

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Synthese

2.1.1 Synthese von Cyclen

1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (**8**), auch als [12]aneN₄ oder Cyclen bezeichnet, wurde in einer fünfstufigen Synthese ausgehend von Diethylen-triamin (**1**) und Diethanolamin (**4**) synthetisiert. Hierbei wurde nach der 1974 von Richman und Atkins vorgestellten Methode gearbeitet.¹⁸ Die Syntheseroute ist in Abbildung 7 dargestellt.

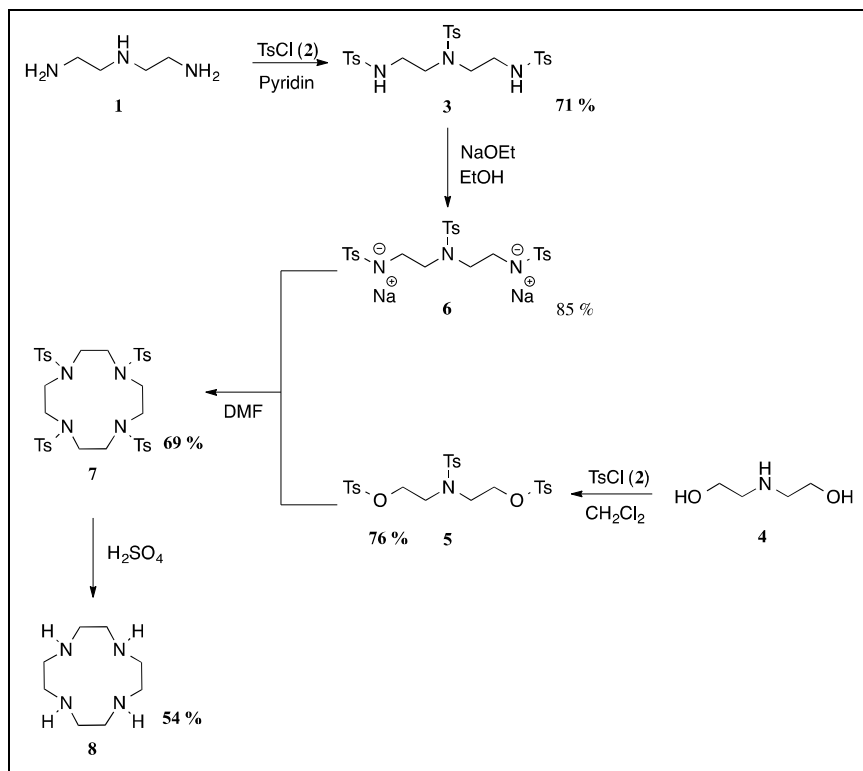


Abbildung 7: Syntheseroute für Cyclen.

Auch wenn es sich bei der von Richman und Atkins entwickelten Syntheseroute um die am häufigsten zitierte handelt, ist sie in weiten Teilen wenig konkret. Daher wurde für die Synthese der Edukte **3**, **5** und **6** nach verschiedenen anderen Vorschriften gearbeitet. Zunächst wurde das Dinatriumsalz **6** dargestellt. Hierbei wurde nach einer Vorschrift von Atkins, Richman und Oettle vorgegangen.³⁷ Im ersten Schritt wurde Diethylentriamin (**1**) tosyliert und dann die Aminogruppen deprotoniert. Die Tosylierung gewährleistet, dass Nebenreaktionen wie die Bildung von tertiären Aminen im Zyklisierungsschritt vermieden werden. Die Ausbeute in Höhe von 85 % entspricht der Literatúrausbeute.

Die Tosylschützung des Diethanolamins **5** wurde nach einer Vorschrift von Huang durchgeführt.³⁸ Der Reaktion wird hierbei Triethylamin hinzugesetzt, welches den bei der Reaktion zwischen Tosylchlorid und Diethanolamin freiwerdenden Chlorwasserstoff abfängt und zum Hydrochloridsalz reagiert. Dieses lässt sich einfach durch Filtration entfernen. Die Tosylierung ist nötig, da es sich bei den Hydroxylgruppen um schwache Abgangsgruppen handelt, wogegen Tosylat eine sehr gute Abgangsgruppe ist und somit die nachfolgende Zyklisierung begünstigt. Die Zyklisierung erfolgte analog zu der Originalvorschrift von Atkins und Richman. Hierbei wurde unter Inertbedingungen und Hochverdünnung eine Lösung des tosylierten Ethanolamins **5** zu einer Lösung des Natriumsalzes **6** über mehrere Stunden hinzugegeben. Diese Bedingungen sind notwendig, um eine intramolekulare Zyklisierung zu begünstigen und die als Nebenreaktion ablaufende intermolekulare Polymerisierung zu unterdrücken.

