

Die Synthese von Mucin-Glycopeptid- Vakzinkonjugaten und Adjuvanzien für eine potentielle Krebsimmuntherapie

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Simone Di Pietro
geboren in Hamburg

Dekan: Prof. Dr.

1. Berichterstatter: Prof. Dr.

2. Berichterstatter: Prof. Dr.

Tag der mündlichen Prüfung:

Fiat justitia, aut pereat mundus

(Friedrich Wilhelm I)



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von September 2006 bis März 2012
am Institut für Organische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

In Gedenken an A. P.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Fakten und Zahlen zu Krebs	1
1.2	Die Immunüberwachung	3
1.3	Immune-Escape-Mechanismen	5
1.4	Tumorimmuntherapie	11
1.5	Das epitheliale Mucin MUC1	15
1.6	MUC1 als überexprimiertes tumorassoziertes Antigen	18
2	Zielsetzung	21
3	Allgemeiner Teil	24
3.1	Die Synthese von tumorassozierten Galactose-Aminosäure-Konjugaten	24
3.2	Die Disaccharid-Aminosäure-Konjugate	27
3.2.1	Die Synthese der (2,6)-Sialyl- <i>N</i> -acetylgalactosamin-Aminosäure-Bausteine (ST _N -Antigene)	27
3.2.2	Die Synthese der T-Antigene als Vorstufe der regioisomeren (2,3)- und (2,6)-Sialyl-T-Antigen-Konjugate	32
3.2.3	Die Synthese der (2,6)-Sialyl-T-Antigen-Konjugate	37
3.2.4	Die Synthese des (2,3)-Sialyl-T-Antigen-Konjugats	40
3.3	Die Synthese der Spacereinheiten	42
3.3.1	Synthese des Diethylenglycolspacers	42
3.3.2	Synthese des Triethylenglycolspacers	43
3.4	Die Synthesen von Adjuvanzien	43
3.4.1	Allgemeine Betrachtungen	43
3.4.2	<i>N</i> -Palmitoyl- <i>S</i> -(2,3-bispalmitoyloxy-(2 <i>R</i> , <i>S</i>)-propyl)-(<i>R</i>)-cystein	46
3.4.3	Die Synthese des Mitogens Pam ₃ Cys-OH	48
3.4.4	Allgemeines zu Lipopolysacchariden	49

3.4.5	Die Synthese von Monophosphorlipid A.....	55
3.4.6	Die Synthese der Fettsäuren.....	58
3.4.7	Die Glucosamin-Bausteine.....	62
3.4.8	Die Disaccharid-Bausteine.....	73
3.5	Die Synthese von Glycopeptiden aus der tandem repeat-Domäne des epithelialen Mucins MUC1.....	80
3.5.1	Grundlegende Prinzipien der (Glyco-)Peptidsynthese und das allgemeine Protokoll der automatisierten Festphasensynthese.....	82
3.5.2	Die Synthese von glycosylierten Heptadecapeptiden.....	92
3.5.3	Die Synthese von glycosylierten Docosapeptiden.....	95
3.5.4	Die Synthese von geschützten glycosylierten Docosapeptiden.....	100
3.6	Die Entwicklung von extern adjuvierten Zweikomponenten-Vakzinen.....	111
3.6.1	Allgemeine Grundlagen und biologischer Hintergrund.....	111
3.6.2	Die Synthese von Interleukin-1 β -MUC1-Konjugaten.....	116
3.6.3	Die Synthese von MUC1-Ova ₍₃₂₃₋₃₃₉₎ -Konjugaten.....	126
3.7	Die Synthese von MUC1-Glycopeptid-Lipidkonjugaten durch Fragmentkondensation.....	129
3.7.1	Die Synthese von MUC1-Glycopeptid-Pam ₃ Cys-Konjugaten.....	129
3.7.2	Die Fragmentkondensation von MUC1-Glycopeptiden mit dem Lipopeptid..	132
3.7.3	Die Fragmentkondensation von MUC1-Glycopeptiden mit dem MPL-A.....	137
3.8	Die Synthese von Neoglycoproteinen.....	142
3.8.1	Biologischer Hintergrund.....	142
3.8.2	Die Konjugation von glycosylierten MUC1-Glycopeptiden an Rinderserumalbumin (BSA).....	145
3.8.3	Die Konjugation des glycosylierten Docosapeptids an Tetanus-Toxoid (TTox).....	151
3.9	Die Immunologische Evaluierung der synthetisierten Konjugate.....	153
4	Zusammenfassung.....	164
5	Experimenteller Teil.....	179

5.1	Allgemeines und Messgeräte	179
5.2	Die Synthesen der geschützten Aminosäuren	188
5.2.1	Die Synthesen des geschützten Threonins	188
5.2.2	Die Synthesen des geschützten Serins	189
5.3	Die Synthese der Galactosyldonoren	191
5.3.1	Die Synthese des peracetylierten Galactosylbromids	191
5.3.2	Die Synthese des Galactosylbromid-Bausteins	194
5.4	Die Synthesen der Galactosamin-Aminosäuren-Konjugate	197
5.4.1	Die Synthese des Galactose-Threonin-Konjugats	197
5.4.2	Die Synthese des Galactosamin-Serin-Konjugats	200
5.5	Die Synthese des Neuraminsäure-Bausteins	203
5.6	Synthesen von Disaccharid-Aminosäuren-Konjugaten	206
5.6.1	Die Synthesen des Disaccharid-Threonin-Konjugats	206
5.6.2	Die Synthesen des Disaccharid-Serin-Konjugats	216
5.7	Synthesen von Trisaccharid-Aminosäuren-Konjugaten	226
5.7.1	Die Synthese des Trisaccharid-Threonin-Konjugats	226
5.7.2	Die Synthesen der Trisaccharid-Serin-Konjugate	229
5.8	Die Synthese der Spacereinheiten	242
5.8.1	Synthese von <i>N</i> -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-9-amido-4,7-dioxa-nonansäure	242
5.8.2	Synthese von <i>N</i> -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-12-amido-4,7,10- trioxadodecansäure	246
5.9	Die Synthesen von Immunstimulanzien und Adjuvanzen	249
5.9.1	Die Synthese des Mitogens <i>N</i> -Palmitoyl- <i>S</i> -[2,3-bis-(palmitoyloxy)-(<i>R,S</i>)- propyl]-(<i>R</i>)-cystein (Pam ₃ Cys)	249
5.9.2	Die Synthese vom Monophosphorlipid A (AS595) und seinem Derivat	255
5.10	Festphasenglycopeptidsynthesen	303
5.10.1	Das allgemeine Protokoll der automatisierten Peptid-Festphasensynthese	303

5.10.2	Die Synthesen der (Glyco-)Peptide mit einer Partialsequenz aus dem MUC1	305
5.10.3	Adjuvierte MUC1-Konjugate.....	353
5.11	Die Synthese von MUC1-Glycopeptid-Lipidkonjugaten durch Fragmentkondensation	399
5.11.1	Festphasensynthese eines Mitogen-Pentapeptids.....	399
5.11.2	Die Synthese von Pam ₃ Cys-MUC1-Glycopeptid-Konjugaten	400
5.11.3	Die Synthese von MUC1-Glycopeptid-Glycophosphorlipid-Konjugaten (AS595).....	417
5.12	Die Synthese von Neoglycoproteinen.....	435
5.12.1	Konjugation von glycosylierten Heptadecapeptiden an Rinderserumalbumin (BSA)	435
5.12.2	Konjugation von glycosylierten Docosapeptiden an Rinderserumalbumin (BSA)	436
5.12.3	Konjugation des glycosylierten Docosapeptids an Tetanus-Toxoid (TTox) ...	437
6	Literaturverzeichnis	438
7	Spektrenanhang.....	452

Abkürzungsverzeichnis

α	spezifischer Drehwert
Abb.	Abbildung(en)
absol.	absolut
Ac	Acetyl
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
Ala	L-Alanin
APC	Antigen-präsentierende Zellen
äq	äquatorial
Äquiv.	Äquivalente
Arg	L-Arginin
AS	Aminosäurerest
Asn	L-Asparagin
Asp	L-Asparaginsäure
Aufl.	Auflage
ax	axial
BB	Breitband (entkoppeltes ^{13}C -Spektrum)
BCR	B-Zell-Rezeptor
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin, bovine serum albumin
Bzn	Benzyliden
c	Konzentration
C	Celsius
cal	Kalorie(n)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFA	<i>Freunds Adjuvans</i>
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
2-CT	2-Chlortrityl
CTL	cytotoxische T-Zellen
Cys	L-Cystein
δ	chemische Verschiebung
d	Tag(e); Dublett
Da	Dalton
d_b	breites Dublett
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	dendritische Zellen; Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett
dd_b	breites Dublett vom Dublett
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
dq	Dublett vom Quartett
dt	Dublett vom Triplett

EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
engl.	englisch
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
Et	Ethyl
FACS	fluorescence activated cell sorting
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fmoc	Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl
FmocOSu	Fluoren-9-ylmethylsuccinimidylcarbonat
g	Gramm
Gal	D-Galactose
GalN	D-Galactosamin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Gew.-%	Gewichtsprozent
GlcN	D-Glucosamin
Gln	L-Glutamin
Glu	L-Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde(n)
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat
HFIP	Hexafluoroisopropanol
His	L-Histidin
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR-ESI	<i>High Resolution Electrospray Ionisation</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. Horseradish Peroxidase
Hrsg.	Herausgeber
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
i. Hochvak.	im Hochvakuum
i. Vak.	im Vakuum
IDO	Indoleamin-2,3-dioxygenase
IFA	inkomplettes <i>Freundsches</i> Adjuvans
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Ile	L-Isoleucin
ⁱ Prn	Isopropyliden
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Kat.	Katalysator
Kdo	<i>2-Keto-3-desoxy-octonat</i>
KLH	keyhole limpet hemocyanin
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge

l	Liter
LBP	LPS bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharide
Lys	L-Lysin
<i>m</i>	meta
m	Meter; Multipllett
M	Molar
max.	maximal
<i>m_c</i>	zentriertes Multipllett
Me	Methyl
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute(n)
mind.	mindestens
mol	Mol
MPL-A	Monophosphorlipid-A
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MS	Molekularsieb; Massenspektrometrie
MUC	Mucin
ⁿ Bu	<i>n</i> -Butyl
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetyl-D-neuraminsäure
NK	natürliche Killer-Zellen
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidin-2-on
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
<i>o</i>	ortho
OVA	Hühnerserum-Ovalbumin
<i>p</i>	para
p.a.	pro analysi
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PD-L1	programmed death ligand-1
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
PMBzn	4-Methoxybenzyliden / <i>p</i> -Methoxybenzyliden
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
ppm	<i>parts per million</i>
PPY	4-Pyrrolidinpyridin
Pro	L-Prolin
q	Quartett; quartär
q _p	Pseudoquartett
quant.	quantitativ
Raumtemp.	Raumtemperatur
<i>R_f</i>	Retentionsfaktor
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>R_t</i>	Retentionszeit
s	Singulett
<i>s_b</i>	breites Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
Ser	L-Serin
SG	Schutzgruppe

Sia	Sialinsäure / <i>N</i> -Acetyl-D-neuraminsäure
Su	Succinimidyl
t	Triplett
T	Temperatur
t _p	Pseudotriplett
t _b	breites Triplett
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCR	T-Zell-Rezeptor
tdd	Triplett vom Dublett vom Dublett
<i>tert</i>	tertiär
Tf	Trifluormethansulfonyl
TFA	Trifluoressigsäure
TGF-β	Transforming Growth Factor β
T _H -Zellen	T-Helferzellen
THF	Tetrahydrofuran
Thr	L-Threonin
TLR	Toll-Rezeptoren
TMS	Trimethylsilyl
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α, tumor necrosis factor-α
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
Tol	Toluol
Troc	2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl
Troc-Cl	Chlorameisensäure-2,2,2-trichlorethylester
Trt	Trityl
TsOH	Toluolsulfonsäure
TTox	Tetanus-Toxoid
UV	Ultraviolett
V	Volumen; Volt
v	oder
Val	L-Valin
vgl.	vergleiche
Xan	Xanthogenat

1 Einleitung

1.1 Fakten und Zahlen zu Krebs

Krebs ist eine der ältesten bekannten Krankheiten und galt bei den alten Ägyptern als Strafe der Götter.^[1] In Deutschland ist Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache.^[2] Daher ist es nicht überraschend, dass nicht nur Vertreter der Life Science-Branche, sondern auch Ökonomen diese Krankheit in Augenschein nehmen. Laut einer im Fachmagazin „*The Lancet*“ jüngst veröffentlichten Studie verursacht Krebs allein in der Europäischen Union jährlich Kosten von 126 Milliarden Euro.^[3] Darin sind sowohl die direkten Kosten von Krebserkrankungen im Gesundheitssystem als auch die Kosten für die Wirtschaft berücksichtigt, die durch Krankheitstage, den vorzeitigen Tod der Patienten und die Pflege durch Angehörige entstehen. Von den 51 Milliarden Euro Kosten, welche direkt dem Gesundheitssystem zuzurechnen sind, entfallen 28,4 Milliarden Euro auf die Behandlung in Krankenhäusern und 13,6 Milliarden Euro auf Medikamente. Da es bisher keine generelle Lösung für die Krebstherapie gibt, ist es nicht verwunderlich, dass die Pharmaindustrie laufend neue Krebsmedikamente auf den Markt bringt. Allein im Jahr 2012 wurden 16 neue Krebsarzneimittel bei der europäischen Zulassungsbehörde EMA (European Medicines Agency) zugelassen. Für Betroffene sind die neuen Medikamente mit Hoffnungen verbunden, aber diese Spezialpharmaka sind teuer und treiben die Kosten für das Gesundheitssystem in die Höhe.^[4] Für die Entwicklung eines Krebsmedikaments ist das Verständnis der Krebsentwicklung essentiell. Krebs (Malignom) als Sammelbegriff für eine Vielzahl verwandter Krankheiten bezeichnet eine bösartige Gewebeneubildung (Neoplasie), bei der entartete Zellen unkontrolliert proliferieren.^[5-7] Maligne Tumoren unterscheiden sich von benignen Tumoren in drei Eigenschaften - sie wachsen infiltrierend, destruierend und metastasierend. Die malignen Neoplasien werden unterteilt in solide Tumoren und maligne Systemerkrankungen. Solide Tumoren werden in die zwei Gruppen Karzinome und Sarkome unterteilt. Karzinome sind Geschwülste, die aus entarteten Epithelzellen, den Deckzellen der Haut, der Schleimhäute, der weichen Organe sowie Drüsenzellen entstehen. Sarkome hingegen entstehen aus entarteten Zellen des Gewebes, z. B. aus dem Bindegewebe (Fibrosarkome), aus Muskelzellen (Myosarkome) oder aus Knochenzellen (Osteosarkome). Der Anteil der Karzinome macht mit 90 % einen Großteil aller Krebserkrankungen aus, während er für Sarkome bei etwa fünf Prozent liegt. Während Karzinome mit zunehmendem Alter deutlich häufiger auftreten, findet man bei Sarkomen nur eine geringe Abhängigkeit zum Lebensalter. Die bösartigen Systemerkrankungen werden oft als Leukämien oder

Lymphome bezeichnet. Sie befallen das Blut- und Lymphsystem, welches die Organe systemisch miteinander vernetzt. Bösartige Systemerkrankungen stellen rund fünf Prozent aller Krebserkrankungen dar.

Gemein haben die Krebserkrankungen, dass die krankhaften Veränderungen auf eine Störung des genetisch geregelten Gleichgewichts zwischen Zellzyklus (Wachstum und Teilung) und Zelltod (Apoptose) zurückzuführen sind. Prinzipiell kann jedes Organ des menschlichen Körpers von Krebs befallen werden. Es gibt jedoch erhebliche Häufigkeitsunterschiede nach Alter, Geschlecht, kollektiver Zugehörigkeit, geographischer Region und Ernährungsgewohnheiten.^[2] In Deutschland treten Krebserkrankungen gehäuft in Organen wie den Brustdrüsen (Frauen), Prostata (Männer), Darm und Lunge auf (Abbildung 1). Je nach Lokalisation des Tumors liegen unterschiedliche Krankheiten mit unterschiedlichem Verlauf und unterschiedlichen Behandlungserfordernissen zugrunde.

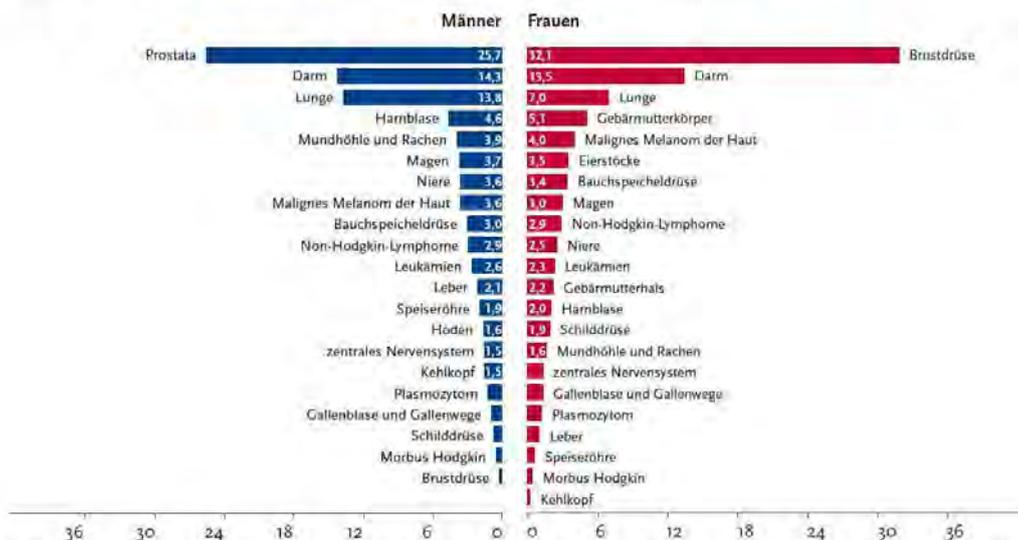


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorkategorien an Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008 (ohne nicht melanotischen Hautkrebs).^[2]

Die Entstehung von Krebs kann selten auf nur eine Ursache zurückgeführt werden. Großen Einfluss haben Noxen (krankheitserzeugende Einflüsse und Stoffe) während der Zellteilung, welche zur Veränderung im Erbgut führen. Zu ihnen zählen physikalische Noxen (UV-, Röntgen-, radioaktive Strahlung), chemische Noxen (Toxine, mutagen wirkende Substanzen), und Onkoviren. Ebenfalls krebsfördernd sind Einflüsse, die das Immunsystem daran hindern, entartete Zellen zu erkennen und zu beseitigen. Besonders Zellen, die sich schnell teilen, sind anfällig für Schäden. Entartet eine Zelle zur Tumorzelle, so kann sie dennoch versuchen die Differenzierung des Ausgangsgewebes zu imitieren. Liegt dieser Fall vor, so spricht man von einem differenzierten Tumor. Bei fehlender Imitation liegt ein undifferenzierter Tumor vor. Dies ist von essentieller Bedeutung, da mit abnehmender Differenzierung die Prognose zur Genesung schlechter wird und unter anderem die Neigung zur Metastasierung zunimmt.^[6]

1.2 Die Immunüberwachung

Zur Beseitigung von entarteten Zellen bedient sich das Immunsystem verschiedener Prozesse. Dennoch können entartete Zellen durch geschickte Mechanismen dem Immunsystem entkommen. Die erste These der „Immunüberwachung“ (immune surveillance), in der Zellen des Immunsystems Tumoren aufspüren und zerstören, wurde bereits 1950 von *Burnet*^[8] und *Thomas* als Konzept der „*tumor immune surveillance*“ postuliert. Seitdem musste die Hypothese häufiger modifiziert werden, da die Beziehung zwischen Immunsystem und Tumoren deutlich komplizierter ist. Prinzipiell ist das Immunsystem in der Lage, entartete Zellen zu erkennen und zu zerstören.^[9] Trotz der „*tumor immune surveillance*“ entwickeln auch immunkompetente Individuen Tumoren, was belegt, dass die Eliminierung der Tumorzellen nicht immer erfolgreich ist. Tumoren werden durch das angeborene Immunsystem, vor allem durch natürliche Killer-Zellen (NK in Abbildung 2) und Makrophagen, bekämpft.



Abbildung 2: Durch NK-Zellen eingeleitete Apoptose, Gleichgewicht zwischen inhibierenden und aktivierenden Signalen.^[10]

Mit Hilfe spezieller Rezeptoren, wie den KIR-Rezeptoren und den natürlichen cytotoxischen Rezeptoren, z. B. den NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D und dem DNAM-1-Molekül, können NK-Zellen Tumorzellen erkennen, da sich diese durch eine verminderte Expression von MHC-I(Major Histocompatibility Complex)-Molekül-Komplexen auf ihrer Zelloberfläche im Vergleich zu normalen Zellen unterscheiden. Die durch die NK-Zellen initiierte Apoptose von

Tumorzellen beruht auf der Verschiebung des Gleichgewichts zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen. Die verminderte Expression von MHC-I-Molekülen führt somit zum Fehlen der inhibierenden Signale. NK-Zellen binden an die Zielzelle und initiieren die Apoptose durch Freisetzung cytotoxischer Granula.^[10] Dies führt zur Zerstörung der entarteten Zielzelle. Das Prinzip wird als „*Missing-self-Hypothese*“ bezeichnet und wurde vom schwedischen Immunologen *Klas Kärre* in den 80er Jahren postuliert.^[11-12] So kann der Totalverlust von MHC-I-Komplexen an einer Zelle die Lyse durch NK-Zellen nach sich ziehen.

Darüber hinaus sind NK-Zellen in der Lage mit IgG-Antikörpern bedeckte Zellen über ihren Fc_γ -Rezeptor zu erkennen und dadurch zu neutralisieren. Die Zelle wird, wie im vorherigen Fall, durch Apoptose zerstört (Abbildung 3).



Abbildung 3: Neutralisierung einer antikörperbeladenen Zielzelle durch NK-Zellen.^[10]

Die Zerstörung der Zielzelle durch NK-Zellen wird zusätzlich durch verschiedene Cytokine, wie das IL-2 oder das IL-12, die im Mikromilieu sezerniert werden, unterstützt. Die Zerstörung von entarteten Zellen über Makrophagen ist hingegen wesentlich komplexer. Diese sind in der Lage, tumorspezifische Oberflächenstrukturen zu erkennen, bedürfen jedoch einer Stimulation durch Interferon- γ (IFN- γ), welches durch T_H1 (T-Helfer)-Zellen nach Kontakt mit einer Makrophage sezerniert wird. Durch die aktivierende Wirkung des IFN- γ sind T_H1 -Zellen in der Lage, lysosomale Enzyme, Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid oder auch TNF- α (tumor necrosis factor) freizusetzen, die zur Zerstörung von Tumorzellen beitragen. Bei Abwesenheit von IFN- γ produzierenden NK- oder T_H1 -Zellen kommt es zu keiner Aktivierung. Die Makrophagen bleiben inaktiv. Das adaptive Immunsystem ist ebenfalls in der Lage Tumoren mit Hilfe der cytotoxischen T-Zellen (CTL) anhand von Fremd-Antigenen zu erkennen. Die Unterscheidung von entarteten zu gesunden Zellen erfolgt mithilfe des T-Zell-Rezeptors (TCR) und des MHC-I-Proteinkomplexes. Diese befinden sich an der Oberfläche der Zellen und binden Peptidfragmente (8 – 10 Aminosäuren), die ein Abbild der in den Zellen synthetisierten Proteine darstellen. Die im Thymus geprägten

cytotoxischen T-Lymphozyten (CD8⁺ T-Zellen) sind so selektioniert, dass deren TCR nicht an MHC-I-Proteinkomplexe, die aus körpereigenen Proteinen entstammen, binden. Dieses Phänomen schützt den Körper vor Angriffen des eigenen Immunsystems und wird als Selbsttoleranz bezeichnet. Entartet eine Zelle durch Mutation, so exprimiert sie in der Regel neuartige Proteine, die dann als MHC-I-Komplexe an der Oberfläche der Zelle präsentiert werden. Diese körperfremden MHC-I-Proteinkomplexe werden von cytotoxischen T-Lymphozyten durch deren TCR erkannt, und der programmierte Zelltod wird über die physiologischen Signalwege (Fas/FasL, Perforin/Granzyme) eingeleitet. Damit stehen dem Immunsystem verschiedene Wege zur Zerstörung von malignen Zellen zur Verfügung. Dennoch bietet das Immunsystem keinen vollständigen Schutz, was die Tatsache beweist, dass auch gesunde immunkompetente Personen an Krebs erkranken können.

1.3 Immune-Escape-Mechanismen

Das einfache Drei-Stufen-Modell der Karzinogenese gliedert sich in die Phasen Initiierung, Promotion und Progression.

Die Initiierung ist der erste Schritt der Karzinogenese, in welcher eine Mutation durch ein Karzinogen hervorgerufen wird. Wird die Mutation in der DNA nicht durch ein „Wächtergen“ repariert oder die Zelle nicht durch Apoptose eliminiert, so persistiert die Mutation und es liegt ein irreversibler DNA-Schaden vor. Für die Entstehung eines Tumors sind mehrere Mutationen in Genabschnitten, etwa von Tumorsuppressorgenen, nötig, welche für die Kontrolle des Zellzyklus und der Zellteilung zuständig sind.^[13] Diese regen dann die Zelle zu unkontrolliertem Wachstum an. Das Ergebnis ist eine neue Zelle bzw. Spezies mit völlig anderen Charaktereigenschaften, die zwar noch keine neoplastische Zelle darstellt, jedoch für die Wirkung von Promotoren anfällig ist.

In der zweiten Phase erhält die mutierte Zelle einen Wachstumsstimulus, der zur Vermehrung führt. Der Wachstumsreiz kann erfolgen sowohl durch nicht genotoxische Karzinogene, die eine Entzündung fördern, aber keine Mutation auslösen, als auch durch Einwirkungen von Hormonen, die den Wachstumsstimulus durch sogenannte Wachstumsfaktoren fördern. Dabei gibt die Zelle durch klonale Expansion ihre DNA-Schäden an die Tochterzellen weiter. Durch die instabile DNA der proliferierenden Zelle steigt das Risiko für weitere Mutationen in Tumorsuppressorgenen. Durch den stetigen Wachstumsreiz und die Zellproliferation entsteht ein benigner Tumor, der begrenzt wächst und noch nicht metastasiert, wobei aber durch jede

Zellproliferation das Risiko für neue Mutationen steigt, sodass sich ein maligner Tumor bilden kann.

Im dritten und letzten Schritt kommt es zur Transformation der benignen zur malignen Zelle. Die Zellen im präneoplastischen Stadium erfahren durch karzinogene Einwirkung weitere Mutationen in den Tumorsuppressorgenen, die dazu führen, dass zahlreiche Protoonkogene in Onkogene umgewandelt werden. Die Zelle ist potenziell bösartig, teilt sich unentwegt und wird immortal, sofern Apoptose-Gene (z. B. p53) betroffen sind. Durch die zahlreichen Zellteilungen wird die Tumormasse aufgebaut und die Zellen entdifferenzieren sich zunehmend, wobei sie gesundes Gewebe verdrängen. Aus noch unbekanntem Gründen erlangen die Tumorzellen die Fähigkeit, sich aus dem Zellverband zu lösen und zu metastasieren, was letztendlich den Tod für den Patienten bedeutet.

Erst in der Progressionsphase sind die Abwehrmechanismen des Immunsystems in der Lage, die Zelle als neuen Phänotyp zu „erkennen“. Die Phasen der Tumorentwicklung und der Selektion können dabei, wie in Abbildung 4, in drei Phasen untergliedert werden.^[9]



Abbildung 4: Tumorentwicklung in Abhängigkeit der „immunen surveillance“.^[10]

In der Eliminierungsphase erkennen Immunzellen die entarteten Zellen und leiten die zuvor beschriebenen Mechanismen der „*immune surveillance*“ ein. Einen genaueren Überblick der parallel ablaufenden Prozesse liefert das von *Dunn* entworfene Modell für die Eliminierungsphase des Cancer-Immunoediting-Prozesses.^[9]

Sobald solide Tumoren eine bestimmte Ausdehnung erreicht haben, benötigen sie eine erweiterte Blutzufuhr, die durch stroma- und angiogenetische Proteine hervorgerufen wird. Durch das vermehrte Wachstum und die infiltrierende Verdrängung werden in der ersten Phase der Eliminierung von den angrenzenden Zellen Entzündungssignale ausgesendet, die Zellen des angeborenen Systems zum Entzündungsherd rekrutieren (Abbildung 4 Spalte 1 und Abbildung 5 a);

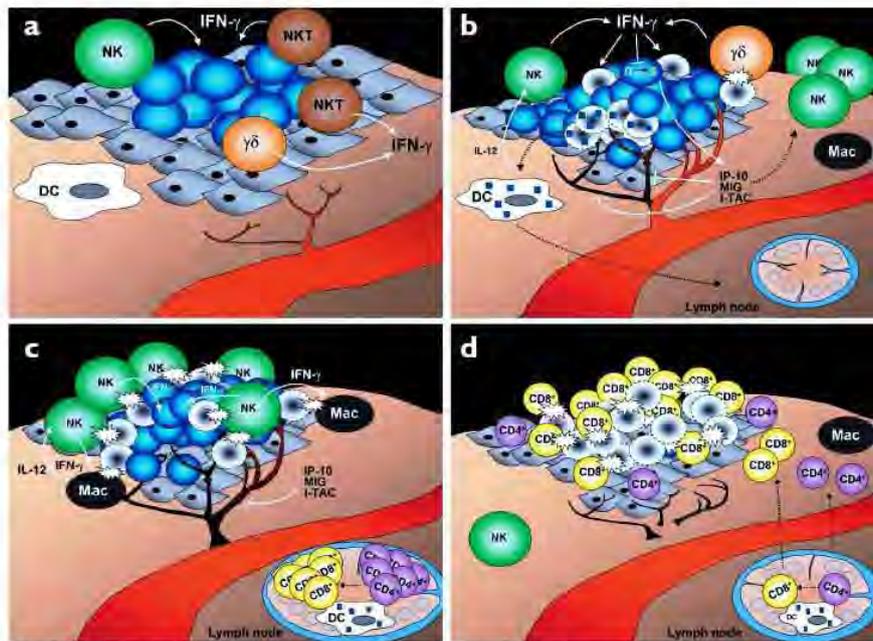
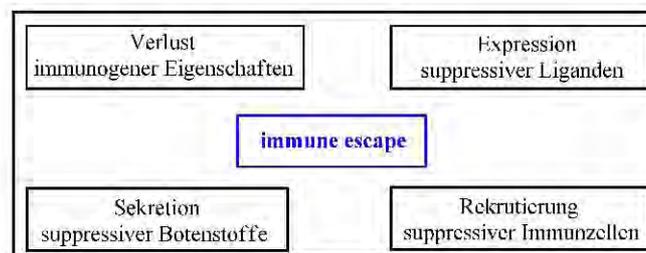


Abbildung 5: Modell für die Eliminationsphase des Cancer-Immunoediting-Prozesses.^[9] (CXCL11 (ITAC) = Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, wirkt chemotaktisch auf aktivierte T-Zellen; CXCL10 (IP10) = Interferon- γ - inducible Protein 10, wirkt chemotaktisch auf Monocyten/Makrophagen, T-Zellen, NK-Zellen und dendritische Zellen, fördert die T-Zell-Adhäsion an Endothelzellen, inhibiert die Angiogenese^[14-15]; CXCL9 (MIG) = Monokine induced by Gamma-Interferon, von Makrophagen produziert zur Aktivierung von T-Lymphozyten und somit der Aktivierung des adaptiven Immunsystems).

Die Lymphozyten (NKT = CTL; $\gamma\delta$ = TCR, bestehend aus γ - und δ -Untereinheiten, erkennt vermutlich vorwiegend körpereigene MHC-I-Peptidkomplexe) erkennen die entarteten Strukturen der Zellen anhand des MHC-I-Proteinkomplexes und werden zur Produktion von IFN- γ angeregt. Durch das von den Lymphozyten sezernierte IFN- γ kommt es mutmaßlich durch antiproliferative und apoptotische Mechanismen zur Zerstörung einzelner Zellen (Abbildung 5 b). Zusätzlich regt es die Bildung von Chemokinen an, einschließlich der angiostatischen Chemokine (ITAC, IP-10, MIG), die sowohl die Neovaskularisation des Tumors inhibieren als auch weitere NK-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen und andere Immun-Effektoren zum Tumor leiten. Die initiierten Maßnahmen haben einen antiproliferativen Einfluss auf die Tumorentwicklung, da die herbeigerufenen Zellen den Tumor attackieren. Die eingeleiteten immunologischen und nichtimmunologischen Mechanismen führen in einigen Tumorzellen zur Apoptose. Die toten Tumorzellen bzw. Bruchstücke zerstörter Tumorzellen werden von dendritischen Zellen aufgenommen und zu den Lymphknoten transportiert. In der dritten Phase, der Eliminierung, nimmt die gegenseitige Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen durch die reziproke Produktion von IFN- γ und IL-12 ab (Abbildung 5 c). Stattdessen wird die Apoptose der tumorösen Zellen durch den Tumornekrosefaktor(TNF)-Liganden, Perforin und reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Verbindungen eingeleitet. Die in die Lymphknoten eingewanderten dendritischen Zellen induzieren die Ausbildung von tumorspezifischen CD4⁺-T_H2-Zellen, die durch

Ausschüttung von IFN- γ wiederum die Ausbildung von CD8⁺-T_H1-Zellen erleichtern. Zudem sind CD4⁺-T_H2-Helferzellen an der Produktion antitumoraler Antikörper beteiligt, die durch Komplementaktivierung sowie durch ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) zur Tumorabwehr beitragen, indem Antikörper über den Fc γ RIII-Rezeptor von Makrophagen oder NK-Zellen die Zerstörung der Tumorzelle auslösen (Abbildung 3). In der vierten und letzten Phase wandern tumorspezifische CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen zum Tumor und zerstören die restlichen Antigen-präsentierenden Tumorzellen, die IFN- γ ausgesetzt waren und daraufhin an Widerstandsfähigkeit gewonnen haben (Abbildung 5 d). Bei nicht erfolgreicher Zerstörung aller entarteten Zellen tritt die Equilibrium-Phase ein (Abbildung 4, Spalte 2 und 3). Während dieses Prozesses üben die Lymphozyten und das sezernierte IFN- γ einen strengen Selektionsprozess auf die Tumorzellen aus, die das Tumorbett, bestehend aus unterschiedlichen genetisch instabilen und schnell mutierenden Tumorzellen, zwar eindämmen jedoch nicht vollständig auslöschen können. Das heißt das Immunsystem kommt einerseits seiner Aufgabe nach Überwachung nach, indem es entartete Zellen zerstört und somit den Organismus schützt. Andererseits ist es durch seine natürliche Selektion maßgeblich daran beteiligt, dass nur die resistenteren Tumorzellen den Selektionsprozess überstehen (*Survival of the Fittest*).^[16] Der Vorgang, bestehend aus der Überwachung und der Selektion, wird als Immunoediting bezeichnet.^[9, 15, 17] Die Equilibrium-Phase ist die zeitlich am längsten andauernde Phase.

Im Escape-Prozess sind die Tumorzellen durch Anpassungen unempfindlich gegen die eingeleiteten Maßnahmen des Immunsystems geworden. Dies ist der Augenblick, in dem sie beginnen zu expandieren und das Tumorbett verlassen. Der Tumor ist in diesem Moment klinisch detektierbar. Trotz der verschiedenen Mechanismen, die das Immunsystem zur *Immune surveillance* benutzt, sind Tumorzellen in der Lage, der Apoptose durch Anpassungsmechanismen zu entkommen (Schema 1).



Schema 1: Stark vereinfachtes Schema der Immune-Escape-Mechanismen.

Diese Anpassungen sind auf Mutationen durch die Krebszellen und die Selektion durch das Immunsystem zurückzuführen.^[15, 17] Eines der am weitesten verbreiteten Phänomene ist, dass Tumoren eine nur geringe Immunogenität besitzen und somit der Erkennung durch das Immunsystem entgehen können (Abbildung 6 Spalte 1).^[10]



Abbildung 6: Mögliche Mechanismen wie Tumoren der Immunerkennung entgehen.^[10]

In einigen Tumoren werden keine neuen (fremden) Peptide produziert, welche an MHC-I-Peptidkomplexen präsentiert werden könnten. Daher fungieren diese Tumore wie ganz normale Zellen und werden nicht erkannt. Wieder andere haben teilweise oder komplett die MHC-Proteine zur Antigen-Präsentation verloren oder exprimieren keine co-stimulatorischen Proteine. Sie entkommen somit der Erkennung durch aktivierte naive T-Zellen. Eine andere Möglichkeit, dem Immunsystem zu entkommen, besteht in der Abwesenheit von co-stimulatorischen Signalen wie dem B7-Rezeptor an Antigen-präsentierenden Zellen (APC) (Abbildung 6, Spalte 2 und Abbildung 7). Dies führt zur Tolerierung des Tumorantigens und damit des Tumors.



Abbildung 7: Aktivierung von naiven T-Zellen durch drei unterschiedliche Signale der APC.^[10]

Andere Tumoren reagieren auf die Antikörperbildung des Immunsystems mit Internalisierung der Antikörper durch Endozytose und anschließender Zersetzung, wodurch sie ebenfalls dem Immunsystem entkommen (Abbildung 6, Spalte 3). Eine weitere Möglichkeit, in der die durch das Immunsystem gebildeten Antikörper ihre Wirkung verlieren, ergibt sich während der genetischen Instabilität in der Equilibrium-Phase. Tumorzellen, die von den Antikörpern nicht attackiert werden, haben somit einen selektiven Vorteil. Durch genetische Veränderungen

besteht des Weiteren die Möglichkeit des Verlustes der Antigene, wodurch diese nicht mehr exprimiert werden und die Antikörper somit nutzlos sind. Andere Tumore besitzen die Eigenschaft, Moleküle zu produzieren, die immunsupprimierend wirken (Abbildung 6, Spalte 4). So exprimieren viele Tumorarten PD-L1 (programmed death ligand-1), der zur B7-Familie gehört. Der PD-L1 wirkt inhibierend auf den PD-1-Rezeptor, der auf aktivierten T-Zellen vorzufinden ist. Des Weiteren sind Tumore in der Lage, Enzyme, wie Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO), zu produzieren, welche Tryptophan zu dem immunsuppressiven Metaboliten Kynurenin abbauen. Tumore sind jedoch auch in der Lage, indirekt immunsupprimierend zu wirken, indem sie den Wachstumsfaktor TGF- β (Transforming Growth Factor β) sezernieren, welcher regulatorische T-Zellen rekrutiert, die durch Ausschüttung von Cytokinen, wie IL-10, immunsupprimierend auf CTL und T_H1-Zellen wirken. Die Ausschüttung von TGF- β hat außerdem weitreichende Folgen für NK-Zellen.^[18] Wie bereits zuvor erwähnt, erkennen NK-Zellen Tumorzellen durch eine verminderte Expression von MHC-I-Molekül-Komplexen und initiieren die Apoptose durch aktivierende Liganden (Abbildung 2). Da die Expression von NKG2D auf CD8⁺-T-Zellen sowie auf NK-Zellen entscheidend durch TGF- β gehemmt wird, hat dies weitreichende Folgen. Auf diese Weise entkommen Tumorzellen nicht nur CTL-Zellen, sondern auch NK-Zellen, obwohl sie bei einem MHC-1-Verlust durch Apoptose zerstört werden müssten. Dem Immunsystem können sich Tumore des Weiteren durch den Aufbau einer physikalischen Barriere entziehen, indem sie Collagen rund um den Tumor sezernieren, was Lymphozyten am Zugang hindert (Abbildung 6, Spalte 5). Ein weiterer Einflussparameter wird als Immunseneszenz beschrieben.^[18] Hauptgrund für die Inzidenz von malignen Erkrankungen ist die mit dem Alter abnehmende Fähigkeit von Immunzellen, neue Antigene zu erkennen und zu bekämpfen. Als letztes soll noch der tumorinduzierte „counterattack“ vorgestellt werden.^[17] So sind Fas-Liganden (FasL, CD95) exprimierende Krebszellen in der Lage, die Apoptose in Lymphozyten einzuleiten. Hierzu bindet der FasL, der an der Oberfläche von Krebszellen exprimiert wird, an den Fas-Rezeptor der Lymphozyten und löst damit den programmierten Zelltod aus (Abbildung 8).

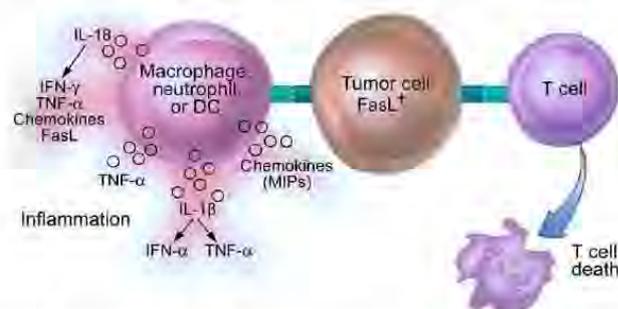


Abbildung 8: Vorgeschlagener Mechanismus zum Tumor „counterattack“.^[17]

1.4 Tumormimmuntherapie

Für die Behandlung von Krebserkrankungen kommen verschiedene Strategien zum Einsatz, wobei die frühzeitige Eradikation oft die besseren Ergebnisse liefert, da sich Resistenzen schwerer als bei weniger aggressivem Vorgehen ausbilden können.^[19] Die klassischen Behandlungsmethoden bei Krebs beruhen auf drei Säulen - der operativen Tumorentfernung (Resektion), der Chemotherapie und der Strahlentherapie. Die beiden letztgenannten Methoden haben erhebliche zytotoxische Nebenwirkungen. Häufig werden die Therapiemethoden miteinander kombiniert. Bei der Chemotherapie handelt es sich um eine medikamentöse Therapie. Die unter kurativen, adjuvanten oder palliativen Aspekten eingesetzten Zytostatika wirken sowohl zytotoxisch als auch zytostatisch hauptsächlich auf entartete Zellen.^[20] Eine Form der Chemotherapie geht auf Beobachtungen an Opfern der Bombardierung eines mit *S*-Lost (Senfgas) beladenen Schiffes am Ende des 2. Weltkrieges zurück, bei denen eine Schädigung der stark proliferierenden Zellen beobachtet wurde.^[21] Aus den Erkenntnissen wurde ein weniger toxisches *N*-Lost-Analogon als Chemotherapeutikum (Endoxan®) entwickelt, welches die erhöhte Wachstumsrate von Tumorzellen ausnutzte. Bekannte Meilensteine der Zytostatikaentwicklung sind u.a. Methotrexat (ab 1950), die Cisplatinverbindungen (ab 1965) oder Taxol (Zulassung 1992, Abbildung 9).^[22]

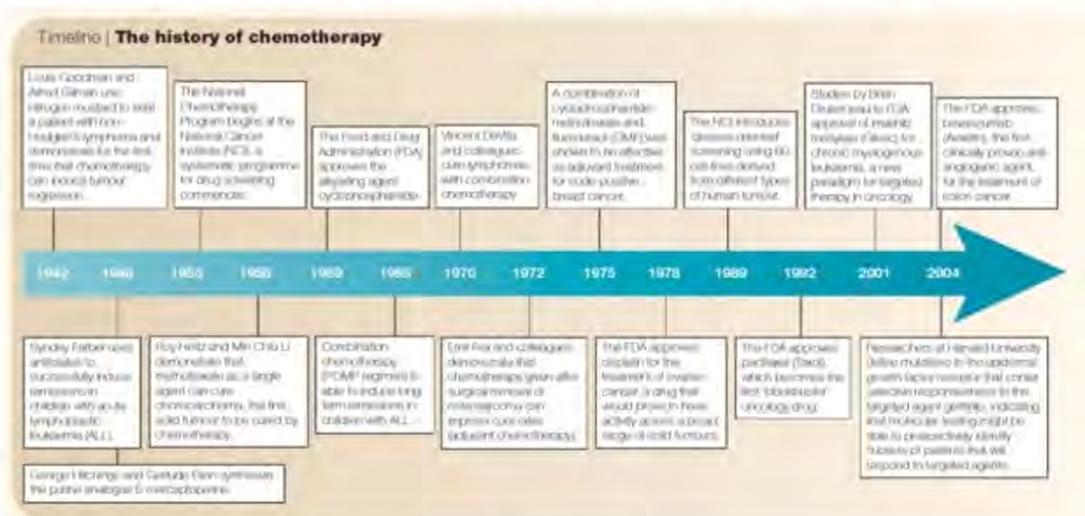


Abbildung 9: Historische Entwicklung der Chemotherapeutika.^[22]

Moderne Chemotherapien beruhen auf dem gleichzeitigen Einsatz von mehreren Wirkstoffen, wobei das Ansprechen von verschiedenen Faktoren, wie der Halbwertszeit des Wirkstoffes, der Bioverfügbarkeit in den entarteten Zellen sowie deren Chemosensitivität und Chemoresistenz, abhängt. Die zur Anwendung kommenden Wirkstoffe haben verschiedene Wirkmechanismen. Manche wirken auf Zellen, die sich gerade in der Mitose befinden. Ein Beispiel hierfür sind die Anthracycline, welche die Topoisomerase-Aktivität hemmen, so dass

die Zellteilung nicht mehr stattfinden kann.^[23-24] Andere Wirkstoffe, wie die Cisplatinverbindungen, induzieren DNA-Schäden durch Quervernetzungen (intrastrand- oder interstrand-crosslink) unterschiedlichster Art, die zu Konformationsänderungen in den DNA-Strängen und zu anschließender Überexpression des p53-Proteins führen, was wiederum direkt und indirekt die Apoptose einleitet.^[25-26] Zytostatika, die zur Gruppe der Alkylantien gehören, alkylieren die DNA. Dadurch kommt es bei der DNA-Transkription zu Fehlpaarungen und somit zu Mutationen. Diese bewirken die Einleitung der Apoptose der Tumorzelle. Vertreter der Alkylantien sind die Stickstoff-Lost-Derivate, wie z. B. Bendamustin.^[27] DNA-Schäden können aber auch durch den Einbau falscher Nucleoside induziert werden. Ein Beispiel hierfür ist Gemcitabin, ein Prodrug, dessen zytostatische Wirkung darauf beruht, dass anstatt von Cytidin Gemcitabintriphosphat in die DNA eingebaut wird, wodurch die DNA-Synthese unterbrochen und der Zelltod eingeleitet wird.^[28] Resistenzen gegen die eingesetzten Zytostatika sind nicht selten und können originär bestehen oder sich behandlungsbedingt ausbilden. Daher ist die kurzfristige und vollständige Eradikation von Tumoren essentiell, um diesem Sachverhalt vorzubeugen. In Abbildung 10 sind die Cisplatin-Resistenzmechanismen zusammengefasst, die bedingt auch für weitere Zytostatika zutreffen.

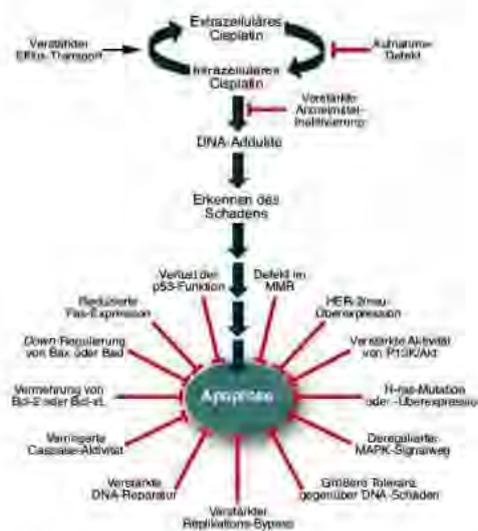


Abbildung 10: Übersicht über wesentliche Cisplatin-Resistenzmechanismen.^[25]

Die verwendeten Zytostatika wirken oft unselektiv, da sowohl gesundes Gewebe als auch Tumoren angegriffen werden. So rufen sie bei Patienten zum Teil massive Nebenwirkungen hervor, wie z. B. die Schwächung der Immunabwehr, Magen-Darm-Störungen und Haarausfall. Paradoxerweise sind viele Zytostatika selbst karzinogen.^[23] Da die therapeutische Breite der Zytostatika sehr gering ist, können die Dosierungen aufgrund der Toxizität nur bis zu einem bestimmten Punkt gesteigert werden. Wenn nicht alle Zellen des Tumors und die

seiner Metastasen eradiziert werden, ist mit Resistenzbildung zu rechnen. Resistenzen müssen frühestmöglich erkannt werden, um der Anhäufung von Mutationen entgegenzuwirken. Daher wird an neuen Therapieverfahren geforscht, die eine hohe selektive Wirkung gegen Krebszellen aufweisen.

Eine Krebsimmuntherapie mit ihren verschiedenen Ansätzen besitzt ein vielversprechendes Potenzial. Man unterscheidet zwischen der aktiven und der passiven Immuntherapie. Bei der aktiven Immunisierung werden Substanzen verabreicht, die im Immunsystem des Empfängers eine Immunantwort auslösen. Die induzierte Immunantwort soll im Idealfall zur Apoptose der Tumorzellen oder zumindest zu einem verzögerten Tumorwachstum führen. Im Gegensatz dazu werden bei der passiven Immunisierung Antikörper oder Antikörper-Fragmente verabreicht, die selektiv an Tumorzellen binden sollen und durch verschiedene Mechanismen zur Zerstörung der Tumore führen (vgl. Abbildung 3). Im Bereich der passiven Immunisierung sind derzeit laut Veröffentlichung im Bundesanzeiger Nr. 388 vom 08.09.2013 31 zugelassene monoklonale Antikörper gegen Krebserkrankungen im klinischen Einsatz.^[29] Die Wirkmechanismen der monoklonalen Antikörper sind vielseitig. Sie dienen z. B. der Abwehr (Rituximab), der Hemmung der Signaltransduktion (Trastuzumab), der Hemmung der Angiogenese (Ranibizumab), der Vergiftung durch Kopplung mit Zellgiften oder radioaktiven Substanzen oder der Verknüpfung als trifunktionale Antikörper zur Bindung von CTL an Tumoren (Catumaxomab).^[10, 30] Zur Produktion monoklonaler Antikörper werden vorwiegend Mauszellen genutzt, die jedoch bei Verwendung am Menschen die Produktion von Antimausantikörpern nach sich ziehen und damit eine Blockierung der therapeutischen Antikörper bewirken oder schwere allergische Reaktionen hervorrufen würden. Diese Probleme können durch humanisierte Antikörper umgangen werden. Eine Antikörperbehandlung sollte sich möglichst spezifisch gegen die Krebszellen richten und gesundes Gewebe nicht zerstören, wobei die Balance zwischen Wirksamkeit und Nebenwirkungen gefunden werden muss. Trotz des zielgerichteten Wirkmechanismus sind die zugelassenen Antikörper nicht frei von Nebenwirkungen. Die Entwicklung von therapeutischen Antikörpern setzt das Vorhandensein von tumorspezifischen Merkmalen auf Krebszellen voraus, die jedoch nicht auf gesunden Zellen vorkommen sollten. Solche Strukturmerkmale sind Tumorantigene, die von Krebszellen produziert werden und in der Lage sind, Immunantworten auszulösen. Diese Tumormarker sind daher wichtige Zielstrukturen der Krebsimmuntherapie und Diagnostik.^[31] Viele der bekannten Tumorantigene werden als MHC-I-Komplexe auf der Zellmembran präsentiert.^[10] Unterschiede im Aufbau und/oder in der Expressionsdichte im Vergleich zu einer normalen

Zelle machen die Tumorantigene zu potenziellen Targets sowohl für Effektorzellen des Immunsystems^[32] als auch für Antikörper. Sie werden unterteilt in die tumorspezifischen Antigene (TSA) und die tumorassoziierten Antigene (TAA). Tumorantigene sind Fragmente von in Tumoren produzierten Proteinen, die sich auf der äußeren Zellmembran, im Zellplasma und im Zellkern befinden können. Sie sind die Folge des in Krebszellen veränderten Genoms, durch das neue körperfremde Genprodukte oder Proteine entstehen können. Oft führen die Veränderungen jedoch nicht zu einer Immunantwort, da es sich nicht um körperfremde Genprodukte handelt. Das in der Krebsimmuntherapie für therapeutische Zwecke benötigte idealisierte Tumorantigen wird von allen Krebszellen bei jeder Krebserkrankung ausschließlich auf der Zellmembran exprimiert, ist jedoch auf gesunden Zellen nicht vorzufinden.^[33] Es wird zudem über den MHC-I-Komplex an der Zellmembran präsentiert, wodurch es von T-Zellen im MHC-restriktierten Modus erkannt werden kann. Die Expression des Tumorantigens sowohl auf der Zelloberfläche als auch über den MHC-I-Komplex erfolgt in hoher Dichte über den gesamten Zellzyklus und wird nicht herunterreguliert (vgl. Abbildung 6, Spalte 1). Der Idealfall wird jedoch in der Realität nicht vorgefunden. Von den über 2000 bekannten Tumorantigenen^[34] sind die meisten nicht tumorspezifisch (TSA), sondern tumorassoziiert (TAA), was dazu führt, dass sie auch von gesunden Zellen exprimiert werden. Allerdings sind bei vielen Tumoren die Tumorantigene überexprimiert oder es liegen durch Mutationen im Genom strukturelle Veränderungen in der Proteinsequenz vor. Viele Tumorantigene treten nur bei bestimmten Tumorarten und dort oft auch nur in bestimmten Fällen auf. Danach richtet sich die Klassifizierung, die vom Expressionsmuster abhängt und zwischen Differenzierungsantigenen, Mutationsantigenen, onkoviralen Proteinen, Tumor-Hoden-Antigenen und überexprimierten Antigenen unterscheidet.^[10, 35-36] Wegen der daraus hervorgehenden Komplexität an Tumorantigenen können nicht für alle Krebserkrankungen monoklonale Antikörper bereitgestellt werden. Da es sich bei den meisten Antigenen um TAA handelt, ist die Problematik bei der Anwendung von Antikörpern, so selektiv diese auch sein mögen, dass stets Nebenwirkungen und Gewebeschädigungen auftreten können. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das HER2-Tumorantigen, das nicht nur auf der Zelloberfläche bestimmter Brust- und Magentumoren vorkommt, sondern in geringerem Umfang auch auf gesundem Herzmuskelgewebe. Patienten, die aus diesem Grund mit Trastuzumab behandelt werden, erleiden ohne die Einleitung von Gegenmaßnahmen irreparable Schädigungen am Herzmuskel.^[30] Ein weiteres Problem ist die mangelnde Konzentration und Reichweite der Antikörper bei mit Nährstoffen unterversorgten großen Tumoren und zahlreichen Metastasen. Eine Antikörper-Tumorthherapie wird auch in Zukunft an konventionelle Therapien gebunden

sein und unterstützend verabreicht werden. Bei den in der EU zugelassenen HPV-Impfstoffen *Cervarix*[®] und *Gardasil*[®], die zur Immunisierung gegen humane Papillomviren (HPV) eingesetzt werden, handelt es sich nicht um eine Krebsimmuntherapie im eigentlichen Sinn, sondern vielmehr um Impfstoffe, die auf die Erreger zielen, die vor allem Gebärmutterhalskrebs auslösen können. Zum derzeitigen Zeitpunkt stehen keine Therapeutika für eine spezifische aktive Immunisierung von Tumoren bereit.

1.5 Das epitheliale Mucin MUC1

Mucine (lat. mucus) sind protektive Substanzen und strukturgebende Bestandteile des Schleims vieler Organismen.^[37-38] Sie gehören zur Familie der hochmolekularen filamentartigen Glycoproteine, die auf Epithelzellen exprimiert werden und aus einer Proteinkette bestehen, an deren Seitenketten Polysaccharide angeknüpft sind, die einen Anteil von 50 – 90 % am Gewicht ausmachen können.^[39] Die 19 literaturbekannten humanen Mucine können in sekretorische und membrangebundene Formen untergliedert werden.^[40] Sekretorische Mucine bilden viskose, über intermolekulare Disulfidbrücken^[41] verknüpfte oligomere Mucinsekrete (Mucus), die dem Schutz von Epithelzellen des respiratorischen, gastrointestinalen und reproduktiven Traktes dienen (Abbildung 11).

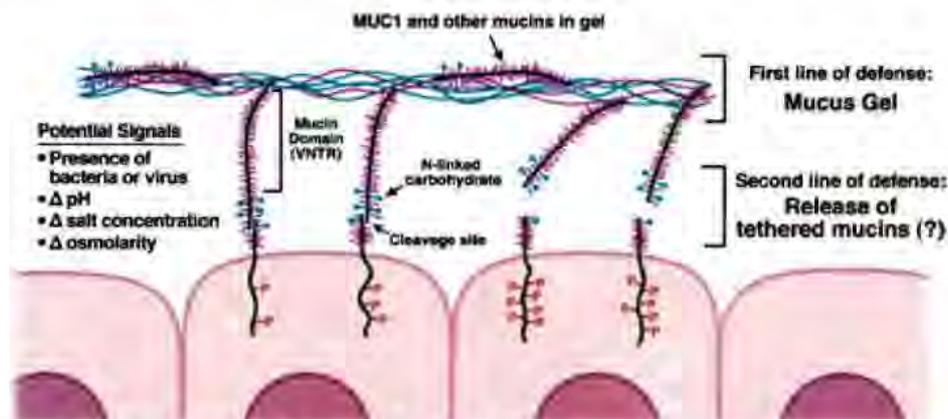


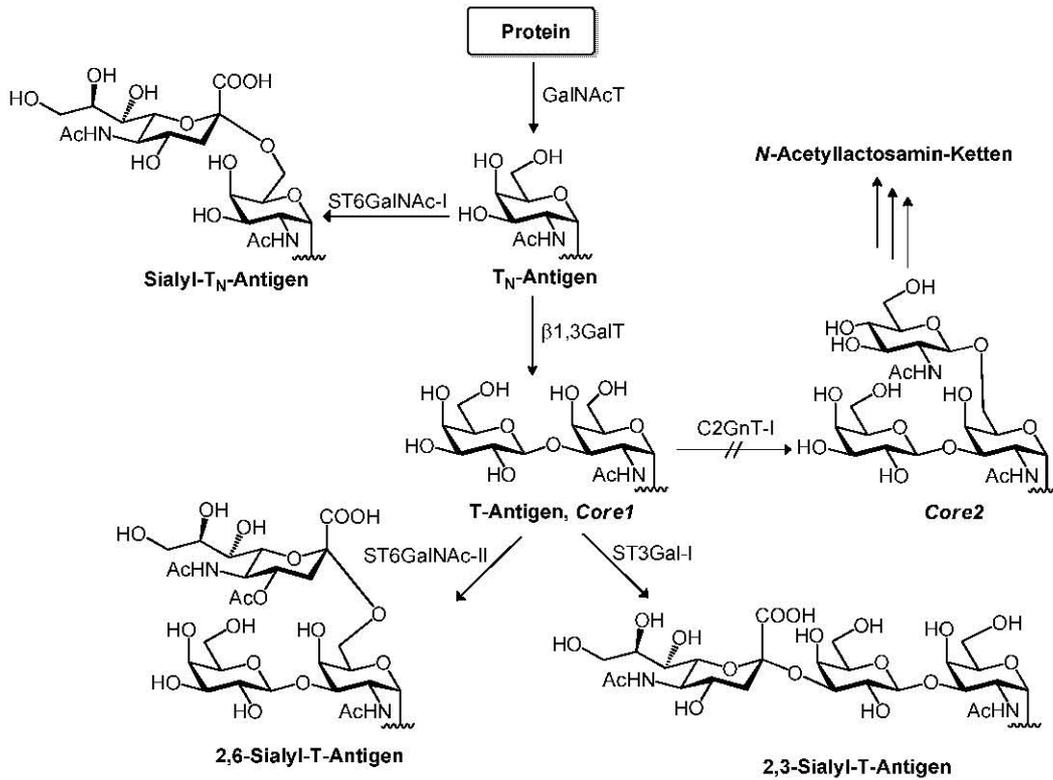
Abbildung 11: Der Schutz der Epithelzellen durch Mucine.^[39]

Die Polysaccharide verleihen den Mucinen eine hohe Wasserbindungskapazität und schützen das zentrale Protein vor der Proteolyse oder Einwirkung von Säuren (im Verdauungssystem). Mucine sind wichtig für die Barrierefunktion der Schleimhäute und für die Adhäsion. Während membrangebundene Mucine über eine hydrophobe Domäne in der Lipiddoppelschicht verankert sind, üben sie als Bestandteil der Glycocalyx eine Schutzfunktion für die darunter liegenden Zellen aus und sind an Zelladhäsionsprozessen sowie an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt. Obwohl die Aminosäurezusammensetzung von 12 – 20 Aminosäuren für jede Mucinart verschieden und charakteristisch ist, ist

der Aufbau ihrer Protein-Kernstruktur aus einer variablen Anzahl an repetitiven Sequenzeinheiten (ca. 20 – 150), den tandem repeats (variable number of tandem repeats, VNTR), ein gemeinsames Strukturmerkmal. Die tandem repeat-Domänen sind in allen Fällen reich an Prolin und den potentiell *O*-glycosylierten Aminosäuren Threonin und Serin, an denen komplexe oligomere Kohlenhydratstrukturen, die auf den acht unterschiedlichen Kernstrukturen beruhen (Core1 bis Core8), angeknüpft sind.^[42]

Das auf den Epithelzellen verschiedener Organe ubiquitäre, exprimierte Mucin MUC1 nimmt unter den Glycoproteinen vom Mucintyp eine Sonderstellung ein. Als erstes Mucin wurde es durch monoklonale murine Antikörper (SM3) gegen Fetttröpfchen aus humaner Milch nachgewiesen^[39] und galt lange Zeit als das einzige Transmembran-Mucin.^[39, 43-48] Die Entdeckung weiterer Mucine und damit einhergehend die vollständige Gensequenzanalyse zeigten, dass die Mucine MUC3 – 4,^[49-50] MUC12 – 13^[51-52] und MUC15 – 17^[53-55] ebenfalls über Transmembrandomänen verfügen und somit in membrangebundener Form vorkommen. Das MUC1 wird als Transmembran-Heterodimer exprimiert, dessen Proteinteile stark in der Größe variieren, wobei das größere der beiden nicht-kovalent miteinander verknüpften Fragmente die extrazelluläre Domäne mit den tandem repeats bildet.^[46] Die repetitiven Sequenzeinheiten des MUC1 bestehen aus 20 Aminosäuren der Aminosäuresequenz AHGVT SAPDTRPAPGSTAPP und beinhalten fünf potentielle *O*-Glycosylierungsstellen, wobei die Glycosylierungsmuster nicht nur gewebs- und zelltypspezifisch sind, sondern auch stark vom jeweiligen Entwicklungsstand der Zelle abhängen.^[46] Die Anzahl der tandem repeat-Einheiten unterliegt einem vererbten Polymorphismus des MUC1-codierenden Genabschnitts und bewegt sich in der Regel zwischen 20 und 120.^[46] Sowohl der hohe Prolinanteil als auch die zahlreichen komplexen Polysaccharide in den Kohlenhydratseitenketten verursachen im Proteinteil eine starre, langgestreckte Konformation, sodass MUC1 über die Glycocalyx (200 – 500 nm) weit in den extrazellulären Raum hineinragt.^[56] Die Transmembranregion sowie die kurze cytoplasmatische Domäne wird von dem kleineren der beiden MUC1-Proteinfragmente gebildet, das vermutlich durch Interaktion mit dem Cytoskelett an Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist (Abbildung 11).^[39, 57] Die komplexen Kohlenhydratstrukturen werden im Anschluss an die ribosomale Proteinbiosynthese in diversen Kompartimenten des *Golgi*-Apparats aufgebaut. Die selektive Glycosylierung der Serin- und Threonin-Seitenkettenfunktionen des MUC1 erfolgt im *cis*-*Golgi*-Apparat durch einen katalytischen Prozess, in dem das *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) durch *N*-Acetylgalactosamin-Transferase (GalNAcT) an die Seitenkette von Serin oder Threonin

unter Ausbildung einer *O*-glycosidischen Bindung zum T_N-Antigen angeknüpft wird (Schema 2).^[42, 58]



GalNAcT: UDP-*N*-Acetyl- α -D-galactosamin: Polypeptid *N*-Acetylgalactosaminyltransferasen
 β 1,3GalT: Core 1 β 1,3-Galactosyltransferase
 C2GnT-I: Core 2 β 1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase-I
 ST6GalNAc-I: CMP-NeuNAc:GalNAc-R α 2,6-Sialyltransferase-I
 ST6GalNAc-II: CMP-NeuNAc:GalNAc-R α 2,6-Sialyltransferase-II
 ST3Gal-I: CMP-NeuNAc:Gal β 1,3GalNAc-R α 2,3-Sialyltransferase-I

Schema 2: Tumorassoziierte *O*-Glycosylierung des Mucins MUC1.^[58]

In normalen Zellen erfahren Mucinmoleküle beim weiteren Durchlaufen des *Golgi*-Apparats eine schrittweise Verlängerung der Saccharidseitenketten. Dabei wird durch die β 1,3-Galactosyltransferase das zentrale *N*-Acetylgalactosamin mit Galactose zur sogenannten Core1-Struktur (β Gal(1→3)- α GalNAc; T-Antigen) umgesetzt. Die Core1-Struktur dient β 1,6-*N*-Acetylglucosamintransferasen (C2GnT-I) als Ausgangsverbindung bei der darauffolgenden Übertragung von *N*-Acetylglucosamin, woraufhin sich die Core2-Struktur (β Gal(1→3)-[β GlcNAc-(1→6)] α GalNAc) ausbildet.^[58] Die Core2-Struktur wird durch weitere Glycosyltransferasen in komplexe oligomere *N*-Acetylglucosamin-Ketten überführt. Durch Anknüpfung von Fucose oder Sialinsäure bzw. durch Sulfatierung wird das Kettenwachstum im *trans-Golgi*-Apparat terminiert.^[46, 59] Auf gesunden Epithelzellen werden überwiegend auf der Core2-Einheit basierende Oligosaccharidstrukturen beobachtet, die entsprechend des vorgestellten Biosynthesewegs aufgebaut werden (Abbildung 11) und so das Peptidrückgrat des MUC1 effektiv verhüllen.

1.6 MUC1 als überexprimiertes tumorassoziertes Antigen

Während das gesunde epitheliale Mucin MUC1 eine starre langgestreckte Konformation im Glycoproteinteil einnimmt, die nur auf der extrazellulären Seite der Zelle zu finden ist, geht diese Polarisation zur apicalen Seite in Tumorzellen verloren.^[60] Auf Adenokarzinomzellen, also Karzinomen, die aus Drüsengeweben hervorgehen, wird das Glycoprotein auf der gesamten Zelloberfläche und im Vergleich zu Normalzellen in drastisch erhöhter Weise exprimiert.^[46, 61] Zusätzlich zum Polaritätsverlust und zur erhöhten Expression wird im tumoralen Gewebe eine charakteristisch veränderte Kohlenhydratstruktur beobachtet (Abbildung 12), die auf eine fehlerhafte Aktivität verschiedener Glycosyltransferasen im *cis/trans-Golgi-Apparat* zurückgeführt werden kann.^[42, 46]

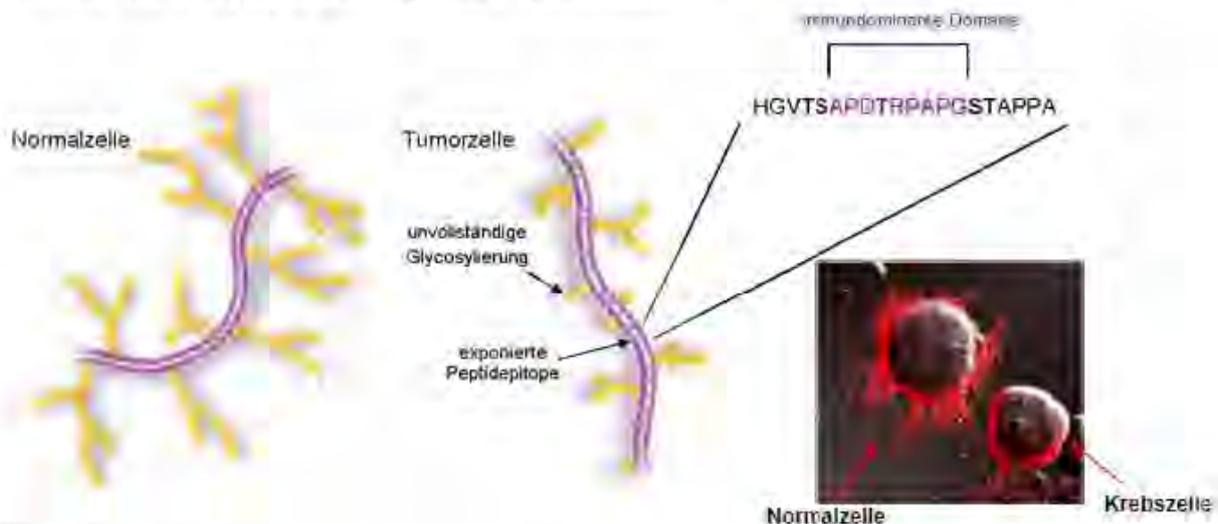


Abbildung 12: Differenz in der Expression von MUC1 zwischen einer Normalzelle und einer Krebszelle.

Sowohl die Herunterregulierung als auch die in einigen Krebszelllinien (z. B. BT20, T47D) ganz fehlende Expression der β 1,6-*N*-Acetylglucosamintransferase (C2GnT-I) führt partiell bzw. vollständig zum Erliegen der Bildung von komplexen Sacchariden mit Core2-Struktur.^[42, 58] Bei gleichzeitig erhöhter Aktivität verschiedener Sialyltransferasen (ST6GalNAc-I, ST6GalNAc-II, ST3Gal-I) kommt es zu einem frühzeitigen Abbruch des Glycankettenwachstums wie in den Brustkrebszelllinien T47D und MCF7 (Michigan Cancer Foundation).^[46] Wegen der nun relativ kurzen Saccharidseitenketten ist das Proteinrückgrat für das Immunsystem zugänglich. Veränderte Enzymaktivitäten zwischen normalen Zellen und Tumorzellen führen zur Expression der sogenannten tumorassozierten Antigenstrukturen (Schema 2).^[58] Das vorwiegend auf Magen-, Darm-, Ovarial- und Mammakarzinomen zu beobachtende tumorassozierte Sialyl-T_N-Antigen^[62-64] beruht auf der Sialylierung des *N*-Acetylgalactosamins (T_N-Antigen), welches durch die α 2,6-Sialyltransferase ST6GalNAc-I

im frühen Stadium der Glycoproteinbiosynthese katalysiert wird.^[58] Die Herunterregulierung der *N*-Acetylglucosamintransferase (C2GnT-I) führt auch zu einer Akkumulation der Core-1-Struktur. Diese als T-Antigen bezeichnete Struktur (*Thomsen-Friedenreich-Antigen*) wurde als tumorassoziiertes Antigen schon früh in Brustkrebsgeweben nachgewiesen.^[65] Dort dient es als Substrat für die in Karzinomzellen überexprimierten Sialyltransferasen α ST3Gal-I und α ST6GalNAc-II, die die Bildung der beiden regioisomeren Antigene (2,3)-Sialyl-T- und (2,6)-Sialyl-T-Antigene katalysieren. Diese Antigene sind bei Patienten mit akuter myeloider Leukämie auf der Oberfläche von Leukocyten vorzufinden.^[66] Das (2,3)-Sialyl-T-Antigen kann als dominierendes Glycan in der Brustkrebszelllinie T47D,^[67] in Magenkarzinomzellen des Typs HT-29 und K562^[68] sowie in verschiedenen Dickdarmkrebszellen^[69] nachgewiesen werden. Bei der weiteren katalytischen Übertragung einer Sialinsäureeinheit auf das (2,3)-Sialyl-T-Antigen durch α 6-Sialyltransferase (α 6STGalNAc-II) wird das bis-sialylierte T-Antigen (Disialyl-Core1) als tumorassoziierte Saccharid-Struktur erhalten, das ebenfalls in Brusttumoren beobachtet werden kann.^[58] Durch die charakteristisch verkürzten Oligosaccharidseitenketten, welche immunogene Strukturen darstellen, kommt es zu einer Freilegung von in gesunden Zellen abgeschirmten Sequenzen des Apoproteins, wodurch neue, tumorspezifische Peptidpitope für das Immunsystem zugänglich werden (Abbildung 13).

Eine dieser sogenannten immundominanten Peptid-Domänen ist die Sequenz PDTRP des tandem repeat des MUC1, die von verschiedenen monoklonalen Antikörpern erkannt wird. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen konnte für diese partielle Sequenz innerhalb des MUC1 eine definierte turn-Struktur ermittelt werden,^[70-71] die von der Art der Glycosylierung des MUC1 abhängt^[72] und aus dem gestreckten Peptidrückgrat herausragt, wodurch sie Antikörpern eine Andockstelle bietet. Eine weitere immundominante Domäne stellt die partielle Sequenz GSTA dar, wobei die glycosylierte Variante immunogener wirkt und über den monoklonalen Antikörper SM3 nachgewiesen werden kann.^[73-74] Die Sequenzabschnitte TSAPDTRPA sowie STAPPAHGV stellen jeweils ein CD8⁺-T-Zell-Epitop dar und führen in Immunisierungsversuchen zu einer cytotoxischen T-Zell-Antwort.^[75-76] Das MUC1 wird in malignen Zellen je nach Krebszelllinie nicht nur in charakteristisch veränderter Form exprimiert, sondern ist zudem entscheidend an der Entwicklung, der Ausbreitung und dem Wachstum von Tumoren beteiligt. Der Verlust der Polarisation, d. h. die Expression des MUC1 auf der gesamten Epithelzelloberfläche, gilt als initialer Vorgang bei der Bildung von metastasierenden Zellen. Sowohl durch die langgestreckte Struktur des MUC1-Glycoproteins als auch durch den hohen Sialinsäureanteil wird die Oberfläche von Tumorzellen sterisch sowie elektrostatisch abgeschirmt, sodass E-Cadherin vermittelte Zell-

Zell-Kontakte blockiert^[77] und/oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen über Integrine destabilisiert werden.^[78] Diese Vorgänge begünstigen das Ablösen von Krebszellen aus dem Zellverband. Das tumorassoziierte MUC1 übt des Weiteren seine immunsuppressive Wirkung aus, indem andere Oberflächenantigene maskiert und die Adhäsion von NK-Zellen und CTL-Zellen eingeschränkt werden,^[79] wobei der Grad der MUC1-Expression als direkter Indikator für das Fortschreiten bei einer Vielzahl von Krebsarten angesehen werden kann. Das verstärkte Auftreten von tumorassoziierten Antigenen auf der Oberfläche von Tumorzellen korreliert häufig mit einer schlechten Prognose für den Patienten.^[80]

Die Krebsbehandlung durch aktive Immunisierung mit Tumorstoffen verfolgt das Ziel, die Toleranz des Immunsystems gegenüber tumorassoziierten Antigenstrukturen zu brechen und eine starke körpereigene Immunantwort durch simultane Aktivierung von CTL-Zellen und einer T-Helferzelle vermittelten Antikörperproduktion auszulösen. Eine CTL-Antwort ist nicht immer ausreichend, um die Entwicklung von Tumoren zu unterbinden.^[48] Spezifische Antikörper sind in der Lage, sowohl eine komplementvermittelte Lyse von Tumorzellen als auch die Eliminierung von zirkulierenden Krebszellen einzuleiten. Sie sind daher ein entscheidender Bestandteil der Krebsimmuntherapie. Die im MUC1 auf Tumorzellen charakteristisch veränderten Glycopeptid-Antigene sowie der Polymorphismus^[46] in dem tandem repeat des MUC1 und die unmaskierten freiliegenden Peptid-Epitope stellen immunogene Strukturen dar, auf deren Grundlage die Entwicklung selektiver Immuntherapien, mit dem Ziel gegen den Tumor gerichtete Immunantworten zu induzieren, gelingen könnte.

2 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgt die Synthese von definierten tumorassoziierten Glycopeptidantigenen aus der extrazellulären, repetitiven Sequenz des epithelialen Mucin MUC1. Der Einsatz von synthetischen Glycopeptiden, die Partialstrukturen krebsspezifischer Zelloberflächenglycoproteine imitieren, sollte die Induktion sowohl einer zellulären als auch einer MHC-restringierten humoralen Immunantwort ermöglichen. Die vollsynthetischen Glycopeptide als Antigenstrukturen müssen so modifiziert werden, dass das Immunsystem die tumorassoziierten Zelloberflächenglycoproteine als entartet erkennt. Dies bildet auch die Grundlage für die Entwicklung von Antitumorvakzinen in der Krebsimmuntherapie. Als Zielsequenzen dienen eine aus 17 Aminosäuren aufgebaute Partialstruktur, die das Peptidepitop PDTRP als immundominante Domäne enthält, sowie die aus 22 Aminosäuren bestehende Sequenz, die die vollständige Wiederholungseinheit (tandem repeat) des MUC1 beinhaltet. Letztere weist die immundominante Domäne und ebenso die beiden Sequenzabschnitte TSAPDTRPA und STAPPAHGV, die jeweils ein cytotoxisches CD8⁺-T-Zellepitop repräsentieren, auf (Abbildung 13).^[39, 75-76]

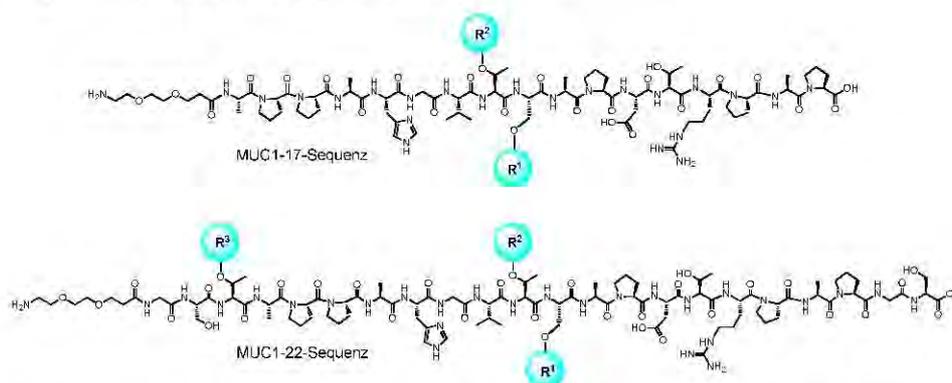


Abbildung 13: Geplante Zielsequenzen aus der extrazellulären Wiederholungseinheit des MUC1.

An diese Peptidsequenzen sind die in der Einleitung beschriebenen tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene, wie das T_N-, das T-, das ST_N-Antigen sowie die beiden regioisomeren (2,3)-ST- und (2,6)-ST-Antigene jeweils an Serin oder Threonin angebunden (Abbildung 14).

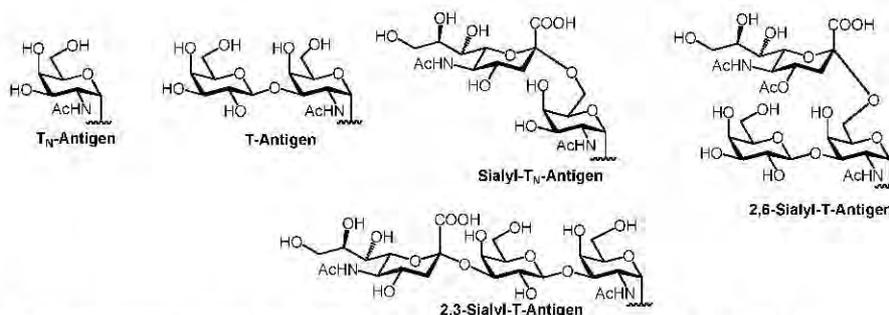


Abbildung 14: Die tumorassoziierten Saccharid-Antigene des tandem repeat im MUC1.

Die größte Tumorspezifität dürften die tumorassoziierten ST_N-Antigene sowie das (2,3)-ST-Antigen haben. Sie sind daher von besonderer Bedeutung. Die Glycosylierungen erfolgen bei der 17er Sequenz sowohl an Serin als auch an Threonin, die jeweils die immundominante Domäne flankieren. Um den Einfluss der Glycanseitenketten auf die Immunogenität zu untersuchen, ist die Synthese von doppelt glycosylierten Peptiden, in denen beide Aminosäuren jeweils die sperrigen ST_N-Antigene tragen, beabsichtigt. Des Weiteren ist der Austausch des Threonin tragenden ST_N-Antigens gegen ein Serin-ST_N-Antigen vorgesehen, um den Einfluss der beiden Aminosäuren auf die Wiedererkennung durch das Immunsystem zu ermitteln. Im 22er Glycopeptid erfolgt die Glycosylierung ebenfalls an den die immundominante Domäne flankierenden Aminosäuren. Zusätzlich wurde im STAPPAHGV-Motiv das Threonin mit verschiedenen Antigenen glycosyliert. Für die Induktion einer potenten Immunantwort ist das B-Zellepitop (MUC1-Glycopeptid) nicht ausreichend, sodass eine Anbindung an weitere immunstimulierende Epitope nötig ist. Hierzu wird ein nicht-immunogener Spacer an das B-Zellepitop gekoppelt. Dieser dient sowohl als Abstandhalter als auch zur Konjugation verschiedener Epitope. Geeignete Immunstimulatoren sind Cytokine, T_H2-Peptidepitope, Mitogene und immunogene Carrier-Proteine. Für die Stimulierung des Immunsystems sollen verschiedene Komponenten, z. B. das IL-1 β , das als internes Adjuvans verzeichnet wird, zum Einsatz kommen (Abbildung 15, D).^[81]



Abbildung 15: Darstellung der geplanten Strukturen zur Erzeugung von Tumorzukzinen.

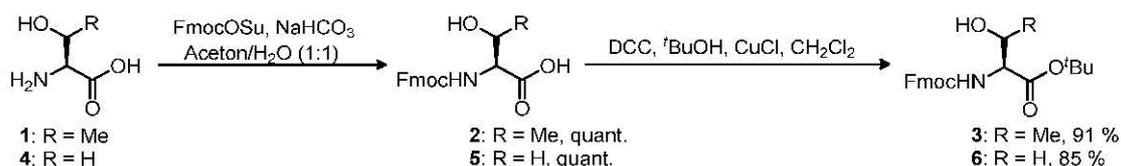
Durch die Verwendung eines externen Adjuvans soll die Immunogenität nochmals gesteigert werden. Hierzu wird Monophosphorlipid-A (MPL-A), welches in verschiedenen Zukzinen (Cervarix[®], Fendrix[®]) als Adjuvans vorliegt, synthetisch gewonnen und den Zukzinkonjugaten I – IV hinzugefügt. Im Zukzinkonjugat II kommt das Ovalbumin

(OVA₃₂₃₋₃₃₉) zur Verwendung, welches in transgenen Mäusen als T_H2-Zell-Epitop erkannt wird und zur Bildung von Antikörpern führt.^[82] Die Vakzinkonjugate III und IV werden an Mitogene, wie den TLR2-Agonisten Pam₃Cys-Ser-Lys₄, oder an das MPL-A (TLR4-Agonist) gebunden. Ähnlichkeiten haben die Vakzinkonjugate III und IV mit dem Impfstoff Tecemotide (*Stimuvax*[®]), der von *Biomira Inc.* (Edmonton, Canada) für die aktive Immuntherapie entwickelt wurde, wobei die Ähnlichkeit des Vakzinkonjugates III zu Tecemotide größer ist. Die synthetisierten Vakzine III und IV übersteigen in der Komplexität der Synthese das Tecemotide bei Weitem. Diese Lipoglycopeptide ermöglichen zusammen mit dem Adjuvans MPL-A die Ausbildung von Liposomkonjugaten, die bei Immunisierungen den Depot-Effekt nach sich ziehen und zur Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen führen sollten, sodass Tumorzellen mit überexprimiertem MUC1 am Wachstum gehemmt werden.^[83-84] Die Konjugate V – VII werden mit Hilfe der ältesten Methode zur Darstellung von Vakzinkonjugaten synthetisiert, in der Haptenmoleküle kovalent an Carrierproteine gebunden werden. Als Carrierproteine sollen sowohl Rinderserumalbumin (BSA) als auch Tetanus-Toxoid (TTox) über einen nicht-immunogenen Spacer gebunden werden. Dabei stellen gerade Carrierproteine oft stark immunogene Strukturen dar. Nach Aufnahme und Prozessierung durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) werden die Vakzinkonjugate als Peptidfragmente auf MHC-II-Komplexen präsentiert, was zur Aktivierung im *Priming*-Prozess von T_H2-Zellen führen kann. Bei der erfolgreichen Wechselwirkung von T_H2-Zellen mit B-Zellen kommt es zur Proliferation und Differenzierung der B-Zellen in Antikörper sezernierenden Plasmazellen, wobei die Antikörper sich sowohl gegen die Epitope des Carrierproteins als auch gegen die angekuppelten Haptene richten.

3 Allgemeiner Teil

3.1 Die Synthese von tumorassoziierten Galactose-Aminosäure-Konjugaten

Ein Charakteristikum von Krebszellen ist die Veränderung der Kohlenhydratstruktur im Vergleich zu normalen Zellen, die auf eine veränderte Aktivität und Expression von Glycosyl- und Sialyltransferasen zurückzuführen ist.^[42, 58] Die verminderte Aktivität von β 1,6-*N*-Acetylglucosamintransferasen führt zu einer Akkumulation der Core1-Struktur (vgl. Kapitel 1.5). Die Vorstufe der Core1-Struktur, das T_N-Antigen, ist sowohl Zielmolekül als auch Ausgangsverbindung für den biomimetischen Aufbau komplexer tumorassoziierten Antigene. Die Synthese der *N*-Acetylgalactosamin-Aminosäure-Bausteine erfolgte nach der von *B. Liebe* erarbeiteten Synthesestrategie.^[85-86] Schlüsselschritt ist die stereoselektive Glycosylierung der vollgeschützten Aminosäure-Derivate (**3** und **6**) mit einem Galactosylbromid-Derivat. Die in den späteren Stufen angestrebten regio- und stereoselektiven Glycosylierungsreaktionen mit dem Sialyl-Donor orientieren sich an literaturbekannten Strategien.^[87-89] Hierzu wird zunächst der erste Galactosylrest mit einem geeigneten vollgeschützten Aminosäurederivat (Threonin oder Serin) verknüpft und das resultierende Konjugat dann nach einigen Schutzgruppenmanipulationen zu den Disacchariden umgesetzt. Die für die Festphasensynthese nach Fmoc-Strategie benötigten T_N-Antigen Derivate müssen in geeignete Galactosylakzeptoren umgewandelt werden. Zunächst sind jedoch die Aminosäure-Bausteine in geeignete Ausgangsverbindungen zu überführen. Hierzu wird die Aminogruppe von L-Threonin **1** bzw. L-Serin **4** mit Fluoren-9-ylmethylsuccinimidylcarbonat (FmocOSu) umgesetzt, wobei das Carbamat **2** bzw. **5** entsteht (Schema 3).^[90]

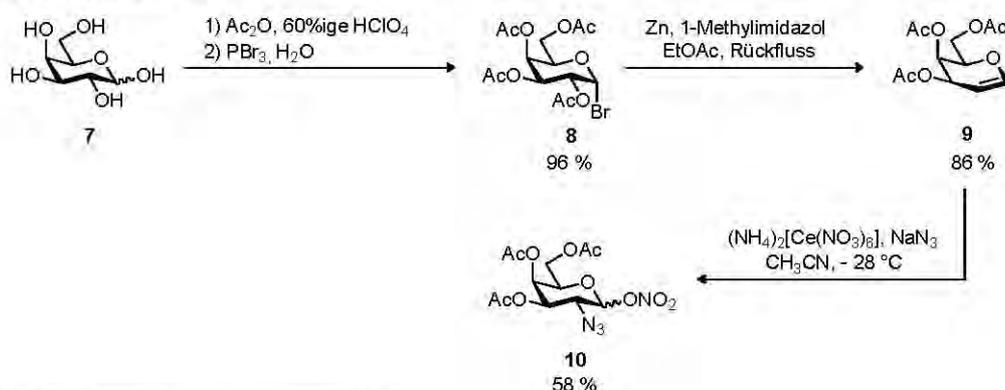


Schema 3: Die Synthese der N- und C-terminal geschützten Aminosäure-Bausteine 3 und 6.

Anschließend wird die freie Carboxylfunktion durch Veresterung mit *tert*-Butanol unter dem aktivierenden Einfluss von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)^[91] und Kupfer(I)-chlorid als *tert*-Butylester blockiert.^[92-94] Nach flashchromatographischer Reinigung kann die orthogonal geschützte Aminosäure **3** in einer Ausbeute von 91 % bezogen auf L-Threonin **1** bzw. 85 % bezogen auf L-Serin **4** isoliert werden. Im zweiten Syntheseschritt ist darauf zu achten, dass es aufgrund des großen Überschusses an *tert*-Butanol und DCC nicht zu einer zusätzlichen

Blockierung der Hydroxylfunktion des L-Threonins bzw. L-Serins in Form eines *tert*-Butylethers kommt. So muss bei der Durchführung der Reaktion die Temperatur zwischen 17 und 18 °C gehalten werden. Die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle zeigte, dass die Bildung des *tert*-Butylether erst bei Temperaturen über 18 °C zu beobachten ist. Daher sind für die erfolgreiche Durchführung der zweiten Synthesestufe sowohl die Temperatur als auch die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle, welche unnötig lange Reaktionszeiten vermeidet, sowie der abschließende Reaktionsabbruch durch ein Butanol/Wassergemisch unerlässlich. Die *tert*-Butylether-Bildung konnte auf diese Weise vollständig umgangen werden, was auch die chromatographische Reinigung erheblich erleichterte.

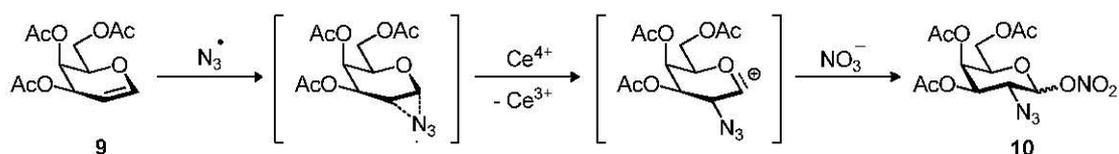
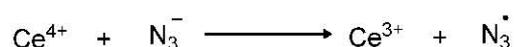
Zur Darstellung des Galactosederivats, welches in der 2-Position eine maskierte Aminofunktion in Gestalt eines Azids trägt und welches für die Glycosylierung der geschützten Aminosäure-Bausteine **3** bzw. **6** verwendet werden kann, wird D-Galactose **7** durch Reaktion mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart katalytischer Mengen an Perchlorsäure peracetyliert. Das entstandene Pentaacetat wird *in situ* unter Kühlung mit Phosphortribromid und der benötigten Menge an Wasser versetzt, bis es vollständig zum Galactosylbromid **8** umgesetzt ist (Schema 4).^[95-96]



Schema 4: Die Synthese des Azidonitrats **10**.

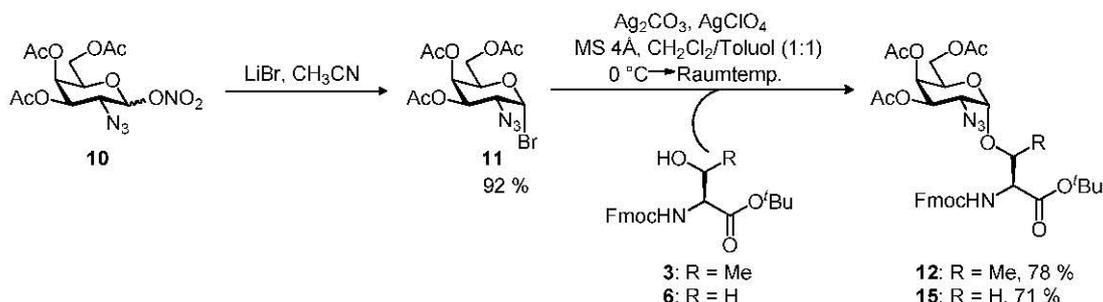
Dabei bildet sich aufgrund des anomeren Effektes ausschließlich das α -Anomer, welches auch in seine kristalline Form überführt werden kann. Das erhaltene Galactosylbromid **8** wird durch Reduktion mit aktiviertem Zink in Gegenwart von 1-Methylimidazol in das Galactal **9** überführt.^[95-96] Das Galactal kann sowohl durch flashchromatographische Reinigung als auch durch Vakuumdestillation in reiner Form erhalten werden. Bei besonders reinem Produkt kommt es nach längerem Stehenlassen bei -28 °C zur Kristallisation. Die optimierte Ausbeute lag nach drei Stufen bezogen auf D-Galactose **7** bei 83 %. Im natürlich vorkommenden T_N-Antigen ist das *N*-Acetylgalactosamin über eine α -glycosidische Bindung mit dem Aminosäurerest Threonin bzw. Serin verknüpft. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass bei den Glycosylierungsreaktionen zum synthetischen T_N-Antigen hauptsächlich das α -Anomer entsteht. Zu diesem Zweck muss in der 2-Position der Galactose eine funktionelle

Gruppe eingeführt werden, die sowohl keinen Nachbargruppeneffekt während der Glycosylierungsreaktion ausübt als auch später ohne großen Aufwand in die Aminofunktion umgewandelt werden kann. Die Azidogruppe erfüllt beide Voraussetzungen. In der Azidonitratisierung nach Lemieux^[97] mit Cer(IV)-ammoniumnitrat und Natriumazid in Acetonitril wird die Azidofunktion in 2-Stellung und die Nitratgruppe am anomeren Zentrum eingeführt. Dies gelingt mit einer Ausbeute von 58 %, wobei das Produkt **10** als Anomerengemisch erhalten wird. Durch fraktionierende Kristallisation aus Cyclohexan/Ethylacetat lassen sich die beiden Anomere trennen. Das α -Anomer fällt als kristalliner Feststoff an und wird durch NMR-Spektroskopie charakterisiert. Für den nachfolgenden Syntheseschritt ist jedoch die Anomerentrennung nicht erforderlich. Der Mechanismus der Azidonitratisierung wurde von Lemieux wie folgt formuliert (Schema 5).^[97]



Schema 5: Der Mechanismus der Azidonitratisierung nach Lemieux.^[97]

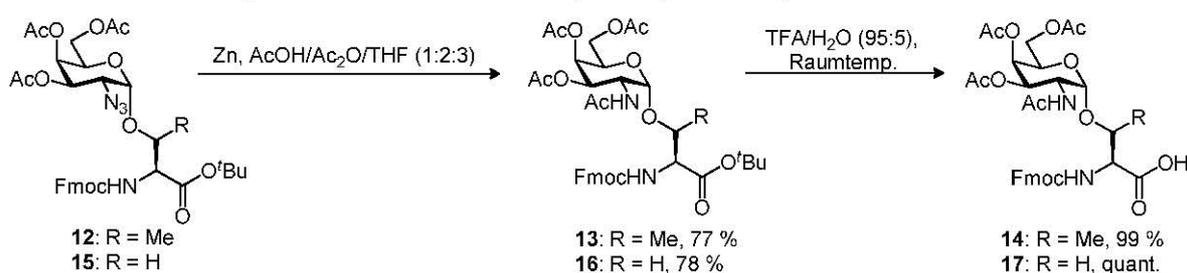
Im ersten Schritt abstrahiert Ce^{+IV} ein Elektron aus dem Azidanion. Das gebildete Azidradikal greift die Doppelbindung des Galactals **9** an, wonach ein weiteres Ce^{+IV} -Ion die Oxidation zum Oxycarbeniumion vollzieht. Der Angriff eines Nitratanions am anomeren Zentrum ergibt schließlich das Gemisch der anomeren Nitrate **10**. Die Umsetzung des Azidonitrats **10** mit Lithiumbromid liefert das für die Glycosylierungsreaktion benötigte Bromid **11**, wobei aufgrund des anomeren Effekts ausschließlich das α -Anomer entsteht (Schema 6).^[97]



Schema 6: Die Galactosylierung der Aminosäurederivate **3** und **6** zu den Konjugaten **12** und **15**.

Wegen der begrenzten Stabilität wurde das Bromid **11** durch zügige Flashchromatographie gereinigt, wonach eine Lagerung und ein späterer Einsatz in Reaktionen möglich waren. Die darauffolgende Glycosylierungsreaktion mit den Aminosäureakzeptoren wurde nach der modifizierten *Koenigs-Knorr* Glycosylierung von *Paulsen* und *Hölck* durchgeführt.^[98-100] Das Bromid **11** wird durch äquimolare Mengen an Silbercarbonat sowie eine katalytische Menge

an Silberperchlorat aktiviert und mit den Aminosäurebausteinen **3** bzw. **6** zur Reaktion gebracht (Schema 6).^[87] Wegen der fehlenden Nachbargruppenaktivität der Azidofunktion bildet sich durch den anomeren Effekt das α -Glycosid **12** bzw. **15**. Die Ausbeuten liegen zwischen 70 – 80 %. Zu erwähnen ist, dass bei großen Ansätzen das β -Anomer nicht immer vollständig abgetrennt werden konnte. Die Trennung wurde in der darauffolgenden Stufe vorgenommen. Die α -glycosidische Bindung lässt sich NMR-spektroskopisch anhand der Kopplung des anomeren Protons $^3J_{H1,H2}$ von 3.7 – 3.6 Hz belegen. Auch die Tieffeldverschiebung des anomeren Protons belegt die α -Glycosidstruktur. Die Glycosylierungsprodukte **12** bzw. **15** werden mit aktiviertem Zink in einer Mischung aus Essigsäure, Essigsäureanhydrid und Tetrahydrofuran reduziert. Hierbei wird die Azido- zur Aminofunktion umgewandelt und *in situ* acetyliert (Schema 7).



Schema 7: Die Synthesen der Galactose-Aminosäure-Konjugate **14** und **17**.

Soll das T_N-Antigen in der Festphasenglycopeptidsynthese eingesetzt werden, so wird den Produkten **13** bzw. **16** die *tert*-Butylestergruppe mit Trifluoressigsäure und Wasser (95:5) in Abwesenheit eines Kationenscavenger abgespalten. Auf diese Weise konnten die T_N-Aminosäure-Festphasenbausteine **14** und **17** nach chromatographischer Reinigung nahezu quantitativ isoliert werden.

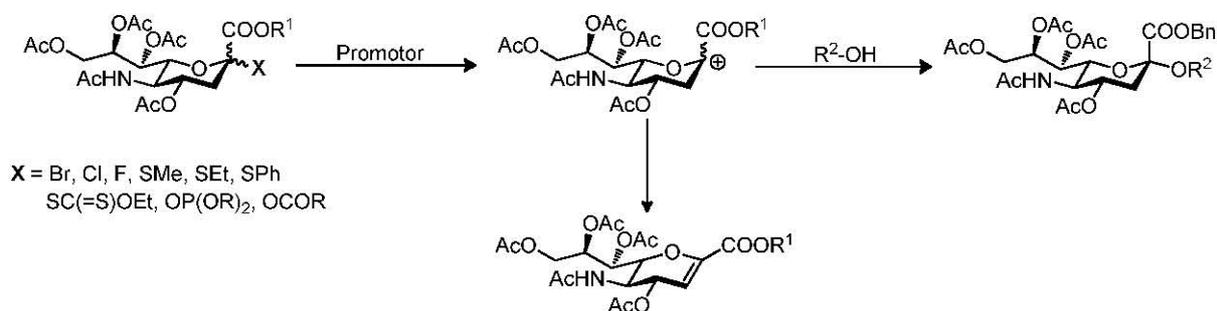
3.2 Die Disaccharid-Aminosäure-Konjugate

3.2.1 Die Synthese der (2,6)-Sialyl-*N*-acetylgalactosamin-Aminosäure-Bausteine (ST_N-Antigene)

3.2.1.1 Der Neuraminsäure-Baustein

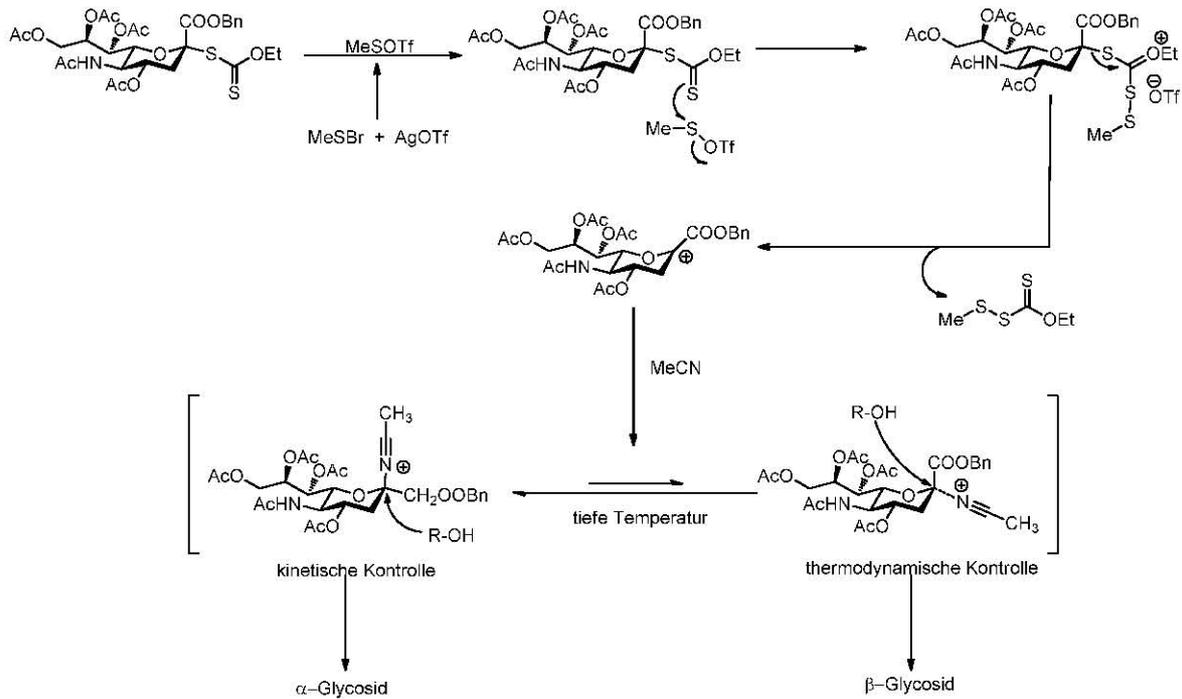
Die frühe Sialylierung des T_N-Antigens während der Glycoproteinbiosynthese führt zu den tumorassoziierten Sialyl-T_N-Antigenen. Die Sialylierung wird durch die α 2,6-Sialyltransferase-I katalysiert. Diese tumorassoziierte Antigenstruktur ist vorwiegend auf Magen-, Darm-, Ovarial- und Mammakarzinoma vorzufinden^[62-63, 101-102] und ist im Hinblick auf die Entwicklung von Tumorstoffen von besonderem Interesse. Mehr als 80 % der Krebsarten in der Brust, der Prostata und den Eierstöcken exprimieren das ST_N-Antigen. Die

Expression der ST_N -Antigene ist im Gegensatz dazu in normalem Gewebe stark reduziert und beschränkt sich auf nur wenige epitheliale Gewebe an sekretorischen Grenzlinien.^[103] Die Überexpression des ST_N -Antigens in verschiedenen Karzinoma korreliert mit einem aggressiven Phänotyp und einer schlechten Prognose für den Patienten.^[104-105] Synthetisch zugänglich sind die ST_N -Antigene durch regio- und stereoselektive Sialylierung an der reaktiven, primären 6-Hydroxyfunktion des T_N -Antigen-Bausteins.^[106] Da das anomere Zentrum der Sialinsäure ein tertiäres Kohlenstoffatom ist, stellen Sialylierungen eine synthetische Herausforderung dar. Nach Aktivierung mit einem Promotor bildet sich ein sterisch gehindertes tertiäres Oxycarbeniumion, das für einen nucleophilen Angriff schwerer zugänglich ist (Schema 8).



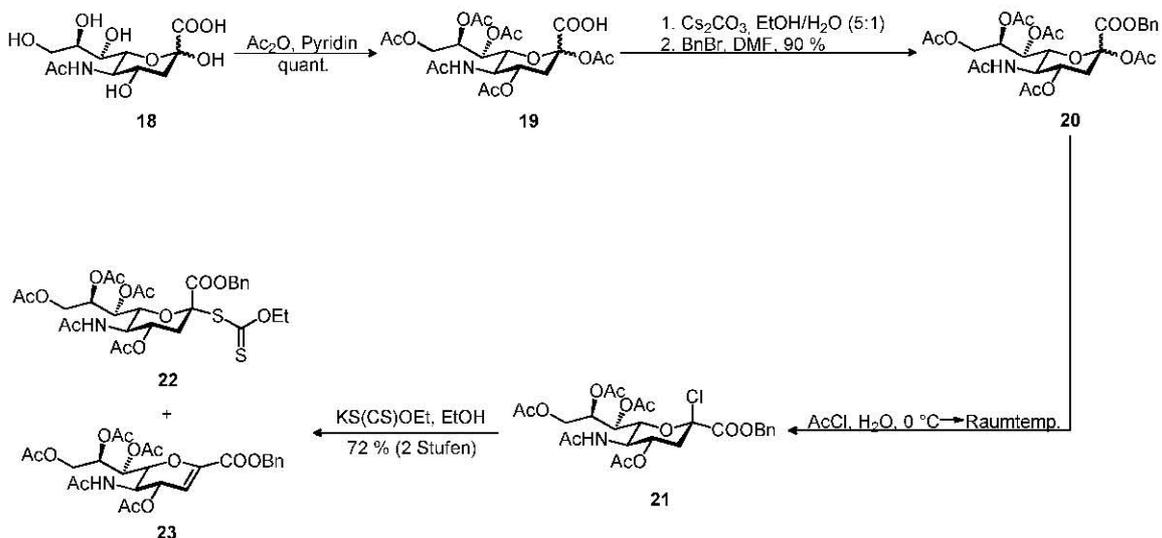
Schema 8: Allgemeines Schema der Sialylierung und Glycalbildung.

Dieses intermediäre Carbeniumion wird durch die elektronenziehende Carboxylfunktion am anomeren Zentrum destabilisiert, weshalb Neuraminsäureendonoren leicht 2,3-Eliminierungen zu Glycalen erleiden. Dies hat zur Folge, dass die Donoren in einem großen Überschuss eingesetzt werden müssen. Ein weiteres Problem ist die stereoselektive Bildung der glycosidischen Bindung. Wegen des Fehlens eines nachbargruppenaktiven Substituenten am C3-Atom der Neuraminsäure müssen Alternativen zur stereochemischen Kontrolle während der Sialylierung gesucht werden. Die Lösung dieses Problems lieferten *Lönn* und *Hasegawa*, die zeigen konnten, dass die stereochemische Kontrolle von Sialylierungsreaktionen durch die Wahl des Lösemittels und der Temperatur beeinflussbar ist.^[107-109] Bei der Verwendung von Acetonitril wird die Nitrilgruppe an das intermediär gebildete Sialylkation koordiniert.^[110] Es bilden sich sowohl ein axiales als auch ein äquatoriales Nitrilium-Konjugat, die miteinander im Gleichgewicht stehen (Schema 9). Tiefe Temperaturen führen zur Verschiebung des Gleichgewichts zum kinetisch bevorzugten axialen β -Nitril-Addukt, an dem ein Angriff des Alkohols stereoselektiv von der α -Seite erfolgt. Glycosylierungen in der Kälte liefern somit in einer kinetisch kontrollierten Reaktion überwiegend das gewünschte α -Sialosid. Im Gegensatz dazu überwiegt bei höheren Temperaturen das thermodynamisch stabilere, äquatoriale Konjugat, aus dem das β -Glycosylierungsprodukt gebildet wird. Die Darstellung der Sialyl-Antigene bedarf Neuraminsäureendonoren mit geeigneten Austrittsgruppen (Schema 8).^[111]



Schema 9: Aktivierung und stereochemische Kontrolle des Sialinsäuredonors in der Sialylierungsreaktion.

Zu den sehr effizienten Austrittsgruppen zählen die anomeren Phosphate^[112] oder Xanthogenate,^[113] die zwar eher ungewöhnlich sind, sich jedoch in Glycosylierungsreaktionen als besonders geeignet erwiesen haben. Donoren wie die anomeren Fluoride oder Trichloracetimide, die bei anderen Glycosylierungen weite Anwendung finden, spielen bei Sialylierungen eine untergeordnete Rolle. Auch in dieser Arbeit wird das von *Marra* und *Sinay* eingeführte Ethylxanthogenat (Ethoxydithiocarbonat)^[113] der *N*-Acetylneuraminsäure, das sich bereits als besonders geeignet für Sialylierungen der 6-Hydroxyfunktion von entsprechenden Akzeptoren erwiesen hat,^[86-87, 114] als Donor für sämtliche Sialylierungsreaktionen verwendet. Zur Darstellung des Neuraminsäurexanthogenats wird *N*-Acetyl-D-neuraminsäure **18** in Essigsäureanhydrid und Pyridin vollständig acetyliert,^[115-116] wobei sich quantitativ das Pentaacetat **19** bildet (Schema 10).

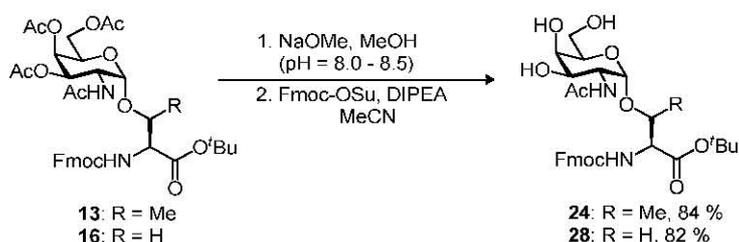


Schema 10: Die Synthese des Neuraminsäure-Bausteins **22**.

Als Schutzgruppe für die Carboxylgruppe in C1-Position dient der Benzylester, der im Gegensatz zum Methyl ester neutral hydrogenolytisch spaltbar ist. Das gebildete Rohprodukt **19** wird als Anomerengemisch mit Cäsiumcarbonat in das Cäsiumsalz überführt, das mit Benzylbromid in *N,N*-Dimethylformamid zum Benzylester **20** in einer Ausbeute von 90 % reagiert. Der Benzylester **20** reagiert in Acetylchlorid, dem eine geringe Menge Wasser zugesetzt wird, zum Chlorid **21**,^[113] welches aufgrund des anomeren Effekts ausschließlich als β -Anomer erhalten wird. Das begrenzt stabile Chlorid **21** wird ohne Reinigung umgehend mit Kaliummethylxanthogenat in einer S_N2 -Reaktion zum Neuraminsäurederivat **22** in einer Ausbeute von 72 % umgesetzt.^[113] Daher entsteht neben dem gewünschten Produkt **22** auch das Eliminierungsprodukt **23**, welches sich selbst durch mehrfache flashchromatographische Reinigung nicht vollständig abtrennen lässt. Da das Glycal **23** auch im Laufe der sich anschließenden Sialylierungsreaktionen (vgl. Schema 8 und Schema 10) gebildet wird und diese nicht negativ beeinflusst, kann hier auf eine weitere Reinigung verzichtet werden. Zu beachten ist jedoch, dass das Glycal **23** bei der Ansatzberechnung in Glycosylierungsreaktionen berücksichtigt wird. Mittels NMR-Spektroskopie lässt sich das ungefähre Verhältnis der beiden Komponenten im Produktgemisch über die Integrale zu einem Verhältnis von Xan:Glycal \approx 5:1 ermitteln, was einem Gehalt an Xanthogenat in der Mischung von etwa 83 % entspricht. Auf diesen Wert geht auch die Bestimmung der Ausbeute zurück. Für analytische Zwecke kann man durch präparative RP-HPLC reines Produkt erhalten. Der Neuraminsäure-Baustein **22** wird über vier Stufen in einer Gesamtausbeute von 65 % bezogen auf *N*-Acetyl-D-neuraminsäure (**18**) erhalten. Zur Aktivierung der Sialinsäurexanthogenate bedarf es äquimolarer Mengen thiophiler Promotoren.^[117] Häufig wurden Methylsulfonyltriflat (MeSOTf),^[118] Dimethyl(methylthio)sulfoniumtrifluormethansulfonat (DMTST)^[119-120] und eine Mischung aus *N*-Iodsuccinimid (NIS) und Trifluormethansulfonsäure (TfOH) als Aktivierungsreagenzien verwendet.^[121-122] Für die Synthese des ST_N -Antigens wird das Xanthogenat **22** mit Methylsulfonyltriflat als Promotor aktiviert.^[86-87, 114] Hergestellt wird das stark thiophile Reagenz *in situ* aus Silbertriflat und Methylsulfonylbromid, das zuvor durch die Reaktion äquimolarer Mengen von Brom und Dimethyldisulfid in 1,2-Dichlorethan hergestellt wurde. Die Aktivierung des Donors erfolgt durch Koordination des Methylsulfonyltriflat-Schwefelatoms an das Schwefelatom des Thiocarbonats unter Ausbildung eines Disulfids, welches über eine Eliminierung des Xanthogenats für die Erzeugung des intermediären Glycosylkations sorgt (Schema 9).

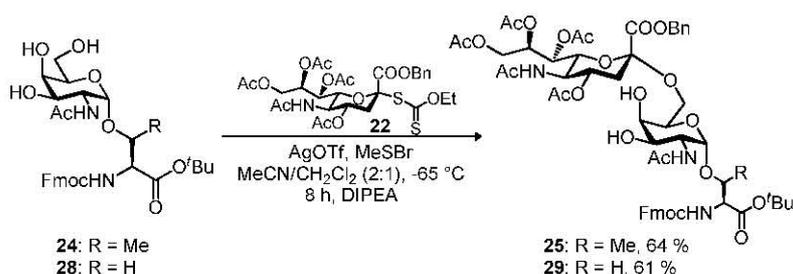
3.2.1.2 Die Glycosylierung zu den (2,6)-Sialyl-*N*-acetylgalactosamin-Aminosäure-Bausteine (ST_N-Antigene)

Soll der T_N-Baustein als Glycosylakzeptor in einer Glycosylierungsreaktion zum Aufbau komplizierter Saccharide, wie zum Beispiel des ST_N-Antigens oder der beiden regioisomeren (2,3)-ST- bzw. (2,6)-ST-Antigene, dienen, so wird die *tert*-Butylestergruppe nicht abgespalten. Vielmehr werden zunächst die Acetylgruppen von den Verbindungen **13** und **16** unter *Zemplén*-Bedingungen^[123] entfernt (Schema 11).^[86, 88] Dabei ist zu beachten, dass sobald der pH-Wert von 8.5 überschritten wird, es zur Abspaltung der basenlabilen Fmoc-Gruppe kommt.^[87]



Schema 11: Die Synthese der Galactose-Konjugate **24** und **28**.

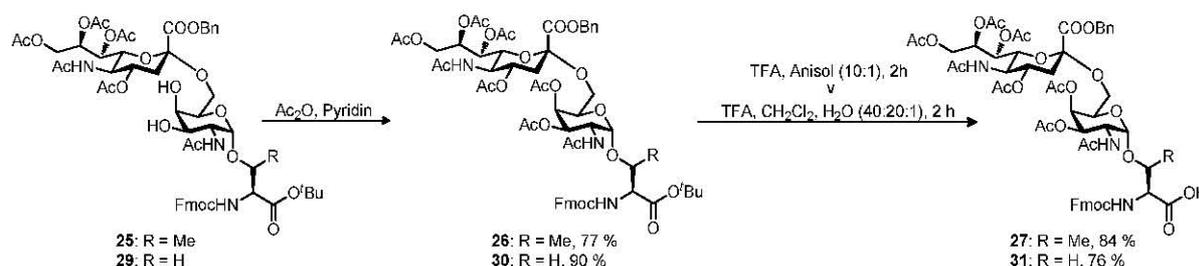
Nach Neutralisierung lassen sich gute Ausbeuten durch Umsetzung des erhaltenen Rohproduktes mit Fmoc-OSu und *N,N'*-Diisopropylethylamin (DIPEA) erzielen. Die Menge an zuzusetzenden Fmoc-OSu wird über die Dünnschichtchromatographie abgeschätzt und kann bis zu 0.5 Äquiv. betragen. Charakteristisch für die Deacetylierungen ist, dass die Umsetzungen der Threonin-Derivate im Vergleich zu den Serin-Derivaten einfacher bezüglich Aufarbeitung und Reinigung sind. Auch sind die Ausbeuten an Threonin-Derivaten immer höher als die an Serin-Derivaten. Die Sialylierung der T_N-Konjugate **24** und **28** erfolgt mit 2.5-fachem Überschuss an Neuraminsäuredonor **22**. Hierzu wurde vor jedem Ansatz die Reinheit des Xanthogenatdonors durch ein NMR-Spektrum bestimmt und auf den Donor umgerechnet. Die Umsetzung findet bei $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Mischung aus Acetonitril/Dichlormethan (2:1) statt, wobei zuerst das Silbertriflat zur Reaktionsmischung zugefügt wird. Anschließend wird langsam eine Lösung von Methylsulfonylbromid in 1,2-Dichlorethan per Spritzenpumpe zugetropft (Schema 12).^[86, 94]



Schema 12: Sialylierung des T_N-Antigens zur Erzeugung der Sialyl-T_N-Aminosäure-Konjugate **25**, **29**.

Der Zusatz von Dichlormethan verhindert das Einfrieren der Reaktionsmischung bei den tiefen Temperaturen. Die Reaktion verläuft sowohl wegen der größeren Reaktivität als auch

wegen der geringeren sterischen Hinderung der primären 6-Hydroxyfunktion des Galactosamins regioselektiv. Die gewünschten α -Glycoside werden in Ausbeuten von ca. 60 % isoliert. Entstandenes β -Anomer sowie das durch β -Eliminierung aus überschüssigem Donor gebildete Sialinsäureglycal **23** werden säulenchromatographisch, in härteren Fällen durch RP-HPLC, abgetrennt. Für die Festphasenglycopeptidsynthese müssen die Hydroxygruppen der Disaccharid-Aminosäure-Konjugate **25** und **29** mit Acetanhydrid in Pyridin umgesetzt werden. Die Blockierung der Hydroxyfunktion dient sowohl dem Schutz vor unerwünschten Nebenreaktionen während der Peptidsynthese als auch der Stabilisierung der glycosidischen Bindungen (Schema 13).



Schema 13: Die Synthese der ST_N -Bausteine **27** und **31** für die Festphasenglycopeptidsynthese.

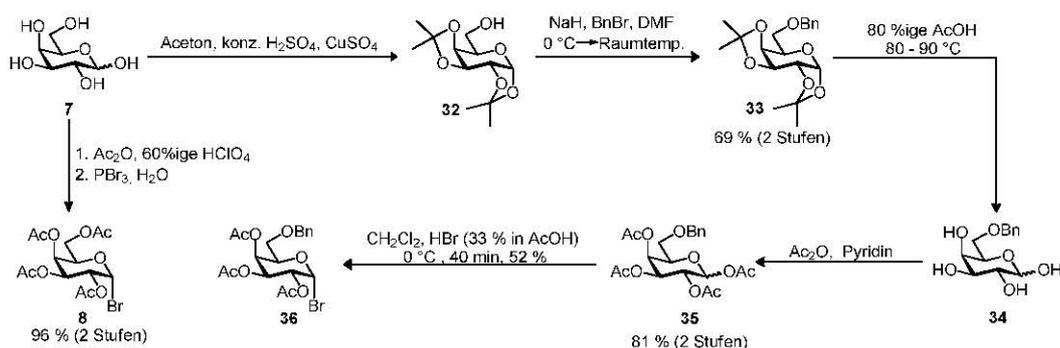
Die abschließende Spaltung des *tert*-Butylesters kann mit unterschiedlichen Mischungen erfolgen. Allen gemeinsam ist das Vorhandensein von Trifluoressigsäure. Der Verzicht auf Anisol als Kationenscavenger wirkt sich günstig auf die darauffolgende Reinigung aus und liefert die für die Peptidsynthese benötigten Antigene in höherer Reinheit. Die Endstufen **27** und **31** werden sowohl säulenchromatographisch als auch durch präparative RP-HPLC gereinigt. Dadurch konnten Verunreinigungen beseitigt und negative Auswirkungen während der Peptidsynthese ausgeschlossen werden.

3.2.2 Die Synthese der T-Antigene als Vorstufe der regioisomeren (2,3)- und (2,6)-Sialyl-T-Antigen-Konjugate

Als erstes Krebsantigen wurde 1984 das T-Antigen (*Thomsen-Friedenreich*-Antigen) beschrieben, das tumorspezifisch in Brustgeweben vorliegt.^[124] Durch veränderte Enzymexpression in Krebszellen kommt es zur Anhäufung der Core2-Vorläufer-Struktur (Gal β 1-3GalNAc). Dieses Disaccharid tritt besonders in fortgeschrittenen Tumoren auf. Beschrieben wurde die erhöhte Expression in Speiseröhren-, Brust- und Lungenkarzinoma.^[124-127]

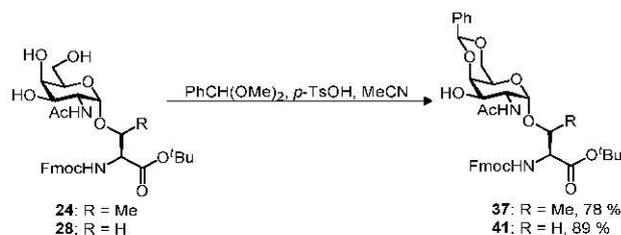
Zur Darstellung der T-Antigene werden daher zunächst die benötigten Galactosyldonoren synthetisiert. Hier kommen je nach Synthesestrategie zwei unterschiedlich geschützte Donoren in Frage: der bereits bekannte Galactosylbromid-Donor **8** und der als

6-*O*-Benzylether geschützte Galactosylbromid-Donor **36**, der in einer literaturbekannten Synthese in insgesamt fünf Stufen aus D-Galactose **7** gewonnen wird (Schema 14).^[128-130]



Schema 14: Die Synthese des Galactose-Bausteins **36**.

Dabei werden zuerst die vier sekundären Hydroxylfunktionen der D-Galactose **7** säurekatalysiert mit Aceton in Gegenwart von Kupfer(II)-sulfat als wasserentziehendes Mittel in zwei Isopropylidenacetale überführt.^[128] Während bei Reaktionen mit Benzaldehyddimethylacetal selektiv das 4,6-Acetal ausgebildet wird, entsteht im Fall von Isopropylidenacetalen in der Regel der fünfgliedrige Ring, also das 1,2- und 3,4-Acetal, sofern die beteiligten Hydroxygruppen *cis* zueinander stehen.^[131] Anschließend wird die primäre Hydroxylfunktion des erhaltenen Diisopropylidenacetals **32** mit Natriumhydrid deprotoniert und mit Benzylbromid zum Benzylether **33** umgesetzt.^[132] Nach chromatographischer Reinigung wird der Galactosebaustein **33** in einer Ausbeute von 69 % bezogen auf D-Galactose erhalten. Danach werden die Isopropylidenschutzgruppen mit 80%iger Essigsäure bei ca. 80 °C abgespalten,^[132] bevor die vier freigewordenen Hydroxylgruppen des Galactosebausteins **34** mit Essigsäureanhydrid/Pyridin vollständig acetyliert werden. Gegebenenfalls kann die Veresterung mit katalytischem 4-Dimethylaminopyridin (DMAP)^[133] beschleunigt werden.^[132] Das Anomerengemisch **35** wird in einer Ausbeute von 81 % bezogen auf **33** erhalten. Durch vorsichtige Umsetzung des Anomerengemisches **35** mit 33%iger Bromwasserstoffsäure bei 0 °C binnen 40 Minuten erhält man nach chromatographischer Reinigung das durch den anomeren Effekt begünstigte α -Galactosylbromid **36** in 55%iger Ausbeute.^[134] Zur Synthese der T-Antigene geht man von den partiell geschützten Verbindungen **24** bzw. **28** aus. Schlüsselschritte sind die selektiven 3- β -Galactosylierungen der T_N-Konjugate **37** bzw. **41** mit den Galactosylbromiden **8** und **36**. Hierzu ist die Blockierung der 4- und 6-Hydroxylfunktionen des Galactosamins notwendig. Die Umsetzung der selektiv deblockierten Hydroxylverbindungen **24** und **28** mit Benzaldehyddimethylacetal in Acetonitril und katalytischen Mengen *p*-Toluolsulfonsäure^[135] bei einem pH-Wert von 4 liefert durch säurekatalysierte Umacetalisierung die entsprechenden 4,6-*O*-Benzyliden-geschützten Galactose-Derivate **37** und **41** (Schema 15).^[88]



Schema 15: Die Synthese von 4,6-*O*-Benzyliden-geschützten Galactose-Derivaten.

Die selektiv in der 3-Position unmaskierten Galactosylakzeptoren **37** und **41** werden nach flashchromatographischer Reinigung in guten Ausbeuten erhalten. Das Benzylidenacetal zeichnet sich durch eine geringere Säuresensibilität im Vergleich zum *p*-Methoxybenzylidenacetal aus, das ebenfalls als Schutzgruppe Verwendung findet. So kann in Glycosylierungsreaktionen eine säurekatalysierte Abspaltung der Schutzgruppe verhindert werden. Ebenso können die Glycosylakzeptoren auch in der Trichloracetimidat-Methode nach *Schmidt* eingesetzt werden, die eines saureren Milieus bedürfen. Für die Glycosylierung der Hydroxylgruppe in der 3-Position des Galactosamins sind in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben, wie beispielsweise der Einsatz anomerer Halogenide oder Trichloracetimidate. Im vorliegenden Fall war die Anwendung der Trichloracetimidat-Methode nach *Schmidt*^[136-137] nicht geeignet. Das Trichloracetimidat, welches mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat aktiviert wird, liefert bei der Galactosylierung von *N*-Acetylgalactosamin-Serin-Konjugaten überwiegend den unerwünschten Orthoester, wie von *T. Reipen*^[138-139] und *C. Brocke*^[89] im Rahmen ihrer Dissertationen beschrieben wurde (Abbildung 16)

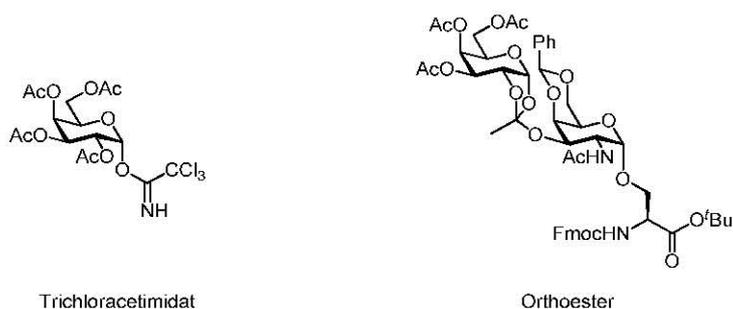
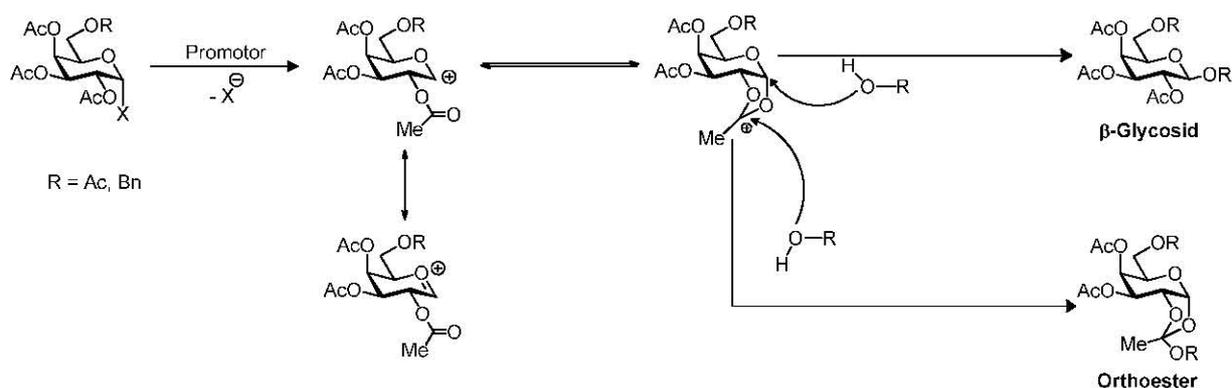


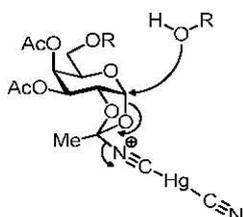
Abbildung 16: Trichloracetimidatdonor nach Schmidt und Orthoesterbildung als Nebenprodukt der *T*-Antigensynthese.

Der allgemeine Glycosylierungsmechanismus eines Glycosyldonors mit einem nachbargruppenaktiven Substituenten in der 2-Position ist in der Literatur wie folgt beschrieben (Schema 16).^[140]



Schema 16: Orthoesterbildung als Konkurrenzreaktion zur Bildung des β -Glycosids.

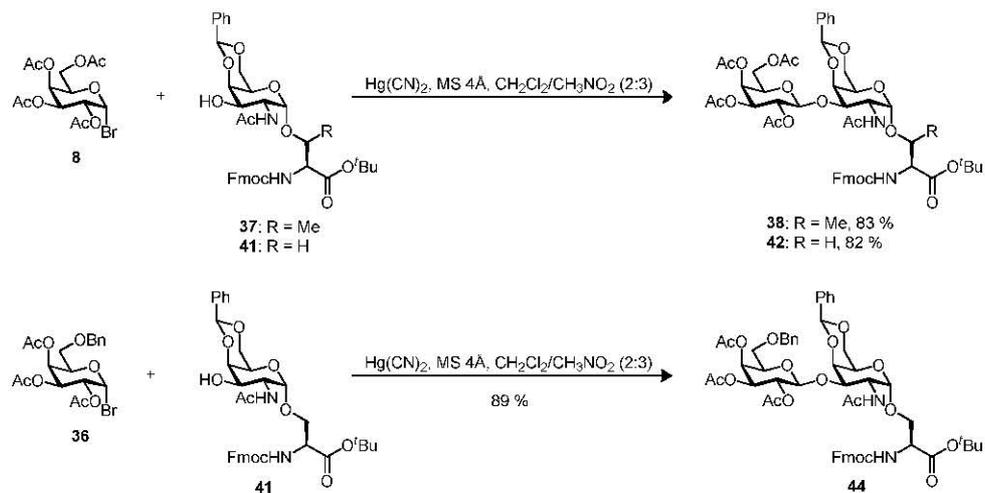
Der Angriff des Glycosylakzeptors (in der Darstellung als „ROH“ wiedergegeben) an dem durch Aktivierung des Glycosyldonors entstandenen Kation kann zum einen orbitalkontrolliert am anomeren Zentrum erfolgen, wodurch sich das gewünschte β -Glycosid bildet. Zum anderen kann unter Ladungskontrolle eine Reaktion am Dioxolenium-Kohlenstoff stattfinden, wobei der entsprechende Orthoester entsteht. Die Bildung des kinetisch favorisierten Orthoesters ist reversibel, wodurch unter sauren Bedingungen die Eliminierung und erneute Addition des Glycosylakzeptors das thermodynamisch stabilere β -Glycosid liefert. *K. Baumann* berichtet ebenfalls von Orthoester-Strukturen^[141] in ihrer Arbeit an in 2-Stellung Azido-funktionalisierten Akzeptoren. Deren Umlagerung zum gewünschten Produkt wird durch Erhöhung der Temperatur auf Raumtemperatur vorangetrieben und deren Charakter zur Orthoesterbildung vermieden.^[141] Daher wurde für die Glycosylierung der Akzeptoren **37** und **41** auf die Glycosylhalogenide zurückgegriffen, die sich nach der klassischen *Koenigs-Knorr*-Reaktion mit Silbersalzen aktivieren lassen.^[98] Eine Weiterentwicklung dieser Variante ist die Glycosylierung nach *Helferich*,^[142-143] die sich in vorherigen Arbeiten als am ergiebigsten gezeigt hatte.^[89, 144] Die als Glycosyldonoren eingesetzten Bromide werden nach dieser Methode durch Quecksilber(II)-cyanide aktiviert, wobei die Orthoesterbildung durch eine vorübergehende Anbindung des Cyanidions am Dioxolenium-Kohlenstoff wirkungsvoll vermieden wird (Schema 17).



Schema 17: Die Steuerung der Regioselektivität bei Glycosylierungsreaktionen nach der Helferich-Methode.

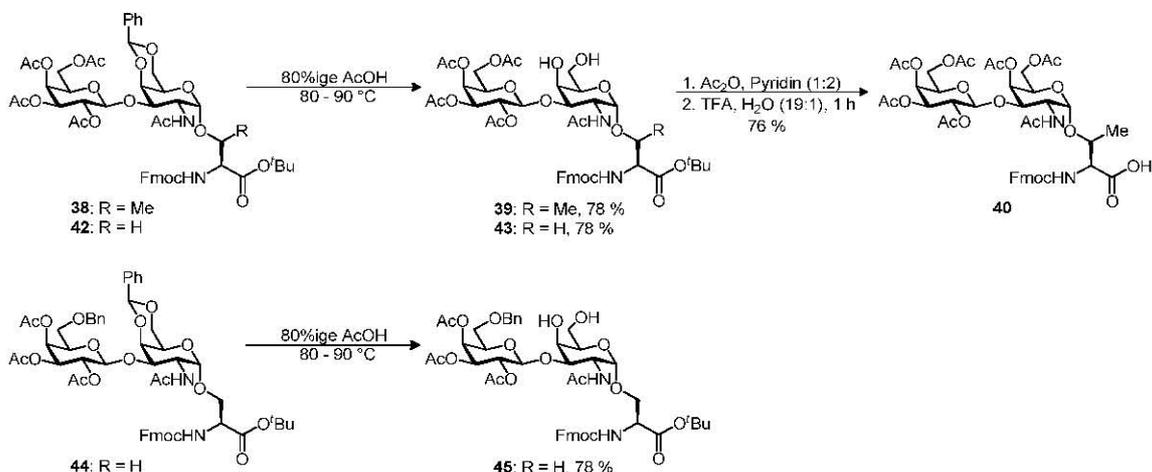
Die selektive Anknüpfung des Glycosylakzeptors an das anomere Zentrum des Glycosyldonors erfolgt durch eine orbitalkontrollierte Addition und führt schließlich zum gewünschten Produkt. Die Umsetzung der Konjugate **37** und **41** mit den Galactosylbromid-

Donoren **8** bzw. **36** unter Einfluss von Quecksilber(II)-cyanid ergibt das gewünschte β -verknüpfte Disaccharid in Ausbeuten höher als 80 % (Schema 18).



Schema 18: Galactosylierung unter Bildung der Disaccharid-Konjugate **38**, **42**, **44**.

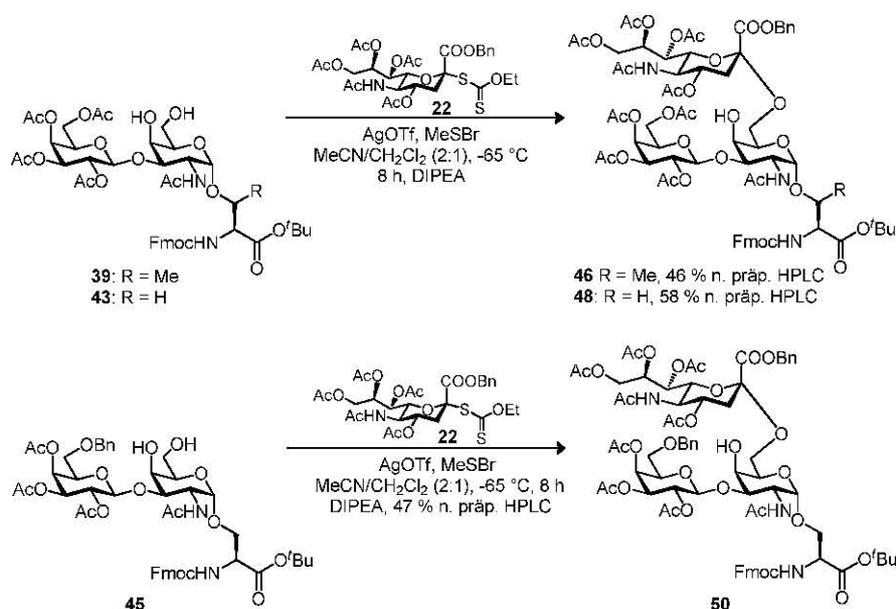
Das Vorliegen der gewünschten β -Konfigurationen kann in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren anhand der Kopplungskonstanten $^3J_{\text{H1,H2}}$ von 7.7 Hz für Verbindung **38** bzw. 7.9 Hz für die Verbindungen **42** und **44** bewiesen werden. Die Bildung des Orthoesters als Nebenprodukt kann durch NMR-spektroskopische Untersuchungen ausgeschlossen werden. Für die Vollendung des T-Antigen-Bausteins, der für die Glycopeptidsynthese geeignet ist, sind drei weitere Synthesestufen erforderlich. Hierzu werden die Benzylidenacetale in den Verbindungen **38**, **42** und **44** in 80%iger Essigsäure bei 80 °C gespalten, wobei die sowohl in 4- als auch in 6-Stellung ungeschützten Bausteine **39**, **43** und **45** in jeweils 78 % erhalten werden (Schema 19). Anschließend werden die freien Hydroxylgruppen des Bausteins **39** mit Acetanhydrid/Pyridin acetyliert. Im letzten Reaktionsschritt erfolgt die Spaltung des *tert*-Butylester in Trifluoressigsäure/Wasser. Das T-Antigen **40** wird nach flashchromatographischer Reinigung in 76 % über zwei Stufen erhalten.



Schema 19: Abspaltung der Benzylidenacetale und Synthese des T-Antigens **40**.

3.2.3 Die Synthese der (2,6)-Sialyl-T-Antigen-Konjugate

Die partiell deblockierten T-Antigen-Bausteine **39** und **43** stellen geeignete Vorstufen für die Synthese der (2,6)-Sialyl-T-Antigene dar (Schema 19). Zwar ist auch der Baustein **44** für die Synthese geeignet, jedoch ist von der Verwendung wegen des Benzylethers, der später hydrogenolytisch abgespalten wird, abzuraten. Daher sollte die Synthese des (2,6)-Sialyl-T-Antigens aus dem Baustein **8** erfolgen. Schlüsselschritt der (2,6)-Sialyl-T-Antigensynthese ist die regioselektive Sialylierung der primären 6-Hydroxyfunktion der T-Antigenkonjugate **39**, **43** und **45**. Diese erfolgt analog der Glycosylierung des T_N-Antigens zum ST_N-Antigen (vgl. Kapitel 3.2.1.2) unter Verwendung des Xanthogenats **22** als Donor, das in einem Überschuss von ca. 2,5 Äquiv. eingesetzt wird. Zur Aktivierung des Xanthogenats dient wieder *in situ* gebildetes Methylsulfenyltriflat. Die Reaktionsführung bei niedriger Temperatur in Acetonitril/Dichlormethan (2:1) begünstigt die Bildung der gewünschten α -Sialoside **46**, **48** und **50** in einer kinetisch kontrollierten Reaktion (Schema 20). Neben dem α -Anomer und einem geringeren Teil an β -Anomer entsteht das Glycal **23** der Sialinsäure durch β -Eliminierung.



Schema 20: Sialylierung zu den (2,6)-Sialyl-T-Antigenen **46**, **48**, **50**.

Neben dem Glycal können auch Folgeprodukte aus dem Promotor flashchromatographisch abgetrennt werden. Da die α - und β -Sialylierungsprodukte wie der nicht umgesetzte Sialylakzeptor **22** und das Glycal **23** sehr ähnliches Elutionsverhalten während der Chromatographie zeigen, müssen diese Komponenten durch präparative RP-HPLC voneinander getrennt werden.^[88, 139] Eine Glycosylierung der 4-Position findet wegen deren geringer Aktivität und größerer sterischen Hinderung nicht statt. Nach Flashchromatographie

und RP-HPLC werden die reinen $\alpha(2,6)$ -ST-Antigene **46**, **48** und **50** in Ausbeuten zwischen 46 % – 58 % isoliert (Schema 20), wobei auf die Isolierung des β -Anomers verzichtet wurde. Die α -glycosidische Bindung von Sialinsäurederivaten kann nicht durch die Bestimmung der Kopplungskonstante im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nachgewiesen werden, da kein Proton am anomeren Zentrum vorhanden ist. Für die Zuordnung der Konfiguration α - und β -verknüpfter peracetylierter Neuraminsäureglycoside wurden durch Vergleich spektroskopischer Daten verschiedene empirische Regeln aufgestellt,^[145-148] die im Wesentlichen auf Differenzen folgender chemischer Verschiebungen bzw. Kopplungskonstanten basieren:

- 1.^[149] $\delta_{\text{H}3_{\text{äq}}} (\alpha\text{-Anomer}) > \delta_{\text{H}3_{\text{äq}}} (\beta\text{-Anomer})$
- 2.^[145, 150] $\delta_{\text{H}4} (\alpha\text{-Anomer}) < \delta_{\text{H}4} (\beta\text{-Anomer})$
- 3.^[146-147] $|\delta_{\text{H}9\text{a}} - \delta_{\text{H}9\text{b}}| (\alpha\text{-Anomer}) < |\delta_{\text{H}9\text{a}} - \delta_{\text{H}9\text{b}}| (\beta\text{-Anomer})$
- 4.^[146-147] $^3J_{\text{H}7, \text{H}8} (\alpha\text{-Anomer}) > ^3J_{\text{H}7, \text{H}8} (\beta\text{-Anomer})$

Diese Kriterien dienen als Anhaltspunkt für die Unterscheidung zwischen α - und β -Anomeren von Sialinsäurekonjugaten, sind jedoch nicht generell gültig und lassen sich bei komplexen Verbindungen nicht immer anwenden. Eindeutig kann die anomere Konfiguration durch ein HMBC-Experiment bestimmt werden, in welchem C,H-Kopplungen über zwei oder mehr Bindungen abgebildet werden. In Abbildung 17 ist das HMBC-Spektrum des α -(2,6)-Sialyl-T-Derivats **46** dargestellt, welches die Kopplungen der äquatorialen und axialen Protonen am C3-Atom der Neuraminsäure zu den vicinalen Kohlenstoffatomen zeigt.^[151]

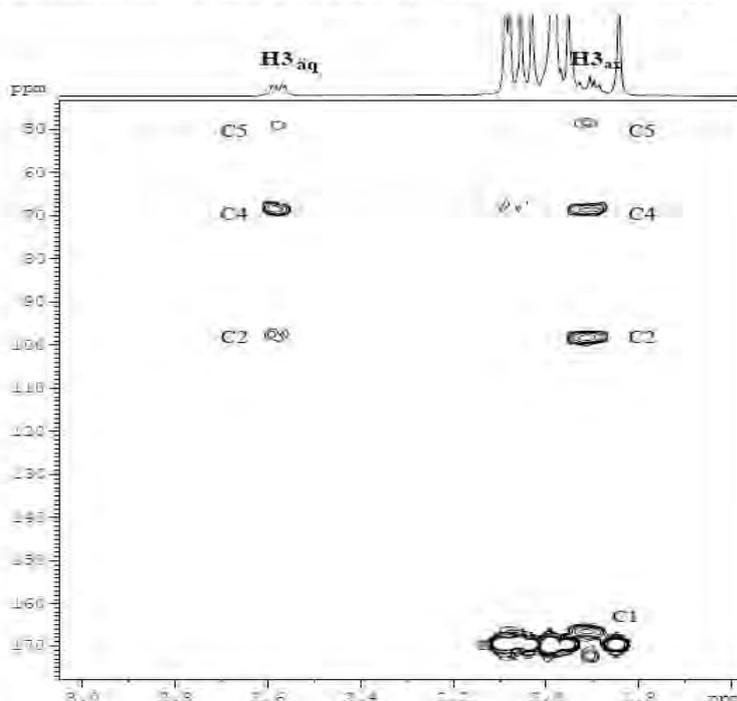
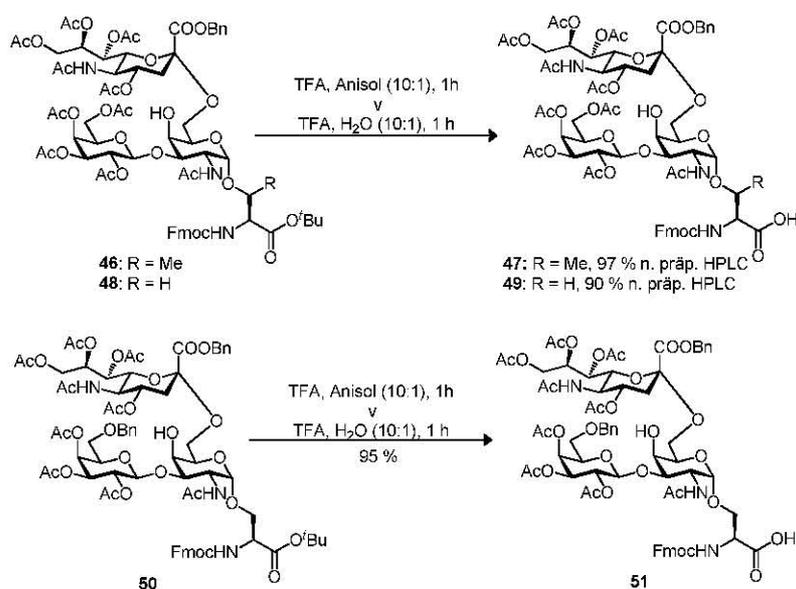


Abbildung 17: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum des α -(2,6)-ST-Antigens **46**.

Zur Ermittlung der Konfiguration am anomeren Zentrum wird die Kopplung zum C1 mit Hilfe der *Karplus*-Beziehung betrachtet.^[152-153] Diese Beziehung wird benutzt, um die

Größenordnung der $^3J_{C,H}$ Kopplung abzuschätzen, wobei eine Abhängigkeit zwischem der vicinalen Kopplungskonstante und dem Torsionswinkel φ besteht. So ist die Kopplungskonstante bei Torsionswinkeln nahe 90° sehr gering, während sie bei Winkeln von 0° und 180° maximal ausfällt. Aufgrund des Torsionswinkels von 90° , ist die Kopplung zwischen dem äquatorialen H3 sowohl zum α - als auch zum β -ständigen C1-Atom so schwach, dass in den HMBC-Spektren beider Anomere kein Korrelationspeak zu finden sein sollte. Im Falle des α -Anomers nehmen das axiale Proton an C3 und das Kohlenstoffatom C1 einen Winkel von 180° ein, was gemäß der *Karplus*-Beziehung zu einer großen Kopplungskonstante führt. Dementsprechend ist im HMBC-Spektrum ein Korrelationssignal zwischen dem axialen H3 und C1 zu beobachten. Im Falle des β -Anomers hingegen liegt zwischen dem axialen H3 und C1 eine schwache axial-äquatoriale-Wechselwirkung vor, welche im HMBC-Spektrum nicht zu erkennen ist. Anhand dieses NMR-Experiments kann die Konfiguration des α -Anomers belegt werden.

Um den für die Glycopeptidsynthese geeigneten Baustein zu erhalten, erfolgt im letzten Reaktionsschritt die Deblockierung der Carboxylfunktion an der Aminosäure. Hierzu werden die Bausteine **46**, **48**, **50** mit Trifluoressigsäure und Anisol (10:1) als Kationenscavenger versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Alternativ kann auch Wasser an Stelle von Anisol zugesetzt werden. Umsetzungen mit Wasser zeigten, dass das Produkt sehr rein erhalten wird. Nebenprodukte wurden in der Dünnschichtchromatographie nicht detektiert (Schema 21).



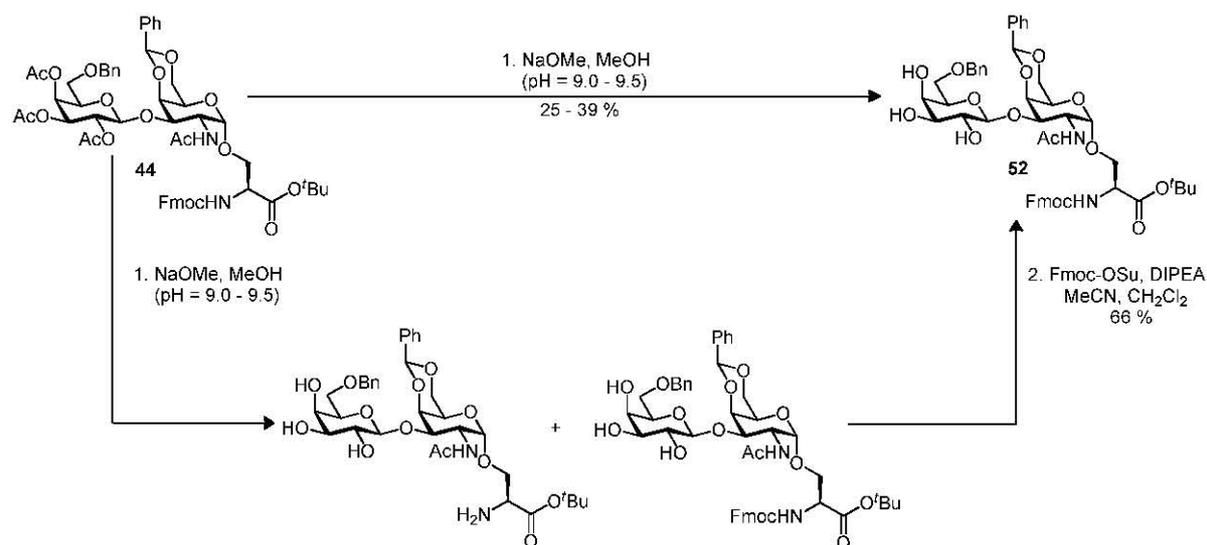
Schema 21: Spaltung des *tert*-Butylesters zu den für die Glycopeptidsynthese fertigen Bausteinen **47**, **49**, **51**.

Auf die Acetylierung der sterisch stark gehinderten 4-Hydroxyfunktion des Galactosaminbausteins wird verzichtet. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die 4-Hydroxy-

funktion durch Capping während der Peptidsynthese nicht acetyliert wird. Nach RP-HPLC-Reinigung werden die reinen (2,6)-Sialyl-T-Bausteine **47**, **49**, **51** in Ausbeuten größer als 90 % erhalten.

3.2.4 Die Synthese des (2,3)-Sialyl-T-Antigen-Konjugats

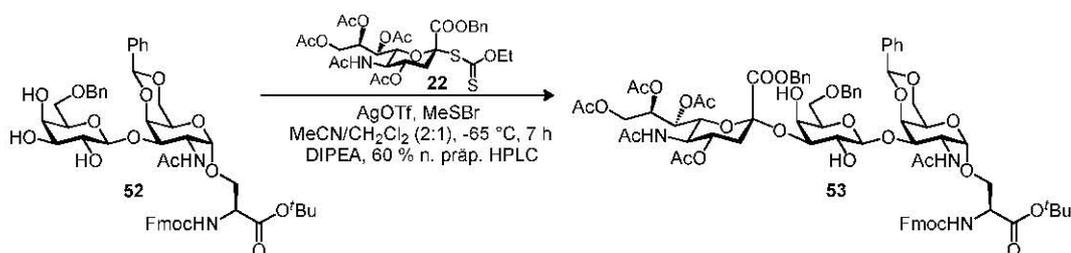
Zur Darstellung des (2,3)-Sialyl-T-Antigens geht man von der Verbindung **44** aus. Die Deblockierung der Hydroxylgruppen in 2'-, 3'- und 4'-Position der Galactoseeinheit durch Umesterung unter *Zemplén*-Bedingungen^[123] liefert den für die Sialylierung in 3'-Position benötigten Akzeptor. Während diese Deacetylierung bei den T_N-Antigenen **24** und **28** ohne große Probleme vonstattgeht, erweist sie sich im vorliegenden Fall als schwierig. Zum Starten der Reaktion wird ein vergleichsweise hoher pH-Wert von ca. 9.5 benötigt (Schema 22).



Schema 22: Die Synthese des Sialylakzeptors 52 durch Verseifung.

Unter diesen Bedingungen ist die Fmoc-Gruppe nicht völlig stabil. Vermutet wird, dass die Blockierung der primären 6'-Hydroxyfunktion als Benzylether die Abspaltung der Acetylgruppen erschwert, indem die häufig zu beobachtende Acetylgruppenwanderung zur freien 6'-Hydroxyfunktion und deren bevorzugte Abspaltung an der primären Hydroxygruppe gehindert ist. So berichten verschiedene Experimentatoren von der erschwerten Abspaltung und damit einhergehend von niedrigen Ausbeuten.^[151, 154-155] Für die Umesterung von **44** nach *Zemplén* wird das Edukt mit Natriummethanolat in Methanol 20 h bei einem pH-Wert von 9.0 – 9.5 gerührt. Die ersten Umsetzungen zeigten, dass die Ausbeuten relativ gering waren und im Bereich zwischen 25 % – 39 % lagen. Wie die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle zeigte, war die unerwünschte Abspaltung der Fmoc-Gruppe bereits vor der vollständigen Deacetylierung erfolgt. Daher wurde die Strategie geändert und der pH-Wert

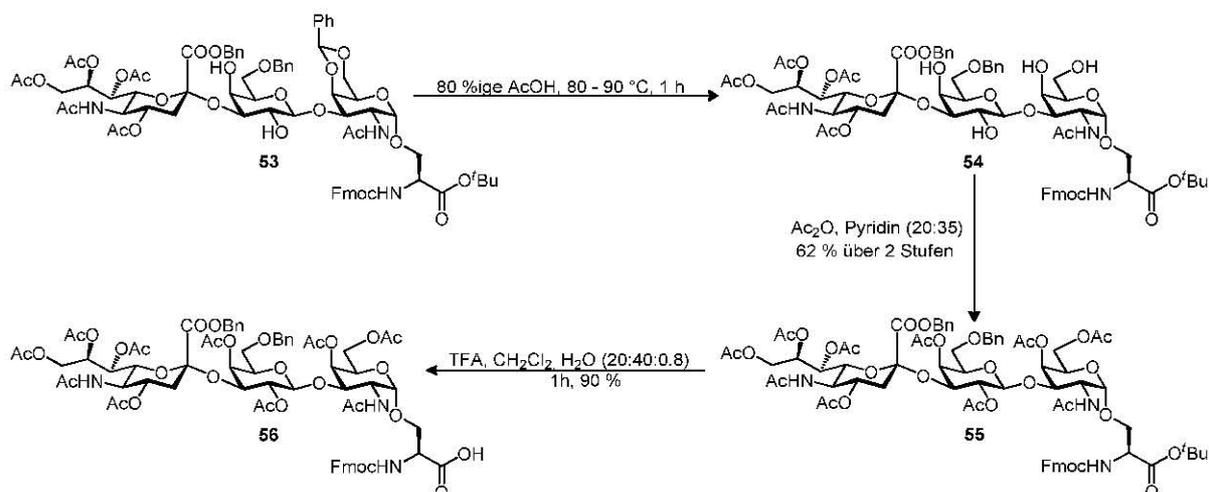
solange erhöht bis die verbliebenen Acetylgruppen entfernt waren. Das Gemisch aus dem gewünschten Produkt und dem Fmoc-deblockierten Produkt wurde durch Umsetzung mit Fmoc-OSu in Acetonitril und Dichlormethan wieder an der Aminokomponente blockiert, was die Gesamtausbeute auf 66 % steigen lässt. Schlüsselschritt bei der Synthese des (2,3)-Sialyl-T-Antigens ist die regio- und stereoselektive Sialylierung der 3'-Hydroxyfunktion des T-Antigens **52** (Schema 23).



Schema 23: Sialylierung zum (2,3)-Sialyl-T-Antigen **53**.

Zur Reaktion des Sialyl-Donors **22** mit dem Akzeptor **52** wurde der Donor bei -65 °C mit Silbertriflat und Methylsulfenylbromid aktiviert. Nach der Reaktion wurde mit *N,N'*-Diisopropylethylamin neutralisiert und das Rohprodukt durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt. Da nicht alle Verunreinigungen abgetrennt werden konnten, wurde eine präparative RP-HPLC-Reinigung angeschlossen, in der das Anomerengemisch aufgetrennt und weitere Verunreinigungen beseitigt wurden. So wurde das α -Anomer in einer Ausbeute von 60 % erhalten. Auf die quantitative Bestimmung des β -Anomers wurde verzichtet.

Um den Baustein **53** in einen für die Glycopeptidsynthese geeigneten Baustein zu überführen, müssen Schutzgruppen-Manipulationen erfolgen. Hierzu wird das Benzylidenacetal durch wässrige Essigsäure 1 h bei 80 °C gespalten. Anschließend wurden die freien Hydroxygruppen in Acetanhydrid/Pyridin (Schema 24) zum geschützten Konjugat **55** acetyliert (62 % über zwei Stufen).



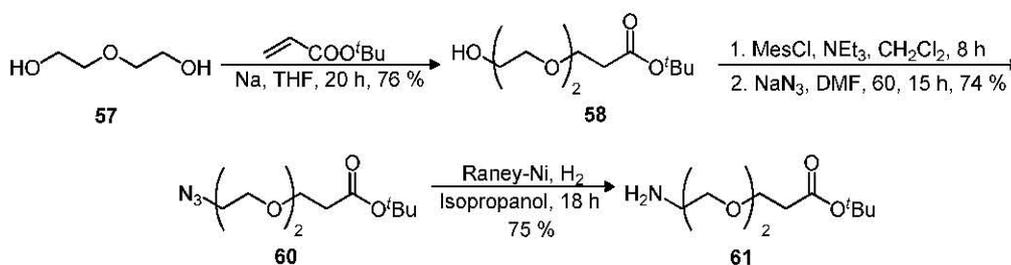
Schema 24: Schutzgruppenmanipulationen zur Synthese des (2,3)-Sialyl-T-Antigens **56**.

Schließlich erfolgt die Spaltung des *tert*-Butylesters in Dichlormethan, Trifluoressigsäure und Wasser. Nach flashchromatographischer Reinigung wird der Baustein für die Glycopeptidsynthesen in einer Ausbeute von 90 % erhalten.

3.3 Die Synthese der Spacereinheiten

3.3.1 Synthese des Diethylenglycolspacers

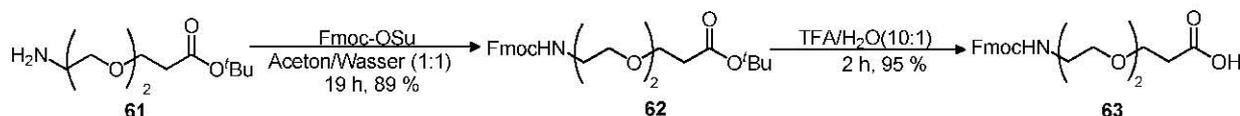
Zur Schaffung räumlicher Distanz zwischen dem Glycopeptidteil, dem sogenannten B-Zell-Epitop und verschiedenen angeknüpften Epitopen sowie zur Verhinderung gegenseitiger konformationeller Beeinflussung werden Spacermoleküle verwendet. Als flexible Spacer werden oft Oligoethylenglycoleinheiten verwendet. Polyethylenglycol (PEG) ist ein inertes Polymer. Es ist untoxisch, nicht ionisch und hydrophil. Verwendet wird es zur Stabilisierung, Immobilisierung oder zur Modifizierung physikalischer Eigenschaften in biologischen Molekülen speziell in Peptiden, Proteinen oder anderen biologischen Molekülen.^[156] Dazu werden die Biomoleküle mit PEG konjugiert, was PEGylierung genannt wird. Zum Einsatz kamen Di- und Triethylenglycolspacer mit Fmoc-blockierter Aminofunktion und freier Carbonylfunktion, wobei sich die Verwendung des eingesetzten Spacers nach der synthetisierten Peptidlänge richtete. Beide Spacer wurden durch die gleiche Syntheseroute synthetisiert, die für den Triethylenglycolspacer publiziert wurde^[114, 157] und für den Diethylenglycolspacer analog verläuft. Die synthetisierten Spacer lassen sich analog einer Aminosäure an beliebiger Stelle im Peptid integrieren und dienen als universelle Abstandhalter in der Festphasenpeptidsynthese. Zur Synthese des Fmoc-geschützten Spacers wird zunächst Di- bzw. Triethylenglycol in einer *Hetero-Michael*-Addition mit Acrylsäure-*tert*-butylester in Tetrahydrofuran umgesetzt (Schema 25).



Schema 25: Die Synthese des aminofunktionalisierten Diethylenglycolspacers **61**.

Nach flashchromatographischer Reinigung erhält man das Produkt **58** in 76%iger Ausbeute. Anschließend wird die freie Hydroxyfunktion mit Mesylchlorid und Triethylamin in Dichlormethan mesyliert. Das Mesylat wurde mit Natriumazid in das Azid **60** in 74%iger Gesamtausbeute nach chromatographischer Reinigung überführt. Die Azidofunktion wird mit

Wasserstoff über *Raney*-Nickel zum Amin **61** reduziert und liefert nach chromatographischer Reinigung das freie Amin in einer Ausbeute von 75 %. Sodann wird das Amin mit Fmoc-OSu in Aceton/Wasser (1:1) in das Fmoc-blockierte Derivat überführt (Schema 26).

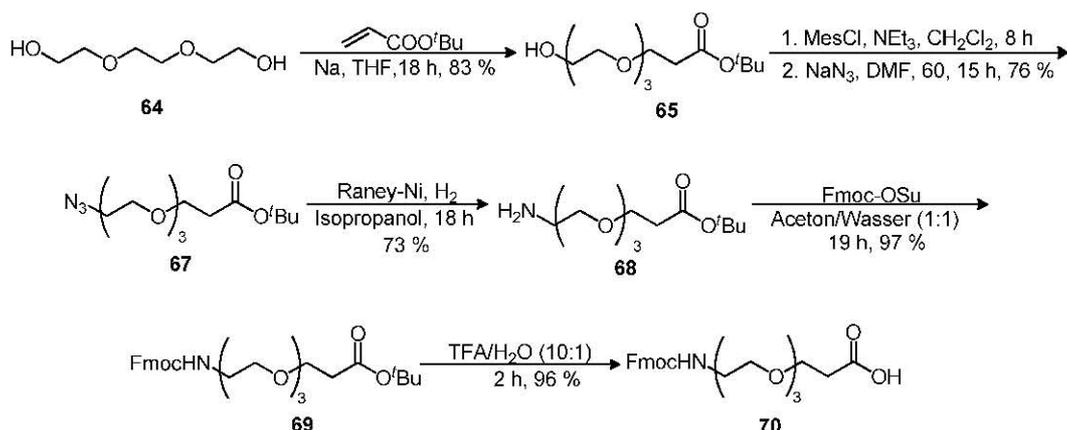


Schema 26: Die Synthese des aminofunktionalisierten Diethylglycolspacers 63.

Schließlich erfolgt die acidolytische Spaltung des *tert*-Butylesters in Trifluoressigsäure/Wasser. Das Weglassen von Anisol als Kationenscavenger liefert den Spacer **63**, welcher in der Kälte zu hellgelben Kristallen erstarrt.

3.3.2 Synthese des Triethylglycolspacers

Die Synthese des Triethylglycolspacers verläuft analog.^[114, 157] Ausgangsverbindung ist das Triethylglycol **64** (Schema 27).^[157]



Schema 27: Die Synthese des aminofunktionalisierten Triethylglycolspacers 70.

Im Großen und Ganzen verliefen die Reaktionen sehr ähnlich. Bis auf die Reduktion des Azids **67** ergaben die Reaktionen beim Triethylglycolspacer höhere Ausbeuten.

3.4 Die Synthesen von Adjuvanzen

3.4.1 Allgemeine Betrachtungen

Im nativen Immunsystem existieren eine Reihe verschiedener Rezeptoren, die Pathogene erkennen und so Reaktionen auslösen. Rezeptoren, die die Oberfläche von Bakterien direkt erkennen, binden häufig an Wiederholungsmuster, wie beispielsweise Kohlenhydrat- oder Lipidgruppen, die für mikrobielle Oberflächen charakteristisch sind, aber nicht in Körperzellen vorkommen.^[10] Einige dieser Rezeptoren, wie beispielsweise der

Mannoserezeptor der Makrophagen, stimulieren die Phagozytose direkt, während andere Rezeptoren sezerniert werden und so die Phagozytose von Pathogenen durch Opsonierung oder durch Aktivierung des Komplementsystems stimulieren. Die Rezeptoren des nativen Immunsystems besitzen auch eine wichtige Funktion bei der Signalübertragung für die induzierten Antworten, die für lokale Entzündungen verantwortlich sind, ebenso wie bei der Mobilisierung neuer Effektorzellen, der Eindämmung von lokalen Infektionen und beim Auslösen von adaptiven Immunantworten. Die Übertragung solcher Reize erfolgt durch signalgebende Rezeptoren, die als Toll-Rezeptoren (TLR) zusammengefasst werden. Sie bezeichnen eine Struktur des sogenannten nativen Abwehrsystems (innate immunity) und gehören zur Gruppe der PRRs (Pattern-Recognition Receptors). TLR-ähnliche Rezeptoren dienen der Erkennung von PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), die ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vorkommen und entsprechende Aktivierungen von Genen steuern. Hierdurch wird die Aktivierung des „antigen-spezifischen adaptiven Immunsystems“ (antigen-specific acquired immunity) eingeleitet und moduliert. Diese sind zwischen den verschiedenen Spezies stark konserviert. TLR-4 erkennt gramnegative Bakterien über die Assoziation mit dem peripheren Membranprotein CD14, einen Rezeptor für bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), die an das LPS-bindende Protein LBP gebunden sind. TLR-2 reagiert auf mikrobielle Proteoglycane, wobei nicht bekannt ist, wie die Erkennung erfolgt. Die Verknüpfung von TLR-2 und TLR-4 aktiviert einen in der Evolution früh entstandenen Signalweg, der den Transkriptionsfaktor NF κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und eine Reihe von Genen aktiviert, darunter auch Gene für Cytokine. Man unterscheidet im Wesentlichen fünf Hauptgruppen von Cytokinen: Interferone, Interleukine, co-stimulierende Moleküle, Tumornekrosefaktoren und Chemokine, die bei der Steuerung der adaptiven Immunantwort in späteren Phasen einer Infektion von entscheidender Bedeutung sind. NF κ B ist von großer Bedeutung für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und des Zelltodes.^[158] Bei NF κ B handelt es sich nicht um ein einzelnes Protein, sondern um sieben verschiedene Proteine. Die Aktivierung von NF κ B gilt als kritisch für die Entstehung von Entzündungen. Schließlich erfüllt NF κ B wichtige Funktionen im Bereich der Entwicklung des Immunsystems und der lymphatischen Organe. Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen wird NF κ B auch mit zahlreichen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Bei einigen Arten von Krebserkrankungen wird eine solche Rolle zunehmend als wahrscheinlich angesehen, so dass Bestandteile des NF κ B-Signalweges inzwischen wichtige Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente geworden sind. Zu den Stimuli, die eine Aktivierung von NF κ B auslösen können, zählen

Wachstumsfaktoren, Cytokine (z. B. TNF- α und IL-1 β), Signale aus der Familie der TLR-Rezeptoren (z. B. bakterielle und virale Antigene, LPS, doppelsträngige RNA) und chemisch-physikalische Noxen (z. B. freie Radikale, UV-Strahlung).^[159] In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus zur Stimulierung und Aktivierung von NF κ B auf ein Cytokin, das IL-1 β , und auf zwei der TLR-Rezeptoren, TLR-2 und TLR-4, gelegt.

In der Pharmakologie werden Hilfsstoffe, die die Wirkung eines Arzneistoffes verstärken, dabei aber möglichst keine eigene pharmakologische Wirkung entfalten, als Adjuvanzen bezeichnet. Ein Beispiel für ein Adjuvans stellt Dimethylsulfoxid dar, welches als Penetrationsbeschleuniger in einigen Arzneimitteln zur Anwendung kommt.^[160] Klassisches Einsatzgebiet für Adjuvanzen ist die Immunologie. Hier werden Adjuvanzen eingesetzt, um die Immunantwort auf eine verabreichte Substanz unspezifisch zu steigern. Das heißt, dass für die spezifische Immunantwort das Antigen und für die Stärke der Antwort zusätzlich das Adjuvans verantwortlich ist. Adjuvanzen können zu einer lokalen Gewebereizung führen und binden das Antigen, so dass es nur verzögert freigesetzt wird. Beispiel hierfür ist das *Pegasys*[®] Interferon α -2_b, das durch PEGylierung des Interferons gewonnen wird und dessen renale Clearance verzögert ist, wodurch sich die Plasmahalbwertszeit des Interferons α -2_b auf das 10-Fache verlängert. Dadurch werden eine erhöhte Antikörperbildung und eine verstärkte Immunantwort erreicht. Als weitere Beispiele sind die Impfstoffe *Cervarix*[®] und *Fendrix*[®] zu nennen, in denen das Adjuvans AS04 vorzufinden ist. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus zwei Komponenten, dem gereinigten Monophosphorlipid-A (MPL-A) (LPS \rightarrow MPL-A), welches aus den Bakterienzellwänden von *Salmonella minnesota* gewonnen wird, und Aluminiumhydroxid bzw. Aluminiumphosphat.^[161] Wie neuere Studien belegen, haben Adjuvanzen die Aluminiumverbindungen enthalten, jedoch nicht nur benigne Effekte, sondern werden laut C. Exley in Verbindung mit toxischen Effekten und Alzheimer gebracht.^[162-165] So konnte die Arbeitsgruppe um Prof. R. Gherardi in einer kleineren Gruppe von Menschen Impfkomplicationen nachweisen, die als makrophagische Myofasziitis (MMF) bezeichnet werden und durch den in Impfstoffen enthaltenen Zusatzstoff Aluminiumhydroxid zu einer chronischen Muskelerkrankung führen, bei denen die Fresszellen des Immunsystems den aufgenommenen Aluminiumkomplex nicht abbauen können.^[166]

Wie aus der Studie von GSK (*GlaxoSmithKline*) entnommen werden kann, löst AS04 die Aktivierung von NF κ B aus, was für die Entwicklung von neuen Vakzinen von Interesse ist.^[161] Therapeutisch sind Adjuvanzen als Bestandteil von Impfstoffen bedeutsam. In ihrer Funktion als Wirkverstärker stellen sie keinen Arzneistoff, sondern einen pharmazeutischen Hilfsstoff dar. Grundsätzlich gilt die Regel, dass zum Erzielen des erwünschten Effekts die

Hilfswirkung eines Adjuvans umso mehr benötigt wird, je kleiner das in Frage kommende Antigen ist. Substanzen wie die LPS, die co-stimulierende Aktivitäten induzieren, fanden jahrelang in Gemischen Verwendung, die man zusammen mit Proteinantigenen injiziert hat, um deren Immunogenität zu steigern.^[159] Dabei hat sich auf empirischem Weg herausgestellt, dass Adjuvantien mit Bestandteilen von Mikroorganismen am besten geeignet sind, um Makrophagen und dendritische Gewebezellen dazu anregen zu können, co-stimulierende Moleküle und Cytokine zu exprimieren.

3.4.2 *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3-bispalmitoyloxy-(2*R*,*S*)-propyl)-(*R*)-cystein

TLR-2 und TLR-4 aktivierende Substanzen können gleichzeitig sowohl Adjuvantien als auch Mitogene sein. Mitogene Substanzen sind in der Lage, in einer nicht antigenspezifischen Weise B- und/oder T-Zellen zu stimulieren und dabei die Zellteilung anzuregen. Daher sind sie für die Immunogenität von Strukturen von besonderem Interesse. Beispiele für mitogene Substanzen sind Concanavalin A (ConA, ein Protein aus der Jackbohne, das zur Gruppe der Lektine gehört), das die Mehrzahl aller T-Zellen unabhängig von ihrer Spezifität stimulieren kann. Die Aktivierung erfolgt vermutlich über Oberflächenrezeptoren der T-Zelle über den CD3-Komplex.^[167] Weitere mitogene Substanzen sind Phytohämagglutinin (PHA, Feuerbohne), welches T-Zellen aktiviert, und Pokeweed-Mitogen (PWM, Kermesbeere), das B- und T-Zellen stimuliert.^[159] Lipoproteine stellen einen Bestandteil der Zellwand von gramnegativen und grampositiven Bakterien sowie von Mycoplasmen dar.^[168-171] Die Isolierung weiterer bakterieller Lipoproteine zeigte, dass die Peptidsequenz der Lipoproteine/-peptide keine Homologien aufweist. In der vorliegenden Arbeit kam *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3-bispalmitoyloxy-(2*R*,*S*)-propyl)-(*R*)-cystein (Pam_3Cys) als Adjuvans und Mitogen zum Einsatz (Abbildung 18).

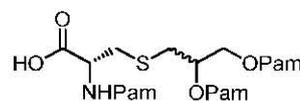


Abbildung 18: Die Struktur von Pam_3Cys .

