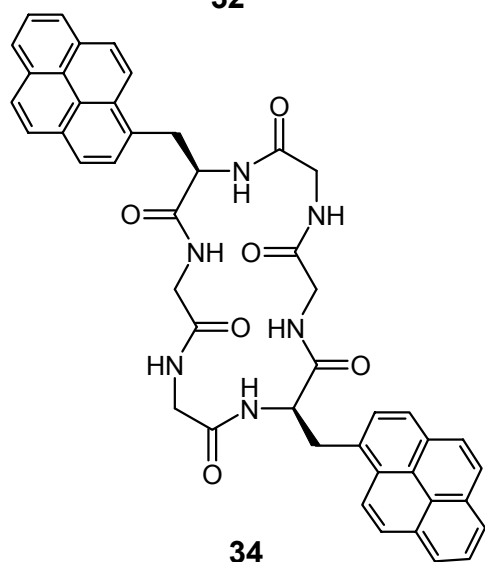
**28****29****30****31**



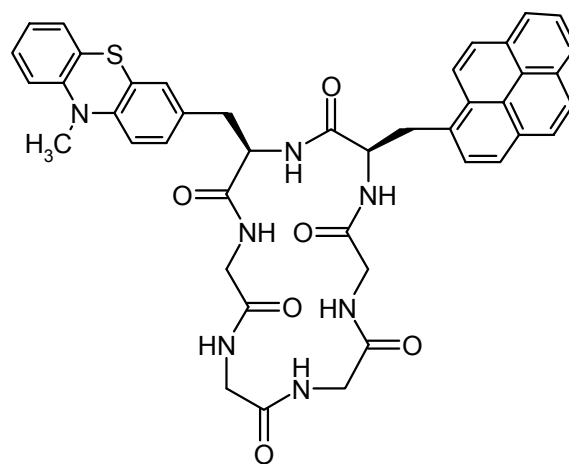
32



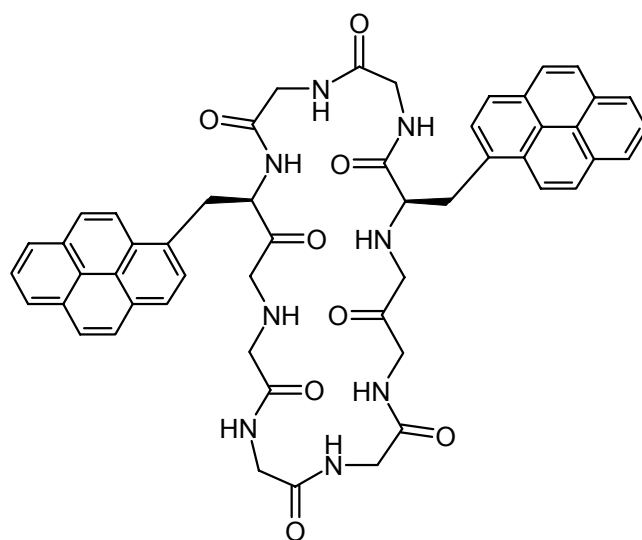
33



34



35



36

	$R^1$	$R^2$
<b>a</b>	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{C}-\text{O}-\text{tBu} \end{array}$	$\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$
<b>b</b>	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{C}-\text{O}-\text{tBu} \end{array}$	H
<b>c</b>	$\text{H} \cdot \text{HCl}$	$\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$
<b>d</b>	$\text{H} \cdot \text{HCl}$	H
<b>e</b>	$\text{H} \cdot \text{HOTf}$	H

## 11 Publikationen und Präsentationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder werden zur Veröffentlichung eingereicht. Des weiteren wurden verschiedene Ergebnisse im Rahmen mehrerer Vorträge und Posterpräsentationen vorgestellt.

