

**Dendrimere Bisphosphonatrezeptoren zur  
molekularen Erkennung von basischen  
Proteinoberflächen**

**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften**

**dem**

**Fachbereich Chemie  
Der Philipps-Universität Marburg**

**Vorgelegt von**

**Markus Arendt  
aus Hilden**

**Marburg/Lahn 2005**

Vom Fachbereich Chemie

Der Philipps-Universität-Marburg als Dissertation am 2. März 2005 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Schrader

Zweitgutachter: Prof. Dr. Armin Geyer

Tag der Disputation am 16. März 2005

### ***Danksagung:***

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader in der Zeit von September 2000 bis Januar 2005 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader danke ich für die interessante Aufgabenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft und sein Vertrauen in mich auch in schweren Zeiten.

Für die Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Armin Geyer, Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen und Herrn Prof. Dr. Andreas Greiner.

Für die Unterstützung bei der Aufreinigung der Proteine danke ich Nadine Schracke und dem Arbeitskreis Marahiel. Für die Aufnahme zahlreicher Massenspektren danke ich Dr. Uwe Linne und der Massenabteilung des Fachbereichs Chemie unter der Leitung von Dr. Steinbach.

Der NMR-Abteilung und ganz besonders Frau Dr. Xiulan Xie danke ich für die Aufnahme der PFG-Messungen und aller weiteren NMR-Spektren.

Weiterhin danke ich meinen Vertiefern Antje Teichert, Martin Gräser, Steffen Loh und Valerie Honndorf.

Ganz besonders danke ich natürlich meinem Arbeitskreis für die angenehme Arbeitsatmosphäre, darunter Matthias Junkers, Michael Maue und Petra Rzepecki für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Teile dieser Arbeit sind publiziert, eingereicht oder auf Kongressen präsentiert worden:

- [1] S. Rensing, M. Arendt, A. Springer, T. Grawe, T. Schrader, *Optimization of a synthetic arginine receptor. Systematic tuning of noncovalent interactions, Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 5814-5821.
- [2] R. Zadnani, M. Arendt, T. Schrader, *Multipoint Recognition of Basic Proteins at a Membrane Model, J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7752 - 7753.
- [3] M. Arendt, J. Thomann, X. Xie, T. Schrader, *Dendrimeric Multiplication of a Single Arginine Recognition Motif into an Efficient Protein Surface Binder, Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, in Revision
- [4] M. Arendt, T. Schrader, *Erkennung argininreicher Peptide mit oligomeren Bisphosphonat-Pinzetten*, Poster GDCH Jahrestagung, Würzburg, **2001**
- [5] S. Rensing, M. Arendt, T. Grawe, T. Schrader, *Optimization of a synthetic arginine receptor*, Poster ORCHEM, Bad Nauheim, **2002**

---

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Einleitung</b>	1
<b>1.1 Funktionen basischer Proteine</b>	1
<b>1.2 Das Prinzip der Multivalenz</b>	2
<b>1.3 Erkennung von Proteinoberflächen</b>	3
<b>1.4 Protein-tagging – Funktion und Aufreinigung</b>	4
<b>2. Aufgabenstellung</b>	8
<b>3. Durchführung und Ergebnisse</b>	10
<b>3.1 Darstellung der Monomerbausteine</b>	10
<b>3.2 Untersuchungen der Monomerbausteine an der Filmwaage</b>	13
<b>3.3 Polymere Bisphosphonate</b>	19
<b>3.4 Oligomere mit Proteinrückgrat</b>	21
3.4.1 Lösungssynthese der oligomeren Bisphosphonate	23
3.4.2 Festphasensynthese der oligomeren Bisphosphonate	27
3.4.3 Synthese des Peptidrückgrats mit anschließender Anknüpfung der Bisphosphonate	30
<b>3.5 Oligomere mit Dendrimeren als Rückgrat</b>	31
3.5.1 Hydrazonbildung	31
3.5.2 Reduktive Aminierung	33
3.5.3 Darstellung der Dendrimeren	35
3.5.4 Untersuchung der Dendrimeren mit LED-PFG-DSTE	39
3.5.4.1 Messung des hydrodynamischen Volumens durch Diffusionsmessungen	41
3.5.4.2 Messung der pH-Abhängigkeit des hydrodynamischen Volumens	45
3.5.4.3 Bestimmung von Assoziationskonstanten mit LED-PFG-DSTE	46
3.5.5 UV/Vis-Messungen der Dendrimeren	49
3.5.6 Fluoreszenzmessungen	54
3.5.7 Dendrimere mit monofunktionalisierten Seitengruppen	58
3.5.8 Dendrimere an der festen Phase	60
<b>4. Zusammenfassung</b>	62
<b>5. Ausblick</b>	64
<b>5.1 Ausweitung des Proteinspektrums</b>	64

<b>5.2</b>	<b>Aufreinigung getaggtter Proteine über Affinitätschromatographie</b>	65
<b>5.3</b>	<b>Verknüpfung monofunktionalisierter Dendrimerer mit anderen Erkennungseinheiten</b>	65
<b>5.4</b>	<b>Engreifen in Enzymfunktionen durch Komplexierung mit Dendrimeren</b>	66
<b>6.</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	67
<b>6.1</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	67
<b>6.2</b>	<b>Synthesen der Verbindungen</b>	69
<b>6.3</b>	<b>NMR-Titrationen</b>	109
<b>6.4</b>	<b>UV/Vis-Titrationen</b>	112
<b>6.5</b>	<b>LED-PFG-DSTE-Messungen</b>	115
<b>6.6</b>	<b>Fluoreszenztitrationen</b>	117
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	124

# 1. Einleitung

## 1.1 Funktionen basischer Proteine

Um die grundlegenden Funktionen der Zelle aufrecht zu erhalten, muß diese ständig nucleinsäurebindende Proteine produzieren, die die verschiedensten Aufgaben übernehmen. Dieser Mechanismus umfaßt DNA-Polymerasen, die die DNA vervielfältigen, um bei der Mitose der neu entstandenen Zelle einen eigenen Chromosomensatz zu verschaffen, RNA-Polymerasen, die die Informationen der DNA ablesen, um diese dann mit Hilfe der Ribosomen in Proteine zu übersetzen, Histone, die die Erbinformation in Form der DNA im Zellkern auf kleinstem Raum verpacken und organisieren und zahlreiche weitere Proteine und Enzyme.

Ihnen allen ist gemein, daß sie bei Wechselwirkung mit dem negativen Rückgrat der DNA oder RNA, die negativen Ladungen ausgleichen müssen. Daher tragen sie in großer Mehrzahl basische Aminosäuren wie Lysin und Arginin, die unter physiologischen Bedingungen protoniert sind und mit ihren positiven Ladungen die Ladung des DNA/RNA-Rückgrats neutralisieren. Dieser einfache Ladungsausgleich ist jedoch weitaus spezifischer als es zunächst den Anschein hat. *Fox et al.* konnten zeigen, daß kurze Proteinfragmente und Proteinoide mit hohem Lysinanteil selektiv an Homopolynukleotide wie Polycytosin und Polyuracil, nicht aber an Polyadenin oder Polyguanin binden und im Gegensatz dazu Proteinoide mit zahlreichen Argininen selektiv Polyadenin und Polyguanin aber nicht Polycytosin und Polyuracil binden<sup>[1-3]</sup>.

Doch nicht nur in dem Zusammenspiel mit der DNA bzw. RNA übernehmen die basischen Proteine eine wichtige Rolle. Auch in anderen Wirkmechanismen und bei bestimmten Zellfunktionen sind sie von zentraler Bedeutung. Als Beispiel sei hier der natürliche Transport von Substanzen durch die Zellmembran genannt<sup>[4, 5]</sup>. Hierbei wird angenommen, daß die Transportpeptide bei dem Schließungsvorgang mit den negativen Ladungen der Phospholipide in Wechselwirkung treten und dabei die Membran durchlässig für verschiedenste „Transportgüter“ machen<sup>[6, 7]</sup>. Dieses Prinzip wird neuerdings dazu genutzt, um durch künstlich hergestellte argininreiche Peptide, sogenannte „trojanische Pferde“, Wirkstoffe in Zellen einzuschleusen und so an ihren Wirkort zu befördern. Daraus haben sich bereits eine Anzahl neuer Behandlungsmöglichkeiten für Krankheiten eröffnet<sup>[8-10]</sup>.

## 1.2 Das Prinzip der Multivalenz

Wie bereits eingangs erwähnt, spielt die Wechselwirkung zwischen dem Phosphorsäurerückgrat von Nucleinsäuren und basischen Proteinen eine wichtige Rolle in den verschiedenen Funktionen einer Zelle. Das einfache Bindungsmotiv, bei dem Phosphat an ein Lysin oder Arginin bindet, ist jedoch äußerst schwach und keineswegs spezifisch. Wie gelingt es der Zelle nun, Proteine und DNA-/RNA-Fragmente aufeinander abzustimmen? In erster Linie geschieht dies durch Multiplikation ein und desselben Bindungsmotivs<sup>[11]</sup>.

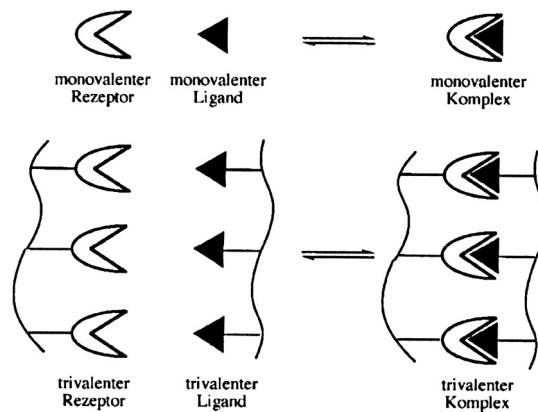


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Prinzips der Multivalenz<sup>[11]</sup>

Man unterscheidet bei diesen polyvalenten Bindungen zwischen positiv kooperativen (synergistischen), nichtkooperativen (additiven) und negativ kooperativen (einander störenden) Bindungseffekten. Dazu definiert man den Terminus der Kooperativität  $\alpha$  mit:

$$\alpha = \frac{\lg(\mathbf{K}_N^{\text{poly}})}{\lg(\mathbf{K}^{\text{mono}})^N} \quad (1)^{[12]}$$

wobei  $\mathbf{K}_N^{\text{poly}}$  die Assoziationskonstante der polyvalenten Bindung angibt und  $\mathbf{K}^{\text{mono}}$  die Bindungskonstante des monovalenten Falles mit der Anzahl  $N$  Bindungsstellen. Ist  $\alpha > 1$  handelt es sich um einen synergistischen Effekt. Die Gesamtbindungsenergie ist größer als die Summe der Energien der Einzelbindungen. Bei  $\alpha = 1$  sind die einzelnen Bindungsschritte unabhängig voneinander und addieren sich linear auf. Im Falle von  $\alpha < 1$  behindern die Bindungsmotive einander und die Gesamtbindungsenergie ist schwächer als die Summe der einzelnen Bindungsenergien. Alle drei Fälle treten in der Natur auf.

Betrachtet man den Fall einer multivalenten Komplexbildung, so läßt sich leicht Veranschaulichen, woher die Selektivität der Bindung stammt. Mag die monovalente Wechselwirkung zwischen Wirt und Gast unter physiologischen Bedingungen noch sehr



schwach sein, so steigt die Bindungskonstante bei einer Vervielfältigung selbst im Falle einer nichtkooperativen Bindung exponentiell an. Der multivalente Rezeptor bindet daher nur an solche Gäste, die ebenfalls genügend Bindungsstellen für die einzelnen Rezeptorfunktionalitäten besitzen. Bei rigiden Rezeptoren müssen diese außerdem perfekt vororganisiert sein, um eine exponentielle Bindungssteigerung zu gewährleisten<sup>[13]</sup>.

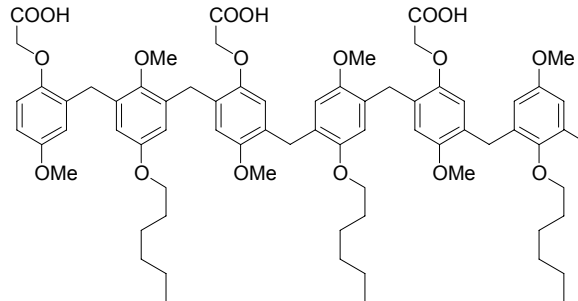
Ein gutes Beispiel der wenigen künstlichen multivalenten Rezeptoren ist die Vervielfältigung des Wirkstoffes Vancomycin. Vancomycin bindet an die kurze Peptidsequenz D-Ala-D-Ala auf der Oberfläche von bakteriellen Zellwänden durch hydrophobe und Wasserstoffbrückenwechselwirkungen. Die Dissoziationskonstante zwischen monovalentem Vancomycin und dem Peptid beträgt  $K_d = 10^{-6}$  M und konnte beim Übergang auf einen trivalenten Rezeptor mit drei kovalent verknüpften Vancomycineinheiten und einem trivalenten Gast bestehend aus drei D-Ala-D-Ala Bausteinen um den Faktor  $10^{11}$  auf  $K_d = 4 \times 10^{-17}$  M gesteigert werden<sup>[14, 15]</sup>, was in etwa dem genannten Effekt bei nichtkooperativer Bindung entspricht.

### 1.3 Erkennung von Proteinoberflächen

Auch bei der Erkennung von Proteinoberflächen wird oft auf das oben genannte Prinzip der Multivalenz zurückgegriffen. Dazu gehören die Protein-Zucker-Erkennung<sup>[16, 17]</sup>, die zelluläre Adhäsion<sup>[18-20]</sup> und die Blockierung der Anlagerung von Pathogenen an ihre Zielzellen<sup>[11]</sup>. Einen ersten Ansatz verwendeten *Shuker et al.*, indem sie einen divalenten Rezeptor entwickelten, der aus zwei unterschiedlichen Bausteinen besteht. Diese binden an zwei benachbarte Bindungstaschen auf dem FK506-binding-protein (FKBP)<sup>[21]</sup>. FKBP inhibiert Calcineurin und blockiert damit die Aktivierung der T-Helferzellen<sup>[22]</sup>. Die künstlichen Rezeptoren für die einzelnen Bindungsstellen wurden durch Untersuchung einer Bibliothek von 10000 kleinen Molekülen gefunden und anschließend kovalent verknüpft. Dabei konnten die beiden einzelnen Bindungsereignisse von  $K_d = 2.0 \mu\text{M}$  bzw.  $100 \mu\text{M}$  auf eine Gesamtbindung von  $K_d = 19 \text{ nM}$  gesteigert werden.

Bei der Suche nach Oligomeren, die Proteinoberflächen erkennen, entwickelten *Regan et al.* kleine oligomere Phenoxyessigsäuren, die human leukocyte elastase (HLE) inhibieren<sup>[23]</sup>. HLE ist eine Serinprotease, die eine sehr basische Oberfläche aus 18 Argininen und nur 6 sauren Aminosäuren besitzt. Dicht um das aktive Zentrum liegen 4 Arginine, umgeben von

einer Reihe von hydrophoben Aminosäuren. Über kinetische Messungen konnte mit diesem einfachen Rezeptor, der lipophile und anionische Einheiten kombiniert, eine Inhibition der Aktivität (siehe Abbildung 2) mit  $K_i = 17 \text{ nM}$  beobachtet werden.



**Abbildung 2:** Rezeptor von *Regan* zur Inhibierung von HLE.

*Hamilton* erweiterte das Oligomerdesign zu einer starren, antikörperähnlichen Struktur, bei der vier Peptidschleifen an den oberen Rand eines Calix[4]arens gebunden sind<sup>[24]</sup>. Durch Variation der Aminosäuren in den Loops konnte ein potenter Inhibitor für Chymotrypsin gefunden werden, der mit seinen Asparaginsäureeinheiten die zahlreichen Arginine und Lysine auf der Oberfläche des Proteins komplexiert ( $K_i = 0.81 \text{ } \mu\text{M}$ ). Ein monovalenter Rezeptor bestehend aus einem einzelnen Peptidloop zeigte dagegen keinerlei Inhibition.

*Collier* und *Whitesides* entwickelten ein polyvalentes Polyacrylamidpolymer, das selektiv den Milzbranderreger inhibieren kann<sup>[25]</sup>. *Bacillus anthracis*, der Erreger des Milzbrands, enthält drei wichtige Proteine: ein protektives Antigen (PA) und zwei enzymatische Einheiten, den endämischen Faktor (EF) und den letalen Faktor (LF). Alle drei werden aus dem Bakterium ausgeschleust und PA zerfällt bei der Bindung an eine Säugetierzelloberfläche in Untereinheiten (PA63), die sich zu einem Heptamer zusammenlagern. Dieses Heptamer bildet zusammen mit EF und LF einen Komplex, der in die Wirtszelle eindringt und diese abtötet. Ein Dodecapeptid wurde entdeckt, das die Komplexierung von EF und LF an das Heptamer mit  $\text{IC}_{50} = 150 \text{ } \mu\text{M}$  unterbindet. Dabei wird angenommen, daß das Peptid vor allem mit der hydrophoben Oberfläche des Heptamers wechselwirkt. Um die Bindungsaffinität zu erhöhen, wurde das einzelne Bindungsmotiv auf einem Polyacrylamid vervielfältigt. Dieser multivalente Rezeptor inhibierte die LF Bindung mit  $\text{IC}_{50} = 20 \text{ nM}$  und konnte *in vivo* die Toxizität des Milzbrandgiftes in Mäusen vollständig eliminieren<sup>[26]</sup>.

## 1.4 Protein-tagging – Funktion und Aufreinigung

Die rekombinante Darstellung von Proteinen in *Escherichia coli* ist mittlerweile zu einer Standardmethode der Herstellung funktionaler Proteine geworden, nicht zuletzt dank der immer besser werdenden Verfügbarkeit verschiedener effizienter Expressionsvektoren, der Fähigkeit der Bakterien auf preiswerten Medien zu wachsen und der etablierten Methoden für *high-density* Zellkulturen<sup>[27]</sup>. Ein wichtiger – meist auch der aufwendigste Schritt – ist die Aufreinigung der exprimierten Proteine. Die Entwicklung ausgeklügelter Proteinfusions-systeme hat die Produktion in *E. coli* in größerem Maßstab erst möglich gemacht. Dabei wird dem zu exprimierenden Protein ein Affinitätstag durch die rekombinanten DNA-Techniken angefügt, der meist aus einer kurzen, definierten Peptidsequenz besteht, die eine selektive und starke Bindung an einen speziellen Bindungspartner gewährleistet. Dieser Bindungspartner ist meist auf einem geeigneten, festen Trägermaterial immobilisiert und dadurch in der Lage, das Fusionsprotein aus einer Vielzahl weiterer Proteine herauszufiltern. Auch hier wird oft ein einzelnes, einfaches Bindungsmotiv vervielfältigt, um zu einer hinreichend starken und selektiven Bindung zu kommen.

Diese Affinitätstag-Ligandsysteme variieren in ihrer Größe von kleinen Sequenzen einiger weniger Aminosäuren bis zu großen Bindungsproteinen. Drei dieser Systeme haben sich als praktikabelste etabliert<sup>[28]</sup>.

Der am meisten benutzte Tag ist der Polyhistidintag bestehend aus 6 Histidinen, der selektiv an einen Nickelnitriлотriessigsäurekomplex (Ni-NTA) bindet. *Hochuli* und *Smith* waren die ersten, die diesen Tag für die Aufreinigung von Mäusedihydrofolatreduktase an Ni<sup>2+</sup> beladenem NTA-Harz verwendeten<sup>[29, 30]</sup>. Obwohl der Tag 6 Histidineinheiten trägt, können aus stochastischen Erwägungen maximal zwei davon an der Bindung zu den freien Koordinationsstellen des immobilisierten Metallions (Cu<sup>2+</sup> oder Ni<sup>2+</sup>) beteiligt sein. Die größere Anzahl an Histidinen gewährleistet entropisch, daß genügend von ihnen in der richtigen Konformation vorliegen, um das Metallion zu binden<sup>[31]</sup>. Trotz der weit verbreiteten Anwendung in zahlreichen Proteinaufreinigungen (siehe IMAC = immobilized metal ion affinity chromatography), besitzt der His-Tag einige Einschränkungen. Beispielsweise besitzen auch zahlreiche natürlich vorkommende Peptide eine gewisse Affinität zu Metallen, da sie ebenfalls Strukturmerkmale zur Metallchelatformung besitzen<sup>[28]</sup>. Diese Beschränkung der Selektivität reduziert die Reinheit der gewünschten Proteins. Für die Darstellung von Proteinen in pharmazeutischer oder industrieller Produktion ist die Anwendbarkeit dieses

Tags somit limitiert. Auch das sogenannte „Ausbluten“ der Chromatographiesäule, bei dem Nickelionen in das Produkt gelangen können, trägt zu Einschränkungen der Anwendbarkeit bei. Bei einigen Fusionsproteinen besitzt der Hexahistag zudem nicht die erwartete Affinität für immobilisierte Metallionen<sup>[31, 32]</sup>. Dies kann daran liegen, daß Tandemsequenzen (Sequenzen aus gleichen Aminosäuren) die Tertiärstruktur des Proteins verändern und der Tag im Inneren des Proteins verborgen wird<sup>[33]</sup>. Auch die Behinderung des aktiven Zentrums und damit die Inaktivierung des exprimierten Proteins wurde beobachtet<sup>[34]</sup>.

Ein weiterer gebräuchlicher Tag ist das Glutathion S-Transferase Fusionsprotein GST, das selektiv an immobilisiertes Glutathion bindet<sup>[35]</sup>. Neben einigen Vorteilen<sup>[28]</sup> besitzt es jedoch den Nachteil seiner Größe (26 kDa), außerdem kann reduziertes Glutathion zur Reduktion verschiedener Gruppen im Protein und damit unter anderem zu einer erhöhten Anzahl an Disulfidbrücken führen<sup>[36]</sup>.

Das dritte, wichtige *tagging*-System ist FLAG<sup>TM</sup>, das 1988 von *Hopp et al.* entwickelt wurde<sup>[37]</sup>. Dieses System basiert auf der Calciumionenabhängigen Bindung eines monoklonalen Antikörpers (Maus anti-FLAG IgG M1) an ein acht Aminosäuren langes Peptidfragment (DYKDDDDK). Dieses Fragment besitzt weiterhin eine seltene protease-aktive Sequenz (DYKDD), bei der der Tag nach der Aufreinigung des Proteins wieder abgespalten werden kann. Das getaggte Protein wird nach Aufbringen auf die Säule einfach durch „Weglassen“ der Ca<sup>2+</sup>-Ionen im Eluenten wieder von der Säule gewaschen. Der Nachteil dieses Tags besteht darin, daß das Fragment nur an den *N*-Terminus des Peptids angefügt werden darf. Auch hat es sich gezeigt, daß es im Gegensatz zu Proteinen für die Herstellung rekombinanter Peptide nur wenig geeignet ist<sup>[28]</sup>.

Es gibt noch eine große Anzahl weiterer Taggingssysteme, die jeweils nur auf ein kleines Produktspektrum zurecht geschnitten sind<sup>[38, 39]</sup>. Zu erwähnen sei hier noch der Strep tag I, bei dem Streptavidin selektiv an ein *C*-terminales Fragment aus neun Aminosäuren bindet (AWRHPQFGG;  $K_d = 3.7 \times 10^{-5}$  M) und der Strep tag II, bei dem Streptactin an eine Sequenz aus acht Aminosäuren bindet (WSHPQFEK). Beide wurden von *Schmidt* und *Skerra* entwickelt<sup>[40, 41]</sup>.

Für die vorliegende Arbeit ist besonders die Verwendung polykationischer Tags, bestehend aus Argininen bzw. Lysinen, interessant. *Sassenfeld* und *Brewer* waren hier die ersten, die Untersuchungen an Arg- bzw. Lystags durchgeführt und ihre Verwendung für die Proteinaufreinigung getestet haben<sup>[42]</sup>. Die Einbindung polykationischer Tags macht das Fusionsprotein bei physiologischem pH-Wert wesentlich basischer. Die große Anzahl positiver Ladungen kann daraufhin genutzt werden, um das getaggte Protein mit Hilfe einer

Ionentauschersäule durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial aufzureinigen. Generell sind polykationische Tags ideal für die Produktion therapeutischer Proteine, da der Tag im allgemeinen nur einen geringen Effekt auf die Faltungsdynamik und die Bioaktivität des Proteins hat<sup>[28, 43]</sup>. Die Lösungseigenschaften des rekombinanten Proteins werden durch den polyionischen Tag ebenfalls verbessert und die Tendenz zur Bildung von Aggregaten wird verringert. Es ist auch möglich einen Arginintag durch Carboxypeptidase B wieder abzuspalten<sup>[44]</sup>. Die Carboxypeptidase schneidet hinter allen basischen Aminosäuren, die sich am *N*- oder *C*-Terminus befinden ab. Danach ist jedoch eine weitere Ionentauschersäule vonnöten, um die nichtgespaltenen Peptide und die Carboxypeptidase wieder abzutrennen.

Als Nachteil hat sich jedoch die erhöhte Tendenz zum Abbau Arg-getaggtter Peptide in Bakterienstämmen erwiesen. Dies macht die Verwendung von *E. coli* Stämmen notwendig, die keine Omp A Protease besitzen, da auch diese den basischen Teil von Proteinen abschneidet<sup>[45]</sup>. Die polykationischen Tags bestehen in der Regel aus 5 bis 15 Argininen, je nach Trennproblem. Durch den Einsatz von Molekülen, die in physiologischem Medium spezifisch an Arginin binden, könnte die Anzahl der verwendeten Arginine in einem solchen Tag drastisch verringert werden, wodurch ein Teil der negativen Effekte umgangen wird.

In dieser Arbeit wird ein solches, spezifisches Bindungsmotiv für basische Aminosäuren vorgestellt, welches kovalent vervielfältigt werden kann und stark an Arg-Tags und basische Proteine bindet.

## 2. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Darstellung und Untersuchung neuer Erkennungseinheiten für Proteinoberflächen. Dabei sollte ausgehend von der bereits bekannten Bisphosphonat-Bindungsgruppe **1**, die selektiv Guanidinium- und Ammoniumgruppen bindet, unter Ausnutzung von multivalenter Bindungsverstärkung die Bindungsaffinität soweit erhöht werden, daß eine selektive Bindung arginin- und lysinreicher Domänen in Peptiden auch in wäßriger, gepufferter Lösung erfolgen kann. Diese basischen Domänen spielen wie eingangs erwähnt eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung zwischen DNA bzw. RNA prozessierenden und bindenden Proteinen und bieten somit ein lohnendes und interessantes Target für pharmakologische und biologische Untersuchungen.

Um die Bisphosphonat-Pinzette **1** in einen Baustein umzuwandeln, der eine Vervielfältigung des Bindungsmotivs in einer multivalenten Erkennungseinheit ermöglicht, mußte an geeigneter Position eine funktionelle Gruppe eingefügt werden. Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt<sup>[46]</sup>, ist eine solche Gruppe an Position 5 möglich und sinnvoll.

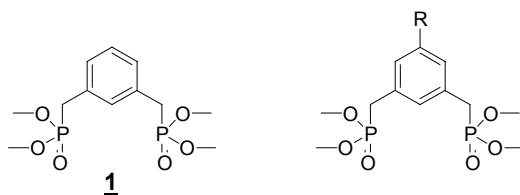


Abbildung 3: Die Bisphosphonatpinzette **1** mit möglichem Substituenten an Position 5

Desweiteren mußte ein Grundgerüst gefunden und dargestellt werden, an das die Bisphosphonat-Gruppe angefügt werden konnte. Dabei boten sich verschiedene Strategien an, wie in den folgenden Kapiteln gezeigt werden soll. Zunächst war die Anknüpfung an ein peptidisches Rückgrat naheliegend und sollte zu einem flexiblen Baukastensystem führen, bei dem die bisphosphonatmodifizierten Bausteine mit anderen Erkennungseinheiten und Spacergruppen kombiniert werden können.

Ein schnellerer Zugang zu multifunktionellen Erkennungseinheiten sollte durch die verschiedenen Techniken der Polymerisation möglich sein. Mit diesen können in gewissem Rahmen auch definierte Strukturen erreicht werden.

Schließlich gibt es noch eine weitere Möglichkeit, bei der relativ schnell multifunktionelle Bindungseinheiten erhalten werden können: dendrimere Grundgerüste mit funktionellen Endgruppen wie Polypropylenimin PPI und Polyamidoamin PAMAM könnten als Rückgrat

genutzt werden, an das die Bisphosphonat-Erkennungseinheit angeknüpft werden kann. Sollte diese Anknüpfung quantitativ möglich sein, wären damit noch besser definierte, monodisperse Strukturen als bei den Polymeren zugänglich.

Für diese unterschiedlichen Herangehensweisen mußten geeignete Synthesestrategien zur Darstellung multivalenter Rezeptoren entwickelt werden. Anschließend mußten Möglichkeiten gefunden werden, ihre Wechselwirkungen mit Proteinoberflächen quantitativ zu bestimmen. Die NMR-Shift-Titration kann hierbei nicht mehr angewandt werden, da die Vielzahl der Signale eines Proteins die Verfolgung eines bestimmten Signals über weite Strecken verhindert.

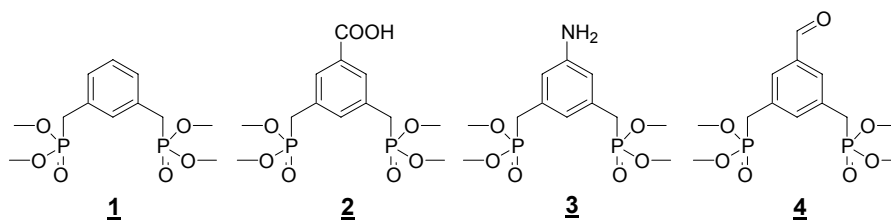
Alternativ bietet sich die UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie an. Auch die Messung des Diffusionskoeffizienten mit Hilfe der NMR-Spektroskopie kann zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten genutzt werden.

### 3. Durchführung und Ergebnisse

#### 3.1 Darstellung der Monomerbausteine

Zur Darstellung eines multivalenten Liganden für arginin- oder lysinreiche Peptide bzw. Proteinoberflächen erscheint es sinnvoll, die bereits erfolgreich verwendete Pinzette **1** zu funktionalisieren und somit für anschließende Verknüpfungen zu oligomeren Strukturen zugänglich zu machen. Leicht darstellbar sind hierbei an Position 5 geeignet substituierte Monomere, deren Synthese schon in eigenen Vorarbeiten durchgeführt werden konnte<sup>[46]</sup>.

Als besonders praktikable funktionelle Gruppen zur weiteren Verknüpfung haben sich hierbei die Carbonsäure- (bei **2**) und die Aminofunktion (bei **3**) erwiesen. In dieser Arbeit konnte erstmals ein Aldehydbaustein **4** erfolgreich synthetisiert und oligomerisiert werden, wie in Kapitel 3.5.2 näher ausgeführt wird. Da die Darstellung dieser drei Bausteine hinsichtlich ihrer Effizienz gegenüber den Vorarbeiten deutlich verbessert werden konnte, sei ihre Synthese hier nochmals in Kürze erläutert.



**Abbildung 4:** Bisphosphonatgrundgerüst und Ankergruppen in 5-Position.

Die carbonsäure- und aminofunktionalisierten Bisphosphonate können angelehnt an eine Vorschrift von *Nakhle et. al.* hergestellt werden<sup>[47]</sup>.

Bei der Darstellung des aminofunktionalisierten Bisphosphonatbausteins **3** geht man von dem kommerziell erhältlichen 3,5-Dimethyl-nitrobenzol aus. Zunächst wird diese Ausgangsverbindung über eine *Wohl-Ziegler*-Bromierung mit *N*-Bromsuccinimid in das zweifache Benzylbromid überführt<sup>[47]</sup>. Die Reinigung nach diesem Schritt kann über Kristallisation erfolgen, da die unterschiedlichen Reaktionsprodukte, im Gegensatz zum Carbonsäure- bzw. Esterderivat, verschieden gut kristallisieren. Die Kristallisation erfolgt dabei in einem Essigester/Hexan Gemisch.

Anschließend setzt man das 3,5-Dibromomethyl-nitrobenzol in einer *Michaelis-Arbuzow*-Reaktion mit Trimethylphosphit um. Das Produkt kann ebenfalls nach teilweisem Entfernen



des Trimethylphosphits und des Methyl-dimethoxyphosphonats als entstehendes Nebenprodukt im Hochvakuum aus Essigester/Hexan umkristallisiert werden. Die in Vorarbeiten durchgeführte umständliche und langwierige Säulenchromatographische Aufreinigung entfällt an dieser Stelle.

Abschließend wird die Nitrofunktion in Methanol mit Palladium auf Kohle und Wasserstoff zum Amin reduziert. Auf dieser Stufe ist das Bisphosphonat nicht stabil und die Aminofunktion wird leicht durch Sauerstoffspuren oxidiert. Praktikabler ist es das Bisphosphonat auf der Nitrostufe zu lagern und erst kurz vor der weiteren Umsetzung zum Amin zu reduzieren.

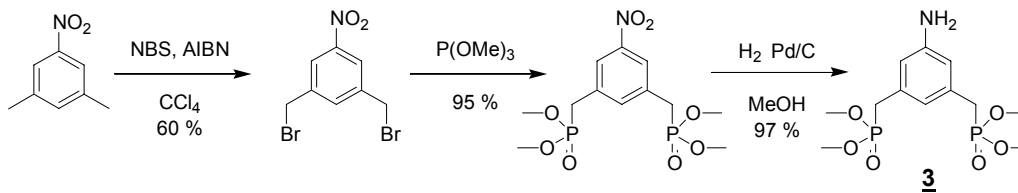


Abbildung 5: Darstellung des Bisphosphonatbausteins **3**

Die Bisphosphonatcarbonsäure **2** wird ausgehend von Mesitylen dargestellt, indem dieses zunächst mit Sauerstoff und Cobaltstearat als Katalysator zur 3,5-Dimethylcarbonsäure oxidiert wird und anschließend über NBS-Bromierung und *Michaelis-Arbuzow*-Phosphorylierung zum Bisphosphonat umgesetzt wird<sup>[48]</sup>. Dabei entsteht jedoch nicht die freie Carbonsäure, sondern deren Methyl ester. Wahrscheinlich reagiert das in der Reaktionslösung zwischenzeitlich entstehende Methylbromid in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit der Carbonsäure und erzeugt den Methyl ester und ein Bromid.

Der Ester wird in einem Methanol-Wasser-Gemisch mit Lithiumhydroxid bei 0° C gespalten.

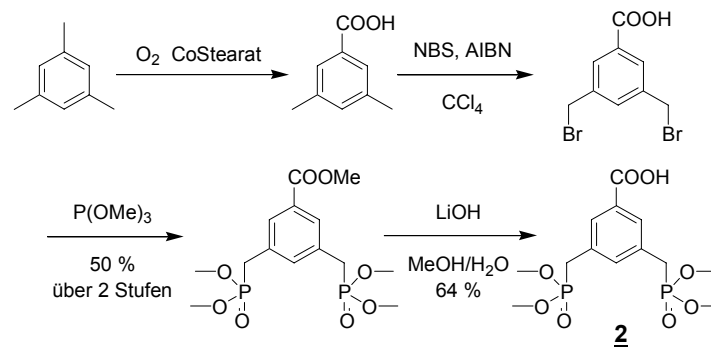
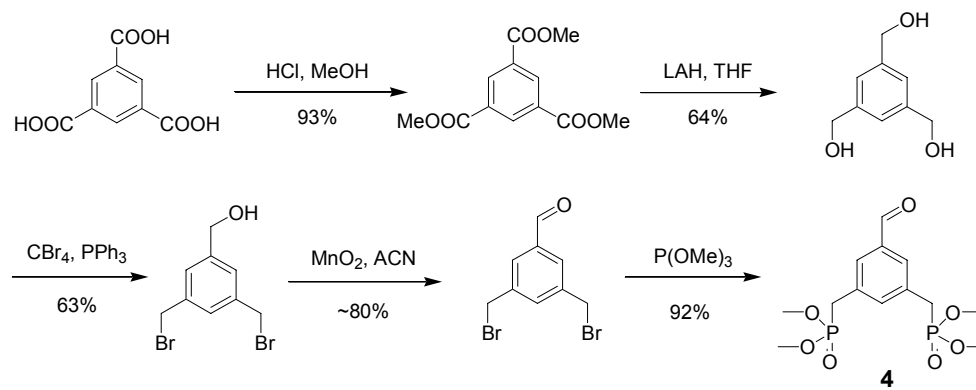


Abbildung 6: Darstellung des Bisphosphonatbausteins **2**

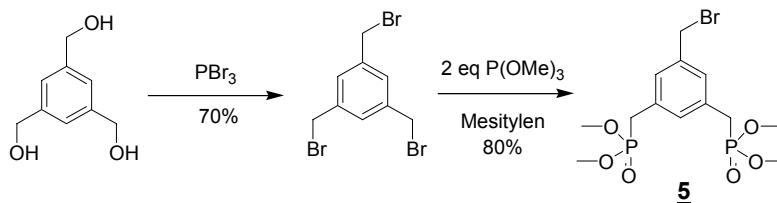
Zur Darstellung des Aldehydbausteins **4** geht man von Trimesinsäure aus, die zunächst durch HCl-Einleitung in Methanol zum Trimethylester verestert wird. Anschließend wird der Trimethylester mit Lithiumaluminiumhydrid zum Triol reduziert. Durch die *Appel*-Reaktion

können selektiv durch Zugabe von zwei Äquivalenten Triphenylphosphin und Tetrabrommethan zwei der Alkoholfunktionen durch Bromide substituiert werden<sup>[49]</sup>. Anschließend erfolgt die *Michaelis-Arbuzow*-Reaktion zur Darstellung des Bisphosphonats. Die verbleibende Alkoholfunktion wird mit Braunstein schonend zum Aldehyd oxidiert.



**Abbildung 7:** Darstellung des Bisphosphonataldehydbausteins **4**

Schließlich wurde erstmals die Synthese eines mit einem Benzylbromid funktionalisierten Bisphosphonates **5** durchgeführt. Dabei wird das bereits bei der Darstellung von **4** erwähnte 1,3,5-Trihydroxymethylbenzol mit Phosphortribromid zum Tribromid umgesetzt und anschließend mit zwei Äquivalenten Trimethylphosphit in Mesitylen zur Verbindung **4** umgesetzt. Das so erzeugte Benzylbromid kann zur nukleophilen Substitution und somit zur Verknüpfung mit zahlreichen weiteren Bausteinen herangezogen werden.



**Abbildung 8:** Darstellung des Bisphosphonatbromidbausteins **5**

Aufbauend auf diesen vier Monomeren ist die Darstellung unterschiedlicher kovalent verknüpfter Oligomere auf Bisphosphonatbasis möglich, was in den anschließenden Kapiteln 3.3 bis 3.5 näher ausgeführt werden soll.

Bevor jedoch zu den Oligomeren übergegangen wurde, wurden die einfache Bisphosphonatpinzette unter annähernd physiologischen Bedingungen an der Luft-Wasser-Grenzschicht in Filmwaageexperimenten untersucht.

### 3.2 Untersuchungen der Monomerbausteine an der Filmwaage

Eine Möglichkeit, die Wechselwirkung des Argininrezeptors mit oligomeren Argininpeptiden oder gar argininreichen Proteinen zu untersuchen, bietet die Verwendung einer Filmwaage. In wäßriger Lösung beträgt die Assoziationskonstante für die Komplexbildung zwischen Bisphosphonat und Arginin  $K < 10 \text{ M}^{-1}$  und ist daher kaum meßbar. Die Wasserstoffbrückenbindungen und auch die  $\pi$ -Kationenwechselwirkung spielen in wäßriger Lösung durch Konkurrenz mit den Wassermolekülen nur noch eine untergeordnete Rolle. Die eigentliche Bindung wird in der Hauptsache nur durch den hydrophoben Effekt und die etwas geringeren Coulombwechselwirkungen bestimmt. Letztere, die den größten Beitrag bietet, ist in wäßriger Lösung jedoch geringer, als in organischen Lösungen. Die Gesamte Bindungsstärke nimmt also hin zu wäßrigen Lösungen stark ab.

An Luft/Wasser-Grenzflächen nimmt die Dielektrizitätskonstante des Wassers ( $\epsilon_r = 78$ ) jedoch hin zu der an der Grenzfläche befindlichen aliphatischen Phase (z.B. Stearinsäuremonoschicht  $\epsilon_r = 2$ ) kontinuierlich ab<sup>[50]</sup>. Daher sind polare Wechselwirkungen an der Grenzfläche stärker als in Lösung. Weiterhin kann die Monoschicht als Modell zur molekularen Erkennung an Lipidmembranen von Zellen angesehen werden. Sie bietet daher eine interessante biomimetische Umgebung<sup>[51]</sup>. Auch als Vorversuch für multivalente Rezeptoren bietet die Monoschicht eine interessante Möglichkeit, da sich in der fluiden Lipidschicht durch Selbstassemblierung mehrerer Monomerbausteine über einem polyvalenten Gast bereits multivalente Rezeptorstrukturen ausbilden.

Zunächst mußte der Bisphosphonatbaustein hierzu geeignet chemisch modifiziert werden, um seine Einlagerung in die Lipidmonoschicht zu gewährleisten. Am besten eignete sich dazu der Baustein **3**, der über eine Amidknüpfung mit einer Fettsäure zum Hexadecyl-3,5-bis(dimethoxyphosphinyl-methyl)phenylamid **6** umgesetzt werden kann. Anschließend wurden die zwei Methylester mit Lithiumbromid in Acetonitril gespalten. Desweiteren wurde das Bisphosphonat **6** durch Fällung mit verdünnter Salzsäure in das protonierte Phosphonat **7** überführt und anschließend mit einer Lösung aus 1 M Tetrabutylammoniumhydroxidlösung zum Tetrabutylammoniumsalz **8** umgesetzt (Abbildung 9).

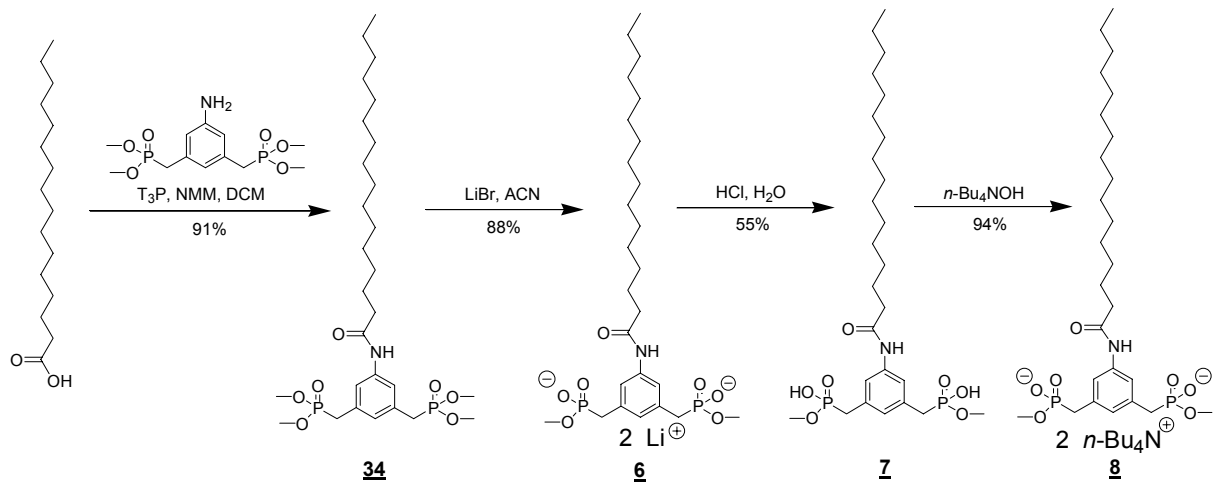


Abbildung 9: Darstellung der Lipidbausteine für die Filmwaage-Experimente.

Diese Rezeptoren sollten sich aufgrund ihres amphiphilen Charakters gut in die Lipidschicht an der Luft/Wasser-Grenzfläche einlagern. Die Experimente wurden an einer Filmwaage nach *Langmuir* durchgeführt<sup>[52]</sup>. Dabei wird der Oberflächendruck  $\pi$  an der Grenzfläche über ein *Wilhelmy*-Plättchen gemessen. Auf der Wasseroberfläche schwimmt ein dünner monomolekularer Film von Lipidmolekülen, der von zwei beweglichen Schranken zusammengeschooben oder auseinandergezogen werden kann. Der Oberflächendruck  $\pi$  ist definiert als Differenz der Oberflächenspannung aus reiner und belegter Wasseroberfläche:  $\pi = \sigma_{\text{rein}} - \sigma_{\text{belegt}}$ . Seine Messung in Abhängigkeit der von den Schranken veränderten Oberfläche  $A$  ergibt sogenannte Druck-Fläche-Diagramme (Abbildung 10).

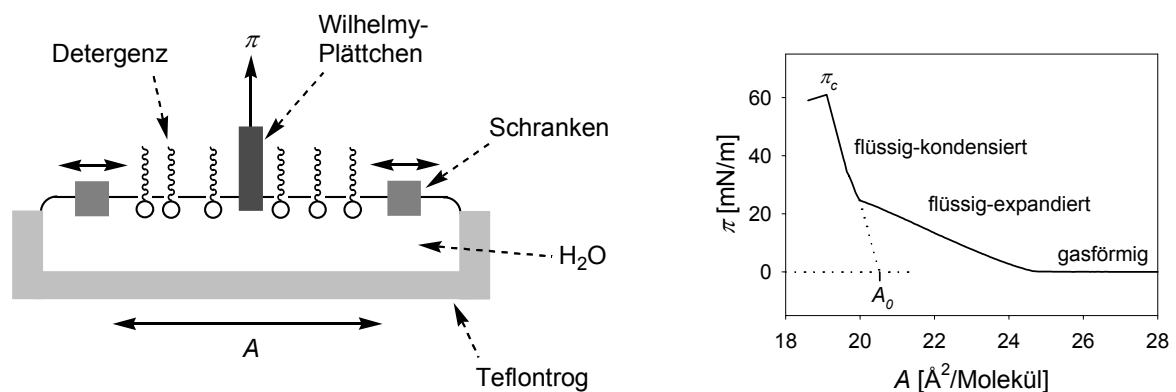


Abbildung 10: links: Schematischer Aufbau einer *Langmuir*-Filmwaage. rechts: Ein typisches Druck-Fläche-Diagramm.

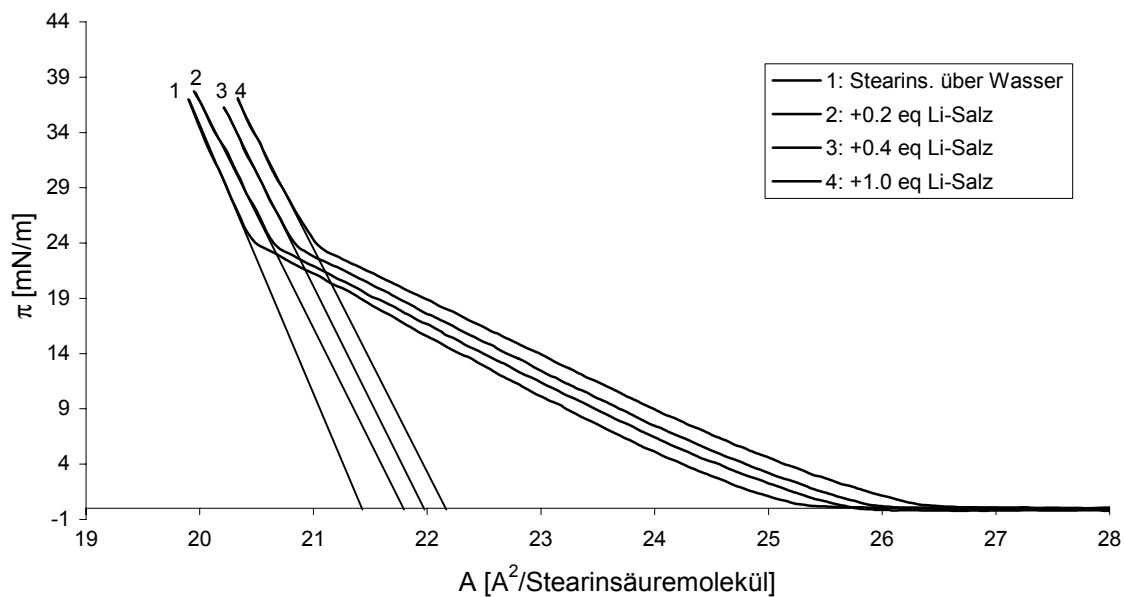
In diesem Diagramm lassen sich drei charakteristische Bereiche erkennen. Von rechts beginnend befindet die Lipidschicht sich zunächst in der sogenannten gasförmigen Phase. Dabei schwimmen die einzelnen Lipidmoleküle ohne eine Orientierung frei auf der Wasseroberfläche. Verringert man die Oberfläche und schiebt die Moleküle weiter zusammen, so wird die sogenannte flüssig-expandierte Phase erreicht. Dabei beginnen sich

die einzelnen Moleküle zu ordnen und stärker aufeinander zu stoßen. Das Diagramm führt in einen leichten Anstieg. Bei weiterer Flächenverringering steigt der Oberflächendruck ab einem bestimmten Punkt stark an und es ist die sogenannte flüssig-kondensierte oder feste Phase erreicht. Die Lipidmoleküle sind nun dicht gepackt und bilden einen kontinuierlichen Film. Wird die Oberfläche noch weiter verringert, so ist irgendwann der Punkt  $\pi_C$  erreicht, bei dem die Monoschicht kollabiert und übereinander geschoben wird.

