

Untersuchungen zur Selbstassemblierung zyklischer Dipeptide

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Alexander Jan Kleinsmann
aus Homberg

Tübingen
2018

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

25.10.2018

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Boris J. Nachtsheim

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thomas Ziegler

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Eberhard Karls Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Boris Nachtsheim in der Zeit von November 2011 bis Oktober 2015 durchgeführt.

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, **PROF. DR. BORIS J. NACHTSHEIM**, für die Möglichkeit meine Promotion in seinem Arbeitskreis in einem äußerst spannenden Forschungsbereich durchzuführen. Ich danke ihm für die mir gewährten Freiheiten und das Vertrauen in meine Forschungsarbeit. Darüber hinaus danke ich ihm für die Förderung meiner Stärken und seine stets offene Tür und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Thomas Ziegler danke ich für die Übernahme der Zweitbetreuung meiner Doktorarbeit und den konstruktiven Austausch in diesem Rahmen.

Herrn Dr. Christian Hempel danke ich aufrichtig für die moralische und fachliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit, die ausführliche Korrektur der vorliegenden Dissertation sowie seine Unterstützung in allen anderen Lebenslagen.

Ferner danke ich folgenden Personen, ohne deren Hilfe die Durchführung meiner Forschung nicht möglich gewesen wäre:

- Prof. Dr. Rolf Daniels für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis rheologische Untersuchungen durchzuführen und für seine freundliche Unterstützung in den theoretischen Grundlagen der Rheologie.
- Frau Elke Nadler für die Aufnahme der REM- und TEM-Aufnahmen der Xerogele und ihre Begeisterungsfähigkeit für meine Projekte. Weiterhin danke ich ihr für ihre Ausdauer und die anregenden Diskussionen während der langen Zeit vor dem Elektronenmikroskop.
- Herrn Dr. Markus Kramer für die hilfreiche Unterstützung in allen NMR-relevanten Fragen und seine stets positive und engagierte Herangehensweise.
- Herrn Dr. Klaus Eichele und Frau Kristina Strohmaier für die Durchführung der ³¹P-NMR-Messungen, deren Auswertung und Interpretation.

Ich danke auch den ehemaligen Doktoranden der Arbeitsgruppe Nachtsheim die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben, Peter Finkbeiner, Ulrich Klöckner, Lucien Caspers, Stefan Riedmüller, Nicole Weckenmann und Xu Wei für die gute Atmosphäre im Labor und den Ansporn in unseren Seminaren.

Publikationen

Folgende wissenschaftliche Publikationen sind aus dieser Doktorarbeit hervorgegangen:

Publikationen in Fachzeitschriften

Phosphate-Triggered Self-Assembly of N-[(Uracil-5-yl)methyl]urea: A Minimalistic Urea-Derived Hydrogelator

A. J. Kleinsmann, N. M. Weckenmann, B. J. Nachtsheim, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9753-9761.

Phenylalanine-Containing Cyclic Dipeptides – The Lowest Molecular Weight Hydrogelators Based on Unmodified Proteinogenic Amino Acids

A. J. Kleinsmann, B. J. Nachtsheim, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7818-7820.

Posterbeiträge und Fachvorträge

Minimalistic and Versatile Peptide- and Uracil-based Hydrogelators

A. J. Kleinsmann, B. J. Nachtsheim, 19. Vortragstagung der GdCH-Fachgruppe Liebig-Vereinigung für Organische Chemie (ORCHEM) Weimar, September 2014 (Poster).

Minimalistic and Versatile Peptide- and Uracil-based Hydrogelators

A. J. Kleinsmann, B. J. Nachtsheim, Münster Symposium on Cooperative Effects in Chemistry, Mai 2014 (Poster).

Untersuchungen zur Selbstassemblierung Cyclischer Dipeptide – Die Niedermolekularsten Peptidischen Hydrogelatoren

A. J. Kleinsmann, B. J. Nachtsheim, Hochschule trifft Industrie (HTI) Schloß Beuggen bei Basel, September 2013 (Vortrag).

Towards the Self-Assembly of Cyclic Dipeptides – The Lowest Molecular Weight Hydrogelators Based on Unmodified Proteinogenic Amino Acids

A. J. Kleinsmann, B. J. Nachtsheim, GdCH Wissenschaftsforum CHEMIE Darmstadt, September 2013 (Poster).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Peptide in der chemischen Biogenese	1
1.1.1	Die Entstehung der ersten Peptide.....	1
1.1.2	Selbstassemblierende Peptide	3
1.1.3	Die Amyloid-Welt-Theorie	4
1.2	Supramolekulare Gele.....	9
1.2.1	Aufbau supramolekularer Gele.....	10
1.2.2	Supramolekulare Hydrogele.....	11
1.3	Supramolekulare Katalyse an Peptid-Nanofasern	18
1.3.1	Katalytische Nanofasern	18
1.4	Rheologie supramolekularer Gele	25
1.4.1	Zeitsweep-Experimente	26
1.4.2	Frequenzsweep-Experimente	27
1.4.3	Amplitudensweep-Experimente.....	28
1.4.4	Regenerationsexperimente	29
2	Aufgabenstellung.....	30
3	Allgemeiner Teil.....	32
3.1	DKP-Hydrogele	32
3.1.1	Synthese der DKPs.....	32
3.1.2	Hydrogelbildung	36
3.1.3	Morphologie der Xerogele	40
3.1.4	Viskoelastische Eigenschaften.....	42
3.1.5	Coassemblierte DKP-Hydrogele	50
3.1.6	Schlussfolgerung.....	55
3.2	Enzymmimetische coassemblierte DKP-Hydrogele.....	56
3.2.1	Einführung.....	56
3.2.2	ANBS-Hydrolyse	58
3.2.3	Coassemblierung auf Basis von π - π -Wechselwirkungen	59
3.2.4	Coassemblierung auf Basis von CH- π -Wechselwirkungen	64
3.2.5	Vergleich der Katalyse in Lösung und Hydrogel.....	68
3.2.6	Katalytische Effizienz der Hydrogele	72
3.2.7	Zweidimensionale NMR-Experimente	75
3.2.8	Schlussfolgerung.....	80
3.3	UMH-Hydrogele	82
3.3.1	Einführung.....	82

3.3.2	Synthese von UMH	82
3.3.3	Hydrogelbildung	82
3.3.4	Morphologie der Xerogele	85
3.3.5	NMR-Experimente.....	86
3.3.6	IR-Spektroskopie.....	89
3.3.7	UV/Vis-Spektroskopie	91
3.3.8	Rheologische Untersuchungen	93
3.3.9	Einfluss des pH-Wertes.....	95
3.3.10	Schlussfolgerung.....	96
4	Zusammenfassung / Summary.....	97
4.1	Zusammenfassung.....	97
4.2	Summary.....	101
5	Experimenteller Teil.....	105
5.1	Allgemeiner Teil.....	105
5.1.1	Allgemeine Arbeitstechniken	105
5.1.2	Analytische Methoden	105
5.1.3	Verzögerte Wirkstofffreisetzung.....	109
5.1.4	Kinetische Untersuchungen mittels ANBS-Hydrolyse.....	109
5.1.5	SPPS-Synthese der DKPs	110
5.1.6	Entschützungsverfahren für PMB-Schutzgruppen	112
5.2	Synthesen	113
5.2.1	Cyclo[L-Phe-Gly] (1)	113
5.2.2	Cyclo[L-Phe-L-Ser(Bzl)] (2a).....	113
5.2.3	Cyclo[L-Phe-L-Ser] (2)	114
5.2.4	Cyclo[L-Phe-L-Cys(PMB)] (3a).....	114
5.2.5	Cyclo[L-Phe-L-Cys] (3).....	115
5.2.6	Cyclo[L-Phe-L-Glu(OBzl)] (4a)	115
5.2.7	Cyclo[L-Phe-L-Glu] (4)	116
5.2.8	Cyclo[L-Phe-L-His] (5).....	116
5.2.9	Cyclo[L-Phe-L-Lys] (6)	117
5.2.10	Cyclo[L-Phe-L-Asp(OBzl)] (7a).....	118
5.2.11	Cyclo[L-Phe-L-Asp] (7).....	118
5.2.12	Cyclo[L-Phe-L-Ala] (8).....	119
5.2.13	Cyclo[L-Phe-L-Val] (9).....	119
5.2.14	Cyclo[L-Phe-L-Tyr(Bzl)] (10a)	120
5.2.15	Cyclo[L-Phe-L-Tyr] (10).....	121
5.2.16	Cyclo[L-Phe-L-Phe] (11)	121

5.2.17	Cyclo[D-Phe-L-His] (12).....	122
5.2.18	Cyclo[L-Phe-D-His] (13).....	122
5.2.19	Cyclo[D-Phe-D-His] (14).....	123
5.2.20	Cyclo[L-Leu-L-Cys(PMB)] (15a).....	123
5.2.21	Cyclo[L-Leu-L-Cys] (15).....	124
5.2.22	Cyclo[L-Val-L-Cys(PMB)] (16a).....	124
5.2.23	Cyclo[L-Val-L-Cys] (16).....	125
5.2.24	Cyclo[L-Val-L-Glu(OBzl)] (17a).....	125
5.2.25	Cyclo[L-Val-L-Glu] (17).....	126
5.2.26	Cyclo[L-Val-L-His(Trt)] (18a).....	126
5.2.27	Cyclo[L-Val-L-His] (18).....	126
5.2.28	Cyclo[Gly-L-Glu(OBzl)] (19a).....	127
5.2.29	Cyclo[Gly-L-Glu] (19).....	128
5.2.30	Cyclo[Gly-L-His(Trt)] (20a).....	128
5.2.31	Cyclo[Gly-L-His] (20).....	128
5.2.32	Cyclo[Gly-L-Cys(PMB)] (21a).....	129
5.2.33	Cyclo[Gly-L-Cys] (21).....	130
5.2.34	Cyclo[Gly-L-Trp] (22).....	130
5.2.35	Cyclo[L-Tyr(Bzl)-L-Tyr(Bzl)] (23a).....	130
5.2.36	Cyclo[L-Tyr-L-Tyr] (23).....	131
5.2.37	Cyclo[L-His(Trt)-L-His(Trt)] (24a).....	131
5.2.38	Cyclo[L-His-L-His] (24).....	132
5.2.39	Cyclo[L-Asp(OBzl)-L-Asp(OBzl)] (25a).....	132
5.2.40	Cyclo[L-Asp-L-Asp] (25).....	133
5.2.41	H-His(Trt)-OH (26).....	133
5.2.42	Boc-His(Trt)-OH (27).....	134
5.2.43	Boc-His(Boc)-OH (28).....	134
5.2.44	Boc-D-His(Boc)-OH (29).....	135
5.2.45	Boc-Lys(Boc)-OH (30).....	136
5.2.46	Boc-D-Phe-OH (31).....	137
5.2.47	Natrium-4-hydroxy-3-nitrobenzensulfonat (HNBS) (32).....	137
5.2.48	Natrium-4-acetoxy-3-nitrobenzensulfonat (ANBS) (33).....	138
5.2.49	5-(Hydroxymethyl)-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-pyrimidindion (34).....	138
5.2.50	<i>N</i> -[(Uracil-5-yl)methyl]harnstoff (UMH) (35).....	139
6	Anhang.....	140
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	140
6.2	Ein- und Dreibuchstabencodes der Aminosäuren.....	143

6.3	Zusätzliche Daten aus Kapitel 3.2	144
6.3.1	Faserdurchmesser der Xerogele	144
6.3.2	Extinktionskoeffizienten von HNBS	146
6.3.3	Lineweaver-Burk-Plots	147
6.3.4	HR-MAS-NOESY NMR-Spektren mit Vorzeichen	149
6.4	Zusätzliche Daten aus Kapitel 3.3	151
6.4.1	Amplitudensweep-Experimente	151
6.4.2	Temperatursweep-Experimente	153
6.4.3	Regenerations-Experimente	155
6.4.4	Frequenzsweep-Experimente	155
6.4.5	FTIR-Spektrum	156
6.4.6	REM-Aufnahmen	156
6.5	Literaturverzeichnis	158

1 Einleitung

1.1 Peptide in der chemischen Biogenese

1.1.1 Die Entstehung der ersten Peptide

Das erste Leben auf unserem Planeten entstand vor 3,5 - 3,8 Mrd. Jahren in Form von einzelligen Organismen mit einem minimalistischen Geno- und Phänotyp.^[1-8] Die anschließende „biologische“ Evolution nach Darwin führte darauf basierend zu den vielfältigen Lebensformen, wie wir sie heute beobachten können. Im Gegensatz zu der biologischen Evolution zellulärer Organismen, ist die vorhergehende „chemische“ Evolution, also die Entwicklung der ersten selbstreplizierenden chemischen Systeme zu diesen ersten Einzellern, deutlich weniger untersucht worden. Aktuelle Forschungen zu dem Ursprung des Lebens lassen also signifikante Lücken in unserem Verständnis über die Mechanismen erkennen, welche es einfachen chemischen Vorläufern erlaubt haben, sich zu komplexen Polymeren zu verbinden um Leben zu ermöglichen. Als gesichert gilt, dass sich in der Zeit der präbiotischen Welt vor mehr als 4 Mrd. Jahren, erste organische Moleküle wie etwa Aminosäuren, Zucker, Nucleobasen und auf diesen Molekülen basierende einfache Biopolymere wie kurze Peptide und RNA gebildet haben (*Abbildung 1*).^[9-35]

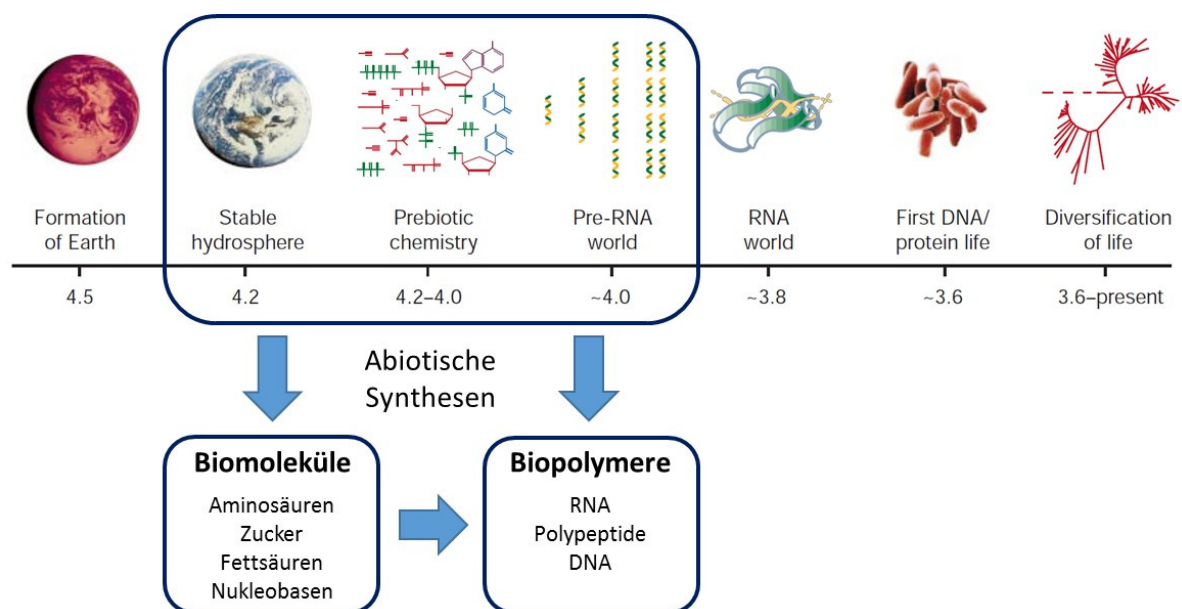


Abbildung 1: Zeitstrahl von der Entstehung der Erde bis zu der Entwicklung des ersten Lebens mit entscheidenden Ereignissen schematisch dargestellt.^[29] Abbildung des Zeitstrahls: Reprinted with permission from Springer Nature, *Nature The antiquity of RNA-based evolution*, Gerald F. Joyce, Copyright 2002.

Einige dieser Polymere haben die Fähigkeit entwickelt, sich selbst zu replizieren. In einer ungeschützten Umgebung unter präbiotischen Bedingungen wäre allerdings jedes dieser Polymere der Zersetzung unterlegen.^[29, 36-37] Es muss sich also ein komplexer chemischer

Mechanismus entwickelt haben, der eine ausreichende Replikationsrate eines bestimmten Biopolymers ermöglicht hat. Diese Replikation muss weiterhin in einem System stattgefunden haben, das die Polymere vor äußeren Einwirkungen wie etwa UV-Strahlung geschützt hat, ohne diese vollständig zu isolieren. In Übereinstimmung mit der „Protein-Welt-Theorie“ konnten verschiedene mögliche Mechanismen für die Bildung von Aminosäuren unter der Bedingungen der urzeitlichen Erde nachgewiesen werden.^[9-13, 31, 38] So wurden z. B. im *Miller-Urey-Experiment* die Bestandteile einer hypothetischen frühen Erdatmosphäre wie Wasser, Methan, Ammoniak und Wasserstoff einer elektrischen Entladung ausgesetzt und aus der entstandenen Reaktionsmischung einfache Aminosäuren isoliert (*Abbildung 2*).

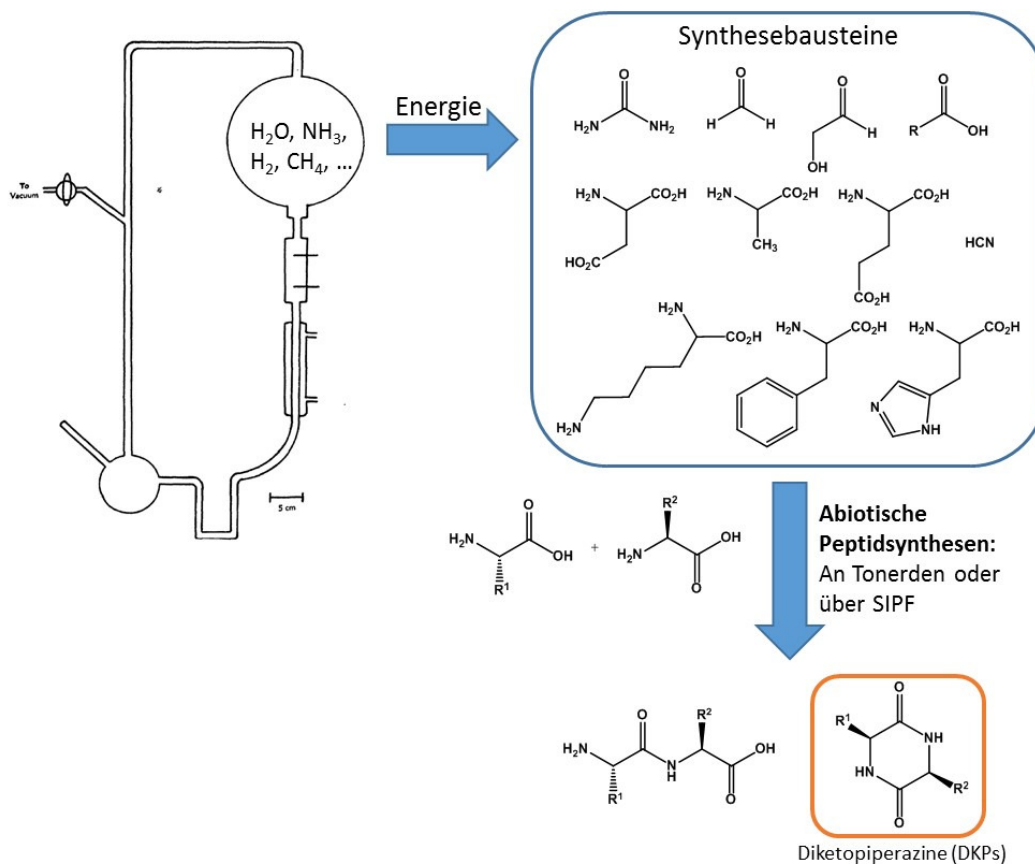


Abbildung 2: Eine mögliche Syntheseroute zu den ersten offenkettigen Dipeptiden und Diketopiperazinen unter präbiotischen Bedingungen.^[9] Abbildung der Apparatur (links): From S. L. Miller, *Science* **1953**, *117*, 528-529. Reprinted with permission from AAAS.

Die Bildung kurzer Peptide aus den vorhandenen Monomeren in der Ursuppe konnte durch die Salz-induzierte Peptidbildung („salt induced peptide formation“ - SIPF) oder die Kondensation von Aminosäuren an Tonerde überzeugend nachempfunden werden.^[19-24] Neben den kurzen, offenkettigen Peptiden konnte auch die Bildung zyklischer Dipeptide (Diketopiperazine - DKPs) in den Experimenten unter präbiotischen Bedingungen beobachtet werden.^[39-43] DKPs zeigen grundsätzlich eine starke Tendenz zur Selbstassemblierung und damit zur Ausbildung von supramolekularen Strukturen.^[44-45]

1.1.2 Selbstassemblierende Peptide

Supramolekulare Strukturen aus einfachen Peptiden waren vermutlich von zentraler Bedeutung für die Entstehung von sich selbst-replizierenden Systemen auf der präbiotischen Erde. Die Selbstassemblierung von kurzen Peptiden zu Amyloiden und anderen Strukturen ist ein intensiv untersuchtes Phänomen und wurde in einer Vielzahl von verschiedenen Milieus, auch unter präbiotischen Bedingungen, beobachtet.^[46-60] Interessanterweise wurden selbstassemblierende Peptide in Synthesen unter diesen Bedingungen in höheren Ausbeuten erhalten, als solche Peptide, die nicht zur Selbstassemblierung neigen.^[58, 61-62] Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung ist die hohe Triebkraft der entsprechenden Monomere miteinander zu interagieren. Auf diese Weise entstehen supramolekulare Komplexe, welche deren Polymerisation kinetisch und thermodynamisch bevorzugen. Die Entstehung von Peptiden, welche in der Lage sind zu hochgeordneten verkapselten Strukturen zu assemblieren, war daher unter urzeitlichen Bedingungen sehr wahrscheinlich und vor dem Hintergrund der Entstehung des Lebens besonders faszinierend. Einige dieser Strukturen sind beständig gegenüber extremen Bedingungen, wie hohen Temperaturen, hohem Druck und organischen Lösungsmitteln.^[51, 63] Ein gutes Beispiel hierfür sind Peptid-basierte amyloide Fibrillen.

Amyloide Fibrillen sind hochgeordnete Aggregate, deren Struktur aus sich wiederholenden Einheiten von intermolekularen β -Faltblatt-Strukturen bestehen, welche senkrecht zu der Fibrillenachse verlaufen.^[64] Wenn mehrere Fibrillen zu dickeren Bündeln im Nanometerbereich assemblieren, diese Fasern sich verzweigen, ein stabiles Netzwerk aufspannen und damit das entsprechende Lösungsmittel immobilisieren, spricht man von einem Gel.^[65] Höher geordnete Amyloid- und Hydrogelstrukturen können geschützte Kompartimente bilden (Zellularität) und eine Anreicherung von monomeren oder oligomeren Biomolekülen ermöglichen (Membranfunktion).^[5, 66] Die meisten Amyloid-bildenden Motive beinhalten aromatische Reste, welche durch π - π -Wechselwirkungen interagieren.^[47, 49, 51-53, 67] Es wird angenommen, dass die aromatischen Wechselwirkungen einen energetischen Beitrag liefern und ordnende und dirigierende Effekte in der Selbstassemblierung haben. Bemerkenswerte Beispiele für die Selbstassemblierung kleiner Peptide sind die Bildung von Nanoröhren (*Abbildung 3B*) durch Diphenylalanin (Peptid I) und die Bildung geschlossener Käfig-Vesikel (*Abbildung 3C*) durch das Tripeptid Cys-Phe-Phe (Peptid II).^[51-53]

Die aromatischen Wechselwirkungen innerhalb von supramolekularen Peptid-Strukturen sind mit denen zwischen Nukleobasen und RNA-bindenden Proteinen vergleichbar.^[68] Waters *et al.* konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass bereits die Ausbildung einer sehr einfachen Sekundärstruktur bei kleinen Peptiden ausreichend ist, Nukleotide spezifisch in

einer nicht-kovalenten Bindungstasche über aromatische Interkalation zu binden.^[69-70] Interessanterweise sind die supramolekularen sphärischen Aggregate des L,L-Diphenylalanins, im Gegensatz zu nicht-aggregierenden Stereoisomeren oder vergleichbaren Dipeptiden, in der Lage Nukleotide und Dinukleotide zu binden und zu stabilisieren.^[58]

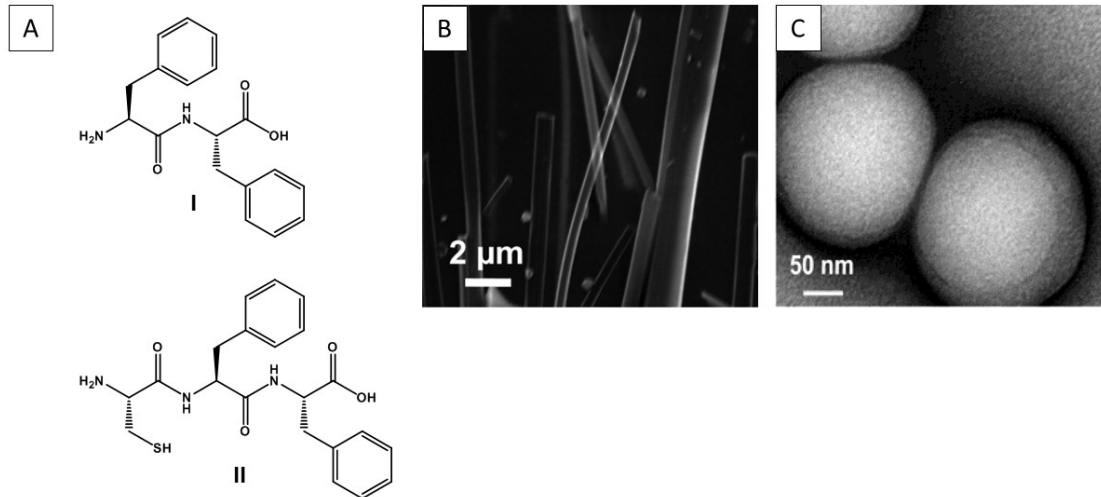


Abbildung 3: (A) Strukturen von Dipeptid Phe-Phe (I) und Tripeptid Cys-Phe-Phe (II); (B) REM-Aufnahmen der Peptid-Nanoröhren gebildet aus dem Dipeptid Phe-Phe (I).^[52] Reproduced from Y. Song, S. R. Challa, C. J. Medforth, Y. Qiu, R. K. Watt, D. Pena, J. E. Miller, F. v. Swol, J. A. Shelnett, *Chem. Commun.* **2004**, 1044-1045 with permission of The Royal Society of Chemistry. (C) TEM-Aufnahmen der Peptid Nanosphären gebildet aus dem Tripeptid Cys-Phe-Phe (II).^[53] Reprinted with permission from M. Reches, E. Gazit, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 581-585. Copyright 2004 American Chemical Society.

Caryn und Gazit konnten zeigen, dass kurze selbstassemblierende Peptide die Bildung definierter verkapselter Räume sowie sequenzspezifische Peptid-RNA-Wechselwirkungen und deren Stabilisierung ermöglichen können. Diese Strukturen können kleine Poren aufweisen die es kleinen Molekülen (z. B. Nukleosiden) erlauben in das Innere zu diffundieren und größere Moleküle (z. B. RNA-Oligomere) zurückzuhalten.^[28, 50, 52, 63, 71-72] Innerhalb solcher zellähnlichen Räume können Nukleotide gebunden werden, die in der geschützten Umgebung polymerisieren.

1.1.3 Die Amyloid-Welt-Theorie

Die bemerkenswerten katalytischen Eigenschaften heutiger Enzyme basieren auf deren Faltung in einzigartige dreidimensionale Strukturen. Die Voraussetzung für eine stabile gefaltete Konformation ist allerdings eine gewisse Mindestgröße (> 10.000 Da).^[73] Ein Protein dieser Größe hat eine enorme Anzahl an möglichen Sequenzen, und es ist daher nicht klar, wie sich in der Natur ausreichend viele Permutationen entwickeln konnten, aus denen sich letztlich eine mit der passenden Faltung und Funktion durchsetzen konnte. Diese Problemstellung hat zu der Vermutung geführt, dass die ersten urzeitlichen Proteine aus kurzen Peptiden aufgebaut waren, welche durch Selbstorganisation β -Faltblatt-basierte Amyloid-Fibrillen angenommen haben („Amyloid-Welt-Theorie“).^[63, 74-75]

Durch die Bildung von amyloiden Fibrillen sind auch sehr kleine Peptide in der Lage, eine hoch geordnete und definierte Konformation anzunehmen, die eine katalytische Aktivität ermöglicht. Korendvych *et al.* haben eine Reihe von 7-mer Peptiden synthetisiert, die in der Lage sind Fibrillen zu bilden und mit Zn^{2+} als Co-Faktor die Hydrolyse eines Acylesters zu katalysieren.^[73] Peptid III (Ac-IHIHQI-CONH₂, *Abbildung 4A*) wurde als das reaktivste Peptid identifiziert und zeigte eine enzymartige Kinetik nach dem Michaelis-Menten-Modell. Die katalytische Aktivität wurde der Nachempfindung der Bindungsstelle der Carboanhydrase (*Abbildung 4B*) durch Bildung einer β -Faltblatt-Struktur und Koordination von Zn^{2+} zugeschrieben (*Abbildung 4C*). Die erhaltenen Fibrillen der kurzen Peptide sind also in der Lage, sowohl ihre eigene Bildung als auch chemische Reaktionen enzymmimetisch zu katalysieren.

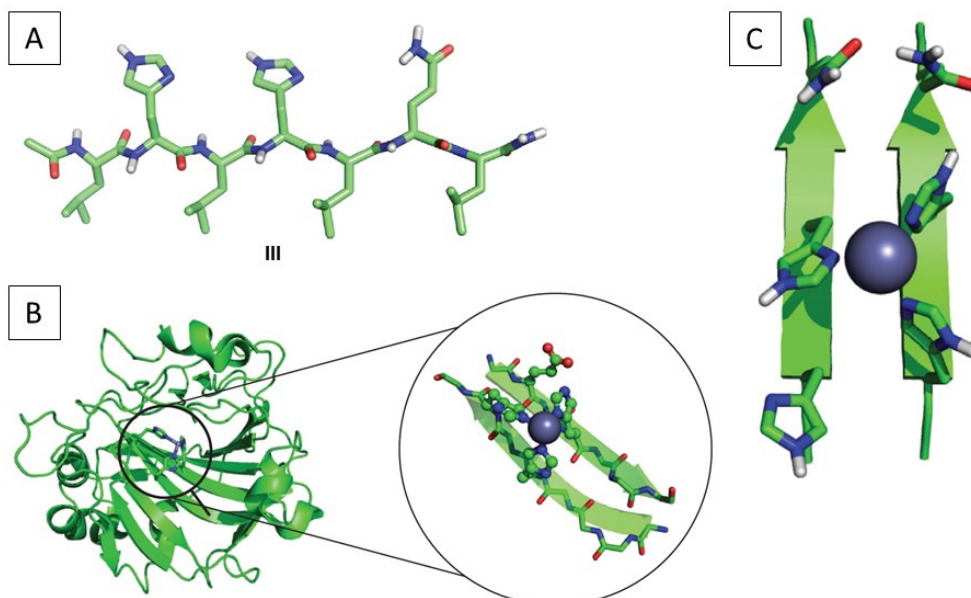


Abbildung 4: (A) Modell von Peptid III (Ac-IHIHQI-CONH₂) in der β -Faltblatt Konfiguration; (B) Struktur der menschlichen Carboanhydrase mit hervorgehobenem Metallbindungsmotiv; (C) Primäre Koordinationssphäre des Zink-Kations.^[73] (A) - (C): Reprinted with permission from Springer Nature, *Nature Chemistry Short peptides self-assemble to produce catalytic amyloids*, C. M. Rufo, Y. S. Moroz, O. V. Moroz, J. Stöhr, T. A. Smith, X. Hu, W. F. DeGrado, I. V. Korendovych, Copyright 2014.

Die Vielseitigkeit und Robustheit dieses supramolekularen Systems konnte in einer weiteren Arbeit der Gruppe von Korendovych bewiesen werden.^[76] Durch die Verwendung von Cu^{2+} anstelle von Zn^{2+} war das gleiche Peptid in der Lage, Metall-koordinierende β -Faltblätter zu bilden, welche die Oxidation von Dimethoxyphenol (DMP) durch die Aktivierung von Sauerstoff katalysieren (*Abbildung 5*).

Die Verbindung zwischen kurzen selbstassemblierten Peptiden und der Entstehung der katalytischen Aktivität in der Evolution der ersten Enzyme wird mit diesen Arbeiten deutlich. Die Beobachtung, dass amyloide Strukturen aus kurzen Peptiden in der Lage sind verschiedene chemische Reaktionen zu katalysieren, stützt die „Amyloid-Welt-Theorie“.

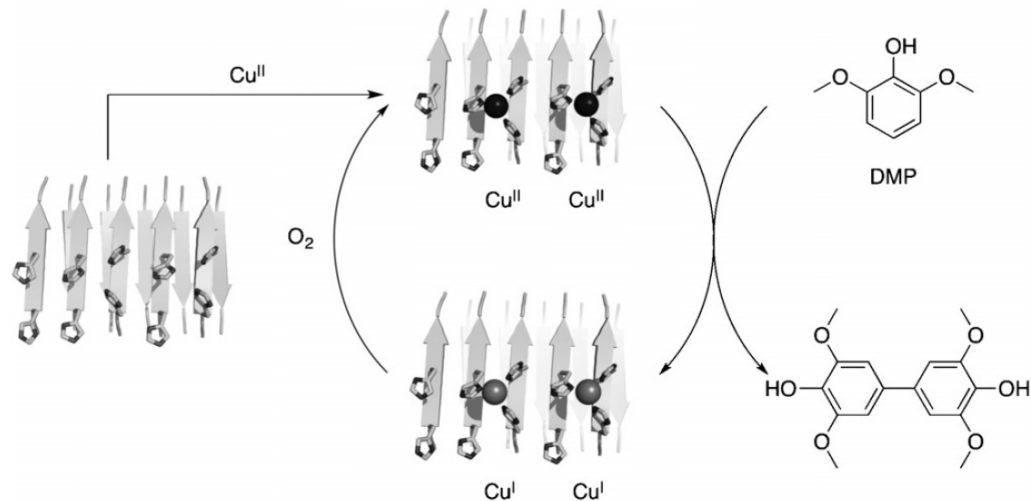


Abbildung 5: Kupfer(II)-vermittelte Oxidation von Dimethoxyphenol (DMP) durch Luftsauerstoff an der β -Faltblattstruktur von Peptid III.^[76] Reprinted with permission from O. V. Makhlynets, P. M. Gosavi, I. V. Korendovych, *Angew. Chem. Int. Ed.* (1999 -) **2016**, *55*, 9017-9020. Copyright 2016 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Basierend auf den Ergebnissen von Korendovych *et al.* und der Erkenntnis, dass binäre alternierende Sequenzen von hydrophoben und hydrophilen Seitenketten in Wasser allgemein stark zu der Bildung von β -Faltblatt-Strukturen neigen, konnten Riek und Mitarbeiter eine Bibliothek katalytisch aktiver Amyloide mit ähnlicher Struktur gezielt aufbauen.^[73, 77] Es wurde dabei beobachtet, dass die erhaltenen Amyloide in einem großen Bereich von Bedingungen stabil sind und ihr Potential als Katalysatoren eine nur geringe Sequenzspezifität aufweist. Mechanismus, Robustheit und optimale Bedingungen der Reaktionen wurden allerdings als sequenzspezifisch identifiziert. Die Attraktivität von Amyloidstruktur aus kurzen Peptiden als Plattform für präbiotische Enzyme wurde in dieser Arbeit hervorgehoben.

Weiterhin konnten Ashkenasy und Mitarbeiter demonstrieren, dass amphiphile β -Faltblatt-Peptide in der Lage sein können, sich autokatalytisch über eine Templat-basierte native chemische Ligation (NCL) zu reproduzieren.^[78] Das selbstassemblierende Peptid **IV** bildet ein definiertes oligomeres Templat (**IV_n**), kann die Bausteine **E** und **N** dirigieren und damit deren Reaktion über die NCL zu Peptid **IV** zu katalysieren (*Abbildung 6A*). Das Peptid **IV** kann sich auf diese Weise aus den geeigneten Bausteinen selbst replizieren, was in einem exponentiellen Reaktionsverlauf deutlich wird. Das nicht-assemblierende Referenzpeptid **IV⁹⁹** zeigt hingegen einen linearen Reaktionsverlauf (*Abbildung 6B*).

Die Fähigkeit durch Selbstorganisation eine hochgeordnete Tertiärstruktur zu bilden und in dieser Form chemische Reaktionen zu katalysieren, sich selbst zu replizieren und äußeren Einflüssen besser zu widerstehen, bestätigt die Vermutung, dass es sich bei kurzen amyloiden Peptiden um eine wichtige Zwischenstufe in der Evolution der heutigen Enzyme handeln könnte.

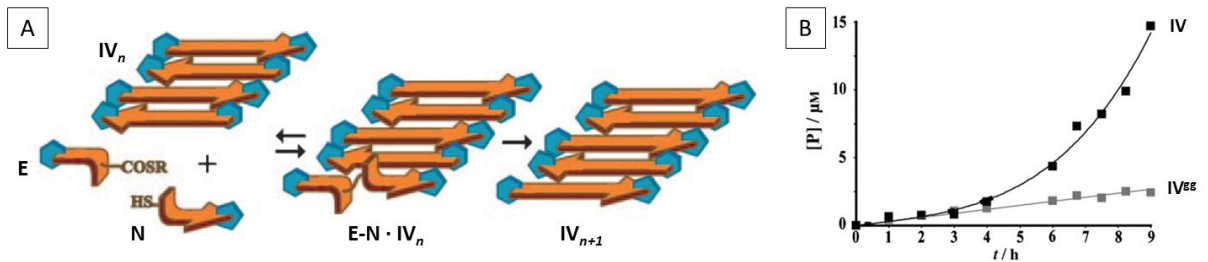


Abbildung 6: Der autokatalytische Prozess von Peptid **IV**; (A) Das antiparallele β -Faltblatt IV_n dient als Template für die kontrollierte Assoziation von E und N, welche über NCL zu Peptid **IV** reagieren; (B) Kinetische Analyse des selbst-replizierenden Mechanismus von Peptid **IV**, gezeigt ist der zeitliche Verlauf der Bildung von **IV** im Vergleich zu dem Kontrollpeptid IV^{99} , welches keine β -Faltblätter bilden kann; **IV** = ABA-EFEFACEFEFEP-CONH₂ (ABA = Acetamidobenzoat), **E** = ABA-EFEFA-COSR (R = CH₂CH₂CONH₂), **N** = H-CEFEFEP-CONH₂, IV^{99} = ABA-EFGFACEFGFEP-CONH₂.^[78]

Xu *et al.* gelang es, das aktive Zentrum von Oxidoreduktasen Häm (**VII**) in die Nanofasern eines Hydrogels einzubauen, das aus zwei verschiedenen Aminosäurederivaten aufgebaut ist (Abbildung 7).^[79-80] Das gemischt-assemblierte System aus Häm **VII** und den beiden Aminosäurederivaten **V** und **VI** zeigte eine deutlich höhere Aktivität als das freie Häm und konnte bis zu 90% der Aktivität der nativen Meerrettich-Peroxidase erreichen.

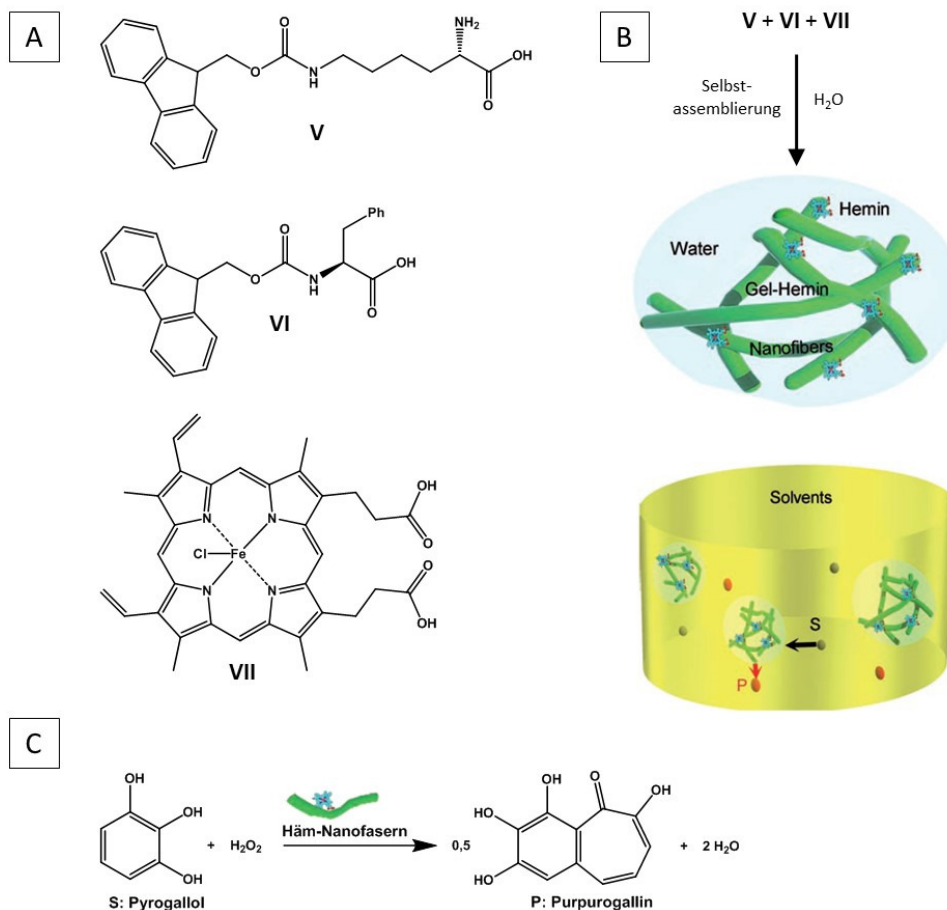


Abbildung 7: (A) Strukturen der Moleküle **V** - **VII**; (B) Vorgehen für die Herstellung Häm-beinhaltender supramolekularer Hydrogele (rechts); (C) Darstellung der enzymmimetisch katalysierten Peroxidation von Pyrogallol zu Purpurogallin (S = Substrat, P = Produkt, Lösungsmittel = 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,4 oder Toluol).^[79] (B) - (C) Reprinted with permission from Q. Wang, Z. Yang, X. Zhang, X. Xiao, C. K. Chang, B. Xu, *Angew. Chem. Int. Ed.* (1999 -) **2007**, 46, 4285-4289. Copyright 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Die Stabilität und Wiederverwendbarkeit konnte zudem durch das molekulare Hydrogel als Matrix deutlich erhöht werden. Das Hydrogel übernimmt hier die Funktion als Gerüst der proteinartigen Struktur des künstlichen Enzyms, unterstützt die Funktion des aktiven Zentrums in organischen Lösungsmitteln, wirkt als immobilisierende Trägermatrix und verhindert die Inaktivierung der aktiven Zentren durch Oxidation. Weitere Experimente konnten zeigen, dass der Einbau von natürlichen Enzymen in molekulare Hydrogele zu einer deutlichen Steigerung der Reaktivität und Stabilität führen kann.^[81]

Dieses Beispiel der Entwicklung eines biomimetischen Katalysators durch die Nachahmung von Enzymen mit stark vereinfachten Systemen stützt die Hypothese von Trevors und Pollack, dass eine Hydrogelumgebung als Zell-ähnlicher Raum für die Entwicklung der ersten, sich selbst replizierenden chemischen Systeme gedient haben könnte.^[36-37] Ein präbiotisches Gel bietet aufgrund seiner speziellen Eigenschaften vielseitige Vorteile als Medium. So hält es Nährstoffe in Wasser zurück und bietet Schutz vor UV-Strahlung sowie mechanischer Belastung. Eine Anreicherung monomerer Biomoleküle wird ermöglicht und deren Polymerisation kann katalysiert werden.

1.2 Supramolekulare Gele

Nach der Hypothese von Trevors und Pollack können insbesondere supramolekulare Gele eine wichtige Rolle als schützende Matrix in der chemischen Evolution gespielt haben.^[36-37] Gele sind vielseitige weiche Materialien, die auf der Dispersion eines Lösungsmittels in einem Feststoff basieren.^[82-84] Dabei bildet der polymere Gelator mit einem typischen Anteil von etwa 1 Gew-% häufig ein dreidimensionales Netzwerk, in dessen Poren das Lösungsmittel mit den übrigen 99 Gew-% immobilisiert wird. Grundsätzlich können „chemische“ bzw. kovalente polymere Gele (kurz: polymere Gele) von „physikalischen“ bzw. supramolekularen polymeren Gelen (kurz: supramolekulare Gele) unterschieden werden. Auf molekularer Ebene basieren polymere Gele auf Makromolekülen, deren monomere Bausteine durch die Bildung chemischer Bindungen polymerisiert wurden. Polymere Gele können eine hohe Stabilität aufweisen, große Mengen an Lösungsmittel aufnehmen und relativ einfach funktionalisiert werden. Daher werden polymere Gele in den verschiedensten Anwendungsgebieten gefunden, wie etwa als Harze in der Peptidsynthese, als Ionentauscher oder als Superabsorber in Windeln. Die Bildung der polymeren Gele ist allerdings irreversibel und eine Funktionalisierung nur relativ unspezifisch möglich.

Supramolekulare Gele basieren hingegen auf Bausteinen, die durch nicht-kovalente sekundäre Wechselwirkungen assemblieren und auf diese Weise Makromoleküle bilden. Die Bausteine (Gelatoren) können wiederum aus größeren polymeren Bausteinen oder aus kleinen Molekülen bestehen. Supramolekulare Gele die auf niedermolekularen Gelatoren basieren („low molecular weight gelators“ - LMWGs), haben einzigartige Vorteile gegenüber polymeren Gelen, denn ihre Bildung ist thermoreversibel und ihre physikalischen Eigenschaften können oft durch äußere Einflüsse wie Temperatur, Anionen, pH-Wert, Ultraschall oder UV-Licht gesteuert werden.^[82-83, 85-97] Supramolekulare Gele haben dementsprechend in den letzten Jahren nicht nur in Bezug auf ihre Rolle in der chemischen Evolution, sondern auch unter materialwissenschaftlichen Aspekten als vielseitige Medien zur Erschaffung und Kontrolle attraktiver Funktionen immer mehr an Bedeutung gewonnen.

Da supramolekulare Gele aus kleinen und sehr einfachen Molekülen aufgebaut sein können, welche sich selbst organisieren, können diese Gele eine Schlüsselstellung in der chemischen Evolution eingenommen haben. Die reversible Bildung der supramolekularen Polymere verleiht diesen Systemen einen dynamischen Charakter und ermöglicht so eine kontinuierliche Veränderung in der Zusammensetzung und dem Aufbau des dreidimensionalen Netzwerks. Auf diese Weise wird die Weiterentwicklung, die Regeneration und das Wachstum des ganzen Systems ermöglicht.

1.2.1 Aufbau supramolekularer Gele

Physikalische (supramolekulare) Polymere sind im Gegensatz zu chemischen Polymeren aus individuellen Molekülen aufgebaut, die sich über attraktive Wechselwirkungen (z. B. Wasserstoffbrücken, aromatischen Wechselwirkungen oder Metallkoordination) zu Fasern im Nano- bis Mikrometerbereich selbstorganisieren.^[98] Das Phänomen der Gelbildung basiert auf einer Verzweigung der resultierenden Nanofasern, welche dadurch ein dreidimensionales Netzwerk aufspannen und das Lösungsmittel durch Oberflächenspannung immobilisieren (siehe *Abbildung 8*).^[97, 99-102]

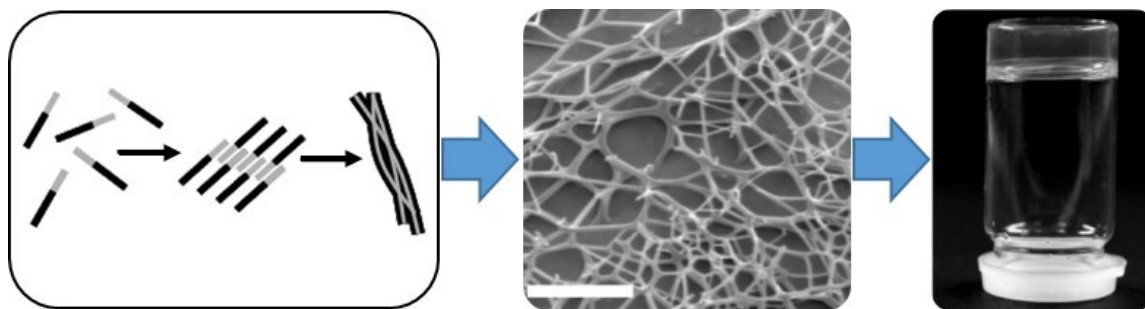


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Gelbildungsprozesses von Monomeren zu Oligomeren und Nanofasern in Lösung (links), gefolgt von der Bildung unlöslicher Assemblate in Form von verzweigten supramolekularen Nanofasern (mitte) und schließlich der Bildung eines Gels (rechts); TEM- und makroskopische Aufnahme stammen von einem Hydrogel aus Peptid I (Fmoc-Phe-Phe-OH), der weiße Balken (mitte) entspricht 500 nm.^[103-104] Schema (links) und REM-Aufnahme: Adapted with permission from V. Jayawarna, M. Ali, T. A. Jowitt, A. F. Miller, A. Saiani, J. E. Gough, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 611-614. Copyright 2006 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Hydrogel-Foto (rechts): Adapted with permission from A. M. Smith, R. J. Williams, C. Tang, P. Coppo, R. F. Collins, M. L. Turner, A. Saiani, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 37-41. Copyright 2008 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Die Primärstruktur der Nanofasern wird durch gerichtete komplementäre Wechselwirkungen der Gelator-Moleküle auf molekularer Ebene festgelegt, welche die anisotrope Aggregation begünstigen.^[105-106] Eine strukturelle Voraussetzung für niedermolekulare Gelatoren sind daher in erster Linie geeignete Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren, die für eine ausreichende Löslichkeit und eine starke Tendenz zur eindimensionalen Selbstassemblierung verantwortlich sind.^[107] Aufgrund der gerichteten attraktiven Wechselwirkung sind Wasserstoffbrücken also eine häufig auftretende Triebkraft für die Aggregation von Gelatoren. Allerdings verliert die Anziehungskraft von Wasserstoffbrücken in Wasser ihre Stärke, wenn diese nicht in einer Vielzahl und kooperativ auftreten und vor dem Lösungsmittel geschützt sind.^[108] Zusätzliche hydrophobe und aromatische Gruppen für die Ausbildung von π - π - und Van-der-Waals-Wechselwirkungen sind bei Hydrogelatoren daher ein entscheidender Faktor und häufig zu beobachten.^[84, 97, 109-114] Zudem können weitere Wechselwirkungen wie Salzbrücken oder die Koordination an Metallzentren eine entscheidende Rolle bei der Gelbildung spielen.^[82, 115-119]

CH- π -Wechselwirkungen gehören im Gegensatz zu den genannten Wechselwirkungen nicht zu den klassischen Interaktionen bei der Bildung von supramolekularen Strukturen und sind mit 1,5 - 2,5 kcal/mol schwächer als Wasserstoffbrücken zwischen =N/=O und -NH/-OH-

Gruppen (3 - 7 kcal/mol).^[120-122] Trotzdem können CH- π -Wechselwirkungen eine bedeutende Rolle in verschiedenen Bereichen der Chemie und biologischen Systemen spielen, zum Beispiel in der Wirt-Gast-Chemie, der Reaktionsselektivität, der Selbstassemblierung von Molekülen in organisierte supramolekulare Strukturen und der Struktur von Proteinen.^[123-130] Wei *et al.* haben weiterhin über einen Organogelator auf Copillar[5]aren-Basis berichtet, dessen Triebkraft für die Selbstassemblierung auf CH- π -Wechselwirkungen beruht.^[131] Ulijn und Mitarbeiter konnten zudem zeigen, dass die Selbstassemblierung bestimmter aromatischer Kohlenhydrat-Amphiphile zu Hydrogelen auf CH- π -Wechselwirkungen beruht und nicht, wie üblicherweise erwartet, auf π -Stacking und H-Brücken.^[132]

1.2.2 Supramolekulare Hydrogele

Eine Vielzahl supramolekularer Gelatoren wurde von natürlich vorkommenden Molekülen wie Peptiden, Harnstoffen und Nukleotiden abgeleitet.^[133-135] Allerdings bilden nur wenige dieser natürlichen Verbindungen ein Gel in Wasser (Hydrogel), ohne dass ein organisches Lösungsmittel zugesetzt werden muss.^[136-141] Einfache Verbindungen, die in reinem Wasser gelieren sind allerdings nicht nur unter präbiotischen Aspekten wichtig, sondern haben auch eine Vielzahl an interessanten Anwendungsmöglichkeiten. Wenn Hydrogele unter Belastung dünnflüssiger werden und sich anschließend regenerieren, spricht man von Thixotropie.^[92, 142-145] Sind Hydrogele thixotrop, kann die Gelmatrix in einer Spritze unter Druck verflüssigt und in ein Gewebe injiziert werden. Nach der Injektion nimmt der Druck ab und im Gewebe kann sich wieder ein viskoelastisches Hydrogel bilden. Diese besondere Fähigkeit ermöglicht den Materialien eine breite Anwendung in den Bereichen der injizierbaren Systeme zur verzögerten Wirkstofffreisetzung und der Gewebeentwicklung (zwei- und dreidimensionale Zellkultur).^[72, 103, 109, 113, 146-158]

1.2.2.1 Peptid-basierte Hydrogelatoren

Grundsätzlich sind Peptidbausteine häufig eingesetzte LMWGs, da sie leicht zu modifizieren sind und eine vielversprechende Biokompatibilität zeigen.^[83-84, 110, 133, 159-169] Hydrogele aus Peptiden basieren häufig auf der Bildung von β -Faltblatt-Strukturen, welche sich in einem Folgeschritt zu einer Amyloid-Überstruktur organisieren.^[133] Amyloid-Fibrillen sind vermutlich das bekannteste Beispiel für selbstassemblierte Peptide in der Natur. Einerseits treten sie bei der Alzheimer- und Prionen-Krankheiten (z. B. Creutzfeldt-Jakob-Krankheit) auf, andererseits spielen sie auch eine wichtige Rolle bei natürlichen Prozessen, wie bei der Einlagerung von Glucagon und anderen Hormonen in Zellen.^[170-175] Die Stapelung von aromatischen Seitenketten („ π -Stacking“) spielt dabei eine wichtige Rolle in dem Prozess der molekularen Anordnung zur Selbstassemblierung zu Amyloidfibrillen.^[67]

Diphenylalanin ist das zentrale Element des β -Amyloid-Polypeptids. Es ist in den molekularen Erkennungsprozess involviert, welcher die Bildung der Amyloidfibrillen im Verlauf der Alzheimerkrankheit verursacht.^[51] Untersuchungen von Gazit *et al.* haben gezeigt, dass freies Diphenylalanin (*Abbildung 9A*) allein eine starke Tendenz zur Selbstassemblierung besitzt und in der Lage ist, in Wasser Nanoröhren zu bilden (*Abbildung 9A*).

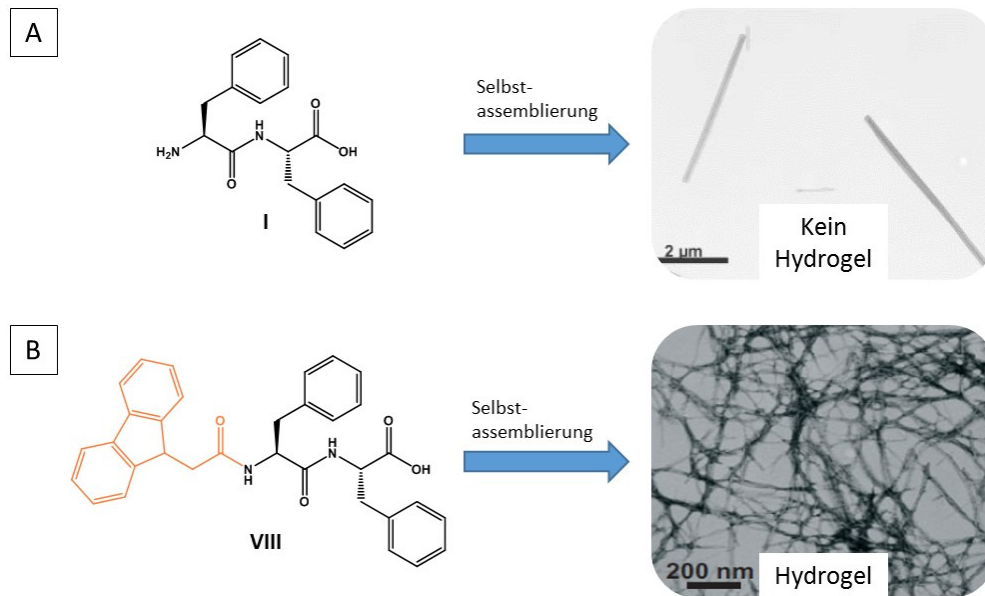


Abbildung 9: (A) Selbstassemblierung von Peptid I (H-Phe-Phe-OH) zu Nanoröhren ohne Hydrogelbildung.^[51] TEM-Aufnahme: M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, *300*, 625-627. Adapted with permission from AAAS. (B) Selbstassemblierung von Peptid VIII (Fmoc-Phe-Phe-OH) zu verzweigten Nanofasern mit Hydrogelbildung.^[176] Adapted with permission from A. Mahler, M. Reches, M. Rechter, S. Cohen, E. Gazit, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1365-1370. Copyright 2006 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Die Fähigkeit der Selbstassemblierung des bemerkenswert kurzen H-Phe-Phe-OH Dipeptids (**I**) konnte durch die Modifizierung des *N*-Terminus mit einer zusätzlichen aromatischen Gruppe stark erweitert werden.^[176] Das resultierende Dipeptid Fmoc-Phe-Phe-OH (**VIII**) bildet ebenfalls amyloide Strukturen, die Fasern erscheinen jedoch flexibler, verzweigen sich zu einem dreidimensionalen Netzwerk und bilden schließlich ein Hydrogel (*Abbildung 9B*). Phenylalanin ist somit ein potenter Baustein für den Aufbau selbstassemblierender kurzer Peptide, da er die Selbstorganisation durch π - π -Wechselwirkungen unterstützt. Diese Aminosäure ist daher in der überwiegenden Zahl kurzer Peptid-Hydrogelatoren vorhanden (vergleiche Peptide **VIII** - **XII**, *Abbildung 10*).^[110, 133, 146, 167] Die eingeschränkte Geometrie und die attraktiven Wechselwirkungen aromatischer Gruppen ermöglichen eine gewisse Ordnung und Richtungsabhängigkeit. Zudem leisten aromatische Wechselwirkungen einen wichtigen energetischen Beitrag zu der Bildung supramolekularer Überstrukturen.^[67] Xu *et al.* konnten eindeutig nachweisen, dass die Selbstassemblierung von Pentapeptid-Derivaten (**XIa-c**) zu Nanofasern und supramolekularen Hydrogelen in Wasser durch aromatische Wechselwirkungen induziert wird (*Abbildung 10*).^[177] Die aromatischen Wechselwirkungen scheinen dabei eher eine dirigierende Funktion für die H-Brücken einzunehmen. Größere

Oligopeptide mit alternierenden lipophilen und hydrophilen Seitenketten auf Phe-Basis neigen stark zur Ausbildung amyloider Strukturen und können Hydrogelatoren auf Peptidbasis ohne zusätzliche Modifizierungen darstellen (vergleiche Peptid **XII**).^[77, 178]

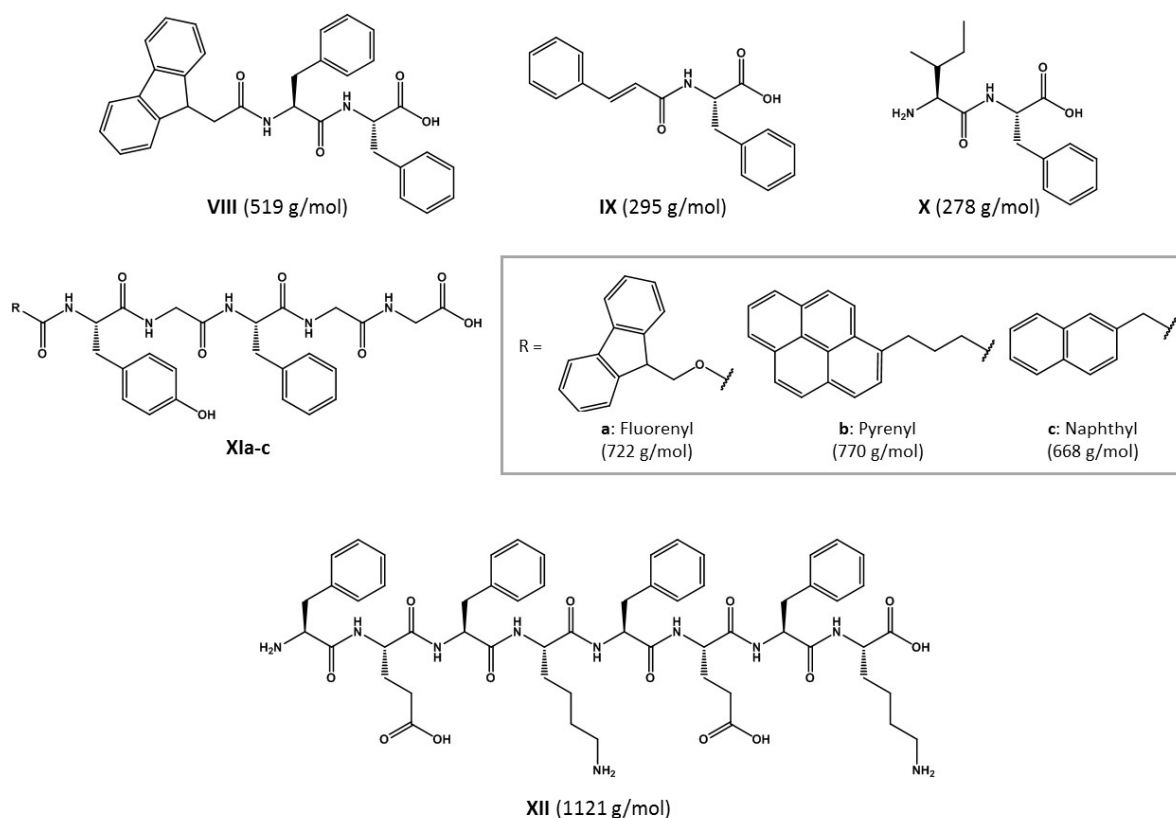


Abbildung 10: Typische Beispiele für peptidbasierte Hydrogelatoren: **VIII**: Fmoc-Phe-Phe-OH,^[176] **IX**: H-D-Val-Phe-Phe-OH,^[160] **X**: Cinnamoyl-Phe-OH,^[179] **XI**: H-Ile-Phe-OH,^[180] **XII**: R-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly-OH (R = Fmoc, Pyrenyl, Naphthyl),^[177] **XIII**: H-Phe-Glu-Phe-Lys-Phe-Glu-Phe-Lys-OH.^[178]

Die Notwendigkeit der Fmoc-Gruppe für die Gelbildung des H-Phe-Phe-OH Dipeptids **VIII** verdeutlicht allerdings, dass Phe-basierte π - π -Wechselwirkungen oft nicht ausreichen, damit ein kleines Peptid zu einem effizienten Hydrogelator wird.^[51, 160, 178, 180-182] Dementsprechend ist es fast immer notwendig, kleine Peptide mit weiteren aromatischen Gruppen (Fmoc-, Naphthyl- oder Pyrenylgruppen) zu modifizieren (vergleiche Peptide **XIIa-c**), welche zusätzliche π - π -Wechselwirkungen ermöglichen.^[145-146, 177, 179, 183] Hydrogelatoren die auf niedermolekularen Peptiden ausschließlich mit unmodifizierten proteinogenen Aminosäuren basieren, bleiben daher eine Rarität.^[180] Viele der literaturbekannten Hydrogelatoren sind zudem nur in der Lage Gele zu bilden, wenn eine gewisse Menge an organischen Lösungsmitteln wie DMSO, DMF oder HFIP zugesetzt wird.^[146, 180, 184-185]

Weiterhin wurden von Xu *et al.* verschiedene Phenylalaninderivate systematisch synthetisiert und untersucht, um die minimalen strukturellen Voraussetzungen für die Bildung von supramolekularen Hydrogelen auf Peptidbasis zu finden. Das Ergebnis der Untersuchungen war der „Hydrogelator mit dem geringsten Molekulargewicht auf Peptidbasis“ (Verbindung **IX**, 295 g/mol).^[179] Es ist allerdings an dieser Stelle anzumerken, dass es sich nach IUPAC-

Nomenklatur nicht um ein Peptid handelt.^[186] Untertroffen wird das geringe Molekulargewicht von Hydrogelator **IX** nach ausgiebiger Literaturrecherche nur von dem Dipeptid H-Ile-Phe-OH (**X**, 278 g/mol), dessen starke Tendenz zur Assemblierung vor dem Hintergrund der Erforschung des amyloidbildenden A β -Peptids der Alzheimer Krankheit entdeckt wurde.^[180]

1.2.2.2 Harnstoff-basierte Hydrogelatoren

Neben Peptiden wurden Derivate von Harnstoffen intensiv vor dem Hintergrund der Hydrogelbildung untersucht. Aufgrund ihrer ausgeprägten Fähigkeit Wasserstoffbrücken auszubilden, zeigen viele Harnstoffderivate exzellente hydrogelbildende Eigenschaften.^[86, 88, 97, 134, 137, 187-199] Bisher konnte die Bildung von Hydrogelen durch Harnstoff-Derivate jedoch nur erreicht werden, wenn zusätzliche aromatische oder lipophile Gruppen vorhanden waren, um die Bildung eines H-Brücken Netzwerks in wässriger Lösung durch π - π - bzw. Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu unterstützen (siehe **XIII - XVIII**, *Abbildung 11*).

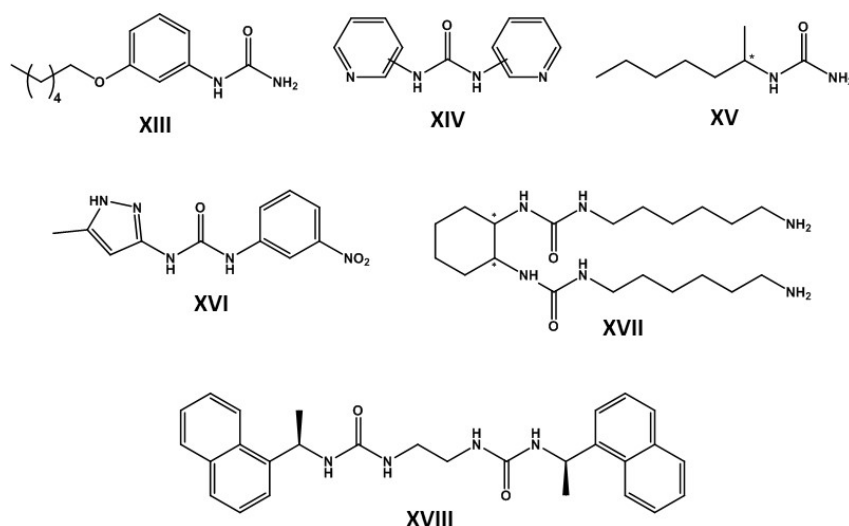


Abbildung 11: Typische Beispiele für Harnstoff-beinhaltende Hydrogelatoren: **XIII**,^[187] **XIV**,^[188] **XV**,^[189] **XVI**,^[86] **XVII**,^[191] **XVIII**.^[87]

Die gelbildenden Eigenschaften von Harnstoff-Hydrogelatoren basieren auf der Ausbildung des α -Band-Motivs, eines sechsgliedrigen Rings aufgebaut aus Wasserstoffbrücken, bestehend aus zwei Wasserstoff-Donoren und einem Carbonyl-Akzeptor.^[200] Die gerichteten Harnstoff Wasserstoffbrücken führen zu einem Wachstum der Fibrillen in eine Dimension, aufgebaut aus dem Harnstoff α -Band-Motiv, welches die Primärstruktur darstellt.^[201-203] Mehrere Fibrillen bilden wiederum Fasern (Sekundärstruktur), welche sich verzweigen und über physikalische Wechselwirkungen quervernetzen, um schließlich ein supramolekulares dreidimensionales Netzwerk (Tertiärstruktur) zu bilden.^[97] Dieser Prozess ist schematisch in *Abbildung 12A* dargestellt. Koordinierende Anionen wie Phosphat sind starke Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und konkurrieren um die Harnstoff-NH-Gruppen (*Abbildung 12B*). Das Harnstoff- α -Motiv wird durch solche Anionen grundsätzlich gestört und die Gelbildung dadurch eingeschränkt oder vollständig inhibiert.^[87-88, 134, 204] Dieser Effekt konnte

dafür genutzt werden, die Geleigenschaften von **XVIII** zu beeinflussen, indem das Harnstoff- α -Motiv z. B. durch die Zugabe von Phosphatanionen gezielt geschwächt wurde.

Verbindung **XVI** bildet eine seltene Ausnahme unter den Harnstoff-basierten Hydrogelatoren, da keine klassischen Harnstoff-Harnstoff-Wasserstoffbrücken vorliegen.^[86] Oxyanionen wie Sulfat und Phosphat koordinieren an die Harnstoffgruppen ohne eine Gelbildung zu stören, da diese auf einer eindimensionalen Stapelung von **XVI**-H⁺ Kationen durch hydrophobe Effekte und π - π -Wechselwirkungen beruht. Interessanterweise können die resultierenden Geleigenschaften von Hydrogel **XVI** gezielt durch die Wahl des Anions gesteuert werden.

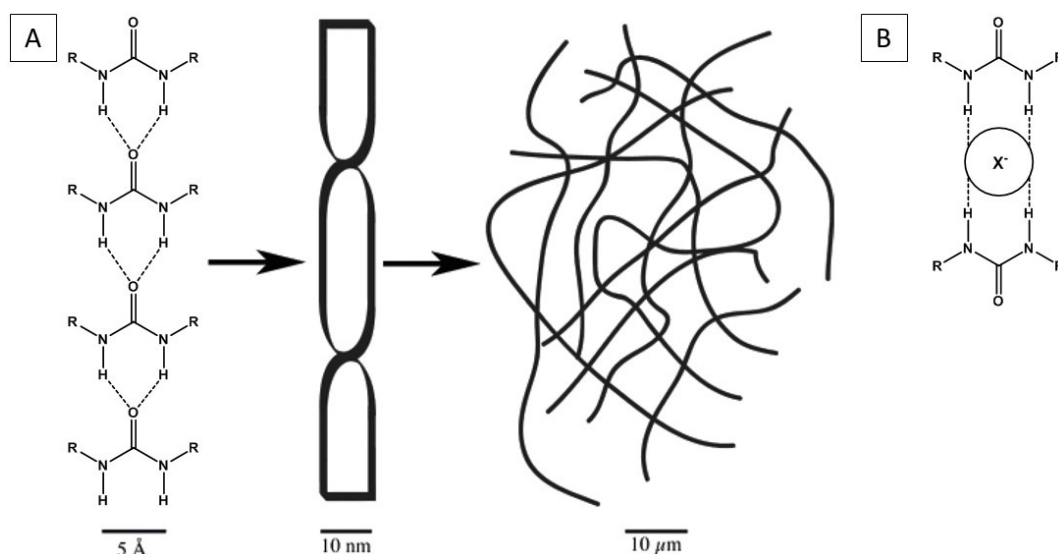


Abbildung 12: (A) Die primäre, sekundäre und tertiäre Struktur selbstassemblierter Harnstoff-basierter Gele;^[97] Reprinted with permission from L. A. Estroff, A. D. Hamilton, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1201-1218. Copyright (2004) American Chemical Society. (B) Halogen- oder Oxyanionen (X⁻) gebunden durch Harnstoffderivate.^[134]

1.2.2.3 Nukleobasen-basierte Hydrogelatoren

Nukleobasenderivate haben ein großes Potential für komplementäre Wechselwirkungen und eine starke Tendenz zur gerichteten Assemblierung. Dementsprechend gibt es verschiedene Beispiele für Nukleobasen-basierte Hydrogele.^[205] Eine interessante Klasse der Nukleobasen-Hydrogelatoren leitet sich von Guanosin (**XIX**) ab (*Abbildung 13A*).^[135, 206-211] Die Bildung von Hydrogelen durch Guanosinderivate **XIX** und **XXI** basiert auf einer G-Quartett-Struktur in Gegenwart von Metallionen wie Na⁺ oder K⁺ (*Abbildung 13B*). Ein großer Nachteil von Guanosin-Hydrogelen ist jedoch die geringe Lebensdauer des Hydrogelzustandes, was die potentielle Anwendung in vielen Bereichen limitiert. Wenige Stunden nach der Bildung der Gele findet ein Kristallisationsprozess statt und das Gel bricht zusammen.^[212] Interessanterweise konnte die Stabilität von Guanosin-Hydrogelen durch die Zugabe des nicht gelbildenden Triacetylguanosins (**XX**) deutlich auf über 1 Jahr verbessert werden.^[210] Die Eigenschaften dieser binären Gele konnten darüber hinaus durch das Verhältnis der Mischungen gezielt gesteuert werden.

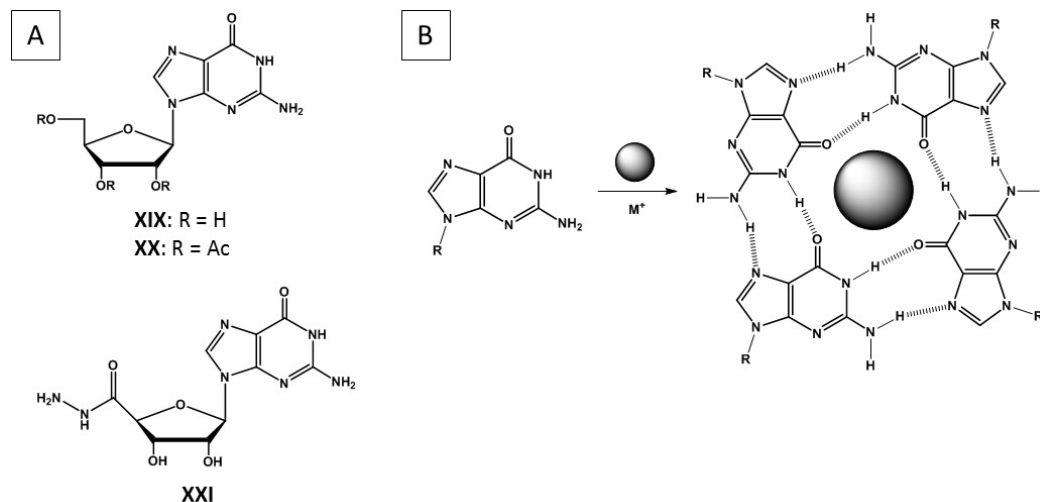


Abbildung 13: Typische Beispiele für Nucleobasen-basierte Hydrogelatoren; Guanin-basierte Hydrogelatoren (links): **XIX**,^[210] **XX** (kein Gelator),^[210] **XXI**;^[206] schematische Bildung der G-Quartett-Struktur (rechts);^[206]

Im Gegensatz zu dem speziellen Fall der Metallionen-induzierten Hydrogelbildung aus Guanosin-Tetramereinheiten, konnte eine Hydrogelbildung von Pyrimidinderivaten nur durch eine zusätzliche Modifizierung der Nucleobase mit aromatischen oder lipophilen Gruppen erreicht werden (**XXII - XXIV**, *Abbildung 14*).^[136, 213-218] Untersuchungen der Gruppen von Shimizu *et al.* konnten zeigen, dass mit C₁₈- und C₂₀-Ketten modifizierte Nucleotid-Bausteine hydrogelbildende Bolaamphiphile ergeben (z. B. **XXIV**).^[136, 217] Weiterhin haben Kim und Mitarbeiter einfache Hydrogelatoren beschrieben, die auf mit Triazol-Linkern modifizierten Desoxyuridin-Derivaten basieren (z. B. **XXII**).^[213]

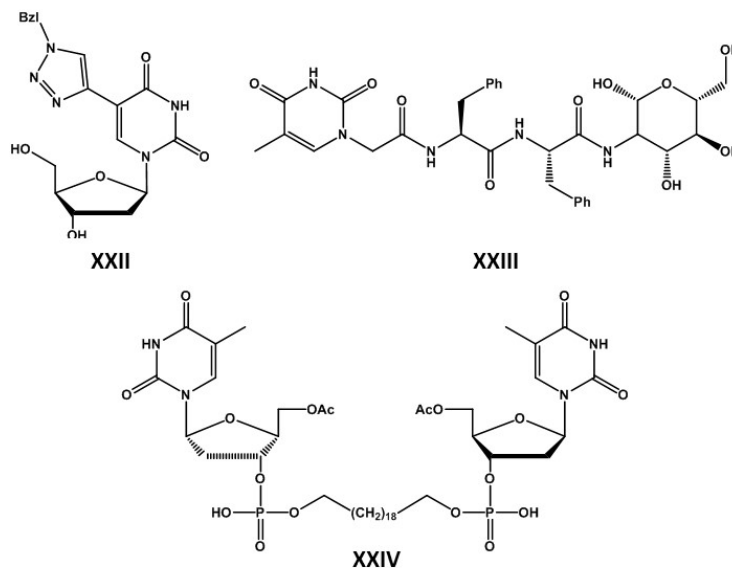


Abbildung 14: Typische Beispiele für Pyrimidin-basierte Hydrogelatoren: **XXII**,^[213] **XXIII**,^[214] **XXIV**.^[136]

Durch die Konjugation von Nucleobasen mit Peptiden und Glykopeptiden konnten Xu und Mitarbeiter die starke Neigung der Nucleobasen zur Bildung von Wasserstoffbrücken nutzen, um die Selbstassemblierung von Peptiden zu verbessern und eine erweiterte Auswahl an neuen Hydrogelatoren zu generieren (wie etwa Peptid **XXIII**).^[214, 216, 219] Interessanterweise

bleibt den Nukleobasen nach der Gelbildung die Fähigkeit erhalten, Wechselwirkungen mit den zu ihnen komplementären Basen einzugehen, was sich positiv auf die Materialeigenschaften gemischt-assemblierter Systeme auswirkt. Diese Arbeit konnte zeigen, dass sich auch einzelne Nukleobasen mit anderen, zur Selbstassemblierung neigenden Systemen kombinieren lassen um neue und einzigartige Hydrogelatoren zu erhalten.

1.3 Supramolekulare Katalyse an Peptid-Nanofasern

Durch die Assemblierung monomerer Einheiten zu supramolekularen Strukturen wie Nanoröhren, Mizellen oder Nanofasern können Funktionsassemblate mit interessanten katalytischen Aktivitäten generiert werden.^[220-224] So kann sich die Reaktivität bestimmter Gruppen durch Nachbarschaftseffekte aufgrund der Selbstassemblierung ändern. Es konnte unter anderem eine Erhöhung des pK_a -Wertes von Carboxylgruppen in fibrillaren Aggregaten von Hydrogelen festgestellt werden.^[225-226] Hierbei handelt es sich um einen Effekt der auch für ionisierbare Reste in den aktiven Zentren von Enzymen beobachtet wurde und der auf einer ungünstigen Ladungsabstoßung zwischen benachbarten Carboxylatanionen beruht.^[227]

Die Nanofasern in supramolekularen Gelen können hochgeordnete eindimensionale Strukturen annehmen, in der eine größere Anzahl funktioneller Gruppen präzise orientiert vorliegen, was zu multivalenten Wechselwirkungen und einer Katalyse auf Basis von kooperativen Effekten führen kann.^[228] Des Weiteren kann die Komplexität der Struktur des selbstassemblierten Systems durch die Kombination von Molekülen mit verschiedenen funktionellen Gruppen und der Variation von nicht-kovalenten Wechselwirkungen erhöht werden. Analog zu komplexen enzymatischen Systemen in der Natur können Substrate, funktionelle Gruppen oder Co-Faktoren so in eine direkte Nachbarschaft gebracht werden.