### Publikationen:

- Optically Active Cyclic Hexapeptides with Covalently Attached Pyrene Probes: Selective Alkaline Earth Metal Ion Recognition Using Excimer Emission  
J. Strauss, J. Daub, *Org. Lett.* **2002**, 4, 683-686.
- Mimicking dye-based functions of natural blue-light photoreceptors by studying photoinduced energy and electron transfer in a pyrene–isoalloxazine(flavin)–phenothiazine triad  
S. Zhen, J. Strauss, J. Daub, *Chem. Commun.* **2002**, 460-462.
- Fluorescent Dye Modified Peptides as Electrochemiluminescent Materials  
J. Strauss, J. Daub, *Adv. Mater.* **2002**, in Vorbereitung.

### Posterpräsentationen:

- Chromophorfunkionalisierte Peptide und Cyclopeptide: Sondenmoleküle mit optoelektrochemischem Eigenschaftsprofil  
Liebig-Vereinigung für Organische Chemie Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie: *Umwelt- und ressourcenschonende Synthesen und Prozesse*, Oldenburg, **2000**.
- Photoactive cyclic and hairpin peptides as optoelectronic probes and molecular activators
  1. Summermeeting of the Graduate College „Sensory Photoreceptors” (GRK 640/1), Nove Hrad, Tschechien, **2001**.

- Photoactive cyclic and hairpin peptides as optoelectronic probes and molecular activators  
10<sup>th</sup> International Conference on *Unconventional Photoactive Systems*, Les Diablerets, Schweiz, **2001**.

**Vorträge:**

- Synthese optisch aktiver artifizierter Aminosäuren, Peptide und Cyclopeptide mit optoelektronischem Eigenschaftsprofil
  1. Workshop „*Life Science*“ der naturwissenschaftlichen Fakultät IV - Chemie und Pharmazie - der Universität Regensburg und der Bayer AG, Regensburg, **2000**.
- Molekulare Sonden: Cyclo- und Hairpin-Peptide
  2. Workshop „*Life Science*“ der naturwissenschaftlichen Fakultät IV - Chemie und Pharmazie - der Universität Regensburg und der Bayer AG, Regensburg, **2001**.
- Photoactive cyclic and hairpin peptides as optoelectronic probes and molecular activators
  1. Summermeeting of the Graduate College „*Sensory Photoreceptors*“ (GRK 640/1), Nove Hrad, Tschechien, **2001**.



## Kristallstrukturdaten für die Pyrenfunktionalisierte Aminosäure 5

Die Vermessung der Kristalle erfolgte auf einem Enraf-Nonius CAD-4-Diffraktometer (Cu-K $\alpha$ -Strahlung und Graphit-Monochromator). Mit der Software SIR-97 und SHELXL97 können die Strukturen direkt gelöst und verfeinert werden.<sup>288</sup>

Summenformel	C <sub>28</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>
Molmasse [g·mol <sup>-1</sup> ]	421.47
Farbe und Habitus der Kristalle	gelbe Nadeln
Größe [mm x mm x mm]	0.32 x 0.04 x 0.03
Kristallsystem, Raumgruppe	orthorhombisch, P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Gitterkonstanten a, b, c [Å]	5.1732(3), 12.8354(4), 32.9207(11)
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ [°]	90, 90, 90
Z, V [Å <sup>3</sup> ], d <sub>ber.</sub> [g·cm <sup>-3</sup> ]	4, 2185.94(16), 1.281
Absorptionskoeffizient $\mu$ [mm <sup>-1</sup> ]	0.66
F (000)	888
Messtemperatur [K]	297
Messbereich $\Theta$ [°]	3.70-60.95
Zahl der gemessenen Reflexe	8062
Restelektronendichte [e·Å <sup>-3</sup> ]	min. -0.266, max. 0.241
R <sub>1</sub> [I>2 $\sigma$ <sub>I</sub> ], wR <sub>2</sub> [I>2 $\sigma$ <sub>I</sub> ]	0.0693, 0.1235
Flack-Parameter	0.2(7)

<sup>288</sup> a) A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, *J. Appl. Cryst.* **1993**, 26, 343;

b) G.M. Sheldrick, SHELXL97, Universität Göttingen, **1997**.