Extrapoliert man die Gerade der flüssig-kondensierten Phase auf die x-Achse, so erhält man den  $A_0$ -Wert (siehe Abbildung 10). Veränderungen dieses Wertes zeigen Einlagerungseffekte bei Zugabe von Rezeptormolekülen oder Einbringung von Gästen in die Subphase. Er verschiebt sich bei Einlagerung in Richtung größerer Oberflächen.

In den vorliegenden Experimenten wurde zunächst Stearinsäure, in Chloroform gelöst, auf die Wasseroberfläche der Filmwaage aufgebracht und es wurde gewartet, bis sich eine stabile Lipidschicht gebildet hat und die Druck-Fläche-Diagramme eine konstante Oberfläche  $A_0$  zeigten. Anschließend wurde das palmitinsäurefunktionalisierte Bisphosphonat ebenfalls in einem Lösungsmittel hohen Dampfdruckes (meist Chloroform) aufgetragen. Das amphiphile Bisphosphonat war jedoch nur in einem Chloroform/Methanol-Gemisch mit mindestens 30% Methanol (im Falle des Tetraäthylammoniumsalzes) oder sogar mindestens 50% Methanol (im Falle des Lithiumsalzes) löslich. Der Nachteil bei der Verwendung polarer Lösungsmittel beim Auftragen ist der Umstand, daß das Lösungsmittel vor dem Verdampfen den einzulagernden Stoff in die Subphase mitreißt und nur ein geringer Teil eingelagert wird. Dies konnte schon in früheren Arbeiten von *Molt* beobachtet werden<sup>[53]</sup>.

Abbildung 11 zeigt die Einlagerung des Lithiumsalzes in die Stearinsäuremonoschicht.



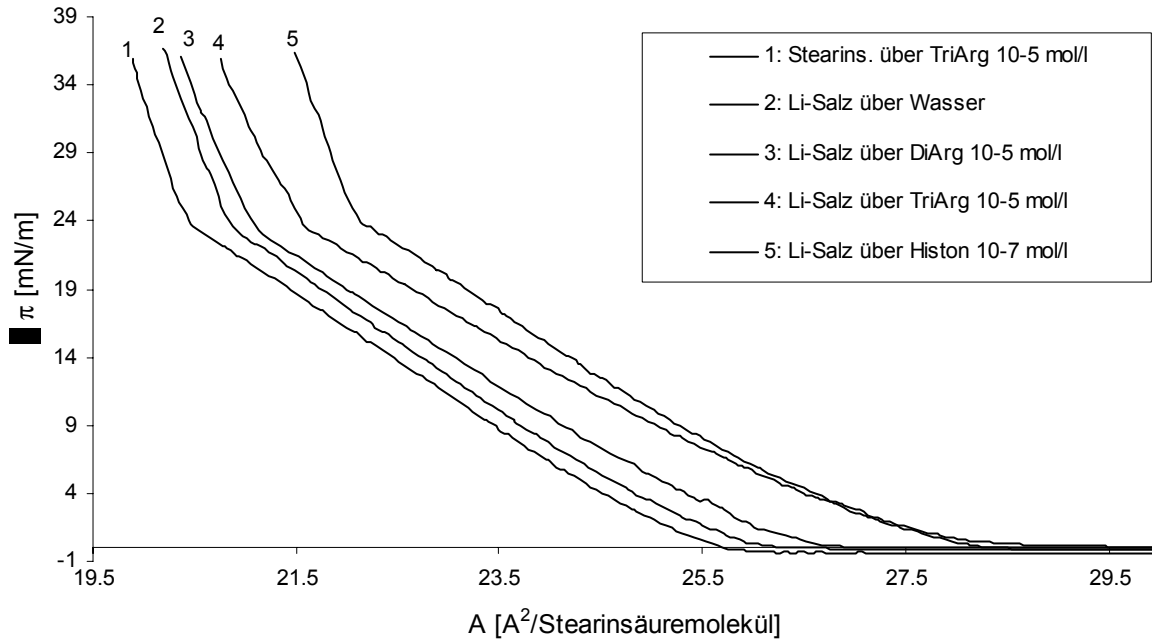
**Abbildung 11:**  $\pi/A$ -Diagramme der Einlagerung des Rezeptors **6** in die Stearinsäuremonoschicht. Die angegebenen Äquivalente des Lithiumsalzes beziehen sich auf die aufgetragene Menge der Stearinsäure.

Wie sich aus dem Diagramm ablesen läßt, wird nur ein kleiner Teil des angebotenen Wirtes in die Lipidmonoschicht eingelagert. Dies läßt sich auf eine recht gute Wasserlöslichkeit des Rezeptors und die Verwendung polarer Lösungsmittel beim Auftragen zurückführen.

In Abbildung 12 wurden verschiedene Gäste in die Subphase eingebracht. Dabei wurde zunächst getestet, ob die Stearinsäuremonoschicht für sich alleine eine Wechselwirkung mit den angebotenen Gästen zeigt. Dies war nicht der Fall. Dagegen zeigte die Einlagerung des Bisphosphonat-Lithiumsalzes einen deutlichen Effekt mit den gelösten Gästen.

Es ist deutlich zu sehen, die Oberfläche sich um so mehr ausweitet, je mehr Arginingruppen der angebotene Gast besitzt. Das basische Histon konnte noch bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  mol/L durch eine deutliche  $\pi/A$ -Verschiebung nachgewiesen werden.

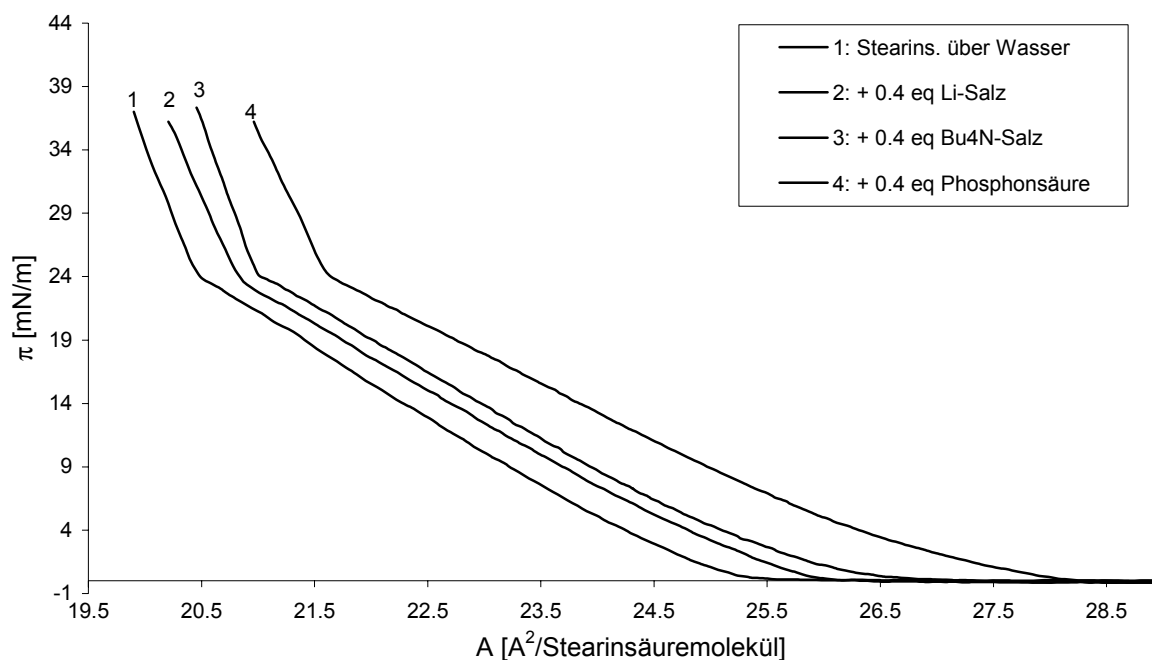
Der beobachtete Effekt beruht vermutlich auf einer Bindung des Gastes durch gelöste Wirtmoleküle in der Subphase und damit einem Ladungsausgleich der polaren Bisphosphonatgruppe. Der Komplex ist unpolarer als das freie Palmitinsäurebisphosphonat und wird daher bevorzugt gegenüber dem freien Liganden in die Monoschicht eingebaut.



**Abbildung 12:**  $\pi$ -A-Diagramme verschiedener Gäste in der Subphase unter einer Steirinsäuremonoschicht mit 0,4 Äquivalenten des Lithiumsalzes **6**. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Extrapolationen auf die x-Achse weggelassen worden.

Um einen stärkeren Effekt zu erzielen, wurde ebenfalls getestet, ob die unpolarere Phosphonsäure bzw. ihr Tetrabutylammoniumsalz aufgrund ihrer höheren Löslichkeit in Chloroform besser in die Lipidschicht eingelagert werden.

Abbildung 13 zeigt die verschiedenen Rezeptoren im Überblick. Während das Lithiumsalz und das Tetrabutylammoniumsalz einen ähnlich großen Effekt zeigen, lagert sich die protonierte Phosphonsäure sehr gut in die Monoschicht ein.



**Abbildung 13:**  $\pi$ -A-Diagramme der einzelnen Wirte bei Einlagerung in die Lipidmonoschicht.

Da die Phosphonsäure **7** die größte Tendenz zur Einlagerung zeigt, wurden ihr ebenfalls verschiedene kationische Gäste in der Subphase angeboten. Es zeigte sich jedoch bei keinem dieser Gäste ein zusätzlicher  $\pi$ /A-Effekt. Offensichtlich besitzt die Phosphonsäure eine geringere Wasserlöslichkeit und damit eine erhöhte Fähigkeit in die Lipidmonoschicht eingelagert zu werden, jedoch sind die Säuregruppen aufgrund der geringeren Dielektrizitätskonstanten und der unpolaren Umgebung an der Monoschicht immer noch protoniert und somit durch das Wegfallen der ionischen Wechselwirkungen nicht in der Lage, in meßbarer Menge den Gast aus der Subphase zu komplexieren.

Eine weitere Erklärung wäre die Möglichkeit, daß sich hier bereits ein Überschuß an Bisphosphonaten in der Monoschicht eingelagert hat und eine zusätzliche Komplexierung mit dem Gast in der Subphase nicht zu einer weiteren Einlagerung führt.

Ähnliche Versuche wurden auch mit dem Tetrabutylammoniumsalz durchgeführt, jedoch zeigten sich dieselben Effekte wie beim Lithiumsalz. Das Gegenion hat also keinerlei Auswirkungen auf die Einlagerungstendenzen oder die Komplexierungsfähigkeit an der Grenzfläche.

Es muß allerdings betont werden, daß diese Modellexperimente in wäßrigem Medium selbst bei geringen Konzentrationen (0.1  $\mu$ M) Hinweise auf eine Komplexierung von Argininen in Peptiden und Proteinen schon durch die einfache Bisphosphonateinheit liefern. Im Hinblick auf die kaum meßbare Einzelwechselwirkung ist dies ein guter Hinweis auf Multivalenz. Eine

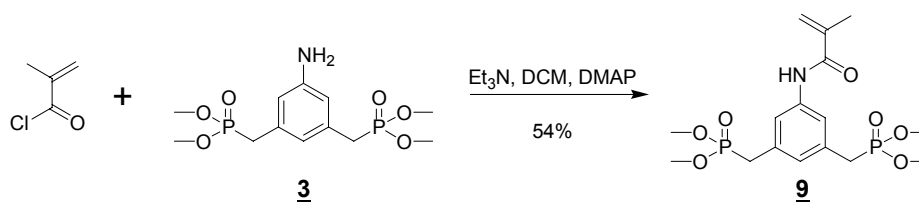


kovalente Vervielfältigung dieses einfachen Bindungsmotivs sollte die Bindung von Proteinen auch in freier wäßriger Lösung möglich machen.

### 3.3 Polymere Bisphosphonate

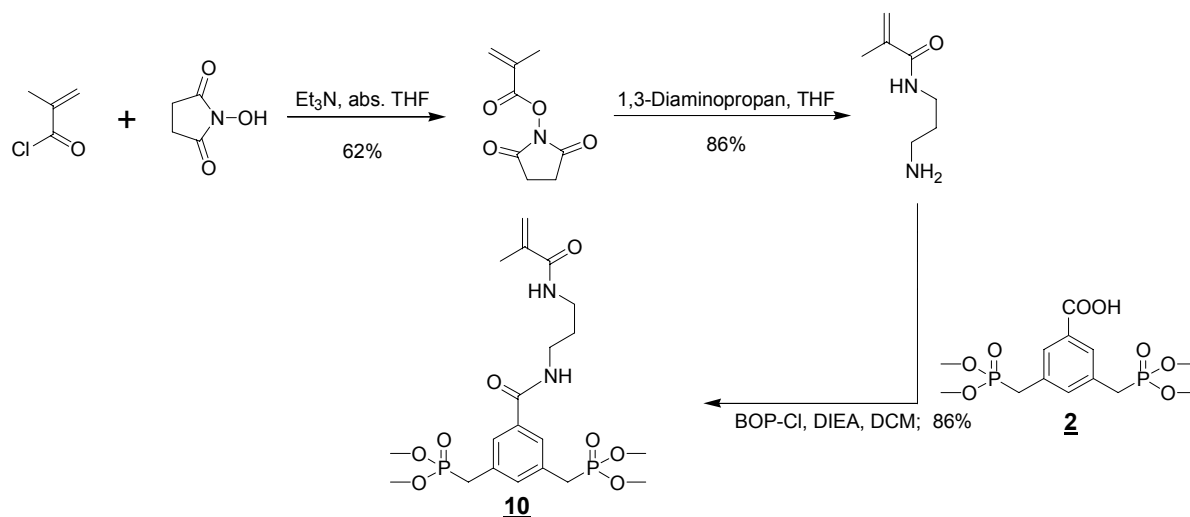
Einen schnellen Zugang zur Darstellung multivalenter Liganden sollte eine radikalische Polymerisierung geeigneter monomerer Bisphosphonateinheiten bieten. Hierzu ist die Synthese solcher Bausteine mit radikalisch polymerisierfähigen Gruppen notwendig. Dies geschieht am einfachsten über die Anknüpfung eines Methacrylsäureamids direkt an den Baustein **3** oder über einen Linker an den Baustein **2**.

Die Reaktion des Aminobisphosphonates **3** mit Methacrylsäurechlorid erfolgte in absolutem Dichlormethan mit frisch destilliertem Triethylamin als Hilfsbase und geringen Mengen DMAP (Abbildung 14). Das DMAP ist hierbei entscheidend. In Abwesenheit findet keinerlei Reaktion statt. In Gegenwart einer katalytischen Menge jedoch verläuft die Reaktion mit einer Ausbeute von 54% nach Aufarbeitung.



**Abbildung 14:** Darstellung des Monomerbausteins **9** aus dem Aminobisphosphonat **3**

Wie erste Versuche gezeigt haben, polymerisiert der Baustein **9** durch einfache Zugabe von AIBN in Lösungsmitteln wie Benzol oder Dichlormethan bei 60°C ohne Schwierigkeiten. Wünschenswert ist eine Variationsmöglichkeit des Abstandes zwischen Bisphosphonat und Polymerrückgrat. Durch die Einführung eines Diaminlinkers wie zum Beispiel 1,3-Diaminopropan in die Bisphosphonatcarbonsäure **2** sind unterschiedliche Abstände wählbar (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Darstellung des Monomerbausteins **10** mit flexiblem Linker.

Auch dieser Monomerbaustein zeigte gute Polymerisationseigenschaften. Da er selten als kristallines und festes Produkt erhalten werden konnte, mußte das zähe Öl bei Temperaturen < 0°C gelagert werden, da sonst in manchen Fällen eine spontane Polymerisation erfolgte.

Ein großer Vorteil der polymeren Bisphosphonate ist ihre leichte und schnelle Zugänglichkeit, und die dabei erzeugten Polymere besitzen eine große Anzahl an Erkennungseinheiten. Allerdings zeichnen sie sich auch durch eine recht breite Verteilung ihrer Molmassen aus. Hierdurch kommt es immer zu einer uneinheitlichen Stöchiometrie bei Bindungsstudien, was die Berechnung von Bindungskonstanten erschwert. Eine wesentlich engere Molgewichtsverteilung ist unter der Verwendung lebender Polymerisationstechniken wie ATRP<sup>[54, 55]</sup>, RAFT<sup>[56, 57]</sup> oder TEMPO-Polymerisationen<sup>[58]</sup> zu erreichen. Wie die Literatur zeigt, ist allerdings auch bei diesen Polymerisationstechniken selbst bei Polydispersitäten von weniger als 1.2 die Molmassenverteilung ziemlich breit.

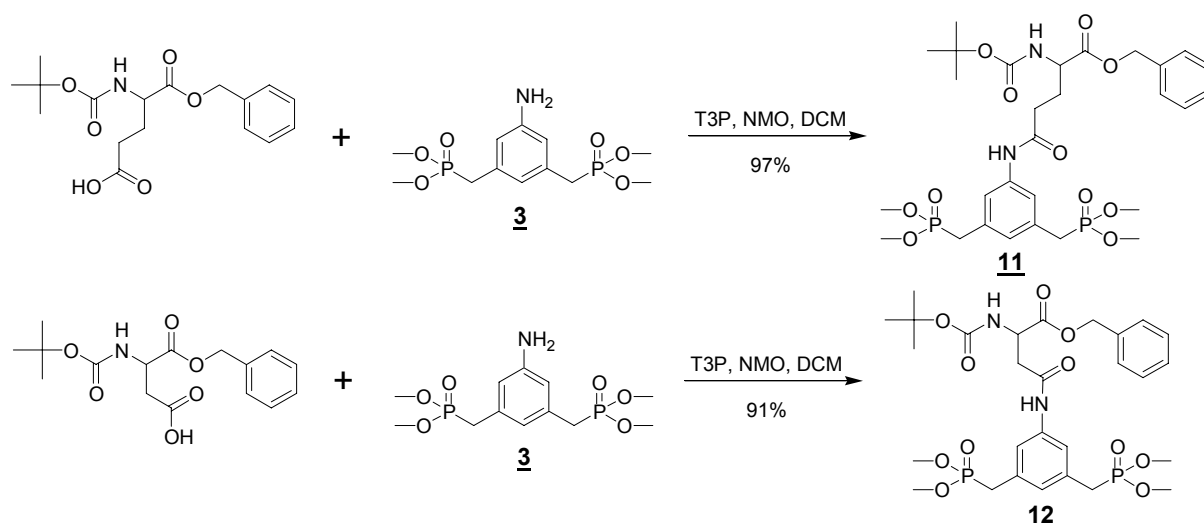
Die hier gelegten Grundlagen wurden von *Renner* in seiner Diplom- und Doktorarbeit verfolgt<sup>[59, 60]</sup>. Daher konnte der Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Darstellung definierterer, monomodaler Erkennungseinheiten gelegt werden.

### 3.4 Oligomere mit Proteinrückgrat

Eine Möglichkeit, mit monodispersen Bausteinen hohe Molmassen zu erreichen, besteht in der Verwendung von Aminosäurebausteinen. Diese unnatürlichen Aminosäuren sollten sich durch sequentielle Peptidsynthese zu klar definierten Oligomeren mit variablen Längen verknüpfen lassen. Zudem können die Abstände zwischen den Pinzetteneinheiten durch die Veränderung der Abfolge zwischen natürlichen und unnatürlichen Aminosäuren variiert werden und so maßgeschneiderte Liganden designt werden. Zusätzlich bietet dieser Ansatz die Flexibilität weitere Erkennungseinheiten einzufügen und auch die Sekundärstruktur dieser künstlichen Liganden gezielt zu verändern.

Zunächst muß also eine unnatürliche Aminosäure dargestellt werden, die in der Peptidsynthese Verwendung finden kann. Dazu wurde auf die Bisphosphonatbausteine **2** und **3** zurückgegriffen, die sich über eine einfache Amidknüpfung an die Seitenketten von Lysin und Ornithin im (Falle von **2**) und Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure (im Falle von **3**) anbringen lassen.

Die Reaktion der geschützten Glutaminsäure mit Baustein **3** mit T3P verlief nahezu quantitativ. Die  $\alpha$ -Carboxyfunktion wurde dabei zunächst über einen Benzylester und die Aminofunktion über eine *tert*-Butyloxycarbonylgruppe (Boc) geschützt (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Synthese des Aminosäurebausteins **11** aus Boc-Glu-OBz und **3** sowie **12** aus Boc-Asp-OBz und **3**.

Bei einer alternativen Synthese unter Verwendung des Carbonsäurebausteins **2** und den geschützten Aminosäuren Z-Lys-OtBu bzw. Z-Orn-OtBu liefert die Kupplung mit T3P geringere Ausbeuten von 66% bzw. 61%. Bessere Ausbeuten brachte die Verwendung von

BOP-Cl als Kupplungsreagenz. Jedoch besitzt das käuflich zu erwerbende BOP-Cl nicht die gewünschte Aktivität; in den meisten Fällen konnte dabei keine Reaktion beobachtet werden. Nur wenn das BOP-Cl frisch hergestellt wurde<sup>[46]</sup>, verliefen die Synthesen mit Ausbeuten von 83% bzw. 86% (Abbildung 17).

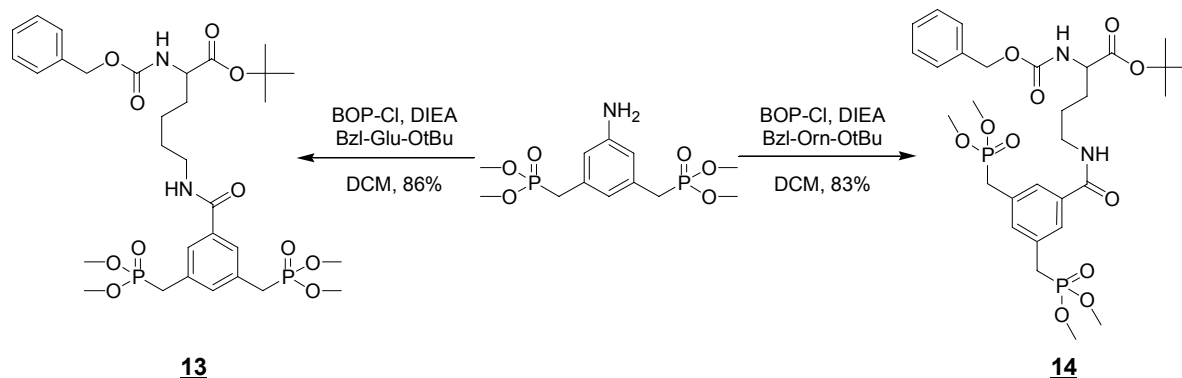


Abbildung 17: Synthesen der Bausteine **13** und **14**.

Um zu testen, ob die Anknüpfung eines derart großen Restes an die Bisphosphonateinheit merkliche Unterschiede in der Bindungsaffinität zu Arginin hervorruft, wurden bei dem Monomerbaustein **11** mit Lithiumbromid selektiv zwei der Phosphonsäuremethylester gespalten (Abbildung 18) und das Produkt **15** mit *N*- und *C*-geschütztem Arginin in Methanol mittels NMR-Shift-Titration untersucht (siehe Experimenteller Teil).

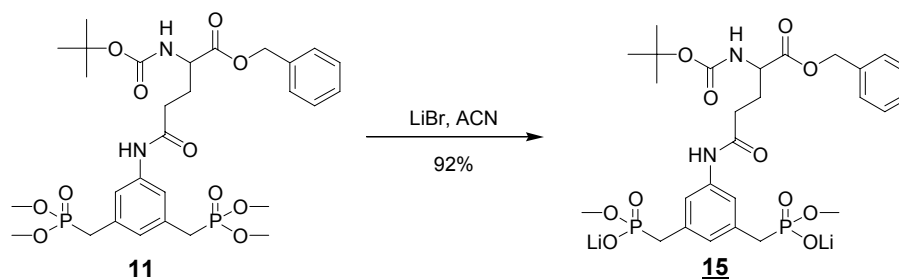


Abbildung 18: Lithiumbromidspaltung des Bausteins **11**

Dabei ergab sich wie schon bei dem einfachen Bisphosphonatbaustein **16**<sup>[48]</sup> eine Bindungskonstante von  $K_a = 800 \text{ M}^{-1} \pm 8 \%$ . Der sperrige Aminosäurerest hat also beim Monomerbaustein keinerlei negative Auswirkungen auf die Argininbindung. Im Folgenden wird die Synthese der Oligomeren nach zwei verschiedenen Strategien beschrieben.

### 3.4.1 Lösungssynthese der oligomeren Bisphosphonate

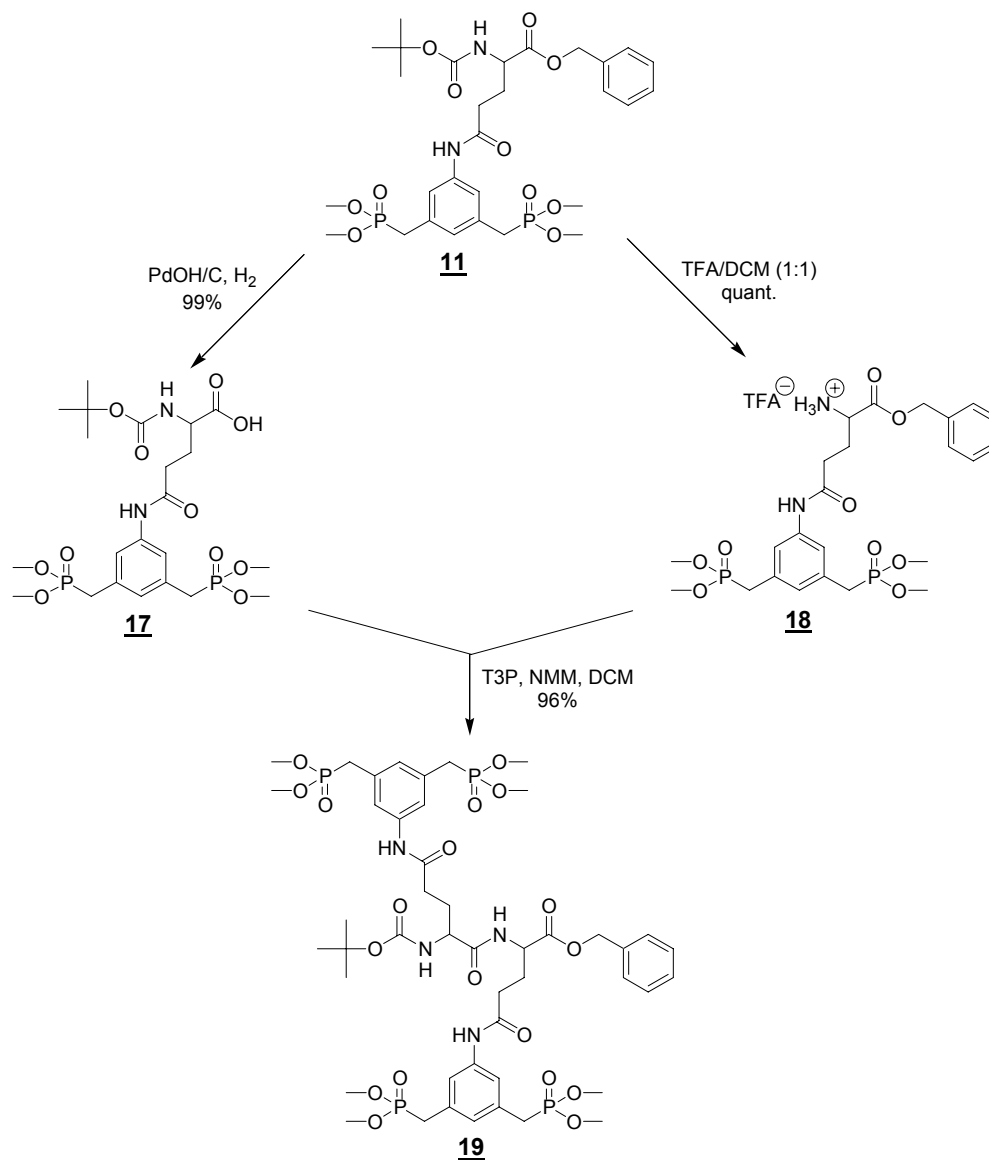
Für die Beschreibung der Synthese der bisphosphonatmodifizierten Peptide wird im wesentlichen der Baustein **11** verwendet. Ähnliche Versuche wurden auch mit den anderen Bausteinen **12**, **13** und **14** zum Teil durchgeführt, jedoch ergaben sich bei diesen keine Verbesserungen in der Synthese.

Die Synthese erfolgte analog der klassischen konvergenten Lösungssynthese von Peptiden. Zunächst wird eine Hälfte des Bausteins **11** C-terminal entschützt und die andere Hälfte N-terminal Boc-entschützt (Abbildung 19). Dabei konnte mit der Benutzung von feuchtem Palladiumhydroxid auf Kohle bei einem Wasserstoffdruck von einem Bar das Produkt **17** in guter Ausbeute erhalten werden.

Die Boc-Entschütung erfolgte in Trifluoressigsäure/Dichlormethan (1:1) mit quantitativem Umsatz zum TFA-Salz **18**.

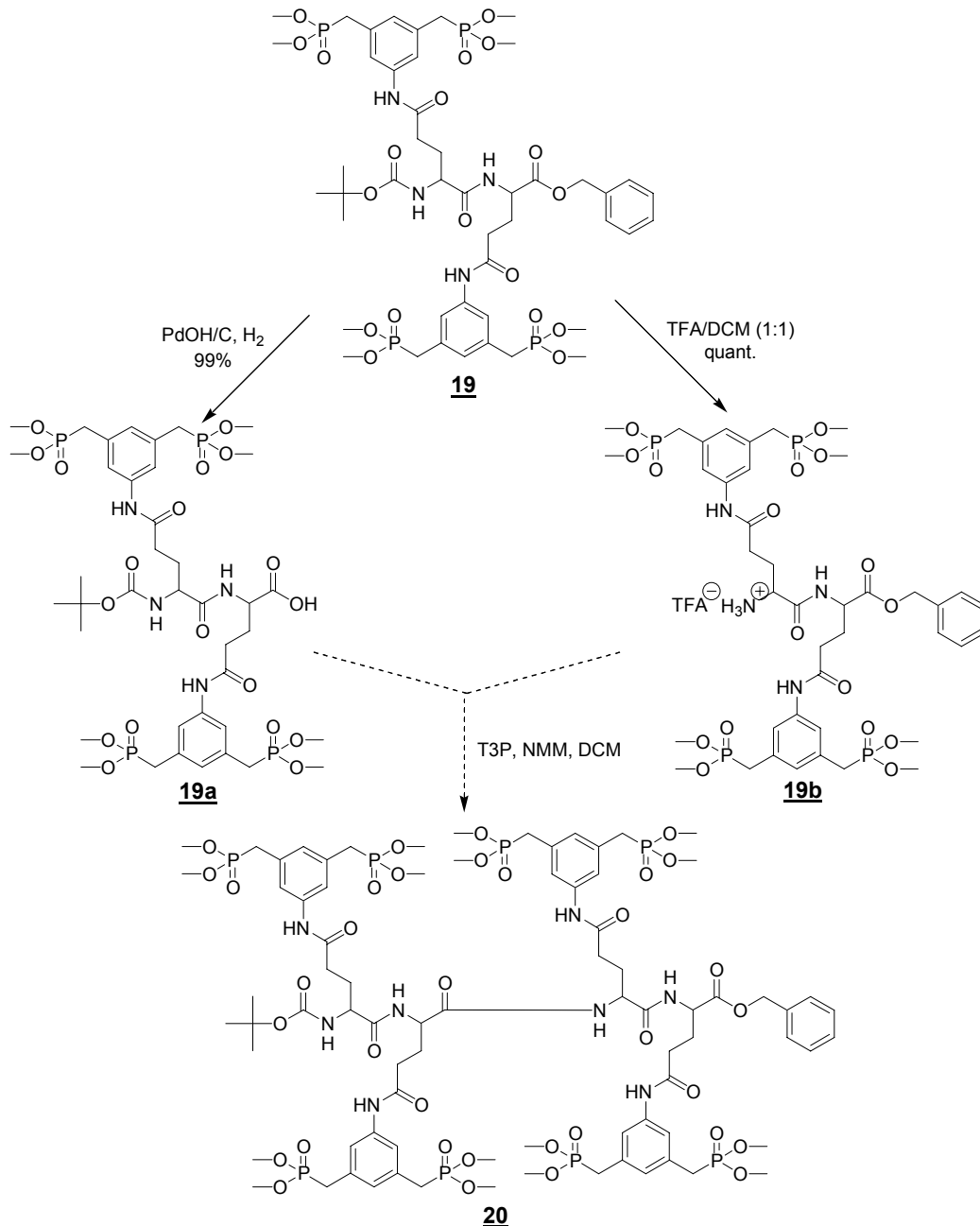
Anschließend wurden die Bausteine **17** und **18** miteinander verknüpft. Dabei wurden verschiedene Peptidkupplungsreagenzien getestet. Das beste Ergebnis brachte T3P mit einer Ausbeute an **19** von 97%. Auch die säulenchromatographische Aufreinigung, die sich bei dem Dimer schon als wesentlich schwieriger als beim Monomer gestaltete, konnte bei der Verwendung dieses Kupplungsreagenzes besser als bei den anderen durchgeführt werden. Bei PyClOP, TBTU und PyBOP gelang es nicht auch bei mehrfacher säulenchromatographischer Aufreinigung das Kupplungsreagenz von dem Produkt abzutrennen. Eine Trennung durch Ausschütteln fiel durch die gute Löslichkeit der Bisphosphonatderivate in nahezu allen Lösungsmitteln und die Eigenschaft dieser Derivate, Nebenprodukte in die andere Phase „mitzuschleppen“ von vorneherein aus.

Nach teilweise zweimaliger säulenchromatographischer Aufreinigung bei Verwendung von T3P konnte das Produkt jedoch sauber erhalten werden.



**Abbildung 19:** Lösungssynthese der oligomeren Bisphosphonate mit Peptidrückgrat. Entschützung des Monomers **11** zu den Bausteinen **17** und **18** sowie der Verknüpfung mit T3P zum Dimeren.

Für die weitere Synthese wurde das Dimer an *N*- und *C*-Terminus entschützt und versucht dieses jeweils mit komplementär entschütztem Monomer oder Dimer zum Trimer oder Tetramer umzusetzen (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Geplante Synthese des Bisphosphonat Tetramers **20**. Die Verknüpfungen mit **17** oder **18** zum Trimer wurde analog durchgeführt.

Dabei verschärfte sich jedoch die bereits beim Dimer beobachtete Aufreinigungsproblematik. Laut DC-Kontrolle konnte bei dieser Reaktion ein deutlicher Umsatz beobachtet werden. Es entstand jedoch ein Reaktionsgemisch, dessen anschließende Aufreinigung nicht gelang. Versuche, die Mischung durch andere Reinigungsmethoden wie Ausschütteln, HPLC oder MPLC aufzutrennen, zeigten keinerlei Erfolg. Da sich bei der Lithiumbromidsplaltung das Lithiumsalz der Phosphonate oft als sauberer weißer Feststoff abschied, wurde versucht, das Reaktionsgemisch direkt für diese Reaktion einzusetzen. Es zeigte sich jedoch in den NMR-Spektren des entstehenden Niederschlags ein Gemisch der verschiedensten Produkte

zusammen mit Verunreinigungen durch die Kupplungsreagenzien der Vorstufen. Auch konnten verschiedene Zersetzungsprodukte des Trimers bzw. Tetramers beobachtet werden. HPLC-MS-Untersuchungen der Mischungen vor und nach der Lithiumbromidsplaltung zeigen zwar, daß sich das gewünschte Produkt in geringen Mengen gebildet hatte, aber alle weiteren Aufreinigungsversuche blieben erfolglos.

Das Dimer **19**, das in sehr guten Ausbeuten erhalten wurde, wurde für die NMR-Shift-Titration mit einem Diargininbaustein mit Lithiumbromid in Acetonitril methylesterentschützt (Abbildung 21).

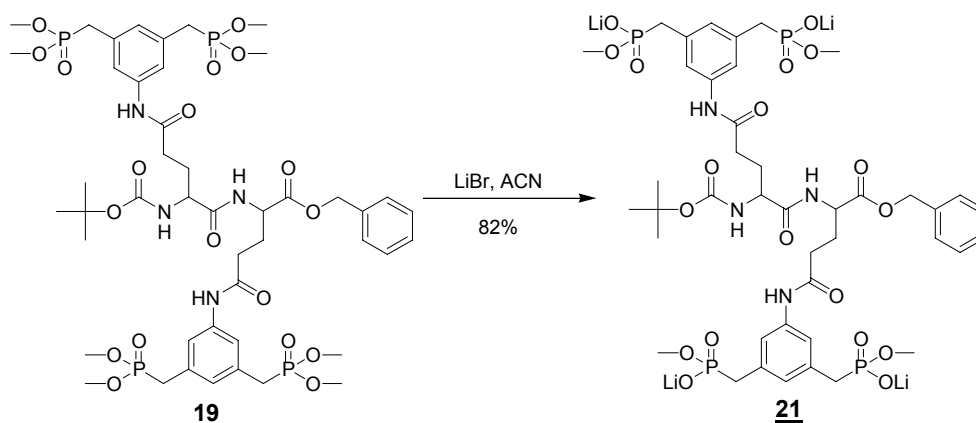


Abbildung 21: Lithiumbromidsplaltung des Dimers **19**.

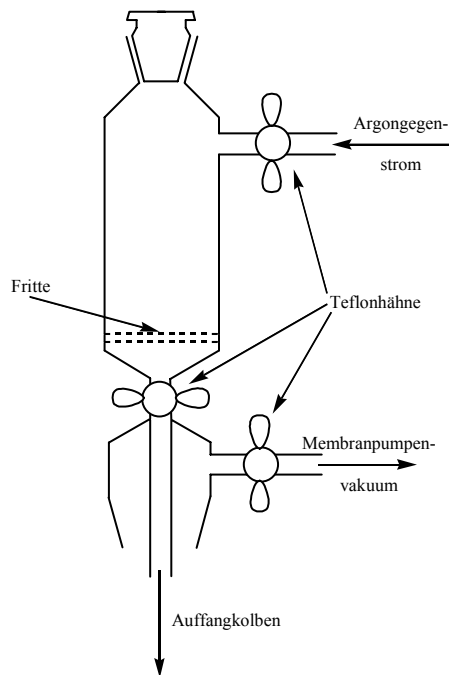
Die NMR-Titration des Tetraphosphonats **21** gegen das einfache Diarginin H-Arg-Arg-OH erfolgte in Methanol (eine entsprechende Titration in Wasser zeigte leider keine erkennbaren Shifts der Protonensignale). Verfolgt wurden jeweils die Aromatensignale des Bisphosphonats sowie die verbleibenden Methylgruppen des Phosphonsäureesters. Es ergab sich eine gemittelte Bindungskonstante von  $K_a = 2000 \text{ M}^{-1} \pm 17\%$ . Dies ist schon eine deutliche Steigerung gegenüber dem Monomer mit etwa  $800 \text{ M}^{-1}$ . Für eine starke Bindung unter physiologischen Bedingungen zeigt sich die Verwendung von zwei Bisphosphonatbausteinen jedoch als noch nicht ausreichend.

Die Synthese höherer Oligomeren ab dem Trimer wurde mit einer anderen Strategie weiter verfolgt. Einerseits wurde versucht (wie im folgenden Kapitel 3.4.2 beschrieben), die Synthese auf die feste Phase zu übertragen, da in diesem Falle eine Aufreinigung der Zwischenprodukte entfällt und das Endprodukt ohne große Verunreinigung durch andere Reagenzien vom Harz abgespalten werden kann. Andererseits wurde versucht, zunächst das Peptidrückgrat aufzubauen und anschließend die Bisphosphonateinheiten in einem einzigen Syntheseschritt gleichzeitig anzuknüpfen.



### 3.4.2 Festphasensynthese der oligomeren Bisphosphonate

Im vorhergehenden Kapitel wurde die Synthese von Bisphosphonatoligomeren in Lösung beschrieben. Dabei lag die Schwierigkeit in erster Linie an der schlechten Aufreinigungsmöglichkeit. Die Synthese an der festen Phase scheint dabei eine vielversprechende Alternative zu sein. Dabei wird die Aminosäure *N*-terminal geschützt an den Linker auf einem Polymerträger angeknüpft; nach Entschützung des *N*-Terminus kann das Peptid konsekutiv aufgebaut werden. Der Vorteil hierbei besteht darin, daß das Harz nach jedem Kupplungsschritt gewaschen werden kann, und keine weitere aufwendige Reinigung vonnöten ist. Der Nachteil ist, daß bis auf den NF31-Farbttest<sup>[61]</sup> und den Kaisertest<sup>[62]</sup> keine Möglichkeit für eine Überprüfung der Vollständigkeit der Kupplung besteht. Bei beiden Tests wird auf *N*-terminale, freie Aminogruppen getestet. Da für die Festphasensynthese Luft- und Wasserausschluß notwendig sind und trotzdem eine einfache Handhabung des Harzes wünschenswert ist, wurde ein Reaktor für die Festphasensynthese entwickelt (Abbildung 22).

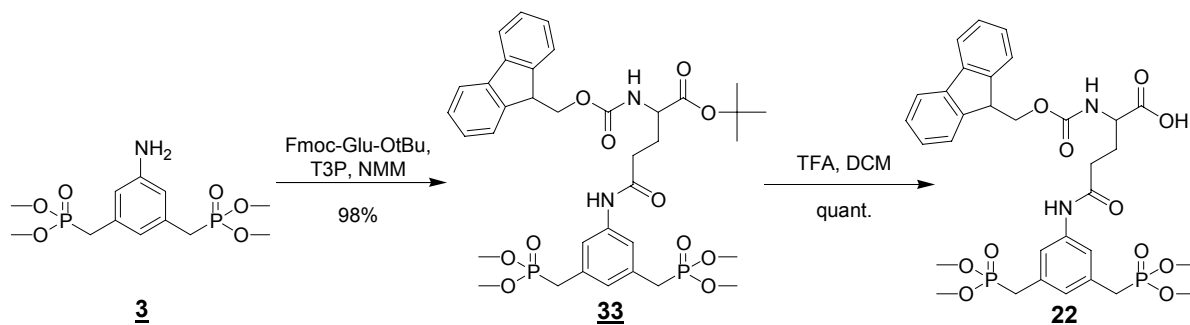


**Abbildung 22:** Festphasenreaktor zur Synthese von Peptiden mit SPPS-Protokoll unter Inertatmosphäre.

Dabei ruht das Harz während aller Arbeitsschritte in einer Inertatmosphäre auf einer Glasfritte und kann somit jederzeit im Argongegenstrom befüllt und gespült werden.

Als Harz wurde ein Wang-Harz auf Polystyrolbasis verwendet, das als Spaltungsgruppe einen säurelabilen Benzylester besitzt.

Bei Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die Boc-SPPS aufgrund der Labilität des Bisphosphonats **11** nicht benutzt werden konnte. Es mußte also zunächst eine neue modifizierte Aminosäure dargestellt werden, die für die Fmoc-SPPS Verwendung finden kann. Dabei wurde das aminofunktionalisierte Bisphosphonat **3** mit der käuflichen Aminosäure Fmoc-Glu-OtBu umgesetzt. Dies gelang mit dem Kupplungsreagenz T3P auch in ausgezeichneten Ausbeuten. Anschließend wurde die Carboxyschutzgruppe in Dichlormethan mit Trifluoressigsäure entfernt (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Darstellung des Bisphosphonatmodifizierten Festphasenmonomers **22**.

Ein kritischer Punkt bei der Festphasensynthese ist die Beladung des Harzes mit der ersten Aminosäure. Diese Reaktion verläuft in den meisten Fällen nicht vollständig und freie reaktive Gruppen am Harz könnten für den weiteren Verlauf der Synthese nachteilig sein. Somit wurde im ersten Schritt eine Aminosäure gewählt, deren Anknüpfung ohne Probleme vonstatten geht. Fmoc-Gly läßt sich, wie Testabspaltungen gezeigt haben, in nahezu quantitativem Umsatz an das Harz bringen. Nach zweifacher Inkubation des Harzes mit der DIC/DIEA-aktivierten Aminosäure, wurde mit 20% Piperidin in DMF die Fmoc-Gruppe abgespalten. Der anschließende NF31-Farbttest verlief deutlich positiv. Als nächstes sollte die erste Bisphosphonatmodifizierte Glutaminsäure **22** angeknüpft werden. Dafür wurden verschiedene Kupplungsreagenzien ausprobiert. Mit dem Kaisertest und dem NF31-Farbttest konnte auf vollständige Kupplung überprüft werden. DIC/DIEA, HBTU/HOAT bzw. TBTU/HOAT und T3P/NMM brachten hierbei keine großen Erfolge. Die Tests verliefen auch bei teilweise dreimaliger Kupplung positiv. Erst HCTU/HOBT zeigte nach zweimaliger Kupplung ein negatives Resultat im Test. Nach Entschützung der N-terminalen Fmoc-Gruppe mit 20% Piperidin in DMF wurde das Dipeptid als Testsubstanz vom Harz abgespalten. Dies erfolgte mit TFA/DCM 1:1 (Abbildung 24).

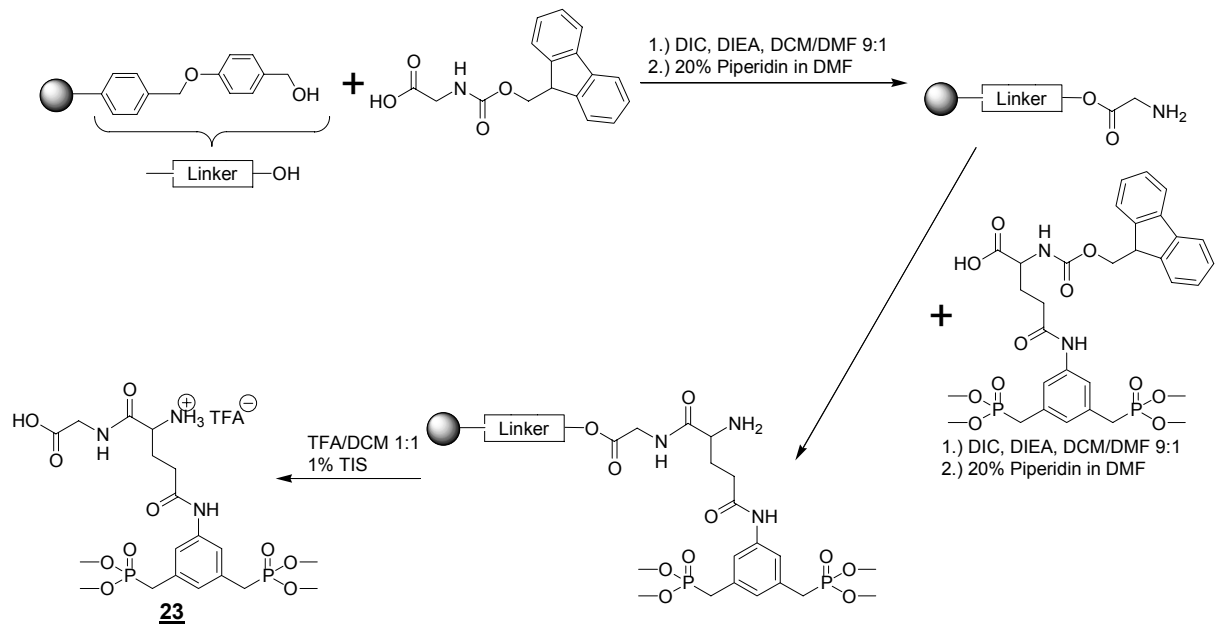
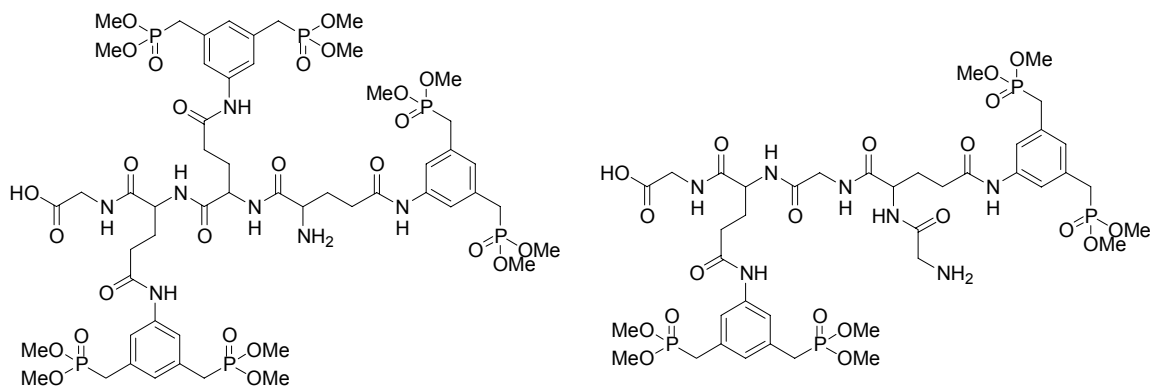


Abbildung 24: Festphasensynthese des Testdipeptids **23**

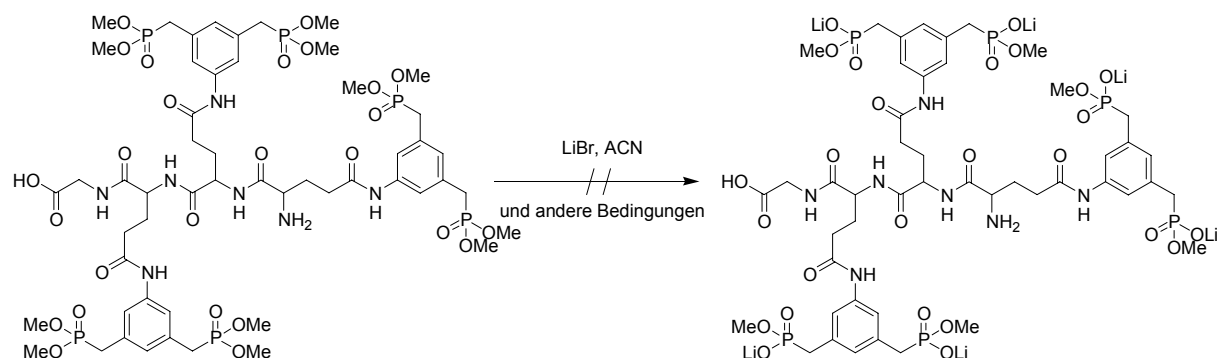
Diese erste Testkupplung verlief mit zufriedenstellenden Ausbeuten, so daß im folgenden versucht wurde größere Bisphosphonatoligomere nach dem gleichen Schema herzustellen. Einerseits wurden dabei Oligomere angestrebt, die die Bisphosphonateinheiten in direkter Nachbarschaft tragen, andererseits solche, die abwechselnd aus Bisphosphonataminosäuren und Glycin bestehen sollten. Letztere wurden auch aus dem Grunde angestrebt, daß mit zunehmender Kettenlänge bei reinen Bisphosphonatoligomeren die Kupplungen in immer schlechteren Ausbeuten erfolgten. Es sollte versucht werden diese durch sterische Hinderung hervorgerufene schlechtere Reaktivität durch Einführung von Glycin als Spacern zu umgehen.