1.3.1 Katalytische Nanofasern

Die erste Verwendung eines für die Aggregation entworfenen Peptid-Katalysators zur Nachahmung eines hydrolytischen Enzyms wurde von Stupp und Guler berichtet.^[229] Mit ihren Untersuchungen konnten sie die Hydrolyse eines Modellesters (*Abbildung 15A*) an der Oberfläche von Nanofasern des selbstassemblierten Peptidamphiphils **XXV** (*Abbildung 15B*) nachweisen. Die hydrolytische Aktivität gegenüber Dinitrophenylacetat (DNPA) beruht auf den Imidazolgruppen der Histidin-Seitenketten, analog zu den aktiven Zentren vieler Enzyme. Es wurden weiterhin die Derivate **XXVI** - **XXVIII** untersucht, die im Gegensatz zu **XXV** sphärische Aggregate bilden, welche aufgrund der gewählten Strukturen eine geringere molekulare Ordnung aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass der Grad der molekularen Ordnung in einem direkten Zusammenhang zu der katalytischen Aktivität steht. Die stark erhöhte katalytische Aktivität der Nanofasern von **XXV** im Vergleich zu der Reaktion in Lösung (mit Imidazol und Histidinmethylester (H-His-OMe)) oder mit sphärischen Aggregaten der Derivate **XXVI** - **XXVIII** wurde auf eine stark erhöhte Konzentration von Histidin-Seitenketten an der Oberfläche der hochgeordneten Nanofasern zurückgeführt. Diese Arbeit verdeutlicht die Möglichkeiten einer „bottom-up“-Strategie für die Entwicklung von katalytisch aktiven Spezies durch das Design von Monomeren in einem supramolekularen biomimetischen Ansatz.

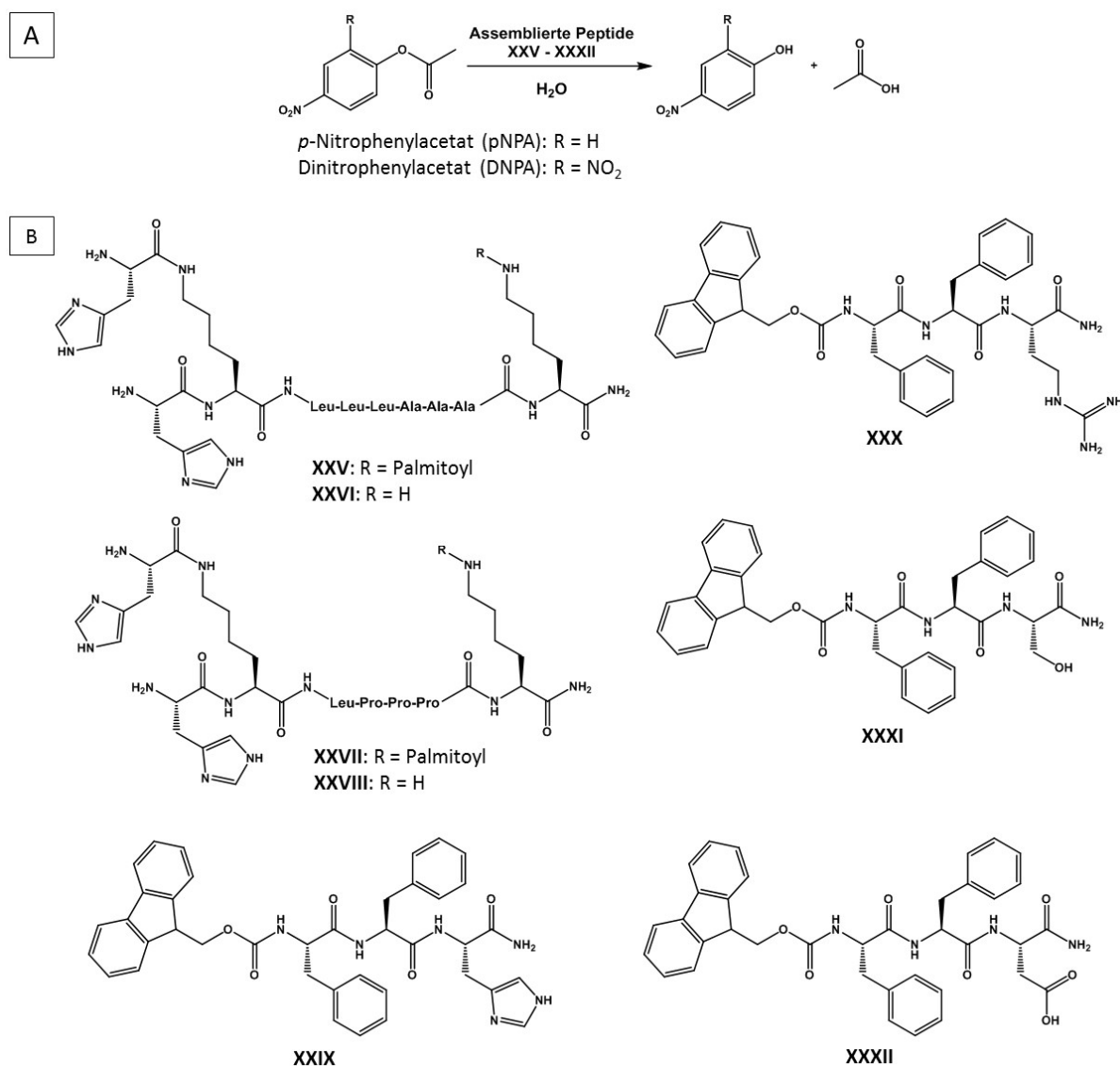
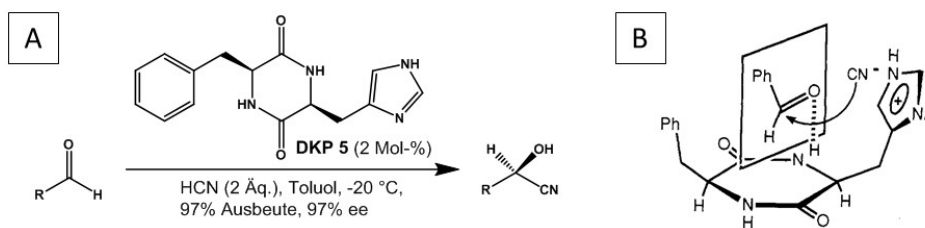


Abbildung 15: (A) Hydrolyse von pNPA und DNPA als Modellreaktion für die Untersuchung assemblierter Peptide; (B) Strukturen der im assemblierten Zustand katalytisch aktiven Peptide **XXV - XXXII**.^[229-231]

Die Komplexität supramolekularer Peptidkatalysatoren kann durch die Coassemblierung von unterschiedlichen Peptiden recht einfach erhöht werden. Liu *et al.* haben über das Histidinbasierte Tripeptid Fmoc-Phe-Phe-His-NH₂ (**XXIX**) berichtet, welches in Form von assemblierten Nanoröhren die Hydrolyse von *para*-Nitrophenylacetat (pNPA) katalysieren kann.^[230] Die katalytische Effizienz der Nanoröhren konnte durch die Coassemblierung mit dem Arginin-Derivat **XXX** erhöht werden, da die Guanidylgruppe die negative Ladung im Übergangszustand stabilisieren kann. Allerdings konnte das molare Mischungsverhältnis **XXIX** zu **XXX** nicht über 20 : 1 erhöht werden, ohne die Nanoröhren zu beschädigen und damit die Reaktionsgeschwindigkeit zu senken. Die Stabilität dieses einfachen supramolekularen Systems erreicht zwar bei weitem noch nicht die strukturelle Stabilität von Enzymen, zeigt allerdings das große Potential durch Coassemblierung verschiedener kleiner Peptidbausteine die aktiven Zentren von Enzymen zu imitieren. In solchen Systemen können mehrere funktionelle Gruppen kooperieren um eine erhöhte katalytische Aktivität zu erreichen.

Eine Weiterentwicklung dieses Prinzips auf Basis von Diphenylalanin-beihaltenden Tripeptiden wurde von He *et al.* berichtet.^[231] Mit der Coassemblierung der Fmoc-FF-Derivate **XXIX**, **XXXI** und **XXXII** zu Nanofasern gelang den Autoren die Nachempfindung der katalytischen Triade Ser/His/Asp nach dem Vorbild der aktiven Zentren von Hydrolasen.^[232] Der durch die Coassemblierung zu hochgeordneten Nanofasern erhoffte kooperative Effekt der Seitenketten konnte anhand der erhöhten Hydrolysegeschwindigkeit von *p*NPA nachgewiesen werden. Eine erhöhte Kontrolle der Anordnung der drei verschiedenen Bausteine konnte zudem durch „molecular imprinting“ erreicht werden, indem das Substrat *p*NPA als Templat vor der Faserbildung zu den gelösten Peptiden gegeben wurde. Obwohl in den vorgestellten Arbeiten eine enzymmimetische Funktion der coassemblierten Nanofasern durch eine Modellreaktion nachgewiesen werden konnte, wurde die genaue Anordnung der verschiedenen Bausteine in den Nanofasern nur aufgrund dieser Ergebnisse vermutet. Die tatsächliche Aufklärung des Aufbaus und der Sequenz coassemblierter Nanofasern stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar.

Wenn die oligomeren Assemblate und einzelnen Nanofasern in der Lage sind, dickere Bündel und Quervernetzungen auszubilden, kann ein dreidimensionales Netzwerk entstehen, welches in der Lage ist das Lösungsmittel zu immobilisieren. Die resultierenden supramolekularen Gele stellen einen weiteren Schritt im Prozess der Assemblierung dar und können im Vergleich zu den löslichen oligomeren Assemblaten grundsätzlich verschiedene Eigenschaften besitzen. Der erste Bericht über ein molekulares Gel in einem katalytischen System von Tanaka, Mori und Inoue beschäftigt sich mit der asymmetrischen Addition von HCN an *meta*-Phenoxybenzaldehyd, katalysiert durch das zyklische Dipeptid Cyclo[L-Phe-L-His] (**5**) (*Schema 1*).^[233] Bei niedriger Temperatur konnte eine deutlich erhöhte Stereoselektivität in der untersuchten Cyanhydrinsynthese beobachtet werden. Weitere Untersuchungen ergaben, dass je nach Reinigungsmethode (bzw. Aktivierungsmethode) des Katalysators entweder transparente Gele, trübe Gele oder Suspensionen in Toluol erhalten wurden.^[234] Einerseits wurde beobachtet, dass die Stereoselektivität der Reaktion bei der Verwendung von **5** als Suspension von Kristallnadeln im Vergleich zu der Reaktion im Gel drastisch reduziert wird (von 97% ee auf 22% ee). Andererseits wurde festgestellt, dass eine erhöhte Rührgeschwindigkeit zu einer höheren Enantioselektivität führte, was auf die veränderte Viskosität des Gels zurückgeführt wurde. Es wurde angenommen, dass es sich bei dieser Reaktion um einen Prozess zweiter Ordnung handelt, bei dem zwei Imidazolreste an der Katalyse beteiligt sind und es sich somit bei der katalytisch aktiven Spezies um ein Dimer handelt.^[235] Eine genaue Untersuchung des Gels fand allerdings nicht statt. Zudem wurde die Heterogenität der Reaktionsmischung eher als störend empfunden, die Aggregation des Katalysators war ursprünglich nicht beabsichtigt.



Scheme 1: (A) Asymmetrische Addition von Cyanwasserstoff an Aldehyde katalysiert durch DKP **5**; (B) Postulierter Mechanismus.^[233] Reprinted with permission from K. Tanaka, A. Mori, S. Inoue, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 181-185. Copyright (1990) American Chemical Society.

Miravet *et al.* haben dagegen über eine bewusste Verwendung von Prolin-basierten Peptiden im Gelzustand als Katalysatoren berichtet.^[236-237] Obwohl freies Prolin aufgrund seiner geringen Basizität nicht dafür bekannt ist, die Nitroaldolreaktion zu katalysieren, konnten Organogele aus dem Pro-beinhaltenen Peptid **XXXIII** erfolgreich als Katalysatoren für die diese Reaktion eingesetzt werden (*Abbildung 16*).

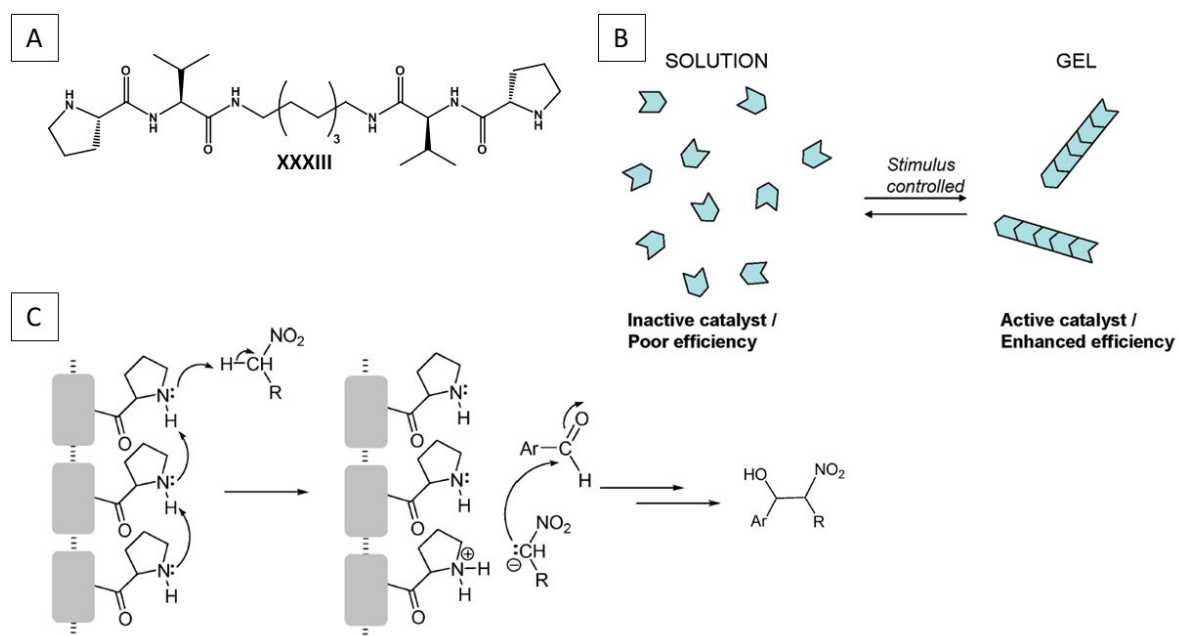


Abbildung 16: (A) Struktur des Pro-basierten Organogelators **XXXIII**; (B) Schematische Darstellung der Aggregation; (C) Erhöhte Basizität durch kooperativen Effekt der Prolingruppen im Organogel.^[237] (B) - (C): Reprinted with permission from F. Rodríguez-Llansola, B. Escuder, J. F. Miravet, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11478-11484. Copyright (2009) American Chemical Society.

Die erhöhte katalytische Aktivität im assemblierten Zustand (*Abbildung 16B*) basiert in diesem System auf einer stark erhöhten Basizität durch einen kooperativen Effekt der benachbarten Prolingruppen (*Abbildung 16C*). Die Organogele von **XXXIII** in Nitroalkanen konnten auf diese Weise, im Gegensatz zu der entsprechenden Lösung, die Henry-Reaktion mit aromatischen Aldehyden katalysieren. Trotz des großen Potentials des Organogels **XXXIII** in der supramolekularen Katalyse ist die Verwendung von Wasser anstelle von organischen Lösungsmitteln zu bevorzugen.

Weiterhin bildet das Pro-basierte Peptid **XXXIV** ein Hydrogel welches in der Lage ist, Aldolreaktionen effizient und enantioselektiv zu katalysieren (*Abbildung 17*).^[238] Das Hydrogel

XXXIV konnte die Reaktion von Cyclohexanon und *para*-Nitrobenzaldehyd mit einer Ausbeute von 99% und einem Enantiomerenüberschuss von 90% katalysieren (*anti* : *syn* = 92 : 8).

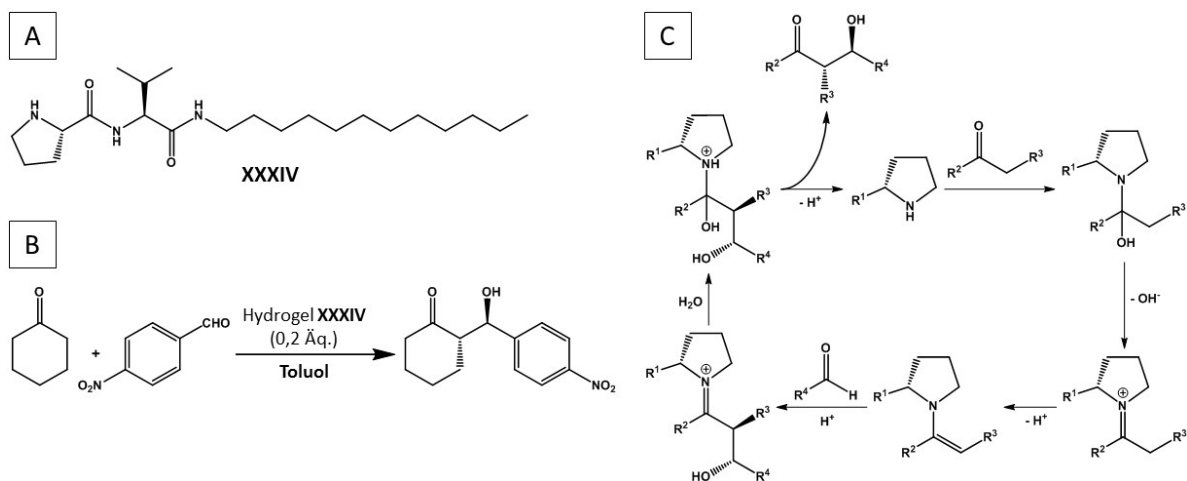


Abbildung 17: (A) Struktur von Hydrogelator **XXXIV**; (B) Schema der von Hydrogel **XXXIV** katalysierten Aldolreaktion; (C) Enamin-basierter Mechanismus der Aldolreaktion mit einem Prolinderivat, die Stereoselektivität lässt sich über das Zimmerman-Traxler-Modell erklären.^[238]

Der Enamin-basierte Mechanismus über Prolin ist mit dem Mechanismus der Typ I Aldolase vergleichbar. Das Hydrogel besitzt folglich enzymmimetische Eigenschaften. Bei diesem katalytischen Hydrogel spielt die Hydrophobie eine duale Rolle. Sie ist einerseits Triebkraft für die Assemblierung und andererseits in den Prozess der Substratbindung an die katalytisch-aktiven Bereiche involviert.^[239] Alkylketone mit unterschiedlich langen C-Ketten wurden als Substrate für die Aldolreaktion untersucht. Bei gleichbleibender Stereoselektivität stieg die Ausbeute mit steigender Kettenlänge signifikant. Die besten Ergebnisse wurden mit 2-Dodecanon erzielt. Polare Ketone wie Aceton zeigten keine Reaktion. Die Ursache für diese Substratselektivität ist, dass die Selbstassemblierung von **XXXIV** in Wasser auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen der C₁₂-Ketten basiert (*Abbildung 18*). Die Hydrogelstruktur bildet auf diese Weise ein „aktives Zentrum“, welches hydrophobe und Van-der-Waals-Wechselwirkungen als Erkennungsbereich mit einem Pro-basierten reaktiven Bereich kombiniert. Durch hydrophobe Wechselwirkungen bewegt sich das Substrat zu den Nanofasern und richtet sich anschließend gezielt aus. Dies ist ein interessantes Beispiel dafür, wie sich eine auf molekularer Ebene verschlüsselte Funktionalität erst auf supramolekularer Ebene entfalten kann.

Im Gegensatz zu den in *Kapitel 1.3.1* beschriebenen Systemen aus coassemblierenden Bausteinen mit kooperativ agierenden funktionellen Gruppen, haben Escuder *et al.* ein System beschrieben, in dem orthogonal selbstassemblierende Bausteine zusammen ein Netzwerk aus verschiedenen Nanofasern bilden.^[240] Durch die Kombination von Hydrogelatoren mit orthogonal katalytisch aktiven Gruppen (**XXXIV** und **XXXV**), die sich in

dem gemischten System selbst sortieren, ist es den Autoren gelungen, das Interferieren der katalytischen Funktion zu verhindern (Abbildung 19A).

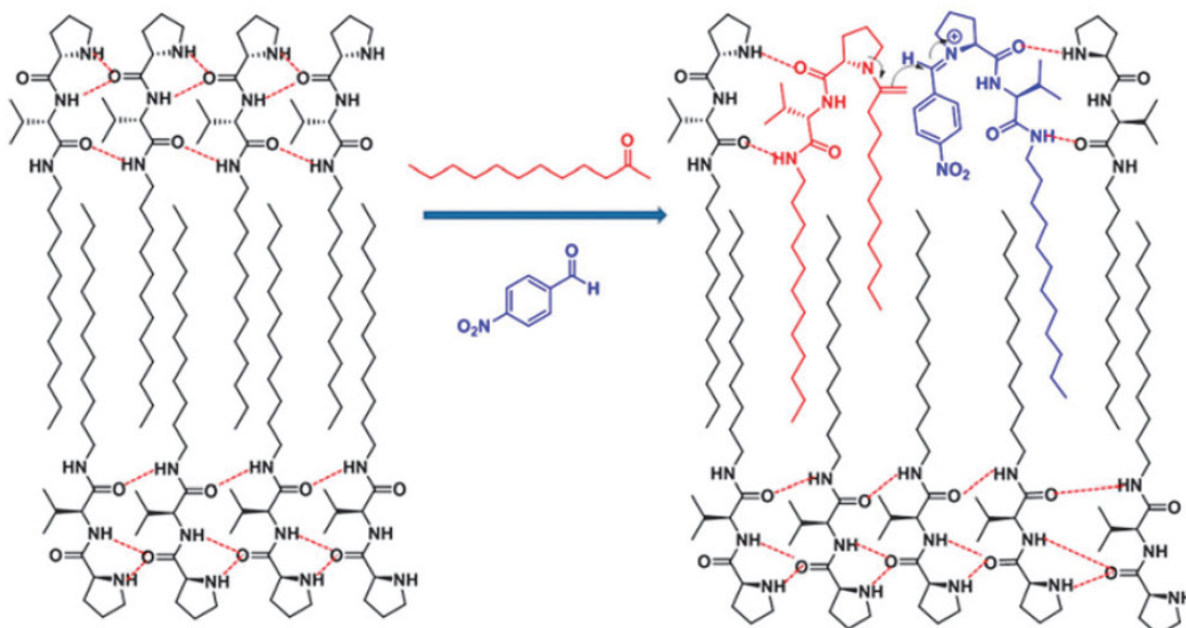


Abbildung 18: Molekulare Anordnung von **XXXIV** im Hydrogelzustand und postuliertes Schema der Aldolreaktion am aktiven Zentrum.^[239] Reproduced from C. Berdugo, J. F. Miravet, B. Escuder, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 10608-10610 with permission of The Royal Society of Chemistry.

Die Deacetylierung des Dimethylacetal-geschützten Benzaldehyds durch die Carbonsäurefunktion von **XXXV** gefolgt von der durch **XXXIV** katalysierten Aldolreaktion mit Cyclohexanon im Hydrogel konnte dabei eine Ausbeute von 85% mit einem Enantiomerenüberschuss von 90% (anti : syn = 84 : 16) erreichen.

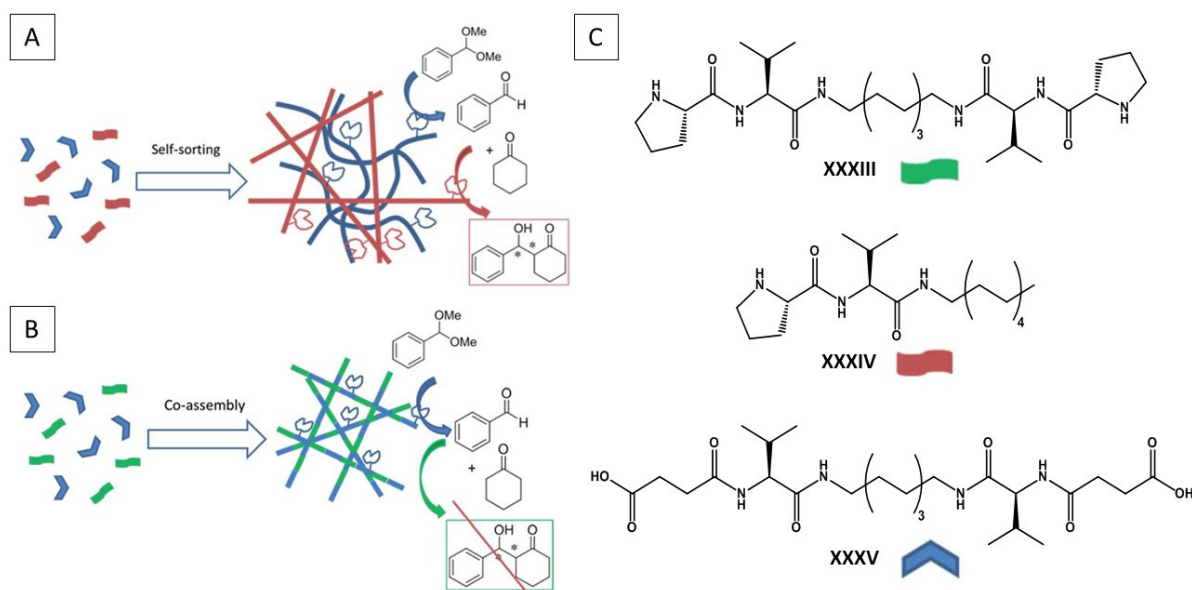


Abbildung 19: (A) Schema der Selbstsortierung von **XXXIV** und **XXXV** sowie Reaktionsschema der Tandemreaktion am resultierenden Hydrogel; (B) Schema der Coassemblierung von **XXXIII** und **XXXIV** und Reaktionsschema der unvollständigen Reaktion am resultierenden Hydrogel; (C) Strukturen der Hydrogelatoren **XXXIII**, **XXXIV** und **XXXV**.^[240] (A) - (C) Reproduced or partially reused from N. Singh, K. Zhang, C. A. Angulo-Pachon, E. Mendes, J. H. van Esch, B. Escuder, *Chem. Sci.* **2016**, 7, 5568-5572 - Published by The Royal Society of Chemistry.

Die Coassemblierung der strukturverwandten Bausteine **XXXIII** und **XXXV** verhindert im Gegenzug die Bildung des finalen Produkts der Aldolreaktionen, da die Prolinfunktion durch spezifische Wechselwirkungen mit der Carbonsäure im Hydrogel protoniert vorliegt und damit deaktiviert wird (*Abbildung 19B*).

Insgesamt lassen sich die Vorteile der Verwendung kleiner selbstassemblierender Peptide als supramolekulare Katalysatoren anhand der hier aufgezeigten Beispiele erkennen. Durch die Verwendung selbstassemblierender Systeme lassen sich die resultierenden Funktionen der Nanofasern und des Hydrogels durch die Wahl der monomeren Bausteine gezielt steuern. Aufgrund einer erhöhten Dichte oder kooperativem Verhalten benachbarter funktioneller Gruppen können enzyymmimetische Nanofasern und Hydrogele erhalten werden. Neben der vielseitigen Anwendung in der Katalyse gewähren diese Systeme einen Einblick in die mögliche Entwicklung präbiotischer Enzyme in der chemischen Biogenese.

1.4 Rheologie supramolekularer Gele

Die mechanischen Eigenschaften von Gelen werden primär durch rheologische Experimente systematisch untersucht. Die Rheologie ist die Untersuchung der Deformation und des Flusses von Materie unter dem Einfluss von angelegter Spannung und eine der wichtigsten Methoden zur Analyse und Definition von viskoelastischen Materialien.^[82, 109, 241-243] Zur Untersuchung eines Materials mittels Rheometer wird die Probe zwischen zwei Platten appliziert. Eine Scherdeformation γ (gemessen in % relativ zu der Höhe der Probe) wird durch sinusartige Oszillation $\gamma(t) = \gamma_0(\sin(\omega t))$ (ω = verwendete Kreisfrequenz) der oberen Platte auf die Probe ausgeübt. Die gemessene Scherspannung σ entspricht einer zur Oszillation phasenverschobenen Sinuskurve $\sigma(t) = \sigma_0(\sin(\omega t + \delta))$ wobei δ der Phasendifferenz zwischen den beiden Kurven entspricht (Abbildung 20).

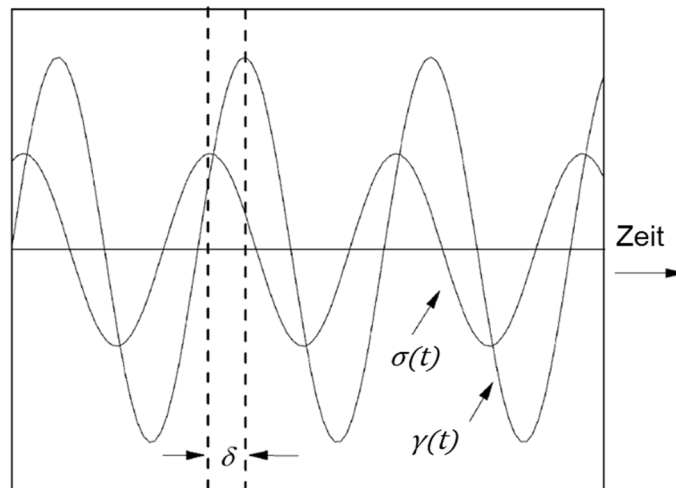


Abbildung 20: Beispiel einer Phasenverschiebung der Scherspannung $\sigma(t)$ relativ zu der Deformation $\gamma(t)$ bei viskoelastischen Materialien.^[109] Reproduced from C. Yan, D. J. Pochan, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3528-3540 with permission of The Royal Society of Chemistry.

Alternativ kann eine Scherspannung vorgegeben und die Deformation mit Phasenverschiebung gemessen werden. Bei rein elastischem Material sind die Spannungs- und Deformationskurven in Phase ($\delta = 0^\circ$), während sie bei rein viskosem Material um $\delta = 90^\circ$ phasenverschoben sind. Wenn eine kontinuierliche schwache Kraft auf ein Material ausgeübt wird und dieses nach einer leichten anfänglichen Deformation einer weiteren Deformation widersteht, handelt es sich um einen Feststoff.^[82] Wenn das Material unter Kraffteinwirkung beginnt zu fließen, handelt es sich um eine Flüssigkeit. Es gibt allerdings Materialklassen, deren Verhalten sich für einen kurzen Zeitraum zwischen diesen beiden Extremen befindet. Wenn das Ausmaß der Deformation des Materials zu der angewandten Kraft oder Spannung proportional ist, spricht man von einem elastischen Material (wie ein Gummiband). Wenn allerdings die Deformationsgeschwindigkeit zu der angewandten Kraft oder Spannung proportional ist, handelt es sich um viskoses Material (wie Honig). Viskoelastische Materialien weisen Teile von beiden Charakteristiken auf. Flüssige, feste, viskose und elastische

Eigenschaften sind unter geringer Krafteinwirkung messbar. Unter einer großen Krafteinwirkung können die genannten festen Stoffe allerdings anfangen zu fließen.

Viskoelastische Materialien haben eine Phasenverschiebung zwischen $\delta = 0^\circ$ und $\delta = 90^\circ$. Das Speichermodul G' (der elastische, feststoffartige Anteil der Probe), das Verlustmodul G'' (der viskose, flüssigkeitsartige Anteil der Probe) und der Verlustfaktor $\tan(\delta)$ (als G''/G' definiert) sind kritische Geleigenschaften. Diese werden als Funktion der angelegten Spannung, der Oszillationsfrequenz oder der Zeit gemessen.^[82, 109, 243-245] G' beschreibt die Deformationsenergie, die während des Scherprozesses in dem Material gespeichert wird und entspricht der Steifheit oder Elastizität des Materials bzw. im Hydrogel der Dichte der Quervernetzungen. G'' repräsentiert die Energie, die während des Scherprozesses verloren geht bzw. in Reibungswärme umgewandelt wird und entspricht dem Fließverhalten des Materials. Der Verlustfaktor $\tan(\delta)$ beschreibt das Verhältnis zwischen Verlustmodul G'' und Speichermodul G' ($\tan(\delta) = G''/G'$). Je größer der Verlustfaktor ist, desto mehr nähert sich das Verhalten der Probe dem einer ideal-viskosen Flüssigkeit an. Je niedriger der Verlustfaktor, desto mehr entspricht das Verhalten der Probe einem ideal-elastischen Festkörper. Wenn also $G'' > G'$ ($\tan(\delta) > 1$) verhält sich die Probe mehr wie eine viskose Flüssigkeit. Wenn $G' > G''$ ($\tan(\delta) < 1$) verhält sich die Probe eher wie ein elastischer Feststoff. Die in dieser Arbeit verwendeten rheologischen Größen sind in *Tabelle 1* zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten rheologischen Größen.

Größe	Bezeichnung	Beschreibung
γ	Scherdeformation	Deformation der Probe durch Scherung
σ	Scherspannung	Ausgeübte Kraft pro Fläche bei Scherung
ω	Kreisfrequenz	Frequenz des oszillierenden Stempels
δ	Phasenverschiebung	Verschiebung der Phasen zwischen Scherspannung und Deformation
G'	Speichermodul	In der Probe gespeicherte Deformationsenergie
G''	Verlustmodul	Bei Scherprozess abgegebene Energie
$\tan \delta$	Verlustfaktor	Verhältnis G''/G'
γ_c	Kritische Deformation	Deformation bei der die Probe auf molekularer Ebene zerstört wird
LVB	Linear-viskoelastischer Bereich	Beschreibt Ausdauer der Probe gegenüber mechanischem Stress

1.4.1 Zeitsweep-Experimente

In Zeitsweep-Experimenten wird die Kinetik der Gelbildung und die Entwicklung der Gel-Festigkeit anhand der Beobachtung von G' und G'' über die Zeit untersucht. Es handelt sich dabei um kritische Materialeigenschaften, welche die Anwendungsmöglichkeiten der Gele

direkt beeinflussen.^[82, 109, 243] Durch die Beobachtung der zeitlichen Entwicklung von G' und G'' kann der Sol-Gel-Übergang einer Lösung direkt verfolgt werden. Diese Methode ist gerade bei schaltbaren Gelen eine sehr interessante Möglichkeit, kinetisch kontrollierte Prozesse zu analysieren.

Der Aufbau eines dreidimensionalen Netzwerks aus Nanofasern ist ein dynamischer Prozess, der vor der makroskopischen Ausbildung eines Gels beginnt und sich danach fortsetzt. Oft folgt der plötzlichen Verfestigung der Peptidlösung durch die Bildung eines ungleichmäßig verwobenen Nanofaser-Netzwerks aufgrund schneller Selbstassemblierung eine langsamere Reorganisationsphase, in der sich die Nanofasern gleichmäßiger über das Netzwerk verteilen.^[149, 246] Die Homogenität des Netzwerkes steigt also mit der Zeit und die Elastizität erreicht ein Plateau. Das Erreichen dieses Gleichgewichtszustands, an dem sich die Materialeigenschaften des Hydrogels nicht mehr verändern, kann unterschiedliche lange Zeiträume einnehmen. Um die viskoelastischen Eigenschaften von Gelen messen und miteinander vergleichen zu können, sollten diese eine gewisse Konstanz, also ein Plateau erreicht haben.

1.4.2 Frequenzsweep-Experimente

Die Frequenzabhängigkeit der Module G' und G'' ist eine weitere kritische Materialeigenschaft. Mit einem Frequenzsweep kann der strukturelle Aufbau sowie die Empfindlichkeit der Probe gegenüber externen Einflüssen bestimmt werden. Bei einem Frequenzsweep wird die lineare Resonanz der Probe bei einer konstanten und geringen Amplitude der Deformation (γ) und variierender Kreisfrequenz (ω) gemessen.

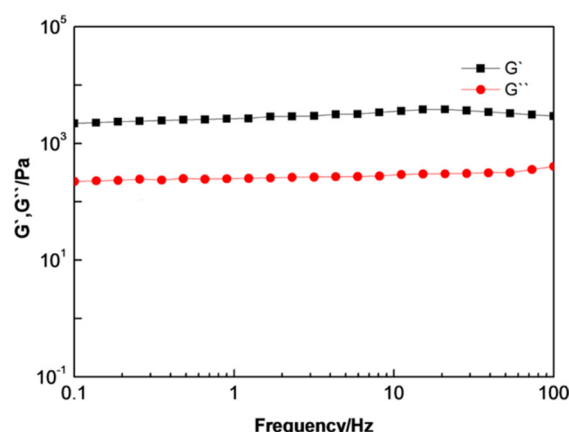


Abbildung 21: Exemplarischer Frequenzsweep eines Gels zeigt die Messung von G' (Pa) und G'' (Pa) in Abhängigkeit von der Frequenz (Hz).^[247] Reprinted with permission from H. Geng, L. Ye, A.-y. Zhang, J. Li, Z.-g. Feng, *Langmuir* **2016**, 32, 4586-4594. Copyright (2016) American Chemical Society.

Bei typischen Gelen sollte G' unterhalb einer kritischen Scherspannung bzw. Deformation, an der sich der Gelzustand in den Solzustand ändert, von der Frequenz nicht beeinflusst werden

und mindestens eine Größenordnung über G'' liegen (siehe *Abbildung 21*).^[82, 243, 248] Durch das Messen der Module in Abhängigkeit von der Frequenz lässt sich das Verhalten des Hydrogels in kurzen und langen Zeitskalen vergleichen.

1.4.3 Amplitudensweep-Experimente

In Amplitudensweep-Experimenten werden das Speichermodul G' und das Verlustmodul G'' in Abhängigkeit der Deformation γ bei konstanter Winkelfrequenz ω gemessen.^[82, 184, 243, 248] Bei geringen Deformationen sind die Module G' und G'' eines Gels annähernd konstant und unabhängig von der Deformation, es handelt sich hier um den linear-viskoelastischen Bereich (LVB, *Abbildung 22*). Wenn jedoch die kritische Deformation γ_c überschritten wird fallen die G' -Werte drastisch ab, was auf einer Zerstörung des supramolekularen Netzwerks beruht. Wasserstoffbrücken, aliphatische und aromatische attraktive Wechselwirkungen werden gebrochen. Steigt die Deformation weiter wird G'' eventuell größer als G' und das Gel beginnt zu fließen (Fließpunkt), es verhält sich dann also wie eine viskose Flüssigkeit und nicht mehr wie ein elastischer Festkörper.

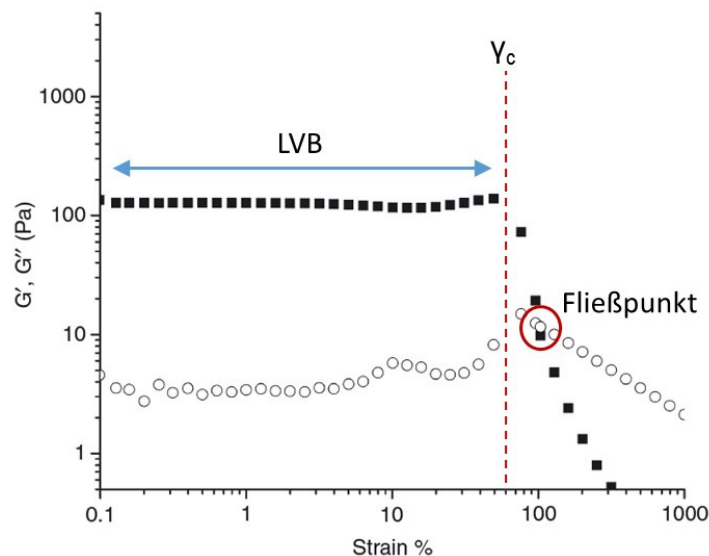


Abbildung 22: Exemplarischer Amplitudensweep eines Gels zeigt die Messung von G' (Pa) und G'' (Pa) in Abhängigkeit von der Deformation (%); schwarze Quadrate: G' , weiße Kreise: G'' .^[243] Adapted with permission from S. Sathaye, A. Mbi, C. Sonmez, Y. Chen, D. L. Blair, J. P. Schneider, D. J. Pochan, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2015**, *7*, 34-68. Copyright 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Je größer der vorhergehende linear-viskoelastische Bereich (LVB) ist, desto größer ist die mechanische Stabilität des entsprechenden Hydrogels. Der LVB beschreibt also die Ausdauer gegenüber Stress durch Deformation auf das Netzwerk. Die kritische Deformation γ_c zeigt an, wann die Quervernetzungen der Nanofasern reißen und sich das System mehr wie eine kolloidale Dispersion als ein elastischer Festkörper verhält.

1.4.4 Regenerationsexperimente

Wenn die Struktur eines supramolekularen Gels durch mechanische Belastung zerstört wird, werden dabei die nicht-kovalenten Bindungen zwischen den Molekülen gebrochen und das System verhält sich dann (nach überschreiten des Fließpunktes) eher wie eine Flüssigkeit.^[145] Die meisten Gelatoren sind nicht in der Lage den Gelzustand wieder herzustellen, bis die kolloidale Dispersion erhitzt wird und sich eine klare Lösung bildet, die im Anschluss wieder gekühlt werden muss. In einigen Fällen konnte allerdings eine spontane Regeneration des Gels nach dem Beenden der mechanischen Belastung beobachtet werden.^[146-149] Gele mit der Eigenschaft, sich unter mechanischer Beanspruchung zu verflüssigen und im Anschluss wieder den viskoelastischen Gelzustand zu regenerieren, werden als thixotrop bezeichnet.^[92, 142-145] Die thixotropen Eigenschaften von Gelen werden in Regenerationsexperimenten untersucht (*Abbildung 23*). Diese Experimente beginnen mit der Messung von G' und G'' unter Bedingungen, bei denen das Gel stabil bleibt. Anschließend wird für einen kurzen Zeitraum die Deformation stark erhöht (deutlich über γ_c), so dass die molekulare Struktur des Gels zerstört wird und es zu fließen beginnt ($G' < G''$). Die Deformation wird danach wieder auf die schonenden Anfangsbedingungen reduziert, um die Regeneration anhand von G' und G'' zu beobachten. Dieser Prozess kann mehrfach wiederholt werden, um die Ausdauer und Alterungserscheinungen des Materials zu untersuchen.

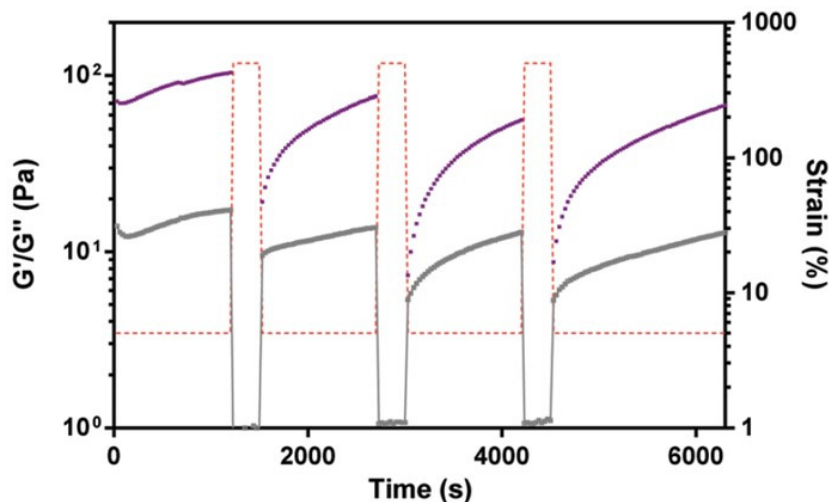


Abbildung 23: Exemplarisches Regenerationsexperiment eines Gels zeigt mehrere Intervalle aus mechanischer Belastung und Regenerationsphasen; lila Quadrate: G' , graue Quadrate: G'' , gestrichelte orange Linie: Deformation.^[218] Reproduced from K. J. Skilling, B. Kellam, M. Ashford, T. D. Bradshaw, M. Marlow, *Soft Matter* 2016, 12, 8950-8957 with permission of The Royal Society of Chemistry.

2 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollten zyklische Dipeptide (2,5-Diketopiperazine - DKPs) als minimalistische und enzymmimetische supramolekulare Katalysatoren in der chemischen Biogenese untersucht werden. Ferner sollten die DKP-Selbstassemblate (Hydrogele) in Hinblick auf deren Materialeigenschaften untersucht werden. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten Hydrogel-bildende DKPs gefunden und anschließend genauer studiert werden. Aus diesem Grund sollte eine Bibliothek verschiedener DKPs systematisch aufgebaut werden. Phenylalanin ist bei vielen Hydrogel-bildenden Peptiden ein essentieller Baustein und sollte daher bevorzugt für die Synthese erster DKPs Verwendung finden. Neben Phenylalanin sollten auch andere lipophile und sterisch anspruchsvolle Aminosäuren wie Valin oder Leucin als Aminosäurebaustein genutzt werden. Diese Aminosäuren ermöglichen hydrophobe Wechselwirkungen und fördern eine Selbstassemblierung gemäß dem in *Abbildung 24* postulierten Modell. Um eine ausreichende Löslichkeit in Wasser zu erreichen und den resultierenden supramolekularen Strukturen eine katalytische Aktivität zu ermöglichen, sollten die lipophilen Aminosäuren in erster Linie mit hydrophilen Aminosäuren mit funktionellen Gruppen an den Seitenketten kombiniert werden. In den folgenden Experimenten sollte die Fähigkeit der ausgewählten DKPs zur Selbstassemblierung in wässrigen Systemen näher betrachtet werden. Ein geeignetes System aus verschiedenen analytischen Methoden für eine ausführliche Charakterisierung des assemblierten Zustands war dafür zu etablieren. Die strukturellen Voraussetzungen der DKPs für die Selbstassemblierung zu Oligomeren bis hin zum Hydrogel sollten folgend aufgeklärt werden, um den Aufbau der resultierenden supramolekularen Systeme besser zu verstehen. Weiterhin sollte die Steuerbarkeit der Hydrogeleigenschaften, insbesondere durch das Mischen verschiedener DKPs, sowie eine potentielle biomedizinische Anwendung der DKP-Hydrogele untersucht werden.

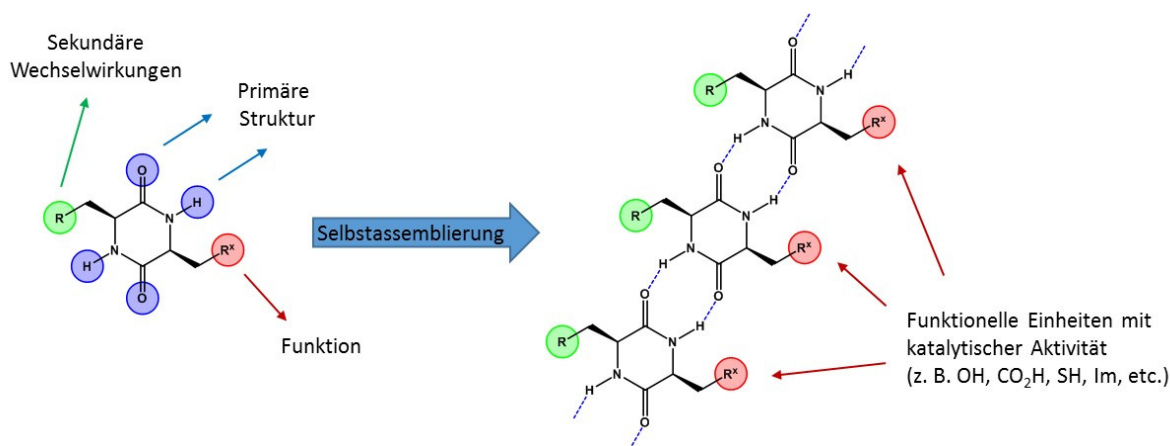


Abbildung 24: Schema der postulierten Selbstassemblierung von DKPs; R = aliphatische und aromatische Reste, R^x = polare Reste mit funktionellen Gruppen; Im = Imidazolyl.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die katalytische Aktivität der DKP-Hydrogele untersucht werden. Dabei sollte anhand einer Modellreaktion eine mögliche enzymmimetische Reaktivität durch die supramolekulare Gel-Matrix überprüft werden. Daher standen vor allem Mischungen von DKPs mit verschiedenen funktionellen Gruppen im Fokus. Ein entscheidendes Zwischenziel bei diesen Untersuchungen war die Aufklärung der molekularen Anordnung innerhalb der coassemblierten Systeme und die gezielte Beeinflussung der Ordnung der supramolekularen Struktur durch das Design der monomeren Bausteine. Unter der Annahme der molekularen Anordnung in *Abbildung 24* sollte ein möglicher intermolekularer kooperativer Effekt zwischen funktionellen Gruppen in gemischten (coassemblierten) Hydrogelen aus unterschiedlichen DKPs überprüft werden. Die verschiedenen funktionellen Gruppen sollten in diesem Modell durch die Coassemblierung im Hydrogel in eine räumliche Nähe gezwungen werden und damit eine veränderte Reaktivität aufweisen.

Im dritten Teil der Arbeit sollten Nucleobasen-abgeleitete Assemblate des Hydrogelators **35** (*N*-[(Uracil-5-yl)methyl]harnstoff - UMH) untersucht werden. Zu Beginn sollte die Synthese optimiert werden, um einen einfacheren Zugang zu größeren Mengen des Hydrogelators zu erhalten.

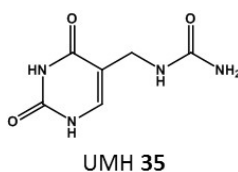


Abbildung 25: Struktur des Hydrogelators *N*-[(Uracil-5-yl)methyl]harnstoff **35** (UMH).

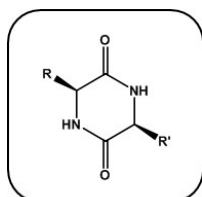
Der Einfluss von Anion, Kation und pH-Wert des Puffers auf die Selbstassemblierungseigenschaften solcher Systeme sollten systematisch untersucht werden.

3 Allgemeiner Teil

3.1 DKP-Hydrogele

3.1.1 Synthese der DKPs

2,5-Diketopiperazine (DKPs) sind zyklische Dipeptide die aus der doppelten Kondensation von zwei α -Aminosäuren erhalten werden. Sie sind in der Natur allgegenwärtig, treten jedoch meist als Abbauprodukte von Polypeptiden auf, insbesondere bei industriell verarbeiteten Lebensmitteln.^[249] Die Bildung von DKPs ist allerdings hauptsächlich als unerwünschte Nebenreaktion in der modernen Peptidsynthese sowie Peptidsynthesen unter präbiotischen Bedingungen bekannt. Sie gelten dabei als unreaktives Nebenprodukt.^[39-43, 250-251] Allerdings bietet alleine die Verwendung der 20 proteinogenen Aminosäuren für den Aufbau eines DKPs über 200 Kombinationsmöglichkeiten und gewährt damit ein großes Potential an katalytischen und koordinierenden Eigenschaften. Die Struktur eines DKPs bietet neben den beiden Lactamfunktionen, welche sich hervorragend für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken eignen, eine große Variation an den Positionen R und R' (*Abbildung 26*).



R, R' = Seitenketten proteinogener Aminosäuren

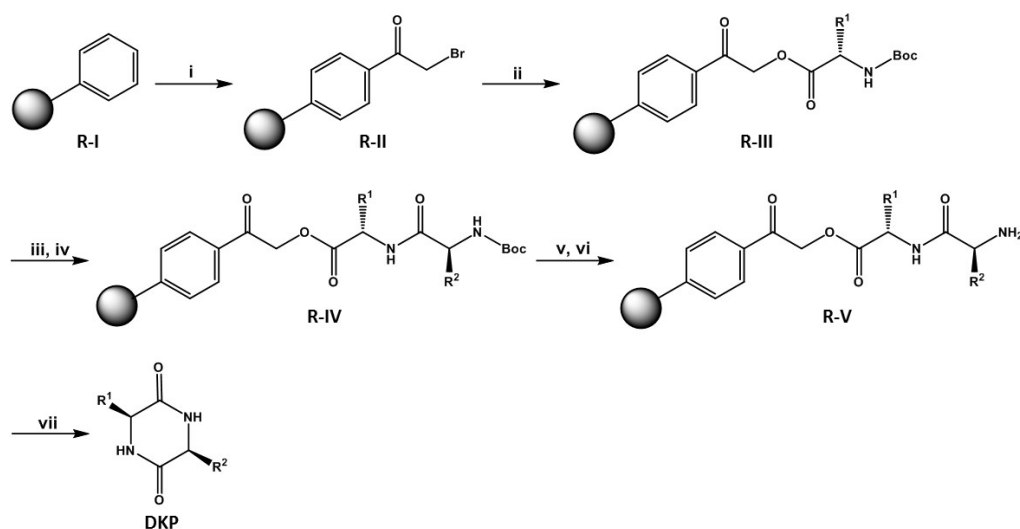
Aliphatischer oder aromatischer Rest	Wasserstoffbrückendonor oder Brønsted-Säure	Wasserstoffbrückenakzeptor oder Brønsted-Base
Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Pro, Phe, Trp, Tyr, Met	Ser, Thr, Cys, Glu, Gln, Asp, Asn, Tyr, Trp	His, Lys, Arg, Gln, Asn

Abbildung 26: Allgemeine Struktur von 2,5-Diketopiperazinen (links); R und R' stehen für die Seitenketten der proteinogenen Aminosäuren, hier unterteilt in ihre Eigenschaften (rechts).

Die Seitenketten der proteinogenen Aminosäuren lassen sich in drei Klassen mit unterschiedlichen Funktionen einteilen, wie in *Abbildung 26* dargestellt. Aliphatische und aromatische Reste können lipophile oder aromatische Substrate koordinieren und die Selbstassemblierung in wässrigen Medien unterstützen. Wasserstoffbrückendonoren und Brønsted-Säuren ermöglichen die allgemeine und spezifische Säure-Katalyse und können im deprotoniertem Zustand als Liganden für Metallkationen fungieren. Wasserstoffbrückenakzeptoren und Brønsted-Basen können allgemeine Basen- und Imin/Enamin-Katalyse ermöglichen und als Liganden für Metallkationen dienen.

Die Synthese der in dieser Arbeit verwendeten DKPs erfolgte durch Festphasen-Peptidsynthese (*Schema 2*) und wird in *Kapitel 5.1.5* ausführlich beschrieben. Für die Synthese wurde eine Bromacetyl-Festphase in Kombination mit einer Boc-Schutzgruppenstrategie verwendet. Ausgehend von kommerziell erhältlichem Polystyrolharz (**R-I**) erfolgte die Funktionalisierung über eine Friedel-Crafts Acetylierung mit

Bromacetylbromid. An die resultierenden Bromacetyl-Festphase (**R-II**) wurde die erste N^α-Boc-geschützte Aminosäure (AS¹) durch nukleophile Substitution unter basischen Bedingungen gekuppelt. Die Boc-Schutzgruppe der Festphase **R-III** wurde mit 3 M HCl in EtOAc abgespalten. Die zweite N^α-Boc-geschützte Aminosäure (AS²) wurde anschließend mit HBTU als Aktivierungsreagenz und DIPEA als Base auf die Festphase gekuppelt. Die N-terminale Boc-Schutzgruppe der Festphase **R-IV** wurde analog zu **R-III** unter sauren Bedingungen abgespalten. Die resultierenden Hydrochloridsalze von **R-IV** wurden im Folgeschritt mit DIPEA basisch gestellt und mit EtOAc/EtOH (1 : 1 (v/v)) gewaschen, um das freie Amin zu generieren und das Chloridsalz zu entfernen. Die Abspaltung des Dipeptids unter gleichzeitiger Zyklisierung erfolgte durch das Rühren der Festphase **R-V** mit 5% Triethylamin in einer THF-Wasser-Mischung für 24 Stunden. Das Mischungsverhältnis von THF zu Wasser wurde dabei der Polarität des resultierenden Peptids angepasst.



Schema 2: Festphasen Peptidsynthese der DKPs ausgehend von Polystyrolharz **R-I** (Poly(styrol-divinylbenzen-copolymer, 2% DVB quervernetzt); i: BrCH₂COBr, AlCl₃, PhNO₂, 20 h; ii: Boc-AS¹-OH, NEt₃, DMF, 24 h; iii: 3 M HCl in EtOAc, 30 min; iv: Boc-AS²-OH, HBTU, DIPEA, DMF, 5 h; v: 3 M HCl in EtOAc, 30 min; vi: DIPEA, EtOAc/EtOH, 5 min; vii: NEt₃, THF/H₂O, 24 h; AS = Aminosäure, R¹ = Seitenkette von AS¹, R² = Seitenkette von AS², graue Kugel = Polystyrolharz.

Die resultierende Bromacetyl-Festphase **R-II** bietet für die Synthese der DKPs große Vorteile. Die Bromid-Funktionalisierung ermöglicht es, die erste Aminosäure mit annähernd quantitativer Ausbeute und unter milden Bedingungen an die Festphase zu kuppeln, ohne diese vorher aktivieren zu müssen.^[252] Ferner ist der resultierende Phenylacetyl-Linker labil gegenüber guten Nukleophilen, stabil unter sauren Bedingungen und ermöglicht eine Spaltung des Peptids von der Festphase **R-V** bei zeitgleicher Zyklisierung mit einem Minimum an Nebenprodukten.^[253] Diese Strategie wurde von Liu *et al.* entwickelt, konnte aber nicht mit zufriedenstellenden Ergebnissen reproduziert werden. Die literaturbekannte SPPS-Synthese der Diketopiperazine wurde an verschiedenen Stellen modifiziert um befriedigende Ausbeuten und Reinheiten zu erhalten. Die vorgeschlagene Verwendung von DCC als Aktivierungsreagenz wurde vermieden, da sich der resultierende Dicyclohexyl-Harnstoff

aufgrund der schlechten Löslichkeit über viele Folgeschritte verschleppt. Stattdessen wurde HBTU als Aktivierungsreagenz für die Kupplung der Aminosäurederivate AS¹ und AS² an **R-II** bzw. **R-III** verwendet. Ein weiteres Problem der ursprünglichen Synthese war das nach der Entschützung und der basischen Behandlung von **R-IV** resultierende DIPEA-Hydrochlorid. Dieses ist im vorgeschlagenen Lösungsmittel (95% EtOH) unlöslich und bleibt auf der Festphase zurück.^[253] DIPEA*HCl und NEt₃*HCl wurden folglich in großen Mengen im Rohprodukt gefunden. Deshalb wurde das Lösungsmittel für die Neutralisierung mit Erfolg von 95% EtOH auf EtOH/EtOAc (1 : 1 (v/v)) geändert.

Die Strukturen der in dieser Arbeit synthetisierten DKPs **1 - 25** sind in *Abbildung 27* dargestellt. Es wurden in erster Linie Phe-beinhaltenden DKPs synthetisiert (DKP **1 - 14**). Die DKPs **2 - 7** wurden aus Phenylalanin und Ser, Cys, Glu, His, Lys und Asp aufgebaut, um eine Funktionalität möglicher Assemblate zu gewährleisten. Weiterhin wurden DKPs synthetisiert, die neben Phe eine weitere lipophile Aminosäure wie Val, Phe oder Tyr enthalten (DKP **1, 8 - 11**), um eine größere Basis für die Untersuchung der selbstassemblierenden Eigenschaften von DKPs zu erhalten. Die Diastereomere von Cyclo[Phe-His] (**5, 12 - 14**) wurden synthetisiert, um den Einfluss der Stereochemie auf die Selbstassemblierung zu untersuchen. Für den Aufbau von DKP **15 - 21** wurden die lipophilen Aminosäuren Gly, Val, Leu und Trp mit Aminosäurebausteinen mit funktionellen Gruppen (His, Cys und Glu) kombiniert, um den Einfluss dieser lipophilen Aminosäure auf die Selbstassemblierung zu untersuchen. Weiterhin wurden symmetrische DKPs wie **11** und **23 - 25** synthetisiert. Die Gesamtausbeuten ausgehend von der Bromacyl-funktionalisierten Festphase **R-II** variieren von 19% - 64% (*Tabelle 2*). Da der Grad der Funktionalisierung der verwendeten Festphasen nicht genauer untersucht wurde und die Kupplungsbedingungen für die einzelnen Peptide nicht optimiert wurden, konnten keine vergleichenden Rückschlüsse von der Sequenz und den verwendeten Schutzgruppen auf die Ausbeuten gezogen werden.

Die Verwendung des Phenylacyl-Linkers in der SPPS bedingt Boc-Schutzgruppen als temporäre N^α-Schutzgruppen, da diese unter leicht bis mäßig sauren Bedingungen abgespalten werden. Die Verwendung der Fmoc-Schutzgruppenchemie würde bei der Entschützung der zweiten Aminosäure unter basischen Bedingungen gleichzeitig zu einer unkontrollierten Abspaltung des Peptids führen. Die verwendeten Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen der jeweils ersten gekuppelten Aminosäuren sind orthogonal zu den Boc-Schutzgruppen (*Tabelle 2*). Für Asp-, Glu- und Ser-Bausteine wurden Benzylschutzgruppen verwendet, da sie gegenüber Säuren stabil sind und nach der Synthese hydrogenolytisch gespalten werden können. Die für das Cystein verwendete PMB-Schutzgruppe sowie die Trt-Schutzgruppe am Imidazolring des Histidins sind stabil unter

leicht bis mäßig sauren Bedingungen, lassen sich jedoch unter stark sauren Bedingungen abspalten (pseudo-orthogonale Schutzgruppen).

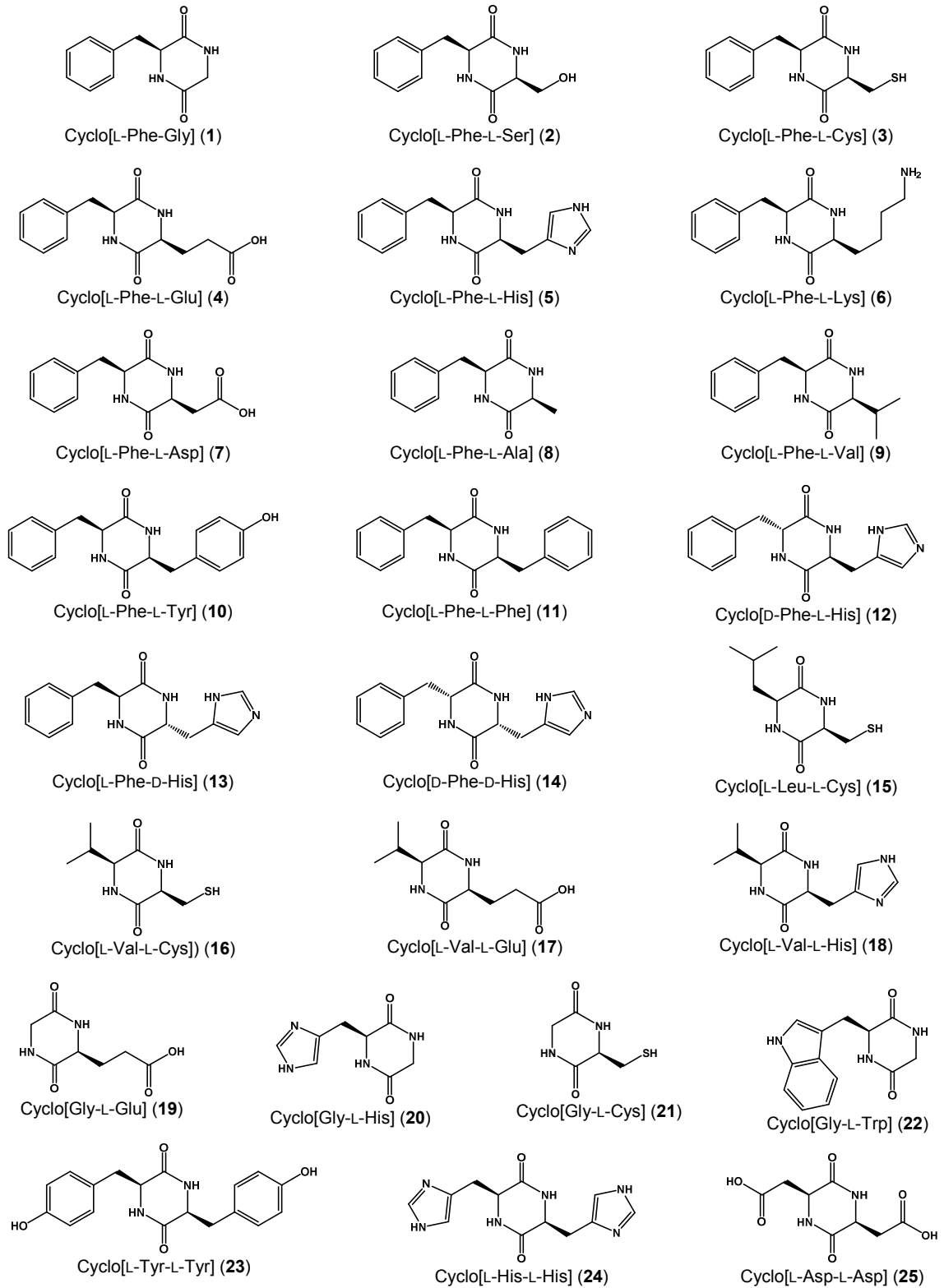


Abbildung 27: Übersicht der synthetisierten DKPs 1 - 25.

Für die Kupplung der zweiten (*N*-terminalen) Aminosäure muss keine orthogonale Schutzgruppenchemie angewendet werden, da die funktionellen Gruppen der Seitenketten

mit der Zyklisierung des Peptids über den *N*-Terminus nicht konkurrieren. Da die Darstellung des orthogonal geschützten Derivats Boc-His(Trt)-OH zudem sehr aufwendig ist, wurde nach ersten Synthesen mit diesem Baustein das einfacher zugängliche Boc-His(Boc)-OH verwendet. Für die Kupplung von Lys-Bausteinen an zweiter Position wurde ebenfalls das symmetrisch geschützte Derivat Boc-Lys(Boc)-OH verwendet.

Tabelle 2: Übersicht der synthetisierten DKPs **1 - 25**, der verwendeten Aminosäure-Bausteine und Schutzgruppen sowie Ausbeuten; die Ausbeute entspricht der Gesamtausbeute ausgehend von der Bromacetyl-Festphase **R-II**.

Eintrag	Diketopiperazin	Aminosäure 1	Aminosäure 2	Ausbeute
1	Cyclo[L-Phe-Gly] (1)	Boc-L-Phe-OH	Boc-Gly-OH	64%
2	Cyclo[L-Phe-L-Ser] (2)	Boc-L-Phe-OH	Boc-L-Ser(Bzl)-OH	50%
3	Cyclo[L-Phe-L-Cys] (3)	Boc-L-Phe-OH	Boc-L-Cys(PMB)-OH	45%
4	Cyclo[L-Phe-L-Glu] (4)	Boc-L-Phe-OH	Boc-L-Glu(OBzl)-OH	33%
5	Cyclo[L-Phe-L-His] (5)	Boc-L-Phe-OH	Boc-L-His(Boc)-OH	51%
6	Cyclo[L-Phe-L-Lys] (6)	Boc-L-Phe-OH	Boc-L-Lys(Boc)-OH	54%
7	Cyclo[L-Phe-L-Asp] (7)	Boc-L-Asp(OBzl)-OH	Boc-L-Phe-OH	47%
8	Cyclo[L-Phe-L-Ala] (8)	Boc-L-Phe-OH	Boc-L-Ala-OH	49%
9	Cyclo[L-Phe-L-Val] (9)	Boc-L-Phe-OH	Boc-L-Val-OH	32%
10	Cyclo[L-Phe-L-Tyr] (10)	Boc-L-Phe-OH	Boc-L-Tyr(Bzl)-OH	60%
11	Cyclo[L-Phe-L-Phe] (11)	Boc-L-Phe-OH	Boc-L-Phe-OH	23%
12	Cyclo[D-Phe-L-His] (12)	Boc-D-Phe-OH	Boc-L-His(Boc)-OH	48%
13	Cyclo[L-Phe-D-His] (13)	Boc-L-Phe-OH	Boc-D-His(Boc)-OH	43%
14	Cyclo[D-Phe-D-His] (14)	Boc-D-Phe-OH	Boc-D-His(Boc)-OH	39%
15	Cyclo[L-Leu-L-Cys] (15)	Boc-L-Leu-OH*H ₂ O	Boc-L-Cys(PMB)-OH	19%
16	Cyclo[L-Val-L-Cys] (16)	Boc-L-Cys(PMB)-OH	Boc-L-Val-OH	30%
17	Cyclo[L-Val-L-Glu] (17)	Boc-L-Glu(OBzl)-OH	Boc-L-Val-OH	45%
18	Cyclo[L-Val-L-His] (18)	Boc-L-His(Trt)-OH	Boc-L-Val-OH	43%
19	Cyclo[Gly-L-Glu] (19)	Boc-L-Glu(OBzl)-OH	Boc-Gly-OH	34%
20	Cyclo[Gly-L-His] (20)	Boc-L-His(Trt)-OH	Boc-Gly-OH	44%
21	Cyclo[Gly-L-Cys] (21)	Boc-Gly-OH	Boc-L-Cys(PMB)-OH	24%
22	Cyclo[Gly-L-Trp] (22)	Boc-L-Trp-OH	Boc-Gly-OH	30%
23	Cyclo[L-Tyr-L-Tyr] (23)	Boc-L-Tyr(Bzl)-OH	Boc-L-Tyr(Bzl)-OH	44%
24	Cyclo[L-His-L-His] (24)	Boc-L-His(Trt)-OH	Boc-L-His(Trt)-OH	41%
25	Cyclo[L-Asp-L-Asp] (25)	Boc-L-Asp(OBzl)-OH	Boc-L-Asp(OBzl)-OH	30%

3.1.2 Hydrogelbildung

DKPs waren bereits vor Beginn dieser Arbeit als organische Gelatoren bekannt und zeigen damit grundsätzlich eine starke Tendenz zur Selbstassemblierung und der Bildung von

supramolekularen Aggregaten.^[44-45] Um die Fähigkeit der verschiedenen DKPs zur Selbstassemblierung unter präbiotischen Bedingungen zu untersuchen, wurden zu Beginn Experimente zu deren Gelierung in Wasser durchgeführt. Auf diese Weise kann der recht komplexe und auf molekularer Ebene schwer zu charakterisierende Prozess der Selbstassemblierung einfach nachgewiesen werden, da die Gelbildung ein „Phänotyp“ der Assemblierung ist.

In ersten Vorversuchen wurde untersucht, welche DKPs die Fähigkeit besitzen Hydrogele zu bilden. Hierfür wurde eine wässrige Suspension des jeweiligen DKPs in einem geschlossenen Schraubdeckelglas erhitzt, bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Anschließend wurde die Lösung im Eisbad abgekühlt. Durch Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde überprüft, ob die übersättigte Lösung ein Hydrogel gebildet hat. Wenn kein gravitationsbedingter Fluss zu beobachten war, wurde die Mischung als Gel definiert. Die Ergebnisse der Vorversuche von allen untersuchten DKPs sind in *Tabelle 3* zusammengefasst.

Das Vorhandensein einer aromatischen Gruppe scheint für die Gelbildung essentiell zu sein. Fast alle untersuchten Phe-beinhaltenden DKPs und einige Tyr-beinhaltende DKPs können Gele bilden. DKPs ohne eine aromatische Seitenkette gelieren nicht. Trotz aromatischer Gruppen konnten für die DKPs Cyclo[L-Phe-L-Tyr] (**10**) und Cyclo[L-Phe-L-Phe] (**11**) (Einträge 10 und 11) keine Hydrogele beobachtet werden. Diese Beobachtung zeigt, dass die Balance zwischen Hydro- und Lipophilie einen wichtigen Grundsatz für die Fähigkeit darstellt, ein Hydrogel bilden zu können. Yang *et al.* haben bei der Untersuchung kurzer linearer Peptide gezeigt, dass mit zunehmender Anzahl an Phe im Peptid die Gelbildung aufgrund erhöhter Hydrophobie erst erschwert und schließlich vollständig verhindert werden kann.^[183] Ein Vergleich der DKPs **5**, **12**, **13** und **14** zeigt weiterhin, dass die Stereochemie nicht zu vernachlässigen ist. Die homochiralen Enantiomere **5** und **14** bilden stabile Gele, die entsprechenden heterochiralen Diastereomere **12** und **13** sind dazu nicht in der Lage. Carny und Gazit haben eine ähnliche Beobachtung für die vier möglichen Diastereomere des offenkettigen Diphenylalanin-Peptids (H-Phe-Phe-OH) beschrieben. Die homochiralen Dipeptide zeigten eine gute Selbstassemblierung in Wasser, während die heterochiralen Diastereomere keine Neigung zur Selbstassemblierung zeigten.^[58] Diese Eigenschaft spiegelt sich in der Homochiralität aller lebender Organismen wider und ist eine interessante Entdeckung vor dem Hintergrund der Entstehung des Lebens.

Weiterhin wird die Hydrogelbildung stark von dem pH-Wert der verwendeten Lösung beeinflusst, falls saure oder basische Gruppen vorhanden sind (wie in DKP **4**, **5** und **6**). Eine zusätzliche Ladung kann die Löslichkeit drastisch erhöhen, im Fall von DKP **4** ist sogar ein präzise eingestellter pH-Wert von 6,0 nötig um eine Hydrogelbildung zu ermöglichen. Zudem

gibt es Ausnahmen wie DKP **7**, welche aus ungeklärten Gründen den kristallinen Zustand bevorzugen. Die Bildung eines Hydrogels anhand der Molekülstruktur scheint also nicht sicher vorhersagbar. In den ersten Untersuchungen haben die Phe-basierten DKPs **1 - 6** mit den hydrophilen Aminosäuren Glycin (**1**), Serin (**2**), Cystein (**3**), Glutamat (**4**), Histidin (**5**) und Lysin (**6**) stabile Hydrogele gebildet (*Abbildung 28*).

Tabelle 3: Vorversuche zu den Gel-bildenden Eigenschaften verschiedener DKPs nach der „tube inversion method“; Allgemeine Versuchsbedingungen: 4 mg DKP pro 96 mg H₂O (4,0 Gew-%) wenn nicht anders vermerkt; G = Hydrogel, S = Suspension.

Eintrag	Diketopiperazin	Ergebnis	Kommentar
1	Cyclo[L-Phe-Gly] (1)	G	Undurchsichtiges Gel
2	Cyclo[L-Phe-L-Ser] (2)	G	Undurchsichtiges Gel
3	Cyclo[L-Phe-L-Cys] (3)	G	Undurchsichtiges Gel, 2,0 Gew-%
4	Cyclo[L-Phe-L-Glu] (4)	G	Klares Gel ⁱ
5	Cyclo[L-Phe-L-His] (5)	G	Trübes Gel
6	Cyclo[L-Phe-L-Lys] (6)	G	Klares Gel
7	Cyclo[L-Phe-L-Asp] (7)	G	Klares Gel
8	Cyclo[L-Phe-L-Ala] (8)	S	Kristalliner Niederschlag
9	Cyclo[L-Phe-L-Val] (9)	G	Undurchsichtiges Gel, 1,0 Gew-%
10	Cyclo[L-Phe-L-Tyr] (10)	S ⁱⁱ	Sehr schlecht löslich in H ₂ O
11	Cyclo[L-Phe-L-Phe] (11)	S	Unlöslich in H ₂ O
12	Cyclo[D-Phe-L-His] (12)	S ⁱⁱ	Gel-artiger Niederschlag
13	Cyclo[L-Phe-D-His] (13)	S ⁱⁱ	Gel-artiger Niederschlag
14	Cyclo[D-Phe-D-His] (14)	G	Trübes Gel
15	Cyclo[L-Leu-L-Cys] (15)	S	
16	Cyclo[L-Val-L-Cys] (16)	S	
17	Cyclo[L-Val-L-Glu] (17)	S	
18	Cyclo[L-Val-L-His] (18)	S	
19	Cyclo[Gly-L-Glu] (19)	S	
20	Cyclo[Gly-L-His] (20)	S	
21	Cyclo[Gly-L-Cys] (21)	S	
22	Cyclo[Gly-L-Trp] (22)	S	
23	Cyclo[L-Tyr-L-Tyr] (23)	G	Klares Gel, 1,0 Gew-%
24	Cyclo[L-His-L-His] (24)	S	
25	Cyclo[L-Asp-L-Asp] (25)	S	

ⁱIn reinem Wasser bildet sich eine undurchsichtige mikrokristalline Masse, welche den „tube inversion“-Test bestand (vgl. *Kapitel 5.1.2*); Versuche in Phosphatpuffer bei pH = 6,0 ergaben ein klares Hydrogel; ⁱⁱ Unabhängig von der Konzentration konnte kein stabiles Hydrogel erhalten werden.

DKPs **1 - 3** und **5** bilden trübe Hydrogele, während das Glutamat-beinhaltende DKP **4** (pH 6,0 in Phosphatpuffer) und das Lysin-beinhaltende DKP **6** transparente Hydrogele bilden. Obwohl im weiteren Verlauf der Untersuchungen neben den DKPs **1 - 6** weitere gelbildende DKPs

gefunden wurden (DKPs **7**, **9**, **14** und **24**), beschränkt sich die ausführliche Charakterisierung auf die Hydrogele **1 - 6**.

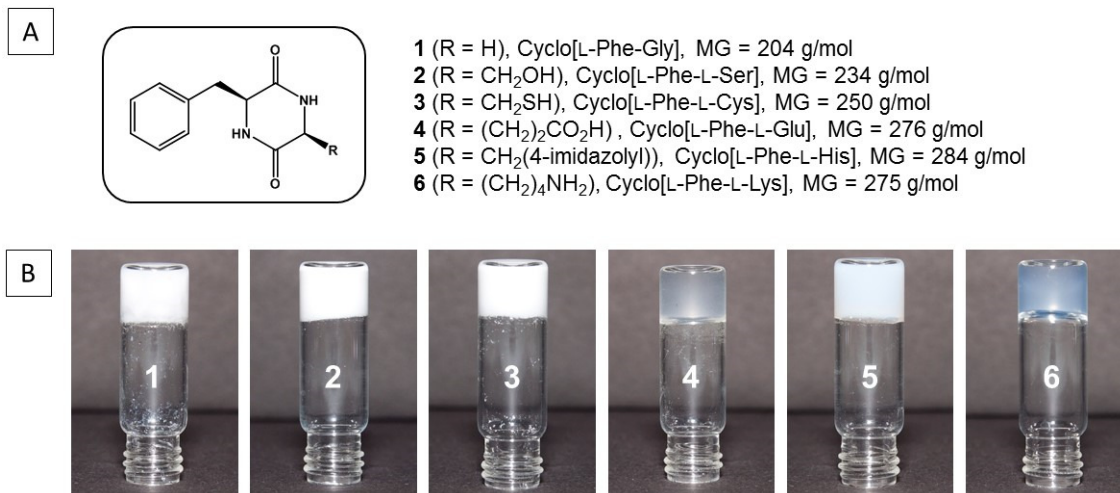


Abbildung 28: (A) Struktur, Bezeichnung und Molekulargewichte der hydrogelbildenden DKPs **1 - 6**; (B) makroskopische Erscheinung der Hydrogele **1 - 6**. (B): Reproduced from A. J. Kleinsmann, B. J. Nachtsheim, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7818-7820 with permission from The Royal Society of Chemistry.

Um die thermische Stabilität sowie den Konzentrationsbereich einer effektiven Gelbildung zu bestimmen, wurde die Sol-Gel-Übergangstemperatur (T_{SG}) der DKP-Lösungen systematisch als Funktion der Konzentration untersucht (*Abbildung 29*). Die minimale Gelator-Konzentration (MGK) entspricht der minimalen Konzentration, bei der sich ein Hydrogel bilden kann.

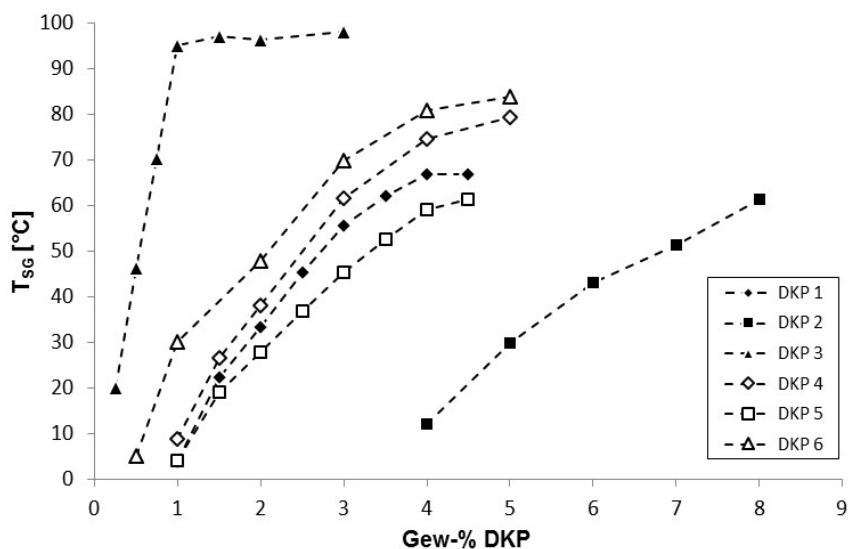


Abbildung 29: Sol-Gel-Übergangstemperatur in Abhängigkeit von der verwendeten DKP-Konzentration in Gewichtsprozent; Lösungsmittel für DKP **4**: 1,0 M Phosphatpuffer pH = 6,0 und für DKP **1 - 3**, **5**, **6**: reines Wasser. Adapted from A. J. Kleinsmann, B. J. Nachtsheim, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7818-7820 with permission from The Royal Society of Chemistry.