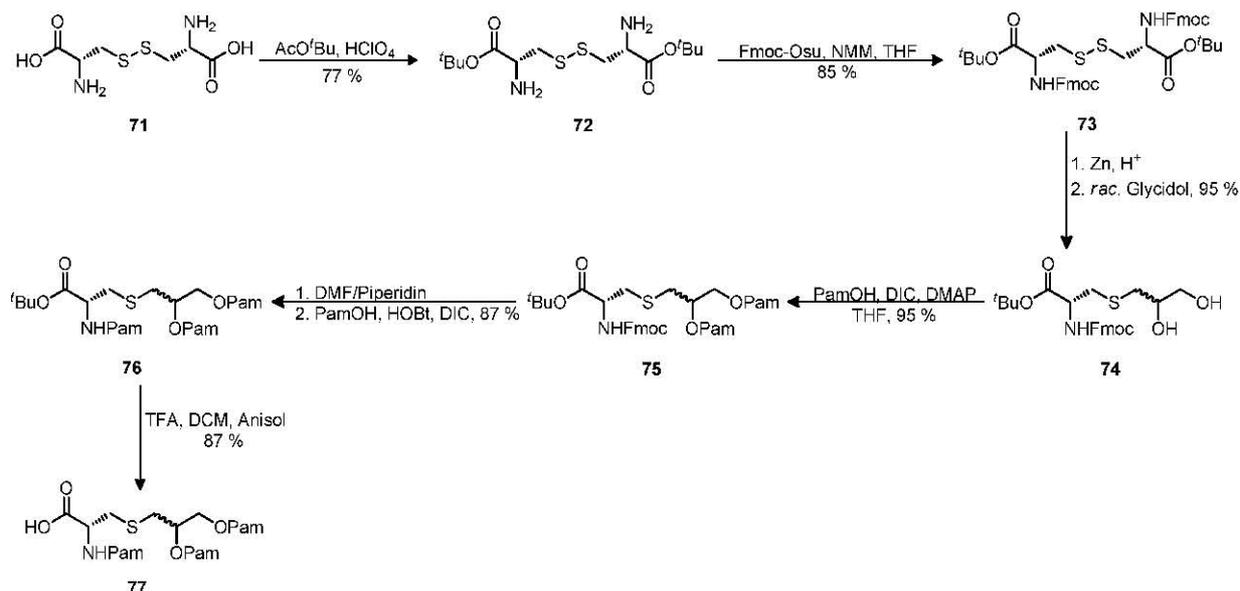
Pam_3Cys ist der synthetische lipophile *N*-terminale Teil des Lipoproteins aus der äußeren Membran des *Escherichia coli*-Bakteriums.^[172] Das synthetische Pam_3Cys unterscheidet sich von der natürlich vorkommenden Substanz dadurch, dass im natürlichen Lipoprotein eine Mischung unterschiedlicher Fettsäurereste enthalten ist, wobei Palmitinsäure Hauptbestandteil ist.^[173] Das von *Wiesmüller et al.*^[174] hergestellte Lipoprotein Pam_3Cys -Ser-Ser-Asn-Ala ist das synthetische Analogon zum *E. coli*-Lipoprotein und zeigt nach *Bessler* sehr ähnliche,

nicht toxische, mitogene Eigenschaften, entsprechend der der Lipopolysaccharide.^[175] Es löst eine vergleichbare Aktivierung von B-Zellen,^[174, 176] Monozyten^[177] und Neutrophilen^[178] wie das natürlich vorkommende Lipoprotein aus. *Braun et al.* konnten bereits 1975 zeigen, dass das isolierte Lipoprotein das murine B-Zellwachstum stimuliert.^[179] Studien von *Norgard* und *Kreuz* mit Lipoproteinen verschiedener Bakterien belegten deren Fähigkeit, sowohl NFκB als auch die Cytokin-Produktion zu aktivieren.^[180] Die synthetischen Analoga des *Braunschen* Lipoproteins fungieren zudem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als potente Immunadjuvantien.^[181-182] Der Einsatz von Lipopeptid-Vakzinen wurde sowohl in Tiermodellen^[183] als auch am Menschen untersucht. In beiden Fällen waren keine toxischen Nebenwirkungen zu beobachten.^[184] Trotz intensiver Untersuchungen blieb lange Zeit unklar, über welchen Mechanismus die Lipopeptide die von ihnen vermittelte Immunantwort auslösen. Erst die Entdeckung der TLR's und die Zuordnung der Lipopeptide und Lipoproteine zu den Liganden des TLR-2 ermöglichte ein tieferes Verständnis der Wirkungsweise der Lipoproteine. Untersuchungen von *Metzger et al.* zur Struktur-Wirkungsbeziehung zeigten, dass die biologische Aktivität des wasserlöslichen Lipohexapeptides Pam₃Cys-Ser-Lys₄ im Vergleich zu den anderen Lipopeptiden am höchsten ist und als effektivstes Additiv zur Auslösung einer zellvermittelten Immunantwort genutzt werden kann.^[185] *Spohn et al.* untersuchten am Pam₃Cys-Ser-Lys₄ den Einfluss von unterschiedlich langen Fettsäuren sowie der Stereozentren und des Grundgerüsts auf die biologische Aktivität.^[182, 186] Durch Variation des Peptidteils wurde gezeigt, dass dieser für die Aktivität der Verbindungen unabdingbar ist. Ein signifikanter Einfluss der Peptid-Kette war jedoch nur bei wenigen Peptid-Sequenzen zu beobachten. Lipopeptide mit nur einer Fettsäure wiesen keine Aktivität auf, während bei Lipopeptiden mit vier Fettresten die biologische Aktivität deutlich vermindert war. Die Verkürzung der Kettenlänge der Fettsäuren führte ab einer Kohlenstoffzahl von zehn und geringer (pro Fettsäure) ebenfalls zu einer deutlich verringerten Aktivität der Verbindungen. Der Austausch des Schwefels verringerte ebenso die biologische Aktivität der Verbindungen signifikant. Untersucht wurden auch die Stereoisomeren. Dabei war in den Studien von *Spohn et al.* das (2*R*,6*R*)-Diastereoisomer am aktivsten. Dies steht doch im deutlichen Kontrast zu den schon früher durchgeführten Studien von *Metzger et al.*, in denen die (2*S*,6*S*)- bzw. (2*R*,6*S*)-Diastereoisomere die höchste biologische Aktivität aufwiesen.^[185] Um dieses Problem zu umgehen, wurde das racemische *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3-bispalmitoyloxy-(6*R*,*S*)-propyl)-(*R*)-cystein synthetisiert. Das so synthetisierte Pam₃Cys-Ser-Lys₄ wirkt als TLR-2-Agonist. Wie bereits erwähnt, gehören Toll-like-Rezeptoren zum nativen Immunsystem. Sie identifizieren Strukturmerkmale der PAMPs,

wodurch es zur Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen kommt, die die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort unterstützen, indem DC an naiven CD4⁺-T-Zellen die Ausdifferenzierung in Abhängigkeit des Cytokinmilieus und anderer Faktoren zu den T_H1- oder T_H2-Zellen induzieren.^[187] Bei der Konjugation des Pam₃Cys-Ser-Lys₄-Mitogens an Vakzinkonjugaten, bestehend aus B- und T-Zell-Epitopen, können selektive Immunantworten in Form von Antikörpern erzielt werden.^[188-191] Beispiele für die positiven Eigenschaften bezüglich der spezifischen T-Zell-Antwort von Adjuvantien, im Speziellen dem Pam₃Cys in Kombination mit dem MPL-A, finden sich in den folgenden Artikeln von *B. Frisch*^[192] und *U. Sahin*.^[193] Wie bei der PEGylierung werden die Eigenschaften von Lipiden eingesetzt, um Überstrukturen, wie Micellen oder Liposome, auszubilden. Bindet man Lipide kovalent an Proteine oder Peptide, lässt sich bei Immunisierungen zusätzlich der Depot-Effekt ausnutzen, der zu einer verzögerten Verteilung eines Impfstoffes in der Blutbahn führt. Dieser Effekt wird bei Immunisierungen mit polaren Vakzinen durch den Einsatz des kompletten *Freunds* Adjuvans (FCA) angewandt. Es handelt sich um ein in der Forschung, jedoch nicht für Menschen zugelassenes Adjuvans, das Immunreaktionen verstärken kann. Daher sind Mitogenkonjugate im Hinblick auf die Entwicklung von humanen Vakzinen, in denen das *Freunds* Adjuvans durch Mitogene ersetzt werden kann, von Interesse.^[172, 182, 194] Ausgehend von diesen Erkenntnissen sollen Konjugate, bestehend aus einem MUC1-Glycopeptid und dem Mitogen Pam₃Cys-Ser-Lys₄, über einen nicht-immunogenen Spacer kovalent miteinander verbunden werden, um sie in Immunisierungsexperimenten zusammen mit dem MPL-A einsetzen zu können, wie in verwandten Beispielen von *GSK* (*Cervarix*[®], *Fendrix*[®]),^[164] Tecemotide (*Stimuvax*[®]) oder dem von *Sahin et al.*^[193] publizierten Modell geschehen.

3.4.3 Die Synthese des Mitogens Pam₃Cys-OH

Das Mitogen *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3)-bispalmitoyloxy-(2*R*,*S*)-propyl)-(*R*)-cystein wird nach einer literaturbekannten Strategie ausgehend von L-Cystin **71** in sechs Stufen synthetisiert.^[182, 195-196] In der ersten Stufe wird L-Cystin mit Essigsäure-*tert*-butylacetat und katalytischen Mengen Perchlorsäure in den zweifach geschützten Bis-*tert*-Butylester **72** überführt (Schema 28). Dann werden beide Aminofunktionen durch Umsetzung mit Fmoc-OSu und *N*-Methylmorpholin in Tetrahydrofuran in einer Ausbeute von 70 % blockiert. Das vollgeschützte Cystin **73** wird danach unter sauren Bedingungen mit Zink umgesetzt, wobei die Disulfid-Bindung reaktiv zum Thiol gespalten wird, welches *in situ* durch Zugabe von (*R*,*S*)-Glycidol in den entsprechenden Thioether **74** umgewandelt und in einer Ausbeute von 95 % erhalten wird.



Schema 28: Die Synthese von Pam₃Cys-OH 77.

Die freien vicinalen Hydroxylfunktionen des Diastereomeren-Gemisches **74** werden anschließend unter *Steglich*-Bedingungen mit Palmitinsäure verestert. Nach Reinigung erhält man das doppelt veresterte Produkt **75** in einer Ausbeute von 95 %. Nachfolgend wird die Fmoc-Schutzgruppe mit 50%iger Piperidinlösung in *N,N*-Dimethylformamid abgespalten und die freie Aminofunktion mit Palmitinsäure durch die Kombination der Kupplungsreagenzien *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und HOBT in *N,N*-Dimethylformamid in das Amid **76** in 87%iger Ausbeute überführt. Im letzten Schritt erfolgt die acidolytische Spaltung des *tert*-Butylesters mit TFA/DCM/Anisol, wobei das Produkt nach Auskristallisation in quantitativer Ausbeute erhalten wird. Es wird anschließend einer flashchromatographischen Reinigung unterzogen, um Beiprodukte zu entfernen, da sie die in späteren Stufen folgende Festphasensynthese erheblich stören würden. Das Pam₃Cys-Mitogen **77** wird in sechs Stufen erhalten und kann anschließend als Adjuvans oder in der Festphasensynthese eingesetzt werden. Es empfiehlt sich, nach jeder zweiten Stufe eine flashchromatographische Reinigung durchzuführen, da durch das Kristallisieren nicht immer alle Verunreinigungen quantitativ beseitigt werden können.

3.4.4 Allgemeines zu Lipopolysacchariden

Gramnegative Bakterien sind dafür bekannt, Bestandteile auf der Zelloberfläche zu besitzen, die bei höheren Spezies sowohl physiologische als auch pathologische Reaktionen hervorrufen können.^[197] Einer dieser Bestandteile sind die Lipopolysaccharide (LPS). Sie sind ein Hauptbestandteil der äußeren Zellwand von gramnegativen Bakterien und essentiell für deren Integrität.^[198] Sie zeichnen sich durch relative Thermostabilität aus und dienen der

serologischen Identifizierung und Charakterisierung. Bei Zellteilung oder Zersetzung von Bakterien werden Teile der LPS frei, die im Wirtsorganismus toxisch wirken. Sie werden jedoch nicht von intakten Bakterien abgegeben. Man bezeichnet sie als Endotoxine. Diese Endotoxine rufen starke Immunreaktionen hervor. LPS zählt zu den potentesten bekannten Immunstimulatoren für Protein- und Kohlenhydrat-Antigene und kann die humorale und die zellvermittelte Abwehr verbessern.^[198-201] Als Antigene sind sie vor allem hauptverantwortlich für die Aktivierung der angeborenen Immunität durch den TLR-4. Die positiven und negativen Folgen dieser Immunaktivierung, das heißt die Bildung einer adäquaten Infektionsabwehr und die Entstehung von krankhaften Symptomen sowie die zugrunde liegenden Mechanismen, sind für die Entwicklung von Adjuvanzen von besonderem Interesse. Endotoxine sind amphiphile Stoffe bestehend aus drei Teilen, einem lipophilen Anteil aus einem Glycolipid, dem Lipid A, einem Core aus Oligosacchariden und einer hydrophilen Region aus Polysacchariden (Abbildung 19).^[198, 202-203]

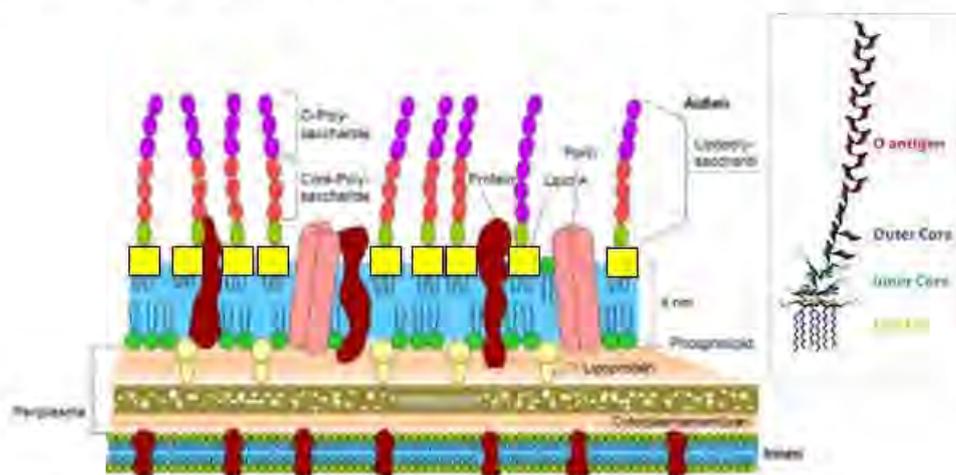


Abbildung 19: Schematische Darstellung gramnegativer Bakterien.

Den Pionieren *Westphal* und *Lüderitz* ist es zu verdanken, dass wir heute viel über die LPS wissen. Sie fanden heraus, dass die Bindung zwischen dem Core aus Oligosacchariden und dem Glycolipidteil selektiv durch milde Säuren gespalten werden kann und dass das Lipid A hauptverantwortlich für die endotoxische Aktivität der LPS ist. Die LPS-Moleküle sind mit ihrem Lipid-A-Teil in der Membran verankert.^[198, 204]

Strukturelle Veränderungen im Bereich des Lipid-A führen zu verminderter oder fehlender Toxizität.^[205] Das Lipid-A besteht aus zwei D-Glucosaminbausteinen, die über eine (β -1,6) glycosidische Bindung miteinander verknüpft sind (Abbildung 20). In den Positionen 1 und 4 ist jeweils eine Phosphatgruppe lokalisiert. An den Positionen 2, 2', 3, 3' sind meist 4 – 6 Fettsäuren mit 10 – 22 Kohlenstoff-Atomen angebunden, von denen vier primär mit dem Saccharidteil verestert oder über Amidbindungen verknüpft sind.

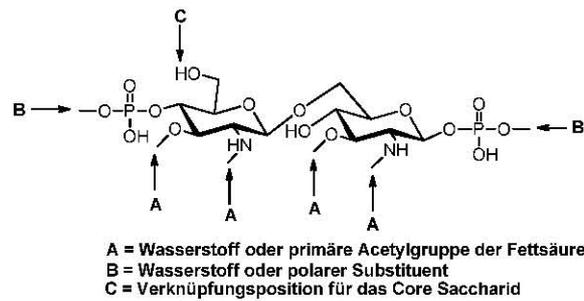


Abbildung 20: Die chemische Struktur des Lipid A.

Die Fettsäurelänge scheint für die biologische Aktivität des Lipid-A Moleküls nicht unbedeutend zu sein.^[206] Die große strukturelle Vielfalt der unterschiedlichen Bakterienstämme und die Diversität innerhalb eines Bakterienstammes machen es jedoch schwer, genaue Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen der biologischen Signifikanz und der Kettenlänge zu ziehen.^[198] Die am Kohlenhydratgerüst gebundenen Fettsäuren sind in der 3-Position hydroxyliert, vorzugsweise in der *R*-Konfiguration.^[198] Häufig vorzufinden ist die (*R*)-3-Hydroxymyristinsäure, die in ihrer Hydroxyform vorliegt oder mit Myristinsäure oder Laurinsäure verestert ist. Die primäre Hydroxyfunktion im zweiten Glucosaminbaustein bildet die Verknüpfungsstelle zu dem Polysaccharidrest über die 2-Keto-3-desoxy-D-mannooctansäure (Kdo). Das Lipid A ist an sich amphiphil, wobei die Fettsäuren den hydrophoben Teil und das Disaccharid mit den beiden Phosphatgruppen den hydrophilen Kopf bilden.^[202, 204] Der mittlere Teil des LPS, die R- oder Core-Region, wird in einen inneren und einen äußeren Teil untergliedert, bei dem die interspezifische Variabilität von innen nach außen zunimmt. Charakteristische Zucker des inneren Anteils sind die Kdo, welche mit dem Lipid A verknüpft ist, sowie L- oder D-glycero-D-manno-Heptosen, während die äußere Core-Region überwiegend aus Hexosen, wie der D-Glucose, der D-Galactose oder *N*-Acetyl-D-glucose, aufgebaut ist.^[202, 207] Das O-Antigen, der äußerste Teil des LPS, ist aus einer variablen Anzahl sich wiederholender Oligosaccharide aufgebaut, die für jede Bakterienspezies spezifisch sind, antigenen Charakter besitzen und bei einigen Stämmen auch ganz fehlen können (sogenanntes rough-LPS).^[198, 202] Der Lipid-A-Teil mit seinen anionischen Gruppen bildet zusammen mit der inneren Kern-Region einen stark negativ geladenen Bereich und bietet so einen Angriffspunkt für zahlreiche natürliche und synthetische Peptide und Proteine.^[208] Wegen Ihrer amphiphilen Natur bilden Endotoxine im wässrigen Milieu Micellen aus, was auch die Schwierigkeit erklärt, sie durch NMR zu charakterisieren. In der aggregierten Form ist LPS nur gering immunogen. Immunantworten werden durch die spontane Diffusion einzelner LPS-Moleküle aus dem Mizellenverband hervorgerufen. Die spontane Diffusion, die durch Serumproteine hervorgerufen wird, erfolgt im Vergleich zum aktiven Transport sehr langsam. Diese Serumproteine sind in der Lage, einzelne Moleküle aus dem Mizellenverband

herauszulösen und sie zu den zellulären Rezeptoren zu transportieren, wo sie in ihrer monomeren Form potentiell toxisch wirken. Im Falle signaltransduzierender Rezeptoren führt diese zur Zellaktivierung und Induktion proinflammatorischer Cytokine.^[198, 209-210] Zur Erkennung von eingedrungenen Erregern haben höhere Organismen eine Reihe von Mechanismen entwickelt, an denen Serumproteine und zelluläre Rezeptoren maßgeblich beteiligt sind. Schlüsselschritt für das Verständnis der Wirkungsweise von Lipopolysacchariden war 1968 die Entdeckung eines Mausstammes, der auf LPS immun reagierte. Die verantwortliche Komponente für die Widerstandsfähigkeit wurde gesucht und als das sogenannte LPS-Gen identifiziert.^[211] 1989 entdeckten *Wright et al.* das Serumprotein LBP (LPS bindendes Protein), das an LPS bindet und die Makrophagenaktivität bezüglich der LPS erhöht.^[212] LBP ist ein 60 kD schweres Glycoprotein, das aus 452 Aminosäuren inklusive einer 25 Aminosäuren langen Signalsequenz besteht und als Akutphasenprotein (APP) hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird.^[213] Die Konzentration von LBP steigt von einem konstitutiven Serumspiegel von 5 – 15 µg/ml auf 30 bis über 100 µg/ml in der Akutphase der Sepsis.^[214] Für die Vermittlung einer zellulären Antwort auf LPS spielen die löslichen Proteine LBP und sCD14 als Transportproteine eine entscheidende Rolle. CD14 ist ein Glycoprotein des angeborenen Immunsystems. Es wird vor allem in Monozyten und Makrophagen exprimiert, wobei es in zwei Formen vorkommt, einmal in seiner festen Form, in dem es über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker mit der Zellmembran verbunden ist (mCD14), und in anderer Form als lösliches Protein (sCD14).^[215-216] Aus den Mizellen dissoziieren nur in geringem Umfang einzelne LPS-Moleküle. Geringe, physiologisch relevante LPS-Konzentrationen wirken in der Zellkultur nur stimulatorisch, wenn Plasma hinzugegeben wird.^[217] Dieser verstärkende Effekt wird durch das im Serum befindliche LBP und das lösliche CD14 (sCD14) vermittelt. LBP, als Lipidtransferprotein, fördert dabei das Herauslösen von LPS aus Mizellen und den Transport von monomerem LPS an humorale oder zelluläre Bindungsstellen.^[218] Eindrucksvoll konnte dies an CD14-positiven Zellen gezeigt werden. In Anwesenheit von LBP ist eine 1000-fach geringere LPS-Konzentration ausreichend, um eine Cytokinausschüttung hervorzurufen.^[213]

Einen hohen Grad an struktureller und funktioneller Übereinstimmung mit dem LBP zeigen das Bakterien permeabilisierende Protein (BPIP, Bactericidal Permeability Increasing Protein), das Cholesterinester-Transferprotein (CETP) und das Phospholipid-Transferprotein (PLTP), sodass sie zu einer Proteinfamilie zusammengefasst werden können. Diese binden Lipidstrukturen oder katalysieren den Austausch von Lipiden zwischen Mizellen und Rezeptor.^[219] BPIP bindet ebenfalls an gramnegative Bakterien, jedoch besitzt es bakterizide

Eigenschaften, indem es die Zellmembran permeabilisiert und dadurch die Bakterien zerstört. Dieser zytotoxische Effekt wird durch LBP verstärkt. Die stimulatorischen Eigenschaften von LBP werden jedoch von BIIP abgeschwächt, sodass es zu einer Konkurrenzreaktion kommt.^[220] Der LBP-vermittelte Transfer von LPS-Monomeren erfolgt in einem zweistufigen Prozess (Abbildung 21).

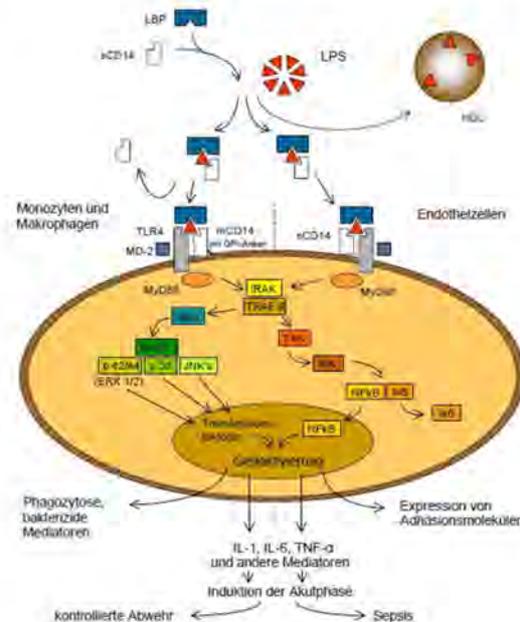


Abbildung 21: LPS-abhängige Induktion proinflammatorischer Abwehrmechanismen in Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen.^[221]

Im ersten Schritt wird das LPS durch das LBP monomerisiert und anschließend auf sCD14 übertragen.^[221] Das sCD14 ermöglicht die Stimulation CD14-negativer Zellen. Anschließend erfolgt der Transport zu den Rezeptormolekülen. Damit TLR4 effizient auf LPS reagieren kann, benötigt es das unterstützende MD-2 Protein. Dabei bindet MD-2 erst an den TLR4. Es scheint dadurch die Affinität der sich anschließend anbindenden bakteriellen Bestandteile zu erhöhen.^[222] Im letzten Schritt wird das LPS auf den TLR4-MD-2-Komplex übertragen.^[213, 216] Über die intrazelluläre Domäne von TLR4 kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden und einer raschen Induktion des Transkriptionsfaktors NFκB. Dieser reguliert die Transkription einer Vielzahl von Genen, die zur Biosynthese und Sekretion von IL-1, IL-6 und TNF-α aus Makrophagen führen, deren Produkte an Abwehr- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Die systemische Wirkung dieser Cytokine zieht im Körper die Akutphase nach sich und dient unter anderem der antimikrobiellen Abwehr. Bei zu starker oder unbalancierter Cytokinausschüttung kann es durch die Überstimulation des Immunsystems zu fehlerhaften Reaktionen bis hin zur Sepsis kommen. Studien an verschiedenen Tiermodellen belegten den antitumoralen Effekt von LPS und seinem biologisch aktiven Teil, dem Lipid A, durch dessen Aktivierung sowohl das angeborene als

auch das erworbene Immunsystem durch die Cytokinproduktion beteiligt sind.^[198] Die Entwicklung von Tumoren kann durch Lipid A entscheidend beeinflusst werden. Zum einen hemmt es den Blutfluss zu tumoralem Gewebe und induziert durch die Ausschüttung von entzündlichen Botenstoffen, wie dem Tumornekrosefaktor (TNF- α), Entzündungsreaktionen, die wiederum Makrophagen anlocken. Diese leiten die Nekrose oder Apoptose ein, die zur Zerstörung des Tumors führen. Lipid A wurde an Tieren sowohl als Pharmakon als auch als Adjuvans in therapeutischen Vakzinen getestet. Die Wirksamkeit der Behandlung war abhängig von dem verwendeten Molekül und Protokoll. Allgemein konnte die Überlebensrate gesteigert werden, die in einigen Fällen durch eine Tumorregrression oder auch Heilung begleitet wurde.

Obwohl verschiedene Lipid A-Spezies, die LPS-Form oder synthetische Analoga, entwickelt und getestet wurden, wurde für die Behandlung von Krebserkrankungen nur das MPL-A als Adjuvans in Krebsvakzinen in Erwägung gezogen und in klinischen Studien am Menschen getestet.^[198] Die Cytokinausschüttung ist vergleichbar zu der durch LPS bewirkten, jedoch ist MPL-A viel weniger toxisch. Es wurde in über 300.000 Fällen in der Erforschung am Menschen für Impfstoffe der nächsten Generation getestet. MPL-A wurde auch als Adjuvans zusammen mit MUC1-Peptiden in einer klinischen Studie bei Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs verabreicht. Es konnten sowohl schwache Mucin-spezifische humorale Antworten als auch eine T-Zell-Antwort mit der Zunahme an CD8⁺-Rezeptoren verzeichnet werden.^[198] Leider war jedoch die Immunantwort insgesamt nicht stark genug.^[223]

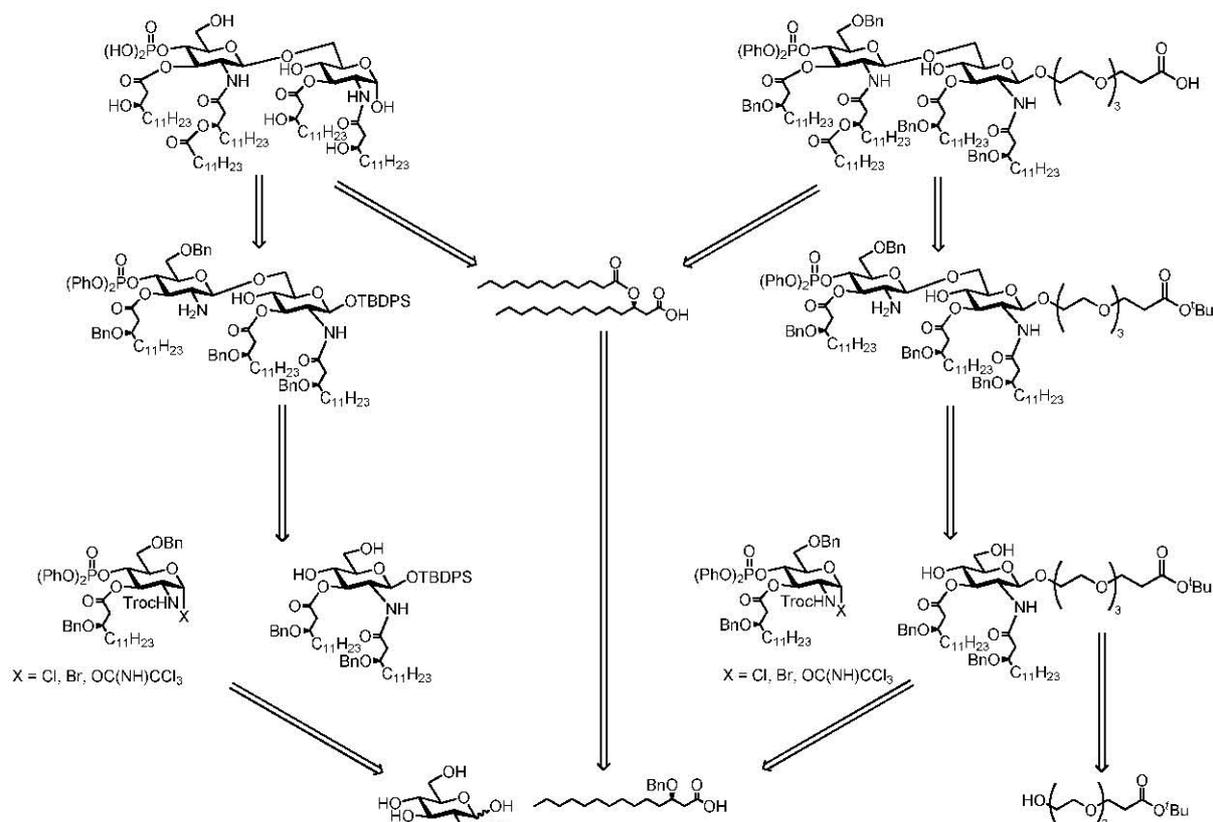
Das Monophosphorlipid A kann durch kontrollierte Hydrolyse der Lipopolysaccharide, z. B. von *Salmonella minnesota* R595, erhalten werden^[224], wobei durch die Heterogenität des LPS-Konjugates und durch die fehlende chemoselektive Spaltung ein Gemisch unterschiedlich hoch substituierter acetylierter Produkte entsteht. Ein genau definiertes Produkt kann nur durch chemische Synthese gewonnen werden. Das so gebildete Lipid A zeichnet sich durch verringerte Toxizität und hervorragende immunstimulatorische Eigenschaften aus. Es gehört zu der neuen Generation von TLR-Agonisten, die für die humane Vakzinierung erprobt und zugelassen wurden. Beispiele sind die Impfstoffe *Cervarix*[®] oder *Fendrix*[®] von GSK, *Stimuvax*[®] von Biomira Inc., in denen das Lipid-A als Adjuvans AS04 zum Einsatz kommt.^[161] Einer der größten Verreiber für Lipid-A-Moleküle mit sowohl natürlichem als auch synthetisch hergestelltem Lipid-A sind *Avanti Polar Lipids*[®] und *Corixa* (heute GSK).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Synthesestrategie entwickelt, um das MPL-A, wie es von *Avanti Polar Lipids*[®] in seiner predominantesten Spezies vertrieben wird, zu

synthetisieren. Des Weiteren wurden Derivate hergestellt, die eine kovalente Anknüpfung an MUC1-Peptide ermöglichen.

3.4.5 Die Synthese von Monophosphorlipid A

Die genaue Struktur des Lipid A von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* wurde Anfang der 1980 von Takayama, Kusumoto, Shiba, Galanos und Rietschel aufgeklärt.^[225] Darauf folgte die Totalsynthese, die von der Arbeitsgruppe um T. Shiba als erste 1985 erfolgreich abgeschlossen werden konnte.^[226] Seitdem wurden verschiedene Synthesestrategien entwickelt und die Anzahl der verschiedenen Lipid-A-Strukturen stetig erweitert. Ziel der folgenden Synthese war es, eine Syntheseroute zu entwickeln, die es gestattet, unterschiedliche Lipid-A-Strukturen mit natürlicher oder unnatürlicher Art zu synthetisieren. Dazu mussten die Schutzgruppen so gewählt werden, dass sie orthogonal zueinander stabil sind. Dies erfordert einen erheblich längeren Syntheseweg, hat jedoch den Vorteil, dass verschiedene Produkte dargestellt werden können. Der Aufbau des Lipid A und seines Derivates erfolgt nach einer konvergenten Synthesestrategie (Schema 29).

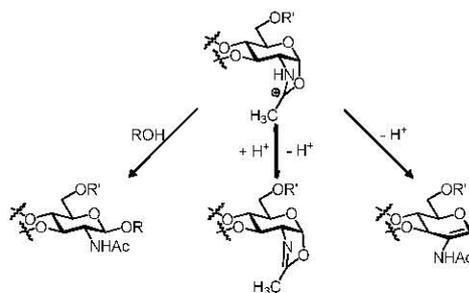


Schema 29: Die Retrosynthese des MPL-A und dem spacergebundenen Derivat.

Dabei werden zuerst die Fettsäuren und aus D-Glucose die orthogonal blockierten Monosaccharid-Bausteine synthetisiert. Diese werden danach in die Lipid-tragenden Monosaccharide umgewandelt, die dann in Glycosyldonoren und Glycosylakzeptoren

überführt werden. Nach der anschließenden Glycosylierungsreaktion wird die Amin-Schutzgruppe abgespalten und mit dem zweiten Fettsäurebaustein zum Amid umgesetzt. Es erfolgt die schrittweise Deblockierung zum amphiphilen Adjuvans-Baustein oder die Abspaltung der *tert*-Butylgruppe unter sehr milden Bedingungen. So wird schließlich der in der Glycopeptid-Festphasensynthese einsetzbare Baustein erhalten. Sämtliche im Laufe der Synthesen erforderlichen Schutzgruppenoperationen sind in Schema 29 aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Bei der Synthesepanung komplexer Moleküle spielt die Wahl der orthogonal stabilen temporären Schutzgruppen eine grundlegende Rolle. Die in den Kohlenhydratstrukturen vorhandenen Hydroxylgruppen müssen durch unterschiedliche Schutzgruppen so blockiert werden, dass eine Differenzierung im Polyalkohol möglich ist. Die Differenzierung kann wegen der unterschiedlichen Reaktivitäten der einzelnen Hydroxylfunktionen gelingen und durch die strategische Wahl der Schutzgruppen ausgenutzt werden. Der am Ende vorliegende vollgeschützte Baustein sollte in wenigen Reaktionen von seinen unterschiedlichen Schutzgruppen befreit werden, um möglichst geringe Ausbeuteverluste zu erleiden. Die in der Kohlenhydratchemie am häufigsten verwendeten Schutzgruppen für die Hydroxylfunktionen sind Acetate und Benzylether, die auch hier zum Einsatz kommen. Acetylgruppen lassen sich wie bereits beschrieben bei einem pH-Wert von 8.5 unter *Zemplén*-Bedingungen^[123] entfernen und erhöhen gleichzeitig die Stabilität der glycosidischen Bindungen gegenüber dem Angriff von Säuren,^[227] was im Hinblick auf die Spaltung der temporären Schutzgruppen in der Glycopeptidchemie wichtig ist. Da diese Saccharidbindungen durch Säuren, insbesondere Trifluoressigsäure, gespalten werden, was möglichst ausgeschlossen werden muss, sind Acetylschutzgruppen sehr geeignet. Demgegenüber haben Benzylether den Vorteil, mittels katalytischer Hydrierung gespalten werden zu können.^[131] Sie erhöhen die Reaktivität der Glycosyldonoren im Vergleich zu den entsprechenden acylgeschützten Bausteinen. Für die anomere Hydroxylgruppe im Glucosaminbaustein muss die Schutzgruppe über weite Strecken der Synthese unter den verschiedensten Bedingungen stabil sein. Nach erfolgreicher Synthese soll sie sich jedoch selektiv abspalten lassen, sodass die Wahl auf einen Silylether, genauer gesagt auf die *tert*-Butyldiphenylsilyl (TBDPS) Schutzgruppe, fiel.^[228-230] Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie unter einer Vielzahl unterschiedlichster Reaktionsbedingungen, die während der Saccharidsynthese nötig sind, wie den Schutzgruppenmanipulationen und Glycosylierungsbedingungen, nicht angegriffen wird und auf milde Weise in Gegenwart weiterer funktioneller Gruppen selektiv gespalten werden kann. Zur stereoselektiven Produktbildung bei Glycosylierungsreaktionen ist der Nachbargruppeneffekt in der 2-Position des Glycosyldonors befindlichen

Schutzgruppen zu beachten. Da im vorliegenden Fall das β -Anomer das gewünschte Produkt darstellt, fällt die Wahl auf eine Schutzgruppe, die bei anomerer Aktivierung einen Nachbargruppeneffekt ausübt und somit die Entstehung des 1,2-*trans*-konfigurierten Glycosids nach sich zieht. Die im Endprodukt vorkommende Acetamidofunktion zeigt zwar eine starke Nachbargruppenaktivität und sollte über ein intermediär gebildetes Oxazoliniumion die gewünschte Stereoselektivität hervorrufen, wurde jedoch wegen sterischer Gründe des sperrigen Restes erst später eingeführt. Des Weiteren erwies sie sich in Glycosylierungsreaktionen bei Glucose und Galactose als ungeeignet.^[231] Die Gründe hierfür sind in der großen Stabilität der Oxazolinstruktur zu finden, die durch die anomere Aktivierung des Glucosaminyldonors unter nachfolgender Abstraktion eines Protons gebildet wird (Schema 30). Als Konkurrenzreaktion zur reversiblen Oxazolinbildung kann es außerdem zur irreversiblen Bildung eines Glycals kommen.



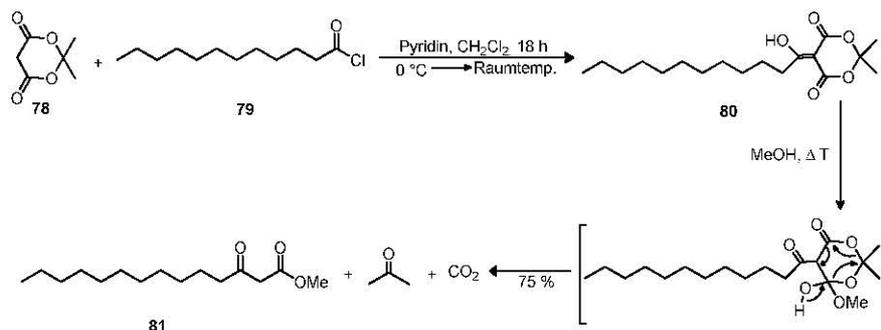
Schema 30: Auftretende Konkurrenzreaktionen von Glucosaminyldonoren nach anomerer Aktivierung.^[231]

Trotz der Reversibilität bedarf es im Allgemeinen drastischer Bedingungen, wie ein stark saures Reaktionsmedium und einer erhöhten Temperatur, um die Oxazolin-Bildung umzukehren und in Richtung des gewünschten Glycosids zu lenken. Das Problem kann jedoch durch die Verwendung der 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl(Troc)-Gruppe^[232] als Aminoschutzgruppe umgangen werden. Die Schutzgruppe zeichnet sich wie die *N*-Acetylschutzgruppe durch ihren Nachbargruppeneffekt aus, hat jedoch den Vorteil, dass der Glucosaminyldonor nicht einen Reaktivitätsverlust durch Oxazolinbildung erleidet.^[93, 233-234] Das gebildete Carbamat lässt sich unter relativ milden Bedingungen in Gegenwart einer Vielzahl anderer Schutzgruppen selektiv spalten. Alternativ kann auch die Fmoc-Schutzgruppe^[235] eingesetzt werden. Sie lässt sich ebenfalls unter sehr milden Bedingungen spalten, ist jedoch nicht basenstabil. Die Überführung der Aminofunktion in ein Phthalimid kam aufgrund der Esterspaltung im Lipidteil in dem sich anschließenden Deblockierungsschritt nicht in Betracht.^[131]

3.4.6 Die Synthese der Fettsäuren

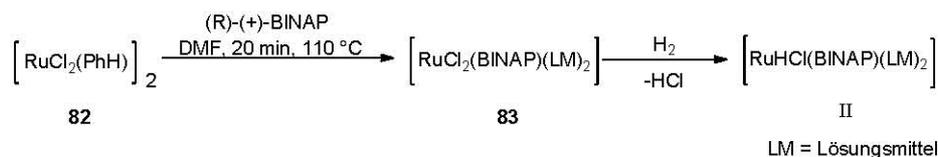
3.4.6.1 Die Synthese der (*R*)-3-Benzoyloxytetradecansäure

Die Synthese der beiden Fettsäure-Bausteine, sowohl die benzylethergeschützte als auch die mit Dodecansäure acylierte Fettsäure, gehen beide von Laurinsäurechlorid aus.^[236] Zunächst wird Meldrumsäure mit Laurinsäurechlorid in der Anwesenheit von Pyridin acetyliert (Schema 31).



Schema 31: Darstellung des β -Ketocarbonsäureesters **81**.

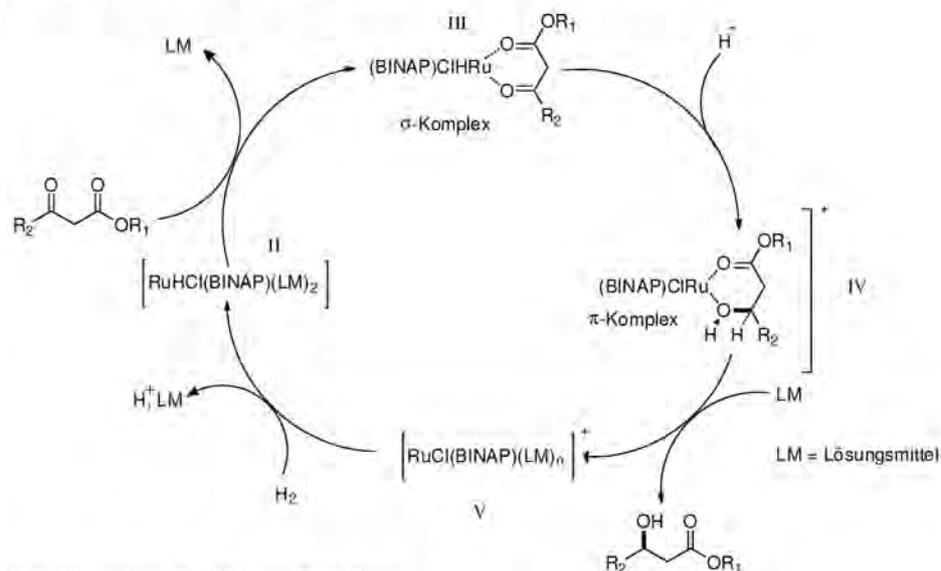
Meldrumsäure reagiert schon in Abwesenheit von starken Basen mit Elektrophilen wie Aldehyden aufgrund ihrer hohen CH-Acidität ($pK_s = 4.97$).^[236] Die gebildete acetylierte Meldrumsäure **80** kann als stabiles Zwischenprodukt in fast quantitativer Ausbeute isoliert werden. Die Umsetzung von **80** in siedendem Methanol liefert unter dem nucleophilen Angriff von Methanol und anschließender Abspaltung von Kohlendioxid und Aceton das gewünschte Produkt. Nach Destillation im Hochvakuum wird der β -Ketocarbonsäureester **81** in einer Ausbeute von 75 % isoliert. Der erhaltene β -Ketocarbonsäureester **81** muss anschließend stereoselektiv zum (*R*)-3-Hydroxyester reduziert werden. Die stereoselektive Reduktion wird nach *Noyori* mit chiralen Ruthenium-BINAP-Komplexen in der homogenen Phase erreicht.^[237] Die käuflich erworbenen Katalysatoren zeigten, obwohl sie neu und versiegelt waren, keinerlei katalytische Aktivität. Dieses Problem konnte durch die Synthese des Katalysators kurz vor der Hydrierung umgangen werden. Dazu wird der $[\text{RuCl}_2(\text{PhH})]_2$ -Komplex mit (*R*)-(+)-BINAP in entgastem *N,N*-Dimethylformamid 20 Minuten auf 110 °C erhitzt (Schema 32).



Schema 32: Die Darstellung der aktiven Katalysatorspezies.

Wichtig war es, unter Schutzgas zu arbeiten, da sich ansonsten der rote Katalysatorkomplex leicht verfärbte. Als katalytisch aktive Spezies wirkt 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl-komplexiertes Rutheniumchloridhydrid, das sich *in situ* durch Einwirkung von

Wasserstoff aus dem Dichlor-Komplex **83** bildet. Der Mechanismus der asymmetrischen Reduktion von β -Ketoestern ist in Schema 33 wiedergegeben.^[238]



Schema 33: Katalysezyklus der Noyori-Reduktion.

Die Hydrierung startet vermutlich mit einem Ru^{II} -Monohydrid **II**, das durch die Heterolyse eines Wasserstoffmoleküls mit Rutheniumdichlorid hervorgeht. Das Rutheniumhydrid **II** bildet mit dem Substrat reversibel den Chelatkomplex **III**, der auch als σ -Komplex bezeichnet wird. Die Protonierung des Sauerstoffs der Ketofunktion überführt den σ -Komplex in den π -Komplex und erhöht zugleich die Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffatoms, wodurch der intramolekulare Hydridtransfer erleichtert wird. Das chirale Produkt wird aus dem entstandenen Hydroxyesterkomplex **IV** durch ein Lösungsmittelmolekül verdrängt und der resultierende kationische Rutheniumkomplex **V** reagiert unter Aufnahme eines Wasserstoffmoleküls zu **II** zurück, wodurch der Katalysekreislauf geschlossen wird. Die Verwendung eines (*R*)-BINAP-Rutheniumkomplexes liefert das (*R*)-konfigurierte Produkt in $>99\%$ ee. Die in Abbildung 22 wiedergegebenen diastereomeren Übergangszustände TS_R und TS_S machen die Bevorzugung der (*R*)-Konfiguration beim Übertragen des Hydrids verständlich.^[238-239]

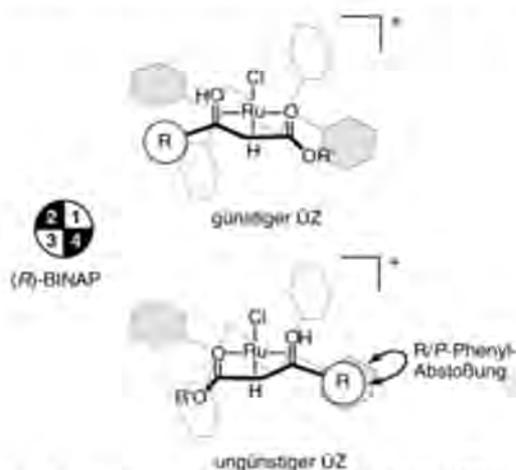
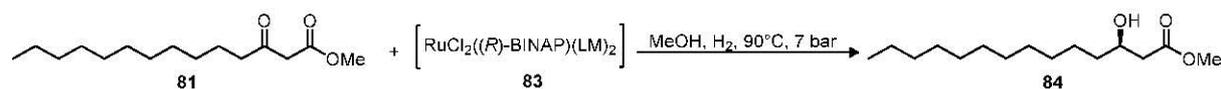


Abbildung 22: Übergangszustände des enantiodeterminierenden Schritts.^[239]

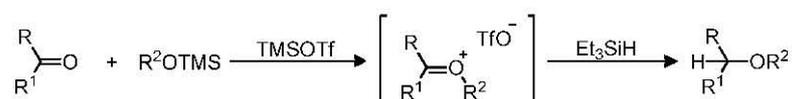
Aus der C_2 -Symmetrie des (*R*)-BINAP-Liganden resultiert ein chirales Rückgrat mit einem in λ -Konformation ausgebildeten siebengliedrigen Chelatring am zentralen Ru^{II} . Im Übergangszustand TS_R , der das (*R*)-konfigurierte Produkt liefert, ist der Ketoester so an das chirale Templat gebunden, dass die Wechselwirkungen mit den äquatorial angeordneten Phenylringen des Liganden gering ist, während im diastereomeren Übergangszustand TS_S eine signifikante Wechselwirkung zwischen dem Rest R des Substrats und den Phenylringen resultiert. Die Koordination des Carbonylsauerstoffatoms an das Rutheniumzentrum führt nicht nur zu einer Beschleunigung der Reaktion, sondern ermöglicht darüber hinaus die Ausbildung des definierten, stereodifferenzierenden Übergangszustands.

Auf diese Weise wird der β -Ketocarbonsäureester **81** mit dem (*R*)-BINAP-Rutheniumkomplex **83** in Methanol im Autoklaven bei 90 °C und 7 bar Wasserstoffatmosphäre hydriert (Schema 34). Nach flashchromatographischer Reinigung kann der Alkohol in einer Ausbeute von 95 % isoliert werden.



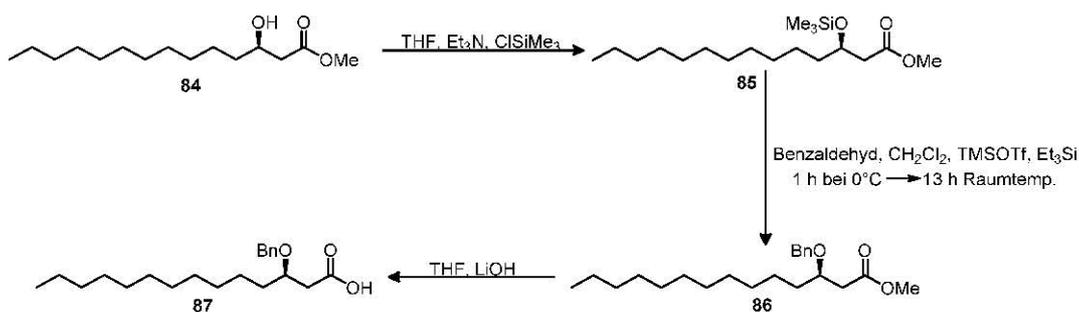
Schema 34: Noyori-Reduktion des Ketocarbonsäureesters **81**.

Zur Vermeidung von Nebenreaktionen muss die erhaltene β -Hydroxygruppe **84** anschließend als Benzylether blockiert werden. Versucht man den Alkohol **84** mit Benzylbromid in der Anwesenheit einer Base, wie Kaliumhydroxid, Bariumoxid, Bariumhydroxid, Natriumhydrid oder Silberoxid zu verethern, so tritt Eliminierung zu (*E*)-Tetradec-2-ensäure oder deren Methylester ein.^[240] Aus letzterem bildet sich durch eine retro-Aldol-Reaktion Dodecanal. Das von *Nishizawa et al.* entwickelte Verfahren erlaubt die selektive Schützung einer Hydroxylgruppe in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer CH-aciden Verbindung, in der es zu einer reduktiven Veretherung einer Carbonylverbindung mit einem Alkoxytrimethylsilan kommt.^[241-242] Dabei bildet sich, katalysiert durch Trimethylsilyltriflat, das Oxoniumion-Intermediat, welches anschließend durch Trialkylsilan-vermittelte Reduktion in den Ether überführt wird (Schema 35).



Schema 35: Alternative Methode zur Darstellung von Ethern über reduktive Veretherung.

Daher wird, um den β -Hydroxyalkohol **84** Benzylether zu schützen, die Hydroxygruppe zunächst mit Chlorotrimethylsilan in den Silylether **85** in einer Ausbeute von 99 % überführt (Schema 36). Dieser wird anschließend mit Benzaldehyd, nach *Nishizawa*^[241-242] in Anwesenheit von katalytischem Trimethylsilyltriflat in das „Acetal“ überführt, welches anschließend mit Triethylsilan zum Benzylether **86** reduziert wird.^[243]

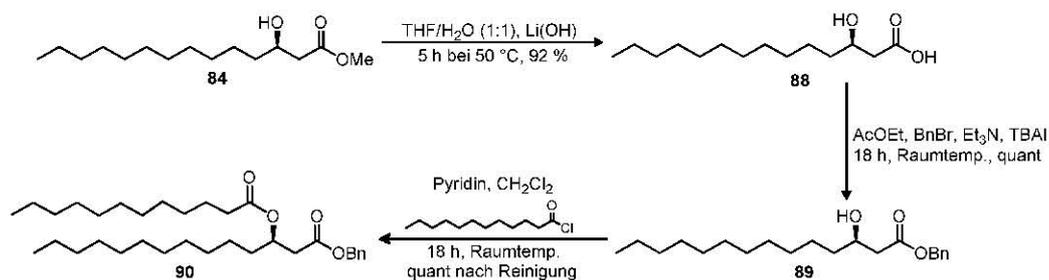


Schema 36: Die Darstellung von (R)-3-Benzyloxytetradecansäure 87.

Das erhaltene Produkt wird ausreichend rein in quantitativer Ausbeute erhalten. In der letzten Stufe wird der Methylester **86** in wässriger 1 N Lithiumhydroxidlösung in Tetrahydrofuran 6.5 h bei ca. 50°C verseift. Für die Isolierung des Produktes wurde mit 1 N Salzsäure auf pH 2.5 angesäuert. Die Säure **87** konnte nach chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 81 % ausgehend von Verbindung **84** isoliert werden.

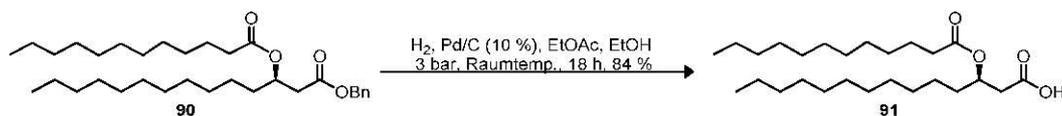
3.4.6.2 Die Synthese von (R)-3-Dodecanoyloxytetradecansäure

Ausgangsverbindung für die Synthese von (R)-3-Dodecanoyloxytetradecansäure ist der β -Hydroxycarbonsäuremethylester **84**. Zuerst wird der Methylester **84** mit Lithiumhydroxid in Wasser/Tetrahydrofuran (1:1) verseift, da eine spätere Deblockierung nicht möglich ist. Das Lithiumsalz wird anschließend mit Salzsäure vorsichtig auf einen pH-Wert von 2.0 eingestellt. Das Rohprodukt **88** wird durch Extraktion mit Dichlormethan mit einer Rohausbeute von 92 % gewonnen (Schema 37). Anschließend wird die Säure **88** mit Benzylbromid, Triethylamin und Tetrabutylammoniumiodid versetzt, wobei Benzylbromid in einer *Finkelstein*-Reaktion mit Tetrabutylammoniumiodid *in situ* das reaktivere Benzyljodid bildet.^[244]



Schema 37: Die Darstellung von (R)-3-Dodecanoyloxytetradecansäure 90.

Dieses reagiert mit dem Carboxylatanion quantitativ zum Benzylester **89**. Die freie Hydroxygruppe von **89** wird mit Dodecanoylchlorid zum Diester **90** in quantitativer Ausbeute acyliert. Um die Fettsäure an das freie Amin des MPL-A ankuppeln zu können, wird der Benzylester hydrogenolytisch gespalten (Schema 38).



*Schema 38: Die Deblockierung des Benzylesters **90**.*

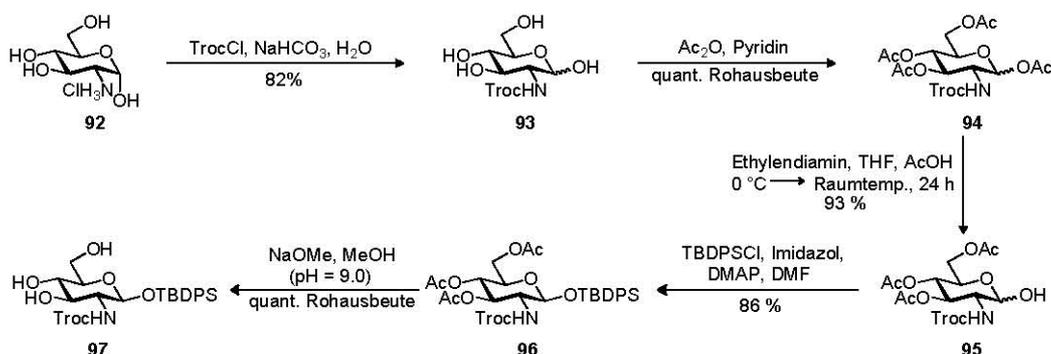
Dazu hydriert man den Diester **90** über Palladium auf Aktivkohle in Ethylacetat/Ethanol (1:1) 18 h bei 3 bar und Raumtemperatur. Die freie Säure **91** konnte nach chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 84 % isoliert werden.

3.4.7 Die Glucosamin-Bausteine

3.4.7.1 Die Synthese des Glucosaminondors

Die Synthesen der Glucosamin-Bausteine, sowohl die der Glucosaminondoren als auch die der beiden Akzeptoren, des in der anomeren Position TBDPS-geschützten Glucosaminderivats und des mit dem Triethylglycolspacer verknüpften Glucosaminderivats, gehen von α -D-Glucosamin-Hydrochlorid (**92**) aus.

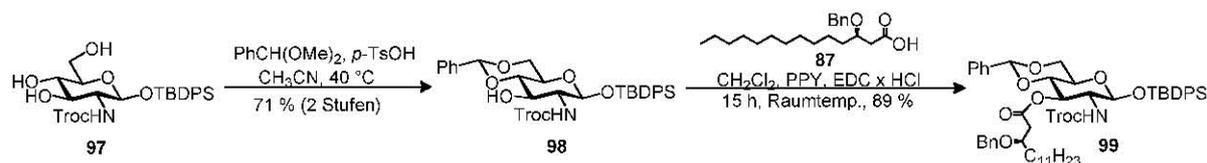
Für die Synthese der Silylglucoside wird die Aminofunktion von **92** als Carbamat durch die Umsetzung α -D-Glucosamin-Hydrochlorid mit Chlorameisensäure-2,2,2-trichlorethylester (2,2,2-Trichlorethoxycarbonylchlorid, TrocCl) in einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung blockiert (Schema 39).^[245]



*Schema 39: Die Synthese des TBDPS-geschützten Glucosamin-Bausteins **97**.*

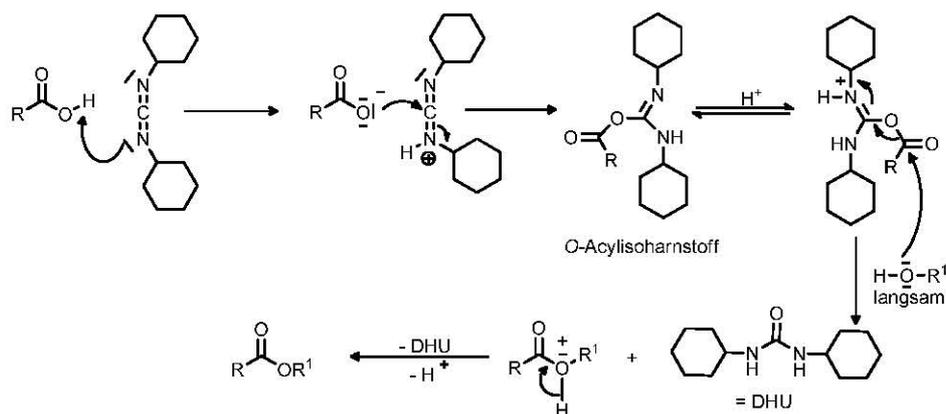
Das Troc-geschützte Glucosaminderivat **93**, das man in einer Ausbeute von 82 % erhält, wird im Anschluss acetyliert^[245] und das resultierende Produkt **94** als Anomerengemisch mit einem Verhältnis von α -/ β -Anomer von 3:2 (laut NMR-Spektroskopie) isoliert. Die selektive Abspaltung der anomeren Acetylgruppe kann sowohl mit Hydraziniumacetat^[245-246] als auch mit Ethylendiaminacetat^[247] erreicht werden. In beiden Fällen wird der reduzierende Zucker **95** erhalten, allerdings ist bei Deblockierung mit Hydraziniumacetat die Ausbeute geringer. Die Hauptursache für die nur mäßige Ausbeute ist vermutlich in der Tatsache zu suchen, dass es neben der Entfernung der anomeren Schutzgruppe zur Spaltung weiterer Acetatfunktionen

kommt.^[141] Daher wird auf die von *Zhang* entwickelte Methode, in der das Acetat des Ethylendiamin zum Einsatz kommt, zurückgegriffen, welche in der Regel langsamer verläuft als die Hydrazinolyse und somit eine höhere Selektivität zeigen sollte.^[247] Durch Behandlung von **94** mit Ethylendiamin/Essigsäure konnte das gewünschte Produkt **95** in 93%iger Ausbeute gewonnen und ohne Reinigung mit *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPSCI) und Imidazol in Gegenwart einer katalytischen Menge an DMAP^[248] umgesetzt werden.^[228] Aufgrund des sterischen Anspruches des TBDPS-Restes, in direkter Nachbarschaft zur Troc-Gruppe erfordert die Umsetzung zum Silylglucosid **96** eine Reaktionszeit von fünf Tagen. Nach chromatographischer Reinigung erhält man es in 86 %iger Ausbeute. Die lange Reaktionszeit sowie die sterische Hinderung erklären somit auch warum ausschließlich das β -Anomer gebildet wird. Den Effekt der geringeren Reaktivität macht man sich auch oft zunutze, um die leichter zugängliche Hydroxylgruppe in der 6-Position eines mehrfach ungeschützten Zuckers in Anwesenheit freier sekundärer Hydroxylgruppen selektiv als TBDPS-Ether zu blockieren.^[228] Im Anschluss zur Silylierung erfolgt die Deacetylierung mit Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 9.0 nach *Zemplén*.^[123] Entgegen den Beobachtungen in analogen Verbindungen^[141] konnte keine Basenlabilität der Aminoschutzgruppe^[131] bei einem pH-Wert von 9.0 beobachtet werden. Das Produkt **97** wird in quantitativer Rohausbeute erhalten und ohne vorherige Reinigung mit Benzaldehydimethylacetal und katalytischen Mengen an 4-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (*p*-TsOH) bei einem pH-Wert von 3.5 umgesetzt.^[135] Die Bildung des Benzylidenacetals bedarf einer Temperatur von 40 °C, um das schwer lösliche Glucosaminderivat **97** in Lösung zu halten.^[141] Das Produkt **98** wurde nach chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 71 % erhalten (Schema 40).^[131] Aufgrund der größeren Stabilität des sechsgliedrigen 4,6-Acetal gegenüber dem fünfgliedrigen Acetal, wie es bei einer Reaktion der Hydroxylgruppen in 3- und 4-Stellung gebildet werden würde, erhält man ausschließlich das gewünschte Produkt **98**



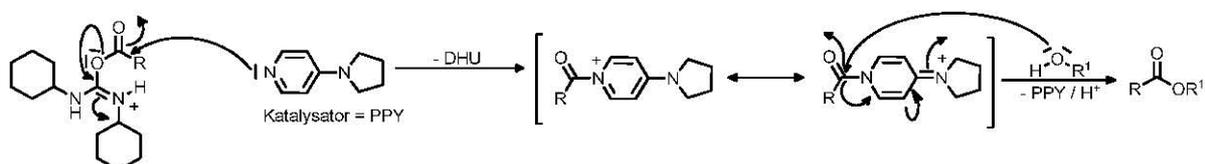
Schema 40: Die Synthese des Glucosaminderivates **99**.

Die freie Hydroxygruppe in der 3-Position wird anschließend mit der Carbonsäure **87** unter Aktivierung mit EDC-Hydrochlorid in den Ester **99** überführt. Dabei reagiert nach *Steglich*^[249] die Carbonsäure mit dem Carbodiimid, z. B. DCC, zu einem *O*-Acylisoharnstoff (Schema 41). Greift der Alkohol den *O*-Acylisoharnstoff an, bildet sich der stabile Dicyclohexylharnstoff (DHU) und ein Ester.



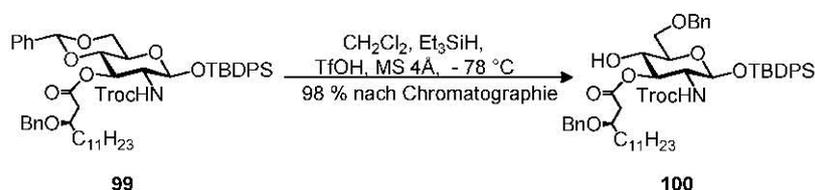
Schema 41: Reaktionsmechanismus zur Veresterung einer Säure und Alkohols durch ein Carbodiimid.

Da der Angriff des Alkohols langsam verläuft, wird die Bildung des Esters oft durch Zugabe von DMAP oder 4-Pyrrolidinpyridin (PPY) als Katalysator beschleunigt und die Bildung eines *N*-Acylharnstoffes unterdrückt (Schema 42).^[133]



Schema 42: Reaktionsmechanismus der Veresterung nach Steglich.

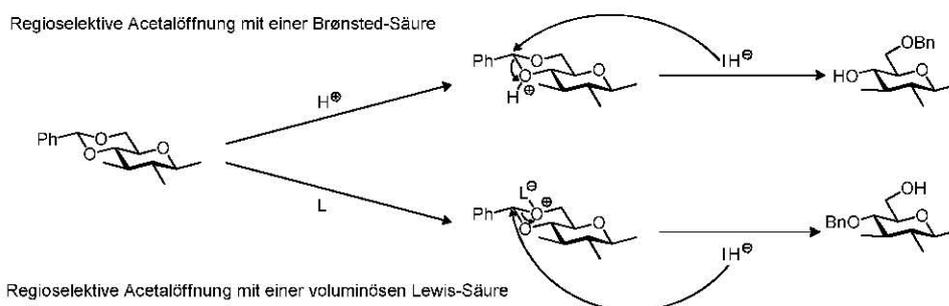
Für die Kupplung der Fettsäure **87** wurden verschiedene Kupplungsreagenzien getestet. Dabei erwies sich 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC_xHCl) am vorteilhaftesten was die Handhabung während der Synthese und die Isolierung, Reinigung und die Ausbeute des Produktes betrifft (Schema 40). Vorteilhaft ist die einfache Aufarbeitungsmöglichkeit des Ansatzes, da überschüssiges Kupplungsreagenz und sein Harnstoffderivat mit Wasser ausgewaschen werden können. Zur Beschleunigung der Reaktion nach *Steglich* kam 4-Pyrrolidinpyridin (PPY) als Acylierungskatalysator zum Einsatz.^[133] Das Produkt **99** wurde nach chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 89 % isoliert. Um das Monosaccharid **99** weiter umzusetzen, wurde das Benzylidenacetal regioselektiv zum primären Benzylether geöffnet (Schema 43).



Schema 43: Die Regioselektive Öffnung des Benzylidenacetals zum primären Benzylether **100**.

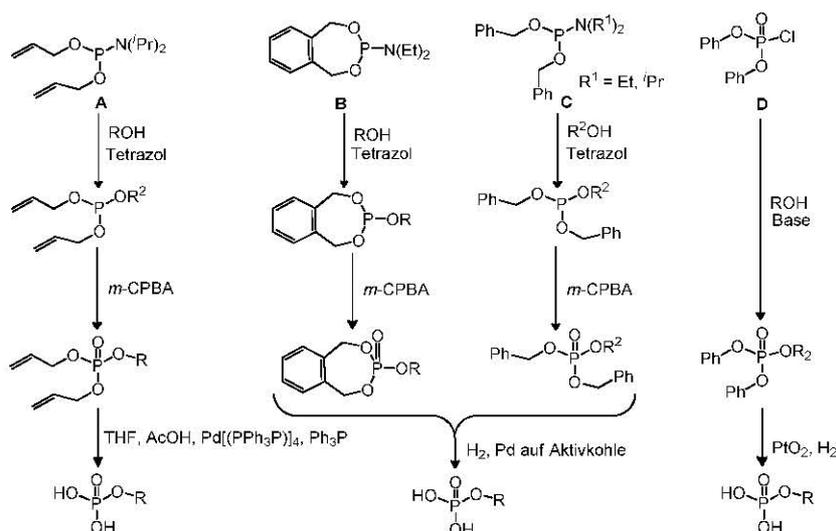
Unter den verschiedenen Verfahren^[250-252] erwies sich die Methode von *DeNinno et al.*,^[251] in der Variante von *Sakagami et al.*,^[252] bei der Trifluormethansulfonsäure und Triethylsilan Verwendung finden, am ertragreichsten. Im Gegensatz zur Umsetzung einer gesättigten Lösung von Chlorwasserstoff in Diethylether und Natriumcyanoborhydrid als Reduktionsmittel^[250] hat die Methode von *Sakagami* den Vorteil, dass der Reaktionsverlauf

bei einer Temperatur von $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht so streng kontrolliert werden muss, da sich das Edukt **99** nicht zersetzt. Auch entfallen die Probleme, die bei der Abtrennung von Borverunreinigungen auftreten. Zu erwähnen ist, dass zur Vervollständigung der Umsetzung nach zwei Stunden weitere 1.5 Äquiv. Trifluormethansulfonsäure zugegeben wurden. Der in der 4-Position ungeschützte Glucosaminyl-Baustein wird nach chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 98 % erhalten. Verantwortlich für die Regioselektivität ist die unterschiedliche Basizität der beiden Sauerstoffatome. Beim Einsatz einer *Brønsted*-Säure wird das basischere, in der 4-Position des Kohlenhydrats befindliche Sauerstoffatom protoniert, sodass die anschließende Hydridübertragung durch das Reduktionsmittel zum entsprechenden 6-*O*-Benzylether führt (Schema 44).



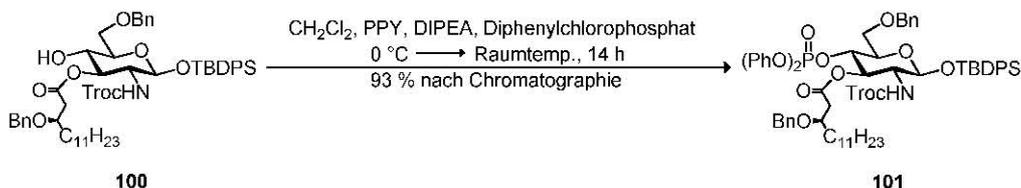
Schema 44: Mechanismus der regioselektiven Benzylidenacetalöffnung.

Während eine *Brønsted*-Säure das basischere Sauerstoffatom bevorzugt, greift eine voluminöse *Lewis*-Säure, wie Aluminiumtrichlorid, dagegen am sterisch weniger gehinderten Sauerstoffatom in der 6-Position an, worauf die Hydridübertragung durch Lithiumaluminiumhydrid schließlich zur Bildung des sekundären Benzylethers führt.^[253] Die Phosphorylierung der MPL-A bedarf eines geeigneten Phosphat-Reagenzes, welches Schutzgruppen trägt, die selektiv neben den anderen Schutzgruppen abspaltbar sind. Die Anzahl der in der Literatur verwendeten Reagenzien zur Synthese von phosphoryliertem MPL-A ist beschränkt. Diese sind z. B. Bis(allyloxy)-(diisopropylamino)phosphan,^[254-255] *N,N*-Diethyl-1,5-dihydro-2,3,4-benzodioxaphosphopin-3-amin^[256-257] und Dibenzyl-*N,N*-diethylphosphoramidit, die bereits durch die Zugabe von Tetrazol aktiviert werden (Schema 45). Die Zugabe eines Alkohols und Tetrazol führen unter Substitution der Aminogruppe zum Phosphit, das mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA) zum Phosphorsäureester oxidiert wird. Während das Allyl-geschützte Phosphat durch einen Palladium(0)-katalysierten Allyltransfer auf ein adäquates Nucleophil über eine π -Allyl-Palladium-Spezies erfolgreich abgespalten werden kann,^[254-255, 258] werden die beiden Benzylgruppen hydrogenolytisch abgelöst,^[256, 259] was jedoch bei Peptid-Konjugaten zu Adsorptionsproblemen führen kann.



Scheme 45: Phosphorylierungsreagenzien in der MPL-A Synthese.

Als weiteres Phosphat-Reagenz wurde das erstmals von *Szabó* und später von der Arbeitsgruppe um *Kusumoto* verwendete Diphenylchlorophosphat eingesetzt, dessen Phenyl-Schutzgruppen nicht an Palladium auf Aktivkohle abgespalten werden.^[226, 260-261] Die Reaktion der freien Hydroxygruppe von **100** mit dem Diphenylchlorophosphat wurde unter *Steglich*-Bedingungen^[133] mit 4-Pyrrolidinopyridin katalysiert (Schema 46).

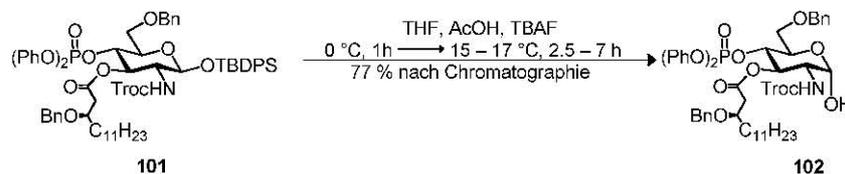


Scheme 46: Veresterung des Diphenylchlorophosphats unter *Steglich*-Bedingungen.

Die sich bildende Salzsäure wird mit *N,N'*-Diisopropylethylamin abgefangen. Der Phosphorsäureester **101** konnte nach chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 93 % isoliert werden. Die Säuresensibilität der Verbindung **101** zeigte sich während der Aufnahme von NMR-Spektren. So führte deuteriertes Chloroform, welches nicht durch basisches Aluminiumoxid entsäuert wurde, bereits zum vollständigen Verlust des Phosphorsäureesters. Hinweise auf die Instabilität gegenüber Säuren wurden von *Szabó* gegeben.^[260]

Um den orthogonal geschützten Baustein **101** als Glycosyldonor verwenden zu können, muss zunächst die anomere Silylgruppe **101** abgespalten werden. Dabei traten unvorhergesehene Probleme auf. Das Produkt konnte zwar unter den in der Literatur angegebenen Bedingungen isoliert werden,^[131, 230] jedoch waren die Ausbeuten niedrig und zahlreiche Nebenprodukte lagen vor. Die Umsetzung mit Eisen(III)-chlorid war sehr langsam. Nach 96 h war noch Edukt vorhanden. Selbst die Reaktion mit Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) erwies sich als problematisch und ergab eine Reihe von Nebenprodukten. Jedoch war diese im Vergleich zu den anderen Reagenzien am vielversprechendsten. Triebkraft der Reaktion ist die

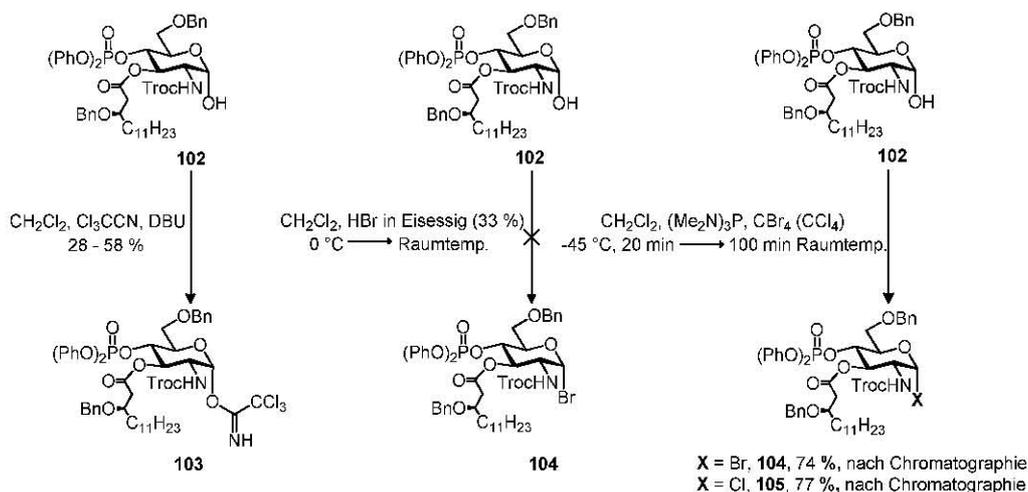
Ausbildung einer Silicium-Fluor-Bindung, welche energetisch gegenüber der Silicium-Sauerstoff-Bindung um 30 kcal/mol begünstigt ist.^[262] Am erfolgreichsten war die Reaktion mit 1.3 Äquiv. TBAF in Tetrahydrofuran (THF) unter Zusatz von 3.3 Äquiv. Essigsäure, um der Basizität des Fluorids entgegenzuwirken (Schema 47).



Schema 47: Die Selektive Deblockierung des Silyl glycosids **102**.

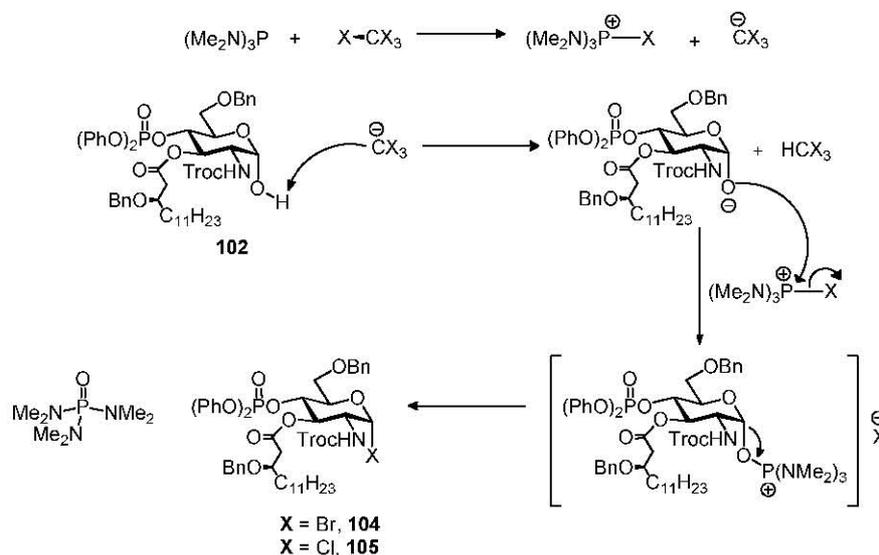
Einen deutlichen Einfluss hatte die Temperatur, die zwischen 15 – 17 °C gehalten werden sollte. Sobald sie höher war, traten Nebenprodukte auf. Bei niedrigeren Temperaturen war die Umsetzung unvollständig. Wurden die Bedingungen eingehalten, konnte das Produkt nach chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 77 % isoliert werden. Überraschenderweise wurde bei der Spaltung des Silylethers kein Anomerengemisch erhalten,^[141, 263] sondern ausschließlich das α -Anomer, was sich NMR-spektroskopisch anhand der kleinen Kopplungskonstante $^3J_{\text{H1,H2}}$ von 3.7 Hz sowie der Tieffeldverschiebung von H-1 (5.25 ppm) belegen ließ. Erstaunlicherweise ist gleichzeitig die Kopplung zur freien Hydroxygruppe sichtbar. Die Kopplungskonstante fällt mit der des Protons von H2 zusammen, sodass das Signal als Tripletts erscheint. Die Größenordnung der vicinalen Kopplung zur Hydroxylgruppe liegt im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Werten von 4 – 5 Hz.^[264]

Der Glucosebaustein **102** muss nun in einen geeigneten Donor überführt werden. Dabei sollen die zwei bewährten Glycosylierungsmethoden, das Trichloracetimidatverfahren nach *Schmidt*^[265-268] und eine modifizierte *Koenigs-Knorr* Glycosylierung,^[231] miteinander verglichen werden. Dazu wird der deblockierte Zucker **102** in das Trichloracetimidat **103**, das Bromid **104** und in das anomere Chlorid **105** überführt (Schema 48).



Schema 48: Die Synthesen der Galactosyldonoren **103**, **104** und **105**.

Die basenkatalysierte Umsetzung von **102** mit Trichloracetonitril^[266, 268] liefert das Trichloracetimidat **103** als α -Anomer,^[266] bereitet jedoch unvorhergesehene Probleme. Die Anwendung von DBU in absolutem Dichlormethan führt zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen und großen Schwankungen in der Ausbeute, die nach chromatographischer Reinigung zwischen 28 – 58 % liegt. Auch die Reaktion **102** mit einer 33%igen Bromwasserstoff-Lösung, wie von *Kusumoto et al.*^[261] bei einer ähnlichen Verbindung angewandt, ist nicht reproduzierbar. Zwar kann das Produkt nach zwei Stunden isoliert werden, jedoch ist der Grad der Zersetzung und die Anzahl der Nebenprodukte, wie von *Szabo* angedeutet hoch.^[260] Deshalb wurde **102** in einer *Appel*-Reaktion^[269] umgesetzt. Alternativ kann auch die modifizierte *Appel*-Reaktion mit Tris(dimethylamino)phosphin zum Einsatz kommen (Schema 49).



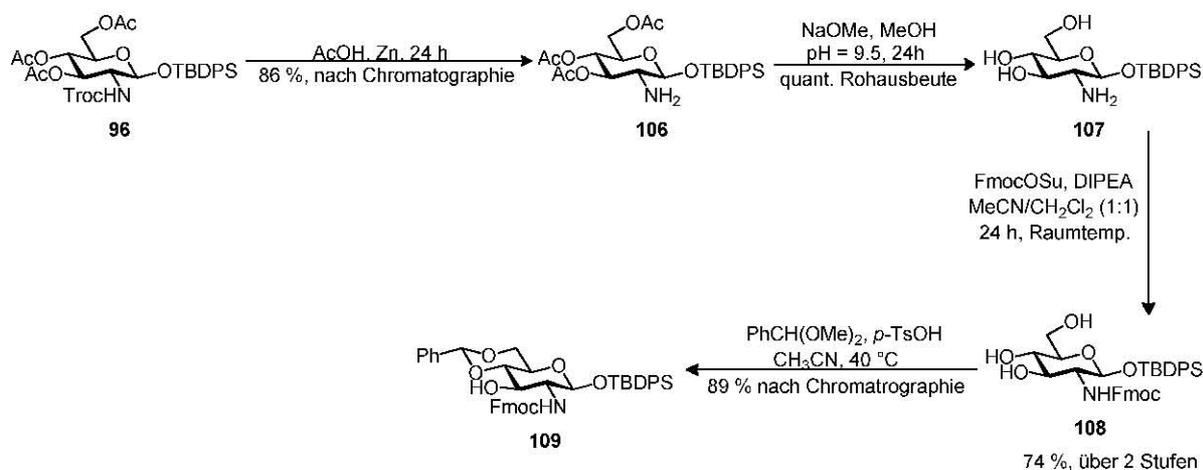
Schema 49: Mechanismus der modifizierten *Appel*-Reaktion zu den Glycosylhalogeniden **104**, **105**.

Triebkraft der *Appel*-Reaktion ist die Bildung des Tris(dimethylamino)phosphinoxids (Oxidation des Phosphor(III) zum Phosphor(V)). Es entsteht nach Aktivierung des Tris(dimethylamino)phosphin zum Chlorphosphoniumion und dessen Reaktion mit dem Alkoholat eine gute Abgangsgruppe. Der nucleophile Angriff des Halogenidanions am Oxophosphoniumion (Schema 49 rechts unten) führt zum Produkt. Die Umwandlung des reduzierenden Zuckers **102** in die Glycosylhalogenide **104** und **105** wird analog zur Darstellung eines Fucosehalogenids^[270] durchgeführt (Schema 48). Das Produkt konnte nach chromatographischer Reinigung in Ausbeuten oberhalb von 74 % isoliert werden. Wichtig ist eine zügige Chromatographie auf einer mit Triethylamin behandelten Säule. Das Vorliegen des α -Glycosylhalogenids wird NMR-spektroskopisch ($^3J_{\text{H1,H2}}$ von 3.6 Hz für **104** bzw. 3.7 Hz für **105**) belegt. Der Glucosamin-Donor **104** bzw. **105** kann so in insgesamt elf Stufen mit

einer Gesamtausbeute von 22 % hergestellt werden, was einer geometrischen Durchschnittsausbeute von 87 % pro Stufe entspricht.

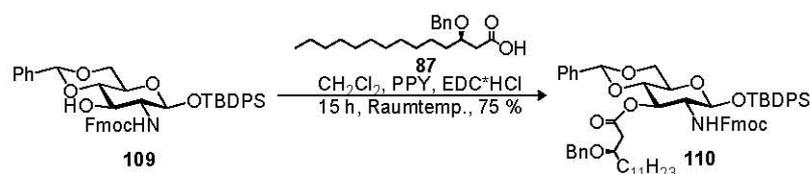
3.4.7.2 Die Synthese des Glucosaminakzeptor-Bausteins

Zur Synthese des Glycosylakzeptors geht man von dem bekannten Baustein **96** aus, von dem die Troc-Gruppe mit aktiviertem Zink in Essigsäure abgespalten wird.^[93] Das freie Amin **106** wird nach chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 86 % isoliert (Schema 50). Deacetylierung mit Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 9.5 nach *Zemplén*^[123] ergibt Verbindung **107**, die ohne Reinigung weiter umgesetzt wird.

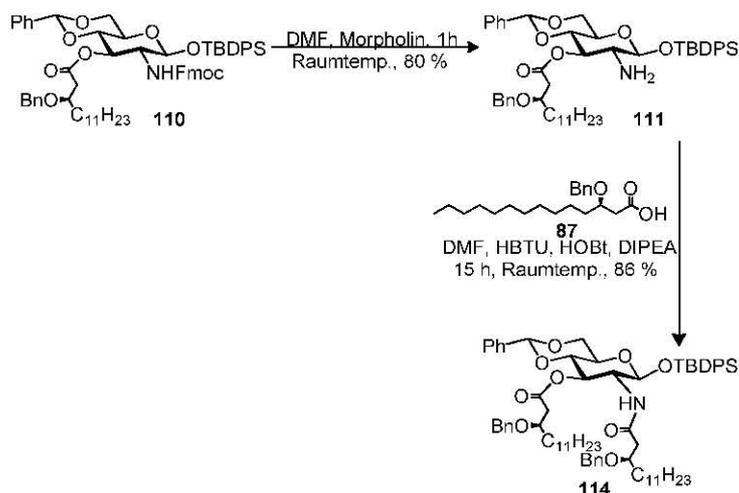


Schema 50: Die Darstellung zum Glucosamin-Akzeptor **109**.

Das Glucosamin **107** wird mit FmocOSu^[90] in das Carbamat **108** überführt, das nach chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 74 % isoliert wird. Durch säurekatalysierte Bildung des Benzylidenacetals mit Benzaldehyddimethylacetal^[135] gewinnt man den Glucosamin-Baustein **109** in einer Ausbeute von 89 % nach chromatographischer Reinigung. Die Acetalbildung kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden, da der Fmoc-geschützte Glucosamin-Baustein **108** im Gegensatz zu dem Baustein **97** eine höhere Löslichkeit in Acetonitril aufweist. Die freie 3-Hydroxylfunktion des Glucosaminderivates **109** wird anschließend durch Veresterung unter *Steglich*-Bedingungen in den Glucosamin-Baustein **110** überführt, der nach flashchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 75 % isoliert werden kann (Schema 51).

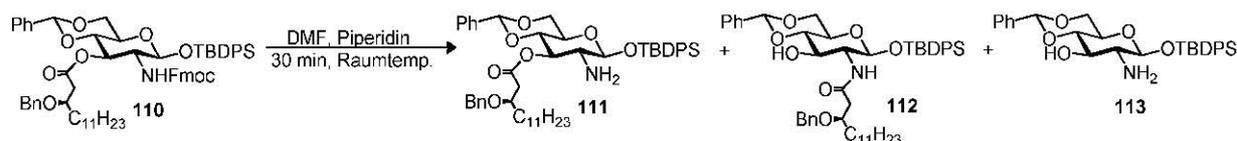


Schema 51: Die Synthese des Glucosamin-Akzeptorbausteins **110**.



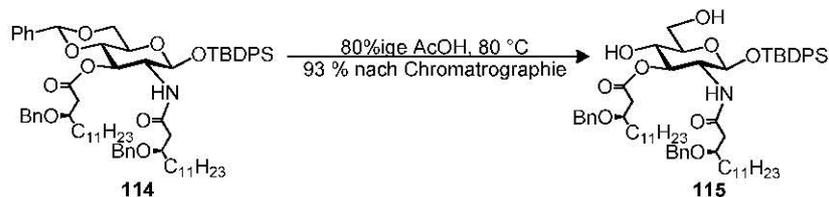
Schema 52: Die Synthese des Glucosamin-Akzeptorbausteins 114.

Zur Einführung der zweiten Fettsäure muss zuerst das Amin von der Fmoc-Schutzgruppe befreit werden. Anstelle von Piperidin^[271] wird Morpholin^[272] verwendet, da mit Piperidin in *N,N*-Dimethylformamid ein Produktgemisch erhalten wurde, das sich zwar chromatographisch trennen ließ, jedoch eine niedrige Ausbeute ergab (Schema 53).



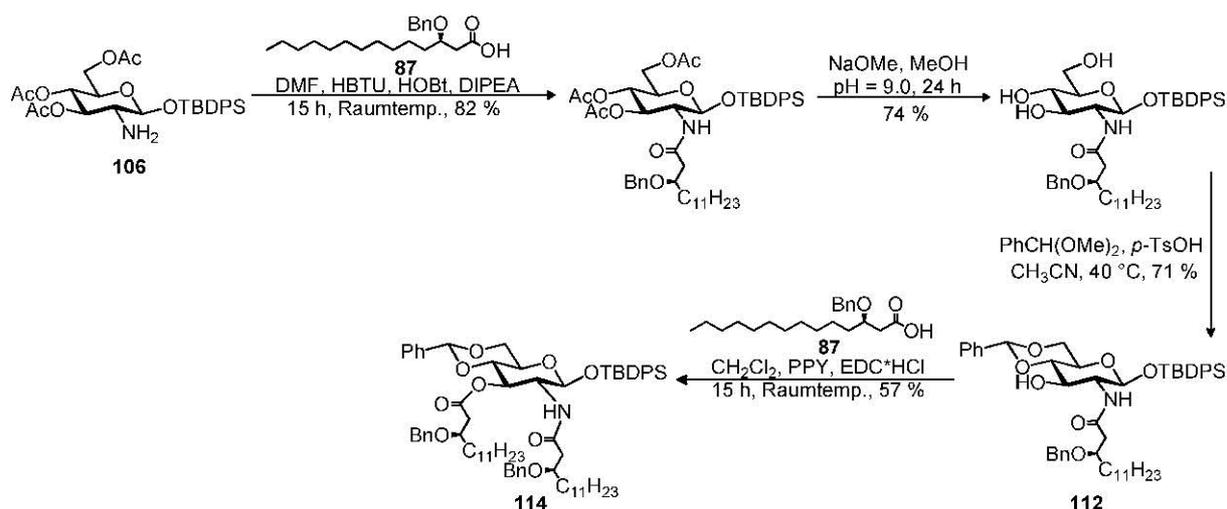
Schema 53: Die Deblockierung des Glucosaminbausteins 110 von der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin.

Zwar kann das Nebenprodukt **112** mit der Fettsäure **87** verestert werden, jedoch fällt die Ausbeute mit 56 % deutlich geringer aus als bei Veresterung des Edukts **109**. Die Umsetzung von **110** mit Morpholin in *N,N*-Dimethylformamid liefert das Produkt **111** in 80%iger Ausbeute nach chromatographischer Reinigung (Schema 52). Zusätzlich fallen 17 % Umacylierungsprodukt **112** an. Im letzten Schritt erfolgt die Benzylidenacetalspaltung in 80%iger Essigsäure bei 80 °C, wobei man den in 4- und 6-Stellung ungeschützten Baustein **115** nach Flashchromatographie in einer Ausbeute von 93 % erhält (Schema 54).



Schema 54: Spaltung des Benzylidenacetals zum Glycosylakzeptor 116.

Eine alternative Route verläuft über die Acylierung des Amins **106** mit der Fettsäure **87** (Schema 55). Die folgende Deacetylierung verläuft bei genauer Einhaltung des pH-Wertes mit Ausbeuten oberhalb von 70 %. Die anschließende Bildung des Benzylidenacetals und die darauf folgende Veresterung bleiben jedoch mit den Ausbeuten hinter den Erwartungen zurück, sodass diese Route nicht weiter verfolgt wird.

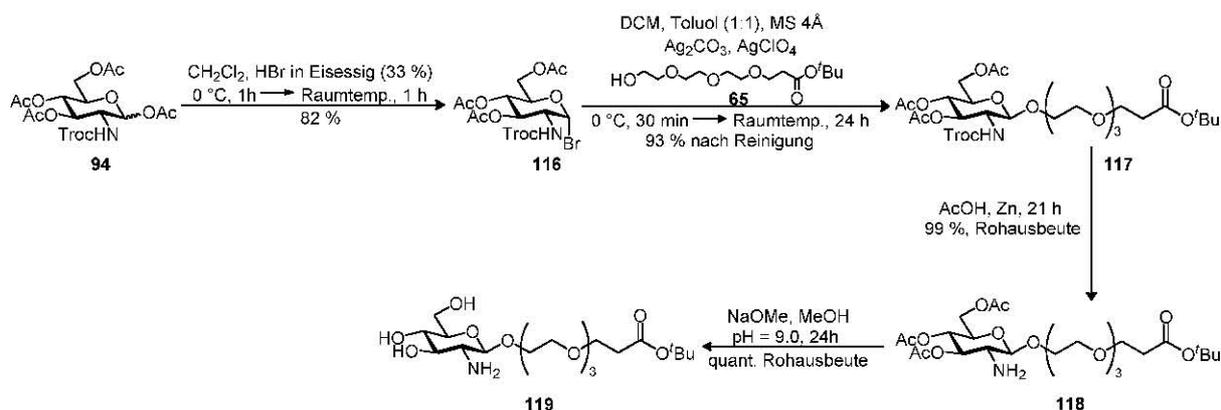


Schema 55: Alternative Route zur Darstellung des Glucosamin-Bausteins **114**.

Der Galactosylamin-Akzeptor **115** wurde aus Verbindung **96** in acht Stufen in einer Gesamtausbeute von 27 % hergestellt.

3.4.7.3 Die Synthese des spacergebundenen Glucosaminakzeptor-Bausteins

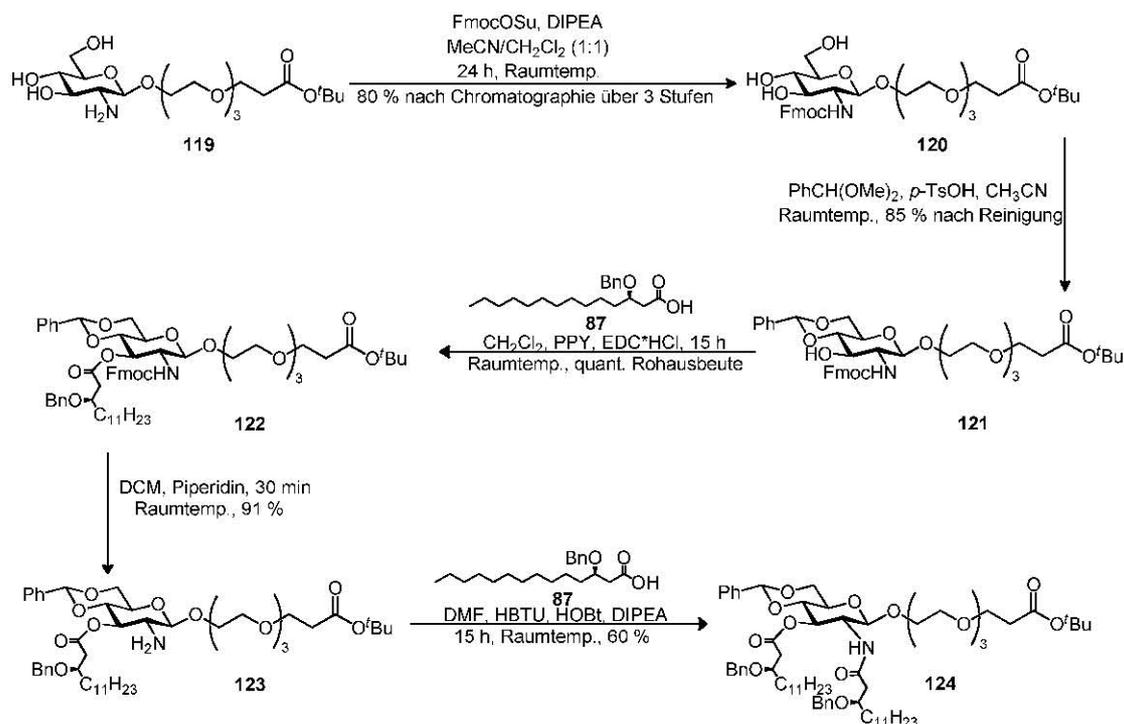
Die Synthese des spacergebundenen Glycosylakzeptors geht von dem bereits synthetisierten Baustein **94** aus. Zunächst wird das Glucosaminderivat **94** mit 33%igem Bromwasserstoff in Eisessig in das Glucosaminylbromid **116** überführt (Schema 56).^[261]



Schema 56: Die Synthese des spacergebundenen Glucosaminakzeptors **119**.

Das α -Anomer wird nach flashchromatographischer Reinigung in 82 % erhalten. Im Anschluss wird der Spacer **65** mit dem Glucosaminylbromid **116** nach *Paulsen und Hölck*^[99-100] in Gegenwart von Silbercarbonat und katalytischem Silberperchlorat glycosyliert. Die Nachbargruppenaktivität der Troc-Gruppe bewirkt die ausschließliche Bildung des β -Anomers, welches in einer Ausbeute von 93 % erhalten wird. Die β -glycosidische Bindung lässt sich $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch anhand der Kopplungskonstante $^3J_{\text{H1,H2}}$ von 8.6 Hz belegen. Von der glycosylierten Verbindung **117** wird mit aktiviertem Zink in Essigsäure die Troc-Gruppe abgespalten,^[261] dabei kann das Produkt **118** durch Ausschütteln mit Wasser von

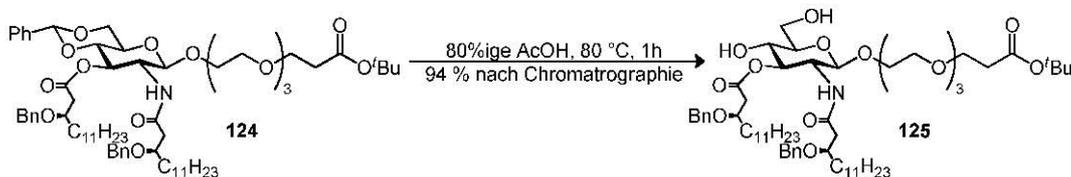
seinen Salzen befreit und in 99 % Ausbeute erhalten werden. Die Acetylgruppen des Glycosylamins **118** werden mit Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 9.5 nach *Zemplén*^[123] entfernt und das quantitative Rohprodukt **119** nach der Aufarbeitung der nächsten Stufe unterworfen. Die freie Aminogruppe von **119** wird anschließend mit FmocOSu^[90] zum Carbamat **120** umgesetzt (Schema 57). Das Produkt **120** wird säulenchromatographisch gereinigt und in einer Ausbeute von 80 % über drei Stufen erhalten.



Schema 57: Die Synthese des spacergebundenen Glucosaminakzeptors 124.

Wie beim Akzeptorbaustein **108** schließt sich die säurekatalysierte Bildung des Benzylidenacetals mit Benzaldehyddimethylacetal^[135] an, in der der Glucosamin-Baustein **121** in einer Ausbeute von 85 % nach chromatographischer Reinigung anfällt. Die freie 3-Hydroxylfunktion von **121** wird durch Veresterung unter *Steglich*-Bedingungen in den Glucosamin-Baustein **122** überführt. Im Gegensatz zum Baustein **110** kommt ein geringerer Überschuss an Fettsäure **87** (1.1 Äquiv.) zum Einsatz und das Produkt **122** wird nicht säulenchromatographisch gereinigt, sondern mit Wasser ausgeschüttelt. Von dem Rohprodukt **122** wurde mit Piperidin^[271] die Fmoc-Gruppe abgespalten. So konnte der deblockierte Glucosaminbaustein **123** nach Flashchromatographie in 91 %iger Ausbeute über zwei Stufen erhalten werden. Die zuvor beobachtete Acylgruppenwanderung, wie in Schema 53 dargestellt, konnte nicht nachgewiesen werden. Die Fettsäure **87** wird anschließend an das deblockierte Amin **123** durch spezielle Kupplungsreagenzien angeknüpft. Für die Bildung des Aktivesters kommt hierzu das Uroniumsalz HBTU^[273-274] in Kombination mit 1-Hydroxybenzotriazolen, wie HOBT,^[275] zum Einsatz. Diese Kondensationsreaktion liefert

das Produkt **124** nach chromatographischer Reinigung nur in einer Ausbeute von 60 %. Dagegen konnte das TBDPS-geschützte Produkt **114** bei gleicher Umsetzung in 86 % Ausbeute isoliert werden. Die Benzylidenacetalspaltung erfolgt in 80%iger Essigsäure bei 80 °C, wobei Baustein **125** in einer Ausbeute von 94 % erhalten wird (Schema 58).



Schema 58: Die Synthese des spacergebundenen Glucosaminakzeptors **125**.

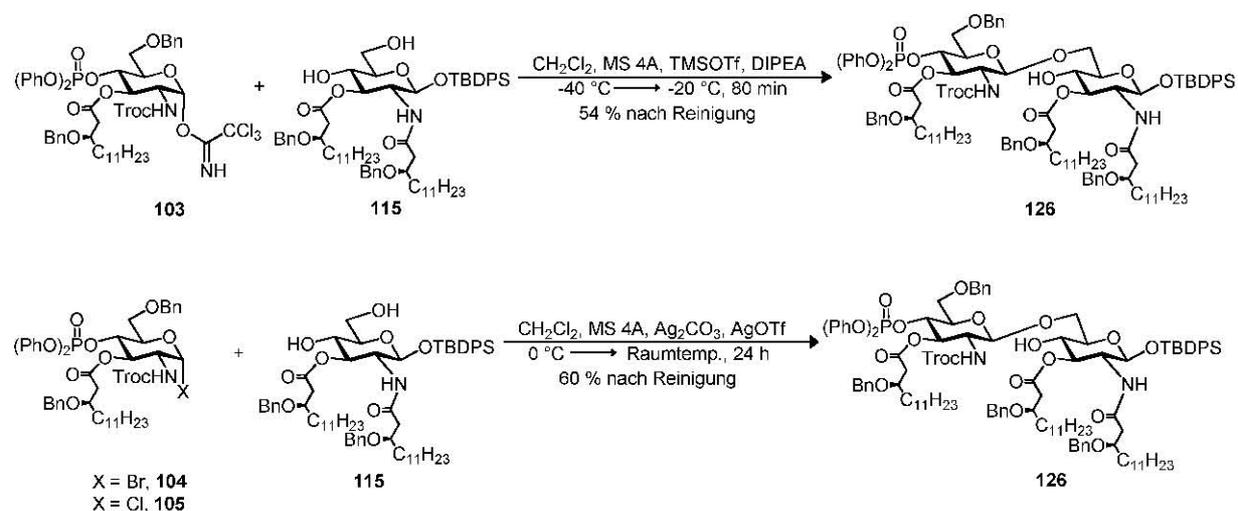
Der zweite Galactosylamin-Akzeptor wird ausgehend von Verbindung **94** in zehn Stufen in einer Gesamtausbeute von 26 % erhalten.

3.4.8 Die Disaccharid-Bausteine

3.4.8.1 Die Synthese des natürlichen MPL-A

Für die Synthese der Disaccharidbausteine sollen zwei Glycosylierungsmethoden miteinander verglichen werden. Bei den ersten Synthesen dieser Disaccharide setzte *Shiba et al.* durchgängig die *Helferich*-Methode ein.^[226, 261] Dabei ist die Substitutionsform der Monosaccharide weniger komplex als die zu verknüpfenden Komponenten in der vorliegenden Arbeit. In dieser Arbeit wurden die Glycosylierungsverfahren nach *Schmidt*^[265-267, 276], eine Kombination aus der *Koenigs-Knorr* Glycosylierung^[98] und ein von *Banoub*^[140, 231] berichtetes Glycosylierungsverfahren von Glycosylaminen angewandt.

Bei der Glycosylierung des Akzeptors **115** mit dem Trichloracetimidat **103** wird das Disaccharid-Konjugat **126** in einer Ausbeute von 54 % gewonnen (Schema 59).



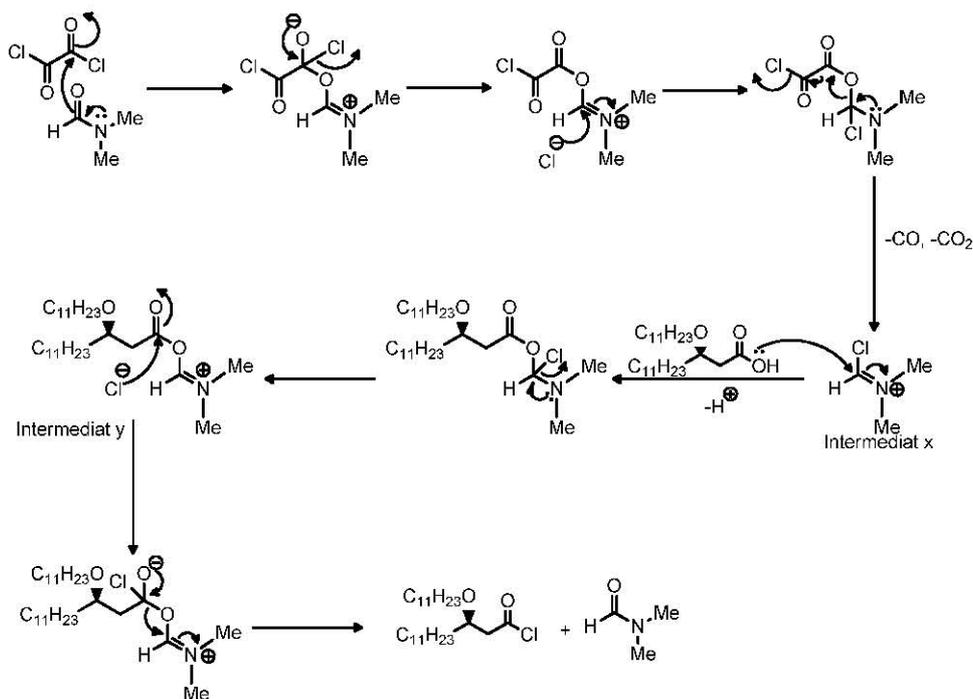
Schema 59: Die Glycosylierung des Akzeptors **115** mit den verschiedenen Donoren zum Disaccharid **126**.

Dabei werden 1.2 Äquiv. des Donors und Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) als Katalysator verwendet. Wegen des Nachbargruppeneffekts der Troc-Gruppe wird selektiv das β -glycosidische Produkt **126** erhalten, was anhand der Kopplungskonstante $^3J_{H1,H2}$ von ca. 8.3 Hz NMR-spektroskopisch belegbar wird. Bei der Glycosylierung des Akzeptors **116** mit den Glycosylhalogeniden wird ebenfalls das Disaccharid-Konjugat **126** erhalten (Schema 59). Die Umsetzung gestaltete sich bezüglich der Reaktionsbedingungen einfacher. Nachteil ist jedoch die längere Reaktionszeit. Bei der Umsetzung des Chlorids **105** fällt im Vergleich zum Bromid **104** die Ausbeute geringfügig niedriger aus. Bei der Verwendung von 2,4,6-Collidin^[231] anstelle von Silbercarbonat als Basenzusatz wurden nur 5 % des Produktes **126** isoliert. Die höchste Ausbeute wurde in der Reaktion des Glucosaminylbromids **104** unter Zusatz von Silbercarbonat und Silbertrifluormethansulfonat erzielt. Sie lag bei 60 % nach chromatographischer Reinigung. Anschließend wird die Troc-Schutzgruppe vom Disaccharid **126** reduktiv mit aktiviertem Zink in Essigsäure entfernt,^[261] wobei das Produkt durch Ausschütteln mit Wasser von seinen Salzen befreit werden kann. Die darauffolgende chromatographische Reinigung liefert **127** in 88%iger Ausbeute (Schema 60).



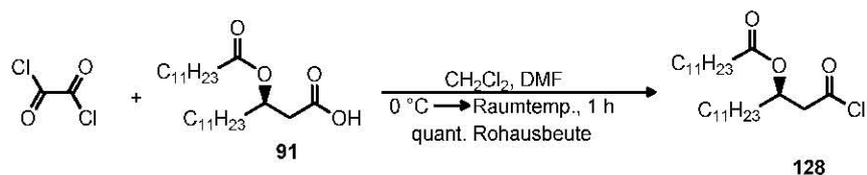
Schema 60: Die Deblockierung von der Troc-Gruppe zum Disaccharid **127**.

Die anschließende *N*-Acylierung wurde mit verschiedenen Kupplungsreagenzien vorgenommen, wie mit den Carbodiimiden^[277] sowie mit Uroniumsalzen, wie HBTU^[273-274] und HATU,^[278-279] in Kombination mit den 1-Hydroxybenzotriazolen HOBT^[275] und HOAt^[280] und mit neueren Kupplungsreagenzien, wie *n*-Propanphosphonsäureanhydrid (PPA, *T3P*[®]).^[281-284] Mit allen geprüften Kupplungsreagenzien konnten keine befriedigenden Ergebnisse erreicht werden. Sowohl die Carbodiimide als auch die Uroniumsalze lieferten das Produkt in geringen Ausbeuten. PPA liefert kein besseres Ergebnis. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um ein sterisches Problem handelt. Daher wird die Carboxylgruppe durch Oxalylchlorid und katalytische Mengen an *N,N*-Dimethylformamid in das Carbonsäurechlorid überführt.^[285] Dabei reagiert das Oxalylchlorid mit dem *N,N*-Dimethylformamid zu dem kationischen elektrophilen Intermediat und den gasförmigen Nebenprodukten Kohlenmonoxid und Kohlendioxid (Schema 61). Das elektrophile Intermediat *x* wird von der Carboxylgruppe nucleophil angegriffen, wobei sich das Intermediat *y* ausbildet, welches intermolekular mit einem Chloridanion reagiert.



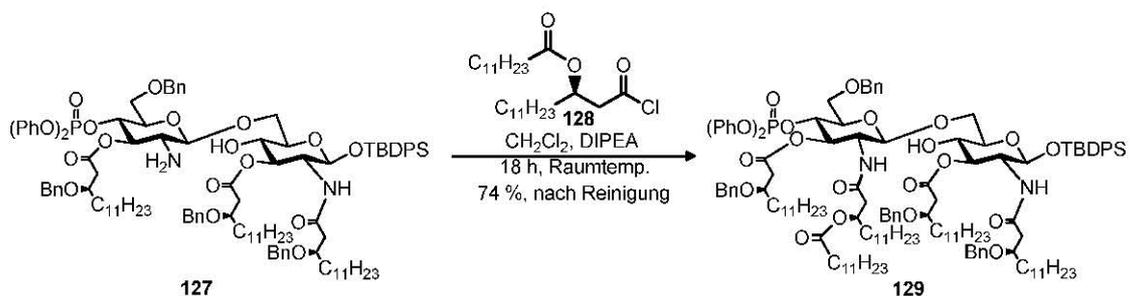
Schema 61: Der Mechanismus der Chlorierung mit Oxalylchlorid und katalytischen Mengen DMF.

In den darauffolgenden Umlagerungen wird das Carbonsäurechlorid erhalten und *N,N*-Dimethylformamid regeneriert. So entsteht aus Carbonsäure **91** das gewünschte Carbonsäurechlorid **128** nach Aufarbeitung in quantitativer Rohausbeute (Schema 62).



Schema 62: Die Darstellung des Carbonsäurechlorids **128**.

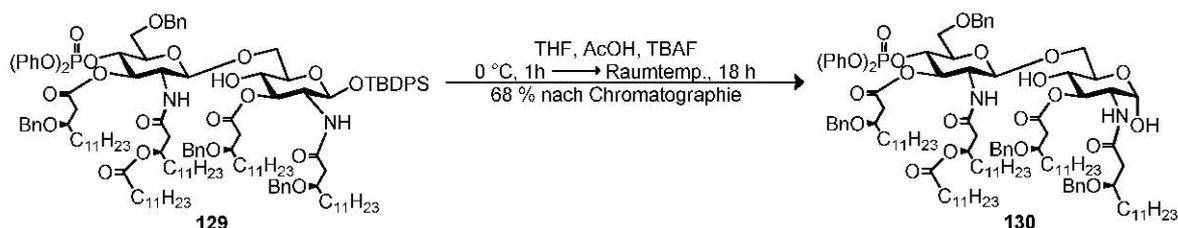
Dieses wird anschließend an das freie Amin **127** unter Zusatz von *N,N'*-Diisopropylethylamin 18 h bei Raumtemperatur gekuppelt. Nach chromatographischer Reinigung konnte das tetra-acetylierte Produkt **129** in einer Ausbeute von 74 % isoliert werden (Schema 63).



Schema 63: Die Kupplung des Carbonsäurechlorids **128** an das Amin **127** zum tetra-acetylierten Produkt **130**.

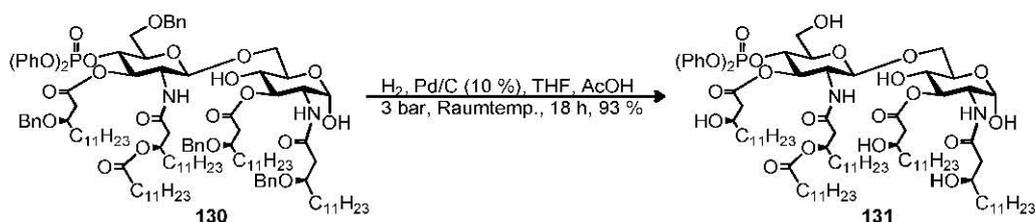
Die selektive Abspaltung der TBDPS-Schutzgruppe wird mit Tetra-*n*-butylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran unter Zusatz von Essigsäure durchgeführt, um der Basizität des Fluorids entgegenzuwirken (vgl. Kapitel 3.4.7.1). Für die Umsetzung war eine längere Reaktionszeit nötig. Sowohl die Löslichkeit als auch die Aggregation zu Mizellen spielen eine nicht unwesentliche Rolle. Wie bei der Deblockierung des Monosaccharids **102** wird nur das

α -Anomer erhalten, jedoch lag die Ausbeute nach Reinigung mit 68 % niedriger als bei der des Monosaccharids **102** (Schema 64).



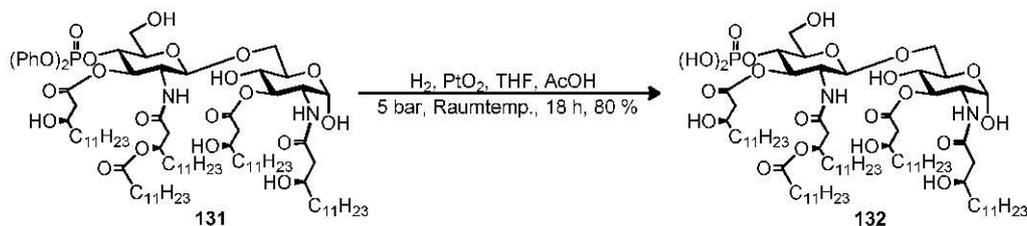
Schema 64: Die Deblockierung des Disaccharids **129** von der TBDPS-Schutzgruppe.

Das selektiv deblockierte MPL-A könnte durch eine modifizierte *Appel*-Reaktion erneut in einen Glucosyldonor umgewandelt werden. Im vorliegenden Fall wurde das Lipidkonjugat **130** weiter deblockiert, indem es in Tetrahydrofuran und Essigsäure im Autoklaven bei 3 bar Wasserstoffatmosphäre über Palladium auf Aktivkohle von den vier Benzylschutzgruppen befreit wurde (Schema 65). Nach Debenzilyerung gestaltete sich die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle zunehmend schwieriger, sodass zusätzlich auf massenspektrometrische Messungen zurückgegriffen wurde. Das Produkt **131** wurde durch aufwendiges Herauslösen vom Hydrierungskatalysator in einer Ausbeute von 93 % als farbloser Feststoff isoliert.



Schema 65: Die Deblockierung von den Benzylgruppen durch Hydrierung des Disaccharids **130**.

In einem zweiten Hydrierungsschritt wurden die beiden Phenylester über den *Adams*-Katalysator (Platin(IV)-oxid) gespalten. Dazu wird das Konjugat **131** erneut in Tetrahydrofuran/Essigsäure gelöst und in einem Autoklaven 18 h bei 5 bar und Raumtemperatur hydriert (Schema 66).



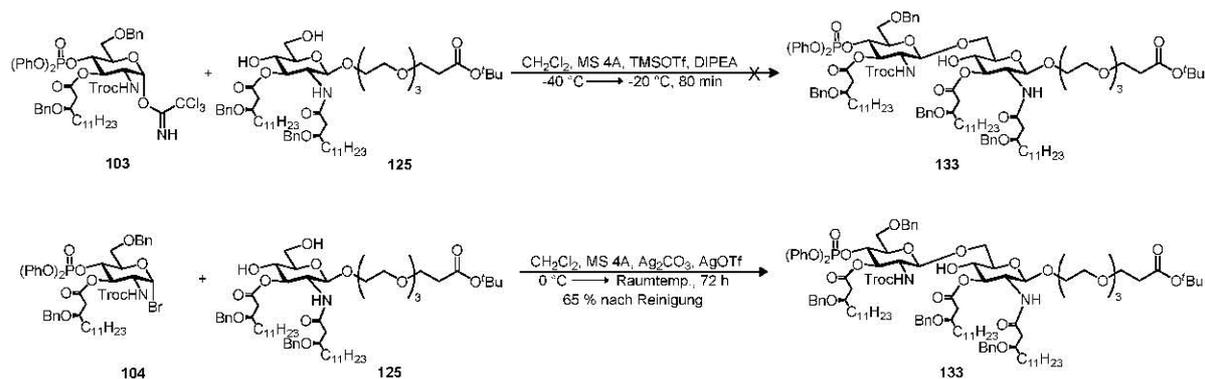
Schema 66: Die Deblockierung von den Phenylethern durch Hydrierung des Disaccharids **131**.

Die Isolierung des Produktes war schwer. Nach Filtration der Hydrierlösung wurde keinerlei Produkt gefunden. Erst durch intensives Waschen des Filterkuchens konnte das Produkt herausgelöst werden, da es schwer löslich ist und kein Lösungsmittelsystem gefunden werden konnte, in dem das Produkt säulenchromatographisch zu reinigen war. Auch eine Reinigung

durch RP-HPLC schied aus, da die Retentionszeiten selbst bei der Verwendung von C4-Säulen außerordentlich lang sind. Des Weiteren wird durch die Alkylketten eine starke Peakbreite hervorgerufen, in der das Produkt während der HPLC zum „Tailing“ neigt. Schließlich wurde das Produkt **132** in Chloroform aufgenommen und mit 0.05 molarer Salzsäurelösung mehrmals gewaschen, um anorganische Salze zu entfernen. Nach dem Konzentrieren wurde es in Chloroform erneut aufgenommen und mit Dioxan unter Kühlung vorsichtig gefällt. Zum Konzentrieren des Niederschlags wurde eine gekühlte Zentrifuge benutzt. Dieser Vorgang des fraktionierten Fällens und des Konzentrierens wird mehrmals wiederholt. Das Produkt wird im letzten Schritt in Dioxan aufgenommen und lyophilisiert, wobei es in einer Ausbeute von 80 % als farbloses Lyophilisat anfällt. Die sich anschließende spektroskopische Charakterisierung gestaltete sich ebenfalls äußerst schwierig. Das Produkt **132** neigt in den verschiedensten Lösungsmitteln zur Agglomeration und zur Mizellenbildung, sodass NMR-spektroskopische Aufnahmen kaum möglich sind. Besonders schwierig ist es, die Mizellenbildung zu unterdrücken, da ansonsten nur die Alkylreste im NMR-Spektrum sichtbar sind. Es wird auf ein Lösungsmittelgemisch aus Deuteriochloroform, Deuteromethanol und deuteriertem Wasser zurückgegriffen. Die Auflösung der Spektren verbesserte sich leicht, blieb jedoch hinter der gewohnten Qualität zurück. Zusätzlich zu den Alkylketten konnte durch das Lösungsmittelgemisch das Grundgerüst der Glucose detektiert werden. Des Weiteren gelang die Aufnahme eines ^{31}P -NMR-Spektrums, welches das Vorliegen des Phosphates belegt. Massenspektrometrische Messungen zeigen im positiven Modus keinerlei detektierbare Massen an. Im negativen Modus ist nur das Produkt detektierbar, wodurch das Vorliegen des MPL-A **132** als nachgewiesen gilt.

3.4.8.2 Das spacergebundene MPL-A

Bei der Synthese des spacergebundenen Disaccharid-Bausteins wurde ebenfalls die Glycosylierung nach *Schmidt*^[265-267, 276] und Modifikation der *Koenigs-Knorr*-Glycosylierung^[98] nach *Banoub et al.*^[140, 231] angewendet. Beim Versuch der Glycosylierung des Akzeptors **125** mit dem Trichloracetimidat **103** unter den für die Synthese von **126** beschriebenen Bedingungen konnte das spacergebundene Disaccharid nicht isoliert werden (Schema 67). Laut Dünnschichtchromatographie war keine Umsetzung festzustellen. Auch die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 10 °C änderte nichts. Der spacergebundene Akzeptor **125** verhält sich anders als der analoge Akzeptor **115**.



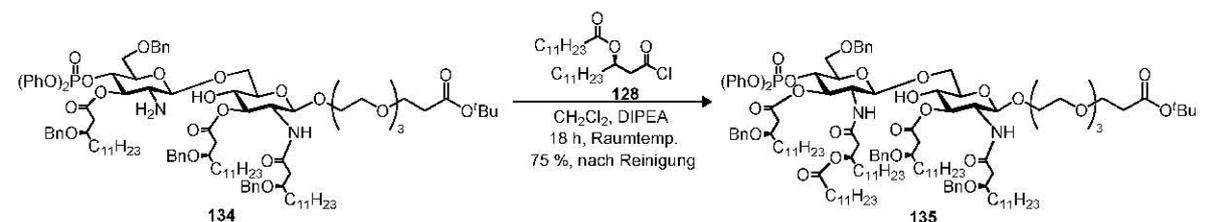
Schema 67: Glycosylierung des Glucosaminakzeptors **125** mit den Donoren **103** und **104**.

Bei der modifizierten *Koenigs-Knorr*-Glycosylierung des Akzeptors **125** mit dem Donor **104** wird das β -glycosidische Produkt **133** nach chromatographischer Reinigung mit 65%iger Ausbeute erhalten. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt die Kopplungskonstante $^3J_{\text{H1,H2}}$ mit einem Wert von 7.8 Hz die β -glycosidische Struktur an. Vom Edukt **133** wird die Troc-Schutzgruppe mit aktiviertem Zink in Essigsäure entfernt^[261] und das Produkt nach chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 96 % isoliert (Schema 68).



Schema 68: Abspaltung der Troc-Gruppe mit Zinkstaub zum freien Amin **134**.

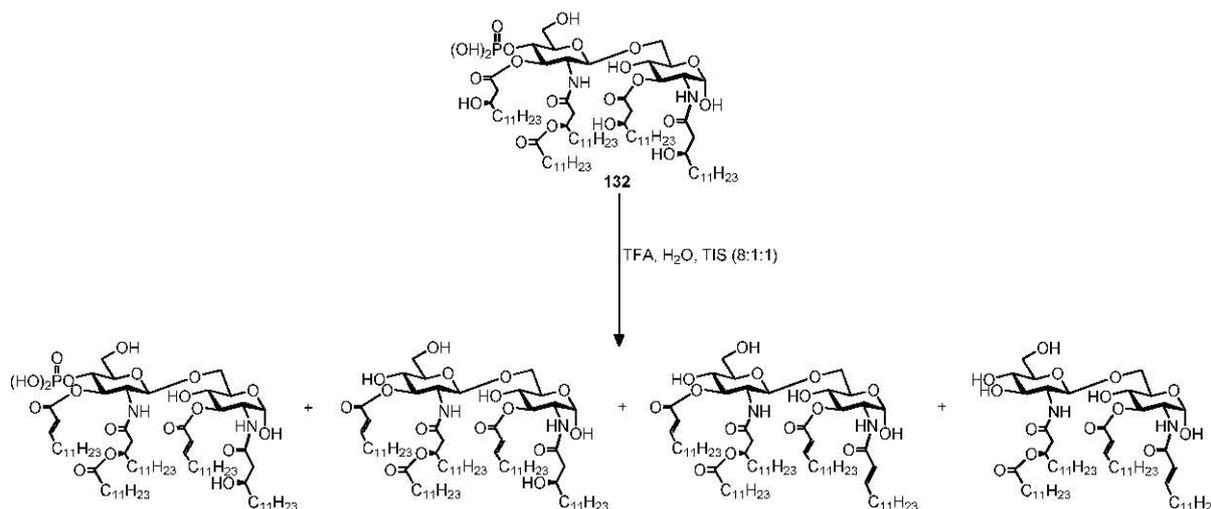
Zur Acylierung wird die Carbonsäure **91** in das Carbonsäurechlorid **128** überführt und an das freie Amin **134** gekuppelt (Schema 69). Das Produkt **135** konnte in einer Ausbeute von 75 % nach Reinigung isoliert werden. Zur Anknüpfung an die Glycopeptide muss im letzten Schritt die *tert*-Butylgruppe von Verbindung **135** abgespalten werden.



Schema 69: Die Kupplung des Carbonsäurechlorids **128** an das Amin **134** zum *tetra*-acetylierten Produkt **135**.

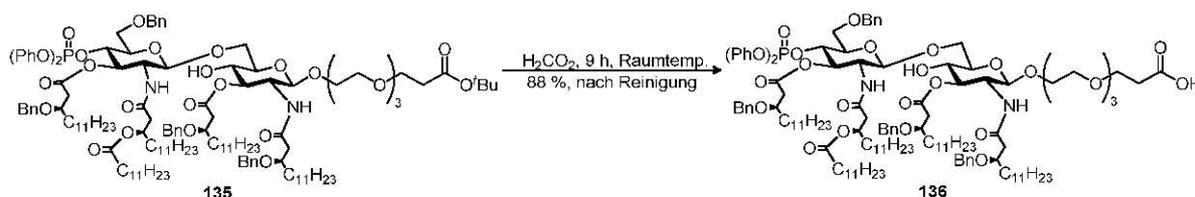
Wie bereits erwähnt, sind die Verbindungen **129** und **135** gegenüber Säuren und Basen unbeständig. Somit gestaltete sich die Suche nach einem Reagenz zur Abspaltung der *tert*-Butylgruppe schwierig. Ziel war es, die *tert*-Butylgruppe^[286] unter Erhalt der Diphenylphosphat-Gruppe zu spalten. Getestet wurden die verschiedenen Säuren, von denen alle bis auf Ameisensäure nicht zum gewünschten Produkt führten. Bei der Umsetzung mit 80%iger Trifluoressigsäure bildete sich aus dem MPL-A **132** innerhalb von 1 h bei Raumtemperatur eine Reihe von Produkten, welche durch Massenspektrometrie identifiziert

wurden (Schema 70). Als erstes wird vermutlich die säurelabile Phosphatgruppe abgespalten, gefolgt von der Dehydratisierung des β -Alkohols zum Alken. Ebenfalls war der Verlust einer Fettsäure zu verzeichnen, dem vermutlich die Dehydratisierung zum Alken vorausgeht. Auch die aus der Dehydratisierung gebildeten Acrylsäurederivate sind wahrscheinlich reaktiv genug, um durch das anwesende Wasser gespalten zu werden.



Schema 70: Die Stabilität des MPL-A 132 gegenüber starken Säuren.

Die Lokalisation der Abspaltungen muss nicht der Realität entsprechen und ist nur als Vorschlag zu verstehen. Zur Abspaltung der *tert*-Butylgruppe erwies sich Ameisensäure in Testansätzen am günstigsten. Die Umsetzung des spacergebundenen MPL-A Derivates **135** mit Ameisensäure liefert bei Raumtemperatur das gewünschte Produkt, das nach chromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 88 % erhalten wird (Schema 71).



Schema 71: Die Spaltung der *tert*-Butylgruppe mit Ameisensäure zum MPL-A Derivat **136**.

Die nötige Reaktionsdauer von 9 h ist zwar lang, jedoch führt eine Temperaturerhöhung zunehmend zu mehr Nebenprodukten. Das MPL-A Derivat **136** kann nun in Vakzinsynthesen eingesetzt werden.

3.5 Die Synthese von Glycopeptiden aus der tandem repeat-Domäne des epithelialen Mucins MUC1

Synthetische MUC1-Glycopeptide zeigten in immunologischen Studien, dass Glycopeptidantigene nach Aufnahme und Prozessierung durch dendritische Zellen über MHC-Moleküle mit einer intakten Glycanseitenkette präsentiert werden.^[287] Des Weiteren können Glycopeptidantigene von spezifischen T-Zellen erkannt werden und eine T-Zell-Stimulierung auslösen.^[288] Die Entwicklung von Antitumorvakzinen aus synthetischen Glycopeptiden schließt krebsassoziierte Peptid- sowie Saccharidepitope mit ein. Die in dieser Arbeit synthetisierten Peptide und Glycopeptide aus der tandem repeat-Domäne des epithelialen Mucins MUC1 werden an der festen Phase synthetisiert, wobei die Saccharidantigene und Adjuvanzien, deren Herstellung in den vorangehenden Kapiteln beschrieben wurde, zum Einsatz kommen. Durch die Integration der unterschiedlichen tumorassoziierten Saccharidantigene und die Varianz der Peptidsequenzen können unterschiedliche Antigenstrukturen hervorgebracht werden, die in immunologischen Untersuchungen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Lymphozyten zu stimulieren, evaluiert werden sollen.

In Anlehnung an den von *Hanisch* in Brust- und Darmkrebszellen gefundenen Polymorphismus^[46] bezüglich der Peptidsequenz, in dem die Aminosäuresequenz der MUC1-Repeating-Unit einen Austausch einzelner Aminosäuren erfährt, soll auch in der vorliegenden Arbeit ein Austausch einzelner Aminosäuren erfolgen. So sind in den verschiedenen Krebszelllinien im DTR-Motiv die Aminosäuren Asparaginsäure⁹ und Threonin¹⁰ zu 50 % durch die Aminosäuren Glutaminsäure⁹ und Serin¹⁰ ausgetauscht, während das Prolin²⁰ zu 30 % durch die Aminosäuren Alanin²⁰ oder Glutamin²⁰ ersetzt sein kann (vgl. Kapitel 1.5). Ebenfalls kann das Threonin¹⁷ durch ein Serin¹⁷ ersetzt sein, während diese Heterogenität in MUC1 aus gesunden Zellen nicht anzutreffen ist. So zeigten die von *Serttas* chemisch und enzymatisch hergestellten Glycopeptidstrukturen, in denen ein Austausch einzelner Aminosäuren erfolgte, in T-Zellstimulationsassays positive Ergebnisse.^[289] Ausgehend von dieser Heterogenität im MUC1 sollen eine Reihe verschiedener Glycopeptide mit unterschiedlichen Antigenen und Glycosylierungsstellen sowie unterschiedlichem Glycosylierungsgrad synthetisiert werden, indem das glycosylierte Threonin durch ein Serin ersetzt sein kann und umgekehrt. Ziel ist es herauszufinden, inwiefern der Austausch einer glycosylierten Aminosäure die Struktur und Immunogenität beeinträchtigt. Sollte der Austausch der glycosylierten Aminosäure sich nicht negativ auf die Immunogenität

auswirken, so könnte auf die Synthese der Antigene mit beiden Aminosäuren verzichtet werden und nur die glycosylierte Aminosäure mit dem höheren Antigencharakter eingesetzt werden. Des Weiteren sollte die Rolle des Glycosylierungsgrades auf die Immunogenität näher untersucht werden, indem an das Glycopeptid eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene angeknüpft wird. Durch den Vergleich von immunologischen Ergebnissen von Glycopeptiden mit unterschiedlichem Glycosylierungsgrad könnte eine Aussage bezüglich der Induktion von Immunantworten getroffen werden. Für die Synthese von mehrfach glycosylierten Peptiden findet man in der Literatur zahlreiche Beispiele. Das unimolekulare pentavalente *Danishesky*-Vakzin besteht aus fünf unterschiedlichen Saccharid-Antigenen. Das Glycopeptidmimetikum wurde durch Fragmentkondensation an ein Carrierprotein geknüpft, wobei die Antigene an unnatürlichen verlängerten Seitenketten an das Peptid gebunden sind.^[290] Eine weitere Möglichkeit den Glycosylierungsgrad zu erhöhen besteht in der Synthese kleiner monoglycosylierter Peptide und der Zusammenfügung dieser zu einem neuen Peptid durch repetitive Fragmentkondensation.^[291] Eine andere Möglichkeit stellt die Mikrowellenunterstützte Glycopeptidsynthese dar, in der im ersten Schritt einfachere Antigene eingebaut werden und im zweiten Schritt eine enzymatische Erweiterung der Zuckerstrukturen erfolgt.^[292] Glycopeptidvakzine mit einem hohen Glycosylierungsgrad weisen jedoch nicht immer immunologisch bessere Resultate auf. So gibt es auch Beispiele, in denen ein hoher Glycosylierungsgrad zu einer verringerten Stimulation des Immunsystems beiträgt bzw. negative Resultate nach sich zieht.^[289, 293] Wie diese Ergebnisse richtig zu deuten sind, soll nicht erörtert werden, wird jedoch der Vollständigkeit halber erwähnt.

Synthetisiert werden Glycoheptadekapeptide und Glycodocosapeptide aus der Wiederholungseinheit des Mucins MUC1 mit den Aminosäuresequenzen APPAHGVTSAPDTRPAP, GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS, die die Motive *PDTRP* bzw. *APDT* als immundominante Domäne enthalten.^[294-295] Wie anhand von immunologischen Studien am murinen System gezeigt werden konnte, werden verschiedene Teilsequenzen aus diesem Peptidepitop über den MHC-I-Komplex präsentiert, sodass es zu einer Stimulation CD8⁺ cytotoxischer T-Zellen kommen kann.^[75] Zunächst werden einfachere Peptide bzw. Glycopeptide hergestellt, in denen anschließend der Saccharidteil zunehmend komplexer ist und wenn möglich mehrfach vorkommt.

3.5.1 Grundlegende Prinzipien der (Glyco-)Peptidsynthese und das allgemeine Protokoll der automatisierten Festphasensynthese

Durch chemische Synthese lassen sich im Gegensatz zur Isolierung aus biologischen Systemen oder biotechnologischen Produktionen definierte (Glyco-)Peptidstrukturen im präparativen Maßstab erzeugen. Des Weiteren erlaubt die chemische Synthese die Modifikationen und lokalisierte Funktionalisierungen, die für den Einsatz in immunologischen Studien und für die Entwicklung von spezifischen Impfstoffkonjugaten interessant sind. Die Aufklärung fundamentaler biologischer Prozesse und Wechselwirkungen, an denen Glycoproteine entscheidend beteiligt sind,^[296-298] hat zunehmendes Interesse an der Synthese von Glycopeptiden und Partialstrukturen biologisch relevanter Glycoproteine ausgelöst.^[299-300] Die Synthese von komplexen Glycopeptiden bedarf einer sorgfältigen Wahl der Schutzgruppen und der Verknüpfungsmethode während der Peptid- und Saccharidsynthese, wobei eine besondere Beachtung den glycosidischen Bindungen aufgrund der Säure- und Basenlabilität zu widmen ist. Die Synthese von Glycopeptiden kann in Lösung oder an einer festen Matrix erfolgen.

Obwohl die Synthese in Lösung durch zahlreiche Beispiele belegt werden kann,^[301-302] hat sich die Synthese an der festen Phase durchgesetzt. Die Grundlage zur Festphasensynthese bilden die von Merrifield 1963 veröffentlichten Arbeiten. Dabei wird im Gegensatz zur Proteinbiosynthese das Peptid sukzessiv vom C- zum N-Terminus aufgebaut, wobei der entscheidende Vorteil der Festphasensynthese darin besteht, dass der wachsende Peptidstrang an einer polymeren Matrix immobilisiert wird, welche aus quervernetztem Polystyrol besteht.^[303] Der polymere Träger sollte sowohl mechanisch stabil als auch chemisch inert sein.^[304-305] Die in der Festphasensynthese verwendeten Polystyrolträger sind in linearer, nicht-vernetzter und in vernetzter Form erhältlich. Vorwiegend bedient man sich jedoch der zuletzt genannten. Obwohl sie unterschiedliche morphologische und chemische Strukturen besitzen, sind fast alle Festphasenträger nach dem gleichen allgemeinen Prinzip aufgebaut (Abbildung 23).

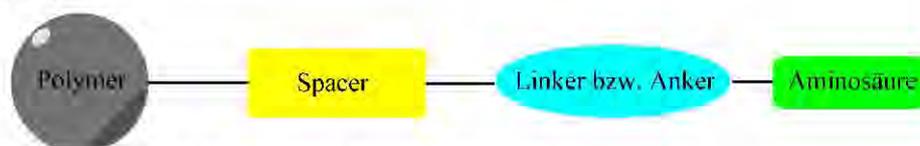


Abbildung 23: Der allgemeine Aufbau eines Festphasenträgers.

Bevorzugt kommt Polystyrol mit 1 – 2 % quervernetztem Divinylbenzol oder *TentaGel*[®] (Polystyrol-Harz mit aufgepfropften Polyethylenglycol-Einheiten 10 – 20) zum Einsatz.^[306] Die Verknüpfung über einen Spacer ermöglicht eine höhere Flexibilität, wodurch Reaktionen kinetisch schneller ablaufen, verglichen mit dem Pendant ohne Spacer.^[307] Spacer üben einen erheblichen Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften des Harzes aus. Eindrucksvoll kann

dies am Quellverhalten des Trägermaterials, wie am Beispiel des *TentaGel*[®]-Harzes, belegt werden.^[308] Die Zugänglichkeit der Reaktionszentren wird maßgeblich durch die Quelleigenschaften beeinflusst, was für den Erfolg der Synthese wichtig ist. Polystyrol quillt in unpolaren Lösungsmitteln wie Dichlormethan, *N,N*-Dimethylformamid, *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) oder Tetrahydrofuran, wohingegen die Verwendung von polaren Solvenzien eingeschränkt ist. Die Quelleigenschaften von Polystyrol in polaren Lösungsmitteln wurden durch Aufpfropfen von Polyethylenglykolketten erheblich verbessert. Pfropfpolymeren, wie z. B. *TentaGel*[®], ermöglichen es die Synthese den Bedürfnissen anzupassen, sodass auch polare Lösungsmittel, wie Methanol oder Wasser, bei *TentaGel*[®] analogen Harzen zum Einsatz kommen können. Dies kann der Tabelle 1 entnommen werden.^[309-311]

	H ₂ O	MeOH	EtOH	CH ₂ Cl ₂	Toluol	DMF	MeCN	THF	Dioxan	Ether	DMSO
Polystyrol 1% DVB	--	1.6	1.7	8.3	8.5	5.6	3.2	8.8	7.8	4.0	
Polystyrol 2% DVB	--	1.6	1.7	6	5.2	3.2	1.9	5.6	5.4		
<i>TentaGel</i> [®] S 0.25 - 0.30 mmol/g	3.6	3.6	2.9	6.3	4.8	4.7	4.2	5.0	5.4	1.9	3.9
<i>TentaGel</i> [®] HL 0.4 - 0.6 mmol/g	3.1	3.6	3.5	5.7	4.1	4.6	3.9	4.2	4.8	2.4	
<i>TentaGel</i> [®] 0.25 - 0.35 mmol/g	4	5.2	3.9	4.9	6.2	6.6	5.9	6.5	6.9	2.1	
HypoGel [®] 400 0.6 - 0.8 mmol/g	1.8	2.9	2.8	6.9	5.5	5.2	4.6	5.3	5.6	2.6	

Tabelle 1: Quellvolumen (ml/g) von Polystyrol- und *TentaGel*[®]-Harz (Trockenvolumen 1.6 ml/g).^[312]

Weiterhin ist die Wahl des Ankersystems wichtig, da es die Verbindung des Trägerpolymers zum wachsenden Peptid herstellt,^[312] wobei die Stabilität während der Synthese Voraussetzung ist. Am Schluss der automatisierten Festphasensynthese findet die Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger statt, wobei die Bindung zwischen der C-terminalen Aminosäure und der Ankergruppierung gelöst wird. Die Ankergruppe ist an die Erfordernisse der (Glyco-)Peptidsynthese anzupassen. Bei der Darstellung von geschützten Peptiden sollte die Abspaltung unter milden Bedingungen erfolgen, um weder die Seitenkettenschutzgruppen noch die amidischen und glycosidischen Bindungen anzugreifen. Es gibt mehrere Ankersysteme, von denen die wichtigsten vorgestellt werden sollen. Unter Anwendung der Fmoc-Strategie kommen häufig säurelabile Anker zum Einsatz, welche unter aciden Bedingungen bei simultaner Abspaltung von säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen gespalten werden. Wichtige Vertreter dieser Ankerklasse sind die kommerziell erhältlichen

Wang-,^[313] Merrifield-,^[303] Sasrin-,^[314-315] Rink-Ester-,^[316] Trityl-,^[317-318] und Barlos-Harze^[319-321] (Abbildung 24).

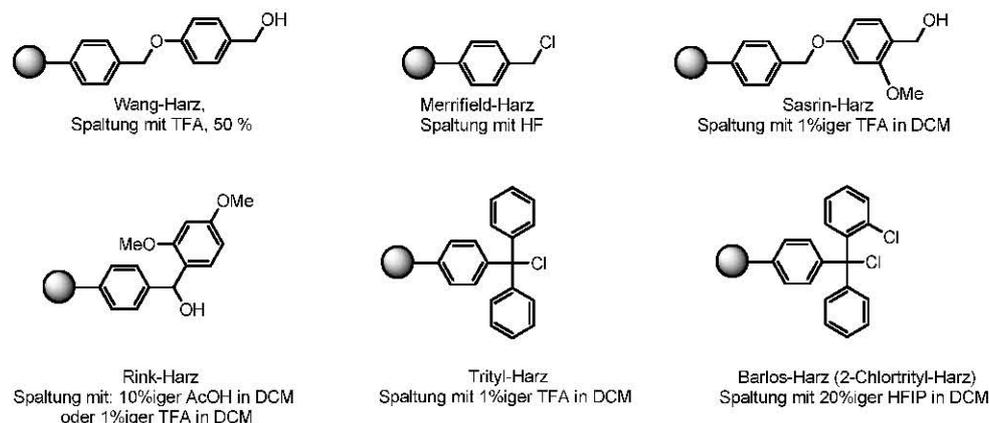


Abbildung 24: Die wichtigsten säurelabilen Ankersysteme.

Während für die Spaltung des Wang-Ankers 50 – 95%ige Trifluoressigsäure benötigt wird, weisen die Trityl-, Rink- und der Barlos-Anker deutlich höhere Säuresensibilität auf,^[322] was die Spaltung unter milden Bedingungen und einen Zugang zu den geschützten (Glyco-)Peptiden ermöglicht.

Die zweite große Gruppe der Ankersysteme stellen die basenlabilen Anker dar, zu denen der Kaiser-Oxim-Linker^[323] und der HMBA-Linker^[324] gezählt werden (Abbildung 25).



Abbildung 25: Die basenlabilen Ankersysteme.

Deren Verwendung kann in der (Glyco-)Peptidsynthese wegen der drastischen Abspaltbedingungen nicht in Betracht gezogen werden, da Nebenreaktionen wie Racemisierung, Aspartimidbildung und die Eliminierung von Glycosiden nicht ausgeschlossen werden können.

Eine Spaltung unter annähernd neutralen Bedingungen ist mit Hilfe von fluoridlabilen Silylankersystemen durchführbar. An ihnen lassen sich wie mit dem bereits zuvor vorgestellten Barlos-Anker vollständig blockierte Glycopeptide synthetisieren. Zu den fluoridlabilen Systemen werden die Silylanker nach Barany,^[325] Chao^[326] und Ramage^[327] gezählt, die durch Tetrabutylammoniumfluorid in *N,N*-Dimethylformamid oder Tetrahydrofuran gespalten werden (Abbildung 26). Die verwendeten Abspalllösungen weisen jedoch deutlich basischen Charakter auf, weshalb die bereits genannten Nebenreaktionen auftreten können.

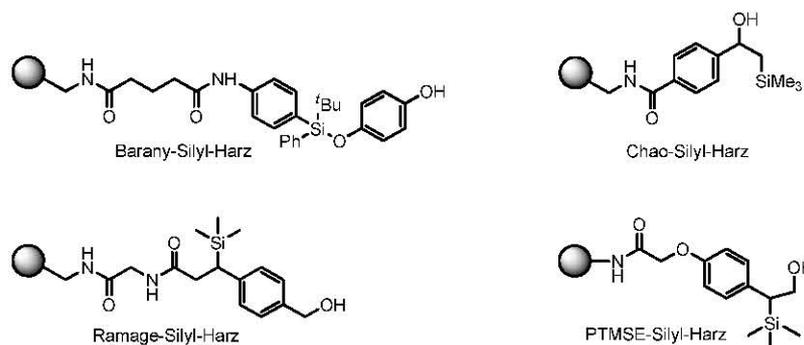


Abbildung 26: Die fluoridlabilen Ankersysteme.

Der PTMSE-Anker^[328] ((2-Phenyl-2-trimethylsilyl)ethyl)-Linker ermöglicht eine Spaltung unter nahezu neutralen Bedingungen in Gegenwart der Fmoc-Gruppe durch Tetrabutylammoniumfluorid in Dichlormethan. Die allylischen und photolablen Anker stellen zwei weitere Klassen der Linkersysteme dar (Abbildung 27).

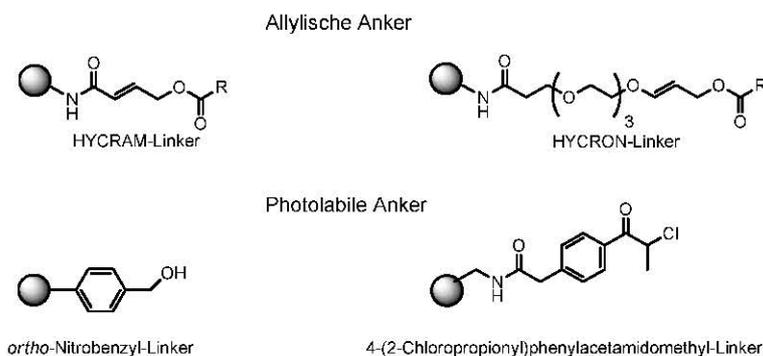
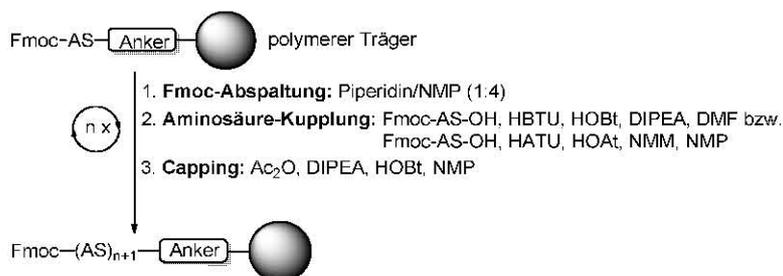


Abbildung 27: Die allylischen und photolablen Ankersysteme für die Festphasenpeptidsynthese.

Unter neutralen Bedingungen werden die allylischen Linker, wie der HYCRAM-^[329] oder der HYCRON-Linker^[330-331] und weitere, durch Palladium(0)-katalysierten Allyltransfer auf ein adäquates Abfangnucleophil über eine π -Allyl-Palladium-Spezies gespalten.^[332-333] Photolabile Anker wurden erstmals von *Rich* und *Zehavi* in der Festphasenchemie eingesetzt^[334-335] und finden dann Verwendung, wenn z. B. sulfatierte Kohlenhydratstrukturen vorliegen. Durch Bestrahlen mit UV-Licht der Wellenlänge 320 – 365 nm wird das Produkt der Festphasensynthese freigesetzt.

In der automatisierten Festphasenpeptidsynthese haben sich zwei Schutzgruppenstrategien bewährt. Bei der Boc-Strategie wird zum temporären Schutz der Aminofunktion die *tert*-Butyloxycarbonyl(Boc)-Gruppe eingesetzt, wobei die Seitenketten der Aminosäuren in der Regel hydrogenolytisch spaltbare Schutzgruppen tragen.^[336-339] Bei der Fmoc-Strategie kommt die Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Gruppe^[340-341] als temporäre Aminoschutzgruppe zum Einsatz, wohingegen die Seitenketten der Aminosäuren vorrangig durch acidolytisch spaltbare Schutzgruppen blockiert werden. Da unter der Boc-Strategie die Gefahr eines Angriffs auf die säureempfindlichen saccharidischen Bindungen besteht, wird bei der Glycopeptidsynthese der Fmoc- gegenüber der Boc-Strategie gewöhnlich der Vorzug

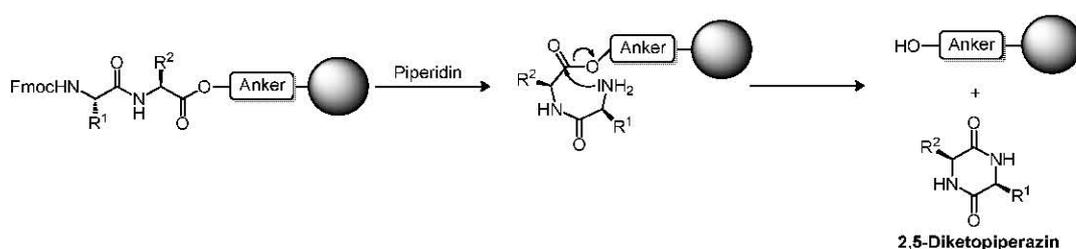
gegeben, so wie auch in dieser Arbeit. Bei der iterativen sequentiellen (Glyco-)Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie wird die Startamino­säure vor Beginn der Synthese über die Carboxylfunktion an eine der vorgestellten Ankergruppen gebunden. Im ersten Schritt wird die Aminogruppe der Startamino­säure, sofern sie in geschützter Form vorliegt, selektiv deblockiert (Schema 72).



Schema 72: Das allgemeine Protokoll der automatisierten Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie.

Hierzu dienen bei der Fmoc-Strategie sekundäre Basen wie Morpholin^[342] oder Piperidin.^[271] Die entstandene freie Aminofunktion steht anschließend für die Kupplung der zweiten *N*-terminal geschützten Aminosäure zur Verfügung, welche unter Zuhilfenahme entsprechender Kupplungsreagenzien gelingt. Im darauffolgenden Capping-Schritt werden die nicht umgesetzten Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid acetyliert, sodass deren weiteres Kettenwachstum zu Fehlsequenzen verhindert wird, die dem gewünschten Produkt zu ähnlich und von diesem nur schwer abtrennbar wären. Das Durchlaufen des dreistufigen Reaktionszyklus liefert nach *n*-Wiederholungen schließlich das Zielpeptid im vollständig geschützten Zustand. Für die Synthese von Glycopeptiden werden die vorsynthetisierten Glycosylamino­säure-Bausteine an der entsprechenden Stelle der Synthese eingebaut. Die Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen müssen so gewählt werden, dass sie während der Festphasensynthese erhalten bleiben, jedoch nach Abschluss unter milden Bedingungen abgespalten werden können. Schließlich wird das (Glyco-)Peptid durch die entsprechende Lösung vom Harz abgespalten und durch Filtration getrennt. Durch die Wahl der Reaktionsbedingungen kann eine simultane Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen der jeweiligen Aminosäuren erfolgen, oder diese können für Fragmentkondensationen erhalten bleiben. Diese und die im Glycanteil vorhandenen Schutzgruppen müssen zu einem späteren Zeitpunkt durch Umsetzungen in Lösung entfernt werden. Die Festphasensynthese hat gegenüber der Synthese in Lösung den entscheidenden Vorteil, dass die polymergebundenen Peptidketten leicht durch Filtration und gründliches Waschen von den Reagenzien abgetrennt werden können. Die einfache Reinigung erlaubt sowohl den Einsatz großer Reagenzienüberschüsse, die dazu führen, dass hohe Umsätze innerhalb kurzer Reaktionszeiten erreicht werden und dass die Synthese automatisiert ist.

Bevor die Synthesen der (Glyco-)Peptide im Einzelnen vorgestellt werden, soll etwas genauer auf die verschiedenen Schritte der Festphasensynthesen eingegangen werden. Fast alle Synthesen wurden an einem ABI-433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt. Zwar wurden auch vereinzelt (Glyco-)Peptide an einem *CEM*[®] Liberty 1-Peptidsynthesizer unter Mikrowellenstrahlung aufgebaut, diese werden an den entsprechenden Stellen besprochen. Als polymere Träger kamen kommerziell erhältliche Polystyrol-Harze der Firma *Rapp Polymere* zum Einsatz, welche über einen 2-Chlortrityl-Anker^[320] mit den C-terminalen Startamino­säuren L-Arginin, L-Lysin, L-Prolin, L-Serin und L-Valin beladen sind (Beladung zwischen: 0.70 – 0.78 mmol/g). Das Ankersystem nach *Barlos* ist säurelabil und erlaubt die Abspaltung des polymergebundenen Peptids durch eine Mischung aus Essigsäure, Trifluorethanol und Dichlormethan oder in Dichlormethan und Hexafluoroisopropanol. Unter den angegebenen Bedingungen bleiben selbst die sehr säurelabilen Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen, wie die Trityl(Trt)- oder die 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl(Pmc)-Gruppe, erhalten. Unter Verwendung des sterisch anspruchsvollen Tritylanker-systems kann die bei Peptidsynthesen, welche nach der Fmoc-Strategie aufgebaut werden, oft auftretende 2,5-Diketopiperazinbildung wirksam unterdrückt werden (Schema 73). Besonders Aminosäuresequenzen, die Glycin oder Prolin am C-Terminus aufweisen, sind dafür prädestiniert und unterliegen in hohem Maße dieser basenkatalysierten intramolekularen Aminolyse.^[343] Dabei führt die baseninduzierte N-terminale Fmoc-Abspaltung auf der Stufe des Dipeptids zu einem intramolekularen Angriff der freien Aminofunktion an der Carboxylgruppe der Startamino­säure, die unter Ausbildung eines Diketopiperazins zu einem Verlust des wachsenden Peptidstranges führt.

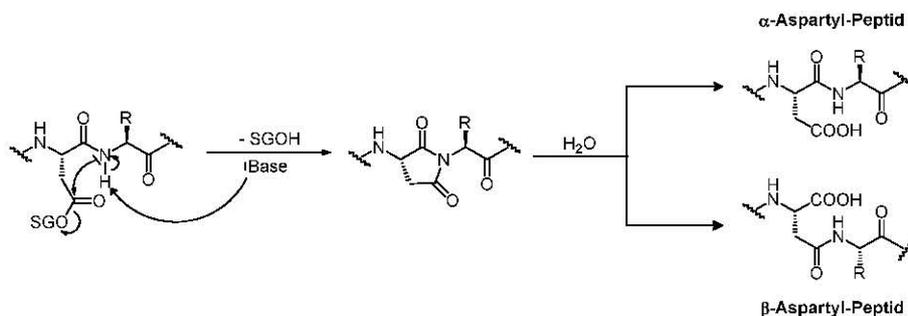


Schema 73: Die 2,5-Diketopiperazinbildung als Nebenreaktion bei der Peptidsynthese.

Das Ausmaß dieser Nebenreaktion und der damit einhergehende Peptidverlust hängen stark von der Zusammensetzung der Aminosäuren ab. Eine Alternative, die Diketopiperazinbildung bei Abwesenheit eines voluminösen Ankers zu verhindern, besteht darin, ein Dipeptid an die Startamino­säure zu koppeln.

Eine weitere zu beobachtende Nebenreaktion, die sowohl während der Festphasenpeptid-synthese nach der *Fmoc*-Strategie als auch während der Entfernung der Schutzgruppen auftritt, ist die Umlagerung von Asparaginsäurederivaten zu Aspartimiden, die sowohl im

Basischen als auch im Säuren auftreten kann.^[344-347] Unter basenkatalysierten Bedingungen tritt die Abstraktion des Amidprotons der C-terminal benachbarten Aminosäure ein. Es folgt der nucleophile Angriff des Amid-Stickstoffs an der geschützten β -Carboxylfunktion der Asparaginsäure unter Ausbildung eines Aspartimids (Schema 74).



Schema 74: Die Aspartimidumlagerung als Nebenreaktion bei der Peptidsynthese.

Die anschließende Hydrolyse ergibt entweder das gewünschte α -Aspartyl-Peptid oder aber das unerwünschte β -Aspartyl-Peptid. Im Säuren kann diese Nebenreaktion durch Behandlung mit Trifluoressigsäure während der Abspaltung des Peptids vom Harz induziert werden. Die Tendenz zur Aspartimidbildung ist abhängig von der jeweiligen Aminosäuresequenz, jedoch in der Nachbarschaft zu Glycin und deblockiertem Serin besonders ausgeprägt.^[345, 348] Sie lässt sich allerdings durch sterisch anspruchsvolle Schutzgruppen an der Carboxylfunktion der Asparaginseitenkette weitgehend unterdrücken. Durchgesetzt hat sich vor allem die Blockierung der Carbonsäure als *tert*-Butylester.^[349] Auch in der vorliegenden Arbeit wird auf diese Schutzgruppe zurückgegriffen.

Bei Verwendung der mit den Aminosäuren vorbeladenen 2-Chlortriptyl-Anker^[320] versehenen Polystyrol-Harze (*Rapp Polymere PS 2-CT-AS*) beginnt die (Glyco-)Peptid-Festphasensynthese direkt mit der Anknüpfung der zweiten Aminosäure, da die N-terminale Aminofunktion in ungeschützter Form vorliegt. Dabei erfolgt die Aktivierung der Carboxylfunktion der anzubindenden Aminosäure *in situ* durch spezielle Kupplungsreagenzien, die für die Festphasensynthese entwickelt wurden (Abbildung 28).

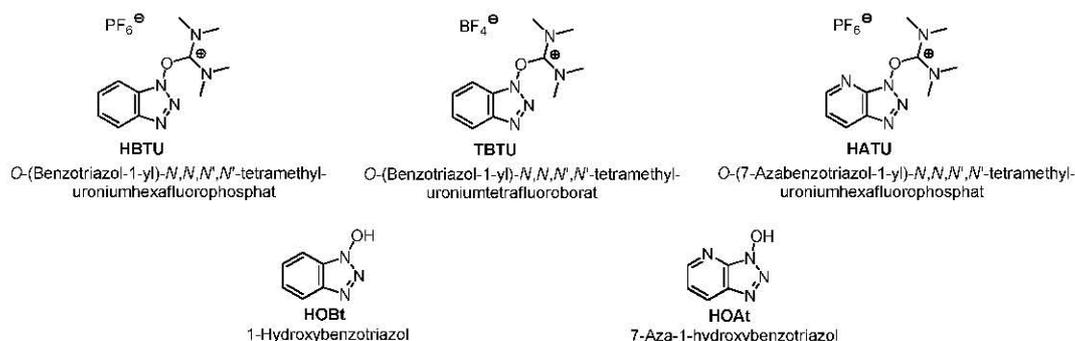
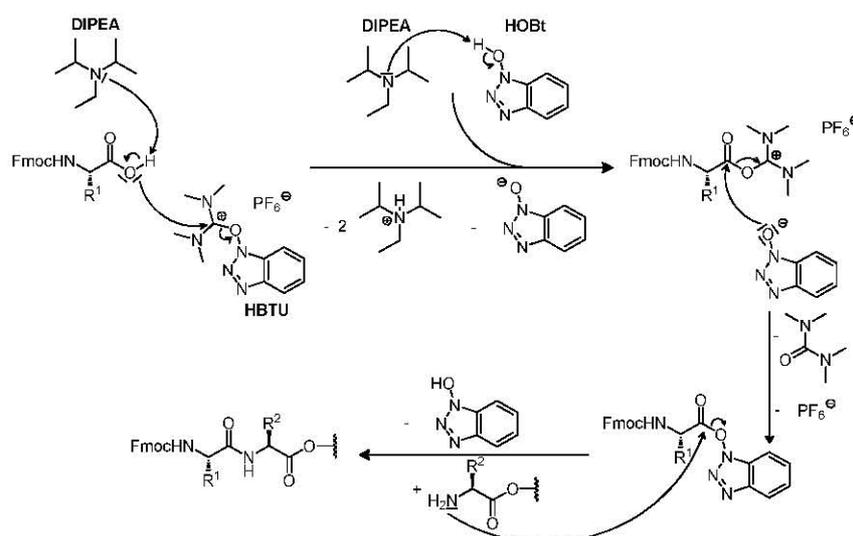


Abbildung 28: Die Kupplungsreagenzien HBTU, TBTU und HATU sowie die Additive HOBt und HOAt.

Zur Knüpfung von Peptidbindungen an der festen Phase haben sich Uroniumsalze, wie HBTU,^[273-274] TBTU^[350] und HATU,^[278-279] in Kombination mit 1-Hydroxybenzotriazolen,

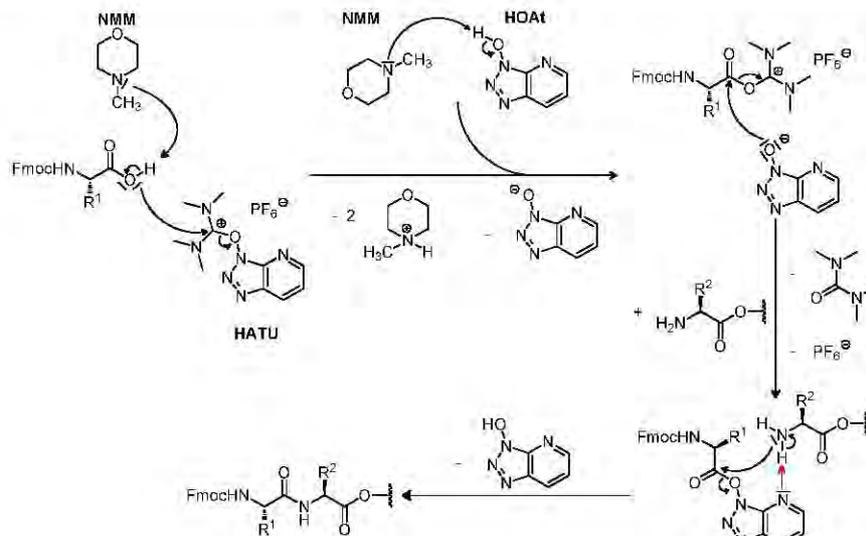
wie HOBt^[275] und HOAt,^[280] bewährt. Dabei ist HATU zusammen mit HOAt als Additiv das effektivste Kupplungsreagenz und wird zur Anknüpfung der sterisch anspruchsvollen glycosylierten Aminosäurebausteine sowie bei Festphasenkondensationen eingesetzt. Der gebildete Aktivester weist aufgrund des elektronenziehenden Stickstoffs eine zusätzlich gesteigerte Reaktivität auf, wobei HOAt wegen seiner höheren Acidität im Vergleich zu HOBt eine bessere Abgangsgruppe darstellt. Die Uroniumsalze sind den Carbodiimiden^[277] vielfach überlegen. Sie weisen eine größere Reaktivität auf, verhindern unerwünschte Nebenreaktionen, wie die Racemisierung oder die basenkatalysierte Acyl-Wanderung vom Isoharnstoff-O-Atom zum Isoharnstoff-N-Atom, und produzieren nicht wie das *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid ein unlösliches Nebenprodukt, das nur bedingt von dem polymergebundenen Peptid abgetrennt werden kann. Die Aktivierung durch HBTU und HOBt läuft wie in Schema 75 dargestellt ab.



Schema 75: Der Peptidkupplungsmechanismus unter Verwendung von HBTU und HOBt als Kupplungsadditiv.

Im ersten Schritt erfolgt eine Deprotonierung der freien Carbonsäure sowie des Additivs HOBt mit *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA), wobei durch den Zusatz von HOBt die Gefahr der Racemisierung der Carbonsäurekomponenten herabgesetzt wird. Es kommt zur Umsetzung des Carboxylats mit dem Uroniumsalz HBTU, wobei das entsprechende reaktive *O*-Acyl-Uroniumsalz als Zwischenstufe entsteht. Dieses wiederum wird von dem deprotonierten HOBt unter Bildung eines weiteren Aktivesters angegriffen, welcher schließlich mit der freien Aminofunktion reagiert, wodurch die gewünschte amidische Peptidbindung erhalten wird.

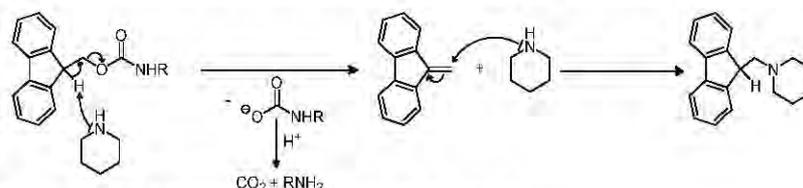
Die Kombination des reaktiveren Reagenzienpaares HATU/HOAt mit *N*-Methylmorpholin (NMM) wird bei der Anknüpfung sterisch anspruchsvoller Saccharid-Festphasenbausteine empfohlen (Schema 76). Dabei ist der HOAt-Aktivester dem HOBt-Aktivester in seiner Reaktivität überlegen.^[278]



Schema 76: Der Mechanismus der Peptidkupplung unter Verwendung von HATU und HOAt.

Die höhere Reaktivität des gebildeten Aktivesters ist auf den elektronenziehenden Stickstoff im Pyridinring zurückzuführen. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen diesem Pyridinstickstoff und der freien terminalen Aminofunktion der polymergebundenen Peptidkette (Schema 76), wodurch die Aminokomponente eine Vororientierung dahingehend erfährt, dass der darauffolgende nucleophile Angriff, die Aminolyse des Aktivesters, erleichtert wird und der Racemisierung entgegenwirkt. Für die Kupplung der Saccharid-Festphasenbausteine ist die Vorkoordination von besonderer Bedeutung, da die Bausteine sowohl eine verminderte Reaktivität aufweisen als auch durch ihre voluminösen Reste in sterischer Hinsicht eingeschränkt sind. Sinnvoll ist die Verwendung der reaktiveren Kupplungsreagenzien auch aus Sicht des geringeren Überschusses an eingesetztem Glycosylaminosäurebaustein.

Nach der Kupplung schließt sich jeweils ein Capping-Schritt zur Acetylierung eventuell nicht umgesetzter Aminofunktionen an. Dieser wird mit Essigsäureanhydrid, *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA) und einer katalytischen Menge an HOBT in *N*-Methylpyrrolidin-2-on durchgeführt. Bei Kupplungen, in denen der Angriff am Aminoterminus erschwert ist, beispielsweise nach Kupplung sterisch anspruchsvoller glycosylierter Aminosäuren, kann die darauffolgende Fmoc-Aminosäure in einer Doppelkupplung verknüpft werden. Dazu wird das Harz zweimal ohne zwischenzeitliches Capping mit der aktivierten Aminosäure behandelt. Im letzten Schritt des Zyklus erfolgt die Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit 20%igem Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin-2-on in drei bis vier Zyklen von jeweils drei Minuten (Schema 77).

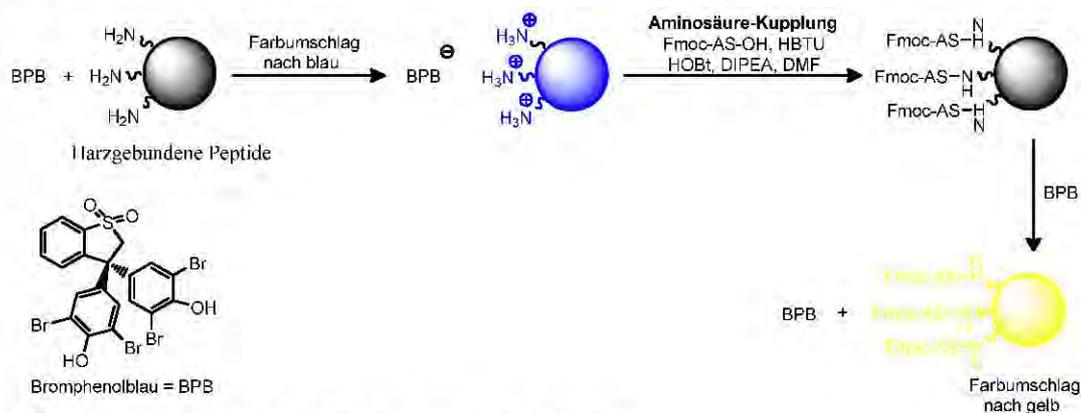


Schema 77: Der Mechanismus der Fmoc-Abspaltung mit Piperidin.

In einer E1cB-Reaktion entsteht zunächst Dibenzofulven, welches mit Piperidin zu einem stabilen Dibenzofulven-Piperidin-Addukt reagiert. Zur Reaktionskontrolle dient die Messung der UV-Absorption des entstehenden Addukts. Der Zyklus wird solange wiederholt bis ein vorprogrammierter Schwellenwert in der UV-Absorption unterschritten wird. Der Vergleich der gemessenen UV-Absorptionswerte dient der Reaktionskontrolle der Schutzgruppenabspaltung. Weiterhin lässt er Rückschlüsse auf die Ausbeute der vorangegangenen Kupplung zu.

Nach dem Aufbau des Peptids wird das (Glyco-)Peptid vom Harz abgespalten und gemäß seines Verwendungszwecks entweder partiell oder komplett durch entsprechende Umsetzungen von den Schutzgruppen befreit.

Die Kupplungsausbeute lässt sich auch durch den *Kaiser-Test*^[351] überprüfen, bei dem nach jeder Kupplung eine Harzprobe von 1 – 3 mg entnommen wird. Diese wird gewaschen, getrocknet und nach dem Versetzen mit den *Kaiser-Testreagenzien* einige Minuten auf über 100 °C erhitzt, wobei sich bei unvollständiger Umsetzung ein charakteristischer Farbumschlag (tief violett) ergibt. Dieses Verfahren ist aufwendig und bringt Substanzverluste mit sich. Des Weiteren ermöglichen Aminosäuren, wie z. B. Serin, Asparagin, Asparaginsäure und sekundäre Amine, wie Prolin, auch bei erfolgreicher Umsetzung keine eindeutigen Schlussfolgerungen. Ein entscheidender Nachteil ist, dass mit zunehmender Peptidlänge der Test bei allen Aminosäuren unzuverlässiger wird, sodass bereits ab der siebten bis achten Aminosäure die gelbe Färbung, die das Indiz vollständiger Kupplung darstellt, nicht immer eindeutig ist. Es wird stattdessen eine grünliche bis gräuliche, trübe Lösung erhalten. Eine Alternative zum *Kaiser-Test* stellt der *Bromphenolblau-Test* dar (Schema 78),^[352] bei dem die Farbe bei einem pH-Wert von 3.0 – 4.6 von blau nach gelb umschlägt.



Schema 78: Die Funktionsweise des Bromphenolblau-Indikators.

Der Farbstoff ist mit den meisten Lösungsmitteln gut löslich und geht keine Reaktionen mit den zugesetzten Reagenzien ein. Nach Anwendung lässt er sich mit einer verdünnten Piperidin- oder *N*-Ethyl-diisopropylamin-Lösung in *N,N*-Dimethylformamid aus dem Harz

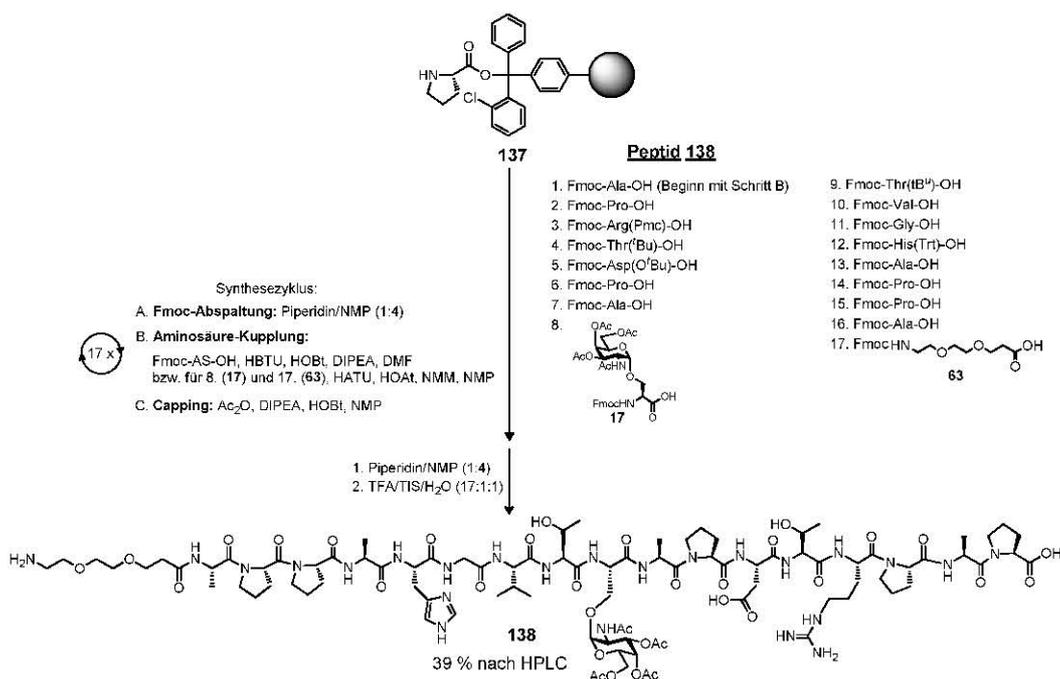
auswaschen. Da für den Test keine Harzprobe entnommen werden muss, kommt es nicht zu Ausbeuteverlusten.

Als Ersatz für den 2-Chlortrityl-Anker kam auch ein mit *para*-Hydroxybenzylalkohol beladenes *TentaGel*[®]-Polystyrolharz mit einer Beladung von 0.16 mmol/g zum Einsatz. Für die Verwendung in einem ABI-433A Peptidsynthesizer mit einer Ansatzgröße von 0.10 mmol erwies sich die Beladung des Harzes als problematisch. So zeigte das Fmoc-Protokoll ein unerwartetes Verhalten bezüglich der UV-Intensität im UV-Abspaltprotokoll an, welche mehr als die max. 100 % betragen konnte. Die Analyse des Sachverhaltes ergab, dass das Problem auf die hervorragende Quelleigenschaft des *TentaGel*[®]-Harzes zurückzuführen ist, wodurch ein beträchtiger Anteil der Lösung aufgesaugt wird, sodass eine hochviskose Masse entsteht. Dabei verhält sich die Fließeigenschaft des Harzes wie die eines nichtnewtonsches Fluids und weist den Charakter der Dilatanz auf. Durch diese Scherverzahnung wird das Harz nicht effektiv genug ausgewaschen, wobei ein Teil der Kupplungslösung trotz Waschens im Reaktor verbleibt und eine gesteigerte Fmoc-Abspaltung vortäuscht. Das Problem konnte nur durch die Verringerung der Ansatzgröße auf 0.05 mmol gelöst werden, da ein Harz mit höherer Beladung nicht erwerbbar war.

3.5.2 Die Synthese von glycosylierten Heptadecapeptiden

Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Glycosylaminosäure-Bausteine wurden in den folgenden Glycopeptidsynthesen an der festen Phase eingesetzt. Im ersten Schritt wird die Darstellung simpler Peptidsequenzen mit Monosacchariden aus dem MUC1-Glycoprotein aufgebaut, um auftretende Probleme zu ermitteln und sie an einfacheren Peptiden zu lösen. Der Fmoc-Strategie folgend wird nach dem allgemeinen Protokoll der automatisierten (Glyco-)Peptid-Festphasensynthese der tandem repeat des MUC-1 von Pro¹ bis Ala¹⁷ in glycosylierter Form mit einfachen Monosacchariden aufgebaut. Zum Einsatz kommt das Polystyrol-Harz **137**, an dem die C-terminale Startaminosäure L-Prolin (Ansatzgröße: 0.1 mmol) über einen 2-Chlortrityl-Anker (2-CT)^[319] an den polymeren Träger gebunden ist. Dieser unterdrückt aufgrund seiner sterisch anspruchsvollen Struktur die Bildung von 2,5-Diketopiperazinen.^[343] Die Verwendung des säurelabilen 2-Chlortrityl-Ankers erlaubt abschließend die simultane Abspaltung vom Harz und sämtlicher Seitenkettenschutzgruppen. Durch die Wiederholung der dreistufigen Reaktionssequenz werden im Peptidsynthesizer die ersten sieben geschützten Aminosäuren gekuppelt. Nach der Fmoc-Abspaltung vom L-Alanin⁸ wird die automatisierte Synthese unterbrochen (Schema 79). Im Anschluss erfolgt die halbautomatische Kupplung von 1.6 Äquiv. der Glycosylaminosäure **17** binnen 8 h unter

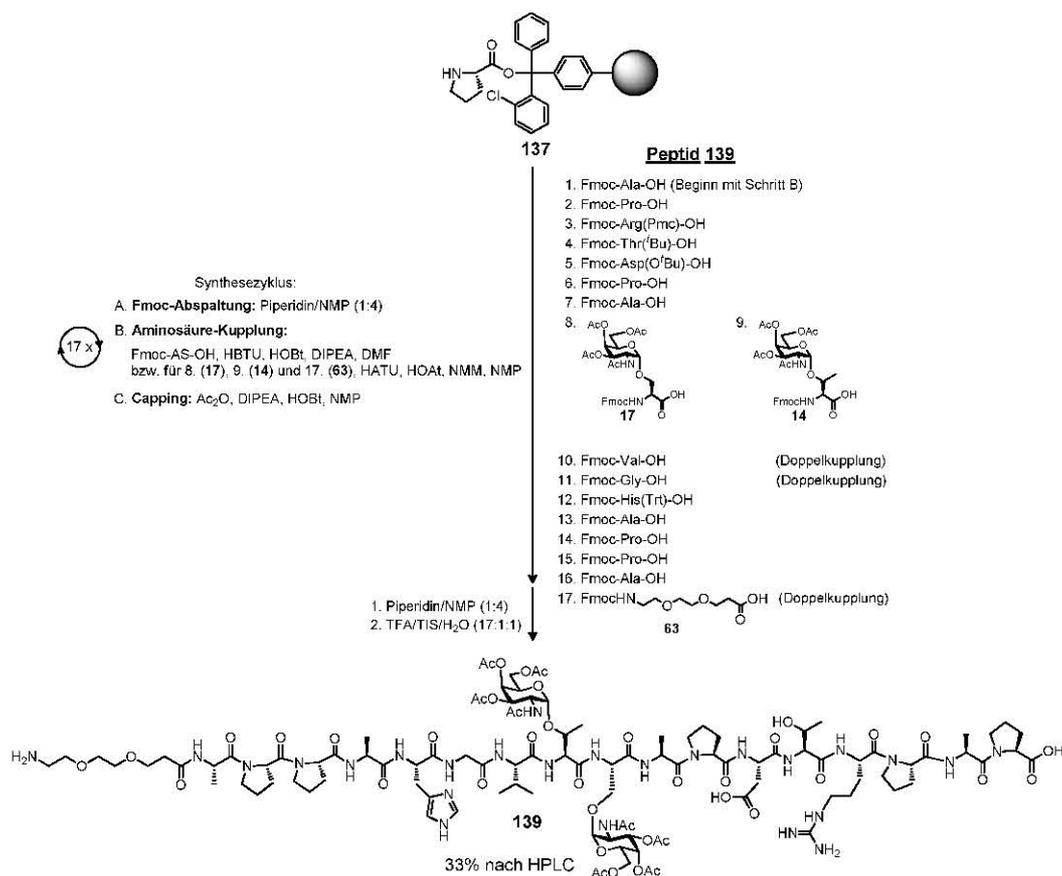
Verwendung der reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU und HOAt in Kombination mit *N*-Methylmorpholin (NMM).



Schema 79: Die Synthese des 17er Glycopeptids **138**.

Danach wird die automatisierte Synthese wieder aufgenommen, wobei die restlichen acht Aminosäuren angeknüpft werden. Im letzten Zyklus wird die Fmoc-Gruppe des L-Alanins¹⁷ abgelöst und der Spacer **63** halbautomatisch mit den reaktiveren Kupplungsreagenzien angebunden. Die Standard-Aminosäuren werden jeweils im Überschuss von 10.0 Äquiv. eingesetzt, wobei zum Schutz der Seitenketten-funktionen bei Asparaginsäure, Serin und Threonin der *tert*-Butylrest, bei Histidin die Trityl(Trt)-Gruppe und bei Arginin die 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl(Pmc)-Gruppe zur Verwendung kommen. Zum Schluss wird das Glycopeptid von der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe befreit und das Produkt acidolytisch durch die Behandlung mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan^[353] als Kationenfänger vom Harz abgelöst und simultan von den säurelabilen Schutzgruppen befreit (Schema 79). Nach präparativer RP-HPLC erhält man das gewünschte partiell geschützte Glycopeptid **138** in einer Ausbeute von 39 % bezogen auf die Startaminosäure am Harz. Die Reinheit des Glycopeptids **138** wird durch analytische RP-HPLC und hoch auflösender Massenspektrometrie bestimmt. Mit der Synthese des monoglycosylierten Peptids ist die Grundlage für die Herstellung weiterer Glycopeptide gelegt. Die Untersuchung des Rohproduktes durch analytische HPLC zeigt, dass sechs kleine Abbruchsequenzen erhalten werden, die darauf zurückzuführen sind, dass die Umsetzung der einzelnen Aminosäuren nicht quantitativ verlief.