Von den reinen Bisphosphonatglutaminsäureoligomeren konnte maximal das Trimer erreicht werden. Bei den abwechselnden Glycin-Bisphosphonatoligomeren entstand aufgrund der schlechten Kupplungsausbeute sogar nur jenes mit zwei Bisphosphonateinheiten (Abbildung 25). Beide waren jedoch nur in Gegenwart verschiedener Abbruchfragmente zu erhalten und konnten aufgrund der bekannten Probleme nicht aufgereinigt werden.



**Abbildung 25:** Mit der Festphasensynthese dargestellte jedoch nicht sauber erhaltene Oligomere.

Ein weiteres Problem in diesem Stadium war die Lithiumbromidspaltung der Phosphonatmethylester. Beim üblichen Refluxieren in Acetonitril fällt das gespaltene Produkt als weißer Niederschlag aus. Bei den Oligomeren mit mehr als zwei Bisphosphonaten setzt die Fällung jedoch bereits vor der vollständigen Spaltung der Methylester ein. Variationen des Lösungsmittels und der Spaltungsreagenzien brachten hierbei keine besseren Ergebnisse. In einigen Fällen wurde sogar eine Zersetzung des Produkts beobachtet.



**Abbildung 26:** Spaltung der Methylester der Phosphonatgruppen.

Für höhere Oligomere mußte deshalb erneut eine andere Synthesestrategie entwickelt werden. Diese ist näher im folgenden Kapitel 3.4.3 beschrieben.

### 3.4.3 Synthese des Peptidrückgrats mit anschließender Anknüpfung der Bisphosphonate

Eine weitere Strategie, die verfolgt wurde, um oligomere Bisphosphonate auf Peptidbasis zu erhalten, ist die vorausgehende Synthese des peptidischen Rückgrats des Oligomers und die anschließende Anknüpfung der Bisphosphonatgruppen an die Aminosäureseitenketten. Dabei wurde für die abschließende Bisphosphonateinführung in erster Linie das Augenmerk auf die Amidkupplung gelegt. Dabei kann der Bisphosphonatbaustein als Amin oder als Carbonsäure

verwendet werden. Die oligomeren Peptide müssen also entweder aus Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure oder aus Lysin bzw. Ornithin aufgebaut sein.

Die Synthese der oligomeren Peptide verlief weitestgehend problemlos sowohl an der festen Phase mit Fmoc-SPPS unter Verwendung von HCTU/Cl-HOBT als Kupplungsreagenzien als auch in Lösung mit Boc-SPPS unter Verwendung von HBTU/HOBT (siehe experimenteller Teil).

Das synthetische Hauptproblem bestand in der anschließenden Amidknüpfung zwischen dem Bisphosphonat und den Seitenketten der Aminosäuren. Bei dem Monomer lieferte schon T3P als Kupplungsreagenz die besten Ergebnisse für die Reaktion zwischen Bisphosphonat und Glutaminsäure. Im Falle der Bisphosphonatcarbonsäure ergab die Umsetzung mit BOP-Cl die höchsten Ausbeuten.

Die Aufreinigung nach multiplen Kupplungsschritten erwies sich auch bei dieser Synthesestrategie als der begrenzende Faktor. Als Maximum konnte ein Trimer sauber erhalten werden. Genau wie auch im vorhergehenden Kapitel ergibt sich aber auch hier wieder das Problem der Methylesterspaltung, die beim Monomer und Dimer problemlos und in guten Ausbeuten erfolgt, aber im Falle des Trimers bereits nur unvollständig erfolgt oder zur Zersetzung im Laufe der Reaktion führt.

Für eine Synthese höherer Oligomere muß also die gesamte Synthesestrategie erneut umgestellt werden, wie im nachfolgenden Kapitel gezeigt wird.

Prinzipiell ist die sequentielle, modifizierte Peptidsynthese für die Darstellung spezifischer Erkennungsmoleküle ein interessanter Ansatz, jedoch birgt sie mit den Bisphosphonaten das große Problem der Ausreinigung der Reaktionsprodukte und mußte daher aufgegeben werden.

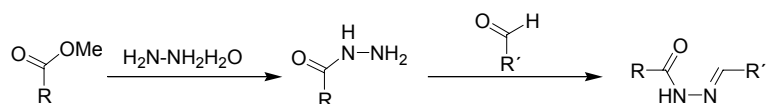
### **3.5 Oligomere mit Dendrimeren als Rückgrat**

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, besteht die größte Schwierigkeit der Synthese der Oligomeren in ihrer Aufreinigung. Ideal wäre also eine Synthese, bei der erst die letzte Reaktion die Bisphosphonate einführt und keine Aufreinigung benötigt wird. Dabei sollte das Bisphosphonat möglichst direkt als Lithiumsalz eingeführt werden, da eine polymeranalogue Spaltung nur mit schlechten Ausbeuten durchzuführen ist. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Reaktionen auf ihre Praktikabilität und Anwendbarkeit untersucht. Wichtig ist dabei vor allem die Frage nach dem Rückgrat, das die Bisphosphonatgruppen tragen soll.

Neben linearen Oligomeren kommen auch dendrimere Grundkörper dafür in Frage. Der Vorteil der Dendrimere liegt in ihrer einfachen Zugänglichkeit. Zudem sind eine Reihe von ihnen auch käuflich zu erwerben.

### 3.5.1 Hydrazonbildung

Eine literaturbekannte Reaktion, die in vielen Fällen gute Ergebnisse liefert, ist die Umsetzung eines Hydrazins mit einem Carbonsäuremethylester und anschließende Reaktion des entstandenen Hydrazids mit einem Aldehyd zum Acylhydrazon (Abbildung 27). Von *Kiedrowski et al.* verwendeten diesen Ansatz, um in wässriger Lösung drei verschiedene ungeschützte DNA-Stränge durch einen dreiteiliges komplementäres Templat mit guten Ausbeuten an einen gemeinsamen Träger zu knüpfen<sup>[63]</sup>.



**Abbildung 27:** Allgemeines Reaktionsschema zur Darstellung von Hydrazonen

Zunächst wurde versucht, den einfachen Benzoesäureester und einen Trimesinsäuretrimethylester zum Hydrazid umzusetzen und durch anschließende Reaktion mit dem Bisphosphonatbenzaldehyd **4** die Bisphosphonatfunktionalität einzuführen. Die entsprechenden Hydrazide waren jedoch extrem unlöslich in allen Lösungsmitteln und nur unter Zersetzung in saurer wässriger Lösung aufzunehmen. Auch die Einführung des Hydrazids an einen Aminosäuregrundkörper wie dem geschützten Glutaminsäuremethylester führte zu einem unlöslichen Produkt. Bei einer Umsetzung von Hydrazinhydrat mit 3,5-Bis[dimethoxyphosphonylmethyl]benzoesäuremethylester **24** entstand ein schwer lösliches, zähflüssiges Öl, das jedoch mit verschiedenen Aldehyden keine weitere Reaktion zeigte.

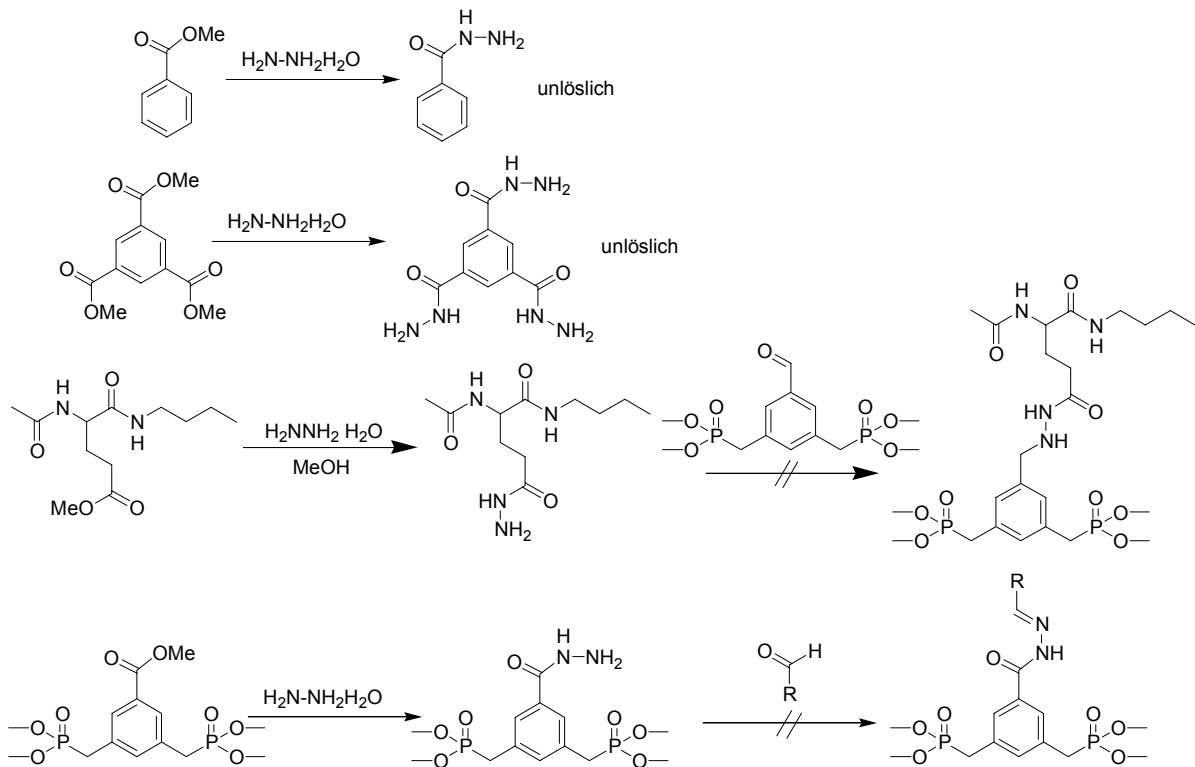


Abbildung 28: Darstellung verschiedener Hydrazide zur Umsetzung mit einem Aldehyd zum Hydrazon.

Die Reaktion ist somit nicht praktikabel für die gegebene Problemstellung.

### 3.5.2 Reduktive Aminierung

Eine weitere literaturbekannte Reaktion, die in nichtwässrigem Medium oftmals gute Ausbeuten liefert, ist die Iminbildung zwischen einem Amin und einem Aldehyd.

In dieser Arbeit konnte durch Umsetzung des Bisphosphonatbenzaldehyd-Bausteins **4** mit Benzylamin in absolutem Dichlormethan das entsprechende Imin erfolgreich in quantitativer Ausbeute hergestellt werden.

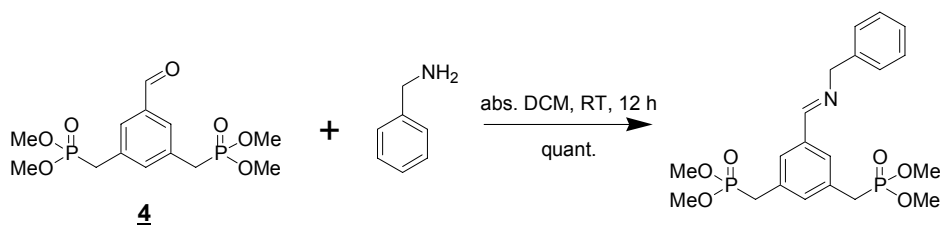
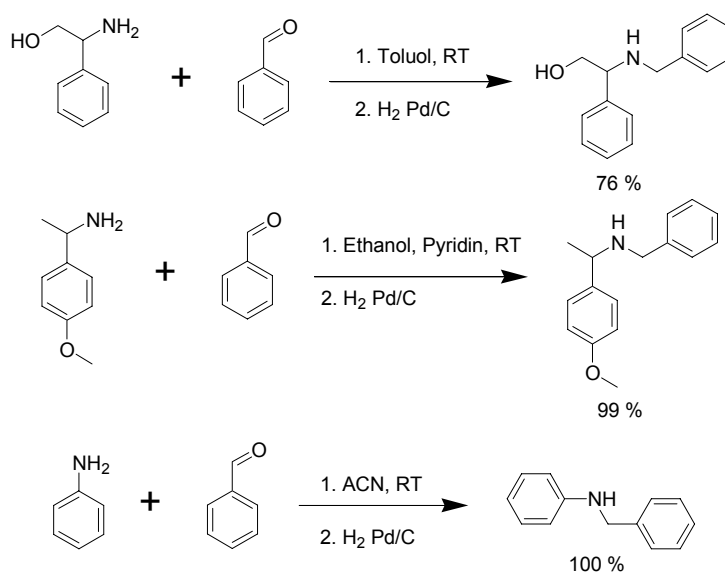


Abbildung 29: Umsetzung des Bisphosphonatbenzaldehyds **4** mit Benzylamin zum entsprechenden Imin.

Dieses ist jedoch keinesfalls gegenüber Wasser stabil und zerfällt bereits nach einer Stunde bei geringer Wasserzufuhr (Luftfeuchtigkeit reicht aus) wieder in seine Ausgangsstoffe.

Das Imin muß also zum entsprechenden Amin reduziert werden, um ein stabiles Produkt zu erhalten, das auch für die Anwendung in wäßrigem Medium geeignet ist. In der Literatur geschieht dies in den meisten Fällen *in situ* mit Natriumcyanoborhydrid, da dieses selektiv nur das Imin zum Amin reduziert und nicht den Aldehyd zum Alkohol<sup>[64]</sup>. Das vorliegende Bisphosphonat-Imin war jedoch völlig unreaktiv gegenüber Natriumcyanoborhydrid.

In der Literatur war in einigen Fällen beobachtet worden, daß das Imin auch selektiv mit Wasserstoff und Palladium auf Kohle zum Amin reduziert werden konnte, ohne das entstehende Benzylamin weiter zu hydrieren (Abbildung 30). Diese Reaktion hätte den Vorteil, das das Reduktionsmittel und der Katalysator einfach von dem Reaktionsmedium abgetrennt werden könnten.



**Abbildung 30:** Literaturbekannte Beispiele für reductive Aminierungen mit Wasserstoff und Palladium auf Kohle.<sup>[64, 65]</sup>

Im vorliegenden Fall gelang es jedoch nicht, das sekundäre Amin zu erhalten. Die Reaktion verlief unter den in Abbildung 30 dargestellten und auch einigen weiteren Bedingungen in allen Fällen bis zur Spaltung des Benzylamins.

Das gegenüber dem Natriumcyanoborhydrid wesentlich reaktivere Natriumborhydrid hingegen reduzierte das Imin quantitativ zum entsprechenden Amin. Dabei galt es jedoch stets zunächst die vollständige Bildung des Imins abzuwarten, bevor das Borhydrid zugegeben werden konnte, da eine *in situ* Zugabe den Aldehyd ebenfalls sehr leicht zum Alkohol reduziert.

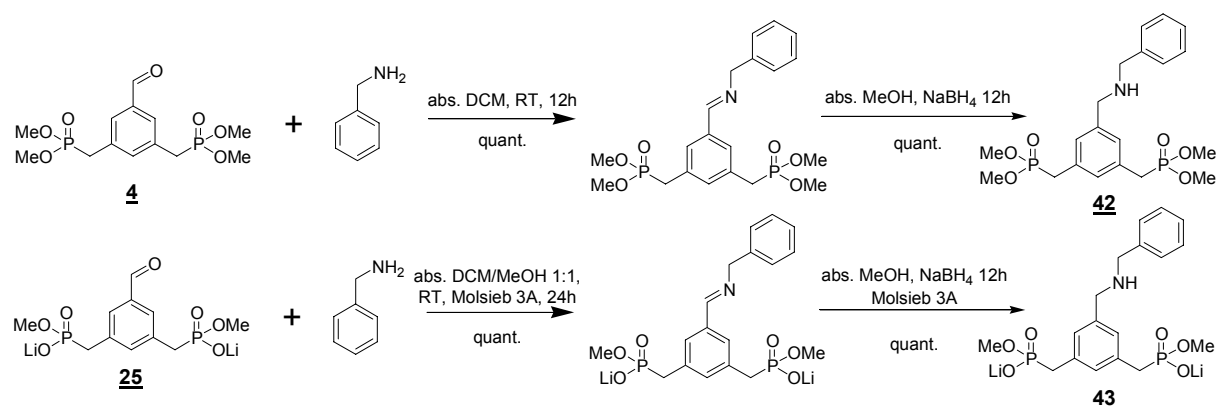
Bei der Durchführung der Reaktion ist es darüber hinaus sinnvoll das Lösungsmittel im Verlauf der Reaktion zu wechseln, da die Iminbildung schneller und vollständiger in



absolutem Dichlormethan verläuft und das Imin nur in absolutem Methanol quantitativ zum Amin reduziert wird.

Diese Reaktionsführung macht es notwendig nach der Reaktion die entstehenden Natrium- und Borsalze über eine HPLC abzutrennen. Einfacher wäre die Verwendung festphasenimmobilisierter Borhydride, wie sie als PSCBH (festphasengebundenes Cyanoborhydrid) oder PSBH (festphasengebundenes Borhydrid) zur Verfügung stehen<sup>[66]</sup>. Es gelang Ley und Mitarbeitern mit PSCBH in einer Eintopfreaktion aus einem einfachen Benzylalkohol durch Oxidation mit Braunstein zum Aldehyd, anschließender Reaktion mit einem Amin zum Imin und dessen sofortiger Reduktion zum sekundären Amin eine Reaktionssequenz zu entwickeln, die quantitativ verlief und durch einfaches Abfiltrieren ein sauberes Produkt ergab<sup>[67]</sup>.

Bei Anwendung der festphasenimmobilisierten Hydride auf die Bisphosphonate zeigte sich erstaunlicherweise das Cyanoborhydrid reaktiver als das Borhydrid, völlig im Gegensatz zu den löslichen Reagenzien. Jedoch verlief die Reduktion mit beiden Reagenzien nicht zufriedenstellend. PSBH erbrachte nur eine Ausbeute von 20 – 30% und das PSCBH eine Ausbeute von 50 – 60%. Dies ist für eine polymeranaloge Anwendung jedoch viel zu gering. Es wurde daraufhin die Reaktionsführung mit löslichem Natriumborhydrid und anschließender Aufreinigung via HPLC beibehalten.



**Abbildung 31:** Reduktive Aminierung des Bisphosphonatbenzaldehyds in seiner ungespaltenen **4** und gespaltenen **25** Methylesterform.

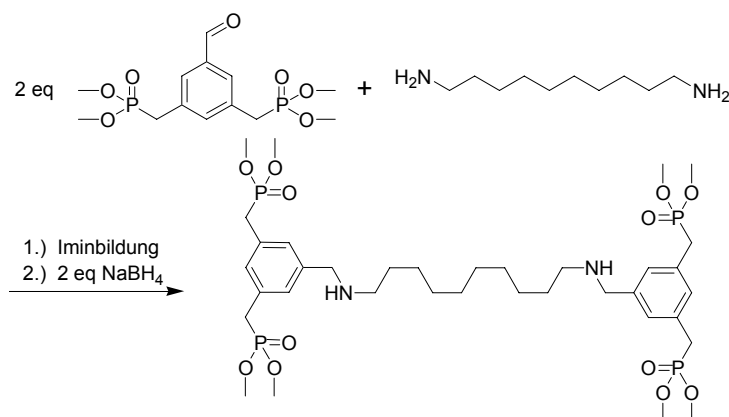
Eine weitere wichtige Zielsetzung war die Umsetzung mit dem bereits zum Dianion gespaltenen *m*-Xylylenbisphosphonsäureester. Hierbei erwies sich die geringe Löslichkeit des Bisphosphonatdilithiumsalzes **25** in Dichlormethan als hinderlich. Durch Zugabe von absolutem Methanol bis zu einem Verhältnis von DCM/MeOH von 1:1 konnte dieses Problem umgangen werden, jedoch waren längere Reaktionszeiten und die Zugabe von Molekularsieb 3 Å zum Abfangen des entstehenden Wassers notwendig.

Die Anwendung dieser vielversprechenden Reaktion auf die Funktionalisierung von Aminodendrimeren wird im folgenden Kapitel erörtert.

### 3.5.3 Darstellung der Dendrimeren

Da die reduktive Aminierung die besten Ergebnisse in den Vorversuchen erbracht hat, wurde sie auch als Methode der Wahl zur Anknüpfung der Bisphosphonate an ein vorgefertigtes Dendrimerrückgrat verwendet. Dabei wurde neben dem Bisphosphonat Baustein **4** ein Grundkörper mit zahlreichen Aminofunktionen benötigt. Ein gut geeignetes Rückgrat wäre das von *Meijer et al.* 1993 synthetisierte Polypropylenimin<sup>[68]</sup>. Dieses ist in verschiedenen Generationen käuflich zu erwerben und schafft einen geeigneten Abstand für die angeknüpften Bisphosphonatgruppen.

Als einfaches Dendrimermodell wurde jedoch zunächst ein Dimer verwendet, in dem zwei der Bisphosphonatbausteine **4** über 1,10-Diaminodecan als Linker mit einander verknüpft sind. Die Anbringung wurde hier ebenfalls erfolgreich durch reduktive Aminierung zur Verbindung **26** durchgeführt (Abbildung 32).

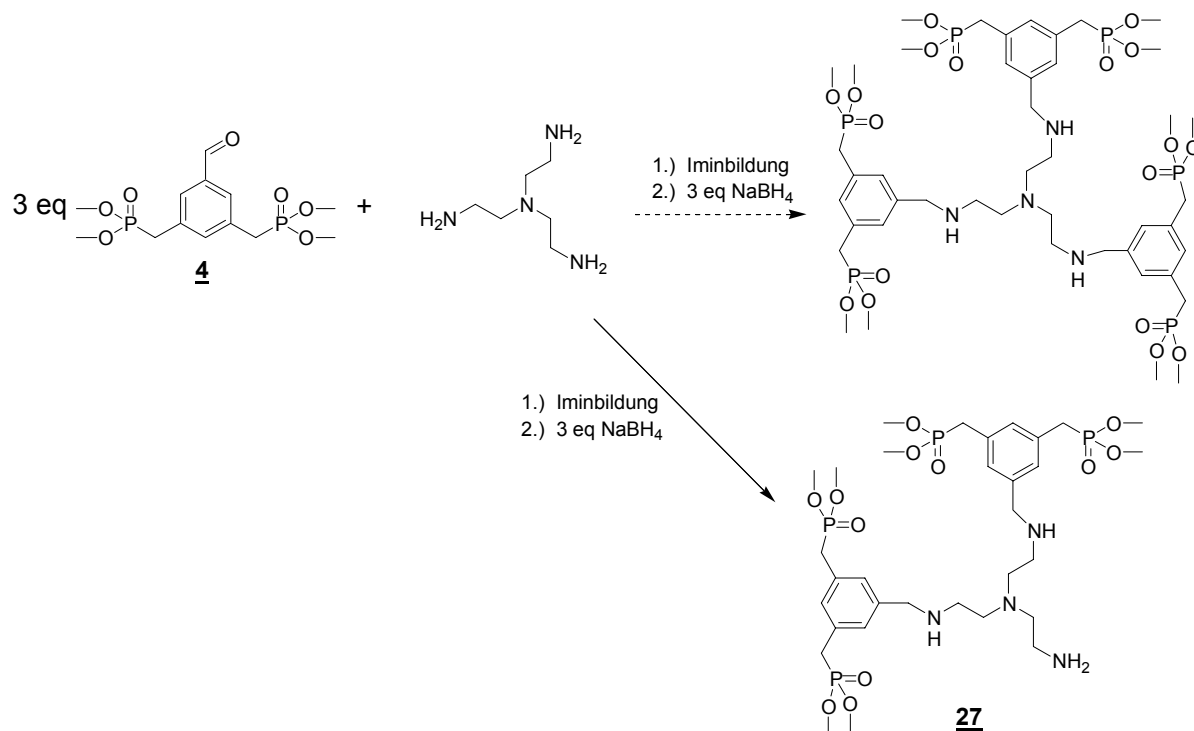


**Abbildung 32:** Darstellung des *N,N'*-1,10-Di[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)benzyl]-diaminodecans **26**

Um die Lücke zwischen dem Dimer und den Polypropylenimindendrimeren zu schließen, wurde als Rückgrat für ein Trimer Tris-(2-aminoethyl)-amin ausgewählt (Abbildung 33).

Wie sich jedoch bei der Durchführung der Reaktion zeigte, konnte im Gegensatz zu den anderen reduktiven Aminierungen, die alle bei Kontrolle der Reaktion durch <sup>31</sup>P-NMR-Messungen von Proben aus der Reaktionslösung einen quantitativen Umsatz zeigten, im Falle des Trimers kein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Bei *molecular-modeling*-Rechnungen des erwarteten Reaktionsproduktes wurde beobachtet, daß sich die Bisphosphonateinheiten am Tris-(2-aminoethyl)-amin nahe kommen können und ihre

Bewegungsfreiheit stark eingeschränkt ist. Es ist daher zu vermuten, daß bei Anknüpfung von zwei Bisphosphonaten die dritte Aminofunktion sterisch abgeschirmt und eine weitere Reaktion verhindert wird. Die zweifach umgesetzte Verbindung **27** konnte durch säulenchromatographische Aufreinigung in guten Ausbeuten erhalten werden.



**Abbildung 33:** Darstellung des Bis-2-(3,5-bis(dimethoxyphosphinylmethyl)benzylaminoethyl)aminoethylamins **27**

Bei den Polypropylenimindendrimeren scheint diese sterische Hinderung keine Rolle mehr zu spielen. Das Tetra-, Octa- und Hexadecamer konnten durch diese Methode aus dem DAB-Am 4, DAB-Am 8 beziehungsweise DAB-Am 16 mit quantitativem Umsatz dargestellt werden.

Bei den Dendrimeren höherer Generation (Generation 2 und 3, also DAB-Am 8 und DAB-Am 16) mußte jedoch im Verlaufe der Reaktion von Dichlormethan auf Dichlormethan/Methanol im Verhältnis 1:1 gewechselt werden, da das Produkt nach der Reaktion eines Teils der Aminofunktionen nicht mehr löslich war und dadurch eine vollständige Umsetzung verhinderte. Es ist zwar möglich, die Iminbildung auch in reinem Methanol durchzuführen, aber dies dauert lange und erfolgt in vielen Fällen aufgrund der leichten Rückreaktion zu den Edukten nicht vollständig.

Wie in den Vorversuchen gezeigt ist auch ein direkter Umsatz des entschützten Bisphosphonatmonomers **25** in der reduktiven Aminierungsreaktion möglich, erfordert jedoch die Verwendung von Methanol über beide Reaktionsschritte, also sowohl Iminbildung als

auch Reduktion müssen in trockenem Methanol durchgeführt werden. Um trotz der schlechteren Iminbildung in Methanol einen vollständigen Umsatz zu gewährleisten, kann der Reaktionsmischung Molekularsieb (3 Å) zugefügt werden. Dies erfordert jedoch eine Filtration durch mikroporöse Spritzenfilter, um die bei der Reaktion zermahlene Molekularsiebfragmente abzutrennen.

Abbildung 34 zeigt die durch reduktive Aminierung dargestellten Bisphosphonat-dendrimere.

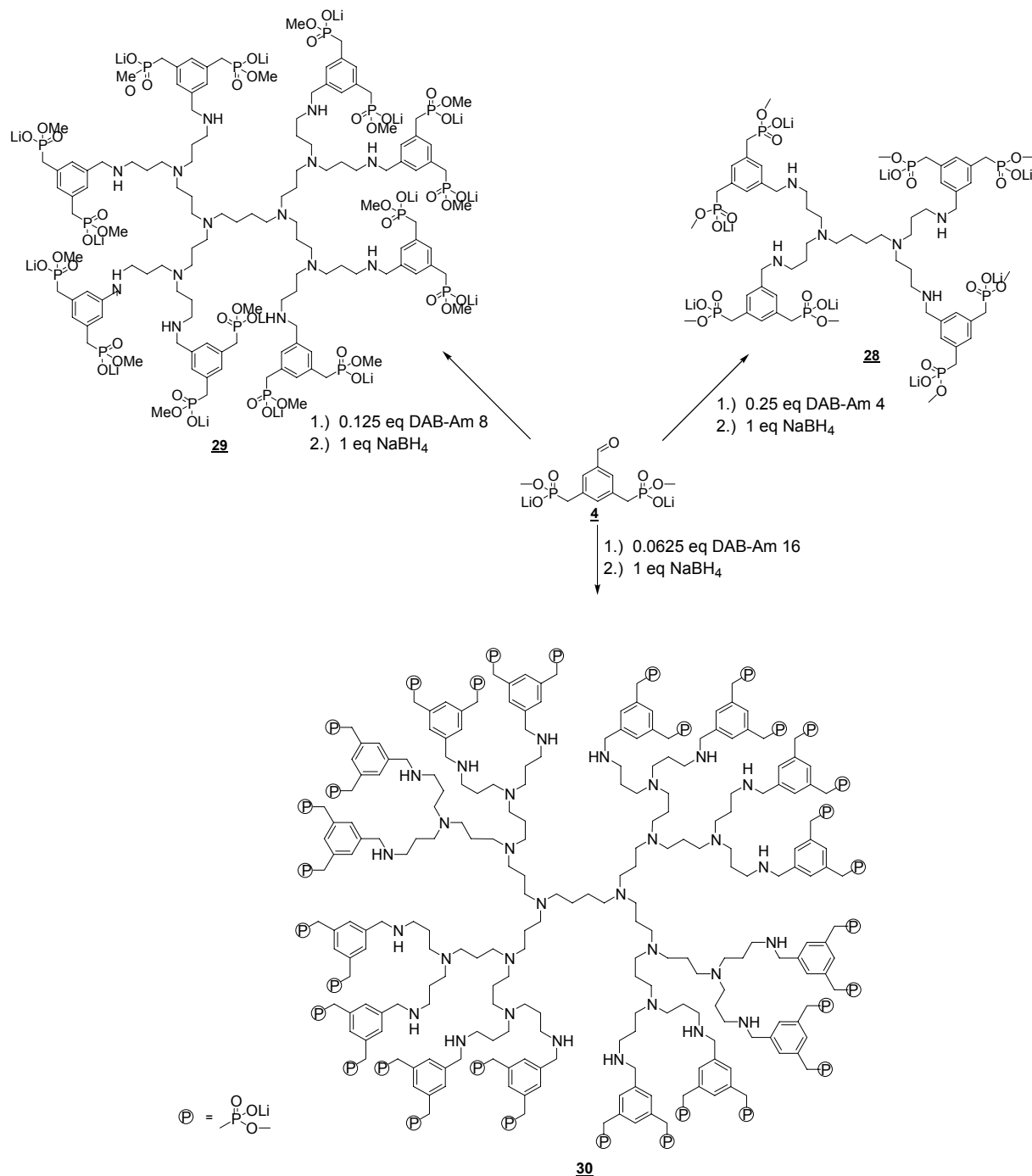


Abbildung 34: Darstellung der Dendrimere **28**, **29** und **30**

Um sie von den entstehenden Borsäuresalzen abzutrennen, wurden die Dendrimere anschließend HPLC-gereinigt. Diese Reinigung konnte weder über eine normale polare Phase noch über eine apolare RP-Säule mit verschiedenen Laufmittelgemischen durchgeführt werden. Im Falle der RP-Säule wurden die Dendrimere samt Verunreinigungen zu Beginn des Laufs eluiert und im Falle der polaren Säulen blieben die bisphosphonatmodifizierten Substanzen liegen und konnten nur ohne Auftrennung mit polaren Lösungsmitteln wieder von der Säule eluiert werden. Dagegen gelang es mit einer „mittelpolare“ Säule von *Macherey-Nagel*, deren RP-18 Phase mit Nitrilendgruppen versehen ist um ihre Polarität zu steigern, die modifizierten Dendrimere sauber aufzureinigen. Eine ausreichende Trennung konnte hierbei bei einem Gradienten von Wasser/Acetonitril von 98% bis 2% Wasseranteil mit einem Zusatz von 1% Trifluoressigsäure im Laufmittel erzielt werden.

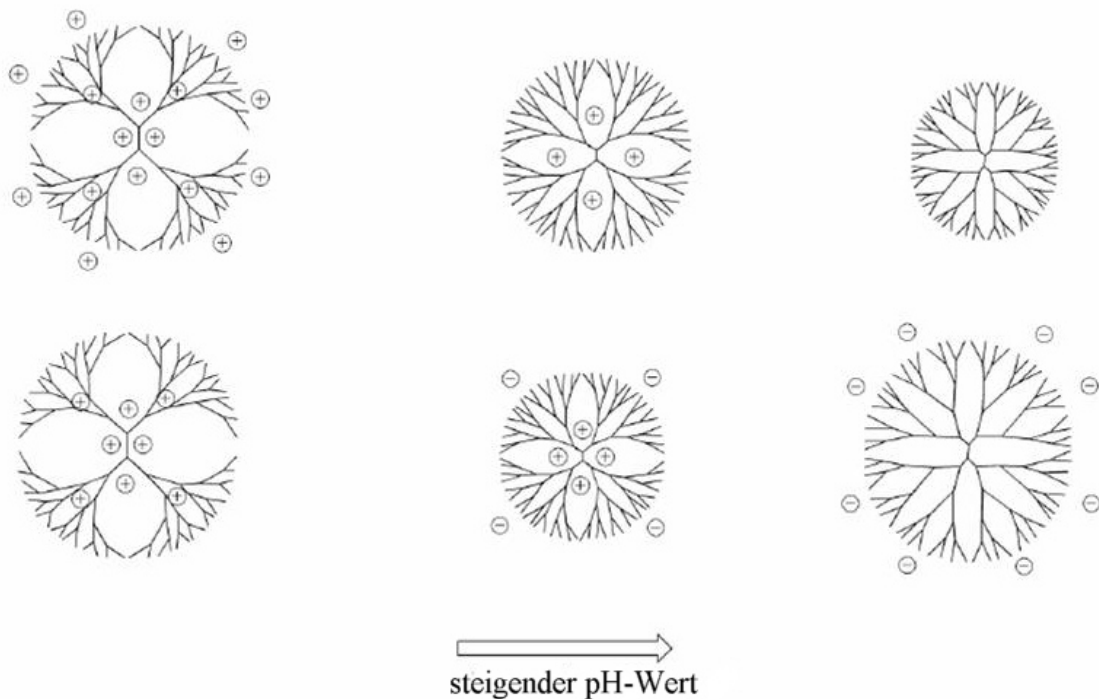
Es bleibt festzustellen, daß durch reduktive Aminierung ein schneller Zugang zu oligomeren Bisphosphonaten zu erreichen ist. Auch die Verwendung des Lithiumsalzes des Bisphosphonats spart einen aufwendigen Reinigungsschritt und eine ebenfalls schwierige polymeranaloge Lithiumbromidspaltung. Polyaminoeinheiten wie zum Beispiel die verwendeten PPI-Dendrimere sind in verschiedenen Formen und Generationen erhältlich, so daß durch reduktive Aminierung einer Vielzahl von oligomeren Grundbausteinen mit aldehydischen Haftgruppen eine große Anzahl möglicher Wirtmoleküle denkbar sind.

Jedoch bergen die dendrimeren Grundgerüste noch eine Reihe von möglichen Problemen, denen im Folgenden einige Aufmerksamkeit geschenkt werden soll.

### **3.5.4 Untersuchung der Dendrimere mit LED-PFG-DSTE**

Dendrimere werden in der Literatur gerne mit Proteinen verglichen und in einigen Fällen auch als Proteinanaloga untersucht<sup>[69]</sup>. Im Gegensatz zu Proteinen bestehen Dendrimere jedoch nicht aus einer linearen, gefalteten Peptidkette die sehr dicht gepackt vorliegt, sondern aus einem verzweigten Kerngerüst. Dieser Aufbau führt dazu, daß Dendrimere eine weniger flexible Struktur besitzen, aber ein größeres Volumen einnehmen und mehr funktionelle Gruppen an der Oberfläche tragen können, als Proteine vergleichbarer Molmasse<sup>[70, 71]</sup>. Ebenso wie bei Proteinen wird auch bei Dendrimeren von nativen, d.h. dicht gepackten und denaturierten, also gestreckten Konformationen gesprochen. In welcher dieser Konformationen die Dendrimere vorliegen, bestimmt neben ihrer Struktur die Polarität, die Ionenstärke und der pH-Wert des Lösungsmittels<sup>[70]</sup>. Die Dendrimertypen wie

Polypropylenimine PPI und der Polyamidoamine PAMAM mit zahlreichen Aminofunktionen zeigen eine hohe pH-Abhängigkeit ihres Volumens. Je weiter der pH-Wert gesenkt wird, desto eher nähern sich diese Dendrimere einer gestreckten Konformation aufgrund elektrostatischer Abstoßung der protonierten tertiären Aminofunktionen in ihrem Kern und primären Aminogruppen auf ihrer Oberfläche an<sup>[72]</sup>. Bei pH-Werten größer als 9 tritt der Effekt des sogenannten „*Backfolding*“ ein. Dabei falten sich die äußeren primären Amine zurück und gehen Wasserstoffbrückenwechselwirkungen mit den noch protonierten tertiären Aminen im Kern ein<sup>[73]</sup>. Dies führt zu einer dichten Packung der Dendrimere.



**Abbildung 35:** Schematische Darstellung des Dendrimervolumens in Abhängigkeit vom pH-Wert. Oben: einfaches PPI-Dendrimer. Unten: carboxyfunktionalisiertes PPI-Dendrimer<sup>[74]</sup>.

Der pH-Bereich dieses *Backfolding's* ist sehr stark von der Beschaffenheit der äußeren funktionellen Gruppen abhängig. Bei PPI-Dendrimern, deren äußere, primäre Aminogruppen durch Carboxylhaltigen Endgruppen funktionalisiert wurden, liegen die Bereiche der gestrecktesten Konformationen bei pH 4 und pH 11<sup>[75]</sup>. Bei dem niedrigen pH-Wert sind die Carboxyfunktionen weitestgehend protoniert, aber die tertiären Aminogruppen im Kern sind ebenfalls protoniert und sorgen durch elektrostatische Abstoßung für eine gestreckte Konformation. Im basischen Bereich jedoch sind die Carboxylgruppen deprotoniert und geladen und sorgen hier ihrerseits für eine Abstoßung und somit für ein größtmögliches Volumen.

Bei pH 6 jedoch ist das Dendrimer zwitterionisch, was dazu führt, daß es dicht gepackt durch Coulombwechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen vorliegt<sup>[75]</sup>.

Diese letztgenannte Struktur der PPI-Dendrimere mit carboxyfunktionalisierter Oberfläche ähnelt dem Aufbau der von uns dargestellten Dendrimere mit PPI-Grundgerüst und azider Oberfläche, in diesem Falle durch Phosphonatgruppen. Die Vermutung liegt nahe, daß in dem pH-Bereich, in dem die Bindungsstudien durchgeführt werden sollen, nämlich unter physiologischen Bedingungen (pH ~ 7), ein ähnlicher Effekt wie bei den carboxyfunktionalisierten PPI-Dendrimeren auftreten könnte. Ein *Backfolding* hätte zur Folge, daß sich einige, wenn nicht alle Phosphonatgruppen in den kationischen Dendrimerkern zurückfalten könnten und für eine Bindung an ein Protein oder Peptid nicht mehr zur Verfügung stünden. Zunächst muß also untersucht werden, ob ein solcher ungünstiger Fall auch bei den vorliegenden Bisphosphonatfunktionalisierten Dendrimeren eintreten kann.

Die Experimente zur Ermittlung der hydrodynamischen Volumina der PPI und PAMAM Dendrimere wurden in der Literatur durch „small angle neutron scattering“ SANS und Diffusionsmessungen mit NMR-Methoden durchgeführt<sup>[75]</sup>. Letztere Methode soll im Folgenden näher erläutert werden und anschließend werden die Ergebnisse dieser Messungen präsentiert.

#### 3.5.4.1 Messung des hydrodynamischen Radius durch Diffusionsmessungen

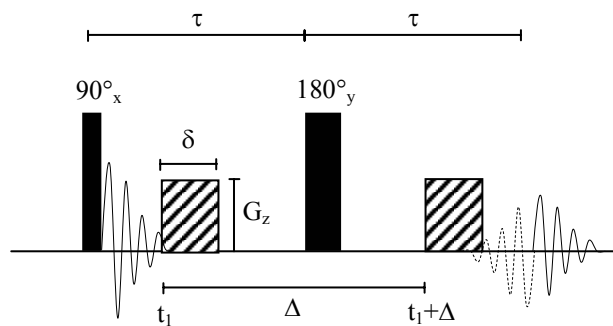
Nach der *Stokes-Einstein-Beziehung* ist der hydrodynamische Radius bei näherungsweise globulären Molekülen proportional der Diffusionsgeschwindigkeit dieses Teilchens in Lösung<sup>[76]</sup>. Das bedeutet, die Geschwindigkeit des Teilchens in Lösung hängt von seiner Größe ab und sinkt mit steigendem Volumen.

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0}$$

**Gleichung 1:** *Stokes-Einstein-Beziehung* mit  $R_h$  = hydrodynamisches Volumen,  $k_B$  = Boltzmannkonstante,  $T$  = Temperatur der Probe,  $\eta$  = Viskosität der Lösung,  $D_0$  = Diffusionskoeffizient.

Diese Näherung ist zwar nur bei sphärischen Molekülen gegeben, aber Dendrimere besitzen eine nahezu sphäroide Struktur<sup>[75]</sup>. Außerdem ist bei diesen Messungen der Absolutwert nicht so entscheidend wie die Relation der Meßergebnisse, weshalb die Näherung für unseren Zweck ausreichend ist. *Hahn's* Untersuchungen über die grundlegenden Phänomene der NMR-Spektroskopie zeigten schon früh einen Einfluß der Diffusionsgeschwindigkeit der

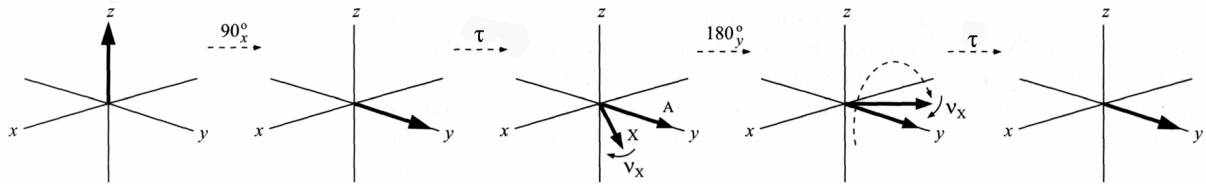
Analyten auf die Signalintensität in Gegenwart von magnetischen Feldgradienten<sup>[77, 78]</sup>. *Stejskal* und *Tanner* entwickelten 1970 eine Methode, die die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten zugänglich machte<sup>[79]</sup>. Die Messung der Geschwindigkeit der Moleküle in Lösung durch NMR ist möglich, da die Information der translationalen Bewegung durch gepulste, magnetische Feldgradienten (PFG) in NMR Datensätzen codiert werden kann<sup>[79]</sup>. Abbildung 36 zeigt die einfachste Pulssequenz für die Aufnahme eines diffusionscodierten NMR-Spektrums<sup>[80]</sup>.



**Abbildung 36:** PFG-STE-Sequenz zur Aufnahme eines diffusionseditierten Spektrums. Nach dem einleitenden  $90^\circ_x$ -Puls beginnt der freie Induktionsabfall, in dessen Verlauf nach der Delayzeit  $t_1$  der Gradientenpuls mit der Länge  $\delta$  und der Stärke  $G_z$  eingestrahlt wird. Nach der Delayzeit  $\tau$  kommt der refokussierende  $180^\circ_y$ -Puls und nach dem Diffusionsdelay  $\Delta$  der zweite Gradientenpuls. Nach  $2\tau$  hat das Spinecho sein Maximum erreicht und die Acquisition des Spektrums beginnt<sup>[80]</sup>.

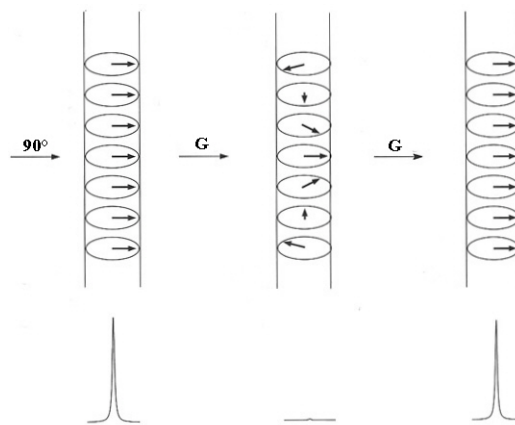
Am einfachsten wird das Prinzip anhand des Vektormodells der Kernspins verdeutlicht<sup>[81]</sup> (Abbildung 37). Zunächst befindet sich der makroskopische Magnetisierungsvektor  $M_0$  in seinem Grundzustand parallel zum Magnetfeld  $B_0$ , das im rotierenden Koordinatensystem der z-Achse entspricht. Beim ersten  $90^\circ_x$ -Puls wird die Magnetisierung in die y-Achse transferiert und eine kohärente, transversale Magnetisierung induziert. Im Verlauf der ersten Delayzeit  $\tau$  defokussiert die Quermagnetisierung aufgrund der unterschiedlichen magnetischen Umgebungen der einzelnen Kerne. Der  $180^\circ_y$ -Puls invertiert die Magnetisierungsvektoren entlang der y-Achse und erzeugt somit ein Spinecho nach einer weiteren Delayzeit  $\tau$ , da die Magnetisierung refokussiert. Der zweite Teil des Spinechos ist auch derjenige Teil, der für den FID der Messung verwendet wird.





**Abbildung 37:** Entwicklung der Magnetisierung im Vektormodell bei einem stimulierten Spinecho<sup>[81]</sup>. Erklärung im Text.

Wird nun im Verlauf der ersten Delayzeit  $\tau$  ein Gradientenpuls angelegt, der ein zusätzliches, variables Magnetfeld  $B_1$  entlang der z-Achse erzeugt, defokussieren die Spinvektoren der Kerne entsprechend ihrer Position. Würde zu diesem Zeitpunkt ein Spektrum aufgenommen, würde aufgrund der fehlenden makroskopischen Magnetisierung kein Signal detektiert. Nach der Delayzeit  $\Delta$  wird nochmals derselbe Gradientenpuls angelegt. Da die Kernspins durch den  $180^\circ$ -Puls invertiert wurden, besitzt der zweite Gradientenpuls dasselbe Vorzeichen und refokussiert die durch den ersten Gradientenpuls defokussierten Magnetisierungsvektoren. Ohne eine Diffusion entlang der z-Achse erfährt jeder Kern dasselbe Magnetfeld  $B_1$  beim ersten wie beim zweiten Gradientenpuls. Das Signal behielte die gleiche Intensität. Wandert der Kern jedoch in der Delayzeit  $\Delta$  aufgrund von Diffusion, Konvektion oder anderen Einflüssen entlang der z-Achse (also entlang der Längsrichtung des NMR-Röhrchens) erfährt er ein anderes Feld beim zweiten Puls als beim ersten. Er wird also nicht vollständig auf denselben Punkt refokussiert. Dadurch nimmt die Signalintensität bei Aufnahme des Spinechos ab (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Entwicklung der Magnetisierungsvektoren bei den Gradientenpulsen ohne Diffusion und Konvektion. Nach dem ersten Gradientenpuls ist keine meßbare makroskopische Magnetisierung mehr vorhanden. Die lokalen Magnetisierungen der Spins sind ortskodiert. Der zweite Gradientenpuls dekodiert diese Information wieder. Im Falle einer Diffusion oder Konvektion der Moleküle ist die Dekodierung bzw. Refokussierung nicht vollständig<sup>[81]</sup>.