Der letzte Schritt in der Synthese des Cyclens **8** ist die Entschützung des tosylierten Makrozyklus **7**. In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Entschützung vorgestellt, die sich in der Laborpraxis jedoch als wenig praktikabel erwiesen haben.^{18,39,40} So konnte in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden, dass zum Beispiel die Entschützung mit Hilfe von Bromwasserstoffsäure und Eisessig nach White *et al.* nicht die publizierten guten Ausbeuten liefert.⁴¹ Die Vorschrift nach Montembault erwies sich schließlich als geeignetste.⁴² Hierbei wird das tosylierte Cyclen für zwei Tage bei 100 °C in 96 % Schwefelsäure entschützt. Durch Sublimation wurde das Cyclen in hoher Reinheit in einer Ausbeute von 54 % erhalten. Diese ist aus oben genannten Gründen als gut zu betrachten.

2.1.2 Synthese von Thiacyclen

1-Thia-4,7,10-triazacyclododecan (**15**), kurz auch [12]aneN₃S oder Thiacyclen, wurde in einer Syntheseroute ganz ähnlich zu der des Cyclens synthetisiert. Hierbei wurde analog zu einer Vorschrift von Marcus *et al.* gearbeitet.⁴³ Die Syntheseroute ist in Abbildung 8 vollständig dargestellt.

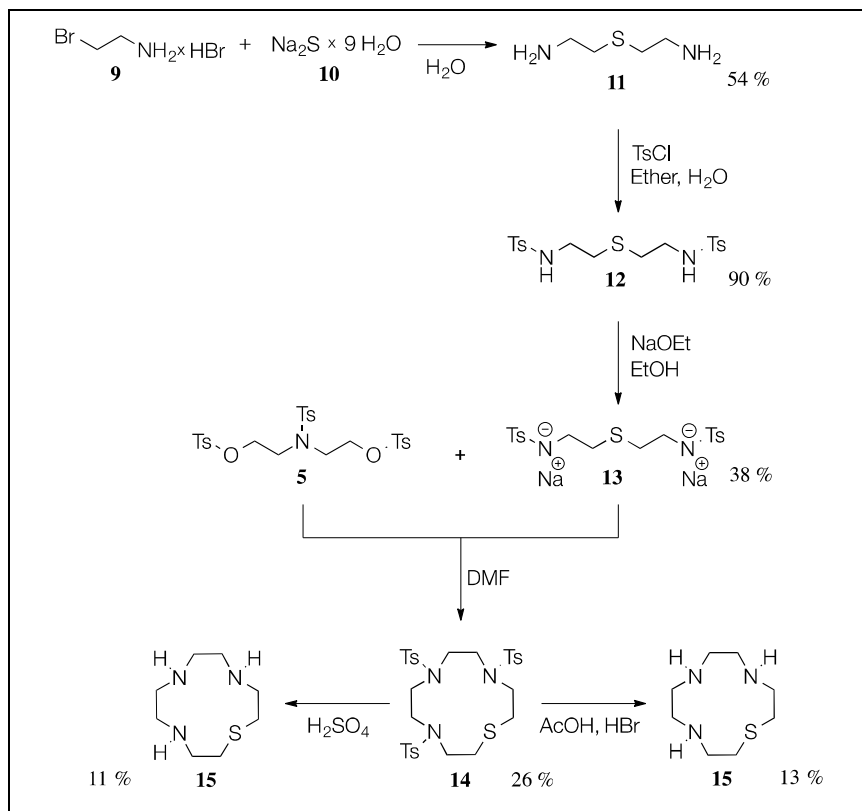


Abbildung 8: Syntheseroute für Thiacyclen **15**.