Die untersuchten DKPs zeigten durchweg reversible Sol-Gel-Phasenübergänge durch abwechselndes Kühlen und Erhitzen. Cyclo[L-Phe-L-Cys] (**3**) stellte sich bei dieser Untersuchung als der effektivste Hydrogelator heraus, da ein stabiles Hydrogel bis zu einer

bemerkenswert geringen Konzentration von nur 0,25 Gew-% erhalten wurde. Weiterhin zeigt Hydrogel **3** eine beeindruckend hohe T_{SG} von bis zu 100 °C bei 1,0 Gew-%. Im Gegensatz dazu wurde das entsprechende Serin-beinhaltende DKP **2** als der am wenigsten effiziente Hydrogelator identifiziert, da hohe Konzentrationen (mindestens 4,0 Gew-%) für die Bildung eines Hydrogels nötig waren und eine niedrige T_{SG} resultiert. Cyclo[L-Phe-L-Gly] (**1**) trägt keine funktionelle Gruppe und bildet bis zu der MGK von 1,0 Gew-% stabile Hydrogele. Mit Ausnahme der Hydrogele **2** und **3** zeigen die hier vorgestellten DKP-Hydrogele ein recht ähnliches Verhalten mit einer MGK von etwa 1,0 Gew-% und einem Sättigungseffekt der Gelbildung bei ca. 4 Gew-%. Bis auf DKP **2** bilden alle DKPs Hydrogele bei Raumtemperatur mit Konzentrationen unter 2,0 Gew-%.

3.1.3 Morphologie der Xerogelee

Die Untersuchung der Morphologie der gefriergetrockneten Hydrogele (Xerogelee) bringt verschiedene Erkenntnisse mit sich. In erster Linie zeigen sich mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (üblicherweise REM oder TEM) die miteinander verwobenen Fasern, sowie im Idealfall das resultierende dreidimensionale Netzwerk, aus dem das Hydrogel aufgebaut ist. So kann im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten (tube inversion method, T_{SG} -Bestimmung) ein direkter und eindeutiger Nachweis erhalten werden, ob es sich bei der Probe um ein klassisches Hydrogel handelt.

Die REM-Aufnahmen der Xerogelee **1** - **6** sind in *Abbildung 30* dargestellt. Das Xerogel **1** zeigt poröse aber hochgeordnete Ebenen, jede Ebene besteht aus miteinander verwobenen Nanofasern (*Abbildung 30A+B*). Xerogel **2** zeigt eine ähnliche, aber versetzte Ebenenstruktur, welche aus verzweigten Nanofasern mit mikrokristallinen Anteilen besteht (*Abbildung 30C+D*). Das Xerogel von DKP **3** ist aus undefinierten Flocken im Nanometerbereich aufgebaut (*Abbildung 30E+F*), während das Glutamat-beinhaltende Xerogel **4** bei pH 6,0 eine definierte schwammartige Struktur bildet (*Abbildung 30G+H*).

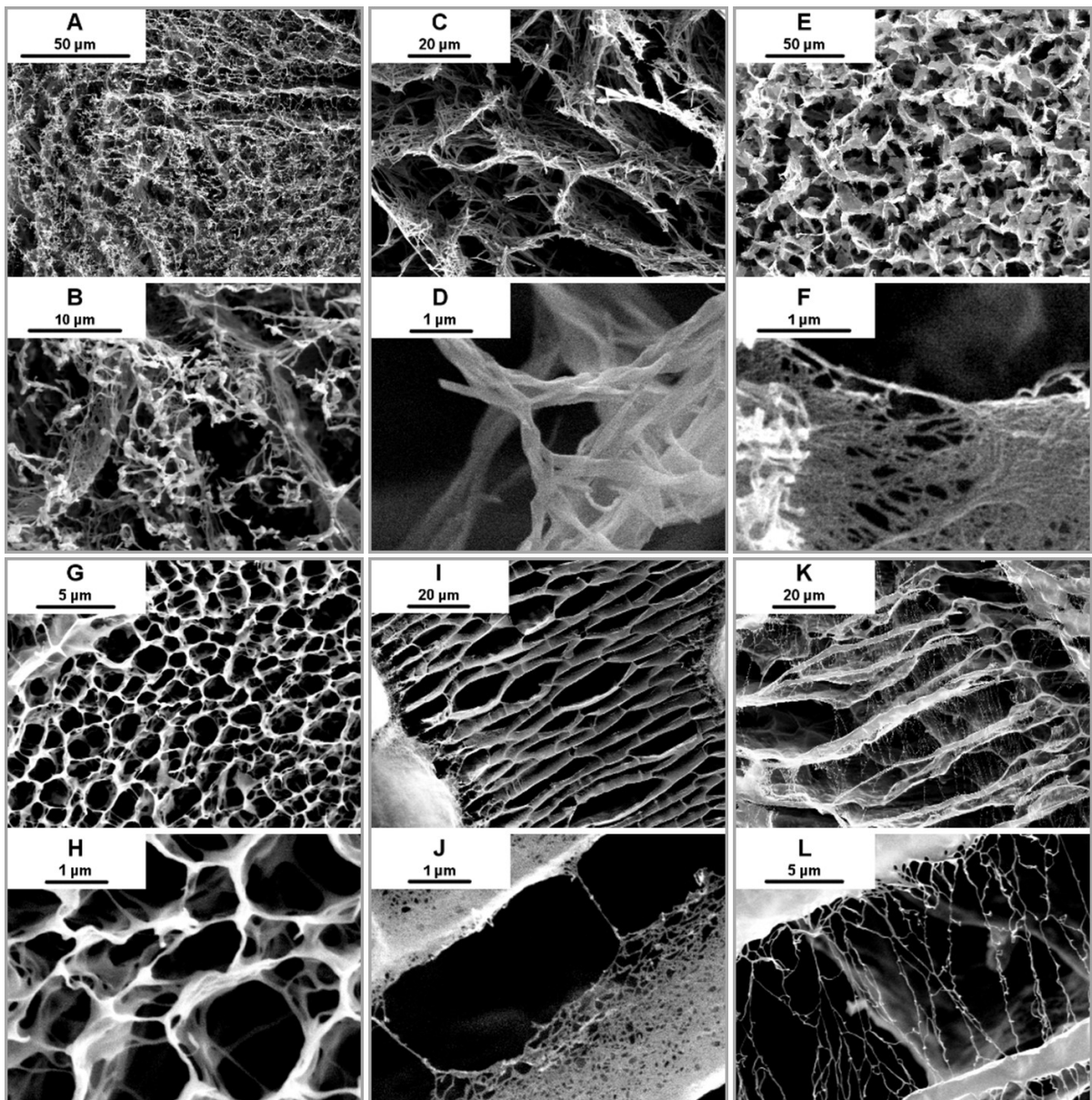


Abbildung 30: REM-Aufnahmen der Xerogele 1 - 6; (A) und (B): Xerogel 1 (1,5 Gew-%); (C) und (D): Xerogel 2 (4,0 Gew-%); (E) und (F): Xerogel 3 (1,5 Gew-%); (G) und (H): Xerogel 4 (4,0 Gew-%, pH = 6 mit NaHCO₃); (I) und (J): Xerogel 5 (1,5 Gew-%); (K) und (L): Xerogel 6 (0,75 Gew-%). (A) - (L): Reproduced from A. J. Kleinsmann, B. J. Nachtsheim, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7818-7820 with permission from The Royal Society of Chemistry.

Mit Hilfe von REM-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem vermeintlichen Hydrogel 4 in reinem Wasser um eine mikrokristalline Paste handelt, die in der Lage ist Wasser zu immobilisieren (*Abbildung 31*). Erst wenn der pH-Wert der Lösung auf pH = 6,0 eingestellt wird, bildet sich tatsächlich ein klares Hydrogel, was durch die REM-Aufnahmen bestätigt wurde. Dieses Beispiel verdeutlicht den Vorteil der REM-Aufnahmen gegenüber der „tube inversion method“. DKPs 5 und 6 bilden dichte, lamellenartige Ebenen, die von gebündelten Nanofasern zwischen den Ebenen verbunden sind (*Abbildung 30I-L*).

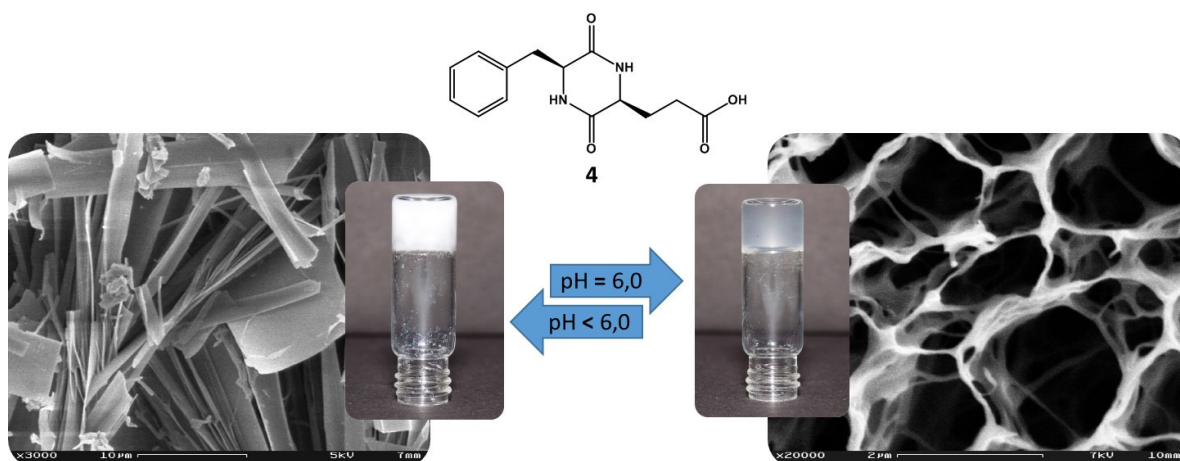


Abbildung 31: REM-Aufnahmen gefriergetrockneter Proben von DKP **4** (Cyclo[L-Phe-L-Glu]) als mikrokristalline Paste (1,5 Gew-% in H₂O (pH = 4)) (links) und als Hydrogel (4,0 Gew-% in H₂O mit gesättigter NaHCO₃-Lösung auf pH = 6 eingestellt).

3.1.4 Viskoelastische Eigenschaften

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei DKPs **1 - 6** um potente Hydrogelatoren handelt, wurden die viskoelastischen Eigenschaften der resultierenden Gele rheologisch intensiv studiert. Bei den rheologischen Experimenten wurden die Konzentrationen der DKPs so gewählt, dass sich die warmen Lösungen einerseits gut verarbeiten ließen und andererseits bei Raumtemperatur ein stabiles Gel bilden. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit (bzw. MGK, siehe *Abbildung 29*) der DKPs, weichen die verwendeten Konzentrationen voneinander ab.

3.1.4.1 Zeitsweep-Experimente

Zunächst wurde für jedes DKP-Hydrogel ein Zeitsweep-Experiment durchgeführt. Hier wird G' über die Zeit bei geringer konstanter Deformation (0,05%) und Winkelfrequenz (10 rad/s) gemessen. Die Gele wurden hierfür direkt auf dem Rheometer durch das Abkühlen einer heißen DKP-Lösung auf der Rheometer-Platte gebildet und direkt im Anschluss gemessen. Für die hier vorgestellten hydrogelbildenden DKPs **1 - 6** wurde die zeitabhängige Veränderung der Gelstärke direkt nach ihrer Bildung anhand der G' -Werte in Zeitsweep-Experimenten verfolgt, um das Alterungsverhalten zu beobachten.

Die zeitabhängigen Experimente zeigen einen starken Anstieg der G' -Werte für alle untersuchten Hydrogele in den ersten Minuten (*Abbildung 32*). Nach einer halben Stunde haben sich die viskoelastischen Eigenschaften der Hydrogele **1 - 5** (*Abbildung 32A-E*) stabilisiert und es wurden konstante G' -Werte beobachtet. Die Hydrogele **2** (*B*) und **5** (*E*) weisen sogar schon nach 5 bzw. 10 Minuten annähernd konstante Werte auf. Die große Ausnahme bildet das Lys-beinhaltende DKP **6**, welches erst nach 20 h konstante G' -Werte aufweist. Das frisch hergestellte Hydrogel zeigt direkt nach der Gelbildung ein geringes

Speichermodul von 700 Pa auf, welches nach einer Alterungszeit von 20 h auf bis zu 150 kPa (den 200-fachen Wert) steigt. Die bemerkenswert alterungsabhängigen viskoelastischen Eigenschaften von Hydrogel **6** wurden auch in folgenden Amplitudensweep- und Regenerations-Experimenten genauer untersucht. Aufgrund dieser Beobachtung wurden Hydrogele **1 - 5** bei anschließenden Experimenten für 30 min vor den Messungen gealtert, DKP-Hydrogel **6** jedoch, je nach Experiment, für 30 min oder 20 h.

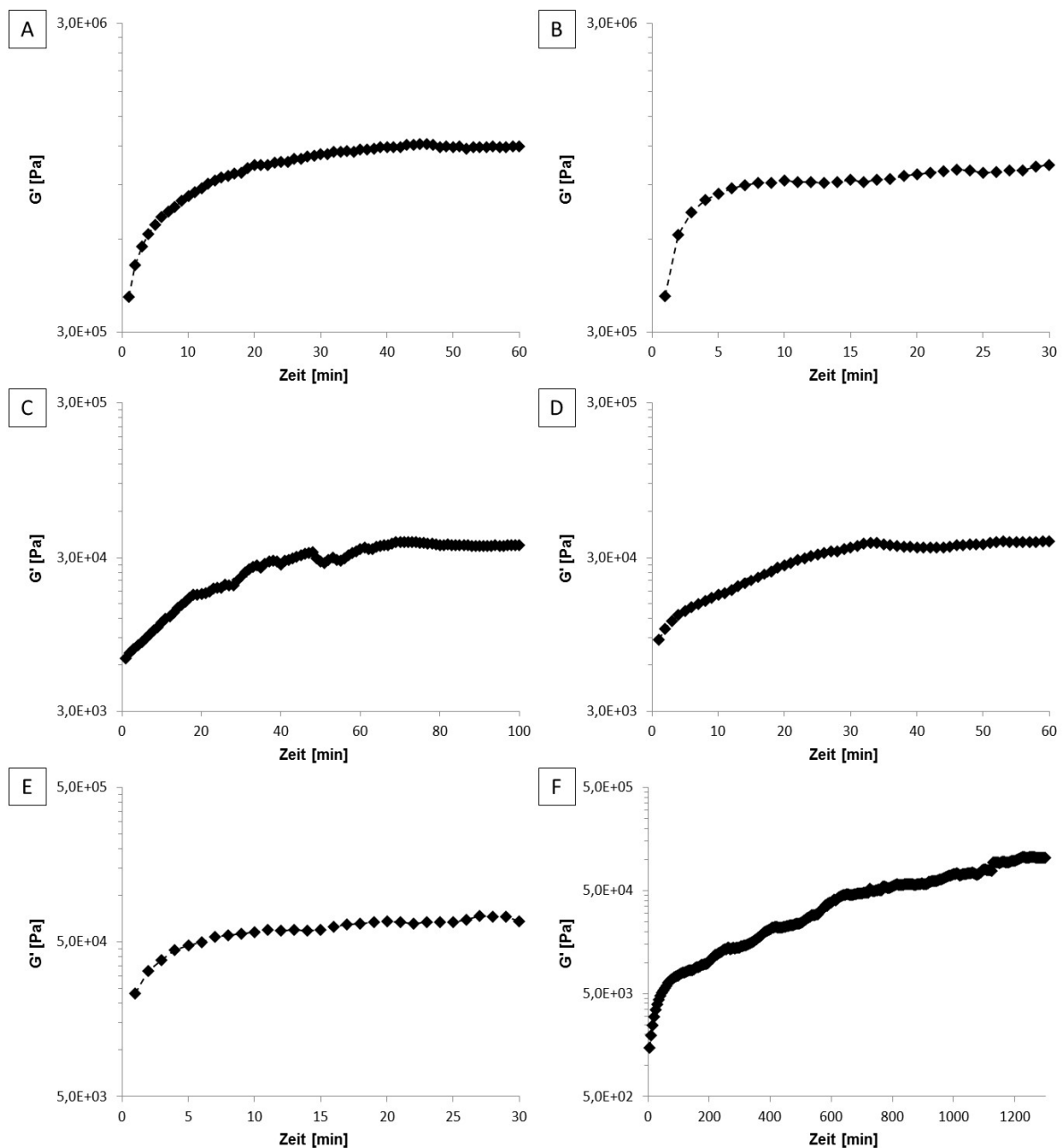


Abbildung 32: Zeitsweep-Experimente der Hydrogele **1 - 6**; (A) Hydrogel **1** (1,5 Gew-%); (B) Hydrogel **2** (5,0 Gew-%); (C) Hydrogel **3** (0,5 Gew-%); (D) Hydrogel **4** (4,0 Gew-% in 1 M Phosphatpuffer pH = 6,0); (E) Hydrogel **5** (1,5 Gew-%); (F) Hydrogel **6** (1,5 Gew-%); Deformation = 0,05%, Winkelfrequenz = 10 rad/s.

3.1.4.2 Frequenzsweep-Experimente

In den Frequenzsweep-Experimenten der Hydrogele **1 - 6** wurde die Deformation konstant gehalten (0,05%) und die Winkelfrequenz variiert (0,1 - 100 rad/s) (Abbildung 33). Die Messungen zeigen, dass die G' -Werte über den gesamten Frequenzbereich deutlich größer als die G'' -Werte sind. Dies ist eine typische Eigenschaft von Gelen.^[248] G' und G'' zeigen weiterhin ein annähernd lineares Verhalten über den untersuchten Frequenzbereich. Bei Messfrequenzen von < 1 rad/s nähern sich G' und G'' leicht an. Diese Beobachtung deutet an, dass sich die Hydrogele bei sehr kleinen Messfrequenzen geringfügig mehr wie viskose Flüssigkeiten verhalten als bei mittleren und hohen Frequenzen. Trotzdem überwiegt der feste und elastische Anteil über den gesamten Frequenzbereich.

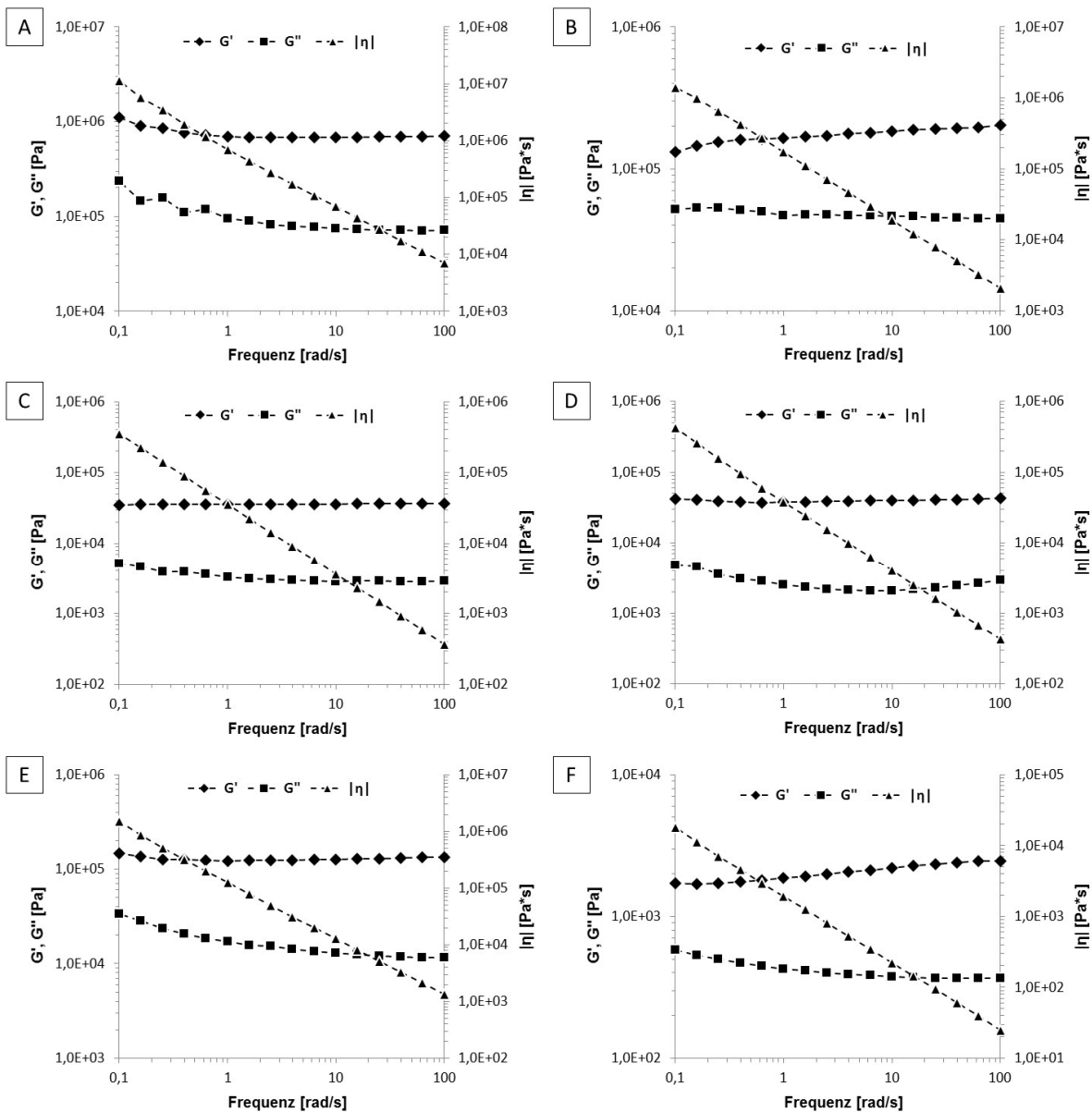


Abbildung 33: Frequenzsweep-Experimente der Hydrogele **1 - 6**; (A) Hydrogel **1** (1,5 Gew-%); (B) Hydrogel **2** (5,0 Gew-%); (C) Hydrogel **3** (0,5 Gew-%); (D) Hydrogel **4** (4,0 Gew-% in 1 M Phosphatpuffer pH = 6,0); (E) Hydrogel **5** (1,5 Gew-%); (F) Hydrogel **6** (1,5 Gew-%, 30 min gealtert); Deformation = 0,05%.

Die geringe Abhängigkeit der G' - und G'' -Werte von der Winkelfrequenz weist darauf hin, dass die Gel-Matrix eine exzellente Toleranz gegenüber externen mechanischen Einflüssen besitzt.^[146, 254] Die komplexe Viskosität $|\eta|$ zeigt keine Plateaus und sinkt bei steigender Frequenz mit einer Steigung von -1, was eine weitere charakteristische Eigenschaft von Gelen darstellt.^[185] Die DKP-Hydrogele **2 - 5** weisen mit $10^4 - 10^5$ Pa eine beeindruckende Größenordnung der G' -Werte auf und sind damit vergleichbar mit den stärksten Peptid-basierten Hydrogelen ($10^4 - 10^5$ Pa). Wenn Hydrogel **6** nach einer Alterungszeit von 30 min gemessen wird, liegt der G' -Wert mit 10^3 Pa (*Abbildung 33F*) bei einer mittelmäßigen Gelstärke.^[149, 179, 184, 255] Nach 20 h Stunden Alterung steigt dieser Wert jedoch auf 10^5 Pa (*Abbildung 32F*). Das Hydrogel **1** ist das stärkste DKP-Hydrogel mit einem G' -Wert von 10^6 Pa und stellt damit eines der stabilsten Gele in seiner Kategorie dar.^[104, 146, 177, 185]

3.1.4.3 Amplitudensweep-Experimente

Die Amplitudensweeps der Hydrogele **1 - 6** wurden bei einer konstanten Frequenz von 10 rad/s gemessen (*Abbildung 34*). Das Ser-beinhaltende Hydrogel **2** stellt trotz der hohen verwendeten Konzentration von 5,0 Gew-% das DKP-Hydrogel mit der geringsten Stabilität dar (LVB bis 0,3% Deformation, *Tabelle 4 Eintrag 2*). Der im Vergleich zu den anderen DKP-Hydrogelen sehr hohe Verlustfaktor $\tan(\delta)$ (G''/G') liegt über den Werten vergleichbarer literaturbekannter Gele und steigt bei einer Erhöhung der Deformation unmittelbar über den charakteristischen Wert für Gele von 10^{-1} .^[104, 146, 256] Dieses Verhalten deutet auf eine geringe Flexibilität der Nanofasern hin. In REM-Aufnahmen (*Abbildung 30*) lässt sich in Übereinstimmung mit dieser Beobachtung eine teilweise Kristallinität der Fasern vermuten. Der kristalline Anteil des dreidimensionalen Netzwerks ist vermutlich auch die Ursache des früheren Bindungsbruchs der Nanofasern (geringer LVB) und folglich dem Abbau des supramolekularen Netzwerks. Diese Eigenschaft der Fasern hat weiterhin Auswirkungen auf die im folgenden Kapitel vorgestellten Regenerationsexperimente. Im Kontrast zu DKP **2** bildet das Cys-beinhaltende DKP **3** mit nur 10% der Konzentration ein deutlich stabileres Hydrogel (LVB bis 0,9% Deformation, *Tabelle 4 Eintrag 3*) und der Verlustfaktor ist deutlich geringer als bei den anderen DKP-Hydrogelen. Der geringe Verlustfaktor deutet auf ein stärker elastisches Verhalten hin, das Material kann also mehr Deformationsenergie speichern und einer bis zu dreimal größeren Deformation widerstehen, ohne dass die physikalischen Bindungen des Netzwerks brechen. Es ist weiterhin bemerkenswert, dass sich die G' - und G'' -Kurven von Hydrogel **1, 3** und 30 min gealtertem Hydrogel **6** in dem gemessenen Bereich nicht schneiden ($\tan \delta < 0$). Im Gegensatz zu den meisten anderen Hydrogelen überwiegt also bis 100% Deformation der elastische Anteil und das Gel beginnt nicht zu fließen. Die Hydrogele **1, 4** und **5** zeigen größere linear-viskoelastische Bereiche von bis zu 2,1% Deformation und Verlustfaktoren zwischen den Werten von Hydrogel **2** und **3**

(vergleiche *Tabelle 4*). Da DKP **4** ausschließlich unter gepufferten Bedingungen bei pH 6 ein Hydrogel bildet und dabei teilweise deprotoniert vorliegt, musste im Unterschied zu Hydrogel **1** und **5** eine höhere DKP-Konzentration verwendet werden.

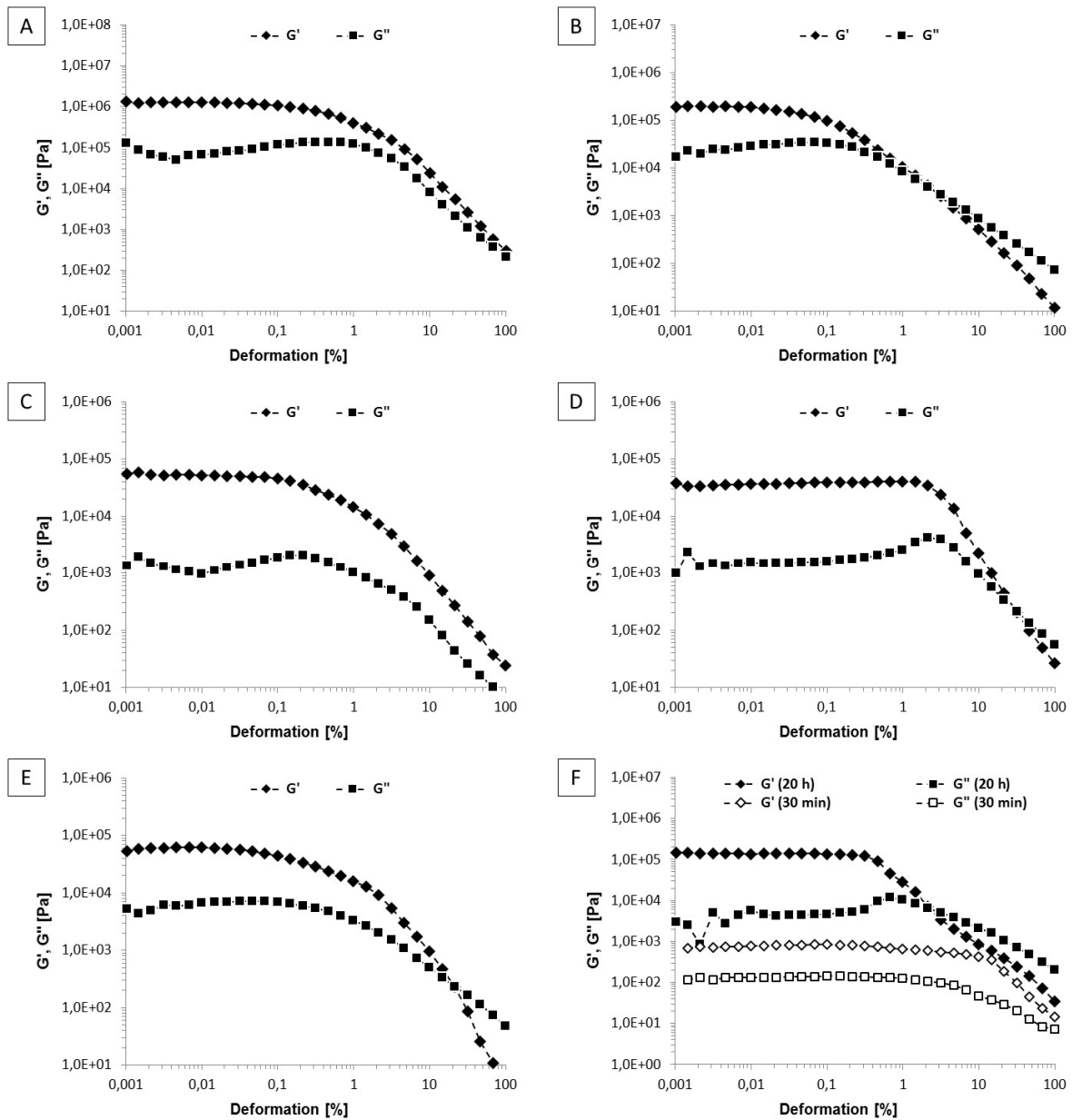


Abbildung 34: Amplitudensweep-Experimente der Hydrogele **1 - 6**; G' = Rauten, G'' = Quadrate; (A) Hydrogel **1** (1,5 Gew-%); (B) Hydrogel **2** (5,0 Gew-%); (C) Hydrogel **3** (0,5 Gew-%); (D) Hydrogel **4** (4,0 Gew-% in 1 M Phosphatpuffer pH = 6,0); (E) Hydrogel **5** (1,5 Gew-%); (F) Hydrogel **6** (1,5 Gew-%, 30 min und 20 h gealtert); Winkelfrequenz = 10 rad/s.

Die Amplitudensweep-Experimente von Hydrogel **6** zeigen stark alterungsabhängige Materialeigenschaften. Das frisch gebildete Hydrogel **6** zeigt den größten LVB ($\gamma_c = 10\%$) und damit die höchste mechanische Stabilität der untersuchten Proben. Selbst bei 100 % Deformation beginnt das Gel nicht zu fließen ($G' > G''$ über den gesamten gemessenen Bereich). Auf der anderen Seite sind G' und der Verlustfaktor deutlich geringer als bei den vergleichbaren, länger gealterten DKP-Hydrogelen. Insbesondere die Tatsache, dass der

Verlustfaktor den Grenzwert von 10^{-1} deutlich überschreitet zeigt, dass die Bildung des dreidimensionalen Netzwerks gerade erst begonnen hat und damit deutlich langsamer als bei den Hydrogelen **1 - 5** verläuft.

Tabelle 4: Übersicht der elementaren rheologischen Eigenschaften der Hydrogele **1 - 6**.

Eintrag	Diketopiperazin	Konzentration [Gew-%]	γ_c [% Def.]	G' [Pa]	$\tan \delta^i$	Fließpunkt [% Def.]
1	Cyclo[L-Phe-Gly] (1)	1,5	1,3	10^6	$5,3 \cdot 10^{-2}$	> 100
2	Cyclo[L-Phe-L-Ser] (2)	5,0	0,3	10^5	$1,5 \cdot 10^{-1}$	3
3	Cyclo[L-Phe-L-Cys] (3)	0,5	0,9	10^5	$1,9 \cdot 10^{-2}$	> 100
4	Cyclo[L-Phe-L-Glu] (4)	4,0	2,1	10^4	$4,4 \cdot 10^{-2}$	32
5	Cyclo[L-Phe-L-His] (5)	1,5	2,1	10^5	$1,1 \cdot 10^{-1}$	22
6ⁱⁱ	Cyclo[L-Phe-L-Lys] (6)	1,5	10	10^3	$1,7 \cdot 10^{-1}$	> 100
7ⁱⁱⁱ	Cyclo[L-Phe-L-Lys] (6)	1,5	0,4	10^5	$4,2 \cdot 10^{-2}$	3

ⁱ bei 0,01% Deformation; ⁱⁱ Alterungszeit 30 min; ⁱⁱⁱ Alterungszeit 20 h.

Nach einer Alterungszeit von etwa 20 h hat Hydrogel **6**, wie durch die Zeitsweep-Experimente gezeigt, einen Gleichgewichtszustand erreicht. Die gealterte Probe weist stark veränderte Materialeigenschaften auf, welche insbesondere in Amplitudensweep-Experimenten deutlich werden (*Abbildung 34*). Die G' -Werte sind um den Faktor 100 auf 10^5 Pa gestiegen und der Verlustfaktor ist auf einen für Gele typischen Wert unter 10^{-1} gefallen (*Eintrag 7*). Damit zeigt Hydrogel **6** nach 20 h Alterungszeit mit den anderen DKPs vergleichbare Gelstärke. Interessanterweise ist zeitgleich mit dem Anstieg der Elastizität die mechanische Stabilität deutlich gesunken. Die kritische Deformation γ_c hat von 10% auf 0,4% abgenommen.

3.1.4.4 Regenerationsexperimente

In den Regenerationsexperimenten wurden die thixotropen Eigenschaften der DKP-Hydrogele untersucht. Die Hydrogele **1 - 6** wurden unter den Bedingungen der vorigen Experimente auf dem Rheometer gebildet und bis zu dem Erreichen konstanter G' und G'' Werte gealtert. Die fertigen Gele wurden für zwei Minuten gemessen, um die G' -Ausgangswerte zu bestimmen (*Abbildung 35*, grüner Bereich). Anschließend wurden die Gele für 30 s mit 100% Deformation belastet (*Abbildung 35*, roter Bereich), um das supramolekulare Netzwerk soweit zu zerstören, dass es anfängt zu fließen ($G'' > G'$ bzw. $\tan \delta > 1$). Nach dem drastischen Abfall der G' - und G'' -Werte wurde anschließend mit einer geringen Deformation gemessen (*Abbildung 35*, blauer Bereich), um die Regeneration des Hydrogels anhand der G' -Werte zu verfolgen. Für eine bessere Übersicht wurden nur die Regenerationsphasen (vgl. *Abbildung 35*, blauer Bereich) der Hydrogele **1 - 6** als prozentuale Regeneration der G' -Werte zum Ausgangswert dargestellt (*Abbildung 36*).

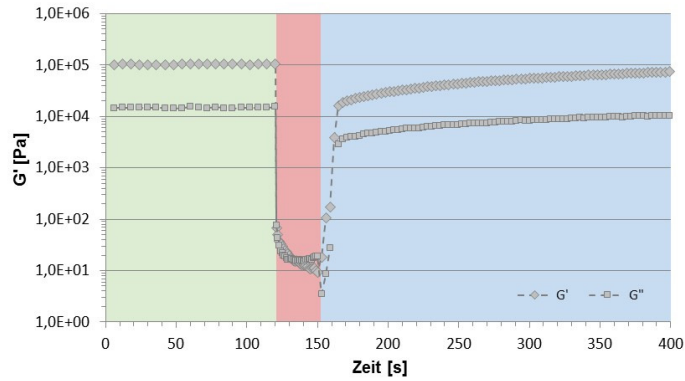


Abbildung 35: Repräsentatives Regenerations-Experiment eines DKP-Hydrogels (DKP 5); Equilibrierungs- (grün), Zerstörungs- (rot) und Erholungsphase (blau); G' = Raute, G'' = Quadrat.

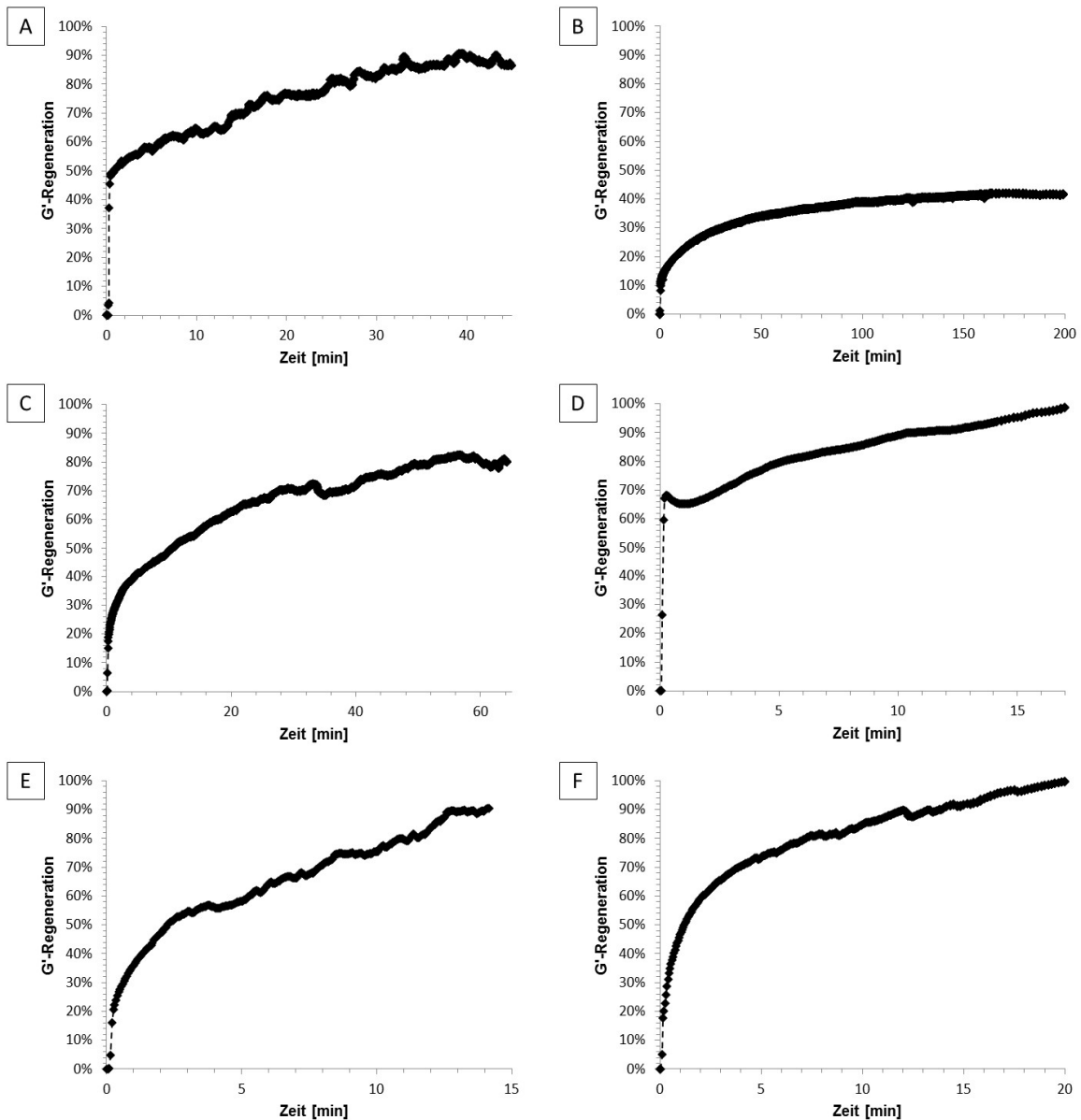


Abbildung 36: Regenerations-Experimente der Hydrogele 1 - 6; Gezeigt ist die prozentuale Regeneration von G' relativ zum Ausgangswert nach Zerstörung durch Deformation; Hydrogele 1 - 5 wurden für 30 min gealtert, Hydrogel 6 für 20 h; (A) Hydrogel 1 (1,5 Gew-%), Startwert $G' = 1,04 \cdot 10^6$ Pa; (B) Hydrogel 2 (5,0 Gew-%), Startwert $G' = 1,10 \cdot 10^5$ Pa; (C) Hydrogel 3 (0,5 Gew-%), Startwert $G' = 5,29 \cdot 10^4$ Pa; (D) Hydrogel 4 (4,0 Gew-% in 1 M Phosphatpuffer pH = 6,0), Startwert $G' = 2,35 \cdot 10^5$ Pa; (E) Hydrogel 5 (1,5 Gew-%), Startwert $G' = 1,44 \cdot 10^5$ Pa; (F) Hydrogel 6 (1,5 Gew-%), Startwert $G' = 9,08 \cdot 10^4$ Pa; Equilibrierungs- (2 min) und Regenerationsphase: Deformation = 0,005%, Winkelfrequenz = 10 rad/s; Zerstörungsphase (30 s): Deformation = 100%, Winkelfrequenz = 10 rad/s.

Hydrogel **1** zeigt in den ersten Sekunden der Regenerationsphase einen sprunghaften Anstieg von G' , gefolgt von einer kontinuierlichen Regeneration bis zu 90% nach 40 Minuten. Im Gegensatz dazu steht wiederum das Ser-beinhaltende Hydrogel **2**, bei welchem sich der G' -Wert selbst nach einer Regenerationszeit von mehr als drei Stunden auf lediglich 40% des Ausgangswertes erholt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Amplitudensweep-Experimenten (*Abbildung 34, Seite 46*) und REM-Aufnahmen (*Abbildung 30*) sind vermutlich teilkristalline Eigenschaften des dreidimensionalen Netzwerks die Ursache für dieses Verhalten. Kristalline Bereiche brechen schneller als flexible Fasern und sind nicht in der Lage sich zu regenerieren. Hydrogel **3** kann auf 80% der initialen Gelstärke in einer Stunde regenerieren. Das His-beinhaltende Hydrogel **5** erreicht 90% des ursprünglichen G' -Wertes nach nur 13 Minuten. Bemerkenswerterweise können sich die Hydrogele **4** und **6** in weniger als 20 Minuten vollständig regenerieren und zeigen damit exzellente selbstheilende Fähigkeiten.

Da DKP-Hydrogel **6** stark alterungsabhängige Materialeigenschaften aufweist, wurde das Regenerationsexperiment auch mit einer frisch gebildeten Probe durchgeführt. In *Abbildung 37* ist der G' -Verlauf einer frischen und einer 20 h alten Probe gezeigt.

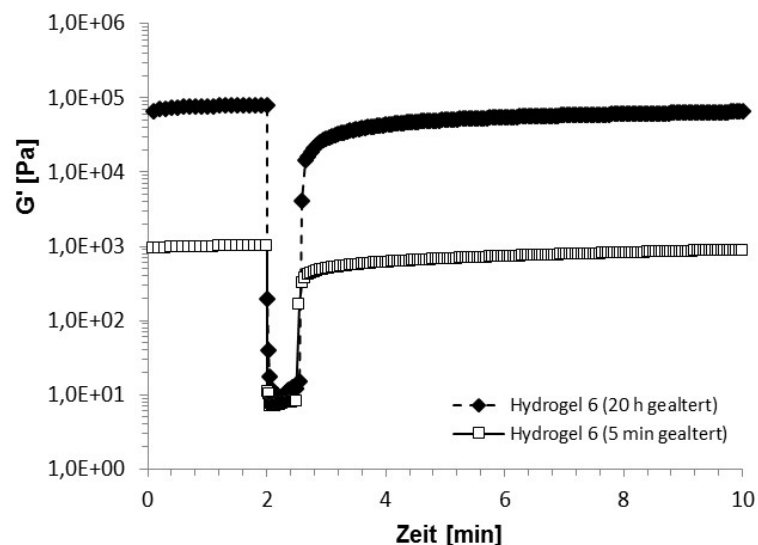


Abbildung 37: Regenerations-Experimente von Hydrogel **6** (1,5 Gew-%); schwarze Rauten: gealtert für 20 h, weiße Quadrate: gealtert für 5 min; Equilibrierungs- und Regenerationsphase: Deformation = 0,005%, Winkelfrequenz = 10 rad/s; Zerstörungsphase (30 s): Deformation = 100%, Winkelfrequenz = 10 rad/s.

Das Regenerationsexperiment der frischen Probe von Hydrogel **6** zeigt eine extrem kurze Regenerationszeit von nur 4 min auf 100% des Ausgangswertes von G' . Da sich das Netzwerk zu diesem Zeitpunkt gerade erst bildet, finden vermutlich neben der Regeneration auch aufbauende Prozesse im Gel statt, was zu einer scheinbar kürzeren Regenerationszeit führt. Das Regenerationsexperiment der gealterten Probe zeigt bei der Belastung und Zerstörung des Gels bei 100% Deformation den gleichen Tiefpunkt von 10 Pa, dennoch kann sich die

Probe nach 20 min auf den Ausgangswert von $\sim 10^5$ Pa regenerieren. Es scheint also, dass die durch 20 h Alterung verursachte Veränderung im Gel erhalten bleibt. Die erhöhte Gelstärke wird deutlich schneller erreicht als durch normale Alterung, da die zusätzlichen Bindungen schneller geknüpft werden können – eine Art „Memory-Effekt“ liegt vor.

3.1.5 Coassemblierte DKP-Hydrogele

Aufgrund der literaturbekannten Berichte über Zweikomponenten-Gele,^[79-80, 111, 115, 257-265] welche unter anderem auf den Wechselwirkungen zwischen Diaminen und Carbonsäuren beruhen,^[115, 257-258, 263] wurde das Verhalten von gemischten Hydrogelen aus dem Glu-beinhaltenden DKP **4** sowie dem Lys-beinhaltenden DKP **6** genauer untersucht (*Abbildung 38*). Es wurden verschiedene Wege gesucht, eine mögliche Wechselwirkung der DKPs nachzuweisen und durch das Mischen die Eigenschaften der resultierenden Hydrogele zu beeinflussen und steuerbar zu machen.

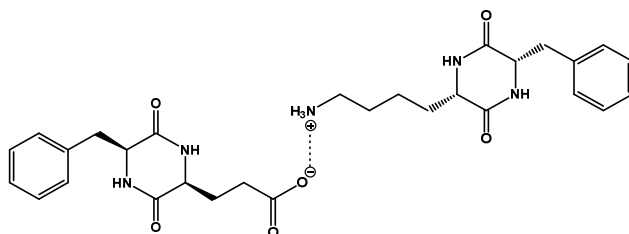


Abbildung 38: Mögliche Wechselwirkung zwischen DKP **4** und **6** auf Basis von Carboxylat-Ammonium-Kontaktpaaren.

3.1.5.1 pH-Beständigkeit

Eine mögliche auf Wasserstoffbrücken- oder Ionenbindungen basierende Wechselwirkung der Amin-Funktion von DKP **6** mit der Carbonsäure-Funktion von DKP **4** sollte einen Einfluss auf die pH-abhängige Stabilität bzw. Sol-Gel-Übergangstemperatur (T_{SG}) haben. Um eine attraktive Wechselwirkung zwischen **4** und **6** innerhalb eines coassemblierten Hydrogels nachzuweisen, wurde dementsprechend die T_{SG} der Einzelkomponenten-Gele und einer äquimolaren Mischung pH-abhängig untersucht.

Die T_{SG} der Hydrogele **4**, **6** und der Mischung **4/6** (1 : 1 (*n/n*)) wurden von pH 2 bis 11 untersucht und zeigten wie erwartet eine grundsätzlich starke Abhängigkeit vom pH-Wert (*Abbildung 39*). DKP **4** bildet ausschließlich bei pH 6 ein Hydrogel (siehe *Abbildung 31 Seite 42*), während DKP **6** bei vergleichbarer Konzentration (2,0 Gew-%) nur unter basischen Bedingungen (pH 8 - 11) stabile Hydrogele bildet. Unter neutralen und sauren Bedingungen liegt DKP **6** vollständig protoniert vor, dementsprechend ist die Löslichkeit stark erhöht und eine elektrostatische Abstoßung der positiv geladenen Lys-Seitenketten erschwert die Assemblierung. Die äquimolare Mischung **4/6** (1 : 1 (*n/n*), 2,0 + 2,0 Gew-%) bildet hingegen

innerhalb des bemerkenswert breiten pH-Bereichs von pH 2 - 11 ein stabiles Hydrogel. Die Sol-Gel-Übergangstemperatur der Mischung erreicht ein Maximum bei pH 2 (79°C) und ein Minimum im neutralen pH-Bereich (27 °C).

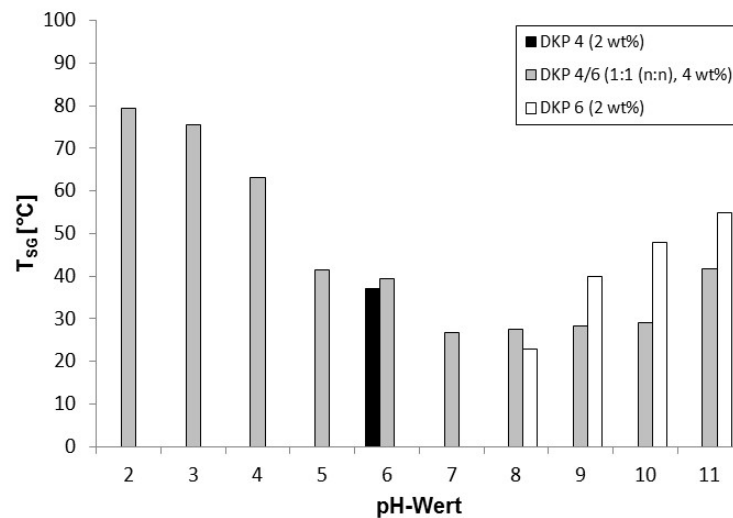


Abbildung 39: pH-abhängige Sol-Gel-Übergangstemperatur der Mischung DKP 4/6 (grau, 1 : 1 (n/n), 4,0 Gew-%) im Vergleich mit den reinen DKP-Hydrogelen 4 (schwarz, 2,0 Gew-%) und 6 (weiß, 2,0 Gew-%); verwendete Puffer: pH 5 - 11: 0,2 M Natriumphosphatpuffer, pH 4: 0,2 M Natriumacetatpuffer, pH 3: 0,2 M Glycin/HCl-Puffer, pH 2: 0,1 M HCl; wenn nötig, wurde der pH-Wert mit verdünnter Natronlauge oder Salzsäure angepasst.

Die Tatsache, dass die Mischung im Gegensatz zu den Einzelkomponenten auch im stark sauren und neutralen pH-Bereich in der Lage ist ein Gel zu bilden, lässt das Vorliegen von Säure-Base-Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken mit oder ohne Protonentransfer) zwischen den Monomeren Bausteinen 4 und 6 innerhalb des supramolekularen Netzwerkes vermuten. Die gehemmte Assemblierung durch eine gesteigerte Löslichkeit von protoniertem DKP 6 im neutralen bis sauren pH-Bereich kann durch die zusätzlichen attraktiven Wechselwirkungen mit DKP 4 ausgeglichen werden. Die elektrostatische Abstoßung von DKP 6 wird durch die gemischte Assemblierung reduziert, während die Kristallisation von DKP 4 verhindert wird. Bei neutralem pH könnte das gemischte Hydrogel sogar von anziehenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Ammonium- und Carboxylatgruppen profitieren. Die verbesserte Stabilität durch die Wechselwirkung verschiedener funktioneller Gruppen und die Beeinflussung der Materialeigenschaften der Mischung durch den pH-Wert verdeutlichen zudem einen großen Spielraum für mögliche Anwendungen von coassemblierten DKP-Hydrogelen.

3.1.5.2 Morphologie

Die Abhängigkeit der Materialeigenschaften des coassemblierten Hydrogels 4/6 vom pH-Wert spiegelt sich auch in verschiedenen Morphologien der Xerogele wider. REM-Aufnahmen bei pH 4 zeigen eine parallele Schichtstruktur (*Abbildung 40A*), die durch undefinierte Netze zusammengehalten wird. Bei pH 7 ändert sich die Morphologie zu lamellenartigen Formen

(Abbildung 40B), welche relativ kompakt wirken. Das Xerogel bei pH 10 weist dagegen eine wabenartige Struktur auf (Abbildung 40C), welche noch einzelne Nanofasern erkennen lässt.

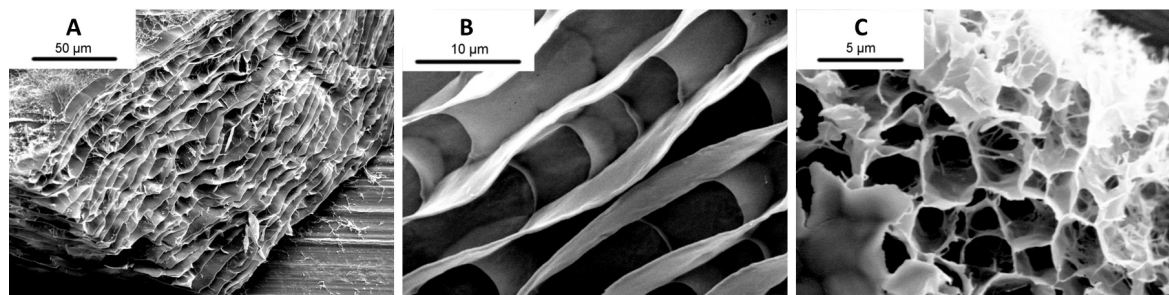


Abbildung 40: REM-Aufnahmen der Xerogele **4/6** (1 : 1 (n/n), 4,0 Gew-%); (A) pH = 4; (B) pH = 7; (C) pH = 10; der pH-Wert der korrespondierenden Hydrogele wurde mit verdünnter Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt. Reproduced from A. J. Kleinsmann, B. J. Nachtsheim, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7818-7820 with permission from The Royal Society of Chemistry.

Die Xerogele der Mischung **4/6** zeigen grundsätzlich von den Einzelkomponenten verschiedene, in sich jedoch homogene Morphologien. Die daher angenommene Coassemblierung der monomeren Einheiten zu einem supramolekularen Netzwerk sollte deshalb durch rheologische Experimente weiter untersucht werden.

3.1.5.3 Viskoelastische Eigenschaften

Die Entwicklung der G' - und G'' -Werte der Hydrogele **4/6** mit der Zeit wurde in Zeitsweep-Experimenten untersucht. Auch hier zeigt sich ein enormer Einfluss des pH-Wertes. Am schnellsten erreicht das Gel bei pH 7 den maximalen G' -Wert (ca. 20 min, *Abbildung 41A*). Bei pH 4 dauert es etwa 60 min und bei pH 10 sind es 14 h, bis sich das Gel vollständig aufgebaut hat (*Abbildung 41A*). Das coassemblierte Gel ähnelt also in diesem Punkt unter basischen Bedingungen dem Verhalten von reinem Hydrogel **6** (*Abbildung 41B*).

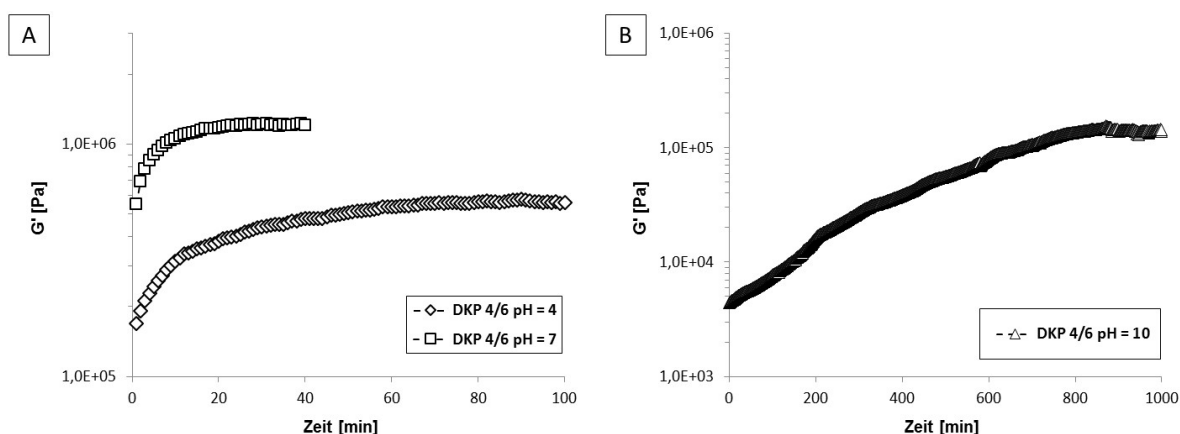


Abbildung 41: Zeitsweep-Experimente der gemischten Hydrogele **4/6** (1 : 1 (n/n)) in 1 M Phosphatpuffer bei (A) pH 4 (2,0 Gew-%, Rauten) und pH 7 (4,0 Gew-%, Quadrate) und (B) pH 10 (2,0 Gew-%, Dreiecke).

Die Amplitudensweep-Experimente zeigen bei pH 7 einen zu pH 4 und 10 vergleichbarem LVB, jedoch die höchsten G' -Werte auf (*Abbildung 42A*). Mit 10^6 Pa sind die Werte hier um fast eine Zehnerpotenz größer als bei pH 4 und pH 10 ($\sim 10^5$ Pa). Allerdings wurde aufgrund

der geringeren Löslichkeit der DKPs bei pH 7 die doppelte Konzentration (4,0 Gew-%) verwendet. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Gelstärke ist daher als gering einzustufen.

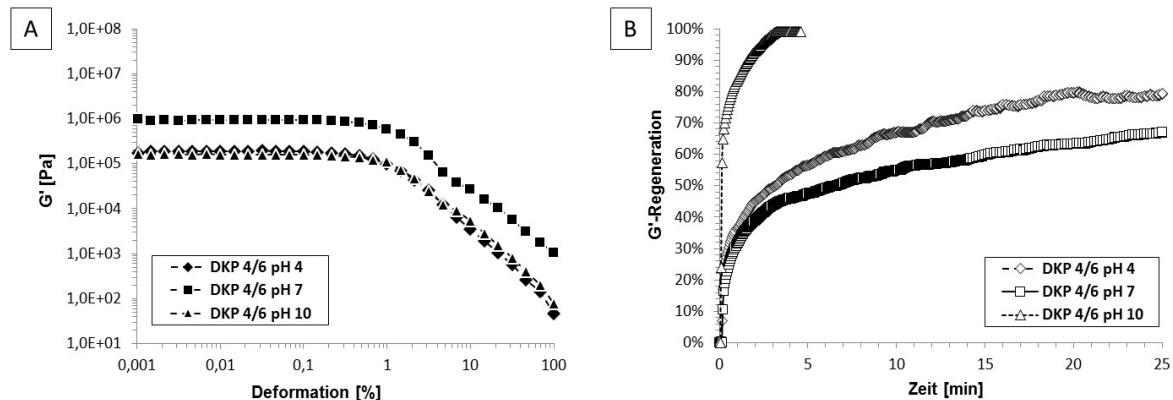


Abbildung 42: Gemischte Hydrogele 4/6 (1 : 1 (n/n)) in 1 M Phosphatpuffer; Rauten: pH 4 (2,0 Gew-%, 1 h gealtert), Quadrate: pH 7 (4,0 Gew-%, 1 h gealtert), Dreiecke: pH 10 (2,0 Gew-%, 15 h gealtert); (A) Amplitudensweep-Experimente (Winkelfrequenz = 10 rad/s) und (B) Regenerationsexperimente, die Erholungsphase ist prozentual vom Ausgangswert G' gezeigt; Equilibrierungs- und Regenerationsphase: Deformation = 0,005%, Winkelfrequenz = 10 rad/s; Zerstörungsphase (30 s): Deformation = 100%, Winkelfrequenz = 10 rad/s.

Die regenerativen Eigenschaften des coassemblierten Hydrogels 4/6 zeigen hingegen eine starke pH-Abhängigkeit (Abbildung 42B). Das Hydrogel bei pH 10 zeigt die schnellste Regeneration nach Zerstörung der Gelstruktur durch Scherung. Nach nur 3 Minuten haben sich G' und G'' auf 100% des Ausgangswertes erholt, wohingegen die Regeneration bei pH 7 und 10 nach 15 min erst bei 60% bzw. 75% liegt. Die Regenerationsgeschwindigkeit der Einzelkomponenten liegt bei ca. 20 min (vergleiche Abbildung 36) und wird von der Mischung bei pH 10 mit 3 min deutlich übertroffen. Die gesteigerte Regenerationsfähigkeit des gemischten Hydrogels 4/6 bei pH 10 ist bemerkenswert, die Geschwindigkeit der vollständigen Regeneration wird von keinem der reinen DKP Hydrogele erreicht.

3.1.5.4 Verzögerte Wirkstoff-Freisetzung

Schließlich sollten die Eigenschaften unterschiedlicher Mischungen der coassemblierten Hydrogele 4/6 in anwendungsbezogenen Experimenten zur verzögerten Wirkstofffreisetzung untersucht werden. Bei ersten Experimenten wurde die Freisetzung von Tetracyclin-Hydrochlorid (TC) als Modells substrat für kleine lipophile Moleküle und Bovine Serum Albumin (BSA) als Modells substrat für vielfach geladene Polypeptide aus verschiedenen DKP-Hydrogelen mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht.^[266] Die Diffusion sollte insbesondere durch das Mischungsverhältnis von DKP 4 und 6 unter physiologischen Bedingungen (PBS-Puffer, pH = 7,4) gezielt beeinflusst werden. Da DKP 4 und 6 unter physiologischem pH-Wert keine stabilen Gele bilden (vergleiche Abbildung 39), konnte sich insbesondere bei diesen Experimenten die erweiterte pH-Stabilität der Mischungen zu Nutze gemacht werden. Dementsprechend wurden neben den reinen Hydrogelen 1 und 5 verschiedene Mischungen der DKPs 4 und 6 (1 : 1, 1 : 2 und 2 : 1 (n/n)) untersucht. Für beide Substrate (TC und BSA)

wurden signifikante Unterschiede in der verzögerten Freisetzung in Abhängigkeit von dem verwendeten Hydrogel beobachtet (*Abbildung 43* und *Abbildung 44*).

Für TC wurde die geringste Verzögerung der Freisetzung nach 24 h für Hydrogel **4/6** (1 : 1) und Hydrogel **4/6** (2 : 1) beobachtet (82% und 80%), während Hydrogel **4/6** (1 : 2) mit 62% eine deutlich stärkere Retardierung des Wirkstoffes zeigt (*Abbildung 43*). Da Tetracyclin unter physiologischem pH negativ geladen vorliegt und das Hydrogel **4/6** (1 : 2) einen positiven Ladungsüberschuss aufweist, scheinen attraktive elektrostatische Wechselwirkungen einen großen Einfluss zu haben. Die Hydrogele **1** und **5** liegen mit ca. 70% Freisetzung nach 24 h im mittleren Bereich der beobachteten Retardierungen. Insgesamt lässt sich eine moderate Differenzierung der Freisetzungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von dem verwendeten Hydrogel feststellen, was für eher schwach ausgeprägte Wechselwirkungen zwischen Substrat und Hydrogelfasern spricht.

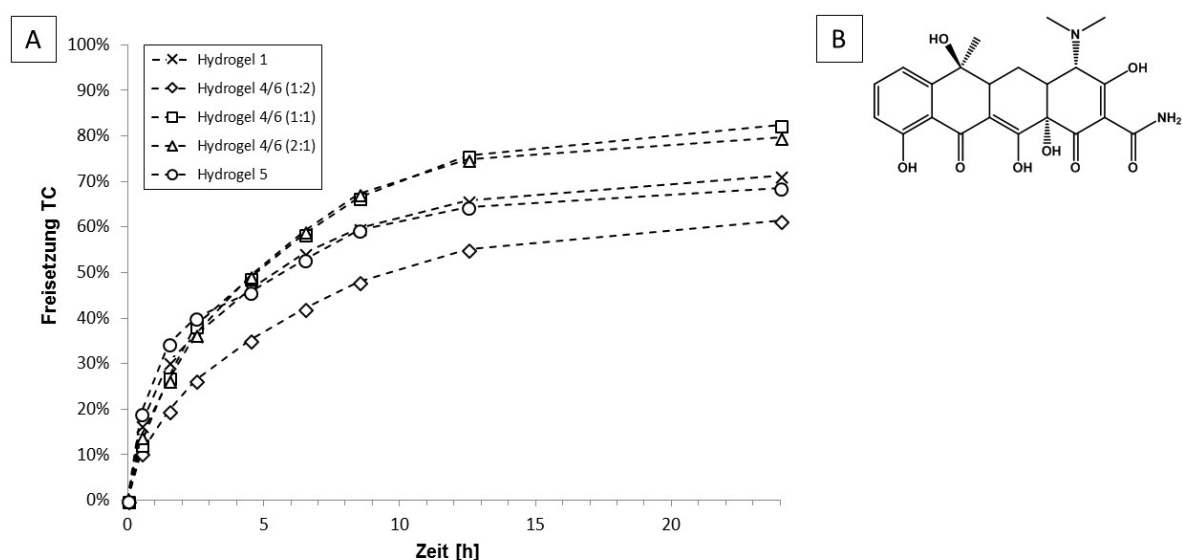


Abbildung 43: (A) Experimente zur verzögerten Wirkstofffreisetzung von Tetracyclin Hydrochlorid (TC) aus den reinen Hydrogelen **1** und **5** und verschiedenen gemischten coassemblierten Hydrogelen **4/6** (DKP **4** : DKP **6** (n/n)) in PBS-Puffer pH 7,4; (B) Struktur von Tetracyclin.

Bei der Untersuchung der BSA-Freisetzung zeigen die DKP-Hydrogele **1** und **5** die stärkste Retardierung, nach 24 h wurden lediglich 22% bzw. 39% des eingeschlossenen Peptids freigesetzt (*Abbildung 44*). Die Mischungen der DKPs **4** und **6** zeigen je nach Mischungsverhältnis ein stark verändertes Retentionsverhalten für BSA. So lässt sich die Freisetzung von BSA über 24 h durch die verschiedenen Mischungsverhältnisse von 55% (**4/6** = 1 : 2) über 76% (**4/6** = 1 : 1) zu 100% (**4/6** = 2 : 1) gezielt beeinflussen. Wie zu erwarten, zeigt BSA aufgrund seiner Größe und Struktur differenziertere Wechselwirkungen mit den verschiedenen Hydrogel-Matrizen als TC. Das Polypeptid ist unter physiologischem pH-Wert insgesamt negativ geladen (isoelektrischer Punkt bei pH = 4,6). Da ein höherer Anteil an basischen Seitenketten (bei **4/6** = 1 : 2 und **5** resultiert eine insgesamt positive Ladung) die Freisetzung stärker verzögert als ein größerer Anteil saurer Seitenketten, sind

elektrostatische Einflüsse auf die Affinität von BSA zu der Hydrogel Matrix als wichtiger Faktor einzuschätzen. Interessanterweise zeigt die Hydrogel-Matrix von DKP **1** das stärkste Retentionsverhalten. Aromatische Wechselwirkungen und Porengrößen sind daher als Einflussfaktoren nicht auszuschließen

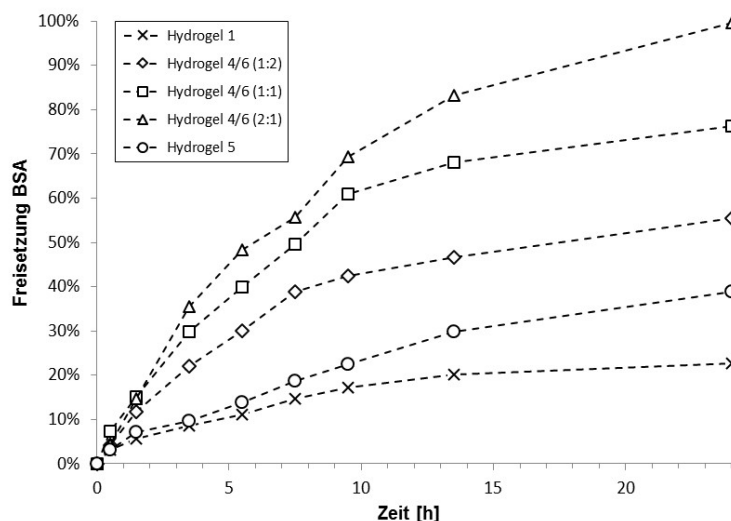


Abbildung 44: Experimente zur verzögerten Wirkstofffreisetzung von Bovine Serum Albumin (BSA) aus den reinen Hydrogelen **1** und **5** und verschiedenen gemischten coassemblierten Hydrogelen **4/6** (DKP **4** : DKP **6** (n/n)) in PBS-Puffer pH 7,4.

3.1.6 Schlussfolgerung

Durch Festphasensynthese konnte eine große Auswahl von DKPs aus proteinogenen Aminosäuren mit unterschiedlichen Kombinationen von hydrophilen und lipophilen Seitenketten synthetisiert werden. Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass insbesondere die auf der Kombination aus Phe und einer hydrophilen Aminosäure basierenden DKPs **1 - 6** in der Lage sind, Hydrogele zu bilden. Die gelbildenden Eigenschaften dieser DKPs wurden ausführlich mittels Rheologie, REM und weiteren Methoden charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass trotz der relativ einfachen Struktur der Monomeren Bausteine die resultierenden Hydrogele bemerkenswert stabil sind und selbstheilende Eigenschaften aufweisen. Das Mischen von zwei verschiedenen DKPs führt zu coassemblierten Hydrogelen mit neuen Materialeigenschaften. So konnten coassemblierte Hydrogele mit einer deutlich erhöhten pH-Beständigkeit und einer gesteigerten Regenerationsrate erhalten werden. Zudem sind coassemblierte Hydrogele als Matrix für eine verzögerte Wirkstofffreisetzung geeignet. Der einfache Aufbau und die Neigung zur Bildung supramolekularer Strukturen bei gleichzeitigem Vorhandensein enzymartiger funktioneller Gruppen sprechen grundsätzlich für eine mögliche Funktion als minimalistische Version von Enzymen und damit für eine mögliche Rolle der DKPs in der chemischen Biogenese (vergleiche *Kapitel 1.1*).

3.2 Enzymmimetische coassemblierte DKP-Hydrogele

3.2.1 Einführung

Die Ausbildung von supramolekularen Strukturen durch Selbstassemblierung kann einen großen Einfluss auf die katalytische Aktivität haben und wurde bereits bei einer DKP-katalysierten Reaktion beobachtet.^[267] Caryn und Gazit beschreiben die Selbstassemblierung von kurzen Peptiden zu höher geordneten Strukturen als ein zentrales Element der chemischen Evolution. Die Bildung supramolekularer Strukturen könnte danach das Bindeglied zwischen der monomolekularen Welt und der selbstreplizierenden polymolekularen Welt darstellen.^[63] Da die Bildung von DKPs unter präbiotischen Bedingungen sehr wahrscheinlich ist, könnten sie eine wichtige Rolle in der Entstehung der ersten, sich selbst-replizierenden Systeme in der chemischen Biogenese gespielt haben.^[39-43] Es sind bisher allerdings nur wenige Beispiele für eine erfolgreiche Anwendung von DKPs in der Katalyse bekannt.^[233, 268-272]

In *Kapitel 3.1* konnte gezeigt werden, dass verschiedene Phe-basierte DKPs (**1 - 7, 9, 14**) Hydrogele bilden und durch deren Mischung Hydrogele mit neuen Materialeigenschaften entstehen können. Die Selbst- und Coassemblierung von Phe-basierten DKPs resultiert vermutlich aus starken H-Brücken zwischen den sechsgliedrigen Diketopiperazin-Ringen, sowie zusätzlichen π - π -Wechselwirkungen zwischen den Phe-Seitenketten, welche gerade in Wasser eine bedeutende dirigierende Wirkung haben können. Eine molekulare Anordnung der DKP-Monomere wie in *Abbildung 45* wird daher angenommen, konnte allerdings experimentell noch nicht nachgewiesen werden.

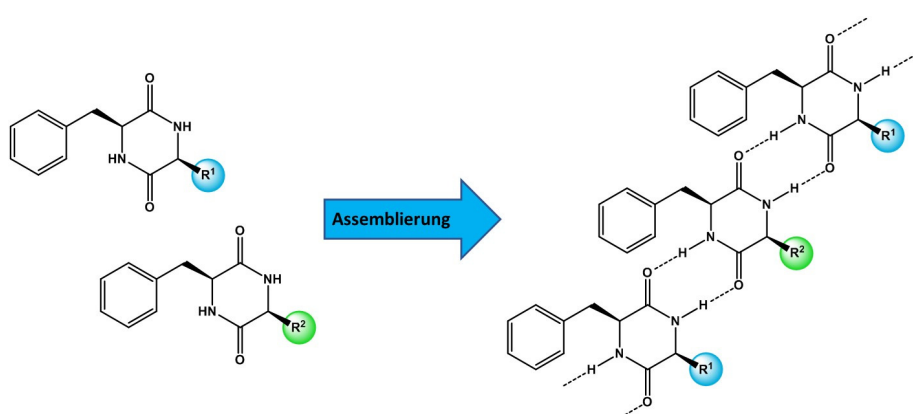
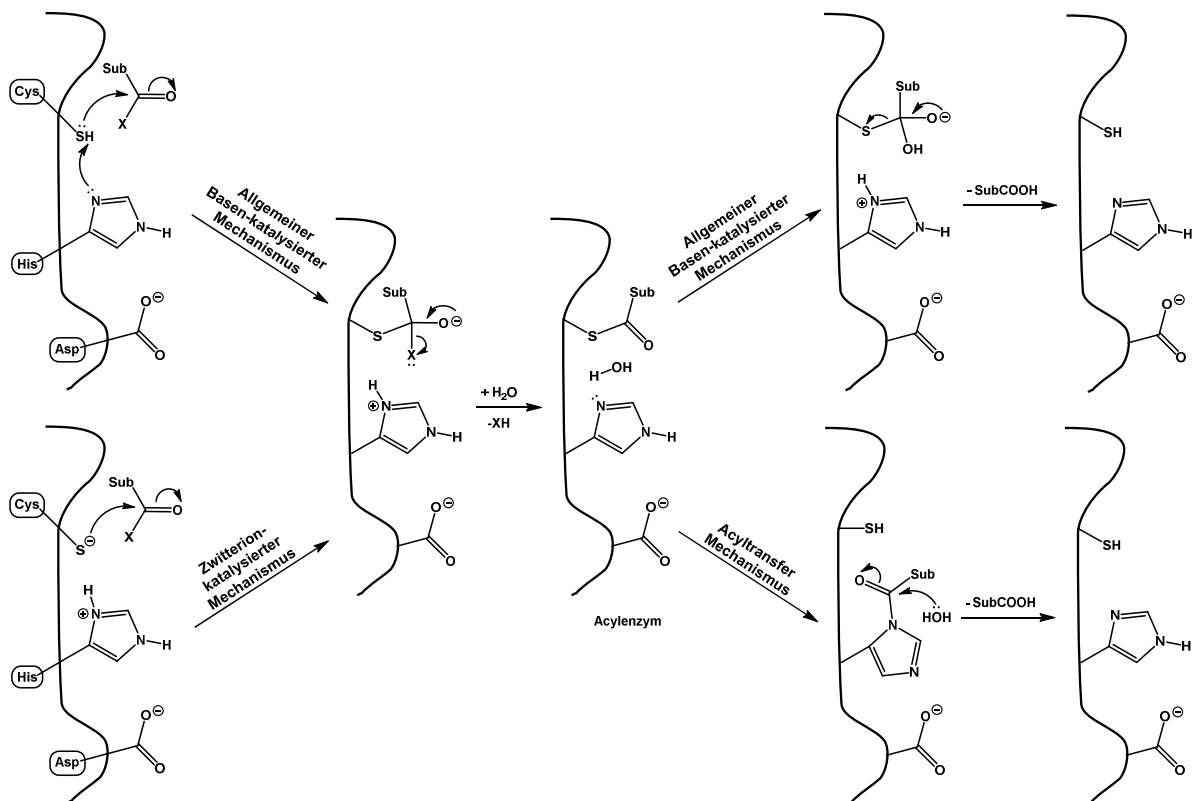


Abbildung 45: Modell für die Selbstassemblierung ($R^1 = R^2$) und Coassemblierung ($R^1 \neq R^2$) von Phe-basierten DKPs in Wasser.

Ein wie in *Abbildung 45* coassembliertes Hydrogel kann einen kooperativen Effekt zwischen verschiedenen funktionellen Gruppen R^1 und R^2 aufweisen und dadurch, ähnlich zu den aktiven Zentren von Enzymen, eine gesteigerte Reaktivität aufweisen. Die katalytischen Eigenschaften der DKPs in assemblierten Zustand sollten daher näher untersucht werden.

Die Verwendung des Histidin-beinhaltenen DKPs **5** steht bei diesen Experimenten im Fokus. Histidin ist die Schlüssel-Aminosäure in den katalytisch aktiven Zentren vieler Enzyme, da die Imidazol-Gruppe sowohl saure als auch basische Funktionen bei physiologischem pH-Wert ausüben kann.^[273-274] Histidin kann die Rolle eines Nucleophils einnehmen, als Base das Schlüsselnucleophil (Serin, Cystein, Wasser) aktivieren oder als Protonen-Shuttle agieren.^[275-277] Dementsprechend wurde die Imidazol-Gruppe bisher intensiv für das Design von künstlichen Esterase-ähnlichen Katalysatoren verwendet.^[73, 229-230, 278-284] Weiterhin wurde bereits von ersten Versuchen einer künstlichen His-Cys-Kooperativität berichtet, mit dem Ziel enzymatische Katalysatoren (z. B. die Cystein-Protease Papain) nachzuahmen.^[285-289] Die möglichen Mechanismen der durch Papain katalysierten Esterhydrolyse sind stark vereinfacht in *Schema 3* dargestellt und zeigen unter anderem die angestrebte kooperative Interaktion von Cystein und Histidin in biomimetischen Katalysatoren.^[289]



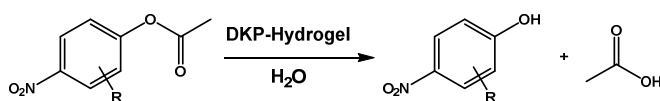
Schema 3: Stark vereinfachte Darstellung der Pfade der durch Papain katalysierten der Ester- und Amidhydrolyse.^[289]

Ein möglicher Reaktionspfad basiert auf der Rolle des Imidazols als allgemeine Base, um den nucleophilen Angriff des Thiols auf das Ester-Substrat zu unterstützen (allgemeiner Basen-katalysierter Mechanismus). Der ungewöhnlich geringe pK_a von 3 - 4 des Cys-25 im Papain ermöglicht andererseits das Vorliegen eines reaktiven Imidazolium-Thiolat-Zwitterionenpaars für die Acylierung des Enzyms (Zwitterionen-katalysierter Mechanismus). Das über einen der beiden Mechanismen gebildete Acylenzym wird anschließend mit Unterstützung der funktionellen Gruppen des aktiven Zentrums hydrolysiert. Das Imidazol kann in der die Rolle

einer allgemeinen Base einnehmen (allgemeiner Basen-katalysierter Mechanismus) oder als Nukleophil über einen Acyltransfer mit anschließender Hydrolyse die Deacylierung des Enzyms katalysieren (Acyltransfer-Mechanismus). Mit dem Vorbild der Cystein-Protease Papain wurde das Cys-beinhaltende DKP **3** als zweiter Baustein für die Bildung der coassemblierten Hydrogele gewählt. Die möglichen enzymmimetischen Eigenschaften der Hydrogele sollten dabei durch eine geeignete Modellreaktion nachgewiesen werden.

3.2.2 ANBS-Hydrolyse

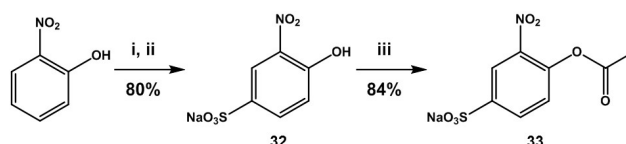
Die Hydrolyse eines Nitrophenylacetat-Derivats sollte als Modellreaktion für die Untersuchung des kooperativen Effekts in den coassemblierten Hydrogelen genutzt werden (*Schema 4*).



Schema 4: Eine Esterhydrolyse als Modellreaktion zur Untersuchung eines kooperativen Effekts im coassemblierten Hydrogel.

Üblicherweise ist das verwendete Substrat für vergleichbare Untersuchungen *para*-Nitrophenylacetat (NPA). Dabei handelt es sich allerdings um einen Kompromiss bei Arbeiten in wässrigen Systemen, da je nach verwendeter Konzentration des Aktivesters größere Mengen an organischem Lösungsmittel zugesetzt werden müssen, um eine ausreichende Löslichkeit des Substrats zu erreichen. Dies kann jedoch auch auf das zu untersuchende System großen Einfluss haben. Je nach Gelator kann ein zu hoher Anteil an organischem Lösungsmittel die Assemblierung stören und schließlich dazu führen, dass sich das Hydrogel auflöst. Für die vollständige Charakterisierung der Aktivester-Hydrolysekinetik durch DKP-Hydrogele (inklusive der katalytischen Konstanten k_{cat} und K_{M}) war es notwendig mit einem Substratüberschuss arbeiten zu können. Da relativ hohe DKP-Konzentrationen (ca. 0,5 - 5,0 Gew-% bzw. 20 - 200 mM) für die Gelbildung benötigt werden, musste ein Substrat mit guter Wasserlöslichkeit verwendet werden, um hohe Konzentrationen von organischen Lösungsmitteln zu vermeiden.