*Stejskal* und *Tanner* stellten für diesen Sachverhalt folgende Formel auf:

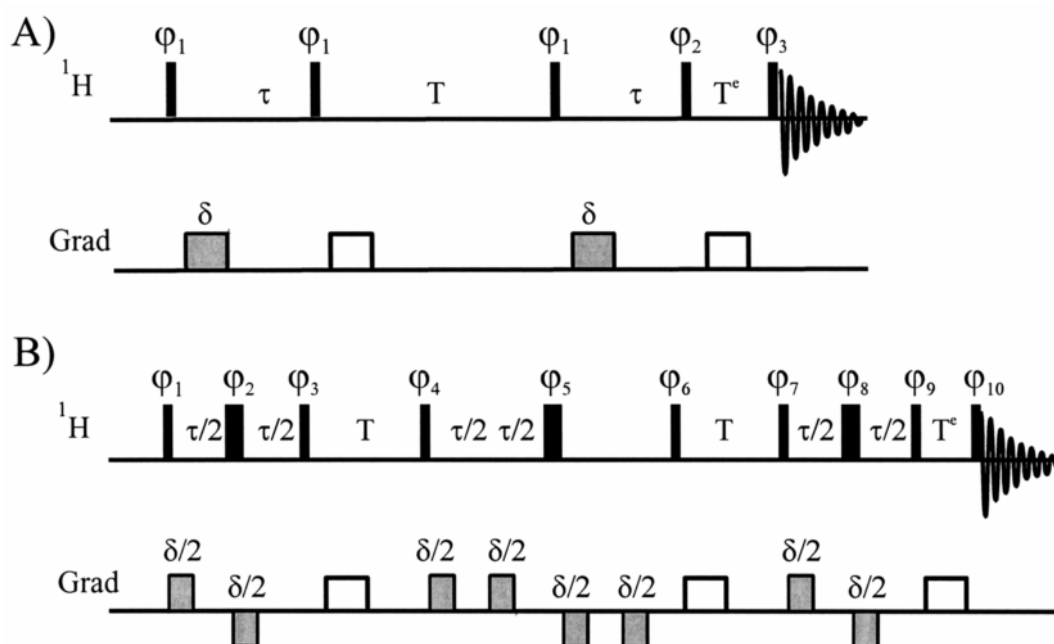
$$\mathbf{I} = \mathbf{I}_0 \times \mathbf{e}^{-\gamma^2 \mathbf{G}^2 \delta^2 \mathbf{D}_0 (\Delta - \frac{\delta}{3})}$$

**Gleichung 2:** *Stejskal-Tanner-Beziehung* mit  $I$  = Intensität des Peaks bei anlegen eines Gradientenpulses,  $I_0$  = Intensität des Peaks ohne Gradientenpuls,  $\gamma$  = gyromagnetisches Verhältnis des Kerns,  $G$  = Feldstärke des Gradientenpulses,  $\delta$  = Länge des Gradientenpulses,  $D_0$  = Diffusionskoeffizient des beobachteten Moleküls und  $\Delta$  = Länge des Diffusionsdelays.

In der Praxis mißt man bei steigenden Feldstärken  $G$  des Gradientenpulses die Abnahme der Intensität eines gut beobachtbaren Signals der zu untersuchenden Substanz. Trägt man in der logarithmierten Version obiger Formel  $\ln I/I_0$  gegen  $\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$  auf (*Stejskal-Tanner-Plot*), kann aus der Steigung der Ausgleichsgeraden direkt der Diffusionskoeffizient  $D_0$  ermittelt werden.

In der Praxis birgt die Pulssequenz aus Abbildung 36 jedoch noch einige Probleme. Zum ersten induzieren die Gradientenpulse sogenannte Wirbelströme (engl. „*eddy currents*“) in den umgebenden metallischen Gegenständen wie Probenkopf und Magnet. Diese Wirbelströme erzeugen im Gegenzug sich langsam abbauende Felder in der Probe, was zu einer Verzerrung der Spektren aufgrund von zeitabhängigen Phasenfehlern führt<sup>[82]</sup>. Es gibt einige apparative Möglichkeiten, die Auswirkungen der Wirbelströme gering zu halten<sup>[83-85]</sup>. *Gibb's* wandelte jedoch die normale STE-Pulssequenz durch Einfügen eines Wirbelstromdelays  $T_e$  und zweier zusätzlicher 90°-Pulse ab, die während des Abklingens der Wirbelströme die Magnetisierung in longitudinaler Richtung vor den Einflüssen der zusätzlichen Felder schützen, und gelangte zu der LED-PFG-STE-Sequenz (Abbildung 39a)<sup>[86]</sup>.

Ein zweites Problem hängt mit der Temperierung der Probe zusammen. Um die Probe keinen allzu großen Temperaturschwankungen auszusetzen, wird sie kontinuierlich über einen Thermostaten kontrolliert und gegebenenfalls geheizt. Dieses Aufheizen erfolgt jedoch nur punktuell am unteren Ende des NMR-Röhrchens, wodurch in der Probe eine thermische Konvektionsströmung erzeugt wird. Diese Strömung verfälscht und überlagert natürlich die Diffusion und führt zu ungewünschten Ergebnissen. *Müller et al.* gelang es durch Einführung der LED-PFG-DSTE-Sequenz die Effekte von Konvektionsströmungen zu minimieren<sup>[87]</sup>.



**Abbildung 39:** Variationen und Verfeinerungen der einfachen PFG-STE-Sequenz. A) LED-PFG-STE von *Gibb* mit dem longitudinalen Wirbelstromdelay  $T^c$ <sup>[86]</sup>. B) LED-PFG-DSTE-Experiment von *Müller* zur Unterdrückung von Konvektionsartefakten durch doppelt stimuliertes Spinecho<sup>[88]</sup>.

### 3.5.4.2 Messung der pH-Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius

Für diese Messungen wurde die LED-PFG-DSTE-Sequenz von *Müller* verwendet. Die Messungen wurden von *Xie* in der NMR-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Universität Marburg durchgeführt. Dazu wurde eine Stammlösung in  $\text{D}_2\text{O}$  des Bisphosphonatmodifizierten PPI-Octamers **29** in einer Konzentration von  $5 \times 10^{-4}$  mol/L angesetzt und auf 6 Reagenzgläser verteilt. Durch Zugabe von 1 M NaOD-Lösung in  $\text{D}_2\text{O}$  wurden in den einzelnen Lösungen sechs verschiedene pH-Werte eingestellt (kontrolliert durch eine Glaselektrode) und anschließend im NMR-Röhrchen auf gleiche Volumina aufgefüllt, um in jedem Röhrchen die gleiche Konzentration zu erzielen. Jedes Röhrchen wurde bei 9 verschiedenen Gradientenpulsstärken von 10 – 90 % der Maximalstärke von  $G_{\text{max}} = 53.5$  G/cm vermessen. Die Meßergebnisse wurden in einem *Stejskal-Tanner*-Plot aufgetragen und aus der Steigung der Ausgleichsgeraden der Diffusionskoeffizient bestimmt. Aus drei Meßreihen für jeden pH-Wert wurde der Mittelwert gebildet und aus diesem über die *Stokes-Einstein*-Beziehung der hydrodynamische Radius errechnet. Da in die Gleichung die Viskosität eingeht, muß dafür Sorge getragen werden, daß diese konstant bleibt oder ihre Änderung zumindest verfolgt wird. Man gibt hierzu einen internen Standard hinzu, also ein Molekül, daß möglichst nicht mit den anderen wechselwirkt und dessen Diffusionskoeffizient

somit nur von der Viskositätsänderung abhängt. In der Praxis verwendet man dabei TMS, Benzol oder Dioxan. Auch das Lösungsmittelsignal selbst kann zur Kontrolle der Viskosität herangezogen werden. In diesem Falle wurde jedoch Dioxan als Indikator verwendet, da es in der Literatur oft verwendet wurde und über Messungen mit Lysozym in verschiedenen Konzentrationen kalibriert werden kann<sup>[89, 90]</sup>.

Tabelle 1 zeigt die ermittelten Diffusionskoeffizienten und hydrodynamischen Radien. Zum Vergleich wurden drei verschiedene Strukturen über *molecular-modeling* berechnet: einerseits für den sauren Bereich die Struktur (1) mit protonierten Phosphonat- und Aminogruppen, zweitens die Struktur (2) mit deprotonierten Phosphonat- und protonierten Aminofunktionen und drittens Struktur (3) für den basischen Bereich mit vollständig deprotonierter Darstellung.

**Tabelle 1:** Ermittelte Diffusionskoeffizienten und hydrodynamische Radien im Vergleich zu den berechneten Radien aus *molecular-modeling*-Rechnungen.

pH-Wert	Diffusionskoeffizient $D_0$ $\cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	hydrodynamischer Radius $R_h$ $\text{Å}$	berechneter Radius $R_h$ aus “molecular modeling”- Rechnungen $\text{Å}$
2.3	1.69	14.5	
5.5	1.66	14.8	(1): ~ 14.4
6.8	1.62	15.3	
7.4	1.60	15.4	(2): ~ 13.7
8.7	1.57	15.6	
9.9	1.54	16.0	(3): ~ 14.1

Die ermittelten Daten zeigen deutlich, daß sich über die gesamte gemessene pH-Skala keine wesentliche Änderung des hydrodynamischen Radius ergibt. Man erkennt einen leichten Anstieg des Radius vom sauren in den basischen Bereich. Dies läßt sich eventuell durch eine leichte Änderung des Volumens über den Verlauf der Titration erklären, denn eine Abhängigkeit des Volumens von der Konzentration ist bei Dendrimern bekannt<sup>[70]</sup>.

Auch im Vergleich mit den ermittelten Radien aus den *molecular-modeling*-Rechnungen zeigt sich, daß die Methode recht genaue Ergebnisse liefert. Die geringen Abweichungen sind über die ungenaue Bestimmung der Radien beim *modeling* zu erklären. Hierbei wurden von Hand verschiedene Abstände vom „Zentrum“ des Dendrimers bis zu seinem Rand vermessen und gemittelt.

Abschließend läßt sich sagen, daß der befürchtete Effekt des *backfolding* nicht eintritt und somit keine Behinderung der Affinitätsmessungen bei neutralem pH-Wert aus dieser Richtung zu erwarten sind.

### 3.5.4.3 Bestimmung von Assoziationskonstanten mit LED-PFG-DSTE

Da die gemessenen Diffusionskoeffizienten eine direkte Aussage über die Beweglichkeit des beobachteten Moleküls in der Lösung machen, können diese Messungen auch zur Ermittlung von Bindungskonstanten verwendet werden. Betrachtet man zwei Moleküle, die miteinander in nichtkovalente Wechselwirkung treten sollen, und besitzen diese beiden Moleküle eine hinreichend große Differenz in ihrer Beweglichkeit und damit in ihrem Diffusionskoeffizienten, so wird das schnellere Molekül bei der Komplexbildung „abgebremst“. Sind die Unterschiede der Diffusionskoeffizienten von Wirt und Gast also hinreichend groß, kann der Diffusionskoeffizient des Komplexes gleich dem Diffusionskoeffizienten des freien Wirtes (also dem unbeweglicheren Molekül) gesetzt werden. Der Diffusionskoeffizient des kleinen Gastes in der Mischung  $D_0$  setzt sich also zusammen aus dem Diffusionskoeffizienten des freien Gastes  $D_f$  und dem Diffusionskoeffizienten des Komplexes bzw. freien Wirtes  $D_b$  nach:

$$D_0 = f_f D_f + f_b D_b$$

Wobei  $f_f$  und  $f_b$  den Molenbruch des freien Wirtes bzw. des Komplexes angibt. Mit  $f_f + f_b = 1$  ergibt sich umgeformt nach  $f_f$ :

$$f_f = \frac{D_0 - D_b}{D_f - D_b}$$

Eingesetzt in das Massenwirkungsgesetz der Komplexdissoziation:

$$K_d = \frac{[L][P]}{[LP]} = \frac{f_f [L]_0 ([P]_0 - f_b [L]_0)}{f_b [L]_0} = \frac{f_f [L]_0 [P]_0 - f_f f_b [L]_0^2}{f_b [L]_0} = [P]_0 \frac{f_f}{f_b} - [L]_0 f_f$$

folgt:

$$K_d = [P]_0 \frac{D_b - D_0}{D_0 - D_f} + [L]_0 \frac{D_0 - D_b}{D_b - D_f}$$

**Gleichung 3:** Formel zur Bestimmung der Komplexdissoziationskonstanten  $K_d$  aus den bekannten Konzentrationen des Wirtes (Protein)  $[P]_0$  und des Gastes (Ligand)  $[L]_0$  und den gemessenen Diffusionskoeffizienten des Gastes  $D_b$ , des freien Wirtes  $D_f$  und des Wirtes in der Mischung  $D_0$ <sup>[91]</sup>.

Diese Gleichung gilt streng genommen nur bei einem 1:1-Komplex. Bei Komplexen anderer Stöchiometrie kann näherungsweise eine der Konzentrationen ( $[L]_0$  oder  $[P]_0$ ) dahingehend geändert werden, daß die 1:1-Stöchiometrie unter der Annahme mehrerer gleicher  $K_a$ -Werte gewahrt bleibt. Ein etwas komplizierterer Ansatz von *Lindon* benutzt die Diffusionsmessung als Titration mit verschiedenen Wirt-Gast-Verhältnissen<sup>[92]</sup>. Diese Methode wurde für die Bestimmung der Affinitätskonstanten zwischen dem Bisphosphonattetramer und BSA

durchgeführt. Dabei wird wie bei einer NMR-Titration und Affinitätsbestimmung über Signalshifts zu dem Gast eine definierte Menge Wirt hinzutitriert und bei den verschiedenen Wirt/Gast-Verhältnissen die Diffusionskoeffizienten gemessen. Bei einer Bindung strebt der gemessene Wert einem Grenzwert entgegen und die resultierende Kurve kann ähnlich den NMR-Shift-Titrationen ausgewertet werden. Es zeigte sich jedoch sowohl bei der sukzessiven Zugabe des Dendrimers zum Protein als auch im umgekehrten Falle der Zugabe des Proteins zum Dendrimer eine hohe Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Konzentration, die den gemessenen Wert überlagerte und eine Auswertung verhinderte. Dies könnte unter anderem an einer gewissen Selbstaggregation oder an dem bekannten Phänomen der konzentrationsabhängigen Größenänderung von Dendrimeren liegen<sup>[70]</sup>. Für die Bestimmung der Bindungskonstanten wurde daraufhin nur die erste Methode von *Lucas* und *Larive* angewandt<sup>[93]</sup>.

Unglücklicherweise bewegt sich der Radius des Bisphosphonatmodifizierten PPI Octamers in der Größenordnung eines kleinen Proteins. Die molekulare Masse ist zwar geringer als bei einem Protein, jedoch ist die Peptidkette eines Proteins dichter gepackt, so daß das eingenommene Volumen in Lösung bei beiden ähnlich ist. Bei dem Octamer liegt der Diffusionskoeffizient bei  $1.97 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  und bei Cytochrom c bei  $1.66 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ . Berechnet man den statistischen Fehler bei Verwendung der Gleichung 3, so kommt man auf eine Ungenauigkeit von mindestens 800 %. Anders sieht es bei dem bisphosphonatmodifizierten PPI Tetramer **28** aus. Hier beträgt der Diffusionskoeffizient  $2.90 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ , was einen statistischen Fehler von 20 % ergibt. Dies ist für eine nähere Untersuchung ausreichend. Bei den durchgeführten Messungen wurden weiterhin die Proteine Chymotrypsin und Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Diese besitzen aufgrund ihres gegenüber dem Cytochrom c größeren Volumens einen geringeren Diffusionskoeffizienten. Damit ergibt sich aus der größeren Differenz der Koeffizienten von Protein und Dendrimer ein noch geringerer Fehler. Dieser abgeschätzte Fehler (abgeleitet von einer Meßungenauigkeit des Diffusionskoeffizienten von 5%) ist jedoch nur ein Mindestwert und kann je nach Meßbedingungen noch übertroffen werden.

Alle Experimente wurden folglich mit dem Tetramer durchgeführt. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Messungen des Tetramers **28** mit den Proteinen Cytochrom c, Chymotrypsin und BSA. Da aus diesen Daten keine Stöchiometrien ermittelt werden können, müssen diese aus anderen Quellen bestimmt werden. Cytochrom c wurde aufgrund der Vergleichbarkeit bei allen drei verwendeten Bestimmungsmethoden (PFG, UV/Vis und Fluoreszenz) untersucht. Die Stöchiometrie für den Komplex mit dem Tetramer wurde aus der UV/Vis-Messung

entnommen (Kapitel 3.5.5) und hier als Grundlage für die Berechnung der Bindungskonstante herangezogen. BSA wurde bei den Fluoreszenztitrationen ebenfalls verwendet. Dort ergab sich eine Stöchiometrie, die etwa bei 4:1 liegt. Für das Chymotrypsin wurde keine Komplexstöchiometrie mit dem Bisphosphonattetramer bestimmt, daher wird sie als 1:1 angenommen. Bei eventuellen höheren Stöchiometrien verringert sich die Bindungskonstante dementsprechend. Die Komplexstöchiometrien sind etwas unsicher, da sie aus anderen Bestimmungsmethoden bei meist anderen Konzentrationen ermittelt wurden. Möglich sind auch gebrochene Verhältnisse und Komplexe unterschiedlicher Zusammensetzung.

**Tabelle 2:** Ergebnisse aus den LED-PFG-DSTE-Messungen zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten und den daraus errechneten Bindungskonstanten nach Gleichung 3.

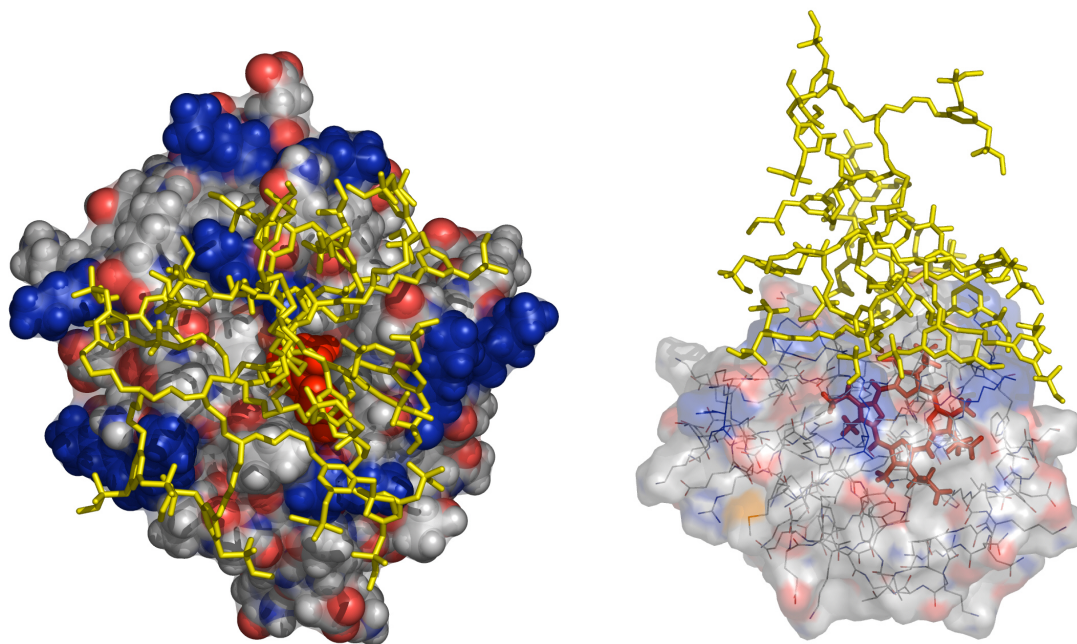
Probe	gemittelter Diffusionskoeffizient	berechnete Dissoziationskonstante $K_d$	Assoziationskonstante $K_a$
freies Cytochrom c	$1.662 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$		
freies Tetramer	$2.895 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$		
Gemisch Cyt-c/Tetramer	$2.759 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$2.92 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$3424 \text{ M}^{-1}$ a)
freies Chymotrypsin	$1.482 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$		
Gemisch Chym./Tetramer	$2.565 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$6.42 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$1560 \text{ M}^{-1}$ b)
freies BSA	$0.633 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$		
Gemisch BSA/Tetramer	$2.591 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$2.24 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$2360 \text{ M}^{-1}$ c)

a) angenommene 2:1 Stöchiometrie aufgrund der UV/Vis-Messungen; b) keine bekannte Stöchiometrie, angenommen als 1:1; c) angenommene 4:1 Stöchiometrie aufgrund der Fluoreszenzmessungen

Die gemessenen Assoziationskonstanten bewegen sich alle in der gleichen Größenordnung. Die isoelektrischen Punkte von Chymotrypsin und Cytochrom c liegen etwa im selben Bereich ( $pI_{\text{Chymotrypsin}} = 8.2$ ;  $pI_{\text{Cytochrom c}} = 9.6$ ). Dabei wird das leicht basischere Cytochrom c um den Faktor 2 besser gebunden als das weniger basische Chymotrypsin. BSA scheint dabei etwas aus dem Rahmen zu fallen, da es mit seinem  $pI$  von 5.7 wesentlich saurer ist und daher schlechter gebunden werden sollte. Allerdings ist es auch wesentlich größer und besitzt auf seiner Oberfläche insgesamt etwa 70 basische Aminosäuren, die sich in den meisten Fällen mit sauren Aminosäuren wie Glutaminsäure oder Asparaginsäure neutralisieren. Jedoch finden sich 4 Domänen, die aus mehreren Lysinen bestehen und folglich eine gute Bindungsstelle für das Dendrimer bieten. Daher liegt die Größenordnung der Bindung in dem Bereich der beiden basischen Proteine. Die Bindung ist bei dem Tetramer noch relativ schwach, jedoch besitzt dieses auch nur vier Haftpunkte. Gegenüber dem einfachen Monomer ist jedoch eine große Steigerung zu beobachten.

### 3.5.5 UV/VIS-Messungen der Dendrimeren

Ein interessantes Target zur Untersuchung der Affinität der Bisphosphonatoligomeren zu Proteinoberflächen stellt Cytochrom c dar. Cytochrom c spielt eine wesentliche Rolle bei der Energiegewinnung der Zelle in den Mitochondrien. An seiner Oberfläche befinden sich eine große Anzahl basischer Aminosäuren wie Lysin und Arginin. Ein Teil dieser Aminosäuren ist um das aktive Zentrum angeordnet, in dem sich die Häm-Gruppe befindet. So ist zu erwarten, daß bei einer Komplexierung dieser basischen Aminosäuren ein Einfluß auf die Absorptionseigenschaften der Häm-Gruppe ausgeübt wird, der sich mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrophotometers beobachten läßt. *Hamilton* untersuchte ausführlich die Affinität von Tetraphenylporphyrinen<sup>[94]</sup> und Calix-[4]-arenen<sup>[24]</sup> zu den basischen Gruppen von Cytochrom c und beobachtete dabei ebenfalls eine Änderung der UV/VIS-Aktivität der Häm-Gruppe um 400 – 420 nm. Die mögliche Struktur eines einfachen Komplexes mit dem Bisphosphonatoctamer **29** wird in Abbildung 40 dargestellt. Deutlich ist die räumliche Nähe des gebundenen Bisphosphonatdendrimers zu der Hämgruppe des Cytochrom c zu erkennen.



**Abbildung 40:** Einfache Minimierung des Bisphosphonat-PPI-octamers **29** (gelb) mit Cytochrom c in *Sybyl* 6.9 (MMFF94, in Wasser, 1000 Schritte). **links:** „Aufsicht“ auf den Komplex. In blau hervorgehoben sind die basischen Aminosäuren, die sich um das aktive Zentrum (Häm-Gruppe in rot) anordnen. **rechts:** Seitenansicht auf den Komplex mit transparentem Cytochrom c. Deutlich ist die räumliche Nähe des Häm (rot) zum Dendrimer zu erkennen.

Für die UV/VIS-Titrationen der Dendrimere mit Cytochrom c wurde zunächst eine 50  $\mu$ M Stammlösung des Proteins in einem 10 mM Phosphatpuffer (pH = 7.1) angesetzt. Es hatte



sich bei Voruntersuchungen gezeigt, daß die UV/Vis-Absorption des Proteins stark pH-abhängig ist und auch leichte Schwankungen der Konzentration zu starken Veränderungen der Absorption führen, die nicht streng dem *Lambert-Beer'schen* Gesetz folgen. Es war dazu unabdingbar, die Konzentration des Proteins über die gesamte Titration konstant zu halten, um diese nichtlinearen Effekte zu eliminieren. Dazu wurde das jeweilige Dendrimer in einer 20 bis 30 fach höheren Konzentration in derselben Proteinlösung gelöst, die auch für die Vorlage benutzt wurde. Bei Zugabe der Dendrimerlösung konnte somit sichergestellt werden, daß die Proteinkonzentration konstant blieb.

Wie auch bei den NMR-Titrationen wurde die Gastkonzentration kontinuierlich erhöht. Anders als erwartet wurde die Absorption jedoch nicht verringert, sondern stieg im Gegenteil um bis zu 30% an. Dies läßt sich möglicherweise durch eine konformationelle Änderung der Proteinstruktur erklären. Es ist bekannt, daß das Cytochrom c bei seiner Denaturierung die Häm-Gruppe aus seiner Bindungstasche entläßt und dabei die Absorption in dem Wellenlängenbereich dieser Gruppe ansteigt<sup>[95, 96]</sup>. Vermutlich ergibt sich aus der Komplexierung des Dendrimers eine konformationelle Änderung im Protein, was in einer Veränderung der Absorption der Häm-Gruppe resultiert.

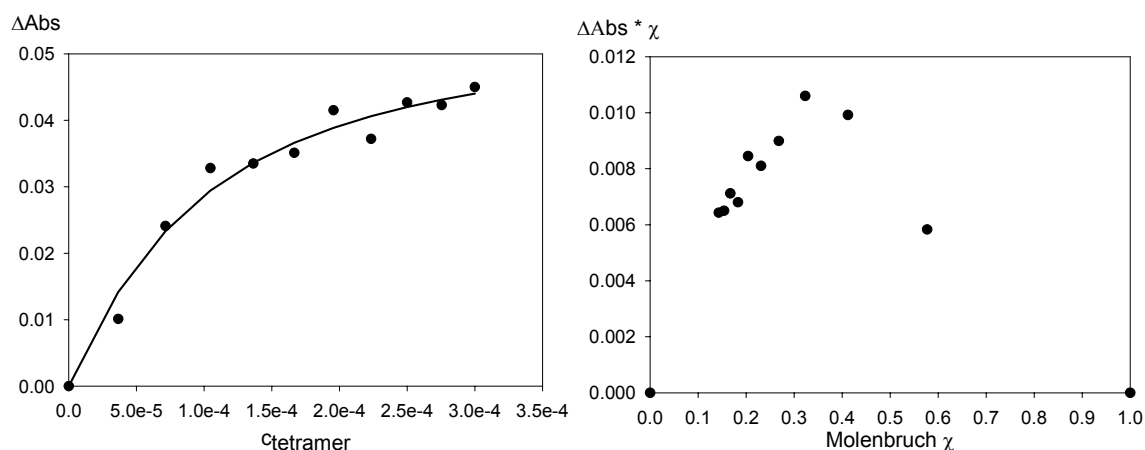
Wie bei Bindungskurven zu erwarten, strebt die Titration einem Grenzwert entgegen, dessen Absorption der Absorption des Komplexes entsprechen sollte. Wie auch bei den NMR-Titrationen kann die Bindungskonstante deshalb durch iterative Annäherung einer Bindungskurve aus vorgegebenen  $K_a$ -Werten an die Titrationswerte ermittelt werden.

Schwieriger ist es, in diesem System die genaue Komplexstöchiometrie herauszufinden. In den mathematischen Grundlagen zum *Job-Plot* wird explizit von einer konstanten Gesamtkonzentration von Wirt und Gast ausgegangen<sup>[97]</sup>. Dies ist jedoch bei der geschilderten Konzentrationsabhängigkeit der UV-Absorption der Häm-Gruppe nicht einzuhalten. Eine zu starke Veränderung der Konzentration des Cytochrom c würde durch störende Einflüsse eine exakte Auswertung der Meßwerte verhindern. Es ist jedoch näherungsweise möglich, direkt aus den Daten der Titration einen *Job-Plot* zu generieren. Aus der so ermittelten Stöchiometrie kann die Bindungskonstante unter der Annahme unabhängig voneinander stattfindender Bindungsereignisse durch Variation der Konzentrationen von Wirt oder Gast näherungsweise ermittelt werden.

Die UV/VIS-Titrationen des Tetramers **28**, des Octamers **29** und des Hexadecamers **30** mit Cytochrom c wurden unter diesen Voraussetzungen durchgeführt.

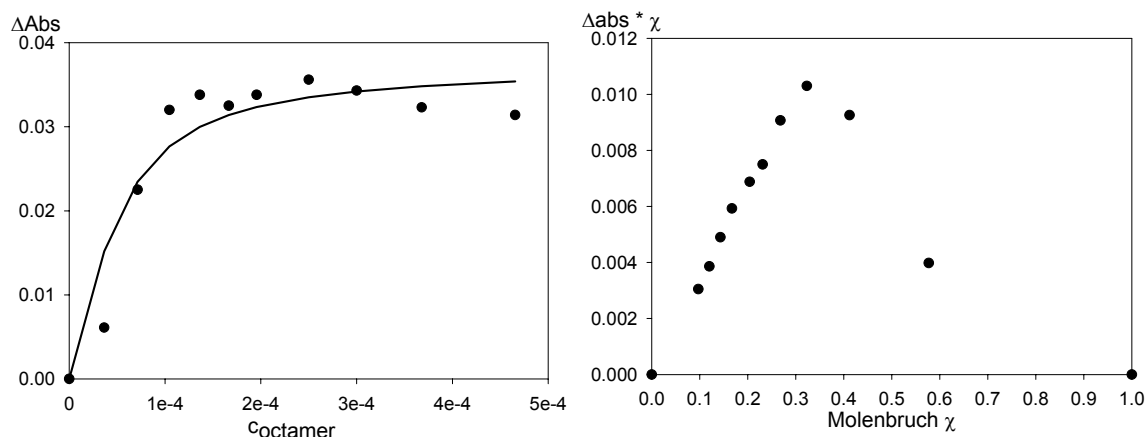
Abbildung 41 zeigt die Titrationskurve des Tetramers **28** mit Cytochrom c und den aus den Titrationsdaten ermittelten *Job-Plot*. Es zeigt sich ein deutliches 2:1 Verhältnis. Das bedeutet,

daß das Protein von zwei bisphosphonatmodifizierten PPI-Tetrameren gebunden wird. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da der „Kranz“ und die Hämtasche einerseits aus fünf basischen Aminosäuren besteht und andererseits weitere basische Aminosäuren auf der Oberfläche des Proteins zu finden sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die Stöchiometrie nicht exakt einem 2:1 Verhältnis entspricht, sondern daß eine uneinheitliche Stöchiometrie vorliegt. Nichtsdestotrotz deutet der *Job*-Plot auf ein klares 2:1-Verhältnis hin, worauf bei der Bestimmung der Komplexbildungskonstante Rücksicht genommen wurde. Unter der Annahme zweier unabhängig voneinander stattfindender Bindungsereignisse ergibt sich eine scheinbare mittlere Bindungskonstante von  $K_a(2:1) = 5270 \text{ M}^{-1} \pm 24 \%$  (für jeden einzelnen Bindungsschritt).



**Abbildung 41:** a) Titrationskurve von Tetrakis[3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)benzylaminopropyl]-1,4-diaminobutan Octalithiumsalz 28 gegen Cytochrom c und b) der aus den Titrationsdaten ermittelte *Job*-Plot.

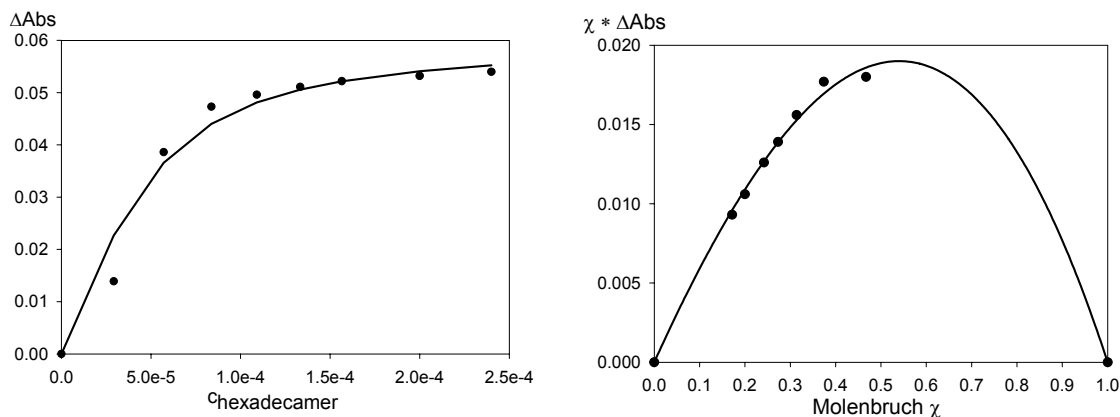
Ähnlich sieht die Situation bei der Bindung des PPI-Octamers 29 aus. Der *Job*-Plot zeigt wieder eine klare 2:1-Stöchiometrie und für die mittlere Bindungskonstante zweier unabhängiger Bindungsschritte ergibt sich ein Wert von  $K_a(2:1) = 10460 \text{ M}^{-1} \pm 41 \%$ .



**Abbildung 42:** a) Titrationskurve von Tetrakis-[bis(3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)-benzylaminopropyl)-1,3-diaminopropyl]-1,4-diaminobutan Hexadecalithiumsalz **29** gegen Cytochrom c und b) der aus den Titrationsdaten ermittelte *Job*-Plot.

Dies bedeutet einen Anstieg der Bindungskonstanten im Vergleich zum Tetramer um den Faktor 2. Da auch die Anzahl der Bindungsstellen im Dendrimer um den Faktor 2 zugenommen hat, kann man von einem proportionalen Anstieg sprechen. Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, ist bei Addition der Bindungsenergien nach  $\Delta G = -RT \ln K$  von einem exponentiellen Anstieg der Bindungskonstante bei Vergrößerung der Multivalenz auszugehen. Abbildung 40 zeigte jedoch schon, daß bei der Bindung des Octamers nur ein Teil der Bisphosphonate für eine Komplexbildung zur Verfügung steht. Der Rest ragt in das Lösungsmittel hinein. Aufgrund des geringeren Anteils an bindenden Bisphosphonatgruppen ist eine solch drastische Steigerung der Bindungskonstanten somit nicht zu erwarten.

Aufgrund der fehlenden Daten für den rechten Teil des *Job*-Plots des Hexadecamers **30**, ist die Stöchiometrie für den Komplex des Cytochrom c mit dem Hexadecamer nur zu vermuten. Allerdings knickt die Kurve, wie deutlich zu sehen ist, bei einem Molverhältnis von 0.5 ab. Eine Extrapolation zeigt dabei ein Maximum in dem Bereich von 0.5, was einer 1:1-Stöchiometrie entsprechen würde. Dieses Ergebnis macht auch Sinn, da das Hexadecamer mit seinem großen Platzbedarf sich weitflächig auf das Cytochrom c legen und einen Großteil der basischen Aminosäuren gegen eine weitere Komplexbildung abschirmen kann. Aufgrund der veränderten Stöchiometrie ergibt sich für das Hexadecamer unter der Annahme eines 1:1-Komplexes eine wesentlich höhere Bindungskonstante von  $K_{a(1:1)} = 58300 \text{ M}^{-1} \pm 45.5 \%$ .



**Abbildung 43:** a) Titrationskurve von Tetrakis-[bis-(bis(3,5-bis-(methoxyphosphonyl-methyl)-benzylamino-propyl-3-aminopropyl)-3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan Ditricontalithiumsalz **16** gegen Cytochrom c und b) der aus den Titrationsdaten ermittelte *Job*-Plot.

In Tabelle 3 sind noch einmal die Bindungskonstanten der gemessenen Komplexe zusammengefaßt. Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Bindungsaffinität bei der Vermehrung der zur Verfügung stehenden Gruppen. Das Prinzip der Multivalenz konnte somit erfolgreich angewendet werden.

**Tabelle 3:** Übersicht über die Bindungskonstanten aus den UV/Vis-Titrationen

Dendrimer	Stöchiometrie	$K_a$ (für jeden Schritt)
Tetramer	2:1	$5300 \text{ M}^{-1}$
Octamer	2:1	$10500 \text{ M}^{-1}$
Hexadecamer	1:1	$58300 \text{ M}^{-1}$

In Anbetracht der Flexibilität des Dendrimers und der Schwäche der Bindung eines einfachen Bisphosphonats zu einer basischen Aminosäure ist dies insgesamt ein beträchtlicher Anstieg der Bindungsaffinität. Vergleicht man dazu die Affinität des Cytochrom c zu seinem natürlichen Bindungspartner, der Cytochrom c Peroxidase, die bei  $K_a = 2.4 \mu\text{M}$  (entspricht  $K_a = 417000 \text{ M}^{-1}$ ) bei einer Pufferkonzentration vom 5 mM und  $\text{pH} = 7$ <sup>[98]</sup> liegt, so ist das Hexadecamer nur um den Faktor 7 schwächer. Bei einer starrereren Anordnung der Bisphosphonatgruppen in komplementärer Anordnung zu ihren Bindungspartnern dürfte die Affinität in derselben Größenordnung liegen wie beim Protein-Protein-Komplex.

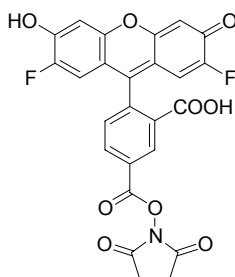
Die Frage, inwieweit es sich bei der untersuchten multivalenten Bindung um eine positiv-kooperative, additive oder negativ-kooperative Affinität nach den Ausführungen aus Kapitel 1.2 handelt, ist in diesem Zusammenhang nicht zu ermitteln, da unbekannt ist, wie viele der Bisphosphonate an der Bindung beteiligt sind. Deutlich ist aber, daß sich die einfache, sehr schwache Bindung eines Bisphosphonats an Arginin von  $K_a = 800 \text{ M}^{-1}$  in Methanol zu einer verhältnismäßig starken Bindung in wäßriger gepufferter Lösung (10 mM

Natriumphosphatpuffer; pH = 7.1) zwischen dem Hexadecamer und einem kleinen Protein steigern ließ. Interessant wäre ein Vergleich mit Bindungsaffinitäten zu anderen Proteinen mit der Frage, ob eine selektive Erkennung bzw. eine Unterscheidung von bestimmten Proteinen möglich ist. Dies soll im folgenden Kapitel näher untersucht werden.

### 3.5.6 Fluoreszenzmessungen

Die Bindungsstudien mit den dendrimeren Bisphosphonaten anhand der UV/Vis-Messungen lieferten bereits sehr interessante Ergebnisse, jedoch ist diese Messung abhängig von der Anwesenheit der Hämgruppe. Bei der Untersuchung anderer Proteine muß entweder auf die für Peptide typische Absorption bei 280 nm zurückgegriffen werden oder es müssen noch bessere Reportergruppen eingefügt werden, die bei der Komplexbildung z. B. durch Veränderung ihrer Absorption im UV-Bereich oder ihrer Fluoreszenzaktivität den Bindungsvorgang meßbar machen. Im Bereich der Proteine werden für diesen Zweck oft Fluoreszenzmarker verwendet, die in erster Linie zur Markierung des Wirkortes oder der Wanderung in lebenden Zellen dienen.

Einer dieser Farbstoffe ist OregonGreen<sup>(TM)</sup> 488 von der Firma *Molecular Probes*. Er läßt sich als aktivierter Succinimidylester selektiv bei pH = 8.4 an den N-Terminus eines Peptids binden (Abbildung 44).



**Abbildung 44:** OregonGreen<sup>TM</sup> 488 Succinimidylester von *Molecular Probes*.

Die Reaktion findet in wäßriger Lösung mit Natriumcarbonatpuffer bei pH = 8.4 statt. Der Fluoreszenzfarbstoff wird in DMSO in fünf bis zehnfachem Überschuß zugefügt und bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem Protein inkubiert. Anschließend werden die Succinimidylestermoleküle, die nicht reagiert haben mit Hydrazinhydrat abgefangen. Das markierte Protein wird schließlich über GPC von Nebenprodukten befreit und durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und entsalzt.

Mit dieser Methode wurden verschiedene Proteine markiert, um ihre Affinitäten zu den Dendrimeren zu testen. Zum direkten Vergleich mit den UV/Vis-Messungen wurde auch das dort verwendete Cytochrom c fluoreszenzmarkiert.

Da der OregonGreen Succinimidylester aufgrund der verschiedenen Zugänglichkeit des *N*-Terminus unterschiedlich leicht mit den Proteinen reagiert, muß zunächst getestet werden, wie gut die Proteine gelabelt wurden. Der Fluoreszenzmarker absorbiert normalerweise bei 496 nm und emittiert bei 535 nm. Dies variiert allerdings von Protein zu Protein und ist wahrscheinlich abhängig von der chemischen Umgebung des *N*-Terminus. Vergleicht man die Absorption einer 1 mg/mL konzentrierten Lösung des gelabelten Proteins bei 280 nm (Absorption des Proteins) mit der Absorption am Maximum des Fluoreszenzmarkers, so kann über die Gleichung 4 der Markierungsgrad des Proteins bestimmt werden.

$$MG = \frac{A_{\max} \cdot MW}{[\text{Protein}] \cdot \epsilon_{\text{Marker}}}$$

**Gleichung 4:** zur Bestimmung des Markierungsgrades **MG** über die Absorption des OregonGreen 488  $A_{\max}$ , dem Molekulgewicht des gelabelten Proteins **MW**, der Konzentration des Proteins **[Protein]** und dem Extinktionskoeffizienten des Fluoreszenzmarkers  $\epsilon_{\text{Marker}} = 70000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ .

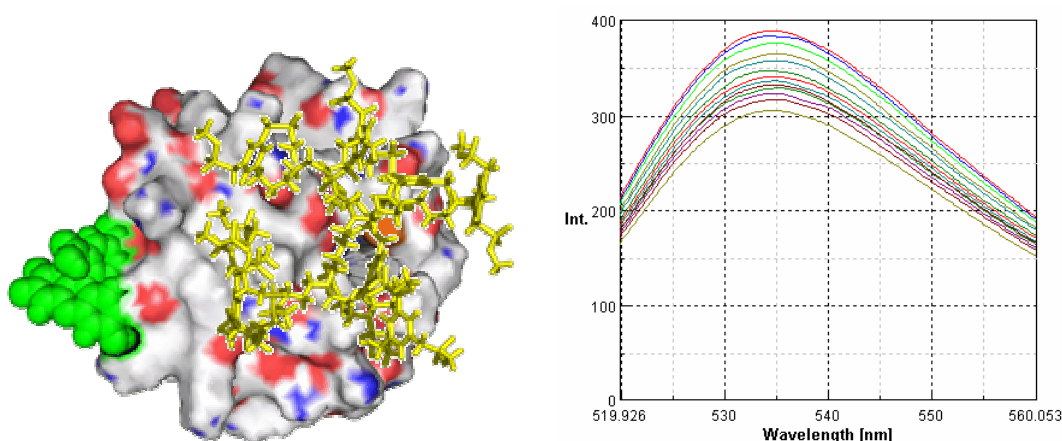
Die Markierungsgrade sind in Tabelle 4 aufgeführt. Sie bewegen sich alle im Bereich von 20 – 50%. Dies bedeutet, daß etwa jedes zweite bis fünfte Protein gelabelt wurde. Der eigentliche Markierungsgrad sollte keinen großen Einfluß auf die Fluoreszenztitration haben. Allein die Intensität eines Effektes hängt von dem Anteil der markierten Proteine ab. Dies setzt natürlich voraus, daß der Fluoreszenzmarker keinen Einfluß auf die Bindung hat und gelabelte und ungelabelte Proteine dieselbe Assoziationskonstante im Komplex mit dem Dendrimer besitzen.

**Tabelle 4:** Übersicht über die mit OregonGreen™ 488 markierten Proteine

Protein	pI	Masse	Markierungsgrad	Konzentration
BSA	5.8	66 kDa	32 %	$1.198 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$
Proteinase K	8.1	29 kDa	12 %	$3.160 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$
Cytochrom c	9.6	12 kDa	20 %	$7.363 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$
Histon H1	10.5	8 kDa	48 %	$6.777 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$
Lysozym	9.1	14 kDa	bei Markierung denaturiert	
Chymotrypsin	8.2	26 kDa	36 %	$3.126 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$

Lysozym denaturierte bei den Markierungsbedingungen und fiel im Verlauf der Reaktion aus. Dasselbe Problem trat auch bei dem Histon H1 auf, jedoch konnte es unter Verwendung einer geringeren Konzentration an Markierungsfarbstoff umgangen werden (nur 4facher Überschuß, auf die Hälfte verdünnt).

Die Fluoreszenztitrationen wurden sowohl mit dem Tetramer als auch mit dem Octamer in 10 mM Phosphatpuffer bei pH = 7.1 durchgeführt. Sowohl das unmarkierte Protein, als auch das Dendrimer zeigten keinerlei Absorption oder Emission in dem beobachteten Wellenlängenbereich. Es wurde beobachtet, daß die Fluoreszenzemission stark temperaturabhängig ist, so daß die Fluoreszenzmesszelle permanent temperiert werden mußte. Auch ein Rühren der Lösung erzeugte stabilere Meßergebnisse, die ansonsten starken Schwankungen unterworfen waren. Bei allen untersuchten Proteinen trat im Verlauf der Titration ein Anstieg der Emissionsintensität des Fluoreszenzmarkers auf. Die Effekte bei Chymotrypsin und Proteinase K waren jedoch zu gering, um daraus eine Aussage über eine eventuelle Bindung abzuleiten. Wahrscheinlich ist der Abstand der Bindungsstelle des Dendrimers von dem markierten *N*-Terminus der entscheidende Faktor für die Stärke des Effekts. Abbildung 45 zeigt am Beispiel des Cytochrom c den Abstand des Fluoreszenzlabels von dem aktiven Zentrum des Proteins, an dem wahrscheinlich das Dendrimer bindet.



**Abbildung 45:** links: Schematische Darstellung des OregonGreen™ 488 (in grün) markierten Cytochrom c im Komplex mit dem Octamer Tetrakis-[bis(3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)benzylaminopropyl)-1,3-diaminopropyl]-1,4-diaminobutan Hexadecalithiumsalz **29** (gelb). rechts: Beispiel einer Schar von Fluoreszenzemissionsspektren im Verlauf einer Titration. Ein deutlicher Anstieg der Emission um etwa 30 % ist zu beobachten.

Trotz dieses großen Abstandes ist ein deutlicher Anstieg der Emissionsintensität bei allen untersuchten Proteinen (außer Proteinase K und Chymotrypsin) zu beobachten gewesen. Wahrscheinlich bedingt die Komplexbildung des Bisphosphonats in einigen Fällen wieder eine Konformationsänderung des Proteins und damit eine Änderung der näheren chemischen Umgebung um den Fluoreszenzmarker. Bei allen Messungen strebt der Anstieg der Emission asymptotisch gegen ein Maximum. Die quantitative Auswertung erfolgte mit demselben Verfahren, wie bei NMR-Shift-Titrationen. Bei der Bestimmung der Stöchiometrie ergaben sich dieselben Probleme wie bei der UV/Vis-Titration. Normalerweise wird bei der

Bestimmung der Komplexstöchiometrie eine Titration mit konstanter Gesamtkonzentration beider Bindungspartner durchgeführt (Job-Plot). Dafür ist es jedoch notwendig, die Konzentration des fluoreszierenden Proteins stark zu variieren. Da diese Variationen eine starke Änderung in den Emissionsspektren hervorrufen, überlagern diese Effekte den im Gegensatz dazu schwachen Effekt der Komplexbildung. Deshalb wurden wie schon bei den UV/Vis-Titrationsen die Stöchiometrien aus den Titrationsen direkt abgeleitet. Diese abgeleiteten Stöchiometrien geben jedoch nur Hinweise auf die tatsächlich vorliegenden Verhältnisse. Aufgrund dieser Tatsache wurden jeweils obere und untere Grenzen für die Stöchiometrie angegeben, zwischen denen sich die tatsächliche Stöchiometrie bewegen wird. Höhere Stöchiometrien (z.B. 2:4 statt 1:2) oder gemischte Stöchiometrien (z.B. 2.5:1) können bei der Anzahl der flexiblen Bindungsstellen nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 5 faßt die Messungen aus den Fluoreszenztitrationsen zusammen.