Den Part des Nucleophils übernimmt bei dieser Synthese das Dinatriumsalz des tosylierten Bis(diethylamino)sulfids **13**. Dieses ist in drei Stufen aus Bromethylamin-Hydrobromid **9** und Natriumsulfid-Nonahydrat **10** zugänglich. In der ersten Stufe wurden die Verbindungen **9** und **10** nach einer Vorschrift von Gahan miteinander umgesetzt.⁴⁴ Zunächst wurde hierbei aus dem Hydrobromidsalz **9** durch Zugabe von Natronlauge das freie Amin

dargestellt. Dieses wurde anschließend unter Bildung des Produkts **11** durch das Sulfidion in einer nucleophilen Substitution angegriffen. Hochverdünnung in Wasser gewährleistet auch bei dieser Reaktion, dass keine höher-substituierten Amine entstehen. Die Ausbeute in Höhe von 54 % entspricht annähernd der Literaturausbeute.

Die Tosylierung der Verbindung **11** wurde nach einer Vorschrift von Hoffmann *et al.* durchgeführt.⁴⁵ Hierfür wird zu einer wässrigen Lösung des Amins eine etherische Lösung von Tosylchlorid hinzugetropft. Anders als in der Vorschrift beschrieben, fällt das Produkt **12** nicht in Form eines weißen Niederschlags aus. Aus diesem Grund ist die in der Vorschrift beschriebene Aufarbeitung mittels Filtration und Waschen nicht praktikabel. Anstelle der beschriebenen Aufarbeitung wurde das Produkt durch Extraktion mit Dichlormethan erhalten. Die Ausbeute ist mit 90 % dennoch sehr gut und mit der Literaturausbeute vergleichbar.

Die Synthese des Dinatriumsalzes **13** wurde ebenfalls analog zu der Vorschrift von Hoffmann *et al.* durchgeführt. Die Ausbeute in Höhe von 38 % ist jedoch schlechter als die Literaturausbeute in Höhe von 85 %.

Die Zyklisierung wurde schließlich nach einer Vorschrift von Marcus *et al.* durchgeführt. Hierfür wurden das Dinatriumsalz **13** und tosyliertes Diethanolamin **5** unter Hochverdünnung in DMF miteinander umgesetzt.⁴³ Die Ausbeute in Höhe von 26 % ist nur etwa halb so groß wie die der Zyklisierung des tosylierten Cyclens **7**. Ein möglicher Grund für diese Diskrepanz könnte die unterschiedliche Konzentration der Lösungen sein: werden nach der Vorschrift von Richman und Atkins für die Zyklisierung des Cyclens Konzentrationen in Höhe von 0.2 M verwendet, setzte Marcus Konzentrationen in Höhe von 0.3 M für das tosylierte Diethanolamin **5** und 0.5 M für das Dinatriumsalz **13** ein. Diese erhöhten Konzentrationen könnten die Polymerisation begünstigen und somit die Ausbeute des Makrozyklus **14** erniedrigen.

Die Entschützung zum freien Makrozyklus **15** wurde aufgrund der positiven Ergebnisse für die Entschützung des Cyclens mit Schwefelsäure auf zwei Arten durchgeführt: zunächst analog zu der Entschützung des Cyclens und zusätzlich analog zu der von Marcus *et al.* publizierten Methode durch Eisessig und Bromwasserstoffsäure. Es zeigte sich, dass beide Methoden eine Ausbeute um 10 % erzielen und somit keine der Methoden der anderen überlegen ist.

2.1.3 Synthese von Oxathiacyclen

1-Oxa-7-thia-4,10-diazacyclododecan (**18**), kurz auch [12]aneN₂OS oder Oxathiacyclen, wurde analog zu einer Vorschrift von Afshar *et al.* synthetisiert.⁴⁶ Die hierfür benötigten Edukte wurden schon im Rahmen der Synthesen von Cyclen **8** und Thiacyclen **15** hergestellt. Die Synthese ist in Abbildung 9 dargestellt.