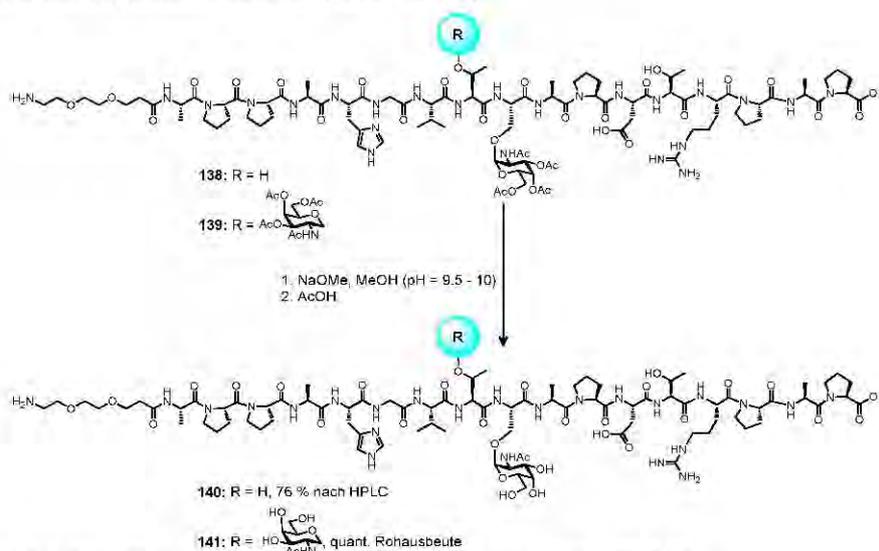
Für das Peptid **139**, das deutlich anspruchsvoller in der Synthese ist, war das Ziel, durch Modifikation der Synthese, eine höhere Ausbeute als für das Peptid **138** zu erzielen (Schema 80).



Schema 80: Die Synthese des Glycopeptids **139**.

Wegen der zwei in der Sequenz aufeinanderfolgenden glycosylierten Aminosäuren und deren sterischen Anspruchs wäre eine geringere Ausbeute zu erwarten. Um diese Faktoren zu berücksichtigen, wird für das glycosylierte L-Threonin¹⁰ **14** ein Überschuss von 3.5 Äquiv. eingesetzt. Des Weiteren werden die darauffolgenden Aminosäuren L-Valin¹¹ und Glycin¹² in Doppelkupplungen verknüpft. Ebenfalls wird der Diethylenglycolspacer **63** doppelt gekuppelt, da bei dem Peptid **138** als Nebenprodukt das spacerfreie Peptid detektiert werden konnte. Nach Abspaltung vom Harz und nach präparativer RP-HPLC fiel das gewünschte partial geschützte zweifach glycosylierte Peptid **139** in einer Ausbeute von 33 % bezogen auf die Startaminosäure am Harz an. Überraschenderweise wurden bei der Reinigung des Peptids **139** über die analytische RP-HPLC zwei Peaks mit unterschiedlichen Retentionszeiten, jedoch mit gleicher molarer Masse detektiert. Die Retentionszeiten liegen bei 22.95 und 25.32 Minuten, wobei der Doppelpeak auch in der präparativen HPLC auftritt. Nach Auftrennung durch präparative HPLC werden die isolierten Substanzen noch einmal in die analytische RP-HPLC eingespritzt. Dieser Vorgang dient der Überprüfung der Reinheit und der Frage, ob es sich bei den zwei Einzelpeaks um die gleiche Substanz handelt. Dies wäre gegeben, wenn beim separaten Einspritzen der beiden Einzelsubstanzen in die analytische RP-HPLC wieder zwei Peaks detektiert werden könnten. Damit liegt der Verdacht nahe, dass es sich nicht um unterschiedliche Isomere, sondern vielmehr um Rotationsisomere handelt, die in der RP-HPLC ein unterschiedliches Elutionsverhalten aufzeigen. Im vorliegenden Fall zeigten

beide Substanzen beim separaten Einspritzen wieder zwei Peaks auf, womit die Annahme bestärkt wird, dass es sich entweder um Rotationsisomere oder um eine reversible Umlagerung handeln muss, was dazu führt, dass beide Fraktionen zusammengeführt werden können. Bedauerlicherweise konnte die Ausbeute nicht gesteigert werden. Die Ausbeute von Produkt **139** liegt trotz der Komplexität mit 33 % in einem vergleichbaren Bereich wie die des Peptids **138**. Anschließend werden die Glycopeptide **138** und **139** von den basenlabilen Schutzgruppen im Glycanteil befreit (Schema 81).



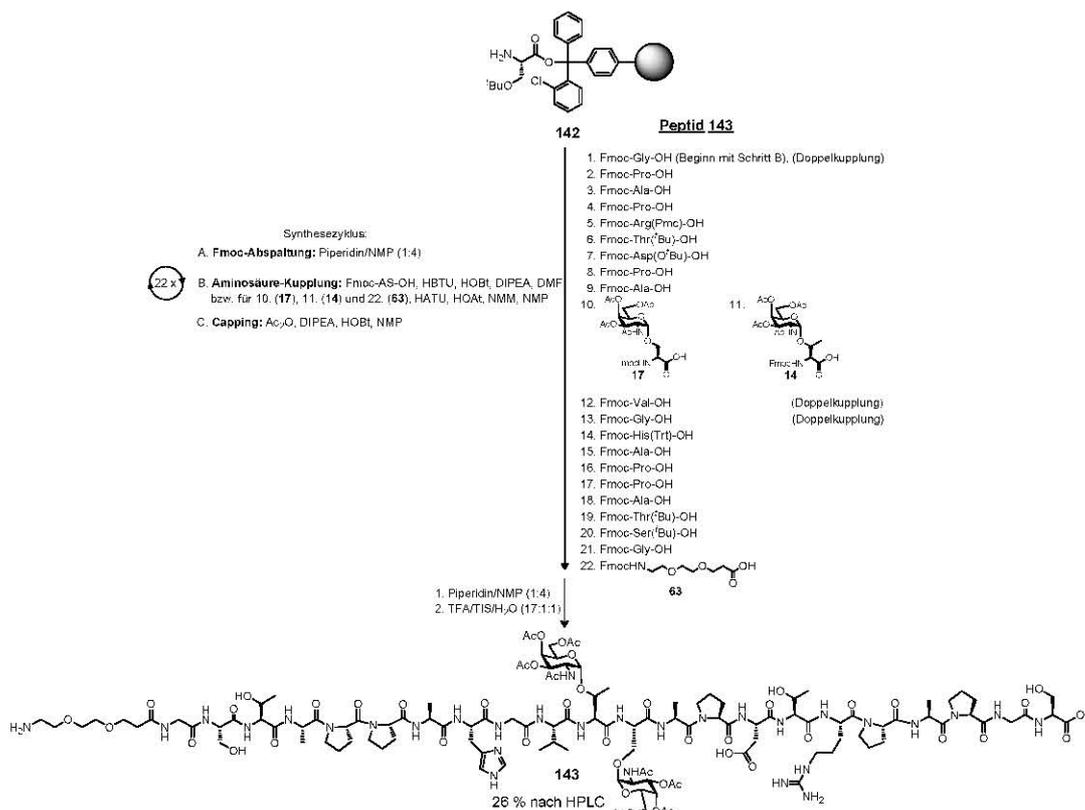
Schema 81: Die Synthese der vollständig deblockierten Glycopeptide **140**, **141**.

Hierzu werden sie in Methanol mit 1%iger Natriummethanolat-Lösung versetzt und solange bei einem pH-Wert von 9.5 bis 10.0 gerührt bis in der analytischen RP-HPLC nur ein Produkt detektiert werden kann. Durch Nachregulierung des pH-Wertes sowie durch die Analyse des Reaktionsansatzes mittels HPLC konnten die Reaktionszeiten auf 16 h für **140** bzw. 18 h für **141** beschränkt werden. Zu beachten ist, dass ein pH-Wert von 10.5 nicht überschritten werden sollte, da mit steigendem pH-Wert die Wahrscheinlichkeit der Racemisierung bzw. Epimerisierung der Aminosäurereste und der β -Eliminierung des Glycans steigt. Nach der Neutralisation mit Essigsäure und Reinigung des Rohproduktes durch semipräparative RP-HPLC erhält man das vollständig deblockierte Glycopeptid **140** in einer Ausbeute von 76 %. Beim Glycopeptid **141** wurde auf eine semipräparative Reinigung verzichtet, da im HPLC-Chromatogramm keine Nebenprodukte nachzuweisen waren. Die Struktur des Glycopeptids **140** wurde von NMR-Spektren und durch Massenspektrometrie belegt, wobei die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale durch zweidimensionale NMR-Experimente erfolgte.

3.5.3 Die Synthese von glycosylierten Docosapeptiden

Der Aufbau der Glycopeptide **143** und **144** erfolgt analog zu der Festphasensynthese des Peptids **139**. Zum Einsatz kommt Polystyrol-Harz **142**, an das L-Serin über den 2-Chlortrityl-

Anker (2-CT)^[319] gebunden ist (Schema 82). Da die verwendeten *Barlos*-Harze *N*-terminal in ungeschützter Form vorliegen und somit kein Zusammenhang zwischen der Fmoc-Abspaltung und der ersten gekuppelten Aminosäure besteht, wird die Synthese so modifiziert, dass die erste Aminosäure doppelt gekuppelt wird. Dadurch wird die UV-Intensität der ersten Fmoc-Abspaltung gleich 100 % gesetzt und dient als Referenzpunkt für die darauffolgenden Umsetzungen. Die nachfolgenden acht Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt, wobei nach der Fmoc-Abspaltung des L-Alanins¹⁰ die automatisierte Synthese unterbrochen wird. Die beiden folgenden glycosylierten Aminosäuren **17** und **14** werden halbautomatisch gekuppelt. Der Glycosylaminosäure-Baustein **17** wird mit 1.6 Äquiv. binnen 8 h und die zweite glycosylierte Aminosäure **14** mit einem Überschuss von 2.0 Äquiv. über 12 h jeweils mit HATU und HOAt gekuppelt. Um die Kupplungsqualität zu überprüfen, kam zum ersten Mal der Indikator Bromphenolblau^[352] vor der Fmoc-Abspaltung zum Einsatz.

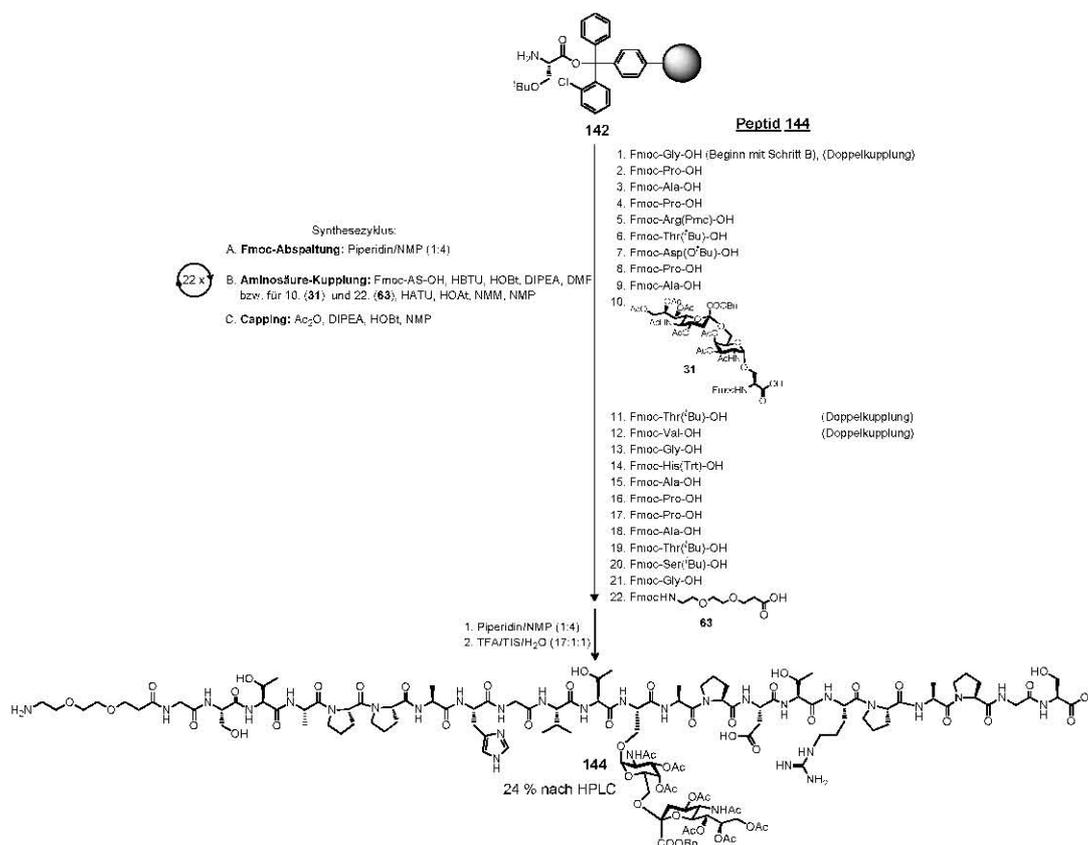


Schema 82: Die Synthese des doppeltglycosylierten Peptids **143**.

Nach der Kupplung der zweiten glycosylierten Aminosäure **14** zeigte der Farbttest eine blaue Färbung an, durch die auf eine „unvollständige“ Umsetzung zu schließen war. Dennoch wurde die Synthese fortgesetzt. Hierzu erfolgte analog zum Peptid **139** eine Doppelkupplung der zwei darauffolgenden Aminosäuren L-Valin¹³ und Glycin¹⁴. Die Kupplung der restlichen acht Aminosäuren erfolgte unter Standardbedingungen. Die Kupplung des Spacers **63** fand halbautomatisch mit 3.0 Äquiv. und HATU/HOAt binnen 16 h statt. Am Schluss der automatisierten Synthese wird von der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe befreit und das Produkt

143 mit Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan^[353] von der Ankergruppe und den säurelabilen Schutzgruppen abgespalten (Schema 82). Nach semipräparativer RP-HPLC erhält man das partiell geschützte Peptid **143** in einer Ausbeute von 26 % bezogen auf die Startaminosäure **142**. Verglichen mit dem Glycopeptid **139** wird eine um 7 % verminderte Ausbeute erhalten. Betrachtet man das Ergebnis nicht absolut, sondern bezieht die um fünf Aminosäuren verlängerte Kettenlänge ein, so relativiert sich dieses. Berechnet man für die beiden Glycopeptide **139** und **143** den geometrischen Durchschnitt pro Kupplungsschritt, so liegt die durchschnittliche Ausbeute pro Aminosäure-Baustein bei 94 %. Wie im Glycopeptid **139** werden bei der Reinigung durch RP-HPLC zwei Produkte mit unterschiedlichen Retentionszeiten jedoch mit gleichen molaren Massen erhalten. Im vorliegenden Fall wurden die Fraktionen erst getrennt isoliert und nach Analyse der zweidimensionalen NMR-Spektren, durch die eine Aspartimidumlagerung ausgeschlossen werden konnte, vereinigt. Das Vorliegen der reinen Verbindung wird durch ein- und zweidimensionale NMR-Spektren und durch hochauflösende Massenspektrometrie bestätigt.

Nach diesen Synthesen wurde nun das Augenmerk auf eine anspruchsvollere Glycosylstruktur gelegt. Zum Einsatz kam der sialylierte Glycosylaminosäure-Baustein **31** (Schema 83).



Schema 83: Die Synthese des Glycopeptids **144**.

Wie bei der Synthese von **143** erfolgt für die erste Aminosäure Glycin² eine Doppelkupplung. Nach Anknüpfung der nächsten Aminosäuren wird die Glycosylaminosäure **31** halbautomatisch mit 1.6 Äquiv. durchgeführt. Die nachfolgenden Aminosäuren L-Threonin¹²

und L-Valin¹³ werden in Doppelkupplungen und die restlichen neun Aminosäuren wieder unter Standardbedingungen angeknüpft. Der Spacer **63** wird daraufhin halbautomatisch angekuppelt. Nach Abspaltung vom Harz und nach semipräparativer RP-HPLC erhält man das partiell geschützte Glycopeptid **144** in einer Ausbeute von 24 % bezogen auf die Startaminosäure. Damit beträgt die Durchschnittsausbeute pro Kupplung annähernd 94 %. Im Gegensatz zu dem doppelt glycosylierten Peptid **143** ist im RP-HPLC-Chromatogramm des Glycopeptids **144** nur ein Produkt detektierbar. Daraus folgt, dass bevorzugt bei doppelt glycosylierten Peptiden, bei denen die Saccharidbausteine direkt aufeinander folgen, Rotationsisomere mit unterschiedlichen Retentionszeiten im HPLC-Chromatogramm aufgefunden werden können. Dieses Verhalten konnte auch bei dem Glycopeptid **145** beobachtet werden, welches im Experimentaltteil aufgrund zu niedriger Ausbeute nicht beschrieben wird (Abbildung 29).

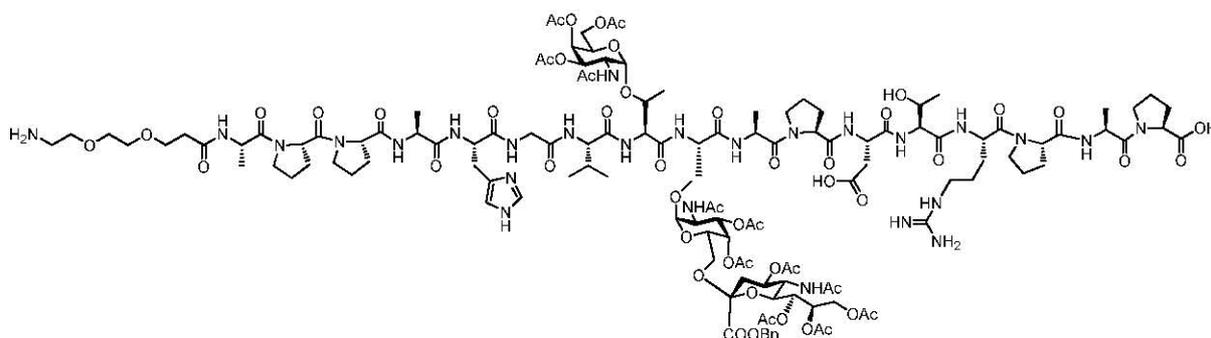
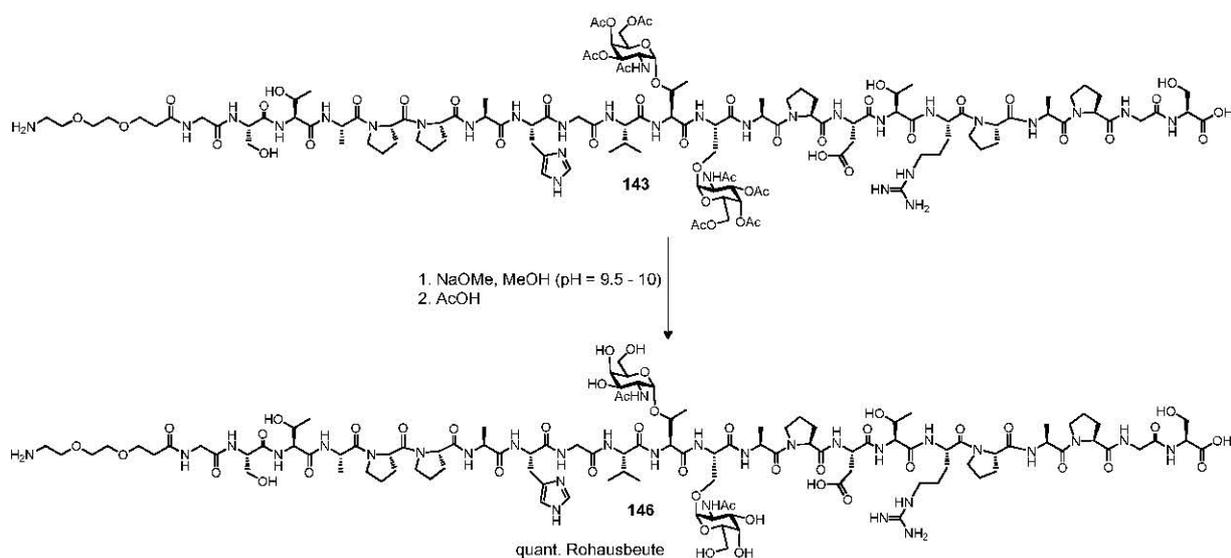


Abbildung 29: Das doppelt glycosylierte Peptid **145**.

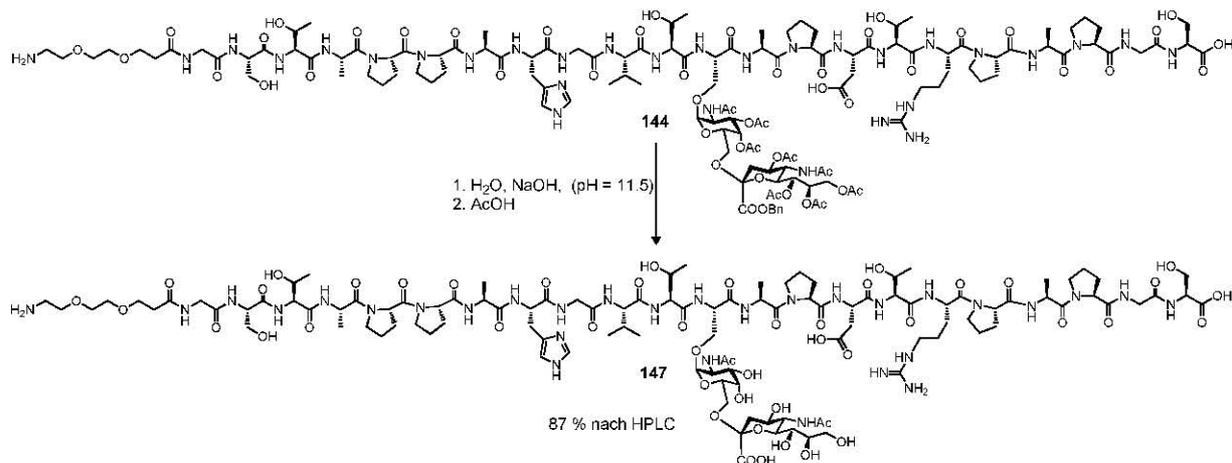
Die beiden Glycopeptide **143** und **144** müssen von den verbliebenen Schutzgruppen im Glycanteil befreit werden. Dazu wird Glycopeptid **143** in Methanol mit 1%iger Natriummethanolat-Lösung bei einem pH-Wert von 10.0 solange gerührt, bis die analytische RP-HPLC einen vollständigen Umsatz anzeigt (Schema 84). Nach 18 h Rühren war das Edukt vollständig umgesetzt und die Lösung wurde mit konzentrierter Essigsäure neutralisiert. Semipräparative Chromatographie war aufgrund ausreichender Reinheit nicht erforderlich.



Schema 84: Die Deblockierung des Glycopeptids **143**.

Die im Reaktionsprodukt befindlichen Salze stören die nachfolgende Umsetzung nicht, sodass das Rohprodukt **146** nur durch Massenspektrometrie charakterisiert wird. Nach der sich anschließenden Reaktion mit Quadratsäurediethylester (vgl. Abschnitt 3.8.2.2) erfolgt die Reinigung und Charakterisierung des gebildeten Produktes.

Für das Glycopeptid **144** musste zusätzlich zu den Acetylgruppen der vorhandene Benzylester entweder hydrogenolytisch über Palladium auf Aktivkohle oder durch Verseifung gespalten werden. Da später (vgl. Abschnitt 3.5.4) die Synthese von vollgeschützten Glycopeptiden mit deblockierten Glycanteil geplant war, sollte am vorliegenden Glycopeptid **144** der Zugang zu diesen validiert werden. Die Hydrogenolyse scheidet wegen der vorhandenen Spaltung der Trityl(Trt)-Schutzgruppe aus. Die Entfernung sowohl des Benzylesters als auch der Acetylgruppen kann im einstufigen Prozess simultan mit wässriger Natriumhydroxid-Lösung bei einem pH-Wert von 11.5 erfolgen (Schema 85). Im zweistufigen Prozess erfolgt in Methanol bei einem pH-Wert von 9.0 zunächst die Umesterung zum Sialinsäuremethylester unter gleichzeitiger Abspaltung der Acetylgruppen. Dies hat den Vorteil, dass sich sowohl ungeschützte als auch geschützte Glycopeptide im Lösungsmittel lösen und die Einstellung des pH-Wertes leichter ist, wodurch die Reaktionsführung einfacher reguliert werden kann.



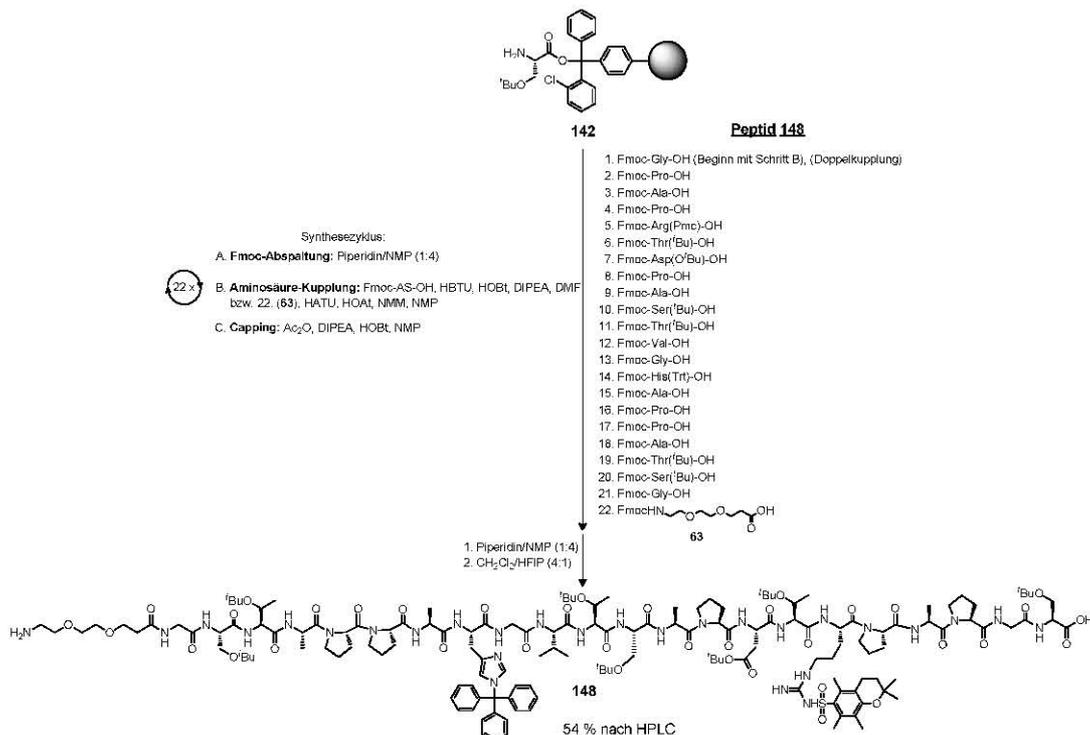
Schema 85: Die Deblockierung des Glycopeptids 147.

Dieser neugebildete Methylester wird aufgearbeitet, bevor er unter basischen Bedingungen zum gewünschten Produkt umgesetzt wird. Der einstufige Prozess hat den Vorteil, dass beide Schutzgruppen simultan entfernt werden können und eine Aufarbeitung nicht nötig ist. Als Nachteil muss jedoch erwähnt werden, dass vollgeschützte Glycopeptide nicht in Wasser löslich sind und somit auf der Wasseroberfläche schwimmen, wobei die Wasserlöslichkeit mit zunehmender Abspaltung der basenlabilen Schutzgruppen steigt. Auch die Einstellung des pH-Wertes ist nicht unproblematisch. So ist ein deutlich höherer pH-Wert in Wasser als in Methanol notwendig, um die Glycanbausteine von den Acetylschutzgruppen zu deblockieren, was unter Umständen zu Nebenreaktionen führen kann. Im vorliegenden Fall wurde das

Glycopeptid **144** in Wasser gelöst und die Schutzgruppen mit Natriumhydroxid bei einem pH-Wert von 11.5 von sämtlichen basenlabilen Schutzgruppen befreit. Obwohl die Umsetzung langsamer abläuft als die Umesterung unter *Zemplén*-Bedingungen, kann das deblockierte Glycopeptid **147** nach Reinigung über die semipräparative HPLC in einer Ausbeute von 87 % isoliert werden (Schema 85).

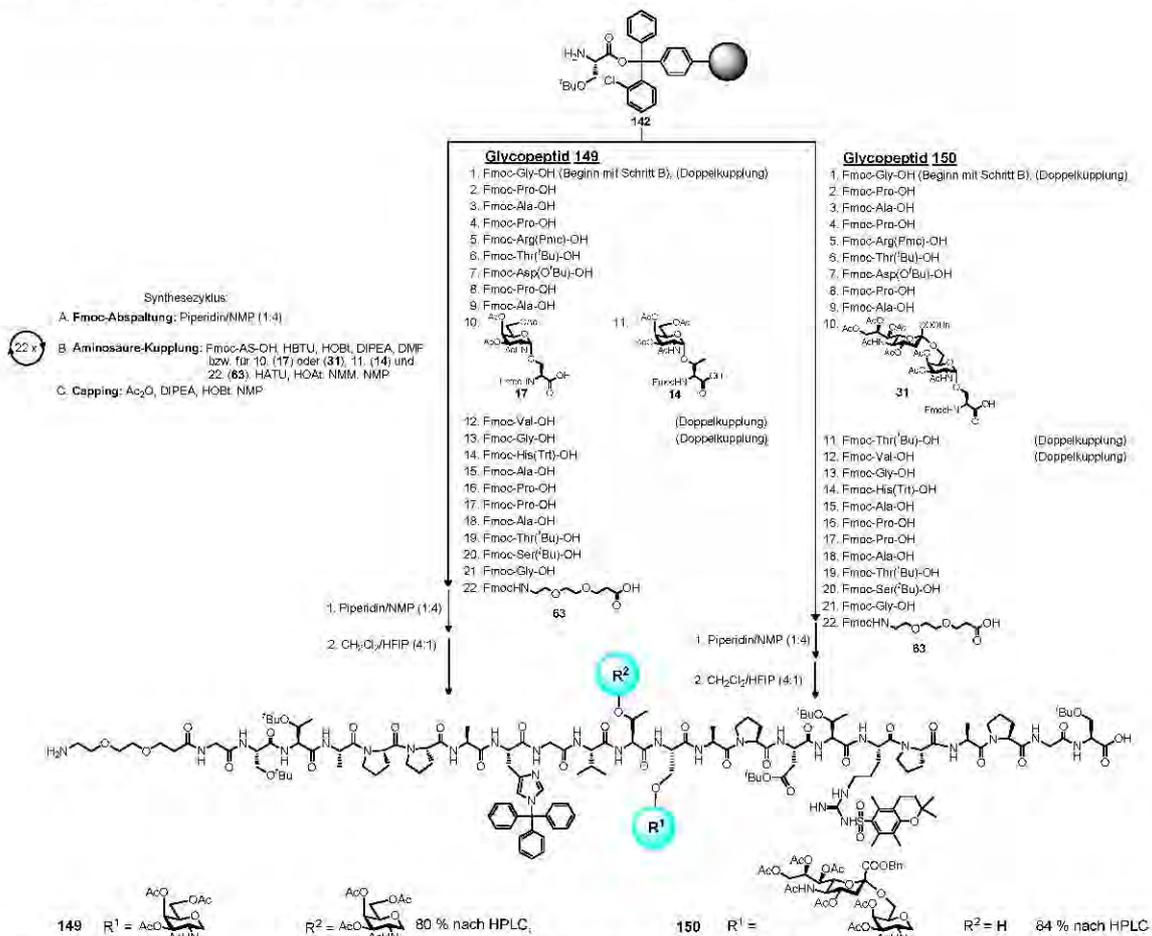
3.5.4 Die Synthese von geschützten glycosylierten Docosapeptiden

Das folgende Kapitel beschreibt die Synthesen geschützter Glycopeptide, um sie in kombinatorischer Weise an verschiedene Fragmente anknüpfen zu können. Diese Synthesen bedürfen eines Ankers, von dem das Glycopeptid unbeschadet freigegeben wird, wobei die Seitenkettenschutzgruppen im Glycopeptid erhalten bleiben. Der verwendete *Barlos*-Anker erlaubt eine milde Abspaltung vom Harz.^[320] Da die Abspaltung des Glycopeptids in Essigsäure, Trifluorethanol und Dichlormethan^[319] bei den zuvor beschriebenen Heptadecapeptiden mit einer Nebenreaktion verbunden war und es zu einer Umesterung des L-Asparaginsäure-*tert*-butylrests mit Trifluoroethanol kam, was sowohl massenspektrometrisch als auch durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte, wurde das von *Bollhagen et al.* verwendete Hexafluoroisopropanol eingesetzt.^[354] Zunächst sollte das unglycosylierte Docosapeptid synthetisiert werden, an dem die geplanten Fragmentkondensationen studiert werden können (Schema 86).



Schema 86: Die Synthese des unglycosylierten Peptids **148**.

Die unglycosylierten Peptid-Adjuvanskonjugate können bei immunologischen Tests als Referenzsubstanzen und zur Ermittlung des Anteils der Glycane an der gesamt immunologischen Antwort dienen. Durch Wiederholung der dreistufigen Reaktionssequenz werden im Peptidsynthesizer 21 Aminosäuren gekuppelt, wobei für das Glycin² als erste Aminosäure eine Doppelkupplung erfolgt (Schema 86). Abschließend wird die halbautomatische Kupplung mit 4.0 Äquiv. des Spacers **63** und HATU/HOAt binnen 16 h vorgenommen. Nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe wird das Peptid mit Dichlormethan und Hexafluoroisopropanol (HFIP) (4:1) vom Harz abgelöst. Nach semipräparativer RP-HPLC erhält man das partiell geschützte Peptid **148** in einer Ausbeute von 54 % bezogen auf die Startaminosäure, wodurch sich eine durchschnittliche Ausbeute von 97.2 % pro gekuppelten Baustein ergibt. Das Peptid wurde sowohl durch hochauflösende Massenspektrometrie als auch durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie charakterisiert. Anschließend wurde das Glycopeptid **149** analog zum Glycopeptid **143** und das Glycopeptid **150** analog zum Glycopeptid **144** synthetisiert (Schema 87).



Schema 87: Die Synthese der glycosylierten vollgeschützten Glycopeptide **149** und **150**.

Dabei blieben die eingesetzten Mengen und die angewandten Kupplungszeiten gleich. Die Synthese der vollgeschützten Glycopeptide **149** und **150** wurde zweifach durchgeführt, wobei sich die angegebenen Werte auf die Zweitsynthese beziehen. Der Zeitraum zwischen den

beiden Synthesen betrug eine Woche. Die Ausbeuten waren sehr unterschiedlich. So wurde bei der erstmaligen Synthese des Glycopeptids **149** eine Ausbeute von 47 %, bei der Zweitsynthese eine Ausbeute von 80 % nach Reinigung erhalten. Für das Glycopeptid **151** lag die Ausbeute bei der Erstsynthese bei 28 % und bei der Zweitsynthese bei 84 % nach Reinigung. Da sowohl die Substanzen als auch das Syntheseprotokoll gleich waren, konnte das Problem nicht auf diese zurückgeführt werden. Übrig blieben nur die angesetzten Lösungen und das Gerät an sich. Da der Ansatz der Reagenzien eine Routinearbeit ist und viele Male durchgeführt wurde, kann dies als Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Die Fehlerquelle lag somit vermutlich beim Gerät selbst. So wurden die beiden Zweitsynthesen nach einer Gerätereperatur und Wartung des ABI-433A Peptidsynthesizers durchgeführt, in der sowohl das Multifunction board (Part Number 603409) als auch das Delivery valve assembly 11 port (Part Number 601374) ausgetauscht wurden. Eine genauere Eingrenzung ist leider nicht möglich, jedoch wirkten sich der Austausch sowie die Wartung äußerst positiv auf die Festphasensynthese aus.

Anhand der Tabelle 2 wird aufgezeigt, wie sich kleine Änderungen der geometrischen Ausbeute pro Kupplungsschritt auf die Gesamtausbeute bei einer 22-stufigen linearen Synthese auswirken.

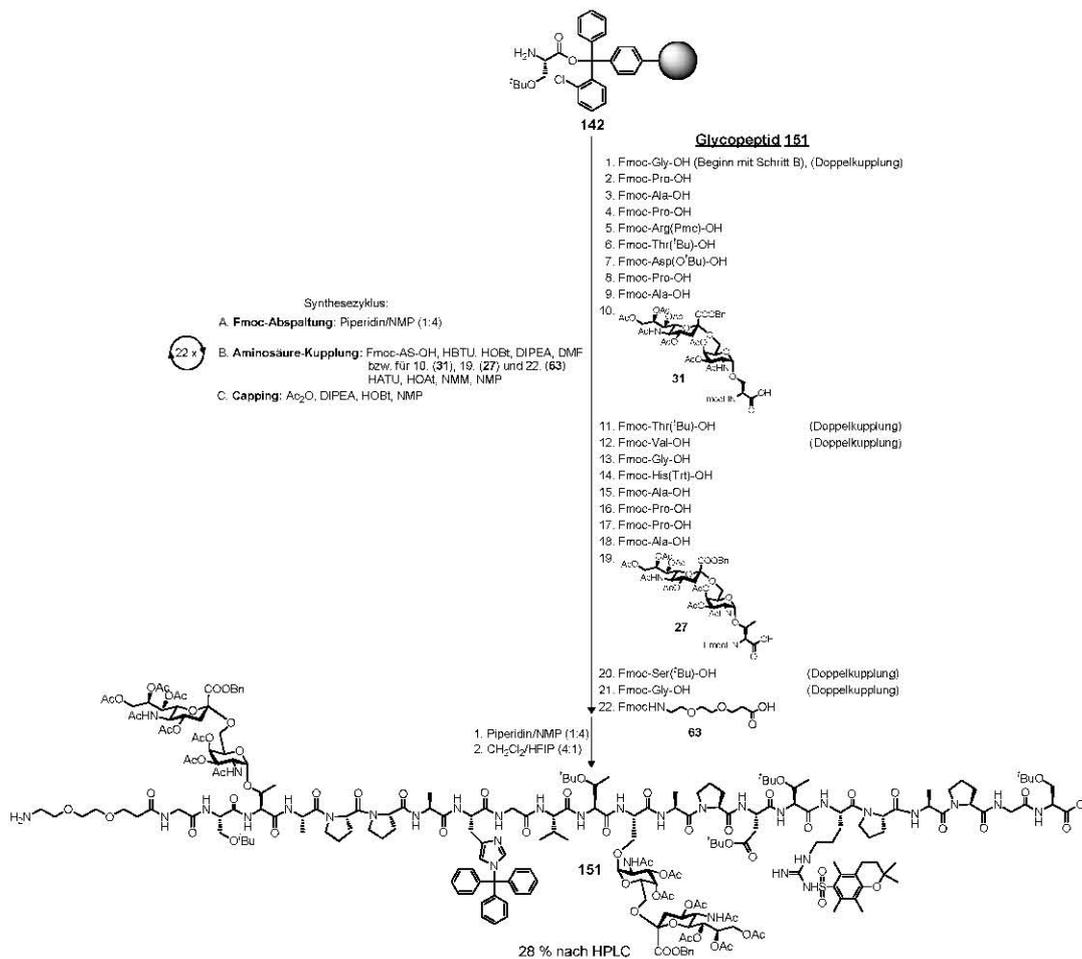
(Glyco-)Peptid	Ausbeute nach HPLC in %	Geometrische Ausbeute pro Kupplungsschritt in %
143	26	94.1
144	24	93.7
148	54	97.2
149 Erstantatz	47	96.6
149 Zweitansatz	80	99.0
150 Erstantatz	28	94.4
150 Zweitansatz	84	99.2

Tabelle 2: Berechnung der geometrischen Ausbeuten pro Kupplungsschritt.

Es wird ersichtlich, dass äußerst kleine Schwankungen im Synthesizer auch bei guter Funktion bei ausreichend langen Synthesen zu kleinen Gesamtausbeuten führen können.

Die synthetisierten vollgeschützten Glycopeptide müssen nach der semipräparativen RP-HPLC-Reinigung vorsichtig aufgearbeitet werden, da es sonst leicht zum Verlust der Trityl- und der 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl(Pmc)-Gruppe kommt. Für das doppelt glycosylierte Peptid **149** konnte anders als zuvor bei den Glycopeptiden **139** und **143**, kein Doppelpeak in der RP-HPLC beobachtet werden. Da sich die Glycopeptide **143** und **149** nur in den Schutzgruppen unterscheiden, müssen diese für das unterschiedliche Konformationsverhalten verantwortlich sein. Nach der Synthese der einfacheren wurden aufwendigere vollgeschützte Glycopeptide synthetisiert, an denen sich Einflussfaktoren, wie die Anzahl der Antigene und der Austausch der Aminosäure am Antigen, ermitteln lassen.

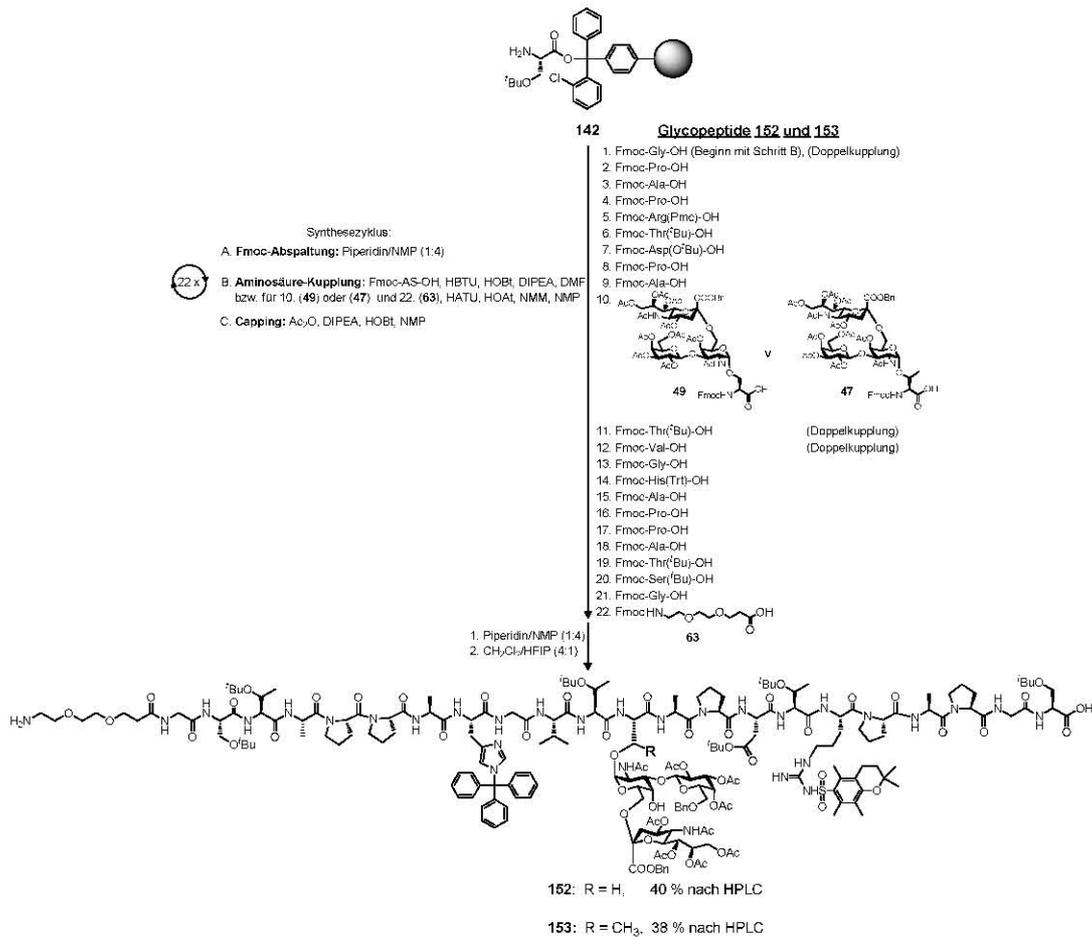
Dies gilt für das doppelt glycosylierte Peptid **151**, welches jeweils am L-Serin¹¹ und am L-Threonin²⁰ ein ST_N-Antigen trägt (Schema 88).



Schema 88: Die Synthese des doppelt glycosylierten vollgeschützten Glycopeptids **151**.

Die Synthese verläuft bis zur Kupplung des L-Alanin¹⁹ analog zur Synthese des Glycopeptids **150**. Die Kupplung des glycosylierten L-Threonins²⁰ **27** erfolgt halbautomatisch mit 1.6 Äquiv. und den reaktiveren Kupplungsreagenzien, wobei laut Fmoc-Abspaltprotokoll ein Abfall in der Ausbeute nach der Kupplung sichtbar wird. Die darauffolgenden Aminosäuren L-Serin²¹ und Glycin²² werden doppelt gekuppelt, um weitere Ausbeuteverluste zu vermeiden. Nach Abspaltung vom Harz konnte das vollgeschützte Glycopeptid **151** nach semipräparativer RP-HPLC-Reinigung in einer Ausbeute von 28 % isoliert werden. Betrachtet man, dass es sich um ein doppelt glycosyliertes Peptid handelt, so ist die Ausbeute verglichen mit anderen Glycopeptidsynthesen als gut zu beurteilen.

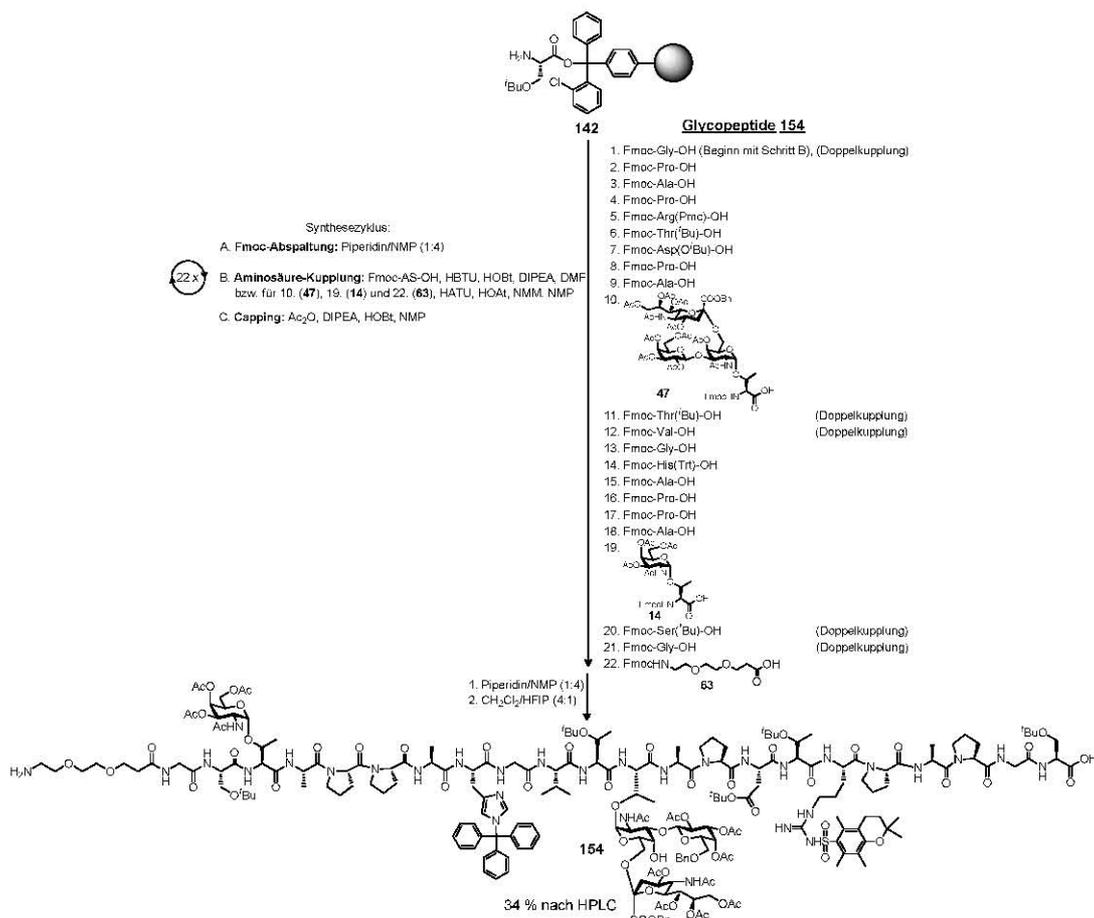
Schließlich wurden zwei monoglycosylierte Peptide aufgebaut, die jeweils das (2,6)-ST-Antigen tragen, wobei im Glycopeptid **153** L-Serin¹¹ durch ein L-Threonin¹¹ ersetzt wurde (Schema 89).



Schema 89: Die Synthese der vollgeschützten Glycopeptide **152** und **153**.

Mit dem Austausch des glycosylierten Serins¹¹ durch das glycosylierte Threonin¹¹ kann ermittelt werden, ob die zusätzliche Methylgruppe einen Einfluss auf die Immunantwort ausüben wird. Sollte sich die Immunantwort zwischen dem natürlich glycosylierten Peptid **152** und dem substituierten Glycopeptid **153** nicht unterscheiden, so könnte der betriebene Syntheseaufwand verringert werden. Die Synthesen der Glycopeptide **152** und **153** wurden in gleicher Weise durchgeführt. Das Serin-tragende glycosylierte Peptid **152** wurde nach semipräparativer RP-HPLC-Reinigung in einer Ausbeute von 40 % isoliert, während das Threonin-tragende Glycopeptid **153** in einer nahezu identischen Ausbeute von 38 % erhalten wurde. Bei der RP-HPLC-Reinigung fiel auf, dass sich die Anwesenheit der zusätzlichen Methylgruppe sowohl in der analytischen als auch in der semipräparativen Säule in den Retentionszeiten niederschlägt. So waren in beiden Fällen die Retentionszeiten für das Glycopeptid **153** länger als für das Glycopeptid **152**.

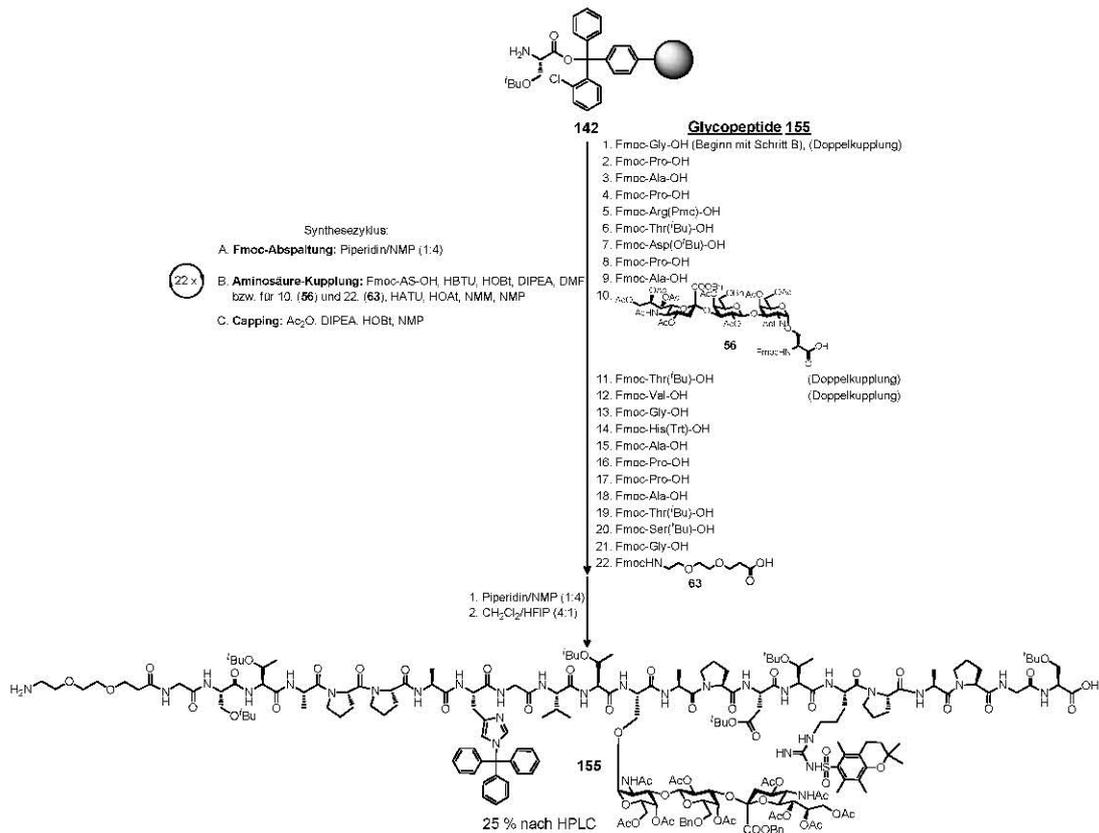
Nach der Synthese der beiden Glycopeptide **152** und **153** wurde ein weiteres Peptid analog zum Glycopeptid **153** synthetisiert, welches an der Aminosäure Threonin²⁰ ein weiteres T_N-Antigen trägt (Schema 90).



Schema 90: Die Synthese des doppelt glycosylierten Peptids **154**.

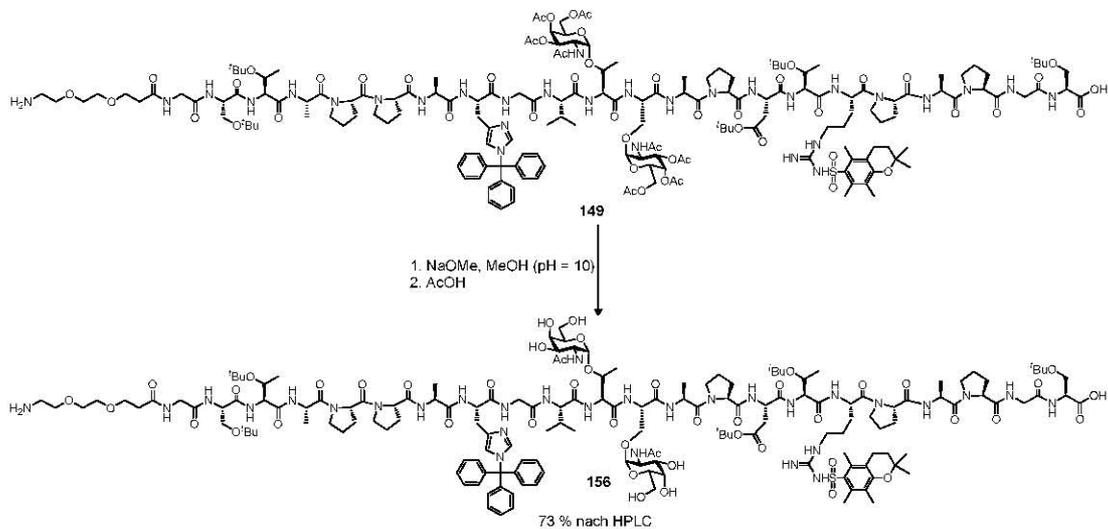
Der T_N-Antigen-Baustein wurde in 3.5 Äquiv. eingesetzt und halbautomatisch gekuppelt. Durch die zusätzliche Glycosylierung wurde eine geringere Ausbeute verglichen zum Glycopeptid **153** erwartet. Das Glycopeptid **154** konnte nach semipräparativer RP-HPLC-Reinigung in einer Ausbeute von 34 % isoliert werden und liegt somit 4 % niedriger als für das Glycopeptid **153**. Die RP-HPLC zeigt deutlich, dass bei gleichen chromatographischen Bedingungen das zusätzliche Glycan im Glycopeptid **154** zu einer Abnahme der Retentionszeit im Vergleich zum Glycopeptid **153** führt.

Abschließend wurde das (2,3)-ST-Antigen-tragende Glycopeptid **155** synthetisiert. Von allen vollgeschützten synthetisierten Glycopeptiden war die Ausbeute für das Glycopeptid **155** nach semipräparativer RP-HPLC-Reinigung mit 25 % am geringsten (Schema 91). Laut Messung der UV-Absorption der Fmoc-Abspaltungslösung war eine signifikante Abnahme der Kupplungsausbeute bei der Anbindung des (2,3)-ST-Antigens **56** zu verzeichnen. Hierin spiegelt sich der sterische Anspruch des Antigen-Bausteins **56** wider.



Schema 91: Die Synthese des vollgeschützten Glycopeptids **155**.

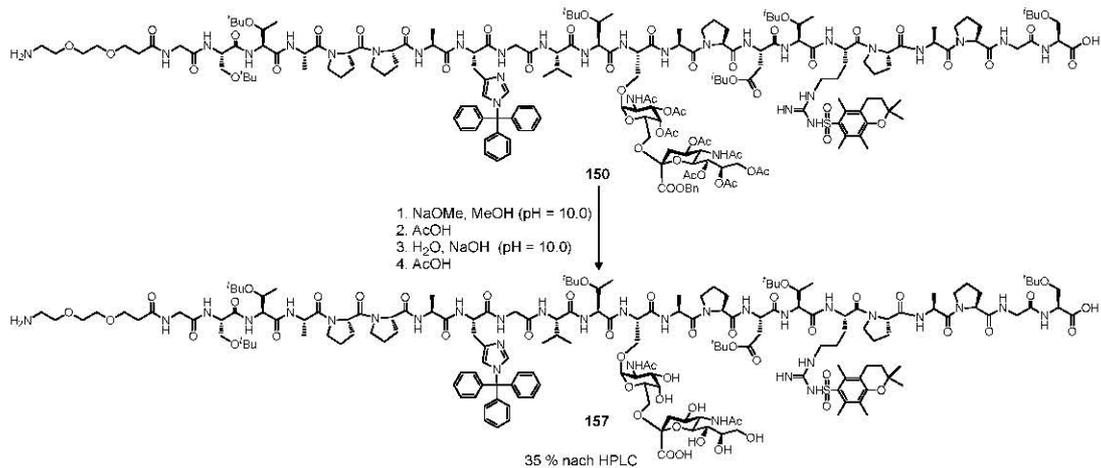
Nach der Synthese und Charakterisierung der acht vollgeschützten (Glyco-)Peptide müssen diese bis auf Peptid **148** partiell sowohl von den basenlabilen als auch hydrogenolytischen Schutzgruppen im Glycanteil befreit werden. Am einfachsten ist dies am Glycopeptid **149** zu bewerkstelligen, da es nur Acetylgruppen trägt, die durch Umesterung nach Zemplén^[123] bei einem pH-Wert von 10.0 entfernt werden (Schema 92). Das partiell entschützte Glycopeptid **156** wird nach semipräparativer RP-HPLC-Reinigung in einer Ausbeute von 73 % isoliert. Dabei werden neben dem gewünschten Produkt drei Nebenprodukte erhalten.



Schema 92: Die Synthese des partiell deblockierten Glycopeptids **156**.

Wahrscheinlich ist es bei der semipräparativen Reinigung in der HPLC wegen der geringen Menge an Trifluoressigsäure zu einem partiellen Verlust der Trityl- und/oder der Pmc-Gruppe gekommen. Dieser Verlust der Schutzgruppen in den Seitenketten ist im HPLC-Chromatogramm durch die starke Abnahme der UV-Absorption für das Glycopeptid abzulesen, während zwei neue Peaks, die den beiden Schutzgruppenstrukturen entsprechen, mit einer starken UV-Intensität auftreten. Gleichzeitig verringert sich die Retentionszeit der unerwünschten Produkte, wodurch diese leicht vom Produkt **156** abgetrennt werden können. Die Nebenprodukte wurden zwar getrennt isoliert, jedoch weder charakterisiert noch in der Ausbeute mitberücksichtigt. Das erhaltene partiell deblockierte Glycopeptid **156** wird durch zweidimensionale NMR-Spektren charakterisiert. Hierzu werden die Spektren in deuteriertem Dimethylsulfoxid aufgenommen, wodurch sowohl im COSY- als auch im TOCSY-Spektrum zusätzlich die Signale der NH-Protonen sichtbar werden. So konnten fast alle ^1H - und ^{13}C -Signale eindeutig den entsprechenden Kernen zugeordnet werden. Für den Peptidteil gelingt die Zuordnung vollständig, ist jedoch im COSY-Spektrum nicht immer eindeutig. Durch die Zuordnung der Kreuzpeaks im TOCSY-Spektrum werden zusätzliche Informationen erhalten, die auch eine Zuordnung der NH-Protonen und die Zuordnung anderer unklarer Signale im COSY-Spektrum ermöglichen. Für die beiden Galactosamin-Bausteine werden separierte Signale sowohl für die Protonen H1 bis H3 als auch für die Kohlenstoffatome erhalten. Für die Protonen H4 bis H6_{ab} kann aufgrund der starken Signalüberlagerungen der Galactosamin-Bausteine nicht immer zweifelsfrei jedes Signal dem jeweiligen Baustein zugeordnet werden. Die Struktur des Glycopeptids **156** kann zweifelsfrei belegt werden. Weitere Daten liefert auch das HMBC-Spektrum, in dem einige der quartären Kohlenstoffe identifiziert werden konnten.

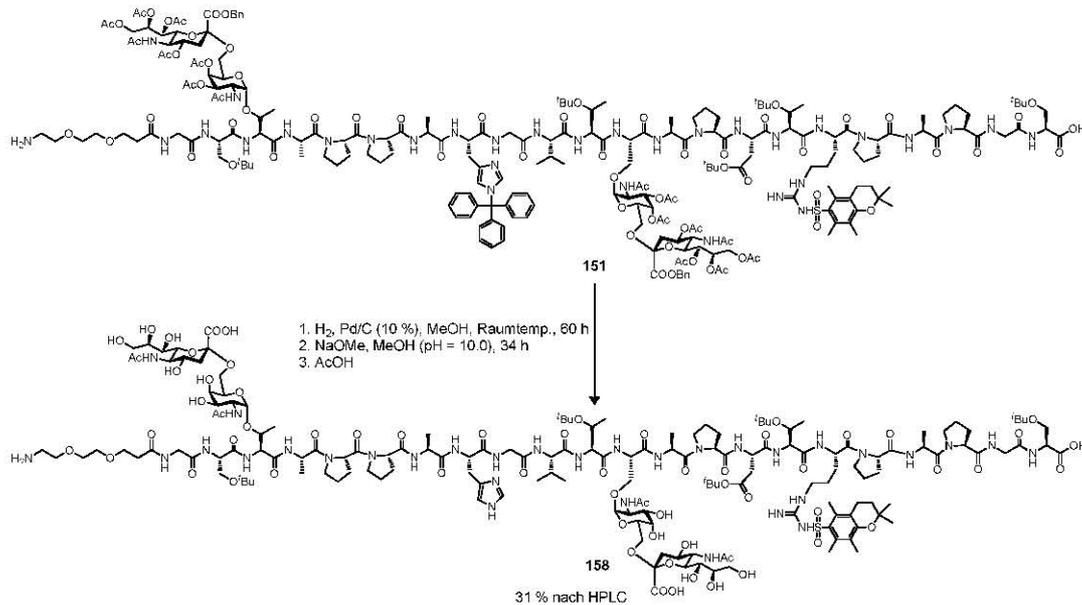
Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, müssen vom Glycopeptid **150** die basenlabilen Schutzgruppen entfernt werden. Da eine hydrogenolytische Abspaltung des Benzylesters mit einem Verlust der Trityl-Gruppe einherginge, wurde zunächst versucht, das Problem durch Umesterung bei einem pH-Wert von 10.0 nach *Zemplén* zu lösen. Dabei geht der Benzylester in den Methylester über (Schema 93). Dieser muss anschließend mit wässriger Natronlauge bei einem pH-Wert von 10.0 verseift werden. Dabei wird auch eine evtl. verbliebene Acetatfunktion hydrolysiert, die trotz Monitoring durch die analytische RP-HPLC und nachfolgende Massenspektrometrie nicht zweifelsfrei nachzuweisen war. Grund hierfür ist, dass der erhaltene Massenpeak bei einer einfachen Acetylierung und einem dreifach protonierten Produkt $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ -Peak sehr ähnlich zu dem Addukt aus dem vollständig deacetylierten Produkt mit den unterschiedlich geladenen Ionen $[\text{M}+\text{H}+2\text{Na}]^{3+}$ ist und somit bei einfachen Massenspektren nicht eindeutig zugeordnet werden kann.



Schema 93: Die Synthese des partiell deblockierten Glycopeptids **157**.

Das partiell deblockierte Glycopeptid **157** wurde nach RP-HPLC-Reinigung in einer Ausbeute von 35 % erhalten. Dabei konnten zusätzlich ca. 24 % einer Mischfraktion aus dem Glycopeptid **157**, welchem die Trityl-, die Pmc-Gruppe oder beide Schutzgruppen fehlen, isoliert werden.

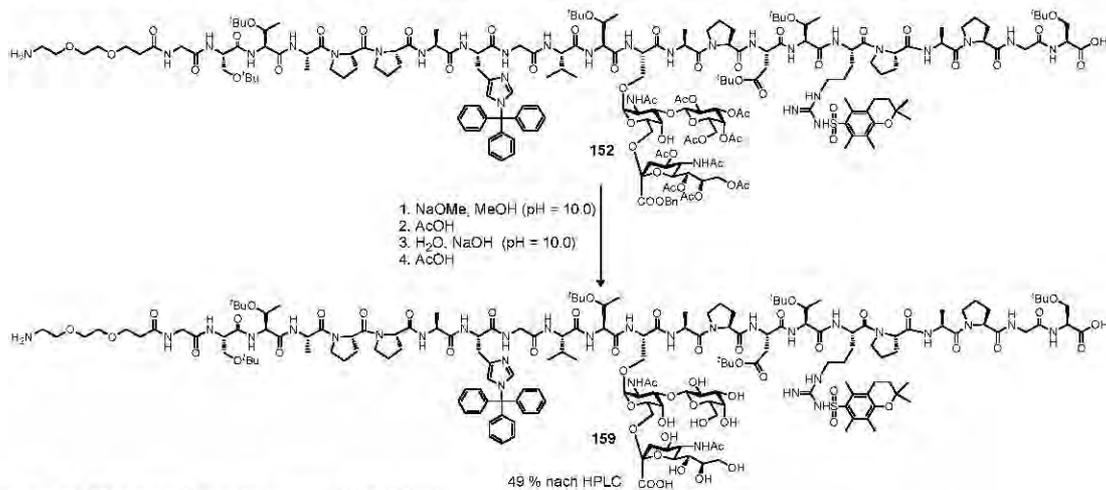
Aufgrund der nur mäßigen Ausbeute wurde bei der Deblockierung des Glycopeptids **151** ein anderer Weg gewählt. Hierbei wurde zuerst der Benzylester hydrogenolytisch mit Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre gespalten (Schema 94).



Schema 94: Die Synthese des partiell deblockierten Glycopeptids **158**.

Dabei kommt es zum Verlust der Trt-Gruppe.^[355] Im Anschluss wurden die basenlabilen Acetylgruppen durch Umesterung nach Zemplén^[123] bei einem pH-Wert von 10.0 hydrolysiert. Nach Aufarbeitung und semipräparativer RP-HPLC-Reinigung wird das Glycopeptid **158** in einer Ausbeute von 31 % isoliert. Zusätzlich wurden noch 21 % des partiell deblockierten Glycopeptids erhalten, bei dem es zum Verlust der Pmc-Gruppe kam. Weiterhin trat bei diesem Glycopeptid aufgrund der langen Reaktionszeiten eine Umesterung in der Seitenkette der Asparaginsäure auf, indem der *tert*-Butylester in den Methylester

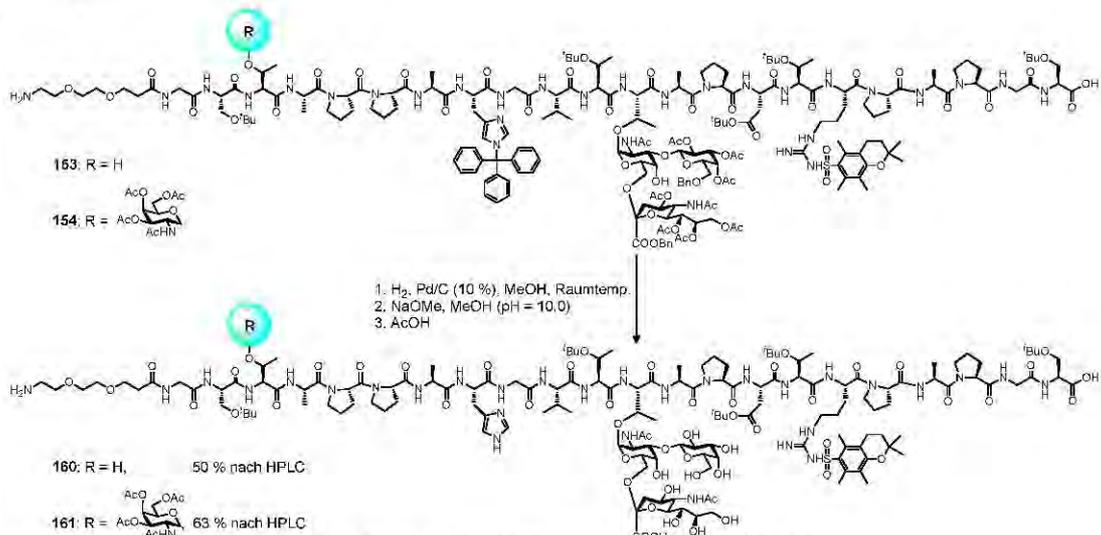
umgeestert wurde. Da die Glycan-Schutzgruppen im Glycopeptid **152** letztlich alle durch milde Verseifung entfernbare sind, wird auf die hydrogenolytische Abspaltung des Benzylesters verzichtet. Hierzu wird das Glycopeptid **152** in Methanol gelöst und unter *Zemplén*-Bedingungen^[123] von den basenlabilen Acetylgruppen befreit (Schema 95). Der erhaltene Methylester wird anschließend vorsichtig in wässriger Natronlauge bei einem pH-Wert von 10.0 hydrolysiert. Diese gesammelten Erfahrungen kamen bei der Deblockierung im Glycopeptid **157** zur Anwendung, wobei auf eine kurze Reaktionsdauer und eine sehr genaue Einstellung des pH-Wertes geachtet wurde. So konnte die Ausbeute nach Aufarbeitung und semipräparativer RP-HPLC auf 49 % gesteigert werden.



Schema 95: Die Synthese des partiell deblockierten Glycopeptids **159**.

Zusätzlich wurde eine Mischfraktion von ca. 15 % des Glycopeptids **159**, welchem die Trityl- oder die Pmc-Schutzgruppe oder auch beide Schutzgruppen fehlen, erhalten.

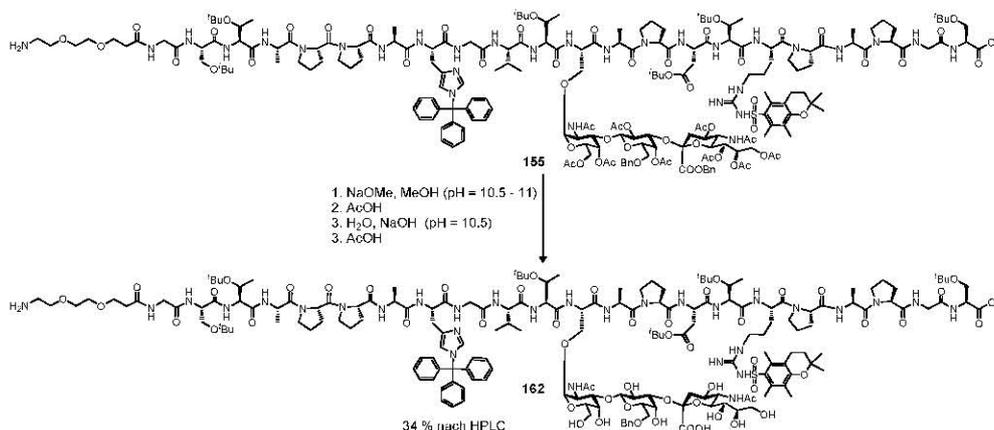
Für die vollgeschützten Glycopeptide **153** und **154** war diese Variante nicht anwendbar, da in der 6-Position der Galactose ein Benzylether vorhanden ist. Da dieser nur hydrogenolytisch entfernbare ist, wird im ersten Schritt sowohl der Benzylether als auch der Benzylester gespalten (Schema 96).



Schema 96: Die Synthese der partiell deblockierten Glycopeptide **160** und **161**.

Hierzu werden die vollgeschützten Glycopeptide **153** und **154** in Methanol über Palladium auf Aktivkohle hydriert, wobei bei beiden Glycopeptiden die Trityl-Gruppe verloren geht. Anschließend wurden die basenlabilen Acetylgruppen in Methanol mit Natriummethanolat gespalten. Nach semipräparativer RP-HPLC-Reinigung wurde das partiell geschützte Glycopeptid **160** in einer Ausbeute von 50 % erhalten. Zusätzlich wurde eine Mischfraktion von ca. 13 % an Nebenprodukten isoliert. Die beiden Glycopeptide **159** und **160** sind aufgrund der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen im NMR-Spektrum unterscheidbar. Für das doppelt glycosylierte Peptid **161** konnte die Ausbeute nochmals gesteigert werden und lag bei 63 % nach semipräparativer RP-HPLC-Reinigung. Vergleicht man die beiden Glycopeptide **160** und **161** bezüglich ihres Elutionsverhaltens, so bewirkt der zusätzliche Galactosylamin-baustein am Threonin²⁰ beim Glycopeptid **161** eine Verkürzung der Retentionszeit bei gleichem Gradienten und erhöht somit insgesamt den hydrophilen Charakter im Glycopeptid **161**. Trotz ihrer komplexen NMR-Spektren konnten beide Glycopeptide zweifelsfrei charakterisiert werden. So gelang es, im Glycopeptid **161** trotz Überlagerungen einiger Signale die einzelnen Glycanteile zuzuordnen.

Da es bei der hydrogenolytischen Deblockierung zum Verlust der Trityl-Gruppe kommt, wurde am Glycopeptid **155** nochmals versucht, alle basenlabilen Acetylgruppen nach Zemplén^[123] zu verseifen (Schema 97). Leider konnten bei einem pH-Wert von 10.0 nicht alle Acetylgruppen abgespalten werden, sodass der pH-Wert auf 10.5 – 11.0 erhöht wurde. Dabei kam es nicht nur zur Umesterung an der Carboxylgruppe der Sialinsäure, sondern auch zur teilweisen Umesterung an der Seitenkette der Asparaginsäure. Die gebildeten Methylester müssen im Anschluss, wie bereits beschrieben, mit wässriger Natronlauge bei einem pH-Wert von 10.5 hydrolysiert werden. Das gewünschte Produkt **162** konnte trotz zahlreicher Nebenreaktionen in einer Ausbeute von 34 % nach semipräparativer RP-HPLC-Reinigung erhalten werden. Zusätzlich wurde eine Mischfraktion von ca. 28 % aus den sechs Nebenprodukten erhalten. Die Deblockierung des in der 6-Position vorhandenen Benzylethers sollte nach der geplanten Fragmentkondensation erfolgen.



Schema 97: Die Synthese des partiell deblockierten Glycopeptids **162**.

Verglichen mit der Deblockierung der Glycopeptide aus dem vorherigen Kapitel ist die Deblockierung der vollgeschützten Glycopeptide wesentlich anspruchsvoller, da es sowohl zu einem Teilverlust der Trityl- oder der Pmc-Gruppe als auch beider Schutzgruppen kommen kann. Des Weiteren kann eine Umesterung in der Seitenkette der Asparaginsäure auftreten sowie eine völlige Deblockierung. Aufgrund der vielen Parameter ist es nicht weiter verwunderlich, dass die Ausbeuten deutlich schlechter ausfallen als im vorangegangenen Kapitel. Für die anschließenden Fragmentkondensationen konnten jedoch die Glycopeptide in ausreichender Menge hergestellt werden.

3.6 Die Entwicklung von extern adjuvierten Zweikomponenten-Vakzinen

3.6.1 Allgemeine Grundlagen und biologischer Hintergrund

Zur Indikation einer starken Immunantwort müssen Antigene mit immunstimulierenden Komponenten (PAMPs) kombiniert werden.^[10, 356-357] Die PRRs leiten innerhalb von drei bis sieben Tagen eine Immunreaktion und Eliminierung der PAMPs ein, da weder B-Zell- noch T-Zell-Rezeptoren des nativen Immunsystems angepasst werden müssen. Als Tumorstoffe sollten Adjuvans enthaltende Zweikomponenten-Vakzine synthetisiert werden, die sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem aktivieren. Dabei wird das angeborene Immunsystem durch ein Pathogen-assoziiertes molekulares Muster hochreguliert, welches nach Aktivierung das adaptive Immunsystem stimuliert. Als PAMP dient das zuvor genannte Liposaccharid MPL-A. Bereits geringste Konzentrationen von Lipid A führen zu starker Aktivierung durch die TLRs, die auf der Plasmamembran von Monozyten (Vorläufer der Makrophagen sowie eines Teils der dendritischen Zellen) und B-Zellen vorliegen und daraufhin Entzündungsfaktoren sezernieren (inflammatorische Cytokine).^[198] Diese Aktivierung wird über Signalweiterleitung ins Zellinnere geführt. Infolgedessen werden z. B. entzündungsfördernde Stoffe (Mediatoren, wie Interleukin-1 β , Interleukin-6 oder der Tumornekrose-Faktor (TNF- α)) gebildet oder der Phagozytose-Prozess eingeleitet. Lipid A wurde bereits in verschiedenen Studien mit Vakzinen getestet, in denen die Aktivierung sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems und eine Antitumorwirkung nachgewiesen werden konnten.^[198] Lipid A beeinflusst die Entwicklung von Tumoren durch die Hemmung des Blutflusses zum tumoralem Gewebe und induziert durch die Ausschüttung von entzündlichen Botenstoffen, wie dem Tumornekrosefaktor (TNF- α), Entzündungs-

reaktionen, die Makrophagen anlocken. Diese wiederum leiten die Nekrose und Apoptose der Zellen ein. Nicht nur Makrophagen sind in der Lage, das Lipid A zu erkennen, sondern auch dendritische Zellen. In ihrer Funktion der Antigen-Prozessierung und Antigen-Präsentation sind dendritische Zellen als einzige Zellen in der Lage, eine primäre Immunantwort zu induzieren. Durch die Wechselwirkung von Chemokinen mit unreifen dendritischen Zellen, die die PAMPs mit ihrem TLR4- und DEC-205-Rezeptor erkennen, werden diese zur Reifung und Wanderung in das lymphoide Gewebe angeregt (Abbildung 30). Dort fungieren sie als die stärksten und wichtigsten Aktivatoren von naiven T-Zellen und B-Zellen, indem sie in großen Mengen die prozessierten Antigene in Form von MHC-Peptid-Komplexen (Major Histocompatibility Complex) zusammen mit co-stimulierenden Molekülen an ihrer Oberfläche präsentieren.^[358]

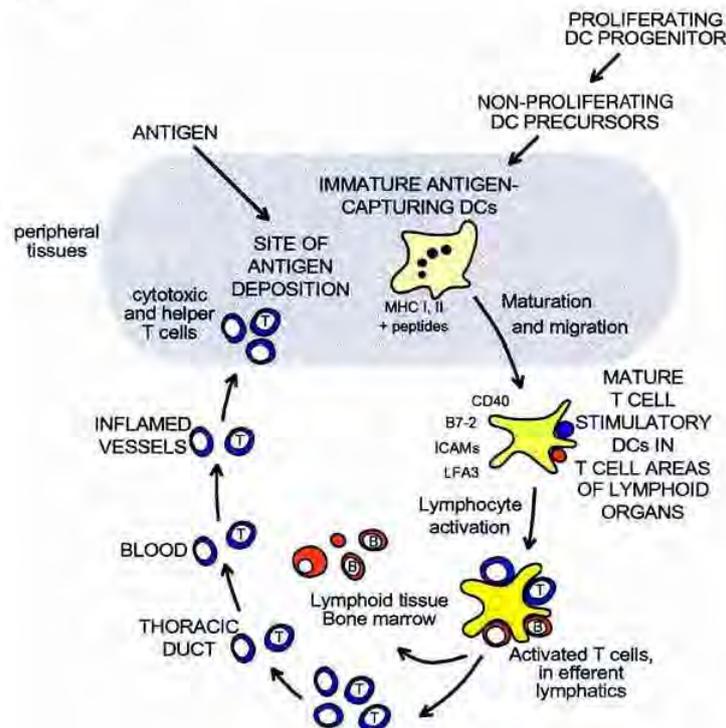


Abbildung 30: Antigen-Präsentation und Priming von naiven T-Zellen durch dendritische Zellen.^[358]

Damit Antigene von T-Lymphozyten erkannt werden können, müssen sie zuvor auf den MHC-Klassen I und II auf der Zelloberfläche präsentiert werden. T-Zellen sind also nicht nur spezifisch für das Antigen, sondern auch für das MHC-Molekül, an dem das Antigen gebunden und präsentiert wird. Diese Eigenschaft wird als T-Zell-Restriktion oder Selbst-Restriktion bezeichnet.^[357] Eine reife naive $CD4^+$ -T-Zelle wird nur aktiviert, wenn sie an ihr spezifisches Antigen in Kombination mit einem MHC-II-Molekül an der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle bindet. Durch co-stimulierende Faktoren kommt es zur Umlagerung von Rezeptoren, wobei der TCR durch den MHC-Antigen-Komplex an das neue Antigen angepasst wird (Abbildung 31).



Abbildung 31: Antigen-präsentierenden Zellen beim Priming von T-Zellen im lymphalen Gewebe.^[10]

Eine dendritische Zelle kann hierbei 100 bis 3000 Antigen-spezifische T-Zellen aktivieren, wodurch sie deutlich effizienter ist als andere Antigen-präsentierende Zellen, was darauf zurückzuführen ist, dass sie 10 bis 100-fach mehr MHC-Peptid-Komplexe an ihrer Oberfläche präsentieren als z. B. Monozyten oder B-Zellen.

MPL-A wurde als Adjuvans zusammen mit einem MUC1 100-mer Peptid in Phase I einer klinischen Studie bei Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs verabreicht, die sich vorher weder einer Chemo- noch einer Strahlentherapie unterzogen hatten.^[223] Es wurde sowohl eine Zunahme der CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut als auch eine Zunahme der Antikörper gegen MUC1 verzeichnet, wobei einige Patienten Antikörper der Klasse IgG ausbildeten, die vor allem gegen Viren und Bakterien wirken. Von 15 Teilnehmern der Studie waren zwei Teilnehmer nach 61 Monaten noch am Leben und symptomfrei. In neueren klinischen Studien wurde MPL-A zusammen mit einem 25er MUC1-Peptid Tecemotide (*Stimuvax*[®]) als liposomales Krebs-Vakzin bei verschiedenen Krebserkrankungen eingesetzt. Es kam zur Induktion von cytotoxischen T-Zellen, die Tumorzellen mit überexprimiertem MUC1 am Wachstum hinderten. Daher erschien ein Konjugat aus dem MPL-A und einem Zweikomponenten-Vakzin sinnvoll.^[83-84] Die Entwicklung eines Antitumorvakzins, welches Antigen-präsentierende Tumoren bekämpfen soll, erfordert außerdem die Aktivierung von B-Zellen, wodurch eine adaptive humorale als auch zelluläre Immunantwort ausgelöst wird. Hierzu muss das Vakzin im ersten Schritt über rezeptorvermittelte Endocytose mit Hilfe der membranständigen Immunglobuline, die auch als B-Zell-Rezeptoren (BCR) bezeichnet werden, internalisiert werden, sodass es in den Endosomen proteolytisch in kleinere Peptidfragmente (12 – 25 Aminosäuren) gespalten werden kann. Die denaturierten Peptidfragmente werden an MHC-II-Moleküle gebunden und auf der Plasmamembran als MHC-II-Komplexe präsentiert. Die Aktivierung und Umwandlung der B-Zelle hin zu einer Antikörper-sezernierenden Plasmazelle bedarf der Wechselwirkung zwischen ihrem MHC-II-Komplex und einer aktivierten antigenspezifischen CD4⁺-T-Helferzelle, welche das Antigenfragment durch ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) am MHC-II-Komplex erkennt. Die gekoppelte Erkennung wird als *linked recognition* bezeichnet und trägt zur Selbst-Toleranz des Immunsystems bei. Diese reife naive CD4⁺-T-Zelle wird ihrerseits nur dann aktiviert,

wenn sie an ihr spezifisches Antigen in Kombination mit einem MHC-II-Molekül an der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle gebunden hat. Diese Antigenerkennung über den MHC-II-Komplex führt zur Sekretion von Cytokinen, wie IL-2 (Proliferations-Induktion), IL-4 (initiale Aktivierung der B-Zell-Proliferation) und IL-6 (B-Zell-Differenzierung). Zusätzlich treten weitere Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und passenden Liganden ein, wie dem B7-Ligand der B-Zelle und dem CD28 der T-Zelle, CD40 mit CD40L und CD2 mit LFA3 (Abbildung 32).

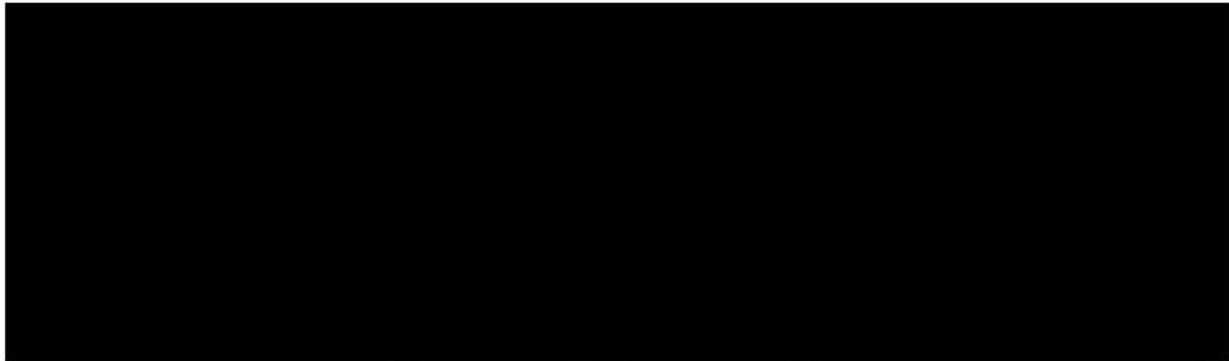


Abbildung 32: *T_H2-Helferzelle vermittelte Stimulation zur Proliferation und Differentiation von B-Zellen.*^[10]

Die Summe dieser Cofaktoren stimuliert die B-Zelle zur Vermehrung (klonale Expansion) und zu einem Reifungsprozess (somatische Hypermutation, Klassenwechsel) zu proliferierenden Antikörper-sezernierenden Plasmazellen und/oder zu B-Gedächtniszellen. Bei der Differenzierung zur Plasmazelle wird auf der Ebene der Antikörper-RNA die Transmembrandomäne durch Spleißen (engl. splicing) entfernt. Daraufhin sezerniert die Plasmazelle lösliche Immunglobuline (Antikörper) derselben Spezifität und Klasse wie die BCRs ihrer Vorläufer-B-Zelle. Die Bildung von Antikörpern gegen die tumorassoziierten Antigene ermöglicht es auch, zirkulierende Tumorzellen und Mikrometastasen auf unterschiedlichen Wegen zu bekämpfen (Abbildung 33 a – c). Monoklonale Antikörper des richtigen Isotyps können Tumoren lysieren, indem sie diese markieren und gleichzeitig natürliche Killerzellen rekrutieren, die durch die Wechselwirkung des Antikörpers mit dem Fc-Rezeptor zur Lyse des Tumors aktiviert werden (Abbildung 33 a). Eine weitere Möglichkeit, Tumoren zu zerstören besteht darin, die Fähigkeit der Endocytose einiger Tumoren auszunutzen. Hierzu wird der Antikörper oder ein Fragment des Antikörpers an ein Toxin gebunden, welches nach dem Andocken des Antikörpers internalisiert wird. Nach Internalisierung des Konjugates kommt es zur Freisetzung des Toxins, das den Tumor zerstört (Abbildung 33 b). Auf dem gleichen Prinzip beruht die dritte Möglichkeit, in der ein Radionuklid an einen Antikörper gebunden wird. Hierbei wird der Tumor durch Bestrahlung zerstört, wobei auch angrenzende Tumoren, die nicht durch den Antikörper markiert sind, zerstört werden (Abbildung 33 c).



Abbildung 33: Eliminierung von Tumoren durch monoklonale Antikörper, die in der Lage sind, tumorspezifische Antigene zu erkennen und die Eliminierung einzuleiten.^[10]

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, vollsynthetische Vakzine zu synthetisieren, die induzierte Immunantworten gegen das tumorassoziierte MUC1 auslösen. Dabei werden zwei Strategien eingesetzt, um Tumoren durch eine cytotoxische T-Zell-Antwort und durch Antikörper induzierte Lyse zu eliminieren. Zur Induktion einer T-Zell vermittelten Antwort werden die MUC1-B-Zell-Epitope an ein Cytokinfragment, an ein Mitogen oder an ein Adjuvans gekuppelt (Abbildung 34).

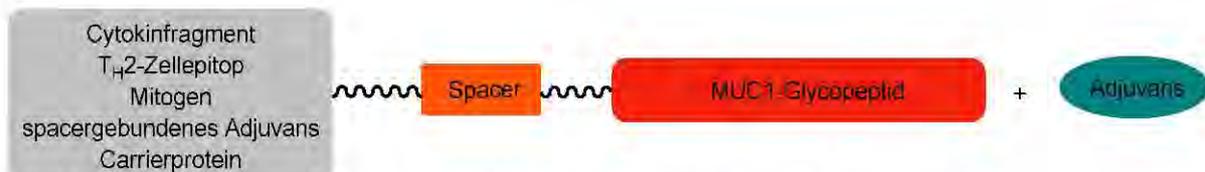


Abbildung 34: Darstellung der geplanten Strukturen zur Erzeugung von Tumorstoffen.

Bei MHC-II restringierten Immunantworten müssen die B-Zell-Epitope an T_H2-Epitope angeknüpft werden. Die entwickelten Konstrukte bestehen somit aus drei Komponenten – dem MPL-A und einem tumorassoziierten Glycopeptidantigen, das wiederum über einen flexiblen, nicht-immunogenen Diethylenglycolspacer entweder mit einem Cytokinfragment, einem T_H2-Zell-Epitop, einem Mitogen, einem spacergebundenen Adjuvans oder einem Carrierprotein verbunden ist (Abbildung 34, vgl. Kapitel 2).

3.6.2 Die Synthese von Interleukin-1 β -MUC1-Konjugaten

Interleukin-1 β (IL-1 β) gehört wie Interleukin-1 α zur Untergruppe der Interleukin-1 Familie, welche zu den Cytokinen (Entzündungsmediatoren) zählen. In zirkulierenden Monozyten und Makrophagen von gesunden Personen ist die Genexpression des IL-1 β -Vorläufers nicht nachweisbar. Werden die Zellen jedoch durch Lipopolysaccharide aus Bakterienwänden oder durch andere Pyrogene stimuliert, kommt es durch den TLR zur Synthese von IL-1 β als Botenstoff, der die Bildung von CD14 induziert.^[359] Cytokine, wie das IL-1 β , leiten die Akute-Phase-Reaktion ein. Zu deren Funktionen gehören die Lokalisierung der Entzündung, die Verhinderung der Ausbreitung und die Unterstützung des Immunsystems bei der Sanierung des Entzündungsherdes. IL-1 β aktiviert Makrophagen und fördert die Differenzierung von T- und B-Lymphozyten. Wie aus der Abbildung 35 zu entnehmen ist, hat die Sezernierung von IL-1 β weitreichende biologische Folgen, wie die Auslösung von Fieber oder gar septischen Schocks, weshalb das IL-1 β für immunologische Zwecke nur bedingt geeignet ist.

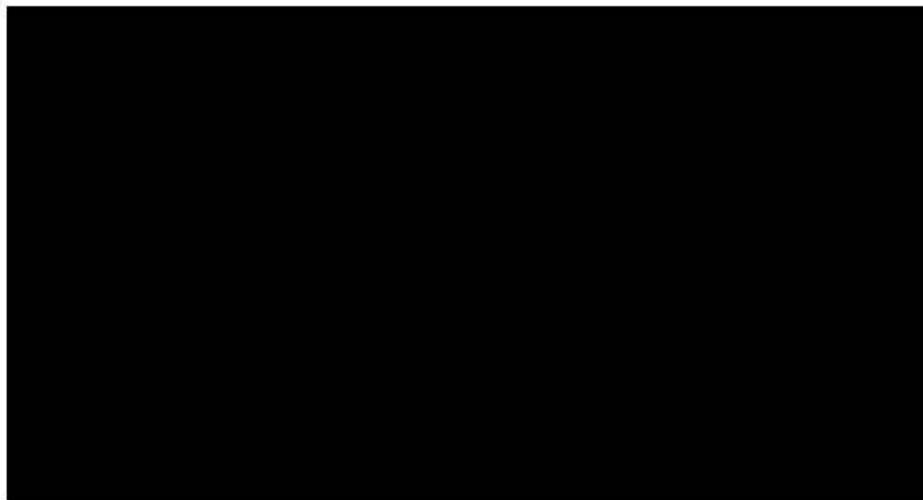


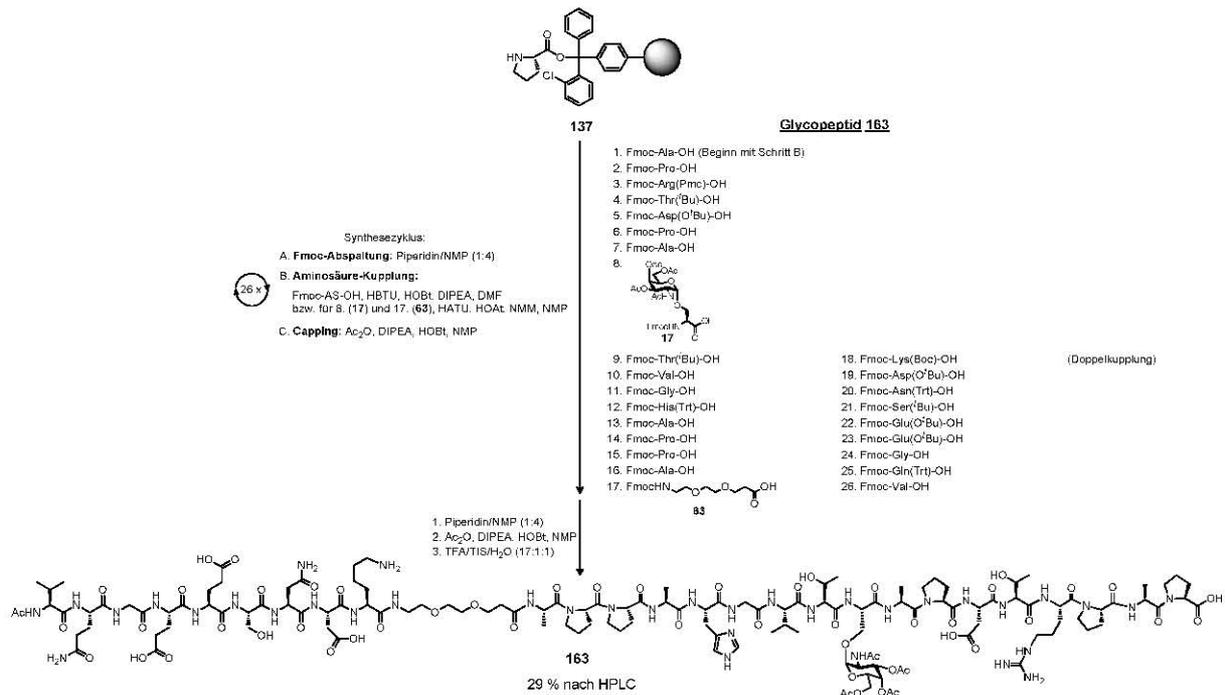
Abbildung 35: Biologische Aktivität von IL-1 β , das an der Koordination während einer Infektion beteiligt ist.^[10]

Das Peptid VQGEESNDK, welches ein Fragment des humanen IL-1 β darstellt, wird sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Immunstimulans eingesetzt. Die erworbene zellvermittelte Abwehr des Immunsystems erfolgt überwiegend durch aktivierte T-Lymphozyten und Makrophagen.^[360] Bestimmte Antigene bewirken die Aktivierung, beschleunigte Proliferation und Differenzierung von T-Zellen mit Spezifität für diese Antigene. So zeigt das Peptidfragment IL-1 β (163 – 171) im murinen System die thymusabhängige Aktivierung von T_H1-Zellen unter gleichzeitiger Sezernierung von Interleukin-2 (IL-2). Die Sezernierung von IL-2 setzt jedoch das Erkennen eines Antigens auf dem MHC-II-Rezeptor einer Antigen-präsentierenden Zelle voraus, woraufhin die T_H1-Zelle IL-2 ausschüttet und sie damit autokrin auf sich selbst wirkt. Durch eine intrazelluläre Signalkaskade wird die Aktivierung

und klonale Teilung der T-Zellen angeregt, weshalb IL-2 das wichtigste Signal für eine T_H1-Zelle darstellt. Neben der autokrinen T_H1-Zellaktivierung wirkt IL-2 auch auf B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen mit dem gleichen Effekt.^[361-362] Die Aktivierung von B-Lymphozyten durch IL-2 ist jedoch im Vergleich zur Aktivierung durch T_H2-Zellen geringer. Die stimulierende Wirkung des IL-1 β Fragments bezüglich der T_H-Zell-abhängigen sowie T_H-Zell-unabhängigen Antikörperbildung wurde in verschiedenen Immunassays sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht, in denen man durch Zugabe des IL-1 β Fragments die Bildung von Antikörpern gegen das jeweilige Antigen anregte.^[362] So konnte man die unterstützende Antikörperbildung gegen das Hepatitis-B-Oberflächenantigen mit einem einfachen Peptidkonjugat nachweisen. Hierzu wurde von Rao und Noyak^[363] das Hepatitis-B-Oberflächenantigen S1-(12 – 32), welches überlappende T_H2- und B-Zell-Epitope enthält, über einen Spacer an das IL-1 β (163 – 171) geknüpft. Zur Überprüfung wurden drei Peptide synthetisiert, das HBV S1-(12 – 32), das IL-1 β (163 – 171) und das Konstrukt aus beiden, welche über einen Spacer aus zwei Glycineinheiten getrennt sind. Das Konjugat aus beiden Peptidfragmenten bewirkte laut Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) eine höhere Antikörperbildung als das HBV S1-(12 – 32) allein, womit seine antikörperstimulierende Wirkung bewiesen werden konnte. In Thymus-abhängigen *in vitro*-Proliferationsstudien war sowohl das Konjugat als auch das IL-1 β (163 – 171) in der Lage, T-Helferzellen zu stimulieren, während das HBV inaktiv war.^[363] In Antitumorstudien wurde IL-1 β (163 – 171) von Forni *et al.* als Adjuvans eingesetzt.^[364] McCune und Marquis verwendeten IL-1 β (163 – 171) als externes Adjuvans, indem sie es zusammen mit bestrahlten Tumoren erkrankten Mäusen zur Vakzinierung spritzten. Von den erkrankten Mäusen waren zwischen 70 – 100 % nach der Behandlung mit dem Vakzin tumorfrei, während in der Vergleichsgruppe, die nur die bestrahlten Tumoren erhielten, nur 0 – 20 % tumorfrei waren.^[365] In weiteren Studien wurde das IL-1 β (163 – 171) über einen nicht-immunogenen Spacer an verschiedene Antigene geknüpft und die Steigerung der antigenspezifischen Antikörper bestimmt.^[81] In allen Fällen hatte das IL-1 β (163 – 171) eine Erhöhung der sezernierten Antikörperkonzentration zur Folge, womit es als ideales immunstimulatorisches Adjuvans für die geplanten Vakzine betrachtet werden kann. Besonders die Untersuchungen von McCune und Marquis waren bezüglich der Zerstörung der Tumoren vielversprechend. Dementsprechend sollen die geplanten MUC1-Vakzine über einen nicht-immunogenen Spacer an das IL-1 β Peptidfragment gekuppelt werden und zusammen mit dem MPL-A in immunologischen Studien Verwendung finden. Dabei sollte im ELISA aufgrund der Abwesenheit eines T_H2-Epitopes nur schwache Antikörperbildung nachzuweisen sein. Jedoch könnte eine T-Zell-

Antwort im Idealfall eine cytotoxische T-Zell-Antwort, die antikörperunabhängig Tumoren zerstört, erwartet werden, die in dafür geeigneten immunologischen Studien überprüft werden müsste.

Der Aufbau der IL-1 β -MUC1-Glycopeptide erfolgt am Polystyrol-Harz **137**, in dem L-Prolin C-terminal über den 2-Chlortrityl-Anker (2-CT)^[319] gebunden ist (Schema 98). Die Synthese des Glycopeptids **163** wird in Analogie zu der beschriebenen Festphasensynthese des Peptids **138** durchgeführt.

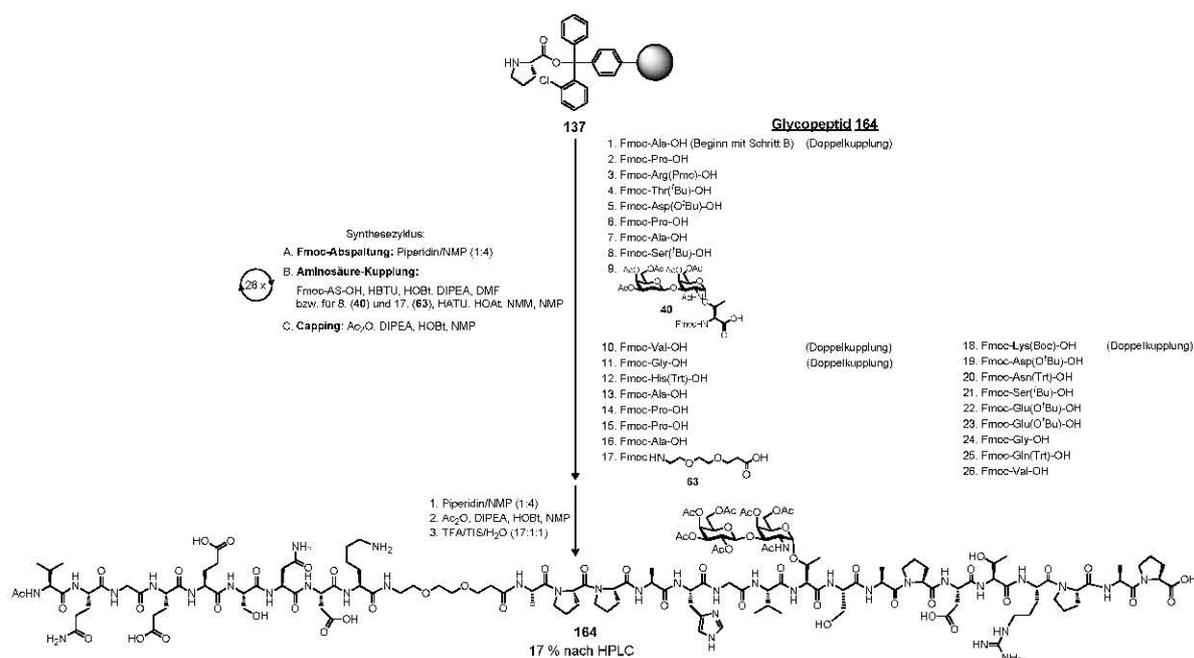


Schema 98: Die Synthese des Interleukin-1 β -MUC1-Glycopeptids **163**.

Nach Abschluss der halbautomatischen Kupplung des Spacers **63** wird die erste Aminosäure des IL-1 β (163-171) L-Lysin¹⁹ doppelt gekuppelt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom L-Valin²⁷ wird die Festphasensynthese durch ein doppeltes Capping abgeschlossen, weil eine Testsynthese nach einmaligen Capping ein Produktgemisch aus dem gewünschten Produkt und dem primären Amin ergeben hatte. Das IL-1 β -Glycopeptid **163** wird nach Abspaltung und semipräparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 29 % erhalten. Die Auswertung des analytischen HPLC-Chromatogramms ergab nachweisbare Abbruchsequenzen nach der ersten Glycosylaminosäure, nach dem L-Lysin¹⁹ und trotz Doppelcapping eine nicht quantitative Umsetzung der terminalen Aminosäure L-Valin²⁷.

Die Erkenntnis aus diesem HPLC-Chromatogramm ist in die Synthesen der nachfolgenden Glycopeptide entsprechend eingeflossen. Das nachfolgende Glycopeptid **164** wurde als einziges nicht an einem ABI-433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems* synthetisiert, sondern am *CEM*[®] Liberty 1-Peptidsynthesizer unter Mikrowellenstrahlung (Schema 99). Aufgrund technischer Mängel verlief die Synthese nicht so glatt wie es im Prospekt von *CEM*[®] beschrieben wird. Das Liberty 1 verfügt im Gegensatz zum ABI-433A

nicht über eine mechanische Durchmischungsapparatur, sondern es wird zur Homogenisierung des Reaktionsansatzes Stickstoff unterhalb des Reaktors eingeleitet, der die Aufgabe des mechanischen Durchmischens übernimmt. So kam es entweder durch einen Ventil- oder Softwarefehler dazu, dass während der Kupplungen sowohl Stickstoff als auch zusätzliche Lösungsmittel kontinuierlich in das Reaktionsvessel eingeleitet wurden, sodass am Ende die vierfache Menge an Lösungsmitteln im Reaktionsmedium vorhanden war. Bei der Kupplung der Aminosäuren mag das aufgrund des höheren Überschusses noch verkraftbar sein, jedoch macht sich dieser Effekt bei den halbautomatischen Kupplungen der Glycosylaminosäure und des Spacers deutlich bemerkbar, da nur mit geringen Überschüssen an Edukt gearbeitet wird. Des Weiteren schien sowohl das Harz **137** als auch der Spacer **63** nur eingeschränkt für den Einsatz im Liberty 1-Peptidsynthesizer geeignet zu sein. Nach der Glycopeptidsynthese konnten nach visueller Betrachtung des Harzes physikalische Veränderungen festgestellt werden. So waren die Polymerkugeln in sich zusammengefallen und die Quellfähigkeit hatte stark abgenommen. Bei der Kupplung des Spacers **63** war sowohl eine Druckerhöhung während der Kupplung als auch eine dunkle Verfärbung der Reaktionslösung zu verzeichnen.

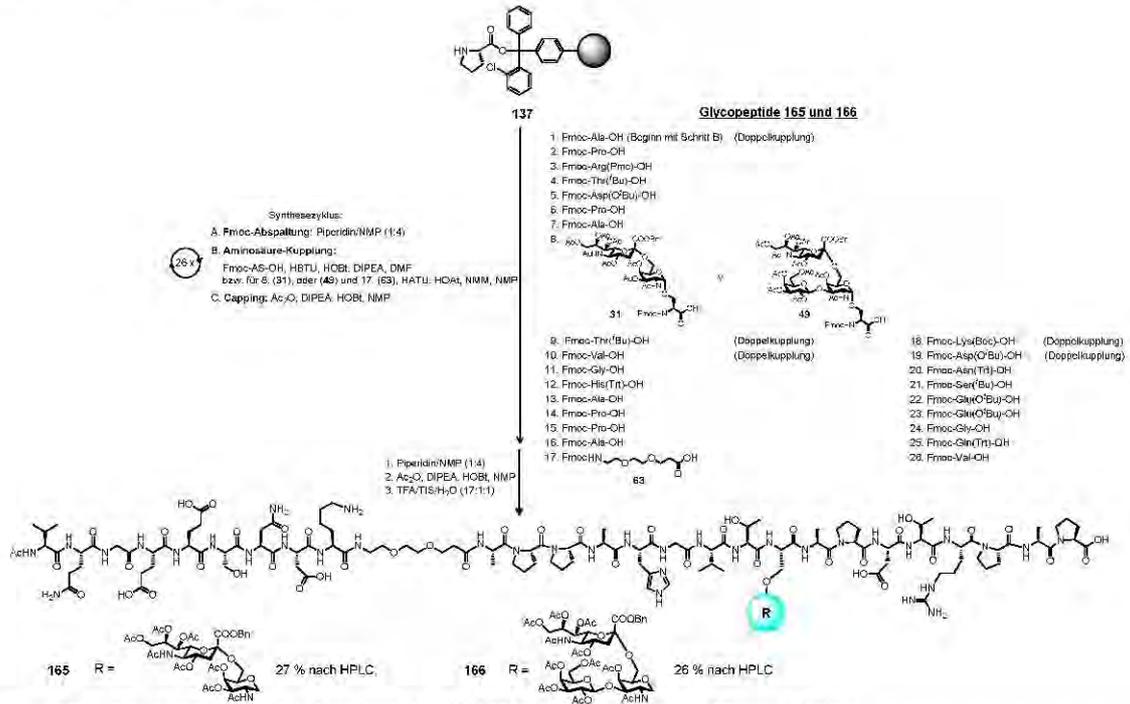


Schema 99: Die Synthese des Interleukin-1 β -MUC1-Glycopeptids **164**.

Trotz der Probleme konnte das Glycopeptid **164** nach Abspaltung und semipräparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 17 % isoliert werden.

Die Glycopeptide **165** und **166** wurden wieder am ABI-433A synthetisiert (Schema 100). So erfolgten sowohl für die erste Aminosäure L-Alanin² als auch für die Aminosäuren L-Threonin¹⁰ und L-Valin¹¹ nach der Glycosylaminosäure Doppelkupplungen. Ebenfalls wurden die auf den Spacer folgenden zwei Aminosäuren doppelt gekuppelt. Die beiden

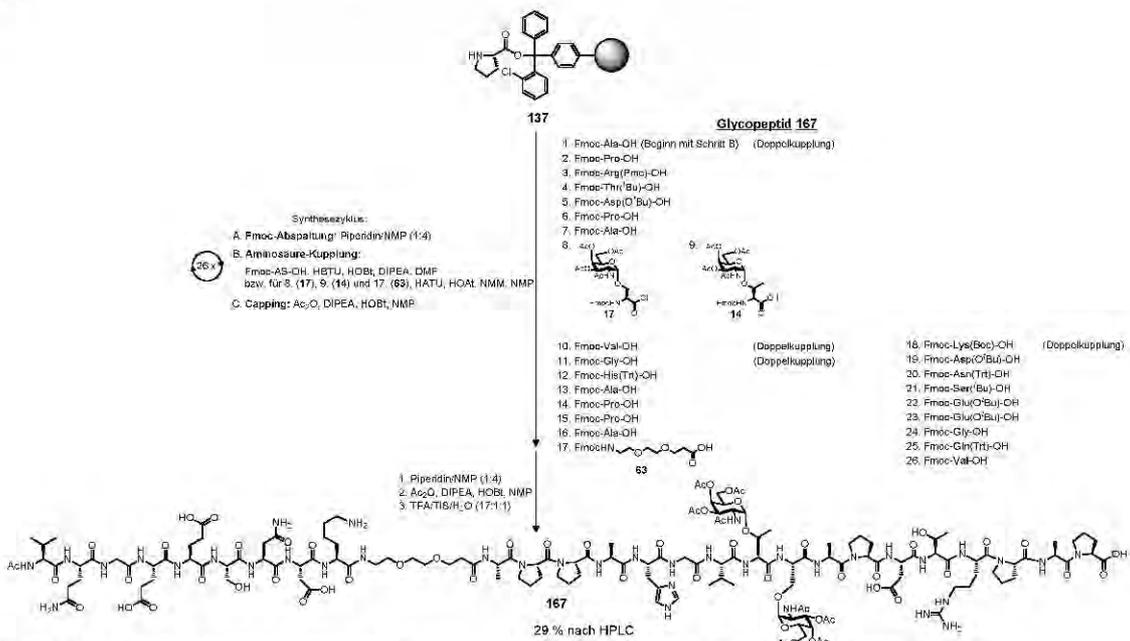
Glycopeptide wurden vom Harz abgespalten und durch semipräparative RP-HPLC in fast identischer Ausbeute isoliert.



Schema 100: Die Synthesen der Interleukin-1 β -MUC1-Glycopeptide **165** und **166**.

Der höhere sterische Anspruch des Glycans **49** spiegelt sich in der Ausbeute nicht wider. Die Glycopeptide **165** und **166** wurden in Ausbeuten von 27 % bzw. 26 % erhalten.

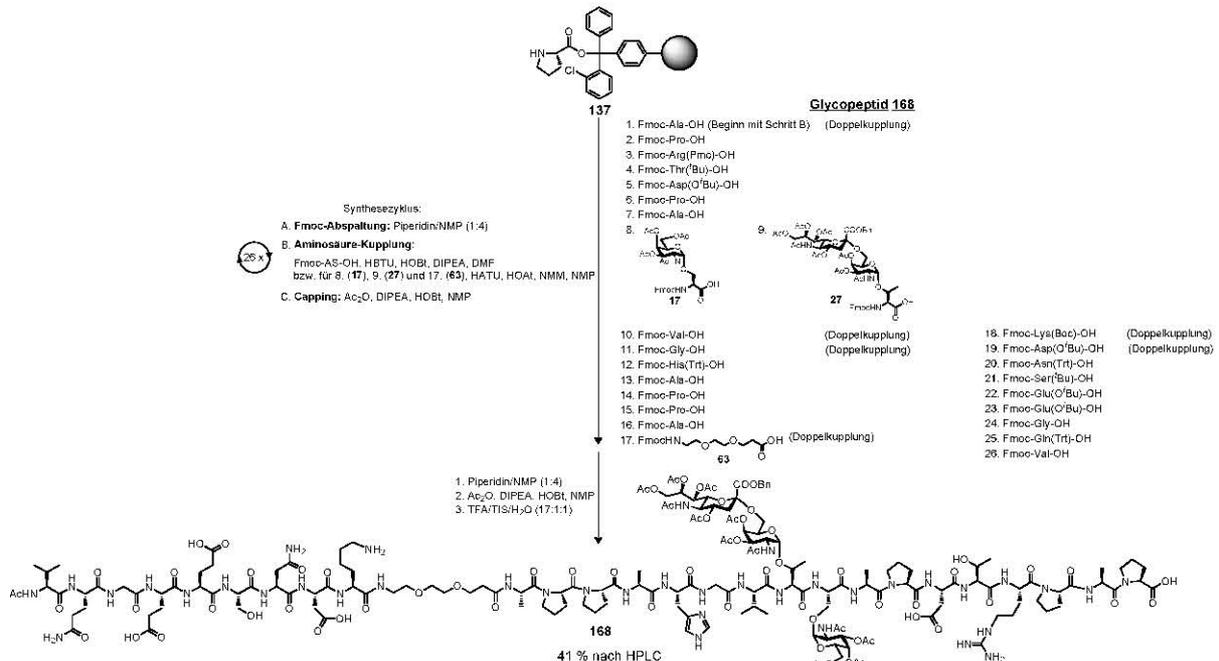
Nach der Synthese der monoglycosylierten Peptide sollte die Synthese von doppelt glycosylierten Peptiden erfolgen. Dabei sollten zwei glycosylierte Aminosäuren direkt aufeinander folgen, was die Synthese aufgrund des sterisch erhöhten Anspruchs erschwert. Der erste Teil des Glycopeptids **167** wurde analog zum Glycopeptid **139** aufgebaut (Schema 101).



Schema 101: Die Synthese des doppelt glycosylierten Interleukin-1 β -MUC1-Glycopeptids **167**.

Obwohl bei der Synthese des Peptids **139** (vgl. Schema 80) die eingesetzte Menge an den jeweiligen Glycosylaminosäuren höher war, wurde für das Glycopeptid **167** eine höhere Ausbeute pro Kupplungsschritt erhalten (Glycopeptid **167** 95.4 % pro Kupplungsschritt vs. Glycopeptid **139** 93.7 % pro Kupplungsschritt). Das Glycopeptid **167** wird nach Abspaltung und semipräparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 29 % erhalten.

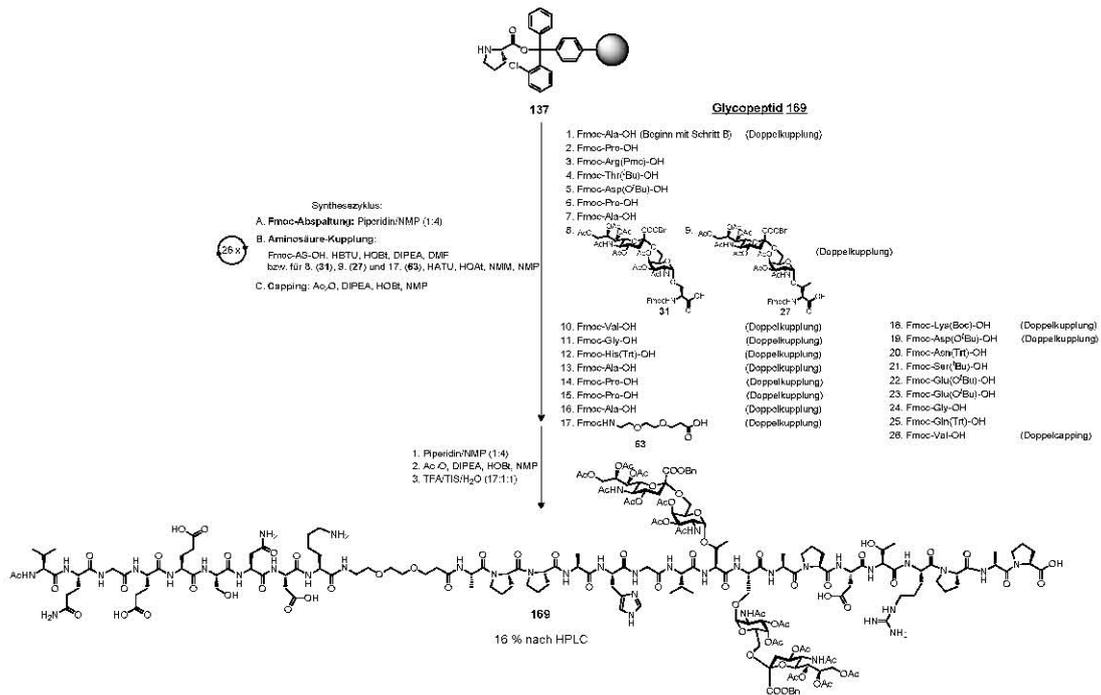
Nach der Synthese des Glycopeptids **167** sollte das am Threonin¹⁰ gebundene Antigen durch das anspruchsvollere ST_N-Antigen **27** ersetzt werden (Schema 102). Das Glycopeptid wurde nach Abspaltung und präparativer RP-HPLC in einer hohen Ausbeute von 41 % isoliert.



Schema 102: Die Synthese des doppelt glycosylierten Interleukin-1 β MUC1-Glycopeptids **168**.

Wie bei den Glycopeptiden **139** und **143** sind auch für das Glycopeptid **168** in der RP-HPLC zwei Substanzen mit unterschiedlichen Retentionszeiten jedoch gleicher molarer Masse detektierbar. Die Vorgehensweise wurde in den vorherigen Kapiteln bereits beschrieben und kam hier ebenso zur Anwendung.

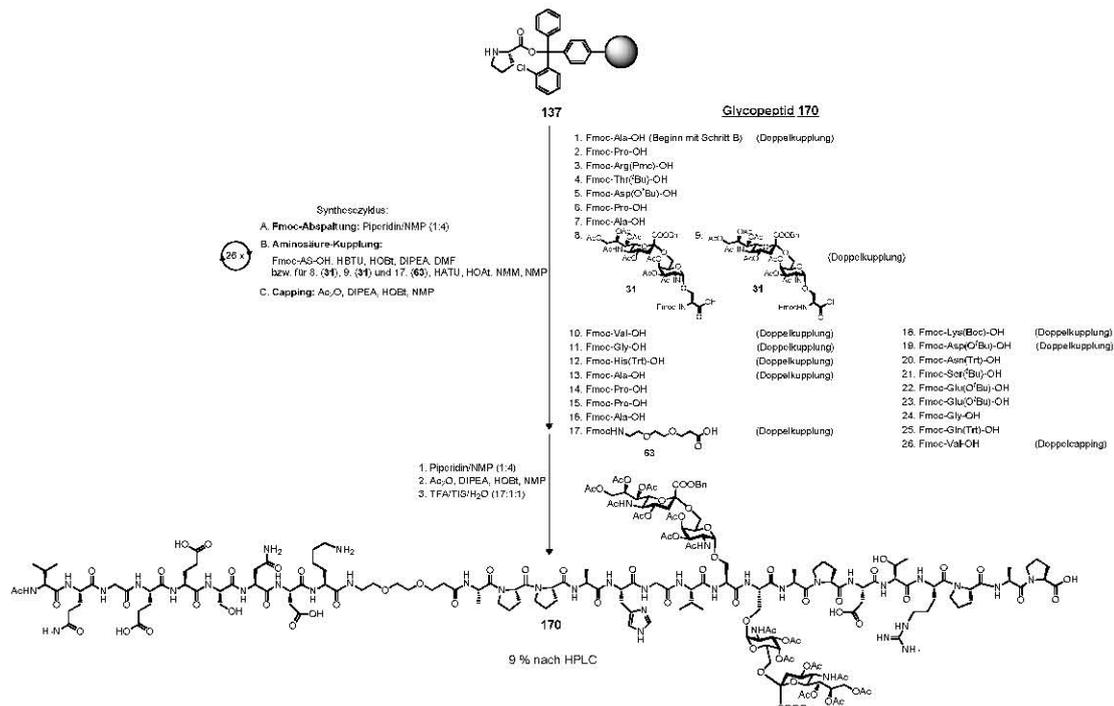
Nach der Synthese des Glycopeptids **168** wurde das T_N-Antigen **17** ebenfalls durch das ST_N-Antigen **31** ausgetauscht. Da beide Antigene sterisch besonders anspruchsvoll sind, wurde mit Schwierigkeiten während der Synthese gerechnet. Die ersten Synthesen blieben erfolglos, da das zweite ST_N-Antigen **27** schwer an den Glycopeptidrest anzukuppeln war (Schema 103). Zur qualitativen Bestimmung der Umsetzung kam der Bromphenolblau-Test^[352] nach der Kupplung des ST_N-Antigens **27** zum Einsatz. Trotz langer Kupplungszeiten wurde eine Blaufärbung angezeigt, was auf das weitere Vorhandensein von freien Aminogruppen hindeutete. Die Synthese des Glycopeptids **169** bedarf sowohl der Doppelkupplung des Antigens **27** als auch langer Kupplungszeiten, um das Produkt in geringer Ausbeute isolieren zu können. Das beste Ergebnis lieferte die Synthese wie sie in Schema 103 dargestellt ist.



Schema 103: Die Synthese des doppelt glycosylierten Interleukin-1 β -MUC1-Glycopeptids **169**.

Das Glycopeptid **169** konnte nach mehreren Ansätzen und zahlreichen Doppelkupplungen nach Abspaltung und Reinigung durch die semipräparative RP-HPLC in einer Ausbeute von 16 % isoliert werden. Ohne die zahlreichen Doppelkupplungen lagen die Ausbeuten zwischen 7 – 9 %. Schwierigkeiten machte auch die am Schluss auszuführende Acetylierung. Trotz zweifacher Ausführung blieb ein gewisser Teil unacetyliert.

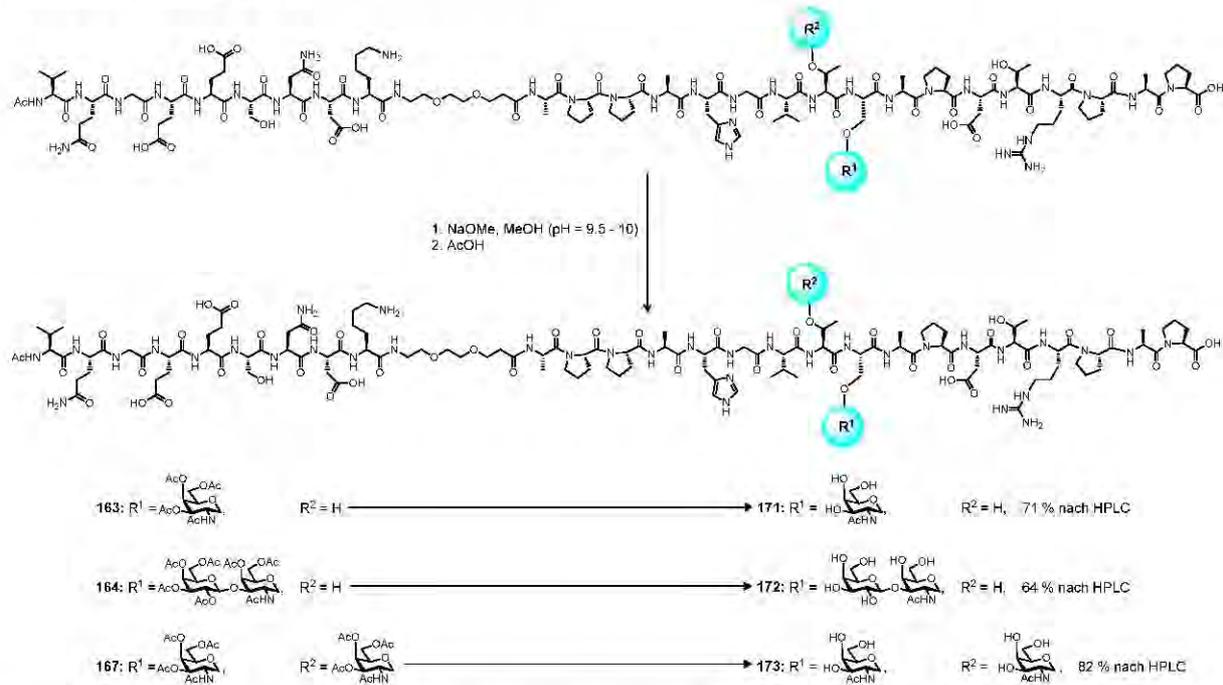
Als letztes Glycopeptid der Interleukinreihe wurde das doppelt glycosylierte Glycopeptid **170** synthetisiert, wobei ein Austausch des glycosylierten Threonins¹⁰ durch ein glycosyliertes Serin¹⁰ erfolgte. (Schema 104).



Schema 104: Die Synthese des doppelt glycosylierten Interleukin-1 β -MUC1-Glycopeptids **170**.

Anhand dieses Glycopeptids sollte ermittelt werden, inwiefern ein Austausch der Aminosäure immunologische Relevanz hat. Da die Synthese des Glycopeptids **170** zeitlich vor der letzten Synthese des Glycopeptids **169** stattfand, wurden die Synthesen nicht in gleicher Weise durchgeführt und die Ausbeute ist somit geringer. Wie beim Glycopeptid **169** war es schwierig, die zweite glycosylierte Aminosäure an den Glycopeptidrest anzubinden, was durch den Bromphenolblau-Test^[352] auch angezeigt wurde. Das Glycopeptid **170** wurde nach Abspaltung und semipräparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 9 % isoliert. Wie bei allen aufeinander folgenden doppelt glycosylierten Glycopeptiden können auch für die Glycopeptide **169** und **170** in der RP-HPLC zwei Substanzen mit unterschiedlichen Retentionszeiten jedoch gleicher molarer Masse gefunden werden.

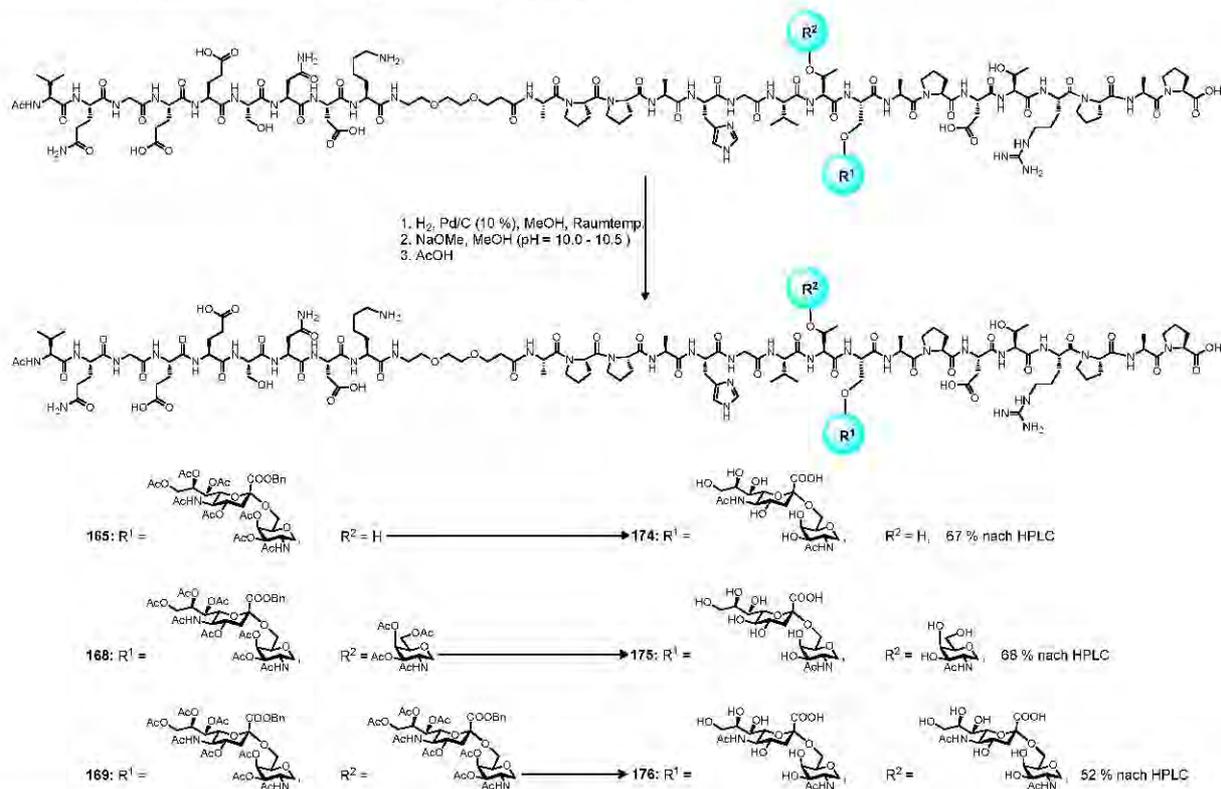
Die synthetisierten Interleukin-1 β -Konjugate müssen anschließend von ihren Schutzgruppen befreit werden. Dies wurde auf drei unterschiedliche Arten vorgenommen. Die basenlabilen Schutzgruppen der ersten Gruppe wurden durch Behandlung mit methanolischer Natriummethanolat-Lösung bei einem pH-Wert zwischen 9.5 – 10.0 nach Zemplén^[123] entfernt (Schema 105).



Schema 105: Die Synthese der deblockierten Glycopeptide **171**, **172**, **173**.

Die Glycopeptide **171** und **173** wurden in Ausbeuten von 71 % bzw. 82 % nach semipräparativer RP-HPLC erhalten. Das Glycopeptid **172** war nur in einer Ausbeute von 64 % nach RP-HPLC zu isolieren. Alle Glycopeptide wurden sowohl durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie als auch durch hochaufgelöste Massenspektrometrie charakterisiert. Für das Glycopeptid **173** gelang die Charakterisierung der beiden unterschiedlichen Galactosamin-Reste überraschend gut. So konnten die Protonen H1 – H3 zweifelsfrei den

unterschiedlichen Glycosylaminosäureresten zugeordnet werden. Für die Protonen H4 – H6_{ab} gelang dies nicht immer, weil Überlagerung mit anderen Signalen des Peptidrests vorlag. Die Deblockierung der zweiten Gruppe verlief zweistufig. In der ersten Stufe wurde der Benzylester der Sialinsäure über Palladium auf Aktivkohle hydrogenolytisch gespalten und der Reaktionsverlauf sowohl durch die analytische RP-HPLC als auch durch Massenspektrometrie verfolgt (Schema 106).

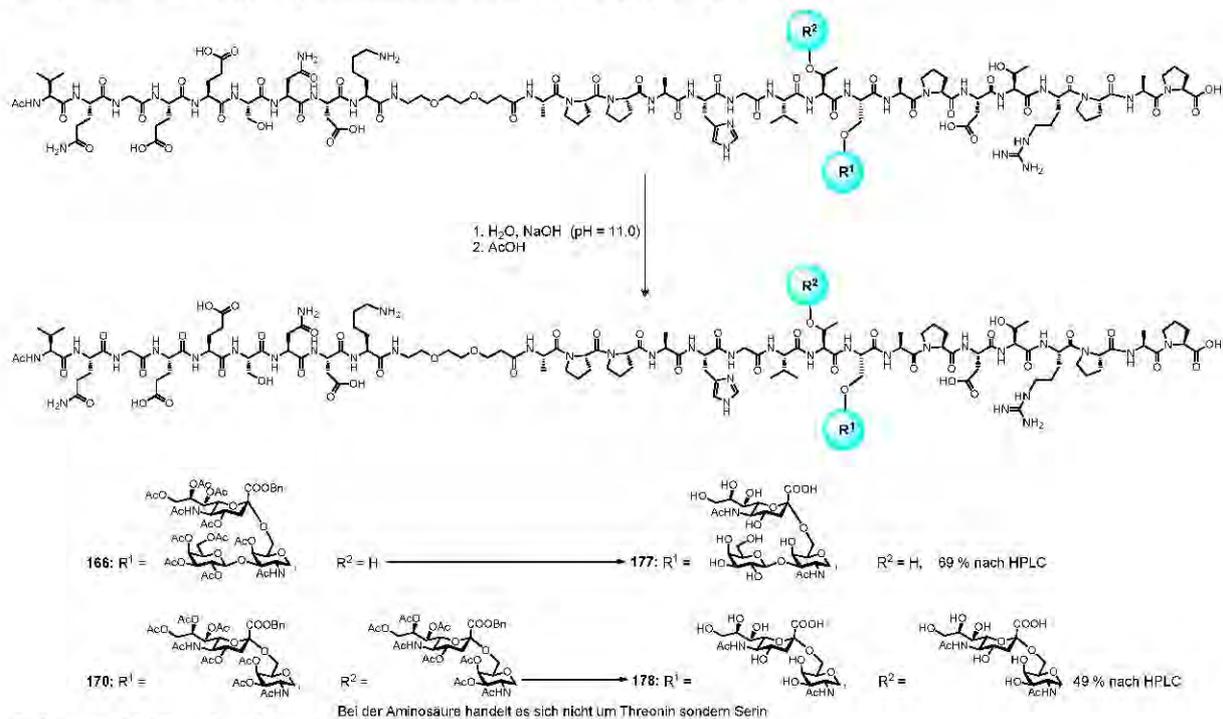


Schema 106: Die Synthese der deblockierten Glycopeptide **174**, **175**, **176**.

Die erhaltenen partiell deblockierten Glycopeptide wurden mit methanolischer Natriummethanolat-Lösung bei einem pH-Wert zwischen 10.0 – 10.5 nach Zemplén^[123] von den *O*-Acetyl-Schutzgruppen befreit. Die Glycopeptide **174** und **175** wurden nach semipräparativer RP-HPLC in Ausbeuten von 67 % bzw. 68 % isoliert. Das Glycopeptid **176** wird erwartungsgemäß in einer niedrigeren Ausbeute (52 %) als für die beiden anderen Glycopeptide erhalten. In der RP-HPLC zeigen sich die Glycopeptide **175** und **176** wieder als Konformere mit unterschiedlichen Retentionszeiten bei gleicher molarer Masse. Die Auswertung der zweidimensionalen NMR-Spektren ist für die Verbindungen **175** und **176** aufgrund der vermehrten Glycansignale und der damit verbundenen Überlagerungen deutlich schwerer als für vergleichsweise einfach glycosylierte Peptide. Durch Aufnahme der Spektren in deuteriertem Dimethylsulfoxid können die Signale der NH-Protonen detektiert werden, die es in einem TOCSY-Experiment ermöglichen, ¹H-¹H-Kopplungen innerhalb eines

Spinsystems über die Kreuzpeaks eindeutiger zuzuordnen als es über ein COSY-Experiment möglich ist. Das Abgleichen der über die COSY-Spektren getroffenen Zuordnungen mit den TOCSY-Spektren führt dazu, dass die Auswertung weniger fehlerbehaftet ist als bei alleiniger Auswertung über COSY-Spektren und sollte standardmäßig durchgeführt werden. Auf diese Weise gelang die Zuordnung der Saccharidprotonen für das Glycopeptid **175**. Für das Glycopeptid **176** können zwar die Galactosylaminoprotonen H1 – H3 zweifelsfrei für jede einzelne Aminosäure identifiziert werden, die Zuordnung der Protonen H4 – H6_{ab} blieb aber aufgrund der großen Ähnlichkeit und der nur geringen Unterschiede mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Für die zwei Sialinsäurereste konnten in den NMR-Spektren keine Unterschiede in den chemischen Verschiebungen gefunden werden. Dies spricht für eine übereinstimmende Konformation der Sialinsäurereste im Glycopeptid.

Zum Abschluss wurde die einstufige Deblockierung der erhaltenen Glycopeptide vorgenommen. Hierzu wurden die Glycopeptide **168** und **170** in wässriger Natriumhydroxid-Lösung bei einem pH-Wert von 11.0 vom Benzylester und von den basenlabilen Acetylenschutzgruppen befreit (Schema 107). In diesem Prozess muss der pH-Wert genauer eingehalten und nachreguliert werden. Des Weiteren muss der Reaktionsverlauf durch die analytische RP-HPLC verfolgt werden, um zu lange Reaktionszeiten zu vermeiden. Die beiden Glycopeptide wurden nach Reinigung in Ausbeuten von 69 % für das Glycopeptid **177** und 49 % für das Glycopeptid **178** isoliert. Glycopeptid **178** kann als Vergleichssubstanz mit ausgetauschter Glycosylaminosäure zum Glycopeptid **176** dienen.



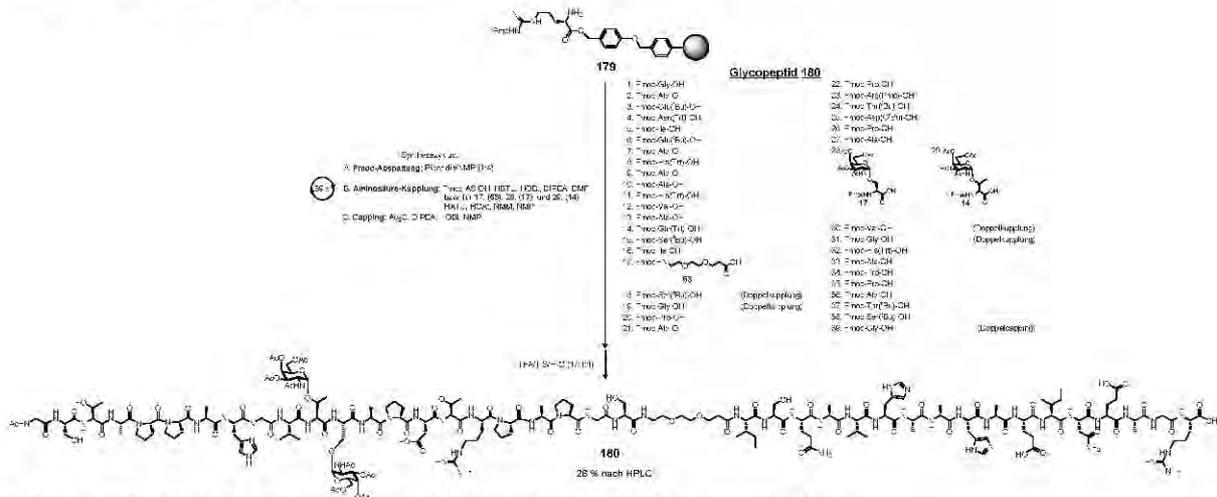
Schema 107: Die Synthese der deblockierten Glycopeptide **177**, **178**.

Die Synthese der Interleukin-1 β -Konjugate ist somit abgeschlossen und die Glycopeptide können zusammen mit dem Adjuvans MPL-A in immunologischen Studien getestet werden.

3.6.3 Die Synthese von MUC1-Ova_(323 – 339)-Konjugaten

Eine weitere Möglichkeit zur Induktion einer adaptiven Immunantwort besteht darin, ein MUC1-Glycopeptid kovalent über einen Spacer an ein T_H2-Epitop zu knüpfen. Das Peptidfragment aus dem Hühnerserum-Ovalbumin (OVA) (323 – 339) stellt solch ein T_H2-Epitop dar, das sowohl Allergene- als auch Antigene-Epitope aus dem Ovalbumin-Protein umfasst.^[366] Daher wurde es in T-Zell-Aktivierungen durch MHC-II-Protein-Komplexe untersucht.^[367-368] Es wird mit dem Vakzin von Antigen-präsentierenden Zellen internalisiert und als MHC-II-Protein-Komplexe an der Zelloberfläche präsentiert, wo es von naiven T-Zellen über den TCR erkannt wird.^[10, 369] B-Lymphozyten nehmen Antigene mit Hilfe des B-Zell-Rezeptors durch rezeptorvermittelte Endocytose auf und präsentieren Peptidfragmente aus dem OVA (323 – 339) und dem MUC1 auf dem MHC-II-Komplex. Werden die präsentierten MHC-II-Antigen-Komplexe des OVA (323 – 339) von T_H2-Helferzellen erkannt, erfolgt eine gegenseitige Aktivierung von B- und T-Lymphozyten (vgl. Kapitel 3.4.6.1 und Abbildung 32). Die Umwandlung der B-Lymphozyten zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen wird durch T_H2-Helferzellen bewirkt, die ihre Spezifität im Kontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen erworben haben. Die umgewandelten B-Lymphozyten schütten Antikörper aus, die an das gleiche Antigenfragment binden, welches vom B-Zell-Rezeptor erkannt wurde, oder sie verändern ihre Antikörper nach dem Zufallsprinzip, sodass einige Zellen Antikörper mit erhöhter Wirksamkeit bilden können. Die T_H2-Zellen von transgenen Mäusen, die einen CD4⁺-Rezeptor für OVA exprimieren, sind in der Lage, den MHC-II-OVA-Peptidkomplex zu erkennen und damit B-Zellen zur Differenzierung in Antikörper-sezernierende Plasma-Zellen zu verwandeln.^[82, 370] Die Funktionsfähigkeit des Konstrukts soll durch die Immunisierung von Mäusen überprüft werden. Die Synthesen der Glycopeptide wurden sowohl am Fmoc-Arginin vorbeladenen R PHB *Tentagel*[®]-Harz **179** als auch am entsprechenden *Barlos*-Harz **181** durchgeführt. Der Aufbau des doppelt glycosylierten Peptids **180** beginnt mit der OVA-Sequenz (Schema 108). Die ersten 17 Aminosäuren werden nach Standardprotokoll gekuppelt, gefolgt von einer halbautomatischen Kupplung des Spacers **63** mit HATU und HOAt. Danach wird das MUC1-B-Zell-Epitop aufgebaut. Dessen erste zwei Aminosäuren L-Serin¹⁹ und Glycin²⁰ werden doppelt gekuppelt, während für die Kupplung der darauffolgenden acht Aminosäuren nach dem Standardprotokoll verfahren wird. Es folgen zwei halbautomatische Kupplungen, in denen die zwei Glycosylaminosäuren **17** und **14** mit HATU/HOAt angeknüpft werden. Das

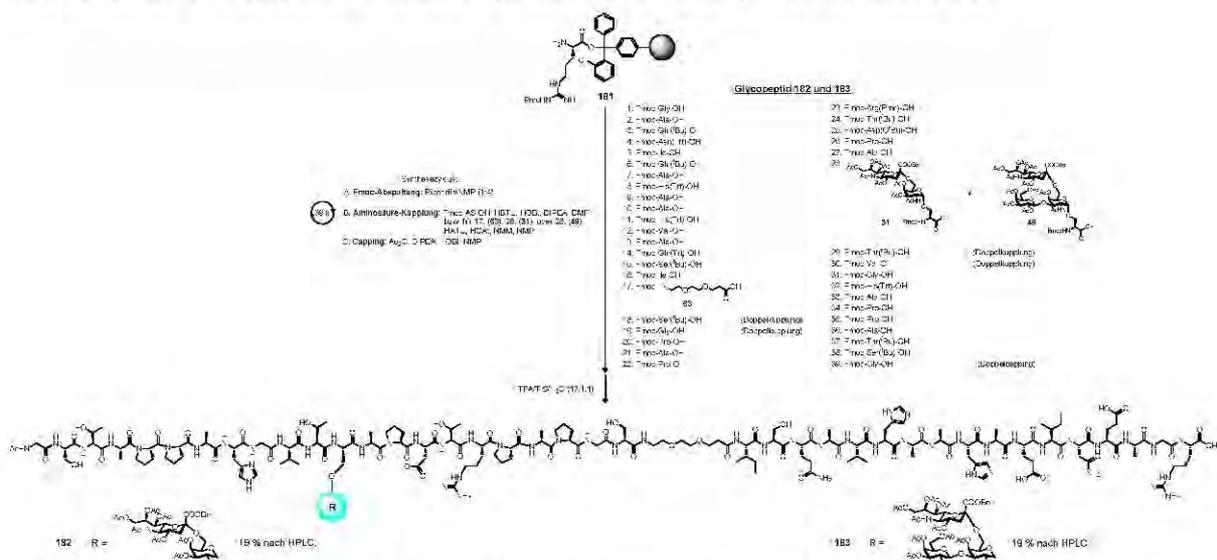
Glycosyl-Serin **17** wird 16 h und das Glycosyl-Threonin **14** 12 h unter Vortex-Schütteln gekuppelt. Die darauffolgenden zwei Aminosäuren L-Valin³¹ und Glycin³² werden wieder in Doppelkupplungen angebunden.



Schema 108: Synthese des OVA₍₃₂₃₋₃₃₉₎-MUC1-Glycopeptid-Konjugats **180**.

Das N-terminale Glycin⁴⁰ wird von der Fmoc-Gruppe befreit und unter Doppelcapping acetyliert. Nach Abspaltung des Glycopeptids vom Harz unter simultaner Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen wird das Rohprodukt durch die präparative RP-HPLC gereinigt und das Glycopeptid **180** in einer Ausbeute von 26 % isoliert.

Die anderen MUC1-OVA-Konjugate wurden am *Barlos*-Harz **181** aufgebaut. Dieses unterscheidet sich vom *Tentagel*[®]-Harz **179** in zwei wesentlichen Punkten. Zum einen ist seine Beladung wesentlich höher, zum anderen liegt die α -Aminogruppe der Startaminosäure in deblockierter Form vor. Die Synthese beginnt mit der Kupplung des Glycins. Die Glycopeptide **182** und **183** wurden in gleicher Weise aufgebaut (Schema 109).



Schema 109: Die Synthesen der OVA₍₃₂₃₋₃₃₉₎-MUC1-Glycopeptid-Konjugate **182** und **183**.

Die ersten 27 Aminosäuren wurden analog zum Glycopeptid **180** aneinander geknüpft. Anschließend werden die Glycosylaminosäuren **31** bzw. **48** halbautomatisch mit HATU und

HOAt unter 16 h Vortex-Schütteln gekuppelt. Die folgenden Aminosäuren L-Threonin³⁰ und L-Valin³¹ wurden ebenfalls doppelt gekuppelt. Die restlichen neun Aminosäuren wurden nach dem Standardverfahren angeknüpft. Die Glycopeptide **182** und **183** wurden nach Reinigung über die präparative RP-HPLC in Ausbeuten von 19 % isoliert.

Auch die Synthese der dreifach glycosylierten Peptide (Abbildung 36) gelang. Das Produkt konnte allerdings nach analytischer Reinigung nur im Massenspektrometer nachgewiesen werden. Die präparative Isolierung durch die RP-HPLC war wegen zahlreicher Abbruchsequenzen zu schwierig (siehe Spektrenanhang).

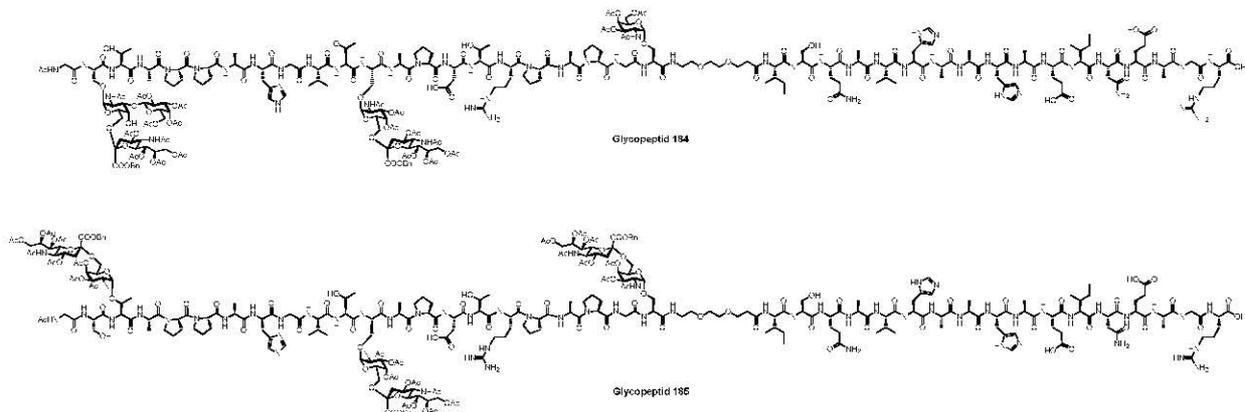
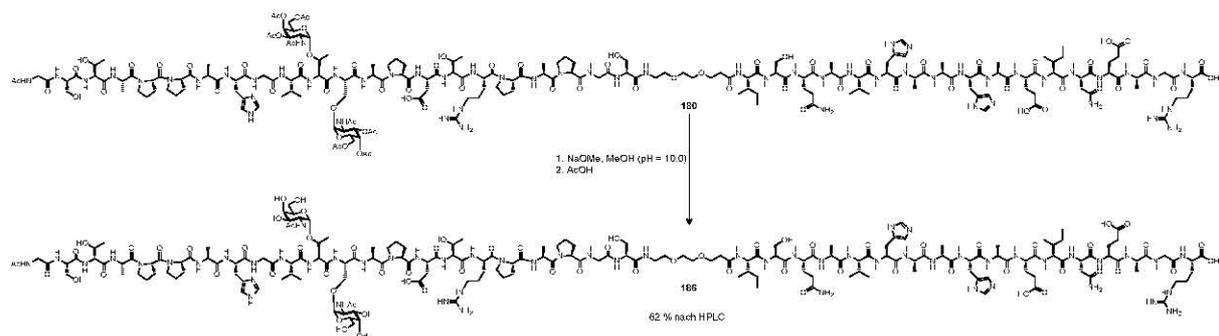


Abbildung 36: Die Synthese der OVA₍₃₂₃₋₃₃₉₎-MUC1-Glycopeptid-Konjugate **184** und **185**.

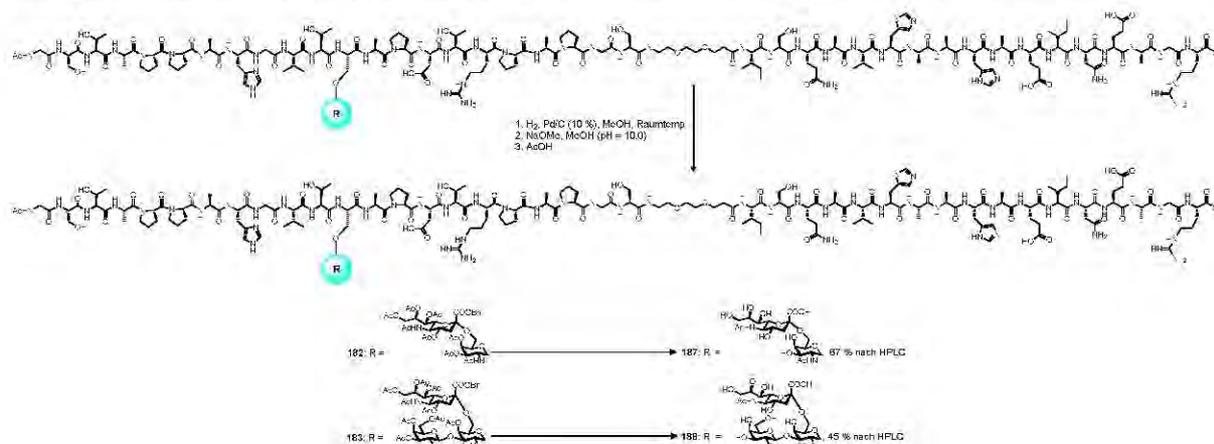
Die Glycopeptide **180**, **182** und **183** wurden im Glycanteil deblockiert. Hierzu wird das Glycopeptid **180** mit Natriummethanolat in Methanol in das Glycopeptid **186** überführt, das nach semipräparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 62 % erhalten wird (Schema 110). Beide Glycanteile können in den NMR-Spektren voneinander unterschieden werden. Es lagen keine Konformere wie bei gleichartigen Verbindungen vor.



Schema 110: Deblockierung des Glycopeptids **180**.

Die Glycopeptide **182** und **183** wurden zweistufig von den Glycanschutzgruppen befreit (Schema 111), indem zuerst die Benzylgruppe hydrogenolytisch über Palladium auf Aktivkohle in Methanol abgespalten und anschließend die Acetyl-Schutzgruppen mit Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 10.0 entfernt wurden. Während der hydrogenolytischen Debenzylierung treten zwei Probleme auf. Als erstes ist eine partielle Deacetylierung zu nennen, sodass ein nicht charakterisierbares Zwischenprodukt mit einer

variablen Anzahl an deblockierten Acetylgruppen erhalten wird, welches sowohl durch analytische RP-HPLC als auch massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte.



Schema III: Deblockierung der Glycopeptide **182**, **183**.

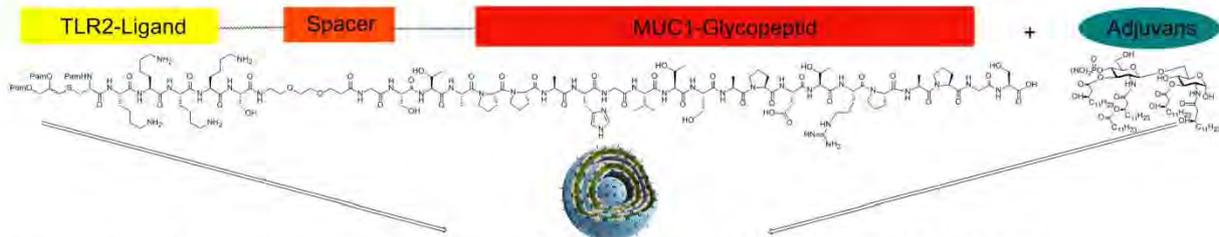
Des Weiteren ist die Abtrennung von der Aktivkohle schwierig, da ein Teil der Glycopeptide an der Aktivkohle adsorbiert bleibt und intensives Waschen erforderlich ist. Trotz des intensiven Waschens konnte nicht alles von der Aktivkohle gelöst werden. Das Glycopeptid **187** wurde in 67 % und das Glycopeptid **188** in 45 % Ausbeute durch semipräparative RP-HPLC isoliert.

3.7 Die Synthese von MUC1-Glycopeptid-Lipidkonjugaten durch Fragmentkondensation

3.7.1 Die Synthese von MUC1-Glycopeptid-Pam₃Cys-Konjugaten

Im folgenden Abschnitt soll die Synthese von extern adjuvierten Zweikomponenten-Vakzinen bestehend aus einem MUC1-Glycopeptid und einem Mitogen vorgestellt werden. Mitogene Substanzen sind in der Lage, in einer nicht antigenspezifischen Weise B- und/oder T-Zellen zu stimulieren und die Zellteilung anzuregen. Sie erhöhen so die Immunogenität von Strukturen (vgl. Kapitel 3.4.2). Als Mitogen sollte das synthetisierte *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3-bispalmitoyloxy-(2*R*,*S*)-propyl)-(*R*)-cystein (**77**) fungieren, welches bereits in Immunisierungen zum Einsatz kam^[172, 174] und in der Lage ist, B-Zellen und Makrophagen zu aktivieren.^[371-372] Anknüpfend an die von Metzger *et al.*^[373-374] gefundenen Resultate sollte das löslichere Lipoheptapeptid Pam₃Cys-Ser-Lys₄ synthetisiert werden, welches sich effektiver als das Pam₃Cys herausgestellt hat und zur Auslösung einer humoralen Immunantwort in der Anwesenheit eines T_H2-Epitopes und B-Zell-Epitopes in der Lage ist.^[185] In der Literatur sind Beispiele für Dreikomponenten-Vakzine aus TLR2-Liganden, T_H2- und B-Zell-Epitopen

beschrieben.^[189, 191] Der enthaltene TLR2-Agonist führt zur Ausbildung von cytotoxischen T-Zellen und zur Produktion und Sekretion von Cytokinen, die wiederum die Antikörperproduktion unterstützen.^[186-187, 374] Das geplante Vakzin soll daher entsprechend Schema 112 synthetisiert und als liposomales Präparat verabreicht werden.



Schema 112: Geplantes liposomales Vakzin aus Pam₃Cys-Spacer-Muc1 Glycopeptid und MPL-A.

Da dieses Konstrukt über kein T_H2-Epitop verfügt, sollte es auch nur bedingt in Lage sein, Antikörper zu produzieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Lipopeptid-Vakzin, aus Pam₃Cys-Ser-Ser-NP (147 – 158) (Influenza Nucleoprotein) in der Lage ist, cytotoxische T-Zellen auf das Influenza-Virus zu *primen*, was die Zerstörung des Virus nach sich zog.^[375] Eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes ist das schon erwähnte Tecemotide (*Stimuvax*[®]), das für die aktive Krebsimmuntherapie entwickelt wurde.^[83-84] Tecemotide ist eine liposomales Krebsvakzin, welches auf das tumorassoziierte Antigen MUC1 zielt. Es besteht aus einer 25 Aminosäuren langen Sequenz (STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP), die somit etwas länger als die tandem repeat-Sequenz und C-terminal mit einem Palmitoyllysin-Rest verknüpft ist. Dieser soll die Eingliederung in das Liposom aus dem MPL-A, Cholesterin, Dimyristoylphosphatidylglycerol und Dipalmitoylphosphatidylcholin erleichtern. Es befindet sich derzeit in der Erprobung in verschiedenen klinischen Studien. Der von *Merck* postulierte Mechanismus läuft entsprechend der Abbildung 37 über den MHC-I-(bzw. HLA)Komplex und über eine cytotoxische T-Zelle ab.

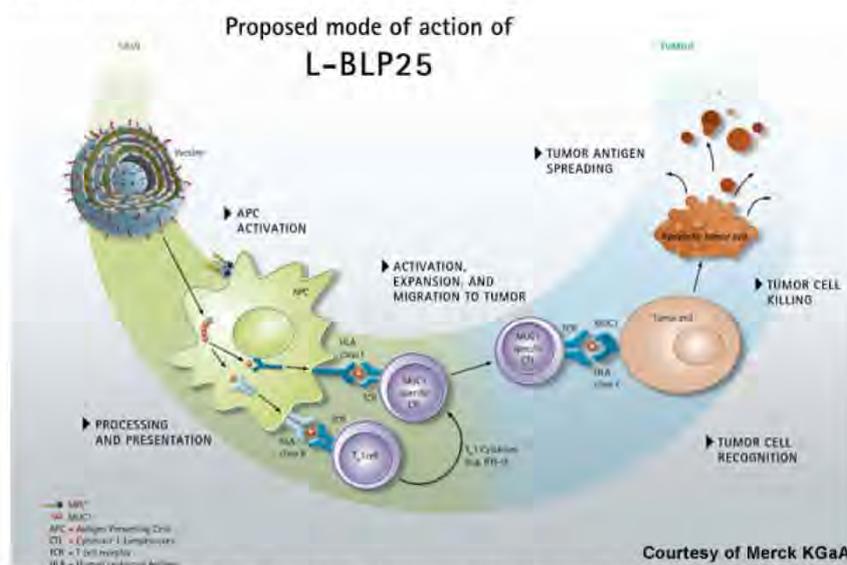


Abbildung 37: Postulierter Wirkmechanismus des Tecemotide mit freundlicher Genehmigung von Merck Serono.

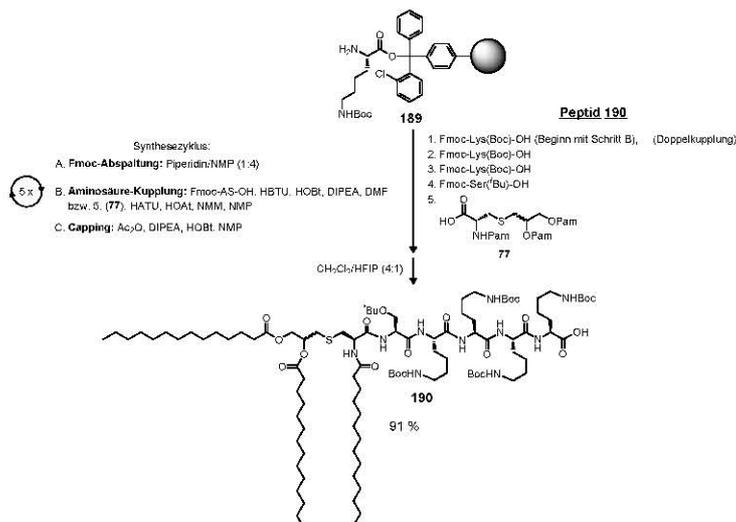
Cytotoxische T-Zellen hindern Tumorzellen mit überexprimiertem MUC1 am Wachstum, indem sie Perforine und Granzyme ausschütten und sie in den programmierten Zelltod treiben. Durch die Produktion und Sekretion von Interferon- γ fördern sie benachbarte Zellen zur Produktion von MHC-I-Proteinen, welches eine stärkere Präsentation von intrazellulär abgebauten Peptiden nach sich zieht.^[10]

In der Literatur lassen sich einige Beispiele für die gemeinsame Verwendung von Pam₃Cys mit dem MPL-A finden.^[192-193] Das geplante liposomale TLR2-MUC1-Konjugat sollte sowohl B- und T-Zellen stimulieren, die Zellteilung anregen als auch die Sezernierung von IL-2 aktivieren, die für die Umwandlung einer naiven CD8⁺-T-Zelle in eine cytotoxische Zelle essentiell ist. Durch liposomale Präsentation mit dem MPL-A-Adjuvans sollte sich zusätzlich zu den immunstimulatorischen Effekten (vgl. Kapitel 3.4.4) noch ein Depot-Effekt ausnutzen lassen können. Dieser ermöglicht die verzögerte Verteilung des Vakzins aufgrund seiner mäßigen Löslichkeit in Wasser. Die Bindung des Lipopeptids sollte als Amid an das Spacer-MUC1-Glycopeptid erfolgen. Der lineare Aufbau des Konstrukts an der festen Phase war wegen der Deblockierung der Acetyl-Schutzgruppen nicht erfolgreich, da es zu einem simultanen Verlust der Palmitinsäureester kam.^[376] Der Aufbau über ein vollständig deblockiertes MUC1-Glycopeptid, in dem die freie Amino-Gruppe des Oligoethylenspacers in einer Fragmentkondensation mit dem freien C-Terminus des vollständig blockierten TLR-2-Agonisten Pam₃Cys-Ser-Lys₄ reagiert, erschien nicht attraktiv. Zum einen ist die „chemoselektive Fragmentkondensation“ in einem begrenzten Rahmen chemoselektiv zum anderen sind die Ausbeuten gering.^[377-379] Sobald Aminosäuren mit freiem Aminoterminus im Peptidkonjugat vorhanden sind, ist die Reaktion nicht mehr anwendbar. Zudem wird das MUC1-Glycopeptid zweimalig zur Deblockierung von Schutzgruppen mit starken Säuren behandelt. Daher wurde nach einer anderen Methode gesucht, die es erlaubt, auch schwierige Glycopeptid-Lipidkonjugate zu synthetisieren.

3.7.1.1 Die Synthese des Pam₃Cys-Ser-Lys₄

Der Aufbau des Lipopeptids Pam₃Cys-Ser-Lys₄ erfolgte an der festen Phase. Um es selektiv über eine Amid-Bindung mit einem Peptidrest zu konjugieren, muss es bis auf die Carboxylgruppe in vollständig blockierter Form vorliegen. Die Festphasen-Lipopeptidsynthese erfolgt an einem mit Lysin(Boc)-OH vorbeladenen *Barlos*-Harz (Schema 113).^[319-321] Die erste Aminosäure L-Lysin(Boc)-OH wurde doppelt und die restlichen drei Aminosäuren wurden unter Standardbedingungen gekuppelt. Zur Anbindung des Pam₃Cys (**77**) wird HATU und HOAt mit *N*-Methylmorpholin in *N*-Methyl-2-pyrrolidon und

Dichlormethan verwendet. Die Lösung wird 16 h unter Vortex-Bedingungen geschüttelt, wonach anschließend ein Bromphenolblau-Test durchgeführt wird.



Schema 113: Die Synthese des Lipopeptids **190**.

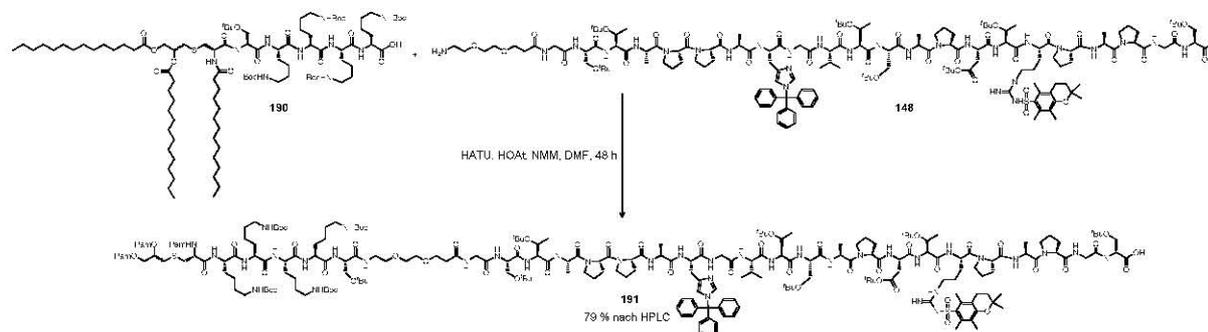
Nachdem der Test durch Gelbfärbung vollständigen Umsatz anzeigte, wurde ein Capping durchgeführt. Bei blauer Färbung wurde die Kupplung mit Pam₃Cys wiederholt. Das Lipopeptid **190** wird nach der Synthese im Vakuum getrocknet und nach gravimetrischer Bestimmung der Ausbeute mit Hexafluoroisopropanol vom Harz abgespalten. Das Produkt konnte in einer Ausbeute von 91 % isoliert werden. Eine Reinigung über die präparative RP-HPLC fand nicht statt, da das analytische Chromatogramm eine ausreichende Reinheit anzeigte, sodass das Lipopeptid **190** für die nachfolgenden Fragmentkondensationen einsetzbar war.

3.7.2 Die Fragmentkondensation von MUC1-Glycopeptiden mit dem Lipopeptid

Für die Fragmentkondensation werden die partiell geschützten MUC1-Glycopeptide (siehe Kapitel 3.5.4) eingesetzt, die den Vorteil haben, dass Nebenreaktionen an der Glycopeptidseitenkette ausgeschlossen werden können. Zudem verhindern die vorhandenen Schutzgruppen die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und Sekundärstrukturen, wodurch das Glycopeptid in Lösung in ausgestreckter Form vorliegen sollte, sodass die Reaktionszentren leichter zugänglich sind.

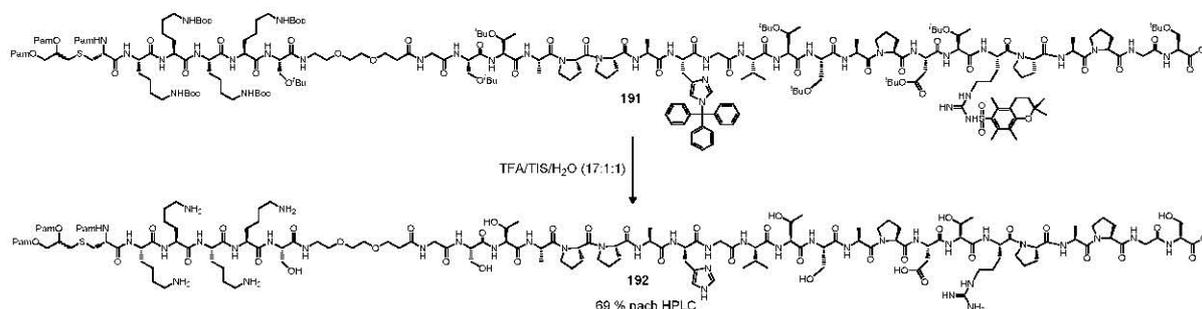
Die Fragmentkondensation mit dem Lipopeptid sollte zuerst am glycanfreien Peptid **148** studiert werden. Hierzu wird Pam₃Cys-Ser(O^tBu)-(Lys(Boc))₄-OH (**190**) mit einer Kombination aus HATU und HOAt in *N,N*-Dimethylformamid 30 Minuten voraktiviert, wobei sich der Aktivester ausbildet (Schema 114). Der Aktivester wird danach zum Peptid

148 zugegeben und das Reaktionsgemisch 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird im Hochvakuum von den Lösungsmitteln befreit und die vollgeschützte Form an einer semipräparativen C4-Protein-Säule mittels RP-HPLC gereinigt. Das geschützte Lipopeptid **191** wird nach Reinigung in einer Ausbeute von 79 % erhalten.



Schema 114: Fragmentkondensation zum vollgeschützten Lipopeptid **191**.

Das Vorhandensein der Schutzgruppen wirkt sich positiv auf die Isolierung durch die RP-HPLC aus. Zum einen erleichtern die UV-aktiven Schutzgruppen die Detektion des Produktes während der semipräparativen RP-HPLC, zum anderen wirken sie der Peakverbreiterung und dem Tailing entgegen. Abschließend müssen die säurelabilen Schutzgruppen entfernt werden. Hierzu wird das Lipopeptid **191** mit Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan^[353] von den säurelabilen Schutzgruppen deblockiert (Schema 115). Das Lipopeptid **192** wird nach Reinigung durch die semipräparative RP-HPLC in einer Ausbeute von 69 % isoliert. Es ist in der semipräparativen RP-HPLC deutlich schwerer zu detektieren als das Edukt. Die Ursache hierfür liegt darin, dass kein scharfer Retentionspeak vorliegt, sondern ein Retentionsintervall, der sich über mehrere Minuten erstreckt und auf die starken Wechselwirkungen der Lipidketten mit der stationären Phase zurückgeführt werden kann.

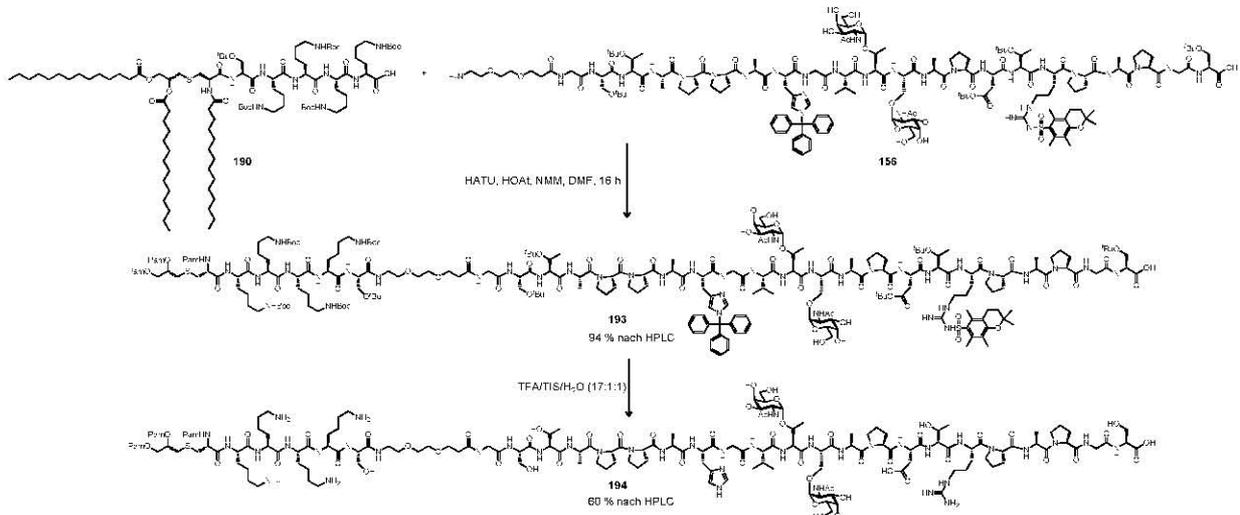


Schema 115: Deblockierung des Lipopeptids **192**.

Das Laufverhalten führt dazu, dass das Produkt **192** nur sehr verdünnt von der Säule eluiert wird. Auch liegen im Lipopeptid **192** nur schwach chromophore Gruppen vor, die eine geringe UV-Absorption hervorrufen. Die beiden Gegebenheiten zusammen führen zur geringen UV-Intensität in der HPLC, sodass der Absorptionspeak im Chromatogramm klein ausfällt und leicht übersehen werden kann. Für die Detektion ist eine Kopplung an ein

Massenspektrometer ratsam. Das erhaltene Lipopeptid wurde durch NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert. In den NMR-Spektren konnten nicht alle Signale detektiert werden, da das Glycopeptid nur wenig löslich ist. Die Signale des Lipidteils fehlten oder waren nur partiell vorhanden. Im wässrigen Medium liegen womöglich Micellen vor. Im Massenspektrum wurde das Produkt **192** in dreifach protonierter Form gefunden. Zusätzlich wurde ein Massenpeak mit einer um 16 Einheiten erhöhten Masse gefunden. Der Diethylether, welcher zum Ausfällen des Lipopeptides benutzt wurde, könnte Spuren von Peroxid enthalten haben, welche zur Oxidation des Schwefels führten.

Die Synthese des doppelt glycosylierten Lipopeptids **193** wurde nach dem gleichen Verfahren vorgenommen. Die eingesetzte Menge an Lipopeptid **190** wurde jedoch von 1.2 auf 1.7 Äquiv. erhöht (Schema 116), was eine Ausbeute von 94 % an **193** nach semipräparativer RP-HPLC zur Folge hatte. Das erhaltene partiell geschützte Lipoglycopeptid **193** wurde analytisch charakterisiert. Im NMR-Spektrum in deuteriertem Chloroform waren viele zum Glycopeptid gehörende Signale nicht detektierbar. Dies trifft vor allem für die Protonen im Glycanteil zu. Die Verwechslung des Eduktes **190** mit dem Produkt **193** kann ausgeschlossen werden, da die beiden Substanzen im HPLC-Chromatogramm deutlich separiert vorliegen und isoliert werden.

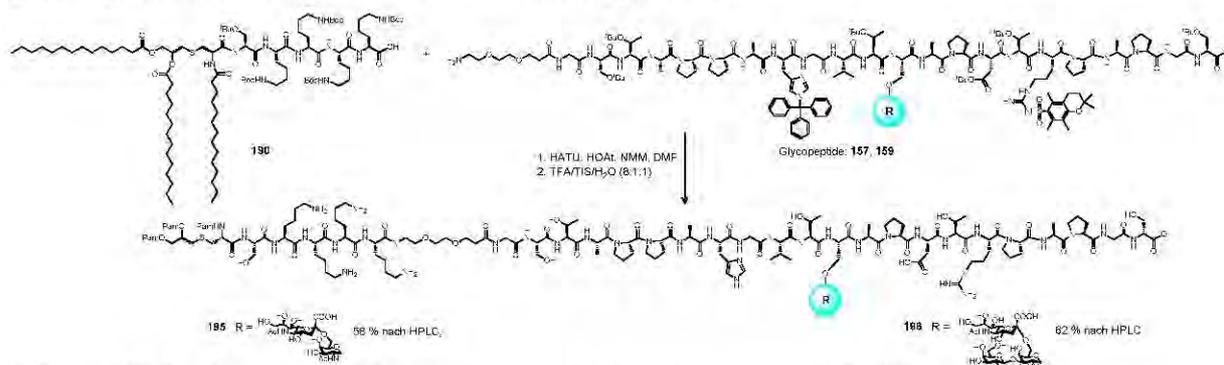


Schema 116: Die Synthese und Deblockierung zum Lipoglycopeptid 194.

