

DISS. ETH Nr. 12002

**KLASSISCHE UND DENDRITISCH MODIFIZIERTE
CYCLOPHANE ZUR MOLEKULAREN ERKENNUNG VON
STEROIDEN**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

PETER WALLIMANN

Dipl. Chem. Univ. Zürich

geboren am 31. Mai 1965

von Kerns (OW) und Lungern (OW)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. F. Diederich, Referent

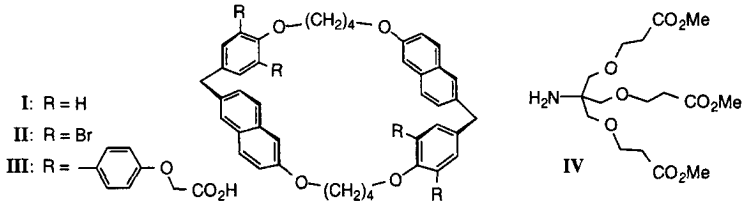
Prof. Dr. D. Seebach, Correferent



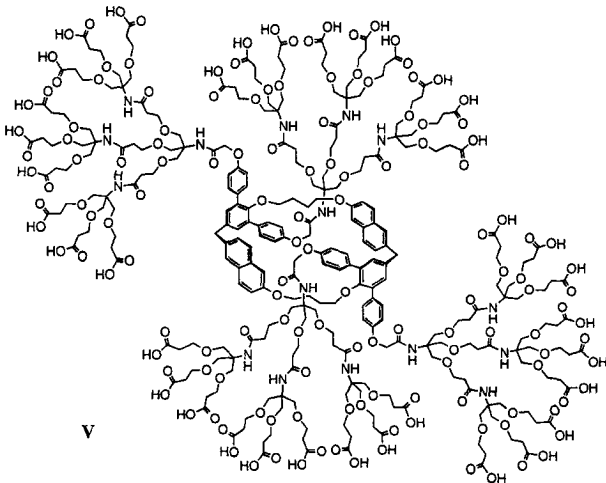
Zürich 1997

Zusammenfassung

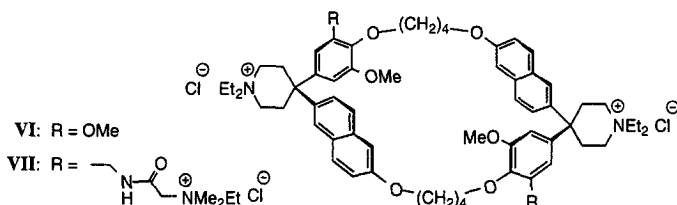
Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Synthese, Analytik und den supramolekularen Eigenschaften herkömmlicher und dendritisch modifizierter Cyclophane mit endoliphilnen Bindungsstellen (Skelett **I**) für Steroide und hydrophilen peripheren Gruppen.



Das vierfach substituierte [6.1.6.1]Paracyclophan **II** wurde in acht Stufen synthetisiert und einer systematischen röntgenkristallographischen Untersuchung unterworfen, was Aufschluss über die Struktur des makrozyklischen Grundkörpers und dessen kanalbildenden Eigenschaften in der Festphase gab. Umfunktionalisierung von **II** führte zum Steroidrezeptor **III** mit einem nahezu rechteckigen Hohlraum. Die Tetrasäure **III** wurde als Kernbaustein für die stufenweise Synthese von Poly(etheramid)-Dendrimeren unter Verwendung der dreifach verzweigten Repetiereinheit **IV** eingesetzt. Dadurch liess sich die geometrisch definierte Bindungsstelle des Cyclophans in ein polymeres Geflecht mit einer Vielzahl peripherer Carboxylatgruppen einbetten. Die als *Dendrophane* bezeichneten Makromoleküle, so z. B. **V**, mit einem Molekulargewicht von 2 – 20 Kilodalton wurden ^{13}C -NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch untersucht.