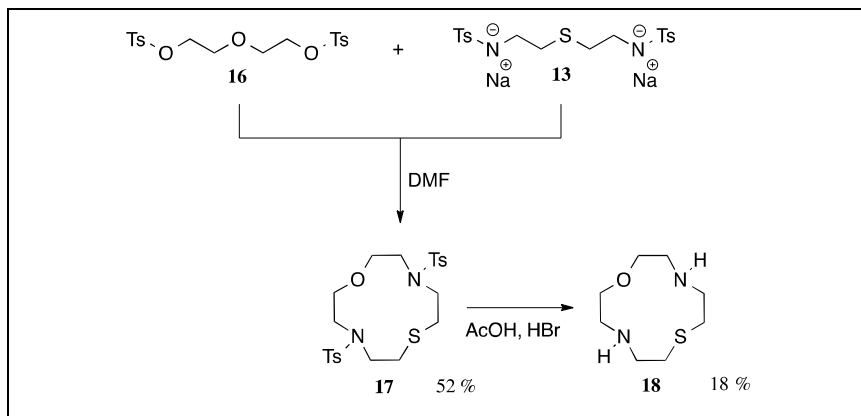


Abbildung 9: Syntheseroute für Oxathiacyclen **18**.

Die Zyklisierung erfolgte erneut ganz analog zu der Zyklisierung von Cyclen **8** bzw. Thiacyclen **15** unter Hochverdünnung in DMF. Die Ausbeute in Höhe von 52 % ist nur etwa halb so groß wie die Literaturausbeute.

Die Entschützung wurde in einer Mischung aus Eisessig und Bromwasserstoffsäure durchgeführt und lieferte den freien Makrozyklus in einer Ausbeute von 18 %. Die Ausbeute ist mit der Literaturausbeute vergleichbar.

2.1.4 Synthese von Mono(interkalator)-substituiertem Cyclen

Um die Affinität des Cyclens **8** und seines Kupferkomplexes zur DNA zu erhöhen, wurde es mit verschiedenen DNA-Interkalatoren substituiert. Hierfür wurden Naphthalin, Anthracen und Anthrachinon gewählt. Die Synthese ist in Abbildung 10 dargestellt.

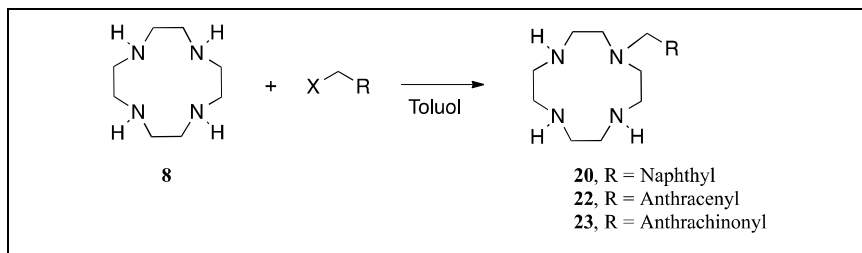


Abbildung 10: Synthese der Mono(interkalator)-substituierten Cyclenderivate (X = Cl o. Br).

Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Akkaya *et al.* durchgeführt.⁴⁷ Sie wurde ursprünglich für die Anthracensubstitution entwickelt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sie auch auf den Naphthalinsubstituenten übertragbar ist. Um Mehrfachsubstitution zu vermeiden, wird bei der Synthese ein fünffacher Überschuss an Cyclen eingesetzt. Das Produkt wird schließlich als Hydrochloridsalz gefällt. Die Ausbeuten betragen mit 24 % für 1-(2-Naphthalinmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (**20**) und 25 % für 1-(9-Anthracenmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (**22**) nur etwa ein Drittel der Literatúrausbeute, jedoch geht Akkaya nicht darauf ein, welche Stöchiometrie das Hydrochloridsalz hat. Untersuchungen durch Elementaranalyse konnten zeigen, dass im Falle des Naphthalinsubstituenten dreieinhalb Äquivalente Chlorwasserstoff und im Falle des Anthracensubstituenten vier Äquivalente Chlorwasserstoff und zwei Äquivalente Wasser in den Produkten **20** und **22** enthalten sind. Würde die Stöchiometrie des Produktes **22** auf die Literatúrausbeute angewendet werden, würde diese anstelle der publizierten 75 % nunmehr 50 % betragen.

Eine weitere Möglichkeit, monosubstituierte Cyclene zu gewinnen, wäre die dreifache Schützung des Cyclens. So ist laut Boldrini *et al.* dreifach-formyliertes Cyclen in hohen Ausbeuten (92 %) verfügbar.⁴⁸

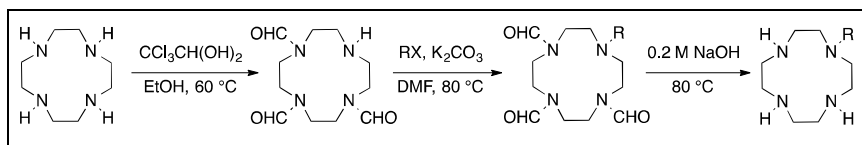


Abbildung 11: Synthese von monosubstituiertem Cyclen nach Boldrini.⁴⁸

Diese Methode verspricht höhere Ausbeuten des monosubstituierten Cyclens und würde den Überschuss an Cyclen überflüssig machen.