**Tabelle 5:** Fluoreszenztitrationsergebnisse (in Klammern die ermittelten Stöchiometrien)

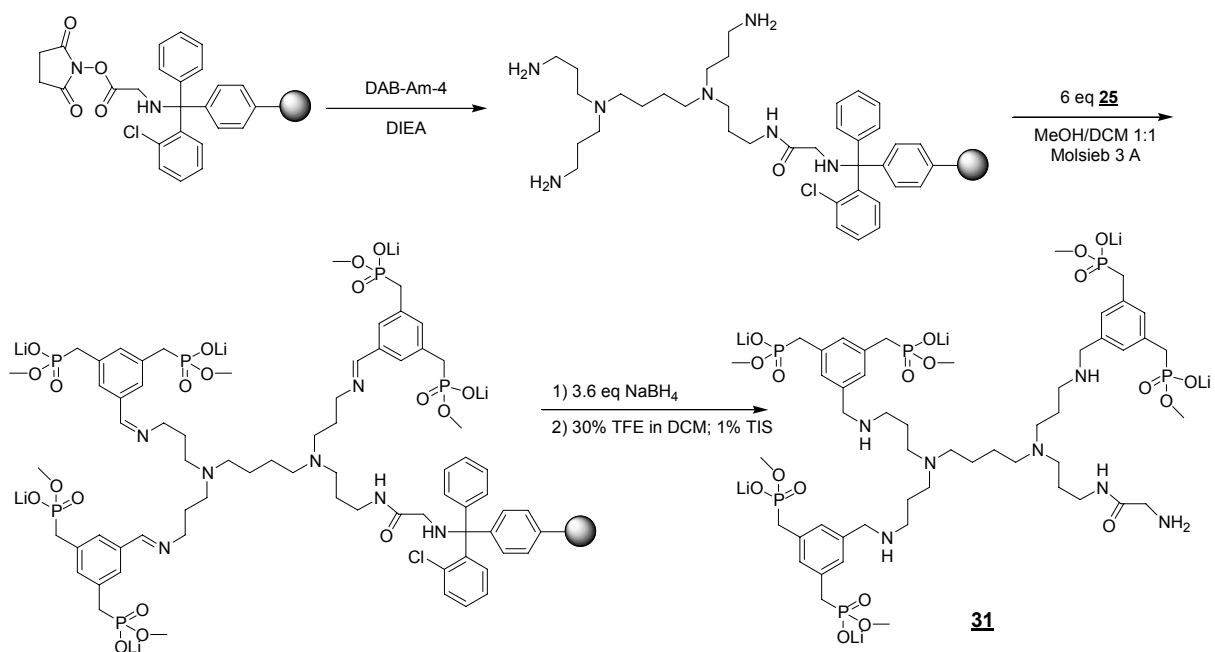
Protein	Tetramer	Octamer
Cytochrome c	2100 M <sup>-1</sup> (2:1)	4900 M <sup>-1</sup> (2:1)
BSA	3100 M <sup>-1</sup> (3:1-4:1)	19700 M <sup>-1</sup> (2:1-3:1)
Chymotrypsin	Effekte zu klein	Effekte zu klein
Histon H1	1100 M <sup>-1</sup> (2:1-3:1)	nicht gemessen
Proteinase K	kein Effekt	kein Effekt

In den meisten Fällen ergibt sich eine Komplexstöchiometrie von 2:1, nur bei BSA sind auch höhere Stöchiometrien von 3:1 oder 4:1 möglich. Dieselbe Tendenz, die auch schon bei den UV/Vis-Titrationsen zu sehen war, wird hier ebenfalls deutlich: Das Octamer bindet die entsprechenden Proteine jeweils um den Faktor 2 bis 6 besser als das Tetramer. Eine deutliche Unterscheidung der Proteine anhand des pI-Wertes ist nicht zu beobachten; betrachtet man die Struktur des BSA genauer, so wird jedoch deutlich, daß trotz des niedrigen pI-Wertes und des daher schwach sauren Charakters des Proteins die sauren Aminosäuren wie Asparaginsäure und Glutaminsäure in konkreten Domänen an der Oberfläche konzentriert sind. Ebenso gibt es deutlich basische Domänen, an die die Dendrimere binden können. Die Bindungsstärke ist also weniger vom allgemeinen sauren oder basischen Charakter des Proteins abhängig, sondern vielmehr von der Anzahl und Dichte der basischen Domänen. Daher ist das größte Protein mit immerhin mehr als 60 basischen Aminosäuren an der Oberfläche (BSA) auch der stärkste Bindungspartner für die Liganden. Das Histon H1 als basischstes Protein wird aufgrund seiner geringen Größe und damit geringen Anzahl an basischen Gruppen am schwächsten gebunden.



### 3.5.7 Dendrimere mit monofunktionalisierten Seitengruppen

Wie bereits in der Einleitung und im letzten Kapitel erwähnt, ist die gezielte Herstellung einer monofunktionalisierten, oligomeren Bisphosphonateinheit wünschenswert, so daß an diese freie funktionelle Gruppe Linkergruppen, Fluoreszenzmarker oder ähnliche Bausteine eingeführt werden können. Alternativ dazu könnte über diese freie Einheit das Oligomer an Oberflächen immobilisiert werden. Ein eleganter Ansatz ist die Monofunktionalisierung über Festphasensynthese, wie sie z. B. bei *Byk et al.* mit Polyaminen durchgeführt wurde<sup>[61]</sup>. In einer etwas abgewandelten Form wurde in dieser Arbeit mit Succinimidylester aktiviertes Glycin auf einem *o*-Chlorotriarylharz verwendet (Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Reaktionsschema zur Darstellung des monofunktionalisierten Bisphosphonatdendrimers *N*-Propyl-4-amidoglycin-tri[3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)benzyl-aminopropyl]-1,4-diaminobutan Hexalithiumsalz **31**

Nach dem üblichen Vorquellen in Dichlormethan wurde ein fünffacher Überschuß an DAB-Am 4 relativ zu der Beladungsdichte des Harzes zugegeben und etwa 24 Stunden im Festphasenreaktor inkubiert. Die Inkubation wurde nach einem Waschschrift mit einer ebenso großen Menge DAB-Am 4 wiederholt. Um die Reaktion des Dendrimers mit dem Harz zu testen, wurde der Kaisertest durchgeführt, der eine deutliche Blaufärbung zeigte. An der festen Phase wurde dann die bereits in Lösung erfolgreich angewandte reduktive Aminierung durchgeführt. Ein zweifacher Überschuß an bereits gespaltenem 3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)-benzaldehyd Dilithiumsalz **25** relativ zu den jetzt an der Oberfläche befindlichen Aminogruppen wurde zugegeben und in einem 1:1 Gemisch aus

trockenem Dichlormethan und Methanol unter Zugabe von wenig Molsieb 3 Å umgesetzt. Nach mehrmaligem Spülen mit dem Lösungsmittelgemisch wurde der Schritt ebenfalls wiederholt. Anschließend wurden dazu 3.6 Äquivalente Natriumborhydrid relativ zur Beladungsdichte des Harzes zugegeben und das Gemisch für weitere 12 Stunden geschüttelt. Nach abschließendem Spülen zeigte der Kaisertest keine Blaufärbung mehr. Auch der wesentlich empfindlichere Farbttest mit NF 31 verlief negativ, ein deutliches Zeichen für den vollständigen Umsatz der Aminofunktionen. Das fertige monofunktionalisierte Tris-Bisphosphonat-Dendrimer **31** konnte anschließend mit 30 % Trifluorethanol in Dichlormethan und 1 % Triisopropylsilan leicht sauer vom Harz abgespalten werden.

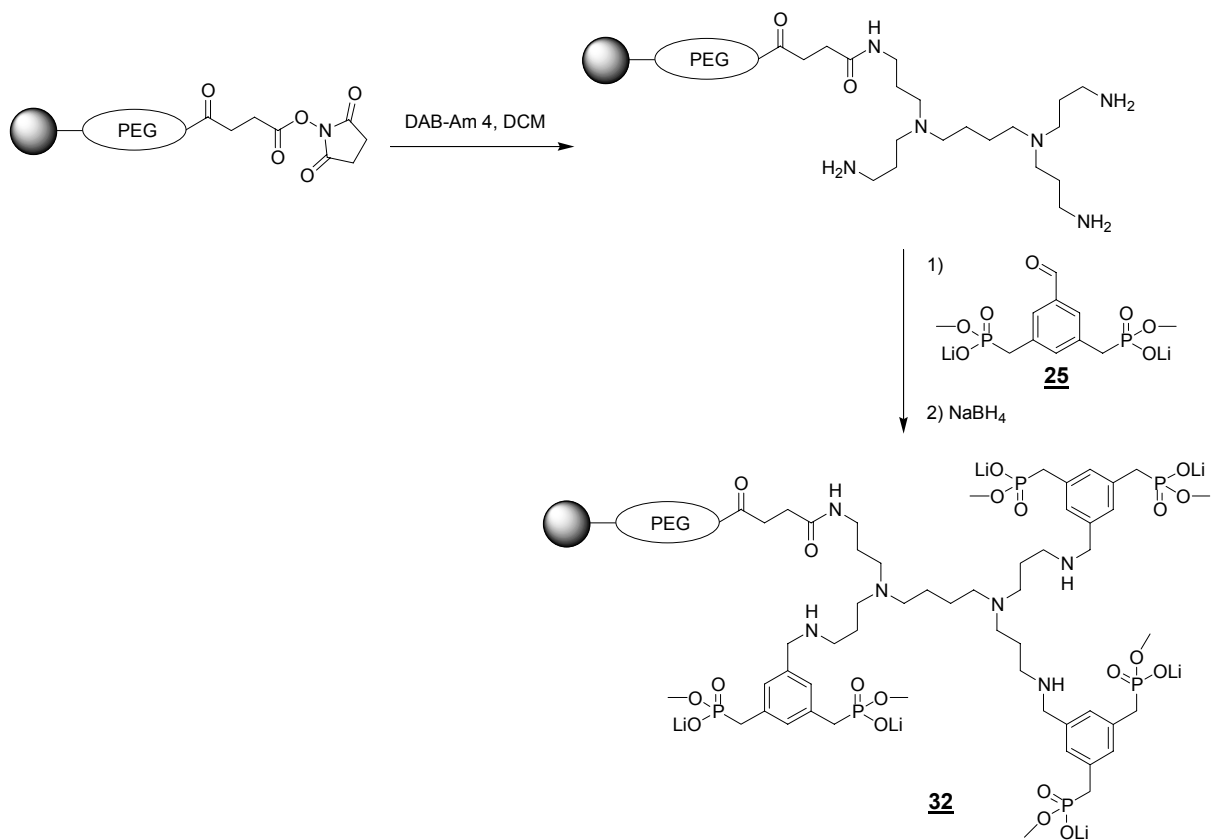
Die freie Aminofunktion bietet eine Reihe von Möglichkeiten, die Bisphosphonaterkennungseinheit mit anderen funktionellen Einheiten zu verbinden. Einerseits könnte das Prinzip aus Kapitel 3.5.6 umgekehrt werden und der Fluoreszenzmarker nicht am Protein, sondern am Dendrimer befestigt werden. Andererseits könnten andere Ankergruppen angeknüpft werden, wie z. B. Nickelnitriлотriessigsäure, die spezifisch Histidintags bindet. Durch die orthogonale Kombination von Bindungsmotiven könnten unterschiedlich „getaggte“ Proteine nichtkovalent verbunden werden und in räumliche Nähe gebracht werden. Dies ist ein lohnendes Projekt für nachfolgende Arbeiten.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten werden im Ausblick näher behandelt.

### 3.5.8 Dendrimere an der festen Phase

Für eine Anwendung ähnlich der IMAC zur Aufreinigung Arg-getaggtter oder basischer Proteine ist eine Immobilisierung der dendrimeren Erkennungseinheit auf einem polymeren Träger notwendig. Dabei ist der Ansatz, der in dem vorhergehenden Kapitel mit dem Chlorotriethylharz verfolgt wurde, ungeeignet, da der Linker äußerst säurelabil ist. Die Reaktion mit dem succinimidylaktivierte Glycin verlief jedoch so vielversprechend, so daß lediglich das Harzmaterial ausgetauscht wurde. Ein mit Succinimid aktiviertes Glycin kann auch auf einem TentaGel-Harz immobilisiert werden. Desweiteren besitzt das Harz einen Polyethylenglycollinker (PEG), der das Harz in einer großen Reihe von Lösungsmitteln verwendbar macht. Die Anbindung des Dendrimers an das Harz erfolgte analog zu der in Kapitel 3.5.7 beschrieben: Das Dendrimer wurde in großem Überschuß relativ zur Beladungsdichte des Harzes zugegeben, um eine monofunktionelle, quantitative Reaktion zu gewährleisten. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, damit keine restlichen Succinimidylglycingruppen den späteren Fortgang der Reaktion behindert. Eine Vernetzung

des Harzes ist auszuschließen, da die reaktiven Gruppen auf der Oberfläche des Harzes so weit vereinzelt sind, daß nur jeweils eine Aminofunktion pro Dendrimer reagieren wird. Anschließend wurde das 3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)-benzaldehyd Dilithiumsalz **25** ebenfalls im Überschuß (2-3fach) relativ zu den freien Aminofunktionen des Dendrimers zugegeben und das gebildete Imin nach einer Reaktionszeit von 36 Stunden mit Natriumborhydrid zum Amin reduziert. Die Iminbildung und anschließende Reduktion wurde mehrfach wiederholt, bis der Kaiser-Test und auch der wesentlich empfindlichere NF31-Test keine freien primären Aminogruppen mehr anzeigten. Abbildung 47 zeigt die vollständige Reaktionssequenz.



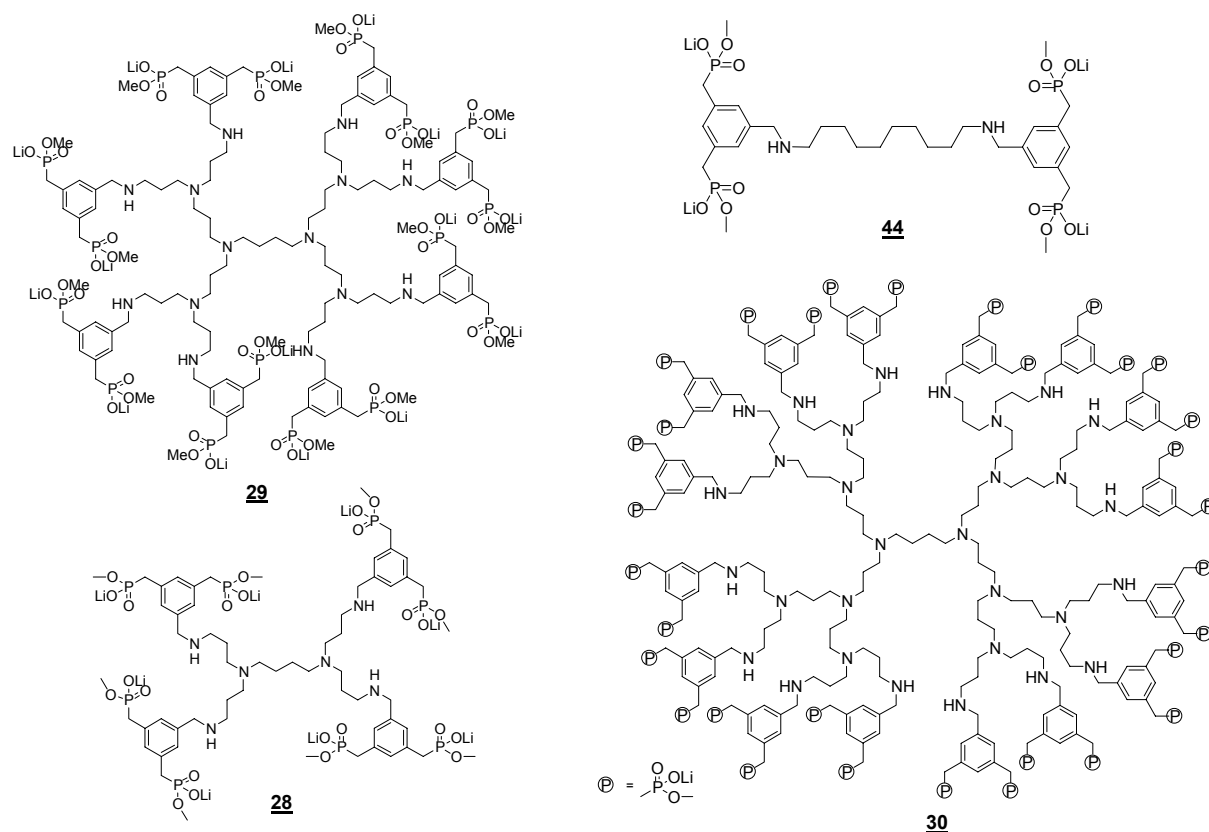
**Abbildung 47:** Reaktionsschema zur Darstellung des festphasenimmobilisierten Bisphosphonatdendrimers **32**.

In der bisherigen rekombinanten Synthese von Proteinen, bei denen Arginintags für die Aufreinigung Verwendung finden, trug das Säulenmaterial eine Vielzahl von Carboxylatgruppen. Die basischeren Proteine wurden dabei durch unspezifische Coulombwechselwirkungen länger auf der Säule gehalten. Das vorliegende bisphosphonatmodifizierte Harz sollte eine höhere Spezifität und Selektivität gegenüber basischen und vor allem Arginin- oder Lysin getaggt Proteinen aufweisen. Auch dieses Projekt ist ein lohnend für weitere Untersuchungen.

## 4. Zusammenfassung

Die Nutzung multivalenter Liganden zur selektiven Erkennung von Proteinoberflächen mit hoher Affinität ist ein effizientes Mittel der Natur, um wichtige biologische Funktionen zu kontrollieren. In der vorliegenden Arbeit sollte unter Ausnutzung dieses Prinzips die schwache Affinität des einfachen Bisphosphonatbausteins zu basischen Aminosäuren (in Methanol:  $800 \text{ M}^{-1}$ ; in Wasser:  $< 10 \text{ M}^{-1}$ ) durch Multiplikation derartig verstärkt werden, daß auch in wäßriger gepufferter Lösung Arginine und Lysine auf der Oberfläche von Proteinen stark gebunden werden können.

Dafür wurde vor allem die reduktive Aminierung als schneller Zugang verwendet, um die Bisphosphonateinheiten bereits in ihrer anionischen Form in nahezu quantitativer Ausbeute an Polypropylenimindrimere verschiedener Generationen anzuknüpfen. Die dabei erzeugten, bisphosphonatmodifizierten Dendrimere besitzen eine definierte monodisperse Struktur und konnten vom Dimer bis zum Hexadecamer dargestellt werden.



**Abbildung 48:** Durch reduktive Aminierung dargestellte, funktionalisierte PPI-Dendrimere.

Die Affinitäten zwischen Dendrimern und Proteinen konnten nicht mehr durch das in unserer Arbeitsgruppe etablierte System der NMR-Shift-Titration untersucht werden. Daher wurde

die Entwicklung verschiedener neuartiger Nachweissysteme ausgearbeitet, um die  $K_a$ -Werte für die Komplexbildung zwischen Dendrimer und Protein zu ermitteln.

Mit Hilfe von PFG-modulierten NMR-Messungen konnte das für eine Vielzahl von Dendrimeren in der Literatur bekannte „backfolding“ der Struktur ausgeschlossen werden. Diese Methode der Diffusionskoeffizientenbestimmung wurde neben UV/Vis-Titrationen und Fluoreszenztitrationen auch genutzt, um die Affinitäten des Dendrimerliganden zu basischen Proteinoberflächen zu bestimmen. Dabei konnte ein Ansteigen der Bindungsenergie mit steigender Dendrimergeneration und der damit einhergehenden Vervielfältigung der Bindungsmotive etabliert werden (Tabelle 6). Die Leistungsfähigkeit der Multivalenz wird deutlich, wenn man bedenkt, daß die monovalente Wechselwirkung in wäßrigem Medium keinerlei meßbare Affinität besitzt, wogegen schon das Tetramer eine deutliche Bindung zeigt. Auch anhand der Stöchiometrien ergibt sich ein schlüssiges Bild dahingehend, daß die kleineren Dendrimere auf den beobachteten Proteinoberflächen mehrfach gebunden werden können und mit steigender Dendrimergröße die Anzahl der Dendrimere pro Protein abnimmt.

**Tabelle 6:** Übersicht über den Anstieg der Bindungskonstanten mit steigender Dendrimergeneration

Dendrimer	Gast	Assoziationskonstante $K_a$	Stöchiometrie
Monomer	Bzl-Arg-OEt	$800 \text{ M}^{-1}$ <sup>a)</sup> $\text{H}_2\text{O}: < 10$	1:1
Dimer	H-Arg-Arg-OH	$2000 \text{ M}^{-1}$ <sup>a)</sup> $\text{H}_2\text{O}: < 10$	1:1
Tetramer	Cytochrom c	$5300 \text{ M}^{-1}$ <sup>b)</sup>	2:1
Octamer	Cytochrom c	$10500 \text{ M}^{-1}$ <sup>b)</sup>	2:1
Hexadecamer	Cytochrom c	$58300 \text{ M}^{-1}$ <sup>b)</sup>	1:1

a) gemessen in Methanol b) gemessen in wässrigem Phosphatpuffer (10 mM, pH = 7.1)

Bei allen drei verwendeten Methoden konnte eine gute Übereinstimmung in den ermittelten Bindungskonstanten gefunden werden. Tabelle 7 stellt die gemessenen Bindungskonstanten aller drei Bestimmungsmethoden gegenüber.

**Tabelle 7:** Übersicht über die Bindungskonstanten der drei Bestimmungsmethoden

System	UV/VIS-Messungen	LED-PFG-DSTE	Fluoreszenz
Cytochrom c vs. Tetramer	$5300 \text{ M}^{-1}$	$3400 \text{ M}^{-1}$	$2100 \text{ M}^{-1}$
Cytochrom c vs. Octamer	$10500 \text{ M}^{-1}$	-	$4900 \text{ M}^{-1}$
Cytochrom c vs. Hexadecamer	$58000 \text{ M}^{-1}$	-	-
BSA vs. Tetramer	-	$2400 \text{ M}^{-1}$	$3100 \text{ M}^{-1}$
BSA vs. Octamer	-	-	$19700 \text{ M}^{-1}$
Chymotrypsin vs. Tetramer	-	$1600 \text{ M}^{-1}$	-
Histon H1 vs. Tetramer	-	-	$1100 \text{ M}^{-1}$

Auch hier wird wieder die Verstärkung der Bindung vom Tetramer zum Octamer deutlich. In drei Fällen ist mindestens eine Verdoppelung der Bindungskonstanten beim Übergang vom

Tetramer auf das Octamer zu beobachten (Cyt c bei den UV/Vis und ebenfalls bei Cyt c und BSA bei den Fluoreszenzmessungen).

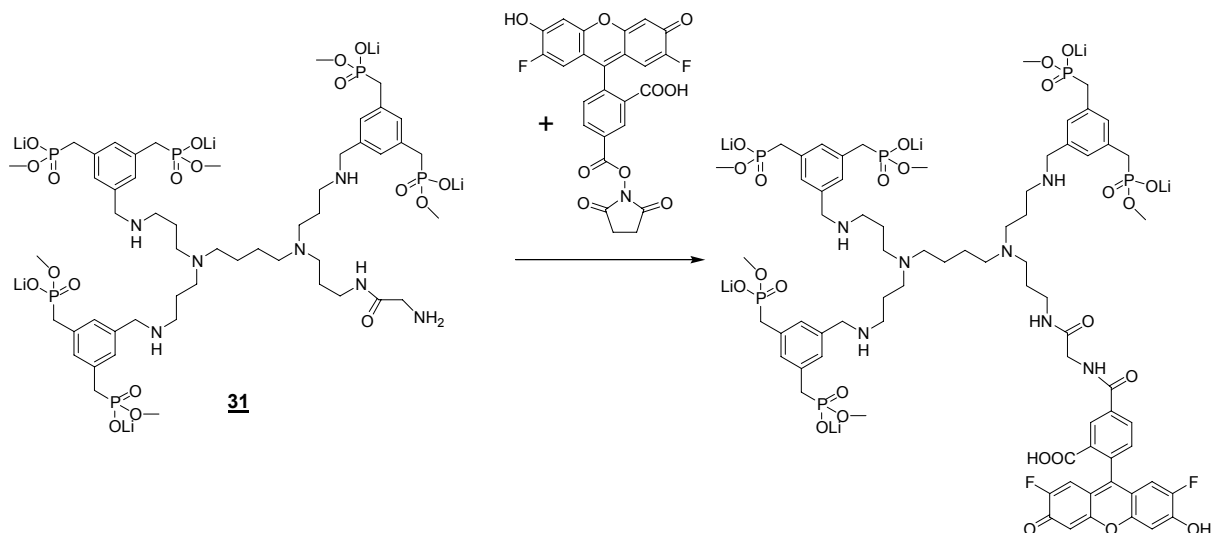
Weiterhin konnten aus den Dendrimeren monofunktionalisierte **(31)** und festphasenimmobilisierte **(32)** Varianten hergestellt werden, die ein breites Spektrum weiterer Verwendungsmöglichkeiten wie die Anknüpfung orthogonaler Erkennungsgruppen oder die Aufreinigung getaggtter Proteine über Affinitätschromatographie eröffnen. Näheres zu den weiteren Verwendungsmöglichkeiten wird im folgenden Ausblick erläutert.

## 5. Ausblick

### 5.1 Ausweitung des Proteinspektrums

Im Rahmen dieser Arbeit wurden schon einige interessante Proteine bezüglich ihrer Affinität zu den dargestellten Dendrimeren getestet. Wichtig wäre nun, das untersuchte Proteinspektrum auszuweiten und eine Reihe weiterer Proteine zu testen. Dabei sollte vor allem untersucht werden, wie groß die Spezifität gegenüber basischen Proteinen ist.

Die Fluoreszenztitration mit OregonGreen<sup>TM</sup> 488-markierten Proteinen scheint dafür ein nützliches Hilfsmittel zu sein. Wie jedoch zu beobachten war, zeigte sich bei einigen dieser Proteine kein Effekt im Emissionsspektrum. Dies kann einerseits darauf zurückzuführen sein, daß keine Affinität zum Dendrimer besteht oder aber daran, daß die Bindungsstelle ans Protein zu weit von dem gelabelten *N*-Terminus entfernt ist und daher kein Effekt zu beobachten war. Eine Möglichkeit diese Limitierung zu umgehen, wäre die Verwendung des OregonGreen-labels am Dendrimer durch Einführung an die freie Aminogruppe des *N*-Propyl-4-amidoglycin-tri[3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)benzyl-aminopropyl]-1,4-diaminobutan Hexalithiumsalzes **31** (Abbildung 49).



**Abbildung 49:** Markierung des Bisphosphonatrimers **31** mit OregonGreen<sup>TM</sup> 488

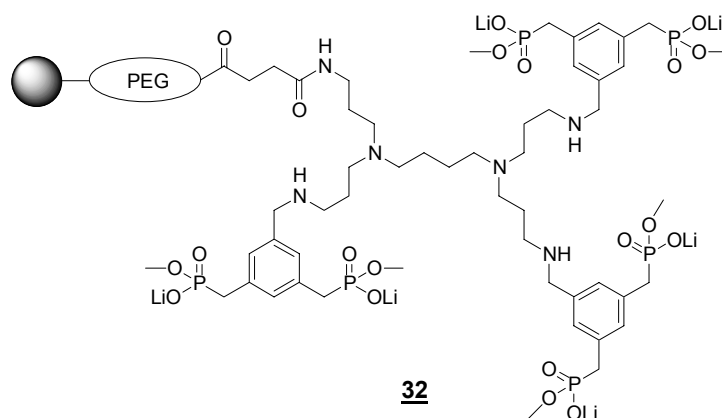
Der Fluoreszenzmarker befände sich in diesem Falle immer direkt an der Bindungsstelle, was in einem besser beobachtbaren Effekt resultieren würde. Auch müßte nicht jedes einzelne Protein vor der Vermessung gelabelt werden.

Auch die Dendrimere höherer Generation könnten so fluoreszenzgelabelt werden und in die Bindungsstudien einbezogen werden.

## 5.2 Aufreinigung getaggtter Proteine über Affinitätschromatographie

Auch das festphasenimmobilisierte Tetramer bzw. Trimer konnte erfolgreich dargestellt werden. Dieses so vorbehandelte Tentagel Harz ist in den meisten polaren Lösungsmitteln aufgrund des Polyethylenglykollinkers gut quellbar und kann einerseits als Säulenmaterial zur Aufreinigung arginingetaggtter Proteine benutzt werden.

Andererseits können auch die unterschiedlichen Laufeigenschaften von Proteinen mit einem breiten pI-Spektrum getestet werden.



**Abbildung 50:** Festphasenimmobilisiertes *N*-Propyl-4-amino-tri[3,5-bis(methoxy-phosphonylmethyl)benzylaminopropyl]-1,4-diaminobutan Hexalithiumsals zur Proteinreinigung

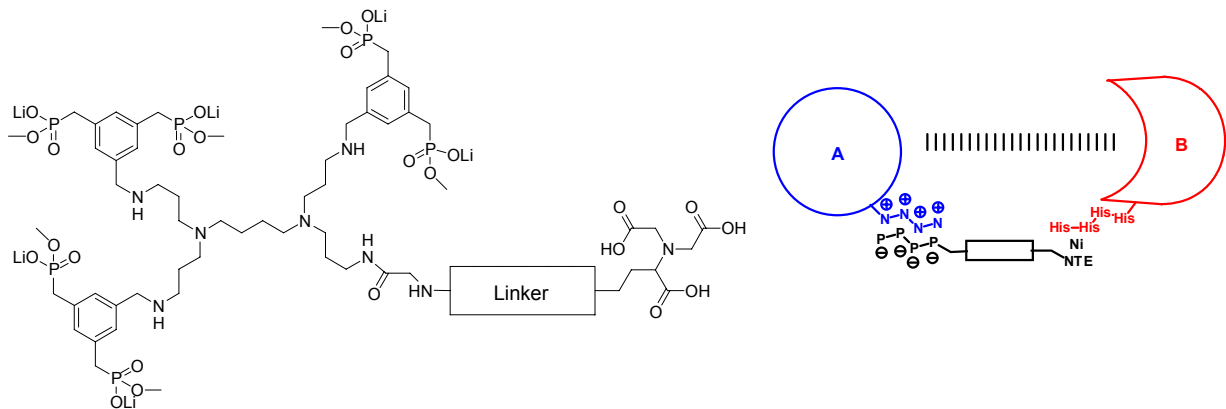
Daneben ist es natürlich auch interessant, die Dendrimere höherer Generationen auf dem Harz zu immobilisieren und ihre Affinität zu Arg-getaggtten Proteinen zu bestimmen. Dabei ist die Frage zu klären, ob bei den höheren Generationen eine längere Verweilzeit auf der Säule zu beobachten ist und Proteine anhand ihres pI oder der Länge des Arginintags aufgetrennt werden können.

## 5.3 Verknüpfung der monofunktionalisierten Dendrimere mit anderen Erkennungseinheiten

Neben dem Anknüpfen eines Fluoreszenzmarkers an die freie Aminogruppe des Bisphosphonattrimers **31** kann diese Stelle auch durch andere funktionelle Einheiten adressiert werden. So wäre es interessant, eine orthogonale Haftgruppe wie zum Beispiel Nitrilotriessigsäure zu verwenden, die in Gegenwart von Nickel an Histidintags bindet. Beide Bindungsstellen in einem Molekül könnten in der Lage sein, in Lösung nichtkovalent und reversibel unterschiedlich getaggtte Proteine in räumliche Nähe zu bringen und ihr funktionelles Zusammenspiel zu beeinflussen bzw. wiederherzustellen. Als Beispiel sei hier



die PCP- und die TE-Domäne der nichtribosomalen Peptidsynthetase (NRPS) genannt, die die Natur dazu benutzt, zyklische Peptidantibiotika herzustellen<sup>[99, 100]</sup>.



**Abbildung 51: Links:** Mögliche Struktur des Bisphosphonat-trimers mit der über einen Linker angefügten Nitrilotriessigsäure zur orthogonalen Erkennung His- und Arg-getaggtter Proteinmodule. **Rechts:** Schematische Darstellung der nichtkovalenten Verknüpfung zweier Proteinmodule A (Arg-getaggt) und B (His-getaggt).

Darüber hinaus kann die freie Ammoniumgruppe genutzt werden, um die Komplexierungseinheit auf Gold oder ähnlichen Oberflächen zu immobilisieren. Bei der Bindung arginingetaggtter Proteine werden diese ebenfalls möglicherweise in geordneten Strukturen auf der Oberfläche nichtkovalent gebunden und stehen so weiteren Untersuchungen zur Verfügung.

#### 5.4 Eingreifen in Enzymfunktionen durch Komplexierung mit Dendrimeren

Eines in dieser Arbeit am besten untersuchten Proteine ist das Cytochrom c. Die bisphosphonatmodifizierten Dendrimere binden mit steigender Generation immer besser an das Protein. *Hamilton* beobachtete bei der Komplexierung mit seinem Porphyrinliganden eine Inhibierung der Reduktion des Häm-Eisens(III) zu Eisen(II)<sup>[101]</sup>. Die Bindungsstelle für die in dieser Arbeit hergestellten Liganden sollte ebenfalls in der Nähe des Kranzes aus basischen Aminosäuren um die Hämgruppe des Proteins liegen und diese somit vor äußeren Einflüssen abschirmen. Inwieweit dabei die Proteinfunktion abgeschaltet wird, muß noch untersucht werden. Dies sollte leicht durch einen entsprechender Assay mit Cytochrom c Reduktase möglich sein. Anschließende Zugabe von Natriumchlorid sollte das Dendrimer wieder freisetzen und das Protein „anschalten“.

Eventuell können noch weitere inhibierende Wirkungen auf andere Proteine getestet werden. So wäre es ebenfalls interessant, ob die Dendrimere die Komplexierung des

Transkriptionsaktivatorprotein Tat an den terminalen Loop der viralen mRNA TAR und damit die Transkription des viralen Codes des AIDS-Virus unterbinden können. Eine solche Wechselwirkung wird als neue AIDS-Therapie diskutiert.

Mit der Entwicklung dieser Dendrimere steht jetzt die Tür offen für eine Reihe von spannenden Experimenten, bei denen Proteinfunktionen nachhaltig beeinflusst werden können.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1 Materialien und Methoden

**Dünnschichtchromatogramme** wurden auf Aluminium-Fertigplatten *Kieselgel 60 F<sub>254</sub>* der Firma *Merck* ausgeführt. Die Substanzen wurden durch Betrachtung unter einer UV Lampe (254 nm bzw. 366 nm) oder durch Anfärben mit *CAM*-Tauchreagenz (2 g Cersulfat, 50 mL konz. Schwefelsäure, 50 g Ammoniummolybdat und 400 mL Wasser, Platte auf 100 °C erwärmen), bzw. mit Ninhydrin-Tauchreagenz (0.3 %ige Lösung in *n*-Butanol, Essigsäure, Platte auf 100 °C erwärmen) sichtbar gemacht.

Für die **Säulenchromatographie** nach der Flash-Methode wurde *Kieselgel 60* (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Preßluft-Überdrucks.

**HPLC-Chromatographie** wurde einer *Merck-Hitachi*-Anlagen (analytisch: L-7150 Pumpe, L-7400 UV Detektor, L-7000 Interface Modul, *Jasco* Säulenofen, L-7614 Lösungsmittel Entgaser; präparativ: K-1800 Pumpe, K-2501 UV-Detektor, *Advantec* SF-3120 Probensammler) durchgeführt.

**Schmelzpunkte** wurden in offenen Glaskapillaren mit einer Kofler-Apparatur Thermophan von *Reichert* gemessen und sind nicht korrigiert.

**UV/Vis-Spektren** wurden auf einem U-3410 Spektrophotometer der Firma *Hitachi* mit Temperiereinheit der Firma *Haake* gemessen. Die Basislinie wurde vor jeder Messung mit reinem Puffer bestimmt. Für die Messungen wurden Küvetten der Firma *Helma* verwendet mit einem Innendurchmesser von 2 mm und einem Strahlengang von 10 mm (Meßvolumen 500 µL).

**Fluoreszenz-Spektren** wurden mit einem FP-6500 Spektrofluorometer der Firma *Jasco* mit integriertem Rührer und Temperiereinheit von *Haake* aufgenommen. Für die Messungen wurden sonderangefertigte Rundküvetten mit 1 cm Innendurchmesser (Meßvolumen 400 - 1400 µL) der Firma *Helma* verwendet.

**Massenspektren (MS)** wurden durch den MS-Service des FB-Chemie, Philipps-Universität Marburg, aufgenommen. ESI-Massenspektren wurden auf einem *Finnigan TSQ 7000*, *Finnigan MAT 95* oder *S<sup>+</sup>Qstar Pulsar i* ESI-TOF Massenspektrometer (*Applied Biosystems*, Darmstadt) gemessen. FD-Massenspektren wurden mit einer *Finnigan MAT 95 S* aufgenommen. MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem *Bruker Flex III* gemessen. Es werden die wichtigsten Signal in *m/z*-Einheiten angegeben, wobei wenn möglich eine Zuordnung in Klammern angemerkt ist.

**Lösungsmittel** und **Chemikalien** wurden falls nicht anders erwähnt, in den kommerziell erhältlichen Qualitäten *puriss. p.a.* oder *purum.* eingesetzt und wurden von den Firmen *Fluka*, *Aldrich*, *Acros*, und *Merck* bezogen. Aminosäuren und Kupplungsreagenzien wurden von den Firmen *Novabiochem*, *Bachem*, *Advanced Chemtech*, *Applied Biosystems* und *Iris Biotech* bezogen. THF wurde über Natrium, Dichlormethan über Calciumhydrid, Methanol über Magnesium und Ethanol über Natrium / Phthalsäure-diethylester getrocknet. DMF und NMP wurden speziell für die Peptidsynthese von *Fluka* bezogen. Lösungsmittel für Extraktionen und Säulenchromatographie waren von technischer Qualität und wurden vor der Verwendung destilliert.

### ***Molecular Modeling* Untersuchungen**

Kraftfeldrechnungen wurden mit dem Programm *MacroModel V 7.2* der Firma *Schroedinger INC.* durchgeführt. Verwendet wurden die Kraftfelder *AMBER\** sowie *OPLS-AA* und das *GB/SA Solvationsmodell* für Wasser. Monte-Carlo Simulationen wurden mit 3000-5000 Schritten gerechnet. Anschließende Moleküldynamik Rechnungen wurden 100 ps bei 300 K durchgeführt und durch Überlagerung der alle 10 ps gespeicherten Strukturen abgebildet.

Weitere Darstellungen von Proteinen und ihren Liganden wurden mit dem Programm *Sybyl 6.0* angefertigt und durch einfache Minimierung mit *MMFF95\** strukturell optimiert.

**Kernresonanzspektren (NMR)** wurden falls nicht anders angegeben bei 300 K auf den Geräten *Bruker DRX 200*, *Bruker AMX 300*, *Bruker AMX 400* und *Bruker AMX 500* aufgenommen. In Klammern sind jeweils die Messfrequenz in MHz sowie das Lösungsmittel vermerkt. Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist in ppm und die Kopplungskonstante *J* in Hz angegeben. Die Signalmultiplizitäten wurden mit den Symbolen *s* (*Singulett*), *brs* (*breites Singulett*), *d* (*Dublett*), *t* (*Triplet*), *q* (*Quartett*), *m* (*Multiplet*) sowie ggf. deren

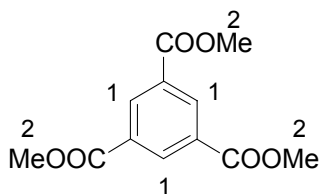
Kombinationen gekennzeichnet. Die Zuordnung der NMR Spektren erfolgte je nach Verbindung mittels APT-, COSY-, HMQC-, HMBC-, TOSCY- und/oder NOESY-Experimenten.

**NMR Titrations:** Titrationsspektren wurden auf den *Bruker AMX 400* oder *Bruker AMX 500* sowie *Bruker AMX 300* Spektrometern gemessen. Wasserunterdrückung erfolgte durch *WATERGATE*. Entsprechende Einwaagen der erfolgreichen NMR Titrations sind nachfolgend aufgeführt. Verdünnungseffekte des Gastes wurden überprüft und gegebenenfalls beachtet.

**Proteinaufreinigung:** Die Aufreinigung der gelabelten Proteine erfolgte über eine *AKTA prime* von *Amersham Pharmacia biotech* über fünf hintereinander geschaltete HiTrap™ Desalting 5 ml Säulen von *Amersham Biosciences* bei einem Fluß von 1 ml/min. Als Eluent wurde ein Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH = 7.1; 10 mM) mit 100 mM NaCl verwendet. Aufkonzentriert und entsalzt wurden die Proteine durch Ultrazentrifugation mit Vivaspin MWCO PES Filtern von *Vivascience/Sartorius*.

## 6.2 Synthesen der Verbindungen

### Darstellung von Trimesinsäuretrimethylester

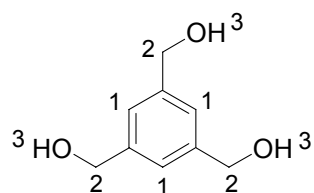


100.0 g Trimesinsäure (476 mmol) wurden in 300 mL absolutem Methanol suspendiert. Unter starkem Rühren wurde 15 min HCl-Gas eingeleitet, wobei sich der Feststoff langsam löste. Anschließend wurde die Lösung etwa 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Dabei bildete sich ein weißer, voluminöser Niederschlag, der abfiltriert, mit Methanol gewaschen und anschließend getrocknet wurde. Ausbeute: 112 g (444 mmol, 93%).

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ[ppm] = 3.92 (s, 9H, H-2), 8.62 (s, 3H, H-1).

Das Spektrum stimmt mit der Literatur überein <sup>[102]</sup>.

### Darstellung von 1,3,5-Trihydroxymethylbenzol



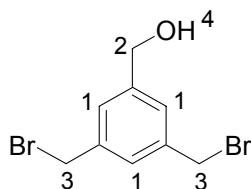
In einem ausgeheizten 500 mL Dreihalskolben wurden unter Argon 15.0 g LAH (395 mmol, 3.3 eq) als Suspension in 80 mL trockenem THF zum Sieden erhitzt. Dazu wurden 30 g Trimesinsäuretrimethylester (119 mmol, 1.0 eq) in 250 mL trockenem THF über einen Zeitraum von 2 h zugetropft. Anschließend wurde das Gemisch weitere 6 h unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen der Mischung wurde mit 20 ml destilliertem Wasser und 40 ml 15 %iger Natronlauge hydrolysiert. Es wurde solange bei Raumtemperatur weitergerührt, bis sich der Niederschlag von grau vollständig nach weiß entfärbt hatte. Der Niederschlag wurde abfiltriert und gründlich mit 100 mL THF gewaschen. Gegebenenfalls kann der Niederschlag nochmals im Heißextraktor mit THF ausgekocht werden (ca. 24 h), um die Ausbeute zu erhöhen. Die vereinigten organischen Lösungen wurden mit 1 M HCl neutralisiert und anschließend, nach entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: Das Produkt enthielt noch große Mengen anorganische Salze und wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe verwendet.

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ[ppm] = 4.50 (s, 6H, H-2), 4.75 (s, 3H, H-3), 7.15 (s, 3H, H-1).

Das Spektrum stimmt mit der Literatur überein <sup>[103]</sup>

### Darstellung von 3,5-Dibromomethyl-benzylalkohol



4.5 g 1,3,5-Trihydroxymethylbenzol (26.8 mmol, 1.0 eq) und 19.5 g Tetrabrommethan (58.8 mmol, 2.2 eq) wurden unter Rühren in 100 mL absolutem Acetonitril auf 0° C gekühlt. Anschließend wurde 15.5 g Triphenylphosphin (59.1 mmol, 2.2 eq) langsam, portionsweise hinzugegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde die Lösung weitere 24 h bei

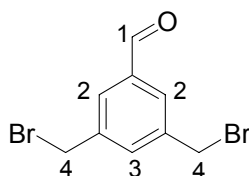
Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, wobei ein braunes Öl zurückblieb, das in wenig Dichlormethan gelöst und über Silicagel mit einem Laufmittelgemisch von Hexan / Essigester (9:1 später umstellen auf 1:1) gereinigt wurde. Ausbeute: 3.1 g (das Edukt war noch mit Natriumchlorid verunreinigt)

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta[\text{ppm}] = 1.93$  (s, 1H, H-4), 4.47 (s, 4H, H-3), 4.68 (s, 2H, H-2), 7.33 (s, 3H, H-1).

Das Spektrum stimmt mit der Literatur überein <sup>[49]</sup>

$R_f$  (Hexan/Essigester 6:4) = 0.36.

### Darstellung von 3,5-Dibromomethyl-benzaldehyd



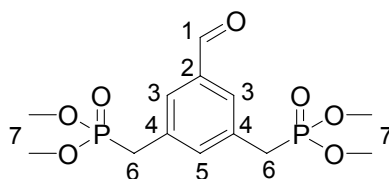
1.0 g 3,5-Dibromomethyl-benzylalkohol (3.4 mmol; 1.0 eq) wurden in 100 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 3.0 g frisch gefälltem Mangan-(IV)-oxid (34 mmol; 10 eq) versetzt. Der Reaktionsverlauf wurde mit DC-Kontrolle (Hexan/Essigester 7:3) verfolgt. Als keine Änderung bei der DC-Kontrolle zu beobachten war, wurden weitere 3.0 g Mangan-(IV)-oxid zugegeben und 8 h gerührt. Anschließend wurde der Feststoff über Kieselgur abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der resultierende weiße Feststoff an Silicagel mit Hexan/Essigester (7:3) chromatographisch gereinigt. Ausbeute: 780 mg (2.7 mmol; 79 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta[\text{ppm}] = 4.53$  (s, 4H, H-4), 7.69 (t,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$  Hz, 1H, H-3), 7.84 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$  Hz, 2H, H-2), 10.01 (s, 1H, H-1).

Die Spektren stimmen mit der Literatur überein <sup>[49]</sup>

$R_f$  (Hexan/Essigester 7:3) = 0.52.

**Darstellung von 3,5-Bis(dimethoxyphosphinylmethyl)-benzaldehyd 4**



700 mg 3,5-Dibromomethylbenzaldehyd (2.4 mmol; 1.0 eq) wurden unter Argon in 30 mL Trimethylphosphit (254 mmol; ca. 100 eq) gelöst und 4 h bei 110° C gerührt. Dabei durfte die Temperatur jedoch keinesfalls 110° C überschreiten. Anschließend wurde das überschüssige Trimethylphosphit im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Das resultierende Öl konnte an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (20:1) gereinigt werden. Ausbeute: 770 mg (2.2 mmol; 92 %)

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 3.23 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,H</sub> = 22.0 Hz, 4H, H-6), 3.71 (d, <sup>3</sup>J<sub>P,H</sub> = 11.0 Hz, 12H, H-7), 7.53 (m, 1H, H-5), 7.70 (m, 2H, H-3), 9.99 (s, 1H, H-1).

**<sup>31</sup>P-<sup>1</sup>H-NMR (81 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 28.2 (s).

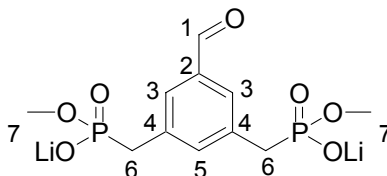
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 32.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,C</sub> = 6.7 Hz), 53.0 (d, <sup>1</sup>J<sub>P,C</sub> = 138.2 Hz), 129.6, 129.9, 131.9, 133.1, 136.9, 191.6.

**Elementaranalyse:** C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub> + 1.5 eq H<sub>2</sub>O; ber. H = 6.14, C = 41.39; gef. H = 5.96, C = 41.55.

**R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Methanol 20:1) = 0.32**

**Smp.:** 72 °C

**Darstellung von 3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)-benzaldehyd Dilithiumsalz 25**



1.0 g 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)-benzaldehyd 4 (2.9 mmol; 1.0 eq) wurden in 50 mL absolutem Acetonitril unter Argon gelöst und nach Zugabe von 0.5 g trockenem Lithiumbromid (5.8 mmol; 2.0 eq) 48 h unter Rückfluß gekocht. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und mit 20 mL absolutem Acetonitril gewaschen. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum erhielt man 870 mg Produkt (2.6 mmol; 90 %).



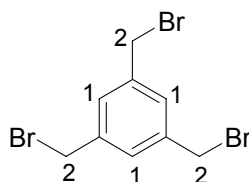
**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, MeOH- $d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 3.05 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 20.7$  Hz, 4H, H-6), 3.51 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 10.2$  Hz, 6H, H-7), 7.58 (m, 1H, H-5), 7.71 (m, 2H, H-3), 9.93 (s, 1H, H-1).

**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz, MeOH- $d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 25.2 (s).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  [ppm] = 33.6 (d,  $^2J_{\text{P,C}} = 6.2$  Hz), 52.2 (d,  $^1J_{\text{P,C}} = 128.1$  Hz), 129.3 (t,  $^3J_{\text{P,C}} = 4.5$  Hz), 136.5 (m), 137.9 (t,  $^3J_{\text{P,C}} = 5.6$  Hz), 196.9.

**Elementaranalyse:**  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_7\text{P}_2\text{Li}_2 + 1.5 \text{ eq H}_2\text{O}$ ; ber. H = 4.75, C = 36.59; gef. H = 4.69, C = 35.81.

### Darstellung von 1,3,5-Tribromomethylbenzol

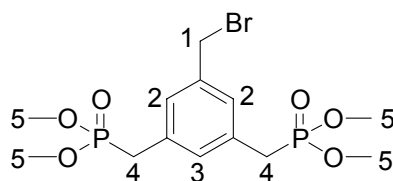


In einem sekurierten und ausgeheizten 250 ml Stickstoffkolben wurden unter Schutzgas 6.9 g 1,3,5-Trihydroxymethylbenzol (41.1 mmol, 1.0 eq) in 150 mL trockenem Diethylether gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung aus 15 mL Phosphortribromid (161 mmol, 3.9 eq) in 15 mL Diethylether wurde langsam zugetropft. Es fiel ein weißer Niederschlag, der sich bei weiterem Rühren über 12 h bei Raumtemperatur wieder auflöste. Die leicht gelbliche Lösung wurde auf Eiswasser gegossen und mit Diethylether extrahiert (3 x mit je 45 mL). Die vereinten Etherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren des Trocknungsmittels und abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der resultierende Feststoff am Hochvakuum getrocknet. Ausbeute: 10.2 g (28.5 mmol, 70 %)

**$^1\text{H-NMR}$ : (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ [ppm]= 4.46 (s, 6H, H-2), 7.36 (s, 3H, H-1).

Die Spektren stimmen mit der Literatur überein <sup>[104]</sup>

### Darstellung von 3,5-Bis(dimethoxyphosphinylmethyl)-1-bromomethyl-benzol 5



500 mg 1,3,5-Tribromomethylbenzol (1.4 mmol, 1.0 eq) wurden in 50 mL Mesitylen gelöst und mit 330  $\mu$ L Trimethylphosphit (2.8 mmol, 2.0 eq) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 6 Stunden zum Sieden erhitzt und anschließend im Ölpumpenvakuum von Lösungsmittel und flüchtigen Nebenprodukten befreit. Das entstehende farblose Öl wurde im Hochvakuum getrocknet und anschließend an Silicagel mit einem Laufmittelgemisch von Dichlormethan/Methanol (15:1) gereinigt. Ausbeute: 460 mg (1.1 mmol; 80%)

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 3.16 (d,  $^2J = 22.0$  Hz, 4H, H-4), 3.69 (d,  $^3J = 11.0$  Hz, 12H, H-5), 4.45 (s, 2H, H-1), 7.17-7.23 (s, 8H, H-2,3).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 33.1 (d,  $^2J_{P,C} = 136.8$  Hz), 54.7 (d,  $^1J_{P,C} = 6.6$  Hz), 126.3, 128.4, 131.5, 136.9.