Von verschiedenen in Frage kommenden Nitrophenyl-Derivaten zeigte lediglich Natrium-4-acetoxy-3-nitrobenzensulfonat (**33**, ANBS) eine ausreichende Löslichkeit und angemessene Reaktivität. Da dieses Substrat nicht kommerziell erhältlich ist, wurde die literaturbekannte Synthese von ANBS optimiert,^[290-291] um die Verwendung von Bleiacetat und Schwefelwasserstoff zu vermeiden. Die Synthese gelang über zwei Stufen mit guten Ausbeuten und hoher Reinheit (*Schema 5*). Das kommerziell erhältliche *ortho*-Nitrophenol wurde mit Chlorsulfonsäure in *para*-Position sulfonyliert und anschließend mit Natriumbicarbonat neutralisiert. Das erhaltene Natrium-4-hydroxy-3-nitrobenzensulfonat (**32**, HNBS) wurde schließlich mittels Essigsäureanhydrid zum Aktivester ANBS (**33**) umgesetzt.



Schema 5: Synthese von Natrium-4-acetoxy-3-nitrobenzenesulfonat (ANBS); i: HSO_3Cl , CS_2 , 4°C \rightarrow RT, 30 min ; ii: NaHCO_3 , H_2O , 4°C ; iii: Ac_2O , Rückfluss, 15 h.

Der Nachweis eines möglichen kooperativen Effekts der funktionellen Gruppen des Cysteins (**3**) und Histidins (**5**) durch die Modellreaktion dient einerseits der Bestimmung des Potentials der gemischten Hydrogele als enzymmimetischer Katalysator. Andererseits kann so indirekt nachgewiesen werden, ob eine hochgeordnete Coassemblierung nach dem Modell in *Abbildung 45* vorliegt.

3.2.3 Coassemblierung auf Basis von π - π -Wechselwirkungen

3.2.3.1 Untersuchung der Morphologie

Für erste Untersuchungen der Coassemblierung wurden die reinen Hydrogele **3** und **5** mit gemischten Hydrogelen **3/5** verglichen. Die Aufnahmen der reinen Hydrogele (*Abbildung 46B+C*) zeigen ein undurchsichtiges Hydrogel **3** und ein trübes Hydrogel **5**. Das gemischte Hydrogel **3/5** ist hingegen deutlich klarer als die Gele der Einzelkomponenten bei vergleichbarer Konzentration (*Abbildung 46D*).

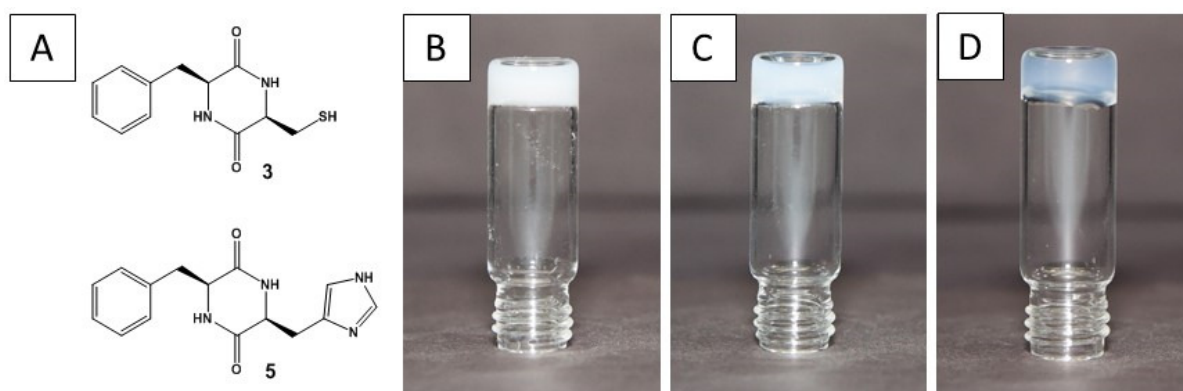


Abbildung 46: (A): Verwendete DKPs **3** und **5**; (B): Hydrogel **3** (1,0 Gew-%); (C): Hydrogel **5** (1,5 Gew-%); (D): Hydrogel **3/5** (1,5 : 1 (*n/n*), Σ 1,5 Gew-%).

Die Coassemblierung wurde weiterhin durch elektronenmikroskopische Aufnahmen der Xerogele untersucht. Die REM- und TEM-Aufnahmen der reinen Xerogele **3** (*Abbildung 47A+B*) und **5** (*Abbildung 47C+D*) zeigen jeweils homogene Nanofasern mit unterschiedlichen Durchmessern von 23 nm (Xerogel **3**, *siehe Anhang S. 144*) und 32 nm (Xerogel **5**, *siehe Anhang S. 144*). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des gemischten Xerogels **3/5** (*Abbildung 47E+F*) zeigen ebenfalls homogene Fasern, allerdings mit einem signifikant geringeren durchschnittlichen Durchmesser der Nanofasern von 12 nm (*siehe Anhang S.*

145). Die Beobachtungen, dass die Mischung **3/5** (1 : 1,5 (*n/n*)) ein klares Hydrogel ohne amorphe Niederschläge bildet und unter dem Elektronenmikroskop ein homogenes Fasernetzwerk mit abweichender Morphologie zu den Einzelkomponenten zu erkennen ist, deuten auf eine erfolgreiche Coassemblierung der beiden DKPs hin.

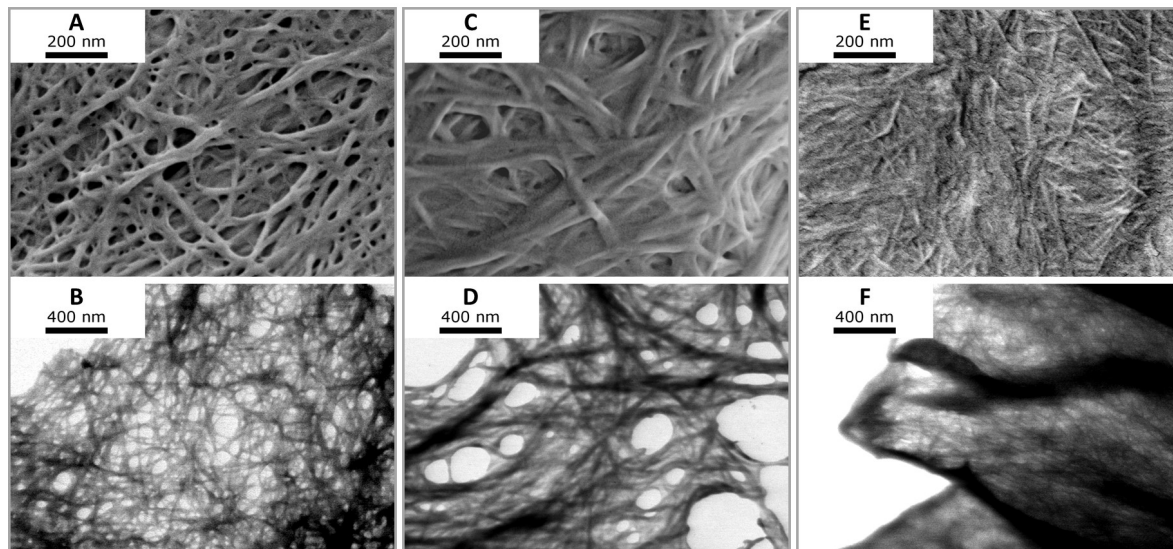


Abbildung 47: REM- (oben) und TEM-Aufnahmen (unten) von (A+B): Xerogel **3** (0,5 Gew-%), (C+D) Xerogel **5** (1,5 Gew-%) und (E+F) **3/5** (1 : 1,5 (*n/n*); Σ 1,0 Gew-%).

3.2.3.2 Untersuchung der katalytischen Eigenschaften

Durch einen kooperativen Effekt zwischen den funktionellen Gruppen des Histidins und Cysteins wäre eine veränderte pH-abhängige Reaktivität durch Co- oder Selbstassemblierung zu erwarten.^[281, 283, 285, 287-289] Dementsprechend wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Anfangsgeschwindigkeiten der ANBS-Hydrolyse untersucht. Zuerst wurde die Anfangsgeschwindigkeit v_0 der ANBS-Hydrolyse in Gegenwart der reinen Hydrogele **3** und **5** in HEPES-Puffer von pH 6,25 bis 8,50 gemessen, unterhalb pH 6,25 konnte von DKP **5** kein stabiles Hydrogel erhalten werden (*Abbildung 48*).

Die Substratlösung wurde auf das zuvor gebildete Hydrogel gegeben und der Reaktionsverlauf wurde anhand der Analyse der Bildung von Natrium-4-hydroxy-3-nitrobenzensulfonat (HNBS) mittels UV/Vis-Spektroskopie bei $\lambda = 406$ nm verfolgt. Die geringe Anfangsgeschwindigkeit v_0 für Hydrogel **3** unter leicht sauren Bedingungen nimmt mit steigendem pH-Wert zu, vermutlich aufgrund einer stärkeren Deprotonierung der Thiofunktion und einer damit erhöhten Nukleophilie (*Abbildung 48A*). Nachdem pH 7,50 erreicht ist wird kein weiterer Anstieg von v_0 beobachtet. Für Hydrogel **5** steigt v_0 bei einer pH-Wert-Erhöhung von 6,25 auf 6,50 sprunghaft an und erreicht ein Maximum von 0,57 mM/min (*Abbildung 48B*). Interessanterweise nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigendem pH-

Wert kontinuierlich ab, bis pH 7,5 erreicht ist. Unter basischen Bedingungen steigt v_0 wieder leicht auf 0,44 mM/min an.

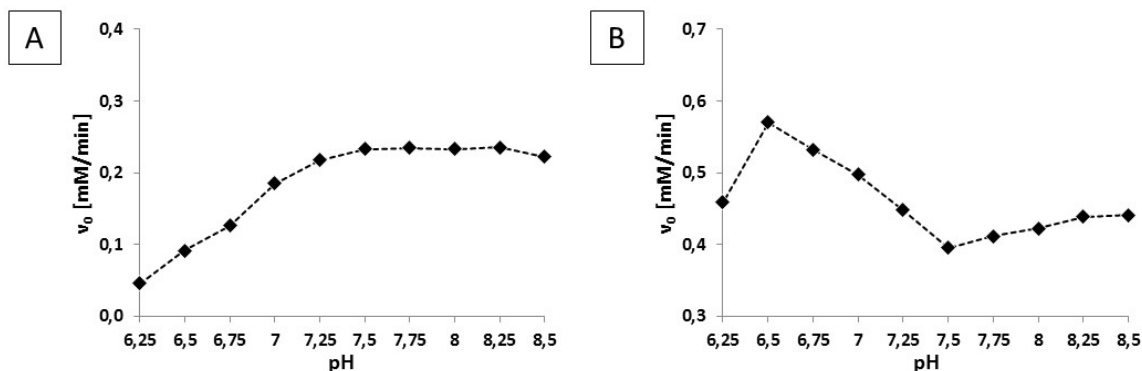
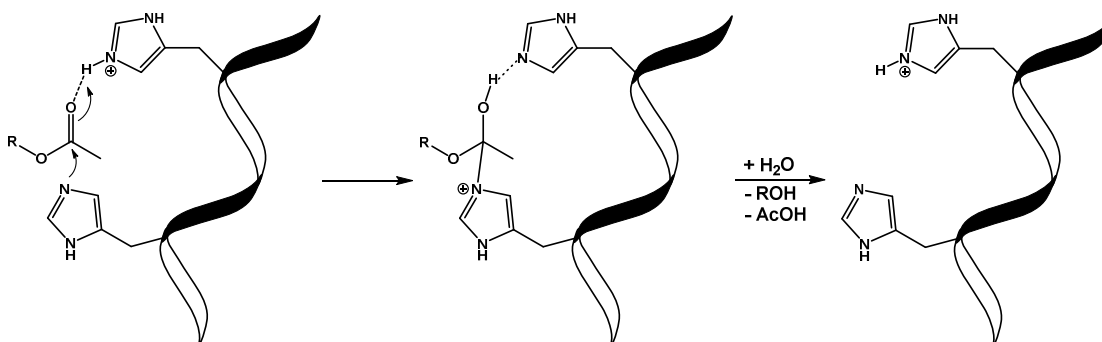


Abbildung 48: Anfangsgeschwindigkeiten der ANBS-Hydrolyse (c (ANBS) = 24 mM) in 0,25 M HEPES-Puffer in Abhängigkeit vom pH-Wert in Gegenwart von (A) Hydrogel **3** (c (Hydrogel) = 40,0 mM); (B) Hydrogel **5** (c (Hydrogel) = 52,8 mM).

Das pH-Profil deutet auf ein kooperatives Verhalten der Imidazolgruppen von DKP **5** hin, da v_0 im leicht sauren pH-Bereich, in dem die His-Reste zu einem großen Teil protoniert vorliegen, größer ist als unter stärker basischen Bedingungen. Da bei pH 6,5 ein äquimolares Verhältnis zwischen protoniertem und unprotoniertem Imidazol-Gruppen vorliegt (pK_a (DKP **5**) = 6,5),^[292] ist die Population von His-HisH⁺-Paaren in den Nanofasern am größten. Das Maximum von v_0 bei pH 6,5 deutet also auf einen überwiegend kooperativen nukleophilen und allgemeinen Säure-katalysierten Mechanismus über ein His-HisH⁺-Paar in Hydrogel **5** hin (Schema 6).^[283]



Schema 6: Nukleophiler und allgemeiner Säure-katalysierter Mechanismus am His-HisH⁺-Paar an schematischen Nanofasern von Hydrogel **5**.

Die protonierte Imidazol-Gruppe kann bei diesem Mechanismus einerseits die ANBS-Carbonylfunktion aktivieren, während eine unprotonierte Imidazol-Gruppe als Nukleophil angreift. Andererseits kann die protonierte Imidazol-Gruppe im Folgeschritt den anionischen Übergangszustand stabilisieren.^[278] Die geringere Reaktivität bei höheren pH-Werten ist das Ergebnis eines höheren Anteils an deprotonierten His-Seitenketten. Dies führt zum Verlust der Fähigkeit als „Säure des aktiven Zentrums“ zu agieren und damit den Übergangszustand zu stabilisieren. Da für DKP **3** kein kooperativer Effekt durch Selbstassemblierung auftreten kann, wird auch kein vergleichbares Maximum im pH-Profil beobachtet.

Die kooperative Zusammenarbeit der Imidazolgruppen innerhalb des Hydrogels war eine Motivation für weitere Experimente mit coassemblierten Hydrogelen, welche His und Cys enthalten. Dementsprechend wurden die Anfangsgeschwindigkeiten v_0 der ANBS-Hydrolyse für Mischungen aus DKP **5** und DKP **3** in Abhängigkeit des Molenbruchs von DKP **3** bei konstantem pH-Wert und konstanter Konzentration untersucht. Die graphische Auftragung des Molenbruchs des coassemblierten Hydrogels **3/5** (Abbildung 49A) zeigt eine glockenförmige Kurve mit einem Maximum der Anfangsgeschwindigkeit bei χ (**3**) = 0,4 bzw. bei einem **3/5**-Verhältnis von 1 : 1,5 (*n/n*).

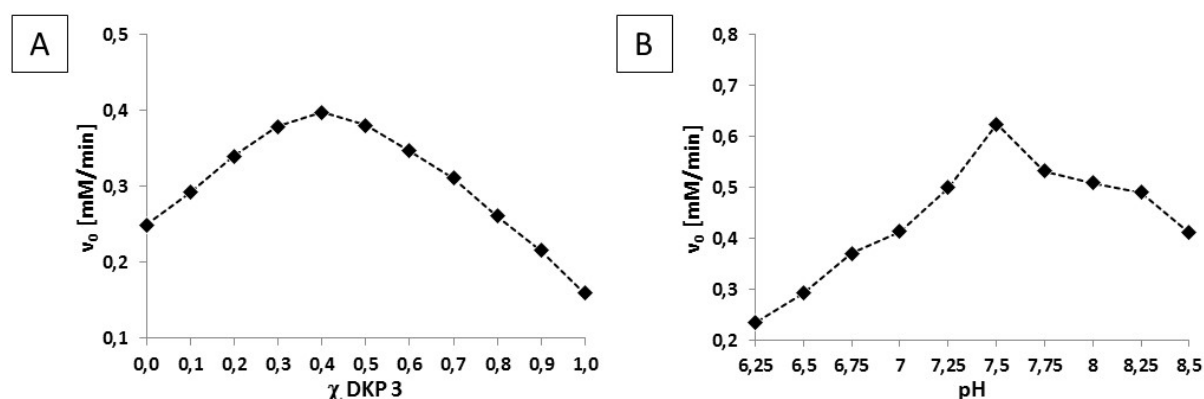


Abbildung 49: Anfangsgeschwindigkeiten der ANBS-Hydrolyse in 0,25 M HEPES-Puffer in Gegenwart des gemischten Hydrogels **3/5**, c (ANBS) = 24 mM; (A) in Abhängigkeit vom Molenbruch von DKP **3** bei pH 8,0 mit c (Hydrogel **3 + 5**) = 30,0 mM; (B) in Abhängigkeit vom pH-Wert für Hydrogel **3/5** (1 : 1,5 *n/n*) ; c (Hydrogel) = 52,8 mM).

Einerseits weist das Maximum darauf hin, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von einem kooperativen Effekt zwischen den Imidazol- und Thiol-Gruppen in dem supramolekularen Netzwerk profitiert. Andererseits deutet die Beobachtung eines relativ breiten und flachen Maximums, welches von einer theoretisch idealen äquimolaren Mischung abweicht, auf eine eher zufällige Verteilung von DKP **3** und DKP **5** innerhalb der Nanofasern hin. Eine treibende Kraft für eine systematisch alternierende Anordnung der unterschiedlichen DKPs war auch nicht zu erwarten, da das postulierte Modell (Abbildung 45) auf DKP-unspezifischen Wasserstoffbrücken und π - π -Wechselwirkungen basiert.

Nachdem das optimale Mischungsverhältnis im Hydrogel **3/5** in Bezug auf die ANBS-Hydrolyse als 1 : 1,5 (*n/n*) bestimmt werden konnte, wurde v_0 mit dieser Mischung in Abhängigkeit des pH-Wertes untersucht (Abbildung 49B). Von pH 6,25 ausgehend steigt v_0 , erreicht ein Maximum bei pH 7,50 und sinkt wieder bei höheren pH-Werten. Obwohl das Maximum bei pH 7,50 ($v_{0,max} = 0,62$ mM/min) eine Anfangsgeschwindigkeit aufweist, welche nur minimal größer ist als die maximale Anfangsgeschwindigkeit des reinen Hydrogels von DKP **5** bei pH = 6,5 ($v_{0,max} = 0,57$ mM/min), lässt die deutliche Verschiebung des Maximums $v_{0,max}$ eine Wechselwirkung der His- und Cys-Seitenketten vermuten (vergleiche Abbildung 50). Das Maximum der Anfangsgeschwindigkeiten deutet darauf hin, dass eine HisH⁺-Cys-

Kooperation vorliegt und der Anteil an reaktiven HisH⁺-Cys⁻-Paaren bei pH 7,50 am höchsten ist. Vermutlich führt der zufällige Einbau von DKP **3** in das coassemblierte Hydrogel auf molekularer Ebene zu einer inhomogenen Sequenz in den Nanofasern, was nur zu einem geringen Anteil an reaktiven HisH⁺-Cys⁻-Paaren führt. Die gesteigerte Reaktivität im Vergleich zu Hydrogel **5** durch teilweise vorliegende HisH⁺-Cys⁻-Paare wird wahrscheinlich durch den Anteil an geringer aktivem DKP **3** kompensiert.

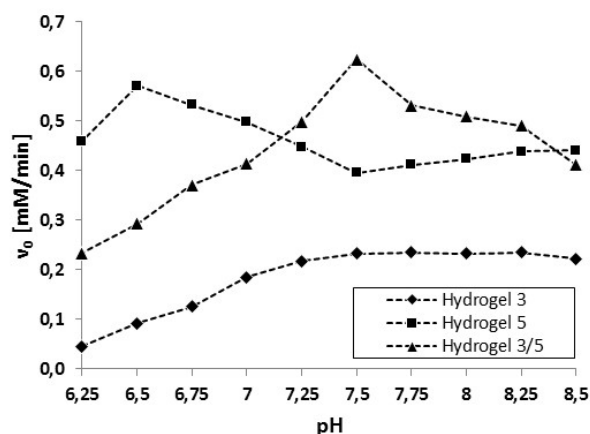
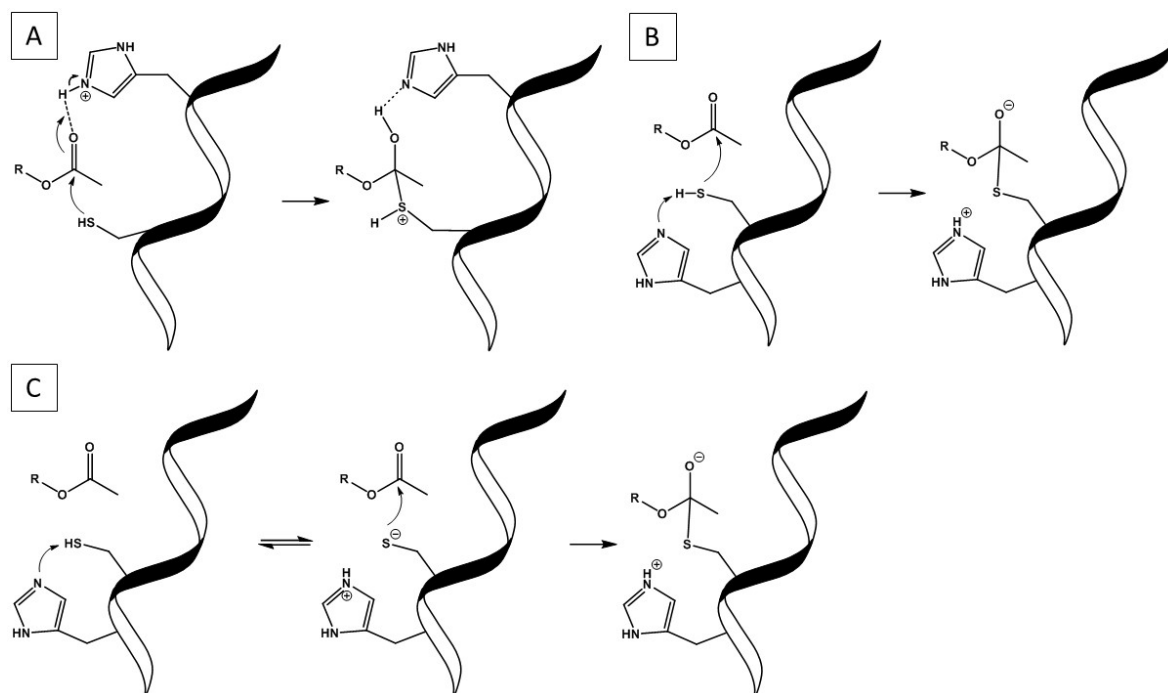


Abbildung 50: Überlagerung der pH-Wert-abhängigen Anfangsgeschwindigkeiten der ANBS-Hydrolyse; Rauten: Hydrogel **3**, Quadrate: Hydrogel **5**, Dreiecke: Hydrogel **3/5** (1 : 1,5 (n/n)).

Die möglichen Mechanismen des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes sind in *Schema 7* dargestellt. Einerseits könnte HisH⁺ als Säure den Ester koordinieren und aktivieren, sowie den Übergangszustand stabilisieren, während das Thiol als besseres Nukleophil angreift (kooperative nukleophile und allgemeine Säure-Katalyse, *Schema 7A*).



Schema 7: Mögliche Mechanismen für den Acetylierungsschritt in der ANBS-Hydrolyse durch einen kooperativen Effekt an den schematischen Nanofasern der coassemblierten Hydrogele **3/5**; (A) allgemeiner Säure und kooperativer nukleophiler Mechanismus; (B) allgemeiner Base und kooperativer nukleophiler Mechanismus; (C) Mechanismus via Zwitterionenpaar.

Andererseits könnte His als Base durch die räumliche Nähe zum Cys den effektiven pK_a der Thiolgruppe des Cys-beinhaltenden DKPs verringern und damit dessen Reaktivität steigern (kooperative nukleophile und allgemeine Base-Katalyse, *Schema 7 B*). Dieser Effekt könnte auch zu einem Zwitterionenpaar wie in *Schema 7C* führen und die Nukleophilie des Cysteins auf diese Weise steigern.

3.2.4 Coassemblierung auf Basis von CH- π -Wechselwirkungen

Durch die Mischung von zwei Phe-basierten DKPs konnte ein coassembliertes Hydrogel mit veränderter Reaktivität erhalten werden, welche vermutlich auf einem kooperativen Effekt der funktionellen Gruppen beruht (*Kapitel 3.2.1*). Die Coassemblierung der zwei Komponenten basiert auf DKP-unspezifischen Wasserstoffbrücken und aromatischen Wechselwirkungen. Dies führt zu einer unkoordinierten Anordnung der DKPs innerhalb der Nanofasern. Das Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Ordnung von zwei verschiedenen DKPs in einem coassemblierten Hydrogel durch das Design der monomeren Bausteine zu steuern. Eine höhere Ordnung, idealerweise eine alternierende Abfolge zweier His- und Cys-beinhaltender DKPs, sollte sich mit einer deutlich höheren Reaktivität in der Modellreaktion bemerkbar machen.

Phenylalanin ist die strukturgebende Aminosäure der meisten gelbildenden DKPs (**1 - 7, 9, 14**). Dementsprechend wurden π - π -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Seitenketten für die Realisierung einer höheren Ordnung in den supramolekularen DKP-Assemblaten postuliert. Um zwei verschiedene DKPs in eine alternierende Anordnung zu bringen, wurden schließlich CH- π -Wechselwirkungen in Betracht gezogen. Modelle für die Coassemblierung auf Basis von π - π - und CH- π -Wechselwirkungen sind in *Abbildung 51* dargestellt.

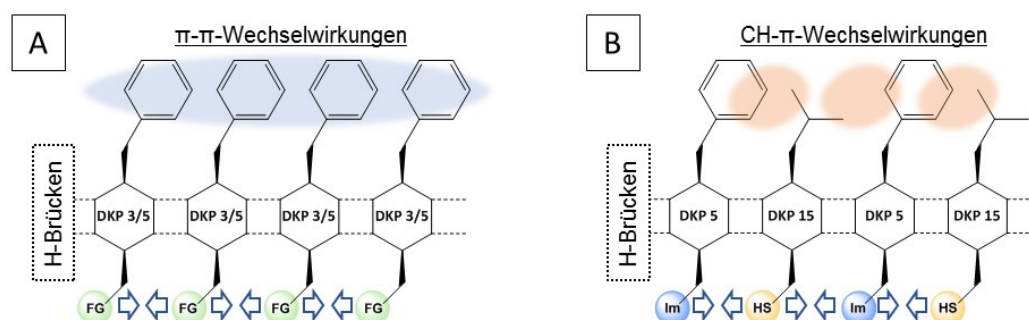


Abbildung 51: Postulierte Modelle für die molekulare Anordnung von Mischungen (A) verschiedener Phe-basierter DKPs und (B) Phe- und Leu-basierter DKPs; DKP-unspezifische Wasserstoffbrücken zwischen dem Sechsringen bilden das Rückgrat (gepunktete Linien); π - π -Wechselwirkungen (blau) treten zwischen Phe-basierten DKPs zusätzlich auf und führen zu einer zufälligen Verteilung der verschiedenen DKPs in den Nanofasern; CH- π -Wechselwirkungen (rot) zwischen Leu- und Phe-beinhaltenden DKPs sollen eine gezielte alternierende Abfolge der DKPs erzwingen; die funktionellen Gruppen werden durch die Coassemblierung in eine räumlich Nähe gebracht; FG = funktionelle Gruppe, Im = Imidazol.

Die Kombination eines Phe-beinhaltenden DKPs mit einem Val- oder Leu-beinhaltenden DKP sollte, im Gegensatz zu den unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Phe-DKPs (*Abbildung 51A*), die DKPs durch CH- π -Wechselwirkungen in eine alternierende Abfolge zwingen (*Abbildung 51B*). Für das hier angestrebte Modell ist es zudem förderlich, dass die untersuchten Leu- (DKP **15**) und Val-DKPs (DKP **16**) nicht in der Lage sind Monoassemblate zu bilden (vergleiche *Tabelle 3*). Eine unkoordinierte Coassemblierung zu einem Hydrogel ist in diesem Modell also nicht möglich, da zwei aufeinanderfolgende Val- oder Leu-DKPs aufgrund mangelnder Wechselwirkungen die Bildung von Nanofasern unterbrechen würden. Falls keine ausreichend attraktiven Wechselwirkungen für eine Coassemblierung auftreten, sollten sich die Val- und Leu-Derivate in mikrokristalliner oder amorpher Form zwischen den Nanofasern des selbstassemblierten Phe-DKPs ablageren.

3.2.4.1 Untersuchung der Morphologie

Erste Versuche zur gemischten Hydrogelbildung von Leu-DKP **15** und Val-DKP **16** mit dem gelbildenden Phe-DKP **5** (*Abbildung 52A*) sollten zeigen, ob ausreichend attraktive Wechselwirkungen vorliegen um eine Coassemblierung zu erreichen.

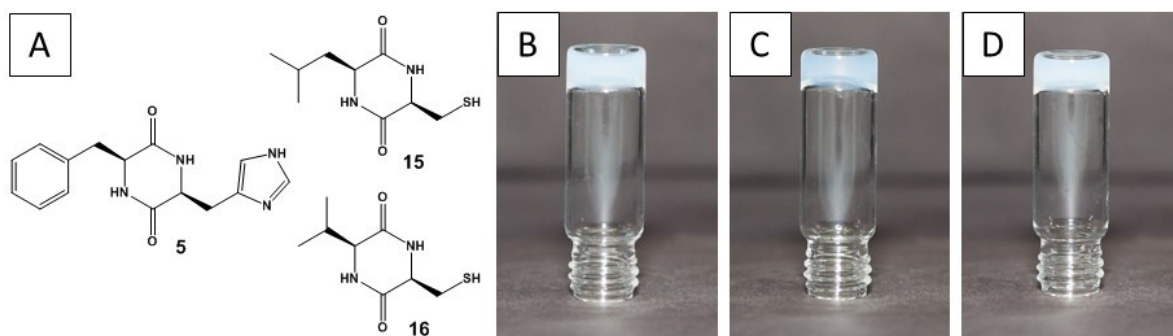


Abbildung 52: (A) Verwendete DKPs **5**, **15** und **16** und Aufnahmen der resultierenden Hydrogele von (B) DKP **5** (1,5 Gew-%), (C) DKP **5/15** (Σ 2,0 Gew-%, 1 : 1 (*n/n*)) und (D) DKP **5/16** (Σ 2,5 Gew-%, 1 : 1 (*n/n*)).

Eine 1 : 1 (*n/n*) Mischung aus **5** und **15** bildet bei 2,0 Gew-% ein klares Hydrogel (*Abbildung 52C*). Eine 1 : 1 (*n/n*) Mischung aus **5** und **16** bildet bei 2,5 Gew-% ein trübes Hydrogel (*Abbildung 52D*). Die äquimolar coassemblierten Hydrogele sind insgesamt homogen und es sind keine kristallinen oder amorphen Einschlüsse zu erkennen.

Die REM- und TEM-Aufnahmen der Xerogele **5/15** (1 : 1 (*n/n*)) (*Abbildung 53A+B*) und **5/16** (1 : 1 (*n/n*)) (*Abbildung 53C+D*) zeigen eine homogene, von den Einzelkomponenten (*Abbildung 47A+B*) deutlich zu unterscheidende Morphologie. Die durchschnittlichen Faserdicken liegen mit 21 nm für Xerogel **5/15** (*siehe Anhang S. 145*) und 33 nm für Xerogel **5/16** (*siehe Anhang S. 146*) im Bereich der Einzelkomponenten (23 nm für Xerogel **3** und 32 nm für Xerogel **5**). Die vollständige Coassemblierung kann aufgrund der homogenen

makroskopischen und elektronenmikroskopischen Erscheinung der Gele angenommen werden.

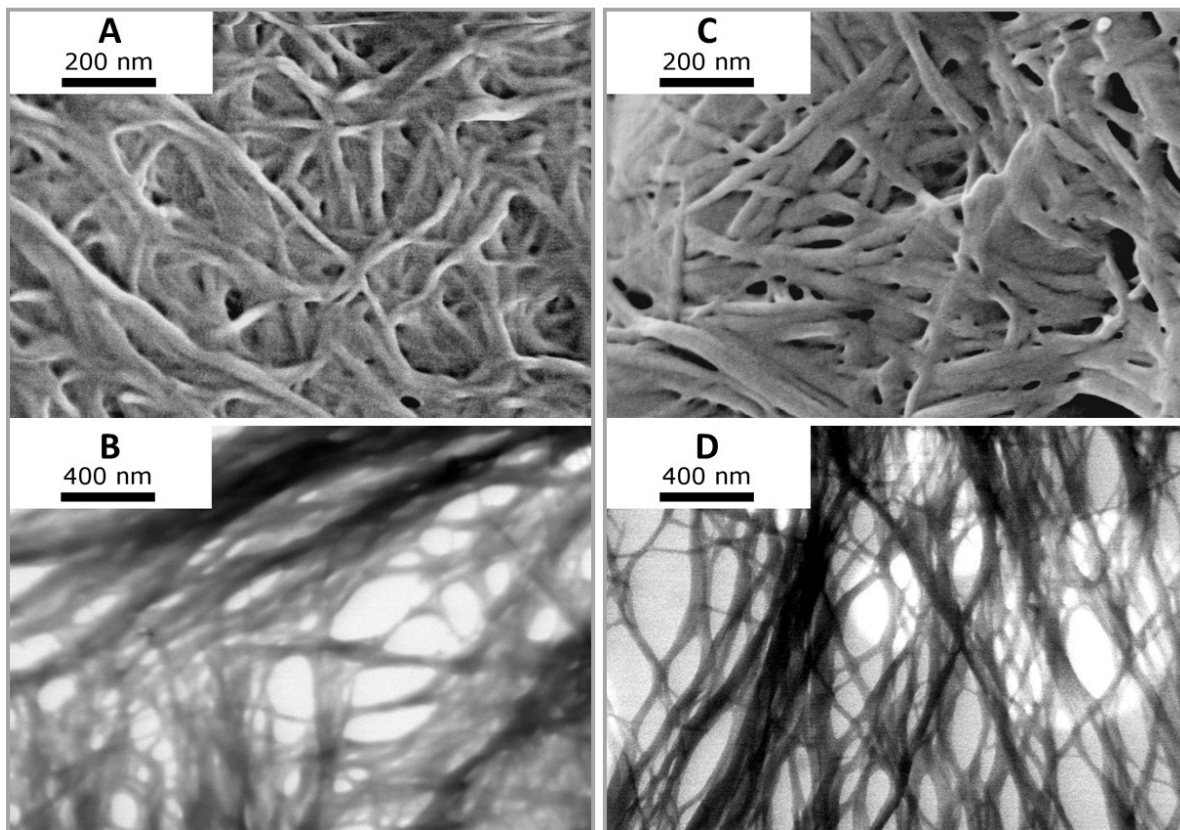


Abbildung 53: REM- (oben) und TEM-Aufnahmen (unten) von (A+B): Xerogel **5/15** (1 : 1 (n/n); 2,0 Gew-%), (C+D) Xerogel **5/16** (1 : 1 (n/n); Σ 2,5 Gew-%):

3.2.4.2 Untersuchung der katalytischen Eigenschaften

In Folgeexperimenten wurde die Anfangsgeschwindigkeit der ANBS-Hydrolyse der coassemblierten Hydrogele in Abhängigkeit des Molenbruchs von DKP **15** und **16** untersucht. Angefangen mit dem reinen Hydrogel **5** steigt v_0 mit der Erhöhung des Anteils von DKP **15** erst langsam an und dann schlagartig bei $\chi = 0,5$ (DKP **5/15** = 1 : 1 (n/n)) auf ein Maximum von 1,1 mM/min (*Abbildung 54A*). Hier zeigt sich, gerade im Vergleich zu dem coassemblierten Hydrogel **3/5** (*Abbildung 49A*), ein sehr schmales und deutliches Maximum.

Ein größerer Anteil von DKP **15** resultiert in einer starken Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit und bei χ (**15**) > 0,7 konnte kein stabiles Hydrogel erhalten werden. Die Variation des Molenbruchs für das coassemblierte Hydrogel **5/16** führt zu einem vergleichbaren Ergebnis (*Abbildung 54B*). Sowohl die Lage als auch die Höhe des Maximums der Anfangsgeschwindigkeiten ($\chi = 0,5$; 1,1 mM/min) sind nahezu identisch. Eine Erhöhung der Anteile von DKP **15** und **16** in den Mischungen auf mehr als ein Äquivalent führt zu inhomogenen Gelen mit amorphem Niederschlag.

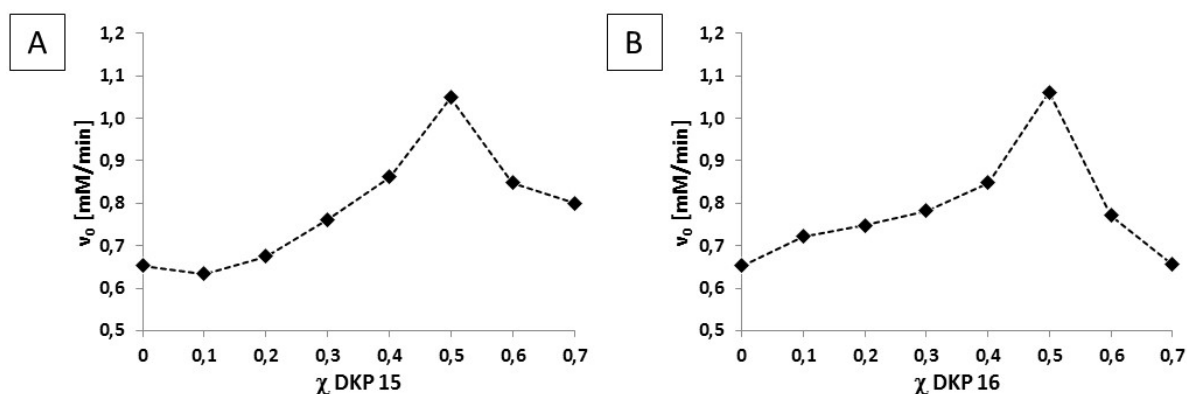


Abbildung 54: Anfangsgeschwindigkeiten der ANBS-Hydrolyse ($c(\text{ANBS}) = 48 \text{ mM}$) in Gegenwart der coassemblierten Hydrogele **5/15** und **5/16** in Abhängigkeit des Molenbruchs der jeweiligen Cys-beinhaltenen DKPs bei $\text{pH} = 8$ in $0,25 \text{ M}$ HEPES-Puffer; (A) Hydrogel **5/15** ($c(\text{Hydrogel}) = 80 \text{ mM}$); (B) Hydrogel **5/16** ($c(\text{Hydrogel}) = 80 \text{ mM}$).

Die weitere Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Modellreaktion wurde anschließend mit dem optimalen Mischungsverhältnis durchgeführt, um die vorliegenden Systeme weiter auszuleuchten und die optimalen Hydrolysebedingungen für jedes System zu finden. Das pH-Profil der ANBS-Hydrolyse für das gemischte **5/15** (1 : 1) Hydrogel zeigt einen steilen Anstieg der Anfangsgeschwindigkeit von $\text{pH} 6,50$ bis zu einem Maximum bei $\text{pH} 7,38$ ($v_{0,\text{max}} = 1,03 \text{ mM/min}$). Bei höheren pH-Werten sinkt v_0 stark ab (Abbildung 55A). Das coassemblierte Hydrogel **5/16** (1 : 1) zeigt ein fast identisches pH-Profil mit einem geringfügig verschobenen Maximum der Anfangsgeschwindigkeit bei $\text{pH} 7,25$ ($v_{0,\text{max}} = 1,15 \text{ mM/min}$) sowie einer erneuten Zunahme von v_0 von $\text{pH} 8,25$ auf $8,50$ (Abbildung 55B).

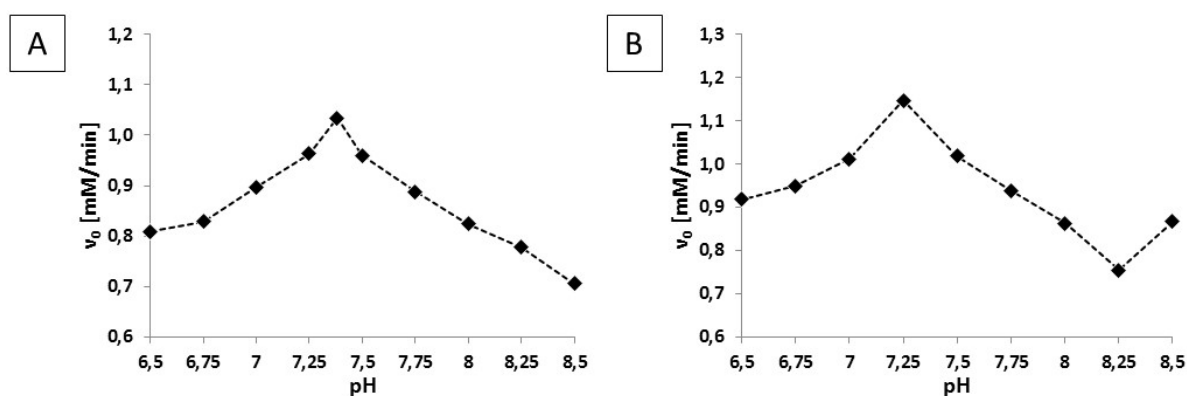


Abbildung 55: Anfangsgeschwindigkeiten der ANBS-Hydrolyse ($c(\text{ANBS}) = 24 \text{ mM}$) in $0,25 \text{ M}$ HEPES-Puffer in Abhängigkeit vom pH-Wert in Gegenwart von (A) Hydrogel **5/15** (1 : 1 (n/n); $c(\text{Hydrogel}) = 106 \text{ mM}$); (B) Hydrogel **5/16** (1 : 1 (n/n); $c(\text{Hydrogel}) = 80 \text{ mM}$).

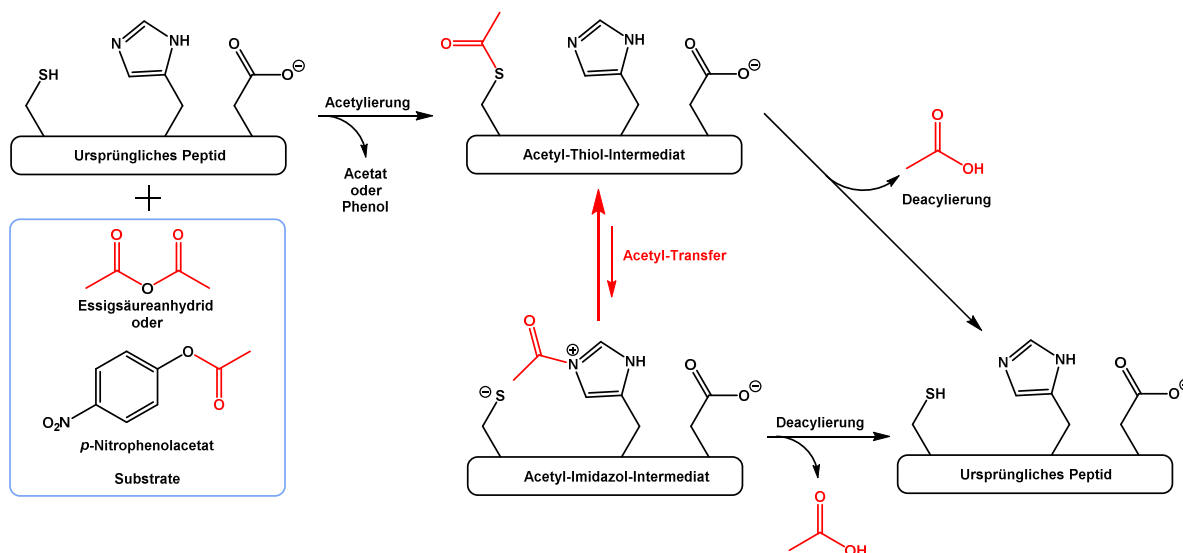
Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen das postulierte Modell zur molekularen Anordnung der DKPs in den coassemblierten Hydrogelen (Abbildung 51) und den Mechanismus der Hydrolyse (Schema 7). Die Bildung von Niederschlägen im Gel bei der Verwendung von mehr als einem Äquivalent DKP **15** bzw. **16** ($\chi > 0,5$) zeigt, dass DKP **15** und **16** ohne die entsprechende Menge an Phe-beinhaltenen Gegenspieler für die Ausbildung von CH- π -Wechselwirkungen nicht in die Nanofasern eingebaut werden können. Eine alternierende Coassemblierung mit DKP **5** kann nach dem Modell nur bis zu einem äquimolaren Verhältnis

möglich sein. Die maximale Anfangsgeschwindigkeit bei einem äquimolaren Verhältnis der His- und Cys-beihaltenden DKPs, spricht für eine katalytische HisH⁺-Cys-Kooperation bei der Esterhydrolyse.

Ohne kooperative Wechselwirkung der funktionellen Gruppen wäre zu erwarten, dass die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse unter basischen (nukleophile oder allgemeine Basen-Katalyse) oder sauren Bedingungen (allgemeine Säure-Katalyse) und nicht im neutralen Bereich überwiegt. Die coassemblierten Hydrogele **5/15** und **5/16** zeigen unter optimalen Bedingungen mit 1,03 mM/min bzw. 1,15 mM/min eine fast doppelt so große maximale Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse im Vergleich mit dem Phe-basierten Hydrogelsystem **3/5** ($v_{0,max} = 0,62$ mM/min). Die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu dem unkoordiniert coassemblierten System ist wahrscheinlich auf eine höhere (alternierende) Ordnung der Cys- und His-DKPs durch CH- π -Wechselwirkungen innerhalb des Hydrogels zurückzuführen.

3.2.5 Vergleich der Katalyse in Lösung und Hydrogel

Die Untersuchung der Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolyse berücksichtigt nur den ersten Schritt einer mehrstufigen Reaktion, in dem das aktive Nukleophil (Thiol oder Imidazol-Gruppe) unter Freisetzung von eines Acetats oder Phenols acetyliert wird (vergleiche *Schema 8*).^[285]



Schema 8: Acetyltransfer und Rückangriff in enzytmimetischen Peptiden: Nach der Acetylierung des Peptids durch das Substrat kann ein schneller Acetyltransfer zwischen dem Thiol und der Imidazolgruppe stattfinden; ein Rückangriff durch das Thiol reduziert die Deacetylierungsgeschwindigkeit deutlich und verhindert weiteren Umsatz.^[285]

Eine anschließende hydrolytische Deacetylierung ist allerdings essentiell für eine katalytische Funktion der Systeme. Um zu überprüfen, ob die Acetylierung der funktionellen Gruppen im

Hydrogel reversibel ist, wurde die Modellreaktion in den folgenden Experimenten mit einem Überschuss an Substrat für eine längere Zeit verfolgt. Um zu überprüfen, ob neben den in Nanofasern gebundene, teilweise in Lösung vorhandene DKPs den Reaktionsverlauf der Modellreaktion beeinflussen oder gar dominieren, wurden die Langzeit-Experimente mit vergleichbaren Systemen in Lösung durchgeführt. Hierfür wurde die Reaktion bei gleicher DKP-Konzentration in wässrigem Puffer in 50% DMF durchgeführt, um eine Gelbildung zu verhindern.

3.2.5.1 Untersuchung der katalytischen Aktivität

Die ANBS-Hydrolyse wurde mit reinem DKP **5** Hydrogel, den coassemblierten Hydrogelen **3/5**, **5/15** und **5/16** und den korrespondierenden Lösungen mit einem deutlichen ANBS-Überschuss für einen längeren Zeitraum beobachtet. In *Abbildung 56A* ist der Reaktionsverlauf der Modellreaktion im Überstand über reinem DKP **5** Hydrogel und in Lösung in 50% DMF dargestellt. Die Lösung zeigt im Vergleich einen schnelleren Reaktionsumsatz, welcher nach 10 Minuten deutlich langsamer steigt und sich asymptotisch einem Substratumsatz annähert, welcher der eingesetzten DKP-Konzentration entspricht. Das reine Hydrogel aus DKP **5** weist eine geringere Reaktionsrate auf, welche sich mit einer abnehmenden Steigung ebenfalls einem Substratumsatz ähnlich der DKP-Konzentration nähert. Diese Beobachtung spricht bei beiden Systemen für eine relativ schnelle Acetylierung des DKPs, gefolgt von einer sehr langsamen Hydrolyse des Acyl-Derivats. Eine katalytische Aktivität kann damit für DKP **5** in Lösung und Hydrogelzustand unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden.

Der Vergleich des Reaktionsverlaufes des coassemblierten Hydrogels **3/5** mit dem der korrespondierenden Lösung offenbart eindeutig neue Charakteristiken (*Abbildung 56B*). Die Lösung zeigt im Vergleich zu dem Hydrogel in den ersten Minuten eine größere Reaktionsgeschwindigkeit, die sich nach 5 - 10 Minuten deutlich verlangsamt und nach einem der eingesetzten DKP-Menge entsprechenden Umsatz nahezu stagniert. Das coassemblierte Hydrogel **3/5** weist andererseits einen annähernd linearen Reaktionsverlauf auf und übertrifft den Reaktionsumsatz der Lösung nach 35 Minuten. Das gemischte Hydrogel **3/5** zeigt damit im Gegensatz zu der DKP-Lösung und dem reinen DKP **5** Hydrogel ein katalytisches Verhalten, woraus zu schließen ist, dass die Hydrolyse der acetylierten Thiol- bzw. Imidazol-Gruppen durch die Coassemblierung ermöglicht wird.

Bemerkenswerterweise zeigt das coassemblierte Hydrogel **5/15** die gleiche Hydrolyse-Anfangsgeschwindigkeit, wie die korrespondierende Lösung, mit einem höheren Reaktionsumsatz des Hydrogels nach nur 5 Minuten (*Abbildung 56C*). Der Reaktionsverlauf der Lösung nähert sich wie bei den vorangegangenen Experimenten asymptotisch der

eingesetzten DKP-Konzentration an, während der Reaktionsumsatz des Hydrogel-Systems annähernd linear steigt.

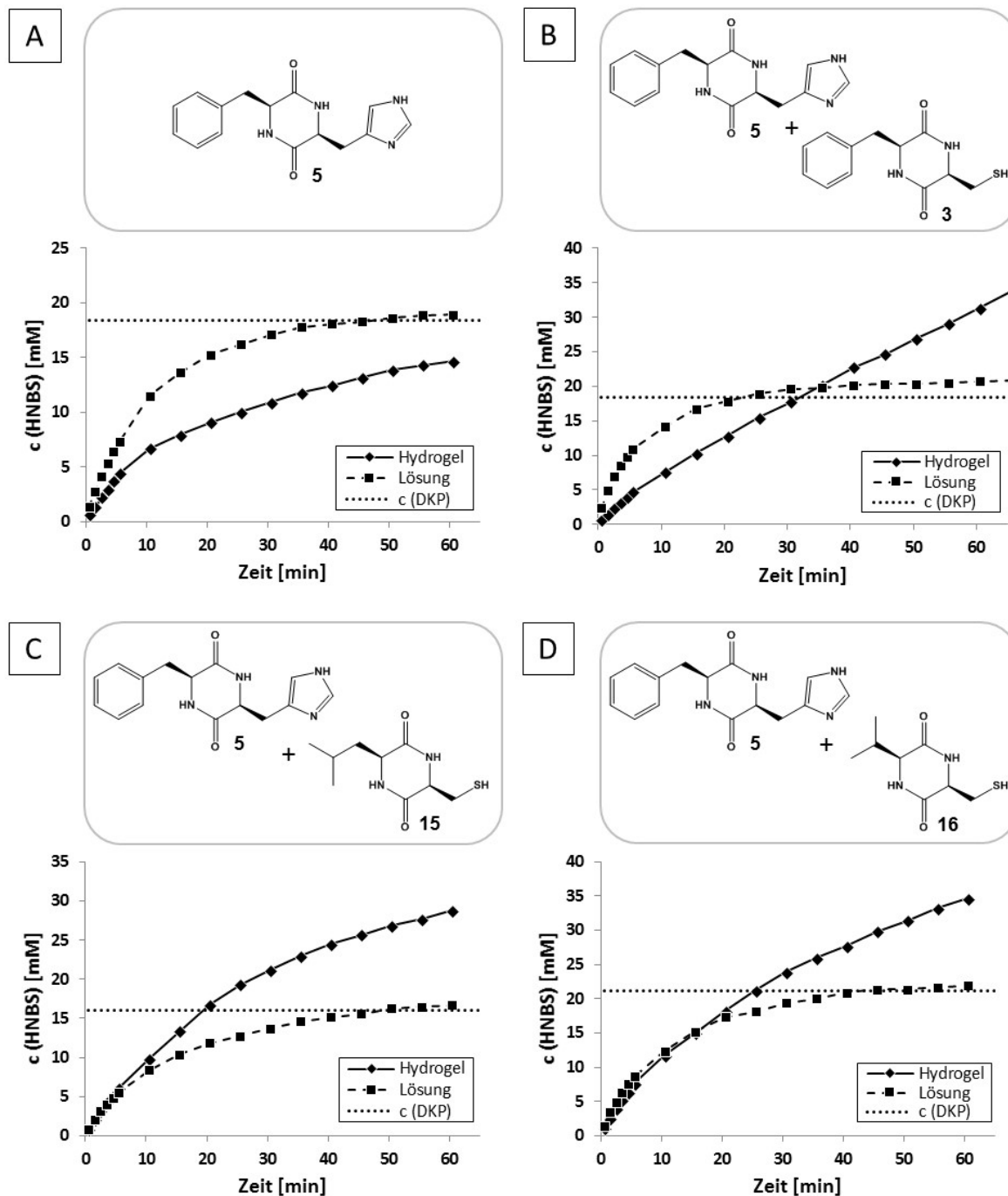


Abbildung 56: Reaktionsverlauf der ANBS-Hydrolyse ($c(\text{ANBS}) = 60 \text{ mM}$), Darstellung der HNBS-Bildung über die Zeit; Vergleich der Reaktion in Lösung (HEPES/DMF = 1 : 1, $V = 1.25 \text{ mL}$) mit der Reaktion im Überstand des korrespondierenden Hydrogels; Quadrate = Reaktion in Lösung, Rauten = Reaktion in Gegenwart des Hydrogels, gestrichelte Linie = gesamte DKP-Konzentration bezogen auf das Gesamtvolumen; (A) DKP 5 (pH = 6,50; $c(\text{Hydrogel}) = 92 \text{ mM}$); (B) DKP 3/5 (1 : 1,5 (n/n); pH = 7,50; $c(\text{Hydrogel}) = 92 \text{ mM}$); (C) DKP 5/15 (1 : 1 (n/n); pH = 7,38; $c(\text{Hydrogel}) = 80 \text{ mM}$);¹ (D) DKP 5/16 (1 : 1 (n/n); pH = 7,25; $c(\text{Hydrogel}) = 106 \text{ mM}$);

Abbildung 56D zeigt den Reaktionsverlauf der ANBS-Hydrolyse des coassemblierten Hydrogels 5/16 und der korrespondierenden Lösung. Die Anfangsgeschwindigkeiten sind

¹ Die maximale DKP-Konzentration des coassemblierten Hydrogel 5/15 ist auf 80 mM begrenzt, da das Hydrogel bei höheren Konzentrationen inhomogen wird.

annähernd identisch, nach 15 Minuten zeigt die Hydrogel-vermittelte Reaktion einen größeren Umsatz als die Lösung. Zusammenfassend zeigt das coassemblierte Hydrogel **5/15** vor Hydrogel **5/16** das beste Resultat der untersuchten DKP-Hydrogele im Vergleich zu den korrespondierenden Lösungen.

Die Langzeit-Experimente machen deutlich, dass die Assemblierung der DKPs keinen Reaktivitätsvorteil gegenüber einer Lösung im Sinne einer gesteigerten Geschwindigkeit der ANBS-Hydrolyse bringt. Die Heterogenität der Hydrogelsysteme limitieren die beobachteten Anfangsgeschwindigkeiten durch eine notwendige Diffusion des Substrats zu den „aktiven Zentren“ der Nanofasern und eine Diffusion des Hydrolyseprodukts zurück zur Oberfläche um erfasst zu werden. Der entscheidende Vorteil der Coassemblierung gegenüber DKPs in Lösung und der Selbstassemblierung von **5** ist anscheinend eine beschleunigte Deacylierung der funktionellen Gruppen. Nach der durch HisH⁺-Cys⁻-Paare beschleunigten Hydrolyse von ANBS kann der Acyltransfer von der Thiol- zur Imidazolgruppe zu einer begünstigten Deacylierung führen (vergleiche *Schema 8*). Acyl-Imidazol-Intermediate sind in der Regel mehr als zwei Größenordnungen labiler gegenüber der Hydrolyse als Acyl-Thiol-Intermediate.^[285, 293-294] Die Experimente zeigen weiterhin den Vorteil der alternierend coassemblierten Gele **5/15** und **5/16** gegenüber dem zufällig coassemblierten Hydrogel **3/5**. Der Zeitpunkt an dem der Reaktionsfortschritt der Lösung überholt wird bietet sich hier als Indikator an. Es wird hier im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten deutlich (vergleiche *Kapitel 3.2.4.1*), dass das Phe-Leu coassemblierte Hydrogel **5/15** dem Phe-Val-System **5/16** überlegen ist, da nach nur 5 Minuten (anstatt 15 Minuten) der Reaktionsumsatz der entsprechenden Lösung übertroffen wird (*Abbildung 56C+D*).

Für die Langzeit-Experimente wurden unterschiedliche Bedingungen für die Hydrogele gewählt, um maximale Stabilität und Widerstand gegen das Auflösen der Gele zu erreichen. Es wurde trotzdem beobachtet, dass sich die Hydrogele **5/15** und **5/16** im Gegensatz zu Hydrogel **3/5** in den Langzeit-Experimenten teilweise aufgelöst haben. Dies erklärt, warum der Reaktionsverlauf des Hydrogels **3/5** annähernd linear verläuft, während die Hydrogele **5/15** und **5/16** über die Zeit abnehmende Reaktionsgeschwindigkeiten aufweisen. Es ist weiterhin zu bedenken, dass auch bei Experimenten mit DKP-Lösungen eine Bildung oligomerer Aggregate nicht ausgeschlossen werden kann. Auch lösliche Aggregate von DKP **5** könnten eine gesteigerte Reaktivität durch einen kooperativen Effekt der Imidazolgruppen aufweisen.^[73, 77, 295] Ein solcher Effekt würde den Ergebnissen und deren Bewertung allerdings nicht widersprechen.

3.2.6 Katalytische Effizienz der Hydrogele

Aufgrund der unterschiedlichen optimalen pH-Werte, Mischungsverhältnisse und Löslichkeiten der DKPs sind die verwendeten Bedingungen nicht direkt vergleichbar. Zu diesem Zweck wurden die konzentrationsunabhängigen katalytischen Konstanten k_{cat} , K_M und die katalytische Effizienz nach dem Michaelis-Menten-Enzymkinetikmodell berechnet. Die Wechselzahl k_{cat} ist die Geschwindigkeitskonstante des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Reaktion.^[296] Die Michealis-Menten-Konstante K_M entspricht der Dissoziationskonstante eines Enzym-Substrat-Komplexes und ist das Maß für die Affinität des Substrates (je kleiner der Wert, desto größer die Affinität). Die katalytische Effizienz vereint die beiden beschriebenen Konstanten und ist als k_{cat}/K_M definiert. Eine große Wechselzahl ergibt also zusammen mit einer hohen Affinität (kleiner Wert von K_M) für das Substrat eine große katalytische Effizienz.

Um die katalytische Effizienz der verschiedenen Systeme zu bestimmen, wurde v_0 der ANBS-Hydrolyse in Abhängigkeit von der Substratkonzentration $[S]$ untersucht. Dabei wurden die für das jeweilige Hydrogel optimalen Bedingungen aus den vorhergehenden Kapiteln verwendet. Für die drei untersuchten coassemblierten Hydrogele zeigt sich bei kleinen Substratkonzentrationen ein annähernd linearer Anstieg der Anfangsgeschwindigkeit v_0 mit der Substratkonzentration (*Abbildung 57A-C*). Bei größeren Substratkonzentrationen verlangsamt sich jedoch die Zunahme von v_0 , analog zu enzymkatalysierten Reaktionen.^[296]

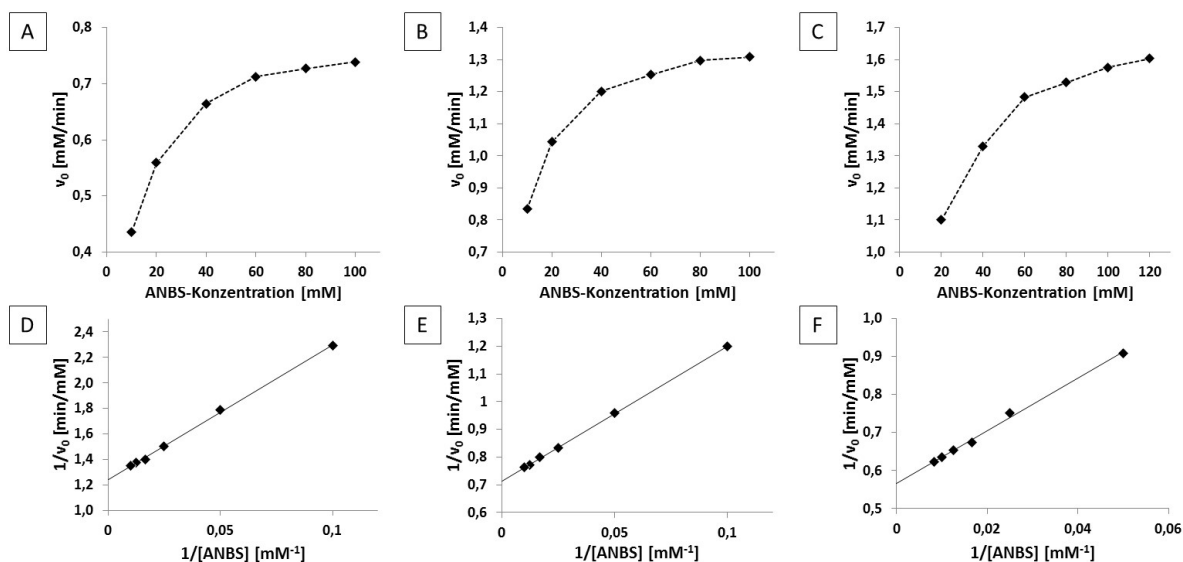


Abbildung 57: Substratkonzentrationsabhängige Anfangsgeschwindigkeiten der ANBS-Hydrolyse katalysiert durch coassemblierte Hydrogele in 0,25 M HEPES-Puffer (oben) und Ausschnitte der korrespondierenden Lineweaver-Burk-Plots (unten): (A+D) Hydrogel **3/5** (1 : 1,5 (*n/n*); pH = 7,50; c (Hydrogel) = 92 mm); (B+E) Hydrogel **5/15** (1 : 1 (*n/n*); pH = 7,38; c (Hydrogel) = 80 mm); (C+F) **5/16** (1 : 1 (*n/n*); pH = 7,25; c (Hydrogel) = 92 mm); die vollständigen Lineweaver-Burk-Plots sind im Anhang gezeigt (*Kapitel 6.3.2, Seite 146*).

Für die Berechnung der katalytischen Konstanten wurden v_0 und die Substratkonzentration $[S]$ jeweils reziprok gegeneinander in Lineweaver-Burk-Diagrammen aufgetragen (*Abbildung*

57D-F). Die erhaltenen Messwerte zeigen eine gute Übereinstimmung mit der für enzymatische Systeme erwarteten Geraden (Trendlinie).

Die Geschwindigkeitskonstanten der Hydrogele wurden anschließend unter Verwendung des Michaelis-Menten Enzymkinetikmodells anhand der Lineweaver-Burk-Diagramme berechnet.^[296] Der Schnittpunkt der Trendlinie mit der Ordinate entspricht der reziproken maximalen Geschwindigkeit bei maximaler Substratkonzentration ($1/V_{\max}$) und der Schnittpunkt mit der Abszisse entspricht der negativen reziproken Michaelis-Menten-Konstante ($-1/K_M$). Weiterhin steht die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} mit der Enzymkonzentration $[E]$ und V_{\max} in dem Verhältnis $k_{\text{cat}} = V_{\max}/[E]$. Die katalytische Effizienz entspricht dem Verhältnis von k_{cat} zu K_M .

Die Betrachtung der Geschwindigkeits-Konstanten in *Tabelle 5* zeigt eine Verdopplung von k_{cat} ausgehend vom Phe-Phe-coassemblierten DKP **3/5** Hydrogel ($k_{\text{cat}} = 0,73 \cdot 10^{-3} [\text{s}^{-1}]$) zu dem Phe-Leu-coassemblierten Hydrogel **5/15** ($k_{\text{cat}} = 1,46 \cdot 10^{-3} [\text{s}^{-1}]$) und dem Phe-Val-coassemblierten Hydrogel **5/16** ($k_{\text{cat}} = 1,60 \cdot 10^{-3} [\text{s}^{-1}]$). Der starke Anstieg von k_{cat} wird hier einer hochgeordneten alternierenden Anordnung der DKPs **5** und **15** respektive **16** innerhalb des coassemblierten Hydrogels zugeschrieben, welche durch spezifische CH- π -Wechselwirkungen zwischen den Phenylringen und den CH_3 -Gruppen von Leu bzw. Val induziert wird. Diese hochgeordneten Systeme weisen vermutlich eine deutlich größere Population an katalytisch aktiven HisH^+ -Cys $^-$ -Paaren auf.

Tabelle 5: Katalytische Konstanten der coassemblierten Hydrogele unter optimalen Bedingungen.

Hydrogel	K_M (10^{-3} M)	k_{cat} (10^{-3} s^{-1})	k_{cat}/K_M ($10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
DKP 3/5 ^a	8,51	0,73	0,86
DKP 5/15 ^b	6,81	1,46	2,14
DKP 5/16 ^c	12,18	1,60	1,31

^a 1 : 1,5 (n/n), pH = 7.50; ^b 1 : 1 (n/n), pH = 7.38; ^c 1 : 1 (n/n), pH = 7.25.

Der Vergleich der katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_M) verdeutlicht weiterhin den enormen Einfluss der jeweiligen lipophilen Aminosäure in den Mischungen (*Abbildung 58*). Obwohl k_{cat} für Hydrogel **5/15** und Hydrogel **5/16** ungefähr gleich groß ist, zeigt das Hydrogel **5/15** ($k_{\text{cat}}/K_M = 2,14 \cdot 10^{-1} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$) aufgrund einer geringeren Michaelis-Menten Konstante K_M eine deutlich größere katalytische Effizienz im Vergleich zu Hydrogel **5/16** ($k_{\text{cat}}/K_M = 1,31 \cdot 10^{-1} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$). Die folglich höhere Substrat-Affinität von Hydrogel **5/15** könnte auf einer vereinfachten CH- π -Wechselwirkung beruhen. Die zusätzliche CH_2 -Gruppe in DKP **15** ermöglicht es den Leu- CH_3 -Gruppen nach dem postulierten Modell, mit dem aromatischen Phe-System zu interagieren ohne eine größere Deformation in der Anordnung der DKPs zu

verursachen. Dies führt zu einer höheren Verfügbarkeit des „aktiven Zentrums“, also der His-Cys-Diade.

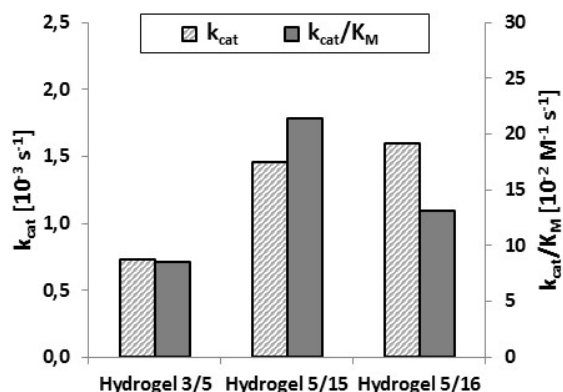


Abbildung 58: Vergleich von k_{cat} (diagonale gestreift) und katalytischer Effizienz k_{cat}/K_M (grau gefüllt) der untersuchten coassemblierten Hydrogele.

Da bereits Systeme mit katalytisch aktiven Nanofasern beschrieben wurden, die eine erhöhte Reaktivität aufgrund einer erhöhten Dichte funktioneller Gruppen durch einen geringeren Faserdurchmesser aufweisen, wurden die Nanofasern der vorgestellten Hydrogele genauer untersucht.^[229, 279] Die Durchmesser von jeweils 40 Nanofasern wurden vermessen und daraus die Durchschnittswerte berechnet. Der Vergleich von k_{cat} mit dem Durchmesser der Nanofasern zeigt ein gegensätzliches Verhalten zu dem von Stupp und Wang beschriebenen Effekt, dass dünnere Nanofasern einer höhere Dichte an funktionellen Gruppen an der Oberfläche aufweisen und somit eine größere hydrolytische Aktivität besitzen. Je größer der Durchmesser der coassemblierten DKP-Hydrogele war, desto höher war auch die katalytische Aktivität (Abbildung 59A).

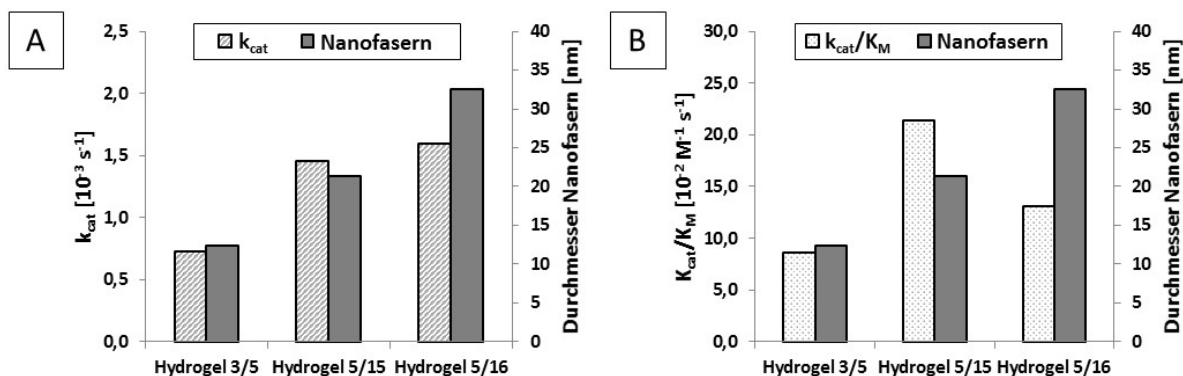


Abbildung 59: Vergleich des durchschnittlichen Nanofaserdurchmessers der untersuchten coassemblierten Hydrogele (grau gefüllt) mit (A) k_{cat} (diagonal gestreift) und (B) der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M (gepunktet).

Ein Vergleich der Faserdurchmesser (siehe Anhang S. 145 - 146) mit der katalytischen Effizienz zeigt, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der Reaktivität der Nanofasern und deren Durchmesser besteht (Abbildung 59B). Eine erhöhte Reaktivität der Hydrogele durch eine geringere Faserdicke lässt sich damit ausschließen.

3.2.7 Zweidimensionale NMR-Experimente

Die in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Experimente bestätigen das postulierte Modell der kooperativen Katalyse durch Selbstanordnung (*Abbildung 51*). Die erhaltenen Daten und Ergebnisse spiegeln jedoch nur indirekt die molekulare Anordnung in dem supramolekularen Netzwerk der Hydrogele wider. In folgenden Experimenten wurde daher versucht, CH- π -Wechselwirkungen innerhalb der coassemblierten Hydrogele mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie direkt nachzuweisen. 2D-NMR-Spektroskopie kann in supramolekularen Systemen eingesetzt werden, um die relativen Positionen von verschiedenen Bausteinen zu untersuchen.^[248] In Wirt-Gast-Komplexen und supramolekularen Organogel-Systemen wurde der Kern-Overhauser-Effekt (*nuclear overhauser effect*, NOE) schon erfolgreich für die Strukturaufklärung eingesetzt.^[297-300] Der Kern-Overhauser-Effekt ist grundsätzlich ab einem Abstand von weniger als 5 Å zu beobachten, große Nähe und Häufigkeit zweier Protonen führen zu einem intensiven Kreuzsignal in NOE-Spektren.^[301] Negative Vorzeichen der Signale deuten auf kleine Moleküle hin, die sich relativ zu der Mischzeit schnell bewegen können. Positive Vorzeichen sprechen für große Moleküle mit einer geringen Dynamik. Da für die Untersuchung von Hydrogelen allerdings in D₂O gearbeitet werden muss, sind die für die Wasserstoffbrücken entscheidenden Protonen nicht zu erkennen. Diese Einschränkung lenkt den Fokus der folgenden Experimente auf mögliche NOEs zwischen CH-Protonen verschiedener DKPs. Es wurden dementsprechend ¹H-HRMAS-NOESY-NMR-Experimente mit den coassemblierten Hydrogelen **3/5**, **5/15** und **5/16** in D₂O durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, ob sich die vermutete räumliche Nähe der lipophilen Seitenketten Phe, Leu und Val nachweisen lässt, um eindeutige Hinweise auf π - π - bzw. CH- π -Wechselwirkungen zu erhalten. Zusätzlich wurden die Mischungen der DKPs in Lösung als Referenzen gemessen, um den Effekt der Coassemblierung deutlich sichtbar zu machen, hierzu wurden geringere Konzentrationen der DKPs in einer D₂O/DMF-d₇ (1 : 1) Mischung gelöst.

3.2.7.1 Untersuchung der molekularen Anordnung

Die ersten NOE-Experimente wurden mit einer Lösung von DKP **3** und **5** (1 : 1 (*n/n*); *Abbildung 60*) sowie dem coassemblierten Hydrogel **3/5** (1 : 1 (*n/n*); *Abbildung 61*) durchgeführt. Die entscheidenden Signale der Phenyl-Ringe im NMR des Hydrogels überlagern vollständig. Die beobachteten Kreuzpeaks im 2D-Spektrum lassen daher keinen Schluss über die molekulare Anordnung zu. Obwohl sich die Signale der meisten CH-Protonen im aliphatischen Bereich nicht überlagern und den DKPs gut zuordnen lassen, lässt sich in dem Spektrum kein intermolekularer NOE erkennen. Interessanterweise weisen die Kreuzsignale im Bereich von 0,0 - 3,5 ppm ein negatives Vorzeichen auf, was auf flexible Bereiche mit einer relativ

schnellen Rotation hinweist (siehe Anhang S. 149). Die Kreuzsignale im aromatischen Bereich zeigen wiederum ein positives Vorzeichen, was auf starre Bereiche mit einer großen Rotationszeit hindeutet.^[301] Die Phenylgruppen bilden also durch attraktive Wechselwirkung einen relativ starren Bereich in der supramolekularen Struktur, wohingegen die anderen Seitenketten relativ frei und beweglich sind. Das Spektrum der korrespondierenden Lösung in D₂O/DMF (1 : 1 (v/v)) zeigt ausschließlich intramolekulare Kreuzpeaks mit negativem Vorzeichen, wie für freie kleine Moleküle zu erwarten. Das 2D-Spektrum des coassemblierten Hydrogels **5/15** (1 : 1) (Abbildung 62) zeigt auf den ersten Blick große Unterschiede im Vergleich zu den Spektren der korrespondierenden Lösung (Abbildung 63) und des Hydrogels **3/5**. Es sind intensive NOE-Kreuzsignale zu erkennen und es fällt auf, dass die aromatischen Phe-Signale sowie die Leu-CH₃-Signale mit jedem anderen Signal einen Kreuzpeak aufweisen. Alle Kreuzsignale weisen ein positives Vorzeichen auf (siehe Anhang S. 150), was auf einen vollständigen Einbau beider DKPs in das supramolekulare Polymer hindeutet.

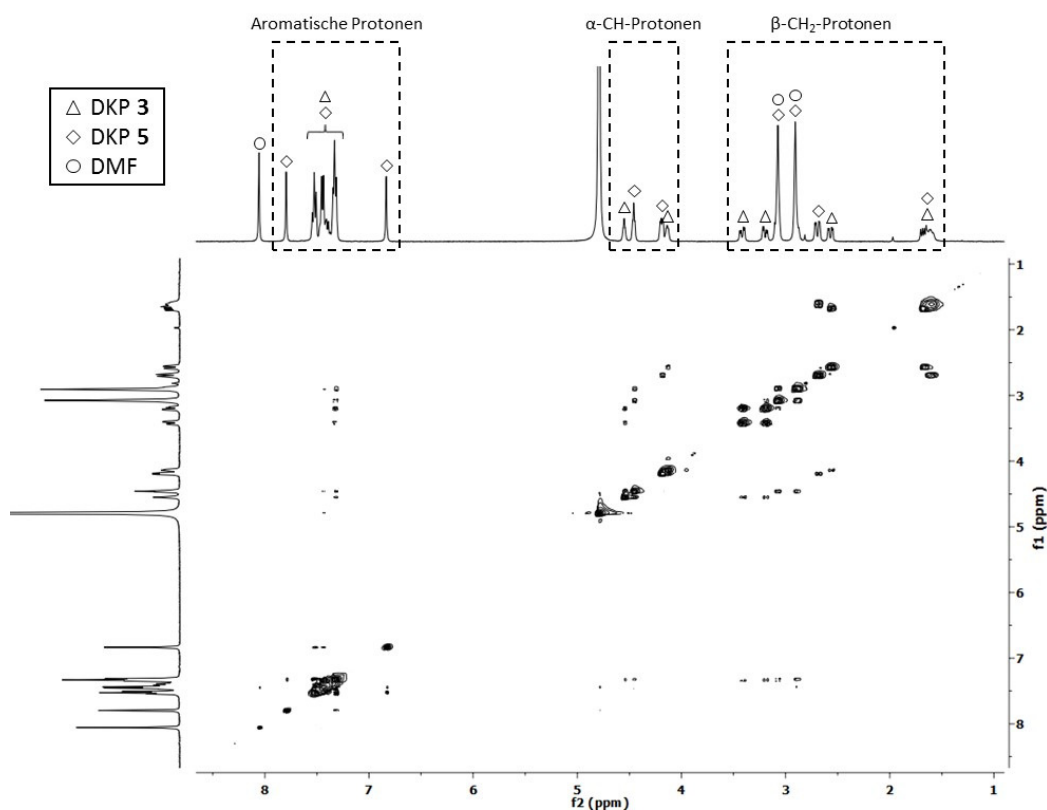


Abbildung 60: ¹H-HRMAS-NOE Spektrum einer Lösung von DKP **3** und **5** (1 : 1 (n/n)); c (DKP) = 18,4 mM in DMF-d₇/D₂O (1 : 1 (v/v)); Rotationsfrequenz = 2,5 kHz; Dreiecke: DKP **3**; Rauten: DKP **5**; Kreise: DMF.

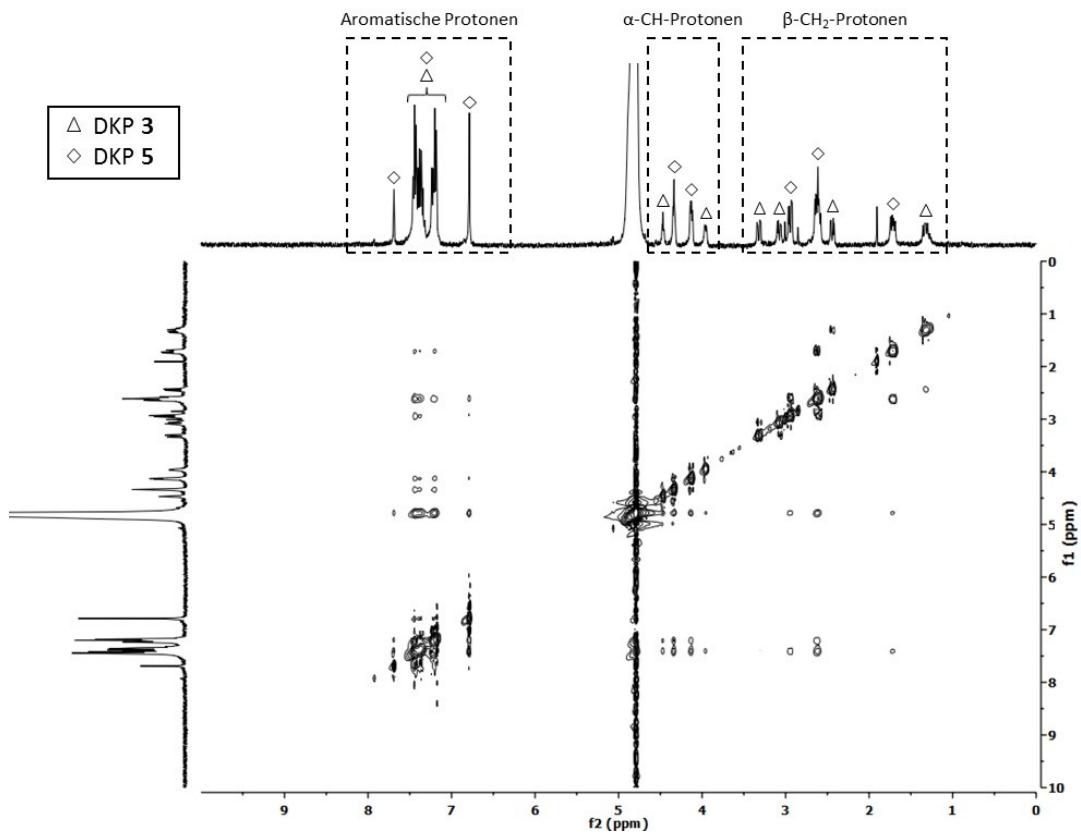


Abbildung 61: ^1H -HRMAS-NOE Spektrum von Hydrogel 3/5 (1 : 1 (n/n); c (Hydrogel) = 56 mM) in D_2O ; Rotationsfrequenz = 2,5 kHz; Dreiecke: DKP 3; Rauten: DKP 5.