2.1.5 Synthese von Bis- und Tris(anthracenmethyl)cyclen

Um zu untersuchen, ob die DNA-Affinität von Interkalator-substituierten Cyclenen durch Mehrfachsubstitution gesteigert werden kann, wurde versucht, zweifach und dreifach Anthracen-substituiertes Cyclen zu synthetisieren.

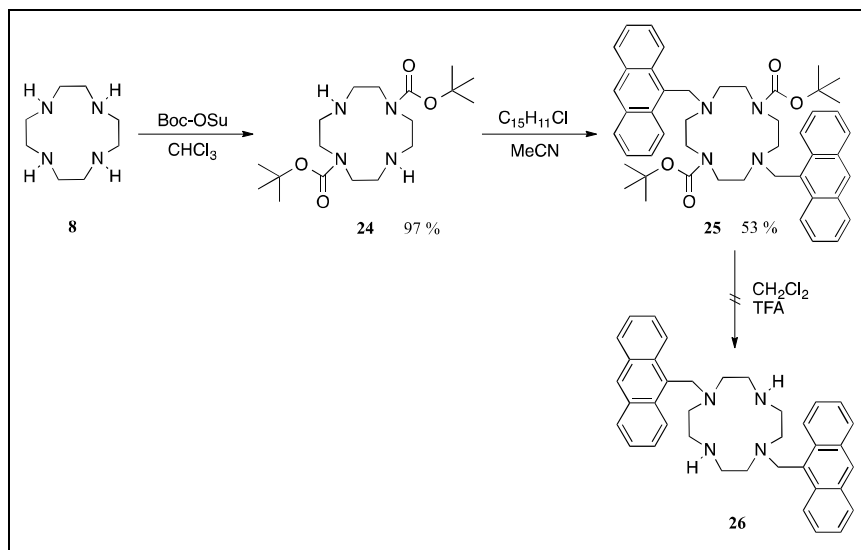


Abbildung 12: Synthese von 1,7-Bis(anthracenmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan.

In Abbildung 12 ist die Syntheseroute zum zweifach Anthracen-substituierten Cyclen dargestellt. Zunächst wurde Cyclen in den Positionen 1 und 7 Boc-geschützt. Hierbei wurde nach einer Vorschrift von De León-Rodríguez gearbeitet. Die Ausbeute von 97 % entspricht hierbei der publizierten Ausbeute. Die Regioselektivität dieser Reaktion kann laut De León-Rodríguez auf die Struktur des Makrozyklus zurückgeführt werden. Die Wasserstoffatome, die an die Positionen N₄ und N₁₀ gebunden sind, befinden sich innerhalb des Makrozyklus und sind in das Zentrum des Rings gerichtet. Sie stehen somit für eine Substitution nicht zur Verfügung.⁴⁹ Die Ein-

führung der Anthracenfunktionen wurde in Acetonitril durchgeführt. Hierbei wurde der Boc-geschützte Cyclenligand **24** mit zwei Äquivalenten des Interkalators für 14 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Um den entstehenden Chlorwasserstoff abzufangen, wurde dem Reaktionsgemisch außerdem Kaliumcarbonat zugesetzt. Die nicht literaturbekannte Verbindung **25** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung in 53 % Ausbeute isoliert werden und wurde über ESI-MS sowie ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie charakterisiert. Obwohl Direktsynthesen zu dem Liganden **26** bekannt sind, wurde sich bewusst dafür entschieden, die Synthese über den Umweg der Boc-Schätzung durchzuführen.⁵⁰ Diese Vorgehensweise bietet zwei Vorteile: es werden durch 1,4-Substitution gebildete Isomere vermieden und die säulenchromatographische Aufreinigung wird erleichtert, da keine freien Aminogruppen vorhanden sind. Frühere Versuche, den zweifachsubstituierten Liganden **26** direkt darzustellen, zeigten, dass es zu einem Produktgemisch bestehend aus einfach-, zweifach- und dreifachsubstituierten Liganden kam, welches sich nicht auftrennen ließ.⁴¹