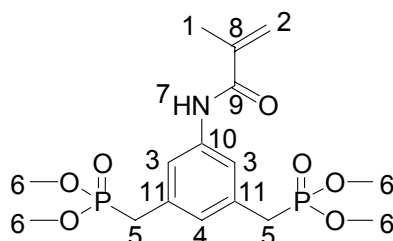
**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ [ppm] = 28.6 (s).

**MS (EI):**  $m/z$  (%) = 414 ( $\text{M}^+$ , 7), 335 ( $\text{M}^+$ -Br, 100), 117 ( $\text{M}^+$ -Br-2 PO(OMe) $_2$ , 10), 77 (arom., 8).

**$R_f$**  (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0.37.

**Smp.:** 79 °C

### Darstellung von Methacryl-3,5-bis(dimethoxyphosphinylmethyl)benzoesäureamid 9



1.5 g 3,5-Bis(dimethoxyphosphinylmethyl)anilin 3 (4.45 mmol, 1.0 eq) und eine Spatelspitze DMAP wurden unter Argon in 100 mL absolutem Dichlormethan gelöst und mit 3 mL frisch destilliertem Triethylamin (22.00 mmol, 4.8 eq) versetzt. 0.6 mL Methacrylsäurechlorid (6.22 mmol, 1.4 eq) in 5 mL absolutem Dichlormethan wurden über einen Zeitraum von einer

Stunde über ein Septum hinzu gegeben. Anschließend wurde noch 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, wobei das Wasserbad 30°C nicht übersteigen sollte. Das resultierende gelbbraune Öl wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (10:1) gereinigt. Ausbeute: 972 mg (2.40 mmol, 54 %)

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 2.05 (s, 3H, H-1), 3.14 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,H</sub> = 21.9 Hz, 4H, H-5), 3.70 (d, <sup>3</sup>J<sub>P,H</sub> = 11.0 Hz, 12H, H-6), 5.47 (s, 1H, H-2<sub>a</sub>), 5.80 (s, 1H, H-2<sub>b</sub>), 7.00 (s, 1H, H-4), 7.48 (s, 2H, H-3), 7.68 (s, 1H, H-7).

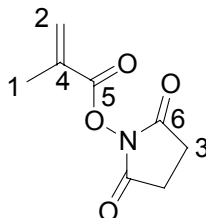
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 18.8 (s, C-1), 29.9 (d, <sup>1</sup>J<sub>P,C</sub> = 6.9 Hz, C-5), 51.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,C</sub> = 136.8 Hz, C-6), 116.8 (s, C-3), 119.1 (s, C-2), 124.3 (s, C-4), 135.7 (s, C-11), 136.8 (s, C-10), 138.0 (s, C-8), 161.3 (s, C-9).

**<sup>31</sup>P-{<sup>1</sup>H}-NMR (81 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 29.4 (s).

**MS (EI):** *m/z* (%) = 404 (M<sup>+</sup>, 35), 390 (M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>, 10), 295 (M<sup>+</sup>-PO(OMe)<sub>2</sub>, 7), 108 (CH<sub>2</sub>PO(OMe)<sub>2</sub>, 45), 69 (M<sup>+</sup>-BP-anilin, 100).

**R<sub>f</sub>** (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0.34.

### Darstellung von Methacrylsäure-*N*-oxysuccinimid



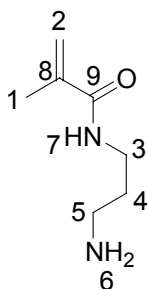
Basierend auf einer Vorschrift von *Eaton et al.*<sup>[105]</sup> wurden zunächst 600 mg *N*-Hydroxysuccinimid (5.2 mmol, 1.0 eq) und 725 µL Triethylamin (5.2 mmol, 1.0 eq) in 13 mL trockenem THF gelöst und auf 0°C abgekühlt. Anschließend wurden über einen Zeitraum von 30 min 503 µL Methacrylsäurechlorid (5.2 mmol, 1.0 eq) in 5 mL THF zugegeben. Nach der Zugabe ließ man das Gemisch auf Raumtemperatur auftauen und rührte noch 2 Stunden, bevor das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt wurde (nicht über 40°C erwärmen). Der Rückstand wurde in 100 mL Diethylether aufgenommen, dreimal mit gesättigter Natriumchloridlösung (je 75 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (LM: Essigester) gereinigt. Ausbeute: 590 mg (M = 183.2 g/mol, 3.22 mmol, 62 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.39 (s, 3H, H-1), 2.37 (s, 4H, H-3), 5.85 (s, 1H, H-2b), 6.51 (s, 1H, H-2a).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 17.8 (C-1), 27.1 (C-3), 127.3 (C-2), 133.7 (C-4), 167.8 (C-6), 138.0 (C-8), 169.5 (C-5).

$R_f$  (Essigester) = 0.37.

### Darstellung von *N*-(3-Aminopropyl)methacrylamid

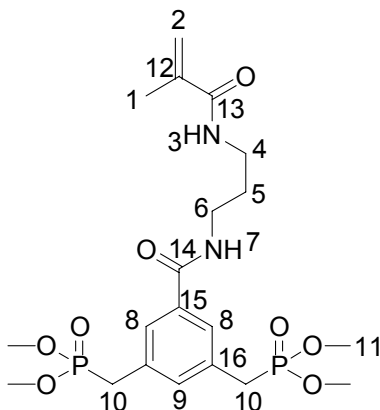


256 mg Methacrylsäure-*N*-oxysuccinimid (1.4 mmol, 1.0 eq) wurden in 30 mL absolutem THF gelöst und auf 0°C abgekühlt. Zu der Lösung wurden langsam 1.7 mL 1,3-Diaminopropan (20.3 mmol, 14.5 eq) gegeben und die Lösung 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Ein weißer Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt (nicht über 40°C erwärmen). Überschüssiges Diamin wurde durch abkondensieren an der Vakuumpumpe entfernt. Ausbeute: 170 mg (1.2 mmol, 86 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.79 (m, 2H, H-4), 1.93 (s, 3H, H-1), 2.59 (m, 2H, H-5), 2.97 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.7$  Hz, 2H, H-3), 5.45 (s, 1H, H-2b), 5.81 (s, 1H, H-2a).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta$ [ppm] = 18.9 (C-1), 37.9 (C-5), 33.8 (C-4), 39.0 (C-3), 119.7 (C-2), 139.2 (C-8), 166.5 (C-9).

## Darstellung von Methacrylamido-4-propyl-3,5-bis(dimethoxyphosphinylmethyl)benzoesäureamid 10



60 mg der 3,5-Bis(dimethoxyphosphinylmethyl)benzoesäure<sup>[46]</sup> **2** (164  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq) wurden mit 21 mg *N*-(3-Aminopropyl)methacrylamid (150  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) und 42 mg BOP-Cl (164  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq) unter Schutzgas in 30 mL absolutem Dichlormethan gelöst und mit 70  $\mu\text{L}$  Diisopropylethylamin (413  $\mu\text{mol}$ , 2.75 eq) versetzt. Die Lösung wurde 8 Stunden bei Raumtemperatur unter DC-Kontrolle gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit (Wasserbad nicht über 40°C). Das resultierende gelbbraune Öl wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Essigester (10:1) gereinigt.

Ausbeute: 61 mg (124  $\mu\text{mol}$ , 83 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 1.86 (s, 3H, H-1), 1.89 (m, 2H, H-5), 2.69 (m, 2H, H-4), 3.19 (m, 2H, H-6), 3.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>P,H</sub> = 10.8 Hz, 12H, H-11), 5.13 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,H</sub> = 20.9 Hz, 4H, H-10), 5.45 (s, 1H, H-2b), 5.98 (s, 1H, H-2a), 7.21 (s, 1H, H-9), 7.56 (s, 2H, H-8), 7.84 (br, 1H, H-3), 7.96 (br, 1H, H-7).

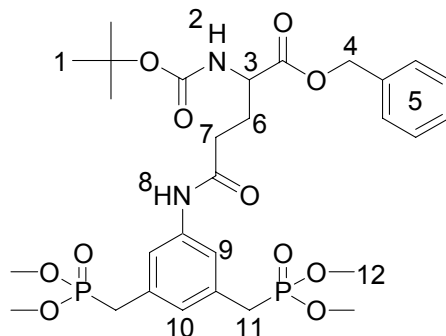
**<sup>31</sup>P-<sup>1</sup>H-NMR (81 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 29.6 (s).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 18.8 (C-1), 30.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,C</sub> = 7.3 Hz, C-10), 34.3 (C-5), 40.3 (C-4), 40.9 (C-6), 52.8 (d, <sup>1</sup>J<sub>P,C</sub> = 138.7 Hz, C-11), 121.8 (C-2), 126.1 (arom), 133.3 (arom), 133.7 (arom), 137.8 (arom), 139.2 (C-12), 164.5 (C-13), 167.5 (C-14).

**MS (EI):**  $m/z$  (%) = 491 (M<sup>+</sup>+1), 421 (M<sup>+</sup>-Methacrylat), 349 (M<sup>+</sup>-Methacrylpropyldiamin), 141 (M<sup>+</sup>-BP-benzoesäure).

**R<sub>f</sub>** (Dichlormethan/Essigester 10:1) = 0.41.

**Darstellung von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-4-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)-phenylamido]glutaminsäurebenzylester 11**



777 mg 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin **3** (2.31 mmol, 1.0 eq) und 774 mg Boc-Glu-OBzl (2.54  $\mu$ mol, 1.1 eq) wurden in einem sekurierten und ausgeheizten Stickstoffkolben in 120 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung wurden 1.6 mL T3P-Lösung (52.1% in Essigester, 2.8 mmol, 1.2 eq) und 1.4 mL *N*-Methylmorpholin (12.7 mmol, 5.5 eq) gegeben. Der Reaktionsverlauf wurde mit DC verfolgt (Laufmittel DCM/Methanol 10:1). Nach Beendigung der Reaktion nach etwa 6 Stunden wurde die Lösung am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das zurückbleibende, gelbliche Öl wurde an Silicagel mit Dichlormethan/Methanol 10:1 gereinigt. Das nach Entfernen des Laufmittels wurde das zurückgebliebene Öl mehrfach mit wenig absolutem Toluol unter vermindertem Druck eingeeengt, wobei ein weißer Feststoff zurückblieb. Ausbeute: 1.41 g (2.15 mmol, 94 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 9H, H-1), 1.71 (m, 2H, H-7), 1.96 (br, 1H, H-6<sub>b</sub>), 2.28 (br, 1H, H-6<sub>a</sub>), 3.13 (d,  $^3J_{P,H} = 21.7$  Hz, 4H, H-11), 3.69 (d,  $^3J_{P,H} = 11.0$  Hz, 12H, H-12), 4.38 (m, 1H, H-3), 5.17 (dd, diastereotop,  $^2J_{H,H} = 2.4$  Hz, 2H, H-4), 5.38 (d,  $^3J_{H,H} = 7.3$  Hz, 1H, H-2), 6.99 (s, 1H, H-10), 7.16 (s, 1H, H-10), 7.35 (s, 5H, H-5), 7.42 (s, 2H, H-9), 8.35 (s, 1H, H-8).

**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 29.02 (s).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 28.5, 26.9, 32.7 (d,  $^2J_{P,C} = 6.6$  Hz), 54.0 (d,  $^1J_{P,C} = 137.6$  Hz), 71.1, 73.3, 118.9, 126.9, 129.2, 137.8, 140.8, 157.5, 172.0.

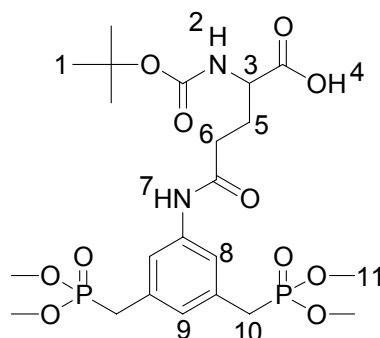
**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 679 ( $\text{M}^+$ +Na), 557 ( $\text{M}^+$ -*t*-BuOCO), 338 ( $\text{M}^+$ -Boc-Glu-OBzl), 242 ( $\text{M}^+$ -BP-Bzl).

**Elementaranalyse:**  $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{P}_2$ ; ber. H = 6.45, C = 53.05, N = 4.27; gef. H = 6.56, C = 53.50, N = 4.28.

$R_f$  (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0.33

Smp.: 81°C

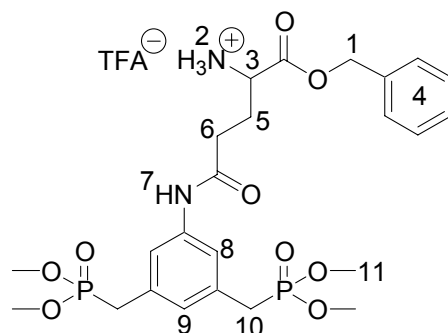
**Darstellung von *N*-tert-Butyloxycarbonyl-4-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenylamido]glutaminsäure 17**



440 mg *N*-tert-Butyloxycarbonyl-4-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenylamido]-glutaminsäurebenzylester 11 (0.67 mmol, 1.1 eq) wurden in 80 mL Methanol gelöst. Zu der Lösung wurden 100 mg Palladiumhydroxid auf Kohle (feucht, 5 % Pd(OH)<sub>2</sub>) gegeben und die schwarze Suspension unter Wasserstoffatmosphäre (1 bar) 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Ausbeute: 380 mg (0.67 mmol, 99 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 1.41 (s, 9H, H-1), 2.20 (m, 2H, H-5), 2.46 (m, 2H, H-6), 3.11 (d, <sup>2</sup> $J_{P,H}$  = 21.9 Hz, 4H, H-10), 3.67 (d, <sup>3</sup> $J_{P,H}$  = 11.0 Hz, 12H, H-11), 4.27 (m, 1H, H-3), 5.71 (d, <sup>3</sup> $J_{H,H}$  = 7.0 Hz, 1H, H-2), 6.89 (s, 1H, H-9), 7.48 (s, 2H, H-8), 9.11 (s, 1H, H-7).  
**<sup>31</sup>P-<sup>1</sup>H-NMR (81 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 29.5 (s).

**Darstellung von 4-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenylamido]glutaminsäurebenzylester Trifluoracetat 18**



500 mg *N-tert*-Butyloxycarbonyl-4-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenylamido]-glutaminsäurebenzylester **11** (0.76 mmol, 1.0 eq) wurden in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst und mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. Zu der Lösung wurde unter Rühren 10 mL Trifluoressigsäure gegeben und etwa eine Stunde unter DC-Kontrolle (Dichlormethan/Methanol 5:1) gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden 20 mL trockenes Toluol hinzugegeben und die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt. Nach abermaliger Zugabe von 20 mL Toluol wurde anschließend zur Trockene eingengt und der Rückstand an der Ölpumpe von weiteren Lösungsmittelresten befreit.

Ausbeute: 504 mg (0.75 mmol, 99 %).

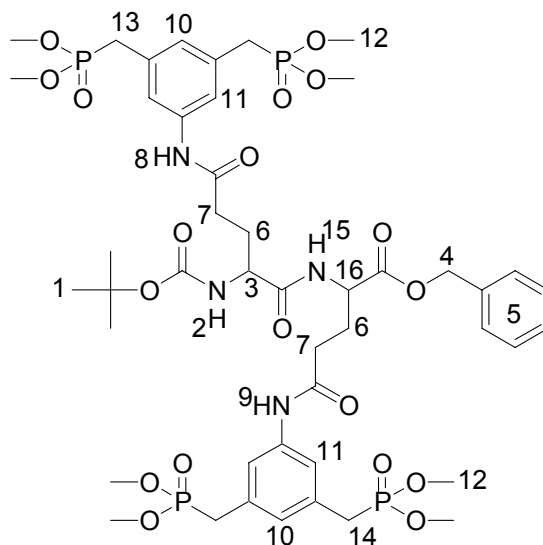
**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 2.18 (m, 2H, H-5), 2.53 (m, 2H, H-6), 3.27 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,H</sub> = 20.8 Hz, 4H, H-10), 3.76 (d, <sup>3</sup>J<sub>P,H</sub> = 10.8 Hz, 12H, H-11), 4.33 (m, 1H, H-3), 5.47 (m, diastereotop, 2H, H-4), 6.01 (m, 3H, H-2), 7.16 (s, 1H, H-9), 7.39 (s, 2H, H-8), 7.42 (s, 5H, H-5), 8.98 (s, 1H, H-7).

**<sup>31</sup>P-<sup>1</sup>H-NMR (81 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 28.9 (s).

**R<sub>f</sub>** (Dichlormethan/Methanol 5:1) = 0.45



**Darstellung von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-Glu-4-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)-phenylamid]-Glu-4-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenylamid]-benzylester **19****



500 mg 4-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenylamido]glutaminsäure-benzylester Tri-fluoracetat **18** (746  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) und 422 mg *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-4-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)-phenylamido]glutaminsäure **17** (746  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden in einem sekurierten und ausgeheizten Stickstoffkolben in 100 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung wurden 686  $\mu\text{L}$  T3P-Lösung (52.1% in Essigester, 1.2 mmol, 1.6 eq) und 280  $\mu\text{L}$  N-Methylmorpholin (3.0 mmol, 4.0 eq) gegeben. Der Reaktionsverlauf wurde mit DC verfolgt (Laufmittel DCM/Methanol 5:1). Nach Beendigung der Reaktion nach etwa 16 Stunden wurde die Lösung am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das zurückbleibende, gelbliche Öl wurde an Silicagel mit Dichlormethan/Methanol 5:1 gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in wenig Dichlormethan aufgenommen und so lange mit n-Hexan versetzt, bis sich die bildende Trübung nicht mehr durch Schütteln entfernen läßt. Das Produkt wurde anschließend im Tiefkühlschrank ausgefroren.

Ausbeute: 791 mg (716  $\mu\text{mol}$ , 96 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.38 (s, 9H, H-1), 2.15 – 1.99 (br m, 4H, H-7), 2.44 – 2.34 (br m, 4H, H-6), 3.00 (d,  $^3J_{P,H} = 21.6$  Hz, 4H, H-14), 3.03 (d,  $^3J_{P,H} = 21.6$  Hz, 4H, H-13), 3.66 (d,  $^3J_{P,H} = 10.6$  Hz, 24H, H-12), 4.35 (m, 1H, H-16), 4.53 (m, 1H, H-3), 5.14 (dd, diastereotop,  $^2J_{H,H} = 2.3$  Hz, 2H, H-4), 6.02 (d,  $^3J_{H,H} = 7.0$  Hz, 1H, H-2), 6.82 (s, 1H, H-10b), 6.86 (s, 1H, H-10a), 7.30 (s, 5H, H-5), 7.36 (s, 4H, H-11), 8.25 (d,  $^3J_{H,H} = 6.3$  Hz, 1H, H-15), 9.16 (s, 1H, H-9), 9.19 (s, 1H, H-8).

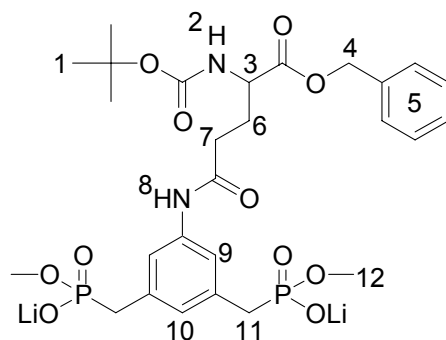
$^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 29.2 (s).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 27.5, 28.0, 28.6, 28.8, 31.1 (d,  $^2J_{\text{P,C}} = 6.7$  Hz), 53.2 (d,  $^1J_{\text{P,C}} = 136.7$  Hz), 55.7, 56.4, 70.9, 73.4, 118.1, 119.7, 124.2, 126.3, 127.7, 128.3, 137.8, 140.6, 141.2, 157.1, 157.8, 169.4, 172.0, 174.3.

MS (ESI):  $m/z$  (%) = 1127 ( $\text{M}^+$ +Na), 1105 ( $\text{M}^+$ +H), 1013 ( $\text{M}^+$ -Bzl), 1003 ( $\text{M}^+$ -Boc), 448 ( $\text{M}^+$ -BP-Glu-Bzl-Boc).

$R_f$  (Dichlormethan/Methanol 5:1) = 0.34.

**Darstellung von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-4-[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)phenylamido]glutaminsäurebenzylester Dilithiumsalz 15**



100 mg *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-4-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenylamido]-glutaminsäurebenzylester (152  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden mit 29 mg Lithiumbromid (335  $\mu\text{mol}$ , 2.2 eq) in 30 mL trockenem Acetonitril gelöst und für 48 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und mehrfach mit trockenem Acetonitril gewaschen. Ausbeute: 90 mg (140  $\mu\text{mol}$ , 92 %).

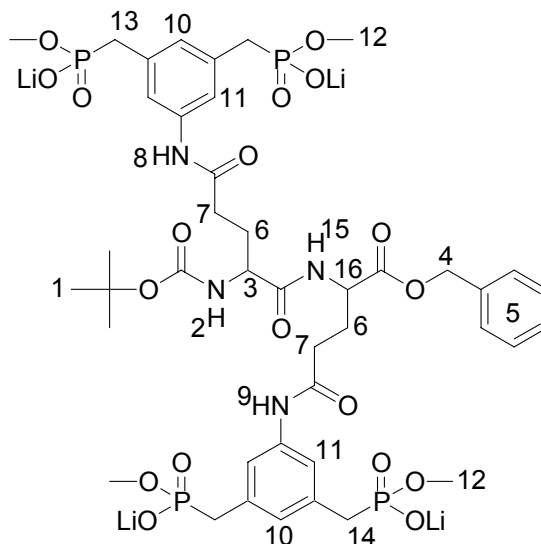
$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.37 (s, 9H, H-1), 1.88 (m, 2H, H-7), 2.30 (br m, 2H, H-6), 3.32 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 20.4$  Hz, 4H, H-11), 3.74 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 10.7$  Hz, 6H, H-12), 4.19 (m, 1H, H-3), 5.09 (dd, diastereotop,  $^2J_{\text{H,H}} = 2.2$  Hz, 2H, H-4), 7.30 (s, 5H, H-5), 7.74 (s, 3H, H-9,10).

$^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 25.3 (s).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 26.9, 28.5, 32.7 (d,  $^2J_{\text{P,C}} = 6.6$  Hz), 54.0 (d,  $^1J_{\text{P,C}} = 137.6$  Hz), 71.1, 73.3, 118.9, 126.9, 129.2, 137.8, 140.8, 157.5, 172.0.

MS (ESI negativ):  $m/z$  (%) = 633 ( $\text{M}^-$ -Li), 627 ( $\text{M}^-$ -2Li+H), 535 ( $\text{M}^-$ -2Li-Bzl), 525 ( $\text{M}^-$ -2Li-Boc).

**Darstellung von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-Glu-4-[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)phenylamid]-Glu-4-[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)phenylamid]-benzylester Tetralithiumsalz 21**



54 mg *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-Glu-4-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)-phenylamid]-Glu-4-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenylamid]-benzylester (48.9  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden mit 19 mg Lithiumbromid (215  $\mu\text{mol}$ , 4.4 eq) in 30 mL trockenem Acetonitril gelöst und für 96 Stunden (4 Tage) unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und mehrfach mit trockenem Acetonitril gewaschen.

Ausbeute: 43 mg (40  $\mu\text{mol}$ , 82 %).

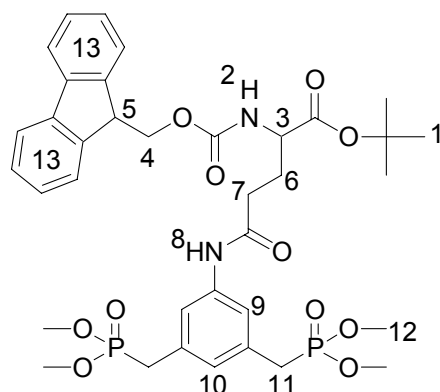
**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.32 (s, 9H, H-1), 2.25 – 1.70 (br m, 4H, H-7), 2.57 – 2.25 (br m, 4H, H-6), 2.97 (d,  $^3J_{P,H} = 20.5$  Hz, 4H, H-14), 2.99 (d,  $^3J_{P,H} = 20.5$  Hz, 4H, H-13), 3.49 (d,  $^3J_{P,H} = 10.3$  Hz, 12H, H-12), 4.03 (m, 1H, H-16), 4.49 (m, 1H, H-3), 5.15 (s, 2H, H-4), 6.97 (s, 2H, H-10), 7.14 (m, 5H, H-5), 7.32 (m, 4H, H-11).

**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  [ppm] = 26.8 (s).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):** nicht meßbar

**MS (ESI negativ):**  $m/z$  (%) = 1065 ( $\text{M}^-$ -Li), 1059 ( $\text{M}^-$ -2Li+H), 1051 ( $\text{M}^-$ -3Li+2H), 866 ( $\text{M}^-$ -2Li-Boc-Bzl), 529 ( $\text{M}^{2-}$ -2Li).

**Darstellung von *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl-4-[3,5-bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenylamido]glutaminsäure-*tert*-butylester 33**



405 mg 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin **3** (1.2 mmol, 1.0 eq) und 500 mg Fmoc-Glu-OtBu (1.2 mmol, 1.0 eq) wurden in einem sekurierten und ausgeheizten Stickstoffkolben in 100 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung wurden 1.0 mL T3P-Lösung (52.1% in Essigester, 1.8 mmol, 1.5 eq) und 0.5 mL *N*-Methylmorpholin (4.7 mmol, 4.0 eq) gegeben. Der Reaktionsverlauf wurde mit DC verfolgt (Laufmittel DCM/Methanol +1 % Et<sub>3</sub>N 10:1). Nach Beendigung der Reaktion nach etwa 8 Stunden wurde die Lösung am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das zurückbleibende, gelbliche Öl wurde an Silicagel mit Dichlormethan/Methanol 10:1 gereinigt.

Ausbeute: 875 mg (1.17 mmol, 98 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 1.47 (s, 9H, H-1), 2.50-1.80 (br m, 4H, H-6,7), 3.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>P,H</sub> = 21.7 Hz, 4H, H-11), 3.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>P,H</sub> = 11.0 Hz, 12H, H-12), 4.19 (m, 1H, H-3), 4.24 (m, 1H, H-5), 4.44 (m, diastereotop, 2H, H-4), 5.69 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-2), 6.95 (s, 1H, H-10), 7.78-7.29 (m, 10H, H-13,9), 8.44 (s, 1H, H-8).

**<sup>31</sup>P-{<sup>1</sup>H}-NMR (81 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 29.1 (s).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 25.4, 26.9, 31.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,C</sub> = 6.2 Hz), 52.6 (d, <sup>1</sup>J<sub>P,C</sub> = 136.7 Hz), 69.7, 72.0, 116.5, 125.4, 127.7, 136.3, 139.3, 156.0, 171.5.

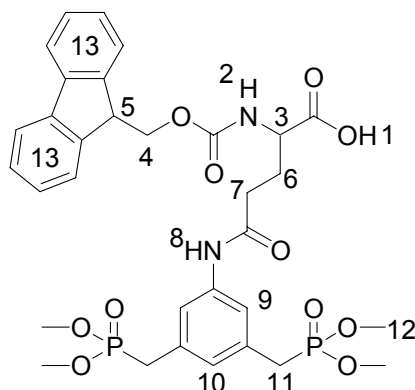
**MS (ESI):** *m/z* (%) = 767 (M<sup>+</sup>+Na), 687 (M<sup>+</sup>-*t*-Bu), 521 (M<sup>+</sup>-Fmoc), 336 (M<sup>+</sup>-Fmoc-Glu-OtBu).

**Elementaranalyse:** C<sub>36</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub> ber. H = 6.23, C = 58.06, N = 3.76; gef. H = 6.82, C = 56.05, N = 4.72.

**R<sub>f</sub>** (Dichlormethan/Methanol 10:1 +1% NEt<sub>3</sub>) = 0.53.

**Smp.:** 76°C

**Darstellung von *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl-4-[3,5-bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenylamido]glutaminsäure 22**



1.17 g *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl-4-[3,5-bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenylamido]-glutaminsäure-*tert*-butylester 33 (1.57 mmol, 1.0 eq) wurden in 60 mL trockenem Dichlormethan gelöst und langsam unter Eiskühlung mit 60 mL Trifluoressigsäure versetzt. Nach einer Stunde wurden etwa 100 mL Toluol zugegeben und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Anschließend wurde der Rückstand nochmals zweimal mit je 50 mL Toluol versehen und abermals am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das gelbliche Öl wurde daraufhin in wenig Dichlormethan gelöst (ca. 50 mL) und langsam mit Diethylether versetzt, bis sich eine Trübung bildet. Das Produkt kristallisierte nach 8 Stunden im Kühlschrank aus. Ausbeute: 1.05 g ( $M = 688.6$  g/mol, 1.52 mmol, 97 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 2.24-1.92 (br m, 2H, H-6), 2.40 (m, 2H, H-7), 3.02 (d,  $^3J_{P,H} = 21.4$  Hz, 4H, H-11), 3.68 (d,  $^3J_{P,H} = 11.0$  Hz, 12H, H-12), 4.08 (m, 1H, H-3), 4.28 (m, diastereotop, 3H, H-4,5), 6.15 (d,  $^3J_{H,H} = 8.2$  Hz, 1H, H-2), 6.79 (s, 1H, H-10), 7.66-7.08 (m, 10H, H-13,9), 8.88 (s, 1H, H-8).

**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 29.6 (s).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 26.4, 32.2 (d,  $^1J_{P,C} = 6.6$  Hz), 53.7 (d,  $^2J_{P,C} = 135.9$  Hz), 71.1, 115.4, 126.3, 128.6, 137.2, 156.9, 140.2, 172.4.

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 688 ( $M^+$ ), 465 ( $M^+$ -Fmoc).

**Elementaranalyse:**  $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{P}_2 + 1.5$  eq TFA; ber. H = 4.63, C = 48.90, N = 3.26; gef. H = 4.74, C = 49.15, N = 4.22.

**Smp.:** 69°C

### Allgemeine Vorschrift zur Synthese von Peptiden an der festen Phase (Fmoc-Strategie)

Nach jedem Schritt erfolgten zwei Waschschrte mit dem für die Reaktion verwendeten Lösungsmittel.

- a) Als polymerer Träger wurde Wang-Harz verwendet mit einer mittleren Beladungsdichte von 0.9 mmol pro g Harz. Das Harz wurde vor jeder Synthese in einem eigens dafür gefertigten Reaktor 2 Stunden unter Argon in Dichlormethan/Dimethylformamid (9:1) vorgequollen.
- b) Die Aminosäure (eq bezogen auf die Beladungsdichte des Harzes) mit *N*-terminaler Fmoc-Schutzgruppe wurde eine Stunde bei 0°C extern unter Argon in DCM/DMF (9:1) voraktiviert und nach Zugabe in den Reaktor 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Je nach Reaktivität der Aminosäure wurde eine von drei verschiedenen Aktivierungsmethoden gewählt:
  1. Aktivierung mit DIC/HOBt. Zu der gelösten, Fmoc-geschützten Aminosäure (2.0 eq) wurden 2.5 eq DIC ( $M = 126.2 \text{ g/mol}$ ,  $d = 0.815 \text{ g/mL}$ ), 5.0 eq HOBt ( $M = 135.1 \text{ g/mol}$ ) und eine Spatelspitze DMAP gegeben. Diese Aktivierung wurde für die Anknüpfung der ersten Aminosäure an das Harz gewählt.
  2. Aktivierung mit HBTU/HOBt. Keine Voraktivierung, direkte Eingabe der Edukte in den Reaktor. 1.5 eq der Fmoc-geschützten Aminosäure, 2.25 eq HBTU ( $M = 379.3 \text{ g/mol}$ ), 3.75 eq HOBt ( $M = 135.1 \text{ g/mol}$ ) und 4.5 eq DIEA ( $M = 379.3 \text{ g/mol}$ ,  $d = 0.76 \text{ g/mL}$ ). Standardaktivierung bei den meisten Aminosäuren.
  3. Aktivierung mit HCTU/Cl-HOBt. Keine Voraktivierung, direkte Eingabe der Edukte in den Reaktor. 2.0 eq Aminosäure, 2.0 eq HCTU ( $M = 413.69 \text{ g/mol}$ ), 2.0 eq Cl-HOBt ( $M = 169.57 \text{ g/mol}$ ), 4.0 eq DIEA ( $M = 379.3 \text{ g/mol}$ ,  $d = 0.76 \text{ g/mL}$ ). Aktivierung bei schwierigen Kopplungsproblemen.
- c) Jeder Kopplungsschritt wurde mindestens zwei Mal durchgeführt. Auf Vollständigkeit der Kopplung wurde mit Hilfe des NF31-Tests getestet<sup>[106]</sup>.
- d) Die Entschützung der *N*-terminalen Aminosäure erfolgte in zweimal 30 min mit 20% Piperidin in DMF. Anschließend wurde das Harz so lange gewaschen, bis kein Piperidin mehr im Filtrat nachweisbar war.
- e) Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach mehrmaligem, gründlichen Waschen mit reinem Dichlormethan (DMF wirkt sich in Gegenwart von TFA nachteilig auf das Peptid aus) in DCM/TFA (1:1) mit 1% TIS (2 × 30 min).

- f) Die vereinigten Filtrate wurden mit ebenso viel Toluol versetzt und am Rotationsverdampfer eingengt. Alternativ dazu kann das Peptid im Eisbad mit kaltem Diethylether ausgefällt werden. Eine weitere Aufreinigung erfolgte mit HPLC.

### Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von Oligoargininen<sup>[107]</sup>

Basierend auf einer Synthese von *Wender et al.*<sup>[107]</sup> können aufgrund der Schwierigkeit der Synthese von Oligoargininen selbige über den Umweg über Oligoornithine und abschließender Perguanidinylierungsreaktion dargestellt werden.

- a) Darstellung der Ornithinmonomere: (Spektren der Zwischenstufen entsprachen der Literatur<sup>[107]</sup>)

100 mg Boc-Orn(Z)-OH (273  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden in 40 mL trockenem Methanol gelöst. Zu der Lösung wurden 50 mg Palladium auf Kohle (5 % Pd) gegeben und der Kolben unter Wasserstoffatmosphäre (1 bar) 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Ausbeute: 63 mg Boc-Orn-OH (271  $\mu\text{mol}$ , 99 %).

63 mg Boc-Orn-OH (271  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden in 30 mL trockenem Methanol gelöst und mit 65  $\mu\text{L}$  Trifluoressigsäureethylester (542  $\mu\text{mol}$ , 2.0 eq) und 79  $\mu\text{L}$  Triethylamin (596  $\mu\text{mol}$ , 2.2 eq) versetzt. Die Lösung wurde für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf die Hälfte eingengt. Die verbleibende Lösung wurde mit 20 mL Wasser und 15 mL Essigester aufgenommen und die wäßrige Phase mit verdünnter Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Anschließend wurde die wäßrige Phase noch fünf Mal mit je 20 mL Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen je drei Mal mit 0.1 M HCl und gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt. Nach Trocknung mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Ausbeute: 80 mg Boc-Orn(COCF<sub>3</sub>)-OH (244  $\mu\text{mol}$ , 90 %).

Zu einer Lösung aus 80 mg Boc-Orn(COCF<sub>3</sub>)-OH (244  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) in 10 mL trockenem THF wurden bei  $-10^{\circ}\text{C}$  27  $\mu\text{L}$  *N*-Methylmorpholin (244  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) gegeben und anschließend 32  $\mu\text{L}$  Chlorameisensäure-benzylester (293  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq) in 5 mL THF hinzu gefügt. Die Lösung wurde auf  $0^{\circ}\text{C}$  langsam aufgetaut und eine Spatelspitze DMAP wurde hinzu gefügt. Die Reaktionsmischung wurde für 3 Stunden gerührt, wobei sie langsam auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Anschließend wurde sie mit 15 mL Wasser

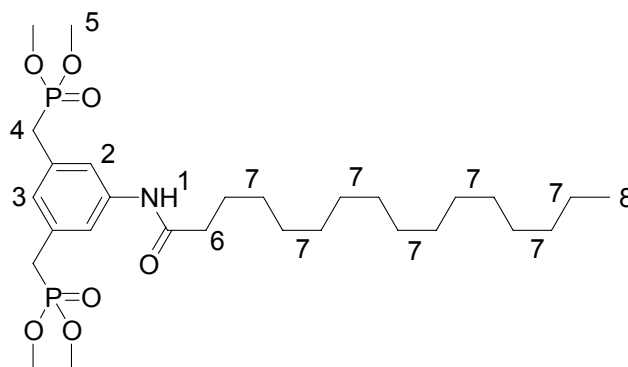
und 15 mL Essigester versetzt und vorsichtig mit 1 M HCl auf pH 2 angesäuert. Anschließend wurde die wäßrige Phase abgetrennt und mehrfach mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden daraufhin noch zwei mal mit 0.1 M HCl ausgeschüttelt und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet.

Ausbeute: 87 mg Boc-Orn(COCF<sub>3</sub>)-OBzl (209 µmol, 86 %).

### b) Synthese der Ornithinoligomeren

- a. Allgemeine Vorschrift zur Boc-Entschützung: Boc-[Orn(COCF<sub>3</sub>)]<sub>n</sub>-OBzl wurde in ausreichender Menge Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung mit dem gleichem Volumen an Trifluoressigsäure versetzt. Nach etwa einer Stunde Rühren wurden etwa 10-20 mL Toluol zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde ungereinigt in der Kupplung eingesetzt.
  - b. Allgemeine Vorschrift zur Benzylentschützung: Boc-[Orn(COCF<sub>3</sub>)]<sub>n</sub>-OBzl wurde in Methanol gelöst und mit Palladium auf Kohle versetzt (5 %ig). In einer Wasserstoffatmosphäre bei 1 bar wurde die Lösung für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Pd/C abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt ungereinigt für die Kupplung verwendet.
  - c. Allgemeine Vorschrift zur Peptidkupplung: H-[Orn(COCF<sub>3</sub>)]<sub>n</sub>-OBzl und Boc-[Orn(COCF<sub>3</sub>)]<sub>n</sub>-OH wurde im 1:1-Verhältnis in Dichlormethan gelöst und mit 1.5 eq HCTU, 1.5 eq Cl-HOBT und 3.0 eq DIEA versetzt. Nach etwa 12 Stunden Rühren bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre wurde das Lösungsmittel abgezogen und das Produkt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Essigester/n-Hexan (1:1) gereinigt (bei höheren Oligomeren ist ein Anteil an Methanol nötig) R<sub>f</sub> = 0.4-0.8
- ### c) Allgemeine Vorschrift zur Perguanylidierung der Ornithinseitenketten: Boc-[Orn(COCF<sub>3</sub>)]<sub>n</sub>-OBzl wurde in wenig Methanol gelöst und mit 40 eq (bezogen auf die Ornithineinheiten) Natriumcarbonat und 40 eq Pyrazol-1-carboxamidinhydrochlorid in dest. Wasser (doppeltes Volumen im Verhältnis zum Methanol) versetzt. Die Lösung wurde für 48 Stunden bei 60°C gerührt und anschließend mit Trifluoressigsäure auf pH = 4 eingestellt. Nach Zugabe von etwas Toluol wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Durch Zugabe von n-Hexan läßt sich das Produkt ausfällen. Eine weitere Aufreinigung kann über RP-HPLC erfolgen (Gradient 5% Wasser/ACN zu 95% Wasser/ACN in 15 min).



**Darstellung von Hexadecyl-3,5-bis(dimethoxyphosphinylmethyl)phenylamid 34**

30 mg 3,5-Bis(dimethoxyphosphinylmethyl)anilin **3** (89.0  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) und 26 mg Palmitinsäure (101.4  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq) wurden in einem sekurierten und ausgeheizten Stickstoffkolben in 50 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung wurden 112  $\mu\text{L}$  T3P-Lösung (52.1% in Essigester, 195.8  $\mu\text{mol}$ , 2.2 eq) und 43  $\mu\text{L}$  *N*-Methylmorpholin (391.6  $\mu\text{mol}$ , 4.4 eq) gegeben. Der Reaktionsverlauf wurde mit DC verfolgt (Laufmittel DCM/Methanol 10:1). Nach Beendigung der Reaktion nach etwa 12 Stunden wurde die Lösung am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das zurückbleibende, gelbliche Öl wurde an Silicagel mit Dichlormethan/Essigester 10:1 gereinigt.

Ausbeute: 48 mg (84.0  $\mu\text{mol}$ , 94 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.09 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$  Hz, 3H, H-8), 1.34 (s, 26H, H-7), 2.54 (m, 2H, H-6), 3.20 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 20.9$  Hz, 4H, H-4), 3.72 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 11.2$  Hz, 12H, H-5), 6.88 (s, 1H, H-3), 7.32 (s, 2H, H-2), 8.22 (s, 1H, H-1).

**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}\text{-NMR}$  (81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 29.1 (s).

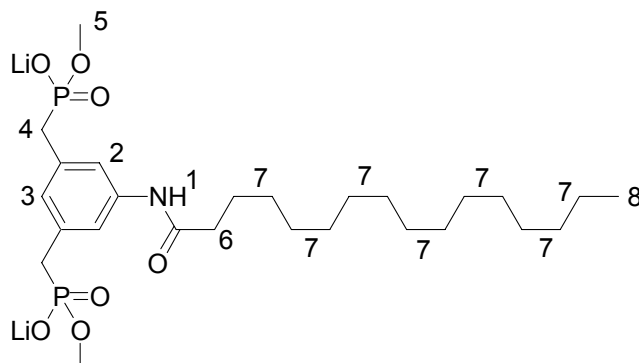
**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 17.7, 24.9, 27.4, 29.6, 30.1, 31.3 (d,  $^2J_{\text{P,C}} = 6.4$  Hz), 33.6, 53.2 (d,  $^1J_{\text{P,C}} = 135.4$  Hz), 117.8, 127.5, 137.3, 144.0.

**MS (EI):**  $m/z$  (%) = 576 ( $\text{M}^+\text{+H}$ , 28), 560 ( $\text{M}^+\text{-CH}_3$ , 100), 546 ( $\text{M}^+\text{-C}_2\text{H}_5$ , 76), 532 ( $\text{M}^+\text{-C}_3\text{H}_7$ , 58), 518 ( $\text{M}^+\text{-C}_4\text{H}_9$ , 35), 504 ( $\text{M}^+\text{-C}_5\text{H}_{11}$ , 23), 490 ( $\text{M}^+\text{-C}_6\text{H}_{13}$ , 14), 336 ( $\text{M}^+\text{-Palmitinsäure}$ , 63).

**$R_f$**  (Dichlormethan/Methanol 20:1) = 0.47

**Smp.:** 56-59°C

**Darstellung von Hexadecyl-3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)phenylamid Dilithiumsalz 6**

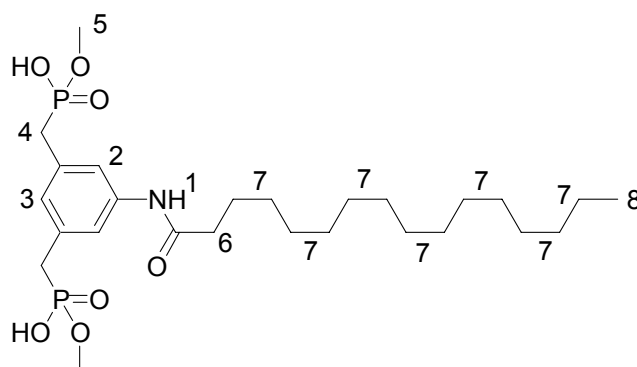


16 mg Hexadecyl-3,5-bis(dimethoxyphosphinylmethyl)phenylamid 34 (28.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden mit 5.5 mg Lithiumbromid (62.9  $\mu\text{mol}$ , 2.2 eq) unter Schutzgas in 30 mL trockenem Acetonitril gelöst und 20 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und mehrfach mit trockenem Acetonitril gewaschen. Ausbeute: 11 mg (19.7  $\mu\text{mol}$ , 69 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.09 (m, 3H, H-8), 1.47 (s, 24H, H-7), 1.86 (s, 2H, H-7), 2.52 (m, 2H, H-6), 3.12 (d,  $^3J_{P,H} = 20.8$  Hz, 4H, H-4), 3.69 (d,  $^3J_{P,H} = 10.5$  Hz, 6H, H-5), 7.21 (s, 1H, H-2), 7.52 (s, 2H, H-2).

**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 26.1 (s).

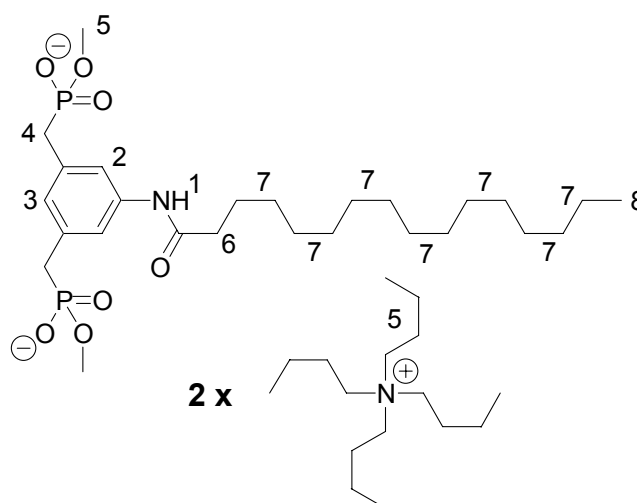
**Smp.:** 64°C

**Darstellung von Hexadecyl-3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)phenylamid 7**

6 mg des Hexadecyl-3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)phenylamid Dilithiumsalzes 6 (10.7  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden in 1.0 mL destilliertem Wasser gelöst und mit wenig 1 M HCl-Lösung angesäuert. Der sich bildende Niederschlag wurde abfiltriert und in wenig Dichlormethan in einen Kolben überführt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Ausbeute: 3 mg (5.5  $\mu\text{mol}$ , 51 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.07 (m, 3H, H-8), 1.33 (s, 24H, H-7), 2.33 (m, 2H, H-7), 2.62 (m, 2H, H-6), 3.37 (d,  $^3J_{P,H} = 21.1$  Hz, 4H, H-4), 3.70 (d,  $^3J_{P,H} = 10.9$  Hz, 6H, H-5), 6.77 (s, 1H, H-3), 7.48 (s, 2H, H-2).

**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 27.1 (s).

**Darstellung von Hexadecyl-3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)phenylamid Ditetraäthylammoniumsalz 8**

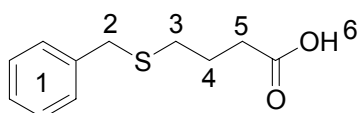
3 mg Hexadecyl-3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)phenylamid 7 (5.5  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden in 2 mL destilliertem Wasser aufgeschlämmt und mit 11  $\mu\text{L}$  1.0 M wäßriger

Tetrabutylammoniumhydroxidlösung (11  $\mu\text{mol}$ , 2.0 eq) versetzt. Nachdem sich der Niederschlag vollständig aufgelöst hatte, wurde die Lösung am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand erneut in Dichlormethan gelöst und abermals zur Trockene eingengt. Ausbeute: 5 mg (4.9  $\mu\text{mol}$ , 88 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 0.83 (m, 12H, H-5d), 1.07 (m, 3H, H-8), 1.28 (m, 8H, H-5c), 1.33 (s, 24H, H-7), 1.48 (m, 8H, H-5b), 2.33 (m, 2H, H-7), 2.62 (m, 2H, H-6), 3.17 (m, 8H, H-5a), 3.46 (d,  $^3J_{P,H} = 20.8$  Hz, 4H, H-4), 3.68 (d,  $^3J_{P,H} = 10.7$  Hz, 6H, H-5), 6.59 (s, 1H, H-3), 7.33 (s, 2H, H-2).

**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 25.0 (s).

### Darstellung von 4-Benzylsulfanylbutansäure 35



700 mg Natriumhydrid (60 % in Öl, 17.0 mmol, 2.0 eq) wurden in einem ausgeheizten, sekurierten Kolben mit Hexan vom Öl befreit und in 30 mL *N*-Methylpyrrolidin aufgeschlämmt. Anschließend wurden 1.0 mL Benzylmercaptan (8.5 mmol, 1.0 eq) in 10 mL *N*-Methylpyrrolidin unter Eiskühlung zugetropft. Nach weiteren 30 min Rührens wurden 840  $\mu\text{L}$  Chlorbuttersäure (8.5 mmol, 1.0 eq) langsam zugetropft und das Reaktionsgemisch anschließend bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde mit kaltem Wasser gequench und die wässrige Phase drei Mal mit Diethylether ausgeschüttelt. Nach Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure wurde abermals drei Mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und der Rückstand nach abdestillieren des Lösungsmittels fraktioniert destilliert (38° C bei  $10^{-3}$  Torr).

Ausbeute: 1.6 g (7.6 mmol, 90 %).