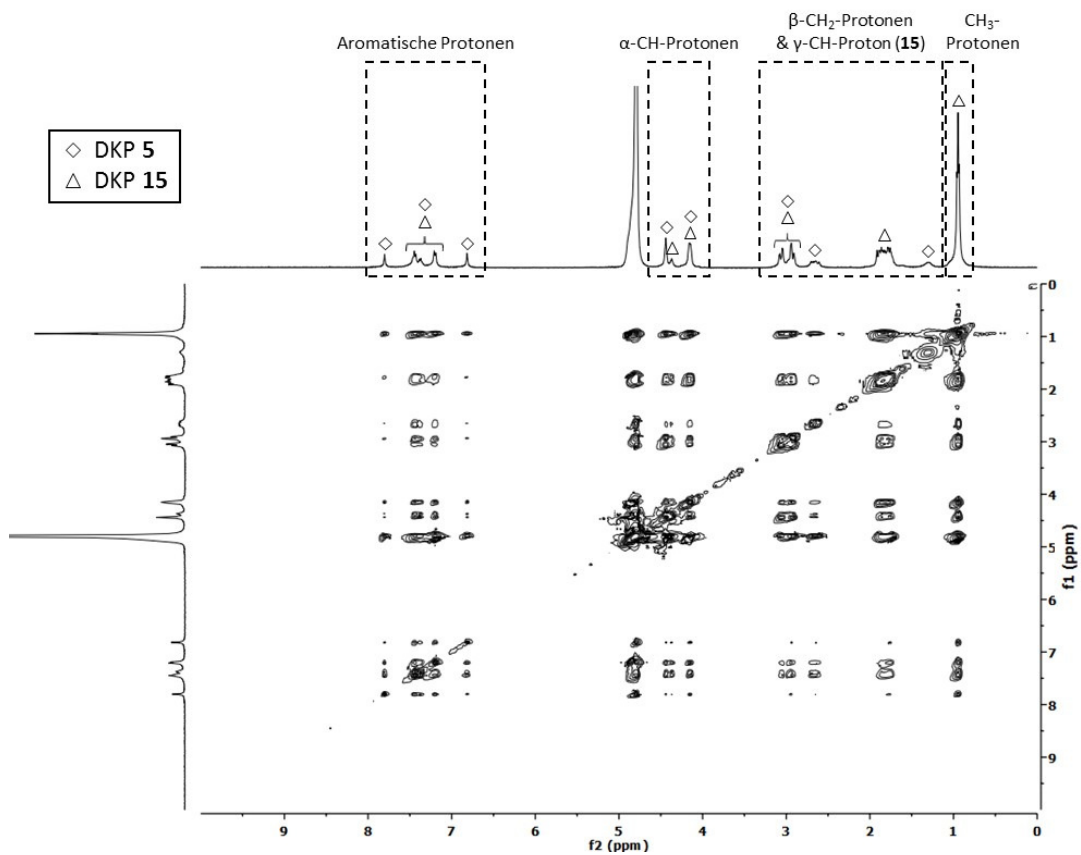


Abbildung 62: ^1H -HRMAS-NOE Spektrum von Hydrogel 5/15 (1 : 1 (n/n); c (Hydrogel) = 80 mM) in D_2O ; Rotationsfrequenz = 4,0 kHz; Rauten: DKP 5; Dreiecke: DKP 15.

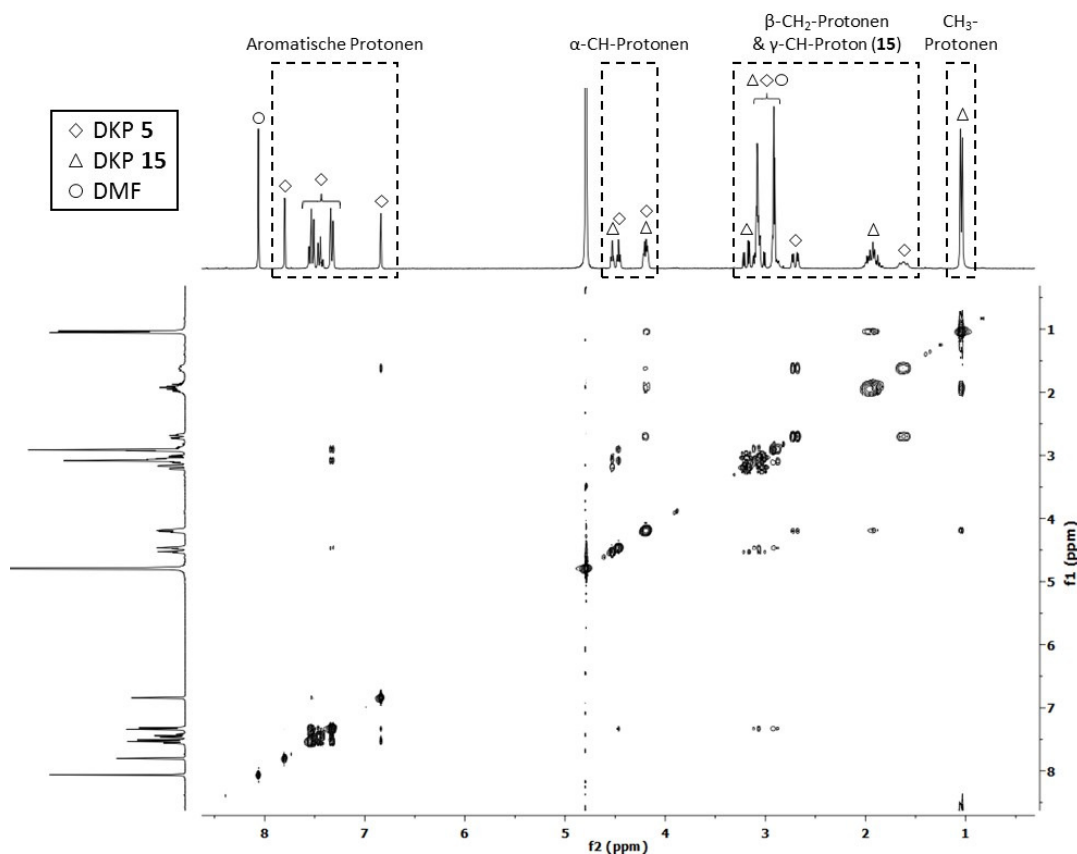


Abbildung 63: ^1H -HRMAS-NOE Spektrum einer Lösung von DKP **5** und **15** (1 : 1 (n/n); c (DKP) = 16,0 mM) in $\text{DMF-d}_7/\text{D}_2\text{O}$ (1 : 1 (v/v)); Rotationsfrequenz = 2,5 kHz; Rauten: DKP **5**; Dreiecke: DKP **15**; Kreise: DMF.

Es wurde ein starker NOE zwischen den Leu- CH_3 -Protonen von DKP **15** und den aromatischen Phe-Protonen von DKP **5** festgestellt (*Abbildung 62*). Dabei handelt es sich um das stärkste intermolekulare Kreuzsignal des 2D-Spektrums, was auf eine große Nähe und relative Häufigkeit innerhalb des supramolekularen Systems hinweist. Grundsätzlich zeigt das ^1H -HR-MAS-NOESY Spektrum ein Muster, welches für ein relativ homogenes und gut geordnetes Netzwerk spricht. Die intensiven und positiven Kreuzsignale unterscheiden das 2D-Spektrum deutlich von dem des coassemblierten Hydrogels **3/5**. Der Einfluss der Assemblierung wird besonders im Vergleich zu dem Spektrum der korrespondierenden Lösung deutlich, bei dem sich nur wenige und schwache intramolekulare NOEs mit negativem Vorzeichen zeigen (*Abbildung 63*).

Die NOE-Experimente des coassemblierten Hydrogels **5/16** (1 : 1) in D_2O (*Abbildung 64*) zeigen zu dem Hydrogel **5/15** vergleichbare Ergebnisse. Neben den zahlreichen und intensiven NOEs, welche ausschließlich positive Vorzeichen aufweisen (*siehe Anhang S. 150*), fällt insbesondere das starke Kreuzsignal zwischen den Val- CH_3 -Protonen und den aromatischen Phe-Protonen auf. Auch in diesem System zeigt das Vergleichsexperiment der beiden DKPs **5** und **16** in einer $\text{D}_2\text{O}/\text{DMF-d}_7$ Lösung den Einfluss der Assemblierung auf das Spektrum (*Abbildung 65*). Die wenigen intramolekularen NOEs der Lösung weisen ein negatives Vorzeichen und eine schwache Intensität auf.

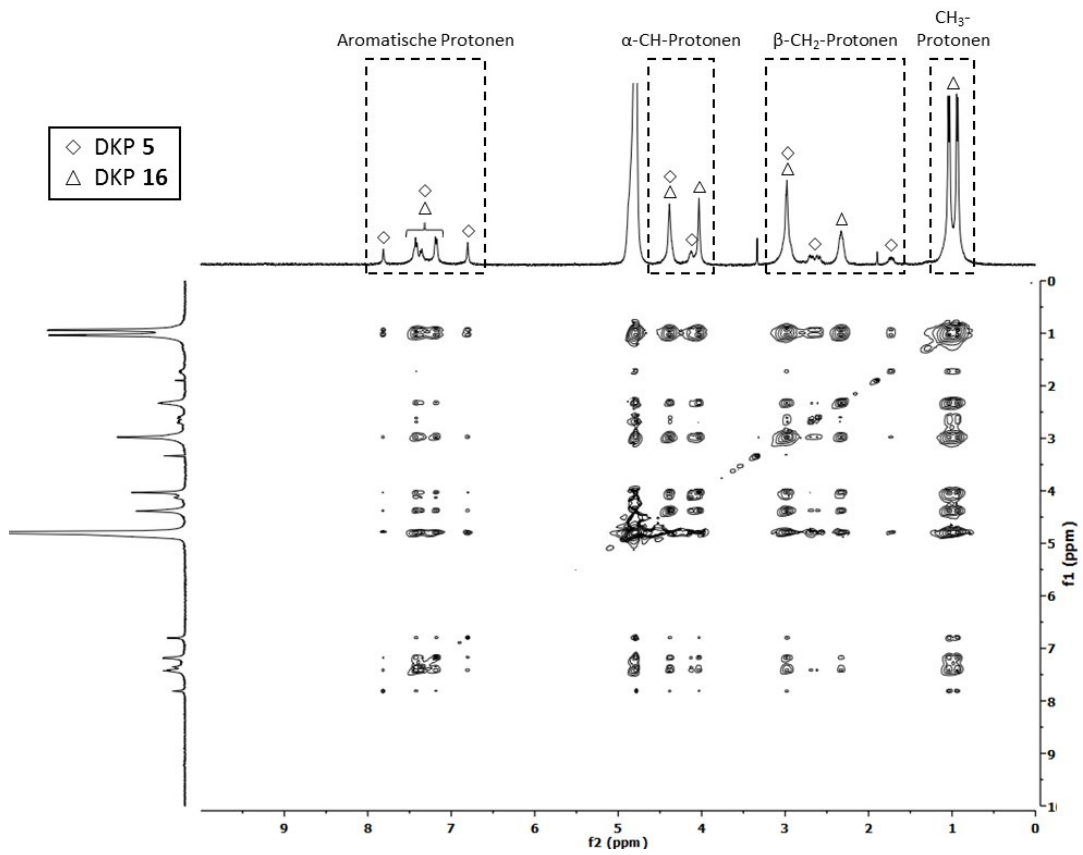


Abbildung 64: ^1H -HRMAS-NOE Spektrum von Hydrogel **5/16** (1 : 1 (*n/n*); *c* (Hydrogel) = 80 mm) in D_2O ; Rotationsfrequenz = 2,5 kHz; Rauten: DKP **5**; Dreiecke: DKP **16**.

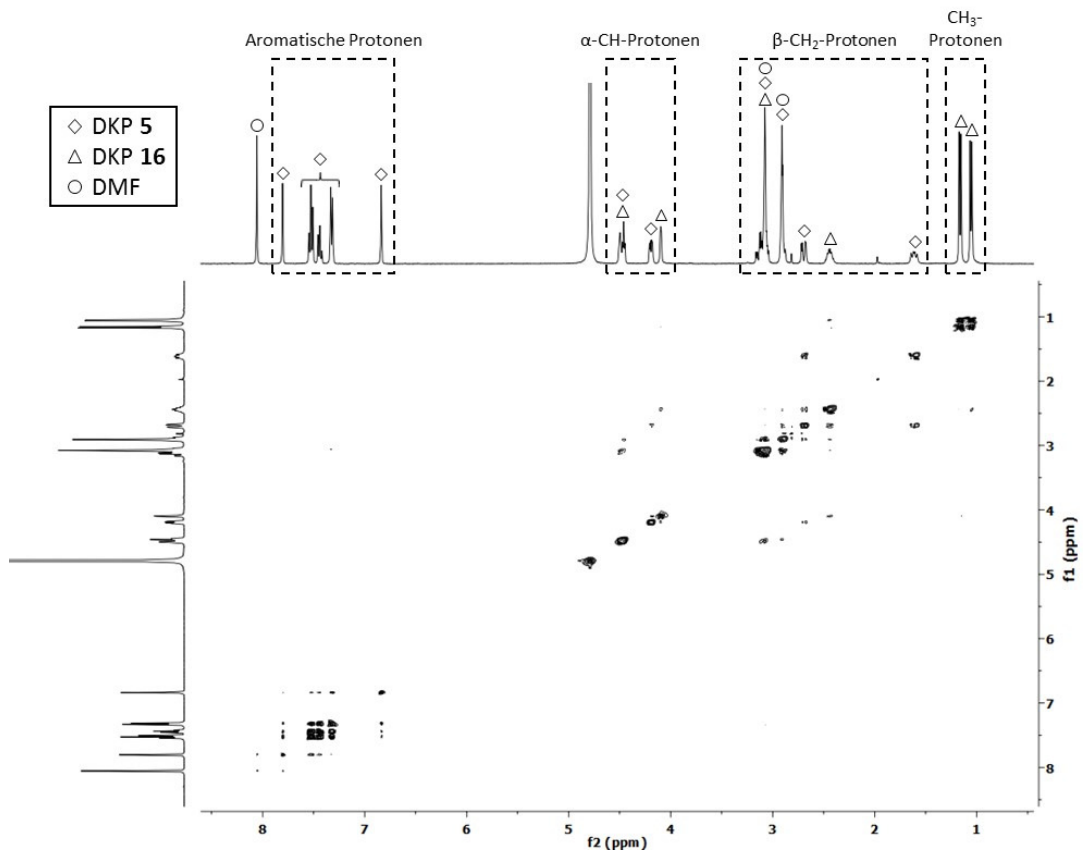


Abbildung 65: ^1H -HRMAS-NOE Spektrum einer Lösung von DKP **5** und **16** (1 : 1 (*n/n*); *c* (DKP) = 21,0 mm) in $\text{DMF-d}_7/\text{D}_2\text{O}$ (1 : 1 (*v/v*)); Rotationsfrequenz = 2,5 kHz; Rauten: DKP **5**; Dreiecke: DKP **16**; Kreise: DMF.

Zusammenfassend konnte also ein starker NOE zwischen den Leu-CH₃-Protonen von DKP **15** (Abbildung 66B) bzw. den Val-CH₃-Protonen von DKP **16** (Abbildung 66C) und den aromatischen Phe-Protonen von DKP **5** festgestellt werden.

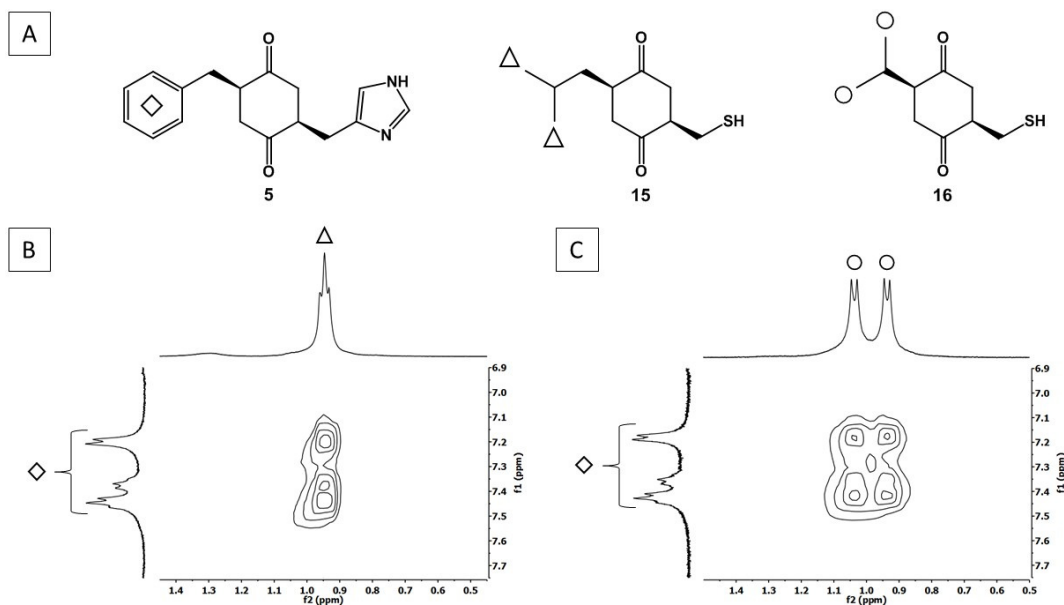


Abbildung 66: (A) Strukturen der DKPs **5**, **15** und **16** mit Zuweisung relevanter Protonen sowie vergrößerte Ausschnitte der HR-MAS-NOE-Spektren und Zuordnung der relevanten Signale von (B) Hydrogel **5/15** (Rauten: aromatische Phe-Protonen von DKP **5**, Dreiecke: CH₃-Protonen von DKP **15**) und (C) Hydrogel **5/16** (Rauten: aromatische Phe-Protonen von DKP **5**, Kreise: CH₃-Protonen von DKP **16**).

Die aromatischen Phe- und die Leu- bzw. Val-CH₃-Protonen der coassemblierten Hydrogele zeigen NOEs mit jedem anderen Proton, allerdings sind die NOEs zwischen den Val- bzw. Leu-CH₃-Protonen und den Phe-Protonen von DKP **5** von allen intermolekularen NOEs mit Abstand am stärksten ausgeprägt.

Die vorgestellten zweidimensionalen NMR-Experimente im Gelzustand weisen eindeutig darauf hin, dass die supramolekularen Netzwerke der coassemblierten Hydrogele **5/15** und **5/16** auf CH- π -Wechselwirkung zwischen Val- bzw. Leu- und Phe-Seitenketten basieren. Folglich konnte alternierende Coassemblierung der DKPs **15** und **16** mit **5** analog zu dem vorgestellten Modell (Abbildung 51) bestätigt werden.

3.2.8 Schlussfolgerung

Durch die Optimierung der Gelbedingungen konnten coassemblierte Hydrogele von His- und Cys-basierten DKPs generiert werden, die eine enzytmimetische Reaktivität aufwiesen. Diese Reaktivität der coassemblierten Hydrogele basiert auf einer, den Enzymen nachempfundenen, räumlichen Anordnung der monomeren Bausteine. Eine gezielte Kontrolle über die molekulare Anordnung konnte durch konzipierte CH- π -Wechselwirkungen zwischen Val- (DKP **16**) bzw. Leu- (DKP **15**) und Phe-basierten (DKP **5**) DKPs erreicht werden. Ein Nachweis der alternierenden DKP-Anordnung gelang mittels kinetischer Untersuchungen

anhand der ANBS-Hydrolyse als Modellreaktion und 2D-NMR-Experimente. Es wäre anhand der erhaltenen Ergebnisse vorstellbar, dass einfache supramolekulare Biopolymere aus verschiedenen DKPs die Vorläufer primitiver Enzyme waren und erste katalytische Aufgaben in der chemischen Evolution übernommen haben. Ein weiterer interessanter Aspekt der coassemblierten DKP-Systeme ist, dass sich die einzelnen Bausteine ohne großen Aufwand miteinander kombinieren lassen und verschiedene funktionelle Gruppen durch Coassemblierung miteinander interagieren können. Mit einer DKP-Bibliothek könnte auf diese Weise eine sehr große Zahl an potentiell enzymmimetischen Systemen post-synthetisch erzeugt werden.

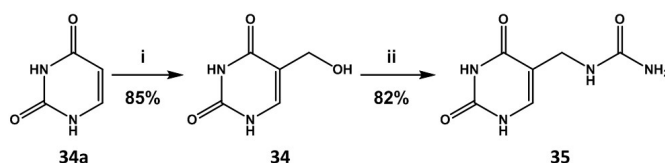
3.3 UMH-Hydrogele

3.3.1 Einführung

Neben verschiedenen Peptiden, wurden Harnstoff- und Nucleobasen-Derivate als exzellente Hydrogelatoren bestätigt (vergleiche *Kapitel 1.2.2*). Diese Stoffklassen sind grundsätzlich darauf ausgelegt, intermolekulare Wasserstoffbrücken zu bilden und neigen daher stark zur Selbstassemblierung. In dieser Arbeit sollte erstmals die Kombination eines Harnstoff- und eines Nucleobasen-Motivs zur Herstellung höher geordneter Assemblate untersucht werden. Die Untersuchung der gelbildenden Eigenschaften des auf dieser Basis entworfenen Hydrogelators *N*-[(Uracil-5-yl)methyl]harnstoff (UMH **35**, *Schema 9*) wird im Folgenden näher dargestellt.

3.3.2 Synthese von UMH

Die literaturbekannte Synthese von UMH (**35**) verläuft ausgehend von Uracil (**34a**) über drei Stufen und wurde mit einer nur geringen Gesamtausbeute von maximal 20% beschrieben.^[302] Die Synthese wurde daher neu entwickelt und gelang durch eine direkte Kondensation von 5-Hydroxymethyluracil **34** mit Harnstoff unter sauren Bedingungen in nur zwei Schritten ausgehend von Uracil (*Schema 9*). Der Aufwand für die Gewinnung von UMH im Grammbereich konnte auf diese Weise mit einer Gesamtausbeute von 70% deutlich reduziert werden. Die hier vorgestellte Synthese wird in Wasser durchgeführt, benötigt weniger Schritte als die literaturbekannte Synthese und führt zu höheren Ausbeuten. UMH (**35**) kann im finalen Schritt durch einfache Filtration in hoher Reinheit isoliert und ohne weitere Aufreinigung verwendet werden.



Schema 9: Optimierte Synthese von *N*-[(Uracil-5-yl)methyl]harnstoff (UMH, **35**). Bedingungen: i) Paraformaldehyd, KOH, H₂O, 55 °C, 72 h; ii) Harnstoff, HCl_{aq}, H₂O, 80 °C, 4 h.

3.3.3 Hydrogelbildung

Die gelbildenden Eigenschaften von **35** wurden zu Beginn durch die „tube inversion method“ (siehe *Kapitel 5.1.2*) untersucht. Bei ersten Versuchen zeigte sich, dass UMH in reinem Wasser und wässrigen Puffern unlöslich ist (*Tabelle 6*). Da UMH durch Deprotonierung eine besser lösliche anionische Form bildet, wurde die Hydrogelbildung anschließend unter basischen Bedingungen untersucht. Unter Erhitzen in Wasser bei pH 10 konnte UMH

schließlich vollständig gelöst werden. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde jedoch eine Suspension und kein Hydrogel erhalten (*Eintrag 1*). Amorphe Niederschläge wurde auch in wässrigen Sulfat-, Acetat-, Carbonat- und Chlorid-haltigen Puffern bei pH 10 erhalten (*Einträge 2 - 5*). Die Beobachtung, dass in den untersuchten wässrigen Puffern keine Hydrogelbildung stattfindet, stimmt mit der Erkenntnis überein, dass stark koordinierende Anionen die Selbstassemblierung von Harnstoff-Derivaten verhindern oder zumindest stark schwächen. Die koordinierenden Anionen stören die Bildung des Harnstoff α -Tape-Motivs, eine Schlüsselwechselwirkung die im Zusammenhang mit der Aggregation von anderen Harnstoff-basierten Hydrogelatoren beschrieben wurde (vergleiche *Kapitel 1.2.2.2*).

Tabelle 6: Untersuchungen zu den gelbildenden Eigenschaften von **35** (5,0 Gew-%) in reinem Wasser und wässrigen Puffern; S = Suspension, G = Hydrogelbildung.

Eintrag	Lösungsmittel / Puffer ^{i,ii}	pH 7	pH 10
1	H ₂ O	unlöslich	S ⁱⁱ
2	Na ₂ SO ₄ / NaHSO ₄	unlöslich	S ⁱⁱ
3	NaOAc/HOAc	unlöslich	S ⁱⁱ
4	Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	unlöslich ⁱⁱⁱ	S
5	NaCl	unlöslich	S ⁱⁱ
6	Na ₃ PO ₄ /NaH ₂ PO ₄	unlöslich	G
7	K ₃ PO ₄ /KH ₂ PO ₄	unlöslich	S

ⁱ Pufferkonzentration = 1,0 M; ⁱⁱ der pH-Wert wurde zusätzlich mit NaOH_{aq} eingestellt; ⁱⁱⁱ der pH-Wert wurde zusätzlich mit HCl_{aq} eingestellt.

Das Experiment wurde schließlich in Natriumphosphatpuffer bei pH 10 durchgeführt und ergab ein undurchsichtiges Hydrogel (*Tabelle 6 Eintrag 6* und *Abbildung 67 links*). Die Verringerung der Gelatorkonzentration von 5,0 auf 2,5 Gew-% führte zu der Bildung eines trüben Hydrogels (*Abbildung 67 rechts*).

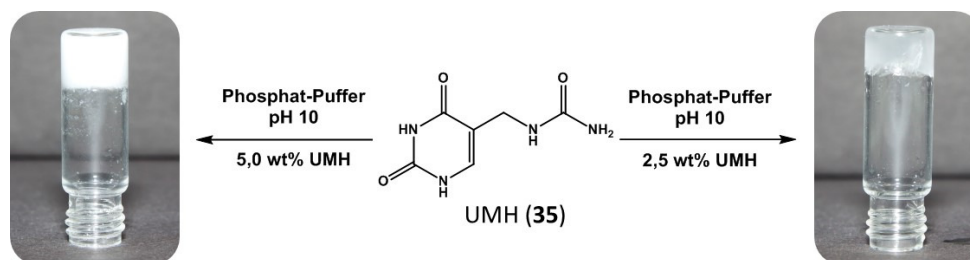


Abbildung 67: Makroskopische Erscheinung der Hydrogele **35** mit verschiedenen Konzentrationen in 1,0 M Natriumphosphatpuffer bei pH 10; links: 5,0 Gew-% UMH, rechts: 2,5 Gew-% UMH. Adapted with permission from A. J. Kleinsmann, N. M. Weckenmann, and B. J. Nachtsheim, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9753 - 9761. Copyright 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Auf Basis dieser Beobachtungen muss sich die molekulare Anordnung von **35** im Gelzustand deutlich von den meisten literaturbekannten Harnstoff-basierten Gelen, welche oft Harnstoff- α -Tapes aufweisen, unterscheiden. Diese Struktur motive werden normalerweise durch Phosphatanionen gestört, dementsprechend handelt es sich bei dem UMH-Hydrogel um ein

sehr seltenes Beispiel einer Phosphat-induzierten Selbstassemblierung eines Harnstoff-basierten Hydrogelators.^[86] Es ist zudem bemerkenswert, dass das Kation des verwendeten Puffers eine entscheidende Rolle bei dem Prozess der Selbstassemblierung haben muss, denn ein Wechsel des Puffers von Natrium- zu Kaliumphosphat verhinderte die Bildung eines Hydrogels vollständig (*Tabelle 6 Eintrag 7*).

In folgenden Experimenten wurde die minimale Gelator-Konzentration (MGK) in Abhängigkeit der verwendeten Äquivalente an Phosphatsalz untersucht. Eine Mischung mit der minimalen Menge an Phosphat (1,0 Äq.) zeigt eine relativ hohe MGK von 5,0 Gew-%, welche mit zunehmender Menge an Phosphat abnimmt (*Abbildung 68*). Ab einer Zugabe von 4,0 Äq. Phosphat reduziert sich die MGK deutlich auf 1,5 Gew-%. Die Erhöhung des Phosphat/Gelator-Verhältnisses auf 6 : 1 hat keinen weiteren Einfluss, die MGK erfährt bei der Verwendung von 8 Äq. jedoch eine zusätzliche geringe Abnahme auf einen Minimalwert von 1,0 Gew-%. Darüber hinaus konnte keine Abnahme der MGK beobachtet werden.

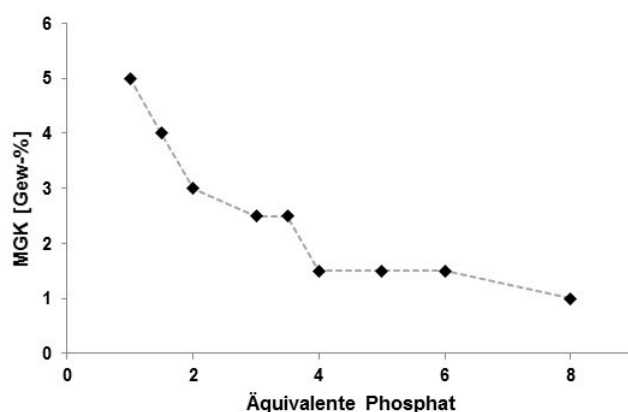


Abbildung 68: minimale Gelator-Konzentration von **35** in Natriumphosphatpuffer mit verschiedenen Phosphatäquivalenten bei pH 10.

Anschließend wurde die Gel-Sol-Übergangstemperatur in Abhängigkeit von den Phosphat-Äquivalenten durch rheologische Temperatur-Sweep-Experimente untersucht (*Abbildung 69*).

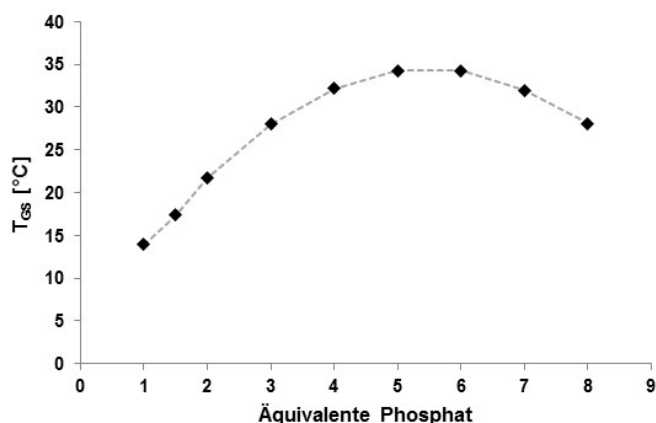


Abbildung 69: Gel-Sol-Übergangstemperatur von UMH (5,0 Gew-%, pH 10) in Natriumphosphatpuffer mit unterschiedlichen Phosphatäquivalenten in wässriger Lösung.

Bei diesen Untersuchungen wurde eine ansteigende thermische Stabilität der Hydrogele mit steigendem Phosphat/UMH-Verhältnis bis zu 5,0 Äq. Phosphat beobachtet. Eine Mischung mit größerem Phosphat-Überschuss zeigte wiederum eine geringere thermische Stabilität.

3.3.4 Morphologie der Xerogele

Die Morphologie der UMH-Hydrogele wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Die makroskopische Struktur ist schon bei geringer Vergrößerung sichtbar und zeigt parallel verlaufende Lamellen (*Abbildung 70 A*). Stärkere Vergrößerungen zeigen Lamellen mit einer Breite von 1 - 2 μm (*Abbildung 70 B+C*) und einer geringen Quervernetzung.

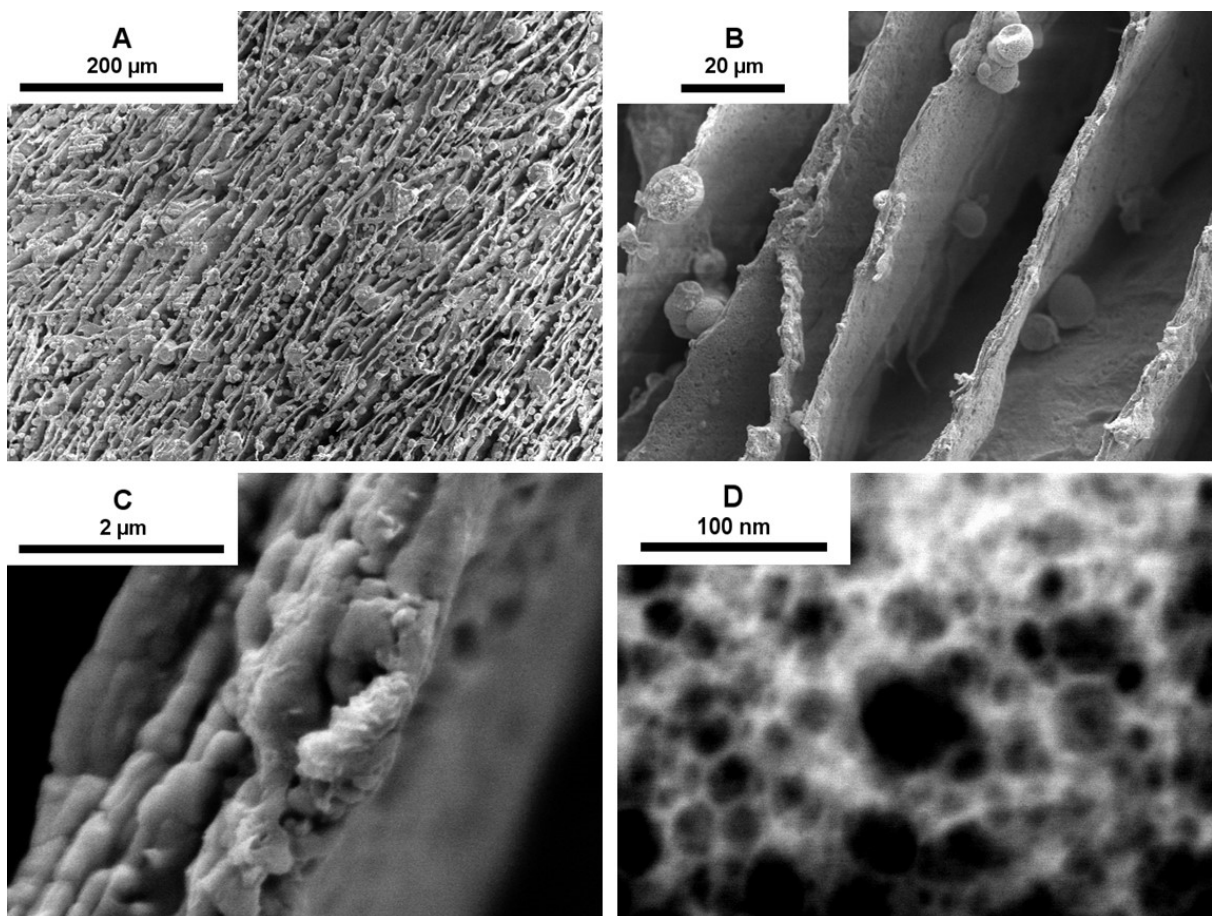


Abbildung 70: (A) - (C) REM- und (D) TEM-Aufnahmen des Xerogels von **35** (5,0 Gew-% in 1,0 M Natriumphosphatpuffer) bei pH 10; Adapted with permission from A. J. Kleinsmann, N. M. Weckenmann, and B. J. Nachtsheim, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9753 - 9761. Copyright 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Amorphe Kugeln mit einem Durchmesser von 5 - 10 μm wurden gleichmäßig verteilt auf der Probe gefunden (*Abbildung 70A+B*). Obwohl die Lamellen relativ dicht und robust wirken, lässt eine TEM-Analyse ein hoch poröses, schwammartiges Inneres mit Poren im Bereich von 10 nm erkennen (*Abbildung 70D*). Überraschenderweise zeigten stärkere Vergrößerungen keine eindeutig definierten Nanofasern, wie sie in den meisten supramolekularen Hydrogelen

vorkommen.^[84, 97, 109-114, 303-307] Andererseits wurde bereits von mit Salz-Additiven versetzten Hydrogelen berichtet, welche eine Partikel-basierte und poröse, schwammartige Morphologie ohne sichtbare Nanofasern aufweisen.^[86, 308-310]

3.3.5 NMR-Experimente

3.3.5.1 ¹³C-NMR-Titrationsexperimente

NMR-basierte Titrationsexperimente wurden durchgeführt, um die Affinität des Phosphats zu UMH (**35**) zu untersuchen und die Hydrogelator/Anionen-Stöchiometrie innerhalb des Hydrogels zu bestimmen. ¹³C-NMR-Titrationsexperimente mit Natriumphosphat wurden in D₂O bei pH 10 durchgeführt, nahe an den Bedingungen der Hydrogelbildung. Die starke Verschiebungen der NMR-Signale der Uracil-Kohlenstoffatome C2, C4 und C6 (Abbildung 71), deuten entweder auf eine starke Wechselwirkung von Natriumphosphat mit dem Uracil-Ring, eine Verschiebung des Tautomer-Gleichgewichts des Uracil-Monoanions (siehe Kapitel 3.3.7) oder beides hin. Bis zu einer Zugabe von 4 Äq. Phosphat wird eine starke Verschiebung der ¹³C-Signale beobachtet. Bei größeren Mengen Phosphat tritt ein Sättigungseffekt auf.

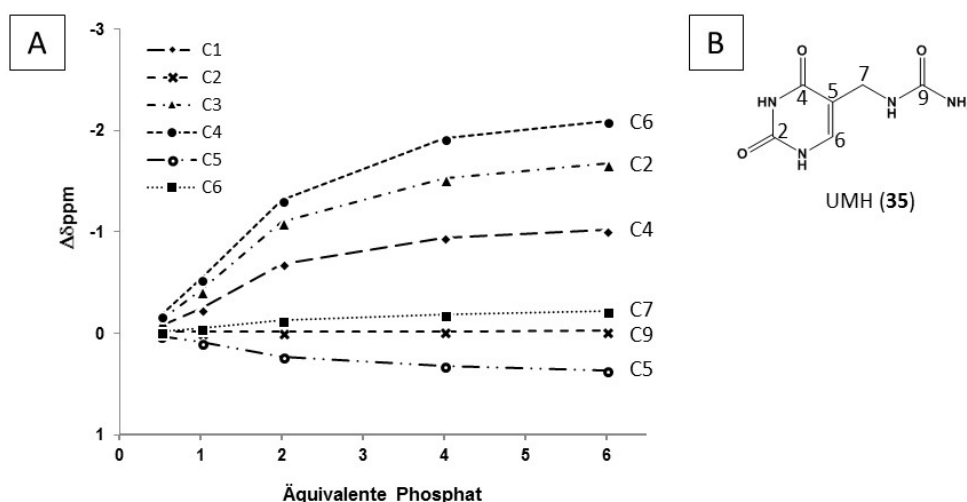


Abbildung 71: (A) ¹³C-NMR-Titrationsexperimente von UMH (**35**) mit Natriumphosphat bei pH 10 in D₂O; (B) Zuordnung der ¹³C-Signale bei UMH. Adapted with permission from A. J. Kleinsmann, N. M. Weckenmann, and B. J. Nachtsheim, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9753 - 9761. Copyright 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

3.3.5.2 ¹H-NMR-Titrationsexperimente

¹H-NMR-Verschiebungen von **35** in DMSO-d₆ wurden in einem analogen Titrationsexperiment gegen die zugesetzten Äquivalente Tetrabutylammoniumphosphat aufgetragen (Abbildung 72). Die Verschiebungen der Harnstoff-Protonen H8 und H10, sowie des Uracil-Protons H6 wurden dabei verfolgt. Alle Signale wurden bei Phosphat-Zugabe in das Tieffeld verschoben, die stärkste Verschiebung wurde mit 1.2 ppm für H8 beobachtet. Wieder wurde ein

Sättigungseffekt für die Zugabe von mehr als 4 Äq. Phosphat beobachtet, was die Ergebnisse aus den ^{13}C -Titrationsexperimenten bestätigt. Bei beiden Titrationsexperimenten wurde ein stufenartiger Anstieg der Verschiebungen gefunden, wenn 1 Äq. Phosphat zugegeben wurde. Dies entspricht der in MGK-Experimenten identifizierten minimalen Menge an Phosphat, welche nötig ist, um ein Hydrogel zu erhalten. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass erst ab einem Phosphat/UMH-Verhältnis von 1 : 1 (n/n) eine spontane Selbstassemblierung stattfindet.

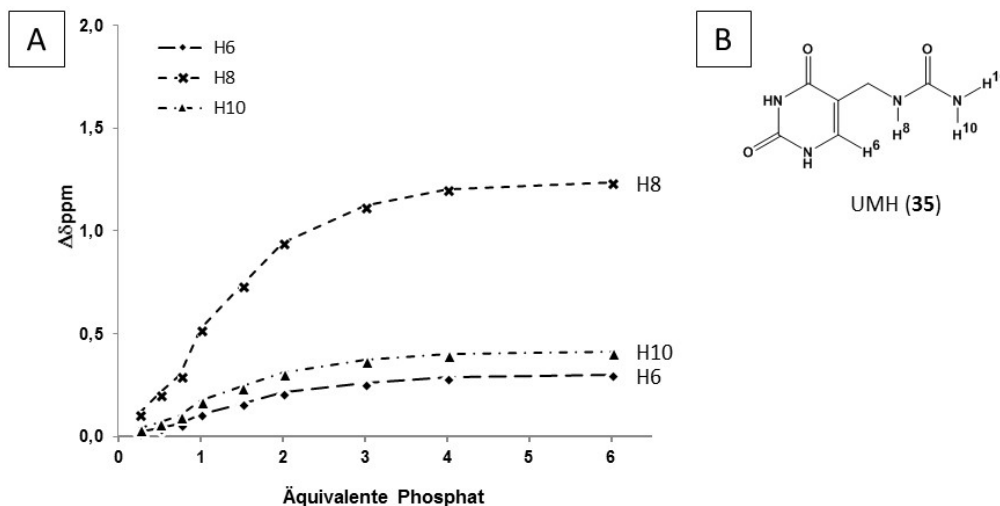


Abbildung 72: ^1H -NMR-Titrationsexperimente von **35** mit $(\text{Bu}_4\text{N})\text{H}_2\text{PO}_4$ in $\text{DMSO}-d_6$; (B) Zuordnung der ^1H -Signale bei UMH.

3.3.5.3 ^{31}P -MAS-NMR-Titrationsexperimente

^{31}P -MAS-NMR-Titrationsexperimente der Hydrogele von **35** mit unterschiedlichen Anteilen an Phosphat wurden durchgeführt, um die Phosphat/UMH-Stöchiometrie innerhalb des Hydrogels durch eine Job-Plot-Analyse zu bestimmen (Abbildung 73).

In den ^{31}P -Spektren der UMH-Hydrogele lassen sich zwei verschiedene Phosphor-Zustände erkennen. Ein scharfes Signal bei 2.84 ppm repräsentiert die Menge an freiem Phosphat in Lösung, wohingegen das verbreiterte Signal mit Rotationsseitenbanden bei 0,40 ppm Phosphatanionen darstellt, welche in das supramolekulare Netzwerk des Hydrogels eingebaut sind. Da die Freiheitsgrade des assemblierten Phosphats eingeschränkt sind, verhält es sich eher wie ein Feststoff im NMR-Spektrum.

Abbildung 74 zeigt die Job-Plot-Analyse basierend auf den Spektren in Abbildung 73. Die Konzentration des assemblierten Phosphats wurde durch Integration und Aufsummierung aller verbreiterten Signale bestimmt. Ein Maximum an eingebautem Phosphat wurde bei einem Molenbruch von $\chi(\text{Phosphat}) = 0,6$ beobachtet, was einem UMH/Phosphat-Verhältnis innerhalb des Hydrogel-Netzwerks von 1 : 1,5 (n/n) entspricht.

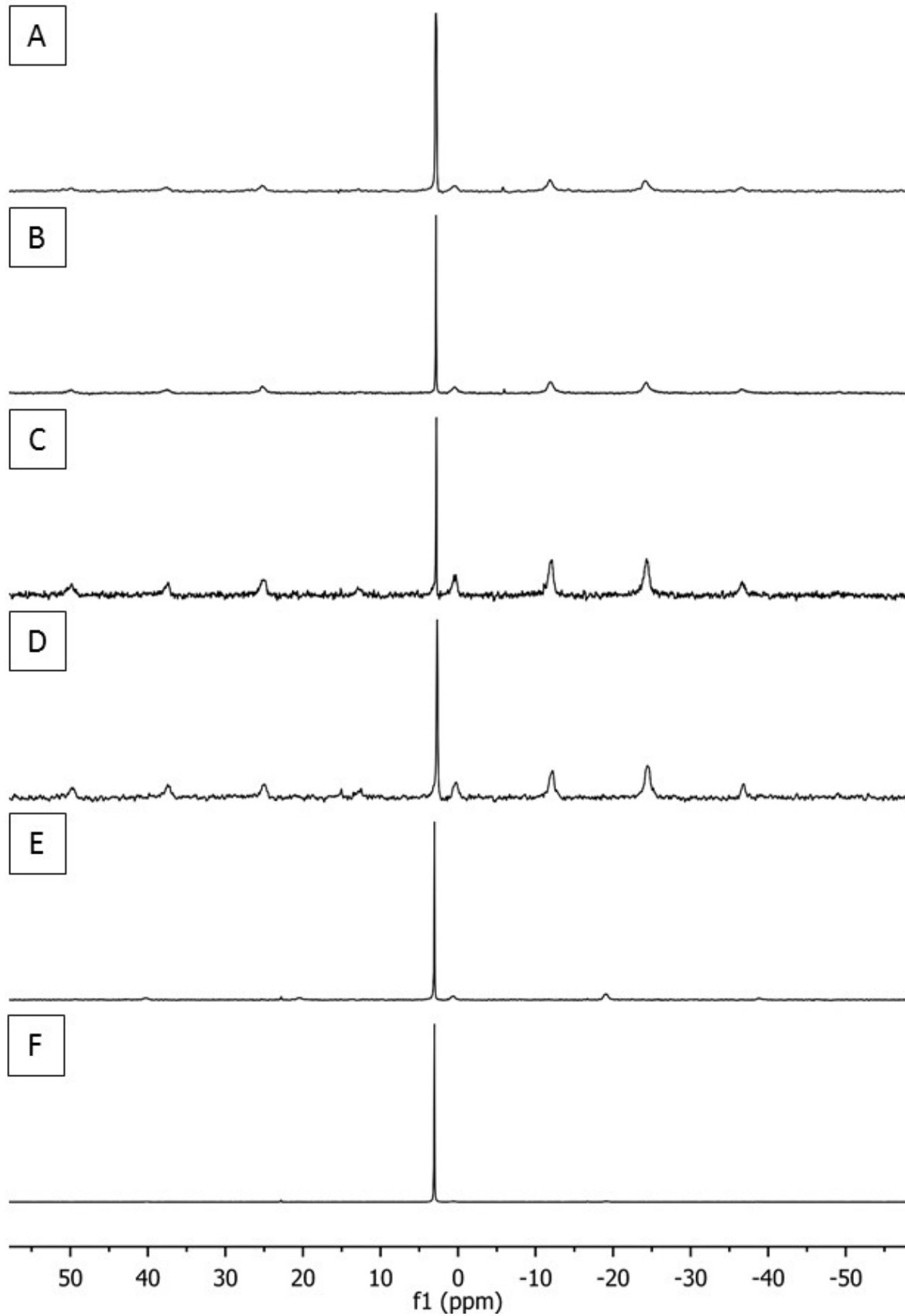


Abbildung 73: ^{31}P -MAS-NMR-Titrationsexperimente der UMH-Hydrogele (**35**) bei pH 10 in D_2O mit unterschiedlichen Mengen an Natriumphosphat: A) $\chi = 0,47$, B) $\chi = 0,50$, C) $\chi = 0,60$, D) $\chi = 0,67$, E) $\chi = 0,80$, und F) $\chi = 0,86$; A) - D) 2,5 kHz Rotationsfrequenz, E) + F) 4,0 kHz Rotationsfrequenz. Reprinted with permission from A. J. Kleinsmann, N. M. Weckenmann, and B. J. Nachtsheim, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9753 - 9761. Copyright 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

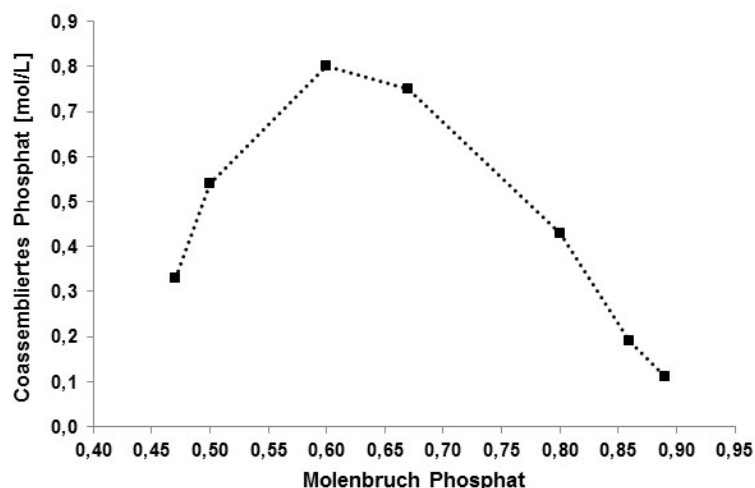


Abbildung 74: Job-Plot-Analyse der UMH-Hydrogele mit unterschiedlichem Phosphatgehalt basierend auf ^{31}P -MAS-NMR-Titrationsexperimenten.

Dieses Ergebnis bestätigt, dass Phosphatanionen fest in das Hydrogel eingebaut sind und damit coassembliert vorliegen. Die Phosphatanionen koordinieren vermutlich an die Harnstoffgruppen, was in einem ersten Schritt der Selbstassemblierung zu Harnstoff-Phosphat-Harnstoff verbundenen UMH-Dimeren führt (*Abbildung 75*). Weitere Phosphatanionen scheinen zudem eine bedeutende Rolle in der zusätzlichen Koordination und Assemblierung der Uracil-Gruppen zu spielen, wie schon durch die Ergebnisse der ^{13}C -NMR-Titrationsexperimente angedeutet wurde.

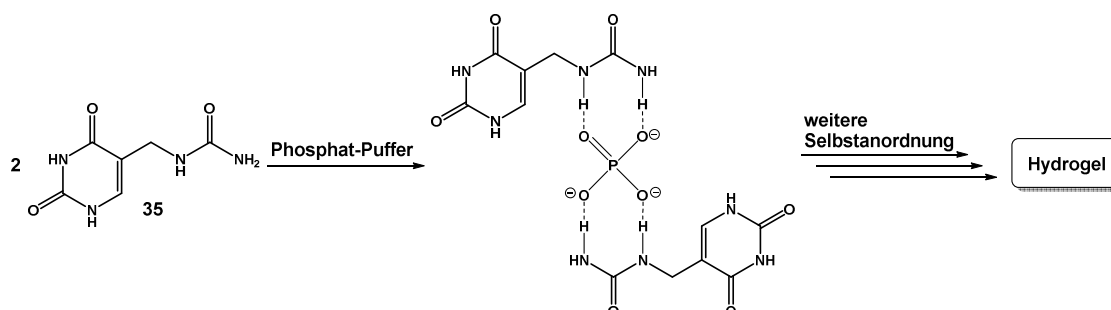


Abbildung 75: Schematische Darstellung der Selbstanordnung von UMH in Phosphat-Puffer zu Dimeren als erster Schritt der Bildung von Hydrogelen.

3.3.6 IR-Spektroskopie

Infrarot-Spektroskopie ist ein nützliches Werkzeug für die strukturelle Analyse eines Hydrogel-Netzwerks. IR-Spektroskopie wurde intensiv genutzt um die Gelbildung zu untersuchen, vor allem da das IR-Spektrum des Gelzustands einfach mit der entsprechenden Lösung und dem Feststoff verglichen werden kann.^[248]

Das IR-Spektrum einer übersättigten (1,0 Gew-%) Lösung von **35** in 1,0 M Natriumphosphatpuffer bei pH 10 (*Abbildung 76, gestrichelte Linie*) zeigt Absorptionsbanden bei $\tilde{\nu} = 3314$ ($\nu_{\text{N-H}}$), 1632 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1070 ($\nu_{\text{P-O}}$) und 982 cm^{-1} ($\nu_{\text{P-O}}$).^[311] Eine anschließende

Kühlung dieser Lösung für 10 min in einem Eisbad ergab ein metastabiles Hydrogel, von dem umgehend ein IR-Spektrum aufgenommen wurde. Das resultierende Spektrum des Hydrogels (*Abbildung 76, kontinuierliche Linie*) weist eindeutige Veränderungen auf. Das IR-Spektrum zeigt eine Verschiebung der charakteristischen NH-Streckschwingungsbanden von 3314 zu 3146 cm^{-1} aufgrund der Bildung von Wasserstoffbrücken mit den C=O-Gruppen während der Selbstassemblierung.^[312] Zudem verschieben sich die Carbonyl-Streckschwingungsbanden von 1632 cm^{-1} (in Lösung) zu 1675 cm^{-1} (im Hydrogel), was sich wiederum auf Wasserstoffbrückenbindungen mit den Uracil-NH-Protonen zurückführen lässt.^[312] Der starke Anstieg der Intensität der IR-Banden bei 1070 und 982 cm^{-1} basiert auf einer Immobilisierung der Phosphationen und bestätigt damit den Einbau des Phosphats in das supramolekulare Netzwerk durch Coassemblierung.

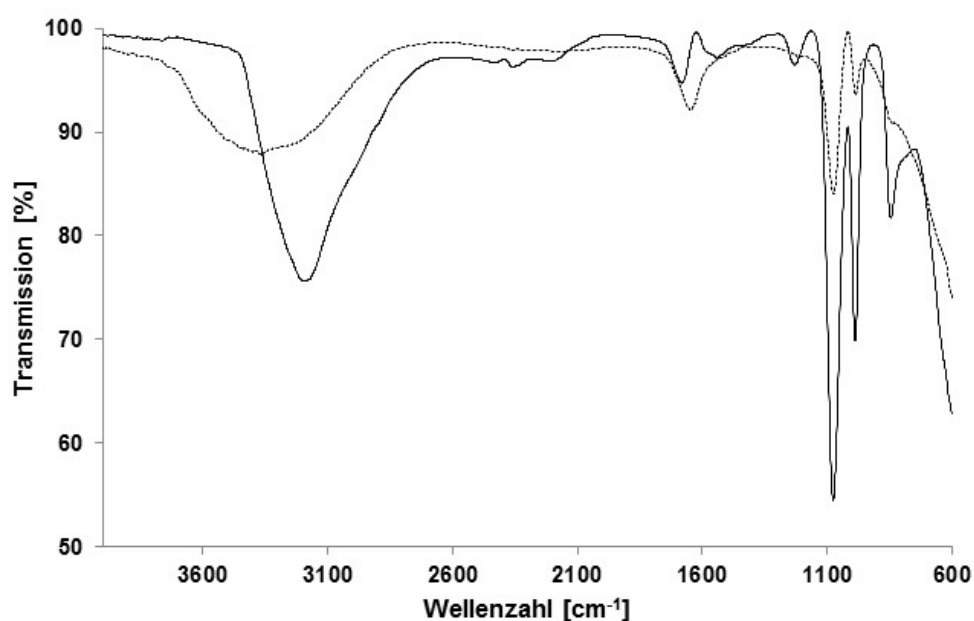


Abbildung 76: IR-Spektren von UMH (1,0 Gew-%) in 1,0 M Natriumphosphatpuffer bei pH 10; Gestrichelte Linie: übersättigte Lösung; Durchgezogene Linie: Hydrogel; Adapted with permission from A. J. Kleinsmann, N. M. Weckenmann, and B. J. Nachtsheim, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9753 - 9761. Copyright 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Aufgrund der Beobachtung, dass sich in Kaliumphosphatpuffer bei gleichen Bedingungen kein Hydrogel bilden kann (*Tabelle 6*), wurden IR-Spektren von UMH in Kalium- und Natriumphosphatpuffer aufgenommen. Ein Vergleich der IR-Spektren der übersättigten UMH-Lösungen in dem jeweiligen Puffersystem zeigt verschiedene Intensitäten der Phosphatbanden als einzigen Unterschied (*Abbildung 77*). Die Phosphatbanden der Natriumphosphat-Probe sind zwar schwächer im Vergleich zu dem korrespondierenden Hydrogel, jedoch deutlich intensiver im Vergleich zu der Kaliumphosphat-Probe, was auf eine teilweise Assemblierung von UMH und Phosphationen in Lösung hinweist. Die schwächeren Phosphatbanden der Kaliumphosphat-Probe zeigen wiederum, dass die UMH-Phosphat-Assemblierung in Lösung durch Kaliumionen inhibiert wird.

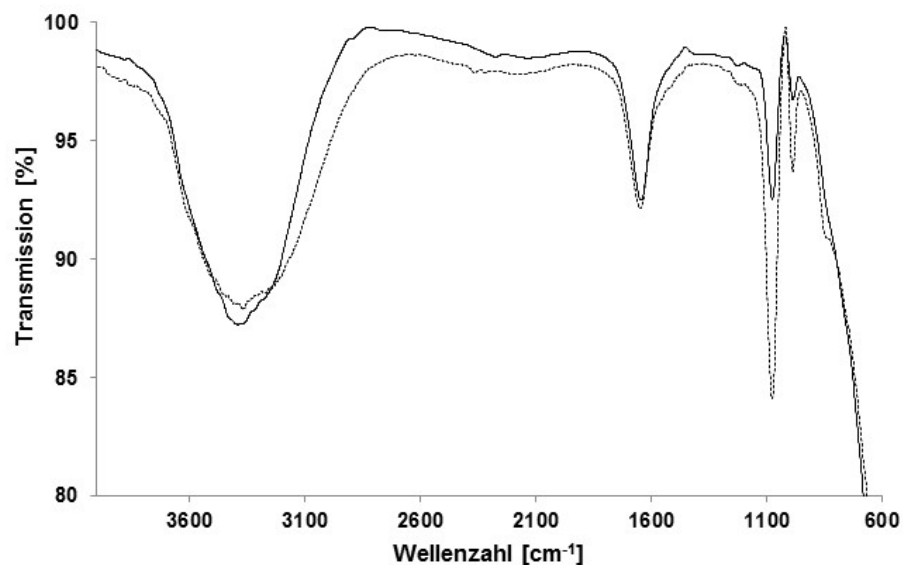


Abbildung 77: IR-Spektren einer übersättigten Lösung von UMH (1,0 Gew-%) bei pH 10 in 1,0 M Natriumphosphat-Puffer (gestrichelte Linie) und in 1,0 M Kaliumphosphatpuffer (durchgezogene Linie); Adapted with permission from A. J. Kleinsmann, N. M. Weckenmann, and B. J. Nachtsheim, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9753 - 9761. Copyright 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

3.3.7 UV/Vis-Spektroskopie

Viele der literaturbekannten LMWHGs sind hinsichtlich ihrer gelbildenden Eigenschaften auf aromatische π -Funktionen wie Phenylalanin oder Modifikationen mit konjugierten π -Systemen, wie Fluorenyl-, Naphthyl- oder Pyrenyl-Gruppen angewiesen (vergleiche *Kapitel 1.2.2*).^[104, 145, 305, 313] Da die Bildung von Hydrogelen von **35** nur unter stark basischen Bedingungen oberhalb des pK_{a1} von Uracil (9,5) beobachtet werden kann,^[314] ist anzunehmen, dass eine einfach deprotonierte Spezies für die Selbstassemblierung notwendig ist. Zwei der möglichen anionischen Tautomere von **35** (*Abbildung 78*) weisen ein erweitertes π -System auf (**35a''** und **35b''**). Eine wichtige Bedingung für die Assemblierung vieler supramolekularer Hydrogele.

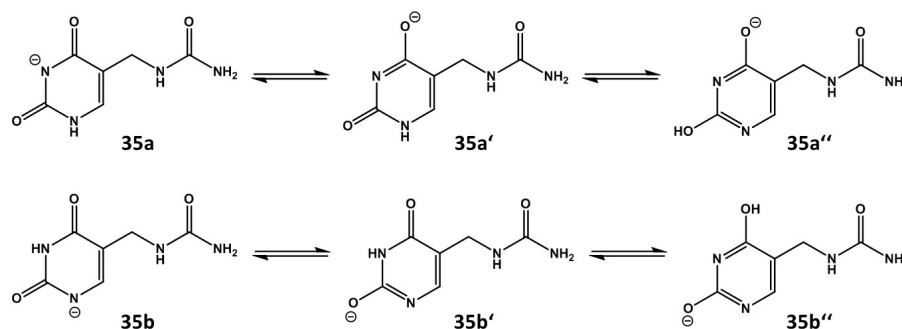


Abbildung 78: Anionische Tautomere von **35**.

Die Tautomere **35a** und **35b** weisen unterschiedliche Absorptionsmaxima auf (λ_{\max} (**35a**) = 260 nm, λ_{\max} (**35b**) = 285 nm), die mit denen der korrespondierenden Tautomeren des unsubstituierten Uracils vergleichbar sind.^[314-316] Da das Tautomeren-

Verhältnis durch UV/Vis-Spektroskopie annähernd bestimmt werden kann, wurde der Einfluss des verwendeten Phosphat-Salzes auf das Tautomeren-Gleichgewicht von **35** näher untersucht. Die UV/Vis-Spektren in *Abbildung 79* wurden in 1,0 M Natrium- und Kaliumphosphatpuffern sowie NaOH-Lösung bei pH 10 aufgenommen. In wässriger NaOH-Lösung liegen beide Tautomere (**35a** und **35b**) in ungefähr gleichem Anteil vor.^[314] Da der Extinktionskoeffizient von **35b** größer ist als der von **35a**, zeigt das Spektrum von **35** in 0,1 mM NaOH ein Absorptionsmaximum (λ_{\max}) bei 285 nm mit einer kleineren Schulter bei 265 nm (*Abbildung 79, gepunktete Linie*), obwohl nahezu ein äquimolares Verhältnis vorliegt.^[314-316]

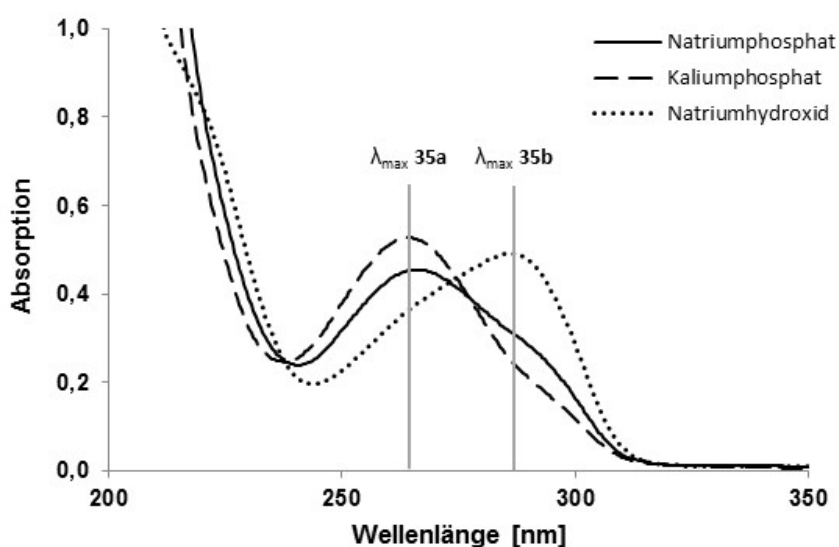


Abbildung 79: UV/Vis-Spektrum von UMH bei pH 10 in 0,1 mM NaOH (gepunktete Linie), 1,0 M Natriumphosphatpuffer (durchgehende Linie) und 1,0 M Kaliumphosphatpuffer (gestrichelte Linie); Adapted with permission from A. J. Kleinsmann, N. M. Weckenmann, and B. J. Nachtsheim, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9753 - 9761. Copyright 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Im Gegensatz dazu zeigt das UV-Spektrum von **35** in Natriumphosphatpuffer (*Abbildung 79, durchgehende Linie*) ein λ_{\max} bei 265 nm mit einer kleinen Schulter bei 285 nm, was eine signifikante Verschiebung des Gleichgewichts zu der 3-*H*-deprotonierten Spezies **35a** aufzeigt. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung von Shapiro und Kang, nach welcher das 3-*H*-deprotonierte Uracil Tautomer in konzentrierten basischen Phosphatlösungen dominiert.^[314-316] Wenn Kaliumphosphatpuffer verwendet wird, verschiebt sich das Gleichgewicht interessanterweise noch weiter in Richtung des Tautomers **35a** (*Abbildung 79, gestrichelte Linie*). Da unter diesen Bedingungen kein Hydrogel gebildet werden kann, könnte dieses Ergebnis bedeuten, dass nicht ein einzelnes Tautomer für die supramolekulare Aggregation wichtig ist, sondern das Verhältnis zwischen **35a** und **35b**. Es wurde allerdings kein Beweis für die Existenz von **35a**“ oder **35b**“ gefunden.

3.3.8 Rheologische Untersuchungen

Durch Amplituden-Sweep-Experimente sollte die mechanische Gelstärke der UMH-Hydrogele in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Phosphatpuffer charakterisiert werden. *Abbildung 80* zeigt ein beispielhaftes Amplituden-Sweep-Experiment für ein UMH-Hydrogel mit 4 Äquivalenten Phosphatsalz bei pH 10. G' ist bei geringer Deformation um den Faktor 10 größer als G'' , was das viskoelastische Verhalten des Hydrogels bestätigt.^[104, 146, 256] Weiterhin weisen die hohen G' -Werte mit mehr als 10^6 Pa auf ein Hydrogel mit hoher Gelstärke hin.

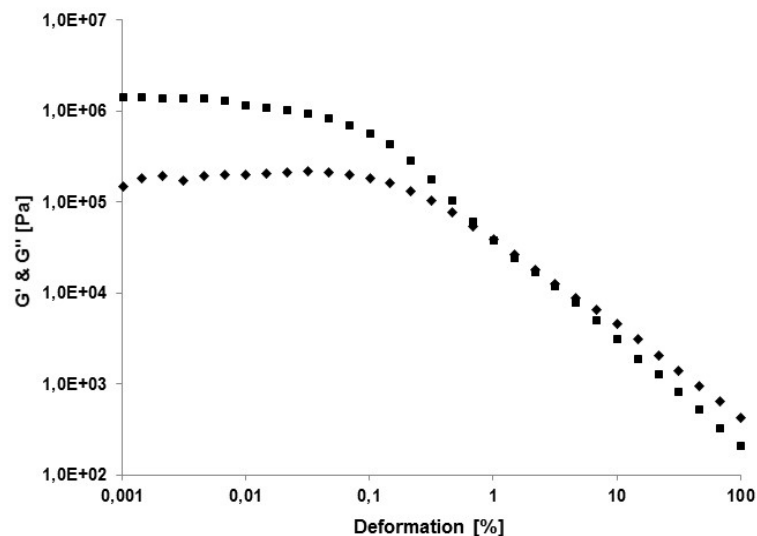


Abbildung 80: Rheologisches Amplitudensweep-Experiment von Hydrogel **35** (5,0 Gew-% + 4 Äq. Natriumphosphat) bei pH 10; Quadrate: Speichermodul G' ; Rauten: Verlustmodul G'' .

Der Einfluss der eingesetzten Phosphat-Äquivalente auf die Gelstärke wurde anschließend genauer untersucht (*Abbildung 81*).

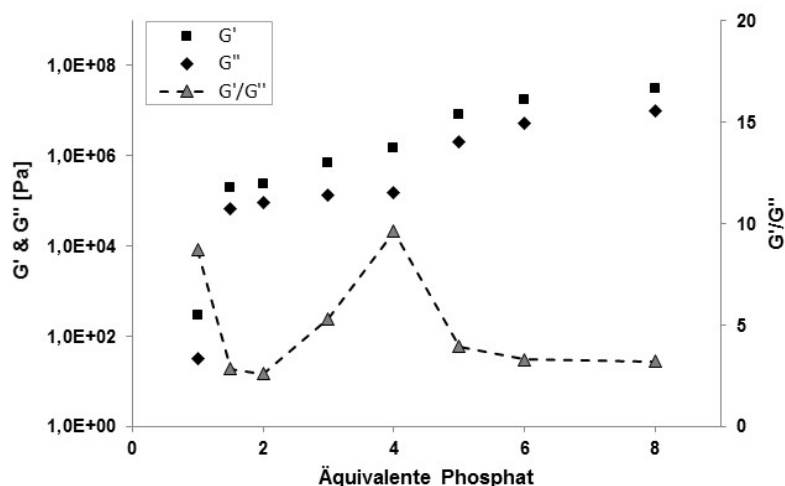


Abbildung 81: G' (schwarze Quadrate) und G'' (schwarze Rauten) von UMH-Hydrogelen (5,0 Gew-%) mit unterschiedlichen Äquivalenten Phosphat (linke y-Achse) und G'/G'' -Verhältnis (graue Dreiecke, rechte y-Achse) bei 8 °C; Adapted with permission from A. J. Kleinsmann, N. M. Weckenmann, and B. J. Nachtsheim, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9753 - 9761. Copyright 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Die Zugabe der minimalen Menge von einem Äquivalent Phosphat ergab ein relativ schwaches Hydrogel mit einem G' von 10^2 Pa. Die Erhöhung der zugesetzten Menge Phosphat auf 1,5 Äquivalente, welche das optimale Verhältnis für das Hydrogel darstellt, verursacht einen enormen Anstieg von G' auf 10^5 Pa. Eine weitere Erhöhung des zugesetzten Phosphat-Anteils führt zu einem kontinuierlichen Anstieg von G' , wobei das Verhältnis von G'/G'' ein Maximum bei 4 Äquivalenten Phosphatsalz erreicht. Dieses Ergebnis stimmt gut mit der vorherigen Beobachtung überein, dass sich die MGK bei diesem Phosphat-Anteil stark verringert und sich zugleich ein Sättigungseffekt bei den NMR-Titrationsexperimenten einstellt. Eine Zugabe von mehr als 8 Äquivalenten Phosphat führte zu keinem nennenswerten Einfluss auf die rheologischen Parameter.

UMH-Hydrogele zeigen zudem ein beeindruckendes Regenerationsverhalten (*Abbildung 82*). Für das Regenerationsexperiment wurde ein UMH-Hydrogel (5 Äq. Phosphat, pH 10) für 30 min gealtert um konstante G' - und G'' -Werte zu erhalten. Anschließend wurde das Gel für 30 s bei 100% Deformation geschert, um das supramolekulare Netzwerk zu zerstören und die Regeneration unter minimaler Belastung für das Gel gemessen. Es konnte unter diesen Bedingungen eine bemerkenswerte Regenerationszeit von nur einer Minute für das Hydrogel beobachtet werden. Dieser Prozess wurde zehnmal wiederholt ohne Ermüdungserscheinungen des Hydrogels zu beobachten. Der Ausgangswert von G' wurde jedesmal wieder erreicht. Lediglich eine geringe Zunahme der Regenerationszeit ging mit jeder Wiederholung der Zerstörungs-Regenerations-Abfolge einher.

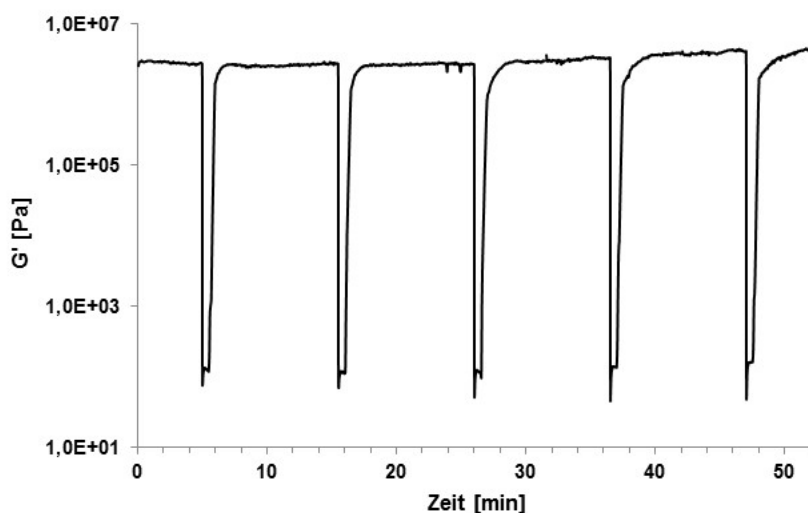


Abbildung 82: Rheologisches Regenerationsexperiment mit einem UMH-Hydrogel (5,0 Gew-%) mit 5 Äq. Natriumphosphat bei pH 10, dargestellt ist der Verlauf des Speichermoduls G' ; Adapted with permission from A. J. Kleinsmann, N. M. Weckenmann, and B. J. Nachtsheim, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9753 - 9761. Copyright 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

3.3.9 Einfluss des pH-Wertes

Da die Bildung des UMH-Hydrogels ausschließlich innerhalb eines pH-Bereichs von 10 bis 12 erreicht werden konnte, wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die grundlegenden Materialeigenschaften untersucht. Dementsprechend wurden verschiedene rheologische Experimente durchgeführt um den Zusammenhang zwischen pH-Wert und Gelstärke, Gel-Sol-Übergangstemperatur und Regenerationsverhalten zu bestimmen (*Tabelle 7*).

Tabelle 7: Einfluss des pH-Wertes auf die Geleigenschaften.

pH	G' [10^6 Pa]	T _{Gs} [°C]	Regenerationszeit [min]
10	3,64	34,3	1,2
11	1,03	30,6	11,2
12	3,91	23,2	7,0

Erste Ergebnisse deuteten an, dass das UMH-Hydrogel mit steigendem pH-Wert schwächer wird, da eine Abnahme des Speichermoduls bei Erhöhung des pH-Wertes von pH 10 auf 11 beobachtet wurde (*Tabelle 7*). Weiterhin wurde eine um den Faktor 10 erhöhte Regenerationszeit nach der Zerstörung des Hydrogels durch Scherkräfte festgestellt. Ferner nimmt die Gel-Sol-Übergangstemperatur mit steigendem pH-Wert ab. Bei pH 12 (hier kann eine vollständige Deprotonierung angenommen werden) steigt G' interessanterweise wieder an und ist sogar größer als bei pH 10. Zudem reduziert sich hier im Vergleich zu pH 11 die Regenerationszeit.

Die Veränderung der viskoelastischen Eigenschaften spiegelt sich zudem durch die makroskopische Erscheinung und die Morphologie der entsprechenden Xerogele wider. Bei pH 10 bildet sich ein undurchsichtiges Hydrogel, wohingegen sich bei pH 11 und 12 trübe, fast klare Gele bilden (*Abbildung 83A-C Inlays*).

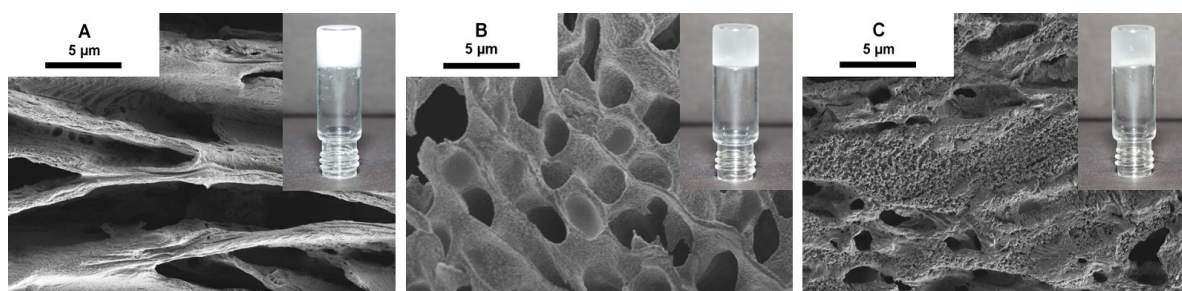


Abbildung 83: REM-Aufnahmen der Xerogele und Fotos der korrespondierenden Hydrogele (Inlays rechts oben) von UMH-Hydrogelen (5,0 Gew-%) mit 5 Äquivalenten Phosphatsalz (A) bei 10, (B) bei pH 11 und (C) bei pH 12. Reprinted with permission from A. J. Kleinsmann, N. M. Weckenmann, and B. J. Nachtsheim, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9753 - 9761. Copyright 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Auf REM-Aufnahmen ist zu erkennen, dass sich die parallelen Lamellen bei pH 10 (*Abbildung 83A*) zu einer bienenwabenartigen Struktur (*Abbildung 83B*) bei pH 11 verändern. Das Xerogel bei pH 12 zeigt wiederum eine hochporöse Morphologie mit ungeordneten

lamellenartigen Bereichen (*Abbildung 83C*). Weitere Vergrößerungen der Xerogel-Aufnahmen befinden sich im Anhang (*siehe Anhang S. 156 - 157*).

3.3.10 Schlussfolgerung

N-[(Uracil-5-yl)methyl]harnstoff (UMH, **35**) wurde als minimalistischer Pyrimidin-beinhaltender Hydrogelator ausführlich charakterisiert. Dieser einfach aufgebaute Hydrogelator ist ein seltenes Beispiel für ein harnstoffbasiertes Molekül, dessen Selbstassemblierung durch Phosphatanionen ausgelöst wird und zudem ohne zusätzliche aromatische oder lipophile Gruppen in wässriger Lösung assembliert. UMH-Hydrogele zeigen beeindruckende selbstheilende Eigenschaften und ein sehr hohes Speichermodul G' mit bis zu 10^7 Pa. Die Materialeigenschaften können durch die Variation der verwendeten Menge an Phosphat und den pH-Wert stark beeinflusst werden. Das UMH/Phosphat-Verhältnis innerhalb der selbstassemblierten Struktur konnte durch ^{31}P -NMR-basierte Job-Plot-Analyse als 1 : 1,5 (*n/n*) bestimmt werden.

4 Zusammenfassung / Summary

4.1 Zusammenfassung

Die Fähigkeit der Phe-beihaltenden DKPs **1 - 6** zur Selbstassemblierung in Wasser wurde im ersten Teil dieser Arbeit ausführlich untersucht (*Abbildung 84 oben*). Trotz der einfachen Struktur und des geringen Molekulargewichts der DKPs konnten eine beachtliche Stabilität sowie selbstheilende Eigenschaften der resultierenden Hydrogele nachgewiesen werden. Die vorgestellten DKPs stellen sehr seltene Beispiele für Peptid-Hydrogelatoren ohne unnatürliche Modifizierung dar, die in der Lage sind in reinem Wasser ohne den Zusatz von organischen Lösungsmitteln Gele zu bilden. Es lässt sich hervorheben, dass es sich bei dem vorgestellten DKP **1** (Cyclo[Gly-L-Phe], Molekulargewicht = 204,23 g/mol) um den niedermolekularsten Hydrogelator auf Peptid-Basis handelt, der bisher beschrieben wurde.