Trotz dieser Vorteile scheiterte die Entschätzung als letzter Schritt in der Synthese des Liganden **26**. Diese wurde nach bekannten Verfahren mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan durchgeführt.^{51,52}

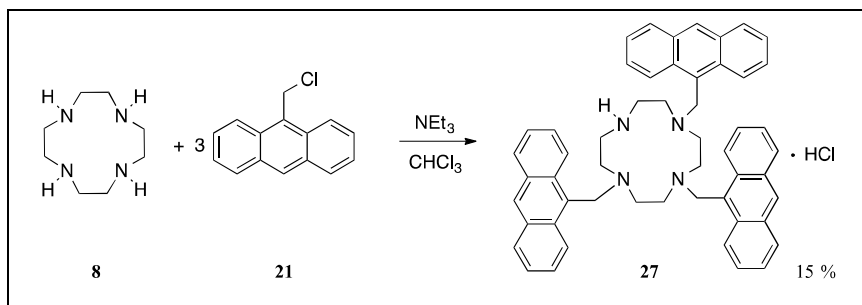


Abbildung 13: Synthese von 1,7-Bis(anthracenmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan.

Das nicht literaturbekannte Tris(anthracen)cyclen **27** wurde in Analogie zu einer Veröffentlichung von Wong und Li für die Dreifachsubstitution von Cyclen synthetisiert.⁵³ Hierbei wurde der Makrozyklus **8** mit drei Äquivalenten des Interkalators **21** in Chloroform unter Zusatz von Triethylamin umgesetzt (Abbildung 13).

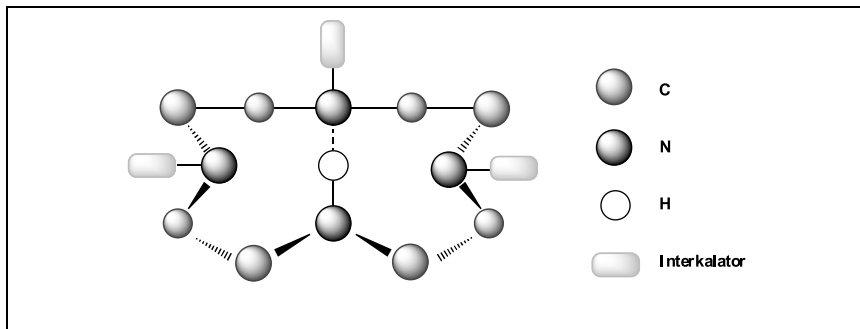


Abbildung 14: Selektivität für die Trialkylierung von Cyclen nach Li.⁵³

Die Selektivität für den dreifach substituierten Liganden führen Wong und Li hierbei auf die Protonierung der freien Aminogruppe zurück, die daraufhin mit dem gegenüberliegenden Stickstoffatom wechselwirkt und somit nicht für eine weitere Substitution zur Verfügung steht (Abbildung 14).

2.1.6 Synthese der Kupfer(II)cyclenanaloga

Die Synthese der Kupferkomplexe des Cyclens, Oxacyclens, Thiacyclens und Oxathiacyclens ist in Abbildung 15 dargestellt.

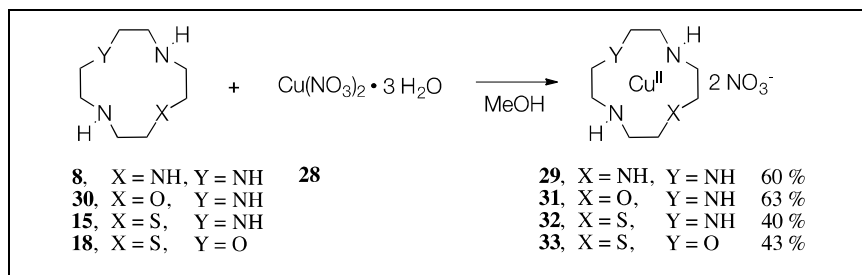


Abbildung 15: Allgemeines Syntheschema für die Kupfer(II)cyclenkomplexe.