## **Danksagung**

---

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Dr. T. Burgemeister, Herrn F. Kastner, Frau N. Kastner-Pustet, Frau A. Schramm und Frau G. Stühler für die Aufnahme der NMR-Spektren; Herrn Dr. T. Burgemeister insbesondere für wertvolle Diskussionen und Tipps bezüglich verschiedenster NMR-Probleme und F. Kastner für temperaturabhängige und 2dim. Messungen;

Frau B. Gruber, Herrn H. Schüller und Herrn G. Wanderinger für die Durchführung der Elementaranalysen;

Herrn Dr. K. Mayer, Herrn J. Kiermeier und Herrn W. Söllner für die Aufnahme der Massenspektren und HPLC-MS-Kopplungen;

Herrn Dr. M. Zabel und Herrn A. Dietrich für die Anfertigung der Röntgenstrukturanalysen;

Herrn Dr. R. Vasold für die Durchführung der HPLC-Messungen sowie viele nette Gespräche über die wichtigen Dinge des Lebens (FC Bayern...);

Herrn Prof. Dr. A. Geyer und Frau D. Fischer für die Unterstützung bei der Auswertung von 2dim. NMR-Spektren;

Herrn Nico Schmiedeberg (AK Prof. Kessler) für die Einführung in Festphasen-Synthesemethoden;

Herrn Prof. Dr. A. Mannschreck für die Möglichkeit zur Nutzung des Polarimeters;

Herrn Prof. Dr. O. S. Wolfbeis für die Möglichkeit zur Verwendung des CD-Spektrometers;

Herrn Rolf Hörger für die ausgezeichnete Arbeit im Rahmen der Zulassungsarbeit.

## **Danksagung**

---

Vor allem möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises bedanken, die stets für eine angenehme und fördernde Arbeitsatmosphäre sorgten und bei allen fachlichen und außerfachlichen Belangen hilfreich zur Seite standen:

Michael Büschel, unserer langjährigen Nummer 1., für die gute Kameradschaft, seine große Hilfsbereitschaft (vor allem auch hinsichtlich Computerproblemen), viele fachliche und außerfachliche Diskussionen und seine Unterstützung im Kampf, die strengen Sitten am AK an sämtliche neue Mitarbeiter weiterzugeben;

Christian Trieflinger, nimmermüder BODIPYler, für seine freundliche Art, einem entnervten kurz vor der Promotion stehenden Kollegen hilfreich unter die Arme zu greifen (Korrekturlesen ...), fachlich versierte Gespräche über die Spiele des FC Bayern, feucht-fröhliche Party-Besuche und eine ungeheuerliche Unterstellung;

Roman Prochazka, meinem osttschechischen Landsmann für ein tolles Wochenende in Nove Hradý einschließlich chinesischem Kinofilm mit tschechischem Untertitel, die angenehme Laboratmosphäre und sein Talent weibliche Praktikantinnen anzulocken;

Michaela Lutz, guter Geist des Arbeitskreises, für die Erledigung aller organisatorischen und lästigen (absolute Lösungsmittel, Chemikalienbestellungen ...) Aufgaben sowie manchen Plausch über Sport, Rezepte und, und, und;

Oleg Kushnir für seine Hilfe bei Computerproblemen und seine unnachahmliche Weise englische Sätze zu beginnen („Ok, so...“);

Gilbert Nöll, nicht linearer Karateka und Marathonläufer, für viele nützliche Tipps in verschiedensten Lebenslagen und seinen Seminardauer-Rekord für die Ewigkeit;

Frau Christine Hübner für ihre angenehm lockere Art und das Bestreben dem AK Beine (für den Marathon) zu machen;

Eshwaran Arun Kumar für seine, durch lautstarke Gesänge ausgedrückte, indische Lebensfreude;

Shen Zhen für original chinesischen grünen Tee und ihre sympathische Art;