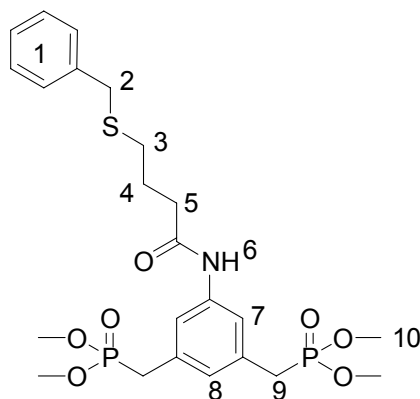
**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ [ppm] = 1.84 (m, 2H, H-4), 2.15 (m, 2H, H-3), 2.64 (m, 2H, H-2), 3.21 (t,  $^3J_{H,H} = 4.6$  Hz, 2H, H-5), 7.06 (m, 5H, H-1).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ [ppm] = 29.2, 33.6, 40.2, 36.7, 117.6, 128.3, 137.4, 176.2.

**MS (EI):**  $m/z$  (%) = 211 ( $M^+ + H$ , 65), 119 ( $M^+ + Bzl$ , 100), 91 ( $Bzl^+$ , 22), 87 ( $M^+ + BzlS$ , 44), 77 ( $arom^+$ , 36).

**Sdp.:** 38 °C bei  $1.0 \times 10^{-3}$  Torr.

**Darstellung von 4-Benzylsulfanylbutansäure-[3,5-bis(dimethoxyphosphorylmethyl)-phenyl]amid 36**



100 mg 4-Benzylsulfanylbutansäure 35 (476  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) und 160 mg 3,5-Bis(dimethoxyphosphinylmethyl)anilin 3 (476  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden in einem sekurierten und ausgeheizten Stickstoffkolben in 80 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung wurden 570  $\mu\text{L}$  T3P-Lösung (50 % in Essigester, 952  $\mu\text{mol}$ , 2.0 eq) und 209  $\mu\text{L}$  *N*-Methylmorpholin (1.90 mmol, 4.0 eq) gegeben. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC verfolgt (Laufmittel DCM/Methanol 20:1). Nach Beendigung der Reaktion nach etwa 12 Stunden wurde die Lösung am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das zurückbleibende, gelbliche Öl wurde an Silicagel mit Dichlormethan/Methanol (20:1) gereinigt.

Ausbeute: 242 mg (457  $\mu\text{mol}$ , 96 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.72 (m, 2H, H-4), 2.27 (m, 2H, H-3), 2.87 (m, 2H, H-2), 3.17 (t,  $^3J_{H,H} = 3.9$  Hz, 2H, H-5), 3.42 (d,  $^2J_{P,H} = 21.2$  Hz, 4H, H9), 3.87 (d,  $^3J_{P,H} = 10.7$  Hz, 12H, H10), 7.15 (m, 5H, H-1), 7.47 (m, 1H, H8), 7.67 (m, 2H, H7).

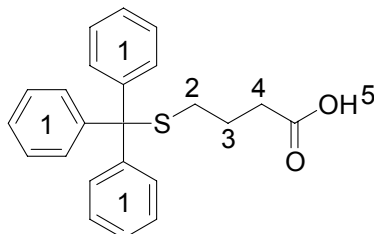
**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz, ):**  $\delta$  [ppm] = 29.8 (s).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 27.7, 30.6, 31.2 (d,  $^2J_{P,C} = 5.7$  Hz), 33.4, 39.3, 54.3 (d,  $^1J_{P,C} = 136.3$  Hz), 119.9, 125.8, 127.0, 128.6, 137.3, 139.2, 142.5, 171.8.

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 530 ( $M^+ + H$ ), 438 ( $M^+ - Bzl$ ), 336 ( $M^+ - \text{ButansäureBzl}$ ), 193 ( $M^+ - \text{Bisphosphonat}$ ).

$R_f$  (Dichlormethan/Methanol 20:1) = 0.33.

### Darstellung von 4-Trytysulfanylbutansäure 37



410 mg Natriumhydrid (60 % in Öl, 10.25 mmol, 2.0 eq) wurden in einem ausgeheizten, sekurierten Kolben mit Hexan vom Öl befreit und in 30 mL *N*-Methylpyrrolidin aufgeschlämmt. Anschließend wurden 1.42 g Triphenylmethylthiol (5.13 mmol, 1.0 eq) in 10 mL *N*-Methylpyrrolidin unter Eiskühlung zugetropft. Nach weiteren 30 min wurden 504  $\mu$ L Chlorbuttersäure (5.1 mmol, 1.0 eq) langsam zugetropft und das Reaktionsgemisch anschließend bei Raumtemperatur 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde mit 50 mL kaltem Wasser gequencht und die wässrige Phase drei Mal mit je 50 mL Diethylether ausgeschüttelt. Nach Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure wurde abermals drei Mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockene eingeengt.

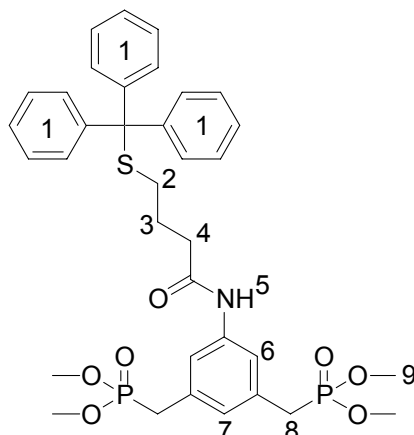
Ausbeute: 1.57 g ( $M = 362.5$  g/mol, 4.33 mmol, 85 %).

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 1.60 (q, 2H, H-3), 2.15 (t,  $^3J_{H,H} = 7.0$  Hz, 2H, H-2), 2.24 (t,  $^3J_{H,H} = 7.3$  Hz, 2H, H-4), 7.40-7.10 (m, 15H, H-1).

**MS (EI):**  $m/z$  (%) = 363 ( $M^+ + H$ , 13), 119 ( $M^+$ -Trityl, 100), 73 ( $M^+$ -Trityl-S- $\text{CH}_2$ , 34).

**Smp.:** 74°C.

**Darstellung von 4-Tritylsulfanylbutansäure-[3,5-bis(dimethoxyphosphorylmethyl)-phenyl]amid 38**



100 mg 4-Tritylsulfanylbutansäure 37 (276  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) und 93 mg 3,5-Bis(dimethoxyphosphinylmethyl)anilin (276  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden in einem sekurierten und ausgeheizten Stickstoffkolben in 80 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung wurden 329  $\mu\text{L}$  T3P-Lösung (50 % in Essigester, 552  $\mu\text{mol}$ , 2.0 eq) und 121  $\mu\text{L}$  *N*-Methylmorpholin (1.10 mmol, 4.0 eq) gegeben. Der Reaktionsverlauf wurde mit DC verfolgt (Laufmittel DCM/Methanol 20:1). Nach Beendigung der Reaktion nach etwa 12 Stunden wurde die Lösung am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das zurückbleibende, gelbliche Öl wurde an Silicagel mit Dichlormethan/Methanol (20:1) gereinigt.

Ausbeute: 179 mg (262  $\mu\text{mol}$ , 95 %).

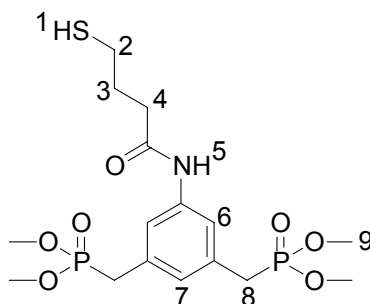
**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.68 (m, 2H, H-3), 2.18 (m, 4H, H-2,4), 3.04 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 21.7$  Hz, 4H, H-8), 3.60 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 11.0$  Hz, 12H, H-9), 6.88 (s, 1H, H-5), 7.35-7.11 (m, 15H, H-1), 7.78 (s, 1H, H-7), 7.95 (s, 2H, H-6).

**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 29.0 (s).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 31.2, 32.8 (d,  $^1J_{\text{P,C}} = 6.4$  Hz), 34.0, 37.9, 53.9 (d,  $^2J_{\text{P,C}} = 137.0$  Hz), 125.3, 126.8, 127.2, 139.3, 137.5, 140.9, 170.7.

**$R_f$**  (Dichlormethan/Methanol 20:1) = 0.38.

**Darstellung von 4-Mercaptobutansäure-[3,5-bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenyl]-amid 39**



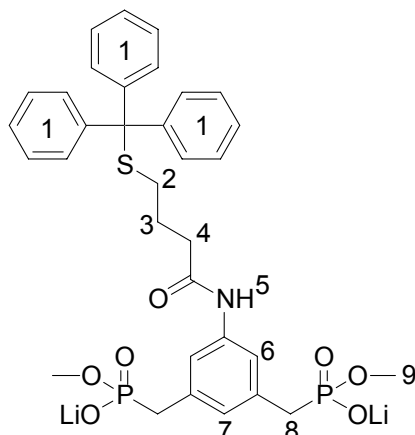
41 mg 4-Tritylsulfanylbutansäure-[3,5-bis(dimethoxyphosphorylmethyl)-phenyl]amid **38** (60  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden unter Eiskühlung in 20 mL Dichlormethan gelöst und mit 10 mL Trifluoressigsäure und 0.3 mL Triisopropylsilan versetzt. Nach etwa 2 Stunden wurde 30 mL Toluol hinzu gegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde abermals in 20 mL Toluol aufgenommen und abermals unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Rohprodukt wurde über Silicagel mit Dichlormethan/Methanol (20:1) gereinigt. Ausbeute: 30 mg (45  $\mu\text{mol}$ , 73 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.43 (m, 1H, H-1), 1.78 (m, 2H, H-3), 2.02 (m, 2H, H-2), 2.13 (m, 2H, H-4), 3.12 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 20.0$  Hz, 4H, H-8), 3.57 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 11.1$  Hz, 12H, H-9), 6.76 (s, 1H, H-5), 7.69 (s, 1H, H-7), 7.87 (s, 2H, H-6).

**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 29.8 (s).



**Darstellung von 4-Trytlylsulfanylbutansäure-[3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)-phenyl]amid Dilithiumsalz 40**

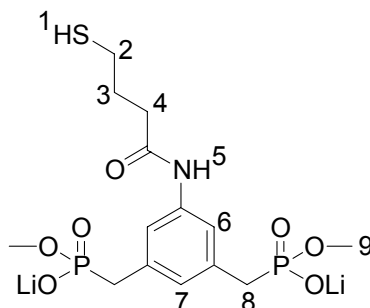


116 mg 4-Trytlylsulfanylbutansäure-[3,5-bis(dimethoxyphosphorylmethyl)-phenyl]amid 39 (170  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden mit 32.5 mg Lithiumbromid (374  $\mu\text{mol}$ , 2.2 eq) unter Schutzgas in 50 mL trockenem Acetonitril gelöst und 48 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und mehrfach mit trockenem Acetonitril gewaschen. Ausbeute: 99 mg (149  $\mu\text{mol}$ , 88 %).

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.52 (m, 2H, H-3), 2.45 (m, 4H, H-2,4), 3.18 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 20.4$  Hz, 4H, H-8), 3.89 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 11.2$  Hz, 6H, H-9), 6.79 (s, 1H, H-5), 7.26-7.05 (m, 15H, H-1), 7.62 (s, 1H, H-7), 7.78 (s, 2H, H-6).

$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 25.9 (s).

**Darstellung von 4-Trytlylsulfanylbutansäure-[3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)-phenyl]amid Dilithiumsalz 41**



77 mg 4-Trytlylsulfanylbutansäure-[3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)-phenyl]amid Dilithiumsalz 40 ( $M = 665.53$  g/mol, 116  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden unter Eiskühlung in 15 mL Dichlormethan gelöst und mit 10 mL Trifluoressigsäure und 0.3 mL Triisopropylsilan

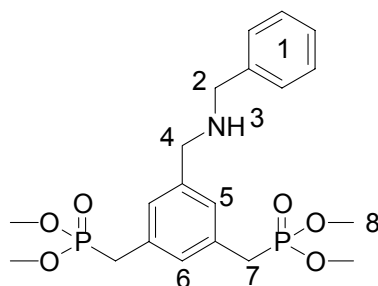
versetzt. Nach etwa 2 Stunden wurde 20 mL Toluol hinzu gegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde abermals in 20 mL Toluol aufgenommen und abermals einrotiert. Der gelblichweiße Feststoff wurde mehrfach mit Acetonitril gewaschen ( $3 \times 20$  mL) und anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 33.4 mg (78.9  $\mu$ mol, 68 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, MeOH- $d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.52 (m, 2H, H-3), 2.45 (m, 4H, H-2,4), 3.23 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 20.8$  Hz, 4H, H-8), 3.89 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 10.9$  Hz, 6H, H-9), 7.67 (s, 1H, H-7), 7.87 (s, 2H, H-6).

**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz, MeOH- $d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 26.1 (s).

### Darstellung von Benzyl-3,5-bis(dimethoxyphosphinylmethyl)benzylamin 42



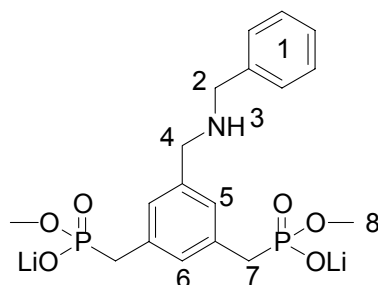
In einem 100 ml Stickstoffkolben wurden unter Argon 132 mg 3,5-Bis(dimethoxyphosphinylmethyl)-benzaldehyd 4 (0.376 mmol, 1.0 eq) in Dichlormethan (50.0 mL) gelöst. Dazu wurden 41.0  $\mu$ L Benzylamin (0.376 mmol, 1.0 eq) gegeben und die Lösung 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das entstandene Imin in Methanol (50.0 mL) gelöst. Dazu wurden 28.0 mg Natriumborhydrid (0.752 mmol, 2.0 eq) gegeben und für weitere 12 h gerührt. Danach wurde das Methanol ebenfalls am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 132 mg (g/mol, 0.30 mmol, 74 %)

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 3.09 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 21.74$  Hz, 4H, H-7), 3.61 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 14.0$  Hz, 6H, H-8), 3.70-3.74 (m, 4H, H-2,4), 7.06-7.28 (m, 8H, H-1,5,6).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (50.2 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 31.3 (d,  $^1J_{\text{P,C}} = 92.1$  Hz, C-7), 51.9 (d,  $^2J_{\text{P,C}} = 13.2$  Hz, C-8), 60.4 (C-2 und 4), 125.9-140.2 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$  (81.0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 29.2 (s).

**Darstellung von Benzyl-3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)benzylamin Dilithiumsalz 43**

100 mg 3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzaldehyd Dilithiumsalz 25 (0.3 mmol, 1.0 eq) und 33  $\mu$ L Benzylamin (0.3 mmol, 1.0 eq) wurden unter Argon in 30 mL absolutem Methanol gelöst und mit Molekularsieb 3 Å versetzt. Die Lösung wurde 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Argongegenstrom mit 15 mg Natriumborhydrid (0.4 mmol, 1.25 eq) versetzt und weitere 4 Stunden gerührt. Das zerstoßene Molsieb wird abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 125 mg (g/mol, 294  $\mu$ mol, 98 %).

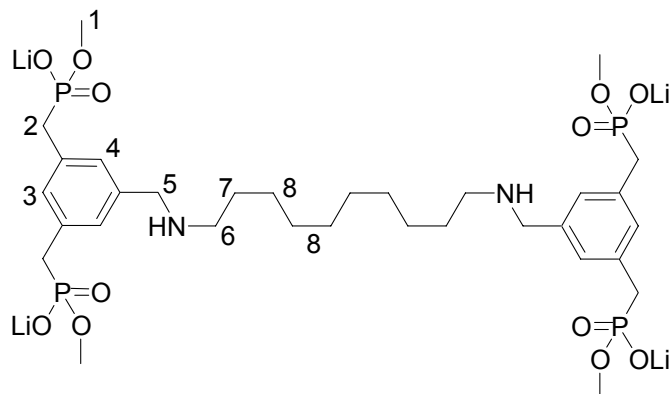
**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, MeOH- $d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 3.52 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 20.5$  Hz, 4H, H-7), 3.58 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 10.2$  Hz, 6H, H-8), 3.88-3.81 (m, 4H, H-2,4), 7.25 (s, 3H, H-5,6), 7.44 (m, 5H, H-1).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (50.2 MHz, MeOH- $d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 30.7 (d,  $^1J_{\text{P,C}} = 90.2$  Hz, C-7), 53.2 (d,  $^2J_{\text{P,C}} = 12.8$  Hz, C-8), 62.3 (C-2,4), 122.6-138.7 (C<sub>arom.</sub>).

**$^{31}\text{P-NMR}$  (81.0 MHz, MeOH- $d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 25.2 (s).

**MS** (MALDI-TOF)  $m/z = 426.3$  [ $\text{M}_{\text{Li-salt}} + \text{H}$ ] $^+$ .

### Darstellung von *N,N'*-1,10-Di[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzyl]diaminodecan Tetralithiumsals 44



100 mg 3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzaldehyd Dilithiumsals 25 (0.3 mmol, 1.0 eq) und 26 mg Diaminodecan (150  $\mu$ mol, 0.5 eq) wurden unter Argon in 30 mL absolutem Methanol gelöst und mit Molekularsieb 3 Å versehen. Die Lösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Argongegenstrom mit 15 mg Natriumborhydrid (0.4 mmol, 1.25 eq) versetzt und weitere 12 Stunden gerührt. Das zerstoßene Molsieb wird abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der resultierende Feststoff wird über HPLC ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ -Gradient (1% TFA) über 45 min, RP-CN-Säule) gereinigt. Ausbeute: 104 mg (129  $\mu$ mol, 86 %).

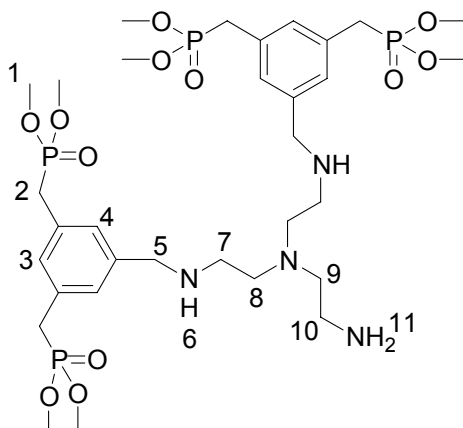
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.36 (m, 12H, H-8), 1.69 (m, 4H, H-7), 2.96 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 20.4$  Hz, 8H, H-2), 3.02 (m, 4H, H-6), 3.48 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 10.6$  Hz, 12H, H-1), 4.06 (s, 4H, H-5), 7.23 (m, 6H, H-3,4).

$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$ [ppm] = 25.9 (s).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ): nicht meßbar.

MS (MALDI-TOF)  $m/z = 808.3$  [ $\text{M}_{\text{Li-salz}}$ ] $^+$ .

**Darstellung von Bis-(2-bis(dimethoxyphosphinylmethyl)benzylaminoethyl)-aminoethyl-amin 27**



100 mg 3,5-Bis(dimethoxyphosphinylmethyl)benzaldehyd **4** (286  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) und 14  $\mu\text{L}$  Tris-(2-aminoethyl)-amin (95.3  $\mu\text{mol}$ , 0.33 eq) wurden unter Argon in einem ausgeheizten Kolben in 30 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Argongegenstrom mit 13 mg Natriumborhydrid (343  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq) versetzt und weitere 6 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand über eine Chromatographiesäule an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (10:1) gereinigt.

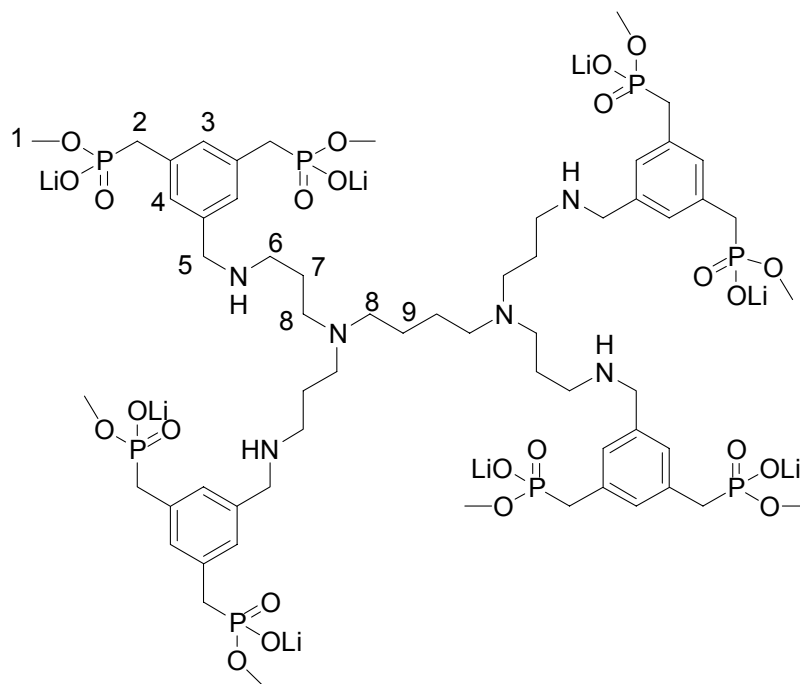
Ausbeute: 76 mg (93  $\mu\text{mol}$ , 98 % nicht HPLC-gereinigt)

**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 2.43 (m, 2H, H-10), 2.76 (m, 6H, H-8,9), 2.89 (m, 4H, H-7), 3.12 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 20.6$  Hz, 8H, H-2), 3.58 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 10.9$  Hz, 24H, H-1), 3.74 (s, 4H, H-5), 6.84 (s, 2H, H-3), 7.03 (s, 4H, H-4).

**$^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 29.7 (s).

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 815 ( $\text{M}^+\text{+H}$ ), 480 ( $\text{M}^+$ -Bisphosphonatmethyl), 146 ( $\text{M}^+$ -2BP).

**Darstellung von Tetrakis[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzylaminopropyl]-1,4-diaminobutan Octalithiumsalz 28**



100 mg 3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzaldehyd Dilithiumsalz 25 (0.3 mmol, 1.0 eq) und 25  $\mu$ L DAB-Amin 4 (75  $\mu$ mol, 0.25 eq) wurden unter Argon in 30 mL absolutem Methanol gelöst und mit Molekularsieb 3 Å versehen. Die Lösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Argongegenstrom mit 15 mg Natriumborhydrid (0.4 mmol, 1.25 eq) versetzt und weitere 12 Stunden gerührt. Das zerstoßene Molsieb wird abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der resultierende Feststoff wird über HPLC ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ -Gradient (1% TFA) über 45 min, RP-CN-Säule) gereinigt. Ausbeute: 80 mg (50  $\mu$ mol, 67 %)

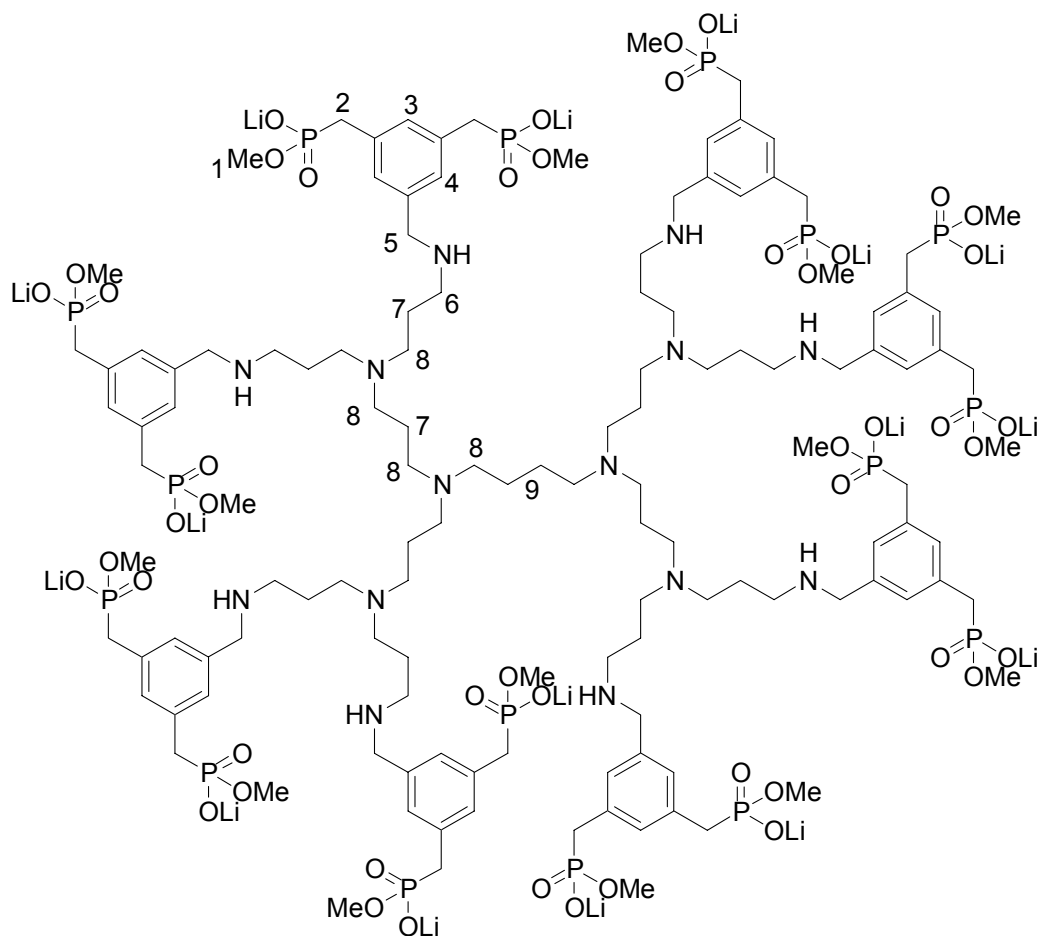
**$^1\text{H}$ -NMR (200 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.46 (br, 4H), 1.72 (br, 8H), 2.54 (br, 12H), 2.69 (br, 8H), 3.00 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 20.5$  Hz, 16H), 3.51 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 10.5$  Hz, 24H), 3.81 (s, br, 8H), 7.13 (s, 12H).

**$^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 27.5 (s).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):** nicht meßbar.

**MS (MALDI-TOF)  $m/z$  1541.7** [ $\text{M}_{\text{protonierte Phosphonate}} + \text{H}$ ] $^+$

**Darstellung von Tetrakis-[bis(3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)benzylaminopropyl)-1,3-diaminopropyl]-1,4-diaminobutan Hexadecalithiumsalz 29**



100 mg 3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzaldehyd Dilithiumsalz 25 (0.3 mmol, 1.0 eq) und 29 mg DAB-Amin 8 (37.5  $\mu\text{mol}$ , 0.125 eq) wurden unter Argon in 30 mL absolutem Methanol gelöst und mit Molekularsieb 3 Å versehen. Die Lösung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Argongegenstrom mit 15 mg Natriumborhydrid (0.4 mmol, 1.25 eq) versetzt und weitere 16 Stunden gerührt. Das zerstoßene Molsieb wird abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der resultierende Feststoff wird über HPLC ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ -Gradient (1% TFA) über 45 min, RP-CN-Säule) gereinigt. Ausbeute: 74 mg (22.3  $\mu\text{mol}$ , 59 %)

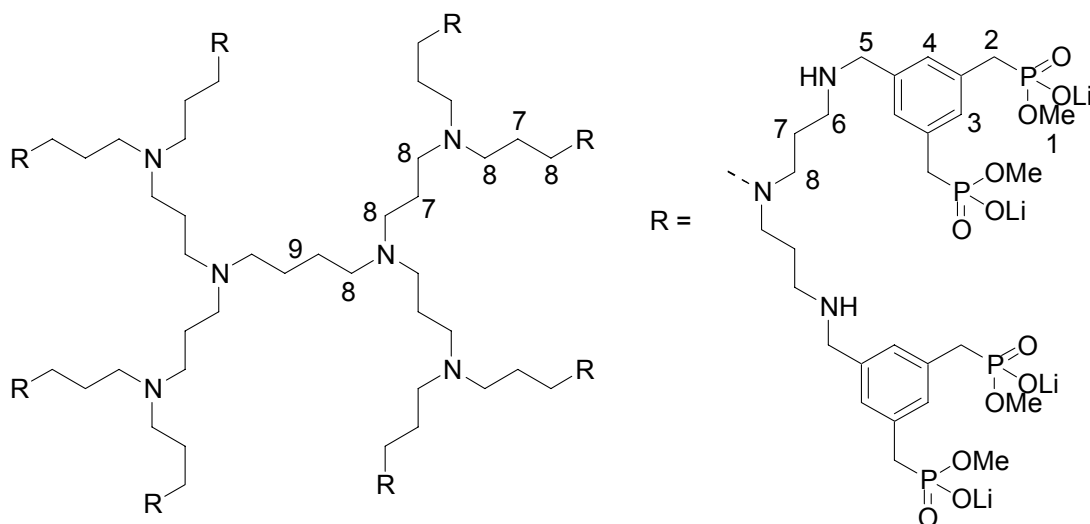
**$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.47 (br, 4H), 1.71 (br, 24H), 2.48 (br, 36H), 2.61 (br, 16H), 2.96 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 20.5$  Hz, 32H), 3.50 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 10.2$  Hz, 48H), 3.69 (s, 16H), 7.11 (s, 8H), 7.16 (m, 16H).

**$^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 26.2 (s).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):** nicht meßbar.

MS (MALDI-TOF)  $m/z$  3321.7  $[M_{\text{Li-salt}} + \text{H}]^+$ .

**Darstellung von Tetrakis-[bis-(bis(3,5-bis-(methoxyphosphonylmethyl)-benzylamino-propyl-3-aminopropyl)-3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan Ditricontalithiumsalsz 30**



100 mg 3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzaldehyd Dilithiumsalsz 25 (0.3 mmol, 1.0 eq) und 32 mg DAB-Amin 16 (18.8  $\mu\text{mol}$ , 0.063 eq) wurden unter Argon in 30 mL absolutem Methanol gelöst und mit Molekularsieb 3 Å versehen. Die Lösung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Argongegenstrom mit 15 mg Natriumborhydrid (0.4 mmol, 1.25 eq) versetzt und weitere 16 Stunden gerührt. Das zerstoßene Molsieb wird abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der resultierende Feststoff wird über HPLC ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ -Gradient (1% TFA) über 45 min, RP-CN-Säule) gereinigt. Ausbeute: 64 mg (10.2  $\mu\text{mol}$ , 54 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.29 (br, 4H), 1.68 (br, 56H), 2.34 – 2.73 (br, 116H), 3.00 (d,  $^2J_{\text{P,H}} = 20.0$  Hz, 64H), 3.50 (d,  $^3J_{\text{P,H}} = 10.2$  Hz, 96H), 3.72 (br, 32H), 7.13 (m, 48H).

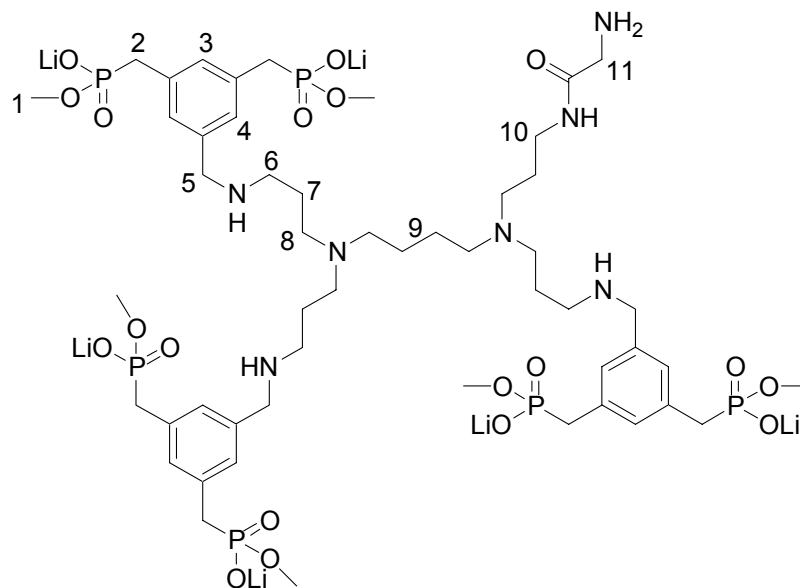
$^{31}\text{P-}\{^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 25.8 (s).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ): nicht meßbar.

MS (MALDI-TOF)  $m/z$  3292.2  $[M_{\text{protonierte Phosphonate}} + 2\text{H}]^{2+}$ .



**Darstellung von *N*-Propyl-4-amidoglycin-tri[3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)benzylaminopropyl]-1,4-diaminobutan Hexalithiumsals 31**



200 mg des vorbeladenen, aktivierten Succinimidyl-glycin-2-chlorotriethylharzes von *novabiochem* (Beladung: 1.0 mmol/g, Best.-Nr.: 04-12-3850, 200  $\mu$ mol, 1.0 eq) wurden 2 Stunden in einem Festphasenreaktor unter Schütteln in trockenem Dichlormethan vorgequollen. Nach Zugabe von 330  $\mu$ L DAB-Am 4 (1.0 mmol, 5 eq) wurde der Reaktor abermals 24 Stunden geschüttelt. Nach mehrmaligem Spülen mit abs. Dichlormethan wurde abermals die gleiche Menge DAB-Am 4 hinzugegeben und weitere 24 Stunden geschüttelt. Der anschließende Kaiser-Test zeigte eine deutliche Blaufärbung des Harzes.

Nach abschließendem Spülen mit abs. Dichlormethan wurden 300 mg 3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzaldehyd Dilithiumsals 25 (900  $\mu$ mol, 4.5 eq) in abs. Dichlormethan und getrocknetem Methanol (ca. 5:1) zugegeben und mit 200 mg Molekularsieb 3 Å 48 Stunden zum Schütteln in einen dunklen Raum gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurden 42 mg Natriumborhydrid (1.10 mmol, 5.5 eq) hinzu gegeben und weitere 12 Stunden geschüttelt. Der Kaisertest zeigte daraufhin noch eine schwache Blaufärbung auf und die letzten zwei Schritte wurden abermals wiederholt.

Die Abspaltung vom Harz erfolgte durch zweimaliges Schütteln mit 30 % Trifluorethanol in Dichlormethan mit 1 % Triisopropylsilan. Mehrmaliges Spülen mit Dichlormethan und Methanol ergaben nach Entfernung der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eine Ausbeute von 82 mg (61.7  $\mu$ mol, 31 %).

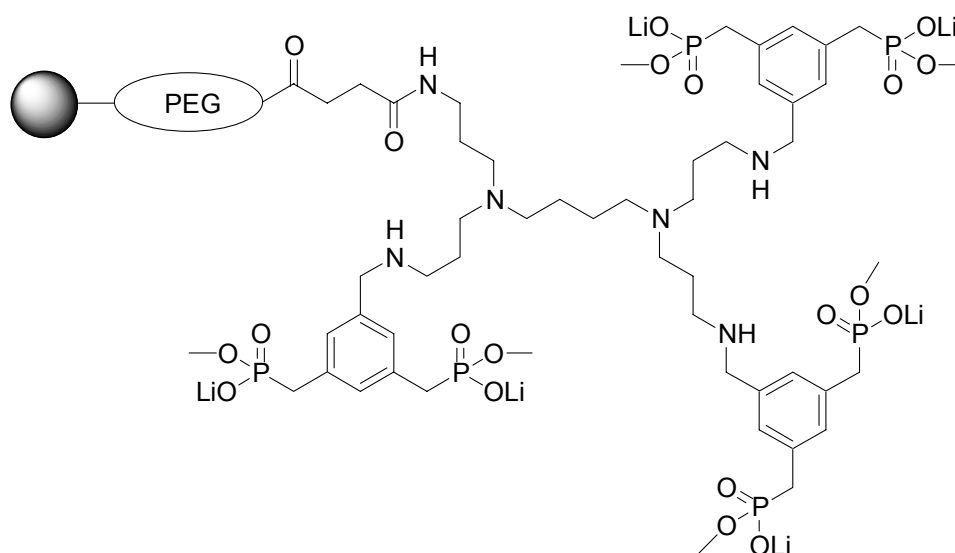
**$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.50 (br, 4H, H-9), 1.68 (br, 8H, H-7), 2.52 (br, 12H, H-8), 2.76 (br, 6H, H-6), 2.85 (m, 2H, H-10), 3.07 (d,  $^2J_{P,H} = 20.9$  Hz, 12H), 3.48 (d,  $^3J_{P,H} = 10.6$  Hz, 18H, H-1), 3.67 (s, 2H, H-11), 4.02 (m, br, 6H, H-5), 7.04 (s, 3H, H-3), 7.29 (s, 6H, H-4).

**$^{31}\text{P-}\{^1\text{H}\}$ -NMR (81 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):**  $\delta$  [ppm] = 25.4 (s).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):** nicht meßbar

**MS (MALDI-TOF)**  $m/z$  1328.4 [ $\text{M}_{\text{Li-Salz}} + \text{H}$ ] $^+$ .

**Darstellung von festphasenimmobilisiertem *N*-Propyl-4-amino-tri[3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)benzyl-aminopropyl]-1,4-diaminobutan Hexalithiumsalz**



200 mg des vorbeladenen, voraktivierten TentaGel S COOSu Harzes von *Advanced ChemTech* (Beladung: 0.5 mmol/g, Best.-Nr.: SJ6090, 100  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurden 2 Stunden in einem Festphasenreaktor unter Schütteln in trockenem Dichlormethan vorgequollen. Nach Zugabe von 165  $\mu\text{L}$  DAB-Am 4 (500  $\mu\text{mol}$ , 5 eq) wurde der Reaktor abermals 36 Stunden geschüttelt. Nach mehrmaligem Spülen mit abs. Dichlormethan wurde abermals die gleiche Menge DAB-Am 4 hinzugegeben und weitere 12 Stunden geschüttelt. Der anschließende Kaiser-Test zeigte eine deutliche Blaufärbung des Harzes.

Nach abschließendem Spülen mit abs. Dichlormethan wurden 167 mg 3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzaldehyd Dilithiumsalz **25** (500  $\mu\text{mol}$ , 5 eq) in abs. Dichlormethan und getrocknetem Methanol (ca. 5:1) zugegeben und mit 200 mg Molekularsieb 3 Å 48 Stunden in einen dunklen Raum geschüttelt. Nach Ablauf der Zeit wurden 42 mg Natriumborhydrid (1.10 mmol, 5.5 eq) hinzu gegeben und weitere 12 Stunden geschüttelt. Zugabe von 3,5-

Bis(methoxy-phosphonylmethyl)benzaldehyd Dilithiumsalz und anschließende Zugabe von Natriumborhydrid wurde zweimal wiederholt, bis der NF31-Farbttest keine freien Aminogruppen mehr anzeigte.

### Allgemeine Vorschrift zum Labeln der Proteine mit Oregon-Green 488™

Von den 5 mg Oregon-Green-succinimidylester wurde zunächst eine Stammlösung in 500 µL DMSO angesetzt. Das Protein wurde in 500 µL eines 0.1 M Natriumcarbonatpuffers gelöst, der mit verdünnter HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 8.3 eingestellt wurde (ca. 5 – 10 mg/mL Proteinkonzentration). Zu der Proteinlösung wurden 95 µL der Oregon-Green-succinimidylester-lösung gegeben und das Gemisch in einem Eppendorfgefäß 1 Stunde inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 100 µL einer 1.5 M Hydroxylaminlösung (pH = 8.5) gegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Protein über eine ÄKTA prime von Amersham Pharmacia biotech über fünf hintereinander geschaltete HiTrap™ Desalting 5 ml Säulen von Amersham Biosciences bei einem Fluß von 1 ml/min aufgereinigt. Als Eluent wurde ein Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH = 7.1; 10 mM) mit 100 mM NaCl verwendet. Aufkonzentriert und entsalzt wurden die Proteine durch Ultrazentrifugation mit Vivaspin MWCO PES Filtern von Vivascience/Sartorius.

Um den Labeling-Grad zu bestimmen wurden von der Proteinlösung bei einer Verdünnung von etwa 0.1 mg/mL die Absorptionen bei 280 nm für das Protein und bei 496 nm für den Fluoreszenzmarker gemessen. Bei kleineren Proteinen wird bei entsprechend höherer Verdünnung gemessen. Aus der Formel:

$$A_{\text{korr}} = A_{280} - A_{496} \cdot 0.12$$

mit  $A_{280}$  für die gemessene Absorption des markierten Proteins bei 280 nm und  $A_{496}$  die Absorption bei 496 nm kann die korrigierte Absorption  $A_{\text{korr}}$  bestimmt werden. Aus  $f \cdot A_{\text{korr}} = 1 \text{ mg/mL}$  mit  $f$  als proteinspezifischem Absorptionsfaktor – bestimmbar aus der Aminosäuresequenz des Proteins – kann die Konzentration des Proteins in Lösung [Protein] in mg/mL bestimmt werden. Der Markierungsgrad MG ergibt sich dann nach:

$$\text{MG} = \frac{A_{\text{max}} \cdot \text{MW}}{[\text{Protein}] \cdot \epsilon_{\text{Marker}}}$$

## Experimenteller Teil

---

mit  $A_{\max}$  als der Absorption des Farbstoffes an seinem Maximum (ca. 490 – 500 nm), MW dem Molgewicht des Proteins und  $\epsilon_{\text{Marker}}$  dem Extinktionskoeffizienten des Fluoreszenzmarkers (Oregon-Green 488  $\epsilon_{\text{Marker}} = 70000$ ).

Stammlösungen der markierten Proteine:

Protein	Menge	Konzentration	Markierungsgrad
BSA	7.612 mg	$1.198 \cdot 10^{-4}$ mol/L	32 %
Proteinase K	7.142 mg	$3.160 \cdot 10^{-5}$ mol/L	12 %
Cytochrom c	4.605 mg	$7.363 \cdot 10^{-4}$ mol/L	20 %
Histon H1	2.855 mg	$6.777 \cdot 10^{-4}$ mol/L	48 %
Chymotrypsin	8.024 mg	$3.126 \cdot 10^{-4}$ mol/L	36 %

### 6.3 NMR-Titrationen

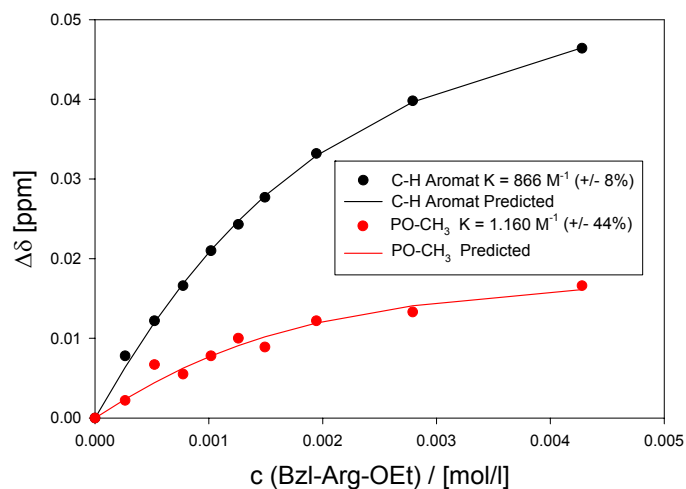
#### *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-4-[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)phenylamido]glutaminsäurebenzylester Dilithiumsalz **15** gegen Bzl-Arg-OEt in Methanol-*d*<sub>4</sub>

Einwaage: **15**: (vorgelegt): 6.64 mg gelöst in 8.00 mL

Diarginin (zugegeben): 7.34 mg gelöst in 1.00 mL

NMR-Nr.	Zugabe μL	V <sub>Gesamt</sub> mL	c( <b>15</b> ) mol/L	c(Bzl-Arg-OEt) mol/L	Δδ(aromat.) ppm	Δδ(POMe) ppm
1	0	0.90	1.295×10 <sup>-3</sup>	-	0.0000	0.0000
2	10	0.90	1.279×10 <sup>-3</sup>	2.641×10 <sup>-4</sup>	0.0078	0.0022
3	20	0.90	1.264×10 <sup>-3</sup>	5.219×10 <sup>-4</sup>	0.0122	0.0067
4	30	0.90	1.249×10 <sup>-3</sup>	7.734×10 <sup>-4</sup>	0.0166	0.0055
5	40	0.90	1.234×10 <sup>-3</sup>	1.019×10 <sup>-3</sup>	0.0210	0.0078
6	50	0.90	1.219×10 <sup>-3</sup>	1.259×10 <sup>-3</sup>	0.0243	0.0100
7	60	0.90	1.205×10 <sup>-3</sup>	1.493×10 <sup>-3</sup>	0.0277	0.0089
8	80	0.90	1.178×10 <sup>-3</sup>	1.945×10 <sup>-3</sup>	0.0332	0.0122
9	120	0.90	1.126×10 <sup>-3</sup>	2.791×10 <sup>-3</sup>	0.0398	0.0133
10	200	0.90	1.036×10 <sup>-3</sup>	4.279×10 <sup>-3</sup>	0.0464	0.0166

Graphische Darstellung der Daten:



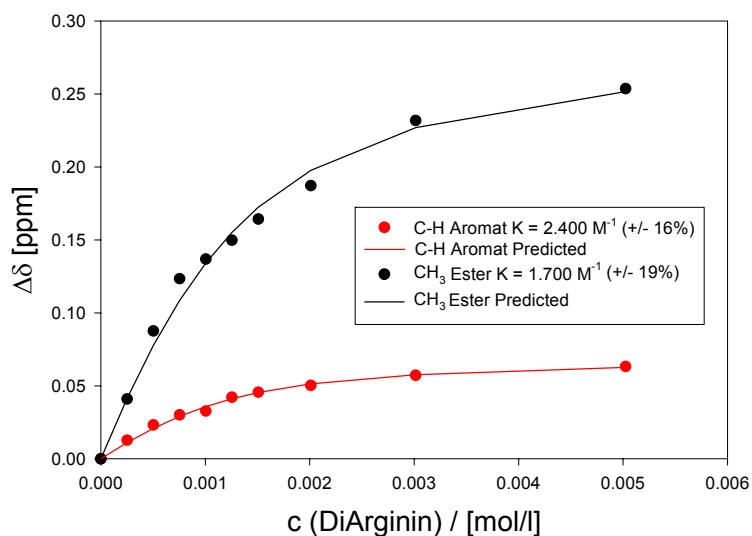
***N*-tert-Butyloxycarbonyl-Glu-4-[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)-phenylamid]-Glu-4-[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)phenylamid]-benzylester Tetra-lithiumsalz 21 gegen Diarginin (H-Arg-Arg-OH) in Methanol-*d*<sub>4</sub>**

Einwaage: 21: (vorgelegt): 10.32 mg gelöst in 7.00 mL

Diarginin (zugegeben): 5.23 mg gelöst in 0.70 mL

NMR-Nr.	Zugabe μL	V <sub>Gesamt</sub> mL	c( <u>21</u> ) mol/L	c(Diarginin) mol/L	Δδ(aromat.) ppm	Δδ(POMe) ppm
1	0	0.90	1.07×10 <sup>-3</sup>	-	0.0000	0.0000
2	10	0.90	1.07×10 <sup>-3</sup>	2.51×10 <sup>-4</sup>	0.0127	0.0410
3	20	0.90	1.07×10 <sup>-3</sup>	5.03×10 <sup>-4</sup>	0.0232	0.0876
4	30	0.90	1.07×10 <sup>-3</sup>	7.54×10 <sup>-4</sup>	0.0301	0.1234
5	40	0.90	1.07×10 <sup>-3</sup>	1.01×10 <sup>-3</sup>	0.0327	0.1368
6	50	0.90	1.07×10 <sup>-3</sup>	1.26×10 <sup>-3</sup>	0.0422	0.1498
7	60	0.90	1.07×10 <sup>-3</sup>	1.51×10 <sup>-3</sup>	0.0456	0.1643
8	80	0.90	1.07×10 <sup>-3</sup>	2.01×10 <sup>-3</sup>	0.0503	0.1872
9	120	0.90	1.07×10 <sup>-3</sup>	3.02×10 <sup>-3</sup>	0.0572	0.2318
10	200	0.90	1.07×10 <sup>-3</sup>	5.03×10 <sup>-3</sup>	0.0632	0.2536

Graphische Darstellung der Daten:



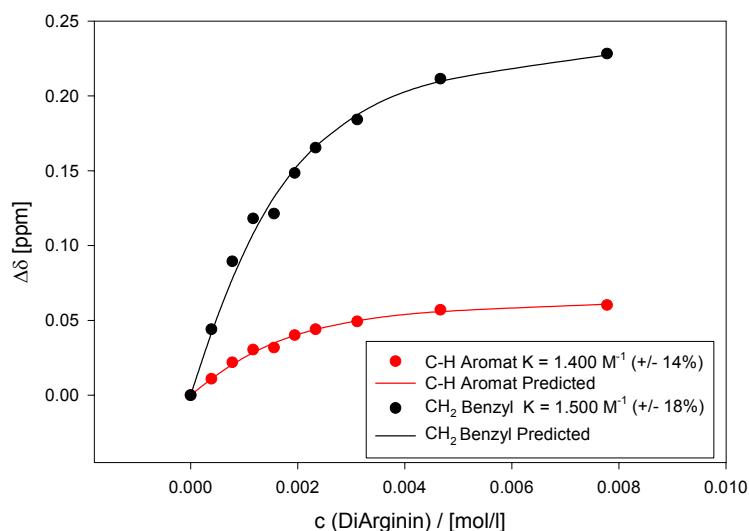
***N,N'*-1,10-Di[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzyl]diaminodecan Tetralithiumsalz **44** gegen Diarginin (H-Arg-Arg-OH) in Methanol-*d*<sub>4</sub>**

Einwaage: **44**: (vorgelegt): 12.73 mg gelöst in 7.87 mL

Diarginin (zugegeben): 8.58 mg gelöst in 0.74 mL

NMR-Nr.	Zugabe μL	V <sub>Gesamt</sub> mL	c( <b>44</b> ) mol/L	c(Diarginin) mol/L	Δδ(H-3,4) ppm	Δδ(H-5) ppm
1	0	0.90	1.56×10 <sup>-3</sup>	-	0.0000	0.0000
2	10	0.90	1.56×10 <sup>-3</sup>	3.89×10 <sup>-4</sup>	0.0110	0.0441
3	20	0.90	1.56×10 <sup>-3</sup>	7.78×10 <sup>-4</sup>	0.0220	0.0895
4	30	0.90	1.56×10 <sup>-3</sup>	1.17×10 <sup>-3</sup>	0.0305	0.1181
5	40	0.90	1.56×10 <sup>-3</sup>	1.56×10 <sup>-3</sup>	0.0318	0.1213
6	50	0.90	1.56×10 <sup>-3</sup>	1.94×10 <sup>-3</sup>	0.0402	0.1485
7	60	0.90	1.56×10 <sup>-3</sup>	2.33×10 <sup>-3</sup>	0.0441	0.1654
8	80	0.90	1.56×10 <sup>-3</sup>	3.11×10 <sup>-3</sup>	0.0493	0.1842
9	120	0.90	1.56×10 <sup>-3</sup>	4.67×10 <sup>-3</sup>	0.0571	0.2115
10	200	0.90	1.56×10 <sup>-3</sup>	7.78×10 <sup>-3</sup>	0.0603	0.2283

Graphische Darstellung der Daten:



## 6.4 UV/Vis-Titrationsen

Die UV/VIS-Titrationsen wurden mit Cytochrom c durchgeführt, dessen Absorption bei dem Absorptionsmaximum des Porphyrinringes bei 409 nm verfolgt wurde. Das Cytochrome c wurde dafür in einer Konzentration von etwa 50  $\mu\text{M}$  in Phosphatpuffer (10 mM; pH = 7.1) eingesetzt. Die funktionalisierten Dendrimere wurden in der Proteinlösung gelöst, um bei der Zugabe der Dendrimere keine Änderung der Proteinkonzentration zu erhalten. Weiterhin wurde getestet, ob die eingesetzten Dendrimere eine Absorption bei der untersuchten Wellenlänge besitzen, was nicht der Fall war. Die Veränderung der Absorption im Laufe der Titration wurde als Basis für eine nicht-lineare Regression in dem Programm *Sigma-plot* zur Bestimmung der Bindungskonstanten verwendet. Die zugehörigen Komplexstöchiometrien wurden aus den aus den Titrationsen abgeleiteten Job-Plots bestimmt und wurden als Basis für die Berechnung der Bindungskonstanten benutzt.