Zu einer methanolischen Lösung von Kupfernitrat wurde eine Lösung des jeweiligen Liganden hinzugegeben und zum Rückfluss erhitzt. Die Bildung des jeweiligen Komplexes zeigte sich umgehend durch eine Farbände-

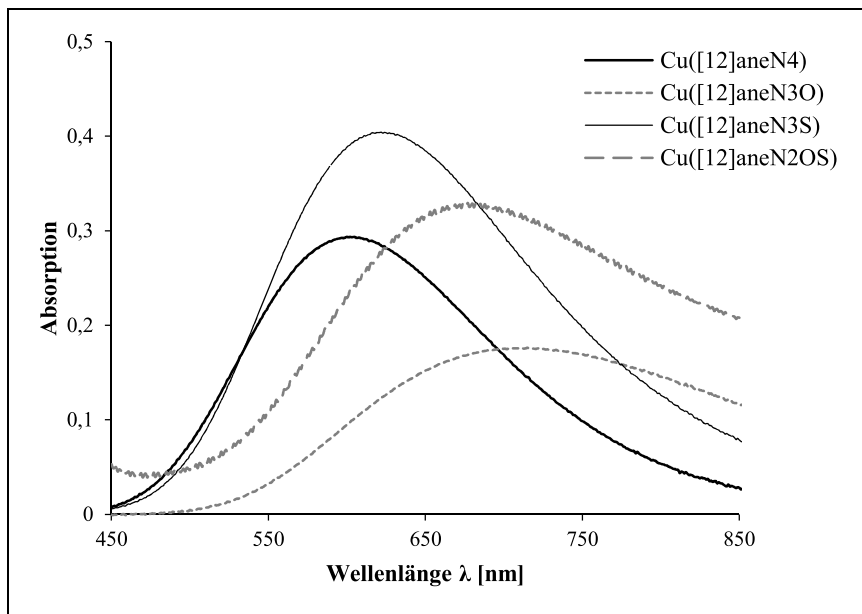


Abbildung 16: Ausschnitt der UV/Vis-Spektren der Kupfer(II)cyclenkomplexe. Die Komplexkonzentration beträgt 5 mM, die Komplexe wurden in 100 mM Tris-HCl-Lösung (pH 7.4) gemessen.

rung der Lösung von farblos nach dunkelblau. Während der Kupfer(II)-cyclenkomplex, $[\text{Cu}([12]\text{aneN}_4)(\text{NO}_3)_2]$ **29**, bereits durch Clay beschrieben wurde, sind vom $[\text{Cu}([12]\text{aneN}_3\text{O})(\text{NO}_3)_2]$ **31** und $[\text{Cu}([12]\text{aneN}_3\text{S})(\text{NO}_3)_2]$ **32** nur Komplexe anderer Metallsalze bekannt. Der $[\text{Cu}([12]\text{aneN}_2\text{OS})(\text{NO}_3)_2]$ -Komplex **33** wird an dieser Stelle zum ersten Mal beschrieben.⁵⁴

Die Kupferkomplexe **29**, **31**, **32** und **33** wurden isoliert und über UV/Vis-Spektroskopie, Massenspektroskopie, Elementaranalyse und IR-Spektroskopie charakterisiert. Im Falle des $[\text{Cu}([12]\text{aneN}_3\text{O})(\text{NO}_3)_2]$ und des $[\text{Cu}([12]\text{aneN}_3\text{S})(\text{NO}_3)_2]$ war es außerdem möglich, Einkristalle für eine Röntgenstrukturanalyse zu gewinnen.

Die maximale Absorption von $[\text{Cu}([12]\text{aneN}_4)(\text{NO}_3)_2]$ **29** beträgt 600 nm, von $[\text{Cu}([12]\text{aneN}_3\text{O})(\text{NO}_3)_2]$ **31** 711 nm, von $[\text{Cu}([12]\text{aneN}_3\text{S})(\text{NO}_3)_2]$ **32** 621 nm und von $[\text{Cu}([12]\text{aneN}_2\text{OS})(\text{NO}_3)_2]$ -Komplex **33** 658 nm (Abbildung 16). Diese Anregungen sind den d-d-Übergängen zuzuordnen.⁵⁵ Es zeigt sich, dass die Verschiebung in den längerwelligen Bereich des

Cyclen-basierte Metallonucleasen
Synthese und biochemische Evaluation

Hormann, J.

2015, XIV, 90 S. 43 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-658-09268-9