Zudem sind charakteristische Signale, z. B. des Histidins und des Lipidteils, im NMR-Spektrum deutlich sichtbar. Die Massenspektrometrie bestätigt das Vorliegen von **193**. Das Edukt **193** wird anschließend mit Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan^[353] von den säurelabilen Schutzgruppen befreit, durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und das Produkt **194** in 60%iger Ausbeute als farbloses Lyophilisat erhalten. Die NMR-Spektren des Produktes **194** zeigten die gleichen Auffälligkeiten wie die des Produktes **192**. Die Signale sind verbreitert und nicht alle sind detektierbar. Im Gegensatz zum Edukt **193** sind die

Protonen des Glycanteils für das Endprodukt **194** im NMR sichtbar und den beiden unterschiedlichen Aminosäuren zuordenbar. Die Signale des Lipidteils sind im Gegensatz zum Edukt **193** nur partiell detektierbar, was die Annahme einer Mizellenbildung unterstützt. Wie die Produkte zuvor konnte das Lipoglycopeptid **194** durch Massenspektrometrie bestätigt werden, wobei es in charakteristischer Weise als zweifach, dreifach und vierfach geladenes Ion detektiert werden konnte. Des Weiteren gelang der Nachweis mittels hochauflösender Massenspektrometrie, durch die das Lipoglycopeptid **194** zweifelsfrei identifiziert werden konnte.

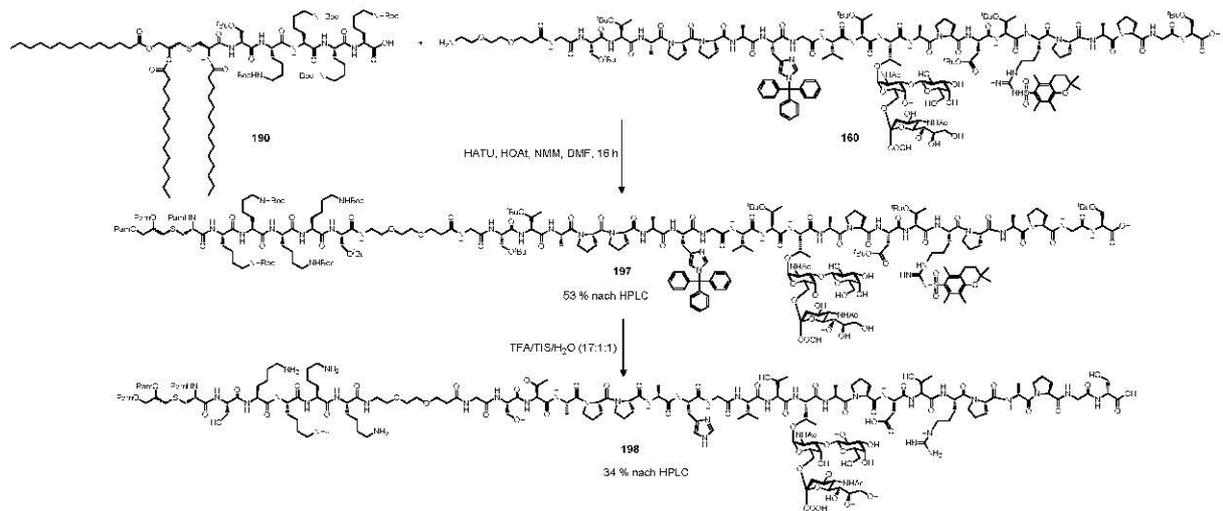
Für die Synthesen der folgenden Lipoglycopeptide **195** und **196** werden ebenfalls 1.7 Äquiv. an Lipopeptid **190** eingesetzt. Beide Ansätze werden 16 h gerührt und anschließend von den Lösungsmitteln im Vakuum befreit (Schema 117). Die erhaltenen Rohprodukte wurden nicht gereinigt, sondern roh in der nächsten Stufe umgesetzt.



Schema 117: Die Synthesen und Deblockierung zu den Lipoglycopeptiden 195, 196.

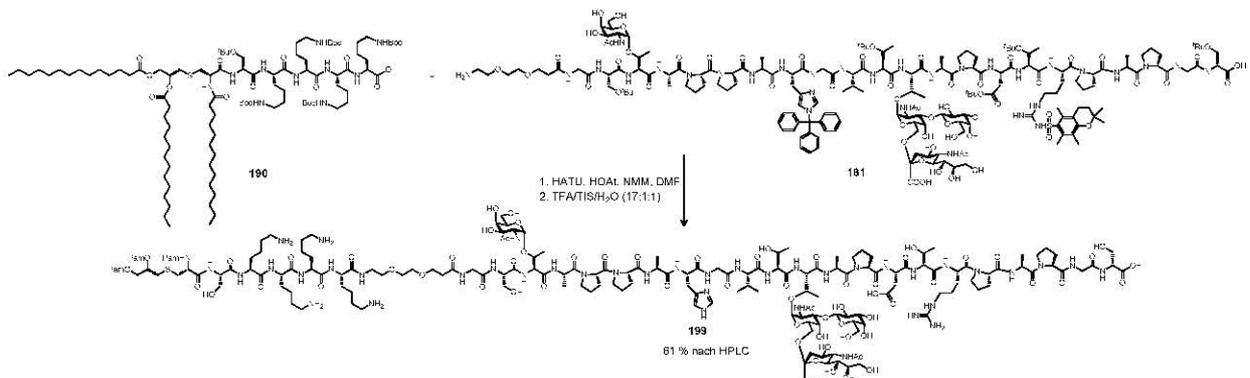
Zunächst wurden sie mit Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan^[353] behandelt, wobei der Gehalt an Trifluoressigsäure auf 80 % herabgesetzt wurde, um die Glycanbestandteile nicht anzugreifen. Die erhaltenen Lipoglycopeptide **195** und **196** wurden mit Diethylether behandelt. Hierbei kam es vermutlich zur Oxidation des Schwefels. Die beiden Lipoglycopeptide wurden über zwei Stufen in einer Ausbeute von 58 % für das Lipoglycopeptid **195** bzw. 62 % für das Lipoglycopeptid **196** erhalten. Sie wurden sowohl durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie als auch durch hochaufgelöste Massenspektren in ihrer Struktur bestätigt.

Die Synthese zum Lipoglycopeptid **198** wurde zweistufig mit der Isolierung des Kupplungsproduktes **197** durchgeführt (Schema 118). Das Kupplungsprodukt **197** wurde nach semipräparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 53 % erhalten. Auf vollständige Charakterisierung wurde verzichtet und mit 80%iger Trifluoressigsäure zum Lipoglycopeptid **198** umgesetzt. Das Lipoglycopeptid wird nach Reinigung durch die semipräparative RP-HPLC in einer Ausbeute von 34 % erhalten und anschließend spektroskopisch charakterisiert.



Schema 118: Die Synthese und Deblockierung zum Lipoglycopeptid **198**.

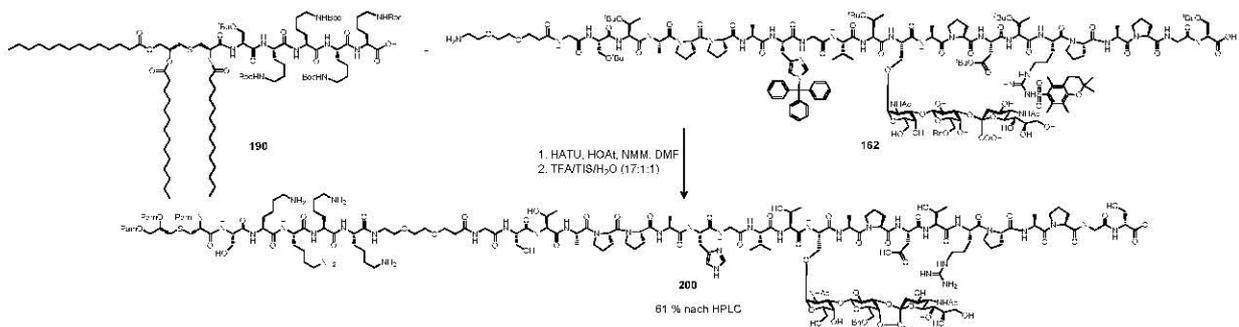
Das doppelt glycosylierte Lipopeptid **199** wird entgegen den Erwartungen im zweistufigen Prozess ohne Zwischenreinigung in einer Ausbeute von 61 % nach semipräparativer RP-HPLC-Reinigung erhalten (Schema 119).



Schema 119: Die Synthese und Deblockierung zum Lipoglycopeptid **199**.

Da auch beim Lipoglycopeptid **199** Diethylether zum Einsatz kam, wurde auch dieses oxidiert. Auch das Lipoglycopeptid **199** wurde analytisch charakterisiert. Die Oxidation kann hier ebenfalls durch hochaufgelöste Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

Als letztes wurde das partiell geschützte Glycopeptid **162** in einer Fragmentkondensation mit dem Lipopeptid **190** umgesetzt. Das gewünschte Produkt konnte nur zum Teil erhalten werden. Zwar gelang die Fragmentkondensation, jedoch wurde sie von einer intramolekularen Lactonbildung begleitet (Schema 120).



Schema 120: Die Synthese und Deblockierung zum Lipoglycopeptid **200**.

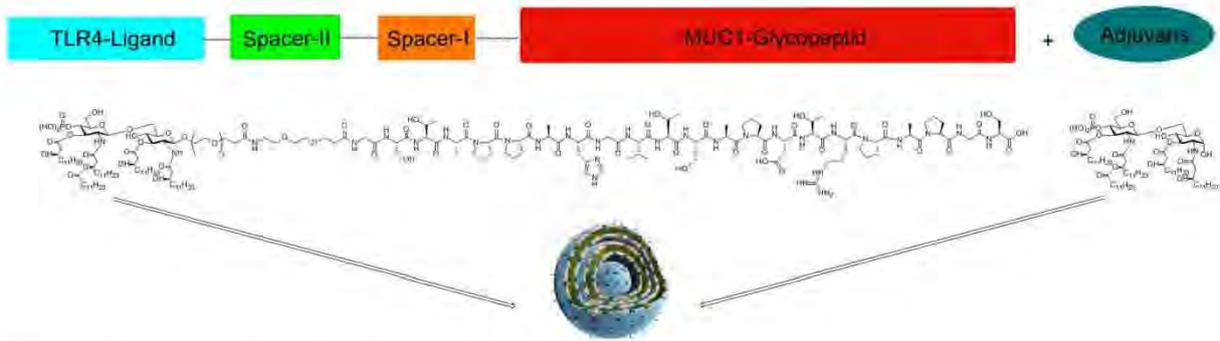
Da das partiell blockierte Zwischenprodukt nicht gereinigt und per Massenspektrometrie vermessen wurde, kann keine Aussage getroffen werden, ob die Lactonbildung während der Fragmentkupplung hervorgerufen wird oder ob die saure Abspaltung zur Ausbildung des Lactons geführt hat. Nach Deblockierung und semipräparativer RP-HPLC konnte das Endprodukt in einer Ausbeute von 32 % isoliert werden. Es können die zwei Isomere 1→2- und das 1→4-verbrückte Lacton ausgebildet werden. Eine Lokalisierung des Lactons durch NMR-Spektroskopie war aufgrund von Substanzmangel und schlechter Auflösung der Spektren nicht möglich. Bei Bildung beider Isomere wäre eine chromatographische Trennung ohnehin nicht möglich gewesen, da die chromatographischen Eigenschaften hauptsächlich durch den Lipidteil des Produktes bestimmt werden und eine Auflösung der Isomere durch die benutzte C4-Säule unmöglich ist. Die Lactonbildung wird durch die erhaltenen Massenspektren angezeigt. Die saure Lactonbildung in sialylierten Oligosacchariden wurde unter anderem von *Dziadek* beobachtet. Sie diene als interner temporärer Schutz für die Carboxylfunktion der Neuraminsäure.^[151, 380-382] Die Substanz wurde nicht weiter umgesetzt, da die Bedingungen für die Lactonöffnung nicht mit der des Lipoglycopeptides vereinbar gewesen wären. Somit stellt das Lipoglycopeptid **199** die Endstufe dar.

Insgesamt gelang die Synthese von sieben Lipo(glyco-)peptiden. Dabei konnten durch die angestrebte Synthesestrategie gute Ausbeuten für die anspruchsvolle Kupplung erzielt werden. Die Isolierung der Lipo(glyco-)peptide gestaltete sich aufgrund der breiten Retentionspeaks in der RP-HPLC und wegen geringer UV-Absorption schwierig, sodass oft Massenspektren herangezogen werden mussten.

3.7.3 Die Fragmentkondensation von MUC1-Glycopeptiden mit dem MPL-A

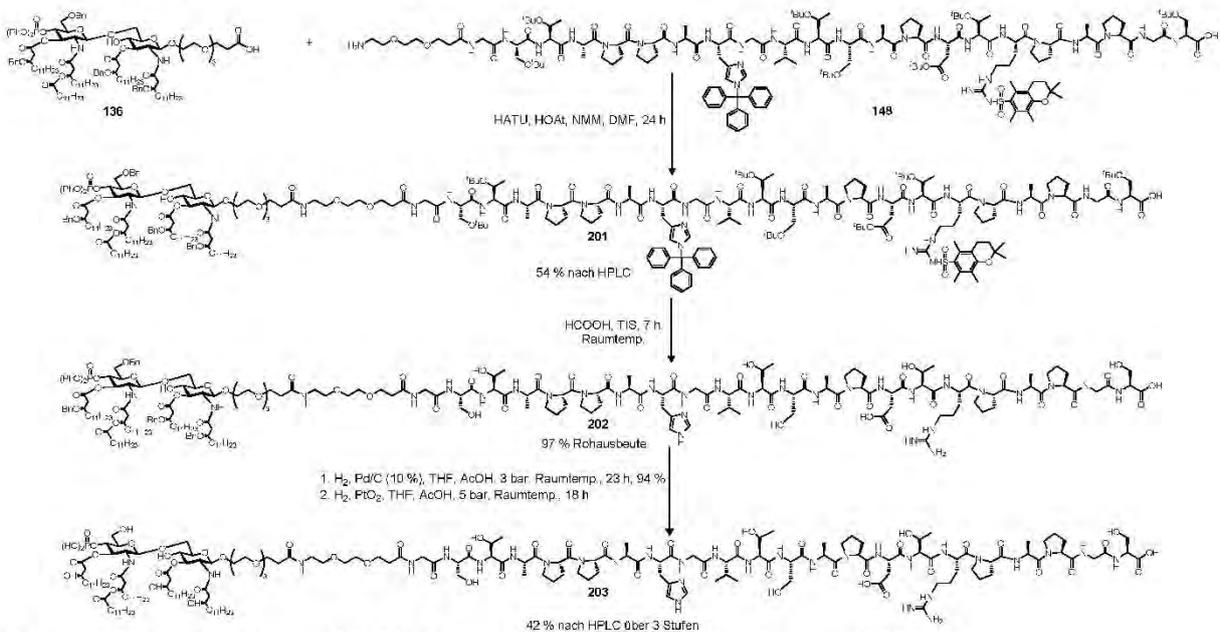
Die in den vorstehend beschriebenen Synthesen gesammelten Erfahrungen werden bei der Synthese von Vakzinen aus einem MUC1-Glycopeptid und zwei Lipidadjuvantien genutzt. Anlass zu den Synthesen waren Untersuchungen von *Ramanathan et al.*,^[223] die von *GSK* auf den Markt gebrachten Impfstoffe *Cervarix*[®] und *Fendrix*[®] sowie das von *Biomira Inc.* entwickelte Tecemotide (*Stimuvax*[®]), in denen Vakzine und als externes Adjuvans das MPL-A vorliegen.^[161] Hier war nun das Ziel ein Zweikomponenten-Vakzin aus dem B-Zell-Epitop und dem TLR4-Liganden, die über einen nicht-immunogenen Spacer gebunden sind, aufzubauen und in ein Liposom einzufügen. Durch die Gleichartigkeit des TLR4-Liganden

und des Adjuvans sollte sich das Vakzin perfekt der liposomalen Struktur anpassen (Schema 121).



Schema 121: Die Synthese eines liposomalen Vakzins.

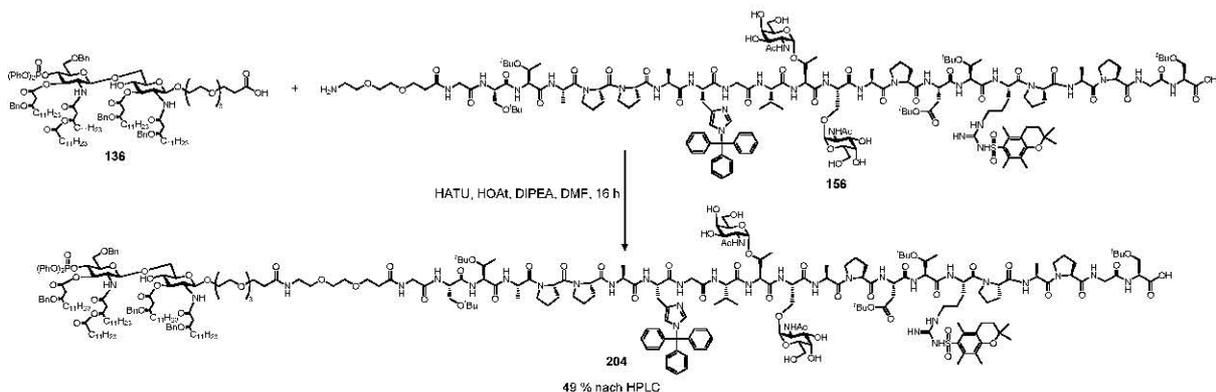
Durch das zusätzliche MPL-A sollte durch Ausbildung von Überstrukturen die Immunogenität nochmals verstärkt werden. Da MPL-A von Natur aus Micellen und Liposome ausbildet,^[198] sollte durch Verwendung des MPL-A als „internes“ und als „externes“ Adjuvans eine spontane Liposomenbildung eintreten. Die für die Synthese benötigten Bausteine wurden bereits in den Kapiteln 3.4.8 und 3.5.4 vorgestellt. Beide Bausteine sollten in einer Fragmentkondensation aneinander gekuppelt werden. Zunächst wurde diese Fragmentkondensation mit dem unglycosylierten Peptid **148** untersucht. Hierzu wurde ein kleiner Überschuss des spacergebundenen MPL-A **136** mit HATU und HOAt in Kombination mit *N*-Methylmorpholin in *N,N*-Dimethylformamid durch 30-minütiges Rühren bei Raumtemperatur in den Aktivester umgewandelt, dieser zum Peptid **148** zugegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt (Schema 122). Das Phosphoryl-Lipoglycopeptid **201** wird nach Reinigung durch die semipräparative RP-HPLC in einer Ausbeute von 54 % erhalten.



Schema 122: Die Synthese und Deblockierung zum Phosphoryl-Lipoglycopeptid **203**.

Das MUC1-Glycopeptid-MPL-A-Konjugat **201** wurde NMR-spektroskopisch und durch hochaufgelöste Massenspektrometrie charakterisiert und in seiner Struktur bestätigt. In den zweidimensionalen NMR-Spektren erschienen die Signale aus dem MPL-A-Teil des Konjugates **201** im Vergleich zum MUC1-Glycopeptid-Teil deutlich intensiver. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte die unzureichende Solvatisierung des Peptid-Teils in deuteriertem Chloroform oder die Bildung von Überstrukturen sein. Das erhaltene Konjugat **201** wird anschließend über 7 h acidolytisch in Ameisensäure von den säurelabilen Schutzgruppen befreit. Das erhaltene Rohprodukt wird mit Dioxan gefällt und der Überstand, in dem sich die Abspaltprodukte befinden, vorsichtig abpipettiert. Nach Lyophilisation wird das Produkt **202** in einer Ausbeute von 97 % erhalten. Die noch enthaltenen Benzyl-Schutzgruppen werden, wie bereits in Kapitel 3.4.8 beschrieben, hydrogenolytisch entfernt. Hierzu wird das Konjugat **202** zuerst in Tetrahydrofuran/Essigsäure im Autoklaven bei 3 bar Wasserstoffatmosphäre über Palladium auf Aktivkohle hydriert. Das debenzylierte Produkt wird in 94%iger Rohausbeute erhalten. Im letzten Schritt werden die Phosphorsäurephenylester über den *Adams*-Katalysator aus Platin(IV)-oxid hydrogenolytisch gespalten. Nach Reinigung durch die semipräparative RP-HPLC wird das Glycopeptid in einer Ausbeute von 42 % erhalten. Die Aufarbeitung und die chromatographische Reinigung erwiesen sich noch schwieriger als die der Pam₃Cys-Konjugate. Durch ausgeprägte Adsorption des Produktes **203** an das Säulenmaterial werden breite Retentionsintervalle mit sehr starkem Tailing verursacht. Die UV-Absorptionsintensität des Endproduktes **203** ist im Vergleich zu den Pam₃Cys-Konjugaten noch niedriger. Das starke Schäumungsverhalten erschwert die Isolierung. Das Produkt wird als farbloses Lyophilisat erhalten. Versuche, das Konjugat **203** zu charakterisieren, scheiterten an dessen Unlöslichkeit. Bestrebungen, das Produkt in Wasser zu lösen, führten zur Agglutination des Produktes.

Für die Fragmentkondensation des zweifach glycosylierten Peptides **156** wurden die Äquiv. am spacergebundenen MPL-A von 1.1 auf 1.5 erhöht (Schema 123).



Schema 123: Die Fragmentkondensation zum Lipoglycopeptid **204**.

Die Zeit für die Aktivesterbildung wurde erhöht und die Lösungsmittelmenge verringert. Die Schritte der Fragmentkondensation wurden analog zur vorherigen Synthese vorgenommen. Das Produkt **204** lag nach Reinigung durch die semipräparative RP-HPLC in einer Ausbeute von 49 % vor. Zusätzlich zum Produkt **204** wurde das Nebenprodukt **204a** isoliert (Abbildung 38). Es handelte sich dabei um das Kondensationsprodukt aus zwei MUC1-Sequenzen mit dem MPL-A. Nach der Reinigung durch RP-HPLC wurde es in einer Ausbeute von 22 % isoliert und durch Massenspektrometrie identifiziert.

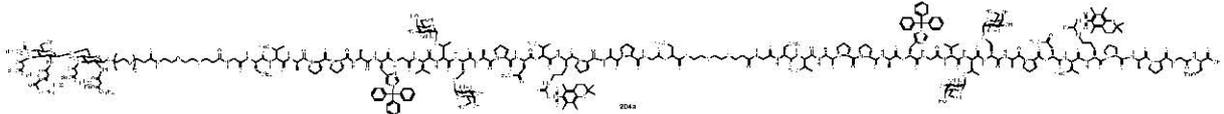
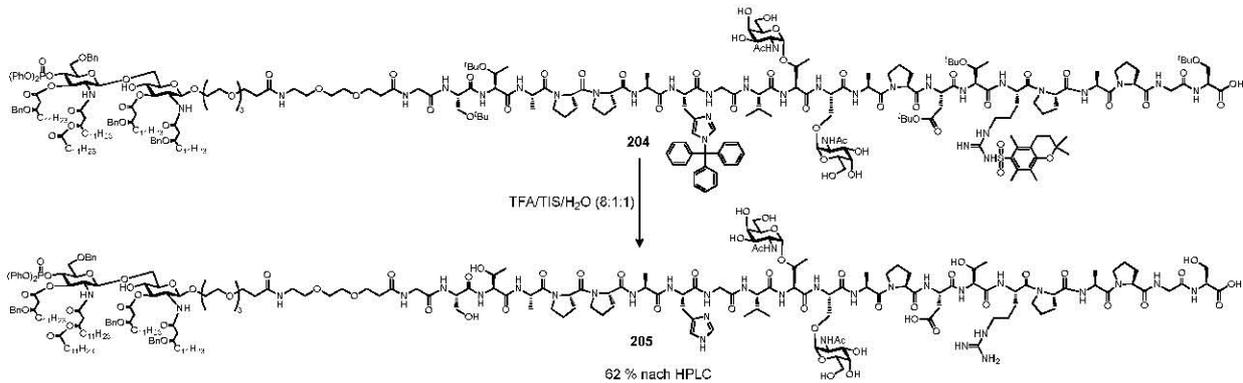


Abbildung 38: Nebenprodukt bei der Fragmentkondensation zum MUC1-MPL-A Konjugat **204a**.

Aufgrund langer Reaktionszeiten bei der Acidolyse der Peptidschutzgruppe mit Ameisensäure wird auf die Deblockierung mit 80 % Trifluoressigsäure zurückgegriffen. Hierzu wurde das Konjugat **204** in Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan^[353] 70 Minuten bei Raumtemperatur gerührt (Schema 124). Nach Reinigung über semipräparative RP-HPLC wird das Konjugat **205** in einer Ausbeute von 62 % erhalten. Der Nachweis des Produktes gelang durch hochaufgelöste Massenspektrometrie.

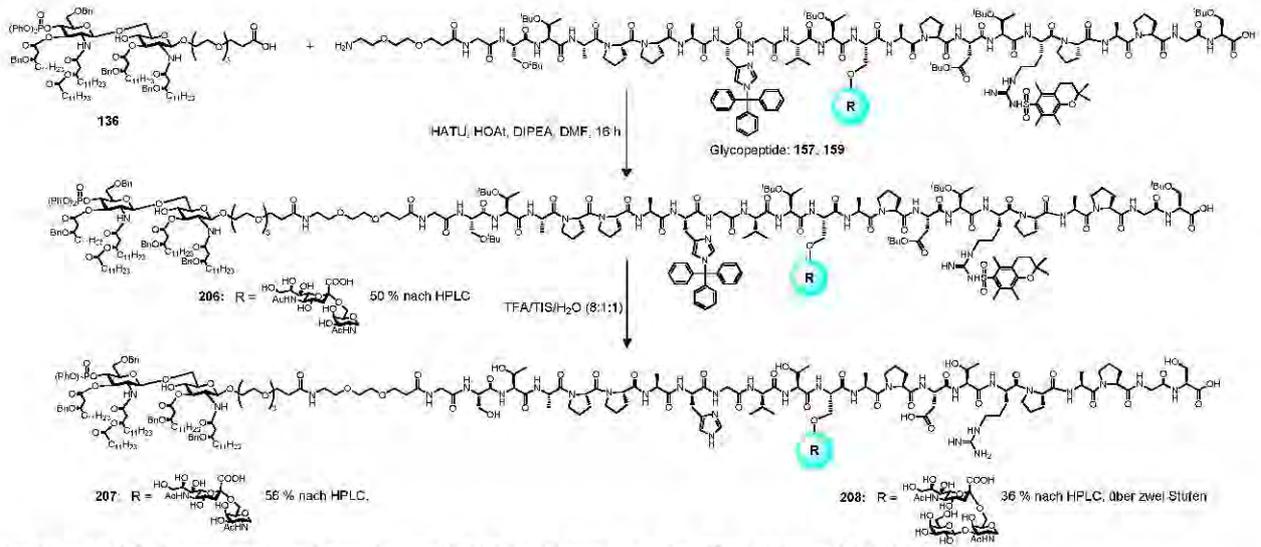


Schema 124: Deblockierung von den säurelabilen Schutzgruppen zum Konjugat **205**.

Die NMR-spektroskopische Vermessung war aufgrund der Löslichkeit des Konstrukt nicht möglich. In deuteriertem Wasser bildeten sich Überstrukturen, die schon bei kleinsten Mengen an Produkt eine milchartige Lösung ergaben. In deuteriertem *N,N*-Dimethylformamid erhielt man hochviskose, gelartige Lösungen.

Für die folgenden Fragmentkupplungen wurden die soeben beschriebenen Reaktionsbedingungen beibehalten. Zum Einsatz kamen die partiell geschützten MUC1-Glycopeptide **157** und **159**, die mit dem deblockierten ST_N- oder mit dem (2,6)-Sialyl-T-Antigen versehen sind (Schema 125). Das ST_N-Antigen tragende MPL-A-Konjugat **206** wird nach der Fragmentkupplung in einer Ausbeute von 50 % nach semipräparativer RP-HPLC isoliert. Bei dem mit (2,6)-Sialyl-T-Antigen verbundenen MPL-A-Konjugat **208** wird auf die

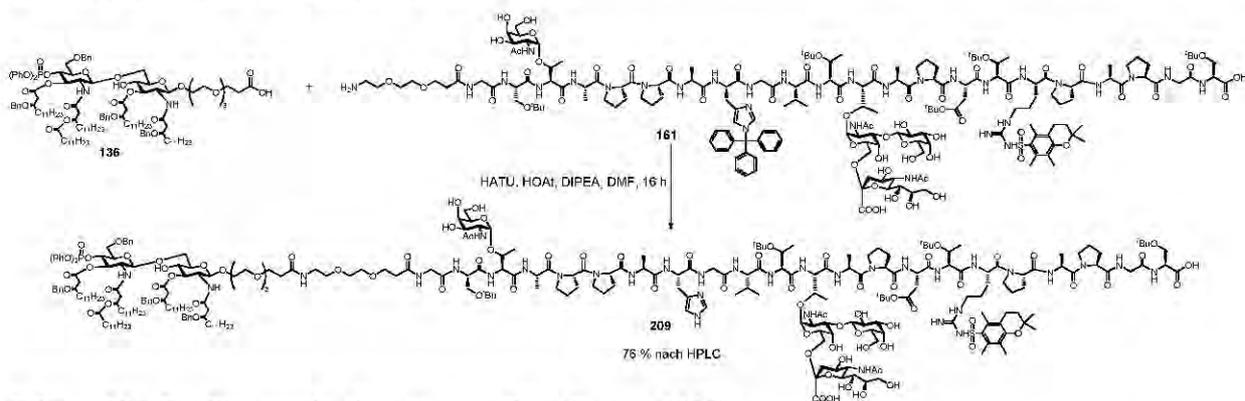
Zwischenreinigung verzichtet und die Spaltung der säurelabilen Schutzgruppen direkt vorgenommen.



Schema 125: Fragmentkondensation und Deblockierung zu den Konjugaten **207**, **208**.

Beim Konjugat **206** kam 80%ige Trifluoressigsäure zum Einsatz, während bei dem mit (2,6)-Sialyl-T-Antigen versehenen Zwischenprodukt eine höher konzentrierte Trifluoressigsäure-Mischung verwendet wurde, da die 80%ige Trifluoressigsäure-Mischung für die Deblockierung des Zwischenproduktes nicht ausreichte. Das MPL-A-Konjugat **207** wird nach semipräparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 56 % erhalten. Für das MPL-A-Konjugat **208** wird nach semipräparativer RP-HPLC eine Ausbeute von 36 % über zwei Stufen isoliert.

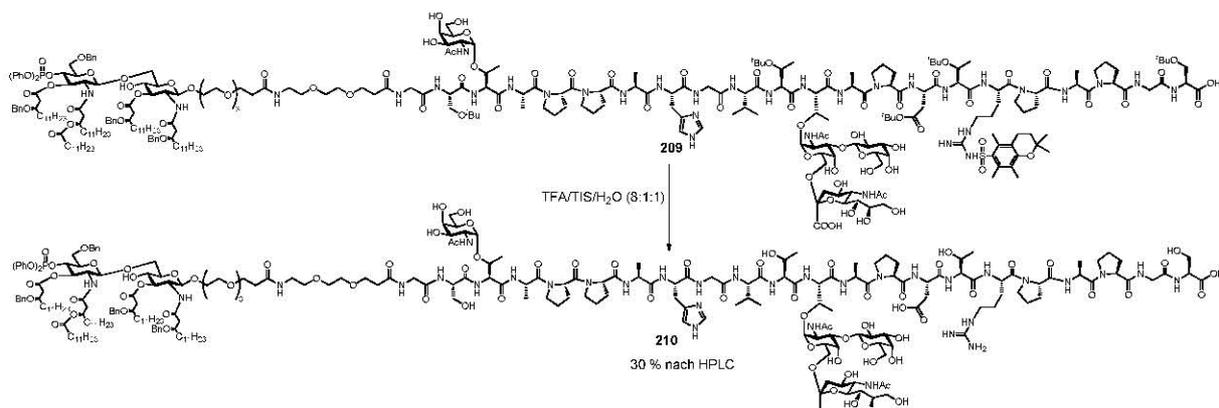
Als letztes MPL-A-Konjugat wurde das zweifach glycosylierte Glycopeptid **161** mit dem MPL-A-Aktivester umgesetzt (Schema 126).



Schema 126: Die Fragmentkondensation zum Lipoglycopeptid **209**.

Im Vergleich zu den anderen MPL-A-Konjugaten wurde die Zeit für die Aktivesterbildung auf 105 Minuten ausgeweitet, was sich positiv auf die Kupplungsausbeute auswirkte. So konnte das Konjugat **209** nach semipräparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 76 % isoliert werden. Von Konjugat **209** werden im letzten Schritt die säurelabilen Schutzgruppen

in 80 % Trifluoressigsäure abgespalten. Das Endprodukt **210** lag nach semipräparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 30 % vor (Schema 127).



Schema 127: Deblockierung der säurelabilen Schutzgruppen zum Konjugat **210**.

Insgesamt wurden fünf MPL-A-Konjugate durch diese Fragmentkondensationen synthetisiert. Diese konnten nach Reinigung charakterisiert werden. Dabei zeigten die NMR-Spektren mit zunehmenden Glycananteil eine schlechtere Qualität, was auf eine unzureichende Solvatisierung der Konjugate zurückgeführt wird. An den geschützten MPL-A-Konjugaten gelang die Spaltung der säurelabilen Peptidschutzgruppen, sodass die deblockierten Konjugate isoliert und gereinigt werden konnten. Die Detektion der deblockierten Konjugate gelang nur durch Kopplung von HPLC und einem Massenspektrometer, da die Konjugate fast keine UV-Absorption zeigten. Die Entfernung der hydrogenolytisch spaltbaren Schutzgruppen wurde nur am unglycosylierten Peptid durchgeführt, das von allen Schutzgruppen befreit werden konnte. Wie das MPL-A zeigen die synthetisierten Konjugate ein stark amphiphiles Verhalten, was die Analytik stark erschwert.

3.8 Die Synthese von Neoglycoproteinen

3.8.1 Biologischer Hintergrund

Wie bereits im Kapitel 3.6.1 beschrieben, erfordert die Aktivierung von B-Zellen zusätzlich die *linked recognition* über eine voraktivierte antigen-spezifische T_H2-Zelle, welche dasselbe Antigenfragment mit Hilfe ihres TCRs am MHC-II Komplex erkennt. Eine Strategie zur Induktion einer potenten Immunantwort besteht darin, die schwach immunogenen Antigene, die sogenannten Haptene, an ein geeignetes Träger-Protein (*Carrier*) zu konjugieren.^[383] Als Carrier-Proteine werden zum Beispiel das Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA),^[384] das Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke (keyhole limpet hemocyanin, KLH)^[385] oder das Tetanus-Toxoid (TTox)^[386-387] verwendet. Die Technik der Hapten-

Carrier-Konjugate kommt vor allem bei Vakzinen, die auf Oligosacchariden beruhen, zum Einsatz.^[378, 387-391] Da diese über keine peptidischen Epitope verfügen, können Antigen-präsentierende Zellen keine Peptidfragmente auf ihren MHC-II-Komplexen präsentieren und wiederum keine T_H2 -Zellen aktivieren, wodurch Saccharidbestandteile nur eine begrenzte Immunogenität aufweisen. Das gesamte synthetische Vakzin-Konjugat kann von einer B-Zelle mit passendem B-Zell-Rezeptor durch rezeptorvermittelte Endocytose internalisiert, proteolytisch gespalten und an MHC-II-Molekülen gebunden werden. Dabei werden nicht nur Fragmente des B-Zell-Epitopes sondern auch verschiedene Peptidfragmente des Carrier-Proteins an der Plasmamembran als MHC-II-Peptidfragment-Komplexe präsentiert (Abbildung 39, vgl. Abbildung 32).

Da in Proteinen oft mehr als nur ein T_H2 -Zell aktivierendes Epitop vorliegt, ist auch die Wahrscheinlichkeit einer Aktivierung drastisch erhöht. Die Entwicklung von Neoglycoproteinen auf der Basis von Carrier-Proteinen, gegen die der Mensch vorimmunisiert ist, stellt ein attraktives Mittel dar, um neue Vakzine mit erweitertem Anwendungsspektrum zu etablieren.

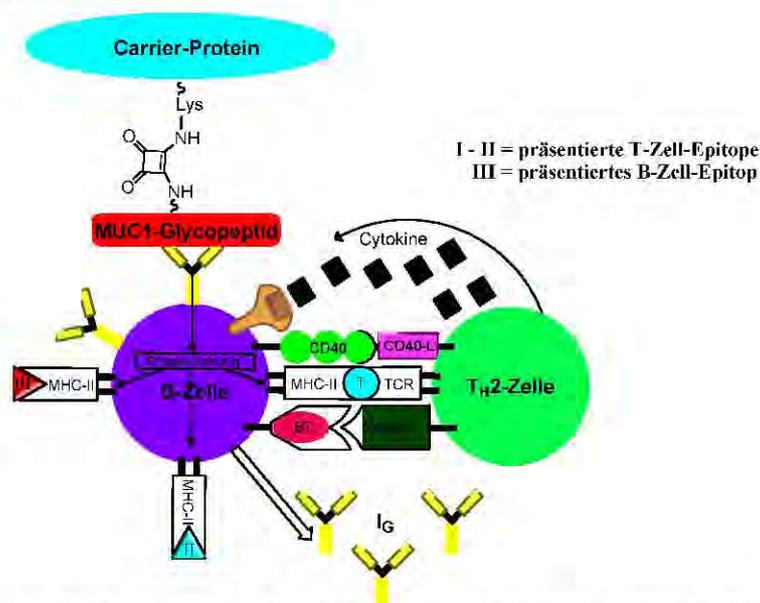


Abbildung 39: Schematische Zeichnung der B-Zell-Aktivierung mit Hilfe eines Carrier-Proteins.

Verwendet werden solche Konjugate auch in Immunoassays wie den ELISA-Analysen, wobei sie als immobilisierte Antigene dienen. Hier macht man sich deren Adsorption an Polystyrol bzw. auch Polyvinylchlorid zunutze. Die am Neoglycoprotein gebundenen Antigene, die selbst nur unzureichend an Polystyroloberflächen immobilisiert werden,^[392] ermöglichen den Nachweis der gegen sie gebildeten Antikörper durch eine enzymatische Farbreaktion.

Die im Kapitel 3.5.2 und 3.5.3 beschriebenen MUC1-Glycopeptide wurden an die Trägerproteine BSA und TTox gekuppelt. Für den Nachweis der Antikörperbildung müssen jedoch zuerst die Antigene (in diesem Fall B-Zell-Epitope) an die Carrier-Proteine konjugiert

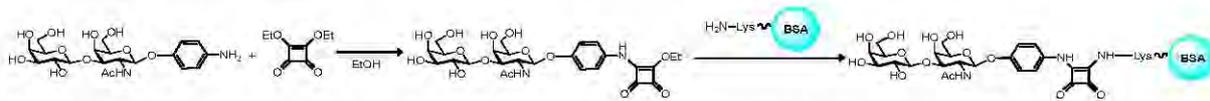
werden, wobei die meisten in der Literatur verwendeten Konjugationstechniken sowohl Vor- als auch Nachteile aufweisen.^[393] Durch unspezifische Reagenzien, wie Glutaraldehyd^[394] oder Diazidverbindungen,^[395] können Haptene kovalent an Proteine angebunden werden. Dabei werden aufgrund zahlreicher Nebenreaktionen mit den funktionellen Gruppen des Proteins keine definierten Konjugate erhalten. Auch die Verwendung der wasserlöslichen Carbodiimide^[396] führt zur Ausbildung von Amidbindungen zwischen dem Hapten und dem Carrier-Protein, welche aufgrund mehrerer funktioneller Gruppen in beiden Reaktionspartnern für dieses Vorhaben nicht in Betracht kommen. Selektivere Konjugationen ermöglichen homo-^[397-398] oder heterobifunktionelle Reagenzien, wie die Crosslinker BMPS^[399] (3-Maleimidopropionsäure-*N*-hydroxysuccinimidester) oder SMCC^[400] (*N*-Succinimidyl-4-(maleimidomethyl)-cyclohexancarboxylat) (Abbildung 40).



Abbildung 40: Heterobifunktionale Crosslinker.

Die Konjugation basiert auf einer Kupplung einer Thiol-Funktion. Die Thiolgruppe addiert sich an die Maleinimid-Funktion,^[401] während der Hydroxysuccinimidester die Ausbildung einer Amidbindung bewerkstelligt. Die vorgestellten Crosslinker haben zwei entscheidende Nachteile. Zum einen muss die an das Carrier-Protein anzuknüpfende Komponente eine Thiolgruppe am Spacer enthalten, die leicht zum Disulfid oxidiert wird, zum anderen sind die verwendeten Maleinimid-Spacer selbst so immunogen, dass es zu einer vom Spacer induzierten Unterdrückung gegen das Antigen kommen kann.^[402] Die in den letzten Jahren von Sharpless unter dem Oberbegriff "Klick-Chemie" zusammengefasste Konjugationstechnik der 1,3-dipolaren Cycloaddition (kat. Huisgen-Cycloaddition) benötigt sowohl ein Azid als auch ein Alkin. Die Einführung der benötigten funktionellen Gruppen in einem weit fortgeschrittenen Synthesestadium ist aufgrund des deblockierten Zustandes der Glycopeptide nur schwer zu bewerkstelligen. Die gebildeten Triazol-Gerüste können als elektronenarme Aromaten eine immunologisch bedenkliche Wirkung haben. Um weder die Tertiärstruktur des Proteins noch das Glycopeptid zu verändern, muss die Kupplungsreaktion unter möglichst milden Reaktionsbedingungen durchführbar sein. Dabei sollten viele funktionelle Gruppen toleriert werden und die Reaktion chemoselektiv verlaufen. Eine Methode, die diese Bedingungen erfüllt, wurde von Tietze *et al.*^[403-404] entwickelt, in der Quadratsäurediethyl-ester (3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion) zum Einsatz kommt. Er bildet mit Aminen bei einem pH-Wert von 8.0 – 8.5 ein Monoamid. Im zweiten Schritt reagieren die im

Carrierprotein vorhandenen Aminogruppen mit dem zuvor hergestellten Quadratsäureamidester bei pH-Wert-Erhöhung zum Neoglycoprotein-Konjugat. Zur Veranschaulichung dieses Sachverhaltes dient die Konjugation von *p*-Aminophenylglycosid an BSA (Schema 128).



Schema 128: Quadratsäurediethylester zur Synthese von Neoglycoproteinen nach Tietze.^[404]

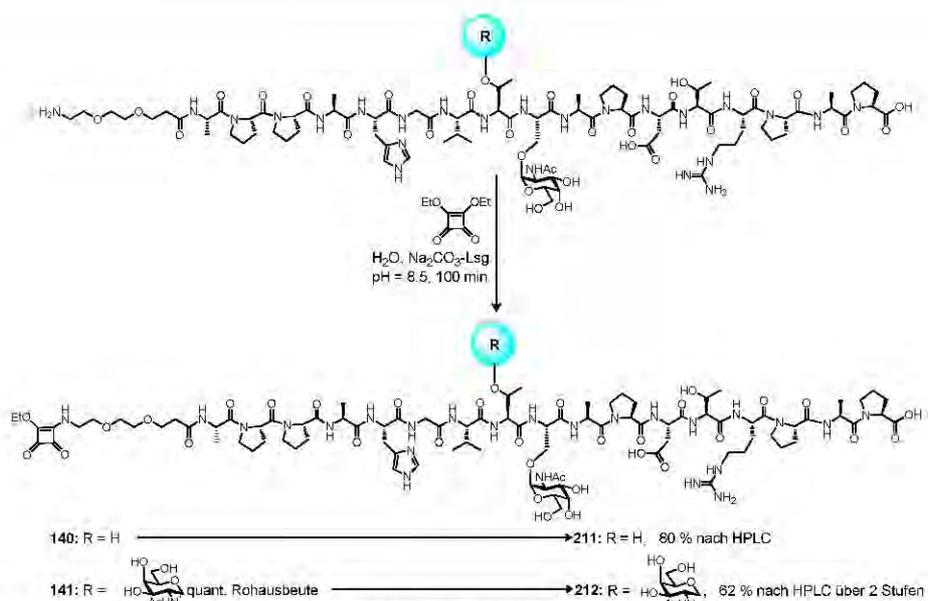
Gemäß diesem Schema sollten MUC1-Glycopeptide zu den entsprechenden Quadratsäureamidester-Derivaten umgewandelt werden, um sie danach an die jeweiligen Carrierproteine binden zu können.

3.8.2 Die Konjugation von glycosylierten MUC1-Glycopeptiden an Rinderserumalbumin (BSA)

3.8.2.1 Die Konjugation von glycosylierten Heptadecapeptiden an Rinderserumalbumin (BSA)

Das Molekulargewicht des BSA variiert je nach Quelle zwischen 66.120,^[405] 66.267^[406] und wurde 1990 auf 66.430 revidiert.^[407] Es ist im Vergleich zu den zuvor genannten Carrierproteinen eher klein, dennoch zusammen mit MUC1-Glycopeptiden als Antigen zur Induktion einer selektiven Immunantwort fähig.^[408] KLH und TTox liefern stärkere immunologische Effekte, können aber nur bedingt per MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert werden. Im Gegensatz dazu lassen sich BSA-Konjugate massenspektrometrisch analysieren. Rinderserumalbumin besteht aus 584 – 590 Aminosäuren und ist frei von Glycanen. Bei einem pH-Wert von 5 – 7 liegen 17 intramolekulare Disulfidbrücken und eine Sulfhydrylgruppe vor.^[405, 407] Zudem enthält es 60 freie Aminogruppen, von denen 59 Lysinresten zuzuordnen sind. Die Aminogruppen können zur Anbindung von Haptenen genutzt werden, wobei in der nativen Konformation nur 30 – 35 der freien Aminogruppen in exponierter Form auf der Außenseite des Proteins liegen. Die Hapten-Anbindung erfolgt über die ϵ -Aminofunktionen der im BSA enthaltenen Lysinreste.

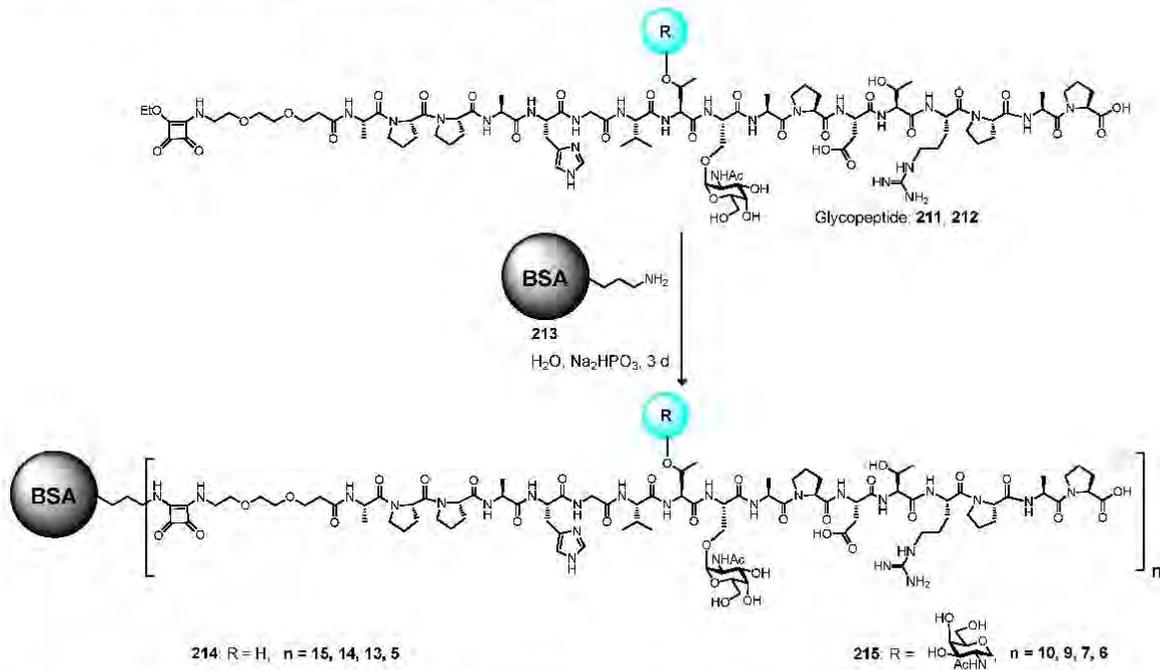
Zur Anknüpfung an das BSA werden die Glycopeptide **140** und **141** an dem Spacer mit Quadratsäurediethylester umgesetzt. Hierzu versetzt man die Glycopeptide **140** und **141** in Wasser mit einem kleinen Überschuss an Quadratsäurediethylester und stellt den pH-Wert mit Natrimcarbonat-Lösung auf 8.5 ein (Schema 129).



Schema 129: Die Synthese der Quadratsäure-funktionalisierten MUC1-Glycopeptide **211**, **212**.

Die Umsetzung kann gut durch analytische RP-HPLC verfolgt werden, da Edukt und Produkt deutlich separiert im HPLC-Chromatogramm vorliegen. Nach 100 Minuten werden beide Reaktionen mit konz. Essigsäure abgebrochen. Das monoglycosylierte Peptid **211** wird nach semipräparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 80 %. Isoliert Vom doppelt glycosylierten Peptid **211** wird eine Ausbeute von 62 % über zwei Stufen erhalten. Die Bildung des Amids kann durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Verglichen zum Amin verursacht das Quadratsäureamid eine Tieffeldverschiebung in der 9-Position der CH₂-Gruppe des Spacers. Des Weiteren konnte für die Substanzklasse der Quadratsäureamide ein bis dato unerwähntes Charakteristikum gefunden werden. Bei Messungen in deuteriertem Dimethylsulfoxid wird sowohl für das Amidproton als auch für die Protonen der CH₂-Gruppe in 9-Position ein doppelter Signalsatz bei halben Intensitätsverhältnis gefunden. Die Beobachtbarkeit von chiralen Stickstoffen hängt von der Inversionsgeschwindigkeit ab. Diese ist hauptsächlich temperaturabhängig und sollte daher bei den durchgeführten Messungen nicht beobachtbar sein. Bezüglich des doppelten Signalsatzes könnte es sich um Konformationseffekte handeln, durch die die diastereotopen 9-CH₂-Protonen unterscheidbar werden. Vielleicht liegen aber Tautomere vor, die unterschiedliche Spektren zeigen. Nach vollständiger Charakterisierung werden die als Quadratsäuremonoester funktionalisierten Glycopeptide **211** und **212** in ca. 100-fachem Überschuss in einem kleinem Volumen an Natriumphosphatpuffer-Lösung bei einem pH-Wert von 9.5 gelöst und mit Rinderserumalbumin **213** drei Tage bei Raumtemperatur gerührt (Schema 130). Danach wurde mit entionisiertem Wasser verdünnt und alle niedermolekularen Bestandteile durch eine Ultrafiltrationsanlage über eine Membran, die Molekulargewichte unter 30.000 g/mol passieren lässt, mindestens 6-mal mit je 50 ml entionisiertem Wasser ultrafiltriert. Zur „Reinigungskontrolle“ wurde der pH-Wert überwacht

und die Ultrafiltration erst dann beendet, wenn der pH-Wert bei 5.5 lag (entspricht entionisiertem Wasser aus der Millipuranlage).



Schema 130: Die Synthese der MUC1-BSA-Konjugaten 214 und 215 und deren Beladung.

Nach Isolierung und Gefriertrocknung erhält man die Neoglycoproteine frei von nicht gebundenen Glycopeptiden. Es erfolgt die Bestimmung der Beladung per MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Für beide Konjugate konnten aussagekräftige MALDI-TOF-Spektren erhalten werden (Abbildung 41 und Abbildung 42). Wie der Abbildung 41 entnommen werden kann, werden unterschiedlich beladene BSA-Konjugate erhalten. Für das BSA-Konjugat **214** können Konjugate mit 15, 14, 13 und 5 MUC1-Glycopeptid-Antigenen pro BSA-Molekül detektiert werden.

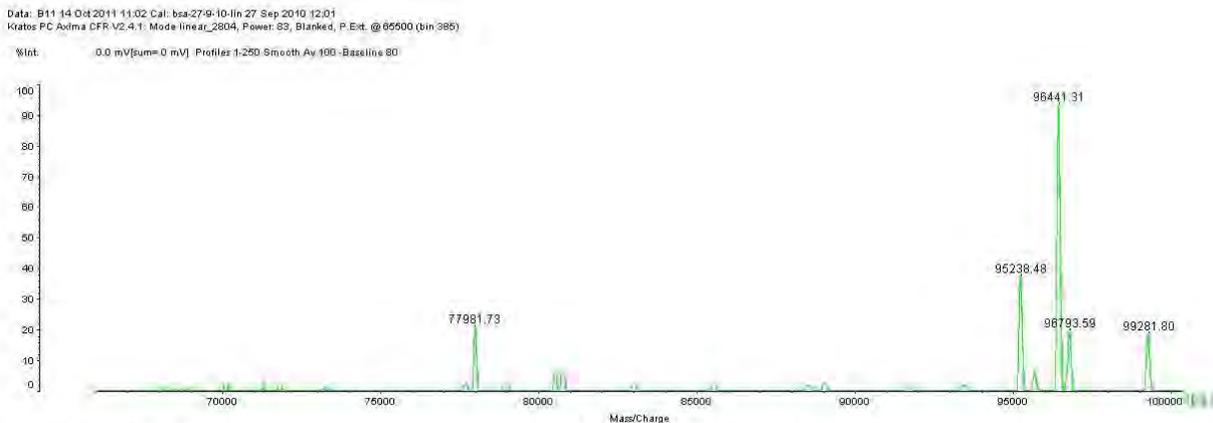


Abbildung 41: Bestimmung der Antigenbeladung des BSA-Konjugates 214.

Für das BSA-Konjugat **215** wurde eine Beladung von 10, 9, 7 und 6 MUC1-Glycopeptid-Antigenen pro BSA-Molekül ermittelt (Abbildung 42).

Data: 14 Oct 2011 11:41 Cal: bsa-27-9-10.lin 27 Sep 2010 12:01
 Kratos PC Axima CFR V2.4.1: Mode Linear_2804, Power: 146, Blanked, P. Ext. @ 65500 (bin 385)

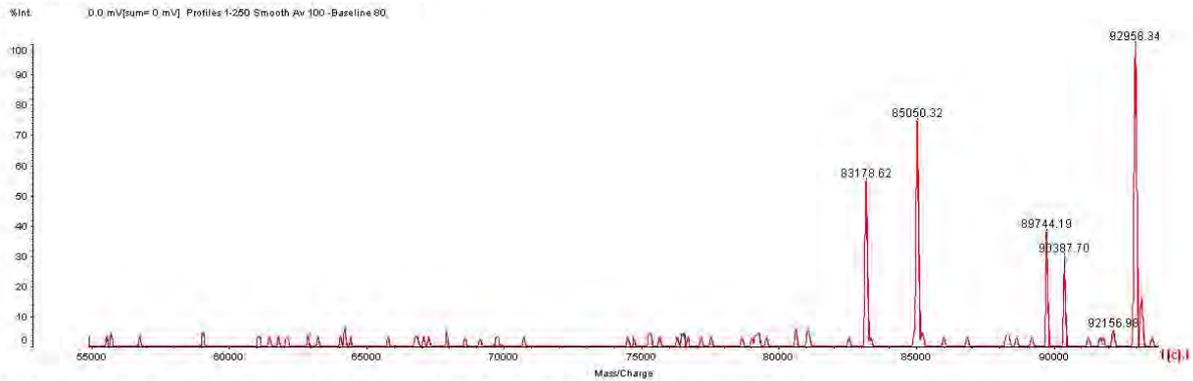
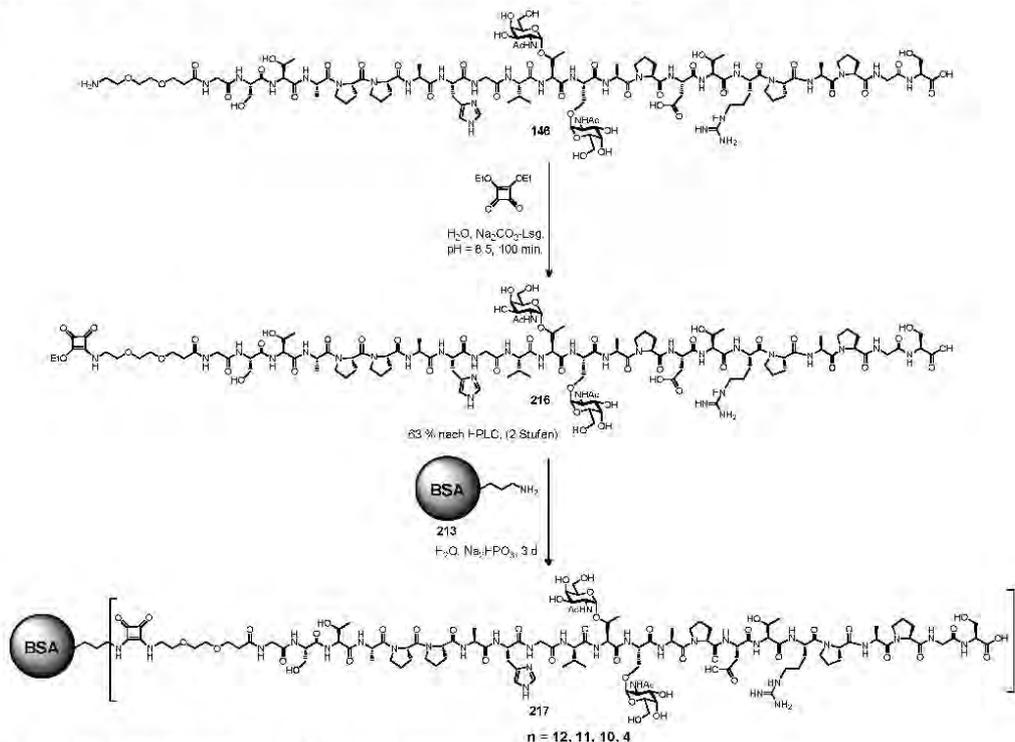


Abbildung 42: Bestimmung der Antigenbeladung des BSA-Konjugates 215.

Die erhaltenen BSA-Konjugate könnten sowohl zur Vakzinierung als auch in ELISA-Untersuchungen für den Nachweis auf gebildete Antikörper zum Einsatz kommen.

3.8.2.2 Konjugation von glycosylierten Docosapeptiden an Rinderserumalbumin (BSA)

Für den Nachweis auf Antikörper gegen die synthetisierten 22er Glycopeptid-Konjugate (Kapitel 3.6.3 und 3.7) bedarf es BSA-Konjugaten, die mit MUC1-Docosapeptiden beladen sind. Deshalb wurden die in Kapitel 3.5.3 beschriebenen MUC1-Glycopeptide an BSA gebunden. Das doppelt glycosylierte Glycopeptid **146** wird nach Entfernung der basenlabilen Schutzgruppen roh mit einem Überschuss an Quadratsäurediethylester in Wasser/Ethanol bei einem pH-Wert von 8.5 in Natriumcarbonat-Lösung umgesetzt (Schema 131).



Schema 131: Die Synthese des MUC1-BSA-Konjugates 217.

Die Reaktion wurde durch analytische RP-HPLC verfolgt und nach vollständigem Verschwinden des Eduktes **146** im HPLC-Chromatogramm durch Neutralisation mit konz. Essigsäure abgebrochen. Das als Quadratsäuremonoester funktionalisierte Glycopeptid **216** wurde nach semipräparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 63 % erhalten. Nach vollständiger Charakterisierung wurden 98,0 Äquiv. des Quadratsäuremonoesters **216** mit dem BSA **213** in einem kleinen Volumen Natriumdihydrogenphosphat-Lösung bei einem pH-Wert von 9,5 gelöst und 3 d gerührt. Nach Aufarbeitung wurden alle niedermolekularen Bestandteile durch eine Ultrafiltration abgetrennt und das Produkt isoliert und gefriergetrocknet. Die Bestimmung der Beladung des Neoglycoproteins **217** durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Abbildung 43) ergab 12, 11, 10 und 4 Glycopeptid-Moleküle pro BSA-Protein. Auch im vorliegenden Fall wird ein aussagekräftiges Spektrum mit guter Auflösung erhalten.

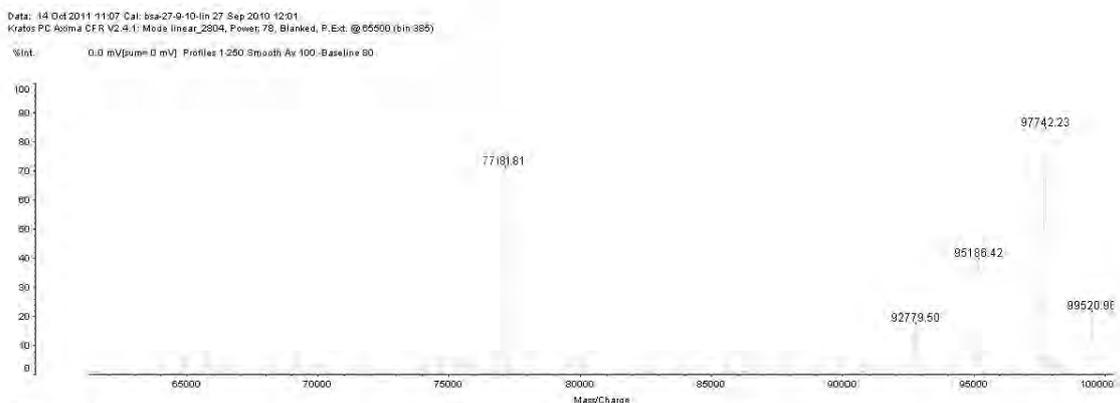
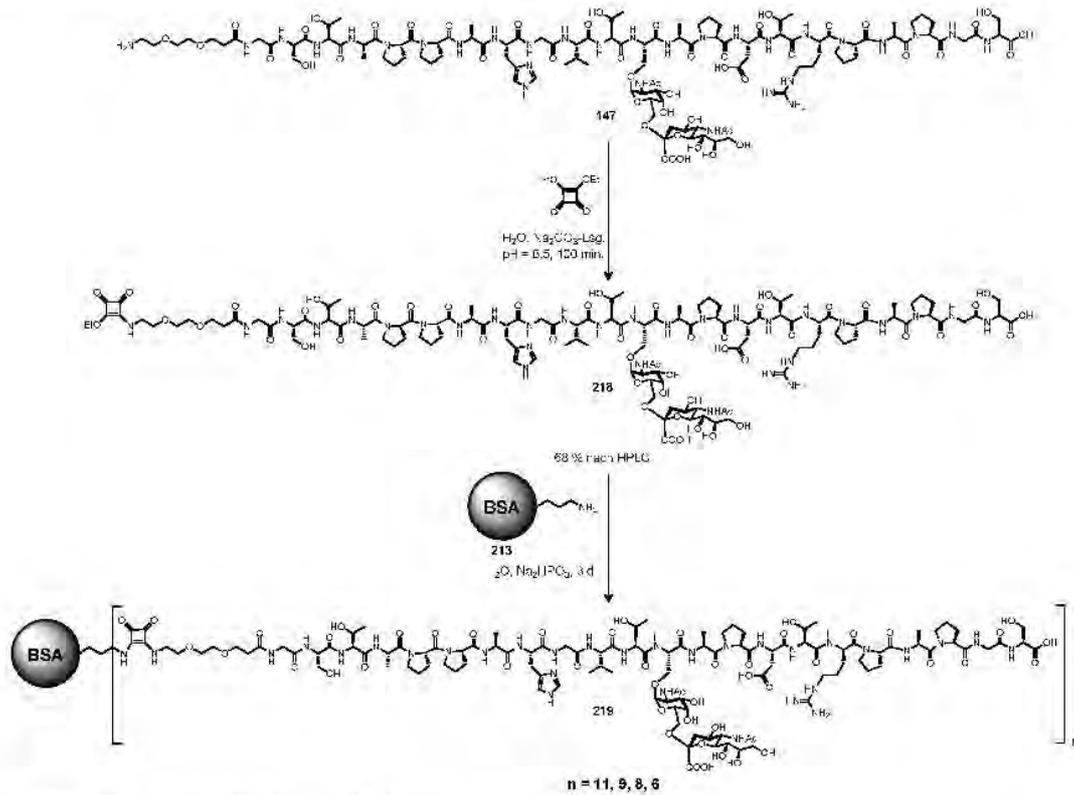


Abbildung 43: Bestimmung der Antigenbeladung des BSA-Konjugates **217**.

Diese hohe Beladung, verglichen mit in anderen Arbeiten hergestellten Analoga, kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen kamen mehr Äquivalente an Quadratsäuremonoester zum Einsatz. Zum anderen wird mit einem kleineren Volumen gearbeitet, sodass die Lösungen konzentrierter vorlagen.

Das sialylierte Glycopeptid **147** wurde unter den gleichen Bedingungen in das Quadratsäuremonoamid **218** überführt (Schema 132). Nach semipräparativer RP-HPLC wurde es in einer Ausbeute von 68 % erhalten und anschließend im Überschuss von 47,5 Äquiv. mit dem BSA-Protein **213** umgesetzt, wobei die Lösungsmittelmenge weiter reduziert wurde.



Schema 132: Die Synthese des MUC1-BSA-Konjugates **219**.

Wie bei den drei vorangegangenen Neoglycoproteinen wird die Beladung des Neoglycoproteins **219** durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt (Abbildung 44).

Data: 4 Nov 2011 11:01 Cal: bsa-27-9-10-1in 27 Sep 2010 12:01
 Kratos PC Axima CFR V2.4.1: Mode linear_2804, Power: 77, Blanked, P.Ext. @ 65500 (bin 385)

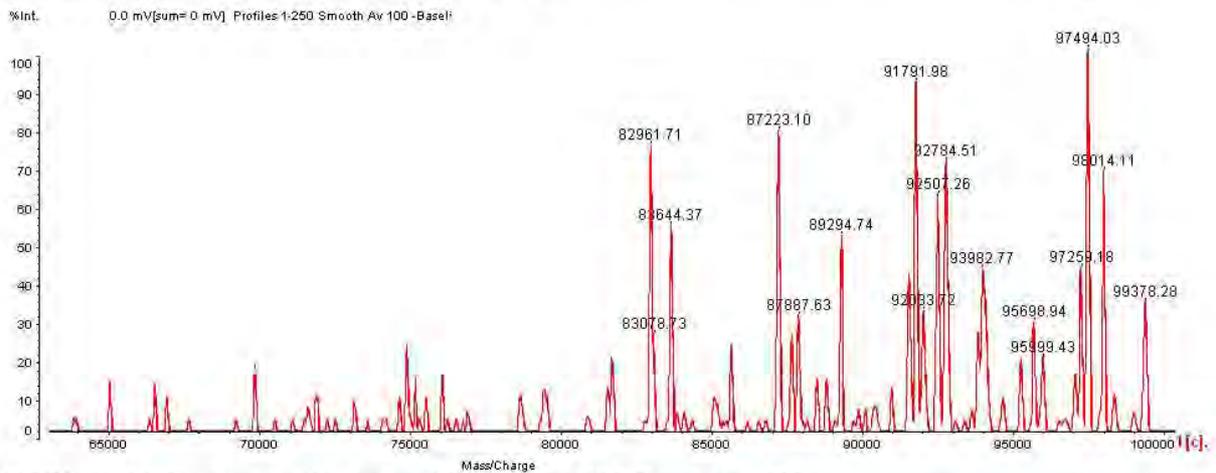
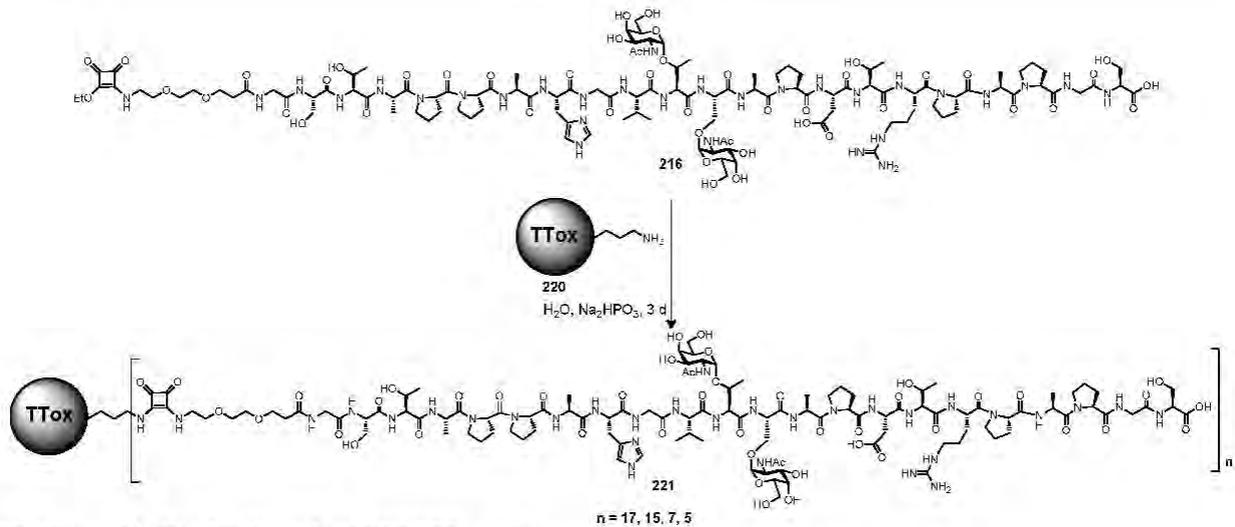


Abbildung 44: Bestimmung der Antigenbeladung des BSA-Konjugates **219**.

Im Vergleich zu den MALDI-TOF-Massenspektren für **217** fällt auf, dass das Spektrum deutlich mehr Peaks enthält. Es wurde eine rechnerische Beladung mit 11, 9, 8 und 6 Glycopeptid-Molekülen pro BSA-Molekül bestimmt. Bei den sialylierten BSA-Konjugaten kommt es während der Aufnahme der Spektren zu einem Verlust an Sialinsäure, wodurch sowohl die vermehrten Peaks als auch die auftretenden Massendifferenzen zu erklären wären.

3.8.3 Die Konjugation des glycosylierten Docosapeptids an Tetanus-Toxoid (TTox)

Das Tetanus-Toxoid gehört zur Untergruppe der Totimpfstoffe. Toxoide sind Toxine, deren giftige Eigenschaften durch spezielle Verfahren eliminiert werden, wobei jedoch der antigene Charakter erhalten bleibt. Toxoidimpfstoffe finden z. B. bei der Tetanus-Prophylaxe Verwendung. Der Tetanus-Toxoidimpfstoff wird durch Kultivierung des *Clostridium tetani*-Bakteriums, das Exotoxine teils aktiv, teils bei Lyse des Bakteriums ins Nährmedium sezerniert, gewonnen. Die Toxine werden durch Sterilfiltration erhalten und durch Behandlung mit Formaldehyd-Lösung über mehrere Tage bei 30 – 40 °C entgiftet.^[409-410] Dabei reagieren die freien Aminogruppen in den Proteinseitenketten des Toxins mit dem Formaldehyd zu Azomethin-Gruppen. Zudem wirkt Formaldehyd als intra- und intermolekularer Crosslinker, welcher die Tertiärstruktur verändert. Die Modifizierungen bewirken, dass das Tetanospasmin nicht mehr an Ganglioside binden kann, wodurch seine toxische Wirkung verloren geht. Tetanospasmin ist ein ca. 150.000 g/mol großes Protein, welches aus 1315 Aminosäuren besteht, die zwei unterschiedlich schwere Untereinheiten bilden.^[411-412] Die schwere Proteinkette mit 858 Aminosäuren ist verantwortlich für die Bindung des Toxins an Ganglioside der Nervenzellen, während die leichte Kette mit 456 Aminosäuren die Neurotoxizität vermittelt. Beide Proteinketten sind kovalent über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Im Tetanus-Toxin befinden sich 107 N-terminale Aminogruppen, die den Lysinseitenketten zuzuordnen sind.^[413] Durch die Detoxifizierung des Tetanospasmins mit Formalin wird ein Teil der freien Aminogruppen in Azomethin- bzw. Aminoal-Gruppen umgewandelt und damit das Tetanus-Toxoid erhalten. Der Rest der nicht umgesetzten Aminogruppen kann zur Anbindung von Antigenen genutzt werden. Zur Gewinnung eines Antitumor-Vakzins soll daher dieses nach dem Botulinumtoxin zweitstärkste bakterielle Toxin zum Einsatz kommen. Das Tetanus-Toxoid als Carrier-Protein ermöglicht die Induktion sehr starker Immunantworten sowohl bei Tieren als auch beim Menschen. Als Carrier-Protein wurde es zusammen mit verschiedenen MUC1-Glycopeptiden in unterschiedliche Vakzin-Konjugate überführt und diente zur Induktion starker Immunantworten in Form von Antikörpern gegen das B-Zell-Epitop.^[377, 414-415] Da Tetanus-Toxoid bei der Vakzinierung gegen Wundstarrkrampf zur Anwendung kommt, sind Vakzine aus Tetanus-Toxoid und MUC1-Glycopeptiden vielversprechend für die Anwendung als Antitumorimpfstoffe beim Menschen. Die Synthese des Tetanus-Toxoid-Neoglycoproteins erfolgt analog zu den vorangegangenen Synthesen der BSA-Neoglycoproteine (Schema 133).



Schema 133: Die Synthese des MUC1-TTox-Konjugates 221.

Zur Konjugation werden 116.0 Äquiv. an mit Quadratsäuremonoester funktionalisiertem Glycopeptid **216** mit TTox **220** in 0.8 ml einer Natriumdihydrogenphosphat-Lösung bei einem pH-Wert von 9.5 gelöst und 3 d gerührt. Danach werden alle niedermolekularen Bestandteile durch eine Ultrafiltrationsanlage entfernt, das Produkt isoliert und gefriergetrocknet und als farbloses Lyophilisat erhalten. Die Beladungsbestimmung des Neoglycoproteins **221** erfolgt am gleichen MALDI-TOF-Gerät wie zuvor. Mit der Aufnahme des MALDI-TOF-Massenspektrums konnte widerlegt werden, dass die Auflösungsgrenze des Gerätes im kausalen Zusammenhang mit dem negativen Messergebnis steht.^[377, 415] Faktoren der Matrixbildung und die Verdünnung erforderten zahlreiche Messungen mit verschiedenen Konzentrationen, um das Spektrum des TTox-Konjugates **221** erhalten zu können (Abbildung 45).

Data: Sep 2011 11:05 Cal: pep3000-14-9-11-1in 14 Sep 2011 10:53
 Kratos PC Axima CFR V2.9.1: Mode linear_2804, Power 80, Blanked, F.Ext. @ 160000 (bin 601)

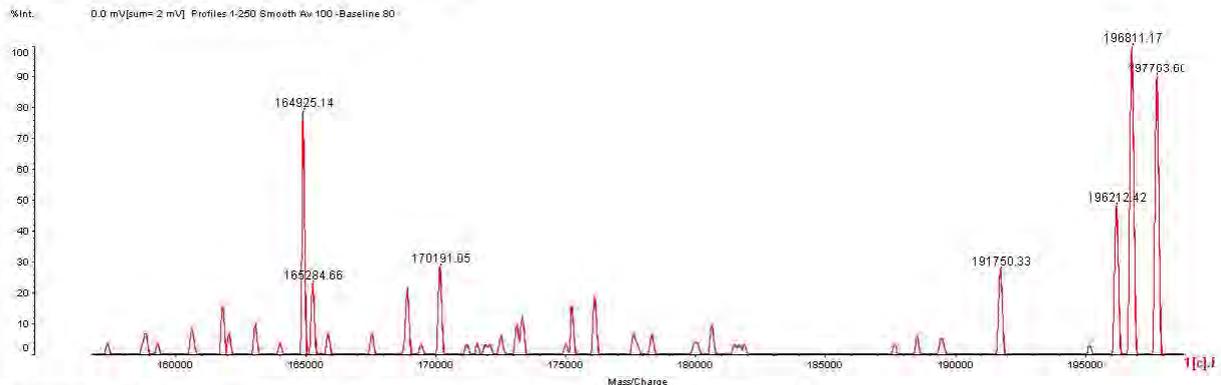


Abbildung 45: Bestimmung der Antigenbeladung des TTox-Konjugates 221.

Das Massenspektrum in Abbildung 45 zeigt die Kupplung des MUC1-Glycopeptides an das TTox-Carrierprotein. Es liegt kein unkonjugiertes Carrier-Protein vor, da im Bereich von 150.000 kein Peak vorzufinden ist. In der Literatur findet man für die Molmasse des Tetanus-Toxins, wie beim BSA-Protein, je nach verwendeter Literatur unterschiedliche Werte.

Berücksichtigt man den Umstand, dass es einen Unterschied zwischen dem Tetanus-Toxin und dem Tetanus-Toxoid bezüglich der Molmasse gibt, wird verständlich, dass die Bestimmung der Beladung je nach verwendeter Molmasse unterschiedlich ausfällt. Legt man einen Wert von 150.700^[412] für das Tetanus-Toxin zugrunde, so weicht der Wert für das Toxoid je nach Hersteller aufgrund der chemischen Behandlung etwas ab. Wird der Wert von 150.700 als Rechengrundlage herangezogen, so kann aus obigen Spektren eine Beladung mit 17, 15, 7 und 5 Glycopeptiden abgeleitet werden. Dem Leser wird eine Differenz von einigen Hundert Einheiten zwischen gemessenen und berechneten Werten auffallen. Diese Differenz wird durch die ungenaue Molmasse des Carrier-Proteins und durch die Kalibrierung des Gerätes mit der Standardsubstanz BSA, die natürlich kleiner ist, verursacht.

3.9 Die immunologische Evaluierung der synthetisierten Konjugate

Die dargestellten Carrier-Konjugate wurden nach der Synthese immunologisch evaluiert. Diese Untersuchungen wurden am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz unter Anleitung von Herrn *Prof. Dr. Edgar Schmitt* durchgeführt. An den Experimenten war maßgeblich *Dipl.-Biol. B. Gerlitzki* mit Unterstützung durch Frau *Dr. N. Gaidzik* beteiligt.

Zur immunologischen Evaluierung des Tetanus-Toxoid-Konjugates **221** wurden drei weibliche balb/c-J-Mäuse mit dem Vakzin **221** und dem *Freunds* Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 21 Tagen erfolgte die erste Booster-Impfung mit dem Vakzin **221** und dem inkompletten *Freunds* Adjuvans (IFA), welche nach 42 Tagen wiederholt wurde. Nach jeweils fünf Tagen nach jeder Booster-Immunsierung wurde Blut aus der Schwanzvene jeder Maus entnommen und zur Gewinnung des Serums zweimal 10 Minuten bei 10.000 Umdrehungen zentrifugiert. Die Bestimmung der Antikörperkonzentration in den Seren erfolgte durch ELISA.

Ein ELISA ist ein serologischer Test, bei dem man gebundene Antigene oder Antikörper mit Hilfe eines gekoppelten Enzyms, das eine farblose Substanz in ein farbiges Produkt umwandelt, nachweist. Durch den ELISA können sowohl niedermolekulare Stoffe, wie Hormone, Pestizide, Toxine, als auch Proteine und Viren identifiziert werden. Um quantitative Aussagen zu ermöglichen, muss mindestens das Antigen und/oder der Antikörper in aufgereinigter Form vorliegen.^[159] Im ELISA nutzt man die Fähigkeit induzierter Antikörper selektiv an das Antigen zu binden. Um die spezifische Bindung bestimmen zu

können, wird eine der beiden Komponenten an eine Mikrotiterplatte adsorbiert. Zum Nachweis des Antigens bedient man sich bei der indirekten Bestimmung, welche auch für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen angewandt wurde, eines Enzym-gekoppelten Zweitantikörpers (Detektionsantikörper), welcher mit seinem gebundenen Reporterenzym das sogenannte Farbstoffsubstrat katalytisch umsetzt. So kommt es zu einer messbaren Färbung, die als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens bzw. des Erstantikörpers dient. Die optische Dichte wird gemessen und ist eine Funktion der Antigen- bzw. Antikörperkonzentration und folgt somit dem *Lambert-Beer'schen* Gesetz. Als Reporterenzyme werden z. B. die Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) oder die Alkalische Phosphatase (AP) verwendet. Im vorliegenden Fall kam der ELISA zum Einsatz, um sowohl induzierte MUC1-spezifische Antikörper im Serum nachzuweisen als auch um deren Antikörper-Spezifität in Neutralisierungsexperimenten zu bestimmen. Das Vorgehen ist in Abbildung 46 skizziert.

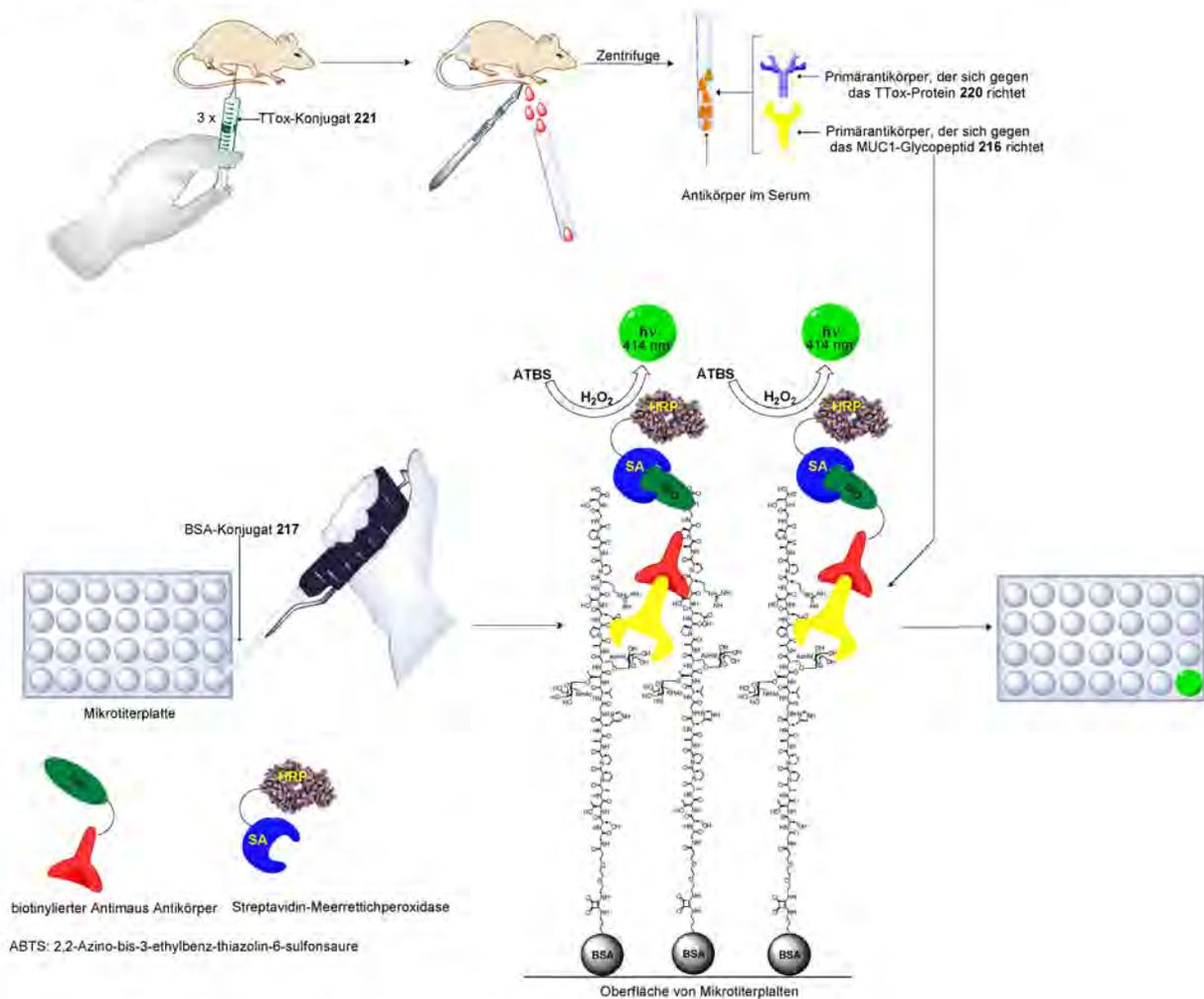
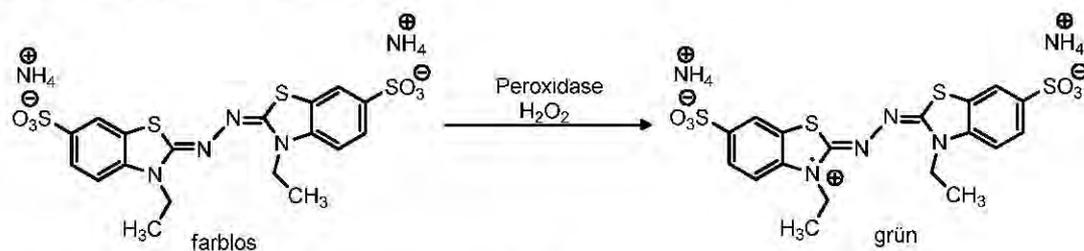


Abbildung 46: Schematische Darstellung des durchgeführten ELISA-Tests.

Zum Nachweis der spezifisch gegen das MUC1-TTox-Neoglycoprotein **221** gerichteten Antikörper wurden die Mikrotiterplatten mit den MUC1-BSA-Konjugaten **217** belegt.^[82] Der

Einsatz von **221** kommt nicht in Betracht, da im Serum sowohl Antikörper gegen das TTox-Carrierprotein als auch gegen das MUC1-Glycopeptid vorliegen und somit das Testergebnis auf gegen MUC1 gerichtete Antikörper verfälscht werden würde. Daher wird das BSA-Konjugat **217** in wässriger Lösung auf die Mikrotiterplatte aufgebracht. Nach Inkubation und Waschen bleibt ein Anteil des Neoglycoproteins **217** auf der ELISA-Platte haften. Der im Serum vorhandene, gegen das MUC1-Glycopeptid gerichtete Primärantikörper bindet selektiv an das immobilisierte MUC1-Glycopeptid. Dieser wird mit einem biotinylierten Anti-Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen, indem die Lösung mit Meerrettichperoxidase-funktionalisiertem Streptavidin (SA-HRP) versetzt wird. Bei Zugabe von 2,2-Azino-bis-3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonsäure (ABTS) und Wasserstoffperoxid katalysiert die Meerrettichperoxidase (HRP) die Oxidation von ABTS zum grünen Radikalkation (Schema 134), dessen Absorptionsmaximum bei $\lambda = 414 \text{ nm}$ liegt und dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann.



Schema 134: Bildung des grünen Radikalkations am ABTS.

In Verdünnungsreihen werden die durch das TTox-Konjugat **221** verursachten Antikörperkonzentrationen in den Seren durch ELISA ermittelt (Abbildung 47).

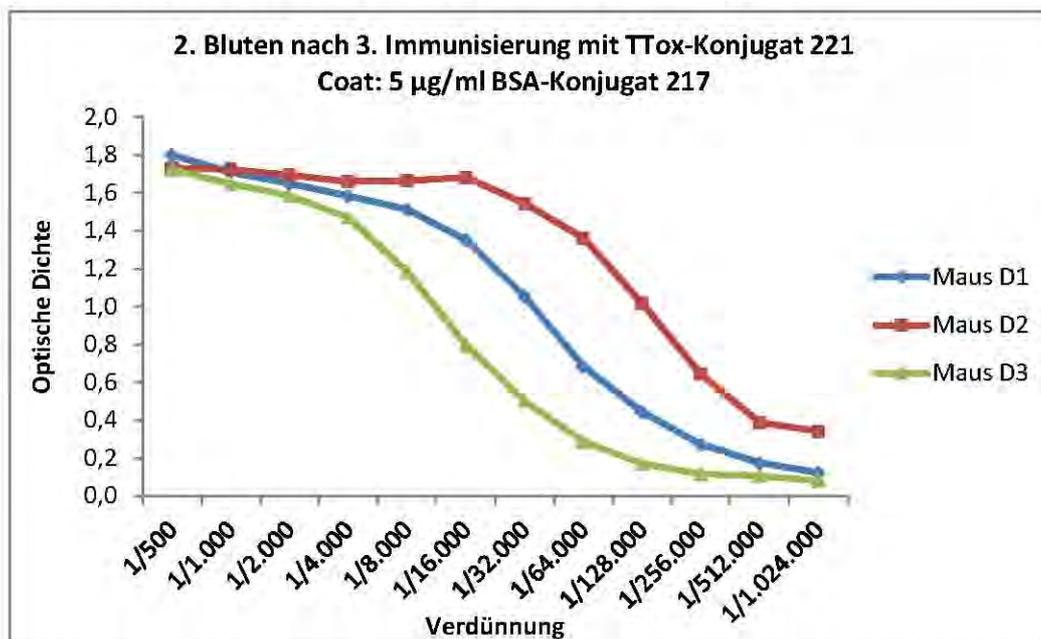


Abbildung 47: ELISA der Seren der mit **221** immunisierten Mäuse (nach erster Booster-Impfung, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-Konjugat **217**).

Wie aus der Abbildung 47 hervorgeht, wurden in den Mäusen D1 und D2 sehr hohe Antikörperkonzentrationen gegen das MUC1-Glycopeptid induziert. Im zweiten Schritt wurden die spezifischen Isotypen-Klassen der induzierten Antikörper bestimmt. Hierzu wurden im ELISA entsprechende Sekundärantikörper verwendet, die in der Lage sind, selektiv an die unterschiedlichen Isotypen zu binden. Dargestellt ist in Abbildung 48 die Isotypenbestimmung der Maus D2, die mit Konjugat **221** immunisiert worden war.

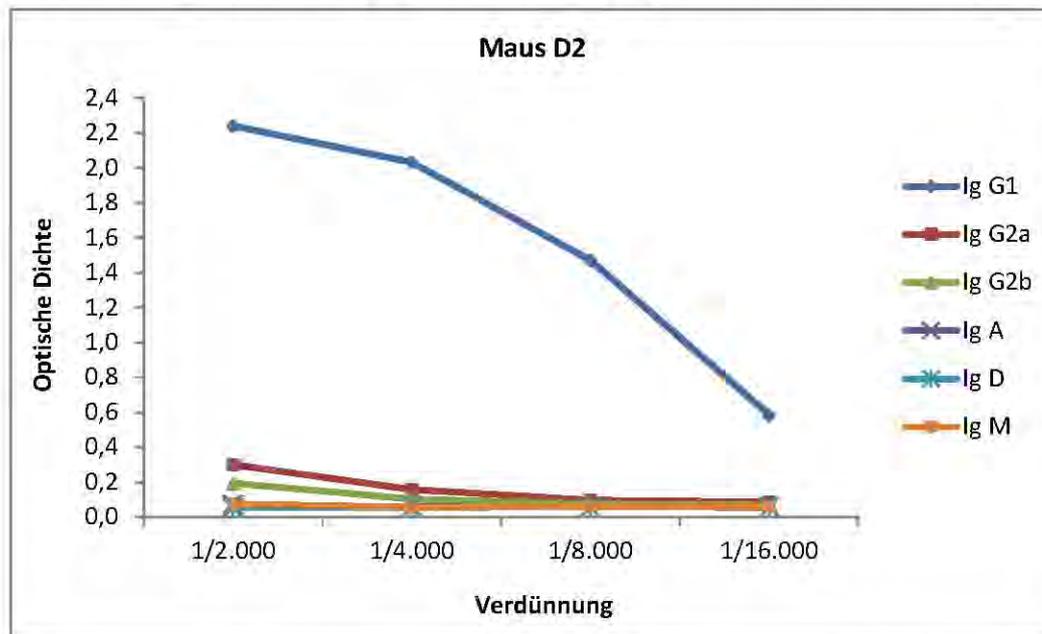


Abbildung 48: Isotypenbestimmung im Serum von Maus D2 nach 3. Immunisierung mit dem Konjugat **221**.

Das Ergebnis zeigt, dass hauptsächlich Antikörper des Isotyps IgG1 induziert wurden und somit eine T_H2 -Zell-vermittelte Immunreaktion vorliegt. Neben dem IgG1-Antikörper kann auch ein Anteil an Antikörpern des Typs IgG2_{ab} nachgewiesen werden.

Im dritten und letzten Schritt wurde untersucht, inwieweit die durch Vakzin **221** gebildeten Antikörper fähig sind, an natürliche Glycoprotein-Strukturen auf der Oberfläche von Tumorzellen zu binden. Hierzu bedient man sich der Durchflusszytometrie, die die Analyse von einzelnen Zellen im hohen Tempo erlaubt. Durchqueren die einzelnen Zellen ein Durchflussrohr, so können sie durch Anlegen einer elektrischen Spannung und mit Hilfe eines Lichtstrahls analysiert werden. Die unterschiedliche Form, Struktur und Färbung der Zellen erzeugen unterschiedliche Effekte, aus denen auf die Eigenschaften der Zellen geschlossen werden kann. Bei der spezielleren Form der Durchflusszytometrie, dem FACS (fluorescence activated cell sorting), werden fluoreszenzmarkierte Zellen gezählt und nach deren Fluoreszenzeigenschaften sortiert. Werden an den Zellen fluoreszenzmarkierte Antikörper gebunden, so kann ein Laser den Farbstoff zur Fluoreszenz anregen. Das emittierte Licht ermöglicht die indirekte Identifizierung von Zellen. Mit Hilfe der FACS-Analyse sollte die

Bindung der induzierten Primärantikörper an Tumorzellen untersucht werden. Zur Detektion des an die Tumorzellen gebundenen Antikörpers wurden diese Zellen mit einem Sekundärantikörper (anti-Maus IgG-Antikörper aus der Ziege mit AlexaFluor 488 markiert) inkubiert (Abbildung 49).

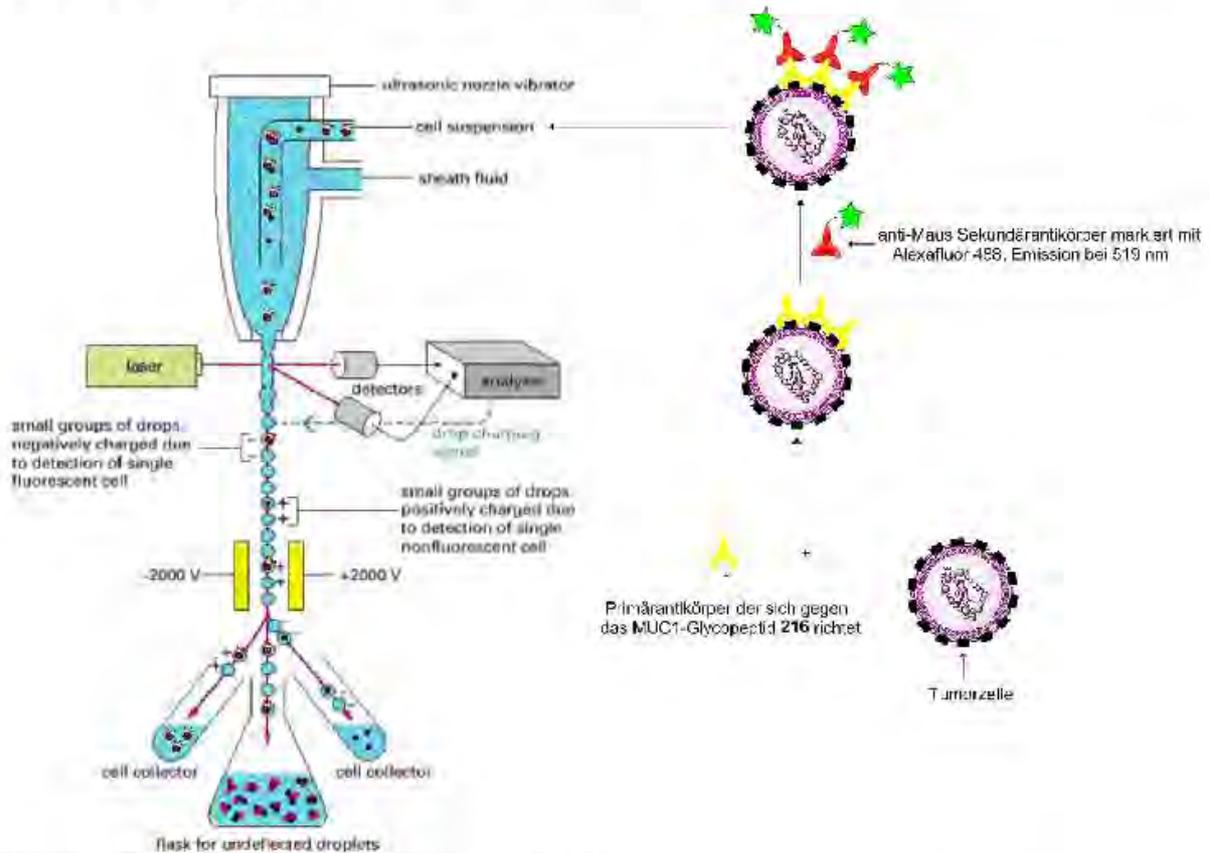


Abbildung 49: Schematische Darstellung der FACS-Analyse.

Als Tumorzellen wurde die Brustkrebszelllinie MCF-7 untersucht, indem sie mit dem Antiserum der mit dem Vakzin-Konjugat 221 immunisierten Maus inkubiert wurde. Der Nachweis der an den Tumorzellen gebundenen Antikörper wurde mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörpers im FACS-Gerät erbracht. In Abbildung 50 sind die Ergebnisse der FACS-Analyse gezeigt. Links sind die unbehandelten MCF-7-Zellen (Negativkontrolle) dargestellt, die keine Fluoreszenz aufweisen, rechts in der Abbildung sind die mit dem Antiserum behandelten MCF-7-Zellen abgebildet. Wie ersichtlich ist, zeigt die unbehandelte Zellpopulation niedrige Fluoreszenzintensität. Die behandelte Zellpopulation weist durch das Binden der beiden Antikörper eine höhere Fluoreszenzintensität auf.

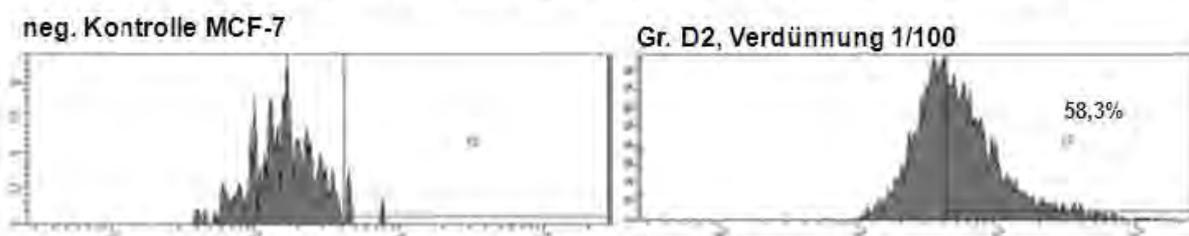


Abbildung 50: FACS-Analyse des Serums an MCF-7-Zellen.

Die erhöhte Fluoreszenzintensität kann nur vorliegen, wenn die im Mausserum vorhandenen Antikörper an die Zellen binden und den Tumor markieren.

Um die Aussage der Ergebnisse zu bestätigen, wurden sie wiederholt mit dem Resultat, dass diese jedoch im Widerspruch zu den Erstergebnissen stehen. Wie aus Abbildung 51 entnommen werden kann, zeigten die durch das Vakzinkonjugat 221 ausgelösten Antikörper D2 bei der Zweitmessung keine Bindung an MCF-7 Zellen, obwohl in der Maus D2 im ELISA-Experiment eine Immunantwort gegen das MUC1-Glycopeptid nachgewiesen wurde.

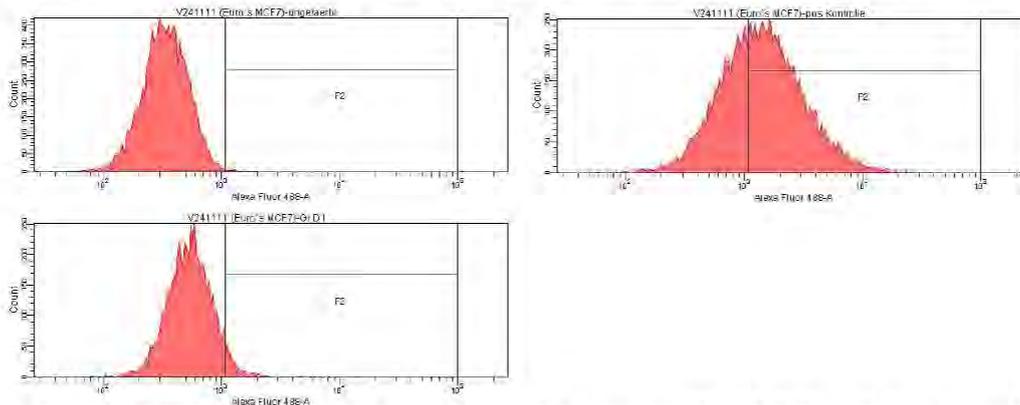


Abbildung 51: Wiederholung der FACS-Analyse des D2-Serums an MCF-7-Zellen, links oben unbehandelte MCF-7-Zellen (Negativkontrolle), rechts oben behandelte MCF-7-Zellen (Positivkontrolle), links unten mit D2-Serum behandelte MCF-7-Zellen.

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse kann keine Aussage bezüglich der Erkennung von MCF-7-Zellen getroffen werden.

Durch Untersuchung der Bindung der Antikörper an verschiedene MUC1-BSA-Konjugate wurde die Spezifität der Antiseren im ELISA bestimmt. Hierzu wurden sechs verschiedene Seren aus anderen Forschungsarbeiten (Maus 7, Maus D2, Maus E2, Maus 5, Maus 8 und Maus 11) an den BSA-Konjugaten 214, 215, 217 und 219 getestet. Die in den Seren induzierten Antikörper entstammen verschiedenen tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid-TTox-Vakzinen mit unterschiedlich lokalisierten Glycosylierungsmuster, verschiedenen Kohlenhydratseitenketten und unterschiedlicher Startaminosäure. Nachfolgend sind die Ergebnisse der ELISA-Experimente und der Ursprung der Seren in Abbildung 52 und Abbildung 53 aufgelistet. Wie aus Abbildung 52 und Abbildung 53 ersichtlich ist, waren alle Seren in der Lage, die synthetisierten BSA-Konjugate 214, 215, 217 und 219 mit einem breiten Erkennungsspektrum zu binden, was auch im Einklang mit den immunologischen Befunden von *N. Gaidzik* und *S. Wagner* steht.^[415-416] Die Seren aus Maus D1 und D2 (Abbildung 47) zeigten bei der Bindung an das BSA-Konjugat 217 höhere Titer als die Seren aus der Vergleichsgruppe in Abbildung 53 oben. Das Serum von Maus D3 (Abbildung 47) wies annähernd ähnliche Titer wie die der Seren aus den Mäusen 5, 7 und 11 (Abbildung 53 oben) auf.

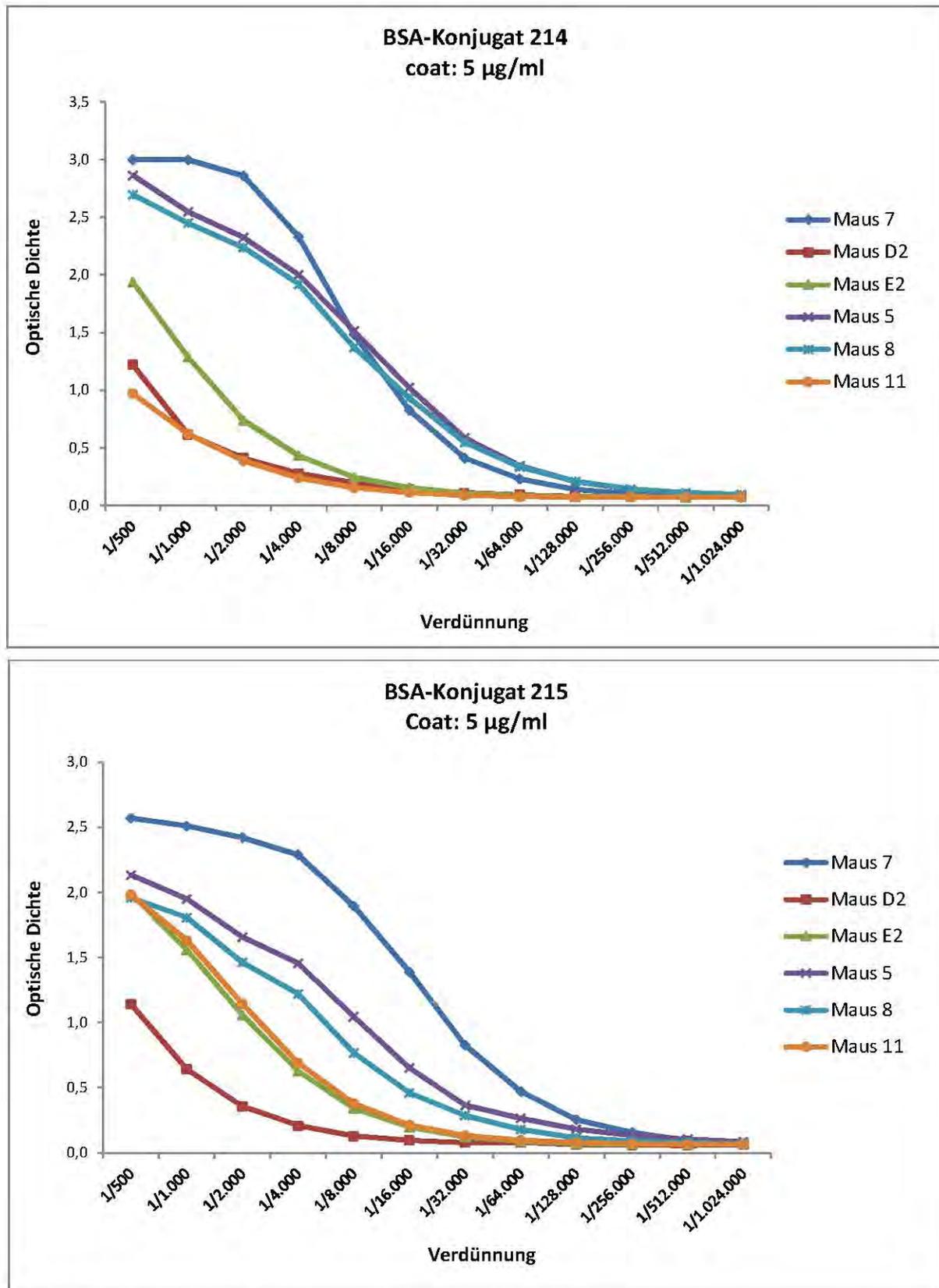


Abbildung 52: Die Bindung der Antiseren am BSA-Konjugat 214 und 215.

Maus 7: immunisiert mit MUC1(20)Thr⁶T-TTox (AK 301), Maus D2: immunisiert mit MUC1(20)Thr⁶ST_N-TTox (AK 252), Maus E2: immunisiert mit MUC1(20)Thr⁶-2,3-ST-TTox (AK 328), Maus 5: immunisiert mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox (NG 105), Maus 8: immunisiert mit MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox (NG 111), Maus 11: immunisiert mit MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-TTox (NG 107).

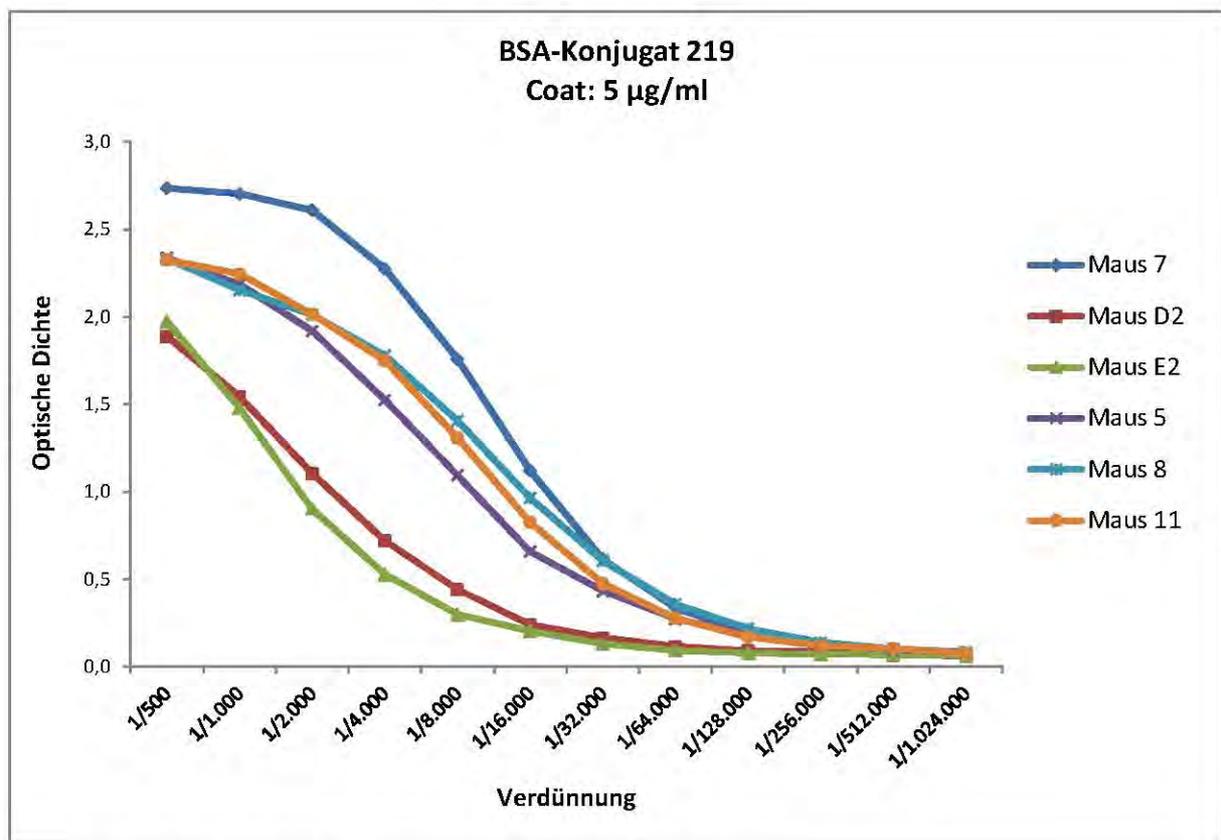
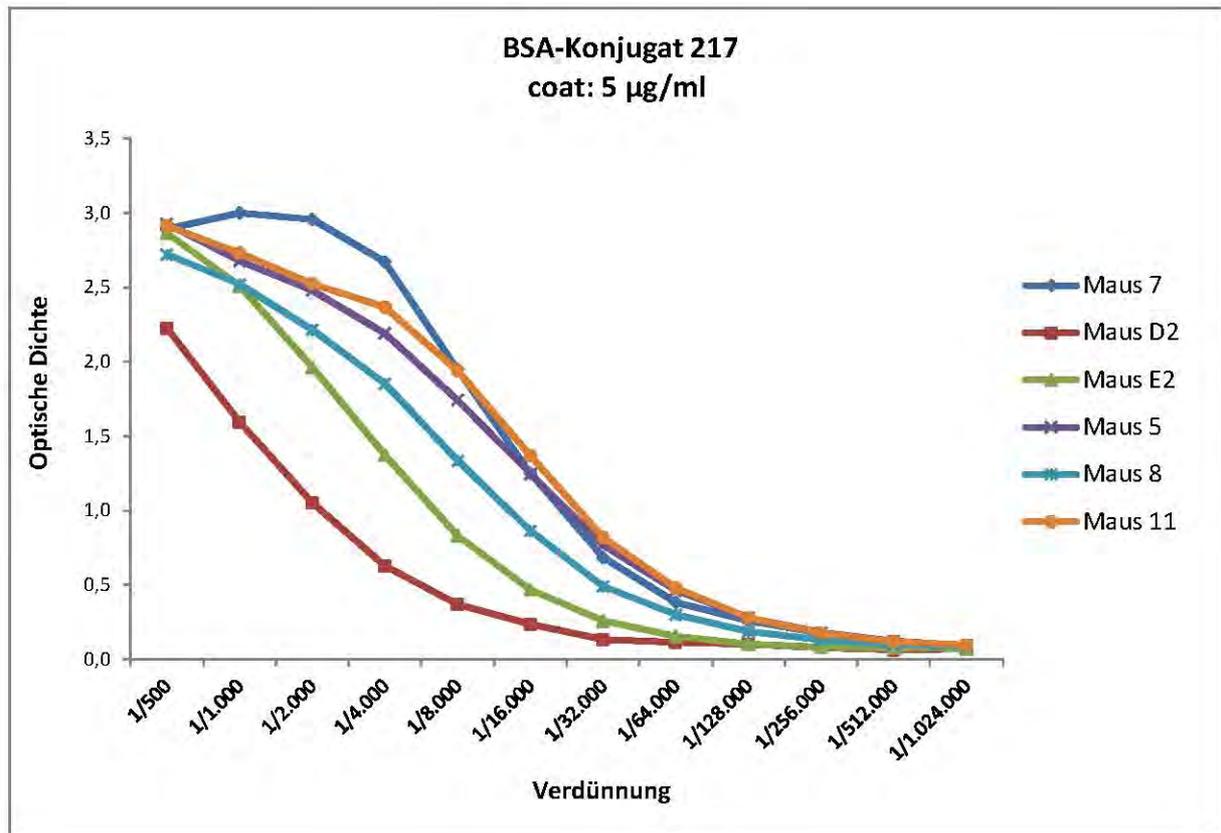


Abbildung 53: Die Bindung der Antiseren am BSA-Konjugat 217 und 219.

Maus 7: immunisiert mit MUC1(20)Thr⁶T-TTox (AK 301), Maus D2: immunisiert mit MUC1(20)Thr⁶ST_N-TTox (AK 252), Maus E2: immunisiert mit MUC1(20)Thr⁶-2,3-ST-TTox (AK 328), Maus 5: immunisiert mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox (NG 105), Maus 8: immunisiert mit MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox (NG 111), Maus 11: immunisiert mit MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-TTox (NG 107).

Die durch die Vakzine induzierten Antikörper sind polyklonal und enthalten verschiedene gegen tumorassoziiertes MUC1 gerichtete Antikörper. Des Weiteren weisen die Peptidsequenzen der Glycopeptidantigene Ähnlichkeiten auf. So ist es nicht ungewöhnlich, dass im ELISA nicht nur die durch das Vakzin **221** induzierten Antikörper am jeweiligen BSA-Konjugat, sondern auch Antikörper aus früheren Arbeiten, die durch andere Tetanus-Toxoid-Vakzine mit synthetischen Glycopeptidantigenen hervorgehen, erkannt werden.

Für die synthetisierten Konjugate in den Kapiteln 3.6.2 und für die beiden Lipoglycopeptidvakzine aus 3.7 waren T-Zell-Proliferationsstudien geplant, in denen die Ausbildung von CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen untersucht werden sollte. Diese sind von den theoretischen Grundlagen^[417] als auch in ihrer Durchführung komplex,^[75, 159] da sie auf die Freisetzung von radioaktivem ⁵¹Cr oder ³H-Thymidin abzielen. Anstelle der T-Zell-Proliferationsstudien wurde die Fähigkeit der Vakzinkonjugate zur Antikörperproduktion untersucht, da Vakzine basierend auf synthetischen MUC1-Peptiden und immunstimulatorischen Komplexen (ISCOM, immune stimulatory complexes) in der Lage waren, Immunantworten auszulösen, in der z. B. eine schwache Mucin-spezifische humorale Antwort als auch eine T-Zell-Antwort mit der Zunahme an CD8⁺-Rezeptoren verzeichnet werden konnte.^[198, 418] ELISA-Untersuchungen sind jedoch in Bezug auf die Ausbildung cytotoxischer T-Zellen nicht thesenstützend. Da ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Wachstum von MCF-7-Zellen und den Cytokinen IL-1 β sowie TNF- α besteht,^[419-420] sind T-Zell-Proliferationsessays interessant.

Neben dem TTox-Konjugat **221** wurde das vollsynthetische IL-1 β -Glycopeptid **173** untersucht. Da im Vakzin **173** kein T_H2-Epitop vorliegt, kann keine T_H2-Zell-induzierte Aktivierung von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen erfolgen (vgl. Kapitel 3.6.1, Abbildung 32 und Kapitel 3.8.1, Abbildung 39). Wie in der Untersuchung zuvor wurden drei weibliche balb/c-J-Mäuse mit dem synthetisierten IL-1 β -Konjugat **173** jedoch ohne das Adjuvans **132** immunisiert und anschließend ihr Serum im ELISA auf Antikörper, die an das BSA-Konjugat **215** binden, untersucht (Abbildung 54).

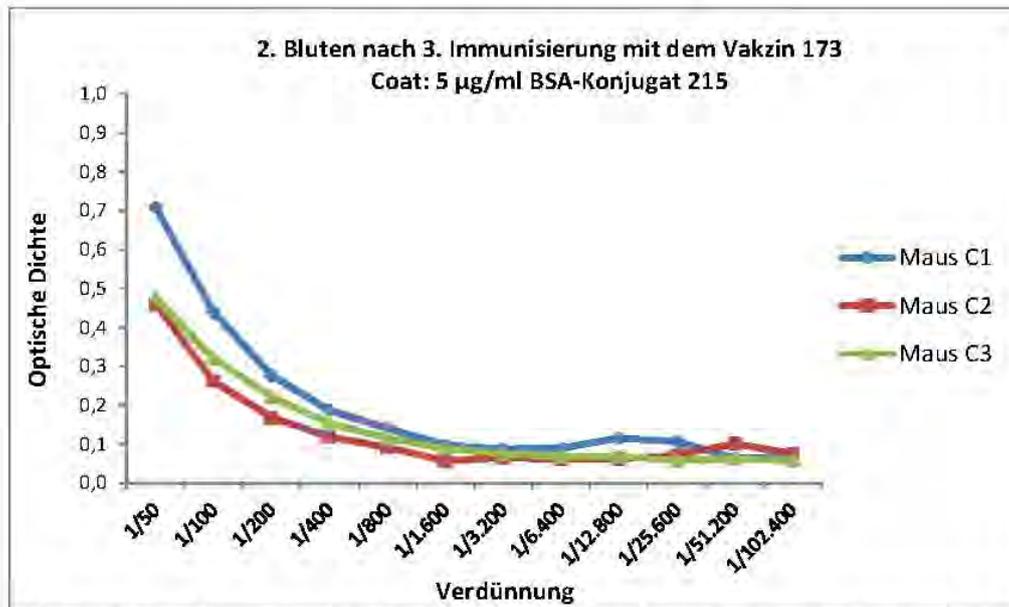


Abbildung 54: ELISA der Seren der mit Vakzin 173 immunisierten Mäuse (nach erster Booster-Impfung, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-Konjugat 215).

Abbildung 54 zeigt, dass in allen drei Mäusen eine geringe Antikörperproduktion gegen das Vakzin 173 nachgewiesen wurde. Die Bildung dieser Antikörper könnte auf die mitogenen Eigenschaften des IL-1 β zurückzuführen sein, das auch eine verstärkende Wirkung auf das IL-2 ausübt. Des Weiteren regt es die Bildung von IL-2-Rezeptoren auf T-Zellen an, welches die Ausdifferenzierung in CTL sowie T_H2-Zellen erleichtert. Die Zusammenhänge der T-Zell-Aktivierung sind in der Abbildung 55 dargestellt.

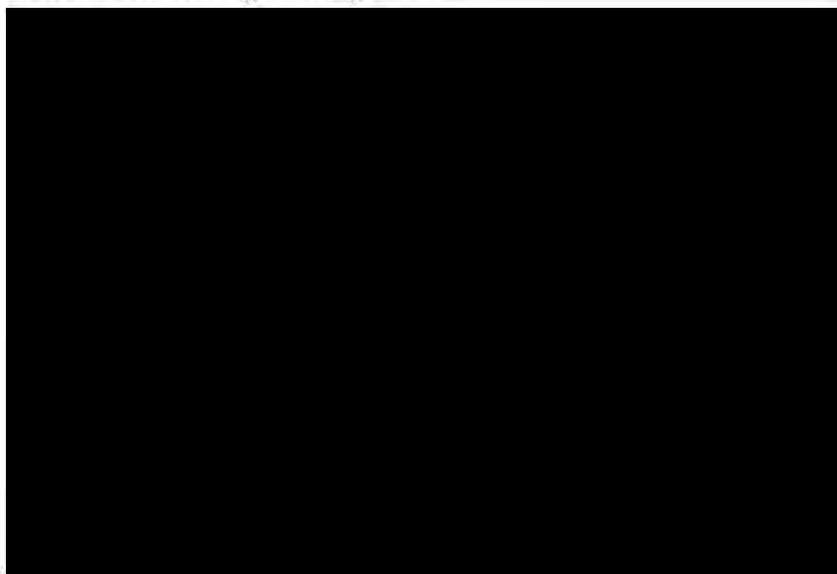


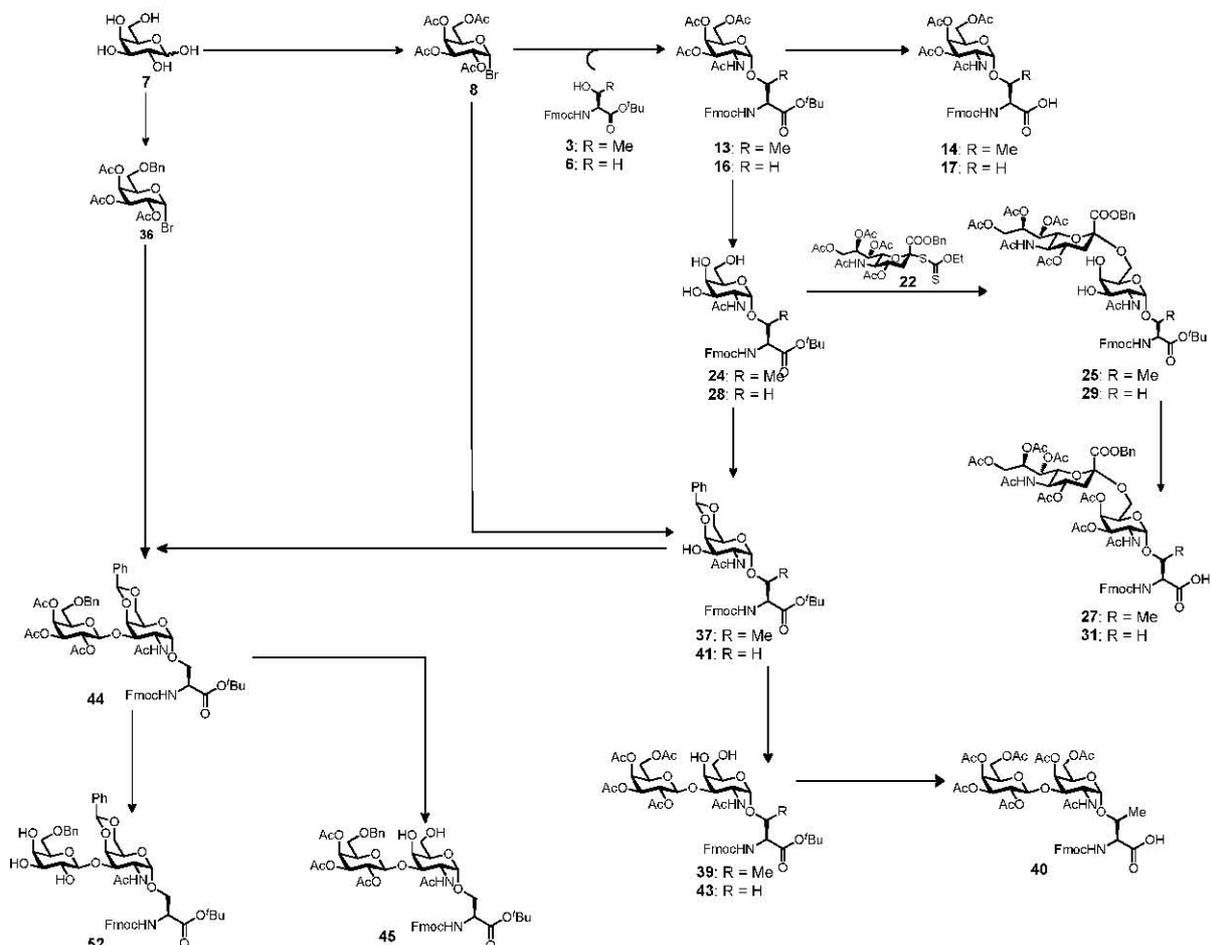
Abbildung 55: Modell zur Aktivierung und Differenzierung von naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.^[357]

Die Abbildung 55 verdeutlicht, dass in diesem Zusammenhang der Einsatz von MPL-A wichtig gewesen wäre und den Grund warum eine CTL-Antwort erwartet wurde. Eine weitere Ursache für die Bildung von Antikörpern könnte in der Ursache begründet sein, dass IL-1 β als direkter Wachstums- und Differenzierungsfaktor auf B-Zellen wirkt.^[362] Verglichen mit den in der Literatur berichteten Ergebnissen, in denen ein T_H2-Epitop vorhanden ist, zeigte

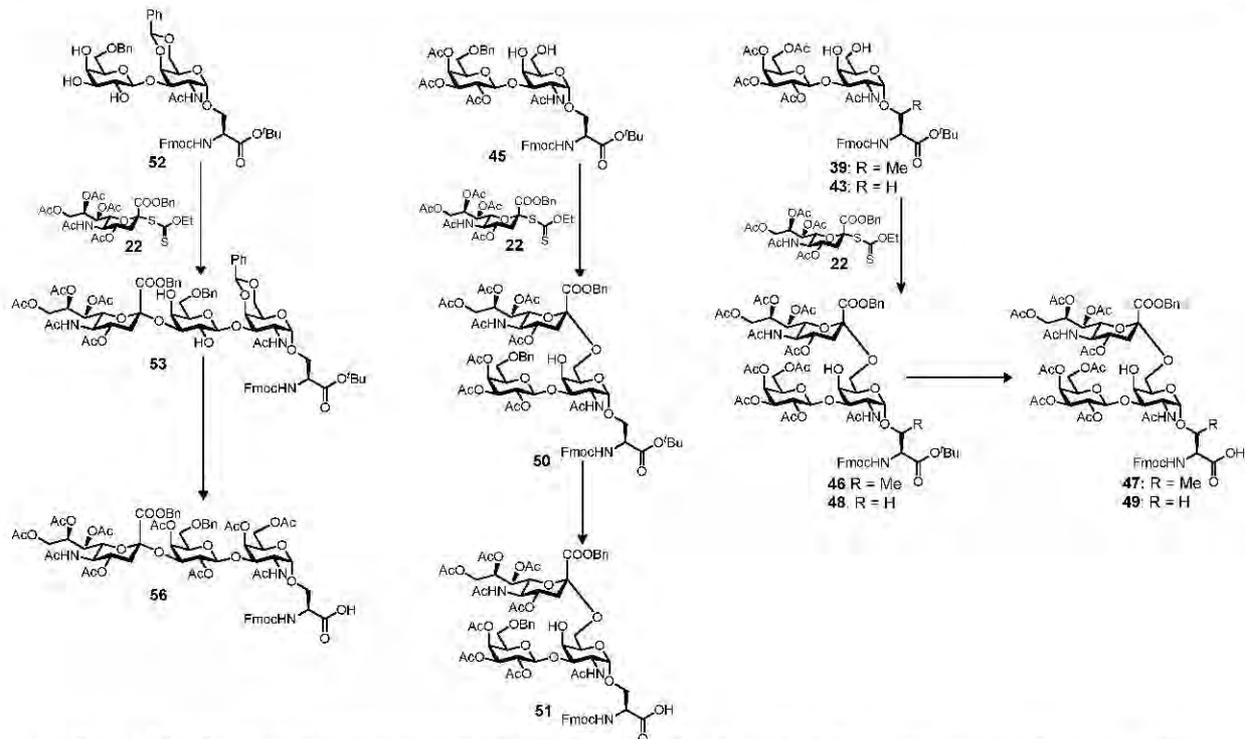
das reine Konjugat **173** eine geringere Antikörperbildung.^[421-422] Von Interesse wäre, ob mit Hilfe des MPL-A-Adjuvans **132** die Immunogenität und die Produktion der Antikörper gesteigert werden kann. Daher ist es sinnvoll, die Experimente unter Verwendung des MPL-A **132** durchzuführen und das Vollblut auf cytotoxische T-Zellen, die tumorassoziiertes MUC1 erkennen und lysieren, zu untersuchen.

4 Zusammenfassung

Trotz intensiver Forschungen stehen noch keine geeigneten Vakzine für die aktive Krebsimmuntherapie gegen Tumorerkrankungen bereit. Die in der passiven Immuntherapie zur Anwendung kommenden Therapeutika sind trotz ausgeklügelter Mechanismen nicht frei von Nebenwirkungen. Eine aktive Immuntherapie mit Hilfe von Antitumorimpfstoffen könnte prophylaktische und therapeutische Wirkungen ohne schwerwiegende Nebenwirkungen, wie sie z. B. durch Chemotherapeutika verursacht werden, entfalten. Das auf gesundem Epithelgewebe in einem hohen Glycosylierungsgrad vorliegende Glycoprotein MUC1 ist auf epithelialen Tumorzellen häufig unterglycosyliert. Diese Strukturunterschiede zwischen MUC1 auf Normalzellen und tumorassoziiertem MUC1 könnten für einen selektiven Angriff des Immunsystems genutzt werden. Dafür werden synthetisch hergestellte Glycopeptide aus der Tandem-Repeat-Region von tumorassoziierten MUC1 mit immunstimulierenden Komponenten zu synthetischen Vakzinen kombiniert. Für dieses Ziel wurden Glycosylaminosäurebausteine mit verschiedenen tumorassoziierten Kohlenhydratantigenen synthetisiert (Schema 135 und Schema 136), die dann in automatisierter Festphasensynthese in die tandem repeat-Domäne des MUC1 integriert wurden.



Schema 135: Vereinfachte schematische Darstellung der Synthese der Glycosylaminosäurebausteine(I).



Schema 136: Vereinfachte schematische Darstellung der Synthese der Glycosylaminosäurebausteine (II).

Als Immunstimulanzien kommen die in Abbildung 56 dargestellten Komponenten in Betracht.

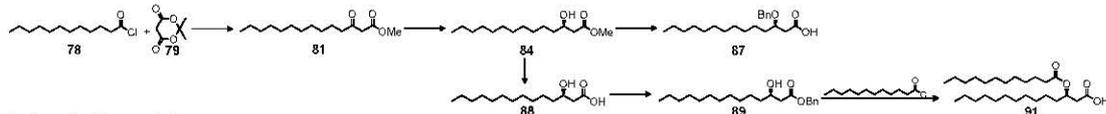


Abbildung 56: Schematische Darstellung von potentiellen synthetischen Antitumorkvakzinen.

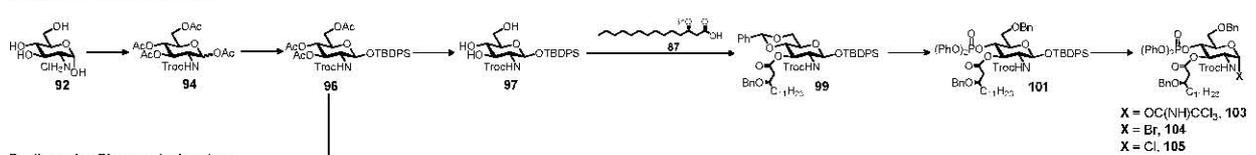
In der vorliegenden Arbeit wurden die MUC1-Glycopeptidantigene mit Immunstimulatoren, wie dem Cytokinfragment IL-1 β (163 – 171), dem Mitogen Pam₃Cys-Ser-Lys₄ oder dem internen MPL-A-Adjuvans kombiniert. Die Strategie ist, neben einer evt. humoralen Immunantwort, die Ausbildung von cytotoxischen T-Lymphozyten zu stimulieren, die durch ihren T-Zell-Rezeptor die entarteten MUC1-Glycoproteine auf den Tumorzellen direkt erkennen und deren programmierten Zelltod einleiten. Mit der zweiten Strategie wurde versucht, mit Hilfe von T-Epitopen, wie OVA (323 – 339), oder mit Hilfe von Carrierproteinen, wie dem BSA oder dem Tetanus-Toxoid, die Aktivierung von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen zu erreichen. Zur Verhinderung gegenseitiger konformationeller Beeinflussung zwischen dem Glycopeptidteil und dem Epitop des Immunstimulators wurden Olygoethylenglycol-Spacer in die Vakzine eingebaut. Als Immunstimulanz für die eingesetzten Vakzine wurde Monophosphoryl-Lipid A (MPL-A) synthetisiert, das in verschiedenen auf dem Markt befindlichen Vakzinen, wie *Cervarix*[®],

Fendrix[®] und im neu entwickelten Krebsvakzin Tecemotide (*Stimuvax*[®]), als externes Adjuvans zum Einsatz kommt.^[83-84, 161, 423] Für MPL-A wurde eine neue Syntheseroute entwickelt, die sowohl die regioselektive Anknüpfung verschiedener Lipidreste als auch die Anbindung an MUC1-Glycopeptide zur Bildung von liposomalen Vakzinkonjugaten erlaubt (Schema 137).

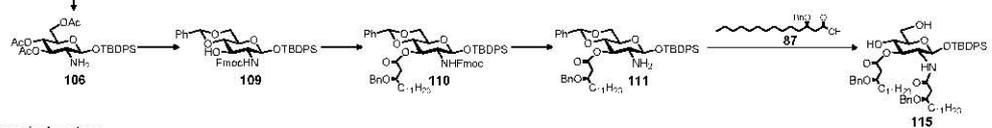
Synthese der Fettsäuren



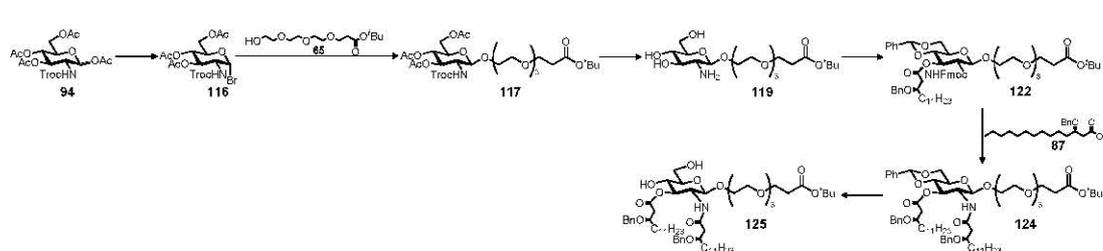
Synthese des Glucosaminindonors



Synthese des Glucosaminakzeptors



Synthese des spacergebundenen Glucosaminakzeptors



Schema 137: Schematische Darstellung der Synthese des MPL-A (I).

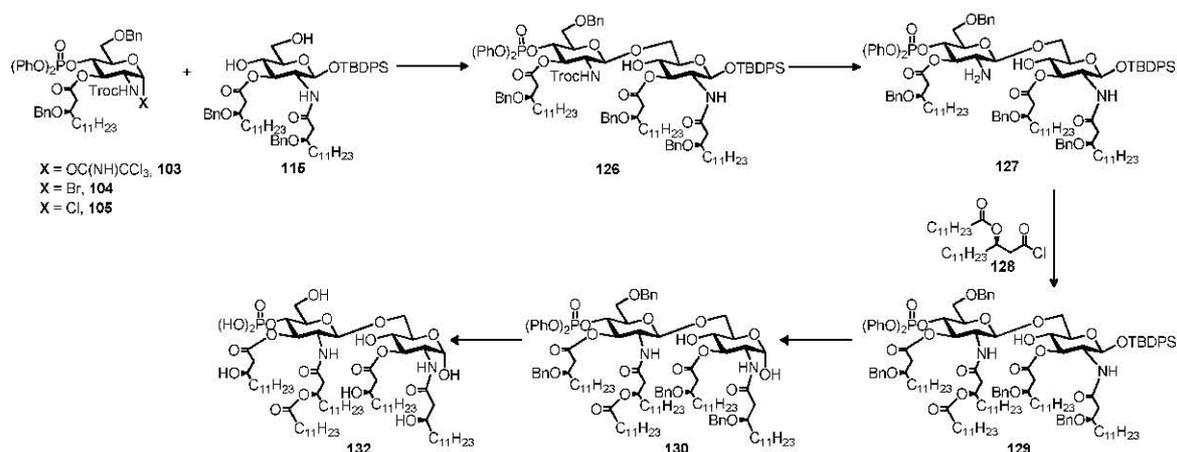
Die Synthesen des MPL-A und des spacergebundenen MPL-A können in vier Teile gegliedert werden (Schema 137). Diese beginnen mit dem Aufbau der beiden Fettsäuren. Dazu wurde Meldrumsäure (**79**) mit Laurinsäurechlorid (**78**) zum β -Ketoester **81** kondensiert.^[236] Schlüsselschritt ist die stereoselektive Reduktion des Ketoesters **81** nach *Noyori*^[237] zum β -Hydroxyester **84**, welcher zum Benzylether und zur Carbonsäure **87** umgesetzt wurde. Alternativ wurde am β -Hydroxyester **84** der Methyl ester in den Benzylester **89** umgewandelt und dieser mit Laurylchlorid zum Diester sowie nach Hydrolyse zur Carbonsäure **91** umgesetzt.

Die Synthesen der Glucosamin-Bausteine gehen von α -D-Glucosamin-Hydrochlorid aus (Schema 137). Schlüsselschritte der Glucosaminindonorsynthese waren die Anknüpfung der Fettsäure **87** zum Baustein **99** und die regioselektive Öffnung des Benzylidenacetals unter Bildung des primären Benzylethers. Schwerer als erwartet gestaltete sich die Abspaltung der TBDPS-Gruppe und die Umwandlung in die Donoren **103**, **104** und **105**. Das Trichloracetimidat **103** wurde durch eine basenkatalysierte Addition des anomeren reduzierenden Zuckers an Trichloracetonitril als das thermodynamisch stabilere α -Anomer

erhalten. Die Umwandlung in die Glycosylhalogenide **104** und **105** erfolgte durch modifizierte *Appel*-Reaktionen.^[269]

In der Synthese des Glucosaminakzeptors **115** aus **96** wurde die Fmoc-Gruppe zur temporären Blockierung der Aminofunktion zum Produkt **109** eingeführt. Nach Veresterung mit der Fettsäure **87**, milder Fmoc-Abspaltung und Einführung der zweiten Fettsäure als Amid wurde die Benzylidengruppe unter Bildung des Akzeptors **115** für die nachfolgenden Glycosylierungen gespalten.

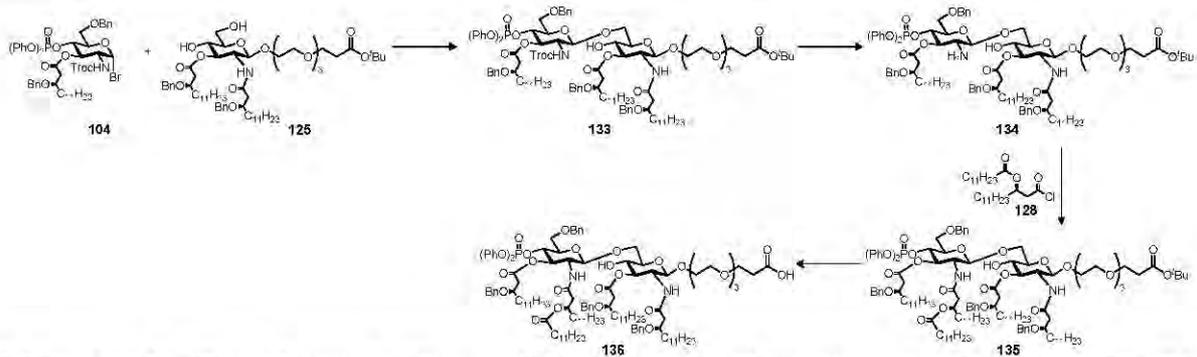
Zur Synthese des spacergebundenen Glucosaminondonors **125** wurde der *N*-Troc-geschützte Baustein **94**^[245] in das anomere Bromid überführt (Schema 137) und dieses zur Glycosylierung des Spacerbausteins **65** zum Produkt **117** eingesetzt. Die weitere Synthese verlief analog der des bereits vorgestellten Glucosaminakzeptorbausteins **115**. Für die Glycosylierung zu dem MPL-A **126** wurden die Glycosylierungsmethoden nach *Schmidt*^[265-267, 276] und nach *Banoub*^[140, 231] angewendet (Schema 138). Schwierig gestaltete sich die Ausbildung des zweiten Amids **129** im Disaccharid. Selbst speziellere Kupplungsreagenzien erwiesen sich als unbrauchbar, sodass die β -Acyloxycarbonsäure **91** schonend in das Carbonsäurechlorid **128** überführt wurde, was daraufhin die Amidbildung zu **129** ermöglichte. Die Entfernung der TBDPS-Gruppe war vermutlich aufgrund der geringeren Löslichkeit schwieriger als bei den Monosacchariden. Im letzten Schritt wurden die Benzylether und die Phenylester hydrogenolytisch abgespalten.



Schema 138: Die Glycosylierung des Akzeptors **115** und die Fertigstellung des MPL-A **132** (IIa).

Sowohl die Reinigung als auch Charakterisierung des Endproduktes gestalteten sich schwierig, konnten jedoch nach verschiedenen Anläufen erfolgreich durchgeführt werden.

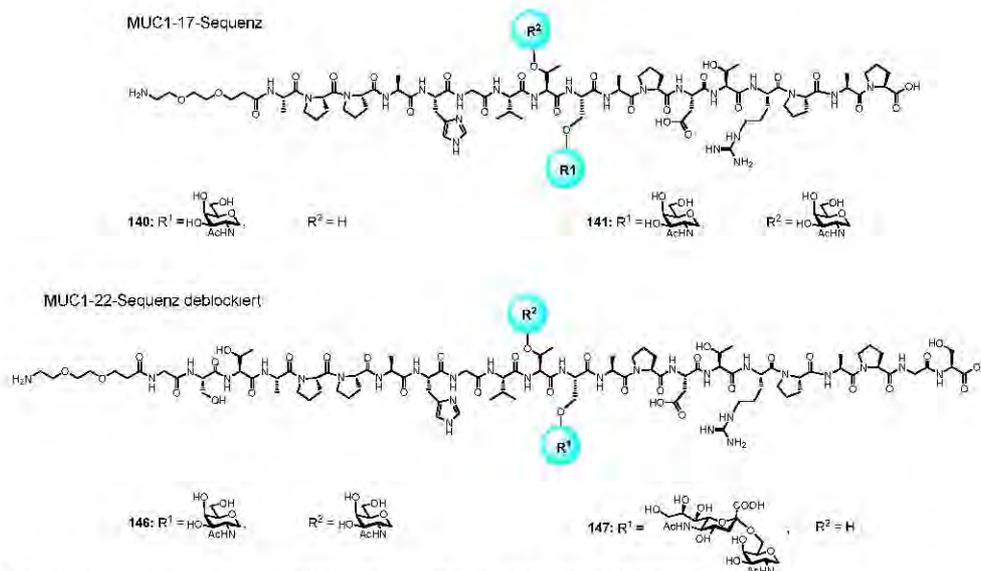
Die Synthese zum spacergebundenen MPL-A konnte nur über das Glucosaminylhalogenid **104** realisiert werden, da das Trichloracetimidatverfahren nach *Schmidt* kein Produkt lieferte (Schema 139).



Schema 139: Die Glycosylierung des Akzeptors **125** und die Fertigstellung zum spacergebundenen MPL-A **136** Teil (Iib).

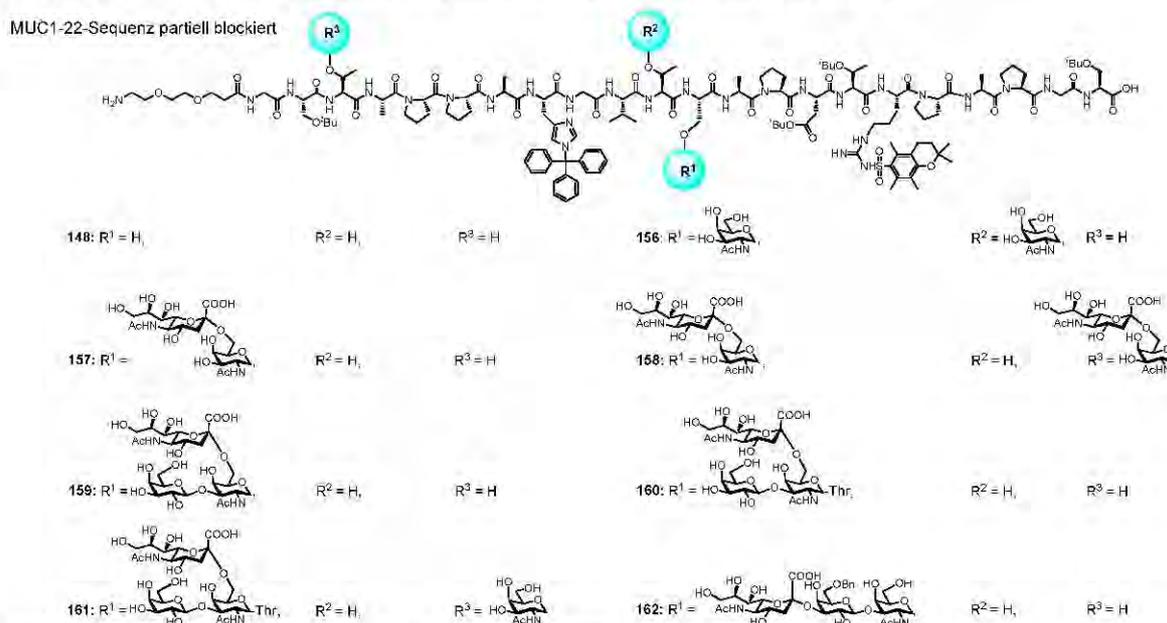
Nach reduktiver Abspaltung der Troc-Gruppe wurde das Amid **133** ebenfalls durch Umsetzung des Amins mit dem Carbonsäurechlorid **128** ausgebildet. Im letzten Schritt wurde der *tert*-Butylester gespalten. Dies war wegen der Säureempfindlichkeit der Phosphatester ein heikler Schritt. Die Umsetzung mit Ameisensäure führte zum Ziel, während Reagenzien wie Trifluoressigsäure-Gemische die Zersetzung des Moleküls auslösten. Dadurch wurde das MPL-A-Spacerkonjugat **136** für Fragmentkondensationen mit den partiell geschützten Glycopeptiden erhalten. Als B-Zellepitope wurden durch automatisierte Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie Heptadecaglycopeptide und Docosaglycopeptide aus dem tandem repeat von MUC1 synthetisiert (Schema 140), indem die jeweiligen tumorassoziierten Antigene integriert wurden. Zur Konjugation an Immunstimulanzen wurden in die Synthesen flexible, nicht-immunogene Oligoethylenglycolspacer eingebaut. Diese erlauben die nachträgliche Funktionalisierung der Glycopeptide.

Sowohl die 17er als auch die 22er Glycopeptide enthalten das Peptidpitop PDTRP als immundominante Domäne. In den 17er Sequenzen ist ein vollständiges cytotoxisches CD8⁺-T-Zell-Epitop repräsentiert (TSAPDTRPA-Motiv),^[75] in den 22er Sequenzen sind es zwei (STAPPAHGV-^[76], TSAPDTRPA-Motiv).



Schema 140: Synthese von ungeschützten Heptadeca- und Docosaglycopeptiden.

Die Synthese der partiell geschützten Glycopeptide erfolgte analog, wobei die Abspaltung vom Harz unter sehr milden Bedingungen unter Erhalt der säurelabilen Schutzgruppen erfolgen musste (Schema 141). Die Deblockierung der Kohlenhydratschutzgruppen gestaltete sich durch Nebenreaktionen in den Aminosäureseitenketten schwieriger.

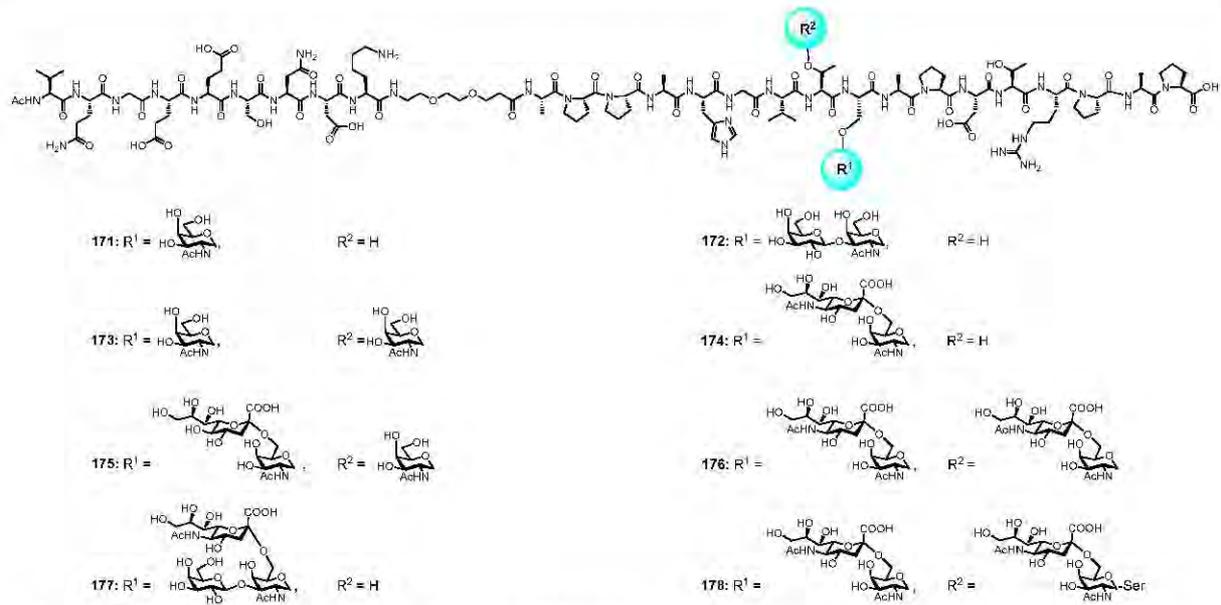


Schema 141: Die Synthese von partiell geschützten Docosaglycopeptiden.

Sämtliche MUC1-Glycopeptide wurden durch die RP-HPLC in reiner Form isoliert und durch 2D-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert. Die Synthese der im Peptidteil geschützten Docosaglycopeptide war ein kompliziertes und langwieriges Unterfangen, erlaubt jedoch wie kein anderes Verfahren die chemoselektive Konjugation an Lipopeptide und Liposaccharide als Immunstimulanzien.

Zur Ausbildung und Stimulation von cytotoxischen T-Lymphozyten kamen drei synthetische Vakzinkonjugate zum Einsatz, die sich in zwei Kategorien untergliedern lassen. Die erste Kategorie besteht aus IL-1 β -Glycopeptid-Konjugaten und dem Adjuvans **132**. Die zweite Kategorie stellen die liposomalen Vakzine dar.

Zum Aufbau der ersten Kategorie wurde am mit Prolin vorbeladenen *Barlos*-Harz zunächst das MUC1-Glycopeptid synthetisiert, wobei die unterschiedlich glycosylierten Aminosäuren integriert wurden. Nach Anbindung des Spacers wurde die neun Aminosäuren lange Interleukin-Sequenz angeknüpft (Schema 142). Es gelang die anspruchsvolle Synthese der Glycopeptide **176** und **178**, in denen in der Sequenz zwei ST_N-Antigen-Bausteine aufeinanderfolgen. Die synthetisierten Vakzine **171** – **178** zusammen mit dem MPL-A **132** sollten dendritische Zellen aktivieren, die wiederum naive T- und B-Zellen stimulieren, indem sie die prozessierten Antigene in Form von MHC-I-Peptid-Komplexen zusammen mit co-stimulierenden Molekülen an ihrer Oberfläche präsentieren.



Schema 142: Die Synthese von Interleukin-1 β -MUC1-Glycopeptiden.

Das Vakzin **173** wurde hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Ausbildung von Antikörpern analysiert. Zur immunologischen Prüfung auf Antikörper wurde **173** ohne das Adjuvans **132** drei weiblichen balb/c-J-Mäusen subkutan injiziert. Nach zwei Booster-Impfungen wurde ihr Serum im ELISA mit Hilfe des entsprechenden BSA-Konjugats **215** untersucht. In Abbildung 57 sind die Ergebnisse dargestellt.

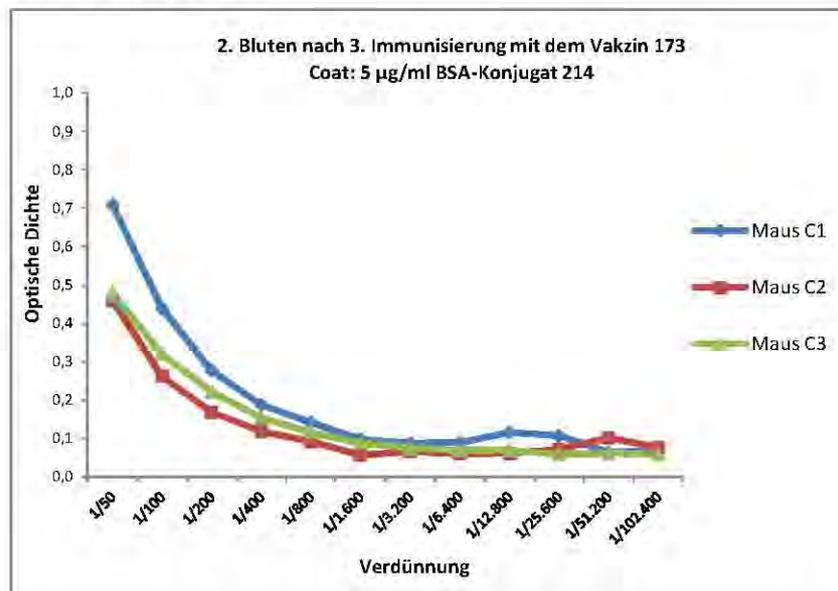
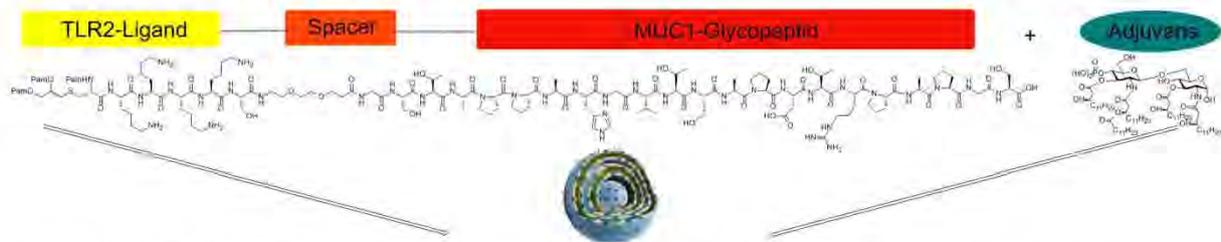


Abbildung 57: ELISA der Seren der mit Vakzin **173** immunisierten Mäuse (nach erster Booster-Impfung, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-Konjugat **214**).

Zwar konnten in allen drei Mäusen Antikörper nachgewiesen werden, jedoch löste das Vakzin aufgrund des fehlenden T_H2-Epitopes wie erwartet nur eine schwache Antikörperproduktion aus.

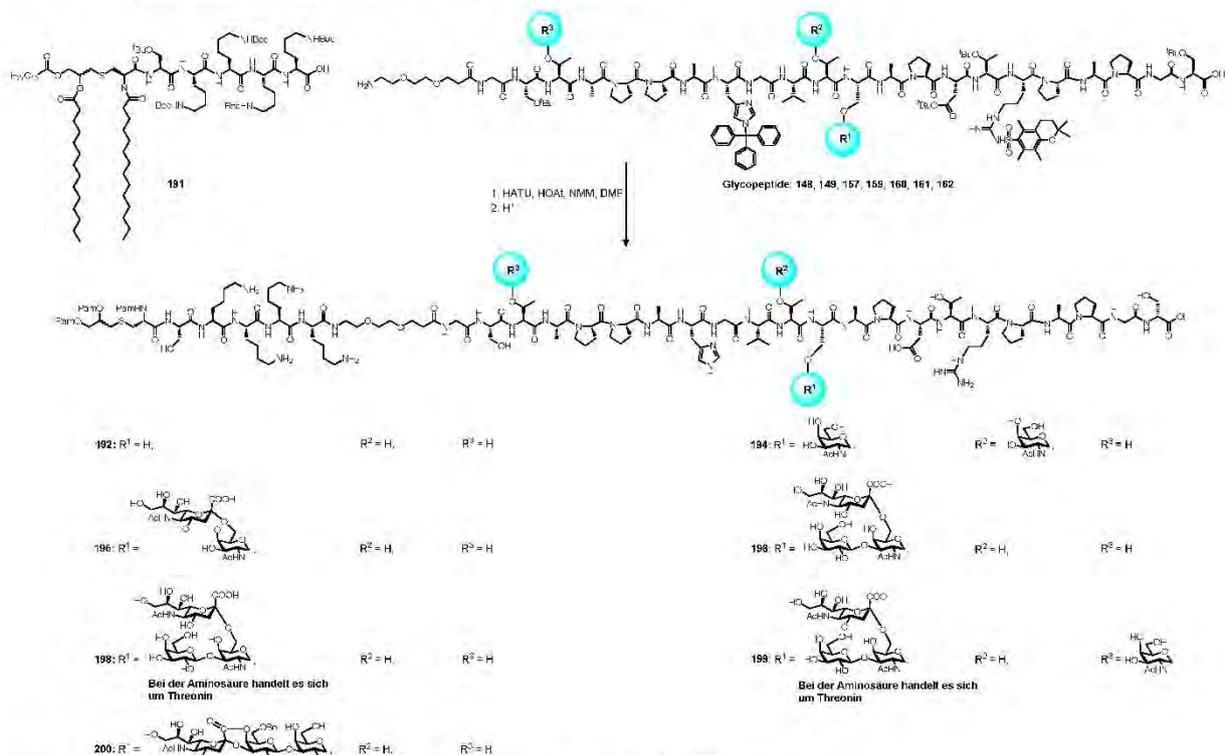
Vorbild für den Aufbau der Vakzin-Klasse der zweiten Kategorie war der sich in den klinischen Studien befindliche Impfstoff Tecemotide (*Stimuvax*[®]) von Merck sowie das

Adjuvans, welches Bestandteil der Impfstoffe *Cervarix*[®] und *Fendrix*[®] ist. Dementsprechend wurde die Synthese eines Zweikomponenten-Konjugats aus dem MUC1-Glycopeptid und dem stark mitogen wirkenden TLR2-Agonist Pam₃Cys-Ser-Lys₄ durchgeführt. Dieser sollte im liposomalen Vakzinkonjugat durch das MPL-A-Adjuvans **132** mittels Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, TNF-α, IL-1β und IL-2 nochmals verstärkt werden (Schema 143).



Schema 143: Geplantes liposomales Vakzin aus dem Pam₃Cys-Spacer-MUC1-Glycopeptid und MPL-A.

Die partiell geschützten MUC1-Docosaglycopeptide (Schema 141) wurden mit dem Lipopeptid **191**, welches durch Festphasensynthese am *Barlos*-Harz aufgebaut worden war, durch Fragmentkondensation gekuppelt (Schema 144).

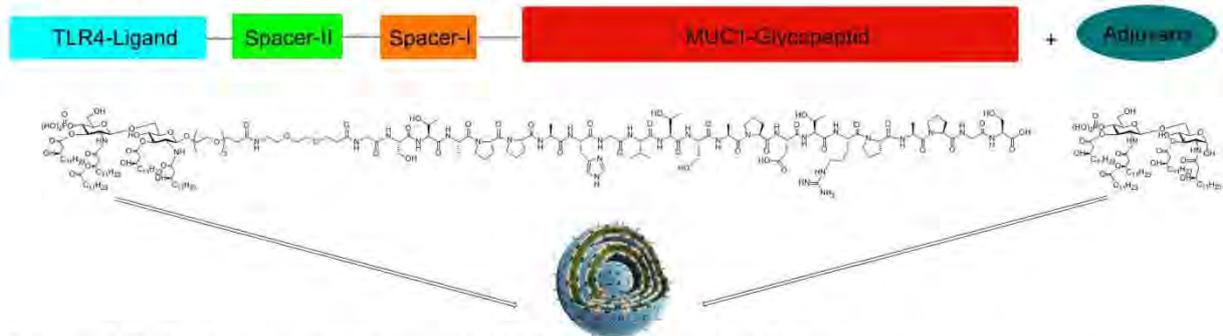


Schema 144: Die Synthese und Deblockierung zu den Lipoglycopeptiden.

Dazu wurde das geschützte Lipopeptid **191** mit HATU, HOAt und *N*-Methylmorpholin in seinen Aktivester überführt und danach mit den partiell geschützten Docosaglycopeptiden umgesetzt. Die Ausbeuten der Fragmentkondensationen lagen zwischen 94 % und 53 %. Nach Charakterisierung der Zweikomponenten-Konjugate wurden die verbliebenen

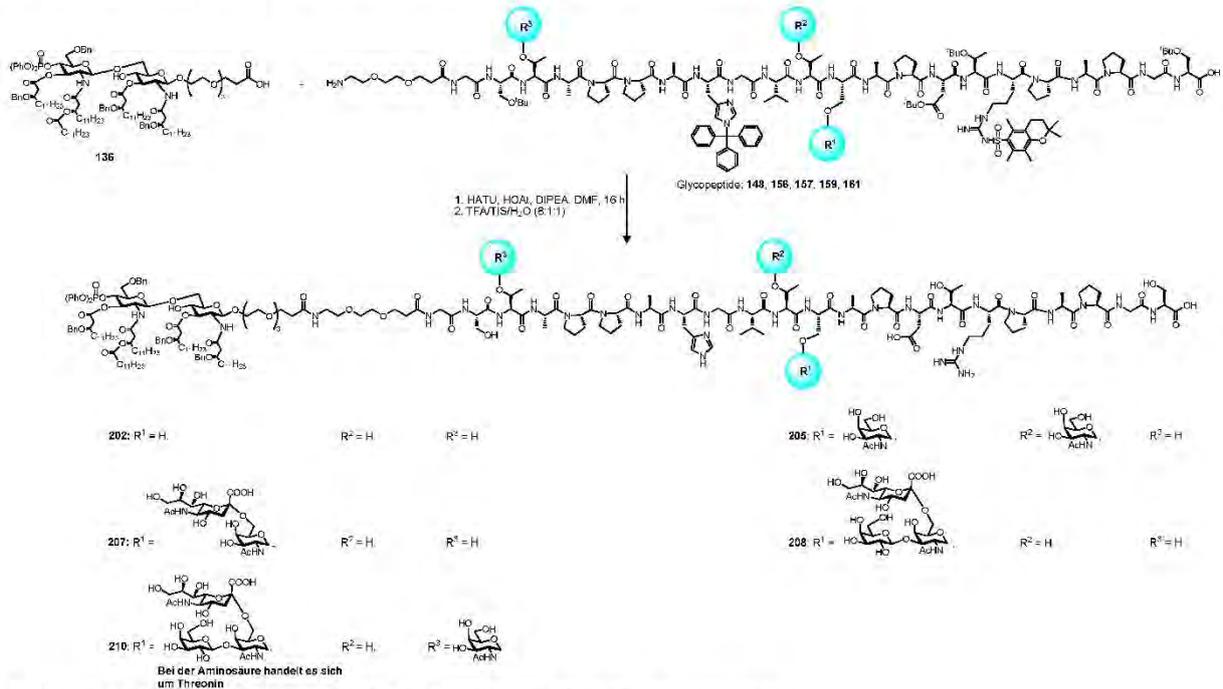
säurelabilen Schutzgruppen acidolytisch abgespalten und die Produkte durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und charakterisiert.

In der Kategorie der liposomalen Vakzinkonjugate wurde als zweiter Typ das doppelt adjuvierte Vakzin nach Schema 145 synthetisiert. Es besteht aus dem spacergebundenen TLR4-Agonisten MPL-A **136**, welcher an die partiell geschützten 22er MUC1-Glycopeptide angeknüpft wurde. Durch die Zugabe des externen Adjuvans MPL-A **132** sollte auch hier die immunologische Wirkung verstärkt werden.



Schema 145: Die Synthese eines liposomalen Vakzins mit externem Adjuvans.

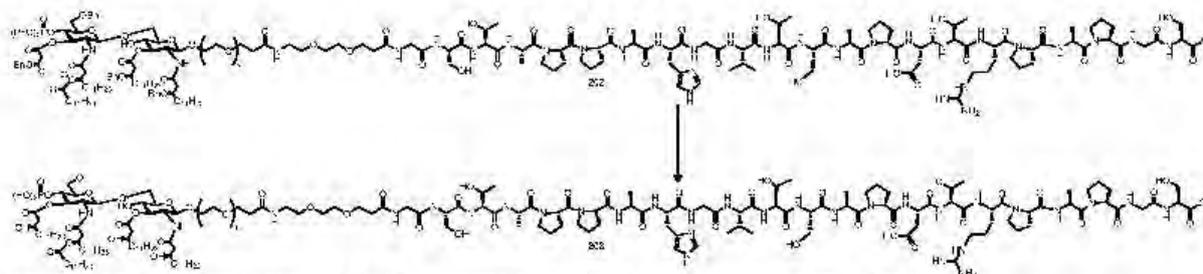
Zur Fragmentkondensation wurde das MPL-A **136** mit HATU, HOAt und *N*-Methylmorpholin in den Aktivester überführt (Schema 146).



Schema 146: Die Synthese und Deblockierung zu den Lipoglycopeptiden.

Durch die vermutlich erschwerte Aktivesterbildung waren die Ausbeuten der Kupplungen nur befriedigend. Nach semipräparativer RP-HPLC und Charakterisierung wurden diese Vakzinkonjugate acidolytisch von den säurelabilen Schutzgruppen befreit und die Produkte erneut durch RP-HPLC chromatographisch gereinigt. Die Isolierung und Charakterisierung war aufgrund des amphiphilen Charakters der Produkte schwierig. Von dem unglycosylierten

Lipopeptid **202** wurden im letzten Schritt in einem zweistufigen Prozess die Benzyl- und Phenyl-Schutzgruppen hydrogenolytisch gespalten und das Lipopeptid anschließend durch RP-HPLC isoliert (Schema 147). Eine analytische Charakterisierung gelang wegen des amphiphilen Charakters und der Neigung des Endproduktes zur Agglutination nicht.



Schema 147: Die Synthese und Deblockierung zum Phosphoryl-Lipoglycopeptid 203.

Es kann angenommen werden, dass die liposomalen Vakzinkonjugate **192** – **199** und **203** aufgrund der Ähnlichkeit zu dem Tecemotide (*StimuVax*[®]) ebenfalls cytotoxische T-Zellen ausbilden und somit analog zu dem von *Merck* postulierten Mechanismus wirken (Abbildung 58).

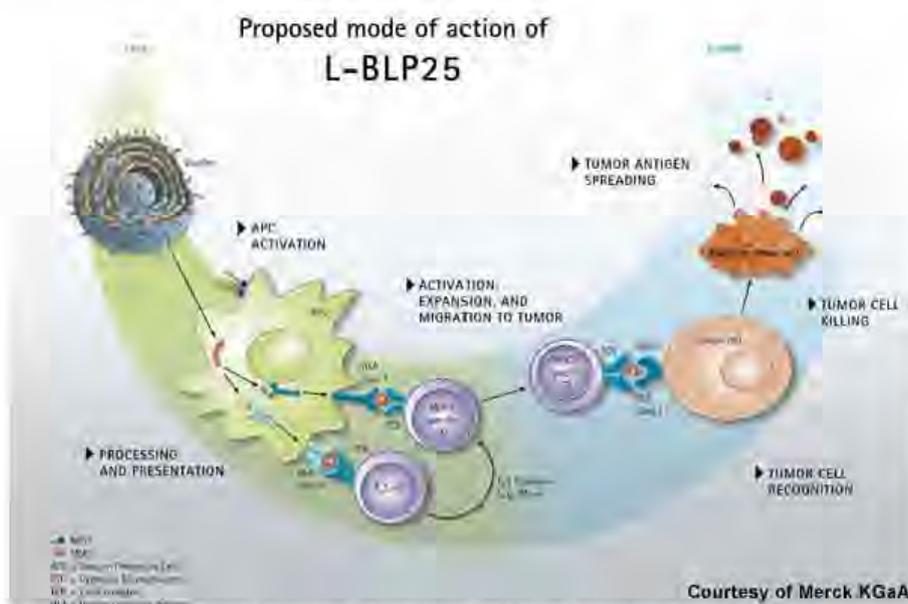
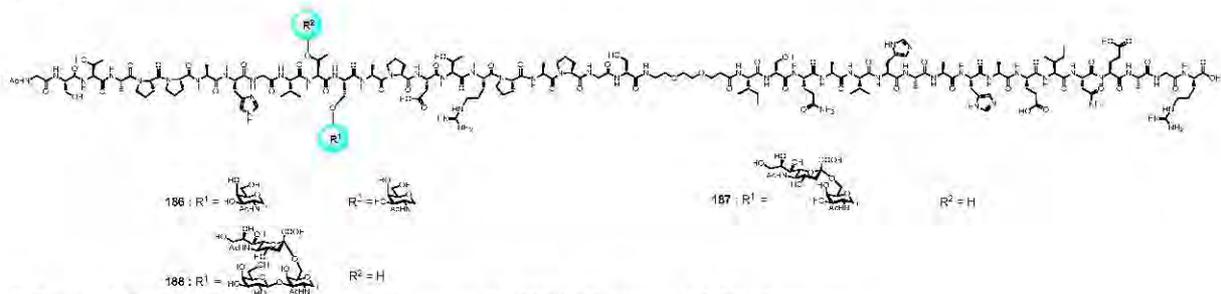


Abbildung 58: Postulierter Wirkmechanismus des Tecemotide mit freundlicher Genehmigung von Merck Serono.

Die durch die liposomalen Vakzinkonjugate induzierten cytotoxischen T-Zellen hindern Tumorzellen mit überexprimiertem MUC1 am Wachstum, indem sie Perforine und Granzyme ausschütten und sie in den programmierten Zelltod treiben. Durch die Produktion und Sekretion von Interferon- γ fördern sie benachbarte Zellen zur Produktion von MHC-I-Proteinen, welches eine stärkere Präsentation von intrazellulär abgebauten Peptiden nach sich zieht.

Im Gegensatz zur ersten Strategie zur Ausbildung von cytotoxischen T-Zellen versucht die zweite Strategie eine Aktivierung von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen

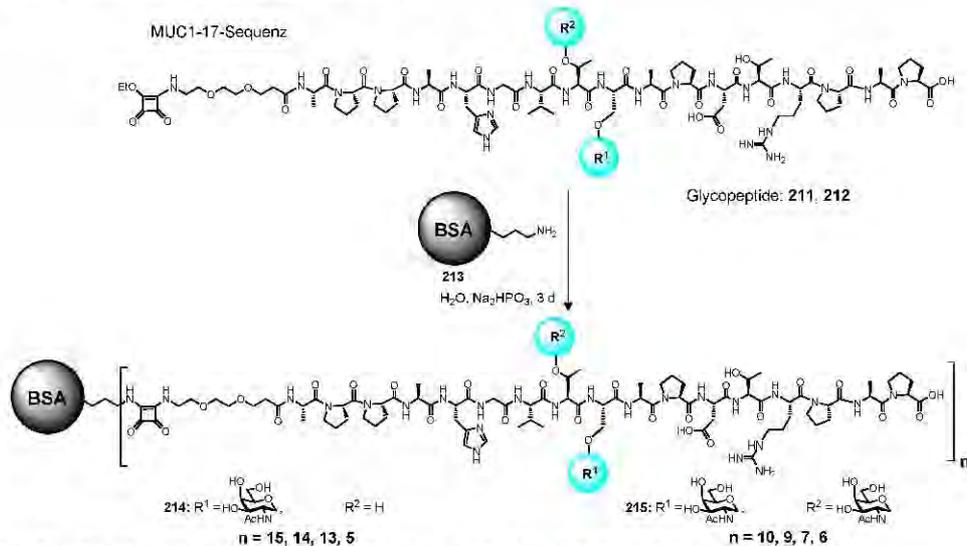
zu erreichen. Zur Stimulation und Ausbildung von Antikörpern durch Plasmazellen können Glycopeptid-Haptene an T_H2-Zell-Epitope gebunden werden. Um Antikörper gegen die synthetischen tumorassoziierten MUC1-Glycopeptide induzieren zu können, wurden sie mit einer Ovalbuminsequenz (OVA 323-339) als T_H2-Zellepitop konjugiert. Mit diesen Vakzinen sollten tumorselektive Antikörper in OVA-transgenen Mäusen ausgebildet werden (Schema 148).



Schema 148: Die Synthesen von OVA₍₃₂₃₋₃₃₉₎-MUC1-Glycopeptid-Konjugaten.

Der Aufbau der OVA-Glycopeptid-Konjugate erfolgte an mit Arginin beladenem *Barlos*-Harz und am PHB-*Tentagel*[®]-Harz, wobei mit dem niedriger beladenen *Tentagel*[®]-Harz bessere Ergebnisse erzielt wurden. So gelang die lineare Synthese der drei Vakzinkonjugate **186** – **188**.

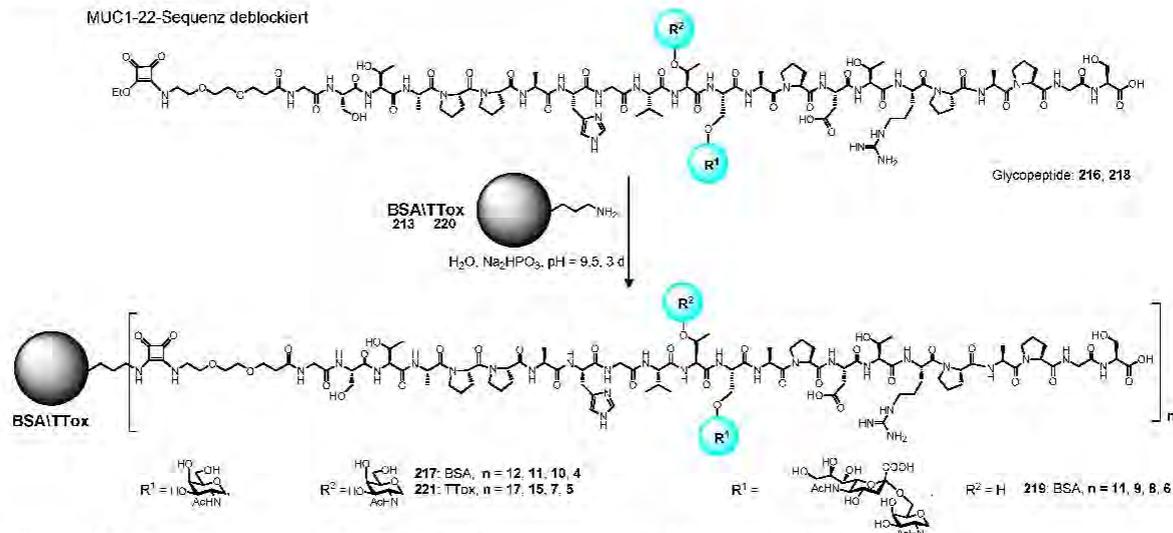
Eine weitere Möglichkeit zur Induktion von Antikörpern eröffnet die Konjugation mit Carrier-Proteinen wie Rinderserumalbumin (BSA) oder Tetanus-Toxoid. Die deblockierten Heptadeca- und Docosaglycopeptide **140**, **141**, **146** und **147** wurden mit Quadratsäurediethylester bei einem pH-Wert von 8.5 in die Quadratsäuremonoamide überführt (Schema 149 und Schema 150).



Schema 149: Die Synthese der MUC1-BSA-Konjugate **214** und **215** und deren Beladung.

Nach semipräparativer RP-HPLC wurden die Quadratsäuremonoamide mit dem jeweiligen Carrier-Protein bei einem pH-Wert von 9.5 zur Reaktion gebracht. Dabei reagieren die in den

Proteinen enthaltenen Lysin-Seitenketten zu den entsprechenden Quadratsäurediamiden (Schema 149 und Schema 150).



Schema 150: Die Synthese von MUC1-Neoglycoproteinen aus BSA oder Tetanus-Toxoid.

Die MUC1-Neoglycoproteine aus Rinderserumalbumin (BSA) wurden hinsichtlich ihrer Beladung an MUC1-Glycopeptiden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert. Danach ist z. B. das MUC1-Neoglycoprotein **217** mit höchstens 12 und mindestens 4 MUC1-Glycopeptid-Molekülen pro BSA-Carrierprotein beladen (Schema 150). Auf analoge Weise wurde an das Tetanus-Toxoid **220** das MUC1-Glycopeptid **216** konjugiert. Es gelang das synthetisierte TTox-Neoglycoprotein **221** durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie zu charakterisieren. Die Messungen ergaben eine Beladung von 17, 15, 7 und 5 Molekülen an MUC1-Glycopeptiden pro TTox-Carrierprotein (Abbildung 59).