In der Folge wurden die supramolekularen Eigenschaften der bereits bekannten Cyclophane **VI** und **VII** sowie der neu synthetisierten Dendrophane mit Kernbaustein **III** durch $^1\text{H-NMR}$ - und mikrocalorimetrische Titrations in wässriger Lösung untersucht. Es zeigte sich, dass die einzelnen Rezeptoren unterschiedlich stabile (1:1)-Komplexe mit diversen Steroidhormonen und Gallensäuren bildeten. Die freie Enthalpie der Komplexbildung (ΔG) betrug bei 25 °C in Wasser oder Wasser/Methanol-Gemischen 3 – 7 kcal mol $^{-1}$; die Assoziationskonstanten (K_a) lagen entsprechend bei $10^2 - 10^5$ l mol $^{-1}$.



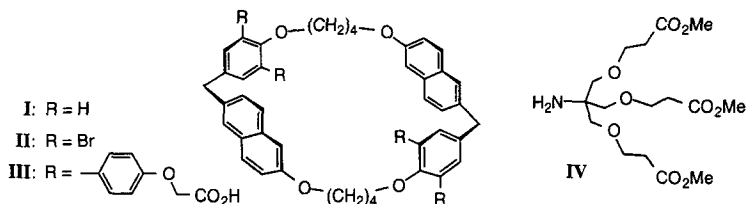
Aufgrund hydrophober Effekte nahm die Stärke der Komplexbildung mit zunehmender Polarität der Substrate und steigendem Substitutionsgrad ab. Markante Affinitätsunterschiede zwischen verwandten Steroiden und den einzelnen Rezeptoren wurden vor allem auf die komplexierungsbedingte Desolvatisierung funktioneller Gruppen zurückgeführt, wobei elektrostatische Effekte ebenfalls eine Rolle spielten. Die Triebkraft der Assoziation zwischen allen untersuchten Steroiden und Rezeptoren folgte einer ausgeprägten Enthalpie/Entropie-Kompensationsbeziehung. Die Einschlußkomplexbildung von Steroiden durch das Cyclophan **VI** erwies sich in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1 als stark enthalpisch kontrolliert ($-\Delta H = 8-14$ kcal mol $^{-1}$). In reinem Wasser und unter Verwendung der Rezeptoren **III** und **VII** war die Komplexbildungsenthalpie ΔH jedoch um bis zu 10 kcal mol $^{-1}$ zugunsten des entropischen Anteils $T\Delta S$ reduziert.

$^1\text{H-NMR}$ -Titrations in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1 zwischen Testosteron und dem Rezeptor **III** sowie den daraus abgeleiteten Dendrophanen bewiesen, dass das Hormon bevorzugt in den Cyclophanhohlraum und nicht in die dendritische Hülle eingelagert wurde. Dabei beeinflusste die Grösse der polymeren Hülle die Komplexstabilität kaum.

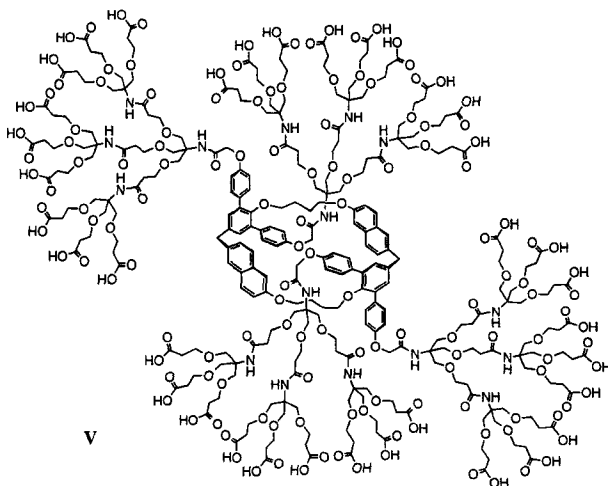
Zur Bestimmung der Austauschkinetik wurden die Dendrophane mit Kern **III** in Gegenwart fluoreszierender Steroid-Sonden Temperatursprung-Relaxationsmessungen ausgesetzt. Sämtliche Dendrophane/Steroid-Komplexe wurden bei tiefer Konzentration in Wasser nahezu diffusionskontrolliert gebildet. Die Dekomplexierungsgeschwindigkeit k_d betrug $10^4 - 10^2$ s $^{-1}$ und verlangsamte sich mit zunehmender Rezeptorgrösse nicht stark. Deutliche Unterschiede wurden allerdings in der Stabilität der einzelnen Komplexe festgestellt. Die Interpretation der entsprechenden Daten erwies sich aufgrund vermuteter Aggregationseffekte als nicht trivial.