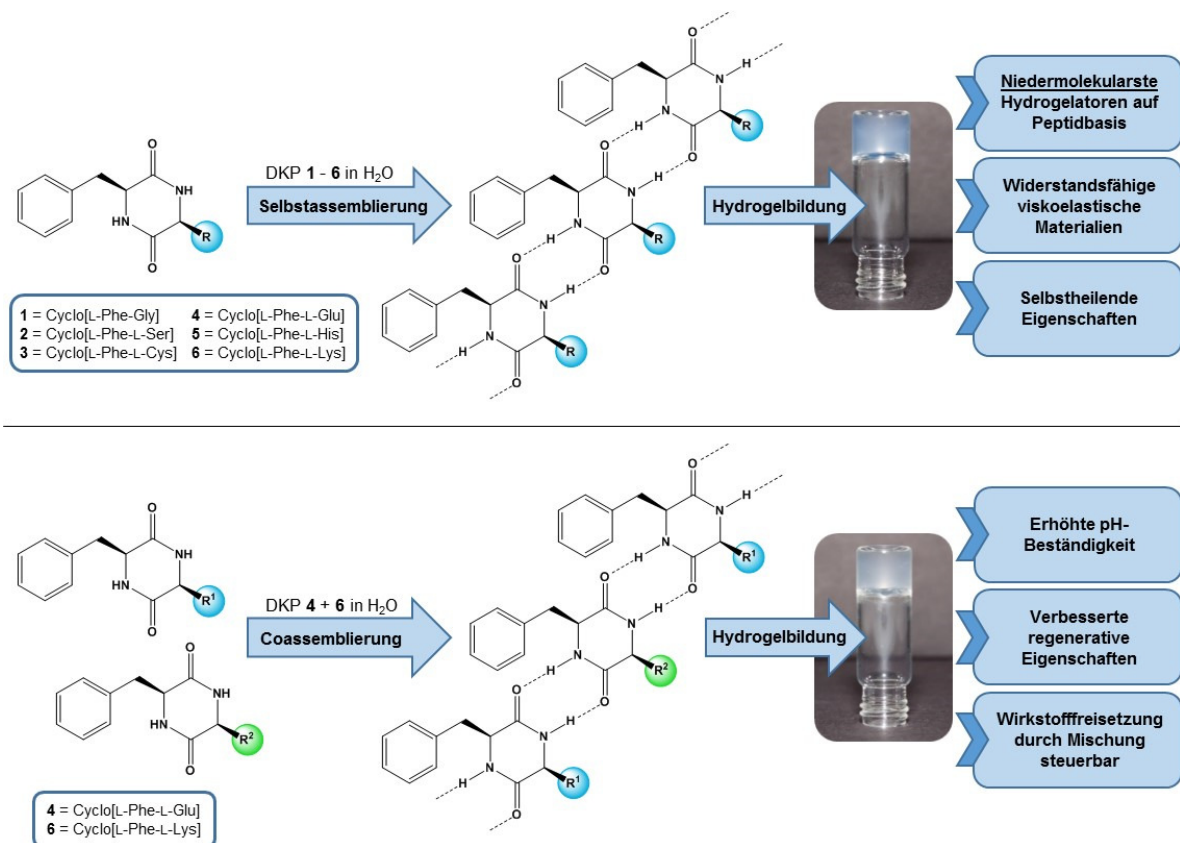


Abbildung 84: (Oben): Schematische Darstellung der Selbstassemblierung von DKP **1 - 6**, exemplarisches Foto des Hydrogels **4** (2,0 Gew-% in 0,5 M Phosphatpuffer bei pH 6,0) und allgemeine Eigenschaften der Hydrogele **1 - 6**; (unten): Schematische Darstellung der Coassemblierung von DKP **4** und **6**, Foto des Hydrogels **4/6** (1 : 1 (n/n), pH 7, 4,0 Gew-%) und Vorteile der Mischung gegenüber den Einzelkomponenten.

Phenylalanin ist essentiell für die hydrogelbildenden Eigenschaften der DKPs **1 - 6** und stellt damit die strukturbestimmende Aminosäure für die supramolekulare Assemblierung dar. Gelstärke, pH-Beständigkeit, minimale Gelatorkonzentration, Struktur der Xerogele und das Regenerationsverhalten werden von der zweiten Aminosäure stark beeinflusst. Die Variation

der Materialeigenschaften der Hydrogele ist damit über einen großen Bereich möglich. Weiterhin konnte die Coassemblierung von zwei verschiedenen Phe-beinhaltenden DKPs zu Hydrogelen mit veränderten Materialeigenschaften nachgewiesen werden (*Abbildung 84 unten*). Neben der erhöhten Stabilität des gemischten Hydrogels **4/6** (1 : 1 (*n/n*)) gegenüber sauren und basischen Bedingungen konnte eine signifikant verbesserte Regenerationsfähigkeit beobachtet werden. Zudem wurde die verzögerte Freisetzung von physikalisch eingeschlossenen Wirkstoffen für eine potentielle biomedizinische Anwendung erfolgreich untersucht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung funktioneller Gruppen im Hydrogel durch Coassemblierung verschiedener DKPs vor dem Hintergrund einer enzymmimetischen Aktivität untersucht (*Abbildung 85*). Mit coassemblierten Hydrogelen aus dem Cys-beinhaltenden DKP **3** und dem His-beinhaltenden DKP **5** konnte ein kooperativer Effekt der funktionellen Gruppen nachgewiesen werden. Die veränderte Reaktivität durch einen kooperativen Effekt der His^{H+}-Cys-Paare wurde durch die Untersuchung der Reaktionskinetik einer Modellreaktion in Abhängigkeit von pH-Wert und DKP-Mischungsverhältnis bestätigt.

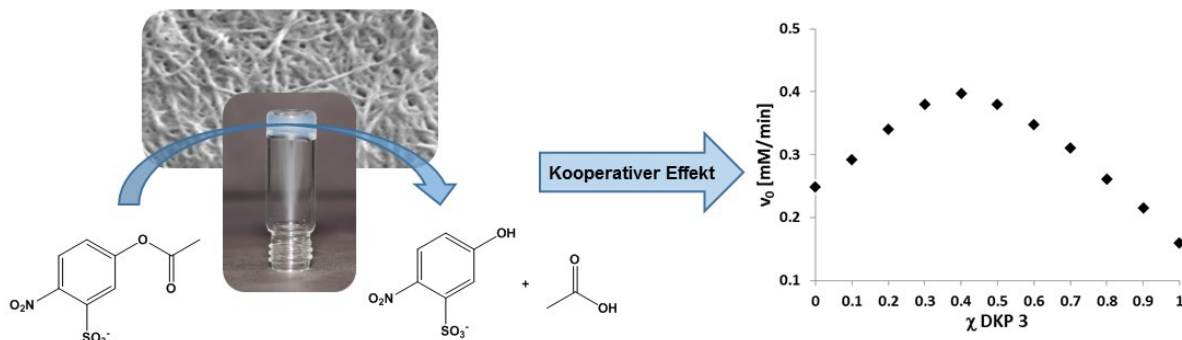
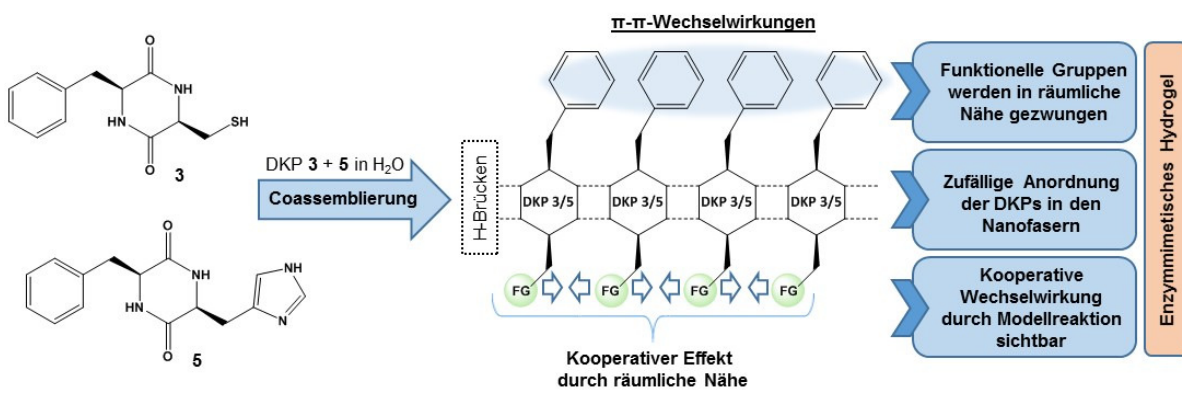


Abbildung 85: (Oben): Schematische Darstellung der Coassemblierung von DKP **3** und **5**; (unten links): Foto des Hydrogels **3/5** (1 : 1,5 (*n/n*), 1,5 Gew-%), Ausschnitt einer REM-Aufnahme (50.000-fache Vergrößerung) des korrespondierenden Xerogels und die ANBS-Hydrolyse als Modellreaktion; (unten rechts): Anfangsgeschwindigkeiten der ANBS-Hydrolyse katalysiert durch coassemblierte Hydrogele **3/5** mit unterschiedlichen Anteilen an DKP **3** mit Maximum bei dem Verhältnis **3/5** = 1 : 1,5 (*n/n*).

Weiterhin konnten durch das Mischen des Phe-basierten DKPs **5** mit den Leu- bzw. Val-basierten DKPs **15** und **16** die ermöglichten CH- π -Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen DKPs gezielt genutzt werden, um eine hoch geordnete Coassemblierung in

den Hydrogelen zu erreichen (*Abbildung 86*). Die alternierende Anordnung der DKPs in den coassemblierten Hydrogelen **5/15** und **5/16** wurde durch eine gesteigerte katalytische Effizienz gegenüber dem coassemblierten Hydrogel **3/5** erkennbar. Außerdem konnten die CH- π -Wechselwirkungen innerhalb der Hydrogele durch zweidimensionale NMR-Experimente eindeutig nachgewiesen und damit das postulierte Modell bestätigt werden. Zusammenfassend konnten durch das Mischen von zwei einfachen DKPs Hydrogele mit einer enzymmimetischen Aktivität erhalten werden, deren Aufbau auf dem gezielten Einsatz von CH- π -Wechselwirkungen basiert.

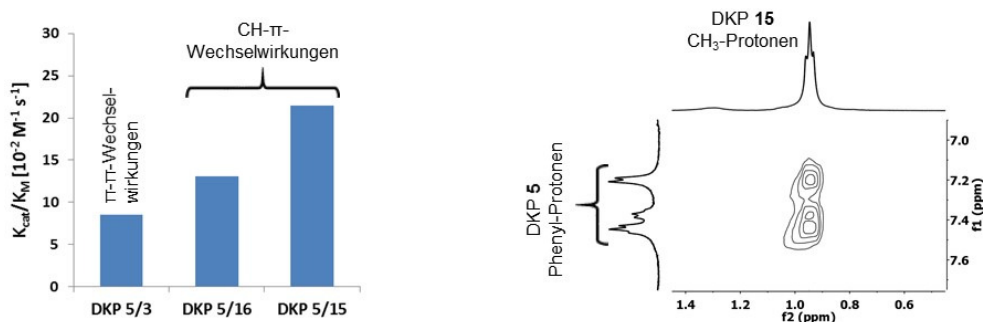
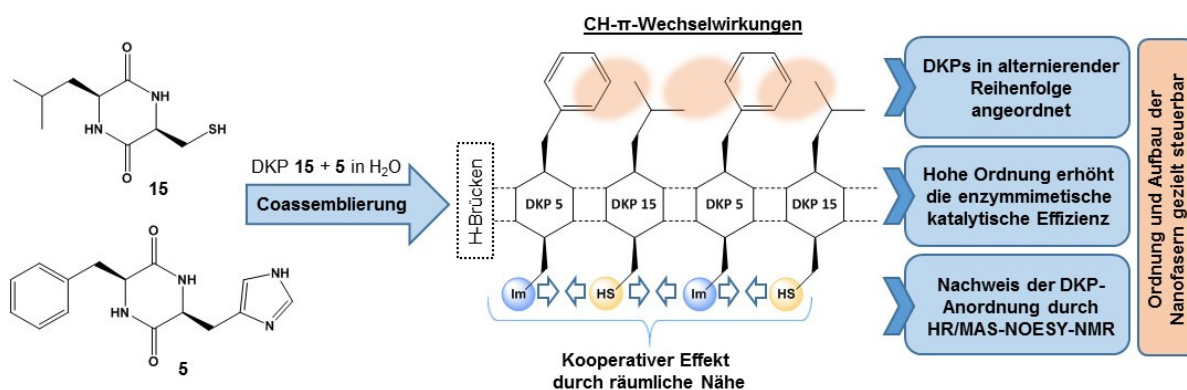


Abbildung 86: (Oben): Schematische Darstellung der Coassemblierung von DKP **5** und **15**; (unten links): Vergleich der katalytischen Effizienz von verschiedenen coassemblierten Hydrogelen im Bezug auf die ANBS-Hydrolyse; (unten rechts): HR-MAS-NOESY-Spektrum des coassemblierten Hydrogels **5/15** (Σ 2,0 Gew-% in D_2O), Ausschnitt zeigt NOE zwischen Phenylprotonen von DKP **5** und CH_3 -Protonen von DKP **15**.

Im letzten Teil der Arbeit wurde *N*-[(Uracil-5-yl)methyl]harnstoff **35** (UMH) als Nukleobasen-basierter Hydrogelator vorgestellt und ausführlich charakterisiert (*Abbildung 87*). UMH stellt ein seltenes Beispiel für einen Harnstoff-beihaltenden Hydrogelator dar, der ausschließlich in Gegenwart von Natriumphosphat Hydrogele bildet und darüber hinaus mit den Phosphatanionen coassembliert. Das UMH-Hydrogel zeigt eine beeindruckend schnelle Regenerationsrate von nur einer Minute und eine hohe Gelstärke mit einem Speichermodul G' von bis zu 10^7 Pa. Die viskoelastischen Eigenschaften, Gel-Sol-Übergangstemperatur, Morphologie und das Regenerationsverhalten des UMH-Hydrogels konnten grundlegend durch Variation der zugegebenen Menge Phosphatsalz oder den pH-Wert beeinflusst werden. Der direkte Einfluss des Phosphats auf die Aggregation von UMH durch NMR-

Titrationsexperimente wurde detailliert untersucht. Durch IR-Experimente konnte bestätigt werden, dass sich die Phosphatanionen direkt in das supramolekulare Netzwerk einbauen. Weiterhin konnte eine mögliche Wirkung von Natriumphosphat auf die Assemblierung durch UV/Vis-Experimente aufgezeigt werden, da die Art des Kations und des Anions einen deutlichen Einfluss auf die Enolautomerie gezeigt haben. Durch den Einsatz von ^{31}P -HR-MAS-NMR und anschließender Job-Plot-Analyse konnte das effektive UMH/Phosphat-Verhältnis innerhalb des Hydrogelnetzwerks als 1 : 1,5 (n/n) bestimmt werden.

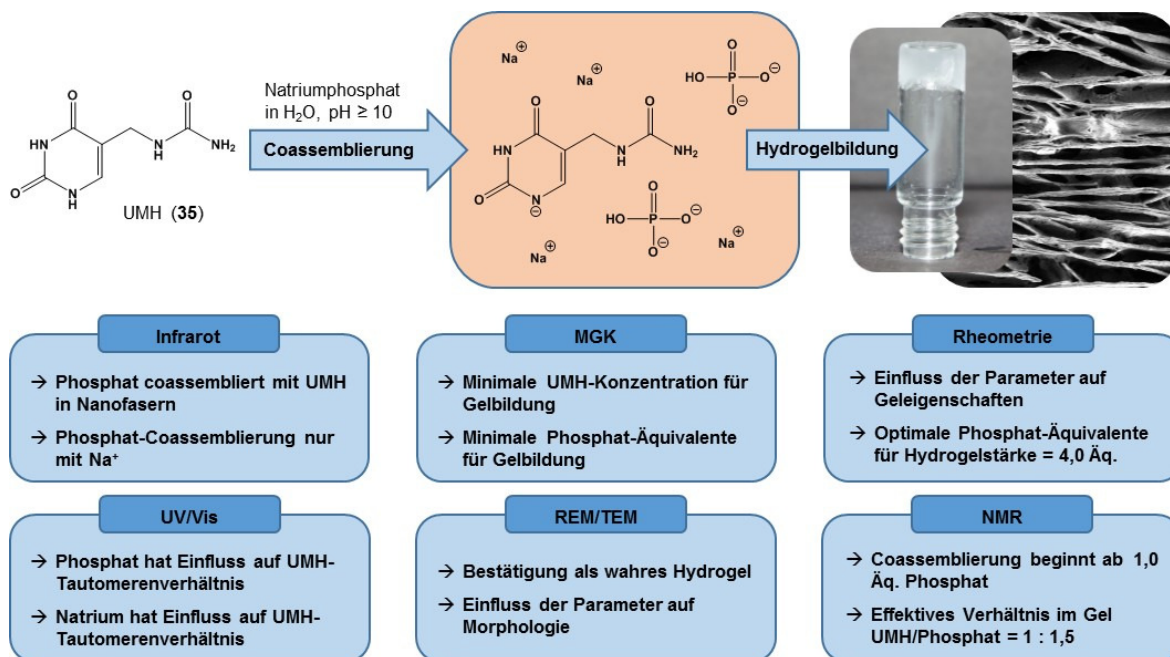


Abbildung 87: Schematische Darstellung der UMH/Natriumphosphat-Coassemblierung und die verwendeten analytischen Methoden und Ergebnisse; Foto eines UMH-Hydrogels (2,5 Gew-% UMH in 1,0 M Natriumphosphatpuffer bei pH 10) und Ausschnitt einer REM-Aufnahme eines UMH-Xerogels (2,5 Gew-% UMH + 5 Äq. Phosphat bei pH 10; 1500-fache Vergrößerung).

4.2 Summary

The ability of Phe-containing DKPs **1 - 6** to self-assemble in aqueous solution was investigated thoroughly in the first part of this thesis (*Figure 1 top*). Despite the simplicity of the structure and the low molecular weight of the DKPs, remarkable stabilities as well as self-healing properties were observed for the resulting hydrogels. DKPs **1 - 6** further represent rare examples of short peptide hydrogelators without unnatural modifications, that are able to form hydrogels in pure water without the addition of organic solvents. To the best of our knowledge, DKP **1** (cyclo[Gly-L-Phe], molecular weight = 204,23 g/mol) represents the lowest molecular weight peptide based hydrogelator described so far. Phenylalanine is essential for the ability of DKPs **1 - 6** to form hydrogels and therefore represents the structure determining amino acid for supramolecular self-assembly. Gel strength, pH resistance, minimum gelator concentration, structure of the xerogels and regenerative behavior were strongly influenced by the choice of the second amino acid, consequently providing highly tunable material properties.

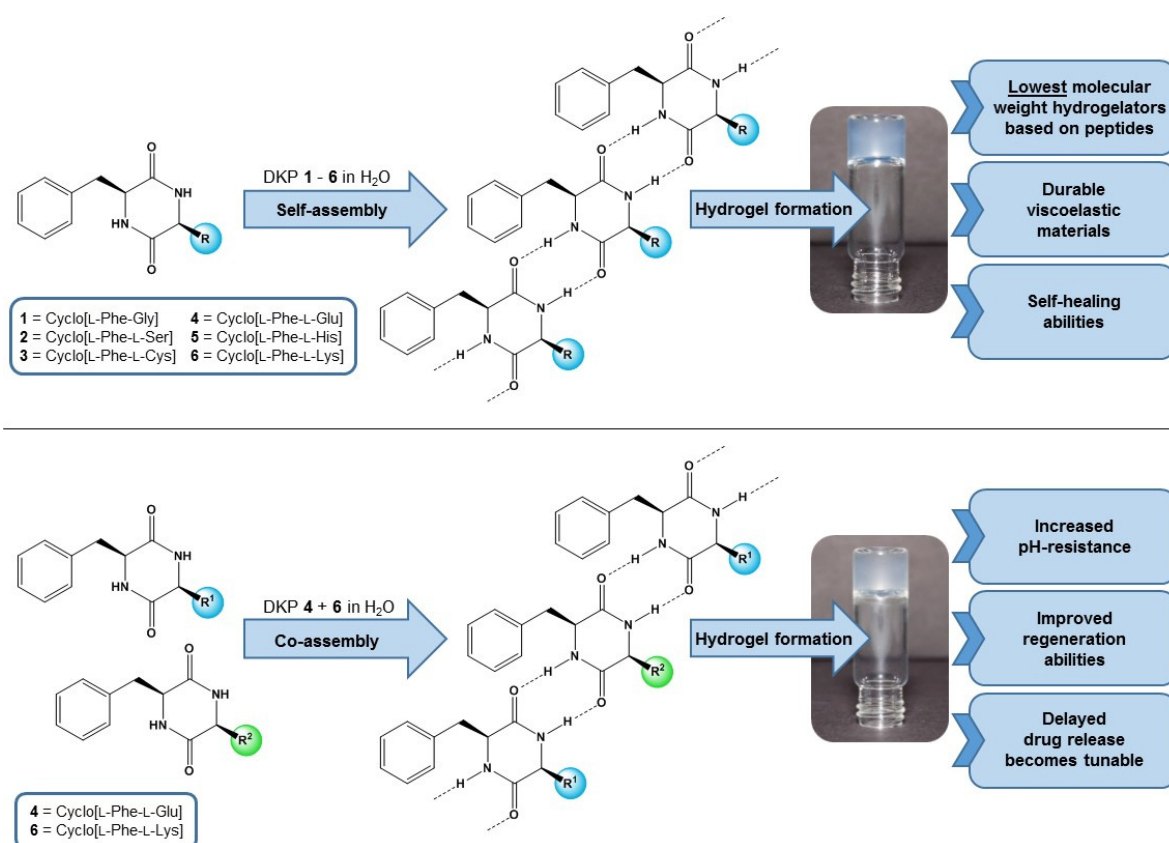


Figure 1: (Top): Schematic presentation of DKP **1 - 6** self-assembly, exemplary photograph of hydrogel **4** (2,0 Gew-% in 0,5 M phosphate buffer at pH 6.0) and general properties of hydrogels **1 - 6**; (bottom): Schematic presentation of coassembly of DKP **4** and **6**, photograph of hydrogel **4** (2,0 Gew-% in 0,5 M phosphate buffer at pH 6.0) and advantages of the coassembled hydrogel compared to the mono-assembled hydrogels.

Further, the coassembly of two different DKPs to a new hydrogel was verified. New material properties that differ from the single-component hydrogels were observed for the

coassembled hydrogel **4/6** (1 : 1 (*n/n*)) (Figure 1 bottom). In addition to an increased resistance of the coassembled hydrogel towards highly acidic or basic conditions, a strongly improved regeneration ability was observed. The inclusion and delayed release of drugs for a potential biomedical application was successfully tested for different DKP-hydrogels.

In the second part of this thesis, the interaction of functional groups in hydrogel state by coassembly of different DKPs was investigated with regard to enzyme mimetic activity (Figure 2). Initial experiments with coassembled hydrogels of Cys-containing DKP **3** and His-containing DKP **5** did reveal a cooperative effect between the functional groups. The changed reactivity by HisH⁺-Cys⁻-cooperativity was confirmed by investigation of a model reaction in dependency of pH value and ratio of the DKPs.

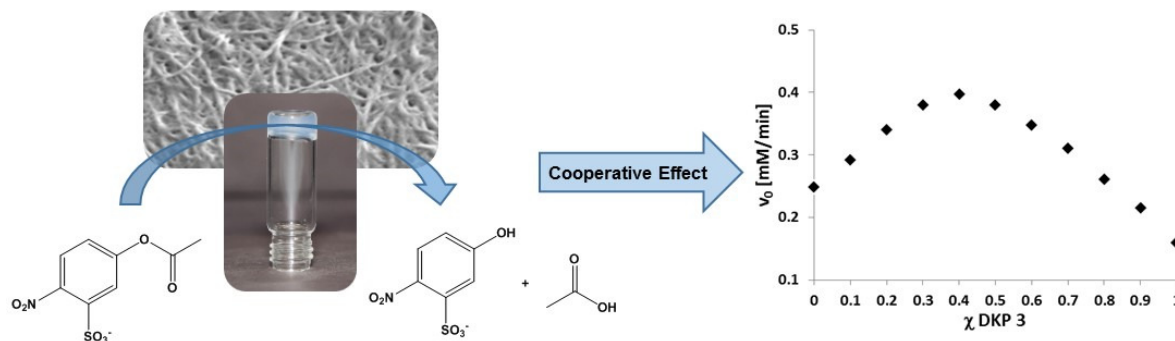
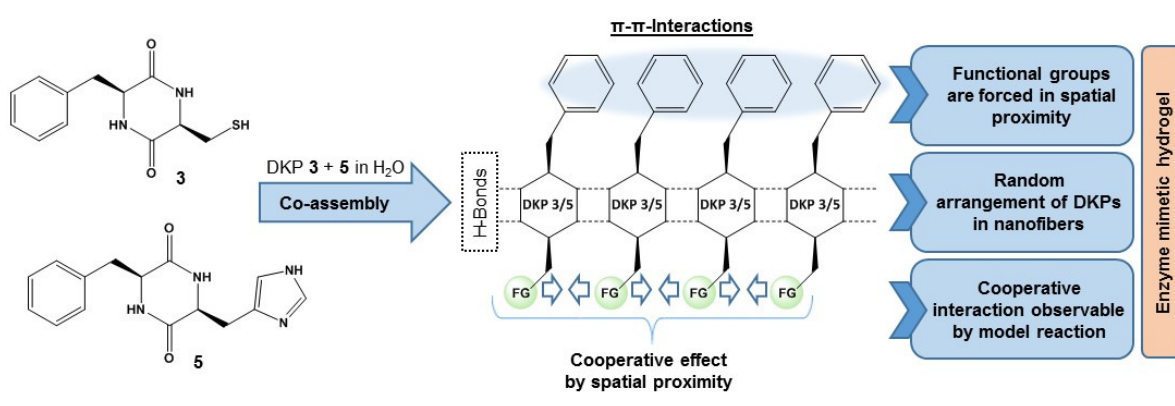


Figure 2: (Top): Schematic presentation of coassembly of DKP **3** and **5**; (bottom left): photograph of hydrogel **3/5** (1 : 1,5 (*n/n*), 1,5 Gew-%), detail of a SEM picture (3000 x magnification) of corresponding xerogel and ANBS hydrolysis as model reaction; (bottom right): initial rate of ANBS hydrolysis catalyzed by coassembled hydrogels **3/5** with varying ratios of DKP **3** with an initial rate maximum at **3/5** = 1 : 1,5 (*n/n*).

By blending of Phe-based DKP **5** with Leu- or Val-based (DKPs **15** and **16**, respectively), CH- π -interactions between the different DKPs could be utilized specifically to achieve a highly ordered coassembly within the hydrogel (Figure 3). On the one hand, the alternating order of the different DKPs in coassembled hydrogels **5/15** and **5/16** was indicated by an increased catalytic efficiency compared to coassembled hydrogel **3/5**. On the other hand, the assumed CH- π -interactions within the coassembled hydrogel were clearly confirmed by two-dimensional NMR spectroscopy. In summary, hydrogels with enzyme mimetic activity were

received by simple blending of two different DKPs and control of coassembly was achieved by selective use of CH- π -interactions.

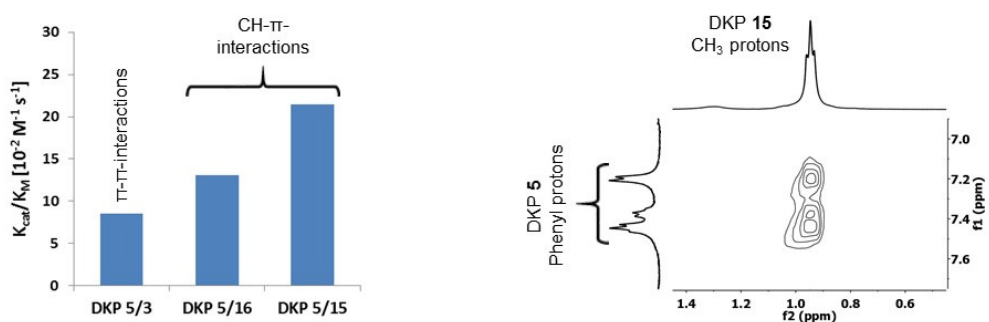
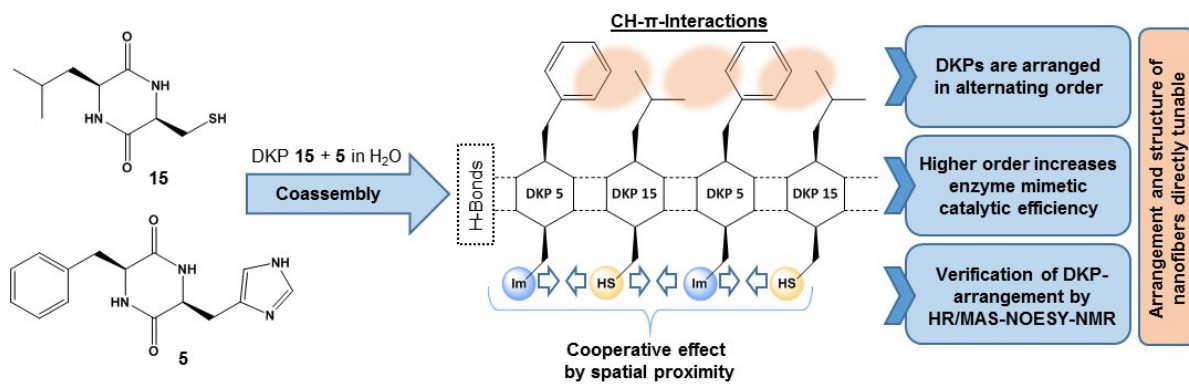


Figure 3: (Top): Schematic presentation of coassembly of DKP **5** and **15**; (bottom left): comparison of catalytic efficiencies of different coassembled hydrogels concerning ANBS hydrolysis; (bottom right): detail of HR-MAS-NOESY-spectrum of coassembled hydrogel **5/15** (Σ 2,0 Gew-% in D₂O), showing NOE cross peak between phenyl protons of DKP **5** and CH₃ protons of DKP **15**.

In the third part of this thesis, *N*-[(Uracil-5-yl)methyl]urea **35** (UMU) is presented as nucleobase-derived hydrogelator and characterized thoroughly (*Figure 4*). UMU further represents a rare example of an urea-containing hydrogelator that specifically forms hydrogels in the presence of sodium phosphate and truly coassembles with phosphate anions. UMU-hydrogels did reveal an impressive regeneration rate of only one Minute and a high gel strength with a storage modulus G' up to 10^7 Pa. The viscoelastic properties, gel-sol transition temperature, morphology and regeneration behavior of UMU hydrogels could be tuned by variation of the added amount of phosphate salt or variation of the pH value. Initial characterization of the UMU hydrogels by determination of the minimum hydrogelator concentration (MGC) in dependency of the added equivalents of phosphate was performed. Further, the direct influence of sodium phosphate on the aggregation of UMU was investigated in detail by NMR titration experiments. The assumption that phosphate anions coassemble with UMU within the hydrogel nanofibers was confirmed by IR-experiments. The influence of cation and anion on the UMU/phosphate coassembly was investigated by UV/Vis experiments and did show a concrete effect on the UMU tautomer ratio. Finally, the application of ³¹P-HR-MAS-NMR of UMU hydrogels followed by Job plot analysis did reveal a UMU/phosphate ratio of 1 : 1.5 (*n/n*) within the hydrogel nanofibers.

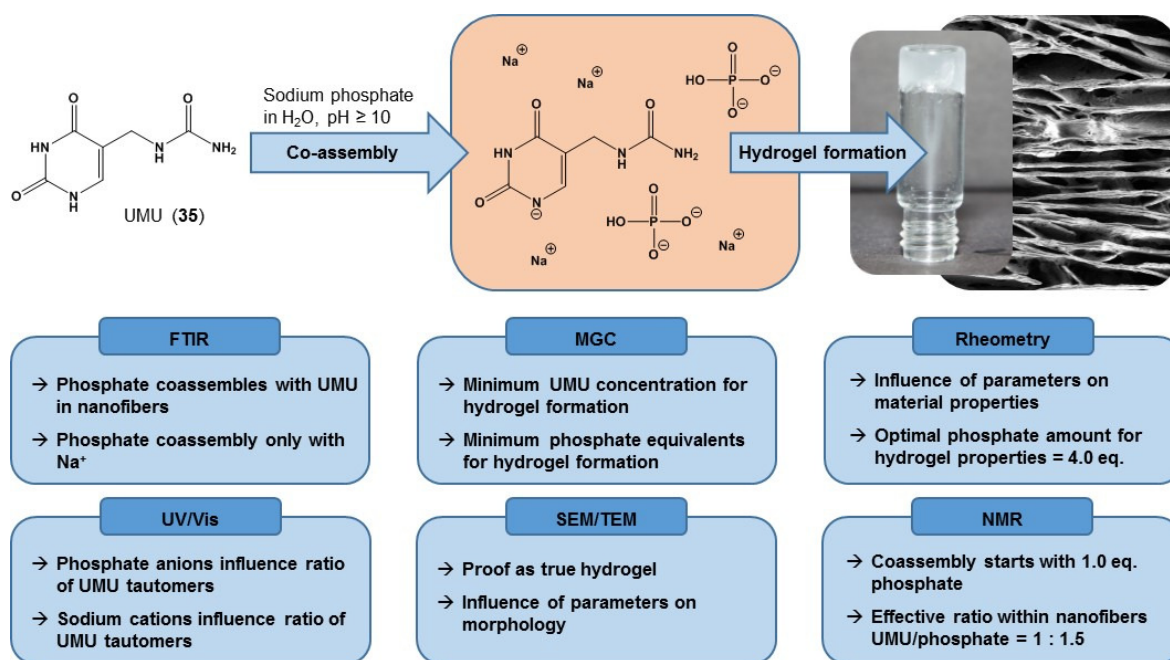


Figure 4: Schematic presentation of UMU/sodium phosphate coassembly, the applied analytical methods und read-out of the experiments; photography of a UMU hydrogel (2,5 Gew-% UMU in 1,0 M sodium phosphate puffer at pH 10) and SEM picture of a UMU xerogel (2,5 Gew-% UMU + 5 eq. sodium phosphate at pH 10; 1500 x magnification).

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeiner Teil

5.1.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Alle Experimente, die den Umgang mit luftempfindlichen Stoffen beinhaltet haben, wurden unter Schutzgasatmosphäre (Argon) durchgeführt. Die Darstellung Cys-haltiger Gele erfolgte unter Argonatmosphäre. Hierfür verwendetes destilliertes Wasser sowie verwendete Puffer wurden vor der Verwendung entgast. Alle verwendeten Startmaterialien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, ohne weitere Aufreinigung und wie von den Herstellern erhalten eingesetzt. Die für organische Synthesen und säulenchromatographische Reinigung verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch durch Destillation gereinigt. Für die Festphasen-Peptidsynthese wurde DMF (Peptide Grade) der Firma Iris Biotech ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die verwendeten Puffer sowie die Hydrogele wurden mit destilliertem Wasser von Milli-Q Qualität angesetzt. Die verwendeten Puffer wurden lichtgeschützt gelagert und nicht länger als fünf Tage verwendet. Das für den Puffer verwendete Na_2HPO_4 wurde vor Verwendung aus Wasser umkristallisiert und im Ofen bei 120 °C getrocknet.

5.1.2 Analytische Methoden

^1H und ^{13}C Kernresonanzspektren sowie ^1H NMR Titrationsexperimente wurden auf einem Bruker Advance 400 MHz Spektrometer in deuteriertem Chloroform (CDCl_3), Dimethylformamid (DMF-d_7), Dimethylsulfoxid (DMSO-d_6) oder Wasser (D_2O) gemessen. Die chemischen Verschiebungen (δ) wurden als Teile einer Million (ppm) und relativ zu den Lösungsmittelrestsignalen angegeben: $\delta(^1\text{H}) = 7.26$ ppm (CDCl_3), $\delta(^1\text{H}) = 8.03$ ppm (DMF-d_7), $\delta(^1\text{H}) = 2.50$ ppm (DMSO-d_6), $\delta(^1\text{H}) = 4.79$ ppm (D_2O); $\delta(^{13}\text{C}) = 77.16$ ppm (CDCl_3), $\delta(^{13}\text{C}) = 163.15$ ppm (DMF-d_7), $\delta(^{13}\text{C}) = 39.52$ ppm (DMSO-d_7). Die chemischen Verschiebungen der ^{13}C NMR Spektren in D_2O wurden relativ zu den Signalen der TMS-Gruppe des internen Standards Natrium-3-(trimethylsilyl)propionat-2,2,3,3- d_4 bei $\delta(^{13}\text{C}) = 0.00$ ppm angegeben. ^{13}C NMR-Spektren wurden bei 101 MHz aufgenommen und durch Breitbandentkopplung vollständig ^1H entkoppelt. Für die Beschreibung der Multiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dd = Dublett von Dublett, dt = Triplett von Dublett, m = Multiplett. Die Kopplungskonstanten J wurden in Hertz [Hz] angegeben. Hochtemperatur-Messungen wurden auf einem Bruker AMX 600 MHz Spektrometer durchgeführt.

¹³C NMR Titrationsexperimente wurden auf einem Bruker DRX 250 MHz Spektrometer in D₂O durchgeführt. Chemische Verschiebungen wurden relativ zu den Signalen der TMS-Gruppe des internen Standards Natrium-3-(trimethylsilyl)propionat-2,2,3,3-d₄ bei $\delta(^{13}\text{C}) = 0.00$ ppm angegeben.

³¹P HR-MAS NMR Spektren der Hydrogele in D₂O wurden bei 202 MHz auf einem Bruker AVII 500 MHz Spektrometer mit einem 4 mm dreifach Resonanz HR-MAS Probenkopf aufgenommen. Die Proben wurden bei 8 °C und mit Rotationsfrequenzen von 2,5 oder 4,0 kHz gemessen.

¹H HR-MAS-NOESY Spektren der Hydrogele in D₂O wurden auf einem Bruker ARX 400 MHz Spektrometer mit einem 4 mm dreifach Resonanz HR-MAS Probenkopf aufgenommen. Die Proben wurden bei Raumtemperatur und mit Rotationsfrequenzen von 2,5 oder 4,0 kHz gemessen.

Die **Säulenchromatographische Aufreinigung** wurde mit Kieselgel der Korngröße 40 - 63 μm durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert.

Für die Reaktionskontrolle mittels **Dünnschichtchromatographie** wurden Folien mit DC-Kieselgel 60 mit Fluoreszenz-Indikator F₂₅₄ verwendet. Substanzen wurden bei einer Wellenlänge von 254 und 366 nm detektiert.

Aufnahmen mittels **Rasterelektronenmikroskop (REM)** wurden mit einem Zeiss DSM 940 und einem Hitachi SU8030 Rasterelektronenmikroskop durchgeführt. Die Proben wurden in einem geschlossenen 4 mL Schraubdeckelglas in destilliertem Wasser (Milli-Q) durch Erhitzen gelöst und die warmen Lösungen wurden auf vorgekühlte Aluminiumbleche getropft. Die Probenbleche wurden für 5 - 20 min bei 4 °C gekühlt, anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert. Bei Verwendung des Zeiss DSM 940 Rasterelektronenmikroskops wurden die Xerogege zusätzlich mit einem Balzers SCD 050 Sputter Coater mit einer dünnen Platinschicht besputtert. REM-Aufnahmen der Xerogege wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 1 kV (Hitachi SU8030) und 10 kV (Zeiss DSM 940) aufgenommen. Wenn ein bestimmter pH-Wert ohne Puffer eingestellt wurde und nicht anders beschrieben, wurden die pH-Werte der Hydrogele mit Triethylamin oder Essigsäure eingestellt.

Aufnahmen mittels **Transmissionselektronenmikroskop (TEM)** wurden mit einem Hitachi SU8030 Rasterelektronenmikroskop im STEM Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 30 kV durchgeführt. Die Proben wurden in einem geschlossenen 4 mL Schraubdeckelglas in destilliertem Wasser (Milli-Q) durch Erhitzen gelöst und für 20 min bei 4 °C gekühlt. Die Hydrogele wurden im Schraubdeckelglas mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und

lyophilisiert. Die resultierenden Xerogele wurden auf einem mit Karbonfilm beschichteten TEM-Netz (200 Mesh, Cu) verteilt.

IR-Spektren wurden auf einem Jasco FT/IR-4100 Spektrometer aufgenommen. Reinsubstanzen wurden als Feststoff gemessen und eine Auswahl an Signalen wurde in reziproken Zentimetern (cm^{-1}) angegeben. Für IR-Messungen von Lösungen und Gelen in Phosphatpuffern wurden die entsprechenden Puffer durch Hintergrundmessungen berücksichtigt. Die Gele wurden in einem geschlossenen 4 mL Schraubdeckelglas durch Erhitzen des Gelators in den entsprechenden Puffern und anschließendem Kühlen auf 4 °C präpariert. Nach Erreichen der Raumtemperatur wurden die Gele mit einem Spatel auf das Spektrometer aufgebracht und gemessen. Übersättigte Lösungen wurden analog zu den Hydrogelen hergestellt, indem auf die Kühlung auf 4 °C verzichtet wurde. Die übersättigten Lösungen wurden gemessen sobald sie Raumtemperatur erreicht hatten.

Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi B-540 Schmelzpunktbestimmungsgerät gemessen.

Massenspektren (MS) wurden mit einem Finnigan MAT95 Spektrometer gemessen. Als Ionisierungsmethoden wurden EI und FAB verwendet.

Hochauflösende Massenspektren (HRMS) wurden auf einem Bruker Daltonics Apex II FT-ICR Massenspektrometer gemessen. ESI wurde als Ionisierungsmethode verwendet.

Spezifische Drehwinkel $[\alpha]$ wurden mit einem Jasco P-1020 Polarimeter mit einer Natriumdampflampe gemessen.

CD-Spektren wurden mit einem Jasco J-720 Spectropolarimeter aufgenommen.

Elementaranalysen wurden mit einem Elementar Vario MICRO Cube CHNS-Analysator gemessen.

UV/Vis-Spektren und die Messung der Absorption bei einzelnen Wellenlängen zur Konzentrationsbestimmung von UV-aktiven Substanzen wurden auf einem Perkin-Elmer Lambda 2 UV/Vis-Spektrometer aufgenommen. Für die Bestimmung von Extinktionskoeffizienten wurden Messungen der Reinsubstanz mehrfach bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. UMH-Proben für die Untersuchung der verschiedenen Tautomere wurden in 1,0 M Puffern gelöst und hatten eine Konzentration von 0,08 mM.

Für die Messung der **Sol-Gel-Übergangstemperaturen** (T_{SG}) der Hydrogele wurden der Gelator und 500 μL destilliertes Wasser in einer Schliffkappe (Hülse, NS 14) vorgelegt und mittels Quickfit und Thermometer verschlossen. Der Gelator wurde durch Erhitzen vollständig gelöst und das Thermometer so positioniert, dass es in die Lösung eintauchte. Die Immobilisierung des Wassers durch Gelbildung wurde während des Abkühlens beobachtet.

Das Abkühlen wurde durch wiederholtes Eintauchen der Schliffkappe für wenige Sekunden in ein Eisbad beschleunigt. Durch das Drehen der Schliffkappe um 180° konnte die vollständige Gelbildung nachvollzogen werden. Die Temperatur zu diesem Zeitpunkt wurde als T_{SG} definiert ("*tube inversion method*"). Jede Messung wurde mindestens zehnmal wiederholt und die Werte wurden gemittelt.

Die **minimale Gelator Konzentration (MGK)** der Hydrogele wurde durch die „tube inversion method“ gemessen. Variierende Mengen des Gelators wurden mit 500 μ L Puffer in 4 mL Schraubdeckelgläser vorgelegt, fest verschlossen und durch Erhitzen gelöst. Die Lösung wurde für 10 Minuten in einem Eisbad gekühlt. Die Probe wurde als Hydrogel definiert, wenn kein schwerkraftbedingtes Fließen zu beobachten war, nachdem das Glas auf den Kopf gedreht wurde. Die minimal benötigte Konzentration zum Bilden eines Hydrogels entspricht der MGK.

Die **rheologischen Untersuchungen** der viskoelastischen Eigenschaften der Hydrogele wurden auf einem Anton Paar Physica MCR 501 Rheometer durchgeführt. Es wurde eine Platte/Platte-Messanordnung mit einem Durchmesser von 25 mm verwendet. Die Messungen wurden bei 25 °C und einem Plattenabstand von 0,2 mm durchgeführt. Für die **DKP-Hydrogele** wurde wie folgt vorgegangen: Der Gelator wurde in destilliertem Wasser (Milli-Q) in einem geschlossenen 4 mL Schraubdeckelglas durch Erhitzen gelöst. Die Hydrogel-Proben wurden *in situ* generiert, indem die entsprechenden warmen Lösungen auf die vorgeheizte Rheometer-Platte (75 °C) gegeben wurden und der Stempel auf die noch flüssige Probe herunter gefahren wurde. Die Probe wurde mit maximaler Kühlrate (20 °C/min) auf 4 °C abgekühlt, nach 10 min bei 4 °C auf 25 °C erwärmt (10 °C/min) und für weitere 10 min gealtert, wenn nicht anders beschrieben. Amplitudensweep-Experimente wurden mit 10 rad/s durchgeführt. Frequenzsweep-Experimente wurden mit einer geringen Deformation/Scherung durchgeführt, die innerhalb des linear viskoelastischen Bereichs des Hydrogels liegt. Für Regenerationsexperimente wurde das Gel für 30 s einer Deformation von 100% ausgesetzt. Die folgende Regeneration wurde mit einer geringen Deformation innerhalb des LVB gemessen. Der zeitabhängige Anstieg der mechanischen Belastbarkeit der Gele wurde mit Zeitsweep-Experimenten bei geringer Deformation (0,05%) untersucht. Hier wurden die Gelator-Lösungen nur für 30 s bei 4 °C gekühlt bevor auf 25 °C erwärmt wurde und die Messung wurde direkt gestartet nachdem das Gel 25 °C erreicht hat. Für **UMH-Hydrogele** wurde der Gelator in Phosphatpuffer in einem geschlossenen 4 mL Schraubdeckelglas durch Erhitzen gelöst. Die Hydrogel-Proben wurden *in situ* generiert, indem die entsprechenden warmen Lösungen auf eine Rheometer-Platte (RT) gegeben wurden und der Stempel auf die noch flüssige Probe herunter gefahren wurde. Die Probe wurde mit maximaler Kühlrate (20 °C/min) auf 8 °C abgekühlt. Für den Vergleich von Amplitudensweep-Experimenten mit

unterschiedlichen Phosphat-Äquivalenten, wurden die Proben für 30 min bei 8 °C gealtert (bis G' und G'' konstante Werte erreicht haben) und anschließend bei 8 °C gemessen. Für alle anderen Experimente wurden die Proben für 10 min bei 8 °C gekühlt, anschließend auf 20 °C (10 °C/min) erwärmt, für weitere 20 min gealtert (bis G' und G'' konstante Werte erreicht haben) und schließlich bei 20 °C gemessen. Amplitudensweep-Experimente wurden mit einer konstanten Frequenz von 10 rad/s durchgeführt. Frequenzsweep-Experimente wurden mit einer konstanten Deformation von 0,005% durchgeführt. Wiederholende Regenerationsexperimente wurden mit einer Frequenz von 10 rad/s gemessen. Es wurde mit einer Deformation von 0,005% für 5 min begonnen, gefolgt von der Belastung des Gels bei 100% Deformation für 30 s. Nach der Zerstörung der viskoelastischen Integrität, indiziert durch $G'' > G'$, wurde die Regeneration des Gels mit einer konstanten Deformation von 0,005% gemessen. Dieser Prozess wurde mehrfach direkt hintereinander wiederholt.

5.1.3 Verzögerte Wirkstofffreisetzung

Die DKPs wurden durch Erhitzen in 400 µL PBS-Puffer (1x) in einem geschlossenen 4 mL Schraubdeckelglas gelöst. Die Lösung wurde auf 40 °C abgekühlt und 100 µL einer Lösung des Wirkstoffmoleküls in PBS (1x) wurde zu der warmen DKP-Lösung gegeben. Die Mischung wurde auf 4 °C gekühlt. Das resultierende wirkstoffbeladene Hydrogel wurde für 24 h bei 4 °C gealtert und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. 500 µL PBS (1x) wurden auf das Hydrogel gegeben, um die Diffusionsexperimente zu starten. Für jeden Messpunkt der Konzentrationsbestimmung wurden 400 µL Probenvolumen entnommen und unmittelbar danach das gleiche Volumen PBS wieder auf das Gel gegeben. Die Konzentration des Wirkstoffes im Probevolumen wurde für BSA bei 280 nm und für Tetracyclin bei 366 nm bestimmt.

5.1.4 Kinetische Untersuchungen mittels ANBS-Hydrolyse

5.1.4.1 Durchführung

Für Experimente bei pH 6,25 und 6,50 wurden 0,25 M MES-Puffer verwendet, für den Bereich von pH 6,75 bis 8,50 wurden 0,25 M HEPES-Puffer verwendet. Wenn Cystein-beinhaltenden DKPs verwendet wurden, wurden die Puffer vor DKP-Zugabe mit Argon entgast. Die DKPs wurden im entsprechenden Puffer (250 µl) in einem 4 mL Schraubdeckelglas durch Erhitzen gelöst und für 20 Minuten in einem Eisbad gekühlt. Das Eisbad wurde anschließend entfernt und die Probe für 20 Minuten auf Raumtemperatur erwärmt. Erst wurde der entsprechende Puffer (950 µl) und danach die ANBS-Lösung in DMF (50 µl) vorsichtig auf das Hydrogel gegeben. Die Lösungen auf dem Hydrogel wurden anschließend durch vorsichtiges

Schwenken gemischt und die Messung der Zeit direkt gestartet. Bei ANBS-Konzentrationen über 60 mM (final in der Puffer DMF-Mischung) wurde ANBS in der Puffer/DMF-Mischung (950 + 50 μ l) gelöst und auf das Hydrogel gegeben. Der Überstand über dem Hydrogel wurde während der Messung alle 10 - 15 s vorsichtig durch Schwenken durchmischt. Die bei jedem Messpunkt entnommene Probe wurde mit dem entsprechenden Puffer verdünnt. Die ANBS-Hydrolyse wurde durch UV/Vis-Messungen bei 406 nm verfolgt. Die experimentell bestimmten Extinktionskoeffizienten für die Konzentrationsberechnung von HNBS sind *Kapitel 6.3.2 in Tabelle 8* angegeben.

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und für die Berechnungen wurde der resultierende Mittelwert verwendet. Die Autohydrolyse wurde in den entsprechenden Puffern bei gleichen pH-Werten und Substratkonzentrationen gemessen und von den Messwerten abgezogen. Die Anfangsgeschwindigkeit entspricht grundsätzlich der Steigung der Messpunkte innerhalb der ersten 5 Minuten (0,5 - 5,5 min). Bei Experimenten mit variierenden Mischungsverhältnissen wurde bei der Bestimmung von v_0 bei Hydrogelen **5/15** und **5/16** die Steigung von 8,0 - 15,0 min für die Bestimmung von v_0 verwendet. Im Gegensatz zu den coassemblierten Hydrogelen **3/5** verlaufen die ersten 5 Minuten für $\chi \geq 0,6$ hier nicht linear und führen zu größeren Abweichungen bei den Wiederholungsexperimenten.

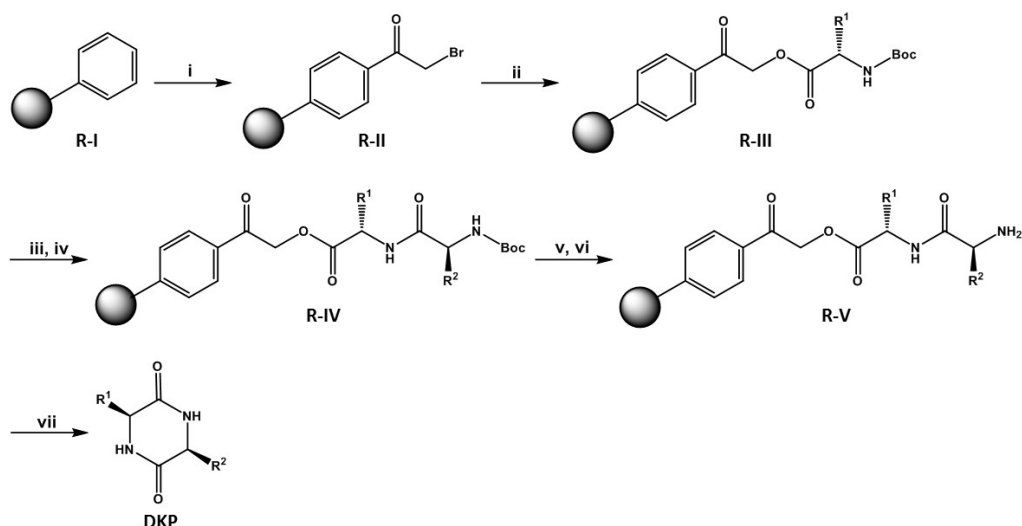
5.1.4.2 Lineweaver-Burk-Plots

Die optimalen Bedingungen aus den vorhergehenden Experimenten wurden für die verschiedenen coassemblierten Hydrogel-Systeme **3/5**, **5/15** und **5/16** verwendet. Die Anfangsgeschwindigkeiten der ANBS-Hydrolyse wurden mit Substratkonzentrationen von 10 bis 120 mM untersucht (siehe *Kapitel 6.3.3 Tabelle 9*). Die Konzentrationen des Substrats und der DKPs für die Berechnung der Lineweaver-Burk-Plots wurden auf das Gesamtvolumen von 1,25 mL (Gelvolumen: 250 μ L, Substratlösung: 1000 μ L) bezogen. Die reziproken Substratkonzentrationen wurden gegen die reziproken Anfangsgeschwindigkeiten v_0 aufgetragen. Der Schnittpunkt der Trendlinie mit der y-Achse entspricht in diesem Modell $1/v_{max}$, der Schnittpunkt mit der x-Achse entspricht $-1/K_M$ (siehe *Kapitel 6.3.3 Tabelle 10*). Die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} ergibt sich aus $v_{max}/[DKP]$ und die katalytische Effizienz entspricht k_{cat}/K_M .

5.1.5 SPPS-Synthese der DKPs

Die Bromacyl-funktionalisierte Festphase **R-I** wurde über eine Friedel-Crafts-Acylierung von Polystyrol-Beads (Poly(styrol-divinylbenzen), 2% quervernetzt, 200-400 mesh) erhalten.^[252] Die Diketopiperazine wurden durch eine Modifikation der Boc-Festphasen Peptidsynthese von Liu *et al.* synthetisiert (*Schema 10*).^[253] Festphase **R-I** (1,0 Äq.) wurde in DMF (10 mL/g)

suspendiert, mit 2,0 Äq *N*^α-Boc geschützter Aminosäure sowie 2,2 Äq. Triethylamin versetzt und für 24 h gerührt. Die Festphase wurde anschließend abfiltriert, intensiv mit DMF (3x), 95% EtOH (5x), EtOAc (2x) und DCM (1x) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Abspalten der Boc-Schutzgruppe wurde durch das Suspendieren der Festphase **R-II** in 3,0 N HCl in EtOAc (mind. 10 mL/g) für 30 Minuten erreicht. Die Festphase wurde über eine P4-Nutsche abfiltriert, mit EtOAc (5x) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Die zweite Aminosäure (3,0 Äq.) wurde in DMF gelöst (1,5 M), in einem Eisbad gekühlt und mit 4,5 Äq. DIPEA versetzt. Eine HBTU-Lösung (2,85 Äq, 0,5 M in DMF) wurde in einem Eisbad gekühlt und zu der Aminosäure-Lösung gegeben. Die Aminosäure-HBTU-Lösung wurde für 5 min bei RT gerührt und zu der Festphase (1,0 Äq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 6 h gerührt und anschließend über eine P4-Nutsche abfiltriert. Die Festphase wurde gründlich mit DMF (3x), MeOH (5x) und DCM (2x) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Festphase **R-III** wurden in 3,0 N HCl in EtOAc suspendiert (mind. 10 mL/g) und für 30 min bei RT gerührt. Die Festphase wurde abfiltriert, gründlich mit EtOAc (5x) gewaschen und direkt weiter umgesetzt. Die Festphase wurde durch Suspendieren in DIPEA (10%) in EtOAc/EtOH (1 : 1 (v/v), mind. 10 mL/g) für 4 Minuten neutralisiert, unmittelbar danach abfiltriert und dreimal für mehr als eine Minute mit Ethanol (95%) gewaschen. Die Abspaltung des Peptids von Festphase **R-IV** unter gleichzeitiger Zyklisierung wurde durch Suspendieren der Festphase in NEt₃ (5%) in THF/H₂O (8 : 1 (v/v), mind. 20 mL/g) für 24 h erreicht. Wenn sich während der Abspaltung ein Niederschlag gebildet hat, wurde dieser durch Zugabe von THF oder Wasser wieder gelöst. Anschließend wurde die Festphase abfiltriert und gründlich mit THF/H₂O (8 : 1 (v/v)) gewaschen und die gesammelten Filtrate vereinigt. Die Abspaltung wurde ein zweites Mal wiederholt. Das weitere Vorgehen wurde bei den einzelnen Synthesen angegeben, die angegebenen Ausbeuten entsprechen den Gesamtausbeuten ausgehend von Festphase **R-I**.



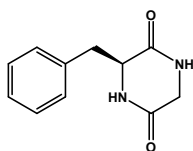
Schema 10: Festphasen Peptidsynthese der DKPs ausgehend von Polystyrolharz **R-I** (Poly(styrol-divinylbenzen-copolymer, 2% DVB quervernetzt); i: BrCH_2COBr , AlCl_3 , PhNO_2 , 20 h; ii: $\text{Boc-AS}^1\text{-OH}$, NEt_3 , DMF, 24 h; iii: 3 M HCl in EtOAc, 30 min; iv: $\text{Boc-AS}^2\text{-OH}$, HBTU, DIPEA, DMF, 5 h; v: 3 M HCl in EtOAc, 30 min; vi: DIPEA, EtOAc/EtOH, 5 min; vii: NEt_3 , THF/ H_2O , 24 h; AS = Aminosäure, R^1 = Seitenkette von AS^1 , R^2 = Seitenkette von AS^2 , graue Kugel = Polystyrolharz.

5.1.6 Entschützungsverfahren für PMB-Schutzgruppen

Die Methode wurde unter Argonatmosphäre durchgeführt. Das PMB-geschützte DKP (2,5 mmol) wurde in 25 mL einer entgasten Mischung aus TFA/ H_2O /Phenol (90 : 5 : 5 (v/v/m)) gelöst und für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend unter vermindertem Druck auf ein Viertel des Volumens eingeeengt und in einem Eisbad gekühlt. Ein Überschuss Diethylether (mind. 100 mL) wurde zugegeben und die resultierende Suspension wurde für 10 min gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert, mit Diethylether (3x) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Rohprodukt wurde in 100 mL einer 10 mM DTT-Lösung in THF/ H_2O (8 : 2 v/v) gelöst und 1,5 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben. Die Lösung wurde für 30 min gerührt und anschließend wurde das THF unter vermindertem Druck entfernt. Die resultierende Suspension wurde für 10 min in einem Eisbad gekühlt, der Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Produkt wurde unter vermindertem Druck getrocknet.

5.2 Synthesen

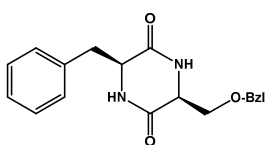
5.2.1 Cyclo[L-Phe-Gly] (1)



Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Phe-OH (15,8 g, 59,5 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Gly-OH (15,6 g, 89,2 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Der Feststoff wurde mit Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-Gly] wurde als farbloser Feststoff erhalten (3,91 g, 19,2 mmol, 64% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.16 (1H, s (br)), 7.89 (1H, s (br)), 7.31 - 7.14 (m, 5H), 4.06 (s, 1H), 3.35 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H), 3.10 (dd, *J* = 4.3 Hz, 13.3 Hz, 1H), 2.88 (dd, *J* = 3.7 Hz, 13.3 Hz, 1H), 2.76 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ 167.0, 165.6; 135.9, 130.0 (2x), 128.0 (2x), 126.7, 55.4, 43.6, 38.7. **MS (EI)** *m/z* berechnet für C₁₁H₁₂N₂O₂: 204,1; gefunden [M]⁺: 204,1. **FTIR** (cm⁻¹): 3190, 3048, 2981, 2925, 2883, 1666, 1462, 1336, 1089, 1005, 859, 842, 796, 755, 702. **Elementaranalyse:** C₁₁H₁₂N₂O₂ (204,23 g/mol) berechnet (%): C 64,69; H 5,92; N 13,72; gefunden (%): C 64,47; H 5,72; N 13,79. α_D^{22} : + 53,3 (*c* = 0,95; DMSO) {+ 26,6 (*c* = 0,95; DMSO)}.^[317] **Schmelzpunkt:** 269 - 271 °C (Zersetzung) {266 - 268 °C}.^[317] Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[318]

5.2.2 Cyclo[L-Phe-L-Ser(Bzl)] (2a)

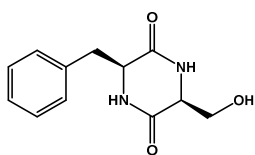


Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Phe-OH (10,6 g, 40,0 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Ser(Bzl)-OH (17,7 g, 60,0 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-Ser(Bzl)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (3,75 g, 11,6 mmol, 58%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.12 - 8.08 (m, 2H), 7.37 - 7.06 (m, 10H), 4.32 (s, 2H), 4.12 - 4.08 (m, 1H), 3.86 - 3.82 (m, 1H), 3.28 (dd, *J* = 3.0 Hz, 9.5 Hz, 1H), 3.05 (dd, *J* = 5.7 Hz, 13.6 Hz), 2.91 (dd, *J* = 4.9 Hz, 13.6 Hz), 2.66 (dd, *J* = 6.3 Hz, 9.5 Hz, 1H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ 166.3, 164.9, 137.8, 136.4, 129.9 (2x), 128.1 (2x), 128.0 (2x), 127.5

(2x), 127.4, 126.4, 72.1, 71.4, 55.3, 54.9, 39.3. **MS (FAB)** m/z berechnet für $C_{19}H_{20}N_2O_3$: 324,1; gefunden $[M+H]^+$: 325,1.

5.2.3 Cyclo[L-Phe-L-Ser] (2)

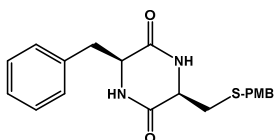


Die Entschützung wurde nach einer Vorschrift von Lyster *et al.* durchgeführt.^[319] Trimethylsilyliodid (3,26 g, 16,3 mmol, 1,40 Äq.) wurde zu einer Suspension von Cyclo[L-Phe-L-Ser(Bzl)] **2a** (3,77 g, 11,6 mmol, 1,0 Äq) in trockenem Dichlormethan gegeben. Die Reaktionsmischung

wurde über Nacht gerührt, anschließend wurde ein Überschuss Methanol zugegeben. Flüchtige Komponenten wurden unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel gereinigt (DCM/MeOH = 9 : 1 (v/v) + 0,5% Et₃N) und Cyclo[L-Phe-L-Ser] wurde als farbloser Feststoff erhalten (2,33 g, 9,94 mmol, 86% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.00 (s (br), 1H), 7.89 (s (br), 1H), 7.31 - 7.15 (m, 5H), 4.86 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.08 - 4.03 (m, 1H), 3.68 - 3.63 (m, 1H), 3.32 - 3.26 (m, 1H), 3.10 (dd, $J = 6.1$ Hz, 13.5 Hz, 1H), 2.98 (dd, $J = 4.9$ Hz, 13.5 Hz), 2.89-2.82 (m, 1H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.4, 165.6, 136.6, 129.9 (2x), 128.0 (2x), 126.4, 63.0, 57.0, 55.4, 39.8. **MS (FAB)** m/z berechnet für $C_{12}H_{14}N_2O_3$: 234,1; gefunden $[M+H]^+$: 235,2. **FTIR (cm⁻¹):** 3320, 3190, 3084, 2964, 2921, 2878, 1665, 1454, 1368, 1335, 1066, 1038, 822, 756, 697, 627. **Elementaranalyse:** $C_{12}H_{14}N_2O_3$ (234,26 g/mol) berechnet (%): C 61,53; H 6,02; N 11,96; gefunden (%): C 61,70; H 5,40; N 12,11. $\alpha_{22}^D = -130,4$ (MeOH, $c = 0,36$) { $-124,6$ ($c = 0,36$; MeOH)}.^[320] **Schmelzpunkt:** 237 - 239 °C (Zersetzung). Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[321]

5.2.4 Cyclo[L-Phe-L-Cys(PMB)] (3a)



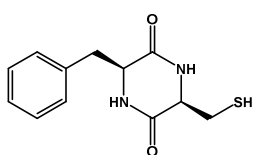
Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Phe-OH (17,5 g, 65,8 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Cys(PMB)-OH (33,7 g, 98,8 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1

(v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Phase wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Der Feststoff wurde mit Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-Cys(PMB)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (5,82 g, 15,7 mmol, 48% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.20 (s (br), 1H), 8.01 (s (br), 1H), 7.29 - 7.14 (m, 7H), 6.85 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 4.21 - 4.17 (m, 1H), 3.85 - 3.80 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.51 (s, 2H), 3.14

(dd, $J = 4.7$ Hz, 13.6 Hz, 1H), 2.94 (dd, $J = 4.9$ Hz, 13.6 Hz), 2.31 (dd, $J = 3.9$ Hz, 13.7 Hz, 1H), 1.52 (dd, $J = 7.4$ Hz, 13.7 Hz). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166.1, 165.8, 158.0, 136.2, 130.1 (2x), 130.0, 129.9 (2x), 128.0 (2x), 126.5, 113.6 (2x), 55.3, 54.9, 53.6, 35.1, 34.6. **MS (FAB)** m/z berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 370,1; gefunden $[\text{M}+\text{H}]^+$: 371,2. **FTIR (cm^{-1})**: 3191, 3088, 3049, 2966, 2892, 1668, 1607, 1583, 1511, 1452, 1336, 1301, 1242, 1177, 1095, 1031, 1011, 923, 821, 756, 701, 670, 634. α_{22}^D : -84,0 (DMSO, $c = 1,0$). **Schmelzpunkt**: 191 - 195 °C (Zersetzung).

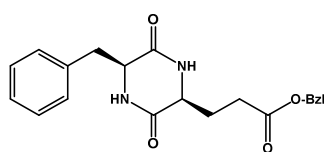
5.2.5 Cyclo[L-Phe-L-Cys] (3)



Cyclo[L-Phe-L-Cys(PMB)] **3a** (1,00 g, 2,70 mmol) wurde nach allgemeiner PMB-Entschützungs-methode entschützt. Cyclo[L-Phe-L-Cys] wurde als farbloser Feststoff erhalten (630 mg, 2,50 mmol, 93% Ausbeute).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.21 (s (br), 1H), 8.04 (s (br), 1H), 7.29 - 7.16 (m, 5H), 4.23 - 4.19 (m, 1H), 3.92 - 3.88 (m, 1H), 3.15 (dd, $J = 4.3$ Hz, 13.6 Hz, 1H), 2.92 (dd, $J = 5.0$ Hz, 13.6 Hz, 1H), 2.36 - 2.29 (m, 1H), 2.01 - 1.93 (m, 1H), 1.74 (t, $J = 8.5$ Hz). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166.4, 165.4, 136.2, 130.2 (2x), 128.0 (2x), 126.5, 55.8, 55.1, 38.1, 27.3. **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: 250,07760; gefunden $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 273,06695. **FTIR (cm^{-1})**: 3182, 3085, 3045, 2965, 2927, 2882, 1660, 1450, 1335, 1239, 1187, 1097, 847, 811, 763, 747, 701. α_{22}^D : -54,3 (DMSO, $c = 1,0$). **Schmelzpunkt**: 246 - 248 °C (Zersetzung). Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[322]

5.2.6 Cyclo[L-Phe-L-Glu(OBzl)] (4a)

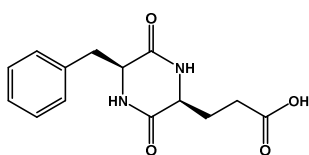


Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Phe-OH (6,82 g, 25,7 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Glu(OBzl)-OH (13,01 g, 38,55 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Phase wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-Glu(OBzl)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (1,68 g, 4,75 mmol, 36% Ausbeute).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.24 (s (br), 1H), 8.09 (s (br), 1H), 7.44 - 7.00 (m, 10H), 5.02 (s, 2H), 4.22 - 4.17 (m, 1H), 3.72 - 3.67 (m, 1H), 3.15 (d, $J = 2.4$ Hz, 13.3 Hz, 1H), 2.82 (dd,

$J = 4.4$ Hz, 13.3 Hz, 1H), 1.76 - 1.66 (m, 2H), 1.32 - 1.21 (m, 1H), 1.13 - 1.02 (m, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 171.9, 166.3, 166.1, 136.2, 135.8, 130.2 (2x), 128.3 (2x), 127.9 (3x), 127.8 (2x), 126.7, 65.2, 55.2, 52.8, 37.9, 28.3, 28.2. **MS (EI)** m/z berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4$: 366,2; gefunden $[\text{M}]^+$: 366,2. **FTIR (cm^{-1})**: 3194, 3086, 3060, 2979, 2902, 1733, 1672, 1456, 1393, 1337, 1259, 1214, 1152, 1102, 956, 863, 844, 819, 754, 700. α_{22}^D : - 16,8 (DMSO, $c = 1,0$). **Schmelzpunkt**: 207 - 210 °C (Zersetzung).

5.2.7 Cyclo[L-Phe-L-Glu] (4)

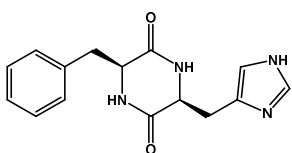


Cyclo[L-Phe-L-Glu(Obzl)] **4a** (1,40 g, 3,83 mmol) wurde in 50 mL Methanol suspendiert und Pd/C (10%, 150 mg) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1,5 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt, anschließend mit Celite® filtriert

und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-Glu] wurde als farbloser Feststoff erhalten (950 mg, 3,44 mmol, 91% Ausbeute).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.92 (s (br), 1H), 8.19 (s (br), 1H), 8.08 (s (br), 1H), 7.29 - 7.14 (m, 5H), 4.21 - 4.16 (m, 1H), 3.71 - 3.66 (m, 1H), 3.13 (dd, $J = 3.8$ Hz, 13.4 Hz, 1H), 2.85 (dd, $J = 4.9$ Hz, 13.4 Hz, 1H), 1.70 - 1.63 (m, 1H), 1.31 - 1.21 (m, 1H), 1.11 - 1.01 (m, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 173.8, 166.5, 166.2, 135.9, 130.2 (2x), 127.9 (2x), 126.7, 55.2, 52.9, 37.9, 28.5. **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$: 276,11101; gefunden $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 299,10038. **FTIR (cm^{-1})**: 3207, 3172, 3151, 3079, 3031, 2922, 2886, 1737, 1663, 1471, 1310, 1272, 1174, 1098, 854, 699, 638. **Elementaranalyse**: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ (276,29 g/mol) berechnet (%): C 60,86; H 5,84; N 10,14; gefunden (%): C 60,92; H 5,85; N 10,05. α_{22}^D : - 28,4 (DMSO, $c = 1,0$). **Schmelzpunkt**: 241 - 243 °C (Zersetzung). Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[323]

5.2.8 Cyclo[L-Phe-L-His] (5)



Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Phe-OH (23,7 g, 89,3 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-His(Boc)-OH (47,6 g, 134 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingedampft, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt, mit einem Überschuss Diethylether versetzt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert, anschließend aus Methanol umkristallisiert und unter vermindertem

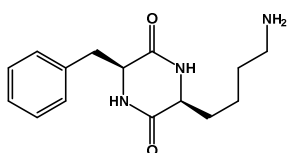
Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-His] wurde als farbloser Feststoff erhalten (6,48 g, 22,8 mmol, 51%).

Bemerkung zu den NMR-Spektren von DKP 5:

In ^{13}C -Spektren in DMSO-d_6 bei Raumtemperatur sind zwei Signale des Imidazolrings aufgrund einer starken Verbreiterung nicht sichtbar. Die Messung bei erhöhter Temperatur ($120\text{ }^\circ\text{C}$) macht die Signale im Spektrum sichtbar, alternativ kann das TFA-Salz in D_2O gemessen werden. Zudem können ^1H -Spektren in DMSO-d_6 je nach Reinigungs- und Trocknungsmethode zusätzliche Signale aufweisen, die vermutlich von relativ stabilen H_2O -Komplexen stammen. Eine Messung als TFA-Salz in D_2O oder ein kurzes Erhitzen bzw. eine kurze Ultraschallbehandlung der Lösung in DMSO-d_6 können das Problem beheben.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O , + 1,1 Äq. TFA) δ 8.52 (s, 1H), 7.46 - 7.33 (m, 3H), 7.19 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 6.95 (s, 1H), 4.54 - 4.44 (m, 1H), 4.26 - 4.12 (m, 1H), 3.17 (dd, $J = 14.0, 3.2$ Hz, 1H), 2.98 (dd, $J = 14.0, 4.4$ Hz, 1H), 2.53 (dd, $J = 15.3, 4.4$ Hz, 1H), 1.89 (dd, $J = 15.3, 7.6$ Hz, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, D_2O , + 1,1 Äq. TFA) δ 172.0, 170.7, 137.7, 136.7, 133.5 (2x), 131.9 (2x), 130.7, 130.1, 120.7, 58.6, 56.2, 41.2, 31.2. $^1\text{H NMR}$ (400 Hz, DMSO-d_6) δ 11.80 (s (br), 1H), 8.08 (s (br), 1H), 7.77 (s (br), 1H), 7.52 (s, 1H), 7.33 - 7.13 (m, 5H), 6.60 (s, 1H), 4.16 - 4.11 (m, 1H), 3.87 - 3.81 (m, 1H), 2.86 (dd, $J = 4.7$ Hz, 13.6 Hz, 1H), 2.81 (dd, $J = 4.9$ Hz, 13.6 Hz, 1H), 2.56 (dd, $J = 3.4$ Hz, 14.4 Hz, 1H), 1.59 (dd, $J = 9.1$ Hz, 14.4 Hz, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO-d_6 , $120\text{ }^\circ\text{C}$): δ 166.3, 165.8, 136.0, 134.1, 133.2, 129.2 (2x), 127.3 (2x), 125.7, 116.0, 54.8, 54.0, 38.1, 30.3. **MS (FAB)** m/z berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$: 284,1; gefunden $[\text{M}]^+$: 285,2. **FTIR (cm^{-1})**: 3185, 3056, 2968, 2884, 2621, 1664, 1454, 1335, 1096, 821, 746, 697, 658, 627. **Elementaranalyse**: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$ (284,32 g/mol) berechnet (%): C 63,37; H 5,67; N 19,71; gefunden (%): C 62,77; H 5,31; N 19,69. α_{22}^D : - 67,4 (AcOH, $c = 2,0$) {- 72,0 (AcOH, $c = 2,0$)}.^[287] **Schmelzpunkt**: $248 - 250\text{ }^\circ\text{C}$ (Zersetzung) { $251 - 253\text{ }^\circ\text{C}$ }.^[233] Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[233]

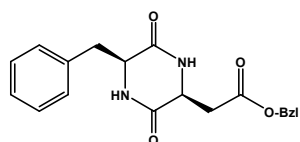
5.2.9 Cyclo[L-Phe-L-Lys] (6)



Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Phe-OH (6,40 g, 24,1 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Lys(Boc)-OH (12,5 g, 36,2 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Der resultierende Feststoff wurde in Ethanol digeriert, abfiltriert und anschließend in Wasser gelöst und dreimal mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit stark basischem Ionentauscher behandelt (Ambersep® 900(OH)) und anschließend lyophilisiert. Cyclo[L-Phe-L-Lys] wurde als farbloser Feststoff erhalten (2,03 g, 6,51 mmol, 54% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.12 (s (br), 1H), 8.03 (s (br), 1H), 7.28 - 7.13 (m, 5H), 4.20 - 4.16 (m, 1H), 3.56 - 3.53 (m, 1H), 3.14 (dd, *J* = 3.7 Hz, 13.4 Hz, 1H), 2.96 (s (br), 2H), 2.83 (dd, *J* = 4.9 Hz, 13.4 Hz, 1H), 2.32 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.09 - 0.99 (m, 3H), 0.79 - 0.68 (m, 2H), 0.67 - 0.59 (m, 1H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ 166.9, 166.0, 136.0, 130.3 (2x), 127.8 (2x), 126.6, 55.2, 53.8, 41.3, 39.4, 33.1, 32.9, 20.9. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₁₅H₂₁N₃O₂: 275,16338; gefunden [M+H]⁺: 276,17054. **FTIR (cm⁻¹)**: 3186, 3047, 2927, 2896, 2864, 1660, 1454, 1339, 1101, 842, 754, 697. **Elementaranalyse**: C₁₅H₂₁N₃O₂ (275,35 g/mol) berechnet (%): C 65,43; H 7,69; N 15,26; gefunden (%): C 65,12; H 7,45; N 15,19. α_{22}^D : - 24,2 (DMSO, *c* = 1,0). **Schmelzpunkt**: 199 - 201 °C.

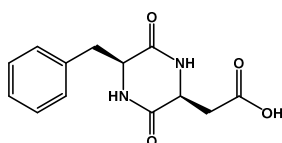
5.2.10 Cyclo[L-Phe-L-Asp(OBzl)] (7a)



Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Asp(OBzl)-OH (8,18 g, 25,3 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Phe-OH (10,1 g, 38,0 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt. Der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-Asp(OBzl)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (2,21 g, 6,27 mmol, 50% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.23 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.42 - 7.14 (m, 10H), 5.02 (s, 2H), 4.25 - 4.20 (m, 1H), 4.09 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.10 (dd, *J* = 13.6, 4.1 Hz, 1H), 2.91 (dd, *J* = 13.6, 4.9 Hz, 1H), 2.02 (dd, *J* = 15.9, 6.0 Hz, 1H), 1.66 (dd, *J* = 15.9, 6.9 Hz, 1H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ 169.5, 166.5, 166.3, 136.2, 136.0, 130.2 (2x), 128.4 (2x), 128.1 (2x), 127.9, 127.8 (2x), 126.7, 65.6, 55.2, 51.1, 38.1, 38.0. **MS (FAB)** *m/z* berechnet für C₂₀H₂₀N₂O₄: 352,1; gefunden [M+H]⁺: 353.0. **FTIR (cm⁻¹)**: 3333, 3181, 3053, 2971, 2889, 1739, 1680, 1664, 1572, 1526, 1498, 1456, 1383, 1357, 1336, 1229, 1266, 1209, 1161, 1102, 1076, 994, 856, 732, 697. α_{22}^D : - 11,4 (DMSO, *c* = 1,0). **Schmelzpunkt**: 212 - 214 °C (Zersetzung).

5.2.11 Cyclo[L-Phe-L-Asp] (7)

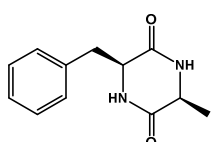


Cyclo[L-Phe-L-Asp(OBzl)] **7a** (1,60 g, 4,54 mmol) und Pd/C (10%, 200 mg) wurden in 100 mL Methanol suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde für 2,5 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt, anschließend mit Methanol verdünnt und unter Argonatmosphäre leicht erwärmt bis sich das Produkt vollständig gelöst hat. Die Suspension wurde mit Celite® filtriert und das

Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-Glu] wurde als farbloser Feststoff erhalten (1,12 g, 4,28 mmol, 94% Ausbeute).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.93 (s (br), 1H), 8.15 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.33 - 7.14 (m, 5H), 4.23 - 4.18 (m, 1H), 4.03 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.10 (dd, $J = 13.6, 4.4$ Hz, 1H), 2.92 (dd, $J = 13.7, 4.9$ Hz, 1H), 2.02 (dd, $J = 16.4, 5.4$ Hz, 1H), 1.54 (dd, $J = 16.5, 7.0$ Hz, 1H). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR** (101 MHz, DMSO- d_6) δ 171.5, 166.7, 166.5, 136.3, 130.1 (2x), 128.1 (2x), 126.7, 55.2, 51.0, 38.0, 37.9. **MS (FAB)** m/z berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$: 262,1; gefunden $[\text{M}-\text{H}]^-$: 260,7. **FTIR (cm^{-1})**: 3187, 3058, 2971, 2929, 2886, 1717, 1666, 1571, 1526, 1496, 1455, 1421, 1336, 1291, 1265, 1205, 1188, 1162, 1101, 1009, 993, 936, 899, 846, 781, 759, 731, 701, 630. α_{22}^D : -33,3 (DMSO, $c = 1,0$). **Schmelzpunkt**: 242 - 246 °C (Zersetzung). Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[45]

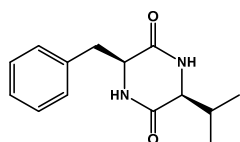
5.2.12 Cyclo[L-Phe-L-Ala] (8)



Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Phe-OH (10,5 g, 39,7 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Ala-OH (11,3 g, 59,5 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Der Feststoff wurde mit Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-Ala] wurde als farbloser Feststoff erhalten (1,84 g, 8,43 mmol, 49% Ausbeute).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.10 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.32 - 7.12 (m, 6H), 4.17 (s, 1H), 3.62 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.12 (dd, $J = 13.4, 3.5$ Hz, 1H), 2.85 (dd, $J = 13.4, 4.8$ Hz, 1H), 0.47 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR** (101 MHz, DMSO- d_6) δ 167.7, 165.8, 136.0, 130.4 (2x), 128.0 (2x), 126.6, 55.3, 49.7, 38.3, 19.7. **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$: 218,10553; gefunden $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 241,09459. **FTIR (cm^{-1})**: 3184, 3034, 2985, 2926, 2898, 1664, 1483, 1466, 1338, 1243, 1211, 1191, 1160, 1105, 1054, 969, 923, 860, 776, 752, 697. α_{22}^D : +7,9 (DMSO, $c = 1,0$). **Schmelzpunkt**: 270 - 274 °C (Zersetzung).