Data: Sep 2011 11:05 Cal: pep3000-14-9-11-14 Sep 2011 10:53
Kratos PC Axima CFR V2.4.1; Mode linear_2804; Power: 80; Blanked; P.Ext. @ 160000 (bin 601)

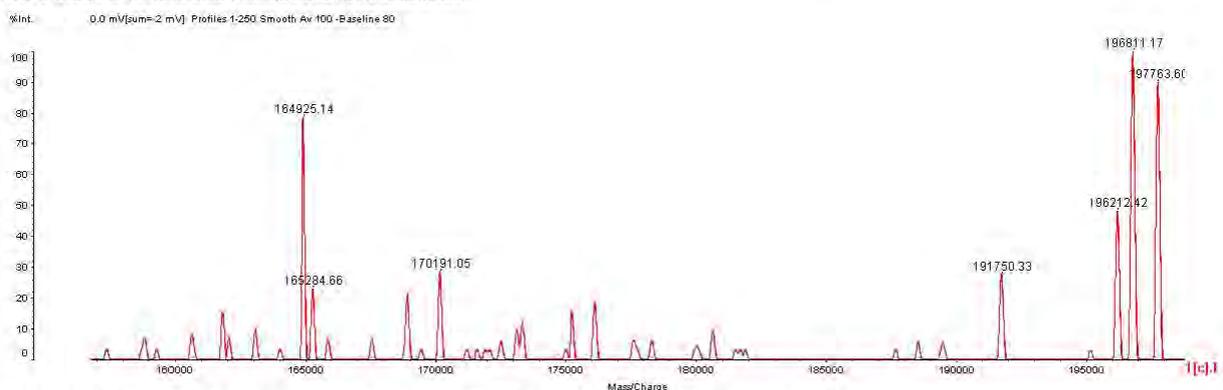


Abbildung 59: Die Bestimmung der Antigenbeladung des TTox-Konjugates **221**.

Zur Ermittlung der immunologischen Eigenschaften wurden drei balb/c-J-Mäuse mit dem Neoglycoprotein **221** immunisiert. Nach der dritten Immunisierung zeigte die ELISA-Analyse am BSA-Konjugat **217**, dass das TTox-Konjugat **221** eine starke Immunreaktion gegen die tumorassoziierte MUC1-Glycopeptidstruktur **146** ausgelöst hat (Abbildung 60).

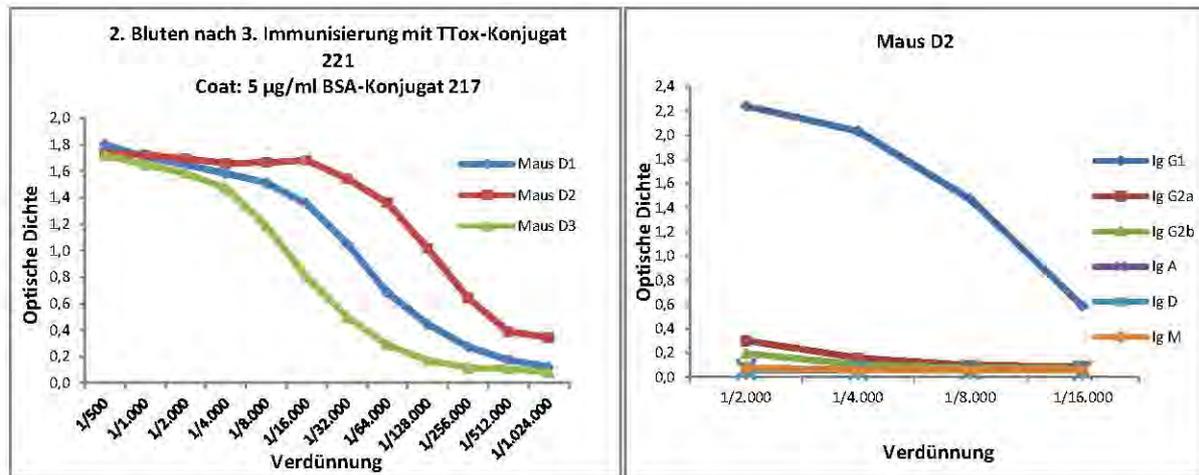


Abbildung 60: ELISA der Seren der mit 221 immunisierten Mäuse (nach erster Booster-Impfung, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-Konjugat 217) und Isotypenbestimmung der Antikörper im Serum von Maus D2, nach 3. Immunisierung mit dem Konjugat 221.

Die Antikörperbildung wurde in allen drei Mäusen induziert (Abbildung 60, links). Die Antikörpersubtyp-Bestimmung offenbarte, dass es sich hauptsächlich um Antikörper des Typs IgG1 (Abbildung 60, rechts) handelt. Des Weiteren konnten geringe Konzentrationen an Antikörpern des Typs IgG2_{a,b} nachgewiesen werden, während keine IgM-Antikörper induziert wurden. Dies deutet auf eine selektive MHC-II-restringierte Immunantwort mit der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses hin. Darüber hinaus wurde die Fähigkeit der sezernierten Antikörper untersucht, Tumorzellen zu erkennen. Es wurden Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 mit dem Antiserum aus einer mit dem Vakzin-Konjugat 221 immunisierten Maus (D2) inkubiert. Aufgrund der sich widersprechenden Ergebnisse der FACS-Analysen kann keine fundierte Aussage getroffen werden, ob die gebildeten Antikörper im Serum von Maus D2 in der Lage sind, an MCF-7-Zellen zu binden.

Nach dem Nachweis der IgG1-Antikörper im D2-Serum, welche durch das TTox-Neoglycoprotein 221 induziert wurden, sollte die Spezifität der gebildeten Serum-Antikörper in weiteren ELISA-Experimenten untersucht werden. Dafür wurde das zum TTox-Neoglycoprotein 221 dazugehörige BSA-Neoglycoprotein 217 mit 6 verschiedenen Seren aus anderen Forschungsarbeiten inkubiert und im ELISA analysiert (Abbildung 61). Die in den Seren induzierten Antikörper entstammen verschiedenen tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid-TTox-Vakzinen mit unterschiedlichem lokalisierten Glycosylierungsmuster, Kohlenhydratseitenketten und unterschiedlicher Startaminosäure. Für den besseren Vergleich sind in Abbildung 61 links nochmal die ELISA-Ergebnisse für das TTox-Neoglycoprotein 221 dargestellt, rechts davon die erhaltenen ELISA-Ergebnisse aus der Analyse der unterschiedlichen Seren an dem BSA-Konjugat 217. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass alle Seren in der Lage waren, an das synthetisierte BSA-Konjugat 217 zu binden. Das

Serum der Maus D3 (Abbildung 61 links) zeigte annähernd ähnliche Titer wie die der Seren aus den Mäusen 5, 7 und 11 (Abbildung 61 rechts).

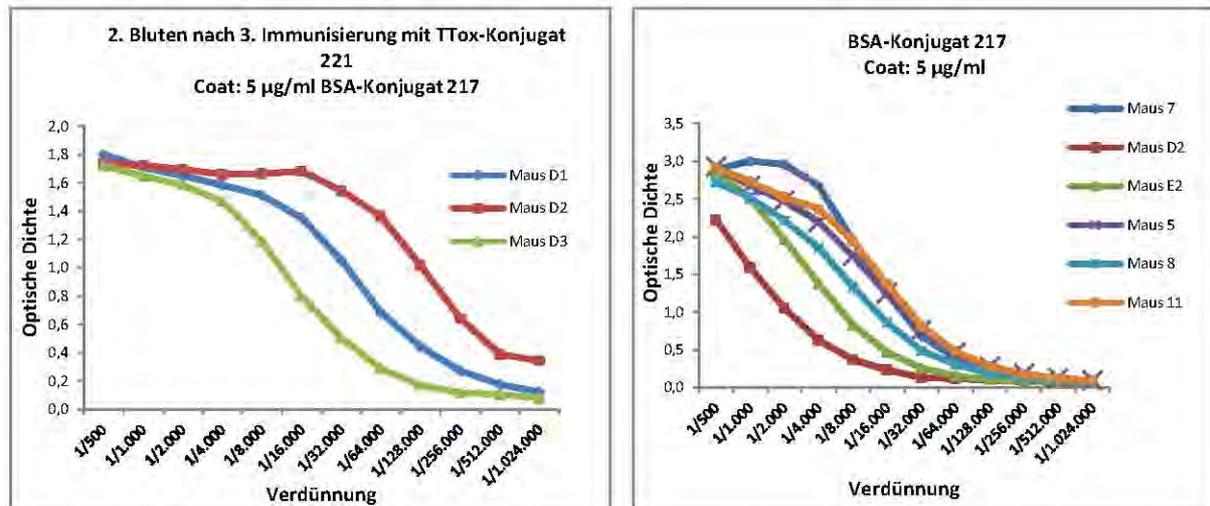


Abbildung 61: Die Bindung der Antiseren an den BSA-Konjugaten 217. Herkunft der Antikörper Maus 7: immunisiert mit MUC1(20)Thr⁶T-TTox (AK 301), Maus D2: immunisiert mit MUC1(20)Thr⁶ST_N-TTox (AK 252), Maus E2: immunisiert mit MUC1(20)Thr⁶-2,3-ST-TTox (AK 328), Maus 5: immunisiert mit MUC1(22)Ser¹⁷ST_N-TTox (NG 105), Maus 8: immunisiert mit MUC1(22)Thr¹⁸ST_N-TTox (NG 111), Maus 11: immunisiert mit MUC1(22)Thr⁶T_N-Thr¹⁸T_N-TTox (NG 107).

Die Seren aus den Mäusen D1 und D2 (Abbildung 65 links) zeigen bei der Bindung an das BSA-Konjugat 217 jedoch höhere Titer als die Seren aus der Vergleichsgruppe (Abbildung 65 rechts). Damit zeigen die in den Seren getesteten Antikörper (Abbildung 65 rechts) ein breites strukturelles Erkennungsspektrum, was auch im Einklang mit den immunologischen Befunden von *N. Gaidzik* und *S. Wagner* steht.^[415-416]

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von unterschiedlichen tumorassoziierten Antigenen, die durch Festphasensynthese in den tandem repeat des epithelialen Mucin MUC1 eingebaut werden. Zur Erzeugung von selektiven Immunantworten wird das synthetische MUC1-Glycopeptid mit einer Reihe von Immunstimulanzien umgesetzt. Es werden hierbei zwei Ziele verfolgt. Zum einen sollen mit Hilfe von synthetischen MUC1-Glycopeptiden und Immunstimulanzien cytotoxische T-Zellen ausgebildet werden, die Tumorzellen mit überexprimiertem MUC1 am Wachstum hindern, indem sie Perforine und Granzyme ausschütten und sie in den programmierten Zelltod treiben. Zum anderen soll mit Hilfe von T_H2-Epitopen eine adaptive humorale B-Zellen-vermittelte Immunantwort in Form von Antikörpern ausgelöst werden. Zur Erzeugung von cytotoxischen T-Zellen kamen das IL-1 β (163 – 169) und die beiden liposomalen Vakzinkonstrukte, bestehend aus dem TLR2-Agonist und dem TLR4-Agonist, zum Einsatz. Die beiden liposomalen Vakzinkonjugate sind von Interesse, da sie als Konkurrenten zum von *Merck* entwickelten Tecemotide (*Stimuvax*[®]) angesehen werden könnten, welches sich zur

Zeit in verschiedenen klinischen Studien befindet. Darüber hinaus wurde eine neue moderne Syntheseroute für das MPL-A entwickelt, welches als Adjuvans in den verschiedenen Vakzinen, wie *Cervarix*[®], *Fendrix*[®] und *Stimuvax*[®], zum Einsatz kommt. Das Vakzin **173** aus dem tumurassoziierten MUC1-Glycopeptid und der immunstimulierenden IL-1 β -Sequenz^[364] war wie erwartet nur zu einer sehr schwachen adaptiven humoralen Antikörperproduktion in der Lage. Zur Induktion von Antikörpern kamen die OVA-, die Tetanus-Toxoid- und die BSA-Konjugate zur Anwendung, von denen das Tetanus-Toxoid-Konjugat **221** auf die Fähigkeit zur Ausbildung von Antikörpern immunologisch getestet wurde. Dieses war in der Lage, eine humorale Antikörperproduktion gegen das MUC1 auszulösen und reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. In einem nächsten Schritt wäre es sinnvoll, die ungetesteten Vakzinkonjugate mit dem synthetischen Adjuvans **132** in T-Zell-Proliferationstests auf die Ausbildung von cytotoxischen T-Zellen zu untersuchen. Abschließend wären pathologische Untersuchungen durchzuführen, in denen bewiesen werden müsste, dass die entwickelten Vakzinkonjugate das Immunsystem dazu anregen, entartete, jedoch nicht gesunde Zellen anzugreifen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

Alle Reaktionen wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur und unter Rühren durchgeführt. Destillationen „i. Vak.“ bzw. „i. Hochvak.“ wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 40 °C ausgeführt. Die erhaltenen Reinsubstanzen wurden nach der chromatographischen Reinigung im Hochvakuum getrocknet.

Lösungsmittel:

Für alle durchgeführten Reaktionen wurden Lösungsmittel des Reinheitsgrades *pro analysi* (p.a.) eingesetzt. Absolutes *N,N*-Dimethylformamid wurde in Septenflaschen über Molekularsieb von der Firma *Fluka* (Schweiz) bezogen. *N,N*-Dimethylformamid (aminfrei, zur Peptidsynthese) wurde von der Firma *Roth* bezogen. Acetonitril, 1,2-Dichlorethan, Dichlormethan, 1,2-Dimethoxyethan und Nitromethan wurden über Calciumhydrid getrocknet und direkt vor dem Gebrauch destilliert. Absoluter Diethylether, absolutes Tetrahydrofuran und absolutes Toluol wurden über Natrium/Benzophenon getrocknet und ebenfalls frisch destilliert.^[424] Die verwendeten Lösungsmittel zur chromatographischen Trennung Cyclohexan, Ethanol, Ethylacetat, Methanol, Petrolether, Toluol wurden vor Gebrauch destilliert.

Molekularsieb:

Es wurde Molekularsieb in Pulverform der Porengröße 4 Å der Firma *Sigma Aldrich*, St. Louis (USA) verwendet. Vor jedem Einsatz wurde das Molekularsieb über einem Quarzstrahler für 6 h im Hochvakuum ausgeheizt und anschließend unter einer Argonatmosphäre gelagert.

Dünnschichtchromatographie:

Für die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumfertigplatten der Firma *Merck*, Darmstadt (Deutschland) verwendet. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und den folgenden Anfärbereagenzien:

„Zucker-Reagenz“

Mischung aus 1 M ethanolischer Schwefelsäure und 0.2%iger ethanolischer 3-Methoxyphenol-Lösung im Volumenverhältnis 1:1.

„Seebach-Reagenz“

Lösung von 1.0 g Cer(IV)-sulfat-Tetrahydrat und 2.5 g Molybdato-phosphorsäure in einer Mischung aus 94 ml Wasser und 6 ml konz. Schwefelsäure.

„Ninhydrin-Reagenz“

Lösung von 1.5 g Ninhydrin in einer Mischung aus 500 ml Methanol und 15 ml Essigsäure.

„Jod-Kammer“

Jod auf Kieselgel, keine Wärmeentwicklung.

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte jeweils (mit der Ausnahme der Jod-Kammer) durch Eintauchen in die jeweilige Anfärbelösung und mittels Wärmeeinwirkung mit einem Heißluftfön.

Flashchromatographie:

Als Säulenmaterial wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 35 – 70 μm der Firma *Acros Organics*, Geel (Belgien) verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungsmittelgemische ist in Volumenverhältnissen angegeben. Es wurde ein Überdruck von ca. 0.6 bar für die Flashchromatographie verwendet.

pH-Wert Bestimmungen:

Die pH-Werte wurden mit pH-Indikatorstäbchen der Firma Merck, Darmstadt, welche über einen kovalent gebundenen Indikator verfügen, bestimmt. Folgende Produkte kamen zum Einsatz:

Acilit[®] (pH-Bereich: 0 – 6)

Neutralit[®] (pH-Bereich: 5 – 10)

Alkalit[®] (pH-Bereich: 7.5 – 14)

Universalindikator (pH-Bereich: 0 – 14)

Die pH-Indikatorstäbchen wurden vor ihrer Verwendung mit Wasser angefeuchtet und dann mit Zellstoff getrocknet. Anschließend wurden die Stäbchen ausreichend lange (mindestens 15 s) in die zu messende Probe eingetaucht und der pH-Wert direkt abgelesen.

Spezifische Drehwerte:

Die Messung der spezifischen Drehwerte erfolgte mit einem Polarimeter der Firma *PerkinElmer*, Wellesley (USA) vom Typ 241 bei den Wellenlängen 578 nm und 546 nm (Quecksilberdampfampe) in einer 10 cm langen Polarimeterzelle und wurden auf die Natrium-D-Linie ($\lambda = 589 \text{ nm}$) extrapoliert. Das verwendete Lösungsmittel, die Konzentration der Lösung in g/100ml sowie die Messtemperatur werden bei den

Verbindungen aufgeführt. Die Einheiten werden entsprechend der allgemeinen Konvention nicht angegeben.

NMR-Spektroskopie:

Die NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten der Firma Bruker, Billerica (USA) bei Raumtemperatur aufgenommen:

Bruker AC-300: 300 MHz-¹H-NMR und 75.5 MHz-¹³C-NMR

Bruker AM-400: 400 MHz-¹H-NMR und 100.6 MHz-¹³C-NMR

Bruker AV-400: 400 MHz-¹H-NMR und 100.6 MHz-¹³C-NMR

Bruker DRX-600: 600 MHz-¹H-NMR und 150.9 MHz-¹³C-NMR

Die chemischen Verschiebungen δ in ppm sind abhängig vom verwendeten deuterierten Lösungsmittel und relativ zum Standard Tetramethylsilan zu verstehen. Zur Kennzeichnung der Signale aus den NMR-Spektren werden die Multiplizitäten wie folgt angegeben:

s – Singulett; d – Dublett; dd – Dublett vom Dublett; ddd – Dublett vom Dublett vom Dublett; dq – Dublett vom Quartett; dt – Dublett vom Triplet; t – Triplet; t_p – Pseudo-Triplet (zum Triplet zusammengefallenes Dublett vom Dublett); tdd – Triplet vom Dublett vom Dublett; q – Quartett; q_p – Pseudoquartett (zum Quartett zusammengefallenes Dublett vom Dublett vom Dublett); m – Multiplet; m_c – zentriertes Multiplet. Verbreiterte Signale werden mit dem Index „b“ angezeigt.

„Pseudomultiplizitäten“ kommen dann zustande, wenn ein Proton zu zwei bzw. drei chemisch sowie magnetisch nicht äquivalenten Kernen Kopplungen sehr ähnlicher Größe aufweist. Die ermittelte Kopplungskonstante kann nur als Näherung angesehen werden und wird demnach auch entsprechend aufgeführt („≈“). Beim jeweiligen Vergleich der Kopplungskonstanten des dazugehörenden zweiten Kerns lässt sich teilweise eine leichte Abweichung feststellen. Solche Differenzen lassen sich durch die nicht immer perfekte symmetrische Form der Peaks erklären. Die Abweichungen von der Symmetrie treten insbesondere bei zusammenfallenden und überlagerten Signalen in Erscheinung und führen zu geringfügig verfälschten Werten der zugehörigen Kopplungskonstanten. Die geringen Unterschiede sind auf der begrenzten digitalen Auflösung des Spektrometers zurückzuführen. Wurde die Lage eines Protons in einem Multiplet durch Analyse des Aufspaltungsmusters oder zweidimensionale Experimente ermittelt, dann werden die entsprechende chemische Verschiebung, sofern erkennbar, die Multiplizität des Signals sowie gegebenenfalls die entsprechende(n) Kopplungskonstante(n) hinter der jeweiligen Zuordnung in geschweiften Klammern { } angegeben. Konnte die Lage eines Protons oder eines Kohlenstoffs nicht durch zweidimensionale Experimente ermittelt werden, so wurden die entsprechenden Protonen mit

geschweiften Klammern und Stern versehen { * }, Kohlenstoffe mit einem Stern. Werte, die mit einer Unsicherheit behaftet sind, wurden mit zwei Sternen versehen.

Folgende Abkürzungen wurden zur Kennzeichnung der verschiedenen Bausteine im ^1H - und ^{13}C -Spektrum benutzt:

GalN	D-Galactosamin
Gal'	D-Galactose (an D-Galactosamin geknüpft)
GlcN	D-Glucosamin
Sia	Sialinsäure; <i>N</i> -Acetyl-D-neuraminsäure
Ser	L-Serin
Thr	L-Threonin
Spa	Diethylenglycolspacer/Triethylenglycolspacer

Die Bezeichnung der übrigen Aminosäure-Bausteine sowie die Bezeichnung der ^1H - und ^{13}C Signale folgen der IUPAC-Empfehlung von 1983.^[425] Gleiche Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz erhalten eine willkürliche Nummerierung. Diese dient der Kennzeichnung und der Zugehörigkeit der einzelnen Signale zu einem Aminosäurerest, gibt jedoch nicht dessen Position im (Glyco-)Peptid wieder. Diese lässt sich anhand der aufgenommenen NMR-Spektren nicht ermitteln.

Massenspektrometrie:

ESI-Massenspektren wurden jeweils mit einem der beiden folgenden Spektrometer gemessen:

Gerät 1: Navigator-Instrument der Firma *ThermoElectron*, Boston (USA) bei Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel, einer Probenkonzentration von 0.1 mg/ml, einer Flussrate von 0.75 ml/min, einer Cone-Voltage von 70 V, 45 V oder 35 V und einem N_2 -Strom von 300 l/h.

Gerät 2: Micromass-Q-TOF-Ultima-3-Spektrometer der Firma *Waters*, Milford (USA) bei Verwendung von Acetonitril und/oder Wasser als Lösungsmittel (evtl. Zusatz von 0.1 % TFA), einer Probenkonzentration von 0.1 mg/ml, einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ und einer Cone-Voltage von 70 V.

Die Messung hochaufgelöster ESI-Massenspektren (HR-ESI-MS) erfolgte mit dem *Waters*-Gerät, wobei zur Kalibrierung eine Lösung von 400 mg Natriumiodid und 10 mg Cäsiumiodid in 400 ml eines Wasser-Isopropanol-Gemisches (V:V = 1:1) eingesetzt wurde. Die Genauigkeit der Messung wird vom Gerätehersteller mit mindestens 5 ppm (Quotienten aus

dem Differenzbetrag von gemessener und berechneter Molekülmasse und der berechneten Masse) angegeben. Die in dieser Arbeit angegebenen Massen beziehen sich auf Neutramoleküle, auch wenn die kationische oder anionische Form angegeben ist. Bei der Kalibrierung des Gerätes wird die Masse des Elektrons von 0.000549 u mitberücksichtigt. Die in runden Klammern vermerkten Molmassen berücksichtigen die natürliche Isotopenverteilung. Die bei den Massenspektren angegebenen Molekülmassen hingegen stützen sich auf die Massen der reinen Isotope ^1H , ^{12}C , ^{35}Cl , ^{19}F , ^{39}K , ^{14}N , ^{23}Na , ^{16}O und ^{32}S . Die zu erwartende Isotopenverteilung der Verbindungen konnte in den Massenspektren wiedergefunden werden. Zur Vereinfachung wird in der Regel nur der erste Isotopenpeak angegeben.

MALDI-TOF Massenspektren wurden mit einem Axima-CFR Gerät der Firma *Shimadzu Group Company* (UK) aufgenommen. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet. Die angegebenen Messwerte geben den Schwerpunkt aller Isotopenpeaks an.

(Glyco-)Peptid-Festphasensynthesen:

Die Festphasensynthese der (Glyco-)Peptide erfolgte an einem ABI-433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems*, Foster City (USA; in Deutschland: Weiterstadt). Zur Verfolgung der Fmoc-Abspaltung kam dabei ein Series-200-UV/VIS-Detektor der Firma *PerkinElmer*, Wellesley (USA) zum Einsatz. Die in allen Fällen verwendeten polymeren Träger wurden von der Firma *Rapp Polymere*, Tübingen (Deutschland) bezogen, während die eingesetzten Fmoc-geschützten Aminosäuren sowie die Kupplungsreagenzien von den Firmen *Novabiochem*, Läfelfingen (Schweiz), *ORPEGEN Peptide Chemicals*, Heidelberg (Deutschland) bezogen wurden. *N*-Methylpyrrolidin-2-on wurde von der Firma *SDS*, Peypin (Frankreich) erworben.

Analytische RP-HPLC:

Die Analyse und Auftrennung von Substanzgemischen erfolgte mittels eines HPLC-Systems der Firma *Knauer*, Berlin (Deutschland). Dabei kamen drei HPLC-Anlagen zum Einsatz. Vor dem Gebrauch wurden die Lösungsmittel etwa 20 min im Ultraschallbad entgast.

Gerät 1: Die HPLC-Anlage bestand aus einer MaxiStar-K1000-Gradientenpumpe, einem Vierkanal-Entgaser, einer analytischen Mischkammer sowie einem Diodenarraydetektor DAD2062 der Firma *Knauer*, Berlin (Deutschland). Die Probenschleife wies eine maximale Füllkapazität von 20 μl auf. Die Steuerung der HPLC-Anlage und die Auswertung der HPLC-Chromatogramme erfolgten rechnergestützt mittels der Software ChromGate[®] in der Version 2.55. Als Eluent für Reversed-Phase-Trennungen kam ein Gemisch aus Acetonitril in HPLC-

Qualität der Firma *VWR International*, West Chester (USA) und Wasser, welches einem Simplicity-185-Wasseraufbereitungssystem der Firma *Millipore*, Billerica (USA) entnommen wurde, zum Einsatz. Bei Bedarf wurden die Eluenten mit 0.1 % TFA versetzt. Die Flussraten lagen bei analytischen Messungen bei 1.00 ml/min. Die Detektion erfolgte durch UV/VIS-Absorption über einen Wellenlängenbereich von 200 nm bis 500 nm.

Folgende Säule der Firma *Phenomenex*, Torrance (USA; in Deutschland: Aschaffenburg) kam für analytische Trennungen zum Einsatz:

Luna-1: 5 μ C18 (2), 250 x 4.60 mm

Analytische-Gradienten

Gradient Ana-1

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	90	10	0.1
40	0	100	0.1
60	0	100	0.1

Gradient Ana-2

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	70	30	0.1
30	0	100	0.1
60	0	100	0.1

Gradient Ana-3

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	45	55	0
60	20	80	0
80	0	100	0

Gradient Ana-4

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	70	30	0.1
40	0	100	0.1
60	0	100	0.1

Gradient Ana-5

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
25	40	60	0.1
40	0	100	0.1

Gradient Ana-6

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	90	10	0.1
90	30	70	0.1
120	0	100	0.1

Gradient Ana-7

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
60	40	60	0.1
80	0	100	0.1

Gradient Ana-8

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
45	40	60	0.1
65	0	100	0.1

Gradient Ana-9

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
30	30	70	0.1
40	0	100	0.1

Gradient Ana-10

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
30	70	30	0.1
40	0	100	0.1

Gradient Ana-11

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
30	40	60	0.1
40	0	100	0.1

Gradient Ana-12

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	90	10	0.1
60	50	50	0.1
80	0	100	0.1

Semi- und präparative RP-HPLC

Gerät 2: Trennungen im semi- und präparativen Maßstab erfolgten teilweise am Gerät 2. Die HPLC-Anlage bestand aus zwei MiniStar-K500-Gradientenpumpen in Verbindung mit einer präparativen Mischkammer sowie einem variablen Wellenlängendetektor der Firma *Knauer*, Berlin (Deutschland). Die Flussrate bei präparativen Trennungen betrug 20 ml/min bzw. 10 ml/min bei semipräparativen Anwendungen. Die Detektion erfolgte durch UV/VIS-Absorption bei einer Wellenlänge von 214 nm. Die Eluenten, die Steuerung der HPLC-Anlage und die Auswertung waren so wie bei der analytischen RP-HPLC angegeben.

Bei den durchgeführten semi- und präparativen Trennungen kam jeweils eine der folgenden Säulen der Firma *Phenomenex*, Torrance (USA; in Deutschland: Aschaffenburg) zum Einsatz:

Luna-1: Luna 10 μ C18 (2), 250 x 50.00 mm, Flussrate: 20 ml/min

Luna-2: Luna 10 μ C18 (2), 250 x 50.00 mm, Flussrate: 10 ml/min

Präparative-Gradienten**Gradient Präp-1**

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	90	10	0.1
40	0	100	0.1
60	0	100	0.1

Gradient Präp-2

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	55	45	0.1
50	0	100	0.1
90	0	100	0.1

Gradient Präp-3

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	90	10	0.1
60	0	100	0.1
90	0	100	0.1

Gradient Präp-4

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	45	55	0
60	20	80	0
100	0	100	0

Gradient Präp-5

Zeit / min	H ₂ O / %	MeOH / %	TFA / %
0	55	45	0.1
50	0	100	0.1
90	0	100	0.1

Gradient Präp-6

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	90	10	0.1
60	50	50	0.1
90	0	100	0.1

Semipräparative-Gradienten**Gradient Semipräp-1**

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
60	40	60	0.1
80	0	100	0.1

Gradient Semipräp-2

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	90	10	0.1
120	30	70	0.1
140	0	100	0.1

Gradient Semipräp-3

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
60	45	55	0.1
80	0	100	0.1

Gradient Semipräp-4

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
80	40	60	0.1
100	0	100	0.1

Gradient Semipräp-5

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
40	30	70	0.1
60	0	100	0.1

Gradient Semipräp-6

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
40	45	55	0.1
60	0	100	0.1

Gradient Semipräp-7

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
30	55	45	0.1
40	0	100	0.1

Gradient Semipräp-8

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
50	45	55	0.1
60	0	100	0.1

Gradient Semipräp-9

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
80	40	60	0.1
120	0	100	0.1

Analytische und semipräparative RP-HPLC

Gerät 3: Die HPLC-Anlage der Firma *Knauer*, Berlin (Deutschland) bestand aus zwei HPLC-Pumpen des Typs Smartline 1000. Zur Entgasung der Lösungsmittel wurde ein 2-Kanal-Online-Degasser mit einem Totvolumen von 7.7 ml pro Kanal eingesetzt. Die Durchmischung der eingesetzten Lösungsmittel erfolgte in einem dynamischen Mischer mit einem internen Volumen von 5.9 ml. Für die Detektion kamen ein UV/VIS-Detektor vom Typ Smartline 2500 und ein RI-Detektor des Typs Smartline 2400 zum Einsatz. Die Probenschleife wies eine maximale Füllkapazität von 2000 µl auf, wobei für analytische Messungen 20 µl an Probe injiziert wurden. Die Steuerung der HPLC-Anlage und die Auswertung der HPLC-Chromatogramme erfolgten rechnergestützt mittels der Software ChromGate® in der Version 3.1.7. Als Eluent für Reversed-Phase-Trennungen kam ein Gemisch aus Acetonitril in HPLC-Qualität der Firma *VWR International*, West Chester (USA) und Wasser, welches aus dem Simplicity-185-Wasseraufbereitungssystem entnommen wurde, zum Einsatz. Bei Bedarf wurden die Eluenten mit 0.1 % TFA versetzt. Die Flussraten lagen bei analytischen Messungen bei 1.00 ml/min und bei semipräparativen Trennungen bei 10.00 ml/min. Die Detektion bei analytischen und semipräparativen Trennungen erfolgte durch UV/VIS-Absorption bei einer Wellenlänge von 214 nm. Für analytische und semipräparative Trennungen wurden die folgenden HPLC-Säulen eingesetzt:

Säule	A1 (analytisch)	A2 (analytisch)	SP1 (semipräparativ)	SP2 (semipräparativ)
Hersteller	MZ-Analytik, Mainz (Deutschland)	Teknokroma Europa Protein 300-Säule	Phenomenex, Torrance (USA)	Teknokroma Europa Protein 300-Säule
Dimension	250 mm x 4.0 mm	250 mm x 4.6 mm	250 mm x 30.0 mm	250 mm x 21.2 mm
Säulenmaterial	MZ-Gel SD-Plus, RP-C ₁₈ , 5 µm	RP-C ₄ , 300 Å, 5 µm	Luna RP-C ₁₈ (2), 100 Å, Axia, 10 µm	RP-C ₄ , 300 Å, 5 µm
Flussrate	1.00 ml/min	1.00 ml/min	10.00 ml/min	10.00 ml/min

Analytische-Gradienten**Gradient A-1**

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
40	40	60	0.1
60	0	100	0.1

Gradient A-2

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
40	0	100	0.1
60	0	100	0.1

Gradient A-3

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	50	50	0.1
40	0	100	0.1
60	0	100	0.1

Gradient A-4

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	50	50	0.1
20	0	100	0.1
60	0	100	0.1

Semipräparative-Gradienten**Gradient SP-1**

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
60	40	60	0.1
80	0	100	0.1

Gradient SP-2

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
60	0	100	0.1
80	0	100	0.1

Gradient SP-3

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
90	0	100	0.1
120	0	100	0.1

Gradient SP-4

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
60	50	50	0.1
90	0	100	0.1

Gradient SP-5

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	50	50	0.1
20	0	100	0.1
60	0	100	0.1

Gradient SP-6

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	95	5	0.1
40	0	100	0.1
60	0	100	0.1

Gradient SP-7

Zeit / min	H ₂ O / %	MeCN / %	TFA / %
0	50	50	0.1
40	0	100	0.1
60	0	100	0.1

Tetanus-Toxoid

Tetanus-Toxoid wurde von der Firma *CLS Behring*, Marburg (Deutschland), bezogen und in Natriumchlorid-Puffer (17 mg TTox/ml) ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ultrafiltration

Die Ultrafiltration erfolgte in einer Stirred Ultrafiltration Cell der Firma *Millipore Corporation*, Bedford (USA). Ultrafiltrationen wurden mit Membranen aus Polyethersulfonen der Durchlässigkeit 30 kDa durchgeführt.

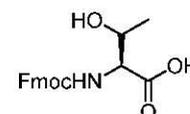
5.2 Die Synthesen der geschützten Aminosäuren

5.2.1 Die Synthesen des geschützten Threonins

Synthese zum *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*L*-threonin (2)^[90]

(Fmoc-Thr-OH)



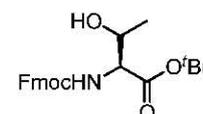
Zu einer Mischung aus Aceton (225 ml) und Wasser (225 ml) werden 20.00 g (167.90 mmol) *L*-Threonin (1) und 14.11 g (167.90 mmol, 1.00 Äquiv.) Natriumhydrogencarbonat suspendiert und unter Rühren mit 56.60 g (167.90 mmol, 1.00 Äquiv.) Fluoren-9-ylmethylsuccinimidylcarbonat versetzt. Es wird 18 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit konz. Salzsäure auf einen pH-Wert von 2.0 eingestellt. Das Aceton wird i. Vak. evaporiert und das Produkt wird viermal mit 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird zweimal mit 150 ml 1 M Salzsäure und 250 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Man trocknet das Rohprodukt i. Hochvak. und setzt es ohne weitere Reinigung und Charakterisierung in die nachfolgende Reaktion ein.

Ausbeute: 57.30 g (167.86 mmol, quant.), Lit.:^[90] 95 %; schwach gelblicher, amorpher Feststoff, $R_f = 0.70$ (EtOAc/AcOH, 10:1).

$C_{19}H_{19}NO_5$ (341.36)

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (3)^[85, 93, 426]

(Fmoc-Thr-O^tBu)



Eine Mischung aus 122.00 g (591.50 mmol, 3.52 Äquiv.) *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid, 55.14 g (744.20 mmol, 4.43 Äquiv.) *tert*-Butanol und 1.95 g (19.70 mmol, 0.12 Äquiv.) wasserfreiem Kupfer(I)-chlorid wird unter Lichtausschluss und unter Argon 3 d bei Raumtemp. gerührt. Die dunkelgrüne Reaktionsmischung wird mit 150 ml absol. Dichlormethan verdünnt und auf 10 °C gekühlt. Es wird innerhalb von 60 min eine Lösung von 57.28 g (167.80 mmol) Fmoc-Thr-OH (2) in 200 ml absol. Dichlormethan zugetropft, wobei mittels Wasserbad die Reaktionstemperatur zwischen 18 – 20 °C gehalten wird (doppeltgeschütztes Produkt entsteht ab 20 °C). Die Reaktionsmischung wird weitere 6 h bei 19 °C unter Argon gerührt und anschließend mit einer Mischung aus *tert*-Butanol und Wasser (1:1, 100 ml) gequenchet. Der ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert und mehrmals mit eiskaltem Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt, sodass weiterer

Harnstoff durch Filtration abgetrennt werden kann. Die Lösung wird dreimal mit 100 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vak. entfernt. Der Rückstand wird in wenig Ethylacetat gelöst und einige Stunden bei $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt, wobei weiterer Harnstoff ausfällt. Nach Filtration wird das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und das Rohprodukt (68.20 g) durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 40.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 4:1 \rightarrow 2:1). Sollte eine Umkristallisation nötig sein, so wird Diethylether/Petrolether verwendet.

Ausbeute: 60.73 g (152.80 mmol, 91 % bezogen auf **1**), Lit.:^[426] 77 % bezogen auf **1**; farbloser, kristalliner Feststoff, Schmp.: $73\text{ }^{\circ}\text{C}$, Lit.:^[426] $72 - 74\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -10.3$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[426] $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -10.00$ ($c = 1.05$, CHCl_3), $R_f = 0.33$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 7.76$ (d, 2H, $^3J_{\text{H4,H3}} = ^3J_{\text{H5,H6}} = 6.9$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $^3J_{\text{H1,H2}} = ^3J_{\text{H8,H7}} = 7.3$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), $7.40 - 7.25$ (m, 4H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc), 5.61 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 8.9$ Hz, NH-Thr), 4.41 (d, 2H, $^3J_{\text{CH}_2,\text{H9}} = 7.1$ Hz, CH_2 -Fmoc), $4.36 - 4.14$ (m, 3H, H9-Fmoc, Thr $^{\alpha}$, Thr $^{\beta}$), 2.11 (s_b, 1H, OH), 1.49 (s, 9H, CH_3 -^tBu), 1.24 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}\gamma,\text{Thr}\beta} = 6.1$ Hz, Thr $^{\gamma}$).

75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 170.34$ (C=O-Thr), 156.84 (C=O-Fmoc), 144.00 , 143.88 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.41 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.82 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.18 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.23 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.08 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 82.73 (C-^tBu), 68.39 (Thr $^{\beta}$), 67.29 (CH_2 -Fmoc), 59.72 (Thr $^{\alpha}$), 47.29 (C9-Fmoc), 28.14 (CH_3 -^tBu), 20.04 (Thr $^{\gamma}$).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 420.23$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 420.18).

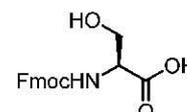
$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ (397.46)

5.2.2 Die Synthesen des geschützten Serins

Synthese zum *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-serin-*tert*-butylester

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-serin (**5**)^[90]

(Fmoc-Ser-OH)



Die Reaktion wird gemäß der Vorschrift zur Synthese von *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-threonin (**2**) durchgeführt.

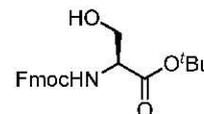
Eingesetzte Mengen: 20.00 g (190.04 mmol) L-Serin (**4**), 15.99 g (190.04 mmol, 1.00 Äquiv.) Natriumhydrogencarbonat, 64.20 g (190.04 mmol, 1.00 Äquiv.) Fluoren-9-ylmethylsuccinimidylcarbonat. Umkristallisation in Cyclohexan/Dichlormethan.

Ausbeute: 62.28 g (190.04 mmol, quant.), Lit.:^[90] 89 %; farbloser Feststoff, $R_f = 0.65$ (EtOAc/AcOH, 10:1).

$C_{18}H_{17}NO_5$ (327.33)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-serin-*tert*-butylester (6)^[154]**

(Fmoc-Ser-O^{*t*}Bu)



Die Reaktion wird gemäß der Vorschrift zur Synthese von *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**3**) durchgeführt.

Eingesetzte Mengen: 62.00 g (189.54 mmol) Fmoc-Ser-OH (**5**), 62.20 g (839.41 mmol, 4.43 Äquiv.) *tert*-Butanol, 138.00 g (669.25 mmol, 3.53 Äquiv.) *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 2.19 g (22.16 mmol, 0.12 Äquiv.) Kupfer(I)-chlorid. Das Fmoc-Ser-OH (**5**) wird in 300 ml einer Mischung aus Dichlormethan und *tert*-Butanol (3:1) zugetropft (geringere Löslichkeit bedingt durch das Edukt selbst als auch durch das Umkristallisieren). Das Rohprodukt (76.3 g) wird in zwei Portionen durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 40.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 4:1 → 2:1). Sollte eine Umkristallisation nötig sein, so wird aus Diethylether/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 61.69 g (161.0 mmol, 85 % bezogen auf **4**), Lit.:^[154] 75 % bezogen auf **4**; farbloser, kristalliner Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = + 5.9$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$), $R_f = 0.36$ (^cHex/Aceton, 2:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.77$ (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.7$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.44 – 7.37 (m, 2H, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.37 – 7.25 (m, 2H, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.71 (d, 1H, $^3J_{NH,Thr\alpha} = 7.3$ Hz, NH-Ser), 4.42 (d, 2H, $^3J_{CH_2,H9} = 6.9$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.33 (m_c, 1H, Ser^{*α*}), 4.23 (t, 1H, $^3J_{H9,CH_2} = 6.9$ Hz, H9-Fmoc), 3.94 (d, 2H, $^3J_{H\beta,H\alpha} = 3.7$ Hz, Ser^{*β*}), 2.23 (s_b, 1H, OH), 1.49 (s, 9H, CH₃-^{*t*}Bu).

75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 169.58$ (C=O-Ser), 156.43 (C=O-Fmoc), 143.99, 143.87 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.49, 141.45 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.87 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.24, 127.21 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.26, 125.21 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.16 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 83.09 (C-^{*t*}Bu), 67.30 (CH₂-Fmoc), 63.92 (Ser^{*β*}), 56.77 (Ser^{*α*}), 47.32 (C9-Fmoc), 28.14 (CH₃-^{*t*}Bu).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 406.16$ ($[M+Na]^+$, ber.: 406.16).

$C_{22}H_{25}NO_5$ (383.44)

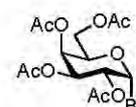
5.3 Die Synthese der Galactosydonoren

5.3.1 Die Synthese des peracetylierten Galactosylbromids

Die Synthese zum 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid (8)^[95, 138]

(α -Ac₄Gal-Br)



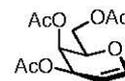
Zu einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus 540 ml Acetanhydrid und 3.6 ml 70%iger Perchlorsäure werden 150.00 g (832.87 mmol) D-Galactose (7) in kleinen Portionen hinzugegeben, sodass die Temperatur 15 °C nicht überschreitet. Nach beendeter Zugabe wird die Reaktionslösung 15 h bei Raumtemp. gerührt. Danach wird die Mischung auf 10 °C abgekühlt und 122 ml (1.30 mol, 1.56 Äquiv.) Phosphortribromid werden innerhalb von 15 min hinzugegeben. Es erfolgt anschließend die langsame Zugabe von 54 ml Wasser. Die Reaktionsmischung wird 4 h bei einer Temperatur zwischen 18 – 20 °C gehalten. Nach dem Verdünnen mit 500 ml eiskaltem Chloroform werden vorsichtig 300 ml Eiswasser zugegeben, die wässrige Phase abgetrennt und die organische Phase nochmal mit 300 ml Eiswasser gewaschen. Die organische Phase wird fünfmal zügig mit 150 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 150 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wird aus Cyclohexan/Ethylacetat umkristallisiert und das Produkt als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 328.84 g (799.71 mmol, 96 % bezogen auf D-Galactose); farbloser, kristalliner Feststoff, $R_f = 0.55$ (Toluol/EtOAc, 3:2), $R_f = 0.39$ (PE/EtOAc, 1:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 6.67 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 4.0$ Hz, H1), 5.52 – 5.46 (m, 1H, H4), 5.38 (dd, 1H, $^3J_{H3,H2} = 10.6$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 3.3$ Hz, H3), 5.02 (dd, 1H, $^3J_{H2,H3} = 10.6$ Hz, $^3J_{H2,H1} = 4.0$ Hz, H2), 4.46 (t, 1H, $^3J_{H5,H6ab} = 6.5$ Hz, H5), 4.16 (dd, 1H, $^3J_{H6a,H5} = 6.3$ Hz, $^2J_{H6a,H6b} = 11.4$ Hz, H6_a), 4.08 (dd, 1H, $^3J_{H6b,H5} = 7.0$ Hz, $^2J_{H6b,H6a} = 11.4$ Hz, H6_b), 2.13, 2.09, 2.04, 1.99 (4 x s, 12H, 4 x CH₃-Ac).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 331.02 ([M-Br]⁺, ber.: 331.10).

C₁₄H₁₉BrO₉ (411.20)

3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (9)^[95-96](Ac₃Galactal)

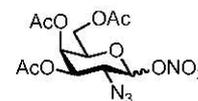
239.00 g (3.65 mol, 4.99 Äquiv.) Zinkstaub werden in 1 N Salzsäure 3 min suspendiert, mit dest. Wasser gewaschen und mit Ethanol und Diethylether getrocknet. Der aktivierte Zinkstaub wird in 700 ml Ethylacetat suspendiert (KPG-Rührer), mit 58.0 ml (59.90 g, 730.04 mmol) 1-Methylimidazol versetzt und zum Sieden erhitzt. Anschließend wird eine Lösung von 300.00 g (731.67 mmol) α -Ac₄Gal-Br (8) in 400 ml Ethylacetat unter kräftigem Rühren innerhalb von 3 h zugetropft. Die Reaktionsmischung wird weitere 2 h zum Sieden erhitzt, nach dem Abkühlen über Hyflo[®] filtriert und mehrmals mit Ethylacetat gewaschen. Das Filtrat wird mit 500 ml 2 M Salzsäure und zweimal mit 350 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Der Rückstand wird i. Hochvak. getrocknet, gefolgt von einer Vakuumdestillation (ohne Kolonne, nur mit Saugvorstoß), wobei der Kolben in ein auf 200 °C vorgeheiztes Ölbad getaucht wird. Es wird ein leicht gelbliches, hochviskoses Öl isoliert, das beim Lagern im Kühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute: 171.73 g (631.15 mmol, 86 %); farbloser, kristalliner Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = -17.4$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.^[427] $[\alpha]_D^{23} = -16.9$ ($c = 1.10$, CHCl₃), $R_f = 0.39$ (°Hex/EtOAc, 2:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 6.46$ (dd, 1H, ³ $J_{H1,H2} = 6.3$ Hz, ⁴ $J_{H1,H3} = 1.8$ Hz, H1), 5.54 (m_c, 1H, H3), 5.42 (dt, 1H, ⁴ $J_{H4,H2} \approx$ ³ $J_{H4,H5} \approx 1.6$ Hz, ³ $J_{H4,H3} = 4.7$ Hz, H4), 4.73 (ddd, 1H, ³ $J_{H2,H1} = 6.3$ Hz, ³ $J_{H2,H3} = 2.7$ Hz, ⁴ $J_{H2,H4} = 1.5$ Hz, H2), 4.31 (m_c, 1H, H5), 4.28 – 4.17 (m, 2H, H6_a, H6_b), 2.13, 2.09, 2.03 (3 x s, 9H, CH₃-Ac).

75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 170.63, 170.35, 170.21$ (C=O-Ac), 145.51 (C1), 98.95 (C2), 72.91 (C5), 63.99 (C3), 63.86 (C4), 62.01 (C6), 20.89, 20.83, 20.73 (CH₃-Ac).

C₁₂H₁₆O₇ (272.25)

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α,β -D-galactopyranosylnitrat (10)^[97](α,β -Ac₃GalN₃-ONO₂)

Zu einer auf –28 °C gekühlten Lösung von 32.50 g (119.45 mmol) Ac₃Galactal (9) in 560 ml absol. Acetonitril werden unter Rühren 205.00 g (374.16 mmol, 3.13 Äquiv.) trockenes Cer(IV)-ammoniumnitrat und 12.30 g (189.23 mmol, 1.59 Äquiv.) trockenes Natriumazid im Argongegenstrom zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei –28 °C unter Argon gerührt. Anschließend wird die intensiv gelbe Reaktionsmischung mit 600 ml eiskaltem Diethylether verdünnt und unter Eiskühlung mit 250 ml Eiswasser versetzt. Man trennt die Phasen, wäscht die organische dreimal mit 300 ml Eiswasser, überprüft den pH-Wert mit

Neutralit[®], trocknet über Magnesiumsulfat und entfernt die Lösungsmittel i. Vakuum. Der Rückstand (44.52 g) wird durch zügige Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt, wobei das Produkt als Anomerengemisch erhalten wird (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 2:1). Es erfolgt zusätzlich eine Anomerentrennung durch fraktionierte Kristallisation in Cyclohexan/Ethylacetat bei 0 °C.

Ausbeute: 26.18 g (69.6 mmol, 58 %); bei fraktionierter Kristallisation Gemisch aus farblosem kristallinem Feststoff und hochviskosem Öl, $R_f = 0.39$ (^cHex/EtOAc, 2:1).

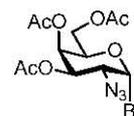
300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = α -Anomer 6.34 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 4.3$ Hz, H1-GalN ^{α}), 5.50 (dd, 1H, $^3J_{H4,H3} \approx 3.2$ Hz, $^3J_{H4,H5} = 1.4$ Hz, H4-GalN ^{α}), 5.25 (dd, 1H, $^3J_{H3,H2} = 11.3$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 3.2$ Hz, H3-GalN ^{α}), 4.36 (td, 1H, $^3J_{H5,H6ab} \approx 6.5$ Hz, H5-GalN ^{α}), 4.21 – 4.04 (m, 3H, H2-GlcN ^{α} {4.16}, H6_{ab}-GalN ^{α} {4.10}), 2.17, 2.07, 2.03 (3 x s, 9H, CH₃-Ac).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 399.01 ([M+Na]⁺, ber.: 399.08).

C₁₂H₁₆N₄O₁₀ (376.28)

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (11)^[97]

(α -Ac₃GalN₃-Br)



Zu einer gut gerührten Suspension von 34.00 g (391.50 mmol, 5.77 Äquiv.) trockenem Lithiumbromid in 250 ml absol. Acetonitril werden bei 0 °C 25.52 g (67.86 mmol) α,β -Ac₃GalN₃-ONO₂ (**10**), gelöst in 100 ml absol. Acetonitril, gegeben. Die Reaktionsmischung wird anschließend 15 h bei Raumtemp. unter Argon gerührt und danach mit 350 ml Dichlormethan verdünnt. Überschüssiges Lithiumbromid wird abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird zweimal mit jeweils 100 ml Eiswasser gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Das resultierende gelbe Öl (26.69 g) wird durch zügige Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 18.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 24.60 g (62.4 mmol, 92 %); farbloses, hochviskoses Öl, $R_f = 0.72$ (Toluol/EtOAc, 3:2), $R_f = 0.44$ (^cHex/EtOAc, 2:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 6.48 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, H1-GalN), 5.52 (dd, 1H, $^3J_{H4,H3} = 2.9$ Hz, H4-GalN), 5.36 (dd, 1H, $^3J_{H3,H2} = 10.7$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 2.9$ Hz, H3-GalN), 4.49 (td, 1H, $^3J_{H5,H6ab} \approx 6.6$ Hz, H5-GalN), 4.19 (dd, 1H, $^3J_{H6a,H5} = 6.6$ Hz, $^2J_{H6a,H6b} = 11.4$ Hz, H6_a-GalN), 4.11 (dd, 1H, $^3J_{H6b,H5} = 6.6$ Hz, $^2J_{H6b,H6a} = 11.4$ Hz, H6_b-GalN), 4.00 (dd, 1H, $^3J_{H2,H3} = 10.7$ Hz, $^3J_{H2,H1} = 3.7$ Hz, H2-GalN), 2.08, 2.07, 2.02 (3 x s, 9H, CH₃-Ac).

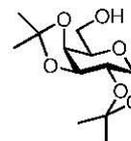
C₁₂H₁₆BrN₃O₇ (394.18)

5.3.2 Die Synthese des Galactosylbromid-Bausteins

Die Synthese zum 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosylbromid

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**32**)^[128]

(α -1,2:3,4-^{*i*}Prn-Gal)



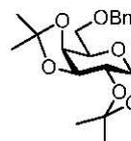
80.00 g (444.30 mmol) D-Galactose (**7**) und 179.00 g (1.12 mol) wasserfreies Kupfer(II)-sulfat werden in 1.35 l Aceton suspendiert und mit 10.5 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wird 12 h bei Raumtemp. gerührt (vollständiger Umsatz dünnschichtchromatographisch überprüft) und dann über Hyflo[®] abfiltriert. Das Kupfersulfat wird gründlich mit Aceton nachgewaschen, das Filtrat mit Calciumhydroxid neutralisiert und über einer dünnen Schicht Hyflo[®] filtriert. Das Aceton wird i. Vak. evaporiert und der Rückstand i. Hochvak. getrocknet und ohne Reinigung und Charakterisierung weiter umgesetzt.

Rohausbeute: 102.56 g (394.04 mmol, 89 %); gelbes, hochviskoses Öl, $R_f = 0.33$ (^{*c*}Hex/EtOAc, 1:2).

$C_{12}H_{20}O_6$ (260.28)

6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**33**)^[132]

(α -6-Bn-1,2:3,4-^{*i*}Prn-Gal)



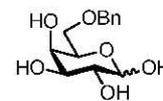
Eine auf 0 °C abgekühlte Lösung aus 90.00 g (345.98 mmol) rohem α -1,2:3,4-^{*i*}Prn-Gal (**32**) in 500 ml *N,N*-Dimethylformamid wird unter Argon portionsweise mit 20.70 g (517.50 mmol, 1.50 Äquiv.) einer 60%igen Dispersion von Natriumhydrid in Mineralöl versetzt. Man entfernt die Kühlung und rührt den Ansatz 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Reaktionsmischung erneut auf 0 °C gekühlt und eine Lösung von 61.6 ml (88.70 g, 518.61 mmol, 1.50 Äquiv.) Benzylbromid in 100 ml *N,N*-Dimethylformamid zugetropft. Die Mischung wird auf Raumtemp. erwärmt und 15 h gerührt. Nach Zugabe von 20 ml Methanol wird das Lösungsmittel i. Hochvak. entfernt und der Rückstand dreimal mit 80 ml Toluol kodestilliert, in 600 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 100 ml Wasser versetzt. Man schüttelt aus, trennt die organische Phase ab, wäscht diese zwei weitere Male mit 100 ml Wasser und trocknet sie über Magnesiumsulfat. Das Lösungsmittel wird i. Vak. evaporiert und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 50.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch ^{*c*}Hex/EtOAc, 20:1 \rightarrow 10:1) gereinigt. Das erhaltene Produkt wird ohne weitere Charakterisierung zur Verbindung **34** umgesetzt.

Ausbeute: 93.16 g (266.04 mmol, 77 %, leicht verunreinigt); gelbes Öl, $R_f = 0.56$ (°Hex/EtOAc, 5:1).

$C_{19}H_{26}O_6$ (350.41)

6-*O*-Benzyl- α,β -D-galactopyranose (**34**)^[132]

(α,β -6-Bn-Gal)



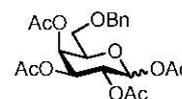
Eine Lösung von 90.00 g (257.02 mmol) α -6-Bn-1,2:3,4-*i*-Prn-Gal (**33**) in 500 ml Eisessig und 125 ml Wasser wird 4 h bei einer Temperatur von 90 °C gerührt. Anschließend wird das Essigsäure-Wasser-Gemisch i. Hochvak. entfernt und der Rückstand mit Toluol kodestilliert, um restliche Spuren an Essigsäure zu entfernen. Das resultierende Rohprodukt wird in heißem Methanol gelöst, mit Diethylether gefällt und i. Vak. getrocknet. Es ist für die nachfolgende Reaktion ausreichend rein und wird ohne weitere Reinigung und Charakterisierung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 58.38 g (216.13 mmol, 84 %); farbloser Feststoff, $R_f = 0.17$ (EtOAc/EtOH, 10:1).

$C_{13}H_{18}O_6$ (270.28)

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α,β -D-galactopyranose (**35**)^[132]

(α,β -6-Bn-Ac₃Gal-OAc)



58.00 g (214.73 mmol) α,β -6-Bn-Gal (**34**) wird in 540 ml Pyridin gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend werden 270 ml Essigsäureanhydrid zugetropft, die Kühlung entfernt und der Ansatz 16 h bei Raumtemp. gerührt. Danach werden Pyridin sowie überschüssiges Essigsäureanhydrid i. Hochvak. entfernt. Der Rückstand wird fünfmal mit 80 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 50.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch °Hex/EtOAc, 3:1) gereinigt, wobei ein Anomerengemisch erhalten wird ($\alpha:\beta = 2:3$, mittels NMR-Spektroskopie bestimmt).

Ausbeute: 78.64 g (179.48 mmol, 97 %); gelbes Öl, R_f^{α} -Anomer = 0.48 (°Hex/EtOAc, 1:1), R_f^{β} -Anomer = 0.44 (°Hex/EtOAc, 1:1), R_f^{α} -Anomer = 0.27 (°Hex/EtOAc, 3:1).

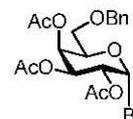
300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.39 – 7.22 (m, 10H, H_{Ar}-Ph), 6.36 (d, 1H, ³ $J_{H1,H2} = 2.8$ Hz, H1-Gal ^{α}), 5.69 (d, 1H, ³ $J_{H1,H2} = 8.3$ Hz, H1-Gal ^{β}), 5.57 (s_b, 1H, H4-Gal ^{α}), 5.51 (dd, 1H, ³ $J_{H4,H3} = 3.3$ Hz, H4-Gal ^{β}), 5.35 – 5.27 (m, 3H, H2-Gal ^{α} , H2-Gal ^{β} , H3-Gal ^{α}), 5.07 (dd, 1H, ³ $J_{H3,H2} = 10.4$ Hz, ³ $J_{H3,H4} = 3.4$ Hz, H3-Gal ^{β}), 4.54 (d, 2H, ² $J_{CH2a,CH2b} = 12.0$ Hz, CH_{2ab}-Bn), 4.43 – 4.35 (m, 2H, CH_{2ab}-Bn {2 x d, 4.41, 4.37, ² $J_{CH2a,CH2b} = 12.0$ Hz, }), 4.29 (t_p, 1H, ³ $J_{H5,H6ab} = 6.4$ Hz, H5-Gal ^{α}), 3.99 (t_p, 1H, ³ $J_{H5,H6ab} = 7.1$ Hz, H5-Gal ^{β}), 3.59 – 3.38 (m, 4H, H6_a-Gal ^{α} , H6_b-Gal ^{α} , H6_a-Gal ^{β} , H6_b-Gal ^{β}), 2.14, 2.10, 2.05, 2.05, 2.03, 2.01, 1.99, 1.98 (8 x s, 24H, CH₃-Ac).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 461.12$ ($[M+Na]^+$, ber.: 461.14).

$C_{21}H_{26}O_{10}$ (438.43)

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosylbromid (36)^[134]

(α -6-Bn-Ac₃Gal-Br)



Eine Lösung von 4.63 g (10.56 mmol) α,β -6-Bn-Ac₃Gal-OAc (**35**) in 70 ml Dichlormethan wird auf 0 °C gekühlt und unter Rühren mit 30.0 ml einer 33%igen Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig tropfenweise versetzt und 40 min bei Raumtemp. gerührt. Der Ansatz wird mit 150 ml eiskaltem Dichlormethan verdünnt, zweimal mit 100 ml Eiswasser und zweimal mit 150 ml einer kalten ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und das Rohprodukt (4.54 g) durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 22.0 cm, Durchmesser = 8.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.52 g (5.53 mmol, 52 %); gelbes, hochviskoses Öl, $R_f = 0.40$ (^cHex/EtOAc, 3:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.36 - 7.22$ (m, 5H, H_{Ar}-Ph), 6.68 (d, 1H, ³ $J_{H1,H2} = 3.9$ Hz, H1-Gal), 5.55 (dd, 1H, ³ $J_{H4,H3} = 3.2$ Hz, H4-Gal), 5.37 (dd, 1H, ³ $J_{H3,H2} = 10.5$ Hz, ³ $J_{H3,H4} = 3.4$ Hz, H3-Gal), 5.00 (dd, 1H, ³ $J_{H2,H3} = 10.5$ Hz, ³ $J_{H2,H1} = 3.9$ Hz, H2-Gal), 4.53 (d, 2H, ² $J_{CH2a,CH2b} = 12.0$ Hz, CH_{2a}-Bn), 4.44 (m, 1H, H5-Gal), 4.39 (d, 2H, ² $J_{CH2a,CH2b} = 12.0$ Hz, CH_{2b}-Bn), 3.52 (dd, 1H, ³ $J_{H6a,H5} = 6.2$ Hz, ² $J_{H6a,H6b} = 9.7$ Hz, H6_a-Gal), 3.46 (dd, 1H, ³ $J_{H6b,H5} = 6.7$ Hz, ² $J_{H6b,H6a} = 9.7$ Hz, H6_b-Gal), 2.08, 2.01, 1.98 (3 x s, 9H, CH₃-Ac).

75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 170.23, 169.94, 169.83$ (C=O-Ac), 137.37 (C_{ipso}-Ph), 128.60, 128.04 (C_{o,m,p}-Ph), 88.77 (C1), 73.57 (CH₂-Bn), 72.17 (C5), 68.29, 68.08, 67.50 (C2, C3, C4), 66.84 (C6), 20.88, 20.73, 20.65 (CH₃-Ac).

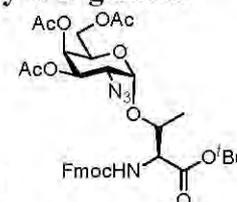
$C_{19}H_{23}BrO_8$ (459.29)

5.4 Die Synthesen der Galactosamin-Aminosäuren-Konjugate

5.4.1 Die Synthese des Galactose-Threonin-Konjugats

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**12**)^[87]

(Fmoc-Thr(α -Ac₃GalN₃)-O^tBu)



Eine Lösung von 22.50 g (56.60 mmol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-Thr-O^tBu (**3**) in 400 ml absol. Dichlormethan/absol. Toluol (1:1) wird mit 40 g gepulvertem Molekularsieb (4 Å, Pulver) unter Argon 1 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Das Reaktionsgemisch wird mit 21.85 g (79.24 mmol, 1.4 Äquiv.) Silbercarbonat und mit 2.93 g (14.15 mmol, 0.25 Äquiv.) wasserfreiem Silberperchlorat¹ in etwa 20 ml absol. Toluol versetzt und weitere 30 min unter Lichtausschluss und einer Argonatmosphäre bei 0 °C gerührt. Danach wird eine Lösung von 24.55 g (62.30 mmol, 1.10 Äquiv.) α -Ac₃GalN₃-Br (**11**) in einer Mischung aus 160 ml absol. Dichlormethan/absol. Toluol (1:1) innerhalb von 30 min zugetropft. Man lässt die Reaktionsmischung auf Raumtemp. erwärmen und rührt 24 h, wobei nach 2 h weitere 15.61 g (56.60 mmol, 1.00 Äquiv.) Silbercarbonat und 2.35 g (56.60 mmol, 0.20 Äquiv.) Silberperchlorat zur Vervollständigung der Umsetzung hinzugefügt werden. Es wird mit 400 ml Dichlormethan verdünnt, das Molekularsieb über Hyflo[®] abfiltriert, und mit Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird zweimal mit 200 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit 150 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Man entfernt die Lösungsmittel i. Vak. und reinigt den Rückstand (42.51 g) durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 45.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch °Hex/EtOAc, 4:1 → 3:1 → 2:1). Bei der flashchromatographischen Reinigung konnte das als Nebenprodukt anfallende β -Anomer nicht vollständig abgetrennt werden.

Ausbeute: 31.48 g (44.30 mmol, 78 %); farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = +78.2$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[87] $[\alpha]_D^{22} = +80$ ($c = 0.99$, CHCl₃), $R_f^\alpha = 0.33$ (°Hex/EtOAc, 2:1), $R_f^\beta = 0.22$ (°Hex/EtOAc, 2:1).

¹ Das im Silberperchlorat enthaltene Hydratwasser wird durch mehrmaliges Kodestillieren mit jeweils etwa 20 ml absol. Toluol entfernt.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.77 (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.64 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.45 – 7.36 (m, 2H, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.36 – 7.27 (m, 2H, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.65 (d, 1H, $^3J_{NH,Thr\alpha} = 9.5$ Hz, NH-Thr), 5.47 (dd, 1H, $^3J_{H4,H3} = 3.3$ Hz, $^3J_{H4,H5} = 1.4$ Hz, H4-GalN), 5.35 (dd, 1H, $^3J_{H3,H2} = 11.2$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 3.3$ Hz, H3-GalN), 5.11 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, H1-GalN), 4.48 – 4.22 (m, 6H, H5-GalN, H6_a-GalN, H6_b-GalN, H9-Fmoc, Thr ^{α} , Thr ^{β}), 4.10 (d, 2H, $^3J_{CH2,H9} = 6.4$ Hz, CH₂-Fmoc), 3.64 (dd, 1H, $^3J_{H2,H3} = 11.2$ Hz, $^3J_{H2,H1} = 3.7$ Hz, H2-GalN), 2.15, 2.08, 2.05 (3 x s, 9H, CH₃-Ac), 1.51 (s, 9H, CH₃-^{*t*}Bu), 1.36 (d, 3H, $^3J_{Thr\gamma,Thr\beta} = 6.5$ Hz, Thr ^{γ}).

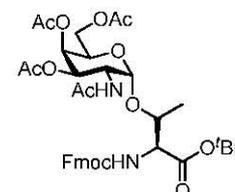
75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [δ/ppm] = 170.47, 170.11, 169.97, 169.33 (C=O-Ac, C=O-Thr), 156.96 (C=O-Fmoc), 144.01 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.41 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.83 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.24 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.43 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.07 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 99.35 (C1-GalN), 83.02 (C-^{*t*}Bu), 76.50 (Thr ^{β}), 68.17, 67.65, 67.19 (C3-GalN, C4-GalN, C5-GalN, CH₂-Fmoc), 61.91 (C6-GalN), 59.35 (Thr ^{α}), 57.85 (C2-GalN), 47.26 (C9-Fmoc), 28.11 (CH₃-^{*t*}Bu), 20.76 (CH₃-Ac), 19.07 (Thr ^{γ}).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 733.45 ([M+Na]⁺, ber.: 733.27).

C₃₅H₄₂N₄O₁₂ (710.73)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (13)^[428]**

(Fmoc-Thr(α -Ac₃GalNAc)-O^{*t*}Bu)



26.50 g (37.28 mmol) Fmoc-Thr(α -Ac₃GalN₃)-O^{*t*}Bu (**17**) werden in

110 ml Essigsäure, 220 ml Essigsäureanhydrid und 330 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 26.50 g (305.86 mmol, 8.20 Äquiv.) Zinkstaub versetzt, welches zuvor durch 3 min Aufschlämmen in 2 M Salzsäure aktiviert, mit Wasser sowie Ethanol gewaschen und mit Diethylether getrocknet wird. Man rührt die Suspension 18 h bei Raumtemperatur. Anschließend werden 500 ml Tetrahydrofuran hinzugegeben, der Zinkstaub über Hyflo[®] abfiltriert und mehrmals mit Tetrahydrofuran nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand wird fünfmal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand (29.96 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 38.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch ^{*c*}Hex/EtOAc, 2:1 → 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 20.48 g (28.17 mmol, 76 %); farbloser, amorpher Feststoff, [α]_D²⁴ = + 65.3 ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[87] [α]_D²² = + 63.4 ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.28$ (^{*c*}Hex/EtOAc, 1:2), $R_f = 0.17$ (^{*c*}Hex/EtOAc, 1:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.78 (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.64 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.41 (m_c, 2H, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.34 (m_c, 2H, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.96 (d, 1H, $^3J_{NH,H2} = 9.8$ Hz, NH-GalN), 5.51 (d, 1H, $^3J_{NH,Thr\alpha} = 9.3$ Hz, NH-Thr), 5.39 (s_b, 1H, H4-GalN), 5.10 (dd, 1H, $^3J_{H3,H2} = 11.3$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 3.2$ Hz, H3-GalN), 4.89 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, H1-GalN), 4.63 (td, 1H, $^3J_{H2,H3} \approx ^3J_{H2,NH} \approx 10.6$ Hz, $^3J_{H2,H1} = 3.7$ Hz, H2-GalN), 4.45 (m_c, 2H, CH₂-Fmoc), 4.33 – 4.04 (m, 6H, H5-GalN, H6_a-GalN, H6_b-GalN, H9-Fmoc, Thr ^{α} , Thr ^{β}), 2.17, 2.04, 2.00 (3 x s, 12H, CH₃-Ac), 1.46 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.33 (d, 3H, $^3J_{Thr\gamma,Thr\beta} = 6.3$ Hz, Thr ^{γ}).

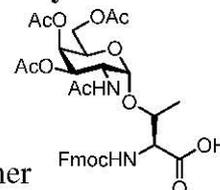
75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [δ/ppm] = 171.04, 170.45, 170.40, 160.13 (C=O-Ac, C=O-Thr), 156.57 (C=O-Fmoc), 143.89, 143.84 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.44 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.92, 127.90 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.27 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.27, 125.20 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.18, 120.15 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 100.11 (C1-GalN), 83.40 (C-^tBu), 76.19 (Thr ^{β}), 68.87, 67.52, 67.50 (C3-GalN, C4-GalN, C5-GalN, CH₂-Fmoc), 62.25 (C6-GalN), 59.03 (Thr ^{α}), 47.41, 47.28 (C2-GalN, C9-Fmoc), 28.22 (CH₃-^tBu), 23.41, 20.89, 20.79 (CH₃-Ac), 18.67 (Thr ^{γ}).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 749.26 ([M+Na]⁺, ber.:749.29).

C₃₇H₄₆N₂O₁₃ (726.77)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (**14**)^[88]**

(Fmoc-Thr(α -GalAc₃NAc)-OH)



4.00 g (5.50 mmol) Fmoc-Thr(α -Ac₃GalNAc)-OtBu (**10**) werden in einer Mischung aus 47.50 ml Trifluoressigsäure und 2.5 ml Wasser gelöst. Man rührt 1.5 h bei Raumtemp., anschließend werden die flüchtigen Bestandteile i. Vak. evaporiert und der Rückstand wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand (3.75 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimension: Länge = 25.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) im Laufmittelgemisch (EtOAc/Hex/TFA, 160:40:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.65 g (5.44 mmol, 99 %); farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = +74.8$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.^[429] $[\alpha]_D^{22} = +65.4$ ($c = 1.45$, CHCl₃), $R_f = 0.27$ (EtOAc/Hex/TFA, 160:40:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.73 (m_c, 2H, H4-Fmoc, H5-Fmoc)*, 7.66 – 7.44 (m, 2H, H1-Fmoc, H8-Fmoc)*, 7.41 – 7.22 (m, 4H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc), 7.04, 6.93 (2 x d, 1H, $^3J_{NH,H2} = 9.9$ Hz, NH-GalN)*, 6.11, 5.94 (2 x d, 1H, $^3J_{NH,Thr\alpha} = 9.6$ Hz, NH-Thr)*, 5.37, 5.29 (m, 1H, H4-GalN)*, 5.13 (dd, 1H, $^3J_{H3,H2} = 11.3$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 3.3$ Hz, H3-GalN), 5.04, 4.99 (2 x d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, H1-GalN)*, 4.77 – 3.88 (m, 9H, H2-GalN,

CH₂-Fmoc, H5-GalN, H6_a-GalN, H6_b-GalN, H9-Fmoc, Thr^α, Thr^β), 2.16, 2.15, 2.04, 2.02, 1.96, 1.94 (6 x s, 12H, CH₃-Ac)*, 1.26, 0.98 (2 x d, 3H, ³J_{Thr^γ, Thr^β} = 6.4 Hz, Thr^γ)*.

75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [δ/ppm] = 173.58, 172.36, 171.46, 171.41, 170.98, 170.53, 170.47, 170.27 (C=O-Ac, C=O-Thr), 158.05, 156.73 (C=O-Fmoc), 143.76, 143.33 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.45 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 128.04, 127.94 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.36, 127.29 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.30, 125.05, 124.77, 124.70 (C1-Fmoc, C8-Fmoc)*, 120.18, 120.12 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 99.60, 98.84 (C1-GalN)*, 77.37, 76.19 (Thr^β)*, 68.17, 67.88 (C3-GalN)*, 67.46, 67.40 (C4-GalN)*, 67.21, 67.13 (C5-GalN, CH₂-Fmoc), 62.32, 62.18 (C6-GalN)*, 58.86, 58.72 (Thr^α)*, 48.72, 48.18, 47.39, 47.07 (C2-GalN, C9-Fmoc)*, 22.97, 22.31, 21.20, 20.96, 20.86, 20.80, 20.76 (CH₃-Ac)*, 18.67, 18.38 (Thr^γ)*.

* Es liegen unterschiedliche Konformere vor.

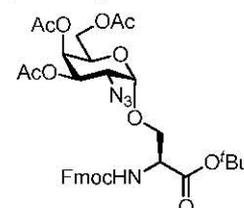
ESI-MS (positiv): [m/z] = 671.19 ([M+H]⁺, ber.: 671.25).

C₃₃H₃₈N₂O₁₃ (670.66)

5.4.2 Die Synthese des Galactosamin-Serin-Konjugats

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-serin-*tert*-butylester (**15**)**^[154, 429]

(Fmoc-Ser(α -Ac₃GalN₃)-O^tBu)



Eine Lösung von 8.84 g (23.06 mmol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-Ser-O^tBu (**6**)

in 200 ml absol. Dichlormethan/absol. Toluol (1:1) wird mit 20 g gepulvertem Molekularsieb (4 Å, Pulver) unter Argon 1 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Das Reaktionsgemisch wird mit 8.90 g (32.30 mmol, 1.40 Äquiv.) Silbercarbonat und mit 1.20 g (5.77 mmol, 0.25 Äquiv.) wasserfreiem Silberperchlorat in etwa 10 ml absol. Toluol versetzt und weitere 30 min unter Lichtausschluss und einer Argonatmosphäre bei 0 °C gerührt. Danach wird eine Lösung von 10.00 g (25.40 mmol, 1.10 Äquiv.) α -Ac₃GalN₃-Br (**11**) in 90 ml absol. Dichlormethan/absol. Toluol (1:1) innerhalb von 30 min zugetropft. Man lässt die Reaktionsmischung auf Raumtemp. erwärmen und rührt 24 h, wobei nach 2 h weitere 6.36 g (23.06 mmol, 1.00 Äquiv.) Silbercarbonat und 0.96 g (4.61 mmol, 0.20 Äquiv.) Silberperchlorat zur Vervollständigung der Umsetzung hinzugefügt werden. Es wird mit 400 ml Dichlormethan verdünnt, das Molekularsieb über Hyflo[®] abfiltriert und mit Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird zweimal mit 100 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit 100 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über

Magnesiumsulfat getrocknet. Man entfernt die Lösungsmittel i. Vak. und reinigt den Rückstand (18.60 g) durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 45.0 cm, Durchmesser = 9.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 4:1).

Ausbeute: 11.41 g (16.38 mmol, 71 %); farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.42$ (^cHex/EtOAc, 1:2), $R_f = 0.09$ (^cHex/EtOAc, 4:1).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.76 (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $^3J_{H3,H2} = ^3J_{H3,H4} = ^3J_{H6,H5} = ^3J_{H6,H7} = 7.4$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.32 (m_c, 2H, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.89 (d, 1H, $^3J_{NH,Thr\alpha} = 7.8$ Hz, NH-Ser), 5.44 (d, 1H, $^3J_{H4,H3} = 2.8$ Hz, H4-GalN), 5.30 (dd, 1H, $^3J_{H3,H2} = 11.1$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 3.3$ Hz, H3-GalN), 4.95 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 3.6$ Hz, H1-GalN), 4.47 – 4.41 (m, 1H, Ser ^{α}), 4.40 (m_c, 2H, CH₂-Fmoc), 4.25 (t, 1H, $^3J_{H9,CH2} = 7.2$ Hz, H9-Fmoc), 4.20 (m_c, 1H, H5-GalN), 4.10 (dd, 1H, $^3J_{H\beta a,H\alpha} = 3.1$ Hz, $^2J_{H\beta a,H\beta b} = 10.7$ Hz, H_a ^{β} -Ser), 4.05 (m_c, 2H, H6_{ab}-GalN), 3.97 (dd, 1H, $^3J_{H\beta b,H\alpha} = 3.1$ Hz, $^2J_{H\beta b,H\beta a} = 10.7$ Hz, H_b ^{β} -Ser), 3.66 (dd, 1H, $^3J_{H2,H3} = 11.1$ Hz, $^3J_{H2,H1} = 3.6$ Hz, H2-GalN), 2.15, 2.06, 1.98 (3 x s, 9H, CH₃-Ac), 1.51 (s, 9H, CH₃-^tBu).

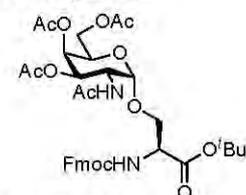
100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 170.57, 170.12, 169.89, 168.63 (C=O-Ac, C=O-Ser), 155.99 (C=O-Fmoc), 143.98, 143.93 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.42 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.88, 127.86 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.24 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.32, 125.30 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.12 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 99.36 (C1-GalN), 83.29 (C-^tBu), 70.15 (Ser ^{β}), 68.16 (C3-GalN), 67.63 (C4-GalN), 67.39 (CH₂-Fmoc), 67.31 (C5-GalN), 61.83 (C6-GalN), 57.64 (C2-GalN), 55.05 (Ser ^{α}), 47.21 (C9-Fmoc), 28.09 (CH₃-^tBu), 20.81, 20.78, 20.76 (CH₃-Ac).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): [m/z] = 719.24 ([M+Na]⁺, ber.: 719.25).

C₃₄H₄₀N₄O₁₂ (696.70)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-serin-*tert*-butylester (16)**^[154, 429]

(Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-O^tBu)



Die Reaktion wird gemäß der Vorschrift zur Synthese von Fmoc-Thr(α -Ac₃GalNAc)-O^tBu (**13**) durchgeführt.

Eingesetzte Mengen: 22.06 g (31.66 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalN₃)-O^tBu (**15**), 21.74 g (332.47 mmol, 10.5 Äquiv.) Zink, 90 ml Essigsäure, 180 ml Essigsäureanhydrid und 270 ml Tetrahydrofuran. Das Rohprodukt (22.83 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel

gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 33.0 cm, Durchmesser = 11.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 4:1 → 1:1).

Ausbeute: 17.67 g (24.79 mmol, 78 %); farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = +57.8$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[429] $[\alpha]_D^{22} = +59.5$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.27$ (EtOAc/^cHex, 2:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.77$ (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.41 (t, 2H, $^3J_{H3,H2} = ^3J_{H3,H4} = ^3J_{H6,H5} = ^3J_{H6,H7} = 7.3$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.32 (m_c, 2H, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.74 (d, 1H, $^3J_{NH,Thr\alpha} = 8.0$ Hz, NH-Ser), 5.67 (d, 1H, $^3J_{NH,H2} = 9.6$ Hz, NH-GalN), 5.38 (d, 1H, $^3J_{H4,H3} = 3.3$ Hz, H4-GalN), 5.11 (dd, 1H, $^3J_{H3,H2} = 11.1$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 3.2$ Hz, H3-GalN), 4.84 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} \approx 3.6$ Hz, H1-GalN), 4.60 (ddd, 1H, $^3J_{H2,H3} \approx 11.1$ Hz, $^3J_{H2,NH} \approx 9.6$ Hz, $^3J_{H2,H1} = 3.6$ Hz, H2-GalN), 4.50 – 4.36 (m, 3H, Ser^α, CH₂-Fmoc), 4.25 (t, 1H, $^3J_{H9,CH2} = 6.9$ Hz, H9-Fmoc), 4.16 – 4.02 (m, 3H, H5-GalN, H6_a-GalN, H6_b-GalN), 3.97 (dd_b, 1H, $^3J_{H\beta a,H\alpha} = 4.3$ Hz, $^2J_{H\beta a,H\beta b} = 11.6$ Hz, H_a^β-Ser), 3.85 (dd_b, 1H, $^3J_{H\beta b,H\alpha} = 3.4$ Hz, $^2J_{H\beta b,H\beta a} = 11.6$ Hz, H_b^β-Ser), 2.16, 2.00, 1.99, 1.93 (4 x s, 12H, CH₃-Ac), 1.49 (s, 9H, CH₃-^tBu).

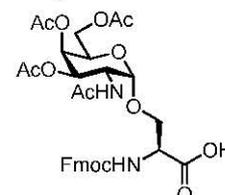
75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 171.05, 170.54, 170.42, 170.18, 169.12$ (4 x C=O-Ac, C=O-Ser), 155.96 (C=O-Fmoc), 143.90, 143.86 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.45 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.94 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.26 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.17 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.19 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 98.97 (C1-GalN), 83.27 (C-^tBu), 69.48 (Ser^β), 68.55, 67.42 (C3-GalN, C4-GalN, C5-GalN), 67.39 (CH₂-Fmoc), 62.03 (C6-GalN), 54.94 (Ser^α), 47.69 (C2-GalN), 47.23 (C9-Fmoc), 28.16 (CH₃-^tBu), 23.37 (CH₃-CONH), 20.91, 20.88, 20.76 (3 x CH₃-Ac).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 735.24$ ([M+Na]⁺, ber.: 735.27).

C₃₆H₄₄N₂O₁₃ (712.74)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serin (17)^[154]**

(Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAc)-OH)



Die Reaktion wird gemäß der Vorschrift zur Synthese von Fmoc-Thr(α -GalAc₃NAc)-OH (**14**) durchgeführt.

Eingesetzte Mengen: 2.00 g (2.81 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-O^tBu (**16**) werden in einer Mischung aus 23.75 ml Trifluoressigsäure und 1.25 ml Wasser gelöst. Es wird 1 h bei Raumtemp. gerührt. Der Rückstand (1.95 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimension: Länge = 33.0 cm, Durchmesser = 3.8 cm) im Laufmittelgemisch (EtOAc/^cHex/TFA, 160:40:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.84 g (2.81 mmol, quant.); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = +88.6$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[429] $[\alpha]_D^{20} = +89.9$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.25$ (EtOAc/^cHex/TFA, 160:40:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 7.73$ (d, 2H, $^3J_{\text{H4,H3}} = ^3J_{\text{H5,H6}} = 7.5$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.57 (d, 2H, $^3J_{\text{H1,H2}} = ^3J_{\text{H8,H7}} = 7.6$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.37 (m, 2H, $^3J_{\text{H3,H2}} = ^3J_{\text{H3,H4}} = ^3J_{\text{H6,H5}} = ^3J_{\text{H6,H7}} = 7.5$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), $7.32 - 7.22$ (m, 2H, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 6.14 (m, 2H, NH-Ser, NH-GalN), 5.34 (sb, 1H, H4-Gal), 5.16 (dd, 1H, $^3J_{\text{H3,H2}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{H3,H4}} = 2.1$ Hz, H3-GalN), 4.95 (d, 1H, $^3J_{\text{H1,H2}} = 3.4$ Hz, H1-GalN), $4.69 - 4.28$ (m, 4H, H2-GalN, CH₂-Fmoc, Ser^α), $4.28 - 3.86$ (m, 6H, H9-Fmoc, H5-GalN, H6_a-GalN, H6_b-GalN, Ser^β), 2.14 (s, 3H, CH₃-Ac), 2.02 (s, 3H, CH₃-CONH), 1.99 (sb, 6H, CH₃-Ac).

75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 172.86, 172.34, 171.28, 170.66, 170.49$ (4 x C=O-Ac, C=O-Ser), 156.11 (C=O-Fmoc), 143.80 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.44 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.97 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.27 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), $125.15, 125.09$ (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.22 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 98.67 (C1-GalN), 69.50 (Ser^β), $68.20, 67.38$ (C3-GalN, C4-GalN, C5-GalN), 67.29 (CH₂-Fmoc), 62.03 (C6-GalN), 54.55 (Ser^α), 48.31 (C2-GalN), 47.25 (C9-Fmoc), 22.78 (CH₃-CONH), $20.90, 20.84, 20.78$ (3 x CH₃-Ac).

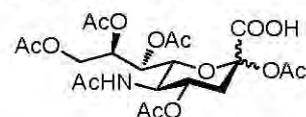
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 679.24$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 679.21).

$\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{13}$ (656.63)

5.5 Die Synthese des Neuraminsäure-Bausteins

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α,β -D-galactonon-2-uloypyranosonat (19)^[116]

(α,β -NeuAc₅NAcCOOH)



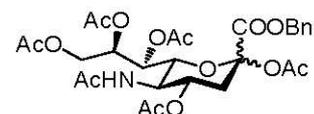
Zu 20.00 g (64.70 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure (18), gelöst in 280 ml Pyridin, werden 140 ml Essigsäureanhydrid innerhalb von 30 min bei 0 °C hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 15 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend von Pyridin und überschüssigem Essigsäureanhydrid i. Hochvak. befreit. Der Rückstand wird viermal mit 80 ml Toluol kodestilliert. Das erhaltene Rohprodukt ist ausreichend rein für die Umsetzung in der nächsten Stufe.

Ausbeute: 33.64 g (64.70 mmol, quant.), farbloser Feststoff, $R_f = 0.34$ (EtOH/ CHCl_3 , 3:1).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 556.11$ ($[\text{M}+2 \times \text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$, ber.: 556.19).

$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NO}_{14}$ (519.45)

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α,β -D-galactonon-2-ulopyranosonat (20)^[116]

 (α,β -Ac₅NeuNAcCOOBn)


Zu einer Lösung von 33.60 g (64.67 mmol) α,β -Ac₅NeuNAcCOOH (**19**) in 100 ml Ethanol gibt man 10.61 g (32.58 mmol, 0.50 Äquiv.) Cäsiumcarbonat gelöst in 20 ml Wasser. Nach Abklingen der Gasentwicklung rührt man die Reaktionsmischung 1 h bei Raumtemp. und entfernt das Lösungsmittel i. Vakuum. Der Rückstand wird dreimal mit 200 ml Toluol kodestilliert und der verbleibende Feststoff in 180 ml *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Anschließend werden 70 ml (100.21 g, 585.87 mmol, 9.06 Äquiv.) Benzylbromid langsam bei 0 °C zugetropft. Danach wird 15 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend das Lösungsmittel i. Hochvak. entfernt. Es wird dreimal mit 200 ml Toluol kodestilliert und der Rückstand in 500 ml Ethylacetat aufgenommen. Ausgefallenes Cäsiumbromid wird abfiltriert und das Filtrat zweimal mit 200 ml dest. Wasser und einmal mit 150 ml ges. Natriumchlorid-Lsg. gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Der Rückstand (59.36 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 34.0 cm, Durchmesser = 11.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 1:1 → EtOAc) gereinigt.

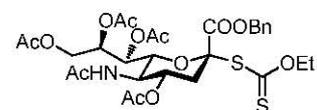
Ausbeute: 35.34 g (57.97 mmol, 90 %); farbloser Feststoff, $R_f^\alpha = 0.37$ (EtOAc), $R_f^\beta = 0.23$ (EtOAc).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.38 (b_s, 5H, H_{Ar}-Ph), 5.45 – 5.39 (m, 1H, NH-Sia), 5.36 (dd, 1H, ³J_{H7,H8} = 5.3 Hz, ³J_{H7,H6} = 1.7 Hz, H7-Sia), 5.23 (m_c, 2H, ²J_{CH2a,CH2b} = 12.2 Hz, H4-Sia, CH_{2a}-Bn), 5.15 (d, 1H, ²J_{CH2b,CH2a} = 12.2 Hz, CH_{2a}-Bn), 5.08 (ddd, 1H, ³J_{H8,H9b} = 6.5 Hz, ³J_{H8,H7} = 5.3 Hz, ³J_{H8,H9a} = 2.7 Hz, H8-Sia), 4.44 (dd, 1H, ³J_{H9a,H8} = 2.7 Hz, ²J_{H9a,H9b} = 12.4 Hz, H9_a-Sia), 4.18 – 4.03 (m, 2H, H5-Sia, H9_b-Sia), 2.54 (dd, 1H, ³J_{H3äq,H4} = 5.0 Hz, ²J_{H3äq,H3ax} = 13.5 Hz, H3_{äq}-Sia), 2.12 (s, 3H, CH₃-Ac), 2.10 (m_c, 4H, H3_{ax}-Sia, CH₃-Ac {2.10, s}), 2.01 (s_b, 9H, 3 x CH₃-Ac), 1.88 (s, 3H, CH₃-Ac).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 632.28 ([M+Na]⁺, ber.: 632.20).

C₂₈H₃₅NO₁₄ (609.58)

O-Ethyl-S-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat]dithiocarbonat (22)^[116]

 (α -Ac₅NeuNAcCOOBn-Xan)


Zu 10.00 g (16.40 mmol) α,β -Ac₅NeuNAcCOOBn (**20**) gelöst in 75 ml absol. Dichlormethan werden bei 0 °C 18 ml Acetylchlorid innerhalb von 30 min zugetropft. Die eisgekühlte

Lösung wird mit 1.8 ml 37%iger Salzsäure innerhalb von 5 min versetzt. Der Ansatz wird bei Raumtemp. 3 d gerührt (dünnschichtchromatographische Kontrolle). Anschließend wird die Lösung mit 100 ml Toluol verdünnt, das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und der Rückstand viermal mit 80 ml Toluol kodestilliert und i. Hochvak. getrocknet.

Ausbeute: 9.57 g (16.32 mmol, quant.); farbloser Feststoff, $R_f = 0.55$ (EtOAc).

$C_{26}H_{32}ClNO_{12}$ (585.98)

9.57 g (16.32 mmol) rohes Neuraminsäurechlorid **21** werden in 240 ml absol. Ethanol aufgenommen und mit 6.00 g (37.40 mmol, 2.28 Äquiv.) Kaliummethylxanthogenat versetzt. Die Suspension wird 18 h unter Lichtausschluss gerührt und anschließend mit 300 ml Dichlormethan verdünnt. Es wird zweimal mit jeweils 100 ml Wasser und einmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Der Rückstand (10.41 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 8.0 cm im Laufmittelgemisch $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:1 \rightarrow 1:3 \rightarrow 1:5) gereinigt.

Ausbeute: 7.93 g (11.81 mmol, 72 %); farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.38$ (EtOAc).

Es wird ein Gemisch aus dem gewünschten Xanthogenat **22** und dem Eliminierungsprodukt **23** erhalten (Xan:Glycal = 5:1, mittels NMR-Spektroskopie bestimmt), das sich flashchromatographisch nicht trennen lässt. Da das Eliminierungsprodukt allerdings auch im Laufe der sich anschließenden Sialylierungsreaktionen gebildet wird und diese nicht negativ beeinflusst, kann an dieser Stelle auf eine weitere, Reinigung verzichtet werden, sofern im Folgenden der Grad der Verunreinigung bei der Ansatzberechnung berücksichtigt wird.

400 MHz- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): [δ/ppm] = 7.34 (m_c, 5H, H_{Ar}-Ph), 5.31 (dd, 1H, $^3J_{\text{H7,H8}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{H7,H6}} = 2.1$ Hz, H7-Sia), 5.28 – 5.23 (m, 2H, NH, H8-Sia), 5.21 (d, 2H, $^2J_{\text{CH2a,CH2b}} = 3.1$ Hz, CH_{2ab}-Bn), 4.84 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H4,H3ax}} = 11.7$ Hz, $^3J_{\text{H4,H5}} = 10.3$ Hz, $^3J_{\text{H4,H3äq}} = 4.6$ Hz, H4-Sia), 4.56 (dd, 1H, $^3J_{\text{H6,H7}} = 2.1$ Hz, $^3J_{\text{H6,H5}} = 10.8$ Hz, H6-Sia), 4.45 – 4.35 (m, 2H, CH₂-Et), 4.32 (dd, 1H, $^3J_{\text{H9a,H8}} = 2.7$ Hz, $^2J_{\text{H9a,H9b}} = 12.5$ Hz, H9_a-Sia), 4.20 (dd, 1H, $^3J_{\text{H9b,H8}} = 6.0$ Hz, $^2J_{\text{H9b,H9a}} = 12.5$ Hz, H9_b-Sia), 4.04 (q, 1H, $^3J_{\text{H5,NH}} \approx ^3J_{\text{H5,H4}} \approx ^3J_{\text{H5,H6}} \approx 10.4$ Hz, H5-Sia), 2.65 (dd, 1H, $^3J_{\text{H3äq,H4}} = 4.7$ Hz, $^2J_{\text{H3äq,H3ax}} = 13.0$ Hz, H3_{äq}-Sia), 2.12, 2.11 (2 x s, 6H, CH₃-Ac), 2.07 (m_c, 1H, H3_{ax}-Sia), 2.01 (s, 6H, 2 x CH₃-Ac), 1.88 (s, 3H, CH₃-Ac), 1.20 (t, 3H, $^3J_{\text{CH3,CH2}} = 7.1$ Hz, CH₃-Et).

75.5 MHz- $^{13}\text{C-NMR}$ [BB] (CDCl_3): [δ/ppm] = 207.20 (C=S), 170.83, 170.66, 170.40, 170.28, 170.24 (C=O-Ac), 167.96 (C1-Sia), 135.03 (C_{ipso}-Ph), 128.92, 128.77, 128.16 (C_{o,m,p}-Ph), 86.67 (C2-Sia), 75.35 (C6-Sia), 70.72 (CH₂-Et), 70.51 (C8-Sia), 68.90 (C4-Sia), 68.11

(C7-Sia), 67.91 (CH₂-Bn), 62.15 (C9-Sia), 49.39 (C5-Sia), 37.27 (C3-Sia), 23.33 (NHAc), 21.21, 20.94, 20.91, 20.89 (4 x CH₃-Ac), 13.19 (CH₃-Et).

ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 694.44 ([M+Na]⁺, ber.: 694.16).

C₂₉H₃₇NO₁₃S₂ (671.73).

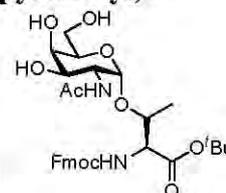
5.6 Synthesen von Disaccharid-Aminosäuren-Konjugaten

5.6.1 Die Synthesen des Disaccharid-Threonin-Konjugats

5.6.1.1 Die Synthese von *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**24**)^[87]

(Fmoc-Thr(α -GalNAc)-*O*^tBu)



7.90 g (10.87 mmol) Fmoc-Thr(α -Ac₃GalNAc)-*O*^tBu (**13**) werden in 170 ml

Methanol gelöst und unter Kontrolle des pH-Werts mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 18 h bei einem pH-Wert von 8.5 gerührt, wobei durch stündliche Zugabe weiterer methanolischer Natriummethanolat-Lösung der pH-Wert nachreguliert wird. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure und entfernt die Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vakuum. Der Rückstand (6.62 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 40.0 cm, Durchmesser = 6.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 2:1 → EtOAc → EtOAc/EtOH → 20:1).

Ausbeute: 5.48 g (9.12 mmol, 84 %); farbloser Feststoff, [α]_D²⁴ = + 39.6 (*c* = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[87] [α]_D²² = + 40.2 (*c* = 1.00, CHCl₃), *R*_f = 0.24 (EtOAc/EtOH, 9:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ /ppm] = 7.76 (d, 2H, ³*J*_{H4,H3} = ³*J*_{H5,H6} = 7.4 Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.61 (d, 2H, ³*J*_{H1,H2} = ³*J*_{H8,H7} = 7.5 Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.40 (t, 2H, ³*J*_{H3,H2} = ³*J*_{H3,H4} = ³*J*_{H6,H5} = ³*J*_{H6,H7} = 7.4 Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.31 (t, 2H, ³*J*_{H2,H1} = ³*J*_{H2,H3} = ³*J*_{H7,H6} = ³*J*_{H7,H8} = 7.8 Hz, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 6.91 (d, 1H, ³*J*_{NH,H2} = 8.0 Hz, NH-GalN), 5.76 (d, 1H, ³*J*_{NH,Thr α} = 9.4 Hz, NH-Thr), 4.88 (d, 1H, ³*J*_{H1,H2} = 3.8 Hz, H1-GalN), 4.58 – 4.36

(m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.34 – 4.20 (m, 3H, H₂-GalN, Thr^β, H₉-Fmoc), 4.15 (m_c, 1H, Thr^α), 4.05 (s_b, 1H, H₄-GalN), 3.99 – 3.75 (m, 4H, H₃-GalN, H₅-GalN, H_{6_{ab}}-GalN), 2.11 (s, 3H, CH₃-Ac), 1.45 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.30 (d, 3H, ³J_{Thr^γ, Thr^β} = 6.3 Hz, Thr^γ).

ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 623.22 ([M+Na]⁺, ber.: 623.26).

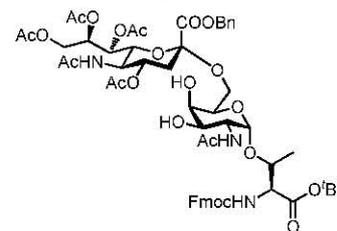
C₃₁H₄₀N₂O₁₀ (600.66)

Herstellung der Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M in absol. 1,2-Dichlorethan)^[118]

Die für Sialylierungsreaktionen benötigte Methylsulfenylbromid-Lösung wird wie folgt hergestellt. 0.71 ml (0.75 g, 8.01 mmol) Dimethyldisulfid und 10 ml absol. 1,2-Dichlorethan werden unter Argon mit 0.41 ml (1.28 g, 7.98 mmol) Brom versetzt und unter Lichtausschluss bei Raumtemp. 15 h gerührt.

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**25**)^[87, 157]

(Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalNAc)-O^tBu)



1.20 g (2.00 mmol) Fmoc-Thr(α -GalNAc)-O^tBu (**24**), 3.00 g (4.47 mmol, 2.24 Äquiv.) α -Ac₅NeuNAcCOOBn-Xan (**22**)

(Gemisch aus dem Xanthogenat und dem Eliminierungsprodukt **23**), etwa 4 g Molekularsieb (4 Å) werden in 40 ml absol. Acetonitril und 20 ml absol. Dichlormethan suspendiert und unter Argon 30 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend kühlt man die Lösung auf – 65 °C ab, gibt unter Lichtausschluss 1.20 g (4.67 mmol, 1.04 Äquiv. bezogen auf **22**) trockenes Silbertrifluormethansulfonat hinzu und rührt die Mischung erneut 45 min bei – 65 °C. Danach werden 3.15 ml (5.04 mmol, 1.13 Äquiv. bezogen auf **22**) einer vorgekühlten 1.6 M Methylsulfenylbromid-Lösung in absol. 1,2-Dichlorethan innerhalb von 45 min zugetropft. Der Ansatz wird 5 h bei – 65 °C gerührt. Danach werden weitere 0.20 g (0.78 mmol, 0.17 Äquiv. bezogen auf das Xanthogenat) Silbertrifluormethansulfonat und 0.40 ml (0.64 mmol, 0.14 Äquiv.) Methylsulfenylbromid-Lösung auf einmal hinzugegeben und weitere 3 h bei – 65 °C gerührt. Nach insgesamt 8 h wird durch Zugabe von 1.2 ml *N*-Ethyl-diisopropylamin neutralisiert, die Reaktionsmischung auf Raumtemp. erwärmt, mit 50 ml Dichlormethan verdünnt und über einer dünnen Schicht Hyflo[®] filtriert. Der Filterkuchen wird fünfmal mit 50 ml Dichlormethan nachgewaschen und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (6.65 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen:

Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 4.0 cm im Laufmittelgemisch °Hex/EtOAc 1:1 → EtOAc → EtOAc/EtOH → 40:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.47 g (1.27 mmol, 64 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = +8.5$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[157] $[\alpha]_D^{22} = +6.3$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.38$ (EtOAc/EtOH, 10:1), $R_f = 0.21$ (EtOAc/EtOH, 20:1).

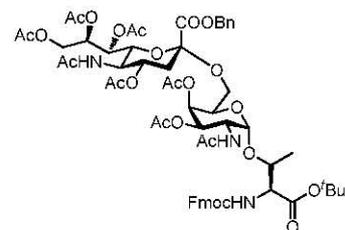
400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 7.77$ (d, 2H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = ^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = ^3J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.6$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), $7.44 - 7.37$ (m, 2H, H3-Fmoc, H6-Fmoc), $7.37 - 7.28$ (m, 7H, H2-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 6.71 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{H}_2} = 7.4$ Hz, NH-GalN), 5.44 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{Thr}\alpha} = 9.4$ Hz, NH-Thr), 5.36 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H}_8,\text{H}_7} \approx 7.4$ Hz, $^3J_{\text{H}_8,\text{H}_9\text{a}} = 2.5$ Hz, H8-Sia), 5.31 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_7,\text{H}_8} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{H}_7,\text{H}_6} = 1.7$ Hz, H7-Sia), 5.26 (d, 1H, $^2J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 12.0$ Hz, CH_{2a}-Bn), 5.21 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{H}_5} = 8.8$ Hz, NH-Sia), 5.17 (d, 1H, $^2J_{\text{CH}_2\text{b},\text{CH}_2\text{a}} = 12.0$ Hz, CH_{2b}-Bn), 4.85 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3\text{ax}} = 12.0$ Hz, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 9.4$ Hz, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3\text{aq}} = 4.6$ Hz, H4-Sia), 4.80 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.9$ Hz, H1-GalN), 4.60 (s_b, 1H, OH3-GalN), 4.48 (d, 2H, $^3J_{\text{CH}_2,\text{H}_9} = 6.9$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.36 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_9\text{a},\text{H}_8} = 2.5$ Hz, $^2J_{\text{H}_9\text{a},\text{H}_9\text{b}} = 12.4$ Hz, H9_a-Sia), 4.26 (t, 1H, $^3J_{\text{H}_9,\text{CH}_2} = 6.9$ Hz, H9-Fmoc), $4.23 - 4.15$ (m, 2H, Thr^α {4.18}, H2-GalN {4.16}), $4.12 - 4.02$ (m, 4H, Thr^β {4.08}, H9_b-Sia {4.06}, H5-Sia {4.05}, H6-Sia {4.03}), 3.93 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_6\text{a},\text{H}_5} = 7.0$ Hz, $^2J_{\text{H}_6\text{a},\text{H}_6\text{b}} = 10.4$ Hz, H6_a-GalN), $3.77 - 3.60$ (m, 3H, H5-GalN {3.71}, H4-GalN {3.67}, H3-GalN {3.63}), 3.52 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_6\text{b},\text{H}_5} = 4.7$ Hz, $^2J_{\text{H}_6\text{b},\text{H}_6\text{a}} = 10.4$ Hz, H6_b-GalN), 2.91 (s, 1H, OH4-GalN), 2.60 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_3\text{aq},\text{H}_4} = 4.6$ Hz, $^2J_{\text{H}_3\text{aq},\text{H}_3\text{ax}} = 12.8$ Hz, H3_{aq}-Sia), $2.12, 2.11, 2.10$ (3 x s, 9H, CH₃-Ac), 2.02 (s_b, 6H, 2 x CH₃-Ac), 1.97 (m_c, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.87 (s, 3H, CH₃-Ac), 1.46 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.28 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}\gamma,\text{Thr}\beta} = 5.9$ Hz, Thr^γ).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1172.25$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1172.44).

$\text{C}_{57}\text{H}_{70}\text{N}_3\text{O}_{22}$ (1150.18)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (26)**^[87, 157]

(Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂Nac)-*O*^tBu)



Zu 938 mg (815.5 μmol) Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalNac)-*O*^tBu (**25**) gibt man 30 ml Pyridin und 15 ml Essigsäureanhydrid bei -10 °C hinzu. Man rührt das

Reaktionsgemisch 14 h bei -10 °C und lässt es dann auf Raumtemp. kommen. Nach 16 h entfernt man überschüssiges Essigsäureanhydrid sowie Pyridin im Hochvakuum. Der dunkelgelbe Rückstand wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und durch

Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 38.0 cm, Durchmesser = 3.5 cm) im Laufmittelgemisch (Hex/EtOAc 1:1 → 1:3 → 1:5 → EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 779 mg (631.2 μmol, 77 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = +28.7$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[157] $[\alpha]_D^{22} = +28.8$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.44$ (EtOAc/EtOH, 10:1), $R_f = 0.22$ (EtOAc).

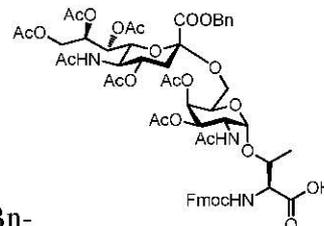
400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.77$ (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.7$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.65 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), $7.45 - 7.28$ (m, 9H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 5.92 (d, 1H, $^3J_{NH,H2} = 9.9$ Hz, NH-GalN), 5.58 (d, 1H, $^3J_{NH,Thr\alpha} = 9.3$ Hz, NH-Thr), $5.36 - 5.28$ (m, 2H, H8-Sia {5.33}, H7-Sia {5.31}), 5.25 (d, 1H, $^2J_{CH2a,CH2b} = 11.9$ Hz, CH_{2a}-Bn), $5.18 - 5.11$ (m, 2H, H4-GalN {5.16}, CH_{2b}-Bn {5.14}, $^2J_{CH2b,CH2a} = 11.9$ Hz), 5.08 (d, 1H, $^3J_{NH,H5} = 7.1$ Hz, NH-Sia), 4.97 (dd, 1H, $^3J_{H3,H2} = 11.3$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 3.2$ Hz, H3-GalN), 4.84 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, H1-GalN), 4.82 (ddd, 1H, $^3J_{H4,H3ax} = 11.8$ Hz, $^3J_{H4,H5} = 9.4$ Hz, $^3J_{H4,H3aq} = 4.6$ Hz, H4-Sia), 4.55 (td, 1H, $^3J_{H2,NH} \approx ^3J_{H2,H3} \approx 10.8$ Hz, $^3J_{H2,H1} = 3.8$ Hz, H2-GalN), 4.47 (d, 2H, $^3J_{CH2,H9} = 6.7$ Hz, CH₂-Fmoc), $4.31 - 4.14$ (m, 4H, H9-Fmoc {4.28}, H9_a-Sia {4.26}, Thr^α {4.23}, Thr^β {4.19}), $4.10 - 4.00$ (m, 3H, H5-Sia {4.07}, H6-Sia {4.07}, H9_b-Sia {4.05}), $3.98 - 3.91$ (m, 1H, H5-GalN), 3.80 (dd, 1H, $^3J_{H6a,H5} = 7.4$ Hz, $^2J_{H6a,H6b} = 10.4$ Hz, H6_a-GalN), 3.12 (dd, 1H, $^3J_{H6b,H5} = 4.4$ Hz, $^2J_{H6b,H6a} = 10.4$ Hz, H6_b-GalN), 2.55 (dd, 1H, $^3J_{H3aq,H4} = 4.6$ Hz, $^2J_{H3aq,H3ax} = 12.8$ Hz, H3_{aq}-Sia), $2.12, 2.09$ (2 x s, 6H, CH₃-CONH), $2.01, 2.01, 1.99$ (s_b, 12H, 4 x CH₃-Ac), 1.92 (m_c, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.86 (s_b, 6H, CH₃-Ac), 1.45 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.29 (d, 3H, $^3J_{Thr\gamma,Thr\beta} = 6.2$ Hz, Thr^γ).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 171.03, 170.91, 170.69, 170.51, 170.33, 170.28, 170.25, 169.76$ (C=O-Ac, C=O-Ser), 167.44 (C1-Sia), 156.66 (C=O-Fmoc), $143.97, 143.84$ (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.45 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 134.81 (C_{ipso}-Ph), $129.18, 128.98, 128.81$ (C_{o,m,p}-Ph), 127.90 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), $127.27, 127.24$ (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.22 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), $120.18, 120.15$ (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 100.22 (C1-GalN), 98.70 (C2-Sia), 83.19 (C-^tBu), 77.36 (Thr^β), 72.72 (C6-Sia), 69.08 (C3-GalN), 69.01 (C4-Sia), 68.62 (C5-GlcN), 68.12 (C8-Sia), 68.00 (CH₂-Bn), 67.73 (C4-GalN), 67.40 (CH₂-Fmoc), 67.20 (C7-Sia), 64.02 (C6-GalN), 62.50 (C9-Sia), 59.26 (Thr^α), 49.27 (C5-Sia), 47.38 (C2-GalN), 47.34 (C9-Fmoc), 37.75 (C3-Sia), 28.23 (CH₃-^tBu), $23.44, 23.33$ (2 x NHAc), $21.15, 20.96, 20.86, 20.78$ (6 x CH₃-Ac), 18.58 (Thr^γ).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1256.50$ ([M+Na]⁺, ber.: 1256.46).

C₆₁H₇₄N₃O₂₄ (1234.25)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (27)**
 (Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂Nac)-OH)



Eine Lösung aus 1.92 g (1.56 mmol) Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂Nac)-O^tBu (**26**) und 20 ml Dichlormethan wird mit 0.8 ml Wasser und 40 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wird 2 h bei Raumtemp. gerührt und dann mit 50 ml Toluol verdünnt. Die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und der gelbe Rückstand wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 2.6 cm im Laufmittelgemisch EtOAc → 6:1 → 3:1 EtOAc/EtOH). Letzte Verunreinigungen werden mittels präparativer RP-HPLC entfernt. R_t = 28.03 min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-1), R_t = 45.18 min (Gerät 2, Säule: Luna-1, Gradient: Präp-1).

Ausbeute: 1.55 g (1.31 mmol, 84 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = +29.9$ ($c = 1.00$, MeOH), Lit.:^[157] $[\alpha]_D^{22} = +29.1$ ($c = 1.00$, MeOH), $R_f = 0.20$ (EtOAc/EtOH, 2:1).

300 MHz-¹H-NMR (MeOH-d₄): [δ/ppm] = 7.78 (m_c, 2H, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.67 (m_c, 2H, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.44 – 7.25 (m, 9H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 5.38 – 5.26 (m, 3H, H7-Sia, H8-Sia, CH_{2a}-Bn), 5.22 – 5.13 (m, 2H, H4-GalN, CH_{2b}-Bn), 4.95 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 11.4 Hz, ³J_{H3,H4} = 3.2 Hz, H3-GalN), 4.85 – 4.75 (m, 2H, H1-GalN, H4-Sia), 4.62 (dd, 1H, ³J_{CH2a,H9} = 6.3 Hz, ²J_{CH2a,H9} = 10.8 Hz, CH_{2a}-Fmoc), 4.44 (dd, 1H, ³J_{CH2b,H9} = 5.9 Hz, ²J_{CH2b,H9} = 10.8 Hz, CH_{2b}-Fmoc), 4.38 – 4.14 (m, 6H, H2-GalN, H9-Fmoc, H9_a-Sia, Thr ^{α} , Thr ^{β} , H6-Sia), 4.08 – 3.90 (m, 3H, H5-Sia, H9_b-Sia, H5-GalN), 3.78 (dd, 1H, ³J_{H6a,H5} = 7.4 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 10.4 Hz, H6_a-GalN), 3.10 (dd, 1H, ³J_{H6b,H5} = 4.4 Hz, ²J_{H6b,H6a} = 10.4 Hz, H6_b-GalN), 2.63 (dd, 1H, ³J_{H3äq,H4} = 4.6 Hz, ²J_{H3äq,H3ax} = 12.7 Hz, H3_{äq}-Sia), 2.08, 2.07 (2 x s_b, 9H, 2 x CH₃-CONH, CH₃-Ac), 1.97, 1.97 (2 x s_b, 6H, 2 x CH₃-Ac), 1.92 (s_b, 3H, CH₃-Ac), 1.91 (m_c, 4H, H3_{ax}-Sia, CH₃-Ac), 1.81 (s_b, 3H, CH₃-Ac), 1.16 (d, 3H, ³J_{Thr γ ,Thr β} = 6.5 Hz, Thr ^{γ}).

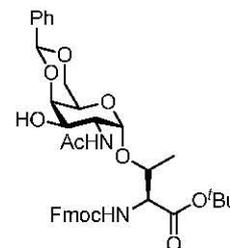
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1200.54 ([M+Na]⁺, ber.: 1200.40).

C₅₇H₆₇N₃O₂₄ (1178.15)

5.6.1.2 Die Synthese von *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (37)^[88]

(Fmoc-Thr(α -4,6-Bzn-GalNAc)-*O*^tBu)



4.00 g (5.10 mmol) Fmoc-Thr(α -GalNAc)-*O*^tBu (**24**) werden in 190 ml Acetonitril gelöst und mit 5.86 ml (5.97 g, 39.3 mmol, 7.70 Äquiv.) Benzaldehyddimethylacetal versetzt. Die Mischung wird mit 4-Toluolsulfonsäure-Monohydrat, gelöst in Acetonitril, versetzt bis ein pH-Wert zwischen 4.0 – 3.5 erreicht ist. Der Ansatz wird 18 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend durch tropfenweise Zugabe von *N*-Ethyl-diisopropylamin unter ständiger Kontrolle des pH-Werts neutralisiert. Die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und der gelbe Rückstand (9.42 g) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 34.0 cm, Durchmesser = 8.50 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 2:1 → 3:5 → 2:5) gereinigt.

Ausbeute: 3.48 g (3.99 mmol, 78 %), Lit.:^[88] 63 % bezogen auf **24**; farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{22} = +70.5$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.: ^[88] $[\alpha]_D^{23} = +72.0$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.23$ (^cHex/EtOAc, 2:5).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.78$ (d, 2H, ³ $J_{H4,H3} = {}^3J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, ³ $J_{H1,H2} = {}^3J_{H8,H7} = 7.6$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.57 – 7.47 (m, 2H, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.48 – 7.28 (m, 7H, H2-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 6.52 (d, 1H, ³ $J_{NH,H2} = 8.5$ Hz, NH-GalN), 5.60 – 5.46 (m, 2H, CH-Bzn {5.57, s}, NH-Thr {5.53, d, ³ $J_{NH,Thr\alpha} = 8.6$ Hz}), 4.96 (d, 1H, ³ $J_{H1,H2} = 3.6$ Hz, H1-GalN), 4.56 – 4.40 (m, 3H, H2-GalN {4.52}, CH₂-Fmoc {4.46, d, ² $J_{CH2,H9} = 6.9$ Hz}), 4.31 – 3.99 (m, 6H, H5-GalN, H6_a-GalN, H6_b-GalN, H9-Fmoc, Thr ^{α} , Thr ^{β}), 3.87 (dd, 1H, ³ $J_{H3,H2} = 11.0$ Hz, ³ $J_{H3,H4} = 3.4$ Hz, H3-GalN), 3.71 (m_c, 1H, H4-GalN), 2.10 (s, 3H, CH₃-Ac), 1.47 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.29 (d, 3H, ³ $J_{Thr\gamma,Thr\beta} = 6.3$ Hz, Thr ^{γ}).

75.5 MHz-¹³C-NMR [BB, DEPT] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 172.66, 171.02$ (C=O-Ac, C=O-Thr), 156.56 (C=O-Fmoc), 143.80 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.48 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 137.58 (C_{ipso}-Bzn), 129.29, 128.38 (C_{o,m,p}-Ph), 127.98 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.24 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 126.44 (C_{o,m,p}-Ph), 125.13 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.19 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.34 (CH-Bzn), 100.62 (C1-GalN), 83.64 (C-^tBu), 76.90 (Thr ^{β}), 75.67 (C3-GalN), 70.01

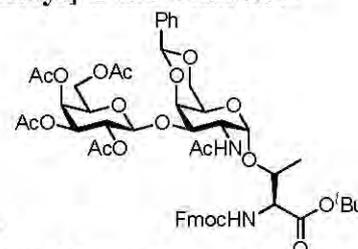
(C4-GalN), 69.33 (C6-GalN), 67.34 (CH₂-Fmoc), 63.84 (C5-GalN), 59.02 (Thr^α), 50.59 (C2-GalN), 47.35 (C9-Fmoc), 28.24 (CH₃-^tBu), 23.21 (CH₃-Ac), 19.17 (Thr^γ).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): $[m/z] = 711.30$ ($[M+Na]^+$, ber.: 711.29).

C₃₈H₄₄N₂O₁₀ (688.76)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl]-*L*-threonin-*tert*-butylester (38)**^[88]

(Fmoc-Thr[α-3-(β-Ac₄Gal)-4,6-Bzn-GalNAc]-O^tBu)



Eine Suspension aus 60 ml absol. Dichlormethan und 20 ml absol.

Nitromethan, 2.57 g (3.73 mmol) Fmoc-Thr(α-4,6-Bzn-GalNAc)-O^tBu (**37**) und 6.0 g Molekularsieb (4 Å) wird unter Argon 30 min bei Raumtemp. gerührt. Es werden 1.88 g (7.47 mmol, 2.00 Äquiv.) Quecksilber(II)-cyanid im Argongegenstrom hinzugegeben und weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird eine Lösung von 7.50 g (18.24 mmol, 4.90 Äquiv.) α-Ac₄Gal-Br (**8**) in einer Mischung aus 15 ml absol. Dichlormethan und 5 ml absol. Nitromethan langsam zugetropft und 1 h bei 0 °C gehalten. Danach wird die Suspension mit weiteren 1.88 g (7.47 mmol, 2.00 Äquiv.) Quecksilber(II)-cyanid versetzt, das Eisbad entfernt und der Ansatz weitere 18 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 200 ml Dichlormethan verdünnt, über Hyflo[®] filtriert und mehrmals mit Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird dreimal mit 100 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 100 ml einer ges. Natriumiodid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Das resultierende Rohprodukt (10.40 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 40.0 cm, Durchmesser = 8.50 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 2:1 → 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.15 g (3.09 mmol, 83 %), Lit.:^[88] 63 %; farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{26} = +64.3$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[88] $[\alpha]_D^{23} = +63.0$ ($c = 1.01$, CHCl₃), $R_f = 0.77$ (EtOAc), $R_f = 0.26$ (^cHex/EtOAc, 1:2).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.79$ (d, 2H, ³J_{H4,H3} = ³J_{H5,H6} = 7.5 Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, ³J = 7.3 Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.58 – 7.49 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.47 – 7.29 (m, 7H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 5.86 (s_b, 1H, NH-GalN), 5.61 (s_b, 1H, NH-Thr), 5.56 (s, 1H, CH-Bzn), 5.39 (d, 1H, ³J_{H4,H3} = 3.3 Hz, H4-Gal'), 5.20 (dd, 1H, ³J_{H2,H3} = 10.4 Hz, ³J_{H2,H1} = 7.7 Hz, H2-Gal'), 5.02 – 4.90 (m, 2H, H3-Gal' {4.99}, H1-GalN {4.94}), 4.76 – 4.63 (m, 2H, H1-Gal' {4.74}, H2-GalN {4.69}), 4.60 – 4.43 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.31 – 4.17 (m, 6H, H4-GalN {4.28}, H9-Fmoc {4.26}, Thr^α {4.23}, H6_a-GalN

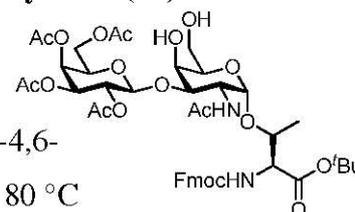
{4.22}, H6_a-Gal' {4.22}, Thr^β {4.21}), 4.16 – 4.05 (m, 2H, H6_b-Gal' {4.12, dd, ³J_{H6b,H5} = 6.6 Hz, ²J_{H6b,H6a} = 9.6 Hz}, H6b-GalN {4.06}), 3.94 – 3.85 (m, 2H, H3-GalN {3.91}, H5-Gal' {3.90}), 3.68 (s, 1H, H5-GalN), 2.15, 2.05, 2.04, 2.01, 1.97 (5 x s, 15H, CH₃-Ac), 1.45 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.27 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 7.1 Hz, Thr^γ).

75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [δ/ppm] = 170.61, 170.48, 170.38, 169.88, 169.65 (C=O-Ac, C=O-Thr), 156.65 (C=O-Fmoc), 143.81 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.49 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 137.67 (C_{ipso}-Bzn), 128.97, 128.32, 128.28, 127.97, 127.23, 126.35, 126.16 (C2-Fmoc, C3-Fmoc, C6-Fmoc, C7-Fmoc, C_{o,m,p}-Ph), 125.02 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 123.23 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.42 (C1-Gal'), 100.82 (CH-Bzn), 100.60 (C1-GalN), 83.37 (C-^tBu), 76.32 (Thr^β), 75.72 (C4-GalN), 74.34 (C3-GalN), 71.01 (C3-Gal', C5-Gal'), 69.24 (C6-GalN), 68.82 (C2-Gal'), 67.11, 66.96 (C4-Gal', CH₂-Fmoc), 63.82 (C5-GalN), 61.45 (C6-Gal'), 59.22 (Thr^α), 47.94 (C2-GalN), 47.34 (C9-Fmoc), 28.21 (CH₃-^tBu), 23.60, 20.84, 20.72 (5 x CH₃-Ac), 19.16 (Thr^γ).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): [m/z] = 1041.38 ([M+Na]⁺, ber.: 1041.38).

C₅₂H₆₂N₂O₁₉ (1019.05)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl]-L-threonin-*tert*-butylester (39)^[89]
(Fmoc-Thr[α-3-(β-Ac₄Gal)-GalNAc]-O^tBu)**



Eine Lösung von 3.15 g (3.09 mmol) Fmoc-Thr[α-3-(β-Ac₄Gal)-4,6-Bzn-GalNAc]-O^tBu (**38**) in 40 ml 80%iger Essigsäure wird 1 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf Raumtemp. abgekühlt, mit 100 ml Toluol verdünnt und Essigsäure sowie Toluol i. Hochvak. entfernt. Der Rückstand (2.90 g) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 3.5 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 2:1 → 1:1 → 1:4).

Ausbeute: 2.24 g (2.40 mmol, 78 %); farbloser, amorpher Feststoff, [α]_D²⁵ = + 39.0 (*c* = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[89] [α]_D²³ = + 43.9 (*c* = 1.00, CHCl₂), *R*_f = 0.15 (^cHex/EtOAc, 1:4).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.74 (d, 2H, ³J_{H4,H3} = ³J_{H5,H6} = 7.5 Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, ³J_{H1,H2} = ³J_{H8,H7} = 7.3 Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.42 (t_p, 2H, ³J_{H3,H2} ≈ ³J_{H3,H4} ≈ ³J_{H6,H5} ≈ ³J_{H6,H7} ≈ 7.4 Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.37 – 7.29 (m, 2H, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.96 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 9.7 Hz, NH-GalN), 5.52 (d, 1H, ³J_{NH,Thrα} = 9.4 Hz, NH-Thr), 5.38 (dd, 1H, ³J_{H4,H3} = 3.4 Hz, ³J_{H4,H5} = 1.1 Hz, H4-Gal'), 5.20 (dd, 1H, ³J_{H2,H3} = 10.6 Hz, ³J_{H2,H1} = 8.0 Hz, H2-Gal'), 4.97 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.6 Hz, ³J_{H3,H4} = 3.3 Hz, H3-Gal'), 4.84 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 3.8 Hz, H1-GalN), 4.64 – 4.35 (m, 4H,

H1-Gal' {4.61}, H2-GalN {4.56}, CH₂-Fmoc {4.53}), 4.28 – 4.00 (m, 6H, H9-Fmoc {4.26}, Thr^α {4.22}, Thr^β {4.16}, H6_a-Gal' {4.16}, H4-GalN {4.11}, H6_b-Gal' {4.09}), 3.96 – 3.87 (m, 2H, H6_a-GalN {3.92}, H5-Gal' {3.91}), 3.87 – 3.75 (m, 2H, H5-GalN {3.85}, H6_b-GalN {3.80}), 3.70 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.5 Hz, ³J_{H3,H4} = 3.2 Hz, H3-GalN), 2.99 (s, 1H, OH4-GalN), 2.71 (s, 1H, OH6-GalN), 2.16, 2.08, 2.04, 2.00, 1.98 (5 x s, 15H, CH₃-Ac), 1.45 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.26 (d, 3H, ³J_{Thr^γ,Thr^β} = 7.2 Hz, Thr^γ).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 170.53, 170.35, 170.28, 169.99, 169.63 (C=O-Ac, C=O-Thr), 156.49 (C=O-Fmoc), 143.80, 143.73 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.45 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.96 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.21 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.02 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.22, 120.19 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.71 (C1-Gal'), 100.18 (C1-GalN), 83.35 (C-^tBu), 77.98 (C3-GalN), 76.36 (Thr^β), 70.95 (C5-Gal'), 70.76 (C3-Gal'), 69.99 (C5-GalN), 69.63 (C4-GalN), 68.61 (C2-Gal'), 67.00 (C4-Gal'), 66.94 (CH₂-Fmoc), 62.90 (C6-GalN), 61.38 (C6-Gal'), 59.14 (Thr^α), 47.62 (C2-GalN), 47.37 (C9-Fmoc), 28.19 (CH₃-^tBu), 23.44, 20.83, 20.77, 20.73, 20.67 (CH₃-Ac), 18.84 (Thr^γ).

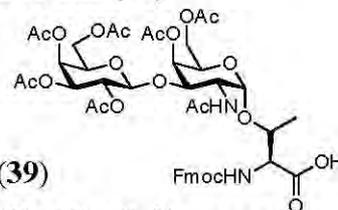
ESI-MS (Gerät 2, positiv): [m/z] = 953.34 ([M+Na]⁺, ber.: 953.35).

1884.67 ([2M+Na]⁺, ber.: 1884.72).

C₄₅H₅₈N₂O₁₉ (930.94)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl]-L-threonin (40)^[89]**

(Fmoc-Thr[α-3-(β-Ac₄Gal)-GalAc₂Nac]-OH)



Zu 750 mg (0.806 mmol) Fmoc-Thr[α-3-(β-Ac₄Gal)-GalNac]-O^tBu (**39**)

werden 60 ml einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus Acetanhydrid/Pyridin (1:2) zugegeben und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Danach werden die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. entfernt und es wird dreimal mit 80 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 150 ml Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit 20 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Dichlormethan i. Vak. evaporiert. Der erhaltene Feststoff wird mit 20 ml einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus Trifluoressigsäure und Wasser (19:1) versetzt und dann 1 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird die Mischung mit 50 ml Toluol verdünnt und die flüchtigen Bestandteile i. Vak. entfernt. Der erhaltene Rückstand wird zweimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und säulenchromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 25.0 cm, Durchmesser = 2.5 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 1:1 → 2:3) gereinigt.

Ausbeute: 587 mg (0.61 mmol, 76 %); farbloser Feststoff, [α]_D²⁵ = + 59.3 (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[89] [α]_D²³ = + 63.1 (c = 1.00, CH₂Cl₂), R_f = 0.15 (^cHex/EtOAc, 2:3).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.78 (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.7$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.8$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.41 (t, 2H, $^3J_{H3,H2} = ^3J_{H3,H4} = ^3J_{H6,H5} = ^3J_{H6,H7} = 7.6$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.32 (t, 2H, $^3J_{H2,H2} = ^3J_{H2,H3} = ^3J_{H7,H6} = ^3J_{H7,H8} = 7.2$ Hz, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 6.17 (d, 1H, $^3J_{NH,H2} = 8.9$ Hz, NH-GalN), 5.59 (d, 1H, $^3J_{NH,Thr\alpha} = 9.2$ Hz, NH-Thr), 5.39 – 5.32 (m, 2H, H4-GalN {5.38}, H4-Gal' {5.36}), 5.12 – 5.04 (m, 1H, H2-Gal' {5.10}), 5.01 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, H1-GalN), 4.94 (dd, 1H, $^3J_{H3,H2} = 10.5$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 3.4$ Hz, H3-Gal'), 4.57 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 7.8$ Hz, H1-Gal'), 4.52 (d, 2H, $^3J_{CH_2-Fmoc,H_9-Fmoc} = 6.6$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.42 – 4.34 (m, 3H, Thr^b {4.40}, Thr^a {4.39}, H2-GalN {4.38}), 4.28 – 4.21 (m, 1H, H9-Fmoc {4.24}), 4.18 – 4.07 (m, 3H, H6_a-Gal' {4.15}, H6_a-GalN {4.14}, H3-GalN {4.14}), 4.04 – 3.92 (m, 2H, H6_b-GalN {3.99}, H6_b-Gal' {3.99}), 3.92 – 3.75 (m, 2H, H5-Gal' {3.87}, H5-GalN {3.85}), 2.15, 2.12, 2.06, 2.04, 2.01, 1.99, 1.98 (7 x s, 21H, CH₃-Ac), 1.28 (d, 3H, $^3J_{Thr\gamma,Thr\beta} = 6.2$ Hz, Thr^γ).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 173.40 (COOH), 172.44, 170.78, 170.65, 170.51, 170.43, 170.25, 170.13 (6 x C=O-Ac, 1 x C=O-Thr), 156.77 (C=O-Fmoc), 143.90, 143.79 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.45 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.96 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.14 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 124.99 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.22 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 100.41 (C1-Gal'), 99.54 (C1-GalN), 76.36 (Thr^b), 72.61 (C5-GalN), 71.00 (C5-Gal'), 70.80 (C3-Gal'), 69.01 (C2-Gal'), 68.68 (C4-GalN), 67.87 (C3-GalN), 67.02 (CH₂-Fmoc), 66.87 (C4-Gal'), 62.97, 61.26 (C6-GalN, C6-Gal'), 58.59 (Thr^α), 49.34 (C2-GalN), 47.38 (C9-Fmoc), 22.89, 20.85, 20.84, 20.81, 20.76, 20.70, 20.66 (7 x CH₃-Ac), 18.47 (Thr^γ).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): [m/z] = 981.26 ([M+Na]⁺, ber.: 981.31)

1939.56 ([2M+Na]⁺, ber.: 1939.63).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 981.3119 ([M+Na]⁺, ber.: 981.3117).

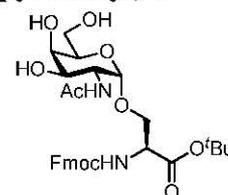
C₄₅H₅₄N₂O₂₁ (958.91)

5.6.2 Die Synthesen des Disaccharid-Serin-Konjugats

5.6.2.1 Die Synthese von *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-di-desoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-serin

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-serin-*tert*-butylester (**28**)^[154]

(Fmoc-Ser(α -GalNAc)-*O*^{*t*}Bu)



6.85 g (9.61 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-*O*^{*t*}Bu (**16**) werden in 150 ml

Methanol gelöst und unter Kontrolle des pH-Werts mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 18 h bei einem pH-Wert von 8.5 gerührt, wobei durch stündliche Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung der pH-Wert nachreguliert wird. Anschließend wird die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure neutralisiert und die Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Der Rückstand (5.96 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 40.0 cm, Durchmesser = 6.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 2:1 → EtOAc → EtOAc/EtOH → 20:1).

Ausbeute: 4.63 g (7.89 mmol, 82 %); farbloser Feststoff, $R_f = 0.25$ (EtOAc/EtOH, 9:1).

300 MHz-¹H-NMR ($CDCl_3$): [δ/ppm] = 7.75 (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.6$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.39 (t, 2H, $^3J_{H3,H2} = ^3J_{H3,H4} = ^3J_{H6,H5} = ^3J_{H6,H7} = 7.4$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.30 (t, 2H, $^3J_{H2,H1} = ^3J_{H2,H3} = ^3J_{H7,H6} = ^3J_{H7,H8} = 7.4$ Hz, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 6.47 (d, 1H, $^3J_{NH,H2} = 7.5$ Hz, NH-GalN), 6.00 (d, 1H, $^3J_{NH,Thr\alpha} = 8.4$ Hz, NH-Ser), 4.82 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} \approx 2.6$ Hz, H1-GalN), 4.51 – 4.27 (m, 4H, Ser ^{α} , CH₂-Fmoc, H2-GalN), 4.21 (t, 1H, $^3J_{H9,CH2} = 7.0$ Hz, H9-Fmoc), 4.02 (m_c, 1H, H4-GalN), 3.98 – 3.69 (m, 6H, H3-GalN, H5-GalN, H6_{ab}-GalN, Ser ^{β}), 2.02 (s, 3H, CH₃-Ac), 1.46 (s, 9H, CH₃-^{*t*}Bu).

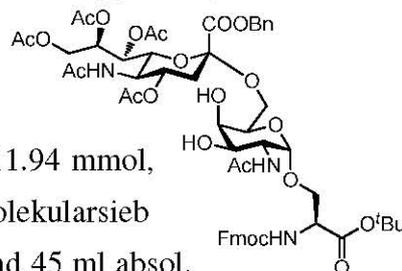
75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] ($CDCl_3$): [δ/ppm] = 169.73, 169.70 (C=O-Ac, C=O-Ser), 156.26 (C=O-Fmoc), 143.80 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.43 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.95 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.25 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.15 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.19 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 98.83 (C1-GalN), 83.27 (C-^{*t*}Bu), 70.69 (Ser ^{β}), 70.32, 69.56, 69.26 (C3-GalN, C4-GalN, C5-GalN), 67.33 (CH₂-Fmoc), 62.76 (C6-GalN), 55.14 (Ser ^{α}), 50.70 (C2-GalN), 47.22 (C9-Fmoc), 28.15 (CH₃-^{*t*}Bu), 23.12 (CH₃-CONH).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 609.20$ ($[M+Na]^+$, ber.: 609.24).

$C_{30}H_{38}N_2O_{10}$ (586.63)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (29)**^[154]

(Fmoc-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalNAc)-O^tBu)



2.80 g (4.77 mmol) Fmoc-Ser(α -GalNAc)-O^tBu (**28**), 8.02 g (11.94 mmol, 2.50 Äquiv.) reines α -Ac₅NeuNAcCOOBn-Xan (**22**) und 9 g Molekularsieb (4 Å) werden in einer Mischung aus 90 ml absol. Acetonitril und 45 ml absol.

Dichlormethan suspendiert und unter Argon 30 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird die Lösung auf $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt, unter Lichtausschluss werden 3.31 g (12.88 mmol, 1.08 Äquiv. bezogen auf **22**) trockenes Silbertrifluormethansulfonat hinzugegeben und die Mischung wird weitere 45 min bei $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Danach werden 7.80 ml (12.48 mmol, 1.05 Äquiv. bezogen auf **22**) einer vorgekühlten 1.6 M Methylsulfenylbromid-Lösung in absol. 1,2-Dichlorethan innerhalb von 45 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 3 h bei $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend werden weitere 0.40 g (1.56 mmol, 0.13 Äquiv. bezogen auf das Xanthogenat) Silbertrifluormethansulfonat und 0.80 ml (1.28 mmol, 0.11 Äquiv.) Methylsulfenylbromid-Lösung auf einmal hinzugegeben und es wird bei $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ weitere 5 h gerührt. Nach insgesamt 8 h wird durch Zugabe von 6.0 ml *N*-Ethyl-diisopropylamin neutralisiert, die Reaktionsmischung auf Raumtemp. erwärmt, mit 150 ml Dichlormethan verdünnt und über einer dünnen Schicht Hyflo[®] filtriert. Der Filterkuchen wird fünfmal mit 50 ml Dichlormethan gewaschen und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (19.65 g) wird durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Säule 1 Länge = 7.0 cm, Durchmesser = 6.5 cm, in EtOAc gesäult, Rückstand 8.55 g, Säule 2 Länge = 44.0 cm, Durchmesser = 6.5 cm im Laufmittelgemisch $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:5 \rightarrow EtOAc \rightarrow EtOAc/EtOH \rightarrow 40:1) gereinigt. Das Eliminierungsprodukt und das β -Anomer werden durch präparative RP-HPLC abgetrennt. $R_t = 34.65$ min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-2), $R_t = 57.72$ min (Gerät 2, Säule: Luna-1, Gradient: Präp-2).

Ausbeute: 3.28 g (2.89 mmol, 61 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{22} = +6.4$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[154] $[\alpha]_D^{22} = +4.8$ ($c = 1.00$, CH_2Cl_2), $R_f = 0.40$ (EtOAc/EtOH, 10:1), $R_f = 0.21$ (EtOAc/EtOH, 20:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 7.76$ (d, 2H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = ^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.6$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.58 (d, 2H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = ^3J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.6$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.43 – 7.37 (m, 2H, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.37 – 7.27 (m, 7H, H2-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 6.37 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{H}_2} = 8.1$ Hz, NH-GalN), 5.74 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{Thr}\alpha} = 8.0$ Hz, NH-Thr), 5.36 (ddd, 1H,

$^3J_{\text{H8,H7}} \approx 7.7$ Hz, $^3J_{\text{H8,H9a}} \approx 2.6$ Hz, H8-Sia), 5.31 (dd, 1H, $^3J_{\text{H7,H8}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{H7,H6}} = 1.7$ Hz, H7-Sia), 5.29 – 5.15 (m, 3H, CH_{2ab}-Bn, NH-Sia {5.26}), 4.83 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H4,H3ax}} = 12.0$ Hz, $^3J_{\text{H4,H5}} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{H4,H3aq}} = 4.7$ Hz, H4-Sia), 4.78 (d, 1H, $^3J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz, H1-GalN), 4.50 – 4.37 (m, 3H, CH₂-Fmoc {4.47}, Ser^α {4.42}), 4.35 (dd, 1H, $^3J_{\text{H9a,H8}} = 2.6$ Hz, $^2J_{\text{H9a,H9b}} = 12.4$ Hz, H9_a-Sia), 4.29 – 4.15 (m, 3H, H2-GalN {4.26}, Ser^{βa} {4.25}, H9-Fmoc {4.22}), 4.14 – 4.02 (m, 3H, H5-Sia {4.09}, H6-Sia {4.08}, H9_b-Sia {4.06}), 3.88 (dd, 1H, $^3J_{\text{H6a,H5}} = 6.2$ Hz, $^2J_{\text{H6a,H6b}} = 9.8$ Hz, H6_a-GalN), 3.83 – 3.65 (m, 4H, H4-GalN {3.79}, H5-GalN {3.73}, H3-GalN {3.69}, Ser^{βb} {3.69}), 3.56 (dd, 1H, $^3J_{\text{H6b,H5}} = 6.1$ Hz, $^2J_{\text{H6b,H6a}} = 9.8$ Hz, H6_b-GalN), 2.62 (dd, 1H, $^3J_{\text{H3aq,H4}} = 4.7$ Hz, $^2J_{\text{H3aq,H3ax}} = 12.8$ Hz, H3_{aq}-Sia), 2.12, 2.11 (2 x s, 6H, CH₃-Ac), 2.02, 2.02, 2.01 (3 x s, 9H, CH₃-Ac), 1.97 (m_c, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.88 (s, 3H, CH₃-Ac), 1.48 (s, 9H, CH₃-^tBu).

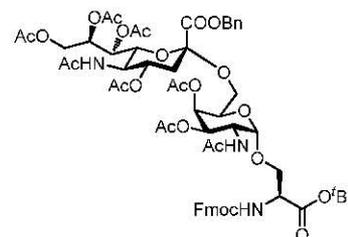
75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [δ/ppm] = 173.03, 171.12, 170.88, 170.47, 170.37, 170.26, 169.79 (C=O-Ac, C=O-Ser), 167.55 (C1-Sia), 156.15 (C=O-Fmoc), 143.79 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.42 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 134.92 (C_{ipso}-Ph), 128.92, 128.89, 128.64 (C_{o,m,p}-Ph), 127.94 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.24 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.12 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.18 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 98.93 (C1-GalN), 98.71 (C2-Sia), 83.25 (C-^tBu), 72.97 (C6-Sia), 71.11 (C3-GalN), 69.12 (C5-GlcN, C7-Sia), 69.05 (C4-Sia), 68.75 (Ser^β), 68.16 (C4-GalN), 68.02 (CH₂-Bn), 67.58 (C8-Sia), 67.31 (CH₂-Fmoc), 63.92 (C6-GalN), 62.69 (C9-Sia), 54.92 (Ser^α), 50.74 (C2-GalN), 49.30 (C5-Sia), 47.22 (C9-Fmoc), 37.59 (C3-Sia), 28.14 (CH₃-^tBu), 23.29, 23.13 (2 x NHAc), 21.22, 21.19, 20.94, 20.91 (4 x CH₃-Ac).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1136.35 ([M+H]⁺, ber.: 1136.45).

C₅₆H₆₉N₃O₂₂ (1136.15)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (30)**^[154]

(Fmoc-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-*O*^tBu)



Zu 1.696 g (1.49 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalNAc)-*O*^tBu (**29**) wird eine Mischung aus 30 ml Pyridin und 15 ml Essigsäureanhydrid bei – 10 °C hinzugegeben. Das

Reaktionsgemisch wird 14 h bei – 10 °C gerührt und anschließend auf Raumtemp. erwärmt. Nach 16 h werden überschüssiges Essigsäureanhydrid sowie Pyridin i. Hochvak. entfernt. Der dunkelgelbe Rückstand wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 38.0 cm, Durchmesser =

3.5 cm) im Laufmittelgemisch (c Hex/EtOAc 1:5 \rightarrow EtOAc) gereinigt. $R_t = 34.91$ min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-1).

Ausbeute: 1.63 g (1.34 mmol, 90 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{22} = +28.6$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[154] $[\alpha]_D^{22} = +25.7$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.21$ (EtOAc).

400 MHz- $^1\text{H-NMR}$ [$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 7.76$ (d, 2H, $^3J_{\text{H4,H3}} = ^3J_{\text{H5,H6}} = 7.6$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $^3J_{\text{H1,H2}} = ^3J_{\text{H8,H7}} = 7.5$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.43 – 7.28 (m, 9H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$), 5.79 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,H2}} = 8.1$ Hz, NH-Thr), 5.71 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 9.9$ Hz, NH-GalN), 5.34 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H8,H7}} = 8.8$ Hz, $^3J_{\text{H8,H9b}} = 5.1$ Hz, $^3J_{\text{H8,H9a}} = 2.6$ Hz, H8-Sia), 5.29 (dd, 1H, $^3J_{\text{H7,H8}} = 8.8$ Hz, $^3J_{\text{H7,H6}} = 1.8$ Hz, H7-Sia), 5.19 (dd, 1H, $^3J_{\text{H4,H3}} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{H4,H5}} = 1.2$ Hz, H4-GalN), 5.16 (d_p, 2H, $^2J_{\text{CH2a,CH2b}} = 3.9$ Hz, $\text{CH}_{2\text{ab-Bn}}$), 5.07 – 4.97 (m, 2H, H3-GalN {5.04}, NH-Sia {5.02}), 4.84 – 4.75 (m, 2H, H1-GalN {4.83}, H4-Sia {4.80}), 4.56 (td, 1H, $^3J_{\text{H2,NH}} \approx ^3J_{\text{H2,H3}} \approx 10.5$ Hz, $^3J_{\text{H2,H1}} = 3.6$ Hz, H2-GalN), 4.49 – 4.34 (m, 3H, Ser $^\alpha$ {4.43}, CH_2 -Fmoc {4.42}), 4.29 – 4.21 (m, 2H, H9_a-Sia {4.26}, H9-Fmoc {4.27}), 4.07 (dd, 1H, $^3J_{\text{H8,H9b}} \approx 5.1$ Hz, $^2J_{\text{H9b,H9a}} = 7.8$ Hz, H9_b-Sia), 4.04 – 4.01 (m, 2H, H5-Sia {4.04}, H6-Sia {4.04}), 3.98 (m_c, 1H, Ser $^{\beta\text{a}}$), 3.93 (t, 1H, $^3J_{\text{H5,H6a}} \approx ^3J_{\text{H5,H6b}} \approx 6.1$ Hz, H5-GalN), 3.87 – 3.75 (m, 2H, Ser $^{\beta\text{b}}$ {3.84}, H6_a-GalN {3.80}), 3.15 (dd, 1H, $^3J_{\text{H6b,H5}} = 5.2$ Hz, $^2J_{\text{H6b,H6a}} = 10.2$ Hz, H6_b-GalN), 2.58 (dd, 1H, $^3J_{\text{H3}\ddot{\text{a}}\text{q,H4}} = 4.7$ Hz, $^2J_{\text{H3}\ddot{\text{a}}\text{q,H3}\text{ax}} = 12.9$ Hz, H3 $_{\ddot{\text{a}}\text{q}}$ -Sia), 2.10, 2.09 (2 x s, 9H, 2 x CH_3 -CONH, 1 x CH_3 -Ac), 2.01, 1.99, 1.94 (s_b, 12H, 4 x CH_3 -Ac), 1.90 (m_c, 1H, H3 $_{\text{ax}}$ -Sia), 1.86 (s_b, 3H, CH_3 -Ac), 1.47 (s, 9H, CH_3 - t Bu).

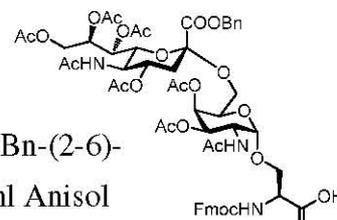
100.6 MHz- $^{13}\text{C-NMR}$ [BB, HMQC] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 170.94, 170.88, 170.77, 170.45, 170.30, 170.25, 170.16, 169.84$ (C=O-Ac, C=O-Ser), 167.40 (C1-Sia), 156.07 (C=O-Fmoc), 143.92, 143.88 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.43, 141.41 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 134.86 ($\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$), 129.09, 128.95, 128.73 ($\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$), 127.91 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.25 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.25 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.15 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 99.11 (C2-Sia), 98.77 (C1-GalN), 83.07 (C- t Bu), 72.75 (C6-Sia), 69.20 (C7-Sia), 69.01 (C4-Sia), 68.88 (Ser $^\beta$), 68.44 (C3-GalN), 68.18 (C5-GalN), 68.01 (C8-Sia, CH_2 -Bn), 67.49 (CH_2 -Fmoc), 67.42 (C4-GalN), 63.63 (C6-GalN), 62.53 (C9-Sia), 55.02 (Ser $^\alpha$), 49.32 (C5-Sia), 47.53 (C2-GalN), 47.27 (C9-Fmoc), 37.88 (C3-Sia), 28.18 (CH_3 - t Bu), 23.44, 23.36 (2 x NHAc), 21.21, 21.19, 20.95, 20.88, 20.82 (6 x CH_3 -Ac).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1220.47$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1220.47).

$\text{C}_{60}\text{H}_{72}\text{N}_3\text{O}_{24}$ (1219.22)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-serin (31)^[154]**

(Fmoc-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OH)



Eine Lösung von 1.67 g (1.36 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)-

α -GalAc₂NAc)-*O*^tBu (**30**) wird mit 30 ml Trifluoressigsäure und 2 ml Anisol

versetzt. Die Reaktionsmischung wird 3 h bei Raumtemp. gerührt und dann mit 50 ml Toluol verdünnt. Die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und der dunkle Rückstand wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 2.6 cm im Laufmittelgemisch EtOAc \rightarrow EtOAc/EtOH 6:1 \rightarrow 3:1) gereinigt. Anschließend erfolgt eine Reinigung mittels präparativer RP-HPLC. R_t = 44.23 min (Gerät 2, Säule: Luna-1, Gradient: Präp-1).

Ausbeute: 1.21 g (1.04 mmol, 76 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{24}$ = + 24.9 (c = 1.00, DMSO), Lit.^[154] $[\alpha]_D^{22}$ = + 26.8 (c = 1.00, DMSO), R_f = 0.15 (EtOAc/EtOH, 2:1).

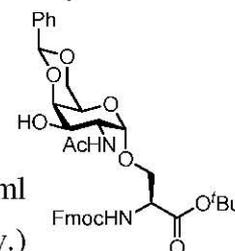
ESI-MS (positiv): $[m/z]$ = 1186.47 ($[M+Na]^+$, ber.: 1186.39).

C₅₆H₆₅N₃O₂₄ (1164.12)

5.6.2.2 Die Synthese von *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-galactopyranosyl)-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosyl]-*L*-serin-*tert*-butylester

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-serin-*tert*-butylester (41)^[155]**

(Fmoc-Ser(α -4,6-Bzn-GalNAc)-*O*^tBu)



2.50 g (4.26 mmol) Fmoc-Ser(α -GalNAc)-*O*^tBu (**28**) werden in 120 ml Acetonitril gelöst und mit 4.90 ml (5.00 g, 32.90 mmol, 7.70 Äquiv.)

Benzaldehyddimethylacetal versetzt. Die Mischung wird mit 4-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (1g/10ml), gelöst in Acetonitril, versetzt bis ein pH-Wert von 3.5 erreicht ist. Der Ansatz wird 18 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend durch tropfenweise Zugabe von *N*-Ethyl-diisopropylamin unter ständiger Kontrolle des pH-Werts neutralisiert. Die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und der gelbe Rückstand (7.42 g) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 34.0 cm, Durchmesser = 6.5 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 2:1 \rightarrow 3:5 \rightarrow 2:5) gereinigt.

Ausbeute: 2.55 g (3.77 mmol, 89 %), Lit.:^[155] 63 % bezogen auf **28**; farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{22} = +80.2$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.20$ ($^c\text{Hex/EtOAc}$, 1:4).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 7.78$ (d, 2H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = ^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = ^3J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.5$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.55 – 7.46 (m, 2H, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.46 – 7.29 (m, 7H, H2-Fmoc, H7-Fmoc, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$), 5.98 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{H}_2} = 8.9$ Hz, NH-GalN), 5.72 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{Ser}^\alpha} = 8.0$ Hz, NH-Ser), 5.54 (s, 1H, CH-Bzn), 4.92 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.5$ Hz, H1-GalN), 4.54 – 4.31 (m, 4H, H2-GalN, Ser^α , $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.28 – 4.20 (m, 2H, H9-Fmoc, $\text{Ser}^{\beta\text{a}}$), 4.19 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 3.1$ Hz, H4-GalN), 4.04 – 3.92 (m, 2H, $\text{H}_b\text{-Ser}^\beta$, $\text{H}_{6\text{a}}\text{-GalN}$), 3.90 – 3.76 (m, 2H, $\text{H}_{6\text{b}}\text{-GalN}$, H3-GalN), 3.66 (s, 1H, H5-GalN), 2.97 (s_b, 1H, OH-GalN), 2.01 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$), 1.49 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$).

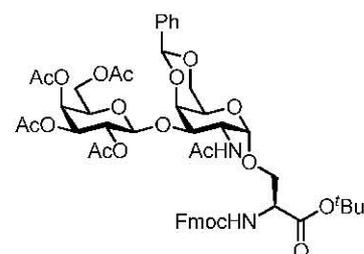
75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 172.72$, 169.48 (C=O-Ac, C=O-Thr), 156.11 (C=O-Fmoc), 143.85, 143.72 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.45 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 137.53 ($\text{C}_{\text{ipso-Bzn}}$), 129.30, 128.37 ($\text{C}_{o,m,p}\text{-Ph}$), 127.97 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.24 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 126.44 ($\text{C}_{o,m,p}\text{-Ph}$), 125.13, 125.04 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.23 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.33 (CH-Bzn), 99.67 (C1-GalN), 83.29 (C-^tBu), 75.45 (C3-GalN), 69.28 (Ser^β , C6-GalN), 68.11 (C4-GalN), 67.35 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 63.56 (C5-GalN), 55.11 (Ser^α), 50.35 (C2-GalN), 47.20 (C9-Fmoc), 28.17 ($\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$), 23.36 ($\text{CH}_3\text{-Ac}$).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): $[m/z] = 1371.62$ ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1371.56).

$\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{10}$ (674.74)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl]-L-serin-*tert*-butylester (**42**)^[155]**

(Fmoc-Ser[α -3-(β -Ac₄Gal)-4,6-Bzn-GalNAc]-O^tBu)



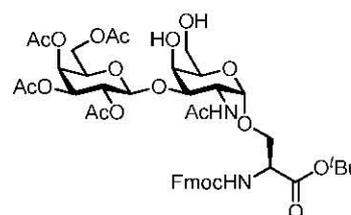
Eine Suspension aus 45 ml absol. Dichlormethan, 15 ml absol. Nitromethan, 2.15 g (3.19 mmol) Fmoc-Thr(α -4,6-Bzn-GalNAc)-O^tBu (**41**) und 5.0 g Molekularsieb (4 Å) wird unter Argon 30 min bei Raumtemp. gerührt. Es werden 1.61 g (6.37 mmol, 2.00 Äquiv.) Quecksilber(II)-cyanid im Argongegenstrom hinzugegeben und der Ansatz weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird eine Lösung von 3.93 g (9.56 mmol, 3.00 Äquiv.) α -Ac₄Gal-Br (**8**) in einer Mischung aus 9 ml absol. Dichlormethan und 3 ml absol. Nitromethan langsam zutropft und 1 h bei 0 °C gehalten. Danach wird die Suspension mit weiteren 1.61 g (6.37 mmol, 2.00 Äquiv.) Quecksilber(II)-cyanid versetzt, das Eisbad entfernt und der Ansatz weitere 18 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 200 ml Dichlormethan verdünnt, über Hyflo[®] filtriert und mehrmals mit Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird dreimal mit 100 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-

Lösung und einmal mit 100 ml einer ges. Natriumiodid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Das Rohprodukt (5.17 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 40.0 cm, Durchmesser = 6.50 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 2:1 → 1:1 → 3:5) gereinigt und ohne Charakterisierung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 2.63 g (2.61 mmol, 82 %); farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.75$ (EtOAc), $R_f = 0.30$ (^cHex/EtOAc, 1:2).

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl]-L-serin-*tert*-butylester (43)** ^[155]

(Fmoc-Ser[α -3-(β -Ac₄Gal)-GalNAc]-*O*^tBu)



Eine Lösung aus 2.63 g (2.62 mmol) Fmoc-Ser[α -3-(β -Ac₄Gal)-4,6-Bzn-GalNAc]-*O*^tBu (42) in 100 ml 80%iger Essigsäure wird 1 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung

auf Raumtemp. abgekühlt, mit 100 ml Toluol verdünnt und Essigsäure sowie Toluol i. Hochvak. entfernt. Der Rückstand (2.45 g) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.5 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 2:1 → 1:1 → 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 1.86 g (2.03 mmol, 78 %); farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = 43.4$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.17$ (^cHex/EtOAc, 1:4).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.78 (d, 2H, ³ $J_{H_4,H_3} = ^3J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, ³ $J_{H_1,H_2} = ^3J_{H_8,H_7} = 7.6$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.42 (t, 2H, ³ $J_{H_3,H_2} = ^3J_{H_3,H_4} = ^3J_{H_6,H_5} = ^3J_{H_6,H_7} = 7.4$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.33 (t, 2H, ³ $J_{H_2,H_1} = ^3J_{H_2,H_3} = ^3J_{H_7,H_6} = ^3J_{H_7,H_8} = 7.4$ Hz, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.81 (d, 1H, ³ $J_{NH,H_2} = 6.9$ Hz, NH-GalN), 5.66 (d, 1H, ³ $J_{NH,Ser^\alpha} = 9.4$ Hz, NH-Ser), 5.36 (d, 1H, ³ $J_{H_4,H_3} = 3.3$ Hz, H4-Gal'), 5.19 (dd, 1H, ³ $J_{H_2,H_3} = 10.5$ Hz, ³ $J_{H_2,H_1} = 7.9$ Hz, H2-Gal'), 5.02 – 4.90 (m, 1H, H3-Gal' {4.95}), 4.81 (d, 1H, ³ $J_{H_1,H_2} \approx 3.0$ Hz, H1-GalN), 4.65 – 4.33 (m, 5H, H1-Gal', H2-GalN, Ser ^{α} , CH₂-Fmoc), 4.23 (t, 1H, ³ $J_{H_9,CH_2-Fmoc} = 6.6$ Hz, H9-Fmoc), 4.18 – 4.01 (m, 4H, H4-GalN, H6_a-GalN, Ser ^{β}), 4.00 – 3.58 (m, 6H, H6_b-GalN, H5-GalN, H5-Gal', H6_{ab}-Gal', H3-GalN), 2.15, 2.06, 2.02, 1.98, 1.94 (5 x s, 15H, CH₃-Ac), 1.49 (s, 9H, CH₃-^tBu).

75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [δ/ppm] = 170.55, 170.35, 170.29, 169.71, 169.49 (C=O-Ac, C=O-Ser), 156.05 (C=O-Fmoc), 143.81 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.48, 141.43 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 128.02 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.29, 127.25 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.08 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.28, 120.23 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.63 (C1-Gal'), 99.30 (C1-GalN), 83.30 (C-^tBu), 78.21 (C3-GalN), 71.08, 70.73, 70.11, 69.54 (C3-Gal', C4-GalN, C5-GalN, C5-Gal'), 69.23 (Ser ^{β}), 68.66 (C2-Gal'), 67.11, 66.99 (CH₂-Fmoc, C4-Gal'), 62.93

(C6-GalN), 61.50 (C6-Gal'), 55.16 (Ser^α), 47.69 (C2-GalN), 47.25 (C9-Fmoc), 28.15 (CH₃-^tBu), 23.40 (Ac-NH), 20.82, 20.79, 20.72, 20.69 (4 x CH₃-Ac).

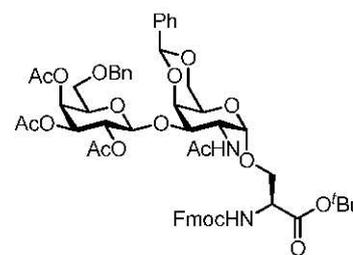
ESI-MS (Gerät 1, positiv): $[m/z] = 939.21$ ($[M+Na]^+$, ber.: 939.34).

C₄₄H₅₆N₂O₁₉ (916.92)

5.6.2.3 Die Synthese von *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-(6-*O*-benzyl-β-D-galactopyrano-syl)-α-D-galactopyranosyl]-L-serin-*tert*-butylester

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl)-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl]-L-serin-*tert*-butylester (**44**)^[154]

(Fmoc-Ser[α-3-(β-6-*O*-BnAc₃Gal)-4,6-Bzn-GalNAc]-*O*^tBu)



Eine Suspension aus 60 ml absol. Dichlormethan, 20 ml absol.

Nitromethan, 2.45 g (3.63 mmol) Fmoc-Ser(α-4,6-Bzn-GalNAc)-

O^tBu (**41**) und 6.3 g Molekularsieb (4 Å) wird unter Argon

30 min bei Raumtemp. gerührt. Es werden 1.84 g (7.26 mmol, 2.00 Äquiv.) Quecksilber(II)-cyanid im Argongegenstrom hinzugegeben und der Ansatz weitere 30 min bei 0 °C gerührt.

Anschließend wird eine Lösung von 6.67 g (14.52 mmol, 4.00 Äquiv.) α-6-Bn-Ac₃Gal-Br (**36**) in einer Mischung aus 30 ml absol. Dichlormethan und 10 ml absol. Nitromethan langsam zugetropft und 1 h bei 0 °C gehalten. Danach wird die Suspension mit weiteren 1.84 g (7.26 mmol, 2.00 Äquiv.) Quecksilber(II)-cyanid versetzt, das Eisbad entfernt und der Ansatz weitere 18 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog zu der von Verbindung (**42**). Das Rohprodukt (7.74 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 40.0 cm, Durchmesser = 8.50 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 2:1 → 1:1 → 3:5) gereinigt.

Ausbeute: 3.39 g (3.22 mmol, 89 %), Lit.:^[154] 91 %; farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = +53.3$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[154] $[\alpha]_D^{22} = +60.00$ ($c = 3.00$, CHCl₃), $R_f = 0.26$ (^cHex/EtOAc, 1:2).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.79$ (d, 2H, ³J_{H4,H3} = ³J_{H5,H6} = 7.5 Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.65 – 7.56 (m, 2H, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.56 – 7.48 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.42 (t, 2H, ³J_{H3,H2} = ³J_{H3,H4} = ³J_{H6,H5} = ³J_{H6,H7} = 7.5 Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.39 – 7.19 (m, 10H, H2-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 5.77 – 5.67 (m, 2H, NH-Ser {5.74}, NH-GalN {5.72, d, ³J_{NH,H2} = 8.6 Hz, }), 5.48 (s, 1H, CH-Bzn), 5.41 (d, 1H, ³J_{H4,H3} = 3.2 Hz, H4-Gal'), 5.20 (dd, 1H, ³J_{H2,H3} = 10.4 Hz, ³J_{H2,H1} = 7.9 Hz, H2-Gal'), 5.04 – 4.91 (m, 2H,

H1-GalN {5.00}, H3-Gal' {4.99}), 4.70 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 7.9$ Hz, H1-Gal'), 4.63 (tp, 1H, $^3J_{H2,NH} \approx ^3J_{H2,H3} \approx 8.9$ Hz, H2-GalN), 4.52 – 4.33 (m, 5H, CH_{2a}-Bn {4.49}, CH_{2a}-Fmoc {4.46}, Ser^α {4.42}, CH_{2b}-Bn {4.39}, CH_{2b}-Fmoc {4.38}), 4.28 (d, 1H, $^3J_{H4,H3} = 3.2$ Hz, H4-GalN), 4.23 (t, 1H, $^3J_{H9,CH2-Fmoc} = 6.7$ Hz, H9-Fmoc), 4.17 (dd, $^3J_{H6a,H5} = 1.6$ Hz, $^2J_{H6a,H6b} = 12.5$ Hz, H6_a-GalN), 3.98 – 3.88 (m, 3H, H_{ab}-Ser^β {3.95}, H3-GalN {3.92}), 3.88 – 3.78 (m, 2H, H6_b-GalN {3.85}, H5-Gal' {3.85}), 3.60 – 3.51 (m, 2H, H5-GalN {3.58}, H6_a-Gal' {3.55}), 3.46 (dd, 1H, $^3J_{H6b,H5} = 5.8$ Hz, $^2J_{H6b,H6a} = 9.5$ Hz, H6_b-Gal'), 2.07, 2.03, 1.98, 1.92 (4 x s, 12H, CH₃-Ac), 1.49 (s, 9H, CH₃-^tBu).

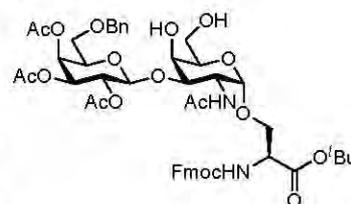
100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 170.41, 170.29, 169.76, 169.63, 169.33 (C=O-Ac, C=O-Ser), 155.98 (C=O-Fmoc), 143.79 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.45 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 137.75, 137.49 (C_{ipso}-Bzn, C_{ipso}-Bn), 128.91, 128.64, 128.62, 128.24, 128.10, 128.00 (C_{o,m,p}-Ph), 127.92 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.27 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 126.32 (C_{o,m,p}-Ph), 125.05 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.27 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.22 (C1-Gal'), 100.70 (CH-Bzn), 99.50 (C1-GalN), 83.11 (C-^tBu), 75.30 (C4-GalN), 74.12 (C3-GalN), 73.61 (CH₂-Bn), 72.44 (C5-Gal'), 71.26 (C3-Gal'), 69.18 (Ser^β), 69.14 (C6-GalN), 68.63 (C2-Gal'), 67.99 (C6-Gal'), 67.75 (C4-Gal'), 67.64 (CH₂-Fmoc), 63.56 (C5-GalN), 55.09 (Ser^α), 48.29 (C2-GalN), 47.22 (C9-Fmoc), 28.17 (CH₃-^tBu), 23.46 (Ac-NH), 20.88, 20.83, 20.75 (3 x CH₃-Ac).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): [m/z] = 1075.34 ([M+Na]⁺, ber.: 1075.41).

C₅₆H₆₃N₂O₁₈ (1052.10)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl]-L-serin-*tert*-butylester (45)^[154]**

(Fmoc-Ser[α -3-(β -6-*O*-BnAc₃Gal)-GalNAc]-*O*^tBu)



Eine Lösung von 2.80 g (2.66 mmol) Fmoc-Ser[α -3-(β -6-*O*-BnAc₃Gal)-4,6-Bzn-Gal-NAc]-*O*^tBu (**44**) in 40 ml 80%iger

Essigsäure wird 1 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf Raumtemp. abgekühlt, mit 100 ml Toluol verdünnt und Essigsäure sowie Toluol i. Hochvak. entfernt. Der Rückstand (2.47 g) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 3.5 cm) im Laufmittelgemisch (^cHex/EtOAc, 2:1 → 1:1 → 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 1.82 g (1.89 mmol, 71 %); farbloser, amorpher Schaum, [α]_D²⁵ = 40.00 (*c* = 1.00, CHCl₃), *R*_f = 0.15 (^cHex/EtOAc, 1:4).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.77 (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.7$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.6$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc),

7.45 (t, 2H, ${}^3J_{\text{H3,H2}} = {}^3J_{\text{H3,H4}} = {}^3J_{\text{H6,H5}} = {}^3J_{\text{H6,H7}} = 7.5$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.36 – 7.23 (m, 7H, H2-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 5.85 (d, 2H, ${}^3J_{\text{NH,Ser}\alpha} = 8.2$ Hz, NH-Ser), 5.69 (d, 1H, ${}^3J_{\text{NH,H2}} = 9.4$ Hz, NH-GalN), 5.40 (dd, 1H, ${}^3J_{\text{H4,H3}} = 3.5$ Hz, ${}^3J_{\text{H4,H3}} = 1.1$ Hz, H4-Gal'), 5.17 (dd, 1H, ${}^3J_{\text{H2,H3}} = 10.3$ Hz, ${}^3J_{\text{H2,H1}} = 7.7$ Hz, H2-Gal'), 4.97 (dd, 1H, ${}^3J_{\text{H3,H2}} = 10.4$ Hz, ${}^3J_{\text{H3,H4}} = 3.4$ Hz, H3-Gal'), 4.81 (d, 1H, ${}^3J_{\text{H1,H2}} = 3.8$ Hz, H1-GalN), 4.61 – 4.53 (m, 2H, H1-Gal' {4.56}, H2-GalN {4.57}), 4.51 – 4.33 (m, 5H, CH_{2a}Bn-Gal' {4.48}, CH_{2ab}-Fmoc {4.43}, Ser^α {4.42}, CH_{2b}Bn-Gal' {4.41}), 4.21 (t, 1H, ${}^3J_{\text{H9,CH2-Fmoc}} = 6.8$ Hz, H9-Fmoc), 4.08 – 4.04 (sb, 1H, H4-GalN {4.08}), 3.93 (dd, 1H, ${}^3J_{\text{Ser}\beta\text{a,Ser}\alpha} = 3.8$ Hz, ${}^3J_{\text{Ser}\beta\text{a,Ser}\beta\text{b}} = 11.9$ Hz, Ser^{βa}), 3.89 – 3.76 (m, 3H, H6_a-GalN {3.86}, H5-Gal' {3.85}, H_b-Ser^β {3.81}), 3.76 – 3.59 (m, 3H, H5-GalN {3.75}, H3-GalN {3.70}, H6_b-GalN {3.69}), 3.49 (dd, 1H, ${}^3J_{\text{H6a,H5}} = 6.7$ Hz, ${}^2J_{\text{H6a,H6b}} = 9.6$ Hz, H6_a-Gal'), 3.44 (dd, 1H, ${}^3J_{\text{H6b,H5}} = 5.8$ Hz, ${}^2J_{\text{H6b,H6a}} = 9.6$ Hz, H6_b-Gal'), 2.93 (sb, 1H, OH4-GalN), 2.45 (sb, 1H, OH6-GalN), 2.06, 2.04, 1.97, 1.93 (4 x s, 12H, CH₃-Ac), 1.46 (s, 9H, CH₃-^tBu).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ ppm] = 170.32, 170.23, 169.75, 169.54, 169.44 (C=O-Ac, C=O-Ser), 156.04 (C=O-Fmoc), 143.82 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.44, 141.41 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 137.38 (C_{ipso}-Bn), 128.68, 128.65, 128.13 (C_{o,m,p}-Ph), 127.94 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.22 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.09 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.22, 120.16 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.58 (C1-Gal'), 99.28 (C1-GalN), 83.19 (C-^tBu), 78.00 (C3-GalN), 73.69 (CH₂-Bn), 72.47 (C5-Gal'), 70.94 (C3-Gal'), 70.10 (C5-GalN), 69.47 (Ser^β), 69.21 (C4-GalN), 68.91 (C2-Gal'), 67.86 (C6-Gal'), 67.49 (C4-Gal'), 67.15 (CH₂-Fmoc), 62.95 (C6-GalN), 55.12 (Ser^α), 47.77 (C2-GalN), 47.23 (C9-Fmoc), 28.13 (CH₃-^tBu), 23.38 (Ac-NH), 20.83, 20.77, 20.70 (3 x CH₃-Ac).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): [m/z] = 987.58 ([M+Na]⁺, ber.: 987.37).

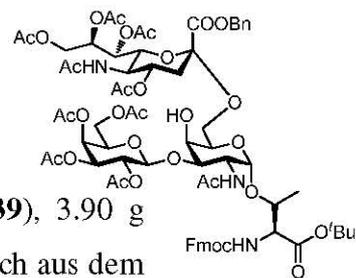
C₄₉H₆₀N₂O₁₈ (965.00)

5.7 Synthesen von Trisaccharid-Aminosäuren-Konjugaten

5.7.1 Die Synthese des Trisaccharid-Threonin-Konjugats

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-threonin-*tert*-butylester (**46**)^[89]

(Fmoc-Thr[α -3-(β -Ac₄Gal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-O^tBu)



2.15 g (2.31 mmol) Fmoc-Thr[α -3-(β -Ac₄Gal)-GalNAc]-O^tBu (**39**), 3.90 g (5.81 mmol, 2.51 Äquiv.) α -Ac₅NeuNAcCOOBn-Xan (**22**) (Gemisch aus dem Xanthogenat und dem Eliminierungsprodukt **23**) und etwa 8 g Molekularsieb (4 Å) werden in einer Mischung aus 60 ml absol. Acetonitril und 30 ml absol. Dichlormethan suspendiert und unter Argon 30 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird die Lösung auf – 65 °C abgekühlt, unter Lichtausschluss werden 1.60 g (6.24 mmol, 2.7 Äquiv. bezogen auf **22**) trockenes Silbertrifluormethansulfonat hinzugegeben und die Mischung weitere 45 min bei – 65 °C gerührt. Danach werden 3.60 ml (5.76 mmol, 2.49 Äquiv. bezogen auf (**22**)) einer vorgekühlten 1.6 M Methylsulfonylbromid-Lösung in absol. 1,2-Dichlorethan innerhalb von 20 min zugetropft und es wird 5 h bei – 65 °C gerührt. Danach werden weitere 0.25 g (0.97 mmol, 0.17 Äquiv. bezogen auf das Xanthogenat) Silbertrifluormethansulfonat und 0.50 ml (0.8 mmol, 0.14 Äquiv bezogen auf das Xanthogenat) Methylsulfonylbromid-Lösung auf einmal hinzugegeben und es wird bei – 65 °C weitere 3 h gerührt. Nach insgesamt 8 h wird durch Zugabe von 1.91 ml *N*-Ethyl-diisopropylamin neutralisiert, die Reaktionsmischung auf Raumtemp. erwärmt, mit 50 ml Dichlormethan verdünnt und über einer dünnen Schicht Hyflo[®] filtriert. Der Filterkuchen wird fünfmal mit 50 ml Dichlormethan nachgewaschen und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (8.42 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 6.0 cm im Laufmittelgemisch °Hex/EtOAc 1:1 → 1:5 → EtOAc). Es werden 2.95 g (1.99 mmol, 86 %) an Rohprodukt erhalten. Zur Abtrennung des Eliminierungsproduktes und des β -Anomeres erfolgt eine Reinigung mittels präparativer RP-HPLC. R_t = 24.05 min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-3), R_t = 57.35 min (Gerät 2, Säule: Luna-1, Gradient: Präp-3).

Ausbeute: 1.56 g (1.05 mmol, 46 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{22} = +20.2$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[89] $[\alpha]_D^{22} = +18.2$ ($c = 1.00$, CH_2Cl_2), $R_f = 0.16$ (EtOAc).

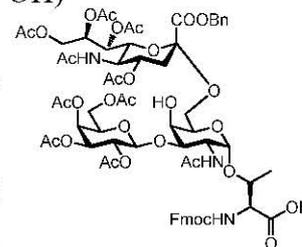
400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 7.78$ (d, 2H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = ^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.6$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = ^3J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 6.4$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.46 – 7.29 (m, 9H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 5.89 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.7$ Hz, NH-GalN), 5.46 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{Thr}^\alpha} = 9.2$ Hz, NH-Thr), 5.38 (m_c, 1H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 3.3$ Hz, H4-Gal'), 5.36 – 5.27 (m, 2H, H8-Sia {5.34}, H7-Sia {5.31}), 5.21 (d, 2H, $^2J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 3.6$ Hz, $\text{CH}_{2\text{ab}}$ -Bn), 5.19 – 5.10 (m, 2H, NH-Sia {5.18}, H2-Gal' {5.14}), 4.97 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 10.3$ Hz, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.0$ Hz, H3-Gal'), 4.84 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3\text{ax}} = 12.8$ Hz, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3\text{äq}} = 4.5$ Hz, H4-Sia), 4.74 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.8$ Hz, H1-GalN), 4.62 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 8.0$ Hz, H1-Gal'), 4.58 – 4.45 (m, 3H, CH_2 -Fmoc {4.53}, H2-GalN {4.52}), 4.29 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_9\text{a},\text{H}_8} = 2.4$ Hz, $^2J_{\text{H}_9\text{a},\text{H}_9\text{b}} = 12.4$ Hz, H9_a-Sia), 4.26 (m_c, 1H, H9-Fmoc {4.26}), 4.20 – 3.99 (m, 7H, Thr^α {4.16}, Thr^β {4.13}, H6_a-Gal' {4.10}, H9_b-Sia {4.09}, H5-Sia {4.06}, H6-Sia {4.06}, H6_b-Gal' {4.03}), 3.94 – 3.78 (m, 4H, H4-GalN {3.93}, H6_a-GalN {3.93}, H5-Gal' {3.86}, H5-GalN {3.81}), 3.63 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 2.7$ Hz, H3-GalN), 3.54 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_6\text{b},\text{H}_5} = 5.2$ Hz, $^2J_{\text{H}_6\text{b},\text{H}_6\text{a}} = 9.9$ Hz, H6_b-GalN), 2.63 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_3\text{äq},\text{H}_4} = 4.7$ Hz, $^2J_{\text{H}_3\text{äq},\text{H}_3\text{ax}} = 12.8$ Hz, H3_{äq}-Sia), 2.15, 2.11, 2.10, 2.08, 2.01, 2.00, 2.00, 1.98 (8 x s, 27H, CH_3 -Ac), 1.93 (m_c, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.86 (s, 3H, CH_3 -Ac), 1.43 (s, 9H, CH_3 -^tBu), 1.26 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}^\gamma,\text{Thr}^\delta} = 7.2$ Hz, Thr^γ).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 170.77, 170.27, 170.24, 170.22, 170.19, 170.08, 170.06, 168.82, 169.66$ (C=O-Ac, C=O-Thr), 167.31 (C1-Sia), 156.45 (C=O-Fmoc), 143.68 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.34 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 134.88 (C_{ipso}-Ph), 128.77, 128.71, 128.44 (C_{o,m,p}-Ph), 127.86 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.13, 127.10 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 124.89 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.12, 120.09 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.53 (C1-Gal'), 100.25 (C1-GalN), 98.74 (C2-Sia), 83.14 (C-^tBu), 77.24 (C3-GalN), 76.59 (Thr^β), 72.83 (C6-Sia), 70.73 (C5-Gal'), 70.60 (C3-Gal'), 69.13 (C8-Sia), 69.08 (C4-Sia, C5-GalN), 68.98 (C2-Gal'), 68.28 (C4-GalN), 67.81 (CH_2 -Bn), 67.49 (C7-Sia), 66.87 (C4-Gal'), 66.74 (CH_2 -Fmoc), 63.77 (C6-GalN), 62.39 (C9-Sia), 60.79 (C6-Gal'), 59.20 (Thr^α), 49.24 (C5-Sia), 47.61 (C2-GalN), 47.27 (C9-Fmoc), 37.49 (C3-Sia), 28.08 (CH_3 -^tBu), 23.19 (NH-Ac), 21.07, 20.85, 20.81, 20.77, 20.74, 20.67, 20.63, 20.58 (8 x CH_3 -Ac, NH-Ac), 18.72 (Thr^γ).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): $[m/z] = 1502.50$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1502.54).

$\text{C}_{71}\text{H}_{89}\text{N}_3\text{O}_{31}$ (1480.47)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-threonin (47)**
(Fmoc-Thr[α -3-(β -Ac₄Gal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-OH)



1.52 g (1.03 mmol) Fmoc-Thr[α -3-(β -Ac₄Gal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-*O*^tBu (46) werden mit 2.0 ml Anisol und 20 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei Raumtemp. gerührt und dann mit 50 ml Toluol verdünnt. Die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und der gelbe Rückstand (1.97 g) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 55.22$ min (Gerät 2, Säule: Luna-1, Gradient: Präp-3).