## Danksagung

---

Rolf Hörger für die schöne Zeit während seiner Zulassungsarbeit und seinen unermüdlichen Kampf mit der Peptidchemie („Sie machen das schon...“)

Markus Komma, meinem Lehrmeister in Sachen Peptidchemie und ehemaligem Laborchef, für die schöne gemeinsame Laborzeit und seine Informationen aus der wirklichen (Arbeits-)Welt;

Gerhard Beer unserem Wackeren Exmitarbeiter für die ausgezeichnete Vorbereitung auf meinen USA-Trip und die angenehme gemeinsame AK-Zeit;

Thomas Mrozek, meinem ehemaligen Laborkollegen für die schöne gemeinsame Zeit, sein Bestreben mir die Photochromie schmackhaft zu machen, abendliche Anrufe aus dem fernen Texas und das Fachsimpeln über richtige Trainingsmethoden;

Franz Redl für seine ruhige freundliche Art und die prompte Erledigung von Literaturanfragen.

Den ehemaligen Arbeitskreiskollegen Reimund Engl, Wolfgang Gaschler, Oliver Köthe, Matthias Kollmannsberger, Christian Stadler, Christoph Lambert, Ernst Richter, Jürgen Schelter, "Ajay" (Dr. A. Ajayaghosh) und Markus Helldobler danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Ebenso möchte ich mich bei einigen langjährigen Studienfreunden bedanken:

Hans-Christoph Gallmeier (Helly, Hellriegel, Hensen ...) für die gemeinsame Bewältigung aller Festphasen-Probleme, unzählige vergnügliche Mensa- und Cafetengänge, unglaublich produktives Korrekturlesen, aktuelle Berichte über US-Sportereignisse und seine freundschaftlichen Aufmunterungen in chemischen Tiefphasen;

Thomas Zwack (Herr Zwack, Zwacki) für unser genau getimtes Mittagessen-Ritual (11:15 Uhr + Frau Strauß-Bonus), die Versorgung mit sämtlicher chemischer Grundausrüstung (absolute Lösungsmittel, Rh-Kat., Liganden ...), intensives Korrekturlesen, den Nachschub von multimedialem Comic-, Film-, Jokematerial und die gemeinsam durchlebte Promotionsendphase;

## Danksagung

---

Jürgen Klankermayer (Tschürgen, Motzki?!), dem dritten im Mensa-Bunde, für jederzeit bereitwillig zur Verfügung gestelltes immenses chemisches Fachwissen, unermüdliches Korrekturlesen und seine trockene Art jede Form von Begeisterung im Keim zu ersticken;

Matthias Weber, meiner Notruf-Stelle (4085), für seine spontane Hilfe bei Autopannen, Computerproblemen und chemischen Fragen, viele Freizeitaktivitäten und seine langjährige Freundschaft auch über Arbeitskreisgrenzen hinaus;

Torsten Mayr, dem Analytiker und Metallkation-Leidensgenossen, für viele hilfreiche Tipps bei analytisch chemischen Problemen, kritisches Korrekturlesen und schöne abendliche Kneipen-Besuche;

Christoph Möhle für unzählige gemeinsam unternommene sportliche Aktivitäten und kritisches Korrekturlesen meines „biologischen“ Manuskriptteils;

Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei:

Hermann, für gründliches Korrekturlesen;

meinen Schwestern Fini und Susi, die mich wo es ging unterstützten und vor allem meine letzte Rettung in Geburtstagsgeschenk-Fragen waren;

meinem Bruder Florian der mit stoischer Ruhe meine Freizeitaktivitäts-Attacken ertrug und jederzeit für alle möglichen Sportspiele bereitstand;

meiner lieben Chrissi, die mir stets die schönen Seiten des Lebens offenbart;

meinen Eltern die mich während der langen Zeit des Studiums außergewöhnlich unterstützt und mir immer den nötigen Rückhalt gegeben haben.