### Titration von Cytochrom c gegen Tetrakis[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzylaminopropyl]-1,4-diaminobutan Octalithiumsalz

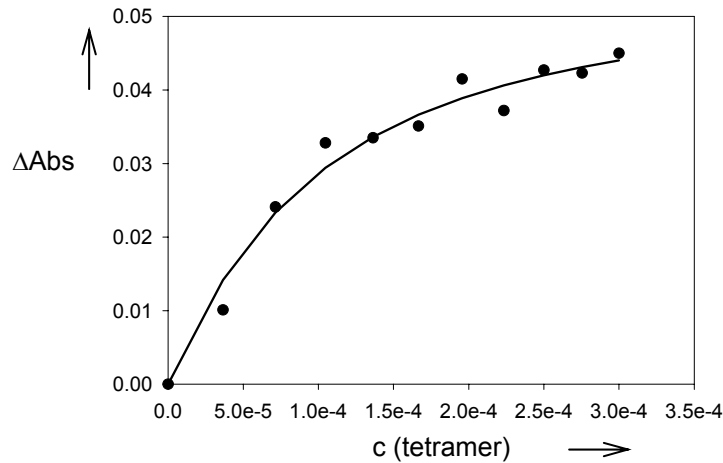
$$c_{\text{cyt-c}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}, c_{\text{tetramer}} = 15 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

Zugabe Tetramer $\mu\text{L}$	Gesamtvolumen $\mu\text{L}$	$c_{\text{cyt-c}}$ $10^{-5} \text{ mol/l}$	$c_{\text{tetramer}}$ $10^{-5} \text{ mol/l}$	Verhältnis $c_{\text{tetramer}}/c_{\text{cyt-c}}$	Absorption	Absorptions- differenz
0	400	5.00	0	-	0.9427	0.0000
10	410	5.00	3.66	0.73	0.9528	0.0101
20	420	5.00	7.14	1.43	0.9668	0.0241
30	430	5.00	10.47	2.09	0.9755	0.0328
40	440	5.00	13.64	2.73	0.9762	0.0335
50	450	5.00	16.67	3.33	0.9778	0.0351
60	460	5.00	19.57	3.91	0.9842	0.0415
70	470	5.00	22.34	4.47	0.9799	0.0372
80	480	5.00	25.00	5.00	0.9854	0.0427
90	490	5.00	27.55	5.51	0.9850	0.0423
100	500	5.00	30.00	6.00	0.9877	0.0450

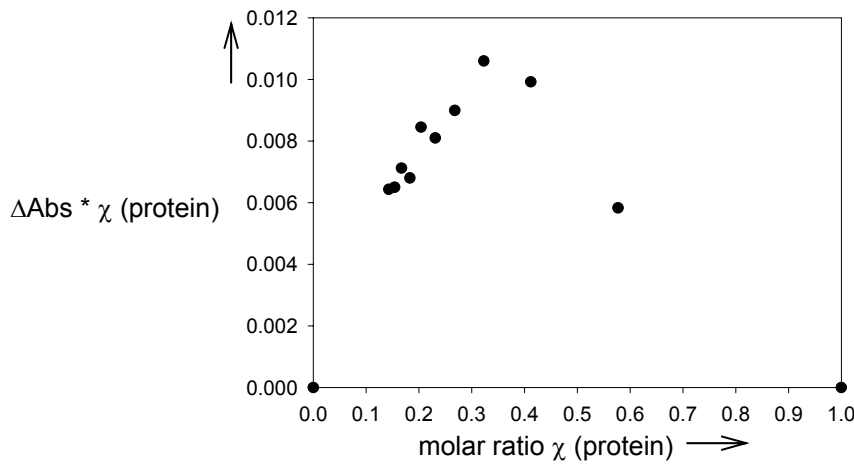
$$K_{a(2:1)} = 5270 \text{ M}^{-1} \pm 24.0 \%$$



Graphische Darstellung der Titrationskurve:



Job-Plot abgeleitet aus den Titrationsdaten:



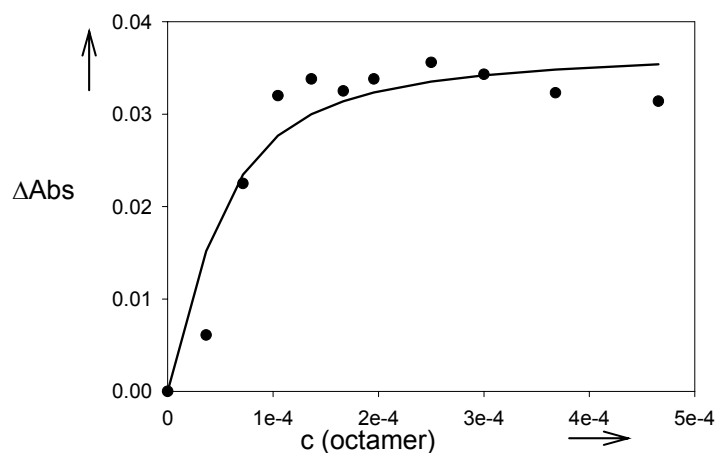
**Titration von Cytochrom c gegen Tetrakis-[bis(3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)-benzylaminopropyl-1,3-diaminopropyl)]-1,4-diaminobutan Hexadecalithiumsals**

$c_{\text{cyt-c}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ ,  $c_{\text{octamer}} = 15 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$

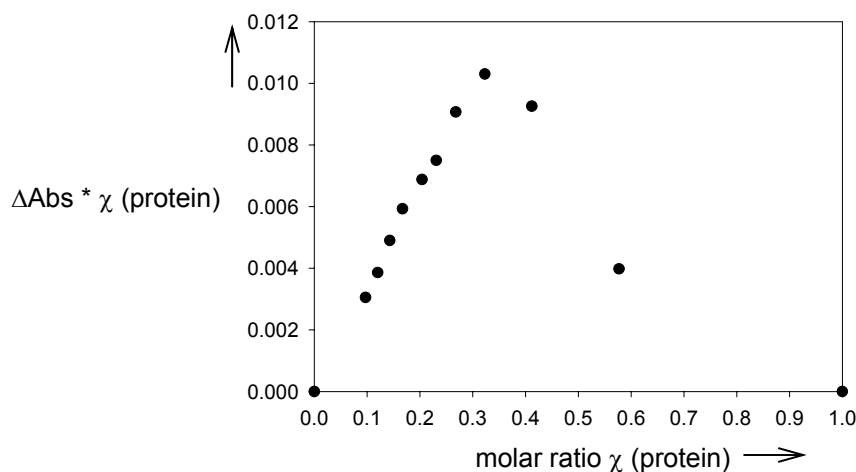
Zugabe Octamer μL	Gesamtvolumen μL	$c_{\text{cyt-c}}$ 10 <sup>-5</sup> mol/l	$c_{\text{Octamer}}$ 10 <sup>-5</sup> mol/l	Verhältnis $c_{\text{Octamer}}/c_{\text{cyt-c}}$	Absorption	Absorptions- differenz
0	400	5.00	0.00	-	0.9178	0.0000
10	410	5.00	3.65	0.73	0.9247	0.0016
20	420	5.00	7.14	1.43	0.9403	0.0225
30	430	5.00	1.05	2.09	0.9498	0.0320
40	440	5.00	1.36	2.73	0.9516	0.0338
50	450	5.00	1.67	3.33	0.9503	0.0325
60	460	5.00	1.96	3.91	0.9516	0.0338
80	480	5.00	2.50	5.00	0.9534	0.0356
100	500	5.00	3.00	6.00	0.9521	0.0343
130	530	5.00	3.68	7.36	0.9501	0.0323
180	580	5.00	4.66	9.31	0.9492	0.0314

$K_{a(2:1)} = 10460 \text{ M}^{-1} \pm 41 \%$

Graphische Darstellung der Titrationskurve:



Job-Plot abgeleitet aus den Titrationsdaten:



**Titration von Cytochrom c gegen Tetrakis-[bis-(bis(3,5-bis-(methoxyphosphonyl-methyl)-benzylamino-propyl-3-aminopropyl)-3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan**

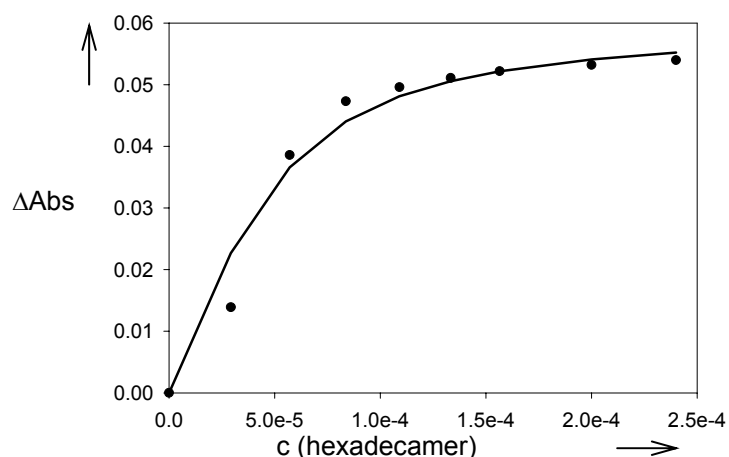
**Ditricontalithiumsalz**

$c_{\text{cyt-c}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ ,  $c_{\text{hexadecamer}} = 12 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$

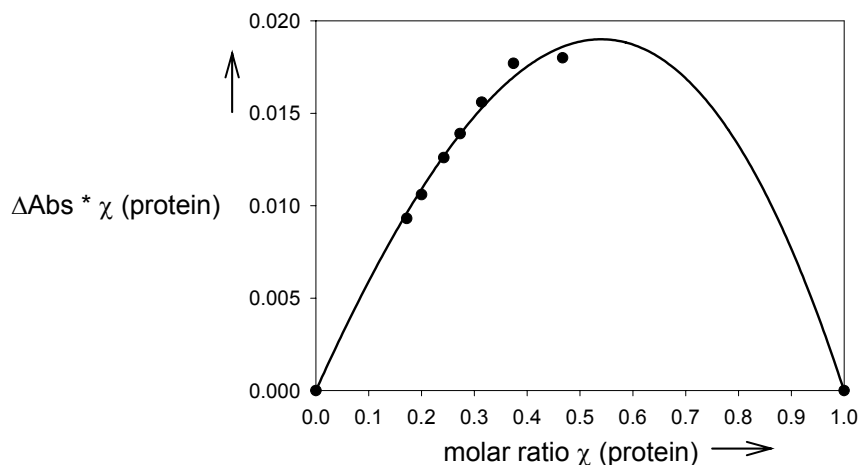
Zugabe Hexadecamer μL	Gesamtvolumen μL	$c_{\text{cyt-c}}$ 10 <sup>-5</sup> mol/l	$c_{\text{Hexadecamer}}$ 10 <sup>-5</sup> mol/l	Verhältnis $c_{\text{Hexadecamer}}/c_{\text{cyt-c}}$	Absorption	Absorptions- differenz
0	400	5	0.00	-	0.8780	0.0000
10	410	5	2.93	0.59	0.8919	0.0139
20	420	5	5.71	1.14	0.9166	0.0386
30	430	5	8.37	1.67	0.9253	0.0473
40	440	5	10.91	2.18	0.9276	0.0496
50	450	5	13.33	2.67	0.9291	0.0511
60	460	5	15.65	3.13	0.9302	0.0522
80	480	5	20.00	4.00	0.9312	0.0532
100	500	5	24.00	4.80	0.9320	0.0540

$K_{a(1:1)} = 58300 \text{ M}^{-1} \pm 45.5 \%$

Graphische Darstellung der Titrationskurve:



Job-Plot abgeleitet aus den Titrationsdaten:



## 6.5 LED-PFG-DSTE-Messungen

### 6.5.1 pH-Abhängigkeit der Diffusionskoeffizienten

Die Messungen wurden auf dem *Bruker* Avance DRX 500 Spektrometer in wässriger Lösung bei 298 K mit Wasserunterdrückung durch Sättigung des Wassersignals durchgeführt. Als Pulsprogramm wurde die LED-PFG-DSTE-Sequenz von *Jerschow* und *Müller*<sup>[87]</sup> mit einem Diffusionsdelay von 51 ms und einer Gradientenlänge von 3 ms verwendet. Die vom *Bruker* Programm *DOSY* generierten *square shape* Gradienten wurden in 9 Inkrementen von 10% bis 90 % of  $G_{\max} = 53.5$  G/cm verwendet. Die Diffusionskoeffizienten wurden durch lineare Regression der Messwerte in *Origin* an den *Stejskal-Tanner-Plot*<sup>[79]</sup> bestimmt. Für die Messungen wurde das bisphosphonatmodifizierte PPI-Oktamer **29** verwendet. Die

Diffusionskoeffizienten wurde anhand von Dioxan als internen Standard um die Viskositätsänderung korrigiert<sup>[108]</sup>. Die Tabelle zeigt den Mittelwert aus drei verschiedenen Messungen. Zum Vergleich sind die berechneten hydrodynamischen Radien aus *molecular-modeling*-Rechnungen aufgeführt. Die Radien lassen sich mit Hilfe der *Stokes-Einstein* Beziehung aus den Diffusionskoeffizienten berechnen:

$$r = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0} \quad [75, 93]$$

pH-Wert	Diffusionskoeffizient $D_0$ $\cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	hydrodynamischer Radius $R_h$ $\text{Å}$	berechneter Radius $R_h$ aus "molecular modeling"- Rechnungen $\text{Å}$
2.3	1.69	14.5	
5.5	1.66	14.8	(1): ~ 14.4
6.8	1.62	15.3	
7.4	1.60	15.4	(2): ~ 13.7
8.7	1,57	15.6	
9.9	1,54	16.0	(3): ~ 14.1

### 6.5.2 Bestimmung der Bindungskonstanten über Diffusionskoeffizientenmessung

Die Diffusionskoeffizienten wurden analog zu jenen in Kapitel 6.5.1 bestimmt. Zunächst wurden jeweils Dendrimer und Protein allein im Puffer vermessen und anschließend in derselben Konzentration im Gemisch. Dies geschah bei verschiedenen Dendrimer und Protein Verhältnissen.

Anhand der Gleichung von *Lucas* und *Larive* wurden aus den gemessenen Diffusionskoeffizienten und den eingesetzten Konzentrationen die Bindungskonstanten bestimmt:

$$K_d = [P]_0 \frac{D_b - D_0}{D_0 - D_f} + [L]_0 \frac{D_0 - D_b}{D_b - D_f} \quad (3)$$

Probe	gemittelter Diffusionskoeffizient	berechnete Dissoziationskonstante $K_d$	Assoziationskonstante $K_a$
freies Cytochrom c	$1.662 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$		
freies Tetramer	$2.895 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$		
Gemisch Cyt-c/Tetramer	$2.759 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$2.92 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$3424 \text{ M}^{-1}$ a)
freies Chymotrypsin	$1.482 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$		
Gemisch Chym./Tetramer	$2.565 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$6.42 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$1560 \text{ M}^{-1}$ b)
freies BSA	$0.633 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$		
Gemisch BSA/Tetramer	$2.591 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$2.24 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$2360 \text{ M}^{-1}$ c)

a) angenommene 2:1 Stöchiometrie aufgrund der UV/Vis-Messungen; b) keine bekannte Stöchiometrie, angenommen als 1:1; c) angenommene 4:1 Stöchiometrie aufgrund der Fluoreszenzmessungen

## 6.6 Fluoreszenztitrationsen

Die Fluoreszenztitrationsen wurden mit den Oregon-Green markierten Proteinen durchgeführt. Die Proteine wurden in Phosphatgepufferter Lösung in den unten angegebenen Konzentrationen verwendet (10 mM, pH = 7.1). Die modifizierten Dendrimere wurden in der Proteinlösung gelöst, um die Proteinkonzentration im Verlauf der Titration konstant zu halten. Für die Ermittlung der Bindungskonstanten wurden die selben Prinzipien wie bei den NMR- und UV/Vis-Titrationsen verwendet.

### Titration von BSA gegen Tetrakis-[bis(3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)benzylaminopropyl-1,3-diaminopropyl)]-1,4-diaminobutan Hexadecalithiumsalz

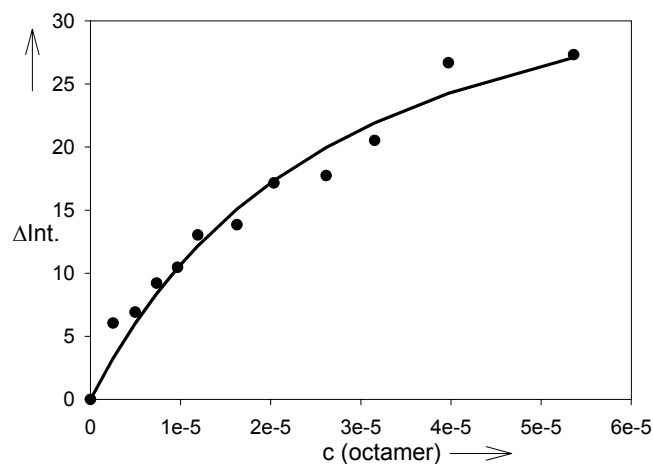
$$c_{\text{BSA}} = 5.99 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}, c_{\text{octamer}} = 1.79 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

Zugabe Octamer	Gesamtvolumen	$c_{\text{BSA}}$	$c_{\text{octamer}}$	Verhältnis $c_{\text{octamer}}/c_{\text{BSA}}$	Fluoreszenz -emission	Emissionsdifferenz
$\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$	$10^{-6} \text{ mol/l}$	$10^{-6} \text{ mol/l}$			
0	700	5.99	0	-	203.577	0
10	710	5.99	2.52	0.42	209.624	6.047
20	720	5.99	4.96	0.83	210.499	6.922
30	730	5.99	7.34	1.23	212.789	9.212
40	740	5.99	9.66	1.61	214.044	10.467
50	750	5.99	1.19	1.99	216.602	13.025
70	770	5.99	1.62	2.71	217.420	13.843
90	790	5.99	20.35	3.40	220.734	17.157
120	820	5.99	26.15	4.36	221.307	17.730
150	850	5.99	31.53	5.26	224.096	20.519
200	900	5.99	39.71	6.63	230.257	26.680
300	1000	5.99	53.61	8.95	230.898	27.321

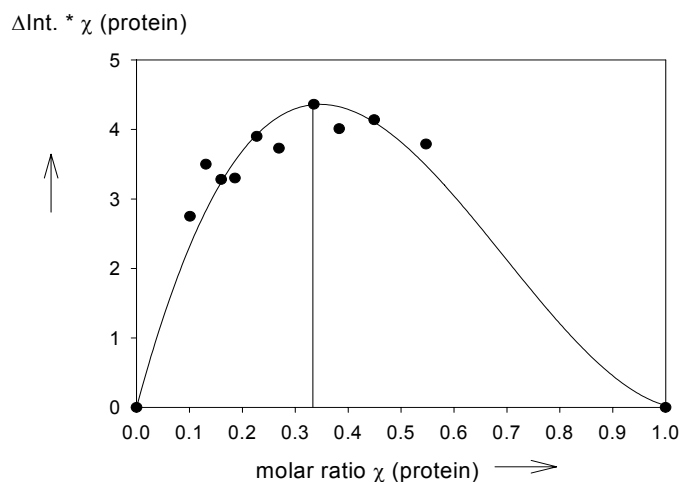
$$K_{a(2:1)} = 19700 \text{ M}^{-1} \pm 22.7 \%$$

$$K_{a(3:1)} = 12600 \text{ M}^{-1} \pm 21.9 \%$$

Graphische Darstellung der Titrationskurve:



Job-Plot abgeleitet aus den Titrationsdaten:



**Titration von BSA gegen Tetrakis[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzylaminopropyl]-1,4-diaminobutan Octalithiumsals**

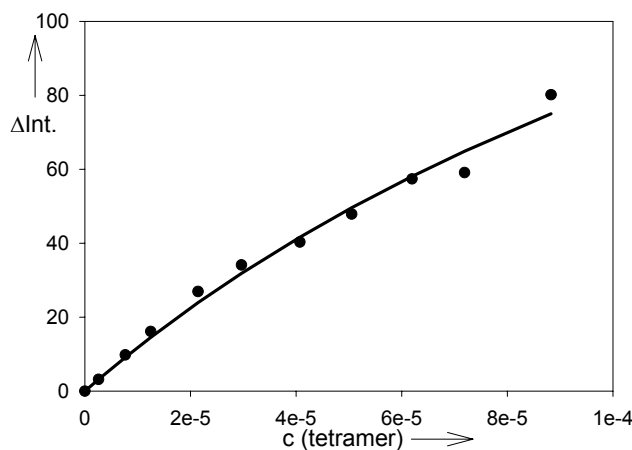
$c_{BSA} = 1.20 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ ,  $c_{\text{tetramer}} = 2.12 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$

Zugabe Tetramer μL	Gesamtvolumen μL	$c_{BSA}$ $10^{-5} \text{ mol/l}$	$c_{\text{tetramer}}$ $10^{-6} \text{ mol/l}$	Verhältnis $c_{\text{tetramer}}/c_{BSA}$	Fluoreszenz-emission	Emissions-differenz
0	400	1.20	0.00	-	690.778	0.000
5	405	1.20	2.62	0.22	693.928	3.150
15	415	1.20	7.67	0.64	700.556	9.778
25	425	1.20	1.25	1.04	706.896	16.118
45	445	1.20	2.15	1.78	717.720	26.942
65	465	1.20	2.97	2.46	724.918	34.140
95	495	1.20	4.07	3.38	731.067	40.289
125	525	1.20	5.05	4.20	738.637	47.859
165	565	1.20	6.20	5.15	748.167	57.389
205	605	1.20	7.19	5.97	749.878	59.100
285	685	1.20	8.83	7.34	770.940	80.162

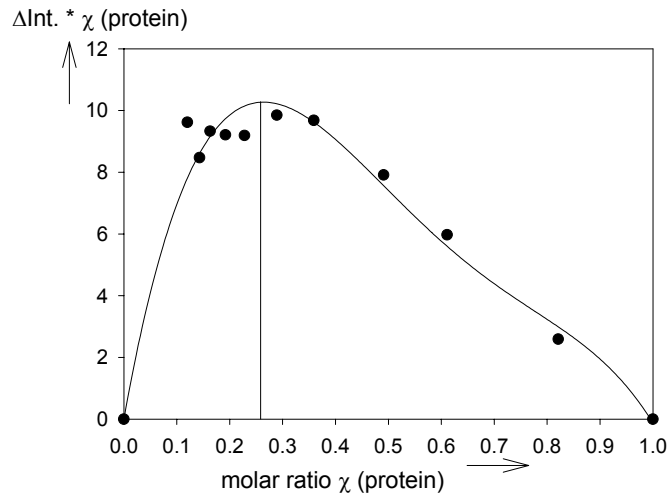
$K_{a(3:1)} = 3120 \text{ M}^{-1} \pm 38 \%$

$K_{a(4:1)} = 1330 \text{ M}^{-1} \pm 36 \%$

Graphische Darstellung der Titrationskurve:



Job-Plot abgeleitet aus den Titrationsdaten:



**Titration von Cytochrom c gegen Tetrakis-[bis(3,5-bis(methoxyphosphonylmethyl)-benzylaminopropyl-1,3-diaminopropyl)]-1,4-diaminobutan Hexadecalithiumsals**

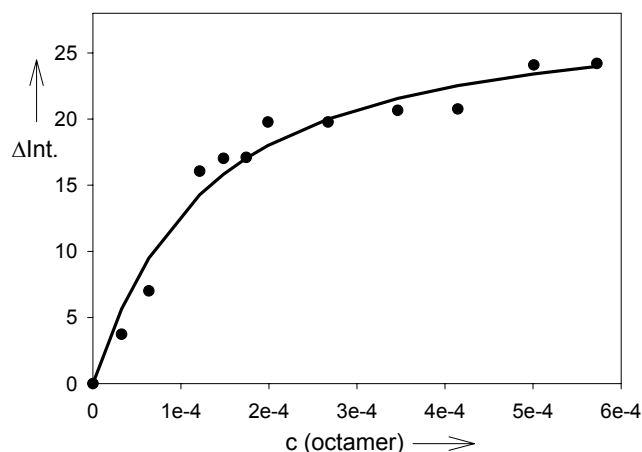
$c_{\text{cytc}} = 7.36 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ ,  $c_{\text{octamer}} = 1.34 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$

Zugabe Octamer	Gesamtvolumen	$c_{\text{cytc}}$	$c_{\text{octamer}}$	Verhältnis $c_{\text{octamer}}/c_{\text{cytc}}$	Fluoreszenz Emission	Emissionsdifferenz
$\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$	$10^{-5} \text{ mol/l}$	$10^{-5} \text{ mol/l}$			
0	400	7.36	0.00	-	324.168	0.000
10	410	7.36	3.26	0.44	327.899	3.731
20	420	7.36	6.36	0.86	331.173	7.005
30 <sup>a</sup>	430	7.36	9.32	1.27	332.824	8.656
40	440	7.36	12.14	1.65	340.227	16.059
50	450	7.36	14.84	2.02	341.189	17.021
60	460	7.36	17.42	2.37	341.261	17.093
70	470	7.36	19.89	2.70	343.943	19.775
100	500	7.36	26.71	3.63	343.937	19.769
140	540	7.36	34.63	4.70	344.817	20.649
180	580	7.36	41.45	5.63	344.926	20.758
240	640	7.36	50.09	6.80	348.249	24.081
300	700	7.36	57.24	7.77	348.366	24.198

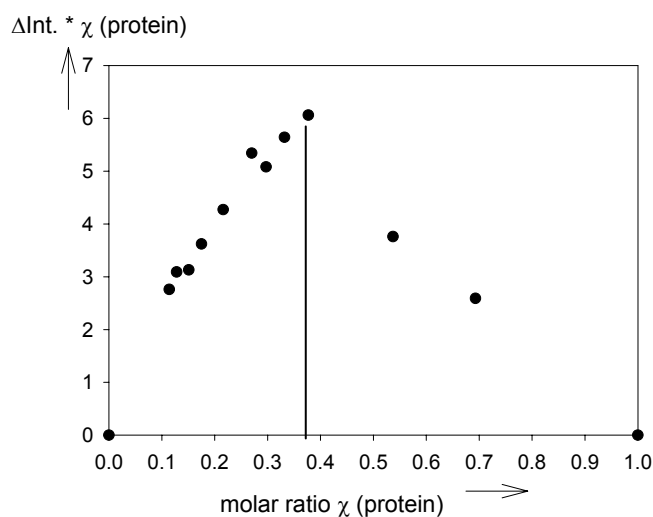
<sup>a</sup>Dieser Meßwert wurde bei den Berechnungen aufgrund von Fittingproblemen ignoriert

$K_{a(2:1)} = 4860 \text{ M}^{-1} \pm 22 \%$

Graphische Darstellung der Titrationskurve:



Job-Plot abgeleitet aus den Titrationsdaten:



### Titration von Cytochrom c gegen Tetrakis[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzylaminopropyl]-1,4-diaminobutan Octalithiumsalz

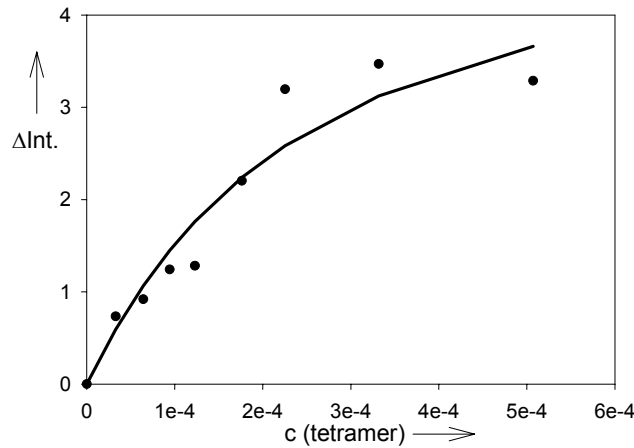
$$c_{\text{cytc}} = 7.36 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}, c_{\text{tetramer}} = 1.35 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$$

Zugabe Tetramer	Gesamtvolumen	$c_{\text{cytc}}$	$c_{\text{tetramer}}$	Verhältnis $c_{\text{tetramer}}/c_{\text{cytc}}$	Fluoreszenz Emission	Emissions- differenz
$\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$	$10^{-5} \text{ mol/l}$	$10^{-5} \text{ mol/l}$			
0	400	7.36	0	-	169.415	0.000
10	410	7.36	3.30	0.45	170.149	0.734
20	420	7.36	6.44	0.87	170.335	0.920
30	430	7.36	9.44	1.28	170.658	1.243
40	440	7.36	12.29	1.67	170.697	1.282
60	460	7.36	17.64	2.40	171.618	2.203
80	480	7.36	22.54	3.06	172.611	3.196
130	530	7.36	33.17	4.51	172.884	3.469
240	640	7.36	50.71	6.89	172.703	3.288

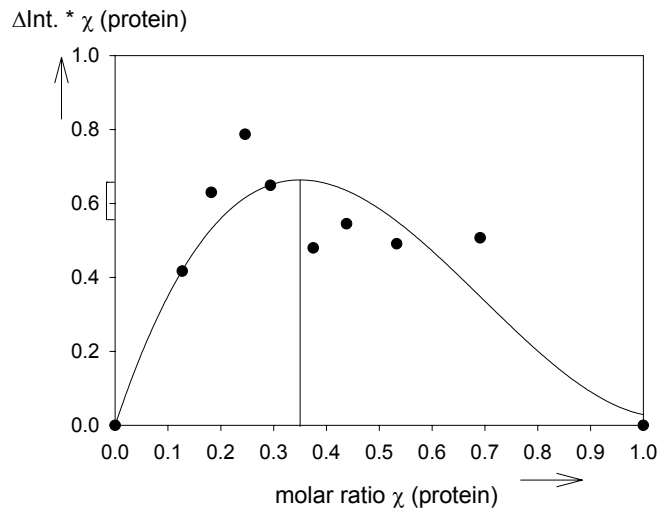
$$K_{a(2:1)} = 2100 \text{ M}^{-1} \pm 46 \%$$



Graphische Darstellung der Titrationskurve:



Job-Plot abgeleitet aus den Titrationsdaten:



**Titration von Histon H1 gegen Tetrakis[3,5-Bis(methoxyphosphonylmethyl)benzylaminopropyl]-1,4-diaminobutan Octalithiumsalz**

$c_{\text{Histon H1}} = 3.39 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ ,  $c_{\text{tetramer}} = 1.92 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$

Zugabe Tetramer $\mu\text{L}$	Gesamtvolumen $\mu\text{L}$	$c_{\text{Histon H1}}$ $10^{-5} \text{ mol/l}$	$c_{\text{tetramer}}$ $10^{-5} \text{ mol/l}$	Verhältnis $c_{\text{tetramer}}/c_{\text{Histon H1}}$	Fluoreszenz Emission	Emissionsdifferenz
0	700	3.39	0	-	284.342	0
10	710	3.39	1.45	0.43	285.233	0.891
20	720	3.39	2.86	0.84	285.951	1.609
30	730	3.39	4.23	1.25	287.394	3.052
40	740	3.39	5.57	1.64	287.858	3.516
50	750	3.39	6.86	2.03	291.490	7.148
70	770	3.39	9.36	2.76	291.969	7.627
90	790	3.39	11.72	3.46	294.731	10.389
120	820	3.39	15.07	4.45	295.848	11.506
150	850	3.39	18.17	5.36	296.016	11.674
200	900	3.39	22.88	6.75	300.813	16.471
300	1000	3.39	30.89	9.12	302.097	17.755

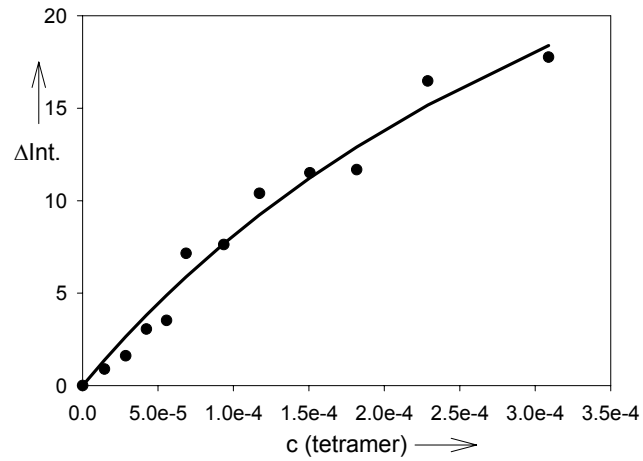
## Experimenteller Teil

---

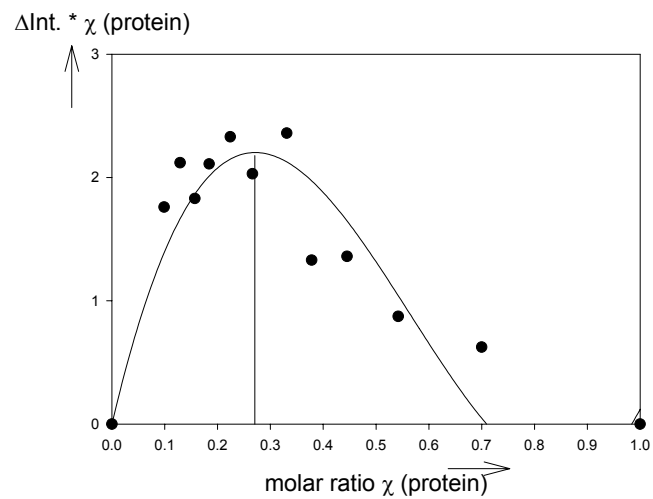
$$K_{a(2:1)} = 1100 \text{ M}^{-1} \pm 35 \%$$

$$K_{a(3:1)} = 720 \text{ M}^{-1} \pm 35 \%$$

Graphische Darstellung der Titrationskurve:



Job-Plot abgeleitet aus den Titrationsdaten:



**Abkürzungsverzeichnis**

ACN	Acetonitril
AIBN	Azobisisobutyronitril
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
Cyt c	Cytochrom c
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin, Hünig-Base
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSTE	doppelt stimuliertes Spinecho
FID	„free induction decay“ freier Induktionsabfall
HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HOAT	1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol
HOBT	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
LED	longitudinaler Wirbelstromdelay („eddy current delay“)
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
PPI	Polypropylenimin
PFG	Pulsfeldgradient
PAMAM	Polyamidoamin
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
STE	stimuliertes Spinecho
T3P	Tripropylphosphonsäureanhydrid
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran

## 7. Literatur

- [1] S. W. Fox, P. R. Bahn, K. Dose, K. Harada, L. Hsu, Y. Ishima, J. Jungck, J. Kendrick, G. Krampitz, J. C. Lacey, K. Matsuno, P. Melius, M. Middlebrook, T. Nakashima, A. Pappelis, A. Pol, D. L. Rohlfing, A. Vegotsky, T. V. Waehneltd, H. Wax, B. Yu, *J. Biol. Phys.* **1994**, *20*, 17.
- [2] P. R. Bahn, S. W. Fox, *Chemtech* **1996**, *26*, 26.
- [3] A. Pappelis, S. W. Fox, *J. Biol. Phys.* **1994**, *20*, 129.
- [4] P. Saalik, A. Elmquist, M. Hansen, K. Padari, K. Saar, K. Viht, V. Langel, M. Pooga, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1246.
- [5] P. Lundberg, U. Langel, *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 227.
- [6] R. Trehin, H. P. Merkle, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 209.
- [7] M. Lindgren, M. Hallbrink, A. Prochiantz, U. Langel, *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 99.
- [8] G. P. H. Dietz, M. Bahr, *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, *27*, 85.
- [9] D. He, H. Yang, Q. Lin, H. Huang, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 192.
- [10] P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 13003.
- [11] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1998**, *37*, 2755.
- [12] K. A. Connors, *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley, New York, **1987**.
- [13] G. M. Whitesides, S. Takayama, E. Holmlin, J. H. Rao, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1999**, *217*, U223.
- [14] J. H. Rao, J. Lahiri, R. M. Weis, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2698.
- [15] J. H. Rao, J. Lahiri, L. Isaacs, R. M. Weis, G. M. Whitesides, *Science* **1998**, *280*, 708.
- [16] M. Kapoor, C. J. Thomas, K. Bachhawat-Sikder, S. Sharma, A. Surolia, in *Recognition of Carbohydrates in Biological Systems Pt A: General Procedures*, Vol. 362, **2003**, pp. 312.
- [17] H. J. Gabius, K. Kayser, S. Gabius, *Naturwissenschaften* **1995**, *82*, 533.
- [18] M. Bienz, F. Hamada, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 528.
- [19] M. C. Siebers, P. J. ter Brugge, X. F. Walboomers, J. A. Jansen, *Biomaterials* **2005**, *26*, 137.
- [20] P. J. Beltran, J. L. Bixby, *Front. Biosci.* **2003**, *8*, D87.
- [21] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531.
- [22] J. Liu, J. D. Farmer, W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, S. L. Schreiber, *Cell* **1991**, *66*, 807.
- [23] J. Regan, D. McGarry, J. Bruno, D. Green, J. Newman, C. Y. Hsu, J. Kline, J. Barton, J. Travis, Y. M. Choi, F. Volz, H. Pauls, R. Harrison, A. Zilberstein, S. A. BenSasson, M. Chang, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3408.
- [24] Y. Hamuro, M. C. Calama, H. S. Park, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1997**, *36*, 2680.
- [25] M. Mourez, R. S. Kane, J. Mogridge, S. Metallo, P. Deschatelets, B. R. Sellman, G. M. Whitesides, R. J. Collier, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 958.
- [26] M. B. Zwick, J. Q. Shen, J. Scott, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 427.
- [27] R. C. Hockney, *Trends Biotechnol.* **1994**, *12*, 456.
- [28] M. T. W. Hearn, D. Acosta, *J. Mol. Recognit.* **2001**, *14*, 323.
- [29] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, D. Stuber, *Biotechn.* **1988**, *6*, 1321.

- [30] M. C. Smith, T. C. Furman, T. D. Ingolia, C. Pidgeon, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 7211.
- [31] H. M. Chao, D. L. Bautista, J. Litowski, R. T. Irvin, R. S. Hodges, *J. Chromatogr. B* **1998**, *715*, 307.
- [32] P. Lindner, B. Guth, C. Wuelfing, C. Krebber, B. Steipe, F. Mueller, A. Plünckthun, *Methods* **1992**, *4*, 41.
- [33] V. V. Kronina, H. J. Wirth, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr. A* **1999**, *852*, 261.
- [34] A. Goel, D. Colcher, J. S. Koo, B. J. M. Booth, G. Pavlinkova, S. K. Batra, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **2000**, *1523*, 13.
- [35] A. D. Sharrocks, *Gene* **1994**, *138*, 105.
- [36] H. M. Sassenfeld, *Trends Biotechnol.* **1990**, *8*, 88.
- [37] T. P. Hopp, K. S. Prickett, V. L. Price, R. L. Libby, C. J. March, D. P. Cerreti, D. L. Urdal, P. J. Conlon, *Biotechn.* **1988**, *6*, 1204.
- [38] K. Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60*, 523.
- [39] E. R. Lavallie, J. M. McCoy, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, *6*, 501.
- [40] T. G. M. Schmidt, A. Skerra, *J. Chromatogr. A* **1994**, *676*, 337.
- [41] T. G. M. Schmidt, J. Koepke, R. Frank, A. Skerra, *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 753.
- [42] H. M. Sassenfeld, S. J. Brewer, **1984**, *2*, 76.
- [43] S. J. Brewer, B. L. Haymore, T. P. Hopp, H. M. Sassenfeld, in *Purification and Analysis of Recombinant Proteins* (Eds.: R. Seetharam, S. K. Sharma), New York, **1991**, pp. 239.
- [44] J. C. Smith, R. B. Derbyshire, E. Cook, L. Dunthorne, J. Viney, S. J. Brewer, H. M. Sassenfeld, L. D. Bell, *Gene* **1984**, *32*, 321.
- [45] C. F. Ford, I. Suominen, C. E. Glatz, *Protein Expr. Purif.* **1991**, *2*, 95.
- [46] M. Arendt, Diplomarbeit thesis, Heinrich-Heine Universität (Düsseldorf), **2000**.
- [47] B. M. Nakhle, S. A. Trammell, K. M. Sigel, T. J. Meyer, B. W. Erickson, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2835.
- [48] S. Rensing, M. Arendt, A. Springer, T. Grawe, T. Schrader, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5814.
- [49] E. Diez-Barra, J. C. Garcia-Martinez, S. Merino, R. del Rey, J. Rodriguez-Lopez, P. Sanchez-Verdu, J. Tejada, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5664.
- [50] G. Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, 4 ed., Wiley-VCH, **1997**.
- [51] H. Brockman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 438.
- [52] K. Ariga, T. Kunitake, *Accounts Chem. Res.* **1998**, *31*, 371.
- [53] O. Molt, Doktorarbeit thesis, Philipps-Universität (Marburg), **2003**.
- [54] J. S. Wang, D. Greszta, K. Matyjaszewski, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1995**, *210*, 227.
- [55] D. M. Haddleton, A. J. Clark, M. C. Crossman, D. J. Duncalf, A. M. Heming, S. R. Morsley, A. J. Shooter, *Chem. Commun.* **1997**, 1173.
- [56] C. L. McCormick, A. B. Lowe, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2002**, *224*, U476.
- [57] R. T. A. Mayadunne, E. Rizzardo, J. Chiefari, Y. K. Chong, G. Moad, S. H. Thang, *Macromolecules* **1999**, *32*, 6977.
- [58] G. Schmidt-Naake, M. Drache, C. Taube, *Angew. Makromol. Chem.* **1999**, *265*, 62.
- [59] C. Renner, Diplomarbeit thesis, Heinrich-Heine Universität (Düsseldorf), **2002**.
- [60] C. Renner, Doktorarbeit thesis, Philipps-Universität (Marburg), **in Arbeit**.
- [61] G. Byk, M. Frederic, D. Scherman, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3219.
- [62] Novabiochem, *Solid Phase Peptide Synthesis Catalogue*, **2003/2004**.
- [63] L. H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Rein, M. Schweitzer, N. Windhab, G. von Kiedrowski, *Nature* **2002**, *420*, 286.
- [64] S. Gomez, J. A. Peters, T. Maschmeyer, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 1037.
- [65] I. Linzaga, J. Escalante, M. Munoz, E. Juaristi, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8973.

- [66] J. Habermann, S. V. Ley, J. S. Scott, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. I* **1998**, 3127.
- [67] S. V. Ley, M. H. Bolli, B. Hinzen, A. G. Gervois, B. J. Hall, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. I* **1998**, 2239.
- [68] E. M. M. Brabander-van den Berg, E. W. Meijer, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1370.
- [69] D. Farin, D. Avnir, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1379.
- [70] U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43.
- [71] A. Nourse, D. B. Millar, A. P. Minton, *Biopolymers* **2000**, *53*, 316.
- [72] I. Lee, B. D. Athey, A. W. Wetzel, W. Meixner, J. R. Baker, *Macromolecules* **2002**, *35*, 4510.
- [73] W. Chen, D. A. Tomalia, J. L. Thomas, *Macromolecules* **2000**, *33*, 9169.
- [74] I. B. Rietveld, W. G. Bouwman, M. Baars, R. K. Heenan, *Macromolecules* **2001**, *34*, 8380.
- [75] I. B. Rietveld, D. Bedeaux, *Macromolecules* **2000**, *33*, 7912.
- [76] C. S. Johnson, *Prog. Nuc. Magn. Res. Spec.* **1999**, *34*, 203.
- [77] E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1950**, *77*, 297.
- [78] E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 580.
- [79] E. O. Stejskal, J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 288.
- [80] W. S. Price, *Con. Magn. Res.* **1997**, *9*, 299.
- [81] T. D. W. Claridge, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Vol. 19*, Pergamon, Oxford, **1999**.
- [82] W. S. Price, *Con. Magn. Res.* **1998**, *10*, 197.
- [83] W. S. Price, P. W. Kuchel, *J. Magn. Reson.* **1991**, *94*, 133.
- [84] S. J. Gibbs, K. F. Morris, C. S. Johnson, *J. Magn. Reson.* **1991**, *94*, 165.
- [85] P. Mansfield, B. Chapman, *J. Magn. Reson.* **1986**, *66*, 573.
- [86] S. J. Gibbs, C. S. Johnson, *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 395.
- [87] A. Jerschow, N. Muller, *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 372.
- [88] A. Jerschow, N. Muller, *Macromolecules* **1998**, *31*, 6573.
- [89] J. A. Jones, D. K. Wilkins, L. J. Smith, C. M. Dobson, *J. Biomol. NMR* **1997**, *10*, 199.
- [90] W. S. Price, F. Tsuchiya, Y. Arata, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11503.
- [91] T. S. Derrick, E. F. McCord, C. K. Larive, *J. Magn. Res.* **2002**, *155*, 217.
- [92] M. L. Liu, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *Anal. Commun.* **1997**, *34*, 225.
- [93] L. H. Lucas, C. K. Larive, *Con. Magn. Reson.* **2004**, *20A*, 24.
- [94] R. K. Jain, A. D. Hamilton, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1721.
- [95] L. Hoang, S. Bedard, M. M. G. Krishna, Y. Lin, S. W. Englander, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12173.
- [96] V. Militello, M. Leone, A. Cupane, R. Santucci, A. Desideri, *Biophys. Chem.* **2002**, *97*, 121.
- [97] P. Job, *Compt. Rend.* **1925**, *180*, 928.
- [98] P. Nicholls, E. Mochan, *Biochem. J.* **1971**, *121*, 55.
- [99] R. Finking, M. A. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453.
- [100] U. Linne, M. A. Marahiel, in *Protein Engineering, Vol. 388*, **2004**, pp. 293.
- [101] Q. Lin, H. S. Park, Y. Hamuro, C. S. Lee, A. D. Hamilton, *Biopolymers* **1998**, *47*, 285.
- [102] M. Engel, C. W. Burris, C. A. Slate, B. W. Erickson, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 8761.
- [103] A. Belaïssaoui, S. Shimada, A. Ohishi, N. Tamaoki, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2307.
- [104] M. J. Plater, T. Jackson, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4673.
- [105] T. M. Tarasow, S. L. Tarasow, C. Tu, E. Kellogg, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3614.
- [106] A. Madder, N. Farcy, N. G. C. Hosten, H. De Muynck, P. J. De Clercq, J. Barry, A. P. Davis, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2787.

- [107] P. A. Wender, T. C. Jessop, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, C. L. VanDeusen, *Org. Lett.* **2001**, 3, 3229.
- [108] D. K. Wilkins, S. B. Grimshaw, V. Receveur, C. M. Dobson, J. A. Jones, L. J. Smith, *Biochem.* **1999**, 38, 16424.

Ich versichere, daß meine Dissertation

**Dendrimere Bisphosphonatrezeptoren  
zur molekularen Erkennung basischer  
Proteinoberflächen**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quelle und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort, Datum)

---

(Markus Arendt)