Ausbeute: 1.43 g (1.00 mmol, 97 %); farbloser Feststoff. Lit.:^[89] $[\alpha]_D^{22} = +26.7$ ($c = 1.00$, CH₂Cl₂).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta_{ppm}] = 7.77$ (d, 2H, ³ $J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.8$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, ³ $J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.44 – 7.27 (m, 9H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 6.19 (d, 1H, ³ $J_{NH,H2} = 9.5$ Hz, NH-GalN), 5.78 (d, 1H, ³ $J_{NH,Thr\alpha} = 10.7$ Hz, NH-Thr), 5.37 (m_c, 1H, ³ $J_{H4,H3} = 3.6$ Hz, H4-Gal'), 5.34 – 5.29 (m, 2H, H8-Sia {5.34}, H7-Sia {5.31}), 5.27 – 5.21 (m, 2H, NH-Sia {5.26}, CH_{2ab}-Bn {5.23}), 5.17 – 5.12 (m, 1H, H2-Gal' {5.15}), 4.96 (dd, 1H, ³ $J_{H3,H2} = 10.6$ Hz, ³ $J_{H3,H4} = 3.4$ Hz, H3-Gal'), 4.90 – 4.82 (m, 2H, H4-Sia {4.86}, H1-GalN {4.85, d, ³ $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz}), 4.60 (d, 1H, ³ $J_{H1,H2} = 7.9$ Hz, H1-Gal'), 4.55 – 4.50 (m, 2H, CH₂-Fmoc {4.52}), 4.42 – 4.34 (m, 3H, H2-GalN {4.39}, Thr ^{α} {4.38}, H9_a-Sia {4.38, dd, ³ $J_{H9a,H8} = 2.5$ Hz, ² $J_{H9a,H9b} = 12.3$ Hz}), 4.34 – 4.27 (m, 2H, Thr ^{β} {4.33}, H9_b-Sia {4.32, dd, ³ $J_{H9a,H8} = 2.4$ Hz, ² $J_{H9a,H9b} = 12.3$ Hz}), 4.25 (t, 1H, ³ $J_{H9,CH2} = 6.6$ Hz, H9-Fmoc), 4.16 (dd, 1H, ³ $J_{H6a,H5} = 5.8$ Hz, ² $J_{H6a,H6b} = 10.7$ Hz, H6_a-Gal'), 4.10 – 4.01 (m, 3H, H6_b-Gal' {4.07}, H5-Sia {4.06}, H6-Sia {4.06}), 3.98 – 3.78 (m, 4H, H5-GalN {3.96}, H6_a-GalN {3.92}, H5-Gal' {3.91}, H4-GalN {3.89}), 3.66 (dd, 1H, ³ $J_{H3,H2} = 11.0$ Hz, ³ $J_{H3,H4} = 2.5$ Hz, H3-GalN), 3.55 – 3.49 (m, 1H, H6_b-GalN {3.53}), 2.63 (dd, 1H, ³ $J_{H3\ddot{a}q,H4} = 4.7$ Hz, ² $J_{H3\ddot{a}q,H3ax} = 12.8$ Hz, H3_{\ddot{a}q}-Sia), 2.14, 2.12, 2.11, 2.11, 2.00 (5 x s, 27H, CH₃-Ac), 1.95 (m_c, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.87 (s, 3H, CH₃-Ac), 1.26 (d, 3H, ³ $J_{Thr\gamma,Thr\beta} = 6.4$ Hz, Thr ^{γ}).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): $[\delta_{ppm}] = 170.96, 170.78, 170.71, 170.49, 170.45, 170.40, 170.35, 170.28, 170.22, 169.98, 169.32$ (C=O-Ac, C=O-Thr), 167.48 (C1-Sia), 157.02 (C=O-Fmoc), 143.99, 143.76 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.37 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 134.99 (C_{ipso}-Ph), 128.93, 128.85, 128.55 (C_{o,m,p}-Ph), 127.95 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.30, 127.28 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.12 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.28,

120.18 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.53 (C1-Gal'), 99.72 (C1-GalN), 98.86 (C2-Sia), 77.36 (Thr^β), 76.74 (C3-GalN), 72.86 (C6-Sia), 70.84 (C5-Gal'), 70.78 (C3-Gal'), 69.00 (C8-Sia), 68.87 (C4-Sia), 68.71 (C5-GalN, C2-Gal'), 68.37 (C4-GalN), 67.97 (CH₂-Bn), 67.91 (C7-Sia), 67.31 (CH₂-Fmoc), 66.88 (C4-Gal'), 64.06 (C6-GalN), 62.79 (C9-Sia), 60.99 (C6-Gal'), 58.83 (Thr^α), 49.44 (C5-Sia), 48.27 (C2-GalN), 47.37 (C9-Fmoc), 37.64 (C3-Sia), 23.25 (NH-Ac), 21.22, 20.97, 20.95, 20.91, 20.90, 20.78, 20.75, 20.69, 20.65 (9 x CH₃-Ac, NH-Ac), 18.32 (Thr^γ).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): $[m/z] = 1446.51$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1446.48).

C₆₇H₈₁N₃O₃₁ (1424.36)

5.7.2 Die Synthesen der Trisaccharid-Serin-Konjugate

5.7.2.1 Die Synthese von *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]-α-D-galactopyranosyl]-L-serin

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]-α-D-galactopyranosyl]-L-serin-*tert*-butylester (**48**)^[154]

(Fmoc-Ser[α-3-(β-Ac₄Gal)-(α-Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))-α-GalNAc]-O^tBu)

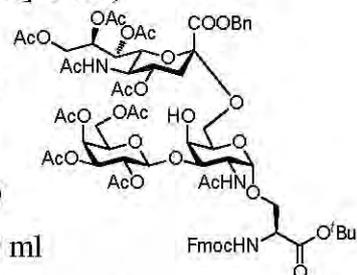
1.76 g (1.92 mmol) Fmoc-Ser[α-3-(β-Ac₄Gal)-GalNAc]-O^tBu (**43**),

3.96 g (5.90 mmol, 3.24 Äquiv.) α-Ac₅NeuNAcCOOBn-Xan (**22**)

(Gemisch aus dem Xanthogenat und dem Eliminierungsprodukt **23**)

und etwa 7 g Molekularsieb (4 Å) werden in einer Mischung aus 40 ml

absol. Acetonitril und 20 ml absol. Dichlormethan suspendiert und unter Argon 30 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird die Lösung auf -65 °C abgekühlt, unter Lichtausschluss werden 1.40 g (5.46 mmol, 3.00 Äquiv.) trockenes Silbertrifluormethansulfonat hinzugegeben und die Mischung wird erneut 45 min bei -65 °C gerührt. Danach werden 2.84 ml (4.54 mmol, 2.36 Äquiv.) einer vorgekühlten 1.6 M Methylsulfenylbromid-Lösung in absol. 1,2-Dichlorethan innerhalb von 20 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 5 h bei -65 °C gerührt, danach werden 1.40 ml



N-Ethyl-diisopropylamin zur Neutralisation hinzugegeben. Es wird auf Raumtemp. erwärmt, mit 50 ml Dichlormethan verdünnt und über einer dünnen Schicht Hyflo[®] filtriert. Der Filterkuchen wird fünfmal mit 50 ml Dichlormethan nachgewaschen und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (7.74 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 6.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 1:1 → 1:5 → EtOAc) gereinigt. Es werden 2.67 g (1.82 mmol, quant.) an Rohprodukt erhalten. Zur Abtrennung des Eliminierungsproduktes sowie des β-Anomers erfolgt eine Reinigung mittels präparativer RP-HPLC. R_t = 22.65 min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-3), R_t = 52.05 min (Gerät 2, Säule: Luna-1, Gradient: Präp-4).

Ausbeute: 1.56 g (1.06 mmol, 58 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = +16.0$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[139] $[\alpha]_D^{23} = +24.6$ ($c = 1.00$, CH₂Cl₂), $R_f = 0.28$ (EtOAc).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.77$ (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), $7.45 - 7.28$ (m, 9H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 5.72 (d, 1H, $^3J_{NH,H2} = 7.9$ Hz, NH-GalN), 5.65 (d, 1H, $^3J_{NH,Thr\alpha} = 9.7$ Hz, NH-Thr), $5.38 - 5.33$ (m_c, 2H, H4-Gal' {5.36}, H8-Sia {5.36}), 5.31 (dd, 1H, $^3J_{H7,H8} = 7.5$ Hz, $^3J_{H7,H6} = 1.7$ Hz, H7-Sia), $5.26 - 5.06$ (m, 4H, CH_{2a}-Bn {5.22}, H2-Gal' {5.16}, CH_{2b}-Bn {5.15}, NH-Sia {5.10}), 4.94 (dd, 1H, $^3J_{H3,H2} \approx 10.8$ Hz, $^3J_{H3,H4} \approx 3.5$ Hz, H3-Gal'), 4.81 (ddd, 1H, $^3J_{H4,H3ax} = 12.8$ Hz, $^3J_{H4,H5} \approx 10.0$ Hz, $^3J_{H4,H3aq} = 4.7$ Hz, H4-Sia), 4.72 (s_b, 1H, H1-GalN), $4.59 - 4.44$ (m, 3H, H1-Gal' {4.55}, H2-GalN {4.53}, CH_{2a}-Fmoc {4.47}), $4.43 - 4.33$ (m, 2H, CH_{2b}-Fmoc {4.40}, Ser^α {4.39}), 4.30 (dd, 1H, $^3J_{H9a,H8} = 2.6$ Hz, $^2J_{H9a,H9b} = 12.4$ Hz, H9_a-Sia), 4.23 (t, 1H, $^3J_{H9,CH2-Fmoc} = 6.8$ Hz, H9-Fmoc), $4.15 - 3.98$ (m, 5H, H6_a-Gal' {4.10}, H9_b-Sia {4.09}, H5-Sia {4.07}, H6-Sia {4.07}, H6_b-Gal' {4.03}), $3.97 - 3.90$ (m, 1H, Ser^{βa} {3.93}), $3.91 - 3.81$ (m, 3H, H4-GalN {3.88}, H6_a-GalN {3.88}, H5-Gal' {3.83}), $3.80 - 3.67$ (m, 2H, H5-GalN {3.76}, H_b-Ser^β {3.73}), $3.67 - 3.60$ (m, 1H, H3-GalN {3.63}), $3.59 - 3.51$ (m, 1H, H6_b-GalN {3.56}), 2.66 (dd, 1H, $^3J_{H3aq,H4} = 4.4$ Hz, $^2J_{H3aq,H3ax} = 12.5$ Hz, H3_{aq}-Sia), 2.14 , 2.11 , 2.09 , 2.01 , 2.00 , 1.99 , 1.97 (6 x s, 24H, CH₃-Ac), 1.93 (m_c, 4H, CH₃-Ac, H3_{ax}-Sia {1.93}), 1.86 (s, 3H, CH₃-Ac), 1.47 (s, 9H, CH₃-^tBu).

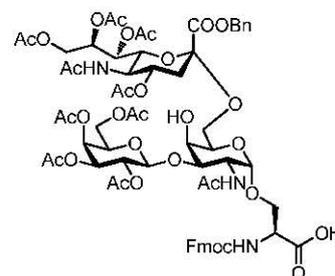
100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 170.88$, 170.87 , 170.36 , 170.32 , 170.30 , 170.29 , 170.22 , 170.15 , 169.59 , 169.43 (C=O-Ac, C=O-Thr), 167.34 (C1-Sia), 156.07 (C=O-Fmoc), 143.78 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.44 , 141.40 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 135.01 (2 x C_{ipso}-Ph), 128.89 , 128.79 , 128.49 (C_{o,m,p}-Ph), 127.98 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.26 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.05 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.24 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.63 (C1-Gal'), 99.17 (C2-Sia), 98.96 (C1-GalN), 83.17 (C-^tBu), 77.68 (C3-GalN), 72.97 (C6-Sia), 70.84 (C5-Gal'), 70.74 (C3-Gal'), 69.10 (C4-Sia), 69.03 , 68.84 (C8-Sia, C2-Gal',

C5-GalN), 68.54 Ser^β, 68.00 (C4-GalN), 67.94 (CH₂-Bn), 67.57 (C7-Sia), 67.21 (CH₂-Fmoc), 66.86 (C4-Gal'), 63.33 (C6-GalN), 62.58 (C9-Sia), 60.91 (C6-Gal'), 55.01 (Ser^α), 49.32 (C5-Sia), 47.69 (C2-GalN), 47.24 (C9-Fmoc), 37.89 (C3-Sia), 28.14 (CH₃-^tBu), 23.33 (NH-Ac), 21.19, 20.95, 20.95, 20.90, 20.80, 20.75, 20.70 (7 x CH₃-Ac).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): [*m/z*] = 1488.49 ([M+Na]⁺, ber.: 1488.52).

C₇₀H₈₇N₃O₃₁ (1466.44)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-*D*-glycero-α-*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]-α-*D*-galactopyranosyl]-*L*-serin (49)**^[154]
(Fmoc-Ser[α-3-(β-Ac₄Gal)-(α-Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))-α-GalNAc]-OH)



1.55 g (1.06 mmol) Fmoc-Ser[α-3-(β-Ac₄Gal)-(α-Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))-α-GalNAc]-O^tBu (**48**) werden mit 2.0 ml Anisol und 20 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung

wird 1 h bei Raumtemp. gerührt und dann mit 50 ml Toluol verdünnt. Die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und der gelbe Rückstand (1.94 g) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. R_t = 54.68 min (Gerät 2, Säule: Luna-1, Gradient: Präp-3).

Ausbeute: 1.34 g (0.95 mmol, 90 %); farbloser Feststoff, [α]_D²⁴ = + 38.3 (*c* = 1.00, CH₂Cl₂), R_f = 0.30 (EtOAc/EtOH/AcOH, 10:1:0.1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ /ppm] = 8.04 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 8.7 Hz, NH-GalN), 7.81 – 7.70 (m, 2H, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.67 – 7.57 (m, 2H, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.44 – 7.23 (m, 9H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 7.10 (d, 1H, ³J_{NH,Thr α} = 8.2 Hz, NH-Ser), 5.39 (td, 1H, ³J_{H8,H9b} ≈ ³J_{H8,H7} ≈ 6.9 Hz, ³J_{H8,H9a} = 2.7 Hz, H8-Sia), 5.34 (s_b, 1H, NH-Sia), 5.32 – 5.21 (m, 3H, H7-Sia {5.30}, H4-Gal' {5.26}, CH_{2a}-Bn {5.22}), 5.21 – 5.13 (m, 2H, H2-Gal' {5.17}, CH_{2b}-Bn {5.14}), 4.97 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 3.5 Hz, H1-GalN), 4.91 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.4 Hz, ³J_{H3,H4} = 3.5 Hz, H3-Gal'), 4.81 (m_c, 1H, H4-Sia), 4.76 – 4.72 (m_c, 1H, Ser^α{4.74}), 4.51 (m_c, 1H, CH_{2a}-Fmoc), 4.43 (m_c, 1H, CH_{2b}-Fmoc), 4.35 (dd, 1H, ³J_{H9a,H8} = 2.6 Hz, ²J_{H9a,H9b} = 12.6 Hz, H9_a-Sia), 4.26 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 8.5 Hz, H1-Gal'), 4.19 – 3.97 (m, 7H, H6_a-Gal' {4.14}, H9-Fmoc {4.12}, Ser^{βab} {4.10}, H5-Sia {4.07}, H9_b-Sia {4.07}, H6-Sia {4.04}), 3.96 – 3.81 (m, 4H, H6_a-GalN {3.93}, H2-GalN {3.90}, H4-GalN {3.86}, H6_b-Gal' {3.84}), 3.75 – 3.70 (m, 1H, H5-GalN {3.72}), 3.63 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.1 Hz, ³J_{H3,H4} = 2.9 Hz, H3-GalN), 3.56 – 3.38 (m, 2H, H6_b-GalN {3.47}, H5-Gal' {3.43}), 2.61 (dd, 1H, ³J_{H3_{äq},H4} = 4.6 Hz, ²J_{H3_{äq},H3_{ax}} = 12.7 Hz, H3_{äq}-Sia), 2.12, 2.10,

2.05, 2.03, 2.02, 2.01, 1.99, 1.97 (8 x s, 27H, CH₃-Ac), 1.94 (m_c, 1H, H_{3ax}-Sia), 1.88 (s, 3H, CH₃-Ac).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ /ppm] = 170.97, 170.78, 170.55, 170.45, 170.38, 170.23, 169.83 (C=O-Ac, C=O-Thr), 167.49 (C1-Sia), 156.14 (C=O-Fmoc), 143.34 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.34 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 134.99 (C_{ipso}-Ph), 129.16, 128.92, 128.88 (C_{o,m,p}-Ph), 128.44, 128.35 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.41, 127.32 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.42, 125.48 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.17 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 102.21 (C1-Gal'), 98.79 (C2-Sia), 97.70 (C1-GalN), 80.70 (C3-GalN), 72.88 (C6-Sia), 70.62 (C5-Gal'), 70.58 (C3-Gal'), 69.10 (C8-Sia), 68.85 (C5-GalN), 68.83 (C2-Gal'), 68.82 (C4-Sia), 67.69 (C4-GalN, C7-Sia), 67.57 (CH₂-Bn), 67.31 (CH₂-Fmoc), 66.77 (C4-Gal'), 66.66 (Ser ^{β}), 63.75 (C6-GalN), 62.55 (C9-Sia), 60.79 (C6-Gal'), 54.44 (Ser ^{α}), 52.34 (C2-GalN), 49.42 (C5-Sia), 47.23 (C9-Fmoc), 37.71 (C3-Sia), 23.18 (NH-Ac), 21.60, 21.22, 20.94, 20.92, 20.78, 20.71, 20.68 (7 x CH₃-Ac).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): [m/z] = 1432.49 ([M+Na]⁺, ber.: 1432.46).

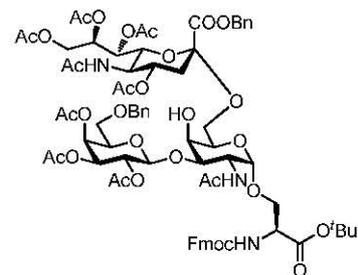
C₆₆H₇₉N₃O₃₁ (1410.33)

5.7.2.2 Die Synthese von *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-2-des-oxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-serin

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galacto-pyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-serin-*tert*-butylester (**50**)^[154]

(Fmoc-Ser[α -3-(β -6-*O*-BnAc₃Gal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-*O*^{*t*}Bu)

1.78 g (1.85 mmol) Fmoc-Ser[α -3-(β -6-*O*-BnAc₃Gal)-GalNAc]-*O*^{*t*}Bu (**45**), 3.47 g (5.17 mmol, 2.8 Äquiv.) α -Ac₅NeuNAcCOOBn-Xan (**22**) (Gemisch aus dem Xanthogenat und dem Eliminierungsprodukt **23**) und etwa 7 g Molekularsieb (4 Å) werden in einer Mischung aus 40 ml absol. Acetonitril und



20 ml absol. Dichlormethan suspendiert und unter Argon 30 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird die Lösung auf - 65 °C abgekühlt, unter Lichtausschluss werden 1.33 g (5.18 mmol, 2.80 Äquiv.) trockenes Silbertrifluormethansulfonat hinzugegeben und die

Mischung weitere 45 min bei $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Danach werden 2.9 ml (4.64 mmol, 2.51 Äquiv.) einer vorgekühlten 1.6 M Methylsulfenylbromid-Lösung in absol. 1,2-Dichlorethan innerhalb von 20 min zugetropft. Es wird 5 h bei $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und anschließend 1.50 ml *N*-Ethyl-diisopropylamin zur Neutralisation zugegeben. Es wird auf Raumtemp. erwärmt, mit 50 ml Dichlormethan verdünnt und über einer dünnen Schicht Hyflo[®] filtriert. Der Filterkuchen wird fünfmal mit 50 ml Dichlormethan nachgewaschen und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (7.21 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 6.0 cm) im Laufmittelgemisch (Hex/EtOAc 1:1 \rightarrow 1:5 \rightarrow EtOAc) gereinigt. Es werden 2.36 g (1.56 mmol, 84 %) an Rohprodukt erhalten. Zur Abtrennung des Eliminierungsproduktes sowie des β -Anomers erfolgt eine Reinigung mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 35.75$ min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-3), $R_t = 69.73$ min (Gerät 2, Säule: Luna-1, Gradient: Präp-3). Ausbeute: 1.31 g (0.87 mmol, 47 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = +13.4$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.21$ (EtOAc).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 7.77$ (d, 2H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = ^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = ^3J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.6$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), $7.45 - 7.17$ (m, 14H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 5.80 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.9$ Hz, NH-GalN), 5.76 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{Thr}\alpha} = 8.1$ Hz, NH-Thr), 5.44 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 1.1$ Hz, H4-Gal'), $5.40 - 5.32$ (m_c, 1H, H8-Sia {5.36}), 5.30 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_7,\text{H}_8} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{H}_7,\text{H}_6} = 1.7$ Hz, H7-Sia), $5.24 - 5.10$ (m, 4H, CH_{2a}-Bn {5.22}, H2-Gal' {5.16}, CH_{2b}-Bn {5.14}, NH-Sia {5.13}), 4.95 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 4.3$ Hz, H3-Gal'), 4.81 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3\text{ax}} = 12.9$ Hz, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3\text{äq}} = 4.5$ Hz, H4-Sia), 4.71 (s_b, 1H, H1-GalN), $4.62 - 4.44$ (m, 4H, H1-Gal' {4.59}, H2-GalN {4.54}, CH_{2a}-Fmoc {4.48}, CH_{2a}-Bn-Gal' {4.48}), $4.42 - 4.34$ (m, 3H, CH_{2b}-Fmoc {4.40}, Ser ^{α} {4.39}, CH_{2b}-Bn-Gal' {4.35}), 4.30 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_9\text{a},\text{H}_8} = 2.7$ Hz, $^2J_{\text{H}_9\text{a},\text{H}_9\text{b}} = 12.5$ Hz, H9_a-Sia), 4.22 (t, 1H, $^3J_{\text{H}_9,\text{CH}_2\text{-Fmoc}} = 6.7$ Hz, H9-Fmoc), $4.12 - 4.01$ (m, 3H, H9_b-Sia {4.09}, H5-Sia {4.07}, H6-Sia {4.07}), $3.95 - 3.85$ (m, 3H, H4-GalN {3.93}, Ser ^{β a} {3.93}, H6_a-GalN {3.89}, dd, $^3J_{\text{H}_6\text{a},\text{H}_5} = 6.2$ Hz, $^2J_{\text{H}_6\text{a},\text{H}_6\text{b}} = 9.5$ Hz), $3.85 - 3.64$ (m, 4H, H5-Gal' {3.83}, H5-GalN {3.76}, Ser ^{β b} {3.73}, H3-GalN {3.71}), 3.55 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_6\text{b},\text{H}_5} = 6.5$ Hz, $^2J_{\text{H}_6\text{b},\text{H}_6\text{a}} = 9.5$ Hz, H6_b-GalN), 3.48 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_6\text{a},\text{H}_5} = 5.8$ Hz, $^2J_{\text{H}_6\text{a},\text{H}_6\text{b}} = 9.5$ Hz, H6_a-Gal'), 3.41 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_6\text{b},\text{H}_5} = 6.8$ Hz, $^2J_{\text{H}_6\text{b},\text{H}_6\text{a}} = 9.5$ Hz, H6_b-Gal'), 2.61 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_3\text{äq},\text{H}_4} = 4.4$ Hz, $^2J_{\text{H}_3\text{äq},\text{H}_3\text{ax}} = 12.5$ Hz, H3_{äq}-Sia), 2.10 , 2.09 , 2.05 , 2.00 , 1.99 , 1.97 (6 x s, 21H, CH₃-Ac), 1.93 (m_c, 4H, CH₃-Ac, H3_{ax}-Sia {1.93}), 1.86 (s, 3H, CH₃-Ac), 1.46 (s, 9H, CH₃-^tBu).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 170.92$, 170.87 , 170.34 , 170.30 , 170.24 , 169.81 , 169.63 (C=O-Ac, C=O-Thr), 167.39 (C1-Sia), 156.10 (C=O-Fmoc), 143.86 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.47 , 141.43 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 137.45 (C_{ipso}-Ph-Gal'),

135.05 (C_{ipso}-Ph), 129.17, 128.91, 128.82, 128.66, 128.58, 128.44, 128.08 (C_{o,m,p}-Ph), 127.99, 127.95 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.28 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.11 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.24 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.66 (C1-Gal'), 99.14 (C2-Sia), 98.94 (C1-GalN), 83.16 (C^tBu), 77.38 (C3-GalN), 73.62 (CH₂Bn-Gal'), 72.98 (C6-Sia), 72.25 (C5-Gal'), 71.06 (C3-Gal'), 69.18 (C4-Sia), 68.88 (C8-Sia, C2-Gal', C5-GalN), 68.50 Ser^β, 67.98 (C4-GalN), 67.85 (CH₂-Bn), 67.62 (C7-Sia), 67.47 (C4-Gal'), 67.38 (C6-Gal'), 67.20 (CH₂-Fmoc), 63.46 (C6-GalN), 62.61 (C9-Sia), 55.08 (Ser^α), 49.31 (C5-Sia), 47.85 (C2-GalN), 47.28 (C9-Fmoc), 37.81 (C3-Sia), 28.16 (CH₃-^tBu), 23.46, 23.35 (2 x NH-Ac), 21.21, 20.96, 20.92, 20.87, 20.82, 20.75 (7 x CH₃-Ac).

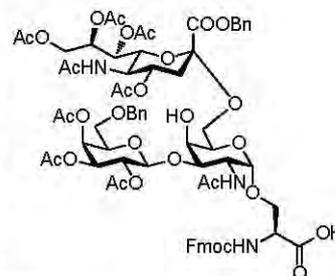
ESI-MS (Gerät 2, positiv): $[m/z] = 1536.54$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1536.56).

C₇₅H₉₁N₃O₃₀ (1514.53)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]-α-D-galactopyranosyl]-L-serin (51)^[154]**

(Fmoc-Ser[α-3-(β-6-*O*-BnAc₃Gal)-(α-Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))-α-GalNAc]-OH)

1.20 g (0.80 mmol) Fmoc-Ser[α-3-(β-6-*O*-BnAc₃Gal)-(α-Ac₄NeuNAc-COOBn-(2-6))-α-GalNAc]-*O*^tBu (50) werden mit 2.0 ml Anisol und 20 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei Raumtemp. gerührt und dann mit 50 ml Toluol verdünnt. Die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und der gelbe Rückstand (1.51 g) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. R_t = 60.11 min (Gerät 2, Säule: Luna-1, Gradient: Präp-3).



Ausbeute: 1.10 g (0.76 mmol, 95 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = +28.3$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[154] $[\alpha]_D^{22} = +27.1$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 8.09$ (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 7.1 Hz, NH-GalN), 7.78 – 7.70 (m, 2H, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.64 – 7.54 (m, 2H, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.45 – 7.06 (m, 15H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph, NH-Ser {7.17}), 5.44 – 5.37 (m, 1H, H8-Sia {5.42}), 5.36 – 5.27 (m, 2H, H4-Gal' {5.32}, H7-Sia {5.30}), 5.23 (d, 1H, ³J_{NH,H5} = 10.2 Hz, NH-Sia), 5.20 – 5.08 (m, 2H, CH_{2a}Bn-Sia {5.17}, H2-Gal' {5.15}), 5.05 (d, 1H, ²J_{CH2bBn,CH2aBn} = 12.2 Hz, CH_{2b}Bn-Sia), 4.98 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 3.5 Hz, H1-GalN), 4.91 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.4 Hz, ³J_{H3,H4} = 3.4 Hz, H3-Gal'), 4.82 – 4.76 (m, 1H, H4-Sia {4.79}), 4.76 – 4.70 (m, 1H, Ser^α{4.74}), 4.44 (dd, 1H,

$^3J_{\text{CH}_{2a}\text{-Fmoc,H9}} = 7.1 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{CH}_{2a}\text{-Fmoc,CH}_{2b}\text{-Fmoc}} = 10.0 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{2a}\text{-Fmoc}$), 4.38 – 4.30 (m, 2H, $\text{H9}_a\text{-Sia}$ {4.36}, $\text{CH}_{2a}\text{Bn-Gal'}$ {4.31}), 4.28 (d, 1H, $^3J_{\text{H1,H2}} = 5.6 \text{ Hz}$, H1-Gal'), 4.14 – 3.97 (m, 8H, $\text{CH}_{2b}\text{Bn-Gal'}$ {4.12}, H9-Fmoc {4.11}, $\text{Ser}^{\beta\text{ab}}$ {4.10}, H5-Sia {4.08}, $\text{H9}_b\text{-Sia}$ {4.08}, H6-Sia {4.03}, $\text{CH}_{2b}\text{-Fmoc}$ {4.03}), 3.96 – 3.84 (m, 3H, $\text{H6}_a\text{-GalN}$ {3.94}, H4-GalN {3.93}, H2-GalN {3.88}), 3.72 (t_p, 1H, $^3J_{\text{H5,H4}} \approx ^3J_{\text{H5,H6a}} \approx ^3J_{\text{H5,H6b}} \approx 6.3 \text{ Hz}$, H5-GalN), 3.64 (dd, 1H, $^3J_{\text{H3,H2}} = 10.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H3,H4}} = 2.9 \text{ Hz}$, H3-GalN), 3.56 (dd, 1H, $^3J_{\text{H6b,H5}} = 4.8 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H6b,H6a}} = 8.9 \text{ Hz}$, $\text{H6}_b\text{-GalN}$), 3.46 (d, 1H, $^2J_{\text{H6a,H6b}} \approx 6.4 \text{ Hz}$, $\text{H6}_a\text{-Gal'}$), 3.40 (t_p, 1H, $^3J_{\text{H5,H4}} \approx ^3J_{\text{H5,H6a}} \approx ^3J_{\text{H5,H6b}} \approx 7.0 \text{ Hz}$, H5-Gal'), 3.19 (d, 1H, $^2J_{\text{H6b,H6a}} = 6.4 \text{ Hz}$, $\text{H6}_b\text{-Gal'}$), 2.55 (dd, 1H, $^3J_{\text{H3äq,H4}} = 4.6 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H3äq,H3ax}} = 12.8 \text{ Hz}$, H3äq-Sia), 2.10, 2.08, 2.05, 2.03, 2.01, 2.00, 1.98, 1.96 (8 x s, 27H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$), 1.92 (m_c, 1H, H3ax-Sia), 1.87 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$).

100.6 MHz- $^{13}\text{C-NMR}$ [BB, HMQC] (CDCl_3): [δ/ppm] = 170.91, 170.89, 170.86, 170.39, 170.19, 170.08, 169.90 (C=O-Ac, C=O-Thr), 167.53 (C1-Sia), 156.07 (C=O-Fmoc), 143.75 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.36 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 137.43 ($\text{C}_{\text{ipso-Ph-Gal'}}$), 135.03 ($\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$), 128.91, 128.84, 128.66, 128.58, 128.41, 128.11, 128.08 ($\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$), 127.97, 127.94 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.69, 127.51 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.51 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.20 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 102.21 (C1-Gal'), 102.50 (C2-Sia), 97.69 (C1-GalN), 80.59 (C3-GalN), 73.25 ($\text{CH}_2\text{Bn-Gal'}$), 72.78 (C6-Sia), 72.02 (C5-Gal'), 70.90 (C3-Gal'), 69.20 (C8-Sia), 68.80 (C2-Gal'), 68.92 (C4-Sia), 68.69 (C5-GalN), 67.65 (C4-GalN), 67.61 ($\text{CH}_2\text{Bn-Sia}$), 67.55 (C4-Gal', C7-Sia), 67.05 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 66.97 (C6-Gal'), 66.24 (Ser^{β}), 63.73 (C6-GalN), 62.50 (C9-Sia), 54.25 (Ser^{α}), 52.18 (C2-GalN), 49.30 (C5-Sia), 47.15 (C9-Fmoc), 37.63 (C3-Sia), 23.23 (NH-Ac), 21.22, 20.95, 20.92, 20.78, 20.69, 20.61, 20.53 (7 x $\text{CH}_3\text{-Ac}$).

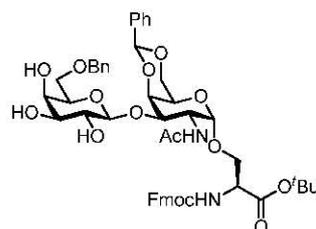
ESI-MS (Gerät 2, positiv): [m/z] = 1480.67 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1480.50).

$\text{C}_{71}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{30}$ (1458.42)

5.7.2.3 Die Synthese von *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- β -*D*-galactopyranosyl)- α -*D*-galactopyranosyl]-*L*-serin

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-(6-*O*-benzyl- β -*D*-galactopyranosyl)- α -*D*-galactopyranosyl]-*L*-Serin-*tert*-butylester (52)^[155]

(Fmoc-Ser[α -3-(β -6-*O*-BnGal)-4,6-Bzn-GalNAc]-*O*^{*t*}Bu)



2.04 g (1.93 mmol) Fmoc-Ser[α -3-(β -6-*O*-BnAc₃Gal)-4,6-Bzn-GalNAc]-*O*^{*t*}Bu (**44**) werden in 200 ml Methanol gelöst und unter Kontrolle des pH-Werts mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 20 h bei einem pH-Wert von 9.0 – 9.5 gerührt, wobei durch stündliche Zugabe weiterer methanolischer Natriummethanolat-Lösung der pH-Wert nachreguliert wird. Anschließend wird die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure neutralisiert und die Essigsäure und die Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt. Der Rückstand (1.91 g) wird mit 1.31 g (3.87 mmol, 2.00 Äquiv.) Fluoren-9-ylmethyl-succinimidylcarbonat und 0.5 g (3.87 mmol, 2.00 Äquiv.) *N*-Ethyl-diisopropylamin versetzt, in 100 ml Acetonitril/Dichlormethan (1:1) gelöst und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend werden die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und der Rückstand dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 1:1 → EtOAc/EtOH 25:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.18 g (1.27 mmol, 66 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = +86.0$ ($c = 1.00$, CH₃CN), Lit.:^[155] $[\alpha]_D^{23} = +102.0$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.39$ (EtOAc/EtOH, 9:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.76$ (d, 2H, $^3J_{H_4,H_3} = ^3J_{H_5,H_6} = 7.6$ Hz, H₄-Fmoc, H₅-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $^3J_{H_1,H_2} = ^3J_{H_8,H_7} = 7.5$ Hz, H₁-Fmoc, H₈-Fmoc), 7.53 – 7.46 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.40 (t, 2H, $^3J_{H_3,H_2} = ^3J_{H_3,H_4} = ^3J_{H_6,H_5} = ^3J_{H_6,H_7} = 7.5$ Hz, H₃-Fmoc, H₆-Fmoc), 7.35 – 7.27 (m, 10H, H₂-Fmoc, H₇-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 6.22 (d, 1H, $^3J_{NH,H_2} = 7.6$ Hz, NH-GalN), 5.95 (d, 1H, $^3J_{NH,Ser^\alpha} = 7.1$ Hz, NH-Ser), 5.42 (s, 1H, CH-Bzn), 4.92 (d, 1H, $^3J_{H_1,H_2} = 3.0$ Hz, H₁-GalN), 4.62 (t_p, 1H, $^3J_{H_2,NH} \approx ^3J_{H_2,H_3} \approx 9.5$ Hz, H₂-GalN), 4.57 – 4.47 (m, 2H, CH_{2a}-Bn {4.54, d, $^2J_{CH_2a,CH_2b} = 11.8$ Hz}, CH_{2b}-Bn {4.47, d, $^2J_{CH_2b,CH_2a} = 11.8$ Hz}, 4.47 – 4.40 (m, 2H, CH_{2a}-Fmoc {4.44}, Ser ^{α} {4.41}), 4.39 – 4.30 (m, 2H, CH_{2b}-Fmoc {4.34}, H₄-GalN {4.29}), 4.26 – 4.18 (m, 2H, H₁-Gal' {4.22}, H₉-Fmoc

{4.19}), 4.14 – 4.10 (m, 1H, H_{6a}-GalN {4.10}), 3.98 – 3.90 (m, 1H, Ser^{βa} {3.92}), 3.87 – 3.76 (m, 3H, Ser^{βb} {3.80}), H₃-GalN {3.77}, H_{6b}-GalN {3.77}), 3.76 – 3.63 (m, 3H, H₄-Gal' {3.71}, H_{6ab}-Gal' {3.68}) 3.63 – 3.46 (m, 3H, H₂-Gal' {3.57}, H₅-GalN {3.52}, H₅-Gal' {3.51}), 3.32 (m_c, 2H, OH₂-Gal' {3.32}, H₃-Gal' {3.30}), 1.95 (s, 3H, CH₃-Ac), 1.47 (s, 9H, CH₃-^tBu).

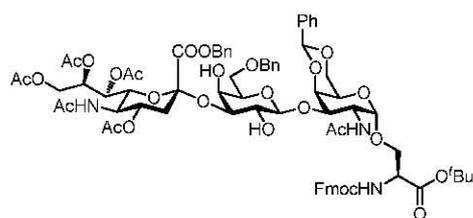
75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [δ/ppm] = 173.20, 169.68 (C=O-Ac, C=O-Ser), 156.32 (C=O-Fmoc), 143.86 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.43, 141.41 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 137.91, 137.80 (C_{ipso}-Bzn, C_{ipso}-Bn), 129.17, 128.58, 128.36, 128.33, 127.99 (C_{o,m,p}-Ph), 127.96 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.25 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 126.76 (C_{o,m,p}-Ph), 125.43 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.20 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 104.90 (C1-Gal'), 101.27 (CH-Bzn), 99.36 (C1-GalN), 83.07 (C-^tBu), 76.32 (C3-GalN), 75.86 (C4-GalN), 73.74 (C5-Gal'), 73.59 (CH₂-Bn), 73.29 (C3-Gal'), 71.05 (C2-Gal'), 70.04 (Ser^β), 69.21 (C6-Gal'), 69.16 (C4-Gal'), 68.93 (C6-GalN), 67.31 (CH₂-Fmoc), 63.51 (C5-GalN), 54.94 (Ser^α), 48.29 (C2-GalN), 47.21 (C9-Fmoc), 28.14 (CH₃-^tBu), 23.33 (Ac-NH).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): [m/z] = 949.38 ([M+Na]⁺, ber.: 949.37).

C₅₀H₅₈N₂O₁₅ (927.00)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-(6-*O*-benzyl-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- β -*D*-galactopyranosyl)- α -*D*-galactopyranosyl]-*L*-serin-*tert*-butylester (53)^[154]**

(Fmoc-Ser[α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-3)-(β-6-*O*-BnGal)-4,6-Bzn- α -GalNAc]-*O*^tBu)



1.27 g (1.37 mmol) Fmoc-Ser[α -3-(β-6-*O*-BnGal)-4,6-Bzn-GalNAc]-*O*^tBu (**52**), 2.87 g (4.27 mmol, 3.12 Äquiv.) α -Ac₅NeuNAcCOOBn-Xan (**22**) (Gemisch aus

dem Xanthogenat und dem Eliminierungsprodukt **23**) und etwa 3 g Molekularsieb (4 Å) werden in einer Mischung aus 40 ml absol. Acetonitril und 20 ml absol. Dichlormethan suspendiert und unter Argon 30 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird die Lösung auf – 65 °C gekühlt, unter Lichtausschluss werden 1.30 g (5.06 mmol, 3.70 Äquiv.) trockenes Silbertrifluormethansulfonat hinzugegeben und die Mischung weitere 45 min bei – 65 °C gerührt. Danach werden 2.40 ml (3.84 mmol, 2.80 Äquiv.) einer vorgekühlten 1.6 M Methylsulfonylbromid-Lösung in absol. 1,2-Dichlorethan innerhalb von 20 min zugetropft. Es wird 3 h bei – 65 °C gerührt und anschließend werden weitere 0.30 g (1.17 mmol, 0.85 Äquiv.) trockenes Silbertrifluormethansulfonat und 0.30 ml (0.48 mmol, 0.35 Äquiv.)

Methylsulphenylbromid-Lösung hinzugegeben. Nach weiteren 3 h bei $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird mit 0.70 ml *N*-Ethyl-diisopropylamin neutralisiert und es wird auf Raumtemp. erwärmt. Es wird mit 50 ml Dichlormethan verdünnt und über einer dünnen Schicht Hyflo[®] filtriert. Der Filterkuchen wird fünfmal mit 50 ml Dichlormethan nachgewaschen und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (5.53 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 38.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm im Laufmittelgemisch $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:5 \rightarrow EtOAc \rightarrow EtOAc/EtOH 50:1) gereinigt. Es werden 1.71 g (1.16 mmol, 85 %) an Rohprodukt erhalten. Die Abtrennung des Eliminierungsproduktes sowie des β -Anomers erfolgt durch präparative RP-HPLC. $R_t = 40.13$ min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-4), $R_t = 63.56$ min (Gerät 2, Säule: Luna-1, Gradient: Präp-5).

Ausbeute: 1.21 g (0.82 mmol, 60 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = +39.8$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[155] $[\alpha]_D^{23} = +44.0$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.50$ (EtOAc/EtOH 10:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 7.77$ (d, 2H, $^3J_{\text{H4,H3}} = ^3J_{\text{H5,H6}} = 7.7$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $^3J_{\text{H1,H2}} = ^3J_{\text{H8,H7}} = 7.2$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.55 – 7.47 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$), 7.40 (t, 2H, $^3J_{\text{H3,H2}} = ^3J_{\text{H3,H4}} = ^3J_{\text{H6,H5}} = ^3J_{\text{H6,H7}} = 7.2$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.38 – 7.22 (m, 15H, H2-Fmoc, H7-Fmoc, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$), 6.53 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,H2}} = 8.3$ Hz, NH-GalN), 6.02 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 8.5$ Hz, NH-Ser), 5.49 (s, 1H, CH-Bzn), 5.47 – 5.41 (m, 1H, H8-Sia {5.46}), 5.27 – 5.19 (m, 2H, H7-Sia {5.22, dd, $^3J_{\text{H7,H8}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{H7,H6}} = 1.4$ Hz}, NH-Sia {5.22}), 5.17 (d, 2H, $^2J_{\text{CH2a,CH2b}} = 4.7$ Hz, $\text{CH}_{2\text{ab-Bn-Sia}}$), 5.07 (d, 1H, $^3J_{\text{H1,H2}} = 3.5$ Hz, H1-GalN), 4.91 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H4,H3ax}} \approx 12.9$ Hz, $^3J_{\text{H4,H5}} \approx 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H4,H3aq}} = 4.5$ Hz, H4-Sia), 4.64 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H2,H3}} \approx ^3J_{\text{H2,NH}} \approx 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H2,H3}} = 3.4$ Hz, H2-GalN), 4.55 (d, 2H, $^2J_{\text{CH2a,CH2b}} = 4.9$ Hz, $\text{CH}_{2\text{ab-Bn-Gal}}$), 4.47 – 4.28 (m, 6H, Ser^{α} {4.44}, $\text{H9}_a\text{-Sia}$ {4.39}, H1-Gal' {4.38}, $\text{CH}_{2\text{ab-Fmoc}}$ {4.38}, H4-GalN {4.35}), 4.27 – 4.14 (m, 2H, H9-Fmoc {4.23}, $\text{H6}_a\text{-GalN}$ {4.20}), 4.11 – 3.99 (m, 2H, H5-Sia {4.04}, H6-Sia {4.04}), 3.99 – 3.83 (m, 6H, H3-GalN {3.95}, $\text{Ser}^{\beta\text{ab}}$ {3.95}, H3-Gal' {3.93}, $\text{H9}_b\text{-Sia}$ {3.92}, $\text{H6}_b\text{-GalN}$ {3.88}), 3.72 – 3.62 (m, 2H, H2-Gal' {3.69}, $\text{H6}_a\text{-Gal}'$ {3.63}), 3.59 (sb, 1H, H5-GalN), 3.52 – 3.43 (m, 2H, $\text{H6}_b\text{-Gal}'$ {3.50}, H5-Gal' {3.48}), 3.28 (sb, 1H, H4-Gal'), 2.64 (dd, 1H, $^3J_{\text{H3aq,H4}} = 4.5$ Hz, $^2J_{\text{H3aq,H3ax}} = 13.4$ Hz, H3_{aq}-Sia), 2.11, 2.09, 2.02, 2.00, 1.97 (5 x s, 15H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$), 1.95 (mc, 1H, H3_{ax}-Sia {1.95}), 1.87 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$), 1.47 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 171.37, 171.05, 170.54, 170.41, 170.31, 169.36$ (C=O-Ac, C=O-Thr), 167.79 (C1-Sia), 156.14 (C=O-Fmoc), 143.89, 143.84 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.43, 141.39 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 138.07, 137.68, 134.37 (3 x $\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$), 129.16, 129.09, 128.93, 128.62, 128.26, 128.04 ($\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$), 127.95, 127.86 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.26, 127.23 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 126.65 ($\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$), 125.22 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.21 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 104.90 (C1-Gal'), 101.14 (CH-Bzn), 99.85 (C1-GalN), 97.73 (C2-Sia), 83.01 (C-^tBu), 76.39 (C3-GalN, C3-Gal'), 75.70

(C4-GalN), 73.73 (CH₂Bn-Gal'), 73.45 (C5-Gal'), 73.09 (C6-Sia), 69.71 (C6-Gal'), 69.54 (Ser^β), 69.28 (C6-GalN), 68.61, 68.58, 68.52, 68.45 (C4-Sia, C8-Sia, C2-Gal', C4-Gal', CH₂Bn-Sia), 67.70 (C7-Sia), 67.48 (CH₂-Fmoc), 63.60 (C5-GalN), 63.34 (C9-Sia), 55.23 (Ser^α), 49.38 (C5-Sia), 48.53 (C2-GalN), 47.21 (C9-Fmoc), 37.50 (C3-Sia), 28.17 (CH₃-^tBu), 23.31 (NH-Ac), 21.35, 21.12, 20.97, 20.86 (4 x CH₃-Ac).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): $[m/z] = 1476.55$ ($[M+H]^+$, ber.: 1476.58).

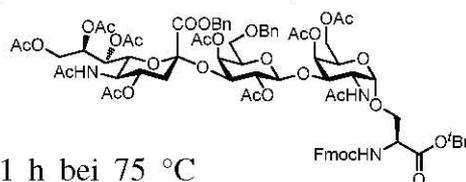
1498.65 ($[M+Na]^+$, ber.: 1498.56).

C₇₆H₈₉N₃O₂₇ (1476.52)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- β -D-galactopyranosyl)- α -D-galactopyranosyl]-L-serin-*tert*-butylester (55)^[154]**

(Fmoc-Ser[α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-3)-(β-6-*O*-BnAc₂Gal)- α -Ac₂GalNAc]-*O*^tBu)

Eine Lösung von 1.93 g (1.27 mmol) Fmoc-Ser[α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-3)-(β-6-*O*-BnGal)-4,6-Bzn- α -



GalNAc]-*O*^tBu (**53**) in 80 ml 80%iger Essigsäure wird 1 h bei 75 °C

gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf Raumtemp. abgekühlt, mit 50 ml Toluol verdünnt und Essigsäure sowie Toluol werden i. Hochvak. entfernt. Der Rückstand (1.82 g) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert.

C₆₉H₈₅N₃O₂₇ (1388.42)

Zu 1.82 g (1.27 mmol) rohem Fmoc-Ser[α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-3)-(β-6-*O*-BnGal)- α -GalNAc]-*O*^tBu (**54**) ($R_f = 0.16$ (EtOAc/EtOH 10:1)) werden 55 ml einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus Acetanhydrid/Pyridin (20:35) gegeben, mit einer katalytischen Menge 4-Dimethylaminopyridin versetzt und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Danach werden die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. entfernt und es wird dreimal mit 80 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand (2.10 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 38.0 cm, Durchmesser = 3.5 cm) im Laufmittelgemisch (Hex/EtOAc 1:5 → EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 1.23 g (0.79 mmol, 62 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = +45.4$ ($c = 1.00$, CHCl₃),

Lit.:^[155] $[\alpha]_D^{23} = +42.0$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.56$ (EtOAc/EtOH 10:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.76$ (d, 2H, ³ $J_{H_4,H_3} = ^3J_{H_5,H_6} = 7.6$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.57 (d, 2H, ³ $J_{H_1,H_2} = ^3J_{H_8,H_7} = 7.5$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.46 – 7.20 (m, 16H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 6.26 (d, 1H, ³ $J_{NH,H_2} = 7.3$ Hz, NH-GalN), 5.92 (d, 1H, ³ $J_{NH,Thr\alpha} = 8.5$ Hz, NH-Ser),

5.58 (td, 1H, ${}^3J_{\text{H8,H9b}} \approx {}^3J_{\text{H8,H7}} \approx 8.3$ Hz, ${}^3J_{\text{H8,H9a}} = 2.6$ Hz, H8-Sia), 5.48 – 5.39 (m, 2H, H4-GalN {5.45}, CH_{2a}Bn-Sia {5.42, d, ${}^2J_{\text{CH2a,CH2b}} = 12.0$ Hz}), 5.25 (dd, 1H, ${}^3J_{\text{H7,H8}} = 8.2$ Hz, ${}^3J_{\text{H7,H6}} = 2.7$ Hz, H7-Sia), 5.11 (d, 1H, ${}^3J_{\text{H4,H3}} = 3.4$ Hz, H4-Gal'), 5.08 (d, 1H, ${}^2J_{\text{CH2b,CH2a}} = 12.0$ Hz, CH_{2b}Bn-Sia), 5.05 – 4.98 (m, 2H, H1-GalN {5.05}, H2-Gal' {5.02}), 4.95 (m_c, 1H, NH-Sia), 4.84 (ddd, 1H, ${}^3J_{\text{H4,H3ax}} = 12.0$ Hz, ${}^3J_{\text{H4,H5}} = 10.0$ Hz, ${}^3J_{\text{H4,H3aq}} = 4.6$ Hz, H4-Sia), 4.62 (d, 1H, ${}^3J_{\text{H1,H2}} = 7.9$ Hz, H1-Gal'), 4.57 – 4.48 (m, 2H, CH_{2a}Bn-Gal' {4.54}, H3-Gal' {4.52}), 4.48 – 4.39 (m, 4H, H2-GalN {4.45}, H9_a-Sia {4.45}, Ser^α {4.44}, CH_{2a}Bn-Gal' {4.43}), 4.39 – 4.28 (m, 2H, CH₂-Fmoc {4.34}), 4.26 – 4.15 (m, 2H, H9-Fmoc {4.22}, H6_a-GalN {4.20}), 4.12 – 3.98 (m, 3H, H5-GalN {4.09}, H5-Sia {4.06}, H3-GalN {4.03}), 3.97 – 3.76 (m, 5H, H6_b-GalN {3.94}, Ser^{βa} {3.90}, H9_b-Sia {3.87}, Ser^{βb} {3.86}, H5-Gal' {3.82}), 3.56 – 3.47 (m, 2H, H6_a-Gal' {3.54, dd, ${}^3J_{\text{H6a,H5}} = 6.2$ Hz, ${}^2J_{\text{H6a,H6b}} = 9.6$ Hz}, H6-Sia {3.51, dd, ${}^3J_{\text{H6,H5}} = 10.7$ Hz, ${}^3J_{\text{H6,H7}} = 2.6$ Hz}), 3.41 (dd, 1H, ${}^3J_{\text{H6b,H5}} = 6.7$ Hz, ${}^2J_{\text{H6b,H6a}} = 9.6$ Hz, H6_b-Gal'), 2.62 (dd, 1H, ${}^3J_{\text{H3aq,H4}} = 4.7$ Hz, ${}^2J_{\text{H3aq,H3ax}} = 12.7$ Hz, H3_{aq}-Sia), 2.31, 2.11, 2.10, 2.08, 2.05, 2.04, 2.01, 1.98, 1.96, 1.82 (10 x s, 30H, CH₃-Ac), 1.66 (t, 1H, ${}^3J_{\text{H3aq,H4}} = {}^2J_{\text{H3aq,H3ax}} = 12.4$ Hz, H3_{ax}-Sia), 1.46 (s, 9H, CH₃-^tBu).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 171.61, 171.04, 170.75, 170.64, 170.52, 170.46, 170.36, 170.00, 169.16 (C=O-Ac, C=O-Thr), 167.34 (C1-Sia), 156.07 (C=O-Fmoc), 143.95, 143.81 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.39, 141.35 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 137.36, 134.86 (2 x C_{ipso}-Ph), 129.11, 129.06, 128.79, 128.77, 128.47 (C_{o,m,p}-Ph), 127.93, 127.90 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.84 (C_{o,m,p}-Ph), 127.23 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.21, 125.12 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.17 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 100.36 (C1-Gal'), 98.24 (C1-GalN), 96.95 (C2-Sia), 82.73 (C-^tBu), 73.52 (CH₂Bn-Gal'), 73.18 (C3-GalN), 72.47 (C6-Sia), 72.20 (C5-Gal'), 71.71 (C3-Gal'), 69.87 (C2-Gal'), 69.28 (C4-Sia), 68.97 (Ser^β), 68.64 (CH₂Bn-Sia), 68.55 (C4-GalN), 68.13 (C8-Sia), 68.01 (C4-Gal'), 67.87 (C6-Gal'), 67.81, 67.79 (C7-Sia, C5-GalN), 67.49 (CH₂-Fmoc), 63.30 (C9-Sia), 63.07 (C6-GalN), 54.82 (Ser^α), 49.37 (C2-GalN), 49.00 (C5-Sia), 47.14 (C9-Fmoc), 37.59 (C3-Sia), 28.16 (CH₃-^tBu), 23.26, 23.15 (2 x NH-Ac), 21.48, 21.37, 21.21, 20.96, 20.90, 20.86 (6 x CH₃-Ac).

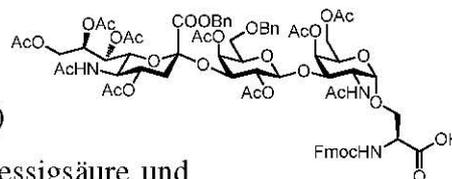
ESI-MS (Gerät 2, positiv): [m/z] = 1578.56 ([M+Na]⁺, ber.: 1578.57).

C₇₇H₉₃N₃O₃₁ (1556.56)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-[2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-*on*at]- β -D-galactopyranosyl)- α -D-galactopyranosyl]-L-serin (56)^[154]**

(Fmoc-Ser[α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-3)-(β -6-*O*-BnAc₂Gal)- α -Ac₂GalNAc]-OH)

Zu 1.23 g (0.79 mmol) Fmoc-Ser[α -Ac₄NeuNAc-



COOBn-(2-3)-(β -6-*O*-BnAc₂Gal)- α -Ac₂GalNAc]-O^tBu (55)

werden 20 ml einer Mischung aus Dichlormethan/Trifluoressigsäure und Wasser (20:40:0.8 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 2 h bei Raumtemp. gerührt und dann mit 50 ml Toluol verdünnt. Die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und der gelbe Rückstand wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rückstands (1.34 g) erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 2.6 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 1:5 → EtOAc → EtOAc/EtOH 10:1).

Ausbeute: 1.06 g (0.71 mmol, 90 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = +29.9$ ($c = 1.00$, MeOH), Lit.:^[155] $[\alpha]_D^{23} = +55.0$ ($c = 1.50$, CHCl₃), $R_f = 0.20$ (EtOAc/EtOH, 2:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.76$ (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.57 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), $7.46 - 7.20$ (m, 16H, H2-Fmoc, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 6.26 (d, 1H, $^3J_{NH,H2} = 7.3$ Hz, NH-GalN), 5.92 (d, 1H, $^3J_{NH,Thr\alpha} = 8.5$ Hz, NH-Ser), 5.58 (td, 1H, $^3J_{H8,H9b} \approx ^3J_{H8,H7} \approx 8.3$ Hz, $^3J_{H8,H9a} = 2.6$ Hz, H8-Sia), $5.48 - 5.39$ (m, 2H, H4-GalN {5.45}, CH_{2a}Bn-Sia {5.42, d, $^2J_{CH2a,CH2b} = 12.0$ Hz}), 5.25 (dd, 1H, $^3J_{H7,H8} = 8.2$ Hz, $^3J_{H7,H6} = 2.7$ Hz, H7-Sia), 5.11 (d, 1H, $^3J_{H4,H3} = 3.4$ Hz, H4-Gal'), 5.08 (d, 1H, $^2J_{CH2b,CH2a} = 12.0$ Hz, CH_{2b}Bn-Sia), $5.05 - 4.98$ (m, 2H, H1-GalN {5.05}, H2-Gal' {5.02}), 4.95 (m_c, 1H, NH-Sia), 4.84 (ddd, 1H, $^3J_{H4,H3ax} = 12.0$ Hz, $^3J_{H4,H5} = 10.0$ Hz, $^3J_{H4,H3\ddot{a}q} = 4.6$ Hz, H4-Sia), 4.62 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 7.9$ Hz, H1-Gal'), $4.57 - 4.48$ (m, 2H, CH_{2a}Bn-Gal' {4.54}, H3-Gal' {4.52}), $4.48 - 4.39$ (m, 4H, H2-GalN {4.45}, H9_a-Sia {4.45}, Ser ^{α} {4.44}, CH_{2a}Bn-Gal' {4.43}), $4.39 - 4.28$ (m, 2H, CH₂-Fmoc {4.34}), $4.26 - 4.15$ (m, 2H, H9-Fmoc {4.22}, H6_a-GalN {4.20}), $4.12 - 3.98$ (m, 3H, H5-GalN {4.09}, H5-Sia {4.06}, H3-GalN {4.03}), $3.97 - 3.76$ (m, 5H, H6_b-GalN {3.94}, Ser ^{β a} {3.90}, H9_b-Sia {3.87}, Ser ^{β b} {3.86}, H5-Gal' {3.82}), $3.56 - 3.47$ (m, 2H, H6_a-Gal' {3.54, dd, $^3J_{H6a,H5} = 6.2$ Hz, $^2J_{H6a,H6b} = 9.6$ Hz}, H6-Sia {3.51, dd, $^3J_{H6,H5} = 10.7$ Hz, $^3J_{H6,H7} = 2.6$ Hz}), 3.41 (dd, 1H, $^3J_{H6b,H5} = 6.7$ Hz, $^2J_{H6b,H6a} = 9.6$ Hz, H6_b-Gal'), 2.62 (dd, 1H, $^3J_{H3\ddot{a}q,H4} = 4.7$ Hz, $^2J_{H3\ddot{a}q,H3ax} = 12.7$ Hz, H3 _{$\ddot{a}q$} -Sia), $2.31, 2.11, 2.10, 2.08, 2.05, 2.04, 2.01, 1.98, 1.96, 1.82$ (10 x s, 30H, CH₃-Ac), 1.66 (t, 1H, $^3J_{H3\ddot{a}q,H4} = ^2J_{H3\ddot{a}q,H3ax} = 12.4$ Hz, H3 _{$\ddot{a}q$} -Sia).

ESI-MS (Gerät 2, positiv): $[m/z] = 1522.59$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1522.51).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1522.5082$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1522.5065).

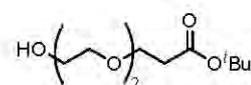
$C_{73}H_{85}N_3O_{31}$ (1500.46)

5.8 Die Synthese der Spacereinheiten

5.8.1 Synthese von *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-9-amido-4,7-dioxa-nonansäure

9-Hydroxy-4,7-dioxo-nonansäure-*tert*-butylester (58)^[430]

(HO-Dispa-^{*t*}Bu)



Zu einer Lösung von 66.20 g (623.82 mmol, 4.00 Äquiv.) Diethylenglycol (**57**) in 150 ml absol. Tetrahydrofuran werden unter Argon 143 mg (6.24 mmol, 0.04 Äquiv.) Natrium gegeben. Nach vollständigem Umsatz des Natriums werden 20.00 g (156.04 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester zugegeben und es wird 20 h bei Raumtemp. gerührt. Durch Zugabe von 5.3 ml 1 N Salzsäure wird neutralisiert und von den Lösungsmittel i. Vak. befreit. Der Rückstand wird in 170 ml ges. Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und dreimal mit 120 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 70 ml ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und das Rohprodukt (32.50 g) durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm) im Laufmittelgemisch (EtOAc) gereinigt.

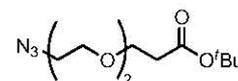
Ausbeute: 27.81 g (118.74 mmol, 76 %); farbloses, hochviskoses Öl, $R_f = 0.42$ (EtOAc).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 3.76 - 3.69$ (m, 4H, H3, (OCH₂)₂), 3.68 – 3.57 (m, 6H, (OCH₂)₃), 2.50 (t, 2H, ³ $J_{H_2,H_3} = 6.6$ Hz, H2), 2.31 (sb, 1H, OH), 1.44 (s, 9H, CH₃-^{*t*}Bu).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 171.08$ (C1), 80.81 (C-^{*t*}Bu), 72.61 (C8), 70.51 (C5, C6), 67.01 (C3), 61.94 (C9), 36.33 (C2), 28.22 (CH₃-^{*t*}Bu).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 257.11$ ($[M+Na]^+$, ber.: 257.14).

$C_{11}H_{22}O_5$ (234.29)

9-Azido-4,7-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (60)^[431](N₃-Dispa-^tBu)

27.00 g (115.24 mmol) HO-Dispa-^tBu (**57**) werden in 40 ml absol. Dichlormethan gelöst und mit 28.30 g (279.67 mmol, 2.42 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Unter Eiskühlung werden 27.30 g (238.32 mmol, 2.07 Äquiv.) Mesylchlorid zugetropft. Es wird 8 h bei Raumtemp. gerührt, das gebildete Triethylaminhydrochlorid über Hyflo[®] abfiltriert und der Filterkuchen mit 200 ml Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird zweimal mit 50 ml Eiswasser und einmal mit 50 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit.

C₁₂H₂₄O₆S (296.38)

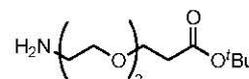
Der Rückstand (**59**) wird in 68 ml *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen, mit 46.50 g (715.27 mmol, 6.21 Äquiv.) Natriumazid versetzt und 15 h bei 60 °C gerührt. Das *N,N*-Dimethylformamid wird i. Hochvak. entfernt und der Rückstand wird in 200 ml Wasser gelöst. Die wässrige Phase wird viermal mit 150 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Der Rückstand (26.34 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch (°Hex/EtOAc 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 22.11 g (85.27 mmol, 74 %); farbloses, hochviskoses Öl, *R_f* = 0.45 (°Hex/EtOAc, 2:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 3.72 (t, 2H, ³*J*_{H3,H2} = 6.5 Hz, H3), 3.69 – 3.59 (m, 6H, (OCH₂)₃), 3.38 (t, 2H, ³*J*_{H9,H8} = 5.1 Hz, H9), 2.51 (t, 2H, ³*J*_{H2,H3} = 6.5 Hz, H2), 1.45 (s, 9H, CH₃-^tBu).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 171.04 (C1), 80.68 (C-^tBu), 70.76, 70.57, 70.17 (C5, C6, C8), 67.11 (C3), 41.50 (C9), 36.41 (C2), 28.23 (CH₃-^tBu).

ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 282.07 ([M+Na]⁺, ber.: 282.14).

C₁₁H₂₁N₃O₄ (259.30)**9-Amino-4,7-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (61)**(H₂N-Dispa-^tBu)

Eine Suspension von 19.25 g einer Ni-Al-Legierung in 600 ml Wasser wird unter starkem Rühren mit ca. 31 g Natriumhydroxid versetzt, bis bei weiterer Zugabe keine Gasentwicklung mehr auftritt. Nach zehnmütigem Stehen bei Raumtemp. wird die Mischung 30 min auf 70 °C erwärmt. Die überstehende Lösung wird abdekantiert, das Raney-Nickel mit Wasser

neutral gewaschen und im Anschluss mehrmals mit Isopropanol gespült. Zum aktivierten Katalysator werden 22.00 g (84.84 mmol) N₃-Dispa-^tBu (**60**), gelöst in 260 ml Isopropanol, gegeben. Die Reaktionsmischung wird mehrmals evakuiert, mit Argon belüftet und schließlich mit Wasserstoff überschichtet. Die Lösung wird 18 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Das Raney-Nickel wird über Hyflo[®] abfiltriert und das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand (17.70 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 9.0 cm im Laufmittelgemisch Methanol/Diethylether 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 14.86 g (63.69 mmol, 75 %); farbloses, hochviskoses Öl, $R_f = 0.15$ (Methanol/Diethylether 1:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 3.72 (t, 2H, $^3J_{H_3,H_2} = 6.5$ Hz, H3), 3.61 (s, 4H, H5, H6), 3.49 (t, 2H, $^3J_{H_8,H_9} = 5.1$ Hz, H8), 2.86 (t, 2H, $^3J_{H_9,H_8} = 5.1$ Hz, H9), 2.51 (t, 2H, $^3J_{H_2,H_3} = 6.5$ Hz, H2), 1.61 (s_b, 2H, NH₂), 1.61 (s, 9H, CH₃-^tBu).

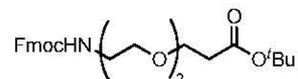
75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 171.07 (C1), 80.70 (C-^tBu), 73.54 (C8), 70.50, 70.39 (C5, C6), 67.05 (C3), 41.92 (C9), 36.41 (C2), 28.23 (CH₃-^tBu).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 234.12 ([M+H]⁺, ber.: 234.17).

C₁₁H₂₃NO₄ (233.30)

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-9-amido-4,7-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (62**)**

(FmocNH-Dispa-^tBu)



Zu einer Lösung von 14.00 g (60.01 mmol) H₂N-Dispa-^tBu (**61**) in 300 ml einer Mischung aus Aceton und Wasser (1:1) werden 5.04 g (60.01 mmol, Äquiv.) Natriumhydrogencarbonat gegeben. Die Reaktionsmischung wird mit 20.65 g (61.20 mmol, 1.02 Äquiv.) Fluoren-9-ylmethyl-succinimidyl-carbonat versetzt und 36 h gerührt. Anschließend wird die Lösung mit halbkonz. Salzsäure auf pH = 6 angesäuert, wobei sich das Produkt als Öl abscheidet. Das Aceton wird i. Vak. evaporiert und das Produkt viermal mit jeweils 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit 200 ml 1 N Salzsäure und 200 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand (28.66 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 24.33 g (53.40 mmol, 89 %); gelbliches, hochviskoses Öl, $R_f = 0.24$ (^cHex/EtOAc, 2:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.76 (d, 2H, $^3J_{H_4,H_3} = ^3J_{H_5,H_6} = 7.5$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $^3J_{H_1,H_2} = ^3J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $^3J_{H_3,H_2} =$

$^3J_{\text{H3,H4}} = ^3J_{\text{H6,H5}} = ^3J_{\text{H6,H7}} = 7.4$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.31 (t, 2H, $^3J_{\text{H2,H1}} = ^3J_{\text{H2,H3}} = ^3J_{\text{H7,H6}} = ^3J_{\text{H7,H8}} = 7.4$ Hz, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.41 (t, 1H, $^3J_{\text{NH,H9}} = 5.3$ Hz, NH), 4.39 (d, 2H, $^3J_{\text{CH2,H9}} = 7.0$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.23 (t, 1H, $^3J_{\text{H9,CH2}} = 7.1$ Hz, H9-Fmoc), 3.72 (t, 2H, $^3J_{\text{H3,H2}} = 6.4$ Hz, H3), 3.66 – 3.51 (m, 6H, H5, H6, H8), 3.40 (q, 2H, $^3J_{\text{H9,H8}} = ^3J_{\text{H9,NH}} = 5.3$ Hz, H9), 2.51 (t, 2H, $^3J_{\text{H2,H3}} = 6.4$ Hz, H2), 1.44 (s, 9H, CH₃-^tBu).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 171.06 (C1), 156.67 (C=O-Fmoc), 144.16 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.44 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.78 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.16 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.25 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.08 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 80.76 (C-^tBu), 70.46, 70.22 (C5, C6, C8), 67.03 (CH₂-Fmoc), 66.81 (C3), 47.40 (H9-Fmoc), 41.08 (C9), 36.35 (C2), 28.23 (CH₃-^tBu).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 478.21 ([M+Na]⁺, ber.: 478.22).

C₂₆H₃₃NO₆ (455.54)

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-9-amido-4,7-dioxa-nonansäure (63)

(FmocNH-Dispa-CO₂H)



8.00 g (24.42 mmol) FmocNH-Spa-^tBu (**62**) werden 2 h in einer Mischung aus 90 ml Trifluoressigsäure und 9 ml Wasser gerührt. Anschließend wird mit 100 ml Toluol verdünnt und i. Vak. eingengt. Der erhaltene Rückstand wird dreimal mit Toluol kodestilliert und das Rohprodukt (7.10 g) wird mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 25.0 cm, Durchmesser = 6.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 1:1 → 1:5 → 0:∞ +0.1 % TFA) gereinigt. Zum Entfernen von Trifluoressigsäureresten wird der Rückstand anschließend mehrmals mit Toluol kodestilliert.

Ausbeute: 6.66 g (16.86 mmol, 95 %); gelbliches, hochviskoses Öl, $R_f = 0$. (^cHex/EtOAc, 1:5 + 0.1 % TFA).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.74 (d, 2H, $^3J_{\text{H4,H3}} = ^3J_{\text{H5,H6}} = 7.2$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $^3J_{\text{H1,H2}} = ^3J_{\text{H8,H7}} = 7.5$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.43 (t, 2H, $^3J_{\text{H3,H2}} = ^3J_{\text{H3,H4}} = ^3J_{\text{H6,H5}} = ^3J_{\text{H6,H7}} = 7.4$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.29 (t, 2H, $^3J_{\text{H2,H1}} = ^3J_{\text{H2,H3}} = ^3J_{\text{H7,H6}} = ^3J_{\text{H7,H8}} = 7.5$ Hz, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.38 (s_b, 1H, NH), 4.41 (d, 2H, $^3J_{\text{CH2,H9}} = 6.9$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.20 (t, 1H, $^3J_{\text{H9,CH2}} = 7.1$ Hz, H9-Fmoc), 3.75 (t, 2H, $^3J_{\text{H3,H2}} = 6.2$ Hz, H3), 3.66 – 3.49 (m, 6H, H5, H6, H8), 3.45 – 3.29 (m, 2H, H9), 2.59 (t, 2H, $^3J_{\text{H2,H3}} = 6.2$ Hz, H2).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 175.25 (C1), 156.76 (C=O-Fmoc), 144.12 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.45 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.81 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.20 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.24 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.10 (C4-Fmoc, C5-Fmoc),

70.51, 70.22, 70.15 (C5, C6, C8), 66.83 (CH₂-Fmoc), 66.46 (C3), 47.35 (CH-Fmoc), 41.03 (C9), 34.81 (C2).

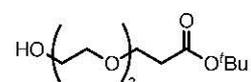
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 837.28$ ($[2M+K]^+$, ber.: 837.30).

C₂₂H₂₅NO₆ (399.44)

5.8.2 Synthese von *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-12-amido-4,7,10-trioxadodecansäure

12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (65)^[331]

(HO-Trispa-^tBu)



Zu einer Lösung von 66.74 g (444.43 mmol, 2.85 Äquiv.) Triethylenglycol (**64**) in 250 ml absol. Tetrahydrofuran werden unter Argon 102 mg (4.44 mmol, 0.03 Äquiv.) Natrium gegeben. Nach vollständigem Umsatz des Natriums werden 20.00 g (156.04 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester zugegeben und es wird 18 h bei Raumtemp. gerührt. Durch Zugabe von 3.8 ml 1 N Salzsäure wird neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in 170 ml ges. Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und dreimal mit 120 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 70 ml ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und das Rohprodukt (36.07 g) ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

Ausbeute: 36.07 g (129.59 mmol, 83 %); farbloses, hochviskoses Öl, $R_f = 0.43$ (EtOAc).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 3.67 - 3.49$ (m, 14H, (OCH₂)₇), 2.95 (sb, 1H, OH)

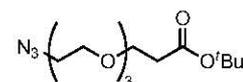
2.44 (t, 2H, ³J_{H₂,H₃} = 6.6 Hz, H₂), 1.37 (s, 9H, CH₃-^tBu).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 301.17$ ($[M+Na]^+$, ber.: 301.16).

C₁₃H₂₆O₆ (278.34)

12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (67)^[157]

(N₃-Trispa-^tBu)



35.53 g (127.65 mmol) HO-Trispa-^tBu (**65**) werden in 60 ml absol. Dichlormethan gelöst und mit 31.35 g (309.81 mmol, 2.43 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Unter Eiskühlung werden 30.27 g (264.24 mmol, 2.07 Äquiv.) Mesylchlorid zugetropft und es wird 14 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird das gebildete Triethylaminhydrochlorid über Hyflo[®] abfiltriert

und der Filterkuchen mit 200 ml Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird zweimal mit 50 ml Eiswasser und einmal mit 50 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit.

$C_{14}H_{28}O_7S$ (340.43)

Der Rückstand (**66**) wird in 100 ml *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen, mit 51.53 g (786.45 mmol) Natriumazid versetzt und 15 h bei 60 °C gerührt. Das *N,N*-Dimethylformamid wird i. Hochvak. entfernt und der Rückstand in 200 ml Wasser gelöst. Die wässrige Phase wird viermal mit 150 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Der Rückstand (33.46 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 29.36 g (96.79 mmol, 76 %); farbloses, hochviskoses Öl, $R_f = 0.41$ (^cHex/EtOAc, 2:1).

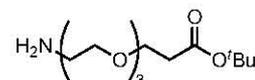
300 MHz-¹H-NMR ($CDCl_3$): [δ/ppm] = 3.83 – 3.50 (m, 12H, (OCH₂)₆), 3.38 (t, 2H, ³ $J_{H_{12},H_{11}} = 5.1$ Hz, H₁₂), 2.49 (t, 2H, ³ $J_{H_2,H_3} = 6.6$ Hz, H₂), 1.43 (s, 9H, CH₃-^tBu).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 326.08 ([M+Na]⁺, ber.: 326.17).

$C_{13}H_{25}N_3O_5$ (303.35)

12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**68**)^[157]

(H₂N-Trispa-^tBu)



Eine Suspension von 22 g einer Ni-Al-Legierung in 600 ml Wasser wird unter starkem Rühren mit ca. 35 g Natriumhydroxid versetzt, bis bei weiterer Zugabe keine Gasentwicklung mehr auftritt. Nach zehnmütigem Stehen bei Raumtemp. wird die Mischung 30 min auf 70 °C erwärmt. Die überstehende Lösung wird abdekantiert, das Raney-Nickel mit Wasser neutral gewaschen und im Anschluss mehrmals mit Isopropanol gespült. Zum aktivierten Katalysator werden 29.36 g (96.79 mmol) N₃-Trispa-^tBu (**67**), gelöst in 350 ml Isopropanol, gegeben. Die Reaktionsmischung wird mehrmals evakuiert, mit Argon belüftet und schließlich mit Wasserstoff überschichtet. Die Lösung wird 18 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Das Raney-Nickel wird über Hyflo[®] abfiltriert und das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand (24.70 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 9.0 cm im Laufmittelgemisch Methanol/Diethylether 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 19.60 g (70.70 mmol, 73 %); farbloses, hochviskoses Öl, $R_f = 0.29$ (Methanol/Diethylether 1:1).

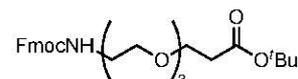
300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 3.68 (t, 2H, $^3J_{H_3,H_2} = 6.5$ Hz, H3) 3.65 – 3.56 (m, 10H, (OCH₂)₅), 3.47 (t, 2H, $^3J_{H_{12},H_{11}} = 4.9$ Hz, H12), 2.83 (t, 2H, $^3J_{NH_2,H_{12}} = 5.0$ Hz, NH₂), 2.47 (t, 2H, $^3J_{H_2,H_3} = 6.5$ Hz, H2), 1.41 (s, 9H, CH₃-^tBu).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 278.16 ([M+H]⁺, ber.: 278.16).

C₁₃H₂₇NO₅ (277.36)

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-12-amino-4,7,10-trioxadodecansäure-tert-butylester (69)^[151]

(FmocNH-Trispa-^tBu)



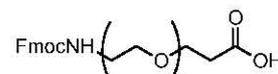
Zu einer Lösung von 7.06 g (25.45 mmol) H₂N-Trispa-^tBu (**68**) in 240 ml einer Mischung aus Aceton und Wasser (1:1) werden 2.13 g (25.45 mmol) Natriumhydrogencarbonat gegeben. Die Reaktionsmischung wird mit 8.74 g (25.96 mmol, 1.02 Äquiv.) Fluoren-9-ylmethylsuccinimidylcarbonat versetzt und 36 h gerührt. Anschließend wird mit halbkonz. Salzsäure auf pH = 6 angesäuert, wobei sich das Produkt als Öl abscheidet. Das Aceton wird i. Vak. evaporiert und das Produkt viermal mit jeweils 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit 200 ml 1 N Salzsäure und 200 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand (12.85 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 8.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 12.34 g (24.69 mmol, 97 %); gelbliches, hochviskoses Öl, $R_f = 0.22$ (^cHex/EtOAc, 2:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.76 (d, 2H, $^3J_{H_4,H_3} = ^3J_{H_5,H_6} = 7.5$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $^3J_{H_1,H_2} = ^3J_{H_8,H_7} = 7.3$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $^3J_{H_3,H_2} = ^3J_{H_3,H_4} = ^3J_{H_6,H_5} = ^3J_{H_6,H_7} = 7.4$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.31 (t, 2H, $^3J_{H_2,H_1} = ^3J_{H_2,H_3} = ^3J_{H_7,H_6} = ^3J_{H_7,H_8} = 7.1$ Hz, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.44 (t, 1H, $^3J_{NH,H_{12}} = 5.1$ Hz, NH), 4.40 (d, 2H, $^3J_{CH_2,H_9} = 6.9$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.22 (t, 1H, $^3J_{H_9,CH_2} = 6.9$ Hz, H9-Fmoc), 3.69 (t, 2H, $^3J_{H_3,H_2} = 6.5$ Hz, H3), 3.66 – 3.52 (m, 10H, (OCH₂)₅), 3.40 (q, 2H, $^3J_{H_{12},H_{11}} = ^3J_{H_{12},NH} = 5.1$ Hz, H12), 2.49 (t, 2H, $^3J_{H_2,H_3} = 6.5$ Hz, H2), 1.43 (s, 9H, CH₃-^tBu).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 522.15 ([M+Na]⁺, ber.: 522.25).

C₂₈H₃₇NO₇ (499.60)

***N*(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-12-amido-4,7,10-trioxadodecansäure (70)**^[151](FmocNH-Trispa-CO₂H)

12.20 g (24.42 mmol) FmocNH-Trispa-^tBu (**69**) werden 2 h in einer Mischung aus 90 ml Trifluoressigsäure und 9 ml Wasser gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit 100 ml Toluol verdünnt und i. Vak. eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wird dreimal mit Toluol kodestilliert und das Rohprodukt (10.90 g) wird mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 25.0 cm, Durchmesser = 11.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 1:1 → 1:5 → 0:∞ +0.1 % TFA) gereinigt.

Ausbeute: 10.40 g (23.44 mmol, 96 %); gelbliches, hochviskoses Öl, $R_f = 0$. (^cHex/EtOAc, 1:5 + 0.1 % TFA). Zum Entfernen von Trifluoressigsäurespuren wird der Rückstand anschließend mehrmals mit Toluol kodestilliert.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.74 (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.39 (t, 2H, $^3J_{H3,H2} = ^3J_{H3,H4} = ^3J_{H6,H5} = ^3J_{H6,H7} = 7.4$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.31 (t, 2H, $^3J_{H2,H1} = ^3J_{H2,H3} = ^3J_{H7,H6} = ^3J_{H7,H8} = 7.1$ Hz, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.42 (t, 1H, $^3J_{NH,H12} = 5.1$ Hz, NH), 4.41 (d, 2H, $^3J_{CH2,H9} = 6.9$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.20 (t, 1H, $^3J_{H9,CH2} = 6.6$ Hz, H9-Fmoc), 3.71 (t, 2H, $^3J_{H3,H2} = 6.1$ Hz, H3), 3.66 – 3.50 (m, 10H, (OCH₂)₅), 3.40 (q, 2H, $^3J_{H12,H11} = ^3J_{H12,NH} = 5.1$ Hz, H12), 2.48 (t, 2H, $^3J_{H2,H3} = 6.0$ Hz, H2).

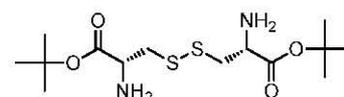
ESI-MS (positiv): [m/z] = 466.12 ([M+Na]⁺, ber.: 466.18).

C₂₄H₂₉NO₇ (443.49)

5.9 Die Synthesen von Immunstimulanzien und Adjuvanzien

5.9.1 Die Synthese des Mitogens *N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis-(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-(*R*)-cystein (Pam₃Cys)

L-Cystin-di-*tert*-butylester (72)

^[195]
(Cys-O^tBu)₂

Zu 45.00 g 70%iger Perchlorsäure werden 15.00 g (62.40 mmol) L-Cystin (**71**) unter Eiskühlung gelöst. Es werden 350 ml (301.00 g, 2.59 mol, 41.53 Äquiv.) Essigsäure-*tert*-butylester hinzugegeben und die Mischung bei Raumtemp. gerührt. Nach ca. 1 h bildet sich eine homogene Lösung. Diese wird 48 h gerührt, wobei ein farbloser Niederschlag ausfällt.

Die Mischung wird anschließend auf $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und 24 h bei dieser Temperatur gerührt. Der Feststoff wird abfiltriert und mit kaltem Diethylether gewaschen. Das Perchlorat wird in wenig Wasser aufgeschlämmt und vorsichtig mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8 erreicht ist. Anschließend wird dreimal mit 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 150 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Das Rohprodukt, ein farbloses hochviskoses Öl, wird ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

Ausbeute: 16.94 g (48.06 mmol, 77 %); farbloses, hochviskoses Öl, $[\alpha]_D^{24} = -8.5$ ($c = 2.00$, MeOH).

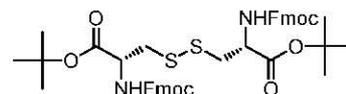
400 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆): $[\delta/\text{ppm}] = 3.48$ (t, 2H, $^3J_{\text{H}\alpha, \text{H}\beta\text{ab}} = 6.4$ Hz, 2 x H^α), 2.96 (dd, 2H, $^3J_{\text{H}\beta\text{a}, \text{H}\alpha} = 6.0$ Hz, $^2J_{\text{H}\beta\text{a}, \text{H}\beta\text{b}} = 13.1$ Hz, 2x H^{βa}), 2.88 (dd, 2H, $^3J_{\text{H}\beta\text{b}, \text{H}\alpha} = 6.8$ Hz, $^2J_{\text{H}\beta\text{b}, \text{H}\beta\text{a}} = 13.1$ Hz, 2 x H^{βb}), 2.27 – 2.05 (m, 4H, 2 x NH₂), 1.41 (s, 18H, 2 x CH₃-^tBu).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 353.16$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 353.16).

C₁₄H₂₈N₂O₄S₂ (352.51)

N,N'-Bis-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-cystin-di-*tert*-butylester (**73**)^[372]

(Fmoc-Cys-O^tBu)₂



15.00 g (42.60 mmol) L-Cystin-di-*tert*-butylester (**72**) und 35.90 g (106.42 mmol, 2.50 Äquiv.) Fluoren-9-ylmethyl-succinimidylcarbonat werden in 170 ml absol. Tetrahydrofuran gelöst. Anschließend werden 10.76 ml (9.90 g, 97.87 mmol, 2.30 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin in 10 ml absol. Tetrahydrofuran langsam hinzugegeben und der Ansatz wird 15 h bei Raumtemp. gerührt. Die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und der Rückstand in 200 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird zweimal mit 150 ml einer 5%igen Zitronensäure-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel i. Vak. wird der Rückstand aus Dichlormethan/Methanol (1:4) umkristallisiert. Das Produkt wird abfiltriert, mit einer kalten Mischung aus *tert*-Butanol/Isopropanol (1:1) gewaschen und i. Hochvak. getrocknet.

Ausbeute: 28.92 g (36.29 mmol, 85 %); farbloser, kristalliner Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = -4.2$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[196] $[\alpha]_D^{23} = -6.4$ ($c = 0.56$, CHCl₃), $R_f = 0.63$ (°Hex/EtOAc, 1:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 7.74$ (d, 4H, $^3J_{\text{H4}, \text{H3}} = ^3J_{\text{H5}, \text{H6}} = 7.5$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.58 (d, 4H, $^3J_{\text{H1}, \text{H2}} = ^3J_{\text{H8}, \text{H7}} = 7.3$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.38 (t, 4H, $^3J_{\text{H3}, \text{H2}} = ^3J_{\text{H3}, \text{H4}} = ^3J_{\text{H6}, \text{H5}} = ^3J_{\text{H6}, \text{H7}} = 7.5$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.30 (t, 4H, $^3J_{\text{H2}, \text{H1}} = ^3J_{\text{H2}, \text{H3}} = ^3J_{\text{H7}, \text{H6}}$

= $^3J_{H7,H8} = 7.5$ Hz, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.74 (d, 2H, $^3J_{NH,H\alpha} = 7.8$ Hz, NH), 4.58 (q, 2H, $^3J_{H\alpha,H\beta} = ^3J_{H\alpha,NH} = 5.9$ Hz, 2 x H $^\alpha$), 4.36 (d, 4H, $^3J_{CH2,H9-Fmoc} = 7.4$ Hz, 2 x CH₂-Fmoc), 4.21 (d, 2H, $^3J_{H9-Fmoc,CH2} = 7.4$ Hz, 2 x CH-Fmoc), 3.30 – 3.08 (m, 4H, 2 x H $^\beta$), 1.48 (s, 18H, CH₃-^tBu).

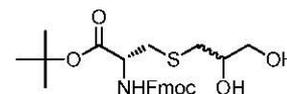
75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [δ/ppm] = 169.47 (C=O), 155.84 (C=O-Fmoc), 143.96, 143.92 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.42 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.84 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.20 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.30 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.10 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 83.28 (C-^tBu), 67.37 (CH₂-Fmoc), 54.29 (C $^\alpha$), 47.24 (CH-Fmoc), 42.04 (C $^\beta$), 28.14 (CH₃-^tBu).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 819.16 ([M+Na]⁺, ber.: 819.27).

C₄₄H₄₈N₂O₈S₂ (796.99)

N-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-S-[2,3-dihydroxy-(R,S)-propyl]-(R)-cystein-tert-butylester (74)^[182]

(Fmoc-Cyst-S-(dihydroxyprop)-O^tBu)



Eine Suspension aus 20.00 g (25.09 mmol) (Fmoc-Cys-O^tBu)₂ (**73**) und 9.85 g (151.63 mmol, 6.04 Äquiv.) Zinkstaub in 220 ml entgastem Dichlormethan wird unter Rühren mit 83 ml einer Lösung aus Methanol, konz. Salzsäure und konz. Schwefelsäure (100:7:1) versetzt. Nach 25 min Rühren bei Raumtemp. werden 9.29 g (125.40 mmol, 5.00 Äquiv.) (±)-Glycidol zugegeben, es wird auf 40 °C erwärmt und 5 h gerührt. Danach wird die Reaktionsmischung i. Vak. auf die Hälfte ihres Volumens eingengt und mit 30 ml einer 5%igen Kaliumhydrogensulfat-Lösung versetzt. Die Mischung wird 20 h bei – 4 °C aufbewahrt und dann über Hyflo[®] filtriert. Das Filtrat wird dreimal mit 100 ml Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen zweimal mit 20 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Öl wird i. Hochvak. getrocknet und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 23.30 g (49.20 mmol, 95 %); farbloses Öl, $R_f = 0.35$ (°Hex/EtOAc, 1:3).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.74 (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.3$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.38 (t, 2H, $^3J_{H3,H2} = ^3J_{H3,H4} = ^3J_{H6,H5} = ^3J_{H6,H7} = 7.4$ Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.29 (t, 2H, $^3J_{H2,H1} = ^3J_{H2,H3} = ^3J_{H7,H6} = ^3J_{H7,H8} = 7.7$ Hz, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.94 – 5.80 (m, 1H, $^3J_{NH,H\alpha} = 8.7$ Hz, NH), 4.54 – 4.33 (m, 3H, Cys $^\alpha$, CH₂-Fmoc), 4.21 (t, 1H, $^3J_{H9-Fmoc,CH2} = 6.9$ Hz, H9-Fmoc), 3.83 – 3.70 (m,

1H, CH-Glyceryl), 3.60 – 3.45 (m, 2H, CH₂-Glyceryl), 3.07 – 2.84 (m, 2H, Cys^β), 2.83 – 2.68 (m, 1H, SCH_a-Glyceryl), 2.68 – 2.53 (m, 1H, SCH_b-Glyceryl), 1.47 (s, 9H, CH₃-^tBu).

75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [δ/ppm] = 156.31 (C=O-Fmoc), 143.86 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.46 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.90 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.24 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.25 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.16 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 83.37 (C-^tBu), 70.64, 70.44 (Glyceryl-CH)*, 67.37 (CH₂-Fmoc), 65.40, 65.16 (Glyceryl-CH₂)*, 54.63 (C^α), 47.26 (CH-Fmoc), 36.98, 36.85 (C^β)*, 36.04, 35.91 (-SCH₂-)*, 28.15 (CH₃-^tBu).

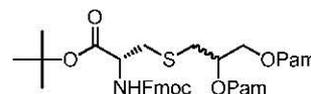
ESI-MS (positiv): [m/z] = 496.15 ([M+Na]⁺, ber.: 496.18).

C₂₅H₃₁NO₆S (473.58)

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise Signalverdopplung (*) auf.

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(R,S)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (75)^[182]**

(Fmoc-Cyst-(pam)₂-O^tBu)



Eine Lösung von 10.00 g (21.12 mmol) Fmoc-Cyst-S-(dihydroxyprop)-O^tBu (**74**), 17.33 g (67.58 mmol, 3.20 Äquiv.) Palmitinsäure, 13.12 ml (10.66 g, 84.47 mmol, 4.00 Äquiv.) *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid und 1.29 g (10.56 mmol, 0.50 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin in 250 ml absol. Tetrahydrofuran wird 5 h bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 11.90 ml Essigsäure versetzt und vom Lösungsmittel i. Vak. befreit. Der Rückstand wird aus Methanol/Dichlormethan (20:1) umkristallisiert.

Ausbeute: 19.06 g (20.05 mmol, 95 %); farbloser Feststoff, *R_f* = 0.31 (°Hex/EtOAc, 1:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.76 (d, 2H, ³*J*_{H4,H3} = ³*J*_{H5,H6} = 7.5 Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, ³*J*_{H1,H2} = ³*J*_{H8,H7} = 7.5 Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.40 (t, 2H, ³*J*_{H3,H2} = ³*J*_{H3,H4} = ³*J*_{H6,H5} = ³*J*_{H6,H7} = 7.4 Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.31 (t, 2H, ³*J*_{H2,H1} = ³*J*_{H2,H3} = ³*J*_{H7,H6} = ³*J*_{H7,H8} = 7.4 Hz, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5.77 – 5.59 (m, 1H, NH), 5.20 – 5.12 (m, 1H, CH-Glyceryl), 4.59 – 4.46 (m, 1H, Cys^α), 4.42 – 4.09 (m, 5H, CH₂-Fmoc, H9-Fmoc, OCH₂-Glyceryl), 3.15 – 2.93 (m, 2H, Cys^β), 2.77 (d, 2H, ³*J*_{SCH₂,CH-Glyceryl} = 6.6 Hz, SCH₂-Glyceryl), 2.39 – 2.17 (m, 4H, 2 x CH₂^α-Pam), 1.77 – 1.56 (m, 4H, 2 x CH₂^β-Pam), 1.47 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.25 (s_b, 48 H, 2 x (CH₂)₁₂-Pam), 0.88 (t, 6H, ³*J*_{H16,H15} = 6.5 Hz, 2 x CH₃-Pam).

75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [δ/ppm] = 173.47, 173.18, 173.15 (3 x C=O), 155.86 (C=O-Fmoc), 143.97 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.43 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.86 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.22 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.32 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.12

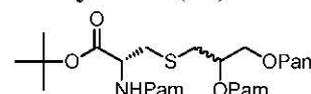
(C4-Fmoc, C5-Fmoc), 83.16 (C-^tBu), 70.37 (CH-Glyceryl), 67.38 (CH₂-Fmoc), 63.59 (CH₂-Glyceryl), 54.46 (Cys^α), 47.27 (CH-Fmoc), 35.52 (Cys^β), 34.41, 34.22 (C2-Pam), 33.37 (SCH₂-Glyceryl), 32.07 (2 x C14-Pam), 29.85, 29.81, 29.64, 29.60, 29.55, 29.51, 29.48, 29.44, 29.40, 29.27 (2 x C4 – C13-Pam), 28.13 (CH₃-^tBu), 25.03 (2 x C3-Pam), 22.84 (2 x C15-Pam), 14.26 (2 x C16-Pam).

ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 972.66 ([M+Na]⁺, ber.: 972.64).

C₅₇H₉₁NO₈S (950.40)

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(R,S)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (76)**^[182]

(Pam₃Cys-O^tBu)



10.00 g (10.52 mmol) Fmoc-Cyst-(pam)₂-O^tBu (**75**) werden in 90 ml *N,N*-Dimethylformamid/Piperidin (1:1) 2 h bei Raumtemp. gerührt. Die Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt, und der Rückstand wird dreimal mit Toluol kodestilliert. Das deblockierte Amin wird in 130 ml Dichlormethan/*N,N*-Dimethylformamid (5:2) gelöst und mit 5.40 g (21.04 mmol, 2.00 Äquiv.) Palmitinsäure, 2.66 g (21.04 mmol, 2.00 Äquiv.) HOBt x H₂O und 2.84 g (21.04 mmol, 2.00 Äquiv.) *N,N*-Diisopropylcarbodiimid versetzt. Es wird 20 h bei Raumtemp. gerührt. Der Ansatz wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und jeweils dreimal mit 100 ml Wasser, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und wieder mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. evaporiert. Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus Chloroform/Methanol (1:5) bei 0 °C gereinigt.

Ausbeute: 8.85 g (9.16 mmol, 87 %); farbloser Feststoff, *R_f* = 0.57 (Hex/EtOAc, 3:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [*δ/ppm*] = 6.31 (d, 1H, ³*J*_{NH,H_α} = 7.3 Hz, NH), 5.17 – 5.06 (m, 1H, CH-Glyceryl), 4.73 – 4.64 (m, 1H, Cys^α), 4.35 – 4.25 (m, 1H, OCH_{2a}-Glyceryl), 4.12 – 4.06 (dd, 1H, ³*J*_{OCH_{2b},CH} = 6.2 Hz, ³*J*_{OCH_{2b},OCH_{2a}} = 12.0 Hz, OCH_{2b}-Glyceryl), 3.05 – 2.96 (m, 2H, Cys^β), 2.71 (d, 2H, ³*J*_{SCH₂,CH-Glyceryl} = 6.5 Hz), 2.34 – 2.23 (m, 6H, 3 x CH₂^α-Pam), 1.66 – 1.50 (m, 6H, 3 x CH₂^β-Pam), 1.45 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.23 (s_b, 72 H, 3 x (CH₂)₁₂-Pam), 0.85 (t, 9H, ³*J*_{H₁₆,H₁₅} = 6.6 Hz, 3 x CH₃-Pam).

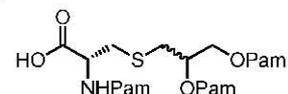
75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [*δ/ppm*] = 173.37, 172.28, 173.05 (3 x C=O), 169.77 (CONH), 83.06 (C-^tBu), 70.34 (CH-Glyceryl), 63.59 (CH₂-Glyceryl), 52.36 (Cys^α), 35.25 (Cys^β), 34.41, 34.22 (C2-Pam), 33.37 (SCH₂-Glyceryl), 31.87 (3 x C14-Pam), 29.75, 29.81, 29.64, 29.60, 29.55, 29.51, 29.48, 29.44, 29.40, 29.27 (3 x C4 – C13-Pam), 28.03 (CH₃-^tBu), 25.03 (3 x C3-Pam), 22.84 (3 x C15-Pam), 14.26 (3 x C16-Pam).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 989.77$ ($[M+Na]^+$, ber.: 989.80).

$C_{58}H_{111}NO_7S$ (966.57)

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-(*R*)-cystein (77)**^[182]

(Pam₃Cys-OH)



8.80 g (9.10 mmol) Pam₃Cys-O^tBu (**76**) werden in 40 ml Dichlormethan gelöst und mit 2.8 ml Anisol sowie 70 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Lösung wird 90 min bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 100 ml Toluol verdünnt, i. Vak. eingengt und anschließend dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 80 ml siedendem Petrolether/Chloroform (16:1) aufgenommen, heiß abfiltriert und bei – 20 °C auskristallisiert. Der erhaltene Rückstand (7.74 g, 8.50 mmol, 93 %) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm im Laufmittelgemisch °Hex/EtOAc/AcOH 200:40:1) gereinigt.

Ausbeute: 7.20 g (7.91 mmol, 87 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = +10.2$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$), $R_f = 0.57$ (EtOAc/AcOH, 100:1).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 6.50$ (d, 1H, $^3J_{NH,H\alpha} = 7.1$ Hz, NH), 5.19 – 5.08 (m, 1H, CH-Glyceryl), 4.84 – 4.70 (m, 1H, Cys^α), 4.37 – 4.27 (m, 1H, OCH_{2a}-Glyceryl), 4.16 – 4.04 (m, 1H, OCH_{2b}-Glyceryl), 3.19 – 3.01 (m, 2H, Cys^β), 2.72 (d, 2H, $^3J_{SCH_2,CH-Glyceryl} = 6.2$ Hz, SCH₂-Glyceryl), 2.37 – 2.22 (m, 6H, 2 x CH₂^α-Pam), 1.69 – 1.51 (m, 6H, 3 x CH₂^β-Pam), 1.23 (s_b, 72 H, 3 x (CH₂)₁₂-Pam), 0.85 (t_p, 9H, $^3J_{H16,H15} \approx 6.3$ Hz, 3 x CH₃-Pam).

75.5 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 173.65, 173.58, 173.48$ (3 x C=O), 172.27 (CONH), 70.17 (CH-Glyceryl), 63.59 (CH₂-Glyceryl), 52.06 (Cys^α), 36.25 (Cys^β), 36.2 (C2-Pam, NHCO), 34.27, 34.16 (2 x C2-Pam), 33.77 (SCH₂-Glyceryl), 31.87 (3 x C14-Pam), 29.75, 29.81, 29.64, 29.60, 29.55, 29.51, 29.48, 29.44, 29.40, 29.27 (3 x C4 – C13-Pam), 25.51 (C3-Pam), 24.93 (2 x C3-Pam), 22.74 (3 x C15-Pam), 14.06 (3 x C16-Pam).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 910.75$ ($[M+H]^+$, ber.: 910.75).

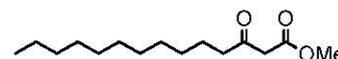
$C_{54}H_{103}NO_7S$ (910.46)

5.9.2 Die Synthese vom Monophosphorlipid A (AS595) und seinem Derivat

5.9.2.1 Die Synthesen der Fettsäuren

5.9.2.1.1 Die Synthese zur (*R*)-3-Benzoyloxytetradecansäure

3-Oxotetradecansäuremethylester (**81**)^[236, 432]



Eine Lösung von 140.00 g Meldrumsäure (**78**) (971.35 mmol, 1.00 Äquiv.) in 500 ml Dichlormethan wird mit 157 ml (1.95 mol, 2.01 Äquiv.) Pyridin versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 250 ml (230.50 g, 1.05 mol, 1.08 Äquiv.) Laurinsäurechlorid (**79**) in 250 ml Dichlormethan über 3 h langsam hinzuge tropft. Die Lösung wird 2 h bei 0 °C und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Überschüssiges Pyridin wird mit 2 N Salzsäure entfernt, die organische Phase mit Wasser neutral gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand wird in 550 ml Methanol 4 h unter Rückfluss erhitzt, wobei Kohlendioxid austritt. Der überschüssige Alkohol wird i. Vak. evaporiert und der Rückstand durch eine sehr kurze Destillationsapparatur ohne Kühlung bei 134 °C i. Hochvak. bei 0.2 mbar destilliert.

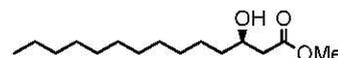
Ausbeute: 187.16 g (730.01 mmol, 75 %), Lit.^[432] 81 %; farbloser, amorpher Feststoff, Sdp. 132 °C/0.2 Torr.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ /ppm] = 3.71 (s, 3H, OMe), 3.43 (s, 2H, H₂), 2.51 (t, 2H, H₄, ³J_{H₄,H₅} = 7.3 Hz), 1.62 – 1.50 (m, 2H, H₅), 1.23 (m_c, 16H, (CH₂)₈), 0.86 (t, 3H, H₁₄, ³J_{H₁₄,H₁₃} = 6.7 Hz).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 279.19 ([M+Na]⁺, ber.: 279.19).

C₁₅H₂₈O₃ (256.38)

(*R*)-3-Hydroxytetradecansäuremethylester (**84**)^[237, 433]



In einem Schlenk-Kolben unter Argon werden 35.0 mg (0.0012 Äquiv.) [RuCl₂(PhH)]₂ (**82**) und 101.0 mg (0.0028 eq.) (*R*)-(+)-BINAP in 5 ml entgastem Dimethylformamid gelöst und 20 min auf 110 °C erhitzt.

In einem zweiten Gefäß legt man unter Argon 15.00 g (58.50 mmol) des β -Ketoesters **81** in 90 ml entgastem Methanol vor und gibt die abgekühlte Katalysator-Lösung **83** dazu. Die vereinigten Lösungen werden in einen Autoklaven überführt und mit wenig Methanol nachgespült. Der Autoklav wird mehrmals mit Wasserstoff geflutet und es wird 18 h bei

90 °C und 7 bar hydriert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemp. wird die Reaktionslösung unter reduziertem Druck eingeeengt und der rohe β -Hydroxyester durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 11.0 cm im Laufmittelgemisch $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 10:1) gereinigt.

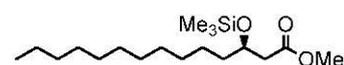
Ausbeute: 14.36 g (55.60 mmol, 95 %), Lit.^[433]: 96 %; klare, farblose Flüssigkeit, $R_f = 0.27$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 5:1), $[\alpha]_D^{20} = -12.5$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.^[433] $[\alpha]_D^{20} = -13.9$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 3.97$ (m, 1H, H3), 3.68 (s, 3H, OMe), 2.90 (br, 1H, OH), 2.49 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}2\text{a},\text{H}3} = 3.1$ Hz, $^2J_{\text{H}2\text{a},\text{H}2\text{b}} = 16.4$ Hz, H2_a), 2.38 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}2\text{b},\text{H}3} = 9.0$ Hz, $^2J_{\text{H}2\text{b},\text{H}2\text{a}} = 16.4$ Hz, H2_b), 1.53 – 1.18 (m, 20H, $(\text{CH}_2)_{10}$), 0.85 (t, 3H, $^3J_{\text{H}14,\text{H}13} = 6.7$ Hz, H14).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 242.28$ ($[\text{M}-\text{OH}+\text{H}]^+$, ber.: 242.22).

$\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_3$ (258.40)

(R)-3-Trimethylsilyloxytetradecansäuremethylester (85)^[241, 244]



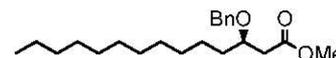
Zu einer Lösung aus 150 ml getrocknetem Tetrahydrofuran und 10.00 g (38.70 mmol) (R)-3-Hydroxytetradecansäuremethylester (**84**) werden 11.84 ml (8.64 g, 85.40 mmol, 2.20 Äquiv.) Triethylamin und 8.39 g (77.23 mmol, 1.99 Äquiv.) Chlorotrimethylsilan gegeben. Die Lösung wird 17 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird mit 200 ml eiskaltem Dichlormethan verdünnt und mit 15 ml kalter gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Die organische Phase wird zweimal mit 75 ml kaltem Wasser gewaschen. Die gesammelten wässrigen Phasen werden zweimal mit Ether (100 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Es werden 12.70 g des rohen Trimethylsilyloxyethers **85** erhalten. Dieser ist ausreichend rein für die Umsetzung in der nächsten Stufe.

Ausbeute: 12.49 g (37.80 mmol, 98 %), Lit.^[36]: 99 %; klare, farblose Flüssigkeit, $R_f = 0.81$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 5:1).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 4.10$ (m, 1H, H3), 3.67 (s, 3H, OMe), 2.44 (d, 1H, $^3J_{\text{H}2\text{a},\text{H}3} = 1.2$ Hz, H2_a), 2.43 (s_p, 1H, H2_b), 1.50 – 1.19 (m, 20H, $(\text{CH}_2)_{10}$), 0.87 (t, 3H, $^3J_{\text{H}14,\text{H}13} = 6.8$ Hz, H14), 0.10 (s, 9H, SiMe_3).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 992.84$ ($[\text{3M}+\text{H}]^+$, ber.: 992.74).

$\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{O}_3\text{Si}$ (330.58)

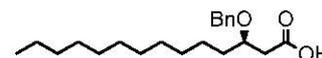
(R)-3-Benzyloxytetradecansäuremethylester (86)^[244]

Zu einer Lösung aus 12.49 g (37.80 mmol) rohem Trimethylsilylether **85**, 4.70 ml (4.94 g, 46.50 mmol, 1.20 Äquiv.) Benzaldehyd in 200 ml trockenem Dichlormethan werden 0.70 ml (0.86 g, 3.87 mmol, 0.10 Äquiv.) Trimethylsilyltriflat zugegeben und 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend werden 5.70 ml (4.10 g, 35.60 mmol, 0.92 Äquiv.) Triethylsilan hinzugegeben und es wird auf Raumtemp. erwärmt. Nach 14 h wird die Lösung mit 150 ml Diethylether verdünnt, mit 200 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit 100 ml Wasser gewaschen. Im Anschluss wird die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. aufkonzentriert. Das erhaltene Rohprodukt ist ausreichend rein für die nächsten Stufe.

Rohausbeute: 13.49 g (quant.); klare, farblose Flüssigkeit, $R_f = 0.75$ (°Hex/EtOAc, 5:1).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 371.25$ ($[M+Na]^+$, ber.: 371.51).

$C_{18}H_{38}O_3Si$ (348.52)

(R)-3-Benzyloxytetradecansäure (87)^[244]

Zu einer Lösung von 13.49 g (38.70 mmol) rohem Benzylether **86** in 200 ml Tetrahydrofuran wird eine wässrige 1 N Lithiumhydroxid-Lösung (200 ml, 0.20 mol) gegeben und 30 min bei 80 °C und anschließend 6 h bei 50 °C gerührt. Danach wird mit 1 N Salzsäure neutralisiert und zweimal mit 250 ml Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Das erhaltene Rohprodukt (16.17 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 11.0 cm im Laufmittelgemisch °Hex/EtOAc 20:1 → 1:5 → 1:5 + 0.1 % AcOH) gereinigt.

Ausbeute: 10.44 g (31.20 mmol, 81 % ausgehend von **84**), Lit.: ^[433] 81 %; farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{20} = -7.2$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$), Lit.: ^[244] $[\alpha]_D^{20} = -5.0$ ($c = 1.20$, $CHCl_3$).

400 MHz-¹H-NMR ($CDCl_3$): δ/ppm = 7.38 – 7.26 (m, 5H, H_{Ar-Ph}), 4.57 (s, 2H, CH-Bzn), 3.87 (qp, 1H, $^3J_{H3,H2ab} \approx ^3J_{H3,H4} \approx 6.1$ Hz, H3), 2.64 (dd, 1H, $^3J_{H2a,H3} = 6.9$ Hz, $^2J_{H2a,H2b} = 15.5$ Hz, H2_a), 2.56 (dd, 1H, $^3J_{H2b,H3} = 5.2$ Hz, $^2J_{H2b,H2a} = 15.5$ Hz, H2_b), 1.72 – 1.50 (m, 2H, H4), 1.53 – 1.18 (m, 18H, $(CH_2)_9$), 0.88 (t, 3H, $^3J_{H14,H13} = 6.1$ Hz, H14).

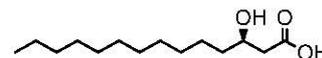
100.6 MHz-¹³C-NMR [BB] ($CDCl_3$): $[\delta/ppm]$ = 175.57 (C1), 137.86 ($C_{ipso-Ph}$), 128.39, 127.83, 127.77 ($C_{o,m,p-Ph}$), 75.68 (C3), 71.51 (CH-Bzn), 39.19 (C2), 33.98 (C4), 31.88 (C12), 29.60, 29.53, 29.51, 29.31 (C6 – C11), 25.05 (C5), 22.66 (C13), 14.10 (C14).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 357.27$ ($[M+Na]^+$, ber.: 357.24).

$C_{21}H_{34}O_3$ (334.49)

5.9.2.1.2 Die Synthese zur (*R*)-3-Dodecanoyloxytetradecansäure

(*R*)-3-Hydroxytetradecansäure (**88**)^[434]



Zu 5.00 g (19.35 mmol) (*R*)-3-Hydroxytetradecansäuremethylester (**84**) wird bei Raumtemp. 80 ml einer Mischung aus Tetrahydrofuran/Wasser (1:1) und 1.39 g (58.10 mmol, 3.00 Äquiv.) Lithiumhydroxid gegeben, wobei sich die Reaktionsmischung leicht erwärmt. Diese wird 1 h bei 80 °C und danach 4 h bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird mit konz. Salzsäure langsam und vorsichtig ein pH-Wert von 2 eingestellt, danach wird die wässrige Lösung dreimal mit 100 ml Dichlormethan extrahiert und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und nach Kodestillation mit Dichlormethan und Trocknung des Rückstands i. Hochvak. wird das erhaltene Rohprodukt ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

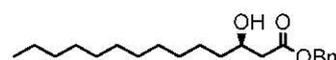
Ausbeute: 4.33 g (17.71 mmol, 92 %) Lit.:^[244] 69 %; farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{20} = -15.3$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[244] $[\alpha]_D^{20} = -16.2$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 4.03$ (td, 1H, $^3J_{\text{H}_3, \text{H}_2\text{b}} \approx ^3J_{\text{H}_3, \text{H}_4} \approx 8.2$ Hz, $^3J_{\text{H}_3, \text{H}_2\text{a}} \approx 3.5$ Hz, H3), 2.58 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_2\text{a}, \text{H}_3} = 3.1$ Hz, $^2J_{\text{H}_2\text{a}, \text{H}_2\text{b}} = 16.6$ Hz, H2_a), 2.47 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_2\text{b}, \text{H}_3} = 8.9$ Hz, $^2J_{\text{H}_2\text{b}, \text{H}_2\text{a}} = 16.6$ Hz, H2_b), 1.60 – 1.38 (m, 2H, H4), 1.38 – 1.17 (m, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 0.87 (t, 3H, $^3J_{\text{H}_{14}, \text{H}_{13}} = 6.9$ Hz, H14).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 757.65$ ($[\text{3M} + \text{Li} + \text{H}_2\text{O}]^+$, ber.: 757.64).

$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_3$ (244.37)

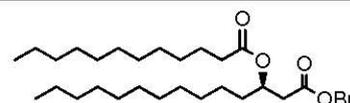
(*R*)-3-Hydroxytetradecansäurebenzylester (**89**)^[244]



Zu einer Lösung von 4.40 g (18.01 mmol) (*R*)-3-Hydroxytetradecansäure (**88**) in 80 ml Ethylacetat werden 9.41 g (55.02 mmol, 3.00 Äquiv.) Benzylbromid, 5.31 g (52.50 mmol, 2.92 Äquiv.) Triethylamin und 3.32 g (8.99 mmol, 0.50 Äquiv.) Tetrabutylammoniumjodid zugegeben und die Mischung 18 h bei Raumtemp. gerührt. Danach werden i. Vak. die Lösungsmittel evaporiert, der Rückstand wird in 300 ml Ether aufgenommen, zweimal mit 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit 100 ml Wasser neutral gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird ohne weitere Reinigung und Charakterisierung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Rohausbeute: 6.02 g (18.00 mmol, quant.); gelber, kristalliner Feststoff, $R_f = 0.29$ (°Hex/EtOAc, 8:1).

$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$ (334.49)

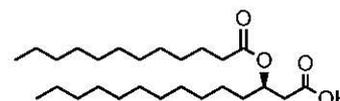
(R)-3-Dodecanoyloxy-tetradecansäurebenzylester (90)^[244]

12.00 g (35.88 mmol) des rohen Alkohols **89** werden bei 0 °C in 10.3 ml (10.09 g, 127.56 mmol, 3.56 Äquiv) Pyridin und 218 ml Dichlormethan mit 10.99 g (50.24 mmol, 1.40 Äquiv.) Dodecanoylchlorid 18 h bei Raumtemp gerührt. Dann wird mit 200 ml Dichlormethan verdünnt und eine Mischung aus 150 ml Eiswasser und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben. Die organische Phase wird abgetrennt und mit 100 ml 1 N wässriger Salzsäure sowie mit 100 ml gesättigter Salzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Das Rohprodukt wird anschließend durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 25.0 cm, Durchmesser = 8.0 cm im Laufmittelgemisch °Hex/EtOAc, 20:1) gereinigt.

Ausbeute: 18.50 g (35.80 mmol, quant., leicht verunreinigt mit Dodecansäure), Lit.: ^[244] 96 %; farbloser Feststoff, $R_f = 0.37$ (°Hex/EtOAc, 20:1), $[\alpha]_D^{24} = +1.3$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.: ^[244] $[\alpha]_D^{22} = +1.8$ ($c = 5.20$, CHCl₃).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.39 - 7.29$ (m, 5H, H_{Ar}-Ph), 5.24 (tt, 1H, ³ $J_{H3,H2ab} \approx 7.3$ Hz, ³ $J_{H3,H4} = 5.4$ Hz, H3), 5.10 (s, 2H, CH-Bzn), 2.63 (dd, 1H, ³ $J_{H2a,H3} = 7.4$ Hz, ² $J_{H2a,H2b} = 15.3$ Hz, H2_a), 2.59 (dd, 1H, ³ $J_{H2b,H3} = 5.6$ Hz, ² $J_{H2b,H2a} = 15.3$ Hz, H2_b), 2.20 (td, 2H, ³ $J_{H16,H17} = 7.5$ Hz, ² $J_{H16a,H16b} = 3.6$ Hz), 1.64 – 1.50 (m, 4H, H4 + H17), 1.34 – 1.16 (s_{br}, 34H, (CH₂)₁₇), 0.88 (m_c, 6H, H14 + H26).

C₃₃H₅₆O₄ (516.80)

(R)-3-(Dodecanoyloxy)tetradecansäure (91)^[244]

Zu 360 ml einer Mischung aus Ethylacetat/Ethanol (1:1) werden 18.00 g (34.80 mmol) des Benzylesters **90** und 600 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle gegeben. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird 18 h bei Raumtemp. unter 3 bar Wasserstoffatmosphäre gerührt. Danach wird die Wasserstoffatmosphäre gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über eine Kartusche mit C18-Säulenmaterial filtriert. Man spült die kleine Säule mehrmals mit reinem Ethylacetat und befreit das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln. Der Rückstand wird einige Male mit Toluol kodestilliert und über Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 25.0 cm, Durchmesser = 8.0 cm im Laufmittelgemisch °Hex/EtOAc, 8:1) gereinigt.

Ausbeute: 12.44 g (29.20 mmol, 84 %), Lit.: ^[244] 86 %; farbloser Feststoff, $R_f = 0.34$ (°Hex/EtOAc, 3:1), $[\alpha]_D^{24} = -0.7$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.: ^[435] $[\alpha]_D^{16} = -1.03$ ($c = 1.17$, CHCl₃).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 5.20 (tt, 1H, ³J_{H3,H2ab} \approx 7.2 Hz, ³J_{H3,H4} = 6.9 Hz, H3), 2.61 (dd, 1H, ³J_{H2a,H3} = 7.3 Hz, ²J_{H2a,H2b} = 15.9 Hz, H2_a), 2.58 (dd, 1H, ³J_{H2b,H3} = 5.6 Hz, ²J_{H2b,H2a} = 15.9 Hz, H2_b), 2.27 (t, 2H, ³J_{H16,H17} = 7.5 Hz, H16), 1.66 – 1.53 (m, 4H, H4 + H17), 1.33 – 1.20 (s_{br}, 34H, (CH₂)₁₇), 0.86 (m, 6H, H14 + H26).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [δ/ppm] = 176.84 (C1), 173.76 (C15), 70.41 (C3), 39.34 (C2), 34.94 (C16), 34.42 (C4), 32.38 (C12 + C24), 30.09, 30.06, 30.01, 29.95, 29.92, 29.82, 29.75, 29.73, 29.60, 29.58 (C6 – C11 + C18 – C23), 25.57, 25.47 (C5 + C17), 23.15 (C13 + C25), 14.59 (C14 + C26).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 449.36 ([M+Na]⁺, ber.: 449.36).

465.34 ([M+K]⁺, ber.: 465.33).

875.73 ([2M+Na]⁺, ber.: 875.73).

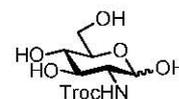
C₂₆H₅₀O₄ (426.67)

5.9.2.2 Die Synthesen der Monosaccharide

5.9.2.2.1 Die Synthese des Glucosamindonors

2-Desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α,β -D-glucopyranose (93)^[141, 245]

(α,β -GlcNTroc-OH)

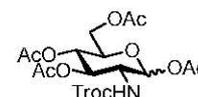


Unter intensivem Rühren werden 100.00 g (463.76 mmol) α -D-Glucosamin-Hydrochlorid (92) in 700 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst und innerhalb von 30 min tropfenweise mit 118.00 g (556.97 mmol, 1.20 Äquiv.) Chlorameisensäure-2,2,2-trichlorethylester (2,2,2-Trichlorethoxycarbonylchlorid) versetzt. Es werden weitere 200 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 3.5 h bei Raumtemp. gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wird mit 1 M Salzsäure neutralisiert, i. Vak. eingengt und der ausgefallene Feststoff wird erneut abfiltriert. Dieser Vorgang wird ein weiteres Mal wiederholt. Die vereinigten Rückstände werden i. Hochvak. bei 45 °C getrocknet und ohne Reinigung und Charakterisierung in nachfolgenden Stufen eingesetzt.

Ausbeute: 135.12 g (381.08 mmol, 82 %), Lit.: ^[141] 85 %; farbloser Feststoff, R_f = 0.50 bzw. 0.39 (EtOAc/EtOH, 10:1).

C₉H₁₄Cl₃NO₇ (354.57)

1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α,β -D-glucopyranose (94)^[141, 245]
(α,β -Ac₃GlcNTroc-OAc)



Zu einer Lösung von 100.00 g (282.03 mmol) α,β -GlcNTroc-OH (**93**) in 500 ml Pyridin werden 250 ml Essigsäureanhydrid bei 0 °C langsam hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemp. 17 h gerührt und anschließend werden überschüssiges Essigsäureanhydrid sowie Pyridin i. Hochvak. entfernt. Der Rückstand wird fünfmal mit 100 ml Toluol kodestilliert und die Reinheit durch Dünnschichtchromatographie bestimmt. Das entstandene Anomerengemisch (mittels NMR-Spektroskopie bestimmt $\alpha:\beta = 6:4$) ist ausreichend rein für die Umsetzung in der nächsten Stufe. Sollte dies nicht der Fall sein, so wird das Rohprodukt durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: °Hex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Rohausbeute: 147.00 g (quant.), Lit.:^[245] 92 %, bezogen auf α -D-Glucosamin-Hydrochlorid; farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.65$ (°Hex/EtOAc, 2:3), $R_f = 0.40$ (°Hex/EtOAc, 1:1), $R_f = 0.20$ (°Hex/EtOAc, 2:1).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): [δ/ppm] = 6.18 (d, 1H, ³ $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, H1-GlcN ^{α}), 5.71 (d, 1H, ³ $J_{H1,H2} = 8.6$ Hz, H1-GlcN ^{β}), 5.34 (d, 1H, ³ $J_{NH,H2} = 9.3$ Hz, NH), 5.24 (t_p, 1H, ³ $J_{H3,H2} \approx$ ³ $J_{H3,H4} \approx 10.2$ Hz, H3-GlcN), 5.15 (t, 1H, ³ $J_{H4,H3} \approx$ ³ $J_{H4,H5} \approx 9.7$ Hz, H4-GlcN), 4.78 (d, 1H, ² $J_{CH2a,CH2b} = 12.1$ Hz, CH_{2a}-Troc), 4.57 (d, 1H, ² $J_{CH2b,CH2a} = 12.1$ Hz, CH_{2b}-Troc), 4.22 (dd, 1H, ³ $J_{H6a,H5} = 4.1$ Hz, ² $J_{H6a,H6b} = 12.3$ Hz, H6_a-GlcN), 4.18 (dd, 1H, ³ $J_{H6b,H5} = 3.3$ Hz, ² $J_{H6b,H6a} = 12.3$ Hz, H6_b-GlcN), 4.10 – 4.01 (m, 1H, H2-GlcN), 4.01 – 3.95 (m, 1H, H5-GlcN), 2.15, 2.04, 2.00, 1.99 (4 x s, 12H, CH₃-Ac).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB] (CDCl₃): [δ/ppm] = 171.59, 171.06, 169.58, 169.08 (C=O-Ac), 154.50 (C=O-Troc), 95.64 (CCl₃), 90.79 (C1-GlcN), 74.98 (CH₂-Troc), 70.73, 70.07, 67.95 (C3-/C5-/C4-GlcN), 61.87 (C6-GlcN), 53.53 (C2-GlcN), 21.23, 21.08, 21.04, 20.95 (4 x CH₃-Ac).

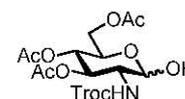
ESI-MS (positiv): [m/z] = 543.98 ([M+Na]⁺, ber.: 544.02)

1067.01 ([2M+Na]⁺, ber.: 1067.04).

C₁₇H₂₂Cl₃NO₁₁ (522.72)

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α,β -D-glucopyranose (95)^[245, 247]

(α,β -Ac₃GlcNTroc-OH)



Zu einer Lösung von 15.33 ml (13.80 g, 229.62 mmol, 1.20 Äquiv.) Ethylendiamin in 300 ml Tetrahydrofuran werden langsam 15.32 ml (16.08 g, 267.78 mmol, 1.40 Äquiv.) Essigsäure

bei 0 °C zugetropft, wobei sich sofort ein farbloser Niederschlag bildet. Anschließend werden 100.00 g (191.31 mmol) rohes α,β -Ac₃GlcNTroc-OAc (**94**) in ca. 300 ml Tetrahydrofuran zugegeben und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 200 ml Wasser wird dreimal mit 150 ml Dichlormethan extrahiert, die organische Phase mit 200 ml 2 N Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Durch Dünnschichtchromatographie wird die Reinheit des erhaltenen Produkts überprüft. Sollte Reinigung notwendig sein, erfolgt sie durch Flashchromatographie an Kieselgel im Laufmittelgemisch °Hex/EE, 3:2.

Ausbeute: 85.33 g (177.52 mmol, 93 %, 76 % bezogen auf α -D-Glucosamin-Hydrochlorid); farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.53$ (°Hex/EtOAc, 2:3), $R_f = 0.18$ (°Hex/EtOAc, 3:2).

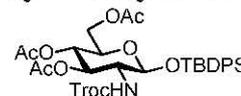
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 502.03$ ($[M+Na]^+$, ber.: 502.01).

983.10 ($[2M+Na]^+$, ber.: 983.02).

C₁₅H₂₀Cl₃NO₁₀ (480.68)

tert-Butyldiphenylsilyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (96**)**^[141]

(β -Ac₃GlcNTroc-OTBDPS)



Eine Lösung aus 40.00 g (83.22 mmol) rohem α,β -Ac₃GlcNTroc-OH (**95**) in 250 ml *N,N*-Dimethylformamid werden mit 8.50 g (124.85 mmol, 1.50 Äquiv.) Imidazol, 0.11 g (0.91 mmol, 0.01 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin und 34.30 g (124.79 mmol, 1.50 Äquiv.) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 5 d bei Raumtemp. gerührt, wobei nach 1 d weitere 0.07 g (0.58 mmol, 0.007 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin zur Vervollständigung der Reaktion zugegeben werden. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Hochvak. evaporiert und der Rückstand zweimal mit 100 ml Toluol kodestilliert. Das schwerlösliche Rohprodukt wird in Methanol aufgenommen, auf Kieselgel aufgezogen und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 42.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch °Hex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 51.71 g (71.90 mmol, 86 %); farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = +8.2$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.64$ (°Hex/EtOAc, 2:3), $R_f = 0.38$ (°Hex/EtOAc, 2:1), $R_f = 0.62$ (Tol/EtOH, 5:1).

400 MHz⁻¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.72 - 7.61$ (m, 4H, H_{Ar}-Ph), 7.47 - 7.41 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.40 - 7.33 (m, 4H, H_{Ar}-Ph), 5.07 - 4.93 (m, 2H, H₄-GlcN {5.04, t_p , $^3J_{H_4,H_3} \approx ^3J_{H_4,H_5} \approx 9.4$ Hz}), H₃-GlcN {4.97, t_p , $^3J_{H_3,H_2} \approx ^3J_{H_3,H_4} \approx 9.4$ Hz}), 4.84 (d, 1H, $^3J_{NH,H_2} = 9.7$ Hz, NH-GlcN), 4.76 (d, 1H, $^2J_{CH_{2a},CH_{2b}} = 12.0$ Hz, CH_{2a}-Troc), 4.57 - 4.51 (m, 2H, CH_{2b}-Troc {4.54, d, $^2J_{CH_{2b},CH_{2a}} = 12.0$ Hz}), H₁-GlcN {4.52, d, $^3J_{H_1,H_2} = 8.1$ Hz}), 4.09 (dd, 1H, $^3J_{H_{6a},H_5} = 5.5$ Hz, $^2J_{H_{6a},H_{6b}} = 12.1$ Hz, H_{6a}-GlcN), 3.98 - 3.85 (m, 2H, H_{6b}-GlcN {3.95, dd, $^3J_{H_{6b},H_5} = 2.4$ Hz, $^2J_{H_{6b},H_{6a}} = 12.1$ Hz}), H₂-GlcN {3.88}), 3.36 (ddd, 1H,

$^3J_{H5,H4} = 9.7$ Hz, $^3J_{H5,H6a} = 5.5$ Hz, $^3J_{H5,H6b} = 2.4$ Hz, H5-GlcN), 1.99, 1.99, 1.97 (3 x s, 9H, CH₃-Ac), 1.07 (s, 9H, CH₃-^tBu).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 170.80, 170.58, 169.39 (C=O-Ac), 154.00 (C=O-Troc), 135.95, 135.76 (C_{o,m,p}-Ph), 132.60, 132.49 (C_{ipso}-Ph), 130.11, 129.99, 127.72, 127.51 (C_{o,m,p}-Ph), 96.03 (C1-GlcN), 95.24 (CCl₃), 74.61 (CH₂-Troc), 72.33 (C3-GlcN), 71.61 (C5-GlcN), 68.71 (C4-GlcN), 62.18 (C6-GlcN), 57.88 (C2-GlcN), 26.68 (CH₃-^tBu), 20.63, 20.59, 19.11 (CH₃-Ac).

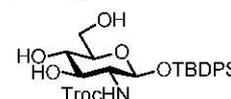
ESI-MS (positiv): [m/z] = 742.14 ([M+Na]⁺, ber.: 742.12).

1459.29 ([2M+Na]⁺, ber.: 1459.25).

C₃₁H₃₈Cl₃NO₁₀Si (719.08)

***tert*-Butyldiphenylsilyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (97)**^[141]

(β -GlcNTroc-OTBDPS)



Eine Lösung aus 800 ml Methanol und 51.50 g (71.70 mmol) β -Ac₃GlcNTroc-OTBDPS (**96**) wird tropfenweise mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 9.0 erreicht ist, wobei durch weitere Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung der pH-Wert nachreguliert wird. Man rührt die Reaktionslösung 14 h und neutralisiert sie anschließend durch vorsichtige Zugabe von konz. Essigsäure. Die Lösung wird i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit und der Rückstand i. Hochvak. getrocknet und ohne Reinigung sowie Charakterisierung weiter umgesetzt.

Rohausbeute: 42.0 g (71.7 mmol, quant.); farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.34$ (Tol/EtOH, 5:1).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 633.39 ([M+H+MeCN]⁺, ber.: 633.14).

C₂₅H₃₂Cl₃NO₇Si (592.97)

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4,6-O-benzyliden-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (98)**^[141]

(β -4,6-Bzn-GlcNTroc-OTBDPS)



42.00 g (70.80 mmol) rohes β -GlcNTroc-OTBDPS (**97**) werden in 800 ml Acetonitril bei 40 °C gelöst und mit 23.70 g (155.73 mmol, 2.20 Äquiv.) Benzaldehyddimethylacetal versetzt. Die Mischung wird mit 4-Toluolsulfonsäure-Monohydrat, gelöst in Acetonitril, versetzt bis ein pH-Wert zwischen 4.0 – 3.5 erreicht ist. Die Mischung wird 3 h bei 40 °C gerührt und durch Zugabe von *N*-Ethyl-diisopropylamin neutralisiert. Anschließend werden die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert, der Rückstand (61.64 g) dreimal mit 50 ml Toluol

kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 44.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc 6:1).

Ausbeute: 34.35 g (54.40 mmol, 71 % bezogen auf **96**); farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = -22.2$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[141] $[\alpha]_D^{24} = -23.0$ ($c = 1.00$, CHCl₃). $R_f = 0.51$ (Tol/EtOH, 5:1), $R_f = 0.37$ (^cHex/EtOAc, 3:1), $R_f = 0.15$ (^cHex/EtOAc, 5:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.70 - 7.61$ (m, 4H, H_{Ar}-Ph), 7.46 – 7.34 (m, 8H, H_{Ar}-Ph), 7.33 – 7.27 (m, 3H, H_{Ar}-Ph), 5.49 (s, 1H, CH-Bzn), 4.94 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 7.0 Hz, NH-GlcN), 4.68 (d, 1H, ²J_{CH2a,CH2b} = 11.9 Hz, CH_{2a}-Troc), 4.60 (d, 1H, ²J_{CH2b,CH2a} = 11.9 Hz, CH_{2b}-Troc), 4.58 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 7.3 Hz, H1-GlcN), 4.09 (dd, 1H, ³J_{H6a,H5} = 5.0 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 10.5 Hz, H6_a-GlcN), 3.74 – 3.64 (m, 3H, H6_b-GlcN {3.72}, H2-GlcN {3.70}, H3-GlcN {3.57}), 3.54 (m_c, 1H, H4-GlcN), 3.12 (td, 1H, ³J_{H5,H6a} = 5.0 Hz, ³J_{H5,H6b} = 9.7 Hz, H5-GlcN), 1.06 (s, 9H, CH₃-^tBu).

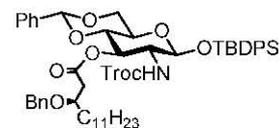
100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 154.69$ (C=O-Troc), 136.69 (C_{ipso}-Bzn), 135.94, 135.84 (C_{o,m,p}-Ph), 132.81, 132.55 (C_{ipso}-Ph), 130.13, 130.01, 129.33, 128.36, 127.75, 127.54, 126.33 (C_{o,m,p}-Ph), 101.88 (CH-Bzn), 96.27 (C1-GlcN), 95.17 (CCl₃), 81.38 (C4-GlcN), 74.90 (CH₂-Troc), 71.63 (C3-GlcN), 68.40 (C6-GlcN), 66.01 (C5-GlcN), 60.41 (C2-GlcN), 26.77 (CH₃-^tBu).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 702.19$ ([M+Na]⁺, ber.: 702.12).

1383.39 ([2M+Na]⁺, ber.: 1383.25).

C₃₂H₃₆Cl₃NO₇Si (681.08)

tert-Butyldiphenylsilyl-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-4,6-O-benzyliden-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranosid (99**)**
 (β-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNTroc-OTBDPS)



Zu einer Lösung aus 11.80 g (17.33 mmol) β-4,6-Bzn-GlcNTroc-OTBDPS (**98**), 6.95 g (20.79 mmol, 1.20 Äquiv.) Carbonsäure **87** sowie 254.0 mg 4-Pyrrolidinpyridin (2.08 mmol, 0.12 Äquiv.) in 400 ml trockenem Dichlormethan werden 3.99 g (20.79 mmol, 1.20 Äquiv.) EDC-Hydrochlorid zugegeben und bei Raumtemp. 15 h gerührt. Nach Zugabe von 100 ml Dichlormethan wird zweimal mit jeweils 50 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung, zweimal mit 50 ml Wasser gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Filtrieren wird das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und das Rohprodukt (18.91 g) durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 20:1 → 15:1) gereinigt.

Ausbeute: 15.46 g (15.50 mmol, 89 %); farbloser, gummiartiger Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = -10.3$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.61$ (^cHex/EtOAc, 5:1), $R_f = 0.38$ (^cHex/EtOAc, 10:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.73 – 7.68 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.66 – 7.62 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.49 – 7.43 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.42 – 7.33 (m, 6H, H_{Ar}-Ph), 7.30 – 7.21 (m, 8H, H_{Ar}-Ph), 5.42 (s, 1H, CH-Bzn), 5.13 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} ≈ ³J_{H3,H4} ≈ 10.0 Hz, H3-GlcN), 4.87 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 9.7 Hz, NH-GlcN), 4.65 (d, 1H, ²J_{CH2a,CH2b} = 11.9 Hz, CH_{2a}-Troc), 4.61 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 8.0 Hz, H1-GlcN), 4.56 (d, 1H, ²J_{CH2b,CH2a} = 11.9 Hz, CH_{2b}-Troc), 4.50 (d, 1H, ²J_{CH2a,CH2b} = 11.6 Hz, CH_{2a}-Bn), 4.40 (d, 1H, ²J_{CH2b,CH2a} = 11.6 Hz, CH_{2b}-Bn), 4.09 (dd, 1H, ³J_{H6a,H5} = 5.0 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 10.5 Hz, H6_a-GlcN), 3.88 (td, 1H, ³J_{H2,NH} = 9.7 Hz, ³J_{H2,H1} ≈ ³J_{H2,H3} ≈ 8.0 Hz, H2-GlcN), 3.78 (q, 1H, ³J_{H3,H2ab} ≈ ³J_{H3,H4} ≈ 6.1 Hz, H3), 3.74 – 3.65 (m, 2H, H6_b-GlcN {3.70}, H4-GlcN {3.69}), 3.18 (td, 1H, ³J_{H5,H6ab} = 9.7 Hz, ³J_{H5,H4} = 5.0 Hz, H5-GlcN), 2.65 (dd, 1H, ³J_{H2a,H3} = 6.2 Hz, ²J_{H2a,H2b} = 15.2 Hz, H2_a), 2.46 (dd, 1H, ³J_{H2b,H3} = 5.8 Hz, ²J_{H2b,H2a} = 15.2 Hz, H2_b), 1.54 – 1.42 (m, 2H, H4), 1.34 – 1.12 (m, 18H, (CH₂)₉), 1.08 (s, 9H, CH₃-^tBu), 0.89 (t, 3H, ³J_{H14,H13} ≈ 6.8 Hz, H14).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 171.67 (C1), 154.24 (C=O-Troc), 138.53, 136.89, 136.08, 135.96 (4 x C_{ipso}-Ph), 132.82, 132.52, 130.28, 130.18, 129.18, 128.42, 128.29, 128.22, 127.82, 127.68, 127.64, 126.20 (C_{o,m,p}-Ph), 101.52 (CH-Bnz), 97.01 (C1-GlcN), 95.33 (CCl₃), 78.80 (C4-GlcN), 75.53 (C3), 74.80 (CH₂-Troc), 71.46 (C3-GlcN), 71.23 (CH₂-Bn), 68.51 (C6-GlcN), 66.50 (C5-GlcN), 58.89 (C2-GlcN), 39.54 (C2), 34.50 (C4), 32.07 (C12), 29.81, 29.79, 29.76, 29.74, 29.68, 29.50 (C6 – C11), 26.86 (CH₃-^tBu), 25.34 (C5), 22.84 (C13), 19.24 (C-^tBu), 14.29 (C14).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1018.36 ([M+Na]⁺, ber.: 1018.36).

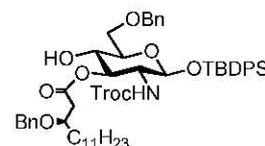
2016.70 ([2M+Na]⁺, ber.: 2016.74).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1018.3636 ([M+Na]⁺, ber.: 1018.3627).

C₅₃H₆₈Cl₃NO₉Si (997.55)

tert-Butyldiphenylsilyl-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranosid (100)

(β-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc-OTBDPS)



Eine Suspension aus 12.40 g (12.43 mmol) β-3-((R)-3-(BnO)Tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNTroc-OTBDPS (**99**) und etwa 4 g Molekularsieb (4 Å) in 200 ml absol. Dichlormethan werden unter Argon 1 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Abkühlen auf – 78 °C werden 4.24 ml (3.09 g, 26.6 mmol, 2.14 Äquiv.) Triethylsilan und dann tropfenweise eine vorgekühlte Mischung aus 1.65 ml (2.8 g, 18.65 mmol, 1.50 Äquiv.) Trifluormethansulfonsäure in 15 ml absol. Dichlormethan innerhalb von 15 min hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird unter Argon 4.5 h bei – 78 °C gerührt, wobei zur Vervollständigung der Umsetzung nach 2 h noch einmal 1.50 Äquiv. Trifluormethansulfonsäure in 15 ml absol. Dichlormethan zugetropft

werden. Zum Reaktionsabbruch werden 15 ml Methanol hinzugegeben und es wird bei -78°C durch tropfenweise Zugabe von *N*-Ethyl-diisopropylamin unter Kontrolle des pH-Wertes neutralisiert. Es wird vom Molekularsieb mit Hyflo[®] abfiltriert und der Filterkuchen dreimal mit 100 ml Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird zweimal mit 50 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen werden dreimal mit 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 20:1 → 10:1 → 5:1).

Ausbeute: 12.18 g (12.18 mmol, 98 %); farbloser, gummiartiger Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = -5.1$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.28$ (^cHex/EtOAc, 5:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 7.73 - 7.68$ (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.65 - 7.61 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.44 - 7.38 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.35 - 7.26 (m, 11H, H_{Ar}-Ph), 7.26 - 7.21 (m, 3H, H_{Ar}-Ph), 4.83 - 4.76 (m, 2H, H3-GlcN {4.79}, NH-GlcN {4.78}), 4.66 (d, 1H, ²J_{CH2a,CH2b} = 11.9 Hz, CH2_a-Troc), 4.55 (d, 1H, ²J_{CH2b,CH2a} = 11.9 Hz, CH2_b-Troc), 4.51 - 4.41 (m, 5H, CH2-Bn {4.51}, H1-GlcN {4.48}, CH2-Bn {4.51 - 4.43}), 3.87 - 3.77 (m, 2H, H3 {3.84}, H2-GlcN {3.82}), 3.69 (t, 1H, ³J_{H4,H5} ≈ ³J_{H4,H3} ≈ 9.2 Hz, H4-GlcN), 3.61 - 3.52 (m, 2H, H6_{ab}-GlcN), 3.16 (dt, 1H, ³J_{H5,H4} = 9.2 Hz, ³J_{H5,H6ab} = 4.2 Hz, H5-GlcN), 2.85 (s_b, 1H, OH₄-GlcN), 2.62 (dd, 1H, ³J_{H2a,H3} = 7.3 Hz, ²J_{H2a,H2b} = 14.8 Hz, H2_a), 2.49 (dd, 1H, ³J_{H2b,H3} = 5.1 Hz, ²J_{H2b,H2a} = 14.8 Hz, H2_b), 1.68 - 1.48 (m, 2H, H4), 1.34 - 1.22 (m, 18H, (CH₂)₉), 1.07 (s, 9H, CH₃-^tBu), 0.88 (t, 3H, ³J_{H14,H13} ≈ 6.8 Hz, H14).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 172.27$ (C1), 153.93 (C=O-Troc), 137.93, 137.64, 135.81, 135.68 (4 x C_{ipso}-Ph), 132.73, 132.35, 129.84, 129.67, 128.22, 128.19, 127.69, 127.53, 127.47, 127.27 (C_{o,m,p}-Ph), 96.20 (C1-GlcN), 95.10 (CCl₃), 75.52 (C3), 75.40 (C3-GlcN), 74.45 (CH₂-Troc), 74.01 (C5-GlcN), 73.54 (CH₂C₃-Bn), 70.87 (CH₂-Bn), 70.09 (C4-GlcN), 69.56 (C6-GlcN), 57.41 (C2-GlcN), 39.40 (C2), 33.88 (C4), 31.75 (C12), 29.49, 29.47, 29.42, 29.18 (C6-C11), 26.55 (CH₃-^tBu), 24.98 (C5), 22.53 (C13), 18.94 (C-^tBu), 13.97 (C14).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1022.37$ ([M+Na]⁺, ber.: 1018.38).

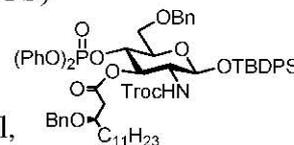
2020.74 ([2M+Na]⁺, ber.: 2020.77).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1020.3811$ ([M+Na]⁺, ber.: 1018.3783).

C₅₃H₆₈Cl₃NO₉Si (999.57)

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-(diphenylphosphoryl)-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**101**)**

(β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc-OTBDPS)



Zu einer Lösung aus 14.83 g (14.84 mmol) (β -3-((*R*)-3-(BnO)-Tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc-OTBDPS (**100**), 1.65 g (11.13 mmol, 0.75 Äquiv.) 4-Pyrrolidinpyridin, 18.39 ml (14.38 g, 111.27 mmol, 7.50 Äquiv.) *N,N*-Diisopropylethylamin in 210 ml absol. Dichlormethan werden bei 0 °C 11.96 g (44.50 mmol, 3.00 Äquiv.) Diphenylchlorophosphat zugetropft und es wird auf Raumtemp. erwärmt. Die Lösung wird insgesamt 14 h gerührt. Nach Zugabe von 200 ml Dichlormethan wird dreimal mit jeweils 50 ml 5%iger Zitronensäure-Lösung, zweimal mit 50 ml Wasser gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und das Rohprodukt (32.02 g) durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 12.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 20:1 → 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 17.01 g (13.81 mmol, 93 %); farbloser, gummiartiger Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = -6.2$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.52$ (^cHex/EtOAc, 5:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.72 – 7.68 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.63 – 7.59 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.43 – 7.37 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.33 – 7.20 (m, 16H, H_{Ar}-Ph), 7.19 – 7.08 (m, 8H, H_{Ar}-Ph), 5.27 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.8 Hz, ³J_{H3,H4} = 9.0 Hz, H3-GlcN), 4.87 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 9.0 Hz, NH-GlcN), 4.80 (dd, 1H, ³J_{H4,H5} ≈ ³J_{H4,H3} = 9.0 Hz, H4-GlcN), 4.70 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 8.0 Hz, H1-GlcN), 4.57 (d, 1H, ²J_{CH2a,CH2b} = 11.9 Hz, CH_{2a}-Troc), 4.45 (d, 1H, ²J_{CH2b,CH2a} = 11.9 Hz, CH_{2b}-Troc), 4.41 – 4.21 (m, 4H, 2 x CH₂-Bn), 3.69 (p, 1H, ³J_{H3,H2ab} ≈ ³J_{H3,H4} ≈ 6.0 Hz, H3), 3.61 (ddd, 1H, ³J_{H2,H3} = 10.8 Hz, ³J_{H2,NH} = 9.0 Hz, ³J_{H2,H1} = 8.0 Hz, H2-GlcN), 3.44 (dd, 1H, ³J_{H6a,H5} = 4.5 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 11.0 Hz, H6_a-GlcN), 3.37 (dd, 1H, ³J_{H6b,H5} = 1.9 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 11.0 Hz, H6_b-GlcN), 3.30 (ddd, 1H, ³J_{H5,H4} = 9.0 Hz, ³J_{H5,H6a} = 4.5 Hz, ³J_{H5,H6b} = 1.9 Hz, H5-GlcN), 2.43 (d, 2H, ³J_{H2ab,H3} = 6.0 Hz, H2_{ab}), 1.52 – 1.37 (m, 2H, H4), 1.34 – 1.16 (m, 18H, (CH₂)₉), 1.06 (s, 9H, CH₃-^tBu), 0.88 (t, 3H, ³J_{H14,H13} ≈ 6.8 Hz, H14).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 171.38 (C1), 153.80 (C=O-Troc), 150.47, 150.29, 138.52, 138.11, 136.00, 135.87 (6 x C_{ipso}-Ph), 132.85, 132.40, 129.99, 129.83, 129.78, 128.36, 128.24, 127.60, 127.53, 127.43, 125.52, 125.49, 120.20, 120.15, 120.11 (C_{o,m,p}-Ph), 95.69 (C1-GlcN), 95.14 (CCl₃), 75.30 (C3), 74.64 (C4-GlcN), 74.57 (CH₂-Troc), 73.88 (C5-GlcN), 73.43 (CH₂C₃-Bn), 72.23 (C3-GlcN), 70.71 (CH₂-Bn), 67.81 (C6-GlcN), 58.53 (C2-GlcN), 38.61 (C2), 34.20 (C4), 31.95 (C12), 29.68, 29.64, 29.61, 29.38, 26.92 (C6 – C11), 26.74 (CH₃-^tBu), 25.32 (C5), 22.72 (C13), 19.14 (C-^tBu), 14.16 (C14).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1254.44$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1254.40).

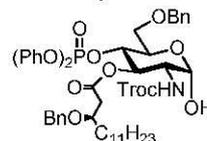
2484.86 ($[2M+Na]^+$, ber.: 2484.82).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1252.4084$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1252.4072).

$C_{53}H_{68}Cl_3NO_9Si$ (1231.74)

4-(Diphenylphosphoryl)-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- α -D-glucopyranose (102)

(α -4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc-OH)



Eine Lösung aus 10.17 g (8.26 mmol) β -4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc-OTBDPS (**101**), 1.56 ml (1.64 g, 27.20 mmol, 3.30 Äquiv.) Eisessig in 200 ml trockenem Tetrahydrofuran wird bei 0 °C 15 min vorgekühlt. Anschließend werden 10.73 ml (10.73 mmol, 1.30 Äquiv.) einer 1.0 M Lösung von Tetra-*n*-butylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran innerhalb von 15 min hinzugegeben. Der Ansatz wird 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die Temperatur innerhalb von 1 h auf 15 °C gebracht und diese bis zum vollständigen Umsatz (2.5 – 7 h) zwischen 15 – 17 °C gehalten. Im Anschluss wird mit 400 ml Dichlormethan verdünnt und die Lösung nacheinander mit 50 ml einer 5%igen Zitronensäure-Lösung, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden dreimal mit 25 ml Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Das Rohprodukt (12.13 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 6.5 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 7:1 → 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 6.32 g (6.36 mmol, 77 %); farbloses, hochviskoses Öl, $[\alpha]_D^{25} = +25.5$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.26$ (^cHex/EtOAc, 3:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.36 - 7.08$ (m, 20H, H_{Ar}-Ph), 5.50 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.6 Hz, ³J_{H3,H4} = 9.2 Hz, H3-GlcN), 5.35 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 9.6 Hz, NH-GlcN), 5.25 (t, 1H, ³J_{H1,H2} = ³J_{H1,OH} = 3.7 Hz, H1-GlcN), 4.73 (dd, 2H, ³J_{H4,H3} ≈ ³J_{H4,H5} ≈ 9.2 Hz, H4-GlcN), 4.71 (d, 1H, ²J_{CH2a,CH2b} = 12.7 Hz, CH_{2a}-Troc), 4.41 – 4.30 (m, 4H, CH_{2b}-Troc {4.39}, CH₂-Bn {4.34}), 4.26 – 4.17 (m, 2H, CH₂-Bn {4.24}, H5-Glc {4.22}), 3.97 (td, 1H, ³J_{H2,H3} = 10.6 Hz, ³J_{H2,NH} = 10.2 Hz, ³J_{H2,H1} = 3.7 Hz, H2-Glc), 3.92 (dd, 1H, ⁴J_{OH,H2} = 1.5 Hz, ³J_{OH,H1} = 4.0 Hz, OH-GlcN), 3.69 (p, 1H, ³J_{H3,H2} ≈ ³J_{H3,H4} ≈ 6.1 Hz, H3), 3.54 (d, 2H, ³J_{H6ab,H5} = 3.9 Hz, H6_{ab}-GlcN), 2.54 (dd, 1H, ³J_{H2a,H3} = 5.6 Hz, ²J_{H2a,H2b} = 16.2 Hz, H2_a), 2.38 (dd, 1H, ³J_{H2b,H3} = 6.6 Hz, ²J_{H2b,H2a} = 16.2 Hz, H2_b), 1.48 – 1.37 (m, 2H, H4), 1.33 – 1.10 (m, 18H, (CH₂)₉), 0.88 (t, 3H, ³J_{H14,H13} ≈ 6.8 Hz, H14).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 172.07 (C1), 154.25 (C=O-Troc), 150.58, 150.33, 138.68, 137.55 (4 x C_{ipso}-Ph), 130.03, 129.97, 128.51, 128.35, 128.07, 127.98, 127.77, 127.53, 125.78, 120.43, 120.39, 120.30 (C_{o,m,p}-Ph), 95.37 (CCl₃), 91.57 (C1-GlcN), 75.25 (C3), 74.99 (CH₂-Troc), 74.71 (C4-GlcN), 73.71 (CH₂C₃-Bn), 70.85 (CH₂-Bn), 70.78 (C3-GlcN), 69.36 (C5-GlcN), 68.57 (C6-GlcN), 54.66 (C2-GlcN), 38.93 (C2), 34.61 (C4), 32.07 (C12), 29.81, 29.79, 29.77, 29.74, 29.50 (C6 – C11), 25.37 (C5), 22.84 (C13), 14.28 (C14).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1014.35 ([M+Na]⁺, ber.: 1014.29).

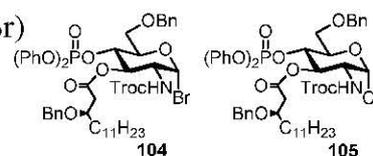
2007.70 ([2M+Na]⁺, ber.: 2007.59).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1014.2914 ([M+Na]⁺, ber.: 1014.2895).

C₄₉H₆₁Cl₃NO₁₂P (993.34)

4-(Diphenylphosphat)-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α -D-glucopyranosylbromid (104, 105)

(α -4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc-Br)



Allgemeine Vorschrift

Eine entgaste und mit Argon geflutete Lösung von 3.00 g (3.02 mmol) α -4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc-OH (**102**) und 5.01 g (15.10 mmol, 5.00 Äquiv.) Tetrabrommethan in 60 ml trockenem Dichlormethan werden bei – 45 °C 15 min vorgekühlt. Es werden 1.48 g (9.06 mmol, 3.00 Äquiv.) Tris(dimethylamino)phosphin hinzugegeben und weitere 20 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wird die Kühlung entfernt und das Gemisch innerhalb 1 h auf Raumtemp. gebracht. Nach insgesamt 2 h (DC-Kontrolle) wird die Mischung mit 200 ml Dichlormethan verdünnt und zweimal mit 50 ml Eiswasser gewaschen. Die organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel i. Vak. bei Raumtemp. entfernt. Das Rohprodukt (9.50 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 25.0 cm, Durchmesser = 3.5 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc/Et₃N, 10:1 + 0.1 %) gereinigt.

Ausbeute: 2.37 g (2.24 mmol, 74 %); farbloses, hochviskoses Öl, [α]_D²⁵ = + 75.3 (*c* = 1.00, CHCl₃), *R_f* = 0.56 (^cHex/EtOAc, 3:1), *R_f* = 0.41 (^cHex/EtOAc, 5:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.36 – 7.14 (m, 20H, H_{Ar}-Ph), 6.58 (d, 1H, ³*J*_{H1,H2} = 3.6 Hz, H1-GlcN), 5.58 (dd, 1H, ³*J*_{H3,H2} = 10.8 Hz, ³*J*_{H3,H4} = 9.2 Hz, H3-GlcN), 5.45 (d, 1H, ³*J*_{NH,H2} = 8.7 Hz, NH-GlcN), 5.07 (q, 1H, ³*J*_{H4,H3} ≈ ³*J*_{H4,H5} ≈ 9.3 Hz, H4-GlcN), 4.73 (d, 1H, ²*J*_{CH2a,CH2b} = 12.0 Hz, CH_{2a}-Troc), 4.46 – 4.31 (m, 4H, CH₂-Bn {4.43}, CH_{2b}-Troc {4.39}, CH₂-Bn {4.34}), 4.31 – 4.21 (m, 2H, CH₂-Bn {4.24}, H5-Glc {4.23}), 4.06 (ddd, 1H, ³*J*_{H2,H3} = 10.8 Hz, ³*J*_{H2,NH} = 8.7 Hz, ³*J*_{H2,H1} = 3.6 Hz, H2-Glc), 3.71

(p, 1H, $^3J_{H3,H2} \approx ^3J_{H3,H4} \approx 6.1$ Hz, H3), 3.61 (tp, 2H, $^3J_{H6ab,H5} = 3.0$ Hz, H_{6ab}-GlcN), 2.53 (dd, 1H, $^3J_{H2a,H3} = 5.8$ Hz, $^2J_{H2a,H2b} = 16.0$ Hz, H_{2a}), 2.41 (dd, 1H, $^3J_{H2b,H3} = 6.3$ Hz, $^2J_{H2b,H2a} = 16.0$ Hz, H_{2b}), 1.48 – 1.37 (m, 2H, H4), 1.38 – 1.07 (m, 18H, (CH₂)₉), 0.90 (t, 3H, $^3J_{H14,H13} \approx 6.8$ Hz, H14).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 172.29 (C1), 153.84 (C=O-Troc), 150.31, 150.15, 138.42, 137.46 (4 x C_{ipso}-Ph), 129.94, 129.87, 128.34, 128.23, 127.71, 127.58, 127.42, 125.71, 120.24, 120.19, 120.14, 120.10 (C_{o,m,p}-Ph), 94.98 (CCl₃), 91.10 (C1-GlcN), 75.05 (C3), 74.61 (CH₂-Troc), 74.35 (C5-GlcN), 73.48 (CH_{2C3}-Bn), 72.78 (C4-GlcN), 70.81 (C3-GlcN), 70.65 (CH₂-Bn), 66.72 (C6-GlcN), 55.88 (C2-GlcN), 38.71 (C2), 34.33 (C4), 31.91 (C12), 29.66, 29.62, 29.57, 29.35, 26.90 (C6 – C11), 25.16 (C5), 22.69 (C13), 14.14 (C14).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1034.34 ([M+Na]⁺, ber.: 1034.25).

2046.69 ([2M+Na]⁺, ber.: 2046.52).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1032.2546 ([M+Na]⁺, ber.: 1032.2556).

C₄₉H₆₀Cl₄NO₁₁P (1011.79)

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1078.24 ([M+Na]⁺, ber.: 1078.20).

2134.47 ([2M+Na]⁺, ber.: 2134.42).

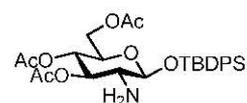
HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1076.2058 ([M+Na]⁺, ber.: 1076.2051).

C₄₉H₆₀BrCl₃NO₁₁P (1056.24)

5.9.2.2.2 Die Synthese des Glucosaminakzeptors

tert-Butyldiphenylsilyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-amino- β -D-glucopyranosid (106)

(β -Ac₃GlcNH₂-OTBDPS)



Eine Lösung von 25.00 g (34.80 mmol) β -Ac₃GlcNTroc-OTBDPS (**96**)

in 150 ml Essigsäure wird mit etwa 12.00 g (183.54 mmol) Zinkstaub versetzt, welches zuvor durch Aufschlännen in 2 M Salzsäure aktiviert, mit Wasser sowie Ethanol gewaschen und mit Diethylether getrocknet wurde. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei Raumtemp. gerührt, über Hyflo[®] filtriert und mit Essigsäure nachwaschen. Das Filtrat wird i. Hochvak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand dreimal mit Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 500 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit 200 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit 100 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel i. Vak. befreit. Der Rückstand (20.23 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 20.0 cm, Durchmesser = 11.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 2:1 → 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 16.26 g (29.9 mmol, 86 %); farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = +1.7$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.28$ ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:1).

400 MHz- $^1\text{H-NMR}$ [$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 7.72 - 7.65$ (m, 4H, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$), 7.46 – 7.33 (m, 6H, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$), 4.96 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 9.9$ Hz, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 9.2$ Hz, H4-GlcN), 4.85 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 10.2$ Hz, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 9.2$ Hz, H3-GlcN), 4.39 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 7.8$ Hz, H1-GlcN), 4.06 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_{6a},\text{H}_5} = 5.7$ Hz, $^2J_{\text{H}_{6a},\text{H}_{6b}} = 12.0$ Hz, H_{6a} -GlcN), 3.90 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_{6b},\text{H}_5} = 2.4$ Hz, $^2J_{\text{H}_{6b},\text{H}_{6a}} = 12.0$ Hz, H_{6b} -GlcN), 3.37 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_4} = 9.9$ Hz, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_{6a}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_{6b}} = 2.4$ Hz, H5-GlcN), 2.99 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 10.2$ Hz, $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 7.8$ Hz, H2-GlcN), 2.05, 1.96, 1.96 (3 x s, 9H, CH_3 -Ac), 1.10 (s, 9H, CH_3 - ^tBu).

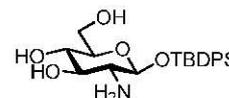
100.6 MHz- $^{13}\text{C-NMR}$ [BB, HMQC] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 170.85, 170.69, 169.88$ (C=O-Ac), 136.00, 135.84 ($\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$), 133.02, 132.89, 130.16, 129.99, 127.84, 127.55 ($\text{C}_{o,m,p}$ -Ph), 98.92 (C1-GlcN), 75.08 (C3-GlcN), 71.70 (C5-GlcN), 69.26 (C4-GlcN), 62.53 (C6-GlcN), 58.09 (C2-GlcN), 27.03 (CH_3 - ^tBu), 20.94, 20.77, 20.74 (CH_3 -Ac), 19.32 (C- ^tBu).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 566.27$ ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 566.20).

$\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{NO}_7\text{Si}$ (527.68)

tert-Butyldiphenylsilyl-2-desoxy-2-amino- β -D-glucopyranosid (107)

(β -GlcNH₂-OTBDPS)



Zu einer Lösung von 10.06 g (20.34 mmol) β -Ac₃GlcNH₂-OTBDPS (**106**) in 110 ml Methanol wird unter Kontrolle des pH-Wertes (Neutralit[®]) frisch hergestellte 1%ige methanolische Natriummethanolat-Lösung zugetropft, bis ein pH-Wert von 9.5 erreicht ist, und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Der pH-Wert wird durch regelmäßige Zugabe weiterer Natriummethanolat-Lösung nachreguliert. Anschließend wird die Reaktionsmischung durch Zugabe von Essigsäure neutralisiert und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Nach Trocknung i. Hochvak. wird das Rohprodukt ohne Reinigung und vollständige Charakterisierung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 8.49 g (max. 20.34 mmol); farbloser Feststoff, $R_f = 0.20$ (EtOAc/EtOH , 10:1).

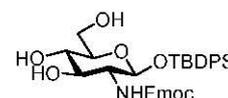
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 418.19$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 418.20).

835.40 ($[\text{2M}+\text{H}]^+$, ber.: 835.40).

$\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{NO}_5\text{Si}$ (417.57)

***tert*-Butyldiphenylsilyl-2-desoxy-2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (108)**

(β -GlcNHFmoc-OTBDPS)



In einer Mischung aus 90 ml Acetonitril und 90 ml Dichlormethan werden 8.49 g (20.33 mmol) β -GlcNH₂-OTBDPS (**107**) und 8.23 g (24.40 mmol, 1.20 Äquiv.) Fluoren-9-ylmethylsuccinimidylcarbonat unter Rühren tropfenweise mit 3.15 g (24.40 mmol, 1.20 Äquiv.) *N*-Ethyldiisopropylamin versetzt. Der Ansatz wird 24 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 4.0 angesäuert. Die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und das Rohprodukt (20.10 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 27.0 cm, Durchmesser = 8.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 1:1 → 0:∞).

Ausbeute: 9.56 g (14.94 mmol, 74 % ausgehend von (**90**)); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{26} = +3.6$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.70$ (EtOAc/EtOH, 10:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.72$ (dd, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, $^4J_{H4,H2} = ^4J_{H5,H7} = 3.2$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.67 (dd, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.60 (dd, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.50 (dd, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 11.9$ Hz, $^4J_{H1,H3} = ^4J_{H8,H6} = 7.5$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), $7.39 - 7.17$ (m, 10H, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H2-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 5.30 (d, 1H, $^3J_{NH,H2} = 8.4$ Hz, NH-GlcN), 4.50 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 7.8$ Hz, H1-GlcN), 4.35 (dd, 2H, $^3J_{CH2,H9} = 6.9$ Hz, $^2J_{CH2a,CH2b} = 10.5$ Hz, CH_{2a}-Fmoc), 4.27 (dd, 2H, $^3J_{CH2,H9} = 6.9$ Hz, $^2J_{CH2a,CH2b} = 10.5$ Hz, CH_{2b}-Fmoc), $4.12 - 4.02$ (m, 1H, H9-Fmoc), $3.60 - 3.43$ (m, 4H, H6_a-GlcN {3.54}, H6_b-GlcN {3.51}, H2-GlcN {3.52}, H4-GlcN {3.47}), 3.34 (t_p, 1H, $^3J_{H3,H2} = ^3J_{H3,H4} = 9.6$ Hz, H3-GlcN), $2.98 - 2.86$ (m, 1H, H5-GlcN {2.92}), $2.75 - 2.22$ (s_b, 3H, 3 x OH), 1.02 (s, 9H, CH₃-^tBu).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 157.39$ (C=O-Fmoc), 143.96, 143.90 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.35, 141.32 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 135.90, 135.85 (C_{o,m,p}-Ph), 133.43, 132.87 (C_{ipso}-Ph), 130.12, 130.02 (C_{o,m,p}-Ph), 127.84, 127.79 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.61, 127.21 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 125.23, 125.20 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.03 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 96.40 (C1-GlcN), 75.38 (C5-GlcN), 74.72 (C3-GlcN), 70.70 (C4-GlcN), 67.21 (CH₂-Fmoc), 61.88 (C6-GlcN), 60.56 (C2-GlcN), 47.11 (CH-Fmoc), 26.88 (CH₃-^tBu), 18.99 (C-^tBu).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1301.56$ ([2M+Na]⁺, ber.: 1301.52).

C₃₇H₄₁NO₇Si (639.81)

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-amino)- β -D-glucopyranosid (109)**

(β -4,6-Bzn-GlcNHFmoc-OTBDPS)



9.00 g (14.07 mmol) β -GlcNHFmoc-OTBDPS (**108**) werden in 100 ml Acetonitril bei 40 °C gelöst und mit 6.96 g (45.70 mmol, 3.25 Äquiv.) Benzaldehyddimethylacetal versetzt. Es wird 4-Toluolsulfonsäure-Monohydrat in Acetonitril hinzuge tropft bis ein pH-Wert von 3.5 erreicht ist und anschließend die Mischung wird über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionslösung wird durch Zugabe von *N*-Ethyl-diisopropylamin neutralisiert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand (11.50 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 25.0 cm, Durchmesser = 6.0 cm) im Laufmittelgemisch (^cHex/EtOAc, 7:1 → 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 9.11 g (12.52 mmol, 89 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{30} = -18.8$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.34$ (^cHex/EtOAc, 3:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.78$ (d, 2H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.70 – 7.65 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.65 – 7.61 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.56 (d, 2H, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.0$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.48 – 7.27 (m, 15H, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H2-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 5.45 (s, 1H, CH-Bnz), 4.71 (d, 1H, $^3J_{NH,H2} = 7.6$ Hz, NH-GlcN), 4.53 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 6.1$ Hz, H1-GlcN), 4.42 (d, 2H, $^3J_{CH2,H9} = 6.4$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.18 (t, 1H, $^3J_{H9,CH2} = 6.4$ Hz, H9-Fmoc), 4.07 (dd, 1H, $^3J_{H6a,H5} = 4.9$ Hz, $^2J_{H6a,H6b} = 10.5$ Hz, H6_a-GlcN), 3.72 – 3.56 (m, 3H, H3-GlcN {3.68}, H6_b-GlcN {3.66}, H2-GlcN {3.63}), 3.55 – 3.42 (m, 1H, H4-GlcN {3.50}), 3.26 – 3.00 (m, 1H, H5-GlcN {3.14}), 1.67 (s, 1H, OH-GlcN), 1.06 (s, 9H, CH₃-^tBu).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 156.74$ (C=O-Fmoc), 144.00, 143.89 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.45, 141.42 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 137.22 (C_{ipso}-Ph), 136.02, 135.95 (C_{o,m,p}-Ph), 133.03, 132.76 (C_{ipso}-Ph), 130.18, 130.04, 129.33, 128.39, 127.86, 127.82, 127.62, 127.25, 126.46 (C_{o,m,p}-Ph, C2-Fmoc, C3-Fmoc, C6-Fmoc, C7-Fmoc), 125.12 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.14 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.93 (CH-Bnz), 96.53 (C1-GlcN), 81.53 (C4-GlcN), 71.75 (C3-GlcN), 68.54 (C6-GlcN), 67.00 (CH₂-Fmoc), 66.13 (C5-GlcN), 60.54 (C2-GlcN), 47.28 (CH-Fmoc), 26.92 (CH₃-^tBu), 19.24 (C-^tBu).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 750.36$ ([M+Na]⁺, ber.: 750.29).

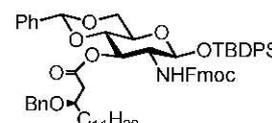
2206.03 ([3M+Na]⁺, ber.: 2205.88).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 750.2869$ ([M+Na]⁺, ber.: 750.2863).

C₄₄H₄₅NO₇Si (727.92)

***tert*-Butyldiphenylsilyl-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**110**)**

(β -3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNHFmoc-OTBDPS)



Eine Lösung aus 5.88 g (8.07 mmol) β -4,6-Bzn-GlcNFmoc-OTBDPS (**109**), 2.70 g (8.07 mmol, 1.00 Äquiv.) Carbonsäure **87**, 148 mg 4-Pyrrolidinpyridin (1.21 mmol, 0.15 Äquiv.) in 70 ml trockenem Dichlormethan wird mit 1.86 g (9.69 mmol, 1.20 Äquiv.) EDC-Hydrochlorid versetzt und 18 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 100 ml Dichlormethan wird zweimal mit jeweils 50 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung, zweimal mit 50 ml Wasser gewaschen und die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und das Rohprodukt (10.40 g) durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 28.0 cm, Durchmesser = 8.0 cm im Laufmittelgemisch PE/EtOAc, 15:1 \rightarrow 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 6.28 g (6.01 mmol, 75 %); farbloser, gummiartiger Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = -9.2$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.73$ (c Hex/EtOAc, 3:1), $R_f = 0.43$ (c Hex/EtOAc, 6:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ /ppm] = 7.77 (d, 2H, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = ^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.3$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.72 – 7.67 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.66 – 7.61 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.58 – 7.52 (m, 2H, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.48 – 7.14 (m, 20H, H3-Fmoc, H6-Fmoc, H2-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 5.43 (s, 1H, CH-Bnz), 5.16 (t_p, 1H, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = ^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 10.0$ Hz, H3-GlcN), 4.77 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.6$ Hz, NH-GlcN), 4.63 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 7.9$ Hz, H1-GlcN), 4.48 (d, 1H, $^2J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 11.6$ Hz, CH_{2a}-Bn), 4.37 (d, 1H, $^2J_{\text{CH}_2\text{b},\text{CH}_2\text{a}} = 11.6$ Hz, CH_{2b}-Bn), 4.30 (dd, 1H, $^3J_{\text{CH}_2\text{a},\text{H}_9} = 7.8$ Hz, $^2J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 10.4$ Hz, CH_{2a}-Fmoc), 4.24 (dd, 1H, $^3J_{\text{CH}_2\text{b},\text{H}_9} = 7.0$ Hz, $^2J_{\text{CH}_2\text{b},\text{CH}_2\text{a}} = 10.4$ Hz, CH_{2b}-Fmoc), 4.15 – 4.04 (m, 2H, CH-Fmoc {4.12}, H6_a-GlcN {4.10}), 3.92 (td, 1H, $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3} \approx ^3J_{\text{H}_2,\text{NH}} \approx 10.0$ Hz, $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 7.9$ Hz, H2-GlcN), 3.81 – 3.66 (m, 3H, H3 {3.76}, H6_b-GlcN {3.74}, H4-GlcN {3.69}), 3.18 (td, 1H, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_4} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6\text{a}} = 5.0$ Hz, H5-GlcN), 2.64 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_2\text{a},\text{H}_3} = 6.4$ Hz, $^2J_{\text{H}_2\text{a},\text{H}_2\text{b}} = 15.1$ Hz, H2_a), 2.44 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_2\text{b},\text{H}_3} = 5.8$ Hz, $^2J_{\text{H}_2\text{b},\text{H}_2\text{a}} = 15.1$ Hz, H2_b), 1.54 – 1.34 (m, 2H, H4), 1.34 – 1.08 (m, 18H, (CH₂)₉), 1.06 (s, 9H, CH₃-^tBu), 0.89 (t, 3H, $^3J_{\text{H}_{14},\text{H}_{13}} = 7.0$ Hz, H14).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ /ppm] = 171.84 (C1), 155.96 (C=O-Fmoc), 144.06, 143.86 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.37 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 138.57, 136.96 (C_{ipso}-Ph), 136.05, 135.97 (C_{o,m,p}-Ph), 132.93, 132.55 (C_{ipso}-Ph), 130.21, 130.09, 129.16, 128.38, 128.29, 127.85, 127.81, 127.77, 127.63, 127.59, 127.21, 126.22 (C_{o,m,p}-Ph, C2-Fmoc, C3-Fmoc, C6-Fmoc, C7-Fmoc), 125.34, 125.27 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 120.09 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 101.51 (CH-Bnz), 97.31 (C1-GlcN), 78.87 (C4-GlcN), 75.66 (C3), 71.65 (C3-GlcN), 71.33 (CH₂-Bn), 68.57 (C6-GlcN), 67.34 (CH₂-Fmoc), 66.49 (C5-GlcN), 58.69

(C2-GlcN), 47.16 (CH-Fmoc), 39.75 (C2), 34.54 (C4), 32.07 (C12), 29.78, 29.71, 29.66, 29.49 (C6 – C11), 26.84 (CH₃-^tBu), 25.25 (C5), 22.83 (C13), 19.24 (C-^tBu), 14.28 (C14).

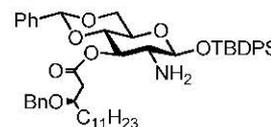
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1066.59$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1066.53).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1066.5249$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1066.5265).

C₆₅H₇₇NO₉Si (1044.39)

tert-Butyldiphenylsilyl-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-4,6-O-benzyliden-2-desoxy-2-amino-β-D-glucopyranosid (111)

(β-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNH₂-OTBDPS)



5.23 g (5.01 mmol) β-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNH₂-OTBDPS (**110**) werden in einer Mischung aus 30 ml *N,N*-Dimethylformamid und 30 ml Morpholin gelöst. Die Lösung wird 1 h bei Raumtemp. gerührt, anschließend wird mit 200 ml Ether verdünnt und dreimal mit jeweils 50 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Der Rückstand (6.08 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 25.0 cm, Durchmesser = 2.5 cm im Laufmittelgemisch PE/EtOAc, 10:1 → 7:1 → 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.30 g (4.01 mmol, 80 %); farbloses, hochviskoses Öl, $[\alpha]_D^{26} = -19.6$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.35$ (°Hex/Aceton, 10:1), $R_f = 0.5$ (°Hex/EtOAc, 3:1)

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.71 - 7.59$ (m, 4H, H_{Ar}-Ph), 7.47 – 7.37 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.39 – 7.29 (m, 6H, H_{Ar}-Ph), 7.29 – 7.18 (m, 8H, H_{Ar}-Ph), 5.36 (s, 1H, CH-Bnz), 4.98 (t_p, 1H, ³J_{H₃,H₂} = ³J_{H₃,H₄} = 9.7 Hz, H₃-GlcN), 4.49 (d, 1H, ²J_{CH_{2a},CH_{2b}} = 11.5 Hz, CH_{2a}-Bn), 4.47 – 4.39 (m, 2H, H₁-GlcN {4.47}, CH_{2b}-Bn {4.44}), 4.02 (dd, 1H, ³J_{H_{6a},H₅} = 5.0 Hz, ²J_{H_{6a},H_{6b}} = 10.4 Hz, H_{6a}-GlcN), 3.81 (p_p, 1H, ³J_{H₃,H₂} ≈ ³J_{H₃,H₄} ≈ 6.1 Hz, H₃), 3.67 – 3.54 (m, 2H, H_{6b}-GlcN {3.66}, H₄-GlcN {3.63}), 3.15 (td, 1H, ³J_{H₅,H₄} = 9.8 Hz, ³J_{H₅,H_{6ab}} = 5.0 Hz, H₅-GlcN), 2.91 (dd, 1H, ³J_{H₂,H₃} = 9.7 Hz, ³J_{H₂,H₁} = 7.6 Hz, H₂-GlcN), 2.64 (dd, 1H, ³J_{H_{2a},H₃} = 6.1 Hz, ²J_{H_{2a},H_{2b}} = 14.7 Hz, H_{2a}), 2.55 (dd, 1H, ³J_{H_{2b},H₃} = 5.8 Hz, ²J_{H_{2b},H_{2a}} = 14.7 Hz, H_{2b}), 1.62 – 1.42 (m, 2H, H₄), 1.39 – 1.11 (m, 18H, (CH₂)₉), 1.08 (s, 9H, CH₃-^tBu), 0.87 (t, 3H, ³J_{H₁₄,H₁₃} = 6.9 Hz, H₁₄).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 171.28$ (C1), 138.58, 137.14 (C_{ipso}-Ph), 135.99, 135.89 (C_{o,m,p}-Ph), 133.13, 132.83 (C_{ipso}-Ph), 130.18, 130.03, 129.07, 128.39, 128.25, 128.05, 127.85, 127.82, 127.68, 127.63, 127.59, 126.22 (C_{o,m,p}-Ph), 101.51 (CH-Bnz), 99.89 (C1-GlcN), 79.23 (C4-GlcN), 75.96 (C3), 73.82 (C3-GlcN), 71.26 (CH₂-Bn), 68.65 (C6-GlcN), 66.62 (C5-GlcN), 59.28 (C2-GlcN), 39.76 (C2), 34.42 (C4),

32.06 (C12), 29.80, 29.78, 29.73, 29.68, 29.49 (C6 – C11), 27.07 (CH₃-^tBu), 25.36 (C5), 22.83 (C13), 19.33 (C-^tBu), 14.27 (C14).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 844.54$ ($[M+Na]^+$, ber.: 844.46).

1667.06 ($[2M+Na]^+$, ber.: 1666.93).

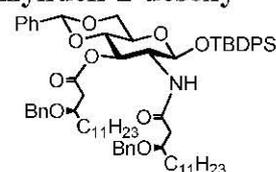
2488.61 ($[3M+Na]^+$, ber.: 2488.40).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 822.4753$ ($[M+H]^+$, ber.: 822.4765).

C₅₀H₆₇NO₇Si (822.15)

***tert*-Butyldiphenylsilyl-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-2-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosid (114)**

(β -3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-OTBDPS)



Eine Lösung aus 1.46 g (4.37 mmol, 1.1 Äquiv.) Carbonsäure **87** wird in 20 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid gelöst und in einer Mischung aus 1.73 g (4.46 mmol, 1.15 Äquiv.) HBTU, 644 mg (4.76 mmol, 1.2 Äquiv.) HOBT und 1.03 g (7.94 mmol, 2.00 Äquiv.) *N*-Ethyl-diisopropylamin 15 min gerührt. Anschließend wird der aktivierte Carbonsäureester zu 3.26 g (3.97 mmol) β -3-((*R*)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNH₂-OTBDPS (**111**), gelöst in 10 ml *N,N*-Dimethylformamid, gegeben und mit 10 ml *N,N*-Dimethylformamid nachgespült. Die Lösung wird 19 h bei Raumtemp. gerührt. Danach werden die Lösungsmittel zunächst i. Vak., dann i. Hochvak. entfernt. Der Rückstand (8.44 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 45.0 cm, Durchmesser = 4.5 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 15:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.89 g (3.41 mmol, 86 %); farbloses Wachs, $[\alpha]_D^{23} = -22.6$ ($c = 1.00$, CHCl₃),

$R_f = 0.55$ (^cHex/EtOAc, 5:1), $R_f = 0.20$ (^cHex/EtOAc, 12:1), $R_f = 0.15$ (^cHex/EtOAc, 15:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.67 - 7.57$ (m, 4H, H_{Ar}-Ph), 7.44 – 7.37 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.37 – 7.29 (m, 6H, H_{Ar}-Ph), 7.29 – 7.14 (m, 13H, H_{Ar}-Ph), 6.18 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 9.7 Hz, NH-GlcN), 5.34 (s, 1H, CH-Bnz), 4.99 (tp, 1H, ³J_{H3,H2} = ³J_{H3,H4} = 9.9 Hz, H3-GlcN), 4.46 (d, 1H, ²J_{CH2a,CH2b} = 6.2 Hz, CH_{2a}^I-Bn), 4.43 (d, 1H, ²J_{CH2b,CH2a} = 6.2 Hz, CH_{2b}^I-Bn), 4.39 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 7.9 Hz, H1-GlcN), 4.33 (d, 1H, ²J_{CH2a,CH2b} = 10.1 Hz, CH_{2a}^{II}-Bn), 4.30 (d, 1H, ²J_{CH2a,CH2b} = 10.1 Hz, CH_{2a}^{II}-Bn), 4.21 (ddd, 1H, ³J_{H2,H3} = 9.9 Hz, ³J_{H2,NH} = 9.7 Hz, ³J_{H2,H1} = 7.9 Hz, H2-GlcN), 4.02 (dd, 1H, ³J_{H6a,H5} = 5.0 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 10.5 Hz, H6_a-GlcN), 3.74 (pp, 1H, ³J_{H3,H2} ≈ ³J_{H3,H4} ≈ 6.2 Hz, H₃^I), 3.68 – 3.55 (H₃^{II} {3.68}, H6_b-GlcN {3.64}, H4-GlcN {3.62}), 3.04 (td, 1H, ³J_{H5,H4} = 9.7 Hz, ³J_{H5,H6a} = 5.0 Hz, H5-GlcN), 2.62 (dd, 1H, ³J_{H2a,H3} = 6.5 Hz, ²J_{H2a,H2b} = 15.0 Hz, H_{2a}^I), 2.40 – 2.30 (m, 2H, H_{2b}^I)

{2.36}, H_{2a}^{II} {2.34}), 2.26 (dd, 1H, $^3J_{H_{2a},H_3} = 4.6$ Hz, $^2J_{H_{2a},H_{2b}} = 15.6$ Hz, H_{2b}^{II}), 1.57 – 1.34 (m, 4H, H_{4a}^{II} {1.53}, H_{4a}^I {1.52}, H_{4b}^I {1.45}, H_{4b}^{II} {1.42}), 1.32 – 1.08 (m, 36H, 2 x (CH₂)₉), 1.02 (s, 9H, CH₃-^tBu), 0.86 (t, 6H, $^3J_{H_{14},H_{13}} = 6.8$ Hz, H_{14}^I , H_{14}^{II}).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 171.44 (C1^I), 171.11 (C1^{II}), 138.67, 138.25, 137.00 (C_{ipso}-Ph), 136.03, 135.96 (C_{o,m,p}-Ph), 133.08, 132.97 (C_{ipso}-Ph), 130.05, 129.95, 129.09, 128.63, 128.34, 128.25, 127.82, 127.74, 127.59, 127.52, 126.17 (C_{o,m,p}-Ph), 101.43 (CH-Bnz), 97.18 (C1-GlcN), 79.03 (C4-GlcN), 76.02 (C3^{II}), 75.64 (C3^I), 71.85 (C3-GlcN), 71.26 (CH₂^I-Bn), 70.79 (CH₂^{II}-Bn), 68.56 (C6-GlcN), 66.26 (C5-GlcN), 55.96 (C2-GlcN), 41.04 (C2^{II}), 39.93 (C2^I), 34.67 (C4^I), 33.79 (C4^{II}), 32.08 (C12), 29.84, 29.81, 29.78, 29.72, 29.52 (C6 – C11), 26.91 (CH₃-^tBu), 25.43, 25.28 (C5^I, C5^{II}), 22.84 (C13), 19.23 (C-^tBu), 14.28 (C14).

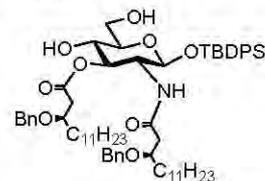
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1160.68 ([M+Na]⁺, ber.: 1160.70).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1160.6964 ([M+Na]⁺, ber.: 1160.6987).

C₇₁H₉₉NO₉Si (1138.63)

tert-Butyldiphenylsilyl-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-benzyl-oxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosid (115)

(β -3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(BnO)-tetra-decanoyl)-OTBDPS)



5.23 g (4.59 mmol) β -3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNH((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-OTBDPS (**114**) werden in 70 ml 80%iger Essigsäure gelöst, mit 10 Tropfen Trifluoressigsäure versetzt und 1 h bei 80 °C gerührt. Danach wird mittels Dünnschichtchromatographie der Reaktionsverlauf überprüft. Bei Bedarf wird weitere Trifluoressigsäure zugegeben und es wird eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf Raumtemp. abgekühlt, mit 200 ml Toluol verdünnt und die Essigsäure sowie Toluol i. Hochvak. entfernt. Der Rückstand (4.97 g) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 25.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 6:1 → 3:1).

Ausbeute: 4.50 g (4.29 mmol, 93 %); farbloser, amorpher Feststoff, [α]_D²³ = -10.8 ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.25$ (^cHex/EtOAc, 3:1), $R_f = 0.08$ (^cHex/EtOAc, 5:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.72 – 7.57 (m, 4H, H_{Ar}-Ph), 7.49 – 7.21 (m, 16H, H_{Ar}-Ph), 6.26 (d, 1H, $^3J_{NH,H_2} = 9.6$ Hz, NH-GlcN), 4.69 (dd, 1H, $^3J_{H_3,H_2} = 10.8$ Hz, $^3J_{H_3,H_4} = 9.0$ Hz, H3-GlcN), 4.53 (d, 1H, $^2J_{CH_{2a},CH_{2b}} = 11.8$ Hz, CH_{2a}^I-Bn), 4.48 (d,

2H, $^2J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 5.1$ Hz, $\text{CH}_{2\text{ab}}^{\text{II}}$ -Bn), 4.43 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 8.0$ Hz, H1-GlcN), 4.38 (d, 1H, $^2J_{\text{CH}_2\text{b},\text{CH}_2\text{a}} = 11.7$ Hz, $\text{CH}_{2\text{b}}^{\text{I}}$ -Bn), 4.09 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H}_2,\text{NH}} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 8.0$ Hz, H2-GlcN), 3.84 (dq, 1H, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2\text{a}} = 7.9$ Hz, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2\text{b}} \approx ^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4} \approx 5.2$ Hz, H_3^{I}), 3.71 (pp, 1H, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2\text{a}} \approx ^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2\text{b}} \approx ^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4} \approx 5.8$ Hz, H_3^{II}), 3.59 – 3.48 (m, 1H, H6_a-GlcN {3.54}), 3.46 – 3.37 (m, 2H, H6_b-GlcN {3.43}, H4-GlcN {3.42}), 2.96 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_4} = 9.3$ Hz, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6\text{a}} = 5.5$ Hz, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6\text{b}} = 3.5$ Hz, H5-GlcN), 2.79 (sb, 1H, OH4-GlcN), 2.57 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_2\text{a},\text{H}_3} = 7.9$ Hz, $^2J_{\text{H}_2\text{a},\text{H}_2\text{b}} = 14.5$ Hz, $\text{H}_{2\text{a}}^{\text{I}}$), 2.45 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_2\text{b},\text{H}_3} = 4.9$ Hz, $^2J_{\text{H}_2\text{b},\text{H}_2\text{a}} = 14.5$ Hz, $\text{H}_{2\text{b}}^{\text{I}}$), 2.41 – 2.29 (m, 2H, $\text{H}_{2\text{a}}^{\text{II}}$ {2.39}, $\text{H}_{2\text{b}}^{\text{II}}$ {2.35}), 1.63 – 1.45 (m, 4H, $\text{H}_{4\text{a}}^{\text{II}}$ {1.62}, $\text{H}_{4\text{a}}^{\text{I}}$ {1.56}, $\text{H}_{4\text{b}}^{\text{I}}$ {1.52}, $\text{H}_{4\text{b}}^{\text{II}}$ {1.48}), 1.36 – 1.17 (m, 36H, 2 x $(\text{CH}_2)_9$), 1.04 (s, 9H, CH_3 -^tBu), 0.88 (t, 6H, $^3J_{\text{H}_{14},\text{H}_{13}} = 6.8$ Hz, H_{14}^{I} , $\text{H}_{14}^{\text{II}}$).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl_3): [δ/ppm] = 172.54 ($\text{C}1^{\text{I}}$), 171.11 ($\text{C}1^{\text{II}}$), 138.21, 137.88 ($\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$), 135.82, 135.77 ($\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$), 133.72, 132.19 ($\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$), 130.11, 130.05, 128.68, 128.55, 128.12, 127.99, 127.91, 127.88, 127.83, 127.63 ($\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$), 96.73 ($\text{C}1$ -GlcN), 76.34 ($\text{C}3$ -GlcN), 76.24 ($\text{C}3^{\text{II}}$), 76.00 ($\text{C}3^{\text{I}}$), 75.17 ($\text{C}5$ -GlcN), 71.07 (CH_2^{II} -Bn), 70.89 (CH_2^{I} -Bn), 69.83 ($\text{C}4$ -GlcN), 62.50 ($\text{C}6$ -GlcN), 54.97 ($\text{C}2$ -GlcN), 41.07 ($\text{C}2^{\text{II}}$), 39.79 ($\text{C}2^{\text{I}}$), 34.00 ($\text{C}4^{\text{I}}$), 33.73 ($\text{C}4^{\text{II}}$), 32.08 (C12), 29.85, 29.81, 29.80, 29.76, 29.52 (C6 – C11), 26.87 (CH_3 -^tBu), 25.46, 25.22 ($\text{C}5^{\text{I}}$, $\text{C}5^{\text{II}}$), 22.85 (C13), 19.15 (C -^tBu), 14.29 (C14).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1072.73 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1072.67).

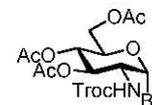
HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1072.6689 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1072.6674).

$\text{C}_{64}\text{H}_{95}\text{NO}_9\text{Si}$ (1050.53)

5.9.2.2.3 Die Synthese des Glucosaminspacerakzeptors

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α -D-glucopyranosylbromid (116)^[436]

(α -Ac₃GlcNTroc-Br)



Eine Lösung von 26.00 g (49.70 mmol) α,β -Ac₃GlcNTroc-OAc (**94**) in 500 ml Dichlormethan wird auf 0 °C gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit 40 ml Bromwasserstoff (33 % in Eisessig) versetzt und 1 h gerührt. Anschließend wird die Kühlung entfernt und es wird eine weitere Stunde bei Raumtemp. gerührt. Der Ansatz wird mit 150 ml Dichlormethan verdünnt und zweimal mit 100 ml Eiswasser sowie Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und das Rohprodukt (28.10 g) durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 18.0 cm, Durchmesser = 8.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

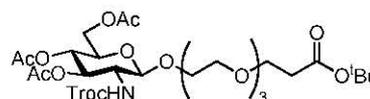
Ausbeute: 22.30 g (41.02 mmol, 82 %); farbloses, hochviskoses Öl, $R_f = 0.59$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 3:1), $R_f = 0.38$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 4:1).

300 MHz- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 6.52$ (d, 1H, $^3J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz, H1-GlcN), 5.42 – 5.28 (m, 2H, NH-GlcN {5.38}, H3-GlcN {5.28}), 5.23 (t_p, 1H, $^3J_{\text{H4,H3}} \approx ^3J_{\text{H4,H5}} \approx 9.7$ Hz, H4-GlcN), 4.81 (d, 1H, $^2J_{\text{CH2a,CH2b}} = 12.0$ Hz, CH_{2a}-Troc), 4.65 (d, 1H, $^2J_{\text{CH2b,CH2a}} = 12.0$ Hz, CH_{2b}-Troc), 4.32 (dd, 1H, $^3J_{\text{H6a,H5}} = 4.0$ Hz, $^2J_{\text{H6a,H6b}} = 12.4$ Hz, H6_a-GlcN), 4.26 (m, 1H, H6_b-GlcN), 4.19 – 4.03 (m, 2H, H2-GlcN {4.13}, H5-GlcN {4.10}), 2.10, 2.05, 2.03 (3s, 9H, CH₃-Ac).

$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{BrCl}_3\text{NO}_9$ (543.58)

[3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (117)

(β -Ac₃GlcNTroc-O-Trispa-^tBu)



Eine Lösung von 6.39 g (22.24 mmol, 1.00 Äquiv.) OH-Trispa-^tBu (**65**) in einer Mischung aus 50 ml absol. Dichlormethan und 50 ml absol. Toluol wird mit 12 g gepulvertem Molekularsieb (4 Å) unter Argon 1 h bei Raumtemp. gerührt. Danach werden 7.59 g (27.50 mmol, 1.20 Äquiv.) trockenes Silbercarbonat sowie eine Lösung von 1.21 g (5.83 mmol, 0.25 Äquiv.) wasserfreiem Silberperchlorat in etwa 10 ml absol. Toluol im Argongegenstrom zugegeben. Der Ansatz wird 30 min bei 0 °C unter Lichtausschluss gerührt, bevor eine Lösung von 13.72 g (25.20 mmol, 1.10 Äquiv.) α -Ac₃GlcNTroc-Br (**116**) in 140 ml absol. Dichlormethan und absol. Toluol (1:1) zugetropft wird. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemp. erwärmt und weitere 24 h gerührt, wobei nach 2 h weitere 1.21 g (5.83 mmol, 0.25 Äquiv.) Silberperchlorat zur Vervollständigung der Umsetzung hinzugefügt werden. Anschließend werden 200 ml Dichlormethan zugegeben, das Molekularsieb wird über Hyflo[®] abfiltriert und mit Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird jeweils zweimal mit 200 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 100 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Das Rohprodukt (20.6 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 10.0 cm im Laufmittelgemisch $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 15.88 g (21.43 mmol, 93 %); farbloses, hochviskoses Öl, $[\alpha]_D^{29} = -6.4$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.18$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:1).

400 MHz- $^1\text{H-NMR}$ [$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 6.53$ (d, 1H, $^3J_{\text{NH,H2}} = 9.4$ Hz, NH-GlcN), 5.10 (dd, 1H, $^3J_{\text{H3,H2}} = 10.1$ Hz, $^3J_{\text{H3,H4}} = 9.4$ Hz, H3-GlcN), 5.04 (t, 1H, $^3J_{\text{H4,H3}} \approx ^3J_{\text{H4,H5}} \approx 9.4$ Hz, H4-GlcN), 4.83 (d, 1H, $^3J_{\text{H1,H2}} = 8.6$ Hz, H1-GlcN), 4.72 (s, 2H, CH₂-Troc), 4.26 (dd, 1H, $^3J_{\text{H6a,H5}} = 4.7$ Hz, $^2J_{\text{H6a,H6b}} = 12.3$ Hz, H6_a-GlcN), 4.11 (dd, 1H, $^3J_{\text{H6b,H5}} =$

2.3 Hz, $^2J_{\text{H6b,H6a}} = 12.3$ Hz, H6_b-GlcN), 3.88 – 3.83 (m, 2H, H3-Spa), 3.82 – 3.74 (m, 1H, H2-GlcN {3.78}), 3.74 – 3.54 (m, 13H, H5-GlcN {3.72}, 6 x CH₂-Spa), 2.49 (t, 2H, $^3J_{\text{H2,H3}} = 6.6$ Hz, H2-Spa), 2.07, 2.00, 1.98 (3 x s, 9H, CH₃-Ac), 1.43 (s, 9H, CH₃-^tBu).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 170.97, 170.89, 170.52 (C=O-Ac), 169.55 (C=O-^tBu), 154.95 (C=O-Troc), 102.03 (C1-GlcN), 95.87 (CCl₃), 80.66 (C-^tBu), 74.58 (CH₂-Troc), 73.31 (C3-GlcN), 71.74 (C5-GlcN), 70.79, 70.76, 70.68, 70.41 (CH₂-Spa), 69.06 (C3-Spa), 68.84 (C4-GlcN), 66.89 (C12-Spa), 62.27 (C6-GlcN), 56.24 (C2-GlcN), 36.35 (C2-Spa), 28.22 (CH₃-^tBu), 20.90, 20.80, 20.75 (3 x CH₃-Ac).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 762.21 ([M+Na]⁺, ber.: 762.17).

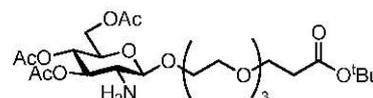
780.18 ([2M+Na]⁺, ber.: 780.14).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 762.1649 ([M+Na]⁺, ber.: 762.1674).

C₂₈H₄₄Cl₃NO₁₅ (741.01)

[3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-amino-β-D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-tert-butylester (118)

(β-Ac₃GlcNH₂-O-Trispa-^tBu)



Eine Lösung von 14.44 g (19.48 mmol) β-Ac₃GlcNTroc-O-Trispa-^tBu (**117**) in 100 ml Essigsäure wird mit etwa 6.75 g (103.24 mmol, 5.30 Äquiv.) Zinkstaub versetzt, welches zuvor durch Aufschlännen in 2 M Salzsäure aktiviert, mit Wasser sowie Ethanol gewaschen und mit Diethylether getrocknet wurde. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemp. 21 h gerührt, anschließend über Hyflo[®] filtriert und mit Essigsäure nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Hochvak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand dreimal mit Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 500 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit 200 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit 100 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung direkt in der nächsten Reaktion eingesetzt.

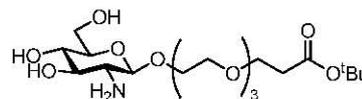
Ausbeute: 10.94 g (19.34 mmol, 99 %); farbloser Feststoff, $R_f = 0.30$ (EtOAc/EtOH, 10:1).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 566.28 ([M+H]⁺, ber.: 566.28).

C₂₅H₄₃NO₁₃ (565.61)

[2-Desoxy-2-amino- β -D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (119)

(β -GlcNH₂-O-Trispa-^tBu)



Eine Lösung von 10.84 g (19.17 mmol) β -Ac₃GlcNH₂-O-Trispa-^tBu (**118**) in 80 ml Methanol wird unter Kontrolle des pH-Wertes mit frisch hergestellter 1%iger methanolischer Natriummethanolat-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 9 erreicht ist, und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Der pH-Wert wird durch regelmäßige Zugabe weiterer methanolischer Natriummethanolat-Lösung bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend wird die Reaktionsmischung durch Zugabe von Essigsäure neutralisiert und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Nach Trocknung i. Hochvak. wird das Rohprodukt ohne Reinigung und vollständige Charakterisierung weiter umgesetzt.

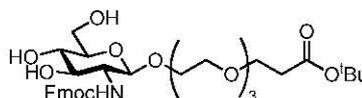
Ausbeute: 8.42 g (max. 19.17 mmol); farbloser Feststoff, $R_f = 0.07$ (EtOAc/EtOH, 10:1).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 440.23$ ($[M+H]^+$, ber.: 440.25).

C₁₉H₃₇NO₁₀ (439.50)

[2-Desoxy-2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (120)

(β -GlcNH_{Fmoc}-O-Trispa-^tBu)



Zu einer Mischung aus 80 ml Acetonitril/Dichlormethan (1:1) werden 8.35 g (19.00 mmol) β -GlcNH₂-O-Trispa-^tBu (**119**) und 8.33 g (24.70 mmol, 1.30 Äquiv.) Fluoren-9-ylmethylsuccinimidylcarbonat gegeben und unter Rühren tropfenweise mit *N*-Ethyl-diisopropylamin versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5 erreicht ist. Der Ansatz wird 24 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 4.0 angesäuert. Die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und das Rohprodukt (17.60 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 8.0 cm im Laufmittelgemisch EtOAc/EtOH, 50:1 → 25:1 → 10:1).

Ausbeute: 10.01 g (15.13 mmol, 80 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{26} = -16.8$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.20$ (EtOAc/EtOH, 10:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.75 - 7.70$ (d, 2H, $^3J_{H_4,H_3} = ^3J_{H_5,H_6} = 7.6$ Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), $7.64 - 7.56$ (d, 2H, $^3J_{H_1,H_2} = ^3J_{H_8,H_7} = 4.2$ Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), $7.39 - 7.33$ (m, 2H, H3-Fmoc, H6-Fmoc), $7.31 - 7.26$ (m, 2H, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 6.25 (d, 1H, $^3J_{NH,H_2} = 6.0$ Hz, NH-GlcN), 4.62 (m_c, 1H, CH_{2a}-Fmoc), 4.56 – 4.47 (m, 2H, H1-GlcN {4.54}, CH_{2b}-Fmoc {4.54}), 4.21 – 4.13 (m, 1H, H9-Fmoc), 3.91 – 3.76 (m, 4H, H6_{ab}-GlcN {3.85}, CH₂-Spa {3.77}), 3.76 – 3.48 (m, 7H, CH₂-Spa {3.74}, CH₂-Spa

{3.62}, H3-Spa {3.55}, H4-GlcN {3.55}), 3.48 – 3.33 (m, 6H, CH₂-Spa {3.46}, H2-GlcN {3.43}, H3-GlcN {3.43}, CH₂-Spa {3.38}), 3.33 – 3.06 (m, 7H, H5-GlcN {3.31}, CH₂-Spa {3.30}, CH₂-Spa {3.25}, CH₂-Spa {3.18}), 2.42 (t, 2H, ³J_{H2,H3} = 6.2 Hz, H2-Spa), 1.41 (s, 9H, CH₃-^tBu).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 171.32 (C=O-^tBu), 157.79 (C=O-Fmoc), 144.21, 144.18 (C1a-Fmoc, C8a-Fmoc), 141.51, 141.47 (C4a-Fmoc, C5a-Fmoc), 127.71, 127.68 (C3-Fmoc, C6-Fmoc), 127.24 (C2-Fmoc, C7-Fmoc), 124.95 (C1-Fmoc, C8-Fmoc), 119.92 (C4-Fmoc, C5-Fmoc), 102.59 (C1-GlcN), 81.04 (C-^tBu), 75.68 (C5-GlcN), 75.37 (C3-GlcN), 71.63 (C4-GlcN), 70.59, 70.35, 70.24, 70.11, 70.04, 69.19 (CH₂-Spa), 66.45 (C3-Spa), 65.88 (CH₂-Fmoc), 62.37 (C6-GlcN), 57.72 (C2-GlcN), 47.34 (CH-Fmoc), 36.13 (C2-Spa), 28.19 (CH₃-^tBu).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 684.33 ([M+Na]⁺, ber.: 684.30).

C₃₄H₄₇NO₁₂ (661.74)

[4,6-O-Benzyliden-2-desoxy-2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (121)

(β -4,6-Bzn-GlcNHFmoc-O-Trispa-^tBu)



8.32 g (12.58 mmol) β -GlcNHFmoc-O-Trispa-^tBu (**120**) werden in 80 ml Acetonitril bei 40 °C mit 6.22 g (40.90 mmol, 3.25 Äquiv.) Benzaldehyddimethylacetal versetzt. Es wird 4-Toluolsulfonsäure-Monohydrat in Acetonitril hinzugegeben, bis ein pH-Wert von 3.5 erreicht ist, und die Mischung über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionslösung wird durch Zugabe von *N*-Ethyl-diisopropylamin neutralisiert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand (15.60 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 25.0 cm, Durchmesser = 6.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 3:1 → 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 8.05 g (10.73 mmol, 85 %); farbloser Feststoff, [α]_D²⁴ = – 31.6 (*c* = 1.00, CHCl₃), *R_f* = 0.26 (^cHex/EtOAc, 1:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.76 – 7.73 (d, 2H, ³J_{H4,H3} = ³J_{H5,H6} = 7.3 Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7.62 (dd, 2H, ³J_{H1,H2} = ³J_{H8,H7} = 6.5 Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7.53 – 7.42 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.38 (td, 2H, ³J_{H3,H2} = ³J_{H3,H4} = ³J_{H6,H5} = ³J_{H6,H7} = 7.4 Hz, ⁴J_{H3,H1} = ³J_{H6,H8} = 2.6 Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7.35 – 7.29 (m, 5H, H2-Fmoc, H7-Fmoc, H_{Ar}-Ph), 6.23 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 7.0 Hz, NH-GlcN), 5.52 (s, 1H, CH-Bzn), 4.72 (dd, 1H, ³J_{CH2a,H9-Fmoc} = 4.8 Hz, ²J_{CH2a,CH2b} = 10.4 Hz, CH_{2a}-Fmoc), 4.65 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 8.4 Hz, H1-GlcN), 4.61 (dd, 1H, ³J_{CH2b,H9-Fmoc} = 4.9 Hz, ²J_{CH2b,CH2a} = 10.4 Hz, CH_{2b}-Fmoc), 4.29 (dd, 1H, ³J_{H6a,H5} = 5.0 Hz,

$^2J_{H6a,H6b} = 10.5$ Hz, $H6a$ -GlcN), 4.20 – 4.16 (m, 1H, $H9$ -Fmoc), 3.83 – 3.73 (m, 2H, $H6b$ -GlcN {3.80}, $H3$ -GlcN {3.72}), 3.63 – 3.50 (m, 4H, $H2$ -GlcN {3.60}, $H4$ -GlcN {3.56}, $H3$ -Spa {3.50}), 3.50 – 3.42 (m, 6H, CH_2 -Spa {3.48}, CH_2 -Spa {3.48}, CH_2 -Spa {3.42}), 3.42 – 3.36 (m, 3H, $H5$ -GlcN {3.41}, CH_2 -Spa {3.38}), 3.26 – 3.19 (m, 2H, CH_2 -Spa {3.27}), 3.14 – 3.05 (m, 2H, CH_2 -Spa {3.12}), 2.45 – 2.34 (m, 2H, $H2$ -Spa {2.42}), 1.38 (s, 9H, CH_3 - t Bu).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR [BB, HMQC] ($CDCl_3$): [δ/ppm] = 171.09 (C=O- t Bu), 157.51 (C=O-Fmoc), 144.02 ($C1a$ -Fmoc, $C8a$ -Fmoc), 141.40, 141.33 ($C4a$ -Fmoc, $C5a$ -Fmoc), 137.17 (C_{ipso} -Ph), 128.93, 128.08 ($C_{o,m,p}$ -Ph), 127.53, 127.51 ($C3$ -Fmoc, $C6$ -Fmoc), 127.05 ($C2$ -Fmoc, $C7$ -Fmoc), 126.28 ($C_{o,m,p}$ -Ph), 124.65 ($C1$ -Fmoc, $C8$ -Fmoc), 119.76, 119.72 ($C4$ -Fmoc, $C5$ -Fmoc), 102.80 ($C1$ -GlcN), 101.59 (CH-Bnz), 81.25 ($C4$ -GlcN), 80.75 (C- t Bu), 72.10 ($C3$ -GlcN), 71.57, 70.35, 70.07, 69.86, 69.84, 68.99 (CH_2 -Spa), 68.62 ($C6$ -GlcN), 66.26 ($C5$ -GlcN), 66.19 ($C3$ -Spa), 65.39 (CH_2 -Fmoc), 58.36 ($C2$ -GlcN), 47.23 ($C9$ -Fmoc), 35.87 ($C2$ -Spa), 27.96 (CH_3 - t Bu).

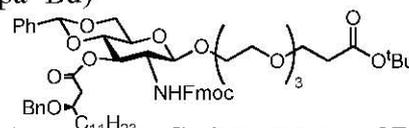
ESI-MS (positiv): [m/z] = 772.37 ([M+Na] $^+$, ber.: 772.37).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 772.3324 ([M+Na] $^+$, ber.: 772.3312).

$C_{41}H_{51}NO_{12}$ (749.84)

[3-*O*-((*R*)-3-Benzoyloxytetradecanoyl)-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-2-(fluoren-9-ylmethoxy-carbonylamino)- β -D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (122)

(β -3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNHFmoc-*O*-Trispa- t Bu)



Eine Lösung aus 5.67 g (7.56 mmol) β -4,6-Bzn-GlcNHFmoc-*O*-Trispa- t Bu (**121**), 2.83 g (8.47 mmol, 1.12 Äquiv.) und 111.0 mg 4-Pyrrolidinpyridin (0.91 mmol, 0.12 Äquiv.) in 70 ml trockenem Dichlormethan wird mit 1.74 g (9.07 mmol, 1.20 Äquiv.) EDC-Hydrochlorid versetzt und 15 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 200 ml Dichlormethan wird zweimal mit jeweils 50 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung, zweimal mit 50 ml Wasser gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und das Rohprodukt (9.50 g) ohne weitere Charakterisierung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Rohausbeute: 8.06 g (max. 7.56 mmol, quant.); farbloser, gummiartiger Feststoff, $R_f = 0.61$ (c Hex/EtOAc, 1:1).

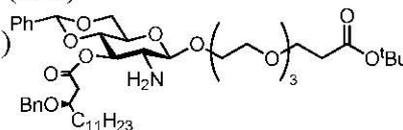
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1088.63 ([M+Na] $^+$, ber.: 1088.57).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1088.5709 ([M+Na] $^+$, ber.: 1088.5711).

$C_{62}H_{83}NO_{14}$ (1066.32)

[3-*O*-((*R*)-3-Benzoyloxytetradecanoyl)-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-2-amino-β-D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (123**)**

(β-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNH₂-O-Trispa-^tBu)



8.06 g (max. 7.56 mmol) rohes β-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNH^{Fmoc}-O-Trispa-^tBu (**122**) werden in 24 ml Dichlormethan gelöst und mit 6.0 ml (5.16 g, 61.30 mmol, 8.10 Äquiv.) Piperidin versetzt. Die Lösung wird 30 min bei Raumtemp. gerührt, anschließend mit 200 ml Ether verdünnt und dreimal mit jeweils 50 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Der Rückstand (9.60 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 6.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 1:1 → 1:3).

Ausbeute: 5.81 g (6.88 mmol, 91 % bezogen auf (**122**)); farbloser Schaum, $[\alpha]_D^{32} = -21.8$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.16$ (^cHex/EtOAc, 1:5), $R_f = 0.10$ (^cHex/EtOAc, 1:3).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.37 - 7.33$ (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.27 – 7.22 (m, 8H, H_{Ar}-Ph), 5.38 (s, 1H, CH-Bzn), 5.12 (tp, 1H, ³J_{H3,H2} = ³J_{H3,H4} = 9.6 Hz, H3-GlcN), 4.67 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 8.4 Hz, H1-GlcN), 4.54 (d, 1H, ²J_{CH2a,CH2b} = 11.9 Hz, CH_{2a}-Bn), 4.38 (d, 1H, ²J_{CH2b,CH2a} = 11.9 Hz, CH_{2b}-Bn), 4.30 (dd, 1H, ³J_{H6a,H5} = 4.5 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 10.2 Hz, H_{6a}-GlcN), 4.14 – 4.04 (m, 2H, CH₂-Spa {4.12}), 4.04 – 3.79 (m, 6H, CH₂-Spa {3.98}, CH₂-Spa {3.96}, CH₂-Spa {3.87}), 3.79 – 3.67 (m, 4H, H3 {3.78}, H_{6b}-GlcN {3.76}, CH₂-Spa {3.67}), 3.67 – 3.46 (m, 6H, H3-Spa {3.63}, CH₂-Spa {3.62}, H4-GlcN {3.59}, H5-GlcN {3.54}), 3.07 – 2.95 (m, 1H, H2-GlcN {3.01}), 2.67 (dd, 1H, ³J_{H2a,H3} = 5.8 Hz, ²J_{H2a,H2b} = 14.6 Hz, H_{2a}), 2.58 – 2.43 (m, 2H, H_{2b} {2.52}, H_{2a}-Spa {2.48}), 2.39 – 2.29 (m, 1H, H_{2b}-Spa {2.35}), 1.42 – 1.38 (m, 11H, H4 {1.42}, CH₃-^tBu {1.41}), 1.28 – 1.09 (m, 18H, (CH₂)₉), 0.85 (t, 3H, ³J_{H14,H13} = 6.8 Hz, H14).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 171.13$ (C=O-^tBu), 170.74 (C1), 138.41, 136.64 (C_{ipso}-Ph), 129.07, 128.25, 128.16, 127.77, 127.45, 126.10 (C_{o,m,p}-Ph), 101.53 (CH-Bnz), 100.96 (C1-GlcN), 82.28 (C-^tBu), 78.67 (C4-GlcN), 75.17 (C3), 74.15 (C3-GlcN), 70.95 (CH₂-Bn), 69.63, 69.57, 69.36 (CH₂-Spa), 68.39 (C6-GlcN), 67.33 (C3-Spa), 67.04, 66.99 (CH₂-Spa), 66.80 (C5-GlcN), 56.42 (C2-GlcN), 39.35 (C2), 34.36, 34.26 (C4, C2-Spa), 31.92 (C12), 29.66, 29.59, 29.48, 29.35, 28.78 (C6 – C11), 28.03 (CH₃-^tBu), 25.15 (C5), 22.69 (C13), 14.13 (C14).

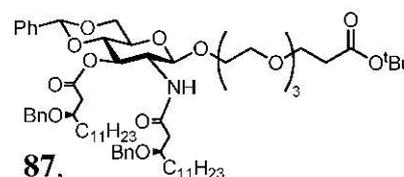
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 866.46$ ([M+Na]⁺, ber.: 866.50).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 844.5212$ ([M+H]⁺, ber.: 844.5211).

C₄₇H₇₃NO₁₂ (844.08).

[3-*O*-((*R*)-3-Benzoyloxytetradecanoyl)-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-2-((*R*)-3-benzoyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (124**)**

(β -3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNH((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-*O*-Trispa-^tBu)



1.84 g (5.51 mmol, 1.10 Äquiv.) Carbonsäure **87**,

2.09 g (5.51 mmol, 1.1 Äquiv.) HBTU, 0.77 g (5.71 mmol, 1.14 Äquiv.) HOBt und 1.29 g (10.01 mmol, 2.00 Äquiv.) *N*-Ethyldiisopropylamin werden in 20 ml absol. Dichlormethan 45 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird die Lösung des aktivierten Carbonsäureesters zu 4.23 g (5.01 mmol) β -3-((*R*)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNH₂-*O*-Trispa-^tBu (**123**) in 20 ml *N,N*-Dimethylformamid gegeben und die Lösung 15 h bei Raumtemp. gerührt. Danach werden die Lösungsmittel zunächst i. Vak., anschließend i. Hochvak. entfernt. Der Rückstand (10.85 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 45.0 cm, Durchmesser = 4.5 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 3:1 \rightarrow 2:1 \rightarrow 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.48 g (3.00 mmol, 60 %); farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{31} = -20.2$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.58$ (^cHex/EtOAc, 1:1), $R_f = 0.13$ (^cHex/EtOAc, 3:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.42 - 7.31$ (m, 7H, H_{Ar}-Ph), 7.31 - 7.21 (m, 8H, H_{Ar}-Ph), 6.85 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 9.3 Hz, NH-GlcN), 5.45 (s, 1H, CH-Bzn), 5.22 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.2 Hz, ³J_{H3,H4} = 9.5 Hz, H3-GlcN), 4.71 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 8.6 Hz, H1-GlcN), 4.57 (d, 2H, ²J = 3.7 Hz, CH₂^{II}-Bn), 4.51 (d, 1H, ²J_{CH2a,CH2b} = 11.7 Hz, CH_{2a}^I-Bn), 4.39 (d, 1H, ²J_{CH2b,CH2a} = 11.7 Hz, CH_{2b}^I-Bn), 4.35 (dd, 1H, ³J_{H6a,H5} = 5.0 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 10.5 Hz, H6_a-GlcN), 4.17 (ddd, ³J_{H2,H3} = 10.2 Hz, ³J_{H2,NH} = 9.3 Hz, ³J_{H2,H1} = 8.6 Hz, H2-GlcN), 3.96 - 3.89 (m, 1H, H3^{II} {3.93}), 3.85 - 3.78 (m, 2H, H3^I {3.80}, H6_b-GlcN {3.78}), 3.77 - 3.72 (m, 1H, H3_a-Spa {3.73}), 3.72 - 3.65 (m, 8H, 2 x CH₂-Spa {3.71}, H3_b-Spa {3.69}, CH₂-Spa {3.71}), H4-GlcN {3.66}), 3.65 - 3.45 (m, 5H, CH₂-Spa {3.58}, CH₂-Spa {3.50}, H5-GlcN {3.48}), 3.45 - 3.35 (m, 2H, CH₂-Spa {3.41}), 2.70 (dd, 1H, ³J_{H2a,H3} = 6.4 Hz, ²J_{H2a,H2b} = 15.0 Hz, H_{2a}^I), 2.50 (td, 2H, ³J_{H2-Spa,H3-Spa} = 6.5 Hz, ²J_{H2a-Spa,H2b-Spa} = 1.3 Hz, H2-Spa), 2.44 (d, 1H, ³J_{H2a,H3} = 6.3 Hz, H_{2a}^{II}), 2.41 (d, 1H, ³J_{H2b,H3} = 6.0 Hz, H_{2b}^I), 2.29 (dd, 1H, ³J_{H2b,H3} = 4.1 Hz, ²J_{H2b,H2a} = 14.8 Hz, H_{2b}^{II}), 1.60 - 1.44 (m, 13H, H4^I, H4^{II}, CH₃-^tBu {1.46, s, 9H}), 1.35 - 1.17 (m, 36H, 2 x (CH₂)₉), 0.87 (tp, 6H, ³J_{H14,H13} \approx 7.0 Hz, H14^I, H14^{II}).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 171.69$ (C=O-^tBu), 171.44 (C1^I), 171.02 (C1^{II}), 138.97, 138.80, 137.13 (C_{ipso}-Ph), 129.11, 128.68, 128.49, 128.38, 128.30,

128.24, 128.03, 127.86, 127.66, 127.52, 126.26 (C_{o,m,p}-Ph), 102.63 (C1-GlcN), 101.53 (CH-Bnz), 80.66 (C-^tBu), 79.13 (C4-GlcN), 76.64 (C3^{II}), 75.74 (C3^I), 72.50 (C3-GlcN), 71.84 (CH₂^{II}-Bn), 71.29 (CH₂^I-Bn), 71.23, 70.91, 70.83, 70.53, 70.51, 68.90 (CH₂-Spa), 68.81 (C6-GlcN), 67.01 (C3-Spa), 66.49 (C5-GlcN), 54.42 (C2-GlcN), 41.83 (C2^{II}), 39.93 (C2^I), 36.46 (C2-Spa), 34.73, 34.51 (C4^I, C4^{II}), 32.11 (C12^I, C12^{II}), 29.98, 29.89, 29.85, 29.82, 29.80 (C6^{II} – C11^{II}), 28.28 (CH₃-^tBu), 25.43, 25.32 (C5^I, C5^{II}), 22.88 (C13^I, C13^{II}), 14.30 (C14^I, C14^{II}).

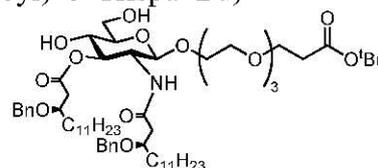
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1182.73$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1182.74).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1182.7465$ ($[M+H]^+$, ber.: 1182.7433).

C₆₈H₁₀₅NO₁₄ (1160.56)

[3-O-((R)-3-Benzoyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-benzyloxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-tert-butylester (125)

(β-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-O-Trispa-^tBu)



Eine Lösung von 3.43 g (2.96 mmol) β-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-4,6-Bzn-GlcNH((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-O-Trispa-^tBu (**124**) in 40 ml 80%iger Essigsäure wird 1 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf Raumtemp. abgekühlt, mit 100 ml Toluol verdünnt und die Lösungsmittel i. Hochvak. entfernt. Der Rückstand (3.41 g) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 25.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm im Laufmittelgemisch °Hex/EtOAc, 3:1 → 1:1 → 0:∞) gereinigt.

Ausbeute: 2.98 g (2.78 mmol, 94 %); farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{35} = -24.9$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.04$ (°Hex/EtOAc, 1:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.42 - 7.23$ (m, 10H, H_{Ar}-Ph), 4.79 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.9 Hz, ³J_{H3,H4} = 9.1 Hz, H3-GlcN), 4.65 (d, 1H, ²J_{CH2a,CH2b} = 12.0 Hz, CH_{2a}-Bn), 4.49 (s, 2H, CH₂^{II}-Bn), 4.47 (d, 1H, ²J_{CH2b,CH2a} = 12.0 Hz, CH_{2b}^I-Bn), 4.33 (dt, ³J_{H2,H3} = 10.9 Hz, ³J_{H2,NH} ≈ ³J_{H2,H1} = 8.6 Hz, H2-GlcN), 4.02 – 3.90 (m, 5H, H3-Spa {3.98}, H4-GlcN {3.95}, CH₂-Spa {3.94}), 3.90 – 3.78 (m, 8H, CH₂-Spa {3.88}, H3^I {3.85}, H3^{II} {3.85}, H1-GlcN {3.83}, H6_a-GlcN {3.82}, CH₂-Spa {3.79}), 3.78 – 3.59 (m, 7H, H6_b-GlcN {3.78}, CH₂-Spa {3.77}, CH₂-Spa {3.71}, CH₂-Spa {3.64}), 3.37 (s_b, 1H, OH6-GlcN), 3.24 – 3.15 (m, 2H, H5-GlcN {3.20}, OH4-GlcN {3.20}), 2.62 (dd, 1H, ³J_{H2a,H3} = 7.4 Hz, ²J_{H2a,H2b} = 14.7 Hz, H_{2a}), 2.57 (td, 2H, ³J_{H2-Spa,H3-Spa} = 6.6 Hz, ²J_{H2a-Spa, H2b-Spa} = 2.3 Hz, H2-Spa), 2.47

(dd, 1H, $^3J_{\text{H}_{2b},\text{H}_3} = 5.2$ Hz, $^2J_{\text{H}_{2b},\text{H}_{2b}} = 14.7$ Hz, H_{2b}^{I}), 2.39 (dd, 2H, $^3J_{\text{H}_{2a},\text{H}_3} = 3.5$ Hz, $\text{H}_{2a}^{\text{II}}$, $^3J_{\text{H}_{2b},\text{H}_3} = 2.3$ Hz, $\text{H}_{2a}^{\text{II}}$), 1.65 – 1.45 (m, 4H, H_4^{I} , H_4^{II}), 1.42 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$), 1.28 – 1.22 (m, 36H, 2 x $(\text{CH}_2)_9$), 0.86 (t_p, 6H, $^3J_{\text{H}_{14},\text{H}_{13}} \approx 7.1$ Hz, H_{14}^{I} , $\text{H}_{14}^{\text{II}}$).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR [BB, HMQC] (CDCl_3): [δ/ppm] = 176.42 (C=O- ^tBu), 172.72 ($\text{C}1^{\text{I}}$), 171.03 ($\text{C}1^{\text{II}}$), 138.76, 138.55, 138.20 ($\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$), 128.77, 128.75, 128.67, 128.54, 128.24, 128.19, 128.12, 128.06, 128.03, 127.98, 127.91, 127.87 ($\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$), 103.22 ($\text{C}1\text{-GlcN}$), 81.16 ($\text{C-}^t\text{Bu}$), 76.51 ($\text{C}5\text{-GlcN}$), 75.74 ($\text{C}3^{\text{II}}$), 75.67 ($\text{C}3^{\text{I}}$), 74.29 ($\text{C}3\text{-GlcN}$), 71.16 ($\text{CH}_2^{\text{II}}\text{-Bn}$), 70.66 ($\text{CH}_2^{\text{I}}\text{-Bn}$), 70.44, 69.80, 69.72, 69.59, 69.55, 69.51 ($\text{CH}_2\text{-Spa}$), 67.93 ($\text{C}3\text{-Spa}$), 67.32 ($\text{C}4\text{-GlcN}$), 61.16 ($\text{C}6\text{-GlcN}$), 52.58 ($\text{C}2\text{-GlcN}$), 40.73 ($\text{C}2^{\text{II}}$), 39.73 ($\text{C}2^{\text{I}}$), 35.22 ($\text{C}2\text{-Spa}$), 34.19, 33.83 ($\text{C}4^{\text{I}}$, $\text{C}4^{\text{II}}$), 32.06 ($\text{C}12^{\text{I}}$, $\text{C}12^{\text{II}}$), 29.95, 29.83, 29.79, 29.66, 29.51 ($\text{C}6^{\text{III}}\text{-C}11^{\text{II}}$), 28.17 ($\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$), 25.25, 24.94 ($\text{C}5^{\text{I}}$, $\text{C}5^{\text{II}}$), 22.82 ($\text{C}13^{\text{I}}$, $\text{C}13^{\text{II}}$), 14.25 ($\text{C}14^{\text{I}}$, $\text{C}14^{\text{II}}$).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1094.73 ([$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, ber.: 1094.71).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1094.7129 ([$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, ber.: 1094.7120).

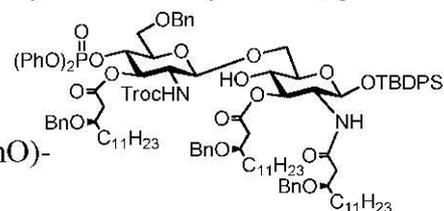
$\text{C}_{61}\text{H}_{101}\text{NO}_{14}$ (1072.45)

5.9.2.3 Die Synthesen der Disaccharide

5.9.2.3.1 Die Synthese von 6-*O*-(4-*O*-Phosphoryl-3-*O*-((*R*)-3-hydroxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((*R*)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl)-3-*O*-((*R*)-3-hydroxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((*R*)-3-hydroxytetradecanoylamino)- α -D-glucopyranose

tert-Butyldiphenylsilyl-6-*O*-[4-(diphenylphosphoryl)-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosid (126)

(β -6-(β -4-((PhO) $_2$ PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-OTBDPS)



Eine Lösung aus 1.14 g (1.08 mmol, 1.20 Äquiv.) α -4-((PhO) $_2$ PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc-Br (**104**), 298 mg (1.08 mmol, 1.20 Äquiv.) Silbercarbonat, 945 mg (0.90 mmol, 1.00 Äquiv.) β -3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-OTBDPS (**115**) und ca. 3.0 g gepulvertem Molekularsieb (4 Å)

wird in 40 ml absol. Dichlormethan unter Argon 1 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf 0 °C abgekühlt und unter Lichtausschluss werden 693 mg (2.70 mmol, 3.00 Äquiv.) Silbertrifluormethansulfonat hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemp. erwärmt und nach 4 h werden weitere 231 mg (0.90 mmol, 1.00 Äquiv.) Silbertrifluormethansulfonat hinzugegeben. Die Lösung wird insgesamt 24 h gerührt und anschließend mit *N*-Ethyl-diisopropylamin neutralisiert. Es wird mit 200 ml Dichlormethan verdünnt, das Molekularsieb über Hyflo[®] abfiltriert und mit Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird jeweils zweimal mit 200 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 100 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Das Rohprodukt (1.95 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 50.0 cm, Durchmesser = 4.4 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 5:1).

Ausbeute: 1093 mg (0.54 mmol, 60 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = -9.5$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.37$ (^cHex/EtOAc, 3:1), $R_f = 0.11$ (^cHex/EtOAc, 5:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 7.75 - 7.61$ (m, 4H, H_{Ar}-Ph), 7.46 – 7.08 (m, 36H, H_{Ar}-Ph), 6.06 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,H2}} = 9.6$ Hz, NH-GlcN^I), 5.32 (dd, 1H, $^3J_{\text{H3,H2}} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H3,H4}} = 9.0$ Hz, H3-GlcN^{II}), 4.78 – 4.64 (m, 3H, H4-GlcN^{II} {4.73}, H3-GlcN^I {4.69}, NH-GlcN^{II} {4.66}), 4.54 – 4.30 (m, 12H, CH_{2a}-Troc {4.53}, H1-GlcN^{II} {4.50}, 3 x CH_{2a}-Bn {4.47}, CH_{2b}-Troc {4.44}, CH₂-Bn {4.40}, H1-GlcN^I {4.38}, 3 x CH_{2b}-Bn {4.33}), 4.12 (dt, $^3J_{\text{H2,H3}} \approx ^3J_{\text{H2,NH}} \approx 9.9$ Hz, $^3J_{\text{H2,H1}} = 8.0$ Hz, H2-GlcN^I), 3.86 (dd, 1H, $^3J_{\text{H6a,H5}} = 3.3$ Hz, $^2J_{\text{H6a,H6b}} = 11.5$ Hz, H6_a-GlcN^I), 3.83 – 3.79 (m, 1H, H_{3-I}^I {3.84}), 3.75 – 3.65 (m, 2H, H_{3-II}^I {3.71}, H_{3-I}^{II} {3.69}), 3.63 (dd, 1H, $^3J_{\text{H6a,H5}} = 2.0$ Hz, $^2J_{\text{H6a,H6b}} = 11.1$ Hz, H6_a-GlcN^{II}), 3.60 – 3.51 (m, 2H, H6_b-GlcN^I {3.58}, H6_b-GlcN^{II} {3.54}), 3.51 – 3.42 (m, 2H, H4-GlcN^I {3.47}, H5-GlcN^{II} {3.45}), 3.28 (dt, $^3J_{\text{H2,H3}} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H2,H1}} = ^3J_{\text{H2,NH}} = 8.4$ Hz, H2-GlcN^{II}), 3.11 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H5,H4}} = 9.0$ Hz, $^3J_{\text{H5,H6b}} = 5.1$ Hz, $^3J_{\text{H5,H6a}} = 3.3$ Hz, H5-GlcN^I), 2.84 (d, 1H, $^3J_{\text{OH,H4}} = 4.0$ Hz, OH-GlcN^I), 2.59 (dd, 1H, $^3J_{\text{H2a,H3}} = 7.8$ Hz, $^2J_{\text{H2a,H2b}} = 14.9$ Hz, H_{2a-I}^I), 2.52 – 2.41 (m, 3H, H_{2b-I}^I {2.45}, H_{2ab-II}^I {2.43, 2.41}), 2.38 (dd, 1H, $^3J_{\text{H2a,H3}} = 6.3$ Hz, $^2J_{\text{H2a,H2b}} = 15.5$ Hz, H_{2a-I}^{II}), 2.27 (dd, 1H, $^3J_{\text{H2b,H3}} = 4.7$ Hz, $^2J_{\text{H2b,H2a}} = 15.5$ Hz, H_{2b-I}^{II}), 1.67 – 1.45 (m, 6H, H_{4-I}^I, H_{4-II}^I, H₄^{II}), 1.33 – 1.18 (m, 54H, 3 x (CH₂)₉), 1.02 (s, 9H, CH₃-^tBu), 0.89 (t_p, 9H, $^3J_{\text{H14,H13}} \approx 6.7$ Hz, H_{14-I}^I, H_{14-II}^I, H₁₄^{II}).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 172.39$ (C_{1-I}^I), 171.20 (C_{1-I}^{II}), 170.96 (C_{1-II}^I), 154.19 (C=O-Troc), 150.61, 150.48, 138.53, 138.27, 138.25, 138.06 (6 x C_{ipso}-Ph), 136.22, 135.92 (C_{o,m,p}-Ph), 133.56, 132.96 (2 x C_{ipso}-Ph), 130.14, 129.99, 129.95, 128.61, 128.53, 128.48, 128.46, 128.04, 127.97, 127.94, 127.84, 127.80, 127.75, 127.70, 127.65,

127.59, 125.70, 120.34, 120.31, 120.29, 120.26 ($C_{o,m,p}$ -Ph), 100.53 ($C1$ -GlcN^{II}), 96.54 ($C1$ -GlcN^I), 95.40 (CCl_3), 76.04 (C_{3-I}^{II}), 75.84 (C_{3-II}^I), 75.72 (C_{3-I}^I), 75.50 ($C3$ -GlcN^I), 74.85 ($C4$ -GlcN^{II}), 74.71 (CH_2 -Troc), 74.57 ($C5$ -GlcN^I), 73.84 ($C5$ -GlcN^{II}), 73.60 (CH_2 -Bn), 72.12 ($C3$ -GlcN^{II}), 71.25, 71.06, 70.85 (3 x CH_2 -Bn), 69.67 ($C4$ -GlcN^I), 68.91 ($C6$ -GlcN^I), 68.22 ($C6$ -GlcN^{II}), 56.69 ($C2$ -GlcN^{II}), 54.97 ($C2$ -GlcN^I), 41.14 (C_{2-I}^{II}), 39.91 (C_{2-I}^I), 38.79 (C_{2-II}^I), 34.38, 34.20, 33.85 (C_{4-I}^I , C_{4-II}^I , C_{4-I}^{II}), 32.07 (3 x C12), 29.83, 29.80, 29.74, 29.52, 27.05 (3 x C6 – C11), 26.80 (CH_3 -^tBu), 25.46, 25.42, 25.24 (C_{5-I}^I , C_{5-II}^I , C_{5-I}^{II}), 22.84 (3 x C13), 19.18 (C -^tBu), 14.28 (3 x C14).

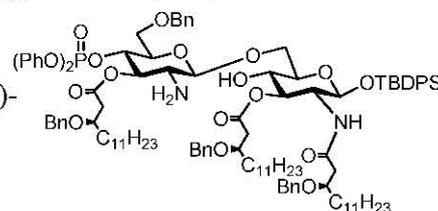
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2049.07$ ($[M+Na]^+$, ber.: 2048.96).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2045.9568$ ($[M+Na]^+$, ber.: 2045.9565).

$C_{113}H_{154}Cl_3N_2O_{20}PSi$ (2025.85)

***tert*-Butyldiphenylsilyl-6-O-[4-(diphenylphosphoryl)-3-O-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-2-amino- β -D-gluco-pyranosyl]-3-O-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-gluco-pyranosid (127)**

(β -6-(β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH₂)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-OTBDPS)



Eine Lösung von 1.73 g (0.85 mmol) β -6-(β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-OTBDPS (**126**) in 25 ml Essigsäure wird mit etwa 1.12 g (17.05 mmol) Zinkstaub versetzt, welches zuvor durch Aufschlännen in 2 M Salzsäure aktiviert, mit Wasser sowie Ethanol gewaschen und mit Diethylether getrocknet wurde. Die Reaktionsmischung wird 4 h bei 60 °C gerührt, über Hyflo[®] filtriert und der Filterkuchen mit Essigsäure nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Hochvak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand dreimal mit Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 500 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit 200 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit 100 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel i. Vak. befreit. Der Rückstand (1.60 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 4.0 cm im Laufmittelgemisch ^oHex/EtOAc, 3:1) gereinigt. Ausbeute: 1.39 g (0.75 mmol, 88 %); farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{25} = -11.8$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$), $R_f = 0.28$ (Chloroform/Aceton, 9:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δppm] = 7.74 – 7.59 (m, 4H, H_{Ar}-Ph), 7.48 – 7.08 (m, 36H, H_{Ar}-Ph), 6.07 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 9.6 Hz, NH-GlcN^I), 5.08 (t_p, 1H, ³J_{H3,H2} = ³J_{H3,H4} = 9.8 Hz, H3-GlcN^{II}), 4.76 – 4.64 (m, 2H, H4-GlcN^{II} {4.69}, H3-GlcN^I {4.68}), 4.55 – 4.28 (m, 9H, 3 x CH_{2a}-Bn {4.47}, CH₂-Bn {4.42}, H1-GlcN^I {4.35}, 3 x CH_{2b}-Bn {4.34}), 4.21 – 4.12 (m, 1H, H2-GlcN^I {4.16}), 4.09 (d, 1H, ³J_{H2,H1} = 7.9 Hz, H1-GlcN^{II}), 3.97 (dd, 1H, ³J_{H6a,H5} = 3.0 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 10.9 Hz, H_{6a}-GlcN^I), 3.89 – 3.75 (m, 2H, H^I_{3-I} {3.82}, H^I_{3-II} {3.78}), 3.72 – 3.62 (m, 2H, H^{II}_{3-I} {3.67}, H_{6a}-GlcN^{II} {3.65}), 3.63 – 3.54 (m, 3H, H_{6b}-GlcN^I {3.58}, H_{6b}-GlcN^{II} {3.57}, H5-GlcN^{II} {3.56}), 3.52 (t, 1H, ³J_{H4,H3} = ³J_{H4,H5} = 9.4 Hz, H4-GlcN^I), 3.18 (ddd, 1H, ³J_{H5,H4} = 9.2 Hz, ³J_{H5,H6b} = 5.7 Hz, ³J_{H5,H6a} = 3.0 Hz, H5-GlcN^I), 2.70 (dd, 1H, ³J_{H2,H3} = 10.4 Hz, ³J_{H2,H1} = 7.9 Hz, H2-GlcN^{II}), 2.61 (dd, 1H, ³J_{H2a,H3} = 7.6 Hz, ²J_{H2a,H2b} = 14.9 Hz, H^I_{2a-I}), 2.52 – 2.41 (m, 3H, H^I_{2ab-II} {2.47}, H^I_{2b-I} {2.44}), 2.37 (dd, 1H, ³J_{H2a,H3} = 6.4 Hz, ²J_{H2a,H2b} = 15.4 Hz, H^{II}_{2a-I}), 2.27 (dd, 1H, ³J_{H2b,H3} = 4.6 Hz, ²J_{H2b,H2a} = 15.4 Hz, H^{II}_{2b-I}), 1.90 (s, 2H, NH₂-GlcN^{II}), 1.72 – 1.39 (m, 6H, H^I_{4-I}, H^I_{4-II}, H^{II}₄), 1.41 – 1.15 (m, 54H, 3 x (CH₂)₉), 1.03 (s, 9H, CH₃-^tBu), 0.90 (t_p, 9H, ³J_{H14,H13} ≈ 6.8 Hz, H^I_{14-I}, H^I_{14-II}, H^{II}₁₄).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δppm] = 172.40 (C^I_{1-I}), 171.25 (C^{II}_{1-I}), 170.97 (C^I_{1-II}), 150.65, 150.51, 138.48, 138.29, 138.23, 138.11 (6 x C_{ipso}-Ph), 136.06, 135.95 (C_{o,m,p}-Ph), 133.25, 133.05 (2 x C_{ipso}-Ph), 130.02, 129.96, 129.92, 128.60, 128.48, 128.46, 128.44, 128.01, 127.82, 127.80, 127.78, 127.66, 127.56, 125.66, 125.64, 120.33, 120.30, 120.28 (C_{o,m,p}-Ph), 104.21 (C1-GlcN^{II}), 96.55 (C1-GlcN^I), 76.04 (C^{II}_{3-I}), 75.91 (C^I_{3-II}), 75.85 (C^I_{3-I}), 75.79 (C3-GlcN^I), 74.26 (C4-GlcN^{II}), 75.02 (C3-GlcN^{II}), 74.53 (C5-GlcN^I), 74.13 (C5-GlcN^{II}), 73.61 (CH₂-Bn), 71.19, 70.88, 70.83 (3 x CH₂-Bn), 69.91 (C6-GlcN^I), 69.80 (C4-GlcN^I), 68.54 (C6-GlcN^{II}), 56.50 (C2-GlcN^{II}), 54.97 (C2-GlcN^I), 41.11 (C^{II}_{2-I}), 39.89 (C^I_{2-I}), 39.16 (C^I_{2-II}), 34.29, 34.16, 33.83 (C^I_{4-I}, C^I_{4-II}, C^{II}_{4-I}), 32.07 (3 x C12), 29.82, 29.79, 29.75, 29.52, 27.05 (3 x C6 – C11), 26.84 (CH₃-^tBu), 25.43, 25.40, 25.27 (C^I_{5-I}, C^I_{5-II}, C^{II}_{5-I}), 22.84 (3 x C13), 19.20 (C-^tBu), 14.28 (3 x C14).

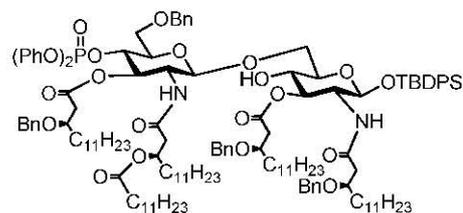
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1873.18 ([M+Na]⁺, ber.: 1873.06).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1850.0695 ([M+Na]⁺, ber.: 1850.0704).

C₁₁₀H₁₅₃N₂O₁₈PSi (1850.45)

***tert*-Butyldiphenylsilyl-6-*O*-[4-(diphenylphosphoryl)-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-((*R*)-3-(dodecanoyl)oxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosid (**129**)**

(β -6-(β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((*R*)-3-(dodecanoyl)oxytetradecanoyl))-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-OTBDPS)



Zu einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus 400 mg (0.94 mmol, 1.00 Äquiv.) (*R*)-3-(Dodecanoyloxy)tetradecansäure (**91**) in 12 ml absol. Dichlormethan wird unter Argon 0.40 ml Oxalylchlorid (595 mg, 4.69 mmol, 4.99 Äquiv.) durch eine Spritze zugetropft. Anschließend werden drei Tropfen *N,N*-Dimethylformamid hinzugegeben und die Lösung 1 h bei Raumtemp. gerührt. Nach 1 h wird der Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Sollte die Reaktion nicht vollständig sein, wird max. eine weitere Stunde gerührt und ein Tropfen *N,N*-Dimethylformamid hinzugegeben. Danach wird mit 50 ml Toluol verdünnt und überschüssiges Oxalylchlorid sowie die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert.

Ausbeute: 417 mg (quant.); farbloses Öl, $R_f = 0.34$ (°Hex/EtOAc, 3:1).

Zu einer Lösung von 921 mg (0.498 mmol) β -6-(β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH₂)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-OTBDPS (**127**) und 322 mg (2.49 mmol, 5.00 Äquiv.) *N*-Ethyl-diisopropylamin in 15 ml absol. Dichlormethan wird unter Argon bei Raumtemp. 332 mg (0.747 mmol, 1.5 Äquiv.) des hergestellten Carbonsäurechlorids **128**, gelöst in 8 ml absol. Dichlormethan, auf einmal hinzugegeben und die Lösung 18 h bei Raumtemp. gerührt. Danach werden die Lösungsmittel zunächst i. Vak., anschließend i. Hochvak. entfernt. Der Rückstand (1.35 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 4.0 cm im Laufmittelgemisch °Hex/EtOAc, 10:1 → 8:1 → 5:1).

Ausbeute: 832 mg (0.368 mmol, 74 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = -4.2$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.86$ (Chloroform/Aceton, 9:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.72 – 7.63 (m, 4H, H_{Ar}-Ph), 7.42 – 7.20 (m, 30H, H_{Ar}-Ph), 7.20 – 7.10 (m, 6H, H_{Ar}-Ph), 5.98 (d, 1H, ³ $J_{NH,H2} = 9.6$ Hz, NH-GlcN^I), 5.52 (d, 1H, ³ $J_{NH,H2} = 7.4$ Hz, NH-GlcN^{II}), 5.45 (dd, 1H, ³ $J_{H3,H2} = 10.6$ Hz, ³ $J_{H3,H4} = 8.9$ Hz, H3-GlcN^{II}), 5.04 – 4.93 (m, 1H, H_{3-II}^{II} {4.98}), 4.89 (d, 1H, ³ $J_{H1,H2} = 8.2$ Hz, H1-GlcN^{II}), 4.79 – 4.66 (m, 2H, H3-GlcN^I {4.74}, H4-GlcN^{II} {4.72}), 4.53 (d, 1H,

$^2J_{\text{CH}_{2a},\text{CH}_{2b}} = 11.6$ Hz, $\text{CH}_{2a}\text{-Bn}$), 4.46 – 4.36 (m, 7H, 2 x $\text{CH}_{2a}\text{-Bn}$ {4.45}, $\text{CH}_2\text{-Bn-6-O-GlcN}$ {4.43}, $\text{H1-GlcN}^{\text{I}}$ {4.38}, 2 x $\text{CH}_{2b}\text{-Bn}$ {4.40}), 4.34 (d, 1H, $^2J_{\text{CH}_{2b},\text{CH}_{2a}} = 11.6$ Hz, $\text{CH}_{2a}\text{-Bn}$), 4.16 (ddd, $^3J_{\text{H}_{2,\text{H}3}} \approx 10.4$ Hz, $^3J_{\text{H}_{2,\text{NH}}} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{H}_{2,\text{H}1}} = 8.1$ Hz, $\text{H2-GlcN}^{\text{I}}$), 3.89 – 3.78 (m, 2H, $\text{H6}_a\text{-GlcN}^{\text{I}}$ {3.86}, $\text{H}_{3\text{-I}}^{\text{I}}$ {3.83}), 3.77 – 3.48 (m, 7H, $\text{H}_{3\text{-II}}^{\text{I}}$ {3.73}, $\text{H}_{3\text{-I}}^{\text{II}}$ {3.69}, $\text{H6}_b\text{-GlcN}^{\text{I}}$ {3.64}, $\text{H6}_a\text{-GlcN}^{\text{II}}$ {3.64}, $\text{H5-GlcN}^{\text{II}}$ {3.57}, $\text{H4-GlcN}^{\text{I}}$ {3.56}, $\text{H6}_b\text{-GlcN}^{\text{II}}$ {3.55}), 3.26 (dt, $^3J_{\text{H}_{2,\text{H}3}} = 10.6$ Hz, $^3J_{\text{H}_{2,\text{NH}}} \approx ^3J_{\text{H}_{2,\text{H}1}} \approx 7.8$ Hz, $\text{H2-GlcN}^{\text{II}}$), 3.10 – 3.01 (m, 1H, $\text{H5-GlcN}^{\text{I}}$ {3.05}), 2.61 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_{2a},\text{H}3} = 7.3$ Hz, $^2J_{\text{H}_{2a},\text{H}2b} = 15.3$ Hz, $\text{H}_{2a\text{-I}}^{\text{I}}$), 2.48 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_{2a},\text{H}3} = 5.7$ Hz, $^2J_{\text{H}_{2a},\text{H}2b} = 15.3$ Hz, $\text{H}_{2a\text{-II}}^{\text{I}}$), 2.43 – 2.31 (m, 3H, $\text{H}_{2b\text{-I}}^{\text{I}}$ {2.41}, $\text{H}_{2b\text{-II}}^{\text{I}}$ {2.38}, $\text{H}_{2a\text{-I}}^{\text{II}}$ {2.37}), 2.31 – 2.18 (m, 3H, $\text{CH}_{16\text{ab-II}}^{\text{II}}$ {2.28}, $\text{H}_{2b\text{-I}}^{\text{II}}$ {2.23}), 2.08 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_{2a},\text{H}3} = 7.6$ Hz, $^2J_{\text{H}_{2a},\text{H}2b} = 14.9$ Hz, $\text{H}_{2a\text{-II}}^{\text{II}}$), 1.99 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_{2b},\text{H}3} = 5.1$ Hz, $^2J_{\text{H}_{2b},\text{H}2a} = 14.9$ Hz, $\text{H}_{2b\text{-II}}^{\text{II}}$), 1.65 – 1.37 (m, 10H, $\text{H}_{4\text{-I}}^{\text{I}}$, $\text{H}_{4\text{-II}}^{\text{I}}$, $\text{H}_{4\text{-I}}^{\text{II}}$, $\text{H}_{4\text{-II}}^{\text{II}}$, $\text{H}_{17\text{-II}}^{\text{II}}\text{-CO}_2$ {1.57}), 1.36 – 1.13 (m, 90H, 5 x $(\text{CH}_2)_9$), 1.02 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$), 0.88 (m, 15H, $\text{H}_{14\text{-I}}^{\text{I}}$, $\text{H}_{14\text{-II}}^{\text{I}}$, $\text{H}_{14\text{-I}}^{\text{II}}$, $\text{H}_{14\text{-II}}^{\text{II}}$, $\text{H}_{26\text{-II}}^{\text{II}}$).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR [BB, HMQC] (CDCl_3): [δ/ppm] = 174.02 ($\text{C}_{15\text{-II}}^{\text{II}}$), 172.14 ($\text{C}_{1\text{-I}}^{\text{I}}$), 170.95 ($\text{C}_{1\text{-I}}^{\text{II}}$), 170.79 ($\text{C}_{1\text{-II}}^{\text{I}}$), 170.60 ($\text{C}_{1\text{-II}}^{\text{II}}$), 150.65, 150.51, 138.56, 138.40, 138.34, 138.14 (6 x $\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$), 136.21, 135.97 ($\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$), 133.36, 133.07 (2 x $\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$), 129.97, 129.95, 129.93, 128.75, 128.54, 128.43, 128.23, 127.95, 127.83, 127.79, 127.72, 127.66, 127.63, 125.63, 120.34, 120.32, 120.29, 120.27 ($\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$), 100.26 ($\text{C1-GlcN}^{\text{II}}$), 96.62 ($\text{C1-GlcN}^{\text{I}}$), 75.92 ($\text{C}_{3\text{-I}}^{\text{II}}$), 75.80 ($\text{C}_{3\text{-II}}^{\text{I}}$), 75.73 ($\text{C}_{3\text{-I}}^{\text{I}}$), 75.53 ($\text{C3-GlcN}^{\text{I}}$), 75.03 ($\text{C5-GlcN}^{\text{I}}$), 74.82 ($\text{C4-GlcN}^{\text{II}}$), 73.79 ($\text{C5-GlcN}^{\text{II}}$), 73.58 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$), 72.19 ($\text{C3-GlcN}^{\text{II}}$), 71.38, 71.09, 70.80 (3 x $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 70.68 ($\text{C}_{3\text{-II}}^{\text{II}}$), 68.80 ($\text{C4-GlcN}^{\text{I}}$), 68.48, 68.44 ($\text{C6-GlcN}^{\text{I}}$, $\text{C6-GlcN}^{\text{II}}$), 56.46 ($\text{C2-GlcN}^{\text{II}}$), 55.29 ($\text{C2-GlcN}^{\text{I}}$), 41.54 ($\text{C}_{2\text{-II}}^{\text{II}}$), 41.29 ($\text{C}_{2\text{-I}}^{\text{II}}$), 39.90 ($\text{C}_{2\text{-I}}^{\text{I}}$), 38.71 ($\text{C}_{2\text{-II}}^{\text{I}}$), 34.60 ($\text{CH}_{16\text{-II}}^{\text{II}}$), 34.60, 34.59, 34.06, 33.99 ($\text{C}_{4\text{-I}}^{\text{I}}$, $\text{C}_{4\text{-II}}^{\text{I}}$, $\text{C}_{4\text{-I}}^{\text{II}}$, $\text{C}_{4\text{-II}}^{\text{II}}$), 32.09 (4 x $\text{C12} + \text{C24}$), 30.31, 29.88, 29.85, 29.82, 29.79, 27.76, 29.56, 29.53, 29.41 (4 x $\text{C6} - \text{C11} + \text{C18} - \text{C23}$), 26.92 ($\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$), 25.51, 25.43, 25.37, 25.31 ($\text{C}_{5\text{-I}}^{\text{I}}$, $\text{C}_{5\text{-II}}^{\text{I}}$, $\text{C}_{5\text{-I}}^{\text{II}}$, $\text{C}_{5\text{-II}}^{\text{II}}$), 25.14 ($\text{C}_{17\text{-II}}^{\text{II}}$), 22.85 (4 x $\text{C13} + \text{C25}$), 19.28 ($\text{C-}^t\text{Bu}$), 14.27 (4 x $\text{C14} + \text{C26}$).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 2281.38 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2281.42).

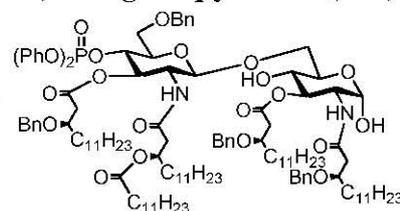
HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 2280.4126 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2280.4126).

$\text{C}_{136}\text{H}_{202}\text{N}_2\text{O}_{21}\text{PSi}$ (2259.11)

6-O-[4-(Diphenylphosphoryl)-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-2-((R)-3-(dodecanoyl)oxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosyl]-3-O-((R)-3-benzyloxy-tetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-benzyloxytetradecanoylamino)-α-D-glucopyranose (130)

(α-6-(β-4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-

GlcNH-((R)-3-(dodecanoyloxy)tetradecanoyl))-3-((R)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-OH)



Eine Lösung von 712 mg (0.315 mmol) β-6-(β-4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((R)-3-(dodecanoyloxy)tetradecanoyl))-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-OTBDPS (**129**) und 63 mg (1.04 mmol, 3.30 Äquiv.) Eisessig in 62 ml trockenem Tetrahydrofuran wird 15 min auf 10 °C vorgekühlt. Anschließend wird innerhalb von 15 min 0.410 ml (0.41 mmol, 1.30 Äquiv.) einer 1.0 M Lösung von Tetra-*n*-butylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran hinzuge tropft. Es wird 1 h bei 10 °C gerührt und anschließend auf Raumtemp. erwärmt. Nach 12 h werden 0.20 Äquiv. und nach 15 h nochmals 0.10 Äquiv. an Tetra-*n*-butylammoniumfluorid zur Vervollständigung der Reaktion hinzugegeben. Nach insgesamt 18 h wird mit 250 ml Dichlormethan verdünnt und die Lösung nacheinander mit 50 ml einer 5%igen Zitronensäure-Lösung, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden dreimal mit 25 ml Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Das Rohprodukt (840 mg) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 2.5 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 2:1 → 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 432 mg (0.214 mmol, 68 %); farbloses Wachs, $[\alpha]_D^{24} = +10.5$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.62$ (^cHex/EtOAc, 1:1), $R_f = 0.20$ (^cHex/EtOAc, 2:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.38 – 7.21 (m, 24H, H_{Ar}-Ph), 7.20 – 7.05 (m, 6H, H_{Ar}-Ph), 6.27 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 9.5 Hz, NH-GlcN^I), 5.74 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 7.4 Hz, NH-GlcN^{II}), 5.56 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.6 Hz, ³J_{H3,H4} = 9.0 Hz, H3-GlcN^{II}), 5.36 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 8.2 Hz, H1-GlcN^{II}), 5.13 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.7 Hz, ³J_{H3,H4} = 9.0 Hz, H3-GlcN^I), 5.09 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 3.5 Hz, H1-GlcN^I), 5.03 – 4.95 (m, 1H, H_{3-II}^{II} {4.99}), 4.72 (q, 1H, ³J_{H4,H3} = 9.1 Hz, ³J_{H4,H5} = 9.1 Hz, H4-GlcN^{II}), 4.54 – 4.35 (m, 8H, 3 x CH_{2a}-Bn {4.50}, O-CH₂Bn {4.42}, 3 x CH_{2b}-Bn {4.38}), 4.19 (ddd, 1H, ³J_{H2,H3} = 10.7 Hz, ³J_{H2,NH} = 9.5 Hz, ³J_{H2,H1} = 3.5 Hz, H2-GlcN^I), 4.00 – 3.90 (m, 2H, H_{6a}-GlcN^I {3.96}, H5-GlcN^I {3.95}), 3.87 – 3.68 (m, 5H, H_{3-I}^I {3.85}, H_{3-I}^{II} {3.81}, H_{6b}-GlcN^I {3.73}, H_{3-II}^I {3.72}, H5-GlcN^{II} {3.71}), 3.64 (dd, 1H, ³J_{H6a,H5} = 2.0 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 11.1 Hz, H_{6a}-GlcN^{II}), 3.56 (dd, 1H, ³J_{H6b,H5} = 5.0 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 11.1 Hz, H_{6b}-GlcN^{II}), 3.37 (t, 1H, ³J_{H4,H3} ≈ ³J_{H4,H5} ≈ 9.5 Hz, H4-GlcN^I), 3.25 (dt, ³J_{H2,H3} = 10.6 Hz, ³J_{H2,H1} ≈ ³J_{H2,NH} 7.8 Hz, H2-GlcN^{II}), 2.62 (dd, 1H,

$^3J_{\text{H}_{2a},\text{H}_3} = 7.6$ Hz, $^2J_{\text{H}_{2a},\text{H}_{2b}} = 14.9$ Hz, H_{2a-I}^I , 2.50 – 2.48 (m, 2H, H_{2a-II}^I {2.46}, H_{2b-I}^I {2.44}), 2.37 – 2.24 (m, 5H, H_{2b-II}^I {2.33}, H_{2ab-I}^{II} {3.32}, H_{16-II}^{II} {2.29}), 2.21 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_{2a},\text{H}_3} = 7.8$ Hz, $^2J_{\text{H}_{2a},\text{H}_{2b}} = 14.9$ Hz, H_{2a-II}^{II}), 2.09 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_{2b},\text{H}_3} = 4.9$ Hz, $^2J_{\text{H}_{2b},\text{H}_{2a}} = 14.9$ Hz, H_{2b-II}^{II}), 1.65 – 1.38 (m, 10H, H_{17-II}^{II} {1.56}, H_{4-I}^I , H_{4-II}^I , H_{4-I}^{II} , H_{4-II}^{II}), 1.36 – 1.13 (m, 88H, $(\text{CH}_2)_{44}$), 0.88 (m, 15H, H_{14-I}^I , H_{14-II}^I , H_{14-I}^{II} , H_{14-II}^{II} , H_{26-II}^{II}).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR [BB, HMQC] (CDCl_3): [δ/ppm] = 174.29 (C_{15-II}^{II}), 172.64 (C_{1-I}^I), 171.26 (C_{1-I}^{II}), 170.67 (C_{1-II}^I), 170.66 (C_{1-II}^{II}), 150.47, 150.30, 138.46, 138.27, 138.12, 137.80 (6 x $\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$), 129.80, 129.78, 128.49, 128.45, 128.34, 128.32, 128.30, 128.28, 128.02, 127.85, 127.82, 127.74, 127.71, 127.66, 127.63, 127.61, 127.55, 125.51, 125.46, 120.19, 120.15, 120.13, 120.08 ($\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$), 99.19 (C1-GlcN^{II}), 91.58 (C1-GlcN^I), 76.49 (C_{3-I}^{II}), 75.74 (C_{3-I}^I), 75.51 (C_{3-II}^I), 74.97 (C4-GlcN^{II}), 74.48 (C3-GlcN^I), 73.88 (C5-GlcN^{II}), 73.46 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$), 71.89 (C5-GlcN^I), 71.82 (C3-GlcN^{II}), 71.51, 70.91, 70.76 (3 x $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 70.70 (C_{3-II}^{II}), 69.33 (C4-GlcN^I), 68.27 (C6-GlcN^{II}), 67.57 (C6-GlcN^I), 56.40 (C2-GlcN^{II}), 51.61 (C2-GlcN^I), 41.86 (C_{2-I}^{II}), 41.60 (C_{2-II}^{II}), 39.75 (C_{2-I}^I), 38.46 (C_{2-II}^I), 34.43 (C_{16-II}^{II}), 34.41, 34.12, 33.92 (C_{4-I}^I , C_{4-II}^I , C_{4-I}^{II} , C_{4-II}^{II}), 31.92 (4 x $\text{C12} + \text{C24}$), 29.72, 29.68, 29.65, 29.62, 29.60, 29.59, 29.53, 29.46, 29.40, 29.39, 29.36, 29.23 (4 x $\text{C6} - \text{C11} + \text{C18} - \text{C23}$), 25.36, 25.18, 25.12 (C_{5-I}^I , C_{5-II}^I , C_{5-I}^{II} , C_{5-II}^{II}), 24.94 (C_{17-II}^{II}), 22.69 (4 x $\text{C13} + \text{C25}$), 14.12 (4 x $\text{C14} + \text{C26}$).

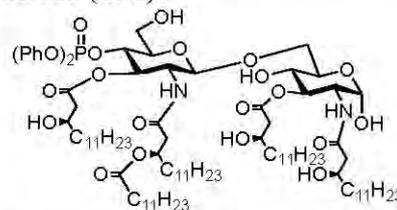
ESI-MS (positiv): [m/z] = 2043.30 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2043.30).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 2042.2925 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2042.2949).

$\text{C}_{120}\text{H}_{184}\text{N}_2\text{O}_{21}\text{P}$ (2020.71)

6-O-[4-(Diphenylphosphoryl)-3-O-((R)-3-hydroxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-(dodecanoyl)oxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-O-((R)-3-hydroxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-hydroxytetradecanoylamino)- α -D-glucopyranose (131)

(α -6-(β -4-((PhO) $_2$ PO)-3-((R)-3-(OH)tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(dodecanoyloxy)tetradecanoyl))-3-((R)-3-(OH)-tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(OH)tetradecanoyl)-OH)



229 mg (113.33 μmol) α -6-(β -4-((PhO) $_2$ PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((R)-3-(dodecanoyl)oxytetradecanoyl))-3-((R)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-OH (**130**) werden in einer Mischung aus 4.5 ml Essigsäure und 40.0 ml

Tetrahydrofuran gelöst und mit 230 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle versetzt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird 18 h bei Raumtemp. unter 3 bar Wasserstoffatmosphäre gerührt. Danach wird die Wasserstoffatmosphäre gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über eine Kartusche mit C18-Säulenmaterial filtriert. Man spült die kleine Säule mehrmals mit reinem Ethylacetat und befreit das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln. Der Rückstand wird einige Male mit Toluol kodestilliert und ohne Reinigung und Charakterisierung der nachfolgenden Reaktion unterworfen.

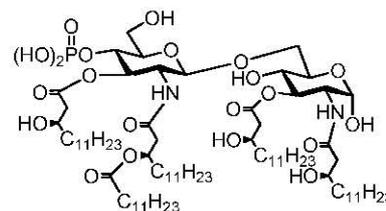
Ausbeute: 185 mg (111.4 μmol , 93 %); farbloses Wachs.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1683.28$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1683.11).

$C_{92}H_{159}N_2O_{21}P$ (1660.22)

6-O-[4-O-Phosphoryl-3-O-((R)-3-hydroxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-(dodecanoyl)-oxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-O-((R)-3-hydroxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-hydroxytetradecanoylamino)- α -D-glucopyranose (132)

(α -6-(β -4-((HO)₂PO)-3-((R)-3-(OH)-tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(dodecanoyloxy)tetradecanoyl))-3-((R)-3-(OH)-tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(OH)-tetradecanoyl)-OH



185 mg (111.4 μmol) rohes α -6-(β -4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(OH)tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(dodecanoyl)oxytetradecanoyl)-3-((R)-3-(OH)-tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(OH)tetradecanoyl)-OH (**131**) werden in einer Mischung aus 4.5 ml Essigsäure und 40.0 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 90 mg Platin(IV)-oxid versetzt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird 18 h bei Raumtemp. unter 5 bar Wasserstoffatmosphäre gerührt. Danach wird die Wasserstoffatmosphäre gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über einen Spritzenfilter filtriert. Der Filter mit dem elementaren Platin wird danach mit einer Mischung aus 42 ml Chloroform, 6 ml Methanol, 0.5 ml Triethylamin und 0.5 ml Wasser gespült. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt. Das Filtrat wird i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit und der Rückstand wird einige Male mit Toluol kodestilliert. Der Rückstand (225 mg) wird anschließend in 150 ml Chloroform aufgenommen und mit 30 ml 0.1 M Salzsäure und zweimal mit 30 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel i. Vak. befreit. Der Rückstand (184 mg) wird anschließend durch fraktionierte Fällung (in wenigen ml Chloroform aufnehmen, Fällung mit Dioxan unter Eiskühlung)

gereinigt. Der Niederschlag wird anschließend in einer Zentrifuge (Bedingungen: 4000/min, 10 °C, 10 min) konzentriert. Die Mutterlauge wird abpipettiert und der Bodensatz gesammelt. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt bis kein Produkt mehr isoliert werden kann. Das Produkt wird in Dioxan suspendiert und an der Gefriertrocknung lyophilisiert. Eine Reinigung mittels Flashchromatographie war nicht möglich.

Ausbeute: 134 mg (89 μ mol, 80 %); farbloses Lyophilisat.

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃, CD₃OD, D₂O): [δ/ppm] = 5.27 – 4.96 (m, 3H, H1-GlcN^I {5.13}, H3-GlcN^{II} {5.05}, H_{3-II}^{II} {4.98}), 4.65 – 4.46 (m, 1H, H1-GlcN^{II} {4.54}), 4.19 – 3.35 (m, 14H, H2-GlcN^{II} {3.97}, H5-GlcN^{II} {3.93}, H_{3-I}^I {3.92}, H6_a-GlcN^{II} {3.89}, H2-GlcN^I {3.86}, H_{3-II}^I {3.86}, H6_b-GlcN^{II} {3.80}, H_{3-I}^{II} {3.78}, H6_{ab}-GlcN^I {3.57}, H4-GlcN^{II} {3.38}, H3-GlcN^I, H4-GlcN^I, H5-GlcN^I), 2.54 – 2.13 (m, 10H, H_{2a-II}^{II} {2.42}, H_{2a-I}^I {2.36}, H_{2b-I}^I {2.31}, H_{2b-II}^{II} {2.27}, H_{2a-II}^I {2.27}, CH_{2-II}^{II}-CO {2.21}, H_{2b-II}^I {2.20}, H_{2ab-I}^I {2.13}), 1.53 – 1.32 (m, 10H, CH_{17-II}^{II}-CO₂ {1.47}, H_{4-I}^I, H_{4-II}^I, H_{4-I}^{II}, H_{4-II}^{II}), 1.30 – 0.87 (m, 88H, (CH₂)₄₄), 0.81 (m_c, 15H, H_{14-I}^I, H_{14-II}^I, H_{14-I}^{II}, H_{14-II}^{II}, H_{26-II}^{II}).

162.05 MHz-³¹P-NMR [³¹P] (CDCl₃, CD₃OD, D₂O): [δ/ppm] = 0.82 ((HO)₂P(O)-O).

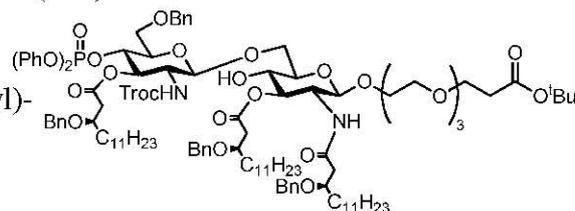
ESI-MS (negativ): [m/z] = 1506.99 ([M-H]⁻, ber.: 1507.02).

C₈₀H₁₅₁N₂O₂₁P (1508.03)

5.9.2.3.2 Die Synthese zum [6-O-[4-(diphenylphosphoryl)-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-2-((R)-3-(dodecanoyl)oxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure

[6-O-[4-(diphenylphosphoryl)-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (133)

(β -6-(β -4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-O-Spa-^tBu)



Eine Lösung aus 489 mg (463.0 μ mol, 1.20 Äquiv.) α -4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc-Br (**104**), 128 mg (463.0 μ mol, 1.20 Äquiv.) Silbercarbonat,

414 mg (386.0 μmol , 1.00 Äquiv.) β -3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH((*R*)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-O-Spa-^tBu (**125**) und 1.0 g gepulvertem Molekularsieb (4 Å) in 21 ml absol. Dichlormethan wird 1 h bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf 0 °C abgekühlt und unter Lichtausschluss werden 297 mg (1.16 mmol, 3.00 Äquiv.) Silbertrifluormethansulfonat hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemp. erwärmt und 72 h gerührt. Danach wird mit *N*-Ethyl-diisopropylamin neutralisiert, mit 200 ml Dichlormethan verdünnt, das Molekularsieb über Hyflo[®] abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird jeweils zweimal mit 100 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 50 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert. Das Rohprodukt (1.02 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 35.0 cm, Durchmesser = 4.4 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 513 mg (251 μmol , 65 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = -8.4$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.81$ (^cHex/EtOAc, 1:2), $R_f = 0.21$ (^cHex/EtOAc, 1:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 7.38 - 7.21$ (m, 24H, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$), 7.20 – 7.09 (m, 6H, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$), 6.72 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,H2}} = 9.3$ Hz, $\text{NH-GlcN}^{\text{I}}$), 5.50 (dd, 1H, $^3J_{\text{H3,H2}} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H3,H4}} = 9.0$ Hz, $\text{H3-GlcN}^{\text{II}}$), 5.33 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,H2}} = 8.0$ Hz, $\text{NH-GlcN}^{\text{II}}$), 4.95 – 4.85 (m, 2H, $\text{H3-GlcN}^{\text{I}}$ {4.90}, $\text{H1-GlcN}^{\text{II}}$ {4.89}), 4.77 (q, 1H, $^3J_{\text{H4,H3}} = ^3J_{\text{H4,H5}} = 9.2$ Hz, $\text{H4-GlcN}^{\text{II}}$), 4.65 (d, 1H, $^2J_{\text{CH2a,CH2b}} = 12.0$ Hz, CH2a-Troc), 4.56 – 4.30 (m, 10H, CH2b-Troc {4.54}, $\text{H1-GlcN}^{\text{I}}$ {4.54}, 3 x CH2a-Bn {3.52}, $\text{Bn-CH}_2\text{-O}$ {4.43}, 3 x CH2b {4.35}), 4.08 (dd, 1H, $^3J_{\text{H6a,H5}} = 3.2$ Hz, $^2J_{\text{H6a,H6b}} = 12.1$ Hz, $\text{H6a-GlcN}^{\text{I}}$), 4.02 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H2,H3}} \approx ^3J_{\text{H2,NH}} \approx ^3J_{\text{H2,H1}} \approx 9.3$ Hz, $\text{H2-GlcN}^{\text{I}}$), 3.94 – 3.81 (m, 2H, $\text{H}_{3-\text{II}}^{\text{I}}$ {3.90}, $\text{H}_{3-\text{I}}^{\text{I}}$ {3.87}), 3.79 – 3.61 (m, 14H, $\text{H6b-GlcN}^{\text{I}}$ {3.77}, $\text{H5-GlcN}^{\text{II}}$ {3.70}, H3-Spa {3.70}, $\text{H}_{3-\text{I}}^{\text{II}}$ {3.70}, $\text{CH}_2\text{-Spa}$ {3.70}, $\text{CH}_2\text{-Spa}$ {3.69}, $\text{CH}_2\text{-Spa}$ {3.65}, $\text{H6a-GlcN}^{\text{II}}$ {3.65}, $\text{CH}_2\text{-Spa}$ {3.64}), 3.60 – 3.47 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{-Spa}$ {3.59}, $\text{H6b-GlcN}^{\text{II}}$ {3.58}, $\text{H4-GlcN}^{\text{I}}$ {3.51}, $\text{H5-GlcN}^{\text{I}}$ {3.43}), 3.46 – 3.34 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-Spa}$ {3.40}, $\text{H2-GlcN}^{\text{II}}$ {3.38}), 2.98 (s, 1H, $\text{OH-GlcN}^{\text{I}}$), 2.65 (dd, 1H, $^3J_{\text{H2a,H3}} = 7.7$ Hz, $^2J_{\text{H2a,H2b}} = 15.1$ Hz, $\text{H}_{2a-\text{I}}^{\text{I}}$), 2.52 – 2.37 (m, 6H, H2-Spa {2.49}, $\text{H}_{2b-\text{I}}^{\text{I}}$ {2.45}, $\text{H}_{2ab-\text{I}}^{\text{II}}$ {2.44}, $\text{H}_{2a-\text{II}}^{\text{I}}$ {2.41}), 2.26 (dd 1H, $^3J_{\text{H2b,H3}} = 4.2$ Hz, $^2J_{\text{H2b,H2a}} = 14.8$ Hz, $\text{H}_{2b-\text{II}}^{\text{I}}$), 1.66 – 1.45 (m, 4H, $\text{H}_{4-\text{I}}^{\text{I}}$, $\text{H}_{4-\text{II}}^{\text{I}}$), 1.45 (s, 11H, $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$, $\text{H}_{4-\text{I}}^{\text{II}}$), 1.39 – 1.10 (m, 54H, 3 x $(\text{CH}_2)_9$), 0.89 (t_p, 9H, $^3J_{\text{H14,H13}} \approx 6.8$ Hz, $\text{H}_{14-\text{I}}^{\text{I}}$, $\text{H}_{14-\text{II}}^{\text{I}}$, $\text{H}_{14}^{\text{II}}$).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 172.14$ (C=O-^tBu), 171.48 ($\text{C}_{1-\text{I}}^{\text{I}}$), 171.19 ($\text{C}_{1-\text{II}}^{\text{II}}$), 171.06 ($\text{C}_{1-\text{II}}^{\text{I}}$), 154.22 (C=O-Troc), 150.54, 150.39, 138.85, 138.45, 138.36, 137.93 (6 x $\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$), 129.95, 129.90, 128.54, 128.48, 128.41, 128.38, 128.21, 128.08, 127.94, 127.91, 127.77, 127.71, 127.67, 127.55, 125.65, 120.29, 120.24, 120.19 ($\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$),

101.94 (C1-GlcN^I), 100.72 (C1-GlcN^{II}), 95.41 (CCl₃), 80.66 (C-^tBu), 76.50 (C_{3-II}^I), 75.32 (C3-GlcN^I), 75.89 (C_{3-I}^I), 75.46 (C_{3-I}^{II}), 74.84 (C4-GlcN^{II}), 74.77 (C5-GlcN^I), 74.51 (CH₂-Troc), 74.06 (C5-GlcN^{II}), 73.56 (Bn-CH₂-O), 72.09 (C3-GlcN^{II}), 71.70 (CH₂-Bn), 71.18 (CH₂-Spa), 71.06, 70.95 (2 x CH₂-Bn), 70.79, 70.68, 70.40, 70.31 (4 x CH₂-Spa), 69.60 (C4-GlcN^I), 68.98 (C6-GlcN^I), 68.55 (C6-GlcN^{II}), 68.18 (CH₂-Spa), 66.86 (C3-Spa), 56.72 (C2-GlcN^{II}), 53.51 (C2-GlcN^I), 41.82 (C_{2-II}^I), 39.81 (C_{2-I}^I), 38.70 (C_{2-I}^{II}), 36.34 (C2-Spa), 34.50, 34.24, 34.20 (C_{4-I}^I, C_{4-II}^I, C_{4-I}^{II}), 32.02 (3 x C12), 29.89, 29.81, 29.77, 29.75, 27.69, 29.47 (3 x C6 – C11), 28.20 (CH₃-^tBu), 25.37, 25.20 (C_{5-I}^I, C_{5-II}^I, C_{5-I}^{II}), 22.80 (3 x C13), 14.25 (C_{14-I}^I, C_{14-II}^I, C_{14-I}^{II}).

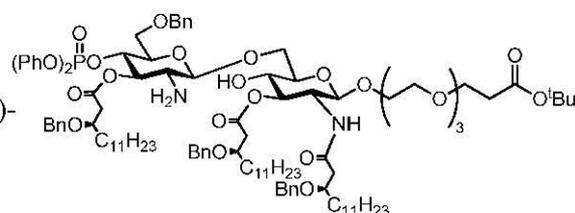
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2069.00$ ($[M+Na]^+$, ber.: 2069.00).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2068.0051$ ($[M+Na]^+$, ber.: 2068.0011).

C₁₁₀H₁₆₀Cl₃N₂O₂₅P (2047.78)

[6-O-[4-(diphenylphosphoryl)-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-2-amino-β-D-glucopyranosyl]-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-benzyloxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (134)

(β-6-(β-4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH₂)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(BnO)-tetradecanoyl)-O-Spa-^tBu)



Eine Lösung von 1.03 g (504 μmol) β-6-(β-4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNTroc)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-O-Spa-^tBu (**133**) in 20 ml Essigsäure wird mit etwa 660 mg (10.10 mmol) Zinkstaub versetzt, welches zuvor durch Aufschlännen in 2 M Salzsäure aktiviert, mit Wasser sowie Ethanol gewaschen und mit Diethylether getrocknet wurde. Die Reaktionsmischung wird 4 h bei 60 °C gerührt, über Hyflo[®] filtriert und der Filterkuchen mit Essigsäure nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Hochvak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand dreimal mit Toluol kodestilliert. Der Rückstand (1.14 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 4.4 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 3:1 → 2:1 → 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 908.0 mg (484.9 μmol, 96 %); farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = -15.9$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.20$ (^cHex/EtOAc, 1:2), $R_f = 0.09$ (^cHex/EtOAc, 1:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.37 – 7.20 (m, 24H, H_{Ar}-Ph), 7.20 – 7.08 (m, 6H, H_{Ar}-Ph), 6.71 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 9.2 Hz, NH-GlcN^I), 5.15 (t_p, 1H, ³J_{H3,H2} = ³J_{H3,H4} = 9.6 Hz, H3-GlcN^{II}), 4.91 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.5 Hz, ³J_{H3,H4} = 9.0 Hz, H3-GlcN^I), 4.69 (q, 1H, ³J_{H4,H3} = ³J_{H4,H5} = 9.2 Hz, H4-GlcN^{II}), 4.55 – 4.29 (m, 10H, H1-GlcN^I {4.53, d, 1H, ³J_{H1,H2} ≈ 7.4 Hz}, 3 x CH_{2a} {4.51}, 3 x CH_{2b} {4.44}, Bn-CH₂-O {4.41}, H1-GlcN^{II} {4.31}), 4.11 (dd, 1H, ³J_{H6a,H5} = 2.9 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 11.4 Hz, H6_a-GlcN^I), 4.04 (dt, 1H, ³J_{H2,H3} = 10.5 Hz, ³J_{H2,NH} ≈ ³J_{H2,H1} ≈ 8.9 Hz, H2-GlcN^I), 3.92 – 3.81 (m, 2H, H^I_{3-II} {3.90}, H^I_{3-I} {3.86}), 3.81 – 3.72 (m, 2H, H^{II}_{3-I} {3.78}, H6_b-GlcN^I {3.78}), 3.72 – 3.51 (m, 15H, H3-Spa {3.69}, CH₂-Spa {3.68}, H5-GlcN^{II} {3.66}, CH₂-Spa {3.64}, CH₂-Spa {3.62}, CH₂-Spa {3.59}, H6_a-GlcN^{II} {3.58}, H4-GlcN^I {3.56}, CH₂-Spa {3.56}), 3.51 – 3.42 (m, 2H, H6_b-GlcN^{II} {3.48}, H5-GlcN^I {3.47}), 3.40 – 3.32 (m, 2H, CH₂-Spa {3.36}), 2.77 (dd, 1H, ³J_{H2,H3} = 9.6 Hz, ³J_{H2,H1} = 8.0 Hz, H2-GlcN^{II}), 2.65 (dd, 1H, ³J_{H2a,H3} = 7.4 Hz, ²J_{H2a,H2b} = 15.0 Hz, H^I_{2a-I}), 2.50 – 2.36 (m, 6H, H2-Spa {2.48}, H^I_{2b-I} {2.45}, H^{II}_{2ab-I} {2.42}, H^I_{2a-II} {2.40}), 2.25 (dd, 1H, ³J_{H2b,H3} = 4.2 Hz, ²J_{H2b,H2a} = 14.7 Hz, H^I_{2b-II}), 1.66 – 1.44 (m, 6H, H^I_{4-I}, H^I_{4-II}, H^{II}_{4-I}), 1.43 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.34 – 1.18 (m, 54H, 3 x (CH₂)₉), 0.87 (t_p, 9H, ³J_{H14,H13} ≈ 6.9 Hz, H^I_{14-I}, H^I_{14-II}, H^{II}₁₄).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 172.19 (C=O-^tBu), 171.52 (C^I_{1-I}), 171.22 (C^{II}_{1-I}), 171.03 (C^I_{1-II}), 150.61, 150.47, 138.90, 138.47, 138.07 (6 x C_{ipso}-Ph), 129.95, 129.91, 128.59, 128.53, 128.52, 128.43, 127.95, 127.92, 127.83, 127.80, 127.70, 127.66, 127.58, 125.66, 125.63, 120.33, 120.31, 120.29, 120.26 (C_{o,m,p}-Ph), 104.14 (C1-GlcN^{II}), 102.01 (C1-GlcN^I), 80.66 (C-^tBu), 76.57 (C^I_{3-II}), 76.37 (C3-GlcN^I), 75.95 (C^I_{3-I}), 75.77 (C^{II}_{3-I}), 75.35 (C3-GlcN^{II}), 74.70 (C4-GlcN^{II}), 74.27 (C5-GlcN^I), 74.20 (C5-GlcN^{II}), 73.61 (Bn-CH₂-O), 71.74 (CH₂-Bn), 71.21 (CH₂-Spa), 71.09, 70.84 (2 x CH₂-Bn), 70.77, 70.50, 70.37 (3 x CH₂-Spa), 70.44 (C6-GlcN^{II}), 70.04 (C6-GlcN^I), 69.36 (C4-GlcN^I), 68.51, 68.52 (2 x CH₂-Spa), 66.89 (C3-Spa), 56.41 (C2-GlcN^{II}), 53.60 (C2-GlcN^I), 41.87 (C^I_{2-II}), 39.87 (C^I_{2-I}), 39.07 (C^{II}_{2-I}), 36.39 (C2-Spa), 34.54, 34.36, 33.98 (C^I_{4-I}, C^I_{4-II}, C^{II}_{4-I}), 32.07 (3 x C12), 29.94, 29.84, 29.81, 29.79, 29.73, 27.51, 29.50 (3 x C6 – C11), 28.24 (CH₃-^tBu), 25.41, 25.37, 25.28 (C^I_{5-I}, C^I_{5-II}, C^{II}_{5-I}), 22.84 (3 x C13), 14.28 (C^I_{14-I}, C^I_{14-II}, C^{II}_{14-I}).

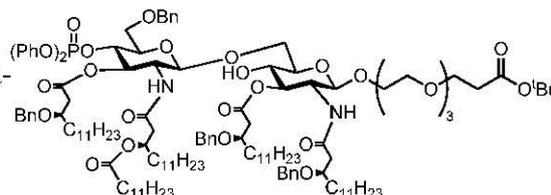
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1895.04 ([M+Na]⁺, ber.: 1895.10).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1872.1097 ([M+H]⁺, ber.: 1872.1150).

C₁₀₇H₁₅₉N₂O₂₃P (1872.38)

[6-*O*-[4-(diphenylphosphoryl)-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-((*R*)-3-(dodecanoyl)oxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (135)

(β -6-(β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((*R*)-3-(dodecanoyl)oxytetradecanoyl))-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-*O*-Spa-^{*t*}Bu)



Zu einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus 200 mg (469.0 μ mol, 1.00 Äquiv.) (*R*)-3-(Dodecanoyloxy)tetradecansäure (**91**) in 7 ml absol. Dichlormethan wird unter Argon 0.20 ml Oxalylchlorid (297.0 mg, 2.34 mmol, 5.00 Äquiv.) durch eine Spritze zugetropft. Anschließend werden drei Tropfen *N,N*-Dimethylformamid hinzugegeben und die Lösung 1 h bei Raumtemp. gerührt. Nach 1 h wird der Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Sollte die Reaktion nicht vollständig sein, wird max. eine weitere Stunde gerührt und ein Tropfen *N,N*-Dimethylformamid hinzugegeben. Danach wird mit 50 ml Toluol verdünnt und überschüssiges Oxalylchlorid sowie die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert.

Ausbeute: 209 mg (quant.); farbloses Öl, $R_f = 0.34$ (^cHex/EtOAc, 3:1).

Zu einer Lösung von 447 mg (238.7 μ mol) β -6-(β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH₂)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-*O*-Spa-^{*t*}Bu (**134**) und 154 mg (1.19 mmol, 5.00 Äquiv.) *N*-Ethyldiisopropylamin in 7 ml absol. Dichlormethan wird unter Argon bei Raumtemp. 170.0 mg (382.0 μ mol, 1.60 Äquiv.) des hergestellten Carbonsäurechlorids **128**, gelöst in 3.23 ml absol. Dichlormethan, auf einmal hinzugegeben. Die Lösung wird 18 h gerührt, danach werden die Lösungsmittel erst unter verminderten Druck, anschließend i. Hochvak. entfernt. Der Rückstand (730 mg) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Säulendimensionen: Länge = 36.0 cm, Durchmesser = 2.7 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 3:1 \rightarrow 2:1 \rightarrow 1:1).

Ausbeute: 408 mg (179 μ mol, 75 %); farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = -3.6$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.28$ (^cHex/EtOAc, 1:1).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 7.38 - 7.21$ (m, 24H, H_{Ar}-Ph), 7.20 - 7.09 (m, 6H, H_{Ar}-Ph), 6.67 (d, 1H, ³*J*_{NH,H2} = 9.5 Hz, NH-GlcN^I), 5.77 (d, 1H, ³*J*_{NH,H2} = 7.1 Hz, NH-GlcN^{II}), 5.52 (dd, 1H, ³*J*_{H3,H2} = 10.6 Hz, ³*J*_{H3,H4} = 8.9 Hz, H3-GlcN^{II}), 5.12 (d, 1H, ³*J*_{H1,H2} = 8.3 Hz, H1-GlcN^{II}), 5.07 - 4.99 (m, 1H, H_{3-II} {5.04}), 4.90 (dd, 1H, ³*J*_{H3,H2} = ³*J*_{H3,H4} = 9.2 Hz, H3-GlcN^I), 4.72 (q, 1H, ³*J*_{H4,H3} = ³*J*_{H4,H5} = 9.1 Hz, H4-GlcN^{II}),

4.59 – 4.36 (m, 9H, CH₂-Bn {4.54}, H^I-GlcN^I {4.48}, CH₂-Bn {4.45}, Bn-CH₂-O {4.42}, CH₂-Bn {4.40}), 4.13 – 3.99 (m, 2H, H^I-GlcN^I {4.07}, H_{6a}-GlcN^I {4.05}), 3.93 – 3.76 (m, 3H, H^I_{3-II} {3.92}, H^I_{3-I} {3.86}, H_{6b}-GlcN^I {3.79}), 3.75 – 3.53 (m, 16H, H^{II}_{3-I} {3.73}, H^{II}-GlcN^{II} {3.72}, H^{II}-GlcN^{II} {3.70}, CH₂-Spa {3.70}, H^{II}-Spa {3.69}, CH₂-Spa {3.63}, H_{6a}-GlcN^{II} {3.63}, CH₂-Spa {3.58}, H^I-GlcN^I {3.58}, H_{6b}-GlcN^{II} {3.56}, CH₂-Spa {3.55}), 3.51 – 3.29 (m, 6H, CH₂-Spa {3.50}, CH₂-Spa {3.39}, H^I-GlcN^I {3.36}, H^{II}-GlcN^{II} {3.33}), 2.65 (dd, 1H, ³J_{H_{2a},H₃ = 7.0 Hz, ²J_{H_{2a},H_{2b} = 15.4 Hz, H^I_{2a-I}), 2.53 – 2.13 (m, 10H, H^I-Spa {2.48}, H^I_{2b-I} {2.43}, H^I_{2a-II} {2.39}, H^{II}_{2ab-I} {2.36}, H^{II}_{16-II} {2.29}, H^I_{2b-II} {2.24}, H^{II}_{2a-II} {2.18}), 2.05 (dd, 1H, ³J_{H_{2b},H₃ = 4.7 Hz, ²J_{H_{2b},H_{2a} = 15.1 Hz, H^{II}_{2b-II}), 1.76 – 1.47 (m, 10H, H^{II}_{17-II} {1.57}, H^I_{4-II} {1.55}, H^{II}_{4-I} {1.55}, H^I_{4-I} {1.54}, H^{II}_{4-II} {1.46}), 1.44 (s, 9H, 3 x CH₃-^tBu), 1.30 – 1.19 (m, 88H, (CH₂)₄₄), 0.91 – 0.86 (m, 15H, H^I_{14-I}, H^I_{14-II}, H^{II}_{14-I}, H^{II}_{14a-II}, H^{II}_{14b-II}, H^{II}_{26-II}).}}}}

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 174.04 (C^{II}_{15-II}), 171.91 (C=O-^tBu), 171.50 (C^I_{1-I}), 170.81 (C^I_{1-II}), 170.72 (C^{II}_{1-II}), 170.48 (C^{II}_{1-I}), 150.62, 150.48, 138.95, 138.71, 138.26, 138.06 (6 x C_{ipso}-Ph), 129.96, 129.92, 128.73, 128.44, 128.41, 128.37, 128.25, 128.19, 127.97, 127.94, 127.87, 127.81, 127.67, 127.57, 127.55, 125.63, 120.34, 120.31, 120.29, 120.26 (C_{o,m,p}-Ph), 102.08 (C^I-GlcN^I), 100.32 (C^I-GlcN^{II}), 80.61 (C-^tBu), 76.56 (C^I_{3-II}), 76.02 (C^I-GlcN^I), 75.78, 75.76 (C^I_{3-I}, C^{II}_{3-I}), 75.02 (C^{II}-GlcN^{II}), 74.82 (C^I-GlcN^I), 73.99 (C^{II}-GlcN^{II}), 73.58 (Bn-CH₂-O), 72.28 (C^{II}-GlcN^{II}), 71.73, 71.26 (2 x CH₂-Bn), 71.20 (CH₂-Spa), 71.11 (CH₂-Bn), 70.89, 70.84 (2 x CH₂-Spa), 70.60 (C^{II}_{3-II}), 70.52, 70.39 (2 x CH₂-Spa), 69.00 (C^I-GlcN^I), 68.63 (CH₂-Spa), 68.42 (C^I-GlcN^I), 68.33 (C^{II}-GlcN^{II}), 66.92 (C^I-Spa), 56.44 (C^{II}-GlcN^{II}), 53.70 (C^I-GlcN^I), 41.96 (C^I_{2-II}), 41.69 (C^{II}_{2-II}), 39.83 (C^I_{2-I}), 38.63 (C^{II}_{2-I}), 36.41 (C^I-Spa), 34.68 (CH^{II}_{16-II}), 34.67, 34.62, 34.57, 34.02 (C^I_{4-I}, C^I_{4-II}, C^{II}_{4-I}, C^{II}_{4-II}), 32.09 (4 x C₁₂ + C₂₄), 30.31, 29.96, 29.94, 29.89, 29.86, 29.84, 27.82, 29.76, 29.57, 29.56, 29.54, 29.53, 29.42, 28.24 (4 x C₆ – C₁₁ + C₁₈ – C₂₃), 27.04 (3 x CH₃), 25.53, 25.41, 25.39, 25.32 (C^I_{5-I}, C^I_{5-II}, C^{II}_{5-I}, C^{II}_{5-II}), 25.13 (C^{II}_{17-II}), 22.85 (4 x C₁₃ + C₂₅), 14.28 (4 x C₁₄ + C₂₆).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 2303.70 ([M+Na]⁺, ber.: 2303.46).

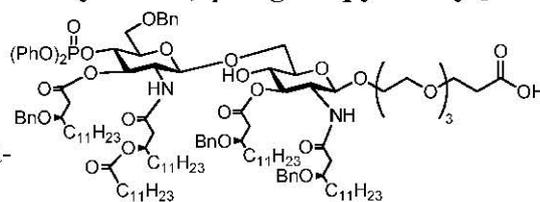
1163.37 ([M+2Na]⁺, ber.: 1163.23).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 2302.4558 ([M+Na]⁺, ber.: 2302.4572).

C₁₃₃H₂₀₇N₂O₂₆P (2281.04)

[6-*O*-[4-(diphenylphosphoryl)-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-((*R*)-3-(dodecanoyl)oxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-12-hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure (136)

(β -6-(β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((*R*)-3-(dodecanoyloxy)tetradecanoyl))-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-O-Spa-CO₂H)



454 mg (199.0 μ mol) β -6-(β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((*R*)-3-(dodecanoyloxy)tetradecanoyl))-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-O-Spa-^tBu (**135**) und 46.3 mg Triethylsilan (398.2 μ mol, 2.00 Äquiv.) werden mit 16 ml Ameisensäure versetzt und 9 h bei Raumtemp. gerührt. Dabei wird der Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Im Anschluss wird mit 50 ml Toluol verdünnt. Die Ameisensäure sowie das Toluol werden i. Hochvak. entfernt, der Rückstand (0.460 g) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm im Laufmittelgemisch ^cHex/EtOAc, 2:1 \rightarrow 1:1 \rightarrow 1:2 + 0.5 % AcOH) gereinigt.

Ausbeute: 390 mg (175.3 μ mol, 88 %); farbloses, hochviskoses Öl, $[\alpha]_D^{24} = -4.6$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $R_f = 0.10$ (^cHex/EtOAc, 1:2 + 0.5 % AcOH).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): [δ/ppm] = 7.38 – 7.21 (m, 24H, H_{Ar}-Ph), 7.21 – 7.08 (m, 6H, H_{Ar}-Ph), 6.74 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 9.4 Hz, NH-GlcN^I), 5.99 – 5.88 (m, 1H, NH-GlcN^{II} {5.94}), 5.50 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 10.8 Hz, ³J_{H3,H4} = 9.2 Hz, H3-GlcN^{II}), 5.06 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 8.2 Hz, H1-GlcN^{II}), 5.04 – 5.00 (m, 1H, H_{3-II} {5.03}), 4.97 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} \approx ³J_{H3,H4} \approx 9.5 Hz, H3-GlcN^I), 4.74 (q, 1H, ³J_{H4,H3} = ³J_{H4,H5} = 9.2 Hz, H4-GlcN^{II}), 4.59 – 4.36 (m, 9H, CH₂-Bn {4.55}, H1-GlcN^I {4.48}, CH₂-Bn {4.46}, Bn-CH₂-O {4.42}, CH₂-Bn {3.38}), 4.14 – 4.00 (m, 2H, H2-GlcN^I {4.07}, H6_a-GlcN^I {4.06}), 3.93 – 3.82 (m, 2H, H_{3-II}^I {3.90}, H_{3-I}^I {3.87}), 3.82 – 3.51 (m, 18H, H6_b-GlcN^I {3.80}, H3-Spa {3.78}, CH₂-Spa {3.76}, H_{3-I}^{II} {3.73}, CH₂-Spa {3.72}, H5-GlcN^{II} {3.71}, CH₂-Spa {3.67}, H6_a-GlcN^{II} {3.63}, CH₂-Spa {3.59}, H4-GlcN^I {3.58}, H6_b-GlcN^{II} {3.58}, CH₂-Spa {3.54}), 3.51 – 3.39 (m, 4H, H2-GlcN^{II} {3.46}, H5-GlcN^I {3.45}, CH₂-Spa {3.45}), 2.66 (dd, 1H, ³J_{H2a,H3} = 6.8 Hz, ²J_{H2a,H2b} = 15.5 Hz, H_{2a-I}^I), 2.59 – 2.53 (m, 2H, H2-Spa {2.56}), 2.52 – 2.18 (m, 8H, H_{2a-I}^{II} {2.49}, H_{2b-I}^I {2.44}, H_{2a-II}^I {2.40}, H_{2b-I}^{II} {2.38}, H_{2b-II}^I {2.29}, CH_{16-II}^{II} {2.29}, H_{2a-II}^{II} {2.23}), 2.14 – 2.10 (m, 1H, H_{2b-II}^{II} {2.12}), 1.69 – 1.42 (m, 10H, H_{17-II}^I {1.57}, H_{4-I}^I

{1.50}, H_{4-II}^I {1.50}, H_{4-I}^{II} {1.50}, H_{4-II}^{II} {1.50}), 1.41 – 1.09 (m, 88H (CH_2)₄₄), 0.89 (tp, 15H, H_{14-I}^I , H_{14-II}^I , H_{14-I}^{II} , H_{14-II}^{II} , H_{26-II}^{II}).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] ($CDCl_3$): [δ/ppm] = 174.08 (C_{15-II}^{II}), 173.59 (CO_2H), 172.16 (C_{1-I}^I), 171.90 (C_{1-I}^{II}), 171.07 (C_{1-II}^I), 170.97 (C_{1-II}^{II}), 150.59, 150.45, 138.73, 138.65, 138.35, 138.00 (6 x $C_{ipso-Ph}$), 129.93, 129.65, 128.57, 128.46, 128.44, 128.38, 128.09, 128.02, 127.98, 127.95, 127.90, 127.87, 127.83, 127.68, 127.65, 127.59, 125.65, 120.34, 120.31, 120.29, 120.27 ($C_{o,m,p-Ph}$), 101.77 ($C1-GlcN^I$), 100.28 ($C1-GlcN^{II}$), 76.53 (C_{3-II}^I), 76.03 ($C3-GlcN^I$), 75.77, 75.65 (C_{3-I}^I , C_{3-I}^{II}), 75.97 ($C4-GlcN^{II}$), 74.62 ($C5-GlcN^I$), 74.04 ($C5-GlcN^{II}$), 73.56 (Bn- CH_2-O), 72.33 ($C3-GlcN^{II}$), 71.63, 71.21, 71.05 (3 x CH_2-Bn), 71.01, 70.81, 70.73, 70.61 (4 x CH_2-Spa), 70.57 (C_{3-II}^{II}), 70.38 (CH_2-Spa), 69.06 ($C4-GlcN^I$), 68.62 (CH_2-Spa), 68.39 ($C6-GlcN^{II}$), 68.29 ($C6-GlcN^I$), 66.71 ($C3-Spa$), 56.08 ($C2-GlcN^{II}$), 53.82 ($C2-GlcN^I$), 41.73 (C_{2-II}^I), 41.67 (C_{2-II}^{II}), 39.87 (C_{2-I}^I), 38.69 (C_{2-I}^{II}), 35.17 ($C2-Spa$), 34.59 (CH_{16-II}^{II}), 34.50, 34.10 (C_{4-I}^I , C_{4-II}^I , C_{4-I}^{II} , C_{4-II}^{II}), 32.08 (4 x C12 + C24), 29.92, 29.88, 27.85, 29.82, 29.76, 29.72, 29.56, 29.53, 29.41 (4 x C6 – C11 + C18 – C23), 25.48, 25.36, 25.33 (C_{5-I}^I , C_{5-II}^I , C_{5-I}^{II} , C_{5-II}^{II}), 25.13 (C_{17-II}^{II}), 22.85 (4 x C13 + C25), 14.28 (4 x C14 + C26).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 2247.60 ($[M+Na]^+$, ber.: 2247.40).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 2246.3896 ($[M+Na]^+$, ber.: 2246.3946).

$C_{129}H_{199}N_2O_{26}P$ (2224.93)

5.10 Festphasenglycopeptidsynthesen

5.10.1 Das allgemeine Protokoll der automatisierten Peptid-Festphasensynthese

Die Peptid-Festphasensynthesen werden an einem ABI-433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems* nach der Fmoc-Strategie durchgeführt. Polymere Träger sind Polystyrol-Harze der Firma *Rapp Polymere*, welche über einen 2-Chlortritylanker (2-CT)^[319] mit einer C-terminalen Startaminosäure versehen sind, oder auch das speziell konzipierte niedrig beladene Tentagel® R, ein Polyethylenglycol-Polystyrol-Copolymerharz, an dem die Startaminosäure über para-Hydroxybenzylalkohol (PHB-AS-Fmoc) angeknüpft ist. Funktionelle Gruppen in den Seitenketten der zum Einsatz kommenden kommerziell erhältlichen N-Fmoc-Aminosäuren werden durch säurelabile Schutzgruppen blockiert. Die

Aminosäuren Serin und Threonin werden als *tert*-Butylether- und Asparaginsäure sowie Glutaminsäure als *tert*-Butylester-blockierte Derivate verwendet. Die Guanidinofunktion des Arginins wird durch die 2,2,5,7,8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonyl-Gruppe (Pmc) geschützt, während die Aminofunktion der Histidin-Seitenkette durch die Trityl-Gruppe (Trt) blockiert wird. Für alle anzuknüpfenden Aminosäuren wird der gleiche dreistufige Syntheseyklus durchlaufen. Mit Ausnahme des ersten beginnt jeder Zyklus mit der Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe durch mindestens zweimalige Behandlung (von je 2.5 min) des funktionalisierten Harzes mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin-2-on (liegt die Startaminosäure in ungeschützter Form vor, entfällt in diesem Fall der Deblockierungsschritt). Nach jedem Abspaltungsvorgang wird durch Messung der UV-Absorption der Abspalt-Lsg. bei einer Wellenlänge von $\lambda = 301$ nm der Gehalt an gebildetem Dibenzofulven-Piperidin-Addukt gemessen. Weicht der Wert der gemessenen UV-Absorption um mehr als 10 % vom vorangegangenen ab, wird der Prozess zur Abspaltung automatisch wiederholt, allerdings höchstens fünf weitere Male. Anschließend erfolgt der Kupplungsschritt. Dazu wird eine Lösung von 10 Äquivalenten der jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäure, 10 Äquivalenten HBTU, 10 Äquivalenten HOBt und 20 Äquivalenten *N*-Ethyl-diisopropylamin in *N,N*-Dimethylformamid in den Reaktor überführt und 15 min dort belassen. Bei problematischen Kupplungen wird zur Steigerung des Umsatzes die Behandlung mit obiger Lösung auf analoge Weise wiederholt (Doppelkupplung). Zur Anknüpfung der Glycosylaminosäure-Bausteine werden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU und HOAt verwendet. *N*-Ethyl-diisopropylamin wird durch *N*-Methylmorpholin und *N,N*-Dimethylformamid durch *N*-Methylpyrrolidin-2-on (NMP) ersetzt. Außerdem erhöht man die Reaktionszeit auf 16 h. Die eingesetzten Mengen sowie die genauen Reaktionsbedingungen sind bei der Beschreibung der einzelnen Synthesen angegeben.

Nach der Peptidkupplung folgt schließlich die Acetylierung nicht umgesetzter Aminogruppen mit einer Lösung von Essigsäureanhydrid (0.5 M), *N*-Ethyl-diisopropylamin (0.125 M) und HOBt (0.015 M) in *N*-Methylpyrrolidin-2-on über 5 min zur Blockierung nicht umgesetzter freier Aminogruppen. Eine effiziente Durchmischung der Reagenzien im Synthesereaktor wird durch starkes Schütteln (Vortex) erreicht. Nach jedem Teilschritt wird das polymergebundene Peptid durch Filtration und gründliches Waschen mit *N*-Methylpyrrolidin-2-on von den Reagenzien befreit.

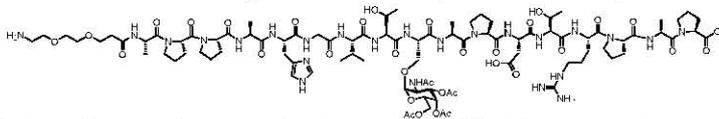
Nach Aufbau der gesamten Aminosäuresequenz, durch entsprechende Wiederholung der verschiedenen Schritte, wird erneut die *N*-terminale Fmoc-Gruppe entfernt und die freie Aminofunktion ggf. acetyliert. Am Ende der Peptid-Festphasensynthese wird mit Dichlormethan gewaschen und das Harz im Stickstoffstrom getrocknet.

5.10.2 Die Synthesen der (Glyco-)Peptide mit einer Partiaalsequenz aus dem MUC1

5.10.2.1 Die Synthese von glycosylierten Heptadecapeptiden

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (**138**)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α -GalAc₃NAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 136 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Pro versehenen Polystyrol-Harzes **137** (Beladung: 0.74 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der automatisierten Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure **17** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 105.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAc)-OH (**17**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 24.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HOAt und 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 8 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die weiteren acht Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Anbindung des Diethylenglycolspacers erfolgt wieder halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung aus 120.0 mg (0.300 mmol, 3.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 126.0 mg (0.331 mmol, 3.31 Äquiv.) HATU, 47.0 mg (0.345 mmol, 3.45 Äquiv.) HOAt, 66.0 mg (0.652 mmol, 6.52 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP. Die Lösung wird 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand) und im letzten Teilschritt wird das Amin von der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin deblockiert, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 332 mg eines Peptidpolymer-Adduktes (Δ = 196 mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger wird das Harz in einen Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) nach

Merrifield überführt und 1 h in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wonach das Harz dreimal mit jeweils weiteren 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (172 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 12.57$ min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-5), $R_t = 25.72$ min (Gerät 2, Säule: Luna-2, Gradient: Semipräp-1).

Ausbeute: 83 mg (0.039 mmol, 39 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{26} = -81.8$ ($c = 1.00$, MeOH).

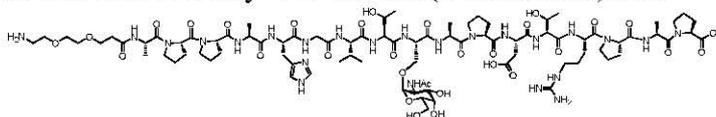
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 711.07$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 711.02).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1065.5182$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1065.5217).

$C_{92}H_{144}N_{24}O_{34}$ (2130.27)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-N-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (140)

($H_2N-(CH_2CH_2O)_2(CH_2)_2CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(\alpha-GalNHAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH$)



38 mg (0.018 mmol) des glycosylierten Heptadecapeptids **138** werden in 35 ml Methanol gelöst und unter kontinuierlicher Kontrolle des pH-Werts mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 16 h bei einem pH-Wert von 9.5 gerührt und der Reaktionsfortschritt wird über die analytische RP-HPLC verfolgt. Durch weitere Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure und entfernt die Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vakuum. Der gelbe Rückstand (78 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 21.87$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 26.85$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 27 mg (13.0 μ mol, 76 %); farbloses Lyophilisat.

400 MHz- 1H -NMR [1H - 1H -COSY] (DMSO- d_6): $[\delta/ppm] = 8.96$ (s, 1H, $H_{2Ar-His}$), 8.32 – 8.22 (m, 2H, NH-Gly {8.25}, NH-His {8.24}), 8.18 (d, 1H, $^3J_{NH,Ala\alpha} = 6.7$ Hz, NH- Ala_4), 8.15

– 7.74 (m, 9H, NH-Ala₃ {8.13}, NH-Asp {8.11}, NH-Ala₁ {8.09}, NH-Ala₂ {8.07}, NH-Val {7.98}, NH-Arg {7.97}, NH-Thr₂ {7.96}, NH-Ser {7.89}, NH-Spa {7.83}), 7.59 (s_b, 1H, NH-Gua), 7.38 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.34 (d, 1H, ³J_{NH,Thrα} = 8.3 Hz, Thr₁), 7.27 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 8.9 Hz, NH-GalN), 4.62 – 4.42 (m, 9H, H1-GalN {4.59}, His^α {4.58}, Asp^α {4.56}, Ala₄^α {4.54}, Ala₁^α {4.53}, Pro₃^α {4.52}, Arg^α {4.49}, Ser^α {4.49}, Ala₃^α {4.46}), 4.37 – 4.27 (m, 5H, Pro₅^α {4.33}, Thr₂^α {4.31}, Pro_(1,2)^α {4.30}, Val^α {4.30}), 4.25 – 4.10 (m, 3H, Pro₄^α {4.21}, Thr₁^α {4.20}, Ala₂^α {4.16}), 4.05 (td, 1H, ³J_{H2,H3} ≈ ³J_{H2,NH} ≈ 9.8 Hz, ³J_{H2,H1} = 3.2 Hz, H2-GalN), 4.00 – 3.83 (m, 3H, Thr₂^β {3.97}, Thr₁^β {3.93}, Gly^{αα} {3.89}), 3.77 – 3.32 (m, 26H, Gly^{αβ} {3.73}, H4-GalN {3.70}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.70 – 3.42}, Ser^{βab} {3.61}, H8-Spa {3.59}, H3-GalN {3.57}, H3-Spa {3.57}, H5-GalN {3.55}, H6_a-GalN {3.52}, H5-Spa {3.52}, H6-Spa {3.52}, H6_b-GalN {3.44}), 3.18 – 3.03 (m, 3H, His^{βa} {3.10}, Arg^δ {3.08}), 3.03 – 2.89 (m, 3H, His^{βb} {2.97}, H9-Spa {2.97}), 2.73 (dd, 1H, ³J_{Aspβa,Aspα} = 6.2 Hz, ²J_{Aspβa,Aspβb} = 16.4 Hz, Asp^{βa}), 2.46 (m_c 1H, Asp^{βb} {2.46}), 2.42 – 2.26 (m, 2H, H2-Spa {2.35}), 2.18 – 2.07 (m, 2H, Pro₄^{βa} {2.14}, Pro₃^{βa} {2.13}), 2.06 – 1.62 (m, 23H, Pro₅^{βa} {2.02}, Pro_(1,2)^{βa} {2.00}, Val^β {2.00}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.00 – 1.78}, 1.85 (CH₃-Ac), Pro₄^{βb} {1.84}, Pro₅^{βb} {1.80}, Pro_(1,2,3)^{βb} {1.78}, Arg^{βa} {1.68}), 1.60 – 1.45 (m, 3H, Arg^{βb} {1.52}, Arg^γ {1.52}), 1.27 – 1.15 (m, 9H, Ala_(3,4)^β {1.19}, Ala₂^β {1.17}), 1.13 (d, 3H, ³J_{Alaβ,Alaα} = 6.9 Hz, Ala₁^β), 1.04 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 6.2 Hz, Thr₂^γ), 0.99 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 6.2 Hz, Thr₁^γ), 0.86 (d, 3H, ³J_{Valγa,Valβ} = 6.6 Hz, Val^{γa}), 0.82 (d, 3H, ³J_{Valγb,Valβ} = 6.6 Hz, Val^{γb}).

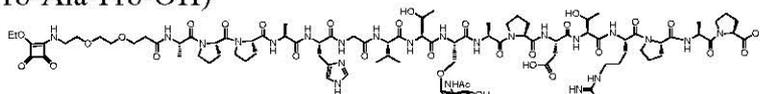
100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (DMSO-d₆): [δ/ppm] = 173.28, 172.45, 171.93, 171.70, 171.64, 171.07, 171.04, 170.55, 170.43, 170.35, 170.16, 170.01, 169.92, 169.89, 169.63, 169.60, 169.53, 169.44, 168.93, 168.85 (C=O), 156.81 (C=N-Guan), 133.72 (C2-Imidazol), 129.06 (C5-Imidazol), 117.12 (C4-Imidazol), 97.47 (C1-GalN), 71.11 (C5-GalN), 69.31, 69.13 (C5-Spa, C6-Spa), 67.89 (C3-GalN), 67.76 (C4-GalN), 66.49 (Thr₁^β), 66.43 (C3-Spa, C8-Spa, Ser^β), 66.31 (Thr₂^β), 60.26 (C6-GalN), 58.84 (Pro₅^α), 58.63 (Pro_(1,2)^α), 57.98 (Pro₄^α), 57.98 (Thr₁^α), 57.94 (Val^α), 57.88 (Thr₂^α), 57.25 (Pro₃^α), 51.99 (Ser^α), 51.16 (His^α), 49.84 (Arg^α), 49.23 (Asp^α), 49.08 (C2-GalN), 48.14 (Ala₂^α), 46.23 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 45.88 (Ala_(1,4)^α), 45.81 (Ala₃^α), 41.61 (Gly^α), 40.36 (Arg^δ), 38.34 (C9-Spa), 35.55 (Asp^β), 35.52 (C2-Spa), 30.42 (Val^β), 28.70 (Pro₅^β), 28.48 (Pro_(1,2)^β), 28.13 (Pro_(3,4)^β), 28.03 (Arg^β), 26.89 (His^β), 24.19 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 24.15 (Arg^γ), 22.58 (CH₃-Ac), 19.30 (Thr₁^γ), 19.24 (Thr₂^γ), 19.14 (Val^{γa}), 17.67 (Val^{γb}), 16.80 (Ala₂^β), 16.78 (Ala_(3,4)^β), 16.72 (Ala₁^β).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1024.55 ([M+2Na]²⁺, ber.: 1024.49).

C₈₆H₁₃₈N₂₄O₃₁ (2004.16)

1-(9-Amino-4,7-dioxa-nonanyl-amido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin)-2-ethoxy-cyclobuten-3,4-dion (211)

(EtO-Squarat-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α -GalNHAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



Zu einer Lösung von 47 mg (23.45 μ mol) des glycosylierten Heptadecapeptids **140** in 8 ml Ethanol/Wasser (1:1) werden über eine 10 μ l Hamilton-Spritze 7.7 mg (45.0 μ mol, 1.92 Äquiv.) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion hinzugegeben. Anschließend wird eine gesättigte Natriumcarbonat-Lsg. mit einer 25 μ l Hamilton-Spritze zugetropft, bis sich ein pH-Wert von 8.5 exakt einstellt. Der Reaktionsfortschritt wird über die analytische RP-HPLC verfolgt und die Reaktion nach 100 min durch Zugabe von 100 μ l konz. Essigsäure abgebrochen. Es wird mit 50 ml Toluol verdünnt, die Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und jeweils dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids (82 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 33.23$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 33.25$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 40 mg (19.0 μ mol, 80 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{17} = -87.5$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): $[\delta/\text{ppm}] = 8.96$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.83 (t, 0.5H, ³ $J_{\text{NH,H9-Spa}} = 6.1$ Hz, NH-Spa), 8.67 (t, 0.5H, ³ $J_{\text{NH,H9-Spa}} = 6.1$ Hz, NH-Spa), 8.32 – 8.22 (m, 2H, NH-His {8.28}, NH-Gly {8.26}), 8.20 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,Ala}\alpha} = 7.1$ Hz, NH-Ala₃), 8.15 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,Ala}\alpha} = 7.3$ Hz, NH-Ala₄), 8.12 – 8.06 (m, 3H, NH-Ala₂ {8.10}, NH-Asp {8.10}, NH-Ala₁ {8.09}), 8.05 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,Val}\alpha} = 8.7$ Hz, NH-Val), 8.02 – 7.95 (m, 2H, NH-Arg {8.02}, NH-Thr₂ {8.00}), 7.91 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,Ser}\alpha} = 7.9$ Hz, NH-Ser), 7.52 (s_b, 1H, NH-Gua), 7.39 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.34 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 8.3$ Hz, Thr₁), 7.27 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,H2}} = 9.0$ Hz, NH-GalN), 4.64 (p, 2H, ³ $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 6.9$ Hz, CH₂-Squa), 4.60 – 4.41 (m, 9H, H1-GalN {4.59}, His ^{α} {4.57}, Asp ^{α} {4.56}, Ala₃ ^{α} {4.55}, Pro₃ ^{α} {4.55}, Ala₁ ^{α} {4.51}, Arg ^{α} {4.50}, Ser ^{α} {4.49}, Ala₄ ^{α} {4.47}), 4.36 – 4.26 (m, 5H, Thr₂ ^{α} {4.33}, Pro₂ ^{α} {4.32}, Val ^{α} {4.32}, Pro₅ ^{α} {4.31}, Pro₁ ^{α} {4.24}), 4.23 – 4.18 (m, 2H, Pro₄ ^{α} {4.21}, Thr₁ ^{α} {4.21}), 4.17 – 4.11 (m, 1H, Ala₂ ^{α} {4.16}), 4.05 (td, 1H, ³ $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} \approx {}^3J_{\text{H}_2,\text{NH}} \approx 10.0$ Hz, ³ $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 3.4$ Hz, H2-GalN), 4.00 – 3.82 (m, 3H, Thr₂ ^{β} {3.98}, Thr₁ ^{β} {3.94}, Gly ^{$\alpha\alpha$} {3.90}), 3.80 – 3.27 (m, 28H, Gly ^{ob} {3.74}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{δ} {3.73 – 3.32}, H4-GalN {3.71}, Ser ^{βab} {3.63}, H9_a-Spa {3.62}, H3-GalN {3.57}, H3-Spa {3.57}, H5-GalN {3.55}, H6_a-GalN {3.52}, H5-Spa {3.50}, H6-Spa {3.50}, H6_b-GalN {3.45}, H8-Spa {3.45}, H9_b-Spa {3.43}), 3.14 – 3.03 (m, 3H, His ^{βa} {3.12},

Arg^δ {3.09}), 2.97 (dd, 1H, $^3J_{\text{His}^{\beta\text{b}},\text{His}^{\alpha}} = 7.5$ Hz, $^2J_{\text{His}^{\beta\text{b}},\text{His}^{\beta\text{a}}} = 15.4$ Hz, His^{βb}), 2.72 (dd, 1H, $^3J_{\text{Asp}^{\beta\text{a}},\text{Asp}^{\alpha}} = 6.3$ Hz, $^2J_{\text{Asp}^{\beta\text{a}},\text{Asp}^{\beta\text{b}}} = 16.2$ Hz, Asp^{βa}), 2.50 (m_c 1H, Asp^{βb}), 2.40 – 2.25 (m, 2H, H2-Spa {2.33}), 2.17 – 2.08 (m, 2H, Pro₄^{βa} {2.14}, Pro₃^{βa} {2.13}), 2.06 – 1.62 (m, 23H, Pro₅^{βa} {2.03}, Val^β {2.01}, Pro_(1,2)^{βa} {2.00}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.00 – 1.78}, Pro_(1,2)^{βb} {1.90}, 1.85 (CH₃-Ac), Pro₄^{βb} {1.91}, Pro₅^{βb} {1.78}, Pro₃^{βb} {1.77}, Arg^{βa} {1.71}), 1.56 – 1.46 (m, 3H, Arg^{βb} {1.54}, Arg^γ {1.53}), 1.36 (t, 3H, $^3J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 6.9$ Hz, CH₃-Squa), 1.22 – 1.15 (m, 9H, Ala_(2,3,4)^β {1.20}), 1.12 (d, 3H, $^3J_{\text{Ala}^{\beta},\text{Ala}^{\alpha}} = 6.9$ Hz, Ala₁^β), 1.04 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}^{\gamma},\text{Thr}^{\beta}} = 6.2$ Hz, Thr₂^γ), 0.99 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}^{\gamma},\text{Thr}^{\beta}} = 6.2$ Hz, Thr₁^γ), 0.86 (d, 3H, $^3J_{\text{Val}^{\gamma\text{a}},\text{Val}^{\beta}} = 6.5$ Hz, Val^{γa}), 0.82 (d, 3H, $^3J_{\text{Val}^{\gamma\text{b}},\text{Val}^{\beta}} = 6.6$ Hz, Val^{γb}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-d₆): [δ/ppm] = 189.39, 189.21 (2 x C=O-Squa), 182.23, 182.07 (COOH-Asp, COOH-Pro), 177.03, 176.71, 173.32, 172.97, 172.48, 171.97, 171.72, 171.68, 171.08, 171.06, 170.61, 170.55, 170.45, 170.38, 170.36, 170.16, 170.06, 170.01, 169.96, 169.87, 169.61, 169.57, 169.54, 169.52, 169.41, 168.95, 168.85, 158.26, 158.09, 158.05, 157.84 (C=O), 156.71 (C=N-Guan), 133.75 (C2-Imidazol), 129.06 (C5-Imidazol), 117.14 (C4-Imidazol), 98.22 (C1-GalN), 71.87 (C5-GalN), 69.96 (C5-Spa, C6-Spa), 69.94 (C8-Spa), 69.28 (CH₂-Squa), 68.57 (C3-GalN), 68.45 (C4-GalN), 66.25 (Thr₁^β), 67.14 (Ser^β), 67.13 (C3-Spa), 67.03 (Thr₂^β), 60.92 (C6-GalN), 59.42 (Pro_(2,5)^α), 58.56 (Pro_(1,4)^α), 58.35 (Thr₂^α), 58.06 (Val^α), 58.03 (Thr₁^α), 57.96 (Pro₃^α), 52.57 (Ser^α), 51.80 (His^α), 50.47 (Arg^α), 49.81 (Asp^α), 49.74 (C2-GalN), 48.85 (Ala₂^α), 47.08 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.66 (Ala₃^α), 46.49 (Ala₄^α), 46.35 (Ala₁^α), 43.68 (C9-Spa), 42.30 (Gly^α), 40.95 (Arg^δ), 36.08 (C2-Spa), 36.01 (Asp^β), 31.19 (Val^β), 29.48 (Pro₅^β), 29.25 (Pro_(1,2)^β), 28.78 (Pro_(3,4)^β), 28.71 (Arg^β), 27.34 (His^β), 24.87 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 24.87 (Arg^γ), 23.36 (CH₃-Ac), 19.96 (Thr₁^γ), 19.73 (Thr₂^γ), 19.72 (Val^{γa}), 18.41 (Val^{γb}), 17.41 (Ala₁^β), 17.34 (Ala_(2,3,4)^β), 16.10 (CH₃-Squa).

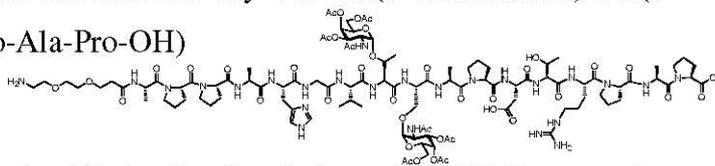
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1065.05 ([M+2H]²⁺, ber.: 1065.15).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1064.5157 ([M+2H]²⁺, ber.: 1064.5139).

C₉₂H₁₄₂N₂₄O₃₄ (2128.25)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanyl-amido-N-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (139)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -Gal-Ac₃NAc)-Ser(α -GalAc₃NAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 130 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Pro versehenen Polystyrol-Harzes **137** (Beladung: 0.77 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der automatisierten Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäuren **17** und **14** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 131.0 mg (0.200 mmol, 2.00 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAc)-OH (**17**), 96.0 mg (0.252 mmol, 2.52 Äquiv.) HATU, 36.0 mg (0.264 mmol, 2.64 Äquiv.) HOAt und 51.0 mg (0.504 mmol, 5.04 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 8 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppen durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Direkt im Anschluss erfolgt die Kupplung mit 234.0 mg (0.349 mmol, 3.49 Äquiv.) Fmoc-Thr(α -GalAc₃NAc)-OH (**14**), 168.0 mg (0.442 mmol, 4.42 Äquiv.) HATU, 63.0 mg (0.463 mmol, 4.63 Äquiv.) HOAt, 90.0 mg (0.889 mmol, 8.89 Äquiv.) NMM in 2.0 ml NMP und unter 12 h Vortex (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Valin und Glycin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die restlichen fünf Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Anbindung des Diethylglycolspacers erfolgt in einer Doppelkupplung halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung bestehend aus 240.0 mg (0.600 mmol, 6.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 288.0 mg (0.757 mmol, 7.57 Äquiv.) HATU, 108.0 mg (0.793 mmol, 7.93 Äquiv.) HOAt, 152.0 mg (1.502 mmol, 15.02 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP und 8 h Vortex (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen, im Stickstoffstrom getrocknet und abermals mit 120.0 mg (0.300 mmol, 3.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 144.0 mg (0.379 mmol, 3.79 Äquiv.) HATU, 54.0 mg (0.397 mmol, 3.97 Äquiv.) HOAt, 76.0 mg (0.751 mmol, 7.51 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP und 8 h gekuppelt. Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 351 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta =$

221 mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger wird das Harz in einen Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) nach Merrifield überführt und 1 h in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit jeweils weiteren 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (301 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 22.95$ min und 25.32 min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-6), $R_t = 50.53$ min und 53.81 min (Gerät 2, Säule: Luna-2, Gradient: Semipräp-2).

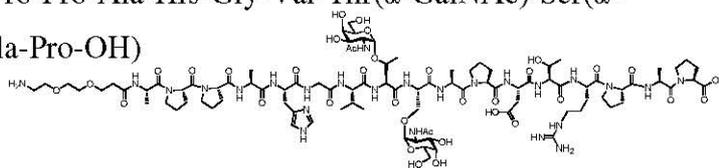
Ausbeute: 80 mg (33.0 μ mol, 33 %); farbloses Lyophilisat.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 820.89$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 820.86).

$C_{106}H_{163}N_{25}O_{42}$ (2459.57)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-N-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (141)

($H_2N-(CH_2CH_2O)_2(CH_2)_2CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(\alpha-GalNAc)-Ser(\alpha-GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH$)



48 mg (0.020 mmol) des glycosylierten Heptadecapeptids **139** werden in 35 ml Methanol unter Kontrolle des pH-Werts mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 18 h bei pH 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt über die analytische RP-HPLC verfolgt. Durch weitere Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. $R_t = 21.25$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1).

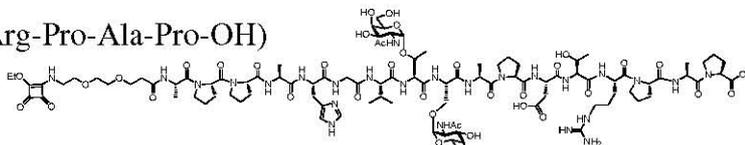
Rohausbeute: 52.0 mg (max. 43.0 mg, quant.); farbloses Lyophilisat.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1126.55$ ($[M+2Na]^{2+}$, ber.: 1126.53).

$C_{94}H_{151}N_{25}O_{36}$ (2207.35)

1-(9-Amino-4,7-dioxa-nonanyl-amido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin)-2-ethoxy-cyclobuten-3,4-dion (212)

(EtO-Squarat-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser(α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



Zu einer Lösung von 43 mg (19.48 μ mol) des glycosylierten Heptadecapeptids **141** in 8 ml Ethanol/Wasser (1:1) werden über eine 10 μ l Hamilton-Spritze 6.4 mg (37.4 μ mol, 1.92 Äquiv.) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion hinzugegeben. Anschließend wird eine gesättigte Natriumcarbonat-Lsg. mit einer 25 μ l Hamilton-Spritze zugetropft, bis sich ein pH-Wert von 8.5 einstellt. Der Reaktionsfortschritt wird durch die analytische RP-HPLC verfolgt und die Reaktion nach 100 min durch Zugabe von 100 μ l konz. Essigsäure abgebrochen. Es wird mit 50 ml Toluol verdünnt, die Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und jeweils dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids (107 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 34.57$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 41.93$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 28 mg (12.0 μ mol, 62 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{20} = -35.4$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 8.96 (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.83 (t, 0.5H, ³ $J_{NH,H9-Spa} = 6.1$ Hz, NH-Spa), 8.67 (t, 0.5H, ³ $J_{NH,H9-Spa} = 6.1$ Hz, NH-Spa), 8.51 (d, 1H, ³ $J_{NH,Ser\alpha} = 9.1$ Hz, NH-Ser), 8.40 (d, 1H, ³ $J_{NH,Ala\alpha} = 7.4$ Hz, NH-Ala₃), 8.34 – 8.20 (m, 2H, NH-His {8.28}, NH-Gly {8.25}), 8.15 (d, 1H, ³ $J_{NH,Ala\alpha} = 7.3$ Hz, NH-Ala₄), 8.11 (d, 1H, ³ $J_{NH,Asp\alpha} = 7.7$ Hz, NH-Asp), 8.10 – 8.03 (m, 3H, NH-Ala_(1,2) {8.10}, NH-Val {8.07}), 8.03 – 7.94 (m, 2H, NH-Arg {8.01}, NH-Thr₂ {8.00}), 7.60 – 7.47 (m, 2H, NH-GalN^{Thr} {7.57}, NH-Gua {7.53}), 7.39 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.35 (d, 1H, ³ $J_{NH,Thr\alpha} = 8.4$ Hz, Thr₁), 7.07 (d, 1H, ³ $J_{NH,H2} = 9.5$ Hz, NH-GalN^{Ser}), 4.64 (p, 2H, ³ $J_{CH_2,CH_3} = 7.1$ Hz, CH₂-Squa), 4.60 – 4.41 (m, 11H, Ser₁ ^{α} {4.61}, His ^{α} {4.58}, Asp ^{α} {4.57}, Thr₂ ^{α} {4.56}, Ala₃ ^{α} {4.55}, Pro₃ ^{α} {4.53}, Ala₁ ^{α} {4.52}, Arg ^{α} {4.50}, Val ^{α} {4.47}, Ala₄ ^{α} {4.46}, H1-GalN^{Ser} {4.43}), 4.39 (d, 1H, ³ $J_{H1,H2} = 3.2$ Hz, H1-GalN^{Thr}), 4.37 – 4.25 (m, 3H, Pro₅ ^{α} {4.33}, Pro_(1,2) ^{α} {4.30}), 4.24 – 4.18 (m, 2H, Pro₄ ^{α} {4.23}, Thr₁ ^{α} {4.20}), 4.17 – 4.08 (m, 3H, H2-GalN^{Thr} {4.16}, Ala₂ ^{α} {4.15}, Thr₂ ^{β} {4.12}), 4.00 (td, 1H, ³ $J_{H2,H3} \approx ^3J_{H2,NH} \approx 10.6$ Hz, ³ $J_{H2,H1} \approx 2.4$ Hz, H2-GalN^{Ser}), 3.96 – 3.83 (m, 3H, Thr₁ ^{β} {3.95}, Gly^{oa} {3.89}, Ser^{ba} {3.88}), 3.80 – 3.27 (m, 31H, Gly^{ob} {3.75}, H4-GalN^{Ser/Thr} {3.71}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{δ} {3.70 – 3.42}, H3-GalN^{Ser} {3.64}, H9_a-Spa {3.62}, H5-GalN^{Ser} {3.62}, H3-GalN^{Thr} {3.58}, H3-Spa {3.57}, H6_a-GalN^{Ser} {3.52}, H6_a-GalN^{Thr}

{3.51}, H5-GalN^{Thr} {3.50}, H5-Spa {3.49}, H6-Spa {3.49}, H8-Spa {3.45}, H9_b-Spa {3.44}, H6_b-GalN^{Thr} {3.44}, H6_b-GalN^{Ser} {3.38}), 3.14 – 3.03 (m, 4H, His^{βa} {3.13}, Arg^δ {3.10}, Ser^{βb} {3.08}), 2.97 (dd, 1H, ³J_{Hisβb,Hisα} = 7.7 Hz, ²J_{Hisβb,Hisβa} = 15.4 Hz, His^{βb}), 2.72 (dd, 1H, ³J_{Aspβa,Aspα} = 6.1 Hz, ²J_{Aspβa,Aspβb} = 16.5 Hz, Asp^{βa}), 2.51 (m_c 1H, Asp^{βb}), 2.39 – 2.26 (m, 2H, H2-Spa {2.32}), 2.18 – 2.09 (m, 2H, Pro₄^{βa} {2.14}, Pro₃^{βa} {2.13}), 2.04 – 1.72 (m, 26H, Pro₅^{βa} {2.03}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.03 – 1.76}, Pro_(1,2)^{βa} {1.99}, Val^β {1.98}, 1.88 (2 x CH₃-Ac), Pro₄^{βb} {1.84}, Pro_(1,2,5)^{βb} {1.79}, Pro₃^{βb} {1.77}, Arg^{βa} {1.70}), 1.56 – 1.46 (m, 3H, Arg^{βb} {1.52}, Arg^γ {1.52}), 1.36 (t, 3H, ³J_{CH₃,CH₂} = 7.1 Hz, CH₃-Squa), 1.22 – 1.15 (m, 9H, Ala_(2,3,4)^β {1.18}), 1.12 (d, 3H, ³J_{Alaβ,Alaα} = 6.8 Hz, Ala₁^β), 1.09 (d, 3H, ³J_{Thr_γ,Thrβ} = 6.4 Hz, Thr₂^γ), 0.99 (d, 3H, ³J_{Thr_γ,Thrβ} = 6.1 Hz, Thr₁^γ), 0.91 (d, 3H, ³J_{Val_{γa},Valβ} = 6.5 Hz, Val^{γa}), 0.84 (d, 3H, ³J_{Val_{γb},Valβ} = 6.6 Hz, Val^{γb}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 189.39, 189.22 (2 x C=O-Squa), 182.24, 182.08 (COOH-Asp, COOH-Pro), 177.04, 176.72, 173.33, 172.98, 172.50, 171.98, 171.77, 171.70, 171.44, 171.08, 170.71, 170.46, 170.40, 170.36, 170.18, 170.00, 169.98, 169.94, 169.74, 169.62, 169.59, 169.56, 169.53, 169.43, 169.17, 168.74, 168.64 (C=O), 156.73 (C=N-Guan), 133.73 (C2-Imidazol), 129.14 (C5-Imidazol), 117.12 (C4-Imidazol), 99.58 (C1-GalN^{Ser}), 97.44 (C1-GalN^{Thr}), 76.11 (Thr_{TN}^β), 71.33 (C5-GalN^{Ser}), 70.90 (C5-GalN^{Thr}), 69.29 (C5-Spa, C6-Spa), 69.19 (C8-Spa), 68.59 (CH₂-Squa), 68.10 (Ser^β), 67.89 (C4-GalN^{Ser/Thr}), 67.88 (C3-GalN^{Ser}), 67.87 (C3-GalN^{Thr}), 66.60 (Thr₁^β), 66.48 (C3-Spa), 60.12 (C6-GalN^{Ser/Thr}), 58.92 (Pro₅^α), 58.74 (Pro_(1,2)^α), 58.14 (Pro₄^α), 57.62 (Thr₁^α), 57.30 (Pro₃^α), 57.19 (Val^α), 55.83 (Thr_{TN}^α), 51.31 (His^α), 51.15 (Ser^α), 49.84 (Arg^α), 49.16 (Asp^α), 49.02 (C2-GalN^{Ser}), 48.41 (C2-GalN^{Thr}, Ala₂^α), 46.30 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 45.91 (Ala₃^α), 45.87 (Ala₄^α), 45.69 (Ala₁^α), 43.52 (C9-Spa), 41.65 (Gly^α), 40.32 (Arg^δ), 35.45 (C2-Spa), 35.41 (Asp^β), 30.79 (Val^β), 28.80 (Pro_(1,2,3)^β), 28.15 (Pro_(4,5)^β), 28.09 (Arg^β), 26.73 (His^β), 24.31 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 24.26 (Arg^γ), 22.72 (2 x CH₃-Ac), 19.36 (Thr₁^γ), 18.64 (Thr_{TN}^γ), 19.12 (Val^{γa}), 18.07 (Val^{γb}), 16.86 (Ala_(2,3,4)^β), 16.77 (Ala₁^β), 15.46 (CH₃-Squa).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1066.61 ([M+2H]²⁺, ber.: 1066.56).

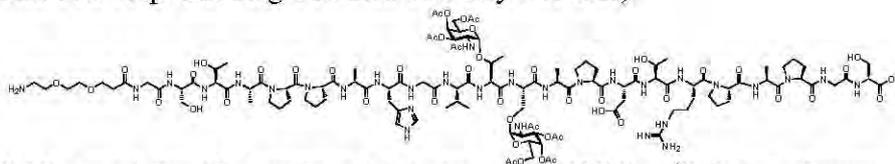
HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1166.0526 ([M+2H]²⁺, ber.: 1166.0536).

C₁₀₀H₁₅₅N₂₅O₃₉ (2331.44)

5.10.2.2 Die Synthese von glycosylierten Docosapeptiden

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin (**143**)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalAc₃-NAc)-Ser(α -GalAc₃-NAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



Ausgehend von 128 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Ser(^tBu) versehenen Polystyrol-Harzes **142** (Beladung: 0.78 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der automatisierten Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Dabei erfolgt für die erste Aminosäure Glycin eine Doppelkupplung. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäuren **17** und **14** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 105.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -GalAc₃-NAc)-OH (**17**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 24.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HOAt, 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 8 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert, mit NMP und Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte, freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Direkt im Anschluss erfolgt die Kupplung mit einer Lösung aus 134.0 mg (0.200 mmol, 2.00 Äquiv.) Fmoc-Thr(α -GalAc₃-NAc)-OH (**14**), 84.0 mg (0.221 mmol, 2.21 Äquiv.) HATU, 31.0 mg (0.228 mmol, 2.28 Äquiv.) HOAt und 44.0 mg (0.435 mmol, 4.35 Äquiv.) NMM in 1.5 ml NMP. Die Lösung wird 12 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand), die anschließenden Schritte sind analog zu den vorherigen. Für die darauf folgenden zwei Aminosäuren L-Valin und Glycin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die restlichen acht Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Anbindung des Diethylglycolspacers erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung bestehend aus 120.0 mg (0.300 mmol, 3.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 126.0 mg (0.331 mmol, 3.31 Äquiv.) HATU, 47.0 mg (0.345 mmol, 3.45 Äquiv.) HOAt, 66.0 mg (0.652 mmol, 6.52 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP und 16 h Vortex (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Im letzten Teilschritt die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und

im Stickstoffstrom getrocknet. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 418 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 290$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz im Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (242 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 21.72$ min (Gerät 1, Säule: Ana-1, Gradient: Ana-7), $R_t = 27.85$ min, 29.37 min (Gerät 2, Säule: Semipräp-1, Gradient: Semipräp-3).

Ausbeute: 37 mg (13.0 μmol , 26 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -54.0$ ($c = 1.00$, MeOH).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 8.96 (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.46 – 7.94 (m, 12H, NH-Gly₂ {8.25}, NH-Gly₃ {8.22}, NH-Ser₃ {8.18}, NH-Gly₁ {8.16}, NH-Ala₄ {8.14}, NH-Asp {8.12}, NH-His {8.10}, NH-Ala₂ {8.06}, NH-Val {8.04}, NH-Ala₂ {8.02}, NH-Ser₁ {8.00}, NH-Ala₁ {7.97}), 7.88 (d, 1H, ³J_{NH,Arg α} = 7.0 Hz, NH-Arg), 7.82 (d, 1H, ³J_{NH,Ser} = 7.7 Hz, NH-Ser₂), 7.79 – 7.72 (m, 3H, NH-Thr₂ {7.76}, NH₂-Spa {7.75}), 7.60 (d, 1H, ³J_{NH,Ser α} = 8.9 Hz, NH-GalN^{Ser}), 7.41 – 7.34 (m, 2H, H_{4Ar}-His {7.38}, Thr₁ {7.36}), 7.05 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 8.3 Hz, NH-GalN^{Thr}), 5.32 – 5.21 (m, 2H, H4-GalN^{Ser/Thr} {5.28}), 5.00 – 4.91 (m, 3H, H1-GalN^{Thr} {4.98}, H3-GalN^{Ser/Thr} {4.96}), 4.81 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 3.5 Hz, H1-GalN^{Ser}), 4.63 – 4.38 (m, 10H, His ^{α} {4.58}, Pro₄ ^{α} {4.54}, Asp ^{α} {4.55}, Ala₁ ^{α} {4.49}, Arg ^{α} {4.49}, Val ^{α} {4.46}, Ala_(3,4) ^{α} {4.44}, Ser₃ ^{α} {4.44}, Ser₁ ^{α} {4.41}), 4.37 – 4.11 (m, 13H, Pro₃ ^{α} {4.30}, Pro_(1,2) ^{α} {4.27}, Pro₅ ^{α} {4.26}, Ser₂ ^{α} {4.25}, H2-GalN^{Ser/Thr} {4.23}, Thr₁ ^{α} {4.20}, Thr_(2,3) ^{α} {4.18}, H5-GalN^{Ser/Thr} {4.18}, Ala₂ ^{α} {4.15}, Thr₃ ^{β} {4.15}), 4.11 – 3.83 (m, 7H, Thr₂ ^{β} {4.15}, H6_a-GalN^{Ser/Thr} {4.03}, H6_b-GalN^{Ser/Thr} {3.98}, Thr₁ ^{β} {3.93}, Ala₃ ^{$\alpha\beta$} {3.88}), 3.82 – 3.26 (m, 28H, Gly_(1,2) ^{$\alpha\alpha$} {3.76}, Ser₂ ^{$\beta\alpha$} {3.74}, Gly_(1,2) ^{$\alpha\beta$} {3.72}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{δ} {3.69 – 3.43}, Ser₃ ^{$\beta\alpha\beta$} {3.63}, Ser₂ ^{$\beta\beta$} {3.62}, H3-Spa {3.61}, Ser₁ ^{$\beta\alpha$} {3.60}, H8-Spa {3.57}, H5-Spa {3.53}, H6-Spa {3.53}, Ser₁ ^{$\beta\beta$} {3.53}), 3.16 – 3.04 (m, 3H, His ^{$\beta\alpha$} {3.10}, Arg ^{δ} {3.09}), 3.02 – 2.92 (m, 3H, His ^{$\beta\beta$} {2.97}, H9-Spa {2.97, q, ³J_{H9-Spa,H8-Spa} \approx ³J_{H9-Spa,NH2-Spa} \approx 5.4 Hz}), 2.72 (dd, 1H, ³J_{Asp $\beta\alpha$,Asp α} = 6.0 Hz, ²J_{Asp $\beta\alpha$,Asp $\beta\beta$} = 16.4 Hz, Asp ^{$\beta\alpha$}), 2.46 (m, 1H, Asp ^{$\beta\beta$} {2.46}), 2.39 (t, 2H, ³J_{H2-Spa,H3-Spa} = 6.4 Hz, H2-Spa), 2.08 – 1.66 (m, 46H, Pro₄ ^{$\beta\alpha$} {2.14}), 2.10, 1.99, 1.98, 1.88, 1.88 (5 x CH₃-Ac), Pro₅ ^{$\beta\alpha$} {2.05}, Pro₃ ^{$\beta\alpha$} {2.03}, Val ^{β} {1.94}, 1.85, 1.81 (2 x CH₃-Ac), Pro_(1,2) ^{$\beta\alpha$} {1.84}, Pro₅ ^{$\beta\beta$} {1.84}, Pro_(1,2) ^{$\beta\beta$} {1.77}, Pro₃ ^{$\beta\beta$} {1.76}, Pro₄ ^{$\beta\beta$} {1.76}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{γ} {2.03 – 1.79}, Arg ^{$\beta\alpha$} {1.69}), 1.57 – 1.47 (m, 3H, Arg ^{$\beta\beta$} {1.52}, Arg ^{γ} {1.52}), 1.24 (d, 3H,

$^3J_{\text{Ala}\beta, \text{Ala}\alpha} = 6.4 \text{ Hz}$, Ala_4^β), 1.18 (m, 6H, $\text{Ala}_{(2,3)}^\beta$ {1.18}), 1.16 – 1.11 (m, 6H, Ala_1^β {1.15}, Thr_3^γ {1.15}), 1.02 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}\gamma, \text{Thr}\beta} = 6.3 \text{ Hz}$, Thr_2^γ), 0.99 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}\gamma, \text{Thr}\beta} = 6.3 \text{ Hz}$, Thr_1^γ), 0.90 (d, 3H, $^3J_{\text{Val}\gamma\alpha, \text{Val}\beta} = 6.5 \text{ Hz}$, $\text{Val}^{\gamma\alpha}$), 0.84 (d, 3H, $^3J_{\text{Val}\gamma\beta, \text{Val}\beta} = 6.6 \text{ Hz}$, $\text{Val}^{\gamma\beta}$).

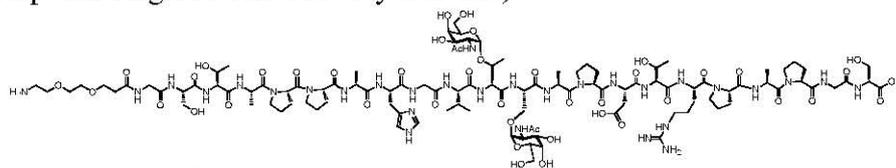
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1425.14$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1425.16).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1424.6522$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1424.6545).

$\text{C}_{120}\text{H}_{186}\text{N}_{30}\text{O}_{50}$ (2848.93)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanilamido-N-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin (146)

($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_2)_2\text{CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr}(\alpha\text{-GalNAc})\text{-Ser}(\alpha\text{-GalNAc})\text{-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH}$)



40 mg (14.0 μmol) des glycosylierten Docosapeptids **143** werden in 40 ml Methanol unter Kontrolle des pH-Wertes mit (pH =10) einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 18 h bei einem pH-Wert von 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt über die analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. $R_t = 18.77 \text{ min}$ (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1).

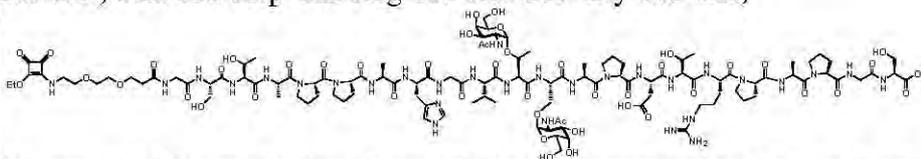
Rohausbeute: 54 mg (max. 37 mg, quant.), farbloses Lyophilisat.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1310.14$ ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1310.12).

$\text{C}_{108}\text{H}_{174}\text{N}_{30}\text{O}_{44}$ (2596.71)

1-(9-Amino-4,7-dioxa-nonanyl-amido-*N*-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin)-2-ethoxy-cyclobuten-3,4-dion (216)

(EtO-Squarat-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser(α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



Zu einer Lösung von 36 mg (14.09 μ mol) des glycosylierten Docosapeptids **146** in 8 ml Ethanol/Wasser (1:1) werden über eine 10 μ l Hamilton-Spritze 4.6 mg (27.1 μ mol, 1.92 Äquiv.) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion zugegeben. Anschließend wird eine gesättigte Natriumcarbonat-Lsg. mit einer 25 μ l Hamilton-Spritze zugetropft, bis sich ein pH-Wert von 8.5 einstellt. Der Reaktionsfortschritt wird durch analytische RP-HPLC verfolgt und die Reaktion nach 100 min durch Zugabe von 100 μ l konz. Essigsäure abgebrochen. Es wird mit 50 ml Toluol verdünnt, die Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids (124 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 34.42$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 25.27$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 24 mg (8.8 μ mol, 63 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{20} = -37.1$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC] (DMSO-*d*₆): $[\delta/ppm] = 8.96$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.83 (t, 0.5H, ³ $J_{NH,H9-Spa} = 6.1$ Hz, NH-Spa), 8.66 (t, 0.5H, ³ $J_{NH,H9-Spa} = 6.1$ Hz, NH-Spa), 8.32 – 8.02 (m, 11H, NH-Gly₂ {8.29}, NH-Asp {8.25}, NH-Gly₁ {8.24}, NH-Ala₃ {8.18}, NH-Ser_{TN} {8.18}, NH-Gly₂ {8.17}, NH-Ala₄ {8.16}, NH-His {8.12}, NH-Ala₂ {8.10}, NH-Arg {8.06}, NH-Thr_{TN} {8.05}), 7.99 (d, 2H, ³ $J_{NH,Ala\alpha} \approx ^3J_{NH,Ser\alpha} \approx 7.6$ Hz, NH-Ala₁, NH-Ser₁ {8.00}), 7.87 (d, 1H, ³ $J_{NH,Val\alpha} = 7.0$ Hz, NH-Val), 7.83 (d, 1H, ³ $J_{NH,Ser\alpha} = 7.7$ Hz, NH-Ser₂), 7.76 (d, 1H, ³ $J_{NH,Thr\alpha} = 8.7$ Hz, NH-Thr₂), 7.48 (m_c, 1H, NH-Guan), 7.38 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.35 (d, 1H, ³ $J_{NH,Thr\alpha} = 8.1$ Hz, NH-Thr₁), 7.27 (d, 1H, ³ $J_{NH,H2} = 9.4$ Hz, NH-GalN^{Ser}), 7.05 (d, 1H, ³ $J_{NH,H2} = 9.5$ Hz, NH-GalN^{Thr}), 4.72 (d, 1H, ³ $J_{H1,H2} = 3.9$ Hz, H1-GalN^{Thr}), 4.64 (p, 2H, ³ $J_{CH_2,CH_3} = 7.0$ Hz, CH₂-Squa), 4.60 – 4.38 (m, 12H, H1-GalN^{Ser} {4.60}, His ^{α} {4.58}, Pro₄ ^{α} {4.55}, Asp ^{α} {4.54}, Thr_{TN} ^{α} {4.51}, Arg ^{α} {4.50}, Val ^{α} {4.50}, Ala₁ ^{α} {4.49}, Ala₄ ^{α} {4.47}, Ser_{TN} ^{α} {4.45}, Ala₃ ^{α} {4.44}, Ser₁ ^{α} {4.42}), 4.37 – 4.22 (m, 5H, Pro₅ ^{α} {4.33}, Pro₃ ^{α} {4.30}, Pro_(1,2) ^{α} {4.27}, Ser₂ ^{α} {4.26}), 4.22 – 4.11 (m, 4H, Thr₁ ^{α} {4.20}, Thr₂ ^{α} {4.18}, Ala₂ ^{α} {4.15}, Thr_{TN} ^{β} {4.15}), 4.08 – 4.01 (m, 2H, H2-GalN^{Ser} {4.06}, Thr₂ ^{β}

{4.06}), 4.00 – 3.85 (m, 3H, H2-GalN^{Thr} {3.98}, Thr₁^β {3.94}, Gly₁^{αa} {3.89}), 3.78 – 3.39 (m, 42H, Gly₁^{ob} {3.76}, Gly_(2,3)^{αa} {3.76}, Gly_(2,3)^{ob} {3.76}, Ser₂^{βa} {3.74}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.72 – 3.39}, H4-GalN^{Ser/Thr} {3.70}, H5-GalN^{Thr} {3.65}, Ser₂^{βb} {3.64}, Ser_{TN}^{βab} {3.63}, H3-GalN^{Thr} {3.62}, H9_a-Spa {3.62}, Ser₁^{βa} {3.61}, H3-Spa {3.59}, H8-Spa {3.58}, H3-GalN^{Ser} {3.57}, H5-GalN^{Ser} {3.56}, Ser₁^{βb} {3.54}, H6_a-GalN^{Ser/Thr} {3.51}, H6-Spa {3.51}, H5-Spa {3.48}, H6_b-GalN^{Ser/Thr} {3.44}, H9_b-Spa {3.43}), 3.15 – 3.02 (m, 3H, His^{βa} {3.11}, Arg^δ {3.10}), 2.98 (dd, 1H, ³J_{Hisβb,Hisα} = 7.6 Hz, ³J_{Hisβb,Hisβa} = 15.2 Hz, His^{βb}), 2.71 (dd, 1H, ³J_{Aspβa,Aspα} = 6.2 Hz, ²J_{Aspβa,Aspβb} = 16.4 Hz, Asp^{βa}), 2.50 (m_c, 1H, Asp^{βb} {2.51}), 2.36 (t, 2H, ³J_{H2,H3} = 6.4 Hz, H2-Spa), 2.18 – 2.10 (m, 1H, Pro₄^{βa} {2.13}), 2.08 – 1.66 (m, 27H, Pro₅^{βa} {2.04}, Val^β {1.98}, Pro₃^{βa} {1.98}, 1.88, 1.86 (2x CH₃-Ac), Pro₃^{βb} {1.86}, Pro_(1,2)^{βa} {1.84}, Pro₅^{βb} {1.78}, Pro_(1,2)^{βb} {1.77}, Pro₄^{βb} {1.75}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.07 – 1.75}, Arg^{βa} {1.69}), 1.57 – 1.45 (m, 3H, Arg^{βb} {1.52}, Arg^γ {1.52}), 1.36 (t, 3H, ³J_{CH₃,CH₂} = 7.0 Hz, CH₃-Squa), 1.20 (d, 3H, ³J_{Alaβ,Alaα□} = 6.7 Hz, Ala₄^β), 1.19 – 1.16 (m, 6H, Ala_(2,3)^β {1.18}), 1.15 (d, 3H, ³J_{Alaβ,Alaα□} = 6.8 Hz, Ala₁^β), 1.12 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 5.7 Hz, Thr_{TN}^γ), 1.02 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 6.3 Hz, Thr₂^γ), 0.99 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 6.1 Hz, Thr₁^γ), 0.90 (d, 3H, ³J_{Valγa,Valβ} = 6.5 Hz, Val^{γa}), 0.84 (d, 3H, ³J_{Valγb,Valβ} = 6.6 Hz, Val^{γb}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 189.39, 189.22 (2 x C=O-Squa), 182.24, 182.08 (COOH-Asp, COOH-Pro), 177.04, 176.73, 172.98, 172.49, 171.99, 171.93, 171.84, 171.82, 171.72, 171.14, 171.02, 170.60, 170.57, 170.39, 170.25, 170.12, 169.99, 169.97, 169.89, 169.87, 169.56, 169.38, 169.01, 168.92, 168.85, 168.77 (C=O), 156.67 (C=N-Guan), 133.73 (C2-Imidazol), 129.12 (C5-Imidazol), 117.12 (C4-Imidazol), 99.21 (C1-GalN^{Thr}), 98.27 (C1-GalN^{Ser}), 75.75 (Thr_{TN}^β), 71.89 (C5-GalN^{Thr}), 71.84 (C5-GalN^{Ser}), 69.97, 69.93 (C5-Spa, C6-Spa, C8-Spa), 69.25 (CH₂-Squa), 69.09 (C3-GalN^{Thr}), 68.60 (C3-GalN^{Ser}), 68.54 (C4-GalN^{Ser/Thr}), 67.22 (Ser_{TN}^β), 67.21 (Thr₁^β), 67.06 (C3-Spa), 62.01 (Ser₁^β), 61.88 (Ser₂^β), 61.01 (C6-GalN^{Ser/Thr}), 60.15 (Pro_(1,2)^α), 59.59 (Pro₃^α), 59.55 (Pro₅^α), 58.44 (Thr₂^α), 58.32 (Thr₁^α), 58.01 (Pro₄^α), 57.59 (Val^α), 56.43 (Thr_{TN}^α), 55.22 (Ser₁^α), 55.11 (Ser₂^α), 52.43 (Ser_{TN}^α), 51.77 (His^α), 50.46 (Arg^α), 49.85 (Asp^α), 49.72 (C2-GalN^{Thr}), 49.62 (C2-GalN^{Ser}), 48.83 (Ala₂^α), 47.11 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.78, 46.75 (Ala_(1,3,4)^α), 44.16 (C9-Spa), 42.33 (Gly₁^α), 42.28 (Gly_(2,3)^α), 40.97 (Arg^δ), 36.24 (C2-Spa), 36.04 (Asp^β), 31.47 (Val^β), 29.51 (Pro₃^β), 29.47 (Pro₅^β), 29.26 (Pro_(1,2)^β), 28.82 (Arg^β), 28.22 (Pro₄^β), 27.41 (His^β), 25.00, 24.92 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 24.92 (Arg^γ), 23.41, 23.35 (2 x CH₃-Ac), 20.26 (Thr₂^γ), 20.06 (Thr₁^γ), 19.72 (Val^{γa}), 19.24 (Thr_{TN}^γ), 18.63 (Val^{γb}), 17.32, 17.20 (Ala_(1,2,3,4)^β), 16.09 (CH₃-Squa).

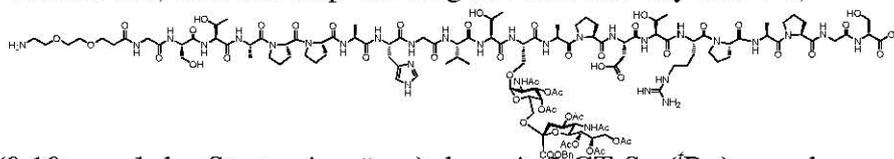
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1361.19$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1361.14).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1360.6339$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1360.6309).

$C_{114}H_{178}N_{30}O_{47}$ (2720.81)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanyl-amido-N-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-O-(2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin (144)

$(H_2N-(CH_2CH_2O)_2(CH_2)_2CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(\alpha-Ac_4-NeuNAcCOOBn-(2-6)-\alpha-GalAc_2NAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)$



Ausgehend von 128 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Ser(^tBu) versehenen Polystyrol-Harzes **142** (Beladung: 0.78 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Dabei erfolgt für die erste Aminosäure Glycin eine Doppelkupplung. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure **31** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 186.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OH (**31**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 25.0 mg (0.184 mmol, 1.84 Äquiv.) HOAt, 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Threonin und L-Valin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die restlichen zehn Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Anbindung des Diethylenglycolspacers erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung von 160.0 mg (0.400 mmol, 4.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 167.0 mg (0.439 mmol, 4.39 Äquiv.) HATU, 62.0 mg (0.456 mmol, 4.56 Äquiv.) HOAt, 89.0 mg (0.880 mmol, 8.80 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP und 16 h Vortex (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Schließlich wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 327 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 199$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz im Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem

Wasser 1 h geschüttelt. Nach Aufarbeitung wird ein gelber Rückstand (192 mg) erhalten. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC.

$R_t = 20.05$ min (Gerät 1, Säule: Ana-1, Gradient: Ana-8), $R_t = 44.68$ min (Gerät 2, Säule: Semipräp-1, Gradient: Semipräp-4).

Ausbeute: 73 mg (24.0 μmol , 24 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -64.1$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz- $^1\text{H-NMR}$ [$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, HMBC] ($\text{DMSO-}d_6$): $[\delta/\text{ppm}] = 8.33 - 8.14$ (m, 6H, NH-Gly₃ {8.30}, NH-Gly₁ {8.26}, NH-Ser_{STN} {8.25}, NH-Asp₁ {8.22}, NH-Gly₂ {8.20}, NH-Ala₂ {8.18}), 8.14 – 7.93 (m, 5H, NH-Ala₄ {8.10}, NH-His₁ {8.08}, NH-Ser₁ {8.04}, NH-Arg₁ {8.01}, NH-Thr₃ {7.96}), 7.90 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Ala}\alpha} = 6.9$ Hz, NH-Ala₁), 7.83 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Ser}\alpha} = 7.6$ Hz, NH-Ser₂), 7.81 – 7.73 (m, 3H, NH-Thr₁ {7.79}, NH-Val₁ {7.79}, NH-Sia {7.77}), 7.54 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,H2}} = 8.8$ Hz, NH-GalN), 7.45 – 7.30 (m, 8H, NH-Thr₂ {7.36}, H_{4Ar}-His {7.35}, H_{Ar}-Bn), 5.26 (d, 1H, $^2J_{\text{CH2a,CH2b}} = 12.5$ Hz, CH_{2a}-Bn), 5.22 (td, 1H, $^3J_{\text{H8,H9b}} \approx 8.4$ Hz, $^3J_{\text{H8,H7}} \approx ^3J_{\text{H8,H9a}} \approx 4.5$ Hz, H8-Sia), 5.20 – 5.13 (m 3H, CH_{2b}-Bn {5.19}, H4-GalN {5.19}, H7-Sia {5.18}), 4.90 (d, 1H, $^3J_{\text{H3,H2}} \approx 12.6$ Hz, H3-GalN), 4.77 (d, 1H, $^3J_{\text{H1,H2}} \approx 5.3$ Hz, H1-GalN), 4.71 (td, 1H, $^3J_{\text{H4,H3ax}} \approx ^3J_{\text{H4,H5}} \approx 10.6$ Hz, $^3J_{\text{H4,H3aq}} = 4.6$ Hz, H4-Sia), 4.61 – 4.23 (m, 16H, His ^{α} {4.57}, Asp ^{α} {4.56}, Pro₄ ^{α} {4.55}, Ala₁ ^{α} {4.50}, Ser_{STN} ^{α} {4.49}, Arg ^{α} {4.48}, Ala₂ ^{α} {4.44}, Ser₁ ^{α} {4.42}, Thr₃ ^{α} {4.39}, Pro_(1,2) ^{α} {4.34}, Pro₃ ^{α} {4.32}, Val ^{α} {4.30}, Pro₅ ^{α} {4.27}, Ala₃ ^{α} {4.26}, Ser₂ ^{α} {4.26}), 4.22 – 4.10 (m, 5H, H2-GalN {4.21}, Thr_(1,2) ^{α} {4.20}, Ala₄ ^{α} {4.16}, H9_a-Sia {4.15}), 4.05 (m, 1H, Thr₂ ^{β}), 4.02 – 3.82 (m, 8H, H6-Sia {4.01}, H9_b-Sia {4.00}, H5-GalN {3.99}, Thr₃ ^{β} {3.98}, Thr₁ ^{β} {3.94}, H5-Sia {3.91}, Gly₁ ^{α} {3.89}), 3.80 – 3.42 (m, 30H, Gly₂ ^{α} {3.77}, Ser_{STN} ^{$\beta\alpha$} {3.77}, Thr₁ ^{β} {3.74}, Ser₂ ^{$\beta\alpha$} {3.74}, Gly₃ ^{α} {3.73}, H6_a-GalN {3.72}, Ser_{STN} ^{$\beta\beta$} {3.71}, Ser₂ ^{$\beta\beta$} {3.63}, Ser₁ ^{$\beta\alpha$} {3.62}, H3-Spa {3.61}, H8-Spa {3.58}, H6-Spa {3.54}, H5-Spa {3.54}, Ser₁ ^{$\beta\beta$} {3.53}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{δ} {3.73 – 3.30}), 3.15 – 3.04 (m, 4H, H6_b-GalN {3.14}, His ^{$\beta\alpha$} {3.10}, Arg ^{δ} {3.10}), 2.96 (m, 3H, His ^{$\beta\beta$} {2.98}, H9-Spa {2.98}), 2.72 (dd, 1H, $^3J_{\text{Asp}\beta\alpha,\text{Asp}\alpha} = 6.5$ Hz, $^2J_{\text{Asp}\beta\alpha,\text{Asp}\beta\beta} = 16.5$ Hz, Asp ^{$\beta\alpha$}), 2.56 (dd, 1H, $^3J_{\text{H3aq,H4}} = 4.6$ Hz, $^2J_{\text{H3aq,H3ax}} = 9.5$ Hz, H3_{aq}-Sia), 2.44 (dd, 1H, $^3J_{\text{Asp}\beta\beta,\text{Asp}\alpha} = 6.5$ Hz, $^2J_{\text{Asp}\beta\beta,\text{Asp}\beta\alpha} = 16.5$ Hz, Asp ^{$\beta\beta$}), 2.39 (t, 1H, $^3J_{\text{H2,H3}} = 6.3$ Hz, H2-Spa), 2.17 – 1.72 (m, 42H, Pro₄ ^{$\beta\alpha$} {2.13}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{γ} {2.07 – 1.75}, Pro₃ ^{$\beta\alpha$} {2.05}, 2.04, 2.00 (2 x CH₃-Ac), Val ^{β} (2.00), Pro₃ ^{$\beta\beta$} {2.00}, 1.96, 1.93, 1.88, 1.86 (4 x CH₃-Ac), Pro₅ ^{$\beta\alpha$} {1.85}, Pro_(1,2) ^{$\beta\alpha$} {1.84}, 1.82 (CH₃-Ac), Pro₅ ^{$\beta\beta$} {1.81}, Pro_(1,2) ^{$\beta\beta$} {1.78}, Pro₄ ^{$\beta\beta$} {1.77}), 1.67 (m, 5H, Arg ^{$\beta\alpha$} {1.69}, CH₃-Ac {1.68}, H3_{ax}-Sia {1.66}), 1.56 – 1.46 (m, 3H, Arg ^{$\beta\beta$} {1.53}, Arg ^{γ} {1.53}), 1.21 – 1.16 (m, 9H, Ala_(2,4) ^{β} {1.19}, Ala₁ ^{β} {1.17}), 1.15 (d, 3H, $^3J_{\text{Ala}\beta,\text{Ala}\alpha} = 6.9$ Hz, Ala₃ ^{β}), 1.06 – 1.02 (m, 6H, Thr₃ ^{γ} {1.04}, Thr₂ ^{γ} {1.02}), 0.98 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}\gamma,\text{Thr}\beta} = 6.3$ Hz, Thr₁ ^{γ}), 0.84 (d, 3H, $^3J_{\text{Val}\gamma\alpha,\text{Val}\beta} = 6.6$ Hz, Val ^{$\gamma\alpha$}), 0.81 (d, 3H, $^3J_{\text{Val}\gamma\beta,\text{Val}\beta} = 6.6$ Hz, Val ^{$\gamma\beta$}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-d₆): [δ/ppm] = 172.45, 171.95, 171.84, 171.69, 171.14, 170.95, 170.66, 170.53, 170.39, 170.26, 170.11, 169.93, 169.90, 169.83, 169.72, 169.57, 169.43, 169.39, 169.39, 169.28, 169.28, 169.01, 168.86, 168.79, 166.69, 158.45, 158.25, 158.04, 157.84, 156.74 (C=O, C1-Sia), 135.06, 133.86, 133.85 (C_{ipso}-Ph, C2-Imidazol C5-Imidazol), 128.57, 128.48, 127.93 (C_{o,m,p}-Ph), 117.21 (C4-Imidazol), 98.14 (C2-Sia), 97.71 (C1-GalN), 72.29 (C6-Sia), 69.99, 69.79 (C5-Spa, C6-Spa, C8-Spa), 69.43 (C4-Sia), 68.37 (C3-GalN), 67.82 (CH₂-Bn), 67.66 (C8-Sia), 67.23 (Thr₁^β), 67.19 (Thr₃^β, C5-GalN), 67.10 (Ser_{STN}^β), 67.07 (C4-GalN, C7-Sia), 67.05 (C3-Spa), 66.74 (Thr₂^β), 62.88 (C6-GalN), 62.38 (C9-Sia), 62.10 (Ser₁^β), 61.89 (Ser₂^β), 60.10 (Pro₅^α), 59.50 (Pro₃^α), 59.30 (Pro₂^α), 58.33 (Thr_(1,2)^α), 58.20 (Pro₁^α), 58.15 (Thr₃^α), 58.06 (Val^α), 57.97 (Pro₄^α), 55.14 (Ser₁^α), 55.08 (Ser₂^α), 52.54 (Ser_{STN}^α), 51.86 (His^α), 50.51 (Arg^α), 49.74 (Asp^α), 48.77 (Ala₄^α), 48.02 (C5-Sia), 47.13, 47.08, 47.05, 47.03 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.89 (C2-GalN, Ala₃^α), 46.76 (Ala₁^α), 46.71 (Ala₂^α), 42.29, 42.28, 42.27 (Gly_(1,2,3)^α), 40.99 (Arg^δ), 38.99 (C9-Spa), 38.09 (C3-Sia), 36.20 (C2-Spa), 36.16 (Asp^β), 31.02 (Val^β), 29.49, 29.37, 29.20 (Pro_(1,2,3,5)^β), 28.73 (Arg^β), 28.13 (Pro₄^β), 27.68 (His^β), 24.98 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 24.91 (Arg^γ), 23.14, 23.12, 23.05, 21.13, 21.06, 21.02, 21.02 (7 x CH₃-Ac), 20.08 (Thr_(2,3)^γ), 20.04 (Thr₁^γ), 19.64 (Val^{γa}), 18.41 (Val^{γb}), 17.28, 17.25, 16.85, 16.49 (Ala_(1,2,3,4)^β).

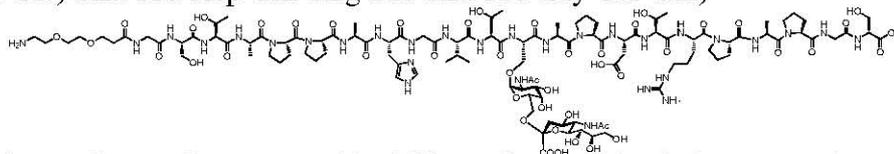
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1009.82 ([M+3H]³⁺, ber.: 1009.79).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1513.6881 ([M+2H]²⁺, ber.: 1513.6861).

C₁₃₀H₁₉₆N₃₀O₅₃ (3027.12)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanilamido-N-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin (147)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α-NeuNAcCOOBn-(2-6)-α-GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



35 mg (11.6 μmol) des glycosylierten Docosapeptids **144** werden in 30 ml einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung mit einem pH-Wert von 11.5 gelöst. Durch tropfenweise Zugabe einer wässrigen Lösung des pH-Wertes 13 reguliert man den pH-Wert nach und bringt ihn auf 11.5. Der Reaktionsfortschritt wird durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe

wässriger Natriumhydroxid-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des Peptids (100 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 18.35$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 26.50$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

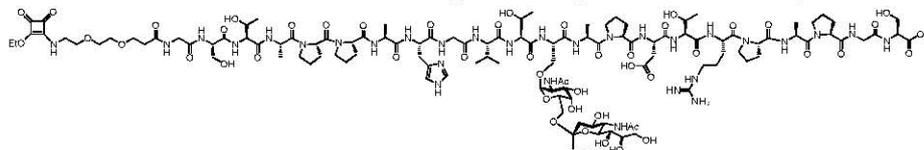
Ausbeute: 27 mg (10.0 μmol , 87 %); farbloses Lyophilisat.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1343.17$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1343.40).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1342.6284$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1342.6309).

$C_{111}H_{178}N_{30}O_{47}$ (2684.77)

1-(9-Amino-4,7-dioxa-nonanilamido-N-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-O-(2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin)-2-ethoxy-cyclobuten-3,4-dion (218)
(EtO-Squarat-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α -NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



Zu einer Lösung von 28 mg (10.43 μmol) des glycosylierten Docosapeptids **147** in 7 ml Ethanol/Wasser (1:1) werden über eine 10 μl Hamilton-Spritze 3.4 mg (20.02 μmol , 1.92 Äquiv.) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion zugegeben. Anschließend wird eine gesättigte Natriumcarbonat-Lsg. mit einer 25 μl Hamilton-Spritze zugetropft, bis sich ein pH-Wert von 8.5 einstellt. Der Reaktionsfortschritt wird über die analytische RP-HPLC verfolgt und die Reaktion nach 100 min durch Zugabe von 100 μl konz. Essigsäure abgebrochen. Es wird mit 50 ml Toluol verdünnt, die Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. evaporiert und dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids (66 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 21.25$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 29.83$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 20 mg (7.1 μmol , 68 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -71.5$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): $[\delta/\text{ppm}] = 8.96$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.83 (t, 0.5H, ³ $J_{\text{NH,H9-Spa}} = 6.1$ Hz, NH-Spa), 8.66 (t, 0.5H, ³ $J_{\text{NH,H9-Spa}} = 6.1$ Hz, NH-Spa), 8.32 – 7.96 (m, 15H, NH-Asp {8.28}, NH-Gly₁ {8.26}, NH-Ser_{STN} {8.18}, NH-Ala_(3,4) {8.17}, NH-Gly_(2,3) {8.17}, NH-His {8.10}, NH-Ala₂ {8.09}, NH-Sia {8.06}, NH-Val {8.06},

NH-Arg {8.02}, NH-Thr₃ {8.01}, NH-Ala₃ {8.01}, NH-Ser₁ {8.00}), 7.92 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Ser}\alpha} = 8.3$ Hz, NH-Ser_{STN}), 7.87 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Ala}\alpha} = 6.8$ Hz, NH-Ala₁), 7.84 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Ser}\alpha} = 7.7$ Hz, NH-Ser₂), 7.76 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 8.7$ Hz, NH-Thr₂), 7.48 (m_c, 1H, NH-Guan), 7.40 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.34 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 8.4$ Hz, NH-Thr₁), 7.24 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,H2}} = 8.9$ Hz, NH-GalN), 4.64 (q, 2H, $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.0$ Hz, CH₂-Squa), 4.60 – 4.38 (m, 10H, H1-GalN {4.58}, His^α {4.57}, Asp^α {4.56}, Ala₄^α {4.56}, Pro₄^α {4.55}, Arg^α {4.50}, Ala₁^α {4.49}, Ser_{STN}^α {4.46}, Ala₃^α {4.44}, Ser₁^α {4.40}), 4.37 – 4.23 (m, 6H, Pro_(1,2)^α {4.35}, Thr₃^α {4.35}, Pro₃^α {4.33}, Pro₄^α {4.27}, Ser₂^α {4.25}), 4.22 – 4.09 (m, 4H, Thr₁^α {4.20}, Thr₂^α {4.17}, Ala₂^α {4.15}), 4.08 – 3.86 (m, 5H, Thr₂^β {4.05}, H2-GalN {4.04}, Thr₃^β {3.99}, Thr₁^β {3.94}, Gly₁^{αa} {3.90}), 3.79 – 3.36 (m, 42H, Gly_(2,3)^{αa} {3.76}, Ser₂^{βa} {3.75}, Gly_(1,2,3)^{ob} {3.73}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.72 – 3.32}, H6_a-GalN {3.69}, H5-GalN {3.65}, Ser₂^{βb} {3.64}, H4-GalN {3.64}, Ser_{STN}^{βab} {3.63}, H9_a-Spa {3.63}, H6_b-GalN {3.62}, Ser₁^{βa} {3.62}, H8-Sia {3.61}, H3-Spa {3.58}, H4-Sia {3.57}, H3-GalN {3.56}, Ser₁^{βb} {3.53}, H5-Sia {3.51}, H9_a-Sia {3.51}, H5-Spa {3.50}, H6-Spa {3.50}, H8-Spa {3.47}, H9_b-Spa {3.43}, H9_b-Sia {3.39}), 3.35 – 3.28 (m, 2H, H6-Sia {3.34}, H7-Sia {3.32}), 3.14 – 3.03 (m, 3H, His^{βa} {3.10}, Arg^δ {3.10}), 2.98 (dd, 1H, $^3J_{\text{His}\beta\text{b},\text{His}\alpha} = 7.3$ Hz, $^3J_{\text{His}\beta\text{b},\text{His}\beta\text{a}} = 15.5$ Hz, His^{βb}), 2.72 (dd, 1H, $^3J_{\text{Asp}\beta\text{a},\text{Asp}\alpha} = 6.3$ Hz, $^2J_{\text{Asp}\beta\text{a},\text{Asp}\beta\text{b}} = 16.5$ Hz, Asp^{βa}), 2.55 – 2.48 (m_c, 2H, H3_{aq}-Sia {2.53}, Asp^{βb} {2.49}), 2.36 (t, 1H, $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 6.5$ Hz, H2-Spa), 2.19 – 2.09 (m, 1H, Pro₄^{βa} {2.13}), 2.09 – 1.72 (m, 25H, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.06 – 1.75}, Pro₅^{βa} {2.05}, Pro₃^{βa} {2.03}, Val^β {2.01}, 1.88, 1.84 (2 x CH₃-Ac), Pro^{βa}_(1,2) {1.84}, Pro₅^{βb} {1.83}, Pro₃^{βb} {1.78}, Pro_(1,2)^{βb} {1.77}, Pro₄^{βb} {1.76}), 1.72 – 1.63 (m, 1H, Arg^{βa} {1.69}), 1.56 – 1.46 (m, 4H, Arg^{βb} {1.52}, Arg^γ {1.53}, H3_{ax}-Sia {1.52}), 1.36 (t, 3H, $^3J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7.1$ Hz, CH₃-Squa), 1.21 – 1.16 (m, 9H, Ala_(2,3,4)^β), 1.15 (d, 3H, $^3J_{\text{Ala}\beta,\text{Ala}\alpha} = 6.8$ Hz, Ala₁^β), 1.04 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}\gamma,\text{Thr}\beta} = 6.2$ Hz, Thr₃^γ), 1.02 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}\gamma,\text{Thr}\beta} = 6.3$ Hz, Thr₂^γ), 0.99 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}\gamma,\text{Thr}\beta} = 6.0$ Hz, Thr₁^γ), 0.86 (d, 3H, $^3J_{\text{Val}\gamma\text{a},\text{Val}\beta} = 6.5$ Hz, Val^{γa}), 0.82 (d, 3H, $^3J_{\text{Val}\gamma\text{b},\text{Val}\beta} = 6.5$ Hz, Val^{γb}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-d₆): [δ/ppm] = 189.39, 189.22 (2 x C=O-Squa), 182.24, 182.08 (COOH-Asp, COOH-Pro), 177.03, 176.72, 172.98, 172.48, 171.97, 171.92, 171.84, 171.76, 171.70, 171.12, 170.56, 170.51, 170.39, 170.24, 170.00, 169.88, 169.86, 169.64, 169.55, 169.38, 169.00, 168.85 (C=O, C1-Sia), 156.66 (C=N-Guan), 133.93 (C2-Imidazol), 129.43 (C5-Imidazol), 117.45 (C4-Imidazol), 98.18 (C1-GalN), 97.82 (C2-Sia), 74.03 (C6-Sia), 71.90 (C8-Sia), 69.98, 69.94 (C5-Spa, C6-Spa, C8-Spa), 69.89 (C5-GalN), 69.12 (CH₂-Squa), 68.88 (C7-Sia), 68.59 (H4-GalN), 68.57 (C4-Sia), 68.37 (C3-GalN), 67.31 (Thr₁^β), 67.14 (C3-Spa), 67.03 (Thr₃^β), 66.91 (Ser_{STN}^β), 66.70 (Thr₂^β), 63.42

(C9-Sia), 63.37 (C6-GalN), 62.18 (Ser₁^β), 61.87 (Ser₂^β), 59.90 (Pro₅^α), 59.53 (Pro₃^α), 58.24 (Thr_(1,2)^α), 58.20 (Pro_(1,2)^α), 58.19 (Thr₃^α), 58.07 (Val^α), 57.97 (Pro₄^α), 55.16 (Ser₁^α), 55.10 (Ser₂^α), 52.67 (C5-Sia), 52.48 (Ser_{STN}^α), 51.77 (His^α), 40.47 (Arg^α), 49.81 (Asp^α), 49.49 (C2-GalN), 48.88 (Ala₂^α), 47.15 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.75 (Ala₃^α), 46.72 (Ala₁^α), 46.68 (Ala₄^α), 43.69 (C9-Spa), 42.30 (Gly₁^α), 42.27 (Gly_(2,3)^α), 40.99 (Arg^δ), 41.18 (C3-Sia), 36.29 (H2-Spa), 36.01 (Asp^β), 31.12 (Val^β), 29.52, 29.49, 29.37 (Pro_(1,2,3,5)^β), 28.81 (Arg^β), 28.20 (Pro₄^β), 27.47 (His^β), 24.91 (Arg^γ), 24.85 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 23.37, 23.16 (2 x CH₃-Ac), 20.20 (Thr₂^γ), 20.04 (Thr₁^γ), 20.01 (Thr₃^γ), 19.69 (Val^{γa}), 18.44 (Val^{γb}), 17.37 (Ala_(2,3,4)^β), 17.27 (Ala₁^β), 16.11 (CH₃-Squa).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1405.18$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1405.14).

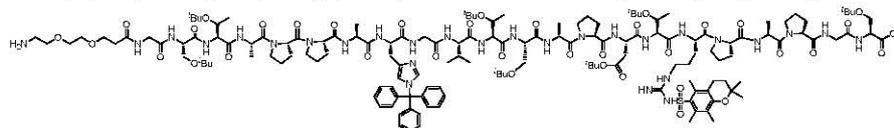
HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1404.6384$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1404.6389).

C₁₁₇H₁₈₂N₃₀O₅₀ (2808.87)

5.10.2.3 Die Synthese von geschützten glycosylierten Docosapeptiden

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{lm}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (148)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^tBu)-Thr(^tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(^tBu)-Ser(^tBu)-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



Ausgehend von 128 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Ser(^tBu) versehenen Polystyrol-Harzes **142** (Beladung: 0.78 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der automatisierten Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Für die erste Aminosäure Glycin erfolgt eine Doppelkupplung. Die Anbindung des Diethylglycolspacers **63** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung bestehend aus 160.0 mg (0.400 mmol, 4.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 167.0 mg (0.439 mmol, 4.39 Äquiv.) HATU, 62.0 mg (0.456 mmol, 4.56 Äquiv.) HOAt, 89.0 mg (0.880 mmol, 8.80 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP und 16 h Vortex (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und

Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Nach der Festphasensynthese werden 452 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 324$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz im Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer Mischung aus Dichlormethan und Hexafluoroisopropanol (HFIP) (4:1) geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der farblose Rückstand (265 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 22.43$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 48.42$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-2).

Ausbeute: 166 mg (0.054 mmol, 54 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -29.1$ ($c = 1.00$, CDCl_3).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 8.27 - 7.52$ (m, 14H, $\text{H}_{2\text{Ar}}\text{-His}$ (s, 1H, {8.24}), NH-His {8.20}, NH-Gly₂ {8.15}, NH-Gly₁ {8.10}, NH-Gly₃ {8.01}, NH-Asp {7.79}, NH-Ala₁ {7.79}, NH₂-Spa {7.72}, NH-Ser₂ {7.70}, NH-Ala₃ {7.62}, NH-Val {7.62}, NH-Ser₁ {7.58}, NH-Thr₁ {7.58}), 7.42 - 7.36 (m, 10H, $\text{H}_{\text{meta}}\text{-Trt}$, $\text{H}_{\text{para}}\text{-Trt}$, NH-Ala₂ {7.45}), 7.30 - 7.24 (m, 1H, NH-Ser₃ {7.27}), 7.13 - 7.05 (m, 6H, $\text{H}_{\text{ortho}}\text{-Trt}$), 7.00 - 6.96 (sb, 1H, $\text{H}_{4\text{Ar}}\text{-His}$ {6.98}), 4.76 - 4.15 (m, 20H, His^α {4.72}, Asp^α {4.69}, Ala_(1,4)^α {4.67}, Pro₅^α {4.60}, Ser₁^α {4.57}, Ser₃^α {4.55}, Ala₃^α {4.52}, Pro_(3,4)^α {4.52}, Val^α {4.51}, Thr_(2,3)^α {4.45}, Pro_(1,2)^α {4.44}, Ser₂^α {4.35}, Thr₃^β {4.28}, Thr₂^β {4.26}, Thr₁^α {4.25}, Ala₂^α {4.17}), 4.14 - 3.36 (m, 32H, Gly_(1,2,3)^α {4.15 - 3.77}, Thr₁^β {4.11}, Ser₃^{βa} {3.85}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.83 - 3.46}, H3-Spa {3.76}, Ser₁^{βa} {3.75}, H8-Spa {3.73}, Ser₂^{βa} {3.71}, H6-Spa {3.64}, Ser₂^{βb} {3.62}, H5-Spa {3.61}, Ser₁^{βb} {3.58}, Ser₃^{βb} {3.49}, His^{βa} {3.45}), 3.23 - 3.11 (m, 3H, His^{βb} {3.21}, H9-Spa {3.17}), 2.88 - 2.75 (m, 1H, Asp^{βa} {2.81}), 2.75 - 2.58 (m, 3H, Asp^{βb} {2.66}, H4-Pmc {2.63}), 2.58 - 2.45 (m, 8H, H2-Spa {2.55}, 2 x CH₃-Pmc {2.50}), 2.31 - 1.53 (m, 30H, Pro_(1,2,3,4,5)^β {2.28 - 1.87}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.17 - 1.89}, Val^β {2.11}, H9a-Pmc {2.10}, Arg^{βa} {1.93}, Arg^{βb} {1.85}, 1.81 (t, ³J_{H3-Pmc,H4-Pmc} = 6.6 Hz, H3-Pmc), Arg^γ {1.64}), 1.46 - 1.09 (m, 84H, 1.40 (s, 9H, CH₃-^tBu), Ala₄^β {1.36}, Ala_(2,3)^β {1.32}, 1.31 (2 x s, 6H, H2a-Pmc), Ala₁^β {1.28}, 1.25 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.21 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.15 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.14 (s, 9H, CH₃-^tBu), Thr₃^γ {1.13}, 1.12 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.11 (s, 9H, CH₃-^tBu)), 1.09 - 0.99 (m, 6H, Thr₂^γ {1.07}, Thr₁^γ {1.05}), 0.93 - 0.85 (m, 6H, Val^{γab} {0.88}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMBC] (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 139.74$ ($\text{C}_{\text{ipso}}\text{-Trt}$), 129.52, 129.28, 128.80 ($\text{C}_{\text{ortho}}\text{-Trt}$, $\text{C}_{\text{meta}}\text{-Trt}$, $\text{C}_{\text{para}}\text{-Trt}$), 117.24 (C6-/C8-Pmc), 70.00 (C5-Spa), 69.98 (C6-Spa), 66.78 (C3-Spa), 66.72 (C8-Spa), 66.35 (Thr₁^β), 66.34 (Thr_(2,3)^β), 61.33 (Ser₃^β),

61.12 (Ser₁^β), 60.62 (Ser₂^β), 60.56 (Pro_(1,2)^α), 60.56 (Thr₃^α), 60.45 (Pro_(3,4)^α), 60.45 (Val^α), 59.17 (Pro₅^α), 59.07 (Thr₁^α), 58.27 (Thr₂^α), 54.63 (Ser₂^α), 53.38 (Ser₃^α), 53.24 (Ser₁^α), 53.20 (His^α), 50.42 (Ala₂^α), 50.17 (Asp^α), 47.58 (Ala₃^α), 47.30 (Ala_(1,4)^α), 47.29 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 42.92 (Gly_(1,2,3)^α), 39.77 (C9-Spa), 36.69 (Asp^β), 35.95 (C2-Spa), 32.39 (C3-Pmc), 30.26 (Val^β), 28.53 (Pro_(2,3,4,5)^β), 28.30, 28.05, 27.85, 27.51, 27.42, 27.27 (7 x CH₃-^tBu), 27.90 (Pro₁^β), 27.85 (2 x C2a-Pmc), 26.98 (His^β), 25.03 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 23.74 (Arg^γ), 21.22 (C4-Pmc), 20.01 (Thr₃^γ), 18.72 (Thr₁^γ), 18.58 (Val^{γab}), 17.84 (C6a-/C8a-Pmc), 17.65 (Thr₂^γ), 17.44 (Ala₁^β), 16.58 (Ala_(2,3,4)^β), 11.98 (C9a-Pmc).

Aufgrund der schlechten Spektrenqualität konnten nicht alle Signale identifiziert werden.

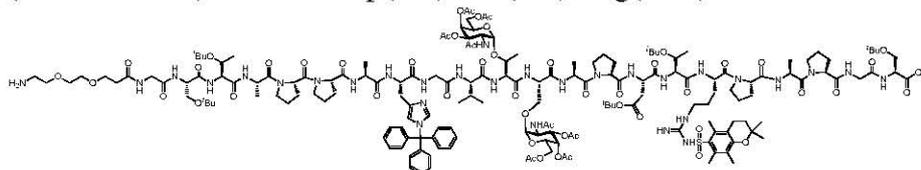
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1557.95$ ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1557.86).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1545.8616$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1545.8616).

C₁₅₃H₂₃₆N₂₈O₃₇S (3091.74)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{lm}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*^z-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (149)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^tBu)-Thr(^tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(α -GalAc₃Nac)-Ser(α -GalAc₃Nac)-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



Ausgehend von 128 mg (0.10 mmol der Startamino-säure) des mit 2-CT-Ser(^tBu) versehenen Polystyrol-Harzes **142** (Beladung: 0.78 mmol/g) wird das Peptid nach der gleichen Vorschrift wie für Verbindung **143** aufgebaut. Nach der Festphasensynthese werden 405 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 277$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz in einem Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer Mischung aus Dichlormethan und Hexafluoroisopropanol (HFIP) (4:1) geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit weiteren 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der farblose Rückstand (355 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer

RP-HPLC. $R_t = 33.27$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 44.38$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-2).

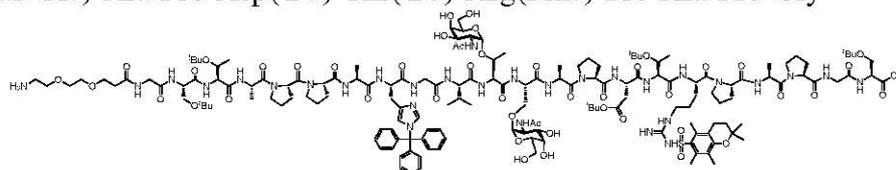
Ausbeute: 291 mg (0.080 mmol, 80 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -5.7$ ($c = 1.00$, CDCl_3).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1819.41$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1819.42).

$\text{C}_{173}\text{H}_{258}\text{N}_{30}\text{O}_{53}\text{S}$ (3638.13)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{lm}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (156)

$(\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_2)_2\text{CONH-Gly-Ser}^t(\text{Bu})\text{-Thr}^t(\text{Bu})\text{-Ala-Pro-Pro-Ala-His}(\text{Trt})\text{-Gly-Val-Thr}(\alpha\text{-GalNAc})\text{-Ser}(\alpha\text{-GalNAc})\text{-Ala-Pro-Asp}^t(\text{Bu})\text{-Thr}^t(\text{Bu})\text{-Arg}(\text{Pmc})\text{-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser}^t(\text{Bu})\text{-OH})$



60 mg (16.0 μmol) des glycosylierten Docosapeptids **149** werden in 44 ml Methanol unter Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 18 h bei einem pH-Wert von 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt über die analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des rohen Peptids (90 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 31.79$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 40.50$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-2).

Ausbeute: 41 mg (12.0 μmol , 73 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -37.6$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): $[\delta/\text{ppm}] = 8.81$ (s, 1H, $\text{H}_{2\text{Ar}}\text{-His}$), 8.23 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Asp}\alpha} = 7.8$ Hz, NH-Asp), 8.18 – 8.15 (m, 2H, NH-Gly₃ {8.18, t, 1H, $^3J_{\text{NH,Gly}\alpha} = 5.6$ Hz}, NH-Ser_{TN} {8.17}), 8.15 – 7.96 (m, 10H, NH-His {8.12}, NH-Ala₄ {8.10}, NH-Thr_{TN} {8.09}, NH-Gly₁ {8.08}, NH-Gly₂ {8.08}, NH-Ala_(1,2) {8.06}, NH-Arg {8.02}, NH-Ser₂ {8.02}, NH-Val {8.00}), 7.85 – 7.74 (m, 4H, NH-Ser₁ {7.84}, NH-Ala₃ {7.81}, NH₂-Spa {7.79}), 7.68 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,H2}} = 8.1$ Hz, NH-Ser₂), 7.48 – 7.42 (m, 9H,

H_{meta}-Trt, H_{para}-Trt), 7.31 – 7.27 (m, 2H, H_{4Ar}-His {7.31}, NH-GalN^{Ser} {7.29}), 7.25 (d, 1H, ³J_{NH,Thrα} = 6.8 Hz, NH-Thr₁), 7.18 – 7.11 (m, 6H, H_{ortho}-Trt), 7.06 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 8.7 Hz, NH-GalN^{Thr}), 6.70 – 6.61 (m, 1H, NH-Guan), 4.71 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 3.7 Hz, H1-GalN^{Thr}), 4.65 – 4.38 (m, 12H, H1-GalN^{Ser} {4.61}, His^α {4.58}, Asp^α {4.57}, Ala₃^α {4.54}, Pro₅^α {4.52}, Arg^α {4.50}, Thr_{TN}^α {4.49}, Ala₄^α {4.48}, Ser_{TN}^α {4.46}, Val^α {4.45}, Pro₄^α {4.44}, Ser₂^α {4.42}), 4.38 – 4.19 (m, 6H, Ser₁^α {4.36}, Pro₃^α {4.35}, Pro₁^α {4.30}, Pro₂^α {4.29}, Thr₁^α {4.25}, Thr₂^α {4.22}), 4.18 – 4.08 (m, 3H, Ala₂^α {4.14}, Thr_{TN}^β {4.14}, Ala₁^α {4.12}), 4.07 (td, 1H, ³J_{H2,NH} ≈ ³J_{H2,H3} ≈ 10.6 Hz, ³J_{H2,H1} ≈ 3.1 Hz, H2-GalN^{Ser}), 4.01 – 3.92 (m, 2H, H2-GalN^{Thr} {3.99}, Thr₂^β {3.96}), 3.92 – 3.84 (m, 1H, Thr₁^β {3.89}), 3.81 – 3.37 (m, 40 H, Gly₁^{αa} {3.79}, Gly₃^{αab} {3.79}, Gly₂^{αab} {3.74}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.72 – 3.31}, Gly₁^{ab} {3.71}, H4-GalN^{Ser/Thr} {3.71}, H5-GalN^{Thr} {3.66}, Ser₁^{βa} {3.64}, Ser_{TN}^{βab} {3.62}, H3-Spa {3.62}, H3-GalN^{Thr} {3.62}, H8-Spa {3.59}, H6-Spa {3.56}, H3-GalN^{Ser} {3.56}, H5-GalN^{Ser} {3.55}, H5-Spa {3.53}, H6_a-GalN^{Ser/Thr} {3.51}, Ser₁^{βb} {3.50}, Ser₂^{βa} {3.50}, Ser₂^{βb} {3.45}, H6_b-GalN^{Ser/Thr} {3.44}), 3.11 – 3.05 (dd, 1H, ³J_{Hisβ,Hisα} ≈ 5.6 Hz, ²J_{Hisβa,Hisβb} ≈ 16.8 Hz, His^{βa} {3.09}), 3.05 – 3.00 (m, 2H, Arg^δ {3.04}), 2.99 – 2.94 (m, 2H, H9-Spa {2.97}), 2.94 – 2.87 (m, 1H, His^{βb} {2.97}), 2.69 (dd, 1H, ³J_{Aspβa,Aspα} = 7.4 Hz, ²J_{Aspβa,Aspβb} = 16.1 Hz, Asp^{βa}), 2.58 (t_p, 2H, ³J_{H4,H3} = 6.8 Hz, H4-Pmc), 2.49 – 2.43 (m, 7H, 2 x CH₃-Pmc {2.47}, Asp^{βb} {2.44}), 2.39 (t, 2H, ³J_{H2,H3} = 6.5 Hz, H2-Spa), 2.19 – 1.61 (m, 33H, Pro₄^{βa} {2.14}, Pro₅^{βa} {2.09}, Pro₃^{βa} {2.06}, Pro₂^{βa} {2.03}, 2.02 (H9a-Pmc), Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.00 – 1.72}, Pro₄^{βb} {1.97}, Val^β {1.97}, Pro₁^{βa} {1.96}, 1.90, 1.87 (2 x CH₃-Ac), Pro₃^{βb} {1.87}, Pro₂^{βb} {1.79}, Pro₁^{βb} {1.78}, H3-Pmc (1.77), Pro₅^{βb} {1.72}, Arg^{βa} {1.67}), 1.51 – 1.38 (m, 12H, Arg^{βb} {1.48}, Arg^γ {1.43}, 1.35 (s, 9H, CH₃-^tBu)), 1.25 (2 x s, 6H, H2a-Pmc), 1.24 – 1.04 (m, 51H, Ala_(3,4)^β {1.20}, Ala₂^β {1.19}, Ala₁^β {1.16}, Thr_{TN}^γ {1.13}, 1.13 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.12 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.10 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.06 (s, 9H, CH₃-^tBu)), 0.99 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 6.2 Hz, Thr₂^γ), 0.95 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 6.1 Hz, Thr₁^γ), 0.88 (d, 3H, ³J_{Valγa,Valβ} = 6.6 Hz, Val^{γa}), 0.82 (d, 3H, ³J_{Valγb,Valβ} = 6.5 Hz, Val^{γb}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 172.33, 171.92, 171.60, 171.53, 170.96, 170.84, 170.60, 170.48, 170.06, 169.98, 169.92, 169.86, 169.79, 169.58, 169.46, 169.38, 168.98, 168.87, 168.85, 168.82, 168.48, 168.37 (C=O), 155.97 (C=N-Guan), 152.37 (C7-Pmc), 140.21 (C_{ipso}-Trt), 136.40 (C2-Imidazol), 134.58 (C5-Pmc), 134.14 (C10-Pmc), 130.55 (C5-Imidazol), 129.30, 128.73 (C_{ortho}-Trt, C_{meta}-Trt, C_{para}-Trt), 122.65 (C9-Pmc), 121.58 (C4-Imidazol), 117.77 (C6-/C8-Pmc), 99.24 (C1-GalN^{Thr}), 98.29 (C1-GalN^{Ser}), 80.65 (C-^tBu), 78.03 (C_{qua}-Trt), 75.68 (Thr_{TN}^β), 73.89 (C2-Pmc), 73.79, 73.50,

73.22, 72.89 (4 x C-^tBu), 71.95 (C5-GalN^{Thr}), 71.67 (C5-GalN^{Ser}), 69.98 (C6-Spa), 69.85 (C5-Spa), 69.08 (C3-GalN^{Thr}), 68.58 (C4-GalN^{Ser/Thr}), 68.49 (C3-GalN^{Ser}), 67.41 (Thr₁^β), 67.23 (Thr₂^β), 67.12 (C8-Spa), 67.10 (C3-Spa), 62.10 (Ser_{TN}^β), 61.98 (Ser_(1,2)^β), 60.96 (C6-GalN^{Ser/Thr}), 59.76 (Pro₄^α), 59.67 (Pro_(1,2)^α), 59.56 (Pro₃^α), 57.89 (Pro₅^α), 57.84 (Thr₂^α), 57.61 (Val^α), 57.30 (Thr₁^α), 56.56 (Thr_{TN}^α), 53.47 (Ser₂^α), 53.20 (Ser₁^α), 52.53 (Ser_{TN}^α), 51.94 (His^α), 50.13 (Arg^α), 49.86 (C2-GalN^{Thr}), 49.68 (C2-GalN^{Ser}), 49.56 (Asp^α), 48.87 (Ala_(1,2)^α), 47.09 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.69 (Ala₄^α), 46.60 (Ala₃^α), 42.24 (Gly_(1,3)^α), 42.22 (Gly₂^α), 40.29 (Arg^δ), 39.08 (C9-Spa), 37.17 (Asp^β), 36.23 (C2-Spa), 32.60 (C3-Pmc), 31.36 (Val^β), 29.58 (Pro₃^β), 29.51 (Pro₄^β), 29.41 (Pro₁^β), 29.37 (Arg^β), 29.36 (Pro₂^β), 28.37, 28.09, 27.72, 27.67 (5 x CH₃-^tBu), 28.22 (Pro₅^β), 27.67 (His^β), 26.92 (2 x C2a-Pmc), 25.16 (Arg^γ), 24.86 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 23.38, 23.29 (2 x CH₃-Ac), 21.21 (C4-Pmc), 19.67 (Val^{γa}), 19.54 (Thr₁^γ), 19.49 (Thr₂^γ), 19.15 (Thr_{TN}^γ), 18.64 (Val^{γb}), 18.03 (Ala₁^β), 17.86 (C6a-/C8a-Pmc), 17.36 (Ala_(2,3)^β), 17.17 (Ala₄^β), 12.41 (C9a-Pmc).

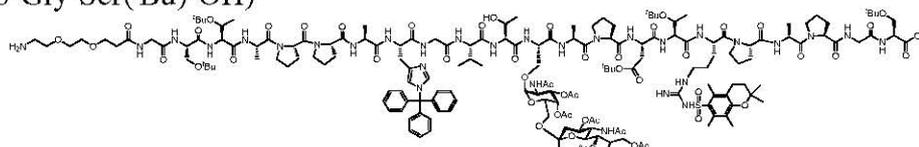
ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 1693.79 ([M+2H]²⁺, ber.: 1693.89).

HR-ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 1692.8770 ([M+2H]²⁺, ber.: 1692.8830).

C₁₆₁H₂₄₆N₃₀O₄₇S (3385.91)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanyl-amido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{Im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (150)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^tBu)-Thr(^tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(^tBu)-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



Ausgehend von 128 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Ser(^tBu) versehenen Polystyrol-Harzes **142** (Beladung: 0.78 mmol/g) wird das Peptid nach der gleichen Vorschrift wie für Verbindung **144** aufgebaut. Nach der Festphasensynthese werden 498 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 370$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz in einem Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer

Mischung aus Dichlormethan und Hexafluoroisopropanol (HFIP) (4:1) geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der farblose Rückstand (375 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 32.02$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 47.07$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-2).

Ausbeute: 325 mg (0.084 mmol, 84 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -18.2$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

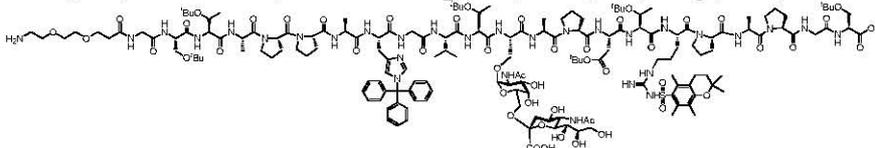
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1937.09$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1936.98).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1935.9807$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1935.9775).

$\text{C}_{187}\text{H}_{276}\text{N}_{30}\text{O}_{56}\text{S}$ (3872.42)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-N-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-O-tert-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-N^{lm}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-tert-butyl-L-threonyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-O-tert-butyl-L-aspartyl-O-tert-butyl-L-threonyl-N^o-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-O-tert-butyl-serin (157)

($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_2)_2\text{CONH-Gly-Ser}^t(\text{Bu})\text{-Thr}^t(\text{Bu})\text{-Ala-Pro-Pro-Ala-His}(\text{Trt})\text{-Gly-Val-Thr}^t(\text{Bu})\text{-Ser}(\alpha\text{-NeuNAcCOOH-(2-6)-}\alpha\text{-GalNAc})\text{-Ala-Pro-Asp}^t(\text{Bu})\text{-Thr}^t(\text{Bu})\text{-Arg}(\text{Pmc})\text{-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser}^t(\text{Bu})\text{-OH}$)



150 mg (0.039 mmol) des glycosylierten Docosapeptids **150** werden in 100 ml Methanol gelöst und unter Kontrolle des pH-Werts mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 19 h bei einem pH-Wert von 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt über die analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Es werden 195 mg des rohen umgeesterten Peptides erhalten. $R_t = 33.80$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1182.21$ ($[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, ber.: 1182.29).

$\text{C}_{169}\text{H}_{260}\text{N}_{30}\text{O}_{50}\text{S}$ (3544.11).

Das rohe Peptid wird in 40 ml einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH = 10.5) gelöst und durch Zugabe einer Natriumhydroxid-Stammlösung auf einen pH-Wert von 10 nachreguliert. Der Reaktionsfortschritt wird durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe wässriger Natriumhydroxid-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz bei genau 10 gehalten. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des Peptids (176 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 30.97$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 42.42$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-2).

Ausbeute: 47 mg (0.013 mmol, 35 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -52.4$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): $[\delta/\text{ppm}] = 8.78$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.28 (m_c, 1H, NH-Asp), 8.16 (t, 1H, $^3J_{\text{NH,Gly}\alpha} = 5.8$ Hz, NH-Gly₃), 8.13 – 7.96 (m, 9H, NH-His {8.10}, NH-Ala₄ {8.09}, NH-Arg {8.09}, NH-Ser₃ {8.09}, NH-Gly₁ {8.09}, NH-Gly₂ {8.07}, NH-Sia {8.06}, NH-Ala₁ {8.05}, NH-Ser₂ {8.03}, NH-Val {8.02}), 7.85 – 7.78 (m, 4H, NH-Ser₁ {7.85}, NH-Thr₃ {7.85}, NH-Ala_(2,3) {7.82}), 7.75 (s_b, 2H, NH₂-Spa), 7.68 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,H2}} = 8.1$ Hz, NH-Thr₂), 7.49 – 7.40 (m, 9H, H_{meta}-Trt, H_{para}-Trt), 7.30 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.24 – 7.21 (m, 1H, NH-Thr₁ {7.22}), 7.18 – 7.11 (m, 6H, H_{ortho}-Trt), 7.08 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,H2}} = 8.7$ Hz, NH-GalN), 6.68 – 6.58 (s_b, 1H, NH-Guan {6.65}), 4.60 (d, 1H, $^3J_{\text{H1,H2}} \approx 3.0$ Hz, H1-GalN), 4.59 – 4.38 (m, 10H, Asp^α {4.58}, His^α {4.57}, Ala₂^α {4.56}, Ala₃^α {4.54}, Pro₅^α {4.52}, Ser_{STN}^α {4.52}, Arg^α {4.49}, Ala₄^α {4.47}, Pro₄^α {4.44}, Ser₂^α {4.43}), 4.38 – 4.20 (m, 8H, Pro₃^α {4.36}, Ser₁^α {4.36}, Thr₃^α {4.34}, Val^α {4.31}, Pro₁^α {4.30}, Pro₂^α {4.28}, Thr₁^α {4.24}, Thr₂^α {4.22}), 4.13 – 4.09 (m, 1H, Ala₁^α {4.12}), 4.03 (td, 1H, $^3J_{\text{H2,NH}} \approx ^3J_{\text{H2,H3}} \approx 9.0$ Hz, $^3J_{\text{H2,H1}} \approx 3.4$ Hz, H2-GalN), 3.97 – 3.84 (m, 3H, Thr₂^β {3.96}, Thr₃^β {3.93}, Thr₁^β {3.90}), 3.83 – 3.67 (m, 6H, Gly₃^α {3.79}, Gly₁^{αα} {3.76}, Gly₂^α {3.74}, Gly₁^{ob} {3.70}), 3.66 – 3.36 (m, 34H, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.71 – 3.36}, H_{9a}-Sia {3.70}, H5-GalN {3.65}, Ser₁^{βa} {3.64}, H_{6a}-GalN {3.63}, H4-GalN {3.62}, Ser_{STN}^{βab} {3.62}, H3-Spa {3.62}, H8-Sia {3.61}, H8-Spa {3.59}, H4-Sia {3.57}, H6-Spa {3.56}, H5-Spa {3.53}, H3-GalN {3.52}, H5-Sia {3.51}, H_{9b}-Sia {3.50}, Ser₁^{βb} {3.50}, Ser₂^{βa} {3.50}, Ser₂^{βb} {3.45}, H_{6b}-GalN {3.42}), 3.36 – 3.27 (m, 2H, H₆-Sia {3.34}, H₇-Sia {3.33}), 3.11 – 2.99 (m, 3H, His^{βa} {3.08}, Arg^δ {3.04}), 3.00 – 2.94 (m, 2H, H₉-Spa {2.97}), 2.94 – 2.88 (m, 1H, His^{βb} {2.91}), 2.68 (dd, 1H, $^3J_{\text{Asp}\beta\text{a},\text{Asp}\alpha} = 7.2$ Hz, $^2J_{\text{Asp}\beta\text{a},\text{Asp}\beta\text{b}} = 16.0$ Hz, Asp^{βa}), 2.58 (t_p, 2H, $^3J_{\text{H4,H3}} = 6.5$ Hz, H4-Pmc), 2.51 (m_c, 1H, H_{3aq}-Sia), 2.49 – 2.42 (m, 7H, 2 x CH₃-Pmc {2.47}, Asp^{βb} {2.44}), 2.39 (t, 2H, $^3J_{\text{H2,H3}} = 6.4$ Hz, H2-Spa), 2.10 – 1.60 (m, 33H, Pro₄^β {2.13}, Pro₅^{βa} {2.08}, Pro₃^{βa} {2.05}, Pro₂^{βa} {2.03}, 2.02 (H_{9a}-Pmc), Val^β {2.01}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.00 – 1.74}, Pro₁^{βa}

{1.96}, 1.89, 1.86 (2 x CH₃-Ac), Pro₃^{βb} {1.87}, Pro₁^{βb} {1.78}, Pro₂^{βb} {1.77}, H₃-Pmc (1.76), Pro₅^{βb} {1.72}, Arg^{βa} {1.67}), 1.56 – 1.31 (m, 13H, H_{3ax}-Sia {1.52}, Arg^{βb} {1.48}, Arg^γ {1.42}, 1.35 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.25 (2 x s, 6H, H_{2a}-Pmc), 1.24 – 1.03 (m, 57H, Ala₂^β {1.22}, Ala₄^β {1.20}, Ala₃^β {1.18}, Ala₁^β {1.16}, 1.13 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.12 (2 x s, 9H, CH₃-^tBu), 1.10 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.06 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.02 – 0.96 (m, 6H, Thr₃^γ {1.00}, Thr₂^γ {0.99}), 0.95 (d, 3H, ³J_{Thr_γ,Thr_β = 6.1 Hz, Thr₁^γ), 0.82 (d, 3H, ³J_{Val_{γa},Val_β = 6.6 Hz, Val^{γa}), 0.79 (d, 3H, ³J_{Val_{γb},Val_β = 6.5 Hz, Val^{γb}).}}}

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 172.29, 171.97, 171.90, 171.60, 171.56, 171.52, 170.95, 170.84, 170.59, 170.46, 170.34, 170.05, 169.95, 169.86, 169.77, 169.57, 169.44, 169.36, 169.17, 168.96, 168.84, 168.80, 168.46 (C=O), 155.96 (C=N-Guan), 152.68 (C₇-Pmc), 140.66 (C_{ipso}-Trt), 136.65 (C₂-Imidazol), 135.01 (C₁₀-Pmc), 134.55 (C₅-Pmc), 130.54 (C₅-Imidazol), 129.72, 129.14 (C_{ortho}-Trt, C_{meta}-Trt, C_{para}-Trt), 123.11 (C₉-Pmc), 121.67 (C₄-Imidazol), 118.16 (C₆-/C₈-Pmc), 98.58 (C₁-GalN), 98.30 (C₂-Sia), 80.23 (C-^tBu), 78.03 (C_{qua}-Trt), 74.07 (C₆-Sia), 73.93 (C-^tBu), 73.78 (C-^tBu), 73.61 (C-^tBu), 73.48 (C₂-Pmc), 73.21 (C-^tBu), 72.88 (C-^tBu), 71.91 (C₈-Sia), 70.03 (C₆-Spa), 69.94 (C₅-Spa), 69.91 (C₅-GalN), 68.85 (C₇-Sia), 68.65 (C₄-Sia), 68.65 (C₄-GalN), 68.45 (C₃-GalN), 67.49 (Thr₁^β), 67.47 (Thr₂^β), 67.26 (Thr₃^β), 67.17 (C₈-Spa), 67.07 (C₃-Spa), 63.35 (C₉-Sia), 63.34 (Ser_{STN}^β), 63.32 (C₆-GalN), 62.20 (Ser₂^β), 62.17 (Ser₁^β), 59.78 (Pro₄^α), 59.73 (Pro₂^α), 59.56 (Pro₃^α), 59.48 (Pro₁^α), 57.93 (Val^α), 57.90 (Pro₅^α), 57.88 (Thr₃^α), 57.84 (Thr₂^α), 57.44 (Thr₁^α), 53.48 (Ser₂^α), 53.18 (Ser₁^α), 52.68 (C₅-Sia), 52.22 (Ser_{STN}^α), 52.02 (His^α), 50.13 (Arg^α), 49.65 (Asp^α), 49.60 (C₂-GalN), 48.84 (Ala₁^α), 47.09 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.57 (Ala₄^α), 46.55 (Ala_(2,3)^α), 42.19 (Gly_(1,2,3)^α), 41.11 (C₃-Sia), 40.25 (Arg^δ), 39.03 (C₉-Spa), 37.18 (Asp^β), 36.22 (C₂-Spa), 32.56 (C₃-Pmc), 31.06 (Val^β), 29.57 (Pro_(2,3)^β), 29.36 (Pro₁^β), 29.33 (Arg^β), 28.42, 28.35, 28.11, 27.65, 27.61 (5 x CH₃-^tBu), 28.22 (Pro_(4,5)^β), 27.76 (His^β), 26.93 (2 x C_{2a}-Pmc), 25.14 (Arg^γ), 24.83 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 23.30, 23.16 (2 x CH₃-Ac), 21.22 (C₄-Pmc), 19.70 (Val^{γa}), 19.48 (Thr₁^γ), 19.43 (Thr_(2,3)^γ), 18.34 (Val^{γb}), 18.18 (C_{6a}-/C_{8a}-Pmc), 18.14 (Ala₁^β), 17.52 (Ala₂^β), 17.28 (Ala_(3,4)^β), 12.40 (C_{9a}-Pmc).

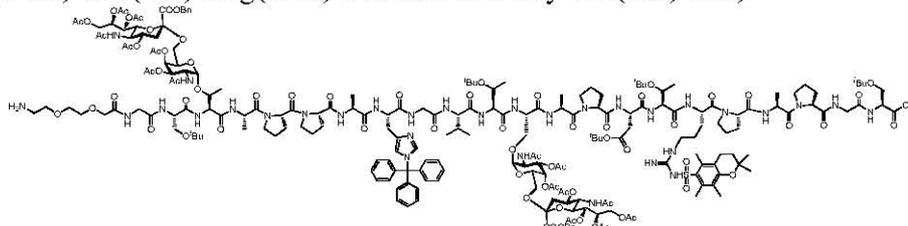
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1177.34 ([M+3H]³⁺, ber.: 1177.29).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1764.9218 ([M+2H]²⁺, ber.: 1764.9223).

C₁₆₈H₂₅₈N₃₀O₅₀S (3530.08)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{lm}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchro-man-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (151)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^tBu)-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂-NAC)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(^tBu)-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAC)-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



Ausgehend von 128 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Ser(^tBu) versehenen Polystyrol-Harzes **142** (Beladung: 0.78 mmol/g) wird das Peptid nach der gleichen Vorschrift wie für Verbindung **144** aufgebaut. Die Kupplung der zweiten glycosylierten Aminosäure **27** erfolgt halbautomatisch. Das deblockierte Harz wird mit einer Lösung aus 189.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAC)-OH (**27**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 25.0 mg (0.184 mmol, 1.84 Äquiv.) HOAt, 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Serin und Glycin erfolgt eine Doppelkupplung. Die Anbindung des Diethylenglycolspacers erfolgt wie bereits in **144** beschrieben. Nach der Festphasensynthese werden 464 mg eines Peptidpolymer-Adduktes (Δ = 336 mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz in einem Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer Mischung aus Dichlormethan und Hexafluoroisopropanol (HFIP) (4:1) geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der farblose Rückstand (365 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. R_t = 36.83 min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), R_t = 47.30 min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-2). Ausbeute: 128 mg (0.028 mmol, 28 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -8.2$ ($c = 1.00$, CHCl₃). **ESI-MS (positiv):** $[m/z] = 1566.58$ ($[M+2Na+H]^3+$, ber.: 1566.39).

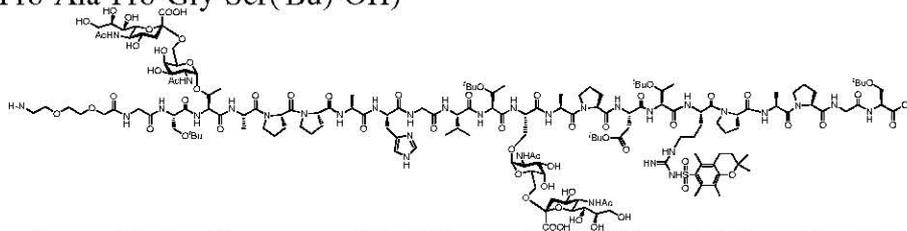
1180.57 ($[M+3Na+H]^{4+}$, ber.: 1180.54).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2326.0930$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 2326.0887).

$C_{221}H_{316}N_{32}O_{75}S$ (4653.11)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butylserin (158)

($H_2N-(CH_2CH_2O)_2(CH_2)_2CONH-Gly-Ser(tBu)-Thr(\alpha-NeuNAcCOOH-(2-6)-\alpha-GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(tBu)-Ser(\alpha-NeuNAcCOOH-(2-6)-\alpha-GalNAc)-Ala-Pro-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(tBu)-OH$)



65 mg (0.014 mmol) des glycosylierten Docosapeptids **151** werden in 50 ml Methanol gelöst und mit 65 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle versetzt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird bei 1 bar Wasserstoffatmosphäre 60 h bei Raumtemp. gerührt. Danach wird die Wasserstoffatmosphäre gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über eine Kartusche mit C18-Säulenmaterial filtriert. Die kleine Säule wird mehrmals mit reinem Methanol gespült und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (63 mg quant.) wird einige Male mit Toluol kodestilliert und ohne Reinigung der nachfolgenden Reaktion unterworfen. $R_t = 31.35$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2126.97$ ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 2126.98).

$C_{188}H_{290}N_{32}O_{75}S$ (4230.55).

Das rohe Peptid wird anschließend in 40 ml Methanol gelöst und unter Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 34 h bei einem pH-Wert von 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert.

Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des rohen Peptids (109 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 29.13$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 48.95$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-3).

Ausbeute: 16 mg (4.0 μ mol, 31 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -19.5$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 8.89 (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.34 – 8.23 (m, 3H, NH-Gly₁ {8.33}, NH-Asp {8.29}, NH-Gly₃ {8.28}), 8.21 – 8.16 (m, 2H, NH-Gly₂ {8.21}, NH-Ala₁ {8.20}), 8.13 – 7.71 (m, 15H, NH-Ala₂ {8.10}, NH-Arg {8.09}, NH-His {8.09}, NH-Thr₃ {8.09}, 2 x NH-Sia {8.05}, NH-Ala₃ {8.00}, NH-Ser₃ {7.98}, NH-Ala₄ {7.92}, NH-Val {7.91}, NH-Ser₁ {7.82}, NH-Thr₂ {7.84}, NH-Ser₂ {7.83}, NH₂-Spa {7.79}), 7.37 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.22 (d, 1H, ³J_{NH,Thr α} = 8.0 Hz, NH-Thr₁), 7.13 – 7.06 (m, 2H, HN-GalN^{Ser/Thr} {7.10}), 6.74 – 6.57 (s_b, 1H, NH-Guan {6.65}), 4.77 – 4.41 (m, 11H, H1-GalN^{Thr} {4.73}, H1-GalN^{Ser} {4.61}, Asp ^{α} {4.58}, His ^{α} {4.58}, Ser₃ ^{α} {4.57}, Ala₄ ^{α} {4.56}, Pro₅ ^{α} {4.54}, Ser_{STN} ^{α} {4.53}, Ala₃ ^{α} {4.49}, Arg ^{α} {4.49}, Ala₁ ^{α} {4.45}), 4.40 – 4.22 (m, 9H, Pro₄ ^{α} {4.39}, Val ^{α} {4.39}, Thr_{STN} ^{α} {4.38}, Pro₃ ^{α} {4.36}, Ser₁ ^{α} {4.36}, Thr₂ ^{α} {4.35}, Pro_(1,2) ^{α} {4.29}, Thr₁ ^{α} {4.25}), 4.18 – 4.06 (m, 2H, Ala₂ ^{α} {4.16}, Thr_{STN} ^{β} {4.11}), 4.02 (td, 1H, ³J_{H₂,H₃} \approx ³J_{H₂,NH} \approx 10.4 Hz, ³J_{H₂,H₁} \approx 3.6 Hz, H2-GalN^{Ser}), 3.99 – 3.86 (m, 4H, H2-GalN^{Thr} {3.98}, Thr₂ ^{β} {3.94}, Gly₃ ^{αa} {3.92}, Thr₁ ^{β} {3.90}), 3.84 – 3.22 (m, 53H, Gly₂ ^{α} {3.80}, H5-GalN^{Thr} {3.75}, H6_a-GalN^{Thr} {3.75}, Gly₁ ^{α} {3.74}, Gly₃ ^{αb} {3.74}, H6_a-GalN^{Ser} {3.70}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{δ} {3.69 – 3.33}, H5-GalN^{Ser} {3.65}, Ser₁ ^{βa} {3.64}, Ser_{STN} ^{αab} {3.64}, H4-GalN^{Ser/Thr} {3.63}, H3-Spa {3.62}, H6_b-GalN^{Ser} {3.62}, 2 x H8-Sia {3.62}, 2 x H9_a-Sia {3.62}, H8-Spa {3.59}, H3-GalN^{Thr} {3.57}, H6-Spa {3.57}, 2 x H4-Sia {3.56}, H5-Spa {3.54}, Ser₃ ^{βa} {3.52}, H3-GalN^{Ser} {3.52}, Ser₁ ^{βb} {3.50}, 2 x H5-Sia {3.50}, Ser₃ ^{βb} {3.46}, H6_b-GalN^{Thr} {3.46}, 2 x H9_b-Sia {3.40}, 2 x H6-Sia {3.34}, 2 x H7-Sia {3.32}), 3.14 – 3.06 (m, 1H, His ^{βa} {3.11}), 3.06 – 3.00 (m, 2H, Arg ^{δ} {3.04}), 3.00 – 2.94 (m, 3H, His ^{βb} {2.98}), H9-Spa {2.97}), 2.68 (dd, 1H, ³J_{Asp βa ,Asp α} = 7.1 Hz, ²J_{Asp βa ,Asp βb} = 16.0 Hz, Asp ^{βa}), 2.58 (t_p, 2H, ³J_{H₄,H₃} = 7.0 Hz, H4-Pmc), 2.54 (m_c, 2H, 2 x H3_{äq}-Sia), 2.49 – 2.42 (m, 7H, 2 x CH₃-Pmc {2.47}, Asp ^{βb} {2.44}), 2.39 (t, 2H, ³J_{H₂,H₃} = 6.4 Hz, H2-Spa), 2.20 – 1.59 (m, 39H, Pro₅ ^{βa} {2.15}, Val ^{β} {2.05}, H9_a-Pmc {2.04}, Pro₂ ^{βa} {2.04}, Pro₄ ^{βab} {2.04}, Pro₃ ^{βa} {2.03}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{γ} {2.02 – 1.74}, Pro₁ ^{βa} {1.95}, Pro₂ ^{βb} {1.95}, 1.89, 1.86 (4 x CH₃-Ac), Pro₃ ^{βb} {1.87}, Pro₁ ^{βb} {1.77}, H3-Pmc {1.77}, Pro₅ ^{βb} {1.77}, Arg ^{βa} {1.66}), 1.56 – 1.30 (m, 13H, H3_{ax}-Sia {1.51}, Arg ^{βb} {1.46}, Arg ^{γ} {1.42}, 1.35 (s, 9H, CH₃-^tBu)), 1.27 – 1.04 (m, 57H, 1.25 (2 x s, 6H, H2a-Pmc), Ala₄ ^{β} {1.22}, Ala_(2,3) ^{β} {1.19}, Ala₁ ^{β} {1.17}), 1.13 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.12 (s, 9H, CH₃-^tBu),

Thr^γ_{STN} {1.11}, 1.10 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.06 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.01 (d, 3H, ³J_{Thr^γ, Thr^β} = 6.2 Hz, Thr^γ), 0.95 (d, 3H, ³J_{Thr^γ, Thr^β} = 5.8 Hz, Thr^γ), 0.86 (d, 3H, ³J_{Val^{γa}, Val^β} = 6.5 Hz, Val^{γa}), 0.83 (d, 3H, ³J_{Val^{γb}, Val^β} = 6.4 Hz, Val^{γb}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 172.43, 172.00, 171.91, 171.60, 170.95, 170.84, 170.59, 170.43, 170.06, 169.94, 169.81, 169.72, 169.36, 169.19, 168.95, 168.84 (C=O), 155.99 (C=N-Guan), 152.37 (C7-Pmc), 134.52 (C10-Pmc), 134.09 (C5-Pmc), 133.86 (C2-Imidazol), 129.53 (C5-Imidazol), 123.12 (C9-Pmc), 118.19 (C6-/C8-Pmc), 117.47 (C4-Imidazol), 99.22 (C1-GalN^{Thr}), 98.68 (2 x C2-Sia), 98.22 (C1-GalN^{Ser}), 80.23 (C-^tBu), 75.64 (Thr^β_{STN}), 73.92 (2 x C6-Sia), 73.90 (C2-Pmc), 73.62 (C-^tBu), 73.48 (C-^tBu), 72.97 (C-^tBu), 72.84 (C-^tBu), 71.83 (2 x C8-Sia), 70.22 (C5-GalN^{Thr}), 70.00 (C6-Spa), 69.90 (C5-Spa), 69.28 (C5-GalN^{Ser}), 68.89 (2 x C7-Sia), 68.73 (C4-GalN^{Ser/Thr}), 68.71 (2 x C4-Sia), 68.71 (C3-GalN^{Thr}), 68.56 (C3-GalN^{Ser}), 67.52 (Thr^β₂), 67.48 (Thr^β₁), 67.15 (C8-Spa), 67.09 (C3-Spa), 64.11 (C6-GalN^{Thr}), 63.46 (C6-GalN^{Ser}), 63.40 (2 x C9-Sia), 63.27 (Ser^β_{STN}), 62.46 (Ser^β₃), 62.25 (Ser^β₁), 59.77 (Pro^α₃), 59.62 (Pro^α_(1,2)), 58.28 (Val^α), 58.00 (Pro^α₄), 57.69 (Pro^α₅), 57.69 (Thr^α₂), 57.26 (Thr^α₁), 56.24 (Thr^α_{STN}), 53.59 (Ser^α₃), 53.17 (Ser^α₁), 52.71 (2 x C5-Sia), 52.18 (Ser^α_{STN}), 51.79 (His^α), 50.11 (Arg^α), 49.63 (Asp^α), 49.60 (C2-GalN^{Ser}), 49.45 (C2-GalN^{Thr}), 48.81 (Ala^α₂), 46.99 (Pro^δ_(1,2,3,4,5)), 46.58 (Ala^α_(1,3)), 46.55 (Ala^α₄), 42.28 (Gly^α₃), 42.25 (Gly^α_(1,2)), 41.15 (2 x C3-Sia), 40.33 (Arg^δ), 38.95 (C9-Spa), 37.17 (Asp^β), 36.27 (C2-Spa), 32.60 (C3-Pmc), 31.08 (Val^β), 29.53 (Pro^β_(2,3,4)), 29.47 (Pro^β₁), 29.35 (Arg^β), 28.42, 28.38, 28.13, 28.09, 27.70 (5 x CH₃-^tBu), 28.21 (Pro^β₅), 27.59 (His^β), 26.90 (2 x C2a-Pmc), 25.12 (Arg^γ), 24.87 (Pro^γ_(1,2,3,4,5)), 23.34, 23.14 (4 x CH₃-Ac), 21.18 (C4-Pmc), 19.73 (Val^{γa}), 19.52 (Thr^γ₁), 19.49 (Thr^γ₂), 18.94 (Thr^γ_{STN}), 18.32 (Val^{γb}), 17.81 (C6a-/C8a-Pmc), 17.50 (Ala^β₄), 17.49 (Ala^β_(2,3)), 16.97 (Ala^β₁), 12.42 (C9a-Pmc).

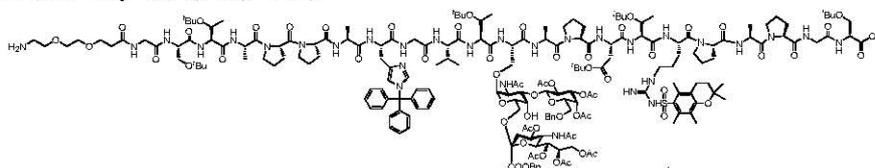
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1242.40 ([M+2H+Na]³⁺, ber.: 1242.29).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1862.9225 ([M+H+Na]²⁺, ber.: 1862.9283).

C₁₆₉H₂₆₂N₃₂O₆₀ (3702.07)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{lm}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (152)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^tBu)-Thr(^tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(^tBu)-Ser[α -3-(β -Ac₄Gal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



Ausgehend von 128 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Ser(^tBu) versehenen Polystyrol-Harzes **142** (Beladung: 0.78 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Dabei erfolgt für die erste Aminosäure Glycin eine Doppelkupplung. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure **51** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 226.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser[α -3-(β -Ac₄Gal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-OH (**51**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 25.0 mg (0.184 mmol, 1.84 Äquiv.) HOAt, 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Threonin und L-Valin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die restlichen neun Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Anbindung des Diethylglycolspacers erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung bestehend aus 160.0 mg (0.400 mmol, 4.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 167.0 mg (0.439 mmol, 4.39 Äquiv.) HATU, 62.0 mg (0.456 mmol, 4.56 Äquiv.) HOAt, 89.0 mg (0.880 mmol, 8.80 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP und 16 h Vortex (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 498 mg eines Peptidpolymer-Adduktes (Δ = 370 mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz im Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer Mischung aus Dichlormethan und Hexafluoroisopropanol (HFIP) (4:1) geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten

Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der farblose Rückstand (411 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 36.37$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 46.45$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-2). Ausbeute: 165 mg (0.040 mmol, 40 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -20.4$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

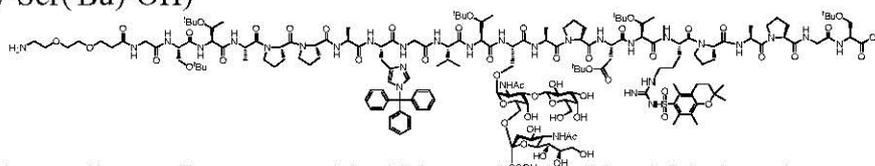
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2071.06$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 2071.01).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2070.0068$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 2070.0045).

$\text{C}_{197}\text{H}_{290}\text{N}_{30}\text{O}_{63}\text{S}$ (4118.64)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanyl-amido-N-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-O-tert-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-N^{lm}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-tert-butyl-L-threonyl-O-[2-acetamido-3-O-(β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-O-tert-butyl-L-aspartyl-O-tert-butyl-L-threonyl-N⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-O-tert-butyl-serin (159)

($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_2)_2\text{CONH-Gly-Ser}^t(\text{Bu})\text{-Thr}^t(\text{Bu})\text{-Ala-Pro-Pro-Ala-His}(\text{Trt})\text{-Gly-Val-Thr}^t(\text{Bu})\text{-Ser}[\alpha\text{-3-(}\beta\text{-Gal)-(\alpha-NeuNAcCOOH-(2-6))-\alpha-GalNAc}]\text{-Ala-Pro-Asp}^t(\text{Bu})\text{-Thr}^t(\text{Bu})\text{-Arg}(\text{Pmc})\text{-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser}^t(\text{Bu})\text{-OH}$)



82 mg (0.020 mmol) des glycosylierten Docosapeptids **152** werden in 80 ml Methanol unter Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 72 h bei einem pH-Wert von 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch weitere Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Die Reaktionsmischung wird durch Zugabe konz. Essigsäure neutralisiert, die Essigsäure und die Lösungsmittel werden i. Vak. evaporiert und der Rückstand dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Es werden 155 mg des rohen ungeesterten Peptides erhalten. $R_t = 33.94$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1854.04$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1853.96).

$\text{C}_{175}\text{H}_{270}\text{N}_{30}\text{O}_{55}\text{S}$ (3706.25)

Das rohe Peptid wird in 40 ml einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung mit einem pH-Wert von 10.5 gelöst und durch Zugabe einer Natriumhydroxid-Stammlösung auf einen pH-Wert

von 10 nachreguliert. Der Reaktionsfortschritt wird über die analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe wässriger Natriumhydroxid-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz bei genau 10 gehalten. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des rohen Peptids (196 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 33.94$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 41.72$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-2).

Ausbeute: 36 mg (10.0 μ mol, 49 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -42.4$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): [δ /ppm] = 8.77 (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.28 – 8.24 (m_c, 1H, NH-Asp {8.25}), 8.16 (t, 1H, ³ $J_{\text{NH,Gly}\alpha} = 5.8$ Hz, NH-Gly₃), 8.13 – 7.96 (m, 10H, NH-Gly₂ {8.13}, NH-Ser_{ST} {8.08}, NH-Ala₄ {8.06}, NH-Gly₁ {8.06}, NH-His {8.06}, NH-Sia {8.04}, NH-Ala₁ {8.03}, NH-Arg {8.01}, NH-Ser₂ {8.00}, NH-Val {8.00}), 7.92 – 7.71 (m, 6H, NH-Ala₃ {7.88}, NH-Thr₃ {7.87}, NH-Ser₁ {7.82}, NH-Ala₂ {7.79}, NH₂-Spa {7.75}), 7.68 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 8.0$ Hz, NH-Thr₂), 7.50 – 7.41 (m, 9H, H_{meta}-Trt, H_{para}-Trt), 7.29 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.26 – 7.18 (m, 1H, NH-Thr₁ {7.23}), 7.17 – 7.10 (m, 6H, H_{ortho}-Trt), 7.02 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,H2}} = 8.4$ Hz, NH-GalN), 6.68 – 6.60 (s_b, 1H, NH-Guan {6.65}), 4.69 (s_b, 1H, H1-GalN), 4.61 – 4.09 (m, 21H, His ^{α} {4.58}, Ala₄ ^{α} {4.55}, Asp ^{α} {4.54}, Ala₂ ^{α} {4.52}, Arg ^{α} {4.50}, Pro₅ ^{α} {4.50}, Ser_{2,6-ST} ^{α} {4.50}, Ala₃ ^{α} {4.47}, Pro₄ ^{α} {4.42}, Ser₂ ^{α} {4.40}, Ser₁ ^{α} {4.36}, Thr₂ ^{α} {4.36}, Pro₃ ^{α} {4.34}, Val ^{α} {4.33}, Pro₁ ^{α} {4.29}, Pro₂ ^{α} {4.27}, Thr₁ ^{α} {4.23}, Thr₃ ^{α} {4.21}, H1-Gal' {4.21}, H2-GalN {4.16}, Ala₁ ^{α} {4.11}), 3.97 – 3.92 (m, 1H, Thr₃ ^{β} {3.94}), 3.92 – 3.81 (m, 3H, Thr₂ ^{β} {3.89}, Thr₁ ^{β} {3.87}, Gly₂ ^{$\alpha\alpha$} {3.83}), 3.81 – 3.37 (m, 42H, Gly₃ ^{α} {3.78}, Gly₁ ^{$\alpha\alpha$} {3.77}, Gly₂ ^{$\alpha\beta$} {3.74}, H5-GalN {3.72}, H6_a-GalN {3.72}, Ser_{ST} ^{$\alpha\alpha$} {3.72}, Gly₁ ^{$\alpha\beta$} {3.70}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{δ} {3.70 – 3.33}, H4-GalN {3.64}, H3-GalN {3.62}, H4-Gal' {3.62}, H6_b-GalN {3.62}, Ser₁ ^{$\beta\alpha$} {3.62}, Ser_{2,6-ST} ^{$\alpha\beta$} {3.62}, H8-Sia {3.62}, H3-Spa {3.60}, H8-Spa {3.57}, H4-Sia {3.56}, H6-Spa {3.56}, H6_a-Gal' {3.55}, H5-Spa {3.53}, Ser₂ ^{$\beta\alpha$} {3.51}, H5-Sia {3.51}, H9_a-Sia {3.50}, Ser₁ ^{$\beta\beta$} {3.48}, H6_b-Gal' {3.47}, Ser₂ ^{$\beta\beta$} {3.42}, H9_b-Sia {3.40}), 3.36 – 3.28 (m, 4H, H6-Sia {3.34}, H2-Gal' {3.32}, H5-Gal' {3.32}, H7-Sia {3.32}), 3.26 – 3.22 (m, 1H, H3-Gal' {3.25}), 3.10 – 3.00 (m, 3H, His ^{$\beta\alpha$} {3.06}, Arg ^{δ} {3.02}), 2.99 – 2.94 (m, 2H, H9-Spa {2.97}), 2.93 – 2.88 (m, 1H, His ^{$\beta\beta$} {2.90}), 2.70 (dd, 1H, ³ $J_{\text{Asp}\beta\alpha,\text{Asp}\alpha} = 7.2$ Hz, ² $J_{\text{Asp}\beta\alpha,\text{Asp}\beta\beta} = 15.6$ Hz, Asp ^{$\beta\alpha$}), 2.58 (t, 2H, ³ $J_{\text{H4,H3}} = 6.9$ Hz, H4-Pmc), 2.50 (mc, 1H, H3_{aq}-Sia), 2.49 – 2.41 (m, 7H, 2 x CH₃-Pmc {2.47}, Asp ^{$\beta\beta$} {2.42}), 2.39 (t, 2H, ³ $J_{\text{H2,H3}} = 6.4$ Hz, H2-Spa), 2.18 – 1.59 (m, 33H, Pro₄ ^{β} {2.12}, Pro₅ ^{$\beta\alpha$} {2.09}, H9_a-Pmc {2.02}, Pro₂ ^{$\beta\alpha$} {2.02}, Pro₃ ^{$\beta\alpha$} {2.00}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{γ} {2.00 – 1.71}, Val ^{β} {1.98}, Pro₁ ^{$\beta\alpha$} {1.93}, 1.89, 1.82 (2 x CH₃-Ac), Pro₃ ^{$\beta\beta$} {1.85}, Pro₁ ^{$\beta\beta$} {1.78}, Pro₂ ^{$\beta\beta$} {1.77}, H3-Pmc {1.75}, Pro₅ ^{$\beta\beta$} {1.71},

Arg^{βa} {1.65}), 1.57 – 1.31 (m, 13H, H_{3ax}-Sia {1.50}, Arg^{βb} {1.46}, Arg^γ {1.41}, 1.35 {s, 9H, CH₃-^tBu}), 1.27 – 1.04 (m, 63H, 1.25 {2 x s, 6H, H_{2a}-Pmc}, Ala₄^β {1.20}, Ala₃^β {1.18}, Ala₂^β {1.16}, Ala₁^β {1.14}, 1.15 {s, 9H, CH₃-^tBu}, 1.13 {s, 9H, CH₃-^tBu}, 1.12 {s, 9H, CH₃-^tBu}, 1.10 {s, 9H, CH₃-^tBu}, 1.06 {s, 9H, CH₃-^tBu}), 1.03 – 0.97 (m, 6H, Thr₂^γ {1.01}, Thr₃^γ {0.99}), 0.95 (d, 3H, ³J_{Thr_γ,Thr_β = 6.0 Hz, Thr₁^γ), 0.83 (d, 3H, ³J_{Val^{γa},Val^β = 6.4 Hz, Val^{γa}), 0.79 (d, 3H, ³J_{Val^{γb},Val^β = 6.3 Hz, Val^{γb}).}}}

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 172.28, 171.97, 171.90, 171.59, 171.51, 170.94, 170.78, 170.59, 170.46, 170.35, 170.33, 170.03, 169.87, 169.77, 169.57, 169.44, 169.35, 169.03, 168.96, 168.83, 168.79, 168.45 (C=O), 155.96 (C=N-Guan), 152.35 (C7-Pmc), 140.24 (C_{ipso}-Trt), 136.43 (C2-Imidazol), 135.08 (C10-Pmc), 134.47 (C5-Pmc), 130.56 (C5-Imidazol), 129.29, 128.70, 127.79 (C_{ortho}-Trt, C_{meta}-Trt, C_{para}-Trt), 123.12 (C9-Pmc), 118.01 (C6-/C8-Pmc), 121.79 (C4-Imidazol), 105.19 (C1-Gal'), 98.71 (C2-Sia), 98.42 (C1-GalN), 80.23 (C-^tBu), 78.01 (C_{qua}-Trt), 77.95 (C3-GalN), 75.83 (C5-Gal'), 74.19 (C-^tBu), 73.99 (C6-Sia), 73.95 (C2-Pmc), 73.68 (C3-Gal'), 73.63 (C-^tBu), 73.47 (C-^tBu), 73.20 (C-^tBu), 72.88 (C-^tBu), 71.77 (C8-Sia), 71.17 (C2-Gal'), 69.96 (C5-GalN), 69.99 (C6-Spa), 69.87 (C5-Spa), 68.89 (C7-Sia), 68.62 (C4-Gal'), 68.52 (C4-GalN), 67.93 (Thr₁^β), 67.52 (Thr₂^β), 67.21 (Thr₃^β), 67.18 (C8-Spa), 67.06 (C3-Spa), 66.58 (C4-Sia), 63.52 (C6-GalN), 63.52 (Ser_{2,6-ST}^β), 63.40 (C9-Sia), 62.19 (Ser₂^β), 62.15 (Ser₁^β), 60.75 (C6-Gal'), 59.73 (Pro₄^α), 57.96 (Thr₃^α), 57.92 (Pro₅^α), 59.70 (Pro₁^α), 59.62 (Pro₂^α), 59.54 (Pro₃^α), 57.85 (Val^α), 57.37 (Thr₂^α), 57.30 (Thr₁^α), 53.47 (Ser₂^α), 53.19 (Ser₁^α), 52.73 (Ser_{2,6-ST}^α), 52.68 (C5-Sia), 52.00 (His^α), 50.11 (Arg^α), 49.67 (Asp^α), 48.78 (Ala₁^α), 48.50 (C2-GalN), 46.99 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.67 (Ala₃^α), 46.59 (Ala_(2,4)^α), 42.24 (Gly_(1,2,3)^α), 41.18 (C3-Sia), 40.26 (Arg^δ), 39.02 (C9-Spa), 37.16 (Asp^β), 36.23 (C2-Spa), 32.60 (C3-Pmc), 31.16 (Val^β), 29.59 (Pro₂^β), 29.52 (Pro₃^β), 29.38 (Pro₁^β), 29.35 (Arg^β), 28.40, 28.38, 28.36, 28.11, 27.66, 27.63 (6 x CH₃-^tBu), 28.23 (Pro_(4,5)^β), 27.77 (His^β), 27.03 (2 x C_{2a}-Pmc), 25.20 (Arg^γ), 24.86 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 23.35, 23.21 (2 x CH₃-Ac), 21.27 (C4-Pmc), 19.66 (Val^{γa}), 19.52 (Thr₁^γ), 19.44 (Thr₃^γ), 18.83 (Thr₂^γ), 18.38 (Val^{γb}), 18.24 (Ala₁^β), 18.10 (Ala₂^β), 17.96 (C_{6a}-/C_{8a}-Pmc), 17.60 (Ala₃^β), 17.36 (Ala₄^β), 12.43 (C_{9a}-Pmc).

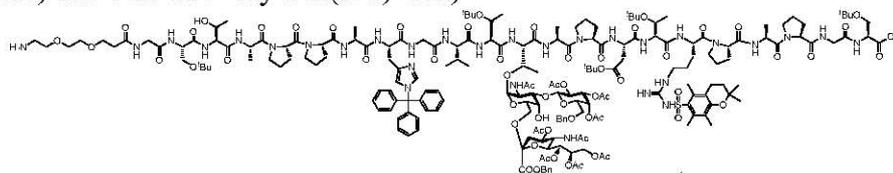
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1231.71 ([M+3H]³⁺, ber.: 1231.64).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1845.9478 ([M+2H]²⁺, ber.: 1845.9487).

C₁₇₄H₂₆₈N₃₀O₅₅S (3692.22)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanyl-amido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{lm}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (153)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^tBu)-Thr(^tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(^tBu)-Thr[α -3-(β -BnAc₃Gal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



Ausgehend von 128 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Ser(^tBu) versehenen Polystyrol-Harzes **142** (Beladung: 0.78 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der automatisierten Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Dabei erfolgt für die erste Aminosäure Glycin eine Doppelkupplung. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 236.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Thr[α -3-(β -BnAc₃Gal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-OH, 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 25.0 mg (0.184 mmol, 1.84 Äquiv.) HOAt, 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Die Kupplung der restlichen elf Aminosäuren und des Diethylenglycolspacer erfolgt wie für Verbindung **152** beschrieben. Nach erfolgter Synthese wird das polymergebundene Peptid in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 497 mg eines Peptidpolymer-Adduktes (Δ = 369 mg Rohpeptid) erhalten. Die Abspaltung erfolgt ebenfalls identisch zur Verbindung **152**. Der farblose Rückstand (420 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. R_t = 37.55 min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), R_t = 50.36 min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-2).

Ausbeute: 158 mg (0.038 mmol, 38 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -21.3$ ($c = 1.00$, CHCl₃)

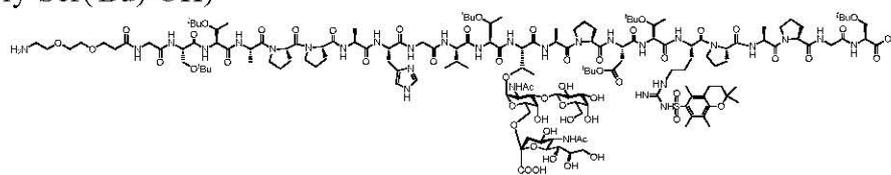
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2102.27$ ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 2102.04).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2101.0259$ ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 2101.0314).

C₂₀₃H₂₉₆N₃₀O₆₂S (4180.75)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*'-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (160)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^tBu)-Thr(^tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(^tBu)-Thr[α -3-(β -Gal)-(α -NeuNAcCOOH-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



158 mg (0.038 mmol) des glycosylierten Docosapeptids **153** werden in 45 ml Methanol mit 65 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle versetzt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird 21 h bei 1 bar Wasserstoffatmosphäre und Raumtemp. gerührt. Der Umsatz wird über die analytische RP-HPLC verfolgt. Danach wird die Wasserstoffatmosphäre gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über eine Kartusche mit C18-Säulenmaterial filtriert. Die kleine Säule wird mehrmals mit reinem Methanol gespült und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (155 mg) wird einige Male mit Toluol kodestilliert und ohne Reinigung der nachfolgenden Reaktion unterworfen. $R_t = 31.87$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1267.65$ ($[M+H+2Na]^{3+}$, ber.: 1267.67).

C₁₇₀H₂₇₀N₃₀O₆₂S (3758.19).

Das rohe Peptid wird anschließend in 45 ml Methanol gelöst und unter Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 36 h bei einem pH-Wert von 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des rohen Peptids (174 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 29.57$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 37.51$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-3).

Ausbeute: 65 mg (19.0 μ mol, 50 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -49.9$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 8.96 (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.53 (mc, 1H, NH-Ala₄), 8.40 – 8.23 (m, 2H, NH-Asp {8.38}, NH-Gly₁ {8.26}), 8.17 (t, 1H, ³J_{NH,Gly α} = 5.8 Hz, NH-Gly₂), 8.13 – 7.94 (m, 9H, NH-His {8.10}, NH-Ala₂ {8.09}, NH-Val {8.09}, NH-Ala₃ {8.08}, NH-Gly₃ {8.08}, NH-Sia {8.06}, NH-Ser₂ {8.02}, NH-Arg {7.98}, NH-Thr₃ {7.98}), 7.89 – 7.73 (m, 5H, NH-Thr_{2,6-ST} {7.88}, NH-Ser₁ {7.83}, NH-Ala₁ {7.81}, NH₂-Spa {7.79}), 7.68 (d, 1H, ³J_{NH,Thr α} = 8.2 Hz, NH-Thr₂), 7.39 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.20 (d, 1H, ³J_{NH,Thr α} = 8.5 Hz, NH-Thr₁), 6.77 – 6.60 (m, 2H, NH-GalN {6.74}, NH-Guan {6.66}), 4.77 – 4.73 (m, 1H, H1-GalN {4.75}), 4.61 – 4.06 (m, 22H, His ^{α} {4.59}, Asp ^{α} {4.56}, Ala_(2,4) ^{α} {4.54}, Pro₅ ^{α} {4.53}, Thr₃ ^{α} {4.51}, Arg ^{α} {4.50}, Ala₃ ^{α} {4.48}, Ser₂ ^{α} {4.41}, Val ^{α} {4.39}, Thr_{2,6-ST} ^{α} {4.38}, Ser₁ ^{α} {4.36}, Pro_(1,2,3,4) ^{α} {4.30}, Thr₁ ^{α} {4.24}, Thr₂ ^{α} {4.22}, Thr_{2,6-ST} ^{β} {4.17}, Ala₁ ^{α} {4.16}, H1-Gal' {4.12}, H2-GalN {4.10}), 4.01 – 3.85 (m, 4H, Thr₂ ^{β} {3.96}, Thr₃ ^{β} {3.92}, Gly₁ ^{$\alpha\alpha$} {3.90}, Thr₁ ^{β} {3.89}), 3.85 – 3.72 (m, 7H, H4-GalN {3.84}, H5-GalN {3.79}, Gly₂ ^{α} {3.79}, H6_a-GalN {3.77}, Gly₁ ^{$\alpha\beta$} {3.75}, Gly₃ ^{$\alpha\alpha$} {3.74}, Gly₃ ^{$\alpha\beta$} {3.70}), 3.71 – 3.35 (m, 32H, Pro_(1,2,3,4,5) ^{δ} {3.71 – 3.35}, Ser₁ ^{$\beta\alpha$} {3.64}, H3-Spa {3.63}, H6_b-GalN {3.62}, H4-Gal' {3.62}, H8-Sia {3.62}, H9_a-Sia {3.62}, H8-Spa {3.59}, H4-Sia {3.57}, H6-Spa {3.56}, H6_a-Gal' {3.53}, H5-Spa {3.53}, Ser₂ ^{$\beta\alpha$} {3.52}, H3-GalN {3.50}, Ser₁ ^{$\beta\beta$} {3.50}, H5-Sia {3.49}, Ser₂ ^{$\beta\beta$} {3.46}, H6_b-Gal' {3.43}, H9_b-Sia {3.40}), 3.35 – 3.18 (m, 5H, H2-Gal' {3.33}, H6-Sia {3.33}, H7-Sia {3.31}, H5-Gal' {3.28}, H3-Gal' {3.23}), 3.15 – 3.08 (m, 1H, His ^{$\beta\alpha$} {3.12}), 3.06 – 2.92 (m, 5H, Arg ^{δ} {3.03}, His ^{$\beta\beta$} {2.97}, H9-Spa {2.97}), 2.68 (dd, 1H, ³J_{Asp $\beta\alpha$,Asp α} = 7.1 Hz, ²J_{Asp $\beta\alpha$,Asp $\beta\beta$} = 15.1 Hz, Asp ^{$\beta\alpha$}), 2.58 (t, 2H, ³J_{H4,H3} = 6.9 Hz, H4-Pmc), 2.50 (mc, 1H, H3_{aq}-Sia), 2.49 – 2.41 (m, 7H, 2 x CH₃-Pmc {2.47}, Asp ^{$\beta\beta$} {2.44}), 2.39 (t, 2H, ³J_{H2,H3} = 6.3 Hz, H2-Spa), 2.17 – 1.60 (m, 32H, Pro₅ ^{$\beta\alpha$} {2.15}, Pro₃ ^{$\beta\alpha$} {2.03}, Pro₄ ^{$\beta\alpha$} {2.03}, Val ^{β} {2.03}, 2.02 (H9_a-Pmc), Pro_(1,2,3,4,5) ^{γ} {2.01 – 1.74}, Pro_(3,4) ^{$\beta\beta$} {1.98}, Pro₅ ^{$\beta\beta$} {1.93}, 1.89, 1.86 (2 x CH₃-Ac), Pro_(1,2) ^{$\beta\alpha$} {1.84}, Pro_(1,2) ^{$\beta\beta$} {1.78}, H3-Pmc (1.76), Arg ^{$\beta\alpha$} {1.66}), 1.56 – 1.31 (m, 13H, H3_{ax}-Sia {1.53}, Arg ^{$\beta\beta$} {1.48}, Arg ^{γ} {1.42}, 1.37 {s, 9H, CH₃-^{*t*}Bu}), 1.29 – 1.04 (m, 57H, 1.25 {2 x s, 6H, H2_a-Pmc}, Ala₄ ^{β} {1.24}, Thr_{2,6-ST} ^{γ} {1.21}, Ala₃ ^{β} {1.20}, Ala_(1,2) ^{β} {1.18}, 1.18 {s, 9H, CH₃-^{*t*}Bu}, 1.13 {s, 9H, CH₃-^{*t*}Bu}, 1.12 {s, 9H, CH₃-^{*t*}Bu}, 1.10 {s, 9H, CH₃-^{*t*}Bu}, Thr₃ ^{γ} {1.08}, 1.06 {s, 9H, CH₃-^{*t*}Bu}), 0.99 (d, 3H, ³J_{Thr γ ,Thr β} = 6.2 Hz, Thr₂ ^{γ}), 0.94 (d, 3H, ³J_{Thr γ ,Thr β} = 6.0 Hz, Thr₁ ^{γ}), 0.88 (d, 3H, ³J_{Val $\gamma\alpha$,Val β} = 6.5 Hz, Val ^{$\gamma\alpha$}), 0.83 (d, 3H, ³J_{Val $\gamma\beta$,Val β} = 6.6 Hz, Val ^{$\gamma\beta$}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 172.45, 172.01, 171.93, 171.82, 171.63, 171.60, 170.98, 170.83, 170.62, 170.48, 170.36, 170.10, 170.00, 169.75, 169.59, 169.47, 169.37, 169.34, 168.99, 168.89, 168.85, 168.80, 168.48 (C=O), 156.00

(C=N-Guan), 152.76 (C7-Pmc), 135.06 (C5-Pmc), 135.00 (C10-Pmc), 133.96 (C2-Imidazol), 129.45 (C5-Imidazol), 123.12 (C9-Pmc), 118.14 (C6-/C8-Pmc), 117.45 (C4-Imidazol), 105.61 (C1-Gal'), 99.51 (C1-GalN), 98.05 (C2-Sia), 80.24 (C-^tBu), 79.34 (C3-GalN), 76.52 (Thr_{2,6-ST}^β), 76.02 (C5-Gal'), 74.65 (C-^tBu), 74.36 (C-^tBu), 74.04 (C-^tBu), 74.03 (C6-Sia), 73.93 (C2-Pmc), 73.54 (C-^tBu), 73.36 (C3-Gal'), 73.29 (C-^tBu), 71.74 (C8-Sia), 71.05 (C2-Gal'), 70.11 (C5-GalN), 70.00 (C6-Spa), 69.91 (C5-Spa), 68.86 (C7-Sia), 68.64 (C4-Gal'), 68.62 (C4-Sia), 68.56 (C4-GalN), 67.78 (Thr₃^β), 67.49 (Thr₁^β), 67.18 (Thr₂^β), 67.15 (C8-Spa), 67.13 (C3-Spa), 63.78 (C6-GalN), 63.48 (C9-Sia), 62.17 (Ser₁^β), 62.13 (Ser₂^β), 60.94 (C6-Gal'), 59.73 (Pro₄^α), 59.58 (Pro_(2,3)^α), 59.40 (Pro₁^α), 57.93 (Thr₂^α), 57.82 (Val^α), 57.82 (Thr_{2,6-ST}^α), 57.75 (Pro₅^α), 57.28 (Thr₁^α), 57.20 (Thr₃^α), 53.54 (Ser₂^α), 53.22 (Ser₁^α), 52.77 (C5-Sia), 51.76 (His^α), 50.19 (Arg^α), 49.78 (Asp^α), 48.81 (Ala₁^α), 48.43 (C2-GalN), 46.99 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.60 (Ala₃^α), 46.53 (Ala_(2,4)^α), 42.32 (Gly₁^α), 42.26 (Gly₃^α), 42.21 (Gly₂^α), 40.91 (C3-Sia), 40.30 (Arg^δ), 39.01 (C9-Spa), 37.19 (Asp^β), 36.24 (C2-Spa), 32.58 (C3-Pmc), 31.28 (Val^β), 29.54 (Pro_(1,2,3,4)^β), 29.23 (Arg^β), 28.62, 28.22, 28.11, 28.06, 27.69, 27.63 (6 x CH₃-^tBu), 28.13 (Pro₅^β), 27.44 (His^β), 26.91 (2 x C2a-Pmc), 25.12 (Arg^γ), 24.84 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 23.37, 23.13 (2 x CH₃-Ac), 21.23 (C4-Pmc), 19.69 (Val^{γa}), 19.52 (Thr₁^γ), 18.55 (Thr₃^γ), 18.50 (Thr₂^γ), 18.05 (Thr_{2,6-ST}^γ), 18.48 (Val^{γb}), 17.84 (C6a-/C8a-Pmc), 17.75 (Ala_(1,2,3)^β), 17.23 (Ala₄^β), 12.38 (C9a-Pmc).

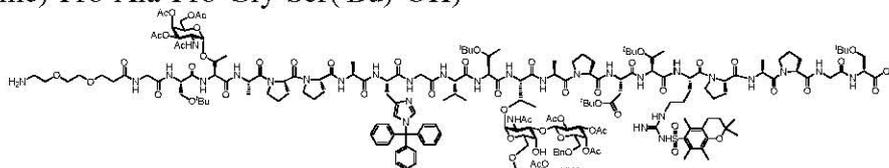
ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 1732.94 ([M+2H]²⁺, ber.: 1732.91).

HR-ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 1731.9137 ([M+2H]²⁺, ber.: 1731.9065).

C₁₅₆H₂₅₆N₃₀O₅₅S (3463.93)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanyl-amido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{Im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(6-benzyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (154)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^tBu)-Thr(α -GalAc₃NAC)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(^tBu)-Thr[α -3-(β -Ac₃BnGal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



Ausgehend von 128 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Ser(^tBu) versehenen Polystyrol-Harzes **142** (Beladung: 0.78 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Dabei erfolgt für die erste Aminosäure Glycin eine Doppelkupplung. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure **47** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 236.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Thr[α -3-(β -Ac₄BnGal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-OH (**47**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 25.0 mg (0.184 mmol, 1.84 Äquiv.) HOAt, 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Threonin und L-Valin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die restlichen sechs Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Kupplung der zweiten glycosylierten Aminosäure **14** erfolgt mit einer Lösung aus 234.0 mg (0.350 mmol, 3.5 Äquiv.) Fmoc-Thr(α -GalAc₃NAC)-OH (**14**), 146.0 mg (0.385 mmol, 3.84 Äquiv.) HATU, 54.0 mg (0.397 mmol, 3.97 Äquiv.) HOAt, 77.0 mg (0.761 mmol, 7.61 Äquiv.) NMM in 1.5 ml NMP und es wird 12 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Serin und Glycin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die Anbindung des Diethylglycolspacers erfolgt wie für Verbindung **152** beschrieben. Nach erfolgter Synthese wird das polymergebundene Peptid in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden

529 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 401$ mg Rohpeptid) erhalten. Die Abspaltung erfolgt ebenfalls identisch zur Verbindung **152**. Der farblose Rückstand (395 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 37.13$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 47.38$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-2).

Ausbeute: 153 mg (0.034 mmol, 34 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -11.2$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

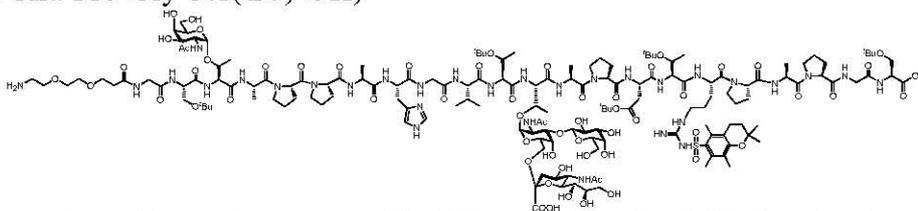
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2227.52$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 2227.57).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2226.5640$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 2226.5647).

$\text{C}_{213}\text{H}_{307}\text{N}_{31}\text{O}_{70}\text{S}$ (4453.95)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-N-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-tert-butyl-L-threonyl-O-[2-acetamido-3-O-(β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-O-(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-O-tert-butyl-L-aspartyl-O-tert-butyl-L-threonyl-N⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-O-tert-butyl-serin (161**)**

($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_2)_2\text{CONH-Gly-Ser}^t(\text{Bu})\text{-Thr}(\alpha\text{-GalNAc})\text{-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr}^t(\text{Bu})\text{-Thr}[\alpha\text{-3-(}\beta\text{-Gal)-}(\alpha\text{-NeuNAcCOOH-(2-6))\text{-}\alpha\text{-GalNAc}]\text{-Ala-Pro-Asp}^t(\text{Bu})\text{-Thr}^t(\text{Bu})\text{-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser}^t(\text{Bu})\text{-OH}$)



153 mg (0.034 mmol) des glycosylierten Docosa-peptids **154** werden in 50 ml Methanol gelöst und mit 80 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle versetzt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird 72 h bei Raumtemp. und 30 bar Wasserstoffatmosphäre gerührt und der Umsatz mittels HPLC überwacht. Danach wird die Wasserstoffatmosphäre gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über eine Kartusche mit C18-Säulenmaterial filtriert. Die kleine Säule wird mehrmals mit reinem Methanol gespült und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (154 mg) wird einige Male mit Toluol kodestilliert und ohne Reinigung der nachfolgenden Reaktion unterworfen. $R_t = 31.38$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2016.73$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 2016.47).

$\text{C}_{180}\text{H}_{281}\text{N}_{31}\text{O}_{70}\text{S}$ (4031.39)

Das rohe Peptid wird in 45 ml Methanol gelöst und unter Kontrolle des pH-Werts mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natrium-methanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 36 h bei einem pH-Wert von 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des Peptids (218 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 28.80$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 36.50$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-3). Ausbeute: 78 mg (0.022 mmol, 63 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -44.5$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): $[\delta/\text{ppm}] = 8.96$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.53 (m_c, 1H, NH-Ala₄), 8.36 (m_c, 1H, NH-Asp), 8.27 (m_c, 1H, NH-Gly₁), 8.19 (t, 1H, ³ $J_{\text{NH,Gly}\alpha} = 5.8$ Hz, NH-Gly₂), 8.15 – 7.68 (m, 14H, NH-Ala₂ {8.11}, NH-His {8.10}, NH-Val {8.10}, NH-Ala₁ {8.09}, NH-Ala₃ {8.09}, NH-Gly₃ {8.08}, NH-Sia {8.07}, NH-Arg {8.00}, NH-Ser₂ {7.97}, NH-Thr^{TN} {7.91}, NH-Ser₁ {7.84}, NH-Thr₂ {7.82}, NH₂-Spa {7.81}), 7.39 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.20 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 7.7$ Hz, NH-Thr₁), 7.14 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 9.1$ Hz, NH-GalN^{TN}), 6.79 – 6.61 (m, 2H, NH-GalN^{2,6-ST} {6.74}, NH-Guan {6.68}), 4.77 – 4.73 (m, 1H, H1-GalN^{2,6-ST} {4.76}), 4.71 (d, 1H, ³ $J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz, H1-GalN^{TN}), 4.60 – 4.05 (m, 23H, His^α {4.58}, Ser₂^α {4.57}, Asp^α {4.56}, Ala₄^α {4.53}, Pro₅^α {4.53}, Thr₂^α {4.51}, Arg^α {4.50}, Ala₃^α {4.48}, Ala₂^α {4.45}, Thr^α_{TN} {4.41}, Val^α {4.40}, Ser₁^α {4.36}, Pro_(1,2,3,4)^α {4.30}, Thr^α_{2,6-ST} {4.29}, Thr₁^α {4.24}, Thr^β_{2,6-ST} {4.17}, Ala₁^α {4.16}, H1-Gal' {4.12}, H2-GalN^{2,6-ST} {4.11}, Thr^β_{TN} {4.10}), 3.99 (td, 1H, ³ $J_{\text{H2,NH}} \approx {}^3J_{\text{H2,H3}} \approx 10.3$ Hz, ³ $J_{\text{H2,H1}} \approx 3.7$ Hz, H2-GalN^{TN}), 3.95 – 3.85 (m, 3H, Thr₂^β {3.93}, Gly₁^{αα} {3.90}, Thr₁^β {3.90}), 3.84 – 3.66 (m, 10H, H4-GalN^{2,6-ST} {3.83}, Gly₃^{αα} {3.81}, Gly₂^{αα} {3.79}, H5-GalN^{2,6-ST} {3.79}, H6_a-GalN^{TN} {3.77}, H5-GalN^{TN} {3.75}, Gly₁^{αb} {3.75}, Gly₂^{αb} {3.72}, H4-GalN^{TN} {3.71}, Gly₃^{αb} {3.69}), 3.65 – 3.36 (m, 35H, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.70 – 3.39}, Ser₁^{βa} {3.64}, H3-Spa {3.63}, H4-Gal' {3.62}, H6_b-GalN^{TN} {3.62}, H8-Sia {3.62}, H9_a-Sia {3.62}, H3-GalN^{TN} {3.58}, H4-Sia {3.58}, H8-Spa {3.58}, H6-Spa {3.56}, H5-Spa {3.54}, H6_a-Gal' {3.53}, Ser₂^{βa} {3.52}, H3-GalN^{2,6-ST} {3.51}, H6_a-GalN^{2,6-ST} {3.50}, Ser₁^{βb} {3.50}, H5-Sia {3.50}, Ser₂^{βb} {3.46}, H6_b-GalN^{2,6-ST} {3.43}, H6_b-Gal' {3.43}, H9_b-Sia {3.40}, 3.35 – 3.18 (m, 5H, H2-Gal' {3.33}, H6-Sia {3.33}, H7-Sia {3.32}, H5-Gal' {3.28}, H3-Gal' {3.23}), 3.14 – 3.07 (m, 1H, His^{βa} {3.11}), 3.06 – 2.92 (m, 5H, Arg^δ {3.03}, His^{βb} {2.99}, H9-Spa {2.97}), 2.68 (dd, 1H, ³ $J_{\text{Asp}\beta\text{a,Asp}\alpha} = 7.2$ Hz, ² $J_{\text{Asp}\beta\text{a,Asp}\beta\text{b}} = 16.7$ Hz, Asp^{βa}), 2.58 (t, 2H,

$^3J_{\text{H4,H3}} = 6.8$ Hz, H4-Pmc), 2.50 (m_c, 1H, H3_{aq}-Sia), 2.49 – 2.43 (m, 7H, 2 x CH₃-Pmc {2.46}, Asp^{βb} {2.45}), 2.40 (t, 2H, $^3J_{\text{H2,H3}} = 6.5$ Hz, H2-Spa), 2.16 – 1.59 (m, 36H, Pro₅^{βa} {2.15}, Pro₄^{βa} {2.03}, Val^β {2.03}, 2.02 (H9a-Pmc), Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.01 – 1.74}, Pro₃^{βa} {2.00}, Pro_(1,2)^{βa} {1.98}, Pro₃^{βb} {1.91}, 1.89, 1.86 (3 x CH₃-Ac), Pro₄^{βb} {1.85}, Pro₂^{βb} {1.84}, Pro₁^{βb} {1.79}, Pro₅^{βb} {1.77}, H3-Pmc {1.76}, Arg^{βa} {1.66}), 1.56 – 1.31 (m, 13H, H3_{ax}-Sia {1.53}, Arg^{βb} {1.47}, Arg^γ {1.42}, 1.37 {s, 9H, CH₃-^tBu}), 1.29 – 0.99 (m, 63H, 1.25 {2 x s, 6H, H2a-Pmc}, Ala₄^β {1.24}, Ala_(1,3)^β {1.19}, Thr_{2,6-ST}^γ {1.19}, 1.18 {s, 9H, CH₃-^tBu}, Ala₂^β {1.17}, 1.12 {s, 9H, CH₃-^tBu}), 1.10 (s, 9H, CH₃-^tBu), Thr_{TN}^γ {1.10}, Thr₂^γ {1.09}, 1.06 {s, 9H, CH₃-^tBu}), 0.94 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}_\gamma, \text{Thr}_\beta} = 6.0$ Hz, Thr₁^γ), 0.88 (d, 3H, $^3J_{\text{Val}_\gamma, \text{Val}_\beta} = 6.4$ Hz, Val^{γa}), 0.83 (d, 3H, $^3J_{\text{Val}_\gamma, \text{Val}_\beta} = 6.5$ Hz, Val^{γb}).

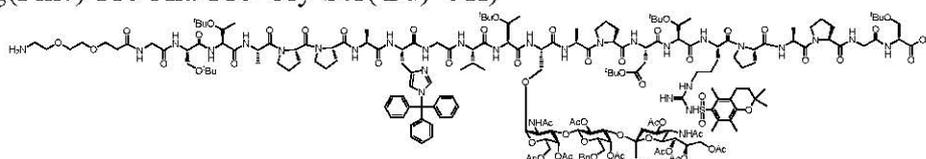
150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 172.45, 172.01, 171.93, 171.88, 171.67, 171.61, 170.97, 170.78, 170.61, 170.36, 170.09, 170.05, 169.99, 169.77, 169.37, 169.34, 169.14, 168.95, 168.85 (C=O), 155.97 (C=N-Guan), 152.72 (C7-Pmc), 135.07 (C10-Pmc), 134.44 (C5-Pmc), 133.84 (C2-Imidazol), 129.45 (C5-Imidazol), 123.12 (C9-Pmc), 118.13 (C6-/C8-Pmc), 117.33 (C4-Imidazol), 105.59 (C1-Gal'), 99.44 (C1-GalN^{2,6-ST}), 99.17 (C1-GalN^{TN}), 98.05 (C2-Sia), 80.24 (C-^tBu), 79.33 (C3-GalN^{2,6-ST}), 76.51 (Thr_{2,6-ST}^β), 75.99 (C5-Gal'), 75.26 (Thr_{TN}^β), 74.92 (C6-Sia), 74.58 (C-^tBu), 74.05 (C-^tBu), 73.94 (C2-Pmc), 73.84 (C-^tBu), 73.34 (C3-Gal'), 73.33 (C-^tBu), 71.53 (C8-Sia), 71.06 (C2-Gal'), 70.68 (C5-GalN^{TN}), 70.09 (C5-GalN^{2,6-ST}), 70.02 (C6-Spa), 69.86 (C5-Spa), 68.87 (C3-GalN^{TN}), 68.87 (C4-Sia), 68.86 (C7-Sia), 68.65 (C4-GalN^{TN}), 68.59 (C4-Gal'), 68.56 (C4-GalN^{2,6-ST}), 67.51 (Thr_(1,2)^β), 67.17 (C3-Spa), 67.14 (C8-Spa), 63.84 (C6-GalN^{TN}), 63.49 (C9-Sia), 62.98 (C6-GalN^{2,6-ST}), 62.27 (Ser₂^β), 62.12 (Ser₁^β), 61.08 (C6-Gal'), 59.59 (Thr_{2,6-ST}^α), 59.59 (Pro_(1,2,3,4)^α), 57.78 (Val^α), 57.72 (Pro₅^α), 57.31 (Thr₁^α), 57.26 (Thr₂^α), 56.21 (Thr_{TN}^α), 53.63 (Ser₂^α), 53.14 (Ser₁^α), 52.79 (C5-Sia), 51.74 (His^α), 50.11 (Arg^α), 49.77 (Asp^α), 49.68 (C2-GalN^{TN}), 48.79 (Ala₁^α), 48.40 (C2-GalN^{2,6-ST}), 47.05 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.63 (Ala₂^α), 46.61 (Ala₃^α), 46.41 (Ala₄^α), 42.31 (Gly₁^α), 42.26 (Gly_(2,3)^α), 40.88 (C3-Sia), 40.28 (Arg^δ), 39.01 (C9-Spa), 37.15 (Asp^β), 36.25 (C2-Spa), 32.54 (C3-Pmc), 31.19 (Val^β), 29.58 (Pro₃^β), 29.53 (Pro_(2,3)^β), 29.40 (Arg^β), 29.29 (Pro₁^β), 28.65, 28.30, 28.10, 27.63, 27.62 (5 x CH₃-^tBu), 28.23 (Pro₅^β), 27.49 (His^β), 26.91 (2 x C2a-Pmc), 25.12 (Arg^γ), 24.82 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 23.39, 23.15 (3 x CH₃-Ac), 21.24 (C4-Pmc), 19.68 (Val^{γa}), 19.53 (Thr₁^γ), 19.01 (Thr_{TN}^γ), 18.63 (Thr_{2,6-ST}^γ), 18.60 (Thr₂^γ), 18.46 (Val^{γb}), 17.84 (C6a-/C8a-Pmc), 17.59 (Ala_(1,3)^β), 17.23 (Ala₄^β), 17.02 (Ala₂^β), 12.38 (C9a-Pmc).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1204.29 ([M+3H]³⁺, ber.: 1204.28).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1805.4086$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1805.4149).

$C_{160}H_{261}N_{31}O_{60}S$ (3611.02)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{Im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-[2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- β -D-galactopyranosyl)- α -D-galactopyranosyl]-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (155)
 $(H_2N-(CH_2CH_2O)_2(CH_2)_2CONH-Gly-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(tBu)-Ser[\alpha-Ac_4NeuNAcCOOBn-(2-3)-(\beta-6-O-BnAc_2Gal)-\alpha-Ac_2GalNAc]-Ala-Pro-Asp(tBu)-Thr(tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(tBu)-OH)$



Ausgehend von 128 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Ser(*t*Bu) versehenen Polystyrol-Harzes **142** (Beladung: 0.78 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der automatisierten Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Dabei erfolgt für die erste Aminosäure Glycin eine Doppelkupplung. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure **56** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 240.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser[α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-3)-(β -6-O-BnAc₂Gal)- α -Ac₂GalNAc]-OH (**56**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 25.0 mg (0.184 mmol, 1.84 Äquiv.) HOAt, 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Threonin und L-Valin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die Kupplung der restlichen acht Aminosäuren und des Diethylglycolspacer erfolgt wie für Verbindung **152** beschrieben. Nach Abschluss wird das polymergebundene Peptid in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 439 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 311$ mg Rohpeptid) erhalten. Die Abspaltung erfolgt wie bei Verbindung **152**. Der farblose Rückstand (336 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids wird mittels präparativer RP-HPLC durchgeführt. $R_t = 38.63$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 49.85$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-2).

Ausbeute: 104 mg (0.025 mmol, 25 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -14.8$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$).

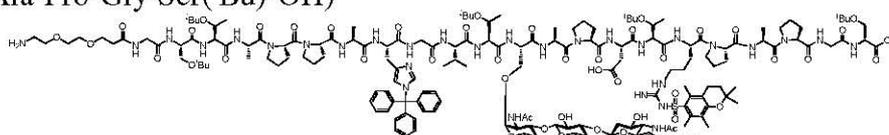
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2105.02$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 2105.04).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2104.0342$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 2104.0379).

$C_{204}H_{296}N_{30}O_{63}S$ (4208.76)

9-Amino-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*tm-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-[2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-(6-*O*-benzyl-3-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- β -D-galactopyranosyl)- α -D-galactopyranosyl]-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (162)

(H₂N-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^tBu)-Thr(^tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(^tBu)-Ser[α -NeuNAcCOOH-(2-3)-(β -6-*O*-BnGal)- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



127 mg (0.030 mmol) des glycosylierten Docosapeptids **155** werden in 90 ml Methanol gelöst und unter Kontrolle des pH-Werts mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 19 h bei pH 10.5 gerührt und der Reaktionsfortschritt durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Es werden 163 mg des rohen umgeesterten Peptids erhalten. $R_t = 35.60$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1281.09$ ($[M+H+2Na]^{3+}$, ber.: 1280.98).

$C_{182}H_{276}N_{30}O_{55}S$ (3796.37)

Das rohe Peptid wird in 40 ml einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH = 10.5) gelöst und durch Zugabe einer Natriumhydroxid-Stammlösung auf einen pH-Wert von 10.5 nachreguliert. Der Reaktionsfortschritt wird durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe wässriger Natriumhydroxid-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz bei 10.5 gehalten. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des Peptids (223 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC.

$R_t = 37.78$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2), $R_t = 67.30$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-3), $R_t = 48.45$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-2).

Ausbeute: 38 mg (0.010 mmol, 34 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -34.2$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): $[\delta/\text{ppm}] = 8.86$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.36 – 8.29 (m, 1H, NH-Gly₁ {8.32}), 8.19 (t, 1H, ³ $J_{\text{NH,Gly}\alpha} = 5.5$ Hz, NH-Gly₂), 8.16 – 7.97 (m, 7H, NH-Ala₃ {8.11}, NH-Ala₄ {8.10}, NH-Gly₃ {8.09}, NH-His {8.08}, NH-Ala₁ {8.06}, NH-Sia {8.05}, NH-Ser₂ {8.02}), 7.97 – 7.76 (m, 6H, NH-Asp {7.92}, NH-Thr₃ {7.91}, NH-Arg {7.87}, NH-Ser₁ {7.84}, NH₂-Spa {7.77}), 7.68 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,Ala}\alpha} = 6.9$ Hz, NH-Ala₂), 7.58 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 5.7$ Hz, NH-Thr₁), 7.52 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,Ala}\alpha} = 9.0$ Hz, NH-Thr₂), 7.48 – 7.41 (m, 9H, H_{meta}-Trt, H_{para}-Trt), 7.35 – 7.23 (m, 6H, H_{Ar}-Bn, 7.27 {s, 1H, H_{4Ar}-His}), 7.16 – 7.10 (m, 6H, H_{ortho}-Trt), 6.93 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,H2}} = 8.1$ Hz, NH-GalN), 6.67 – 6.56 (s_b, 1H, NH-Guan {6.61}), 4.70 (s_b, 1H, H1-GalN), 4.64 – 4.40 (m, 11H, Asp^α {4.62}, His^α {4.56}, Ala₂^α {4.54}, Pro₅^α {4.53}, Ser_{2,3-ST}^α {4.51}, Ala₄^α {4.49}, CH_{2a}-Bn {4.49}, Ala₃^α {4.48}, Arg^α {4.45}, Pro₄^α {4.44}, CH_{2b}-Bn {4.44}), 4.40 – 4.11 (m, 11H, Val^α {4.39}, Thr₃^α {4.38}, Ser_(1,2)^α {4.36}, H1-Gal' {4.34}, Pro_(1,2,3)^α {4.29}, Thr₁^α {4.22}, H2-GalN {4.20}, Thr₂^α {4.19}), 4.06 – 3.99 (m, 2H, Ala₁^α {4.06}, Thr₂^β {4.03}), 3.98 – 3.85 (m, 2H, Thr₁^β {3.96}, Thr₃^β {3.90}), 3.85 – 3.28 (m, 48 H, Gly_(2,3)^{αa} {3.78}, Gly₁^α {3.73}, Gly_(2,3)^{αb} {3.72}, H4-Gal' {3.72*}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.70 – 3.30}, H4-GalN {3.68*}, H3-GalN {3.67}, H3-Gal' {3.67}, Ser₁^{βa} {3.64}, H4-Sia {3.61}, H3-Spa {3.61}, H8-Spa {3.59}, H9_a-Sia {3.59*}, H5-Gal' {3.58*}, H6_a-Gal' {3.57}, Ser₂^{βa} {3.56}, H6_a-GalN {3.55}, H8-Sia {3.55*}, H5-GalN {3.52*}, H6-Spa {3.52}, H5-Sia {3.51}, Ser₁^{βb} {3.50}, Ser_{2,3-ST}^{βa} {3.50}, H5-Spa {3.48}, Ser₂^{βb} {3.46}, H9_b-Sia {3.44*}, H6_b-GalN {3.43}, H6_b-Gal' {3.41}, Ser_{2,3-ST}^{βb} {3.41}, H2-Gal' {3.38}, H6-Sia {3.36}, H7-Sia {3.34}), 3.13 – 3.07 (m, 1H, His^{βa} {3.12}), 3.07 – 2.94 (m, 4H, Arg^δ {3.02}, H9-Spa {2.99}), 2.93 – 2.85 (m, 1H, His^{βb} {2.92}), 2.63 (dd, 1H, ³ $J_{\text{Asp}\beta\text{a,Asp}\alpha} = 5.4$ Hz, ² $J_{\text{Asp}\beta\text{a,Asp}\beta\text{b}} = 15.3$ Hz, Asp^{βa}), 2.58 (t, 2H, ³ $J_{\text{H4,H3}} = 6.9$ Hz, H4-Pmc), 2.55 – 2.48 (m, 2H, Asp^{βb} {2.52}, H3_{aq}-Sia {2.61}), 2.50 – 2.45 (m, 6H, 2 x CH₃-Pmc {2.47}), 2.41 – 2.36 (m, 2H, H2-Spa {2.38}), 2.15 – 1.57 (m, 34H, Pro₄^{βa} {2.14}, Pro₅^{βa} {2.10}, Pro₃^{βa} {2.04}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.04 – 1.74}, Val^β {2.04}, H9_a-Pmc {2.02}, Pro₂^{βa} {2.01}, Pro₄^{βb} {2.01}, Pro₂^{βb} {1.96}, Pro₃^{βb} {1.91}, 1.88, 1.83 (2 x CH₃-Ac), Pro₁^{βa} {1.84}, Pro₁^{βb} {1.78}, H3-Pmc {1.77}, Pro₅^{βb} {1.71}, H3_{ax}-Sia {1.69}, Arg^{βa} {1.62}), 1.52 – 1.32 (m, 12H, Arg^{βb} {1.46}, Arg^γ {1.43}, 1.35 {s, 9H, CH₃-^tBu}), 1.27 – 1.05 (m, 63H, 1.25 {2 x s, 6H, H2a-Pmc}, Ala_(3,4)^β {1.19}, Ala₂^β {1.17}, Ala₁^β {1.15}, 1.15 {s, 9H, CH₃-^tBu}, 1.14 {s,

9H, CH₃-^tBu}, 1.12 {s, 9H, CH₃-^tBu}, 1.10 {2 x s, 18H, CH₃-^tBu}), 1.04 – 0.99 (m, 6H, Thr₂^γ {1.02}, Thr₃^γ {1.00}), 0.97 (d, 3H, ³J_{Thry,Thfβ} = 6.1 Hz, Thr₁^γ), 0.84 – 0.81 (m, 3H, Val^{γa} {0.82}), 0.78 (d, 3H, ³J_{Valγb,Valβ} = 6.5 Hz, Val^{γb}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-d₆): [δ/ppm] = 172.32, 172.14, 171.92, 171.64, 171.60, 171.19, 170.99, 170.58, 170.57, 170.13, 169.92, 169.85, 169.62, 169.45, 169.36, 169.24, 169.08, 168.97, 168.85, 168.57, 168.26, 168.04 (C=O), 155.98 (C=N-Guan), 152.77 (C7-Pmc), 140.62 (C_{ipso}-Trt), 136.46 (C2-Imidazol), 135.13 (C5-Pmc), 135.02 (C10-Pmc), 134.11 (C_{ipso}-Bn), 130.53 (C5-Imidazol), 129.30, 128.77, 128.72, 128.26, 127.80, 127.57, 127.20, 126.68 (C_{ortho}-Trt, C_{meta}-Trt, C_{para}-Trt, H_{Ar}-Bn), 123.12 (C9-Pmc), 121.33 (C4-Imidazol), 118.16 (C6-/C8-Pmc), 105.03 (C1-Gal'), 99.83 (C2-Sia), 98.87 (C1-GalN), 80.37 (C-^tBu), 78.28 (C3-GalN), 78.05 (C_{qua}-Trt), 76.15 (C3-Gal'), 74.31 (C6-Sia), 74.30 (C-^tBu), 74.10 (C-^tBu), 73.92 (C2-Pmc), 73.79 (C5-GalN*), 73.71 (C5-Gal*), 73.48 (C-^tBu), 73.26 (C-^tBu), 72.89 (C-^tBu), 72.63 (CH₂-Bn), 71.22 (C8-Sia), 69.83 (C6-Spa), 69.80 (C4-Gal'), 69.78 (C5-Spa), 68.96 (C6-Gal*), 68.53 (C4-Sia*), 68.49 (C4-GalN*), 68.34 (C2-Gal*), 68.30 (C7-Sia), 67.56 (Thr₁^β), 67.38 (Thr₃^β), 67.18 (C3-Spa), 67.08 (C8-Spa), 66.95 (Thr₂^β), 63.44 (C9-Sia), 62.07 (Ser_{2,3-ST}^β), 62.04 (Ser₁^β), 61.98 (C6-GalN*), 61.98 (Ser₂^β), 59.62 (Pro₄^α), 59.57 (Pro_(1,2,3)^α), 58.04 (Thr₂^α), 57.92 (Pro₅^α), 57.62 (Thr₁^α), 57.59 (Thr₃^α), 57.59 (Val^α), 53.42 (Ser₂^α), 53.28 (Ser₁^α), 53.21 (Ser_{2,3-ST}^α), 52.60 (C5-Sia), 52.03 (His^α), 50.38 (Arg^α), 49.70 (Asp^α), 49.13 (Ala₁^α), 48.45 (C2-GalN), 47.00 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.61 (Ala₂^α), 46.57 (Ala_(3,4)^α), 42.35 (Gly₁^α), 42.25 (Gly_(2,3)^α), 40.34 (C9-Spa), 40.28 (Arg^δ), 38.86 (C3-Sia), 38.10 (Asp^β), 36.24 (C2-Spa), 32.52 (C3-Pmc), 31.08 (Val^β), 29.58 (Pro₃^β), 29.47 (Pro_(2,4)^β), 29.45 (Pro₁^β), 29.11 (Arg^β), 28.48, 28.35, 28.27, 28.12, 28.04, 27.65 (6 x CH₃-^tBu), 28.17 (Pro₅^β), 27.44 (His^β), 26.87 (2 x C2a-Pmc), 25.12 (Arg^γ), 24.84 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 23.27, 23.04 (2 x CH₃-Ac), 21.18 (C4-Pmc), 19.69 (Val^{γa}), 19.59 (Thr₃^γ), 18.96 (Thr₁^γ), 18.71 (Thr₂^γ), 18.27 (Val^{γb}), 18.09 (Ala₁^β), 17.87 (C6a-/C8a-Pmc), 17.54 (Ala₃^β), 17.45 (Ala₂^β), 17.21 (Ala₄^β), 12.40 (C9a-Pmc).

Die mit einem * angegebenen Werte konnten aufgrund der hohen Peakdichte nicht genau ermittelt werden. Es handelt sich bei den angegebenen Werten nur um Vorschläge.

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1255.70 ([M+Ca+H]³⁺, ber.: 1255.61).

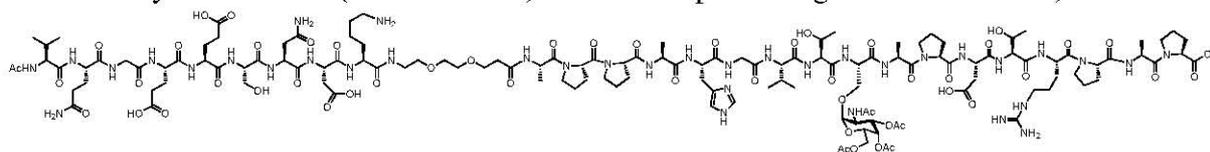
C₁₇₇H₂₆₆N₃₀O₅₅S (3726.24).

5.10.3 Adjuvierte MUC1-Konjugate

5.10.3.1 Die Synthesen von Interleukin-1 β -MUC1-Glycopeptiden

N-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyll-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyll-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyll-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyll-L-arginyll-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (163)

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α -GalAc₃NAC)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 136 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Pro versehenen Polystyrol-Harzes **137** (Beladung: 0.74 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure **17** erfolgt halbautomatisch im Peptidsynthesizer. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 105.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAC)-OH (**17**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 24.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HOAt und 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 8 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die folgenden acht Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Anbindung des Diethylenglycolspacers erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung aus 120.0 mg (0.300 mmol, 3.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 126.0 mg (0.331 mmol, 3.31 Äquiv.) HATU, 47.0 mg (0.345 mmol, 3.45 Äquiv.) HOAt, 66.0 mg (0.652 mmol, 6.52 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP. Die Lösung wird 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die restlichen neun Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt, wobei für das L-Lysin eine Doppelkupplung durchgeführt wird. Im letzten Teilschritt wird Glycopeptid von

der Fmoc-Schutzgruppe befreit. Ein doppeltes Capping schließt die Peptidsynthese ab. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 408 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 272$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz in einen Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) nach Merrifield überführt und 1 h in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (316 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 22.32$ min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-9), $R_t = 33.23$ min (Gerät 2, Säule: Luna-2, Gradient: Semipräp-5).

Ausbeute: 92 mg (29.1 μmol , 29 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -57.9$ ($c = 1.00$, MeOH).

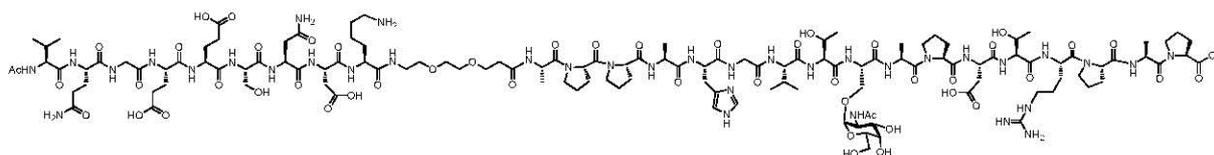
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1053.90$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1053.83).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1053.4943$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1053.4974).

$\text{C}_{133}\text{H}_{208}\text{N}_{36}\text{O}_{53}$ (3159.28)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyglycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginy-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (171)**

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



92 mg (29.1 μmol) des glycosylierten Konjugats **163** werden in 40 ml Methanol unter Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 48 h bei pH 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure und evaporiert die Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vakuum. Der gelbe

Rückstand (102 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 31.80$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 30.13$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 63 mg (20.8 μmol , 71 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{27} = -62.6$ ($c = 1.00$, MeOH).

400 MHz- $^1\text{H-NMR}$ [$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, HMBC] ($\text{DMSO-}d_6$): $[\delta/\text{ppm}] = 8.95$ (s, 1H, $\text{H}_{2\text{Ar-His}}$), 8.29 – 8.20 (m, 4H, NH-Gly_1 {8.25}, NH-Asn {8.24}, $\text{NH-Asp}_{(1,2)}$ {8.24}), 8.19 – 8.00 (m, 10H, Ala_4 {8.17}, NH-Gln {8.15}, NH-Ala_3 {8.12}, NH-Ser_1 {8.12}, NH-Gly_2 {8.11}, NH-His {8.08}, NH-Ala_1 {8.07}, NH-Ala_2 {8.06}, NH-Glu_2 {8.04}, NH-Val_1 {8.02}), 8.00 – 7.81 (m, 6H, NH-Arg {7.97}, NH-Glu_1 {7.94}, NH-Ser_2 {7.94}, NH-Thr_2 {7.94}, NH-Val_2 {7.86}, NH-Lys {7.85}), 7.73 – 7.63 (m, 3H NH-Lys^ϵ {7.68}, NH-Spa {7.67}), 7.56 (t, 1H, $^3J_{\text{NH,Arg}\delta} = 5.6$ Hz, NH-Gua), 7.38 (s, 1H, $\text{H}_{4\text{Ar-His}}$), 7.33 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 8.0$ Hz, Thr_1), 7.25 (d_p, 1H, $^3J_{\text{NH,H}_2} \approx 9.6$ Hz, NH-GalN), 4.63 – 4.40 (m, 11H, $\text{H}_1\text{-GalN}$ {4.59}, Asn^α {4.57}, His^α {4.57}, Asp_1^α {4.55}, Ala_4^α {4.53}, Pro_5^α {4.53}, Ala_1^α {4.51}, Arg^α {4.48}, Asp_2^α {4.47}, $\text{Ser}_{\text{TN}}^\alpha$ {4.47}, Ala_3^α {4.45}), 4.39 – 4.25 (m, 7H, Pro_4^α {4.34}, Val_1^α {4.32}, Thr_2^α {4.31}, $\text{Glu}_{(1,2)}^\alpha$ {4.30}, Ser_2^α {4.30}, Pro_3^α {4.29}), 4.24 – 4.09 (m, 7H, Pro_2^α {4.21}, Pro_1^α {4.20}, Thr_1^α {4.19}, Gln^α {4.16}, Ala_2^α {4.14}, Lys^α {4.12}, Val_2^α {4.11}), 4.09 – 3.84 (m, 4H, $\text{H}_2\text{-GalN}$ {4.04}, Thr_2^β {3.97}, Thr_1^β {3.93}, Gly_1^{aa} {3.88}), 3.81 – 3.41 (m, 28H, Gly_2^{aa} {3.76}, Gly_1^{ob} {3.71}, $\text{H}_4\text{-GalN}$ {3.70}, $\text{Pro}_{(1,2,3,4,5)}^\delta$ {3.69 – 3.41}, Gly_2^{ob} {3.68}, $\text{Ser}_{\text{TN}}^{\beta\text{ab}}$ {3.61}, $\text{Ser}_2^{\beta\text{a}}$ {3.58}, $\text{H}_3\text{-Spa}$ {3.57}, $\text{H}_5\text{-GalN}$ {3.56}, $\text{H}_3\text{-GalN}$ {3.55}, $\text{Ser}_2^{\beta\text{b}}$ {3.52}, $\text{H}_6\text{a-GalN}$ {3.50}, $\text{H}_5\text{-Spa}$ {3.46}, $\text{H}_6\text{-Spa}$ {3.46}, $\text{H}_6\text{b-GalN}$ {3.44}), 3.37 (t, 2H, $^3J_{\text{H}_8,\text{H}_9} = 5.4$ Hz, $\text{H}_8\text{-Spa}$), 3.22 – 3.15 (m, 2H, $\text{H}_9\text{-Spa}$ {3.19}), 3.15 – 3.04 (m, 3H, $\text{His}^{\beta\text{a}}$ {3.10}, Arg^δ {3.08}), 2.98 (dd, 1H, $^3J_{\text{His}^\beta\text{b},\text{His}^\alpha} = 7.4$ Hz, $^2J_{\text{His}^\beta\text{b},\text{His}^\beta\text{a}} = 15.1$ Hz, $\text{His}^{\beta\text{b}}$), 2.81 – 2.65 (m, 4H, Lys^ϵ {2.75}, $\text{Asp}_1^{\beta\text{a}}$ {2.72}, $\text{Asp}_2^{\beta\text{a}}$ {2.71}), 2.60 (dd, 1H, $^3J_{\text{Asn}^\beta\text{a},\text{Asn}^\alpha} = 6.6$ Hz, $^2J_{\text{Asn}^\beta\text{a},\text{Asn}^\beta\text{b}} = 15.6$ Hz, $\text{Asn}^{\beta\text{a}}$), 2.56 – 2.42 (m, 3H, $\text{Asp}_2^{\beta\text{b}}$ {2.51}, $\text{Asp}_1^{\beta\text{b}}$ {2.46}, $\text{Asn}^{\beta\text{b}}$ {2.46}, dd, 1H, $^3J_{\text{Asn}^\beta\text{b},\text{Asn}^\alpha} = 6.3$ Hz, $^2J_{\text{Asn}^\beta\text{a},\text{Asn}^\beta\text{b}} = 15.4$ Hz, $\text{Asn}^{\beta\text{a}}$), 2.41 – 2.30 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-Spa}$ {2.35}), 2.30 – 2.20 (m, 4H, $\text{Glu}_{(1,2)}^\gamma$ {2.26}), 2.16 – 2.07 (m, 4H, $\text{Pro}_1^{\beta\text{a}}$ {2.14}, $\text{Pro}_5^{\beta\text{a}}$ {2.13}, Gln^γ {2.12, t, 2H, $^3J_{\text{Gln}^\gamma,\text{Gln}^\beta} = 7.6$ Hz}), 2.06 – 1.62 (m, 34H, $\text{Pro}_4^{\beta\text{a}}$ {2.02}, Val_1^β {2.01}, $\text{Pro}_3^{\beta\text{a}}$ {2.00}, $\text{Pro}_{(1,2,3,4,5)}^\gamma$ {1.94 – 1.82}, Val_2^β {1.93}, $\text{Glu}_2^{\beta\text{a}}$ {1.90}, $\text{Pro}_2^{\beta\text{a}}$ {1.89}, $\text{Glu}_1^{\beta\text{a}}$ {1.88}, 1.87 ($\text{CH}_3\text{-Ac}$), $\text{Pro}_1^{\beta\text{b}}$ {1.85}, 1.84 ($\text{CH}_3\text{-Ac}$), $\text{Gln}^{\beta\text{a}}$ {1.81}, $\text{Glu}_2^{\beta\text{b}}$ {1.79}, $\text{Pro}_4^{\beta\text{b}}$ {1.79}, $\text{Pro}_{(2,3)}^{\beta\text{b}}$ {1.78}, $\text{Glu}_1^{\beta\text{b}}$ {1.77}, $\text{Gln}^{\beta\text{b}}$ {1.76}, $\text{Pro}_5^{\beta\text{b}}$ {1.76}, $\text{Arg}^{\beta\text{a}}$ {1.71}, $\text{Lys}^{\beta\text{a}}$ {1.68}), 1.60 – 1.40 (m, 6H, $\text{Lys}^{\beta\text{b}}$ {1.55}, $\text{Arg}^{\beta\text{b}}$ {1.51}, Arg^γ {1.51}, Lys^δ {1.49}), 1.35 – 1.23 (m, 2H, Lys^γ {1.29}), 1.22 – 1.15 (m, 9H, Ala_4^β {1.19}, $\text{Ala}_{(2,3)}^\beta$ {1.17}), 1.13 (d, 3H, $^3J_{\text{Ala}^\beta,\text{Ala}^\alpha} = 6.9$ Hz, Ala_1^β), 1.05 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}^\gamma,\text{Thr}^\beta} = 6.2$ Hz, Thr_2^γ), 0.99 (d, 3H,

$^3J_{\text{Thr}\gamma, \text{Thr}\beta} = 6.2 \text{ Hz}$, Thr_1^γ , 0.87 (d, 3H, $^3J_{\text{Val}\gamma\text{a}, \text{Val}\beta} = 6.8 \text{ Hz}$, $\text{Val}_1^{\gamma\text{a}}$), 0.85 – 0.79 (m, 9H, {0.85, d, $^3J_{\text{Val}\gamma\text{a}, \text{Val}\beta} = 6.6 \text{ Hz}$, $\text{Val}_1^{\gamma\text{b}}$ }, $\text{Val}_2^{\gamma\text{a}}$ {0.83}, 0.82 {d, 3H, $^3J_{\text{Val}\gamma\text{b}, \text{Val}\beta} = 6.8 \text{ Hz}$, $\text{Val}_2^{\gamma\text{b}}$ }).

100.9 MHz- ^{13}C -NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO- d_6): [δ/ppm] = 174.07, 174.06, 173.86, 173.25, 172.42, 171.90, 171.81, 171.68, 171.63, 171.60, 171.42, 171.34, 171.25, 171.24, 171.17, 171.11, 171.04, 171.01, 170.54, 170.41, 170.33, 170.15, 169.99, 169.95, 169.87, 169.66, 169.59, 169.50, 169.41, 168.91, 168.83, 168.78 (C=O), 156.77 (C=N-Guan), 134.06 (C2-Imidazol), 129.45 (C5-Imidazol), 117.69 (C4-Imidazol), 97.20 (C1-GalN), 70.96 (C5-GalN), 69.13 (C5-Spa, C6-Spa), 68.42 (C8-Spa), 67.73 (C3-GalN), 67.64 (C4-GalN), 66.39 ($\text{Ser}_{\text{TN}}^\beta$), 66.38 (Thr_1^β), 66.27 (Thr_2^β), 66.27 (C3-Spa), 61.31 (Ser_2^β), 60.28 (C6-GalN), 58.50 (Pro_4^α), 58.47 (Pro_3^α), 58.32 (Thr_2^α), 58.20 (Val_1^α), 58.01 (Thr_1^α), 57.99 (Val_2^α), 57.87 (Pro_2^α), 57.49 (Pro_1^α), 57.03 (Pro_5^α), 54.58 (Ser_2^α), 52.16 (Gln^α), 52.11 (Lys^α), 51.67 ($\text{Ser}_{\text{TN}}^\alpha$), 51.51 ($\text{Glu}_{(1,2)}^\alpha$), 50.97 (His^α), 49.55 (Asp_2^α), 49.37 (Asn^α), 49.33 (Arg^α), 49.13 (Asp_1^α), 49.02 (C2-GalN), 47.99 (Ala_2^α), 46.67, 46.28, 46.07 ($\text{Pro}_{(1,2,3,4,5)}^\delta$), 45.70 (Ala_3^α), 45.67 ($\text{Ala}_{(1,4)}^\alpha$), 41.59 (Gly_2^α), 41.40 (Gly_1^α), 40.17 (Arg^δ), 38.25 (Lys^ϵ), 38.19 (C9-Spa), 36.39 (Asn^β), 35.34 (C2-Spa), 35.25 ($\text{Asp}_{(1,2)}^\beta$), 30.92 (Gln^γ), 30.52 (Lys^β), 30.19 (Val_1^β), 29.97 (Val_2^β), 29.76 ($\text{Glu}_{(1,2)}^\gamma$), 28.59 (Pro_4^β), 28.54 (Pro_3^β), 28.34 (Gln^β), 28.06 ($\text{Pro}_{(1,5)}^\beta$), 27.69 (Arg^β), 27.67 (Pro_2^β), 27.03 (Glu_1^β), 26.99 (Glu_2^β), 26.53 (His^β), 26.18 (Lys^δ), 24.02 ($\text{Pro}_{(1,2,3,4,5)}^\gamma$), 24.01 (Arg^γ), 22.46, 22.24 (2 x $\text{CH}_3\text{-Ac}$), 21.82 (Lys^γ), 19.10 (Thr_1^γ), 19.02 (Thr_2^γ), 18.96 ($\text{Val}_1^{\gamma\text{b}}$), 18.90 ($\text{Val}_1^{\gamma\text{a}}$), 17.69 ($\text{Val}_2^{\gamma\text{ab}}$), 16.78 ($\text{Ala}_{(2,3)}^\beta$), 16.59 (Ala_4^β), 16.51 (Ala_1^β).

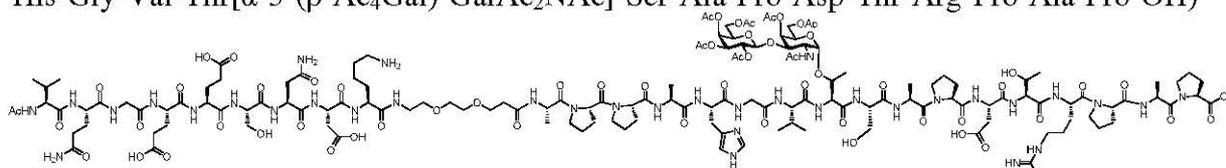
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1011.82 ([M+3H] $^3+$, ber.: 1011.82).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1516.7236 ([M+2H] $^{2+}$, ber.: 1516.7264).

$\text{C}_{127}\text{H}_{202}\text{N}_{36}\text{O}_{50}$ (3033.17)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyl-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-[2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl]-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (164)**

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr[α -3-(β -Ac₄Gal)-GalAc₂Nac]-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 135 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Pro versehenen Polystyrol-Harzes **137** (Beladung: 0.74 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese in einem *CEM*[®] Liberty-1 Peptidsynthesizer unter Mikrowellenstrahlung aufgebaut. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure **40** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 192.0 mg (0.200 mmol, 2.00 Äquiv.) Fmoc-Thr[α -3-(β -Ac₄Gal)-GalAc₂Nac]-OH (**40**), 99.0 mg (0.260 mmol, 2.60 Äquiv.) HATU, 37.0 mg (0.271 mmol, 2.71 Äquiv.) HOAt und 46.0 mg (0.455 mmol, 4.55 Äquiv.) NMM in 3 ml NMP versetzt und 25 min bei 30 W im Stickstoffgegenstrom gerührt. Danach wird abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Valin und Glycin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die folgenden fünf Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Anbindung des Diethylenglycolspacers erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung aus 160.0 mg (0.400 mmol, 4.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 190.0 mg (0.500 mmol, 5.00 Äquiv.) HATU, 71.0 mg (0.522 mmol, 5.22 Äquiv.) HOAt, 89.0 mg (0.880 mmol, 8.80 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP. Die Lösung wird 25 min bei 30 W im Stickstoffgegenstrom gerührt. Danach wird mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen, im Stickstoffstrom getrocknet, die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die restlichen neun Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt, wobei für L-Lysin eine Doppelkupplung durchgeführt wird. Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Ein doppeltes Capping schließt die Peptidsynthese ab. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 264 mg eines Peptidpolymer-Adduktes (Δ = 129 mg Rohpeptid) erhalten. Zur

Abspaltung des Peptids wird das Harz in einen Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) überführt und 1 h in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (142 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 31.53$ min (Gerät 2, Säule: Luna-2, Gradient: Semipräp-3), $R_t = 24.63$ min (Gerät 2, Säule: Luna-2, Gradient: Semipräp-6).

Ausbeute: 60 mg (17.4 μmol , 17 %); farbloses Lyophilisat $[\alpha]_D^{21} = -61.9$ ($c = 1.00$, MeOH).

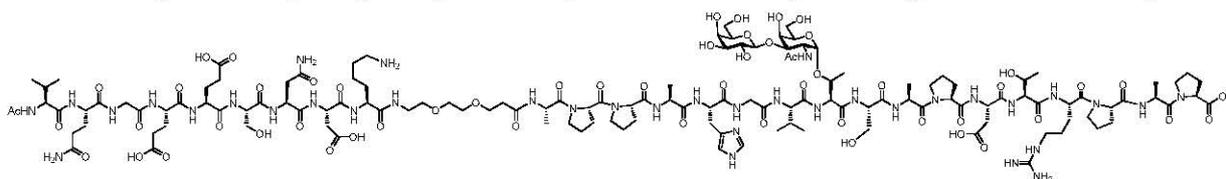
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1724.27$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1724.29).

1149.84 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1149.86).

$\text{C}_{145}\text{H}_{224}\text{N}_{36}\text{O}_{61}$ (3447.53)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyglycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginy-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidylglycyl-L-valyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl]-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (172)**

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr[α -3-(β -Gal)-GalNAc]-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



60 mg (17.4 μmol) des glycosylierten Konjugats **164** werden in 8 ml Methanol unter Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 18 h bei pH 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch weitere Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Der gelbe Rückstand (76 mg) wird durch präparative RP-HPLC gereinigt. $R_t = 34.15$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 29.15$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 36 mg (11.3 μmol , 64 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{21} = -60.2$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): [δ /ppm] = 8.82 (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.29 – 8.20 (m, 4H, NH-Asn {8.25}, NH-Asp_(1,2) {8.25}, NH-Gly₁ {8.23}), 8.20 – 8.01 (m, 10H, NH-Ala₄ {8.17}, NH-Gln {8.16}, NH-Ala₃ {8.13}, NH-Gly₂ {8.11}, NH-Ala₁ {8.09}, NH-His {8.09}, NH-Glu₂ {8.08}, NH-Val₁ {8.08}, NH-Ala₂ {8.07}, NH-Thr_T {8.06}), 8.00 – 7.90 (m, 4H, NH-Arg {7.96}, NH-Glu₁ {7.95}, NH-Ser_(1,2) {7.95}), 7.88 – 7.82 (m, 2H, NH-Lys {7.86}, NH-Val₂ {7.85}), 7.73 – 7.65 (m, 3H, NH-Spa {7.67}, NH-Lys^ε {7.67}), 7.60 – 7.54 (sb, 1H, NH-Gua {7.56}), 7.38 – 7.25 (m, 2H, Thr₁ {7.33}, H_{4Ar}-His {7.31}), 7.07 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 8.7 Hz, NH-GalN), 4.81 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 3.8 Hz, H1-GalN), 4.59 – 4.40 (m, 11H, Asn^α {4.55}, His^α {4.54}, Pro₅^α {4.53}, Ala₁^α {4.51}, Asp₂^α {4.51}, Val₁^α {4.49}, Arg^α {4.48}, Asp₁^α {4.46}, Ala_(3,4)^α {4.44}, Thr_T^α {4.43}), 4.36 – 4.26 (m, 6H, Pro₃^α {4.33}, Glu_(1,2)^α {4.29}, Pro₄^α {4.29}, Ser_(1,2)^α {4.29}), 4.25 – 4.08 (m, 9H, H1-Gal' {4.22}, Pro₂^α {4.20}, Pro₁^α {4.18}, Thr₁^α {4.18}, Gln^α {4.17}, Ala₂^α {4.14}, Lys^α {4.13}, H2-GalN {4.12}, Val₂^α {4.12}, Thr_T^β {4.11}), 3.99 – 3.83 (m, 3H, Thr₁^β {3.93}, H4-GalN {3.88}, Gly₁^{αa} {3.85}), 3.81 – 3.23 (m, 35H, Gly₁^{ob} {3.75}, Gly₂^{αa} {3.75}, H5-GalN {3.71}, Gly₂^{ob} {3.68}, H3-GalN {3.66}, Pro₅^δ {3.63}, H4-Gal' {3.62}, Pro₄^δ {3.59}, Ser_(1,2)^{βa} {3.59}, H3-Spa {3.56}, Ser_(1,2)^{βb} {3.53}, H6_a-GalN {3.51}, H6_a-Gal' {3.51}, Pro_(2,3)^δ {3.50}, Pro₁^δ {3.47}, H5-Spa {3.46}, H6-Spa {3.46}, H6_b-Gal' {3.45}, H6_b-GalN {3.42}, H8-Spa {3.37}, H5-Gal' {3.32}, H2-Gal' {3.31}, H3-Gal' {3.26}), 3.22 – 3.15 (m, 2H, H9-Spa {3.18}), 3.14 – 3.03 (m, 3H, Arg^δ {3.08}, His^{βa} {3.08}), 2.96 (dd, 1H, ³J_{Hisβb,Hisα} = 6.8 Hz, ²J_{Hisβb,Hisβa} = 14.5 Hz, His^{βb}), 2.82 – 2.67 (m, 4H, Lys^ε {2.76}, Asp₂^{βa} {2.72}, Asp₁^{βa} {2.70}), 2.60 (dd, 1H, ³J_{Asnβa,Asnα} = 6.2 Hz, ²J_{Asnβa,Asnβb} = 15.8 Hz, Asn^{βa}), 2.54 – 2.42 (m, 3H, Asp₂^{βb} {2.51}, Asp₁^{βb} {2.50}, Asn^{βb} {2.45, dd, ³J_{Asnβb,Asnα} = 6.4 Hz, ²J_{Asnβa,Asnβb} = 15.8 Hz, Asn^{βa}}), 2.41 – 2.29 (m, 2H, H2-Spa {2.35}), 2.29 – 2.21 (m, 4H, Glu₁^γ {2.25}, Glu₂^γ {2.23}), 2.16 – 2.08 (m, 4H, Pro₂^{βa} {2.12}, Gln^γ {2.11}, Pro₅^{βa} {2.10}), 2.06 – 1.62 (m, 34H, Pro₃^{βa} {2.01}, Pro₄^{βa} {1.99}, Val₁^β {1.96}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {1.95 – 1.80}, Val₂^β {1.93}, Gln^{βa} {1.91}, Glu₁^{βa} {1.90}, 1.88 (CH₃-Ac), Glu₂^{βa} {1.87}, Pro₁^{βa} {1.85}, 1.84 (CH₃-Ac), Pro₄^{βb} {1.82}, Gln^{βb} {1.77}, Pro₁^{βb} {1.76}, Pro_(2,5)^{βb} {1.75}, Glu₁^{βb} {1.74}, Pro₃^{βb} {1.74}, Glu₂^{βb} {1.72}, Arg^{βa} {1.70}, Lys^{βa} {1.67}), 1.60 – 1.39 (m, 6H, Lys^{βb} {1.54}, Arg^{βb} {1.52}, Arg^γ {1.51}, Lys^δ {1.49}), 1.34 – 1.21 (m, 2H, Lys^γ {1.28}), 1.21 – 1.09 (m, 15H, Ala_(3,4)^β {1.17}, Ala₂^β {1.16}, Ala₁^β {1.12}, Thr_T^γ {1.12}), 1.00 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 6.2 Hz, Thr₁^γ), 0.91 (d, 3H, ³J_{Valγa,Valβ} = 6.6 Hz, Val₁^{γa}), 0.88 – 0.78 (m, 9H, Val₂^{γa} {0.84}, Val₁^{γb} {0.83}, 0.81 (d, ³J_{Valγb,Valβ} = 6.2 Hz, Val₂^{γb})).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (DMSO-*d*₆): [δ /ppm] = 174.13, 174.12, 173.88, 173.31, 172.45, 172.03, 171.94, 171.84, 171.73, 171.69, 171.63, 171.45, 171.39, 171.33, 171.30,

171.19, 171.13, 171.07, 170.93, 170.91, 170.44, 170.38, 170.36, 170.31, 170.17, 170.02, 169.95, 169.68, 169.62, 169.55, 169.41, 168.80 (C=O), 156.75 (C=N-Guan), 133.89 (C2-Imidazol), * (C5-Imidazol), 116.31 (C4-Imidazol), 104.40 (C1-Gal'), 98.18 (C1-GalN), 77.60 (C3-GalN), 74.97 (C5-Gal'), 74.83 (Thr_T^β), 72.72 (C3-Gal'), 71.11 (C5-GalN), 70.24 (C2-Gal'), 69.13 (C5-Spa, C6-Spa), 68.64 (C8-Spa), 67.80 (C4-Gal'), 67.39 (C4-GalN), 66.42 (Thr_T^β), 66.28 (C3-Spa), 61.40 (Ser_(1,2)^β), 60.26 (C6-GalN, C6-Gal'), 58.81 (Pro₄^α), 58.66 (Pro₃^α), 58.05 (Pro₂^α), 57.59 (Thr₁^α), 57.49 (Val₂^α), 57.44 (Pro₁^α), 57.13 (Pro₅^α), 56.98 (Val₁^α), 55.88 (Thr_T^α), 54.54 (Ser_(1,2)^α), 52.53 (Gln^α), 52.12 (C2-GalN, Lys^α), 51.46 (Glu_(1,2)^α), 51.19 (His^α), 47.93 (Ala₂^α), 49.82 (Asp_(1,2)^α), 49.57 (Arg^α), 49.23 (Asn^α), 46.34 (Pro₅^δ), 46.20 (Pro₁^δ), 46.19 (Pro_(2,3)^δ), 46.05 (Pro₄^δ), 45.80 (Ala_(3,4)^α), 45.57 (Ala₁^α), 41.63 (Gly₂^α), 41.57 (Gly₁^α), 40.17 (Arg^δ), 38.34 (Lys^ε), 38.19 (C9-Spa), 36.57 (Asn^β), 35.30 (Asp_(1,2)^β), 35.28 (C2-Spa), 30.97 (Gln^γ), 30.63 (Lys^β), 30.63 (Val₁^β), 30.01 (Val₂^β), 29.81 (Glu_(1,2)^γ), 28.65 (Pro₃^β), 28.50 (Pro₁^β), 28.49 (Pro₄^β), 28.07 (Pro₂^β), 28.05 (Arg^β), 27.53 (Pro₅^β), 27.40 (Gln^β), 27.36 (Glu_(1,2)^β), 26.82 (His^β), 26.23 (Lys^δ), 24.10 (Arg^γ), 24.09 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 22.60, 22.21 (2 x CH₃-Ac), 21.85 (Lys^γ), 19.21 (Thr₁^γ), 18.83 (Val₁^{γa}), 18.73 (Val₁^{γb}), 18.14 (Val₂^{γa}), 17.84 (Val₂^{γb}), 17.74 (Thr_T^γ), 17.00 (Ala₁^β), 16.73 (Ala_(2,3,4)^β).

Werte mit einem * konnten nicht ermittelt werden.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1609.25$ ([M+H+Na]²⁺, ber.: 1609.25).

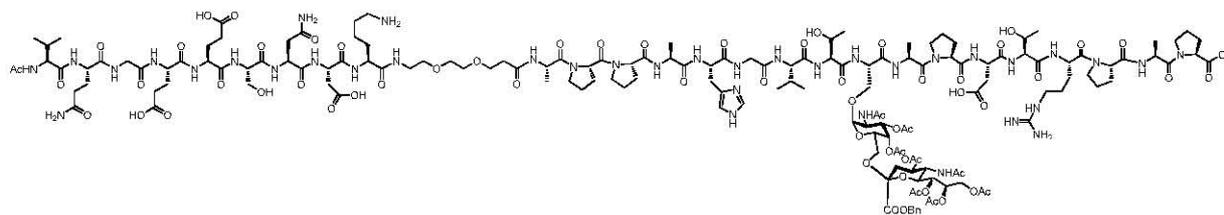
1073.17 ([M+2H+Na]³⁺, ber.: 1073.17).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1597.7500$ ([M+2H]²⁺, ber.: 1597.7528).

C₁₃₃H₂₁₂N₃₆O₅₅ (3195.31)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyl-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (165)**

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 136 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Pro versehenen Polystyrol-Harzes **137** (Beladung: 0.74 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure **31** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers indem das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 186.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OH (**31**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 25.0 mg (0.184 mmol, 1.84 Äquiv.) HOAt, 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand) wird. Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Threonin und L-Valin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die folgenden sechs Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Anbindung des Diethylenglycolspacers erfolgt wieder halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung aus 160.0 mg (0.400 mmol, 4.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 167.0 mg (0.439 mmol, 4.39 Äquiv.) HATU, 62.0 mg (0.456 mmol, 4.56 Äquiv.) HOAt, 89.0 mg (0.880 mmol, 8.80 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP und 16 h Vortex (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Im Anschluss wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die restlichen neun Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt, wobei beim L-Lysin eine Doppelkupplung durchgeführt wird. Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und ein doppeltes Capping durchgeführt. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 492 mg eines Peptidpolymer-Adduktes (Δ = 356 mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz in einen Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) überführt und 1 h in 6 ml einer Mischung aus 15 ml

Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (295 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 31.23$ min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-10), $R_t = 27.63$ min (Gerät 2, Säule: Luna-2, Gradient: Semipräp-7).

Ausbeute: 98 mg (26.7 μmol , 27 %); farbloses Lyophilisat $[\alpha]_D^{24} = -63.7$ ($c = 1.00$, MeOH).

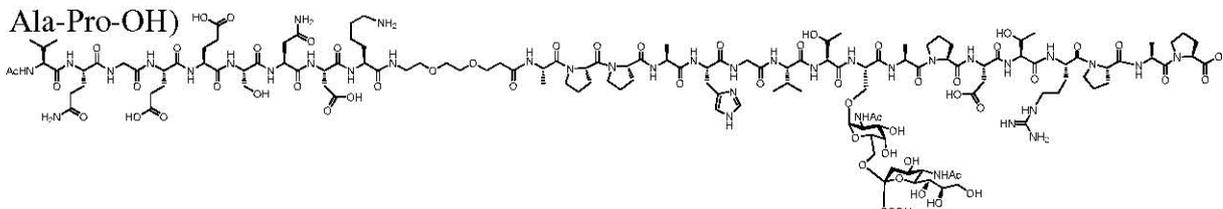
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1834.47$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1834.47).

1223.32 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1223.22).

$C_{157}H_{237}N_{37}O_{64}$ (3666.77)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyl-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (174)**

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α -NeuNAcCOOH-(2-6)- α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-



98 mg (27.4 μmol) des glycosylierten Konjugats **165** werden in 30 ml Methanol gelöst und mit 0.5 ml Essigsäure und 40 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle versetzt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird 13 h bei Raumtemp. unter 1 bar Wasserstoffatmosphäre gerührt. Danach wird die Wasserstoffatmosphäre gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über einer Kartusche mit C18-Säulenmaterial filtriert. Die kleine Säule wird mehrmals mit reinem Methanol gespült und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (106 mg quant.) wird einige Male mit Toluol kodestilliert und ohne Reinigung der nachfolgenden Reaktion unterworfen. $R_t = 26.21$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-2).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1788.96$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1788.81).

1192.97 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1192.87).

$C_{150}H_{231}N_{37}O_{64}$ (3576.65)

Das rohe Peptid wird in 15 ml Methanol gelöst und unter Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natrium-methanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 30 h bei pH 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz konstant gehalten. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des Peptids (112 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 28.23$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 29.73$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 60 mg (18.1 μmol , 67 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{21} = -53.6$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 8.96 (s, 1H, H_{2AR}-His), 8.33 – 8.23 (m, 4H, NH-Asp_(1,2) {8.27}, NH-Asn {8.26}, NH-Gly₁ {8.26}), 8.21 (d, 1H, ³J_{NH,Ala α} = 7.2 Hz, NH-Ala₄), 8.18 – 7.83 (m, 16H, NH-Ser₁ {8.17}, NH-Ala₃ {8.15}, NH-Gln {8.15}, NH-Gly₂ {8.12}, NH-His {8.10}, NH-Ala₁ {8.10}, NH-Ala₂ {8.09}, NH-Glu₂ {8.09}, NH-Val₁ {8.07}, NH-Sia {8.06}, NH-Thr₂ {7.99}, NH-Glu₁ {7.97}, NH-Ser_{STN} {7.95}, NH-Arg {7.92}, NH-Val₂ {7.87}, NH-Lys {7.86}), 7.71 – 7.62 (m, 3H, NH-Spa {7.68}, NH-Lys ^{ϵ} {7.66}), 7.54 – 7.47 (m, 1H, NH-Gua {7.52}), 7.39 (s, 1H, H_{4AR}-His), 7.34 (d, 1H, ³J_{NH,Thr α} = 8.5 Hz, NH-Thr₁), 7.23 (dp, 1H, ³J_{NH,H2} \approx 9.1 Hz, NH-GalN), 4.62 – 4.41 (m, 11H, H1-GalN {4.57}, His ^{α} {4.57}, Asn ^{α} {4.56}, Ala₄ ^{α} {4.55}, Asp₁ ^{α} {4.55}, Pro₅ ^{α} {4.55}, Ala₁ ^{α} {4.52}, Arg ^{α} {4.50}, Asp₂ ^{α} {4.48}, Ser_{STN} ^{α} {4.46}, Ala₃ ^{α} {4.45}), 4.38 – 4.26 (m, 7H, Pro₃ ^{α} {4.35}, Thr₂ ^{α} {4.35}, Val₁ ^{α} {4.35}, Pro₄ ^{α} {4.31}, Ser₂ ^{α} {4.30}, Glu_(1,2) ^{α} {4.30}), 4.24 – 4.10 (m, 7H, Pro₂ ^{α} {4.23}, Thr₁ ^{α} {4.20}, Gln ^{α} {4.18}, Pro₁ ^{α} {4.18}, Ala₂ ^{α} {4.16}, Lys ^{α} {4.15}, Val₂ ^{α} {4.14}), 4.04 (td, 1H, ³J_{H2,H3} \approx ³J_{H2,NH} \approx 9.7 Hz, ³J_{H2,H1} \approx 4.6 Hz, H2-GalN), 4.00 – 3.85 (m, 3H, Thr₂ ^{β} {4.00}, Thr₁ ^{β} {3.94}, Gly₁ ^{$\alpha\alpha$} {3.90}), 3.82 – 3.42 (m, 32H, Gly₂ ^{$\alpha\alpha$} {3.76}, Gly₁ ^{$\alpha\beta$} {3.74}, Gly₂ ^{$\alpha\beta$} {3.72}, H6_a-GalN {3.69}, H5-GalN {3.65}, H4-GalN {3.64}, Ser_{STN} ^{$\beta\alpha\beta$} {3.64}, H9_a-Sia {3.63}, Pro₅ ^{δ} {3.63}, H8-Sia {3.61}, Ser₂ ^{$\beta\alpha$} {3.60}, Pro₄ ^{δ} {3.57}, H3-Spa {3.57}, H4-Sia {3.57}, H3-GalN {3.56}, Ser₂ ^{$\beta\beta$} {3.53}, H5-Sia {3.51}, Pro_(1,2,3) ^{δ} {3.50}, H6_b-GalN {3.47}, H5-Spa {3.46}, H6-Spa {3.46}), 3.41 – 3.28 (m, 5H, H9_b-Sia {3.39}, H8-Spa {3.37}, H6-Sia {3.35}, H7-Sia {3.32}), 3.22 – 3.16 (m, 2H, H9-Spa {3.19}), 3.14 – 3.03 (m, 3H, His ^{$\beta\alpha$} {3.10}, Arg ^{δ} {3.09}), 2.97 (dd, 1H, ³J_{His $\beta\beta$,His α} = 7.3 Hz, ²J_{His $\beta\beta$,His $\beta\alpha$} = 15.3 Hz, His ^{$\beta\beta$}), 2.80 – 2.68 (m, 4H, Lys ^{ϵ} {2.76}, Asp₁ ^{$\beta\alpha$} {2.74}, Asp₂ ^{$\beta\alpha$} {2.72}), 2.60 (dd, 1H, ³J_{Asn $\beta\alpha$,Asn α} = 6.4 Hz, ²J_{Asn $\beta\alpha$,Asn $\beta\beta$} = 15.4 Hz, Asn ^{$\beta\alpha$}), 2.54 – 2.42 (m, 4H, Asp₂ ^{$\beta\beta$} {2.54}, H3_{aq}-Sia {2.53}, Asp₁ ^{$\beta\beta$} {2.48}, Asn ^{$\beta\beta$} {2.45, dd, 1H, ³J_{Asn $\beta\beta$,Asn α} = 6.2 Hz, ²J_{Asn $\beta\alpha$,Asn $\beta\beta$} = 15.4 Hz, Asn ^{$\beta\alpha$} }), 2.40 – 2.34 (dt, 2H, ³J_{H2a,OH} \approx 13.8 Hz, ³J_{H2a,H3} \approx 6.6 Hz, H2_a-Spa), 2.33 – 2.19 (m, 5H, H2_b-Spa {2.30}, Glu_(1,2) ^{γ} {2.26}), 2.17 – 2.08

(m, 4H, Pro₂^{βa} {2.13}, Pro₅^{βa} {2.12}, Gln^γ {2.11}), 2.07 – 1.62 (m, 37H, Pro₃^{βa} {2.02}, Val₁^β {2.00}, Pro₄^{βa} {1.99}, Val₂^β {1.97}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {1.96 – 1.80}, Glu₁^{βa} {1.91}, Glu₂^{βa} {1.89}, 1.88, 1.87 (2 x CH₃-Ac), Gln^{βa} {1.87}, 1.84 (CH₃-Ac), Pro₁^{βa} {1.83}, Pro₂^{βb} {1.81}, Pro₃^{βb} {1.77}, Gln^{βb} {1.76}, Pro_(1,5)^{βb} {1.76}, Glu₁^{βb} {1.75}, Pro₄^{βb} {1.75}, Glu₂^{βb} {1.74}, Arg^{βa} {1.69}, Lys^{βa} {1.68}), 1.60 – 1.40 (m, 7H, Lys^{βb} {1.55}, Arg^γ {1.53}, Arg^{βb} {1.52}, H_{3ax}-Sia {1.51}, Lys^δ {1.50}), 1.35 – 1.21 (m, 2H, Lys^γ {1.27}), 1.21 – 1.15 (m, 9H, Ala₄^β {1.21}, Ala₃^β {1.19}, Ala₂^β {1.18}), 1.13 (d, 3H, ³J_{Alaβ,Alaα} = 6.9 Hz, Ala₁^β), 1.04 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 6.0 Hz, Thr₂^γ), 0.99 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 6.2 Hz, Thr₁^γ), 0.86 (d, 3H, ³J_{Valγa,Valβ} = 6.5 Hz, Val₁^{γa}), 0.85 – 0.79 (m, 9H, (0.84, d, ³J_{Valγa,Valβ} = 7.0 Hz, Val₂^{γa}), Val₁^{γb} {0.82}, 0.81 (d, 3H, ³J_{Valγb,Valβ} = 6.6 Hz, Val₂^{γb})).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (DMSO-d₆): [δ/ppm] = 174.14, 174.12, 174.07, 173.88, 173.31, 172.46, 171.96, 171.93, 171.84, 171.75, 171.66, 171.63, 171.45, 171.41, 171.39, 171.30, 171.20, 171.14, 171.07, 171.04, 170.52, 170.44, 170.39, 170.36, 170.31, 170.18, 170.02, 169.94, 169.85, 169.68, 169.62, 169.53, 169.42, 169.01, 168.86, 168.80 (C=O), 156.72 (C=N-Guan), 133.18 (C2-Imidazol), 128.96 (C5-Imidazol), 116.69 (C4-Imidazol), 98.19 (C2-Sia), 97.46 (C1-GalN), 73.35 (C6-Sia), 71.13 (C8-Sia), 69.23 (C5-Spa, C6-Spa), 69.05 (C5-GalN), 68.58 (C8-Spa), 68.17 (C7-Sia), 67.87 (C3-GalN), 67.86 (C4-GalN), 67.76 (C4-Sia), 66.49 (Thr₁^β), 66.44 (C3-Spa), 66.32 (Thr₂^β), 66.08 (Ser_{STN}^β), 62.62 (C9-Sia), 62.51 (C6-GalN), 61.52 (Ser₂^β), 58.69 (Pro_(3,4)^α), 58.15 (Pro₂^α), 57.82 (Thr₂^α), 57.60 (Val₂^α), 57.56 (Thr₁^α), 57.51 (Val₁^α), 57.48 (Pro₁^α), 57.18 (Pro₅^α), 54.54 (Ser₂^α), 52.59 (Gln^α), 52.26 (Lys^α), 51.96 (C5-Sia), 51.80 (Ser_{STN}^α), 51.56 (Glu_(1,2)^α), 51.08 (His^α), 50.42 (Asp₂^α), 49.65 (Asn^α), 49.64 (Arg^α), 49.07 (Asp₁^α), 48.80 (C2-GalN), 48.14 (Ala₂^α), 46.44 (Pro₅^δ), 46.22 (Pro_(1,2,3)^δ), 46.10 (Pro₄^δ), 45.75 (Ala₃^α), 45.71 (Ala_(1,4)^α), 41.69 (Gly₂^α), 41.56 (Gly₁^α), 40.40 (C3-Sia), 40.28 (Arg^δ), 38.54 (Lys^δ), 38.30 (C9-Spa), 36.61 (Asn^β), 35.38 (C2-Spa), 35.35 (Asp_(1,2)^β), 31.10 (Gln^γ), 30.70 (Lys^β), 30.40 (Val₁^β), 29.98 (Val₂^β), 29.87 (Glu_(1,2)^γ), 28.81 (Pro₃^β), 28.62 (Pro₄^β), 28.37 (Pro₁^β), 28.23 (Pro₂^β), 28.15 (Arg^β), 27.60 (Pro₅^β), 27.46 (Glu_(1,2)^β), 27.13 (Gln^β), 26.92 (His^β), 26.25 (Lys^δ), 24.28 (Arg^γ), 24.14 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 22.63, 22.40 (3 x CH₃-Ac), 21.85 (Lys^γ), 19.28 (Thr₁^γ), 19.13 (Thr₂^γ), 18.98 (Val₁^{γa}), 18.88 (Val₁^{γb}), 17.87 (Val₂^{γab}), 17.72 (Ala_(1,3)^β), 16.98 (Ala_(2,4)^β).

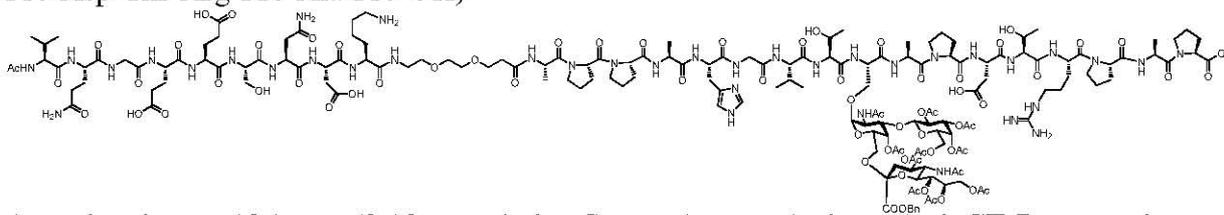
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1662.78 ([M+2H]²⁺, ber.: 1662.78).

1108.85 ([M+3H]³⁺, ber.: 1108.85).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1662.2728 ([M+2H]²⁺, ber.: 1662.2741).

C₁₃₈H₂₁₉N₃₇O₅₈ (3324.43)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyl-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (166)**
 (Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser[α -3-(β -Ac₄Gal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 136 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Pro versehenen Polystyrol-Harzes **137** (Beladung: 0.74 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der automatisierten Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure **49** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 226.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser[α -3-(β -Ac₄Gal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-OH (**49**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 25.0 mg (0.184 mmol, 1.84 Äquiv.) HOAt, 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die folgenden Aminosäuren L-Threonin und L-Valin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die nachfolgenden sechs Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Anbindung des Diethylenglycolspacers erfolgt wieder halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung aus 160.0 mg (0.400 mmol, 4.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 167.0 mg (0.439 mmol, 4.39 Äquiv.) HATU, 62.0 mg (0.456 mmol, 4.56 Äquiv.) HOAt, 89.0 mg (0.880 mmol, 8.80 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 12 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Lysin und L-Asparaginsäure wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die restlichen sieben Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Das terminale

L-Valin wird durch doppeltes Capping acetyliert. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 551 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 415$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz in einen Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) überführt und 1 h in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (346 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 20.91$ min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-11), $R_t = 28.45$ min (Gerät 2, Säule: Luna-2, Gradient: Semipräp-6).

Ausbeute: 102 mg (26.1 μmol , 26 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -62.4$ ($c = 1.00$, MeOH).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1957.56$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1957.37).

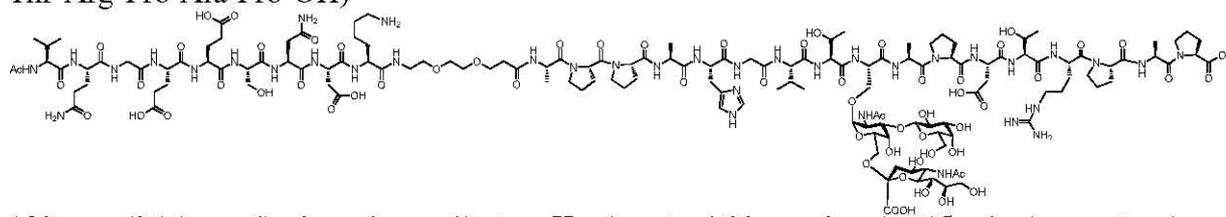
1305.04 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1304.91).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1956.3687$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1956.3662).

$C_{167}H_{251}N_{37}O_{71}$ (3912.99)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyl-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (177)**

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser[α -3-(β -Gal)-(α -NeuNAcCOOH-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



102 mg (26.1 μmol) des glycosylierten Konjugats **166** werden in 15 ml einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH = 10.5) gelöst und durch Zugabe einer Natriumhydroxid-Stammlösung auf einen pH-Wert von 11.0 eingestellt. Der Reaktionsfortschritt wird durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe wässriger Natriumhydroxid-Lösung wird der

pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz bei genau 11.0 gehalten. Anschließend neutralisiert man durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des Peptids (211 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 29.30$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 29.35$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 63 mg (18.1 μmol , 69 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{23} = -49.5$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): [δ /ppm] = 8.96 (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.33 – 8.19 (m, 4H, NH-Gly₁ {8.26}, NH-Asn {8.25}, NH-Asp_(1,2) {8.25}), 8.18 – 7.92 (m, 15H, NH-Gln {8.16}, NH-Ala_(3,4) {8.14}, NH-Ser_{ST} {8.14}, NH-Gly₂ {8.12}, NH-Ala₁ {8.09}, NH-His {8.09}, NH-Glu₁ {8.08}, NH-Ala₂ {8.07}, NH-Sia {8.07}, NH-Val₁ {8.06}, NH-Arg {7.99}, NH-Thr₂ {7.98}, NH-Glu₂ {7.95}, NH-Ser₂ {7.94}), 7.89 – 7.82 (m, 2H, NH-Lys {7.86}, NH-Val₂ {7.86}), 7.70 – 7.61 (m, 3H, NH-Spa {7.68}, NH-Lys^e {7.64}), 7.53 – 7.47 (m, 1H, NH-Gua {7.51}), 7.39 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.35 (d, 1H, ³J_{NH,Thr α} = 8.7 Hz, NH-Thr₁), 7.25 (dp, 1H, ³J_{NH,H2} \approx 8.8 Hz, NH-GalN), 4.68 – 4.61 (m, 1H, H1-GalN {4.64}), 4.61 – 4.41 (m, 10H, His ^{α} {4.59}, Asn ^{α} {4.57}, Asp₁ ^{α} {4.56}, Ala₄ ^{α} {4.55}, Pro₅ ^{α} {4.54}, Ala₁ ^{α} {4.52}, Arg ^{α} {4.50}, Asp₂ ^{α} {4.48}, Ser_{ST} ^{α} {4.46}, Ala₃ ^{α} {4.45}), 4.41 – 4.10 (m, 16H, Pro₄ ^{α} {4.34}, Pro₃ ^{α} {4.33}, Thr₂ ^{α} {4.33}, Val₁ ^{α} {4.33}, Pro₂ ^{α} {4.31}, Ser₂ ^{α} {4.30}, Glu_(1,2) ^{α} {4.29}, H1-Gal' {4.26}, Pro₁ ^{α} {4.21}, H2-GalN {4.20}, Thr₁ ^{α} {4.20}, Gln ^{α} {4.17}, Ala₂ ^{α} {4.15}, Lys ^{α} {4.15}, Val₂ ^{α} {4.13}), 4.00 – 3.82 (m, 3H, Thr₂ ^{β} {3.97}, Thr₁ ^{β} {3.93}, Gly₁ ^{$\alpha\alpha$} {3.91}), 3.81 – 3.42 (m, 35H, Gly₂ ^{$\alpha\alpha$} {3.75}, Gly₁ ^{$\alpha\beta$} {3.73}, H5-GalN {3.72}, H6_a-GalN {3.71}, Gly₂ ^{$\alpha\beta$} {3.70}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{δ} {3.70 – 3.50}, H3-GalN {3.68}, H4-GalN {3.65}, H4-Gal' {3.62}, H9_a-Sia {3.62}, H8-Sia {3.61}, Ser₂ ^{$\beta\alpha$} {3.58}, H4-Sia {3.58}, Ser_{ST} ^{$\beta\alpha\beta$} {3.57}, H3-Spa {3.55}, H6_a-Gal' {3.53}, H5-Sia {3.51}, Ser₂ ^{$\beta\beta$} {3.50}, H6_b-GalN {3.47}, H6_b-Gal' {3.47}, H5-Spa {3.47}, H6-Spa {3.47}), 3.41 – 3.29 (m, 7H, H9_b-Sia {3.39}, H8-Spa {3.38}, H2-Gal' {3.34}, H5-Gal' {3.34}, H6-Sia {3.33}, H7-Sia {3.32}), 3.26 (m_c, 1H, H3-Gal'), 3.22 – 3.14 (m, 2H, H9-Spa {3.18}), 3.14 – 3.03 (m, 3H, His ^{$\beta\alpha$} {3.10}, Arg ^{δ} {3.09}), 2.97 (dd, 1H, ³J_{H_{is} $\beta\beta$,H_{is} α} = 6.4 Hz, ²J_{H_{is} $\beta\beta$,H_{is} $\beta\alpha$} = 15.5 Hz, His ^{$\beta\beta$}), 2.80 – 2.67 (m, 4H, Lys ^{ϵ} {2.76}, Asp₁ ^{$\beta\alpha$} {2.72}, Asp₂ ^{$\beta\alpha$} {2.71}), 2.60 (dd, 1H, ³J_{Asn $\beta\alpha$,Asn α} = 6.2 Hz, ²J_{Asn $\beta\alpha$,Asn $\beta\beta$} = 15.2 Hz, Asn ^{$\beta\alpha$}), 2.56 – 2.42 (m, 4H, Asp₂ ^{$\beta\beta$} {2.53}, H3_{ac}-Sia {2.52}, Asp₁ ^{$\beta\beta$} {2.49}, Asn ^{$\beta\beta$} {2.46, dd, 1H, ³J_{Asn $\beta\beta$,Asn α} = 6.5 Hz, ²J_{Asn $\beta\alpha$,Asn $\beta\beta$} = 15.8 Hz, Asn ^{$\beta\alpha$} }), 2.40 – 2.28 (m, 2H, H2-Spa {2.34}), 2.28 – 2.20 (m, 4H, Glu₁ ^{γ} {2.27}, Glu₂ ^{γ} {2.24}), 2.16 – 2.08 (m, 4H, Pro₁ ^{$\beta\alpha