5.2.13 Cyclo[L-Phe-L-Val] (9)

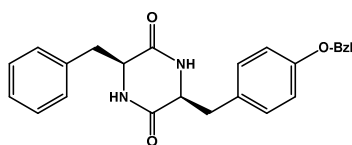


Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Phe-OH (13,8 g, 51,9 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Tyr(Bzl)-OH (28,9 g, 77,9 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v))

wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Der Feststoff wurde mit Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-Val] wurde als farbloser Feststoff erhalten (1,59 g, 6,43 mmol, 32% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.09 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.29 - 7.12 (m, 6H), 4.21 (s, 1H), 3.53 (s, 1H), 3.15 (dd, *J* = 13.4, 4.0 Hz, 1H), 2.87 (dd, *J* = 13.4, 4.8 Hz, 1H), 1.75 - 1.64 (m, 1H), 0.65 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.26 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.5, 166.4, 136.3, 130.3 (2x), 127.9 (2x), 126.5, 59.2, 55.0, 37.8, 31.0, 18.2, 16.2. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₁₄H₁₈N₂O₂: 246,13683; gefunden [M+Na]⁺: 269,12616. **FTIR (cm⁻¹)**: 3194, 3082, 3051, 2967, 2923, 2885, 1661, 1453, 1344, 1252, 1107, 1087, 1014, 922, 893, 849, 832, 800, 759, 699. **α₂₂^D**: -63,0 (DMSO, *c* = 1,0). **Schmelzpunkt**: 266 - 268 °C (Zersetzung).

5.2.14 Cyclo[L-Phe-L-Tyr(Bzl)] (10a)

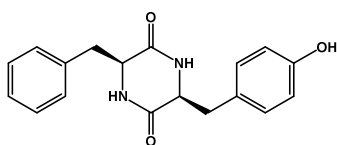


Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Phe-OH (10,5 g, 39,7 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Tyr(Bzl)-OH (12,9 g, 59,5 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem

Druck eingeeengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das Rohprodukt wurde in Methanol digeriert, mit Methanol gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-Tyr(Bzl)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (5,03 g, 12,6 mmol, 63% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.91 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.41 - 7.17 (m, 8H), 7.04 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.99 - 6.88 (m, 4H), 5.05 (s, 2H), 3.97 (s, 1H), 3.91 (s, 1H), 2.57 (dd, *J* = 14.1, 5.1 Hz, 2H), 2.27 (dd, *J* = 13.6, 6.1 Hz, 1H), 2.18 (dd, *J* = 13.6, 6.1 Hz, 1H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.2, 166.2, 157.1, 137.2, 136.6, 130.8 (2x), 129.8 (2x), 128.6, 128.4 (2x), 128.2 (2x), 127.7, 127.4 (2x), 126.4, 114.6 (2x), 69.1, 55.6, 55.4, 38.5. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₂₅H₂₄N₂O₃: 400,17869; gefunden [M+Na]⁺: 423,16790. **FTIR (cm⁻¹)**: 3187, 3086, 3057, 3028, 2928, 2880, 1675, 1658, 1611, 1582, 1509, 1460, 1338, 1307, 1269, 1225, 1177, 1108, 1091, 1039, 1023, 929, 804, 747, 731, 696, 654. **α₂₂^D**: +94,9 (DMSO, *c* = 1,0). **Schmelzpunkt**: 273 - 276 °C.

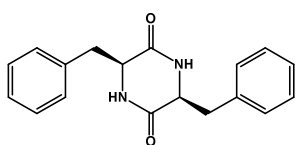
5.2.15 Cyclo[L-Phe-L-Tyr] (10)



Zu einer Lösung aus Cyclo[L-Phe-L-Tyr(Bzl)] **10a** (2,54 g, 6,35 mmol) in 500 mL THF/MeOH (1 : 1 (v/v)) wurde Pd/C (10%, 350 mg) zugegeben. Die Suspension wurde über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt und anschließend mit Celite® filtriert. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Der resultierende Feststoff wurde in Methanol digeriert, anschließend aus THF/Wasser umkristallisiert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-Tyr] wurde als farbloser Feststoff erhalten (1,90 g, 6,12 mmol, 96% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.22 (s, 1H), 7.89 - 7.82 (m, 2H), 7.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.20 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 3.97 - 3.92 (m, 1H), 3.92 - 3.83 (m, 1H), 2.60 - 2.52 (m, 2H), 2.23 - 2.13 (m, 2H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.3, 166.2, 156.1, 136.7, 130.8 (2x), 129.7 (2x), 128.2 (2x), 126.4 (2x), 115.0 (2x), 55.7, 55.4, 38.5. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₁₈H₁₈N₂O₃: 310,13174; gefunden [M+Na]⁺: 333,12096. **FTIR (cm⁻¹)**: 3537, 3207, 3082, 3031, 2936, 2869, 1654, 1615, 1589, 1516, 1496, 1463, 1332, 1274, 1249, 1224, 1200, 1173, 1101, 1081, 919, 878, 808, 751, 697, 657. **α₂₂^D**: -121,7 (DMSO, *c* = 1,0). **Schmelzpunkt**: 295 - 300 °C (Zersetzung).

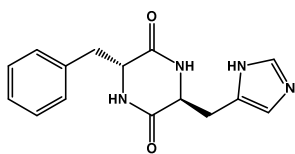
5.2.16 Cyclo[L-Phe-L-Phe] (11)



Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Phe-OH (8,52 g, 32,1 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Phe-OH (12,8 g, 48,2 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt. Der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-L-Phe] wurde als farbloser Feststoff erhalten (1,11 g, 3,76 mmol, 23% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.92 (s, 2H), 7.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 7.21 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.03 (d, *J* = 7.1 Hz, 4H), 4.01 - 3.93 (m, 2H), 2.57 (dd, *J* = 13.6, 4.8 Hz, 2H), 2.23 (dd, *J* = 13.6, 6.2 Hz, 2H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.2 (2x), 136.6 (2x), 129.8 (4x), 128.2 (4x), 126.5 (2x), 55.4 (2x). **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₁₈H₁₈N₂O₂: 294,13683; gefunden [M+Na]⁺: 317,12601. **FTIR (cm⁻¹)**: 3199, 3087, 3057, 2965, 2928, 2875, 1658, 1497, 1458, 1337, 1307, 1267, 1212, 1194, 1091, 1014, 921, 801, 755, 698, 658. **α₂₂^D**: -27,0 (DMSO, *c* = 0,25). **Schmelzpunkt**: 302 - 307 °C (Zersetzung).

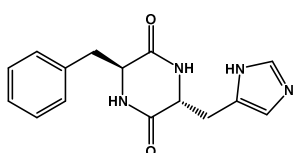
5.2.17 Cyclo[D-Phe-L-His] (12)



Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-D-Phe-OH (10,6 g, 40,0 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-His(Boc)-OH (21,3 g, 60,1 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt, mit einem Überschuss Diethylether versetzt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert und anschließend in Methanol digeriert. Das Produkt wurde abfiltriert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[D-Phe-L-His] wurde als farbloser Feststoff erhalten (2,73 g, 9,61 mmol, 48%).

¹H NMR (400 MHz, D₂O + 1,1 Äq. TFA) δ 8.58 (s, 1H), 7.47 - 7.33 (m, 3H), 7.26 - 7.13 (m, 3H), 4.31 - 4.24 (m, 1H), 3.30 - 2.80 (m, 5H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, D₂O + 1,1 Äq. TFA) δ 173.0, 171.5, 137.1, 136.4, 133.3 (2x), 131.8 (2x), 130.7, 130.1, 120.4, 58.7, 55.4, 42.3, 30.1. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₁₅H₁₆N₄O₂: 284,12733; gefunden [M+H]⁺: 285,13497. **FTIR (cm⁻¹)**: 3194, 3082, 3058, 2987, 2921, 2889, 2783, 2729, 2625, 1661, 1456, 1335, 1270, 1236, 1184, 1092, 1023, 1000, 980, 938. **α₂₂^D**: - 18,1 (DMSO, *c* = 1,0). **Schmelzpunkt**: 252 - 254 °C (Zersetzung).

5.2.18 Cyclo[L-Phe-D-His] (13)



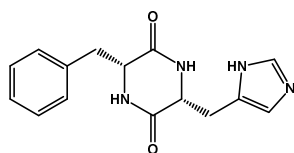
Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Phe-OH (12,8 g, 48,4 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-D-His(Boc)-OH (25,8 g, 72,5 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt, mit einem Überschuss Diethylether versetzt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert und anschließend in Methanol digeriert. Das Produkt wurde abfiltriert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Phe-D-His] wurde als farbloser Feststoff erhalten (2,97 g, 10,5 mmol, 43%).

¹H NMR (400 MHz, D₂O + 1,1 Äq. TFA) δ 8.58 (s, 1H), 7.42 - 7.35 (m, 3H), 7.23 - 7.15 (m, 3H), 4.28 (t, *J* = 3.8 Hz, 1H), 3.28 - 2.87 (m, 5H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, D₂O + 1,1 Äq. TFA) δ 173.0, 171.5, 137.1, 136.4, 133.3 (2x), 131.8 (2x), 130.7, 130.1, 120.3, 58.7, 55.4, 42.3, 30.1. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₁₅H₁₆N₄O₂: 284,12733; gefunden [M+H]⁺: 285,13417. **FTIR (cm⁻¹)**: 3196, 3082, 3057, 2990, 2922, 2890, 2629, 1662, 1457, 1335, 1270, 1237, 1185,

1092, 1024, 1001, 981, 937, 892, 823, 768, 733, 699, 647, 625. α_{22}^D : + 17,7 (DMSO, $c = 1,0$).

Schmelzpunkt: 252 - 255 °C (Zersetzung).

5.2.19 Cyclo[D-Phe-D-His] (14)

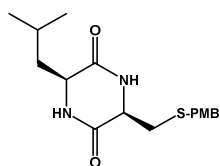


Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-D-Phe-OH (10,5 g, 39,7 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-D-His(Boc)-OH (21,2 g, 59,6 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis die

organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt, mit einem Überschuss Diethylether versetzt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert und anschließend in Methanol digeriert. Das Produkt wurde abfiltriert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[D-Phe-D-His] wurde als farbloser Feststoff erhalten (2,23 g, 7,82 mmol, 39%).

¹H NMR (400 MHz, D₂O + 1,1 Äq. TFA) δ 8.52 (s, 1H), 7.47 - 7.30 (m, 3H), 7.25 - 7.12 (m, 2H), 6.95 (s, 1H), 4.54 - 4.45 (m, 1H), 4.24 - 4.14 (m, 1H), 3.16 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 2.99 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 2.54 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H), 1.90 (dd, $J = 14.4, 7.1$ Hz, 1H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, D₂O + 1,1 Äq. TFA) δ 172.0, 170.8, 137.7, 136.7, 133.5 (2x), 131.9 (2x), 130.7, 130.1, 120.7, 58.6, 56.2, 41.2, 31.2. **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₁₅H₁₆N₄O₂: 284,12733; gefunden [M+H]⁺: 285,13441. **FTIR (cm⁻¹):** 3184, 3088, 3059, 2969, 2878, 2665, 1461, 1335, 1260, 1186, 1097, 1014, 979, 939, 901, 873, 820, 781, 759, 747, 699, 658, 627. α_{22}^D : + 108,2 (DMSO, $c = 1,0$). **Schmelzpunkt:** 257 - 259 °C (Zersetzung) {265 - 266 °C}.^[324] Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[324]

5.2.20 Cyclo[L-Leu-L-Cys(PMB)] (15a)

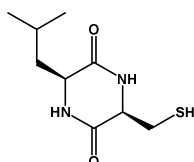


Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Leu-OH*H₂O (12,5 g, 50,0 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Cys(PMB)-OH (25,6 g, 75,0 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis sich ein Niederschlag

gebildet hat. Anschließend wurde ein Überschuss *n*-Hexan zugegeben und die Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Leu-L-Cys(PMB)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (2,27 g, 6,76 mmol, 27% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.39 - 8.30 (m, 1H), 8.14 - 8.06 (m, 1H), 7.27 - 7.18 (m, 2H), 6.91 - 6.82 (m, 2H), 4.17 - 4.09 (m, 1H), 3.83 - 3.76 (m, 1H), 3.75 - 3.68 (m, 5H), 2.86 (dd, *J* = 13.9, 4.6 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 14.0, 4.1 Hz, 1H), 1.94 - 1.83 (m, 1H), 1.72 - 1.58 (m, 2H), 0.90 - 0.84 (m, 6H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 166.1, 158.2, 130.1, 130.0 (2x), 113.8 (2x), 55.0, 54.6, 52.6, 44.1, 35.5, 34.6, 23.4, 23.1, 21.8. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₁₇H₂₄N₂O₃S: 336,15076; gefunden [M+Na]⁺: 359,14022. **FTIR (cm⁻¹):** 3183, 3046, 2956, 2895, 1663, 1610, 1511, 1459, 1329, 1300, 1244, 1175, 1097, 1033, 827, 763, 690. **α₂₂^D:** - 26,9 (DMSO, *c* = 1,0). **Schmelzpunkt:** 177 - 180 °C (Zersetzung). Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[325]

5.2.21 Cyclo[L-Leu-L-Cys] (15)



Cyclo[L-Leu-L-Cys(PMB)] **15a** (900 mg, 2,67 mmol) wurde nach allgemeiner PMB-Entschützungs-methode entschützt. Cyclo[L-Leu-L-Cys] wurde als farbloser Feststoff erhalten (412 mg, 1,89 mmol, 71% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.25 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 4.20 - 4.11 (m, 1H), 3.86 - 3.76 (m, 1H), 2.95 - 2.86 (m, 1H), 2.78 - 2.69 (m, 1H), 2.24 - 2.16 (m, 1H), 1.94 - 1.81 (m, 1H), 1.72 - 1.63 (m, 1H), 1.61 - 1.52 (m, 1H), 0.91 - 0.82 (m, 6H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.4, 166.0, 55.5, 52.4, 43.0, 26.9, 23.4, 23.0, 21.9. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₉H₁₆N₂O₂S: 216,09325; gefunden [M+Na]⁺: 239,08257. **FTIR (cm⁻¹):** 3480, 3431, 3185, 3046, 2956, 2873, 1662, 1460, 1386, 1365, 1325, 1118, 1095, 972, 847, 811, 682. **α₂₂^D:** - 66.4 (DMSO, *c* = 1,0). **Schmelzpunkt:** 221 - 224 °C (Zersetzung). Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[325]

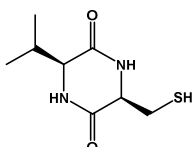
5.2.22 Cyclo[L-Val-L-Cys(PMB)] (16a)

Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Cys(PMB)-OH (16,6 g, 48,5 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Val-OH (15,8 g, 72,7 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Phase wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das Rohprodukt wurde mit Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Val-L-Cys(PMB)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (3,36 g, 10,4 mmol, 43% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.18 - 8.11 (m, 1H), 8.11 - 8.06 (m, 1H), 7.27 - 7.20 (m, 2H), 6.90 - 6.81 (m, 2H), 4.19 - 4.13 (m, 1H), 3.76 - 3.65 (m, 6H), 2.84 (dd, *J* = 13.8, 4.9 Hz, 1H), 2.75 (dd, *J* = 13.8, 4.1 Hz, 1H), 2.26 - 2.15 (m, 1H), 0.98 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.89 (d,

$J = 6.8$ Hz, 3H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166.8, 166.5, 158.2, 130.3, 130.0 (2x), 113.8 (2x), 59.4, 55.0, 54.2, 35.5, 34.4, 31.2, 18.6, 17.3. **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 322,13511; gefunden $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 345,12463. **FTIR (cm^{-1})**: 3189, 3090, 3056, 2970, 1656, 1609, 1583, 1511, 1445, 1303, 1242, 1176, 1108, 1032, 832, 788, 677. α_{22}^D : -20,8 (DMSO, $c = 0,67$). **Schmelzpunkt**: 219 - 222 °C (Zersetzung).

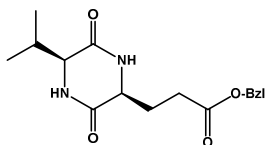
5.2.23 Cyclo[L-Val-L-Cys] (16)



Cyclo[L-Val-L-Cys(PMB)] **16a** (1,00 g, 3,10 mmol) wurde nach allgemeiner PMB-Entschützungsverfahren entschützt. Cyclo[L-Val-L-Cys] wurde als farbloser Feststoff erhalten (430 mg, 2,13 mmol, 69%).

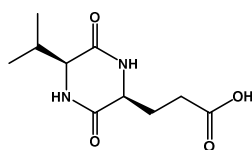
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.07 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 4.20 - 4.15 (m, 1H), 3.78 - 3.74 (m, 1H), 2.96 - 2.86 (m, 1H), 2.80 - 2.72 (m, 1H), 2.28 - 2.19 (m, 1H), 2.18 - 2.11 (m, 1H), 0.97 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.87 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 167.3, 166.4, 59.2, 55.3, 30.7, 26.7, 18.5, 17.2. **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: 202,07760; gefunden $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 225,06702. **FTIR (cm^{-1})**: 3183, 3050, 2957, 2873, 2564, 1657, 1447, 1340, 1242, 1197, 1176, 1161, 1123, 1107, 973, 837, 800, 759, 737, 652. α_{22}^D : -89,9 (DMSO, $c = 1,0$). **Schmelzpunkt**: 251 - 253 °C (Zersetzung).

5.2.24 Cyclo[L-Val-L-Glu(OBzl)] (17a)



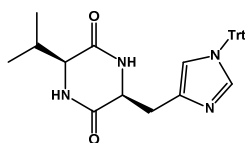
Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Glu(OBzl)-OH (8,23 g, 24,4 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Val-OH (7,95 g, 36,6 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Phase wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das Rohprodukt wurde mit Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Val-L-Glu(OBzl)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (1,90 g, 5,97 mmol, 49% Ausbeute).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.17 (s, 2H), 8.08 (s, 2H), 7.44 - 7.28 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 3.89 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 3.70 - 3.64 (m, 1H), 2.48 - 2.44 (m, 1H), 2.21 - 2.09 (m, 1H), 2.08 - 1.98 (m, 1H), 1.94 - 1.84 (m, 1H), 0.94 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.8$ Hz). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172.2, 167.6, 167.1, 136.2, 128.4 (2x), 128.0, 127.9 (2x), 65.5, 59.3, 53.0, 31.0, 29.5, 28.9, 18.5, 17.0. **MS (FAB)** m/z berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$: 318,2; gefunden $[\text{M}+\text{H}]^+$: 319,1.

5.2.25 Cyclo[L-Val-L-Glu] (17)

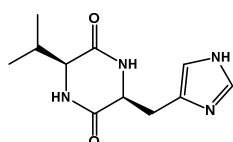
Cyclo[L-Val-L-Glu(OBzl)] **17a** (270 mg, 850 μmol) wurde in 5 mL Methanol suspendiert und Pd/C (10%, 30 mg) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für zwei Stunden unter Wasserstoffatmosphäre gerührt, anschließend mit Celite® filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Cyclo[L-Val-L-Glu] wurde als farbloser Feststoff erhalten (175 mg, 770 μmol , 91% Ausbeute).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.16 (s (br), 1H), 8.15 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 3.86 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 3.69 - 3.65 (m, 1H), 2.40 - 2.24 (m, 2H), 2.20 - 2.09 (m, 1H), 2.01 - 1.91 (m, 1H), 1.89 - 1.78 (m, 1H), 0.95 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 0.84 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR** (101 MHz, DMSO- d_6) δ 174.0, 167.7, 167.1, 59.3, 53.1, 31.1, 29.6, 29.0, 18.6, 17.1. **MS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$: 228,1; gefunden $[\text{M}-\text{H}]^-$: 227,1.

5.2.26 Cyclo[L-Val-L-His(Trt)] (18a)

Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-His(Trt)-OH (11,8 g, 23,7 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Val-OH (7,72 g, 35,6 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Phase wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das Rohprodukt wurde mit Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Val-L-His(Trt)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (2,59 g, 5,42 mmol, 46% Ausbeute).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.99 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.43 - 7.34 (m, 9H), 7.26 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.11 - 7.07 (m, 6H), 6.74 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 4.11 - 4.06 (m, 1H), 3.67 (dt, $J = 3.4, 1.7$ Hz, 1H), 2.97 (dd, $J = 14.6, 4.2$ Hz, 1H), 2.76 (dd, $J = 14.6, 7.5$ Hz, 1H), 2.07 (d, $J = 7.0, 3.4$ Hz, 1H), 0.89 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.71 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR** (101 MHz, DMSO- d_6) δ 167.4, 166.7, 142.3 (3x), 137.7, 136.4, 129.2 (6x), 128.2 (6x), 128.0 (3x), 119.4, 74.5, 59.2, 54.3, 31.6, 30.9, 18.5, 17.0. **MS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2$: 478,2; gefunden $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 501,2.

5.2.27 Cyclo[L-Val-L-His] (18)

Cyclo[L-Val-L-His(Trt)] **18a** (500 mg, 1,04 mmol) wurde in 5 mL TFA/ H_2O (95 : 5 (v/v)) gelöst für eine Stunde gerührt. Das Produkt wurde mit einem Überschuss Et_2O gefällt, die Suspension zentrifugiert und das

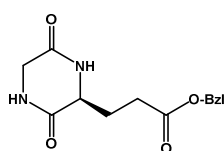
Lösungsmittel abdekantiert. Der Niederschlag wurde zweimal in Et₂O suspendiert, zentrifugiert und das Lösungsmittel abdekantiert. Das erhaltene TFA-Salz wurde in Wasser gelöst, mit schwach basischem Ionentauscher (Bayer Lewatit, OH-Form) neutralisiert und anschließend lyophilisiert. Cyclo[L-Val-L-His] wurde als farbloser Feststoff erhalten (228 mg, 965 µmol, 93% Ausbeute).

Bemerkung zu den NMR-Spektren von DKP 18:

In ¹³C-Spektren in DMSO-d₆ bei Raumtemperatur sind zwei Signale des Imidazolrings aufgrund einer starken Verbreiterung nicht sichtbar. Dieses Phänomen ist bereits von DKP 5 und anderen His-beihaltenden DKPs bekannt und kann durch Messungen bei erhöhter Temperatur oder des TFA-Salzes in D₂O behoben werden. Dies wurde hier nicht durchgeführt.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.83 (s (br), 1H), 8.01 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.09 - 4.03 (m, 1H), 3.68 - 3.64 (m, 1H), 3.03 (dd, *J* = 14.7, 3.9 Hz, 1H), 2.79 (dd, *J* = 14.7, 7.9 Hz, 1H), 2.08 - 1.98 (m, 1H), 0.87 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.68 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ 167.5, 166.7, 134.8, 59.2, 54.4, 30.9, 30.6 (*br*), 18.4, 16.6. **MS (FAB)** *m/z* berechnet für C₁₁H₁₆N₄O₂: 236,1; gefunden [M+H]⁺: 237,1.

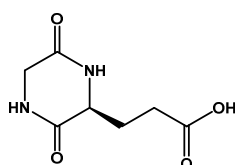
5.2.28 Cyclo[Gly-L-Glu(OBzl)] (19a)



Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Glu(OBzl)-OH (5,40 g, 16,0 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Gly-OH (4,20 g, 24,0 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Phase wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das Rohprodukt wurde mit Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[Gly-L-Glu(OBzl)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (810 mg, 2,93 mmol, 37% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.22 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.41 - 7.29 (m, 5H), 5.08 (s, 2H), 3.86 - 3.81 (m, 1H), 3.80 - 3.64 (m, 2H), 2.48 - 2.39 (m, 2H), 2.03 - 1.90 (m, 2H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ 172.2, 167.5, 166.2, 136.2, 128.4 (2x), 128.0 (3x), 65.5, 53.2, 44.3, 29.2, 27.9. **MS (FAB)** *m/z* berechnet für C₁₄H₁₆N₂O₄: 276,1; gefunden [M+H]⁺: 277,1.

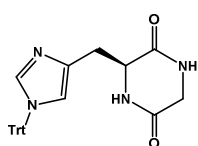
5.2.29 Cyclo[Gly-L-Glu] (19)



Cyclo[Gly-L-Glu(OBzl)] **19a** (590 mg, 2,14 mmol) wurde in 15 mL Methanol gelöst und Pd/C (10%, 50 mg) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt, anschließend mit Celite® filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Cyclo[Gly-L-Glu] wurde als farbloser Feststoff erhalten (362 mg, 1,94 mmol, 91% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.14 (s (br), 1H), 8.20 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 3.82 - 3.79 (m, 1H), 3.78 - 3.73 (m, 1H), 3.71 - 3.63 (m, 1H), 2.37 - 2.21 (m, 2H), 1.97 - 1.81 (m, 2H). **¹³C{¹H}** **NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.9, 167.7, 166.3, 53.4, 44.3, 29.3, 28.1. **MS (EI)** *m/z* berechnet für C₇H₁₀N₂O₄: 186,1; gefunden [M-H₂O]⁺: 168,1.

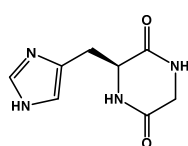
5.2.30 Cyclo[Gly-L-His(Trt)] (20a)



Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-His(Trt)-OH (5,03 g, 10,1 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Gly-OH (2,66 g, 15,2 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Phase wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt und der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das Rohprodukt wurde mit Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[Gly-L-His(Trt)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (971 mg, 2,22 mmol, 44% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.03 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.45 - 7.05 (m, 16H), 6.65 (s, 1H), 4.00 - 3.94 (m, 1H), 3.52 (d, *J* = 17.2, 1H), 3.24 (d, *J* = 17.2, 1H), 2.96 - 2.77 (m, 2H). **¹³C{¹H}** **NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.4, 165.6, 142.3 (3x), 137.9, 135.7, 129.2 (6x), 128.2 (6x), 128.0 (3x), 119.7, 74.5, 54.6, 44.1, 31.8. **MS (FAB)** *m/z* berechnet für C₂₇H₂₄N₄O₂: 436,2; gefunden [M+H]⁺: 437,2.

5.2.31 Cyclo[Gly-L-His] (20)



Cyclo[Gly-L-His(Trt)] **20a** (630 mg, 1,44 mmol) wurde in 8 mL TFA/H₂O (95 : 5 (v/v)) gelöst für eine Stunde gerührt. Das Produkt wurde mit einem Überschuss Et₂O gefällt und zentrifugiert, das Lösungsmittel wurde abdekantiert. Der Niederschlag wurde zweimal in Et₂O suspendiert, zentrifugiert und das Lösungsmittel abdekantiert. Das erhaltene TFA-Salz wurde in Wasser

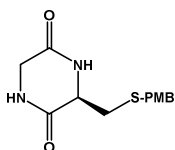
gelöst, mit schwach basischem Ionentauscher (Bayer Lewatit, OH-Form) neutralisiert und anschließend lyophilisiert. Cyclo[L-Val-L-His] wurde als farbloser Feststoff erhalten (277 mg, 1,43 mmol, 99% Ausbeute).

Bemerkung zu den NMR-Spektren von DKP 20:

In ^{13}C -Spektren in DMSO- d_6 bei Raumtemperatur sind zwei Signale des Imidazolrings aufgrund einer starken Verbreiterung nicht sichtbar. Dieses Phänomen ist bereits von DKP 5 und anderen His-beihaltenden DKPs bekannt und kann durch Messungen bei erhöhter Temperatur oder des TFA-Salzes in D_2O behoben werden. Dies wurde hier nicht durchgeführt.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.87 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 4.00 - 3.94 (m, 1H), 3.54 (dd, $J = 17.2, 2.1$ Hz, 1H), 3.32 - 3.26 (m, 1H), 2.96 - 2.84 (m, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 167.6, 165.9, 135.0, 54.6, 44.1, 30.6 (*br*). **MS (FAB)** m/z berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$: 194,1; gefunden $[\text{M}+\text{H}]^+$: 195,2. Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[326]

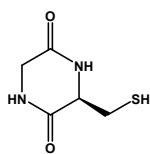
5.2.32 Cyclo[Gly-L-Cys(PMB)] (21a)



Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Gly-OH (6,21 g, 35,4 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Cys(PMB)-OH (18,2 g, 53,2 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis sich ein Niederschlag gebildet hat. Anschließend wurde ein Überschuss Diethylether zugegeben und die Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt. Der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[Gly-L-Cys(PMB)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (1,43 g, 5,10 mmol, 29% Ausbeute).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.18 (m, 2H), 7.23 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 4.12 - 4.04 (m, 1H), 3.90 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H), 3.78 - 3.67 (m, 6H), 2.92 (dd, $J = 14.0, 4.2$ Hz, 1H), 2.71 (dd, $J = 14.0, 4.0$ Hz, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166.6, 165.7, 158.2, 130.1 (3x), 113.8 (2x), 55.1, 54.6, 44.5, 35.5, 35.3. **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 280,08816; gefunden $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 303,07774. **FTIR (cm $^{-1}$)**: 3191, 3078, 2975, 2916, 2878, 1685, 1607, 1512, 1463, 1341, 1303, 1242, 1174, 1084, 1026, 958, 855, 806, 733, 673, 637. α_{22}^D : + 23,4 (DMSO, $c = 1,0$). **Schmelzpunkt**: 218 - 220 °C (Zersetzung).

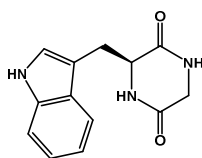
5.2.33 Cyclo[Gly-L-Cys] (21)



Cyclo[Gly-L-Cys(PMB)] **21a** (1,00 g, 3,57 mmol) wurde nach allgemeiner PMB-Entschützungs-methode entschützt. Cyclo[Gly-L-Cys] wurde als farbloser Feststoff erhalten (511 mg, 2,92 mmol, 82% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.13 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 4.14 - 4.08 (m, 1H), 3.85 - 3.69 (m, 2H), 3.00 - 2.90 (m, 1H), 2.79 - 2.69 (m, 1H), 2.24 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.1, 165.9, 55.4, 44.4, 27.7. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₅H₈N₂O₂S: 160,03065; gefunden [M+Na]⁺: 183,01996. **FTIR (cm⁻¹)**: 3209, 3111, 2969, 2854, 1679, 1646, 1447, 1316, 1301, 1253, 1217, 1135, 1093, 993, 972, 900, 861, 775, 676, 660. **α₂₂^D**: + 1,2 (DMSO, *c* = 1,0). **Schmelzpunkt**: 210 - 213 °C (Zersetzung).

5.2.34 Cyclo[Gly-L-Trp] (22)

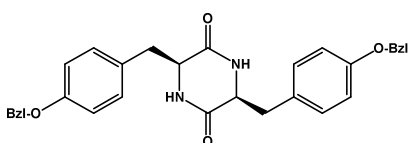


Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Gly-OH (3,0 g, 17,3 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Trp-OH (7,10 g, 21,5 mmol, 2,5 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck vollständig eingeeengt. Das Rohprodukt wurde aus

Wasser umkristallisiert und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH = 95 : 5 (v/v) + 1% NEt₃ → 90 : 10 (v/v) + 1% NEt₃) und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[Gly-L-Trp] wurde als farbloser Feststoff erhalten (630 mg, 2,60 mmol, 30% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.92 (s (br), 1H), 8.09 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7.08 - 7.02 (m, 2H), 6.97 - 6.92 (m, 1H), 4.01 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 3.30 (dd, *J* = 10.0, 3.3 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J* = 14.4, 4.8 Hz, 1H), 3.01 (dd, *J* = 14.4, 4.8 Hz, 1H), 2.79 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 165.6, 135.8, 127.4, 124.4, 120.8, 118.6, 118.3, 111.1, 108.3, 55.4, 43.8, 29.1. **MS (ESI)** *m/z* berechnet für C₁₃H₁₃N₃O₂: 243,1; gefunden [M+Na]⁺: 266,1.

5.2.35 Cyclo[L-Tyr(Bzl)-L-Tyr(Bzl)] (23a)



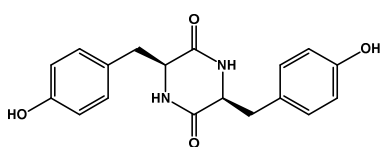
Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Tyr(Bzl)-OH (11,1 g, 30,0 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Tyr(Bzl)-OH (16,7 g, 45,0 mmol, 3,0 Äq.). Die

Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt. Der resultierende Niederschlag wurde durch

Filtration gesammelt und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Rohprodukt wurde in Wasser digeriert, abfiltriert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Tyr(Bzl)-L-Tyr(Bzl)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (3,37 g, 6,66 mmol, 44% Ausbeute).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.87 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 7.43 - 7.24 (m, 10H), 6.99 - 6.90 (m, 8H), 5.05 (s, 4H), 3.95 - 3.86 (m, 2H), 2.56 - 2.49 (m, 2H), 2.21 (dd, J = 13.7, 6.2 Hz, 2H). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR** (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166.2 (2x), 157.1 (2x), 137.1 (2x), 130.8 (4x), 128.7 (2x), 128.4 (4x), 127.7 (2x), 127.4 (4x), 114.6 (4x), 69.1 (2x), 55.6 (2x), 38.5 (2x). **HRMS (ESI) m/z** berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$: 506,22056; gefunden $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 529,210197. **FTIR (cm^{-1})**: 3181, 3063, 3031, 2885, 2852, 1661, 1610, 1582, 1509, 1462, 1376, 1341, 1311, 1297, 1238, 1226, 1194, 1174, 1109, 1041, 1017, 921, 833, 811, 773, 755, 730, 695, 652, 608. α_{22}^D : - 82,0 (DMSO, c = 1,0). **Schmelzpunkt**: 266 - 270 °C (Zersetzung).

5.2.36 Cyclo[L-Tyr-L-Tyr] (23)

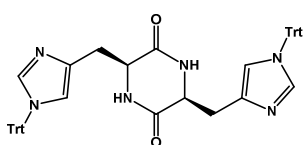


Cyclo[L-Tyr(Bzl)-L-Tyr(Bzl)] **23a** (950 mg, 1,99 mmol) und Pd/C (10%, 150 mg) wurden in 70 mL Methanol suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt, anschließend mit Methanol

verdünnt und erwärmt bis sich das Produkt vollständig gelöst hat. Die Suspension wurde mit Celite® filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Tyr-L-Tyr] wurde als farbloser Feststoff erhalten (650 mg, 1,98 mmol, 99% Ausbeute).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.21 (s, 2H), 7.77 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 6.67 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 3.89 - 3.80 (m, 2H), 2.54 - 2.48 (m, 2H), 2.10 (dd, J = 13.7, 6.5 Hz, 2H). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR** (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166.3 (2x), 156.1 (2x), 130.8 (4x), 126.5 (2x), 115.0 (4x), 55.8 (2x), 38.8 (2x). **HRMS (ESI) m/z** berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$: 326,12666; gefunden $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 349,115965. **FTIR (cm^{-1})**: 3202, 3159, 3079, 3022, 1664, 1651, 1614, 1594, 1516, 1463, 1378, 1337, 1246, 1207, 1173, 1103, 1086, 1012, 925, 883, 824, 797, 778, 691, 652. α_{22}^D : - 138,2 (DMSO, c = 1,0). **Schmelzpunkt**: 275 - 282 °C (Zersetzung).

5.2.37 Cyclo[L-His(Trt)-L-His(Trt)] (24a)

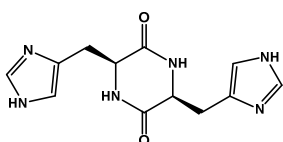


Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-His(Trt)-OH (9,70 g, 19,5 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-His(Trt)-OH (14,6 g, 29,3 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingengt, bis die organischen

Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt. Der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Rohprodukt wurde in Wasser digeriert, abfiltriert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-His(Trt)-L-His(Trt)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (3,37 g, 4,49 mmol, 46% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.99 (s, 2H), 7.43 - 6.95 (m, 32H), 6.67 (s, 2H), 4.04 (s, 2H), 2.82 (d, *J* = 14.4 Hz, 2H), 2.56 - 2.39 (m, 2H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.5 (2x), 142.3 (6x), 137.8 (2x), 136.3 (2x), 129.2 (12x), 128.1 (12x), 127.9 (6x), 119.3 (2x), 74.5 (2x), 54.4 (2x), 31.9 (2x). **MS (FAB)** *m/z* berechnet für C₅₀H₄₂N₆O₂: 758,3; gefunden [M+H]⁺: 759,4.

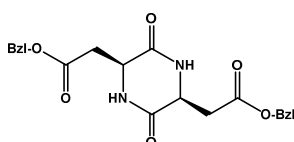
5.2.38 Cyclo[L-His-L-His] (24)



Cyclo[L-His(Trt)-L-His(Trt)] **24a** (900 mg, 1,19 mmol) wurde in 5 mL TFA/H₂O (95 : 5 (v/v)) gelöst für 1,5 h gerührt. Das Produkt wurde mit einem Überschuss Et₂O gefällt und zentrifugiert, das Lösungsmittel wurde abdekantiert. Der Niederschlag wurde zweimal in Et₂O suspendiert, zentrifugiert und das Lösungsmittel abdekantiert. Das erhaltene TFA-Salz wurde in Wasser gelöst, mit schwach basischem Ionentauscher (Bayer Lewatit, OH⁻-Form) neutralisiert und anschließend lyophilisiert. Cyclo[L-Val-L-His] wurde als farbloser Feststoff erhalten (293 mg, 1,07 mmol, 90% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.96 (s, 2H), 7.64 (s, 2H), 6.81 (s, 2H), 4.05 - 3.97 (m, 2H), 2.88 (dd, *J* = 14.7, 3.8 Hz, 2H), 2.47 - 2.41 (m, 2H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.0 (2x), 134.8 (2x), 133.1 (2x), 117.0 (2x), 54.4 (2x), 30.1 (2x). **MS (ESI)** *m/z* berechnet für C₁₂H₁₄N₆O₂: 274,1; gefunden [M+H]⁺: 275,2. Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[327]

5.2.39 Cyclo[L-Asp(OBzl)-L-Asp(OBzl)] (25a)

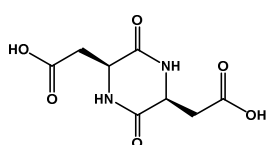


Die Durchführung erfolgte nach allgemeiner SPPS-Synthese mit Boc-Asp(OBzl)-OH (7,89 g, 24,4 mmol, 2,0 Äq.) und Boc-Asp(OBzl)-OH (11,8 g, 36,6 mmol, 3,0 Äq.). Die Rohprodukt-Lösung in THF/Wasser (8 : 1 (v/v)) wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, bis die organischen Lösungsmittelanteile entfernt waren. Die wässrige Suspension wurde unter starkem Rühren im Eisbad gekühlt. Der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert

und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Asp(OBzl)-L-Asp(OBzl)] wurde als farbloser Feststoff erhalten (1,78 g, 4,34 mmol, 36% Ausbeute).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.26 (s, 2H), 7.37 (d, $J = 4.0$ Hz, 10H), 5.10 (s, 4H), 4.36 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 2.85 - 2.70 (m, 4H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 169.9 (2x), 167.4 (2x), 136.0 (2x), 128.4 (4x), 128.0 (2x), 127.9 (4x), 65.7 (2x), 50.9 (2x), 36.0 (2x). **MS (FAB)** m/z berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$: 410,1; gefunden $[\text{M}+\text{H}]^+$: 411,2.

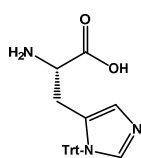
5.2.40 Cyclo[L-Asp-L-Asp] (25)



Cyclo[L-Asp(OBzl)-L-Asp(OBzl)] **25a** (1,20 g, 2,92 mmol) und Pd/C (10%, 50 mg) wurden in 20 mL Methanol suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde unter Wasserstoffatmosphäre gerührt, anschließend mit Wasser verdünnt und bis sich das Produkt vollständig gelöst hat. Die Suspension wurde mit Celite® filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert und unter vermindertem Druck getrocknet. Cyclo[L-Tyr-L-Tyr] wurde als farbloser Feststoff erhalten (550 mg, 2,39 mmol, 82% Ausbeute).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.36 (s, 2H), 8.07 (s, 2H), 4.24 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.73 - 2.57 (m, 4H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 171.6 (2x), 167.6 (2x), 50.9 (2x), 36.2 (2x). **MS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_6$: 230,1; gefunden $[\text{M}-\text{H}]^-$: 228,8.

5.2.41 H-His(Trt)-OH (26)

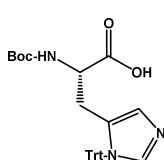


Die Synthese wurde einer Vorschrift von Theodoropoulos *et al.* durchgeführt.^[328] Zu einer Suspension aus Histidin (15,5 g, 99,9 mmol, 1,0 Äq.) in 150 mL trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre wurde Me_2SiCl_2 (13,15 g, 102 mmol, 1,02 Äq.) langsam zugetropft. Die Mischung wurde für 6 h unter Rückfluss erhitzt und 27,9 mL Triethylamin (20,2 g, 200 mmol, 2,0 Äq) wurden zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 min unter Rückfluss erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurden weitere 13,9 mL Triethylamin (10,1 g, 99,9 mmol, 1,0 Äq.) zugetropft, gefolgt von einer Lösung aus Tritylchlorid (28,13 g, 101 mmol, 1,01 Äq.) in 100 mL Dichlormethan. Die Reaktionsmischung wird für zwei Stunden gerührt und anschließend mit einem Überschuss Methanol versetzt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der resultierende Feststoff wird in Wasser aufgenommen, der pH-Wert der Mischung wird mit Triethylamin auf pH 8,0 - 8,5 eingestellt. Die Mischung wurde mit Chloroform ausgeschüttelt und die organische Phase anschließend verworfen. Der

unlösliche Rückstand wurde aus der wässrigen Phase abfiltriert und mit Wasser und Et₂O gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus THF/H₂O umkristallisiert und unter vermindertem Druck getrocknet. H-His(Trt)-OH wurde als farbloser Feststoff erhalten (20,40 g, 51,3 mmol, 51%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.46 - 7.34 (m, 10H), 7.21 - 7.14 (m, 6H), 6.87 (s, 1H), 3.84 (dd, *J* = 8.2, 4.2 Hz, 1H), 3.16 (dd, *J* = 15.4, 4.2 Hz, 1H), 2.98 (dd, *J* = 15.4, 8.2 Hz, 1H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, MeOD) δ 179.3, 144.1 (3x), 140.3, 137.5, 131.3 (6x), 129.7 (3x), 129.6 (6x), 121.7, 77.4, 56.8, 30.3. **MS (FAB)** *m/z* berechnet für C₂₅H₂₃N₃O₂: 397,2; gefunden [M+H]⁺: 398,2.

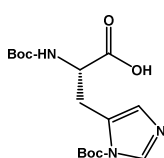
5.2.42 Boc-His(Trt)-OH (27)



H-His(Trt)-OH (3,92 g, 9,86 mmol, 1,0 Äq.) wurde in 40 mL THF/H₂O (1 : 1 (v/v)) suspendiert und in einem Eisbad gekühlt. NaOH (870 mg, 21,7 mmol, 2,2 Äq.) und Di-*tert*-butyldicarbonat (2,37 g, 10,85 mmol, 1,1 Äq.) wurden zu der Reaktionsmischung gegeben. Die Lösung wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, THF wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 60 mL Chloroform zugegeben und die wässrige Phase wurde unter Rühren auf pH 4 gestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Chloroform extrahiert, die vereinten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Boc-His(Trt)-OH wurde als farbloser Feststoff erhalten (5,13 g, 10,3 mmol, quantitativ).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.41 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.40 - 7.25 (m, 9H), 7.13 - 7.04 (m, 6H), 6.68 - 6.63 (m, 1H), 5.61 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.42 - 4.33 (m, 1H), 3.28 (dd, *J* = 15.0, 3.5 Hz, 1H), 3.17 (dd, *J* = 15.0, 7.1 Hz, 1H), 1.34 (s, 9H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ 173.5, 155.1, 141.5 (3x), 137.0, 133.8, 129.8 (6x), 128.6 (3x), 128.4 (6x), 120.9, 79.3, 76.6, 53.3, 29.2, 28.4 (3x). **MS (FAB)** *m/z* berechnet für C₃₀H₃₁N₃O₄: 497,2; gefunden [M+H]⁺: 498,2.

5.2.43 Boc-His(Boc)-OH (28)



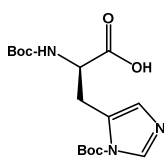
Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Castro *et al.* durchgeführt,^[329] ohne Boc-His(Boc)-OH in das DCHA-Salz zu überführen. Histidin (22,6 g, 146 mmol, 1,0 Äq.) wurde in einer Mischung aus K₂CO₃-Lösung (1 M, 146 mL, 1,0 Äq.) und *iso*-Propanol (36 mL) gelöst und anschließend im Eisbad gekühlt. Boc₂O (70,0 g, 321 mmol, 2,2 Äq.) in 36 mL *iso*-Propanol wurde unter konstanter Kühlung im Eisbad langsam zu der Histidin-Lösung getropft. Die Reaktionsmischung wurde für eine h bei 40 °C gerührt und anschließend mit destilliertem Wasser auf 550 mL Gesamtvolumen

verdünnt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether gewaschen und mit 3,0 M $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ auf pH = 3 angesäuert. Das Produkt wurde mit Diethylether extrahiert (3x) und die vereinten organischen Phasen mit Brine gewaschen. Die organische Phase wurde eingengt und der resultierende Feststoff unter vermindertem Druck getrocknet. Boc-His(Boc)-OH wurde als farbloser Feststoff erhalten (42,7 g, 120 mmol, 82% Ausbeute).

Eine gewisse Menge Rest-Lösungsmittel bleibt im Produkt enthalten und kann über das ^1H -NMR Spektrum bestimmt werden. Dies wurde für die Ausbeute sowie die Reinheit berücksichtigt, welche für die Berechnung der Äquivalente für die Festphasensynthese verwendet wurde.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 5.58 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.43 - 4.50 (m, 1H), 3.28 (dd, J = 14.9, 2.8 Hz, 1H), 3.15 (dd, J = 15.2, 6.6 Hz, 1H), 1.62 (s, 9H), 1.47 (s, 9H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 155.3, 146.4, 137.0, 136.5, 115.7, 86.7, 79.9, 52.9, 29.9, 28.5 (3x), 28.0 (3x). **MS (FAB)** m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6$: 355,2; gefunden $[\text{M}+\text{H}]^+$: 356,2.

5.2.44 Boc-D-His(Boc)-OH (29)

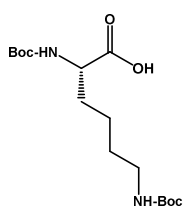


Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Castro *et al.* für das L-Isomer durchgeführt,^[329] ohne Boc-D-His(Boc)-OH in das DCHA-Salz zu überführen. D-Histidin (25,0 g, 161 mmol, 1,0 Äq.) wurde in einer Mischung aus 1,0 M K_2CO_3 -Lösung (160 mL, 160 mmol, 1,0 Äq) und *iso*-Propanol (40 mL) gelöst und anschließend im Eisbad gekühlt. Boc_2O (77,4 g, 354 mmol, 2,2 Äq.) in 40 mL *iso*-Propanol wurde unter konstanter Kühlung im Eisbad langsam zu der Histidin-Lösung getropft. Die Reaktionsmischung wurde für eine h bei 40 °C gerührt und anschließend mit destilliertem Wasser auf 550 mL Gesamtvolumen verdünnt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether gewaschen und mit 3,0 M $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ auf pH = 3 angesäuert. Das Produkt wurde mit Diethylether extrahiert (3x) und die vereinten organischen Phasen mit Brine gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die organische Phase wurde eingengt und der resultierende Feststoff unter vermindertem Druck getrocknet. Boc-His(Boc)-OH wurde als farbloser Feststoff erhalten (50,1 g, 141 mmol, 87% Ausbeute).

Eine gewisse Menge Rest-Lösungsmittel bleibt im Produkt enthalten und kann über das ^1H -NMR Spektrum bestimmt werden. Dies wurde für die Ausbeute sowie die Reinheit berücksichtigt, welche für die Berechnung der Äquivalente für die Festphasensynthese verwendet wurde.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 5.58 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.41 - 4.52 (m, 1H), 3.27 (dd, $J = 14.9, 2.8$ Hz, 1H), 3.17 (dd, $J = 15.2, 6.6$ Hz, 1H), 1.62 (s, 9H), 1.46 (s, 9H). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR** (101 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 155.3, 146.3, 137.0, 136.5, 115.6, 86.7, 79.9, 52.9, 29.9, 28.5 (3x), 28.0 (3x). **MS (FAB)** m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6$: 355,2; gefunden $[\text{M}+\text{H}]^+$: 356,2.

5.2.45 Boc-Lys(Boc)-OH (30)

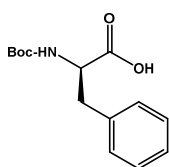


Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Ivanov *et al.* durchgeführt.^[330]

Lysinhydrochlorid (25,0 g, 137 mmol, 1,0 Äq.) wurde in 1,0 M $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ (410 mL, 410 mmol, 3,0 Äq.) gelöst und mit Na_2CO_3 versetzt (17,4 g, 164 mmol, 1,2 Äq.). Die Lysin-Lösung wurde im Eisbad gekühlt und tropfenweise mit Boc_2O (82,2 g, 376 mmol, 2,8 Äq.) in *iso*-Propanol (410 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur für 12 h gerührt. Während der Reaktion wurde der pH-Wert kontrolliert und wenn nötig mit 3,0 M $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ auf pH = 10 - 11 eingestellt. Anschließend wurden alle flüchtigen Stoffe unter vermindertem Druck entfernt und die resultierende wässrige Phase mit 250 mL destilliertem Wasser verdünnt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether und dreimal mit Ethylacetat gewaschen. Zu der wässrigen Phase wurde das gleiche Volumen Ethylacetat gegeben und die Mischung wurde mit 3,0 M $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ auf pH = 2 angesäuert. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden anschließend dreimal mit Brine gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die organische Phase wurde eingeeengt und der resultierende Feststoff unter vermindertem Druck getrocknet. Boc-Lys(Boc)-OH wurde als farbloser Feststoff erhalten (46,0 g, 133 mmol, 97% Ausbeute).

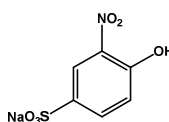
Eine gewisse Menge Rest-Lösungsmittel bleibt im Produkt enthalten und kann über das ^1H -NMR Spektrum bestimmt werden. Dies wurde für die Ausbeute sowie die Reinheit berücksichtigt, welche für die Berechnung der Äquivalente für die Festphasensynthese verwendet wurde.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.06 (s (br), 1H), 5.25 (s, 1H), 4.66 (s, 1H), 4.36 - 4.13 (m, 1H), 3.20 - 3.05 (m, 2H), 1.95 - 1.71 (m, 2H), 1.50 - 1.36 (m, 22H). **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR** (101 MHz, CDCl_3) δ 176.2, 156.2, 155.8, 80.0, 79.9, 53.2, 40.0, 32.0, 29.5, 28.3 (x6), 22.4. **MS (FAB)** m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$: 346,2; gefunden $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 369,2.

5.2.46 Boc-D-Phe-OH (31)

Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Chaikof *et al.* durchgeführt.^[331] D-Phenylalanin (20,0 g, 121 mmol, 1,0 Äq.) wurde in 300 mL Dioxan/H₂O (1 : 1) gelöst und bei Raumtemperatur für 5 min gerührt. Anschließend wurden 175 mL NaOH_(aq) (1,0 M, 175 mmol, 1,5 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde im Eisbad gekühlt. Boc₂O (32,0 g, 147 mmol, 1,2 Äq.) in Dioxan (100 mL) wurde langsam zu der Phenylalanin-Lösung getropft. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 10 min unter Kühlung im Eisbad und anschließend für 3,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Flüchtige Stoffe wurden unter vermindertem Druck entfernt und die resultierende wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 100 mL H₂O verdünnt und mit 3,0 M H₂SO_{4(aq)} angesäuert. Das Produkt wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden mit Brine gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Boc-D-Phe-OH wurde als farbloser Feststoff erhalten (32,8 g, 118 mmol, 97% Ausbeute).

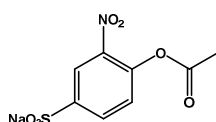
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 - 7.14 (m, 5H), 4.93 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.20 (dd, *J* = 13.6, 5.3 Hz, 1H), 3.09 (dd, *J* = 13.6, 6.4 Hz, 1H), 1.42 (s, 9H). ¹³C{¹H} NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 179.2, 156.1, 136.7, 128.8 (2x), 127.7 (2x), 126.0, 79.7, 59.3, 36.4, 28.6 (3x). **MS (FAB)** *m/z* berechnet für C₁₄H₁₉NO₄: 265,1; gefunden [M+Na]⁺: 288,1. Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[331]

5.2.47 Natrium-4-hydroxy-3-nitrobenzensulfonat (HNBS) (32)

2-Nitrophenol (5,95 g, 42,8 mmol, 1,0 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre in 50 mL trockenem Kohlenstoffdisulfid gelöst. Die Lösung wurde für 10 min in einem Eisbad gekühlt und Chlorsulfonsäure (2,84 mL, 42,8 mmol, 1,0 Äq) wurde tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für 10 min im Eisbad und für weitere 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, dreimal mit *n*-Hexan gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Der Feststoff wurde in 10 mL Wasser suspendiert, in einem Eisbad gekühlt und vorsichtig mit gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt, bis pH = 4 - 5 erreicht wurde. Der erhaltene Feststoff wurde durch Filtration gesammelt und das Filtrat wurde eingeeengt und wiederholt filtriert. Der Filtrerrückstand wurde dreimal mit Aceton gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Rohprodukt wurde in kochender Essigsäure gelöst, heiß filtriert und aus Essigsäure/Benzen umkristallisiert. Der Feststoff wurde mit Benzen gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Natrium-4-hydroxy-3-nitrobenzensulfonat wurde als gelber Feststoff erhalten (8,35 g, 34,6 mmol, 80% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.15 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.72 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ 152.3, 139.8, 135.3, 132.5, 122.2, 118.6. **Elementaranalyse:** C₆H₄NNaO₆S (241,15 g/mol) berechnet (%): C 29,88; H 1,67; N 5,81; S 13,29; gefunden (%): C 29,48; H 1,59; N 5,86; S 13,18. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₆H₄NNaO₆S: 240,96570; gefunden [*M*]⁻: 217,97636.

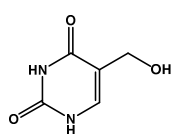
5.2.48 Natrium-4-acetoxy-3-nitrobenzensulfonat (ANBS) (33)



Natrium-4-hydroxy-3-nitrobenzensulfonat (3,00 g, 12,4 mmol) wurde in 75 mL Essigsäureanhydrid suspendiert und für 15 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde im Eisbad gekühlt und der Niederschlag wurde abfiltriert. Der Feststoff wurde aus Methanol umkristallisiert und mit Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Feststoff aus Essigsäure/Benzen umkristallisiert, mit Benzen gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Natrium-4-acetoxy-3-nitrobenzensulfonat wurde als farbloser Feststoff erhalten (2,97 g, 10,5 mmol, 84% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.22 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ 168.5, 147.2, 143.1, 140.6, 132.3, 125.3, 122.5, 20.6. **Elementaranalyse:** C₈H₆NNaO₇S (283,19 g/mol) berechnet (%): C 33,93; H 2,14; N 4,95; S 11,32; gefunden (%): C 33,89; H 2,03; N 5,10; S 11,39. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₈H₆NNaO₇S: 282,97627; gefunden [*M*]⁻: 259,98723.

5.2.49 5-(Hydroxymethyl)-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (34)

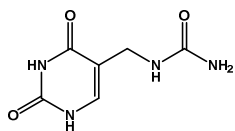


Uracil (10,0 g, 89,2 mmol, 1,0 Äq.) und Paraformaldehyd (3,35 g, 112 mmol, 1,3 Äq.) wurden in einer wässrigen Kaliumhydroxid-Lösung (540 mM, 100 mL) suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde bei 55 °C für 72 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck auf ein Drittel des Volumens eingengt und mit einem Überschuss Aceton versetzt. Der resultierende Feststoff wurde abfiltriert, mit Aceton gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert und unter vermindertem Druck getrocknet. 5-(Hydroxymethyl)-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion wurde als farbloser Feststoff erhalten (10,8 g, 75,9 mmol, 85% Ausbeute).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.04 (s, 1H), 10.70 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 4.84 (s, 1H), 4.10 (s, 2H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ 163.7, 151.3, 138.0, 112.6, 55.7. **MS (FAB)** *m/z*

berechnet für $C_5H_6N_2O_3$: 142,0; gefunden $[M+H]^+$: 143,0. Die analytischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.^[332]

5.2.50 *N*-[(Uracil-5-yl)methyl]harnstoff (UMH) (35)



Konzentrierte Salzsäure (2,89 mL, 35,2 mmol, 5,0 Äq.) wurde zu einer Lösung aus 5-(Hydroxymethyl)-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (1,00 g, 7,04 mmol, 1,0 Äq.) in Wasser (25 mL) gegeben. Die Lösung wurde über einen Zeitraum von 15 min unter Rühren zu einer Lösung aus Harnstoff (2,11 g, 35,2 mmol, 5,0 Äq.) in Wasser (10 mL) bei 80 °C getropft. Die Reaktionsmischung wurde bei 80 °C für 4 h gerührt und anschließend in einem Eisbad gekühlt. Der resultierende Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. *N*-[(Uracil-5-yl)methyl]harnstoff wurde als farbloser Feststoff erhalten (1,06 g, 5,78 mmol, 82%). In manchen Fällen war es notwendig, den Feststoff in siedendem Wasser zu suspendieren, heiß zu filtrieren und das Filtrat unter vermindertem Druck einzuengen, um das reine Produkt zu erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.12 (s, 1H), 10.71 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.11 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 3.74 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H). **¹³C{¹H} NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.2, 158.4, 151.1, 138.5, 110.6, 35.6. **HRMS (FTICR)** *m/z* berechnet für $C_6H_8N_4O_3$: 184,05964; gefunden $[M+Na]^+$: 207,049027. **FTIR (cm⁻¹)**: 3445, 3414, 3013, 2832, 1709, 1631, 1590, 1539, 1452, 1437, 1323, 1246, 1212, 1123, 1010, 888, 857, 824, 757, 643. **Elementaranalyse**: $C_6H_8N_4O_3$ (184,16 g/mol) berechnet (%): C 39,14; H 4,38; N 30,42; gefunden (%): C 38,97; H 3,65; N 30,56.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABA	Acetamidobenzoat
Ac	Acetyl
ANBS	Natrium-4-acetoxy-3-nitrobenzensulfonat
Äq.	Äquivalente
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bzl	Benzyl
bzw.	beziehungsweise
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	<i>N,N</i> -Dicyclohexylamin
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DKP	Diketopiperazin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMP	Dimethoxyphenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNPA	2,4-Dinitrophenylacetat
DTT	Dithiothreitol
DVB	Divinylbenzen
ee	Enantiomerenüberschuss
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
et al.	und Mitarbeiter
FAB	Fast Atom Bombardment
FG	funktionelle Gruppe
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
g	Gramm
G'	Speichermodul
G''	Verlustmodul

GdL	Glucono- δ -lacton
Gew-%	Gewichtsprozent
h	Stunde
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	Hexafluorisopropanol
HNBS	Natrium-4-hydroxy-3-nitrobenzensulfonat
HR	hochauflösend
Im	Imidazol
IR	Infrarot
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
k_{cat}	Geschwindigkeitskonstante
kHz	Kiloherz
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LMWG	Low Molecular Weight Hydrogelator
LVB	linear-viskoelastischer Bereich
M	molar
MAS	Magic Angle Spinning
Me	Methyl
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
MGC	Minimum Gelator Concentration
MGK	minimale Gelator-Konzentration
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
Mrd.	Milliarden
MS	Massenspektrometrie
NCL	native chemische Ligation
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NS	Normschliff
OMe	Methoxy

P	Produkt
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
pNPA	<i>para</i> -Nitrophenylacetat
ppm	parts per million
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
S	Substrat
SEM	Scanning Electron Microscopy
SIPF	Salt Induced Peptide Formation
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
STEM	Scanning Transmission Electron Microscopy
t	Zeit
$\tan \delta$	Verlustfaktor
TC	Tetracyclinhydrochlorid
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
Trt	Trityl
UMH	<i>N</i> -[(Uracil-5-yl)methyl]harnstoff
UMU	<i>N</i> -[(Uracil-5-yl)methyl]urea
V	Volumen
v_0	Anfangsgeschwindigkeit
vgl.	vergleiche
v_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
z. B.	zum Beispiel
γ	Scherdeformation
γ_c	kritische Deformation
δ	Phasenverschiebung, chemische Verschiebung
η	Viskosität
λ	Wellenlänge
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
Σ	Summe
σ	Scherspannung
χ	Molenbruch
ω	Kreisfrequenz
n	Stoffmenge
v	Volumen

6.2 Ein- und Dreibuchstabencodes der Aminosäuren

Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

6.3 Zusätzliche Daten aus Kapitel 3.2

6.3.1 Faserdurchmesser der Xerogele

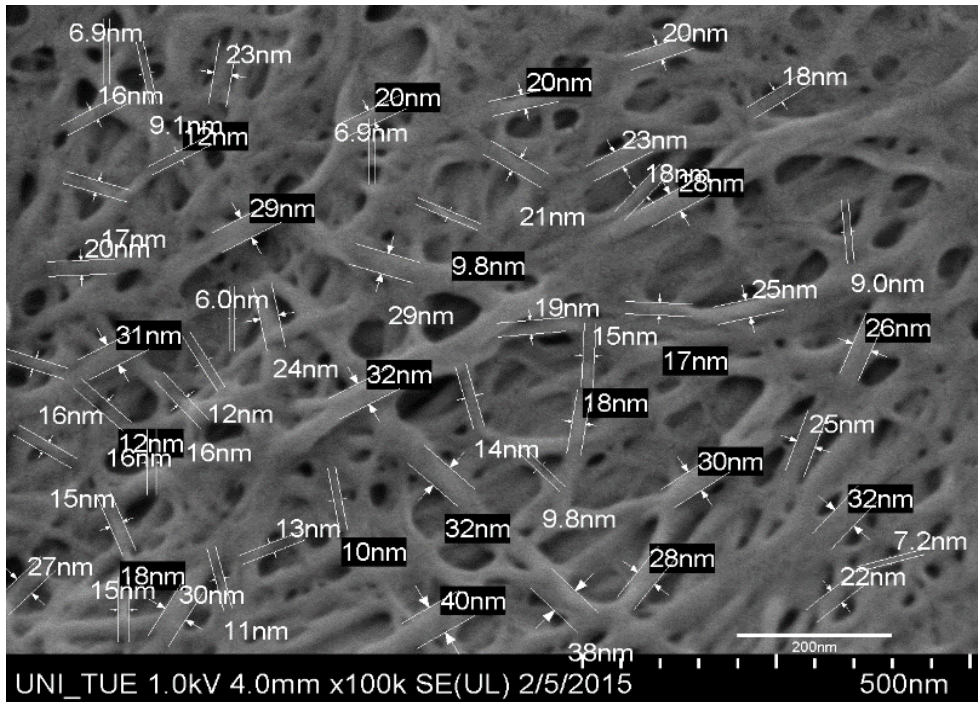


Abbildung 88: REM-Aufnahme von Xerogel 3, die durchschnittlich Faserdicke wurde anhand der vermessenen Fasern manuell ausgewertet.

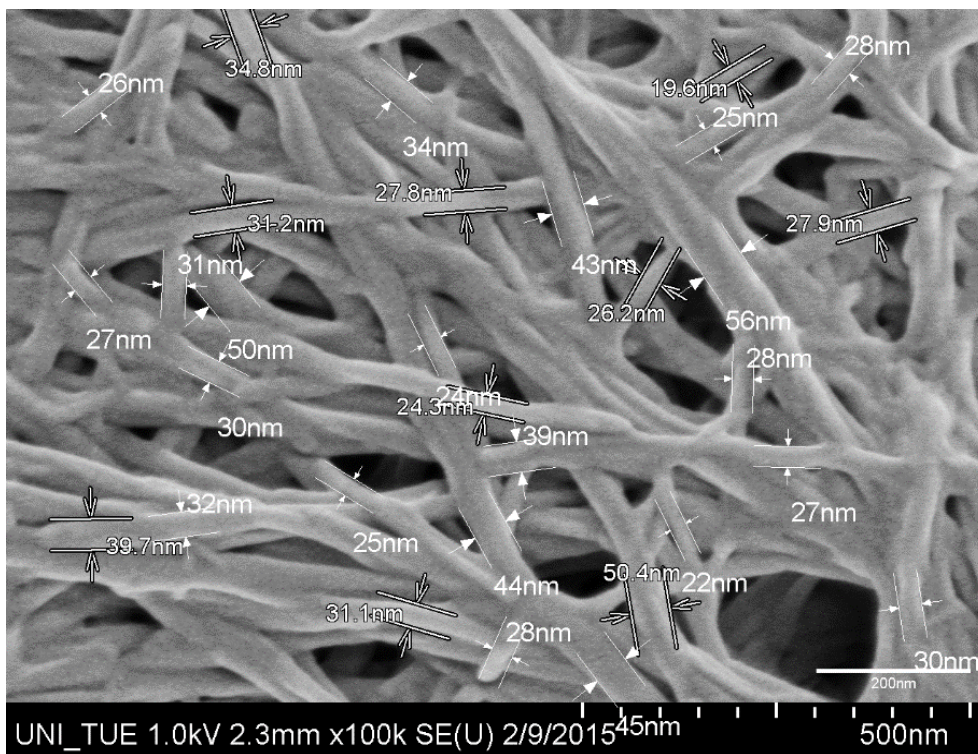


Abbildung 89: REM-Aufnahme von Xerogel 5, die durchschnittlich Faserdicke wurde anhand der vermessenen Fasern manuell ausgewertet.

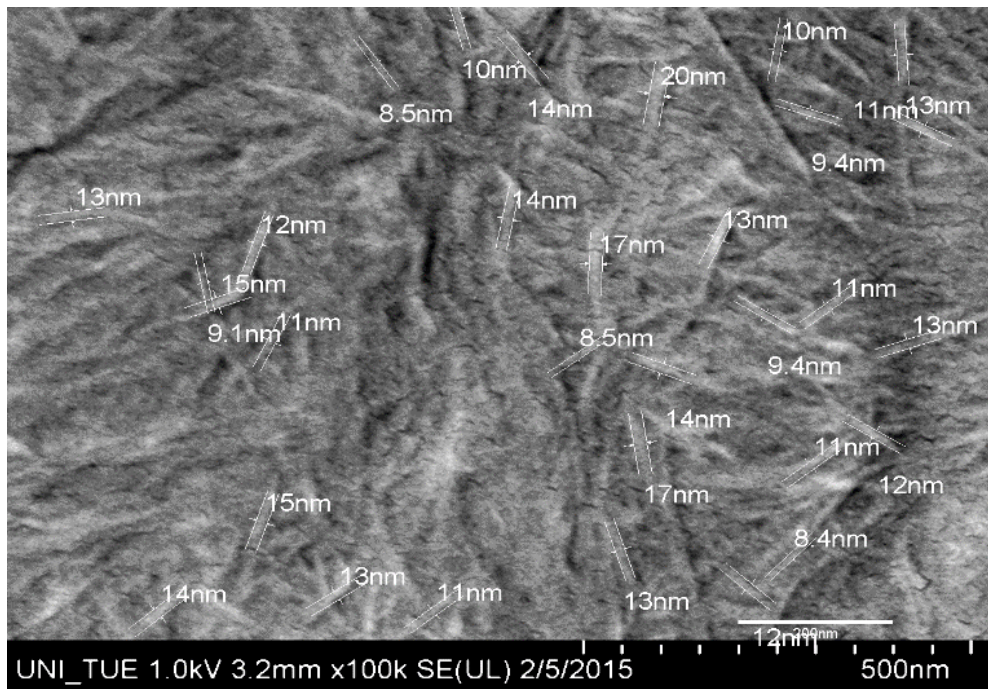


Abbildung 90: REM-Aufnahme von Xerogel 3/5 (1 : 1,5 (n/n)), die durchschnittlich Faserdicke wurde anhand der vermessenen Fasern manuell ausgewertet.

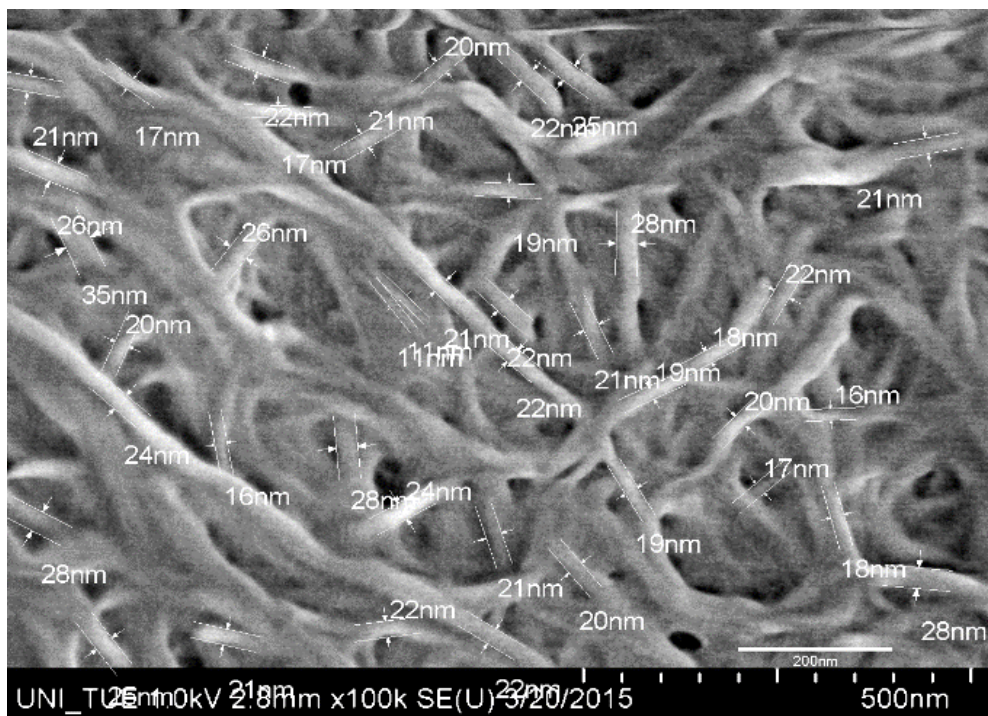


Abbildung 91: REM-Aufnahme von Xerogel 5/15 (1 : 1 (n/n)), die durchschnittlich Faserdicke wurde anhand der vermessenen Fasern manuell ausgewertet.

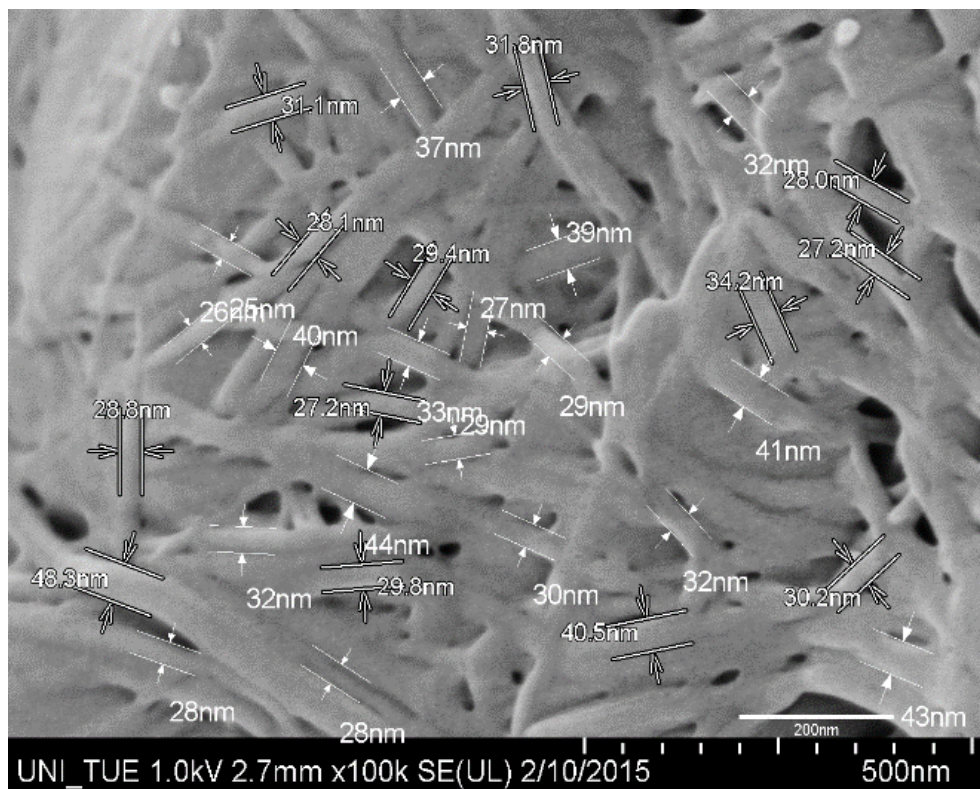


Abbildung 92: REM-Aufnahme von Xerogel 5/16 (1 : 1 (n/n)), die durchschnittlich Faserdicke wurde anhand der vermessenen Fasern manuell ausgewertet.

6.3.2 Extinktionskoeffizienten von HNBS

Tabelle 8: Experimentell bestimmte molare Extinktionskoeffizienten von Natrium-4-hydroxy-3-nitrobenzensulfonat (**32**) bei unterschiedlichen pH-Werten in 0,25 M MES (pH 6,25 und 6,50) und HEPES (pH 6,75 bis 8,50) bei 406 nm.

pH-Wert	ϵ_{λ} [m ² /mol]
6,25	336
6,50	358
6,75	378
7,00	401
7,25	410
7,38	414
7,50	417
7,75	420
8,00	424
8,25	427
8,50	428

6.3.3 Lineweaver-Burk-Plots

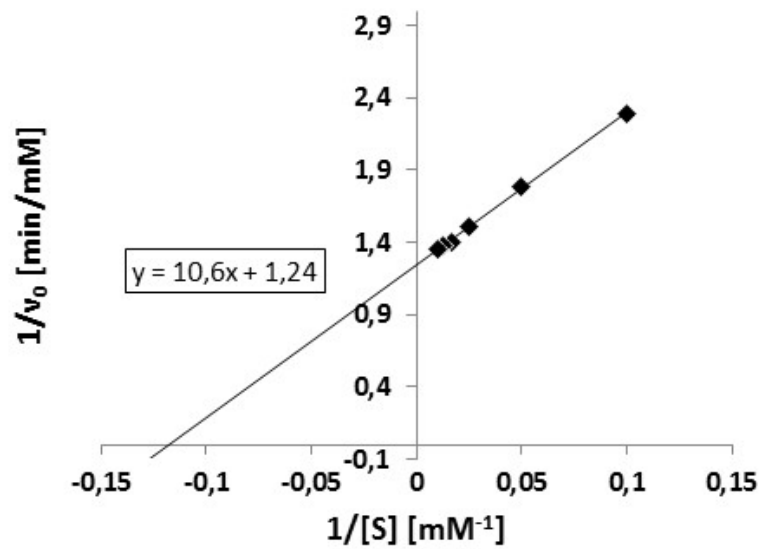


Abbildung 93: Vollständiger Lineweaver-Burk-Plot für die ANBS-Hydrolyse katalysiert durch Hydrogel **3/5** (1 : 1,5 (*n/n*); pH = 7,50; c (Hydrogel) = 92 mM) mit Angabe der Funktion der Trendlinie.

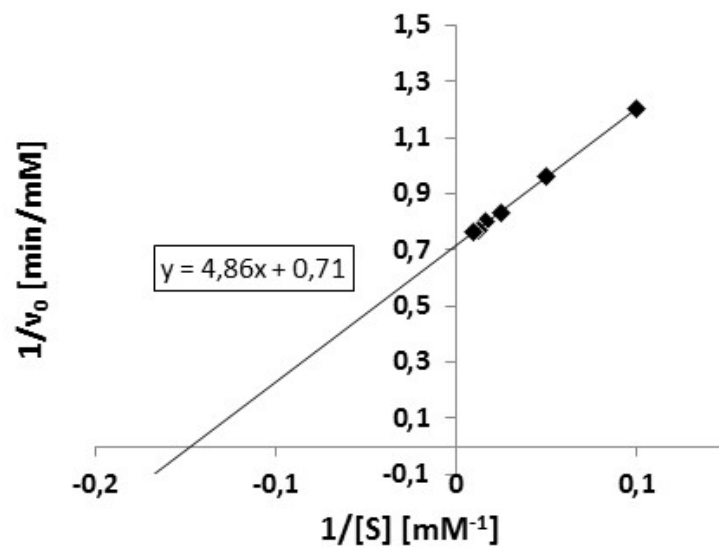


Abbildung 94: Vollständiger Lineweaver-Burk-Plot für die ANBS-Hydrolyse katalysiert durch Hydrogel **5/15** (1 : 1 (*n/n*); pH = 7,38; c (Hydrogel) = 80 mM) mit Angabe der Funktion der Trendlinie.

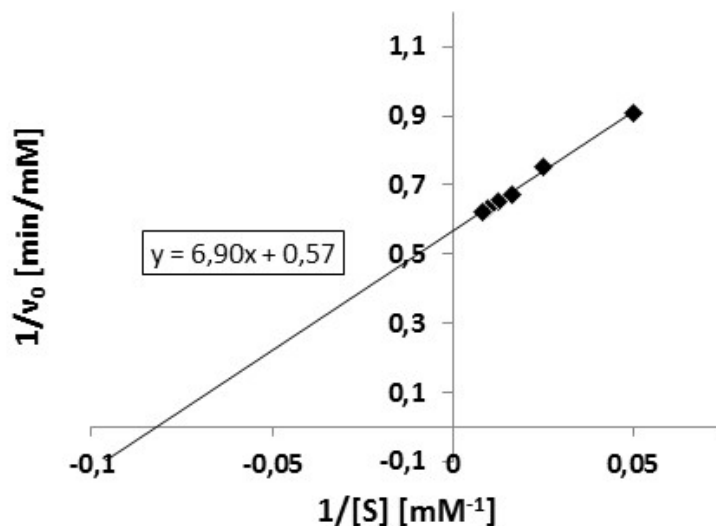


Abbildung 95: Vollständiger Lineweaver-Burk-Plot für die ANBS-Hydrolyse katalysiert durch Hydrogel **5/16** (1 : 1 (*n/n*); pH = 7,25; c (Hydrogel) = 92 mM) mit Angabe der Funktion der Trendlinie.

Tabelle 9: Anfangsgeschwindigkeiten der ANBS-Hydrolyse der coassemblierten Hydrogele mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen; Hydrogel **3/5**: Verhältnis **3/5** = 1 : 1,5 (*n/n*), c (Hydrogel) = 92 mM, c (im Gesamtvolumen) = 18 mM, 0,25 M HEPES pH 7,50; Hydrogel **5/15**: Verhältnis **5/15** = 1 : 1 (*n/n*), c (Hydrogel) = 80 mM, c (im Gesamtvolumen) = 16 mM, 0,25 M HEPES pH 7,38; DKP **5/16**: Verhältnis **5/16** = 1 : 1 (*n/n*), c (Hydrogel) = 92 mM, c (im Gesamtvolumen) = 18 mM, 0,25 M HEPES pH 7,25.

c(ANBS) [mM]	DKP 3/5 v ₀ [mM/min]	DKP 5/15 v ₀ [mM/min]	DKP 5/16 v ₀ [mM/min]
10	0,436	0,83	-
20	0,559	1,04	1,10
40	0,665	1,20	1,33
60	0,712	1,25	1,48
90	0,727	1,30	1,53
100	0,739	1,31	1,58
120	-	-	1,60

Tabelle 10: Trendlinieneigenschaften nach Auftragung der Daten zu Lineweaver-Burk-Plots.