Abstract

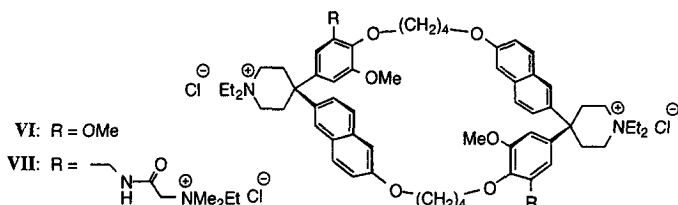
The present work covers the synthesis, analytical and supramolecular properties of cyclophanes, which possess both apolar binding sites for steroids (skeleton **I**) and hydrophilic, conventional or dendritic functional groups at their periphery.



The fourfold functionalized [6.1.6.1]paracyclophane **II** was prepared in eight steps and systematically investigated by X-ray crystallography, which allowed the determination of its precise macrocyclic structure and channel-forming ability in the solid state. Functional group modifications of **II** yielded the water-soluble steroid receptor **III** possessing a nearly rectangular cavity suited for steroid inclusion in solution. The tetraacid **III** was subsequently used as the central core in the synthesis of poly(etheramide)-dendrimers based on the triply branched building block **IV**. By a divergent procedure, cyclophanes embedded in growing polymeric shells, covered by multiple carboxylic acid functional groups, were prepared. These macromolecular compounds, such as **V**, with molecular weights of 2 – 20 kilodaltons were named *dendrophanes* and were thoroughly investigated both by nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry.



In the following work, the supramolecular properties of the two known cyclophanes **VI** and **VII** and those of the novel dendrophanes based on the core **III** and the branching unit **IV** were investigated both by $^1\text{H-NMR}$ - and microcalorimetric titrations in aqueous solutions. The above receptors formed (1:1)-complexes of different stabilities with a variety of steroids such as hormones and bile acids. The Gibb's enthalpy of complexation (ΔG) at 25 °C in water or in mixtures of water/methanol was in the order of 3 – 7 kcal mol $^{-1}$ giving rise to stability constants of $10^2 - 10^5$ l mol $^{-1}$.



Due to hydrophobic effects, the complexation strength generally decreased with increasing substrate polarity and higher degree of substitution. Pronounced differences in affinity were observed for structurally related steroids due to the differential desolvation of polar functional groups upon complexation. In addition, electrostatic effects also played an important role. The driving force for association between all the investigated receptors and steroids followed a remarkably linear enthalpy/entropy-relationship. Thereby, in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1 the inclusion of steroids into the cavity of the cyclophane **VI** proved to be highly enthalpically driven ($-\Delta H = 8 - 14$ kcal mol $^{-1}$). However, in pure water the enthalpy of association between most steroids and the receptors **III** or **VII** was reduced by up to 10 kcal mol $^{-1}$ in favour of the entropic binding contribution $T\Delta S$.

$^1\text{H-NMR}$ titrations in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1 between the steroidal hormone testosterone and the cyclophane **III** as well as the related dendrophanes suggested that the hormone was preferentially inserted into the cyclophane cavity rather than into the fluctuating dendritic shell. Thereby, the size of the latter hardly influenced the strength of complexation.

To precisely assess the exchange kinetics, the dendrophanes based upon **III** and **IV** were subjected to temperature-jump relaxation measurements in the presence of highly fluorescent steroidal probes. It was found that in water and at low concentrations the formation of all the dendrophane/steroid-complexes proceeded nearly diffusion controlled. The decomplexation rates k_d were in the order of $10^4 - 10^2$ s $^{-1}$ and were only slightly affected by the size of the dendritic shell. However, in some cases pronounced differences in the complex stabilities were observed as a function of the dendrimer generation. A straightforward explanation for these phenomena was hard to find, especially since aggregation processes seemed to complicate the picture.