Hydrogel	Funktion der Trendlinie	Schnittpunkt x-Achse [1/mM] (-1/K _M)	Schnittpunkt y-Achse [min/mM] (1/v _{max})
DKP 3/5	y = 10,6x + 1,24	- 0,117	1,24
DKP 5/15	y = 4,86x + 0,714	- 0,147	0,714
DKP 5/16	y = 6,90x + 0,567	- 0,082	0,567

6.3.4 HR-MAS-NOESY NMR-Spektren mit Vorzeichen

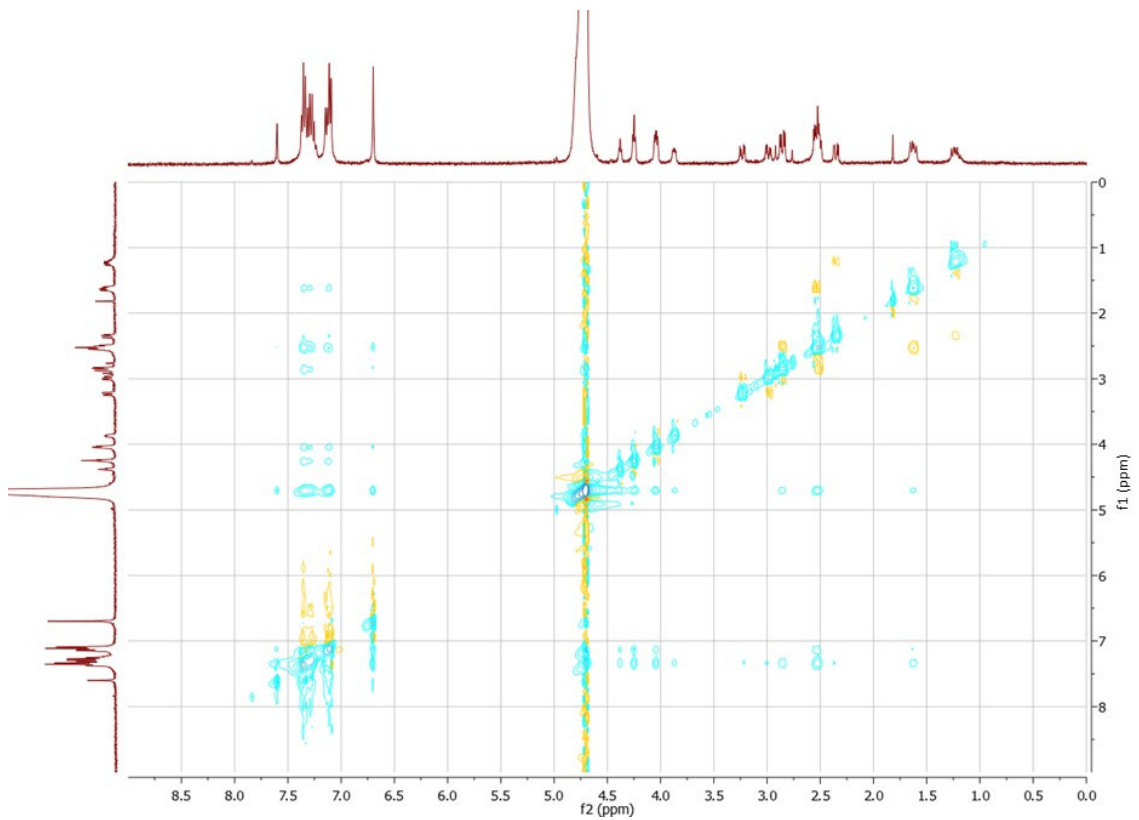


Abbildung 96: ^1H -HRMAS-NOESY Spektrum von Hydrogel **3/5** (1 : 1 (*n/n*); c (Hydrogel) = 56 mM) in D_2O mit farbiger Kennzeichnung der Vorzeichen der Kreuzsignale; Rotationsfrequenz = 2,5 kHz; gelb: positives Vorzeichen, blau: negatives Vorzeichen.

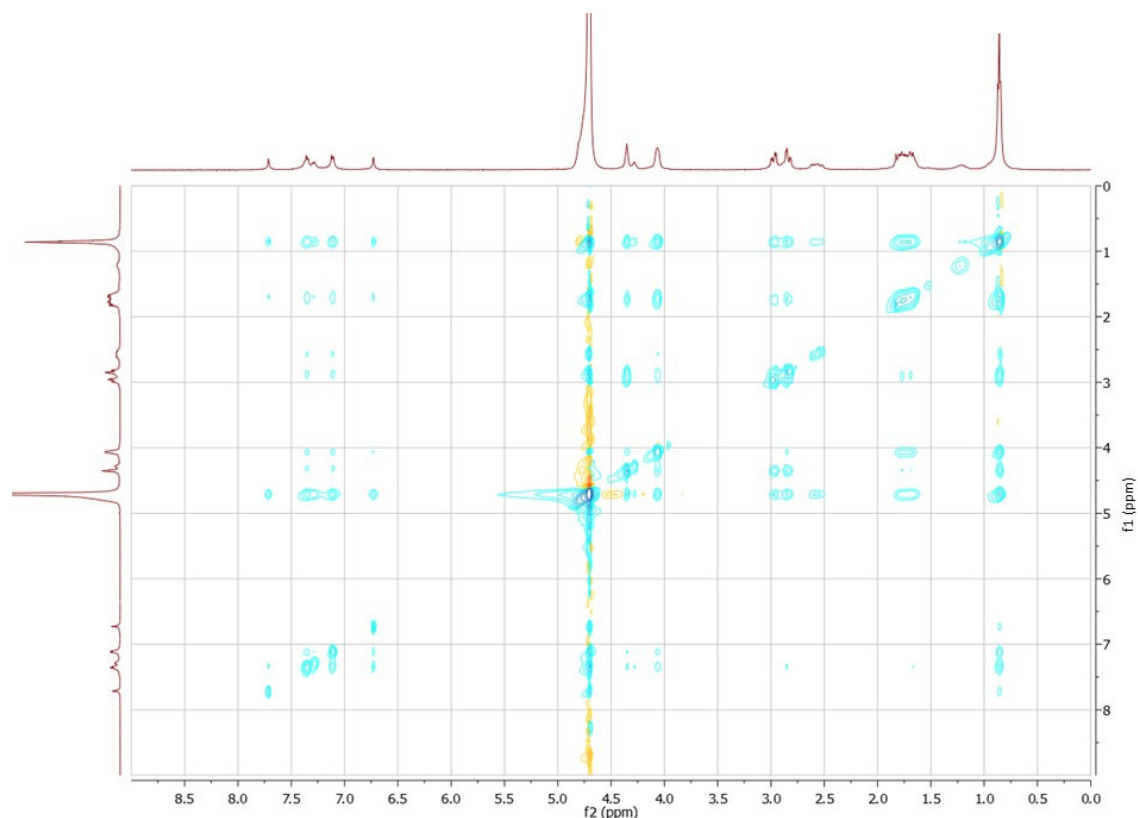


Abbildung 97: ^1H -HRMAS-NOESY Spektrum von Hydrogel **5/15** (1 : 1 (*n/n*); c (Hydrogel) = 80 mM) in D_2O mit farbiger Kennzeichnung der Vorzeichen der Kreuzsignale; Rotationsfrequenz = 4,0 kHz; gelb: positives Vorzeichen, blau: negatives Vorzeichen.

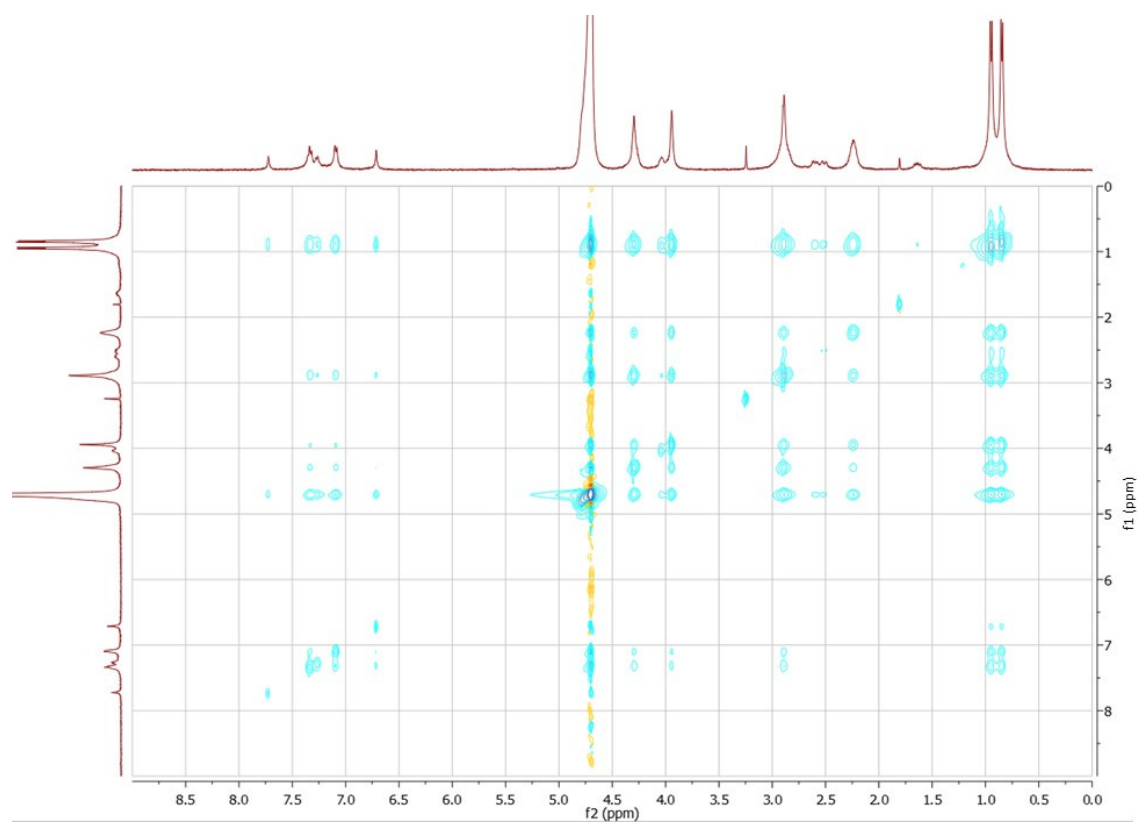


Abbildung 98: ^1H -HRMAS-NOESY Spektrum von Hydrogel **5/16** (1 : 1 (*n/n*); c (Hydrogel) = 80 mM) in D_2O mit farbiger Kennzeichnung der Vorzeichen der Kreuzsignale; Rotationsfrequenz = 4,0 kHz; gelb: positives Vorzeichen, blau: negatives Vorzeichen.

6.4 Zusätzliche Daten aus Kapitel 3.3

6.4.1 Amplitudensweep-Experimente

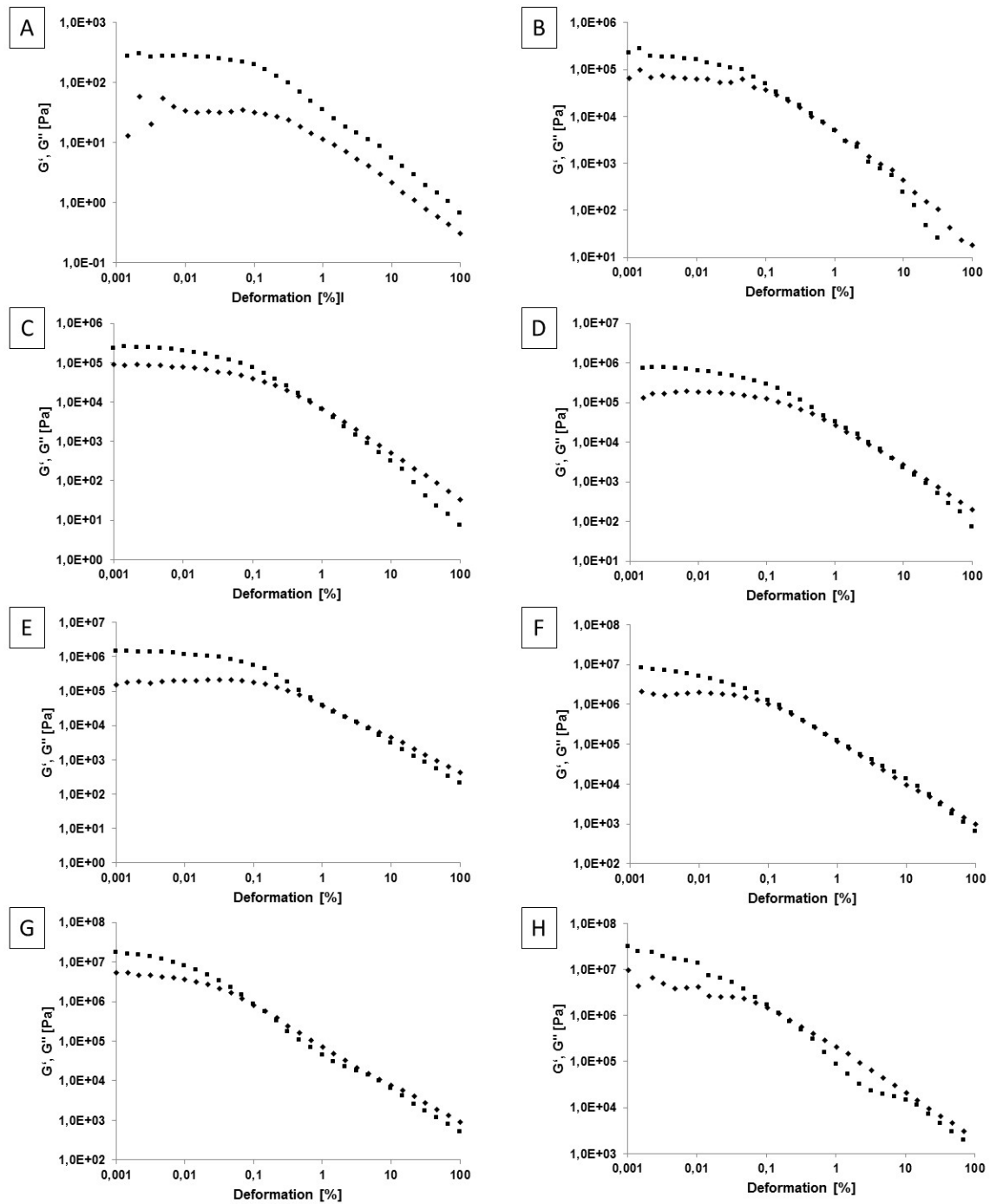


Abbildung 99: Temperatursweep-Experimente der UMH-Hydrogele (5,0 Gew-%) bei pH 10 mit (A) 1,0 Äq. Phosphatsalz, (B) 1,5 Äq. Phosphatsalz, (C) 2,0 Äq. Phosphatsalz, (D) 3,0 Äq. Phosphatsalz, (E) 4,0 Äq. Phosphatsalz, (F) 5,0 Äq. Phosphatsalz, (G) 6,0 Äq. Phosphatsalz, (H) 8,0 Äq. Phosphatsalz.

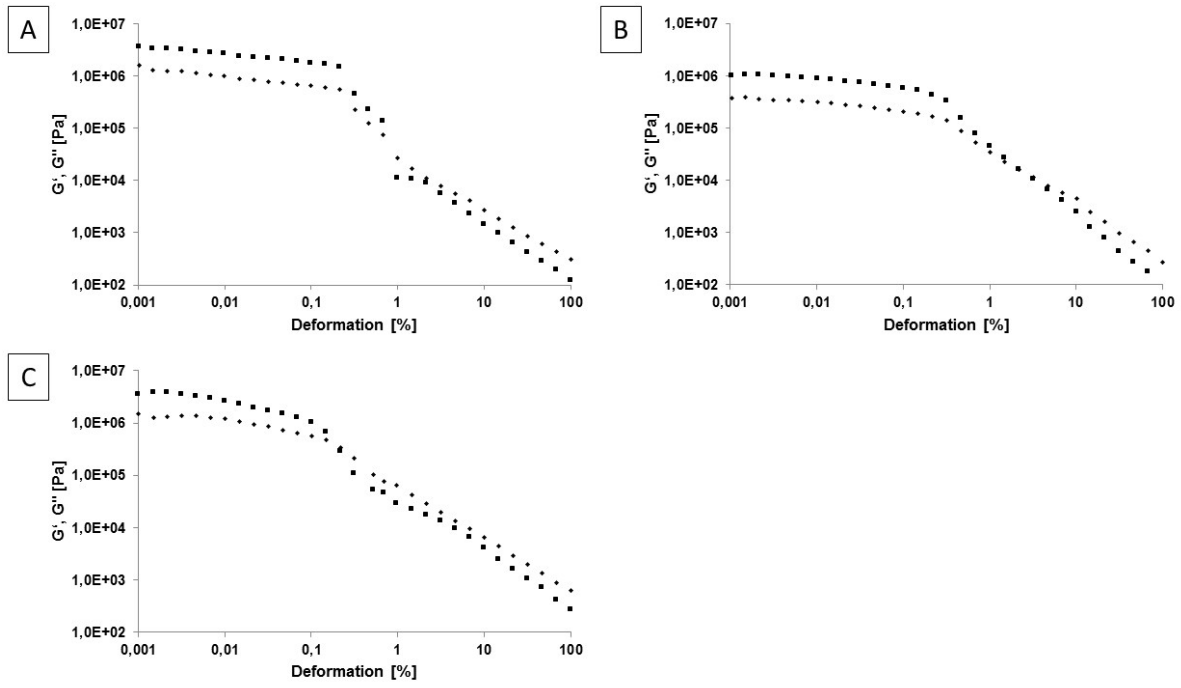


Abbildung 100: Amplitudensweep-Experimente der UMH-Hydrogele (5,0 Gew-%) mit 5,0 Äq. Phosphatsalz bei (A) pH 10, (B) pH 11, (C) pH 12; Quadrate: Speichermodul G' ; Rauten: Verlustmodul G'' .

6.4.2 Temperatursweep-Experimente

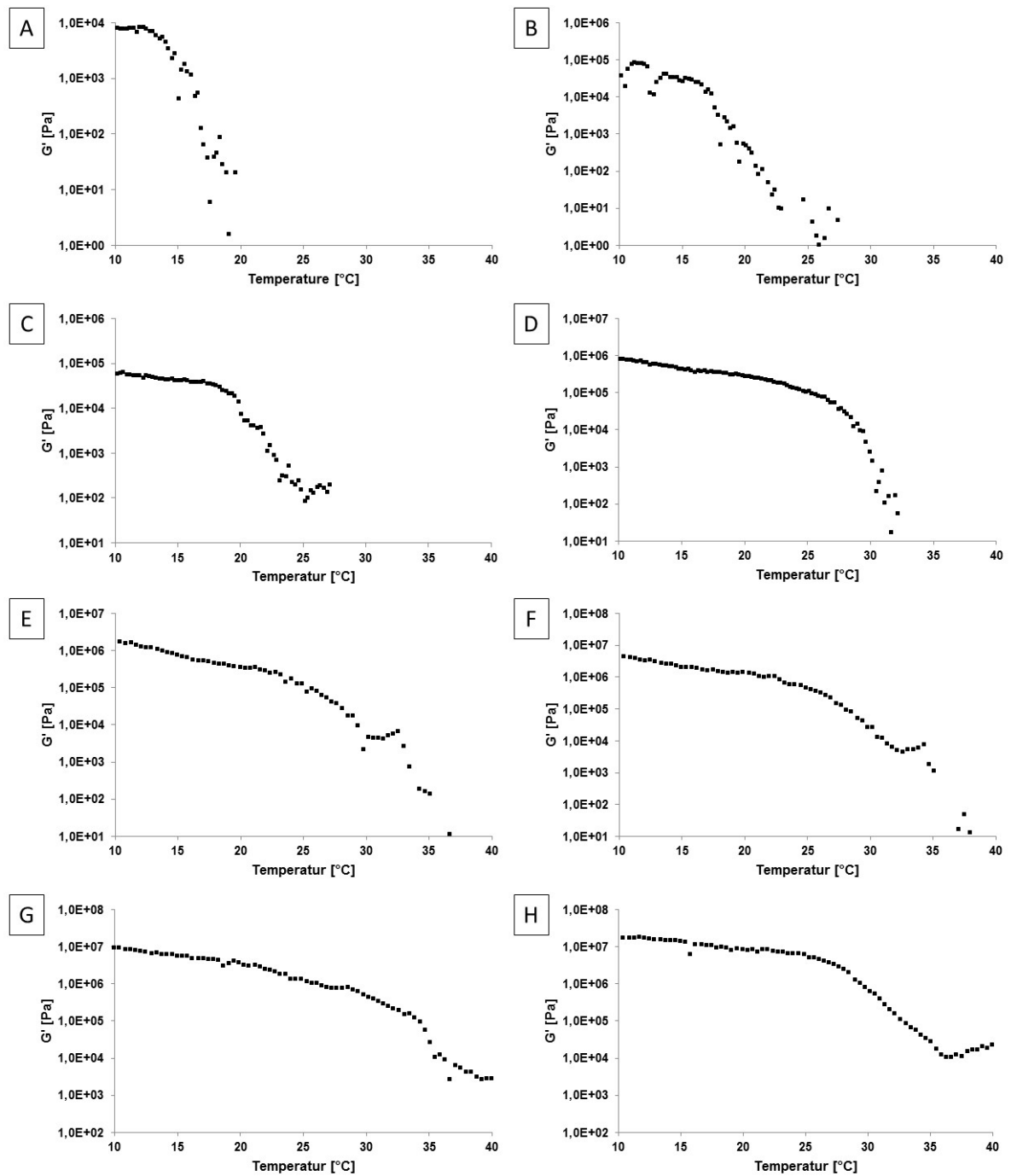


Abbildung 101: Temperatursweep-Experimente der UMH-Hydrogele (5,0 Gew-%) bei pH 10 mit (A) 1,0 Äq. Phosphatsalz, (B) 1,5 Äq. Phosphatsalz, (C) 2,0 Äq. Phosphatsalz, (D) 3,0 Äq. Phosphatsalz, (E) 4,0 Äq. Phosphatsalz, (F) 5,0 Äq. Phosphatsalz, (G) 6,0 Äq. Phosphatsalz, (H) 8,0 Äq. Phosphatsalz.

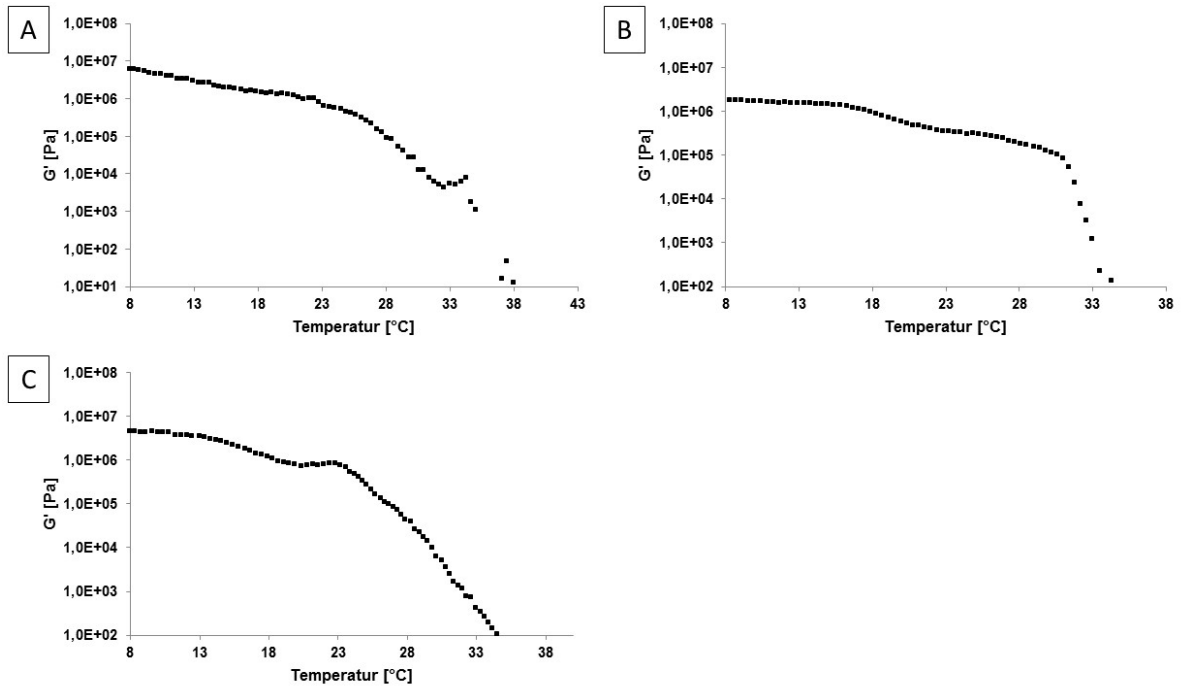


Abbildung 102: Temperatursweep-Experimente der UMH-Hydrogele (5,0 Gew-%) mit 5,0 Äq. Phosphatsalz bei (A) pH 10, (B) pH 11, (C) pH 12.

6.4.3 Regenerations-Experimente

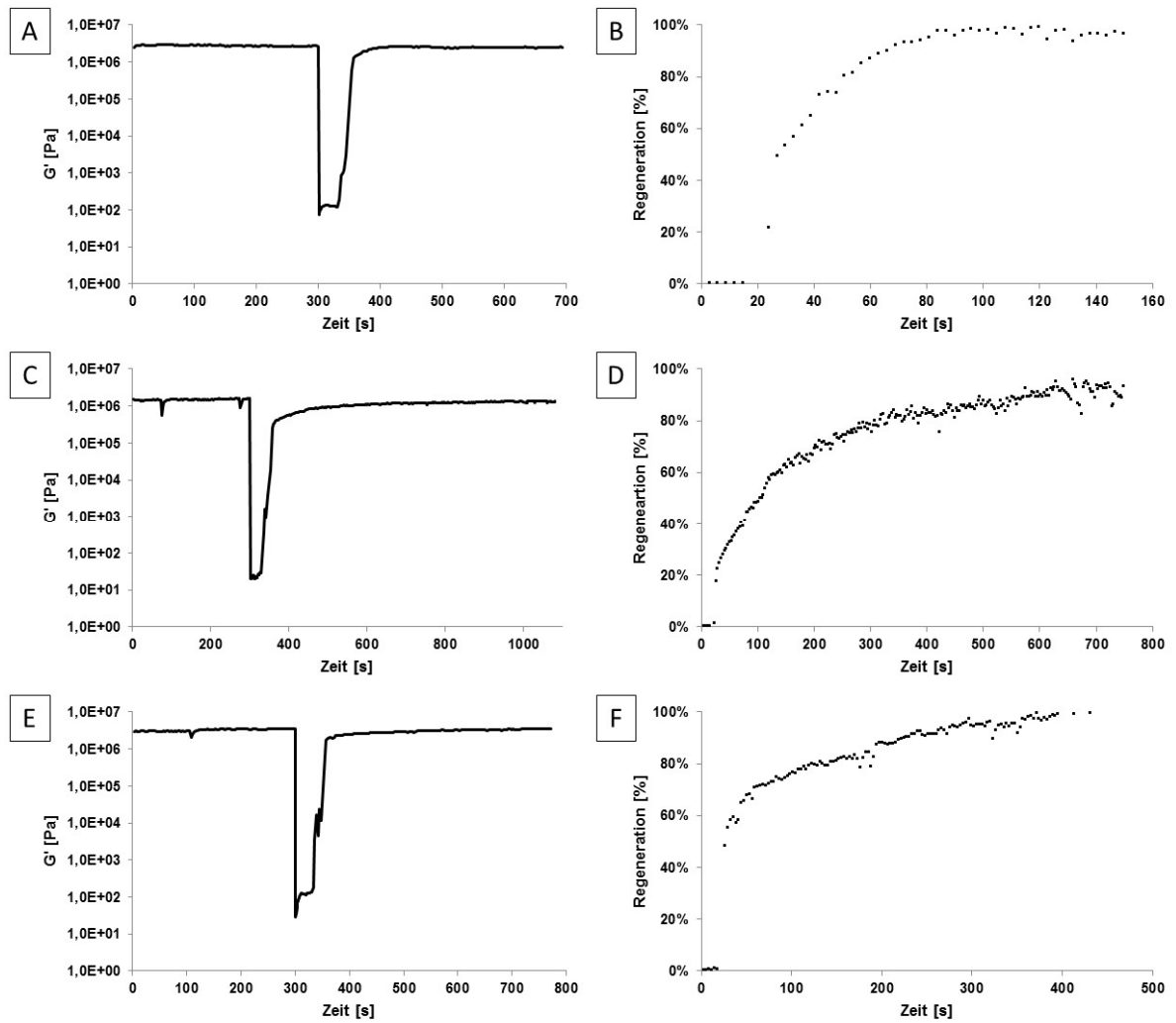


Abbildung 103: Regenerations-Experimente (links) und prozentuale Regeneration ab Beginn der Regenerationsphase (rechts) der UMH-Hydrogele (5,0 Gew-%) mit 5,0 Äq. Phosphatsalz bei (A)+(B) pH 10, (C)+(D) pH 11, (E)+(F) pH 12.

6.4.4 Frequenzsweep-Experimente

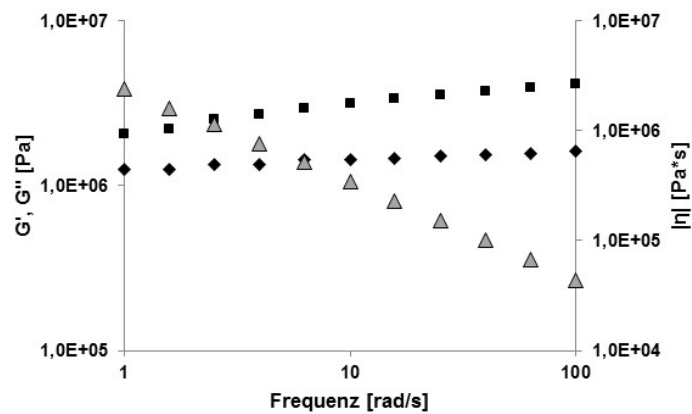


Abbildung 104: Frequenzsweep des UMH-Hydrogels (5,0 Gew-%) mit 5,0 Äq. Phosphatsalz bei 0,01% Deformation.

6.4.5 FTIR-Spektrum

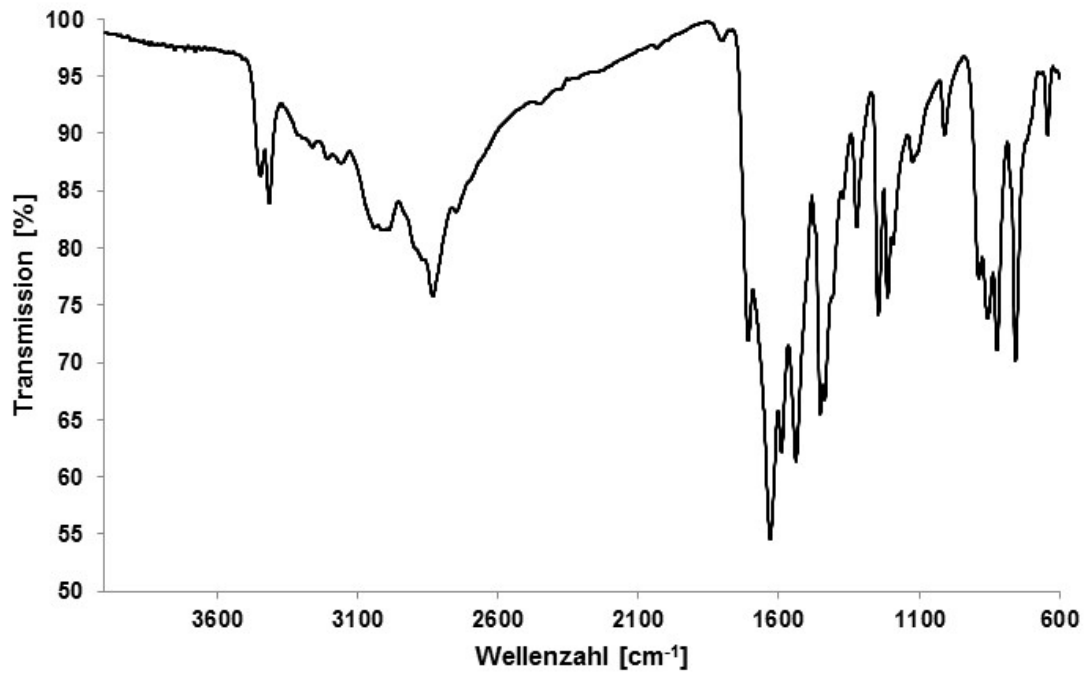


Abbildung 105: FTIR-Spektrum von reinem UMH-Feststoff.

6.4.6 REM-Aufnahmen

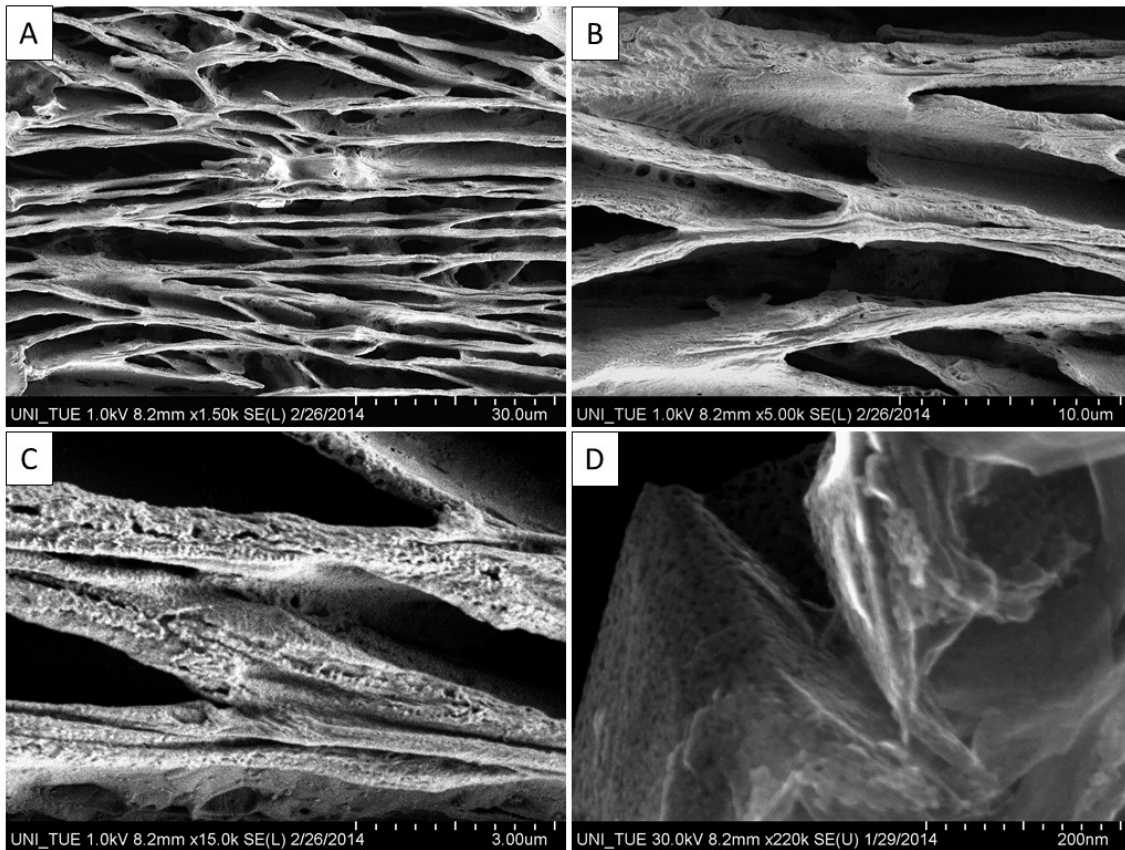


Abbildung 106: REM-Aufnahmen von UMH-Xerogelen (5,0 Gew-% mit 5 Äq. Phosphatsalz) bei pH 10.

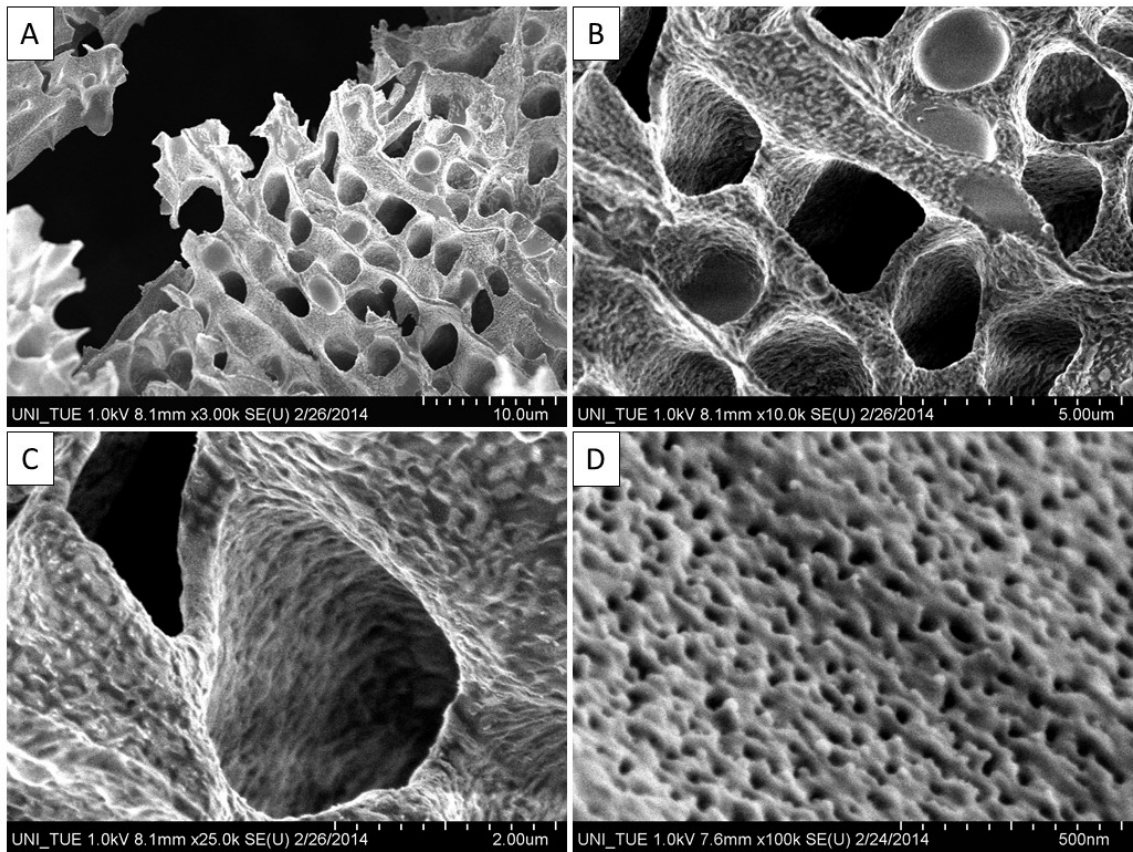


Abbildung 107: REM-Aufnahmen von UMH-Xerogelen (5,0 Gew-% mit 5 Äq. Phosphatsalz) bei pH 11.

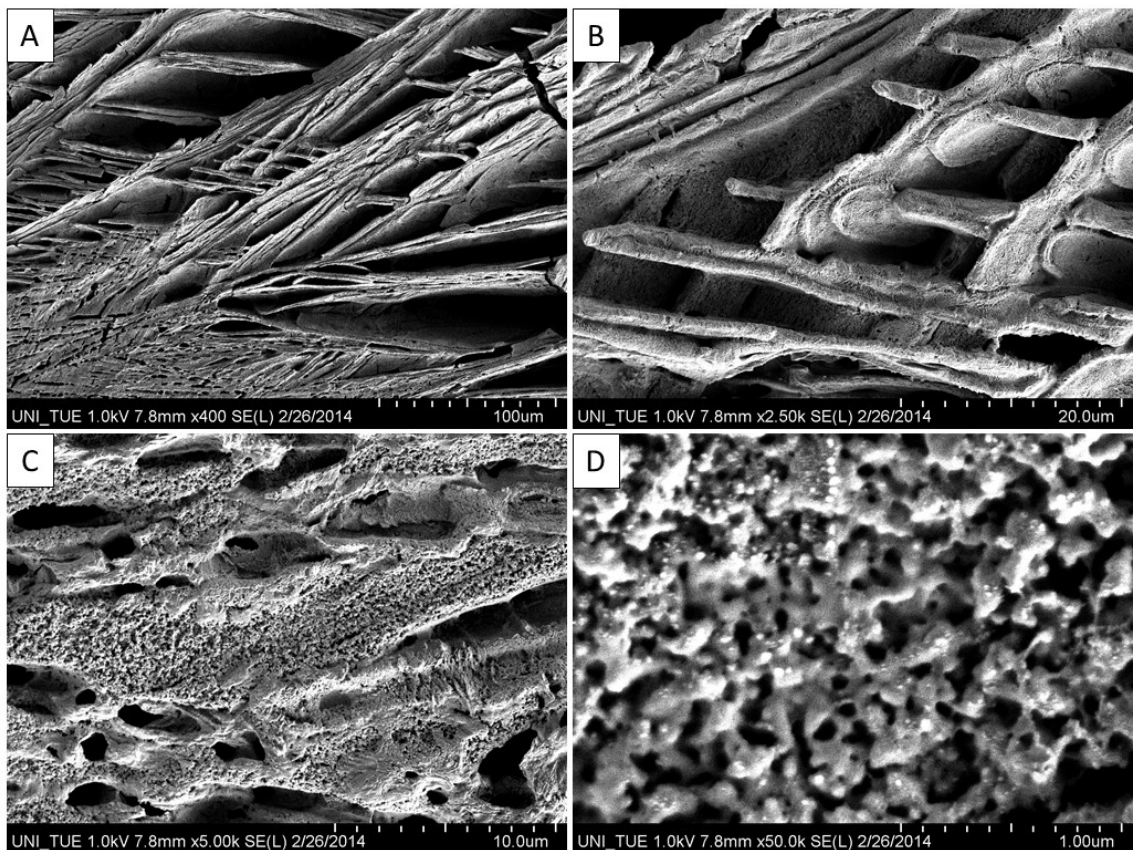


Abbildung 108: REM-Aufnahmen von UMH-Xerogelen (5,0 Gew-% mit 5 Äq. Phosphatsalz) bei pH 12.

6.5 Literaturverzeichnis

- [1] J. M. Hayes, *Nature* **1996**, *384*, 21-22.
- [2] S. J. Mojzsis, G. Arrhenius, K. D. McKeegan, T. M. Harrison, A. P. Nutman, C. R. L. Friend, *Nature* **1996**, *384*, 55-59.
- [3] J. W. Schopf, *Science* **1993**, *260*, 640-646.
- [4] J. McNichol, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2008**, *36*, 255-261.
- [5] S. Mann, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2131-2141.
- [6] P. Forterre, S. Gribaldo, *HFSP J.* **2007**, *1*, 156-168.
- [7] S. Mann, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2013**, *52*, 155-162.
- [8] A. Y. Mulikidjanian, A. Y. Bychkov, D. V. Dibrova, M. Y. Galperin, E. V. Koonin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, E821-E830.
- [9] S. L. Miller, *Science* **1953**, *117*, 528-529.
- [10] K. Plankensteiner, H. Reiner, B. Schranz, B. M. Rode, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2004**, *43*, 1886-1888.
- [11] A. Bar-Nun, N. Bar-Nun, S. H. Bauer, C. Sagan, *Science* **1970**, *168*, 470-472.
- [12] K. Harada, S. W. Fox, *Nature* **1964**, *201*, 335-336.
- [13] C. Palm, M. Calvin, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 2115-2121.
- [14] A. Ricardo, M. A. Carrigan, A. N. Olcott, S. A. Benner, *Science* **2004**, *303*, 196-196.
- [15] D. Müller, S. Pitsch, A. Kittaka, E. Wagner, C. E. Wintner, A. Eschenmoser, G. Ohlofjgewidmet, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1410-1468.
- [16] S. Pitsch, A. Eschenmoser, B. Gedulín, S. Hui, G. Arrhenius, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1995**, *25*, 297-334.
- [17] J. P. Ferris, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1968**, *33*, 693-704.
- [18] M. P. Robertson, S. L. Miller, *Nature* **1995**, *375*, 772-774.
- [19] M. G. Schwendinger, B. M. Rode, *Anal. Sci.* **1989**, *5*, 411-414.
- [20] Y. Suwannachot, B. M. Rode, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1999**, *29*, 463-471.
- [21] N. Lahav, D. White, S. Chang, *Science* **1978**, *201*, 67-69.
- [22] J. Bujdak, H. Slošiarikova, N. Texler, M. Schwendinger, B. M. Rode, *Monatsh. Chem.* **1994**, *125*, 1033-1039.
- [23] J. Bujdák, K. Faybíková, A. Eder, Y. Yongyai, B. M. Rode, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1995**, *25*, 431-441.
- [24] B. M. Rode, H. L. Son, Y. Suwannachot, J. Bujdak, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1999**, *29*, 273-286.
- [25] W. Huang, J. P. Ferris, *Chem. Commun.* **2003**, 1458-1459.
- [26] J. P. Ferris, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2006**, *361*, 1777-1786.
- [27] O. Leslie E, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *39*, 99-123.
- [28] D. Fitz, H. Reiner, M. Rode Bernd, in *Pure and Applied Chemistry, Vol. 79*, **2007**, p. 2101.
- [29] G. F. Joyce, *Nature* **2002**, *418*, 214-221.
- [30] A. Eschenmoser, *Science* **1999**, *284*, 2118-2124.

- [31] B. M. Rode, *Peptides* **1999**, 20, 773-786.
- [32] S. A. Benner, H.-J. Kim, M. A. Carrigan, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 2025-2034.
- [33] B. M. Rode, Y. Suwannachot, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 190–192, 1085-1099.
- [34] K. Ruiz-Mirazo, C. Briones, A. de la Escosura, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 285-366.
- [35] U. F. Müller, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63, 1278-1293.
- [36] J. T. Trevors, G. H. Pollack, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2005**, 89, 1-8.
- [37] J. T. Trevors, *C. R. Biol.* **2011**, 334, 269-272.
- [38] P. Andras, C. Andras, *Med. Hypotheses*, 64, 678-688.
- [39] J. Bujdák, B. M. Rode, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 90, 1-7.
- [40] K. Sakata, H. Yabuta, T. Kondo, *Geochem. J.* **2014**, 48, 219-230.
- [41] M. G. Schwendinger, B. M. Rode, *Inorg. Chim. Acta* **1991**, 186, 247-251.
- [42] J. Bujdák, B. M. Rode, *J. Mol. Evol.* **1997**, 45, 457-466.
- [43] J. Bujdák, A. Eder, Y. Yongyai, K. Faybíkóvá, B. M. Rode, *J. Inorg. Biochem.* **1996**, 61, 69-78.
- [44] K. Hanabusa, Y. Matsumoto, T. Miki, T. Koyama, H. Shirai, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1401-1402.
- [45] K. Hanabusa, M. Matsumoto, M. Kimura, A. Kakehi, H. Shirai, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, 224, 231-244.
- [46] S. K. Maji, M. G. B. Drew, A. Banerjee, *Chem. Commun.* **2001**, 1946-1947.
- [47] M. Reches, Y. Porat, E. Gazit, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 35475-35480.
- [48] K. Lu, J. Jacob, P. Thiyagarajan, V. P. Conticello, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6391-6393.
- [49] L. Tjernberg, W. Hosia, N. Bark, J. Thyberg, J. Johansson, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 43243-43246.
- [50] S. Vauthey, S. Santoso, H. Gong, N. Watson, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 5355-5360.
- [51] M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, 300, 625-627.
- [52] Y. Song, S. R. Challa, C. J. Medforth, Y. Qiu, R. K. Watt, D. Pena, J. E. Miller, F. v. Swol, J. A. Shelnutt, *Chem. Commun.* **2004**, 1044-1045.
- [53] M. Reches, E. Gazit, *Nano Lett.* **2004**, 4, 581-585.
- [54] A. Dehsorkhi, V. Castelletto, I. W. Hamley, *J. Pept. Sci.* **2014**, 20, 453-467.
- [55] I. W. Hamley, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2007**, 46, 8128-8147.
- [56] I. W. Hamley, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2014**, 53, 6866-6881.
- [57] A. Rawat, R. Nagaraj, *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14, 740-746.
- [58] O. Carny, E. Gazit, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2011**, 41, 121-132.
- [59] R. A. Illos, F. R. Bisogno, G. Clodic, G. Bolbach, I. Weissbuch, M. Lahav, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8651-8659.
- [60] A. Brack, L. E. Orgel, *Nature* **1975**, 256, 383-387.
- [61] L. Leman, L. Orgel, M. R. Ghadiri, *Science* **2004**, 306, 283-286.
- [62] B. M. Rode, W. Flader, C. Sottriffer, A. Righi, *Peptides* **1999**, 20, 1513-1516.

- [63] O. Carny, E. Gazit, *FASEB J.* **2005**, *19*, 1051-1055.
- [64] M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. W. Wiltzius, H. T. McFarlane, A. O. Madsen, C. Riek, D. Eisenberg, *Nature* **2007**, *447*, 453-457.
- [65] D. K. Smith, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 684-694.
- [66] S. Mann, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 166-173.
- [67] E. GAZIT, *FASEB J.* **2002**, *16*, 77-83.
- [68] D. M. Blakaj, K. J. McConnell, D. L. Beveridge, A. M. Baranger, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2548-2551.
- [69] S. M. Butterfield, M. L. Waters, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9580-9581.
- [70] S. M. Butterfield, C. M. Goodman, V. M. Rotello, M. L. Waters, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2004**, *43*, 724-727.
- [71] S. Fernandez-Lopez, H.-S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxon, M. R. Ghadiri, *Nature* **2001**, *412*, 452-455.
- [72] T. C. Holmes, S. de Lacalle, X. Su, G. Liu, A. Rich, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 6728-6733.
- [73] C. M. Rufo, Y. S. Moroz, O. V. Moroz, J. Stöhr, T. A. Smith, X. Hu, W. F. DeGrado, I. V. Korendovych, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 303-309.
- [74] J. Greenwald, R. Riek, *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 417-426.
- [75] C. P. J. Maury, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2009**, *39*, 141-150.
- [76] O. V. Makhlynets, P. M. Gosavi, I. V. Korendovych, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2016**, *55*, 9017-9020.
- [77] M. P. Friedmann, V. Torbeev, V. Zelenay, A. Sobol, J. Greenwald, R. Riek, *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143948.
- [78] B. Rubinov, N. Wagner, H. Rapaport, G. Ashkenasy, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2009**, *48*, 6683-6686.
- [79] Q. Wang, Z. Yang, X. Zhang, X. Xiao, C. K. Chang, B. Xu, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2007**, *46*, 4285-4289.
- [80] Q. Wang, Z. Yang, M. Ma, C. K. Chang, B. Xu, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 5073-5078.
- [81] Q. Wang, Z. Yang, Y. Gao, W. Ge, L. Wang, B. Xu, *Soft Matter* **2008**, *4*, 550-553.
- [82] M.-O. M. Piepenbrock, G. O. Lloyd, N. Clarke, J. W. Steed, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1960-2004.
- [83] J. W. Steed, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1379-1383.
- [84] J. Raeburn, A. Zamith Cardoso, D. J. Adams, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5143-5156.
- [85] J. A. Foster, M. Piepenbrock, Marc-Oliver, G. O. Lloyd, N. Clarke, A. K. Howard, Judith, J. W. Steed, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 1037-1043.
- [86] G. O. Lloyd, J. W. Steed, *Soft Matter* **2011**, *7*, 75-84.
- [87] G. O. Lloyd, M.-O. M. Piepenbrock, J. A. Foster, N. Clarke, J. W. Steed, *Soft Matter* **2012**, *8*, 204-216.
- [88] J. A. Foster, R. M. Edkins, G. J. Cameron, N. Colgin, K. Fucke, S. Ridgeway, A. G. Crawford, T. B. Marder, A. Beeby, S. L. Cobb, J. W. Steed, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 279-291.

- [89] S. R. Haines, R. G. Harrison, *Chem. Commun.* **2002**, 2846-2847.
- [90] T. Naota, H. Koori, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9324-9325.
- [91] K. Isozaki, H. Takaya, T. Naota, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2007**, *46*, 2855-2857.
- [92] Z. L. Pianowski, J. Karcher, K. Schneider, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 3143-3146.
- [93] S. Kume, K. Kuroiwa, N. Kimizuka, *Chem. Commun.* **2006**, 2442-2444.
- [94] S. Banerjee, R. K. Das, U. Maitra, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 6649-6687.
- [95] A. R. Hirst, B. Escuder, J. F. Miravet, D. K. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2008**, *47*, 8002-8018.
- [96] E. Melis Sardan, C. Goksu, K. Mohammad Aref, O. G. Mustafa, *Nanotechnology* **2016**, *27*, 402002.
- [97] L. A. Estroff, A. D. Hamilton, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1201-1218.
- [98] L. Brunsveld, B. J. B. Folmer, E. W. Meijer, R. P. Sijbesma, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 4071-4098.
- [99] P. J. Flory, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1974**, *57*, 7-18.
- [100] A. Keller, *Faraday Discuss.* **1995**, *101*, 1-49.
- [101] R. Wang, C. Geiger, L. Chen, B. Swanson, D. G. Whitten, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2399-2400.
- [102] K. Sakurai, Y. Jeong, K. Koumoto, A. Friggeri, O. Gronwald, S. Sakurai, S. Okamoto, K. Inoue, S. Shinkai, *Langmuir* **2003**, *19*, 8211-8217.
- [103] V. Jayawarna, M. Ali, T. A. Jowitt, A. F. Miller, A. Saiani, J. E. Gough, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 611-614.
- [104] A. M. Smith, R. J. Williams, C. Tang, P. Coppo, R. F. Collins, M. L. Turner, A. Saiani, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 37-41.
- [105] B. A. Simmons, C. E. Taylor, F. A. Landis, V. T. John, G. L. McPherson, D. K. Schwartz, R. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2414-2421.
- [106] A. Aggeli, I. A. Nyrkova, M. Bell, R. Harding, L. Carrick, T. C. B. McLeish, A. N. Semenov, N. Boden, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 11857-11862.
- [107] S. Toksoz, H. Acar, M. O. Guler, *Soft Matter* **2010**, *6*, 5839-5849.
- [108] H. Fenniri, P. Mathivanan, K. L. Vidale, D. M. Sherman, K. Hallenga, K. V. Wood, J. G. Stowell, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3854-3855.
- [109] C. Yan, D. J. Pochan, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3528-3540.
- [110] E. K. Johnson, D. J. Adams, P. J. Cameron, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 2024-2027.
- [111] L. E. Buerkle, S. J. Rowan, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 6089-6102.
- [112] A. Noro, M. Hayashi, Y. Matsushita, *Soft Matter* **2012**, *8*, 6416-6429.
- [113] H. Wang, Z. Yang, *Nanoscale* **2012**, *4*, 5259-5267.
- [114] H. Wang, Z. Yang, D. J. Adams, *Mater. Today* **2012**, *15*, 500-507.
- [115] A. R. Hirst, D. K. Smith, M. C. Feiters, H. P. M. Geurts, A. C. Wright, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9010-9011.
- [116] H. Basit, A. Pal, S. Sen, S. Bhattacharya, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6534-6545.
- [117] J. B. Beck, S. J. Rowan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13922-13923.
- [118] W. C. Yount, H. Juwarker, S. L. Craig, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15302-15303.

- [119] W. Weng, J. B. Beck, A. M. Jamieson, S. J. Rowan, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11663-11672.
- [120] H. Suezawa, T. Yoshida, M. Hirota, H. Takahashi, Y. Umezawa, K. Honda, S. Tsuboyama, M. Nishio, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 2053-2058.
- [121] M. Nishio, Y. Umezawa, K. Honda, S. Tsuboyama, H. Suezawa, *CrystEngComm* **2009**, *11*, 1757-1788.
- [122] O. Takahashi, Y. Kohno, M. Nishio, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6049-6076.
- [123] S. Tartaglia, A. Scarso, P. Padovan, O. De Lucchi, F. Fabris, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3926-3929.
- [124] R. Carrillo, M. López-Rodríguez, V. S. Martín, T. Martín, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2009**, *48*, 7803-7808.
- [125] N. P. Barwell, M. P. Crump, A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2009**, *48*, 7673-7676.
- [126] M. Nishio, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6923-6950.
- [127] V. R. Thalladi, T. Smolka, A. Gehrke, R. Boese, R. Sustmann, *New J. Chem.* **2000**, *24*, 143-147.
- [128] M. Harigai, M. Kataoka, Y. Imamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10646-10647.
- [129] M. Nishio, Y. Umezawa, J. Fantini, M. S. Weiss, P. Chakrabarti, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 12648-12683.
- [130] M. Kumar, P. V. Balaji, *J. Mol. Model.* **2014**, *20*, 2136.
- [131] Y. Zhang, B. Shi, H. Li, W. Qu, G. Gao, Q. Lin, H. Yao, T. Wei, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4722-4725.
- [132] L. S. Birchall, S. Roy, V. Jayawarna, M. Hughes, E. Irvine, G. T. Okorogheye, N. Saudi, E. De Santis, T. Tuttle, A. A. Edwards, R. V. Ulijn, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1349-1355.
- [133] A. Dasgupta, J. H. Mondal, D. Das, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 9117-9149.
- [134] J. W. Steed, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3686-3699.
- [135] J. T. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2004**, *43*, 668-698.
- [136] R. Iwaura, K. Yoshida, M. Masuda, K. Yase, T. Shimizu, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 3047-3053.
- [137] G. Wang, A. D. Hamilton, *Chem. Commun.* **2003**, 310-311.
- [138] M. Suzuki, M. Yumoto, M. Kimura, H. Shirai, K. Hanabusa, *Chem. Commun.* **2002**, 884-885.
- [139] M. Suzuki, M. Yumoto, M. Kimura, H. Shirai, K. Hanabusa, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 348-354.
- [140] S. Kiyonaka, K. Sugiyasu, S. Shinkai, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10954-10955.
- [141] J. P. Schneider, D. J. Pochan, B. Ozbas, K. Rajagopal, L. Pakstis, J. Kretsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 15030-15037.
- [142] R. S. Jacob, D. Ghosh, P. K. Singh, S. K. Basu, N. N. Jha, S. Das, P. K. Sukul, S. Patil, S. Sathaye, A. Kumar, A. Chowdhury, S. Malik, S. Sen, S. K. Maji, *Biomaterials* **2015**, *54*, 97-105.
- [143] S. Roy, A. Baral, A. Banerjee, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14950-14957.

- [144] T. V. Chirila, H. H. Lee, M. Odden, M. M. L. Nieuwenhuizen, I. Blakey, T. M. Nicholson, *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131*, n/a-n/a.
- [145] J. Nanda, A. Biswas, A. Banerjee, *Soft Matter* **2013**, *9*, 4198-4208.
- [146] J. Nanda, A. Banerjee, *Soft Matter* **2012**, *8*, 3380-3386.
- [147] H. D. Lu, M. B. Charati, I. L. Kim, J. A. Burdick, *Biomaterials* **2012**, *33*, 2145-2153.
- [148] A. Hatefi, B. Amsden, *J. Control. Release* **2002**, *80*, 9-28.
- [149] S. Ramachandran, Y. Tseng, Y. B. Yu, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1316-1321.
- [150] C. T. S. Wong Po Foo, J. S. Lee, W. Mulyasasmita, A. Parisi-Amon, S. C. Heilshorn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 22067-22072.
- [151] G. A. Silva, C. Czeisler, K. L. Niece, E. Beniash, D. A. Harrington, J. A. Kessler, S. I. Stupp, *Science* **2004**, *303*, 1352-1355.
- [152] Y. S. Pek, A. C. A. Wan, J. Y. Ying, *Biomaterials* **2010**, *31*, 385-391.
- [153] Y. S. Pek, C. A. Wan, Andrew, A. Shekaran, L. Zhuo, J. Y. Ying, *Nat. Nano* **2008**, *3*, 671-675.
- [154] J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Science* **2001**, *294*, 1684-1688.
- [155] N. Park, S. H. Um, H. Funabashi, J. Xu, D. Luo, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 432-437.
- [156] J. Kisiday, M. Jin, B. Kurz, H. Hung, C. Semino, S. Zhang, A. J. Grodzinsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 9996-10001.
- [157] D. M. Ryan, B. L. Nilsson, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 18-33.
- [158] Y. Li, J. Rodrigues, H. Tomas, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2193-2221.
- [159] V. J. Nebot, J. Armengol, J. Smets, S. F. Prieto, B. Escuder, J. F. Miravet, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 4063-4072.
- [160] S. Marchesan, C. D. Easton, F. Kushkaki, L. Waddington, P. G. Hartley, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2195-2197.
- [161] R. Orbach, I. Mironi-Harpaz, L. Adler-Abramovich, E. Mossou, E. P. Mitchell, V. T. Forsyth, E. Gazit, D. Seliktar, *Langmuir* **2012**, *28*, 2015-2022.
- [162] K. A. Houton, K. L. Morris, L. Chen, M. Schmidtman, J. T. A. Jones, L. C. Serpell, G. O. Lloyd, D. J. Adams, *Langmuir* **2012**, *28*, 9797-9806.
- [163] S. Grigoriou, E. K. Johnson, L. Chen, D. J. Adams, T. D. James, P. J. Cameron, *Soft Matter* **2012**, *8*, 6788-6791.
- [164] X. Zhang, X. Chu, L. Wang, H. Wang, G. Liang, J. Zhang, J. Long, Z. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2012**, *51*, 4388-4392.
- [165] R. Wieduwild, M. Tsurkan, K. Chwalek, P. Murawala, M. Nowak, U. Freudenberg, C. Neinhuis, C. Werner, Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2919-2922.
- [166] S. Iqbal, F. Rodriguez-Llansola, B. Escuder, J. F. Miravet, I. Verbruggen, R. Willem, *Soft Matter* **2010**, *6*, 1875-1878.
- [167] A. M. Jonker, D. W. P. M. Löwik, J. C. M. van Hest, *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 759-773.
- [168] J. Kopeček, J. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2012**, *51*, 7396-7417.
- [169] C. Tomasini, N. Castellucci, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 156-172.
- [170] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333-366.
- [171] T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 384-396.

- [172] K. Sasaki, S. Dockerill, D. A. Adamiak, I. J. Tickle, T. Blundell, *Nature* **1975**, 257, 751-757.
- [173] R. M. Epand, *Mol. Pharmacol.* **1982**, 22, 105-108.
- [174] J. S. Pedersen, *J. Diabetes Sci. Technol.* **2010**, 4, 1357-1367.
- [175] S. K. Maji, M. H. Perrin, M. R. Sawaya, S. Jessberger, K. Vadodaria, R. A. Rissman, P. S. Singru, K. P. R. Nilsson, R. Simon, D. Schubert, D. Eisenberg, J. Rivier, P. Sawchenko, W. Vale, R. Riek, *Science* **2009**, 325, 328-332.
- [176] A. Mahler, M. Reches, M. Rechter, S. Cohen, E. Gazit, *Adv. Mater.* **2006**, 18, 1365-1370.
- [177] M. Ma, Y. Kuang, Y. Gao, Y. Zhang, P. Gao, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2719-2728.
- [178] A. Saiani, A. Mohammed, H. Frielinghaus, R. Collins, N. Hodson, C. M. Kielty, M. J. Sherratt, A. F. Miller, *Soft Matter* **2009**, 5, 193-202.
- [179] J. Shi, Y. Gao, Z. Yang, B. Xu, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, 7, 167-172.
- [180] N. S. de Groot, T. Parella, F. X. Aviles, J. Vendrell, S. Ventura, *Biophys. J.* **2007**, 92, 1732-1741.
- [181] M. J. Krysmann, V. Castelletto, A. Kelarakis, I. W. Hamley, R. A. Hule, D. J. Pochan, *Biochemistry* **2008**, 47, 4597-4605.
- [182] J. Naskar, G. Palui, A. Banerjee, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 11787-11792.
- [183] H. Wang, C. Yang, M. Tan, L. Wang, D. Kong, Z. Yang, *Soft Matter* **2011**, 7, 3897-3905.
- [184] F. M. Menger, K. L. Caran, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11679-11691.
- [185] Z. Xie, A. Zhang, L. Ye, Z.-g. Feng, *Soft Matter* **2009**, 5, 1474-1482.
- [186] G. P. Moss, P. A. S. Smith, D. Tavernier, in *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 67, **1995**, p. 1307.
- [187] P. K. Vemula, G. John, *Chem. Commun.* **2006**, 2218-2220.
- [188] D. K. Kumar, D. A. Jose, A. Das, P. Dastidar, *Chem. Commun.* **2005**, 4059-4061.
- [189] J.-U. Kim, D. Schollmeyer, M. Brehmer, R. Zentel, *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, 357, 428-433.
- [190] L. A. Estroff, L. Addadi, S. Weiner, A. D. Hamilton, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 137-141.
- [191] M. de Loos, A. Friggeri, J. van Esch, R. M. Kellogg, B. L. Feringa, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1631-1639.
- [192] M. Ávalos, R. Babiano, P. Cintas, A. Gómez-Carretero, J. L. Jiménez, M. Lozano, A. L. Ortiz, J. C. Palacios, A. Pinazo, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 5656-5669.
- [193] F. Rodríguez-Llansola, B. Escuder, J. F. Miravet, D. Hermida-Merino, I. W. Hamley, C. J. Cardin, W. Hayes, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 7960-7962.
- [194] M. Yamanaka, N. Haraya, S. Yamamichi, *Chem. Asian J.* **2011**, 6, 1022-1025.
- [195] F. Rodríguez-Llansola, D. Hermida-Merino, B. Nieto-Ortega, F. J. Ramírez, J. T. L. Navarrete, J. Casado, I. W. Hamley, B. Escuder, W. Hayes, J. F. Miravet, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 14725-14731.
- [196] Y. Jinno, M. Yamanaka, *Chem. Asian J.* **2012**, 7, 1768-1771.
- [197] D. Higashi, M. Yoshida, M. Yamanaka, *Chem. Asian J.* **2013**, 8, 2584-2587.

- [198] K. Liu, J. W. Steed, *Soft Matter* **2013**, 9, 11699-11705.
- [199] M. Yamanaka, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2013**, 77, 33-48.
- [200] P. Terech, R. G. Weiss, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 3133-3160.
- [201] M. de Loos, Alette G. J. Ligtenbarg, J. van Esch, H. Kooijman, Anthony L. Spek, R. Hage, Richard M. Kellogg, Ben L. Feringa, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2000, 3675-3678.
- [202] J. H. van Esch, F. Schoonbeek, M. de Loos, H. Kooijman, A. L. Spek, R. M. Kellogg, B. L. Feringa, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 937-950.
- [203] H. Kenji, S. Kouji, H. Kazunori, K. Mutsumi, S. Hirofusa, *Chem. Lett.* **1996**, 25, 885-886.
- [204] M. D. Segarra-Maset, V. J. Nebot, J. F. Miravet, B. Escuder, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 7086-7098.
- [205] K. Araki, I. Yoshikawa, in *Low Molecular Mass Gelator*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2005**, pp. 133-165.
- [206] N. Sreenivasachary, J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 5938-5943.
- [207] N. Sreenivasachary, J.-M. Lehn, *Chem. Asian J.* **2008**, 3, 134-139.
- [208] M. Gellert, M. N. Lipsett, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1962**, 48, 2013-2018.
- [209] Y. Yu, D. Nakamura, K. DeBoyace, A. W. Neisius, L. B. McGown, *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 1130-1134.
- [210] L. E. Buerkle, Z. Li, A. M. Jamieson, S. J. Rowan, *Langmuir* **2009**, 25, 8833-8840.
- [211] W. Guschlbauer, J.-F. Chantot, D. Thiele, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1990**, 8, 491-511.
- [212] J. Iball, C. H. Morgan, H. R. Wilson, *Nature* **1963**, 199, 688-689.
- [213] S. M. Park, Y. S. Lee, B. H. Kim, *Chem. Commun.* **2003**, 2912-2913.
- [214] X. Li, Y. Kuang, B. Xu, *Soft Matter* **2012**, 8, 2801-2806.
- [215] L. Moreau, P. Barthélémy, M. El Maataoui, M. W. Grinstaff, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7533-7539.
- [216] X. Li, X. Du, Y. Gao, J. Shi, Y. Kuang, B. Xu, *Soft Matter* **2012**, 8, 7402-7407.
- [217] R. Iwaura, M. Ohnishi-Kameyama, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 6633-6635.
- [218] K. J. Skilling, B. Kellam, M. Ashford, T. D. Bradshaw, M. Marlow, *Soft Matter* **2016**, 12, 8950-8957.
- [219] X. Li, Y. Kuang, H.-C. Lin, Y. Gao, J. Shi, B. Xu, *Angew. Chem. Int. Ed. (1999 -)* **2011**, 50, 9365-9369.
- [220] M. Raynal, P. Ballester, A. Vidal-Ferran, P. W. N. M. van Leeuwen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 1660-1733.
- [221] M. Raynal, P. Ballester, A. Vidal-Ferran, P. W. N. M. van Leeuwen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 1734-1787.
- [222] N. Singh, M. Tena-Solsona, J. F. Miravet, B. Escuder, *Isr. J. Chem.* **2015**, 55, 711-723.
- [223] *Molecular Gels Materials with Self-assembled Fibrillar Networks*, Springer, **2006**.
- [224] D. K. Smith, *Organic Nanostructures*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [225] C. Tang, A. M. Smith, R. F. Collins, R. V. Ulijn, A. Saiani, *Langmuir* **2009**, 25, 9447-9453.

- [226] L. Chen, S. Revel, K. Morris, L. C. Serpell, D. J. Adams, *Langmuir* **2010**, *26*, 13466-13471.
- [227] T. K. Harris, G. J. Turner, *IUBMB Life* **2002**, *53*, 85-98.
- [228] J. F. M. B. Escuder, *Functional Molecular Gels*, RSC, Cambridge, **2014**.
- [229] M. O. Guler, S. I. Stupp, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12082-12083.
- [230] Z. Huang, S. Guan, Y. Wang, G. Shi, L. Cao, Y. Gao, Z. Dong, J. Xu, Q. Luo, J. Liu, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 2297-2304.
- [231] M. Wang, Y. Lv, X. Liu, W. Qi, R. Su, Z. He, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 14133-14141.
- [232] G. Dodson, A. Wlodawer, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 347-352.
- [233] K. Tanaka, A. Mori, S. Inoue, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 181-185.
- [234] H. Danda, *Synlett* **1991**, *1991*, 263-264.
- [235] F. Schoenebeck, K. N. Houk, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1464-1472.
- [236] F. Rodriguez-Llansola, B. Escuder, J. F. Miravet, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3091-3094.
- [237] F. Rodríguez-Llansola, B. Escuder, J. F. Miravet, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11478-11484.
- [238] F. Rodriguez-Llansola, J. F. Miravet, B. Escuder, *Chem. Commun.* **2009**, 7303-7305.
- [239] C. Berdugo, J. F. Miravet, B. Escuder, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10608-10610.
- [240] N. Singh, K. Zhang, C. A. Angulo-Pachon, E. Mendes, J. H. van Esch, B. Escuder, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5568-5572.
- [241] G. M. Kavanagh, S. B. Ross-Murphy, *Prog. Polym. Sci.* **1998**, *23*, 533-562.
- [242] T. G. Mezger, *The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers*, 2nd ed., Vincent Network GmbH and Co KG, Hannover, **2006**.
- [243] S. Sathaye, A. Mbi, C. Sonmez, Y. Chen, D. L. Blair, J. P. Schneider, D. J. Pochan, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2015**, *7*, 34-68.
- [244] C. M. Macosko, *Rheology: Principles, Measurements, and Applications*, Wiley-VCH, Inc., New York, NY, **1994**.
- [245] S. A. Khan, J.R. Royer and S.R. Raghana, in *Rheology: Tools and Methods. Aviation Fuels with Improved Fire Safety: A proceeding.*, National Academy Press, Washington D.C., **1997**.
- [246] Y. Tseng, K. M. An, O. Esue, D. Wirtz, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 1819-1826.
- [247] H. Geng, L. Ye, A.-y. Zhang, J. Li, Z.-g. Feng, *Langmuir* **2016**, *32*, 4586-4594.
- [248] G. Yu, X. Yan, C. Han, F. Huang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6697-6722.
- [249] A. D. Borthwick, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3641-3716.
- [250] in *Side Reactions in Peptide Synthesis*, Academic Press, Oxford, **2016**, p. iii.
- [251] L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1989**, *29*, 465-474.
- [252] T. Mizoguchi, K. Shigezane, N. Takamura, *Chem. Pharm. Bull.* **1970**, *18*, 1465-1474.
- [253] D.-X. Wang, M.-T. Liang, G.-J. Tian, H. Lin, H.-Q. Liu, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 865-867.
- [254] Z. Yang, G. Liang, B. Xu, *Chem. Commun.* **2006**, 738-740.

- [255] S. Roy, A. Banerjee, *Soft Matter* **2011**, *7*, 5300-5308.
- [256] B. Adhikari, J. Nanda, A. Banerjee, *Soft Matter* **2011**, *7*, 8913-8922.
- [257] A. R. Hirst, D. K. Smith, M. C. Feiters, H. P. M. Geurts, *Langmuir* **2004**, *20*, 7070-7077.
- [258] A. R. Hirst, D. K. Smith, M. C. Feiters, H. P. M. Geurts, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5901-5910.
- [259] Q. Wang, Z. Yang, L. Wang, M. Ma, B. Xu, *Chem. Commun.* **2007**, 1032-1034.
- [260] X. Zhu, P. Duan, L. Zhang, M. Liu, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3429-3437.
- [261] A. R. Hirst, J. F. Miravet, B. Escuder, L. Noirez, V. Castelletto, I. W. Hamley, D. K. Smith, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 372-379.
- [262] J. G. Hardy, A. R. Hirst, D. K. Smith, *Soft Matter* **2012**, *8*, 3399-3406.
- [263] K. S. Partridge, D. K. Smith, G. M. Dykes, P. T. McGrail, *Chem. Commun.* **2001**, 319-320.
- [264] A. R. Hirst, D. K. Smith, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5496-5508.
- [265] D. Yuan, B. Xu, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 5638-5649.
- [266] T. Vermonden, R. Censi, W. E. Hennink, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2853-2888.
- [267] J. C. Thoen, M. A. Lipton, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3947-3954.
- [268] J.-i. Oku, S. Inoue, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 229-230.
- [269] J.-i. Oku, N. Ito, S. Inoue, *Makromol. Chem.* **1982**, *183*, 579-586.
- [270] S. Asada, Y. Kobayashi, S. Inoue, *Makromol. Chem.* **1985**, *186*, 1755-1762.
- [271] M. S. Iyer, K. M. Gigstad, N. D. Namdev, M. Lipton, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4910-4911.
- [272] M. S. Iyer, K. M. Gigstad, N. D. Namdev, M. Lipton, *Amino Acids* **1996**, *11*, 259-268.
- [273] M. L. Bender, B. W. Turnquest, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1652-1655.
- [274] T. C. Bruice, G. L. Schmir, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1663-1667.
- [275] F. Schneider, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 583-592.
- [276] L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501-4524.
- [277] Ö. D. Ekici, M. Paetzel, R. E. Dalbey, *Protein Sci.* **2008**, *17*, 2023-2037.
- [278] A. J. Nicoll, R. K. Allemann, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2175-2180.
- [279] C. Yang, H. Wang, D. Li, L. Wang, *Chin. J. Chem.* **2013**, *31*, 494-500.
- [280] D. Zaramella, P. Scrimin, L. J. Prins, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8396-8399.
- [281] K. S. Broo, H. Nilsson, J. Nilsson, A. Flodberg, L. Baltzer, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4063-4068.
- [282] M. Matsumoto, S. J. Lee, M. L. Waters, M. R. Gagné, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**.
- [283] K. S. Broo, L. Brive, P. Ahlberg, L. Baltzer, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11362-11372.
- [284] L. Baltzer, K. S. Broo, H. Nilsson, J. Nilsson, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 83-91.
- [285] T. Takahashi, M. Cheung, T. Butterweck, S. Schankweiler, M. J. Heller, *Catal. Commun.* **2015**, *59*, 206-210.
- [286] M. J. Heller, J. A. Walder, I. M. Klotz, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2780-2785.

- [287] F. Schneider, in *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, Vol. 348, **1967**, p. 1034.
- [288] F. Schneider, H. Wenck, in *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, Vol. 350, **1969**, p. 1653.
- [289] J. P. Street, K. I. Skorey, R. S. Brown, R. G. Ball, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7669-7679.
- [290] H. E. Armstrong, *J. Chem. Soc.* **1871**, 24, 173-176.
- [291] T. C. Bruice, J. Katzhendler, L. R. Fedor, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 1333-1348.
- [292] F. Schneider, in *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, Vol. 338, **1964**, p. 131.
- [293] J. H. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 3598-3601.
- [294] J. P. Guthrie, D. C. Pike, *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 1951-1969.
- [295] N. Singh, M. P. Conte, R. V. Ulijn, J. F. Miravet, B. Escuder, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 13213-13216.
- [296] H. Bisswanger, *Enzyme kinetics : principles and methods*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [297] G. Yu, M. Xue, Z. Zhang, J. Li, C. Han, F. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 13248-13251.
- [298] K.-R. Wang, D.-S. Guo, B.-P. Jiang, Z.-H. Sun, Y. Liu, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 101-106.
- [299] C. Li, K. Han, J. Li, H. Zhang, J. Ma, X. Shu, Z. Chen, L. Weng, X. Jia, *Org. Lett.* **2012**, 14, 42-45.
- [300] V. Lozano, R. Hernandez, A. Arda, J. Jimenez-Barbero, C. Mijangos, M.-J. Perez-Perez, *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 8862-8870.
- [301] T. D. W. Claridge, in *Tetrahedron Organic Chemistry Series, Vol. Volume 27* (Ed.: D. W. C. Timothy), Elsevier, **2009**, pp. 247-302.
- [302] T. P. Johnston, G. S. McCaleb, J. A. Montgomery, *J. Med. Chem.* **1963**, 6, 669-681.
- [303] Y. Tang, C. L. Heaysman, S. Willis, A. L. Lewis, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, 8, 1141-1159.
- [304] T. Park, S. C. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11582-11590.
- [305] Z. Yang, B. Xu, *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 2385-2393.
- [306] P. K. Sukul, S. Malik, *Soft Matter* **2011**, 7, 4234-4241.
- [307] Y. Gao, M. J. C. Long, J. Shi, L. Hedstrom, B. Xu, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 8404-8406.
- [308] Y. Li, J. Liu, G. Du, H. Yan, H. Wang, H. Zhang, W. An, W. Zhao, T. Sun, F. Xin, L. Kong, Y. Li, A. Hao, J. Hao, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 10321-10326.
- [309] A. Tripathi, P. S. Pandey, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 3558-3560.
- [310] I. Kapoor, E.-M. Schon, J. Bachl, D. Kuhbeck, C. Cativiela, S. Saha, R. Banerjee, S. Roelens, J. J. Marrero-Tellado, D. D. Diaz, *Soft Matter* **2012**, 8, 3446-3456.
- [311] F. A. Miller, C. H. Wilkins, *Anal. Chem.* **1952**, 24, 1253-1294.
- [312] B. Roy, A. Saha, A. Esterrani, A. K. Nandi, *Soft Matter* **2010**, 6, 3337-3345.
- [313] T. Kar, S. K. Mandal, P. K. Das, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 14952-14961.

- [314] R. Shapiro, S. Kang, *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, 232, 1-4.
- [315] N. Iza, M. Gil, J. Morcillo, *J. Mol. Struct.* **1988**, 175, 31-36.
- [316] B. E. Billingham, S. A. Oladepo, G. R. Lopnow, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 7392-7397.
- [317] L. Pérez-Picaso, J. Escalante, H. Olivo, M. Y. Rios, *Molecules* **2009**, 14, 2836.
- [318] T. Coursindel, A. Restouin, G. Dewynter, J. Martinez, Y. Collette, I. Parrot, *Bioorg. Chem.* **2010**, 38, 210-217.
- [319] M. E. Jung, M. A. Lyster, *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 3761-3764.
- [320] M. Martins-Teixeira, V. Campo, M. Biondo, R. Sesti-Costa, Z. Carneiro, J. Silva, C. Ivone, *α -Selective glycosylation affords mucin-related GalNAc amino acids and diketopiperazines active on Trypanosoma cruzi, Vol. 21*, **2013**.
- [321] M. Isaka, S. Palasarn, P. Rachtawee, S. Vimuttipong, P. Kongsaree, *Org. Lett.* **2005**, 7, 2257-2260.
- [322] E. van der Merwe, D. Huang, D. Peterson, G. Kilian, P. J. Milne, M. Van de Venter, C. Frost, *Peptides* **2008**, 29, 1305-1311.
- [323] M. R. Harnden, *J. Chem. Soc. C* **1967**, 2341-2351.
- [324] H. Danda, H. Nishikawa, K. Otaka, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 6740-6741.
- [325] T. Furukawa, T. Akutagawa, H. Funatani, T. Uchida, Y. Hotta, M. Niwa, Y. Takaya, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 2002-2009.
- [326] L. Brunetti, A. Chiavaroli, A. Cocco, C. Ferrante, A. Ferrucci, G. Luisi, G. Orlando, F. Pinnen, M. Vacca, *Pharmacol. Rep.* **2013**, 65, 823-835.
- [327] P. Gockel, R. Vogler, M. Gelinsky, A. Meißner, H. Albrich, H. Vahrenkamp, *Inorg. Chim. Acta* **2001**, 323, 16-22.
- [328] K. Barlos, D. Papaioannou, D. Theodoropoulos, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 1324-1326.
- [329] D. L. Nguyen, R. Seyer, A. Heitz, B. Castro, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1985**, 1025-1031.
- [330] A. N. Chulin, I. L. Rodionov, L. K. Baidakova, L. N. Rodionova, T. A. Balashova, V. T. Ivanov, *J. Pept. Sci.* **2005**, 11, 175-186.
- [331] S. M. Rele, S. S. Iyer, E. L. Chaikof, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 5055-5060.
- [332] L. Bérillon, R. Wagner, P. Knochel, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9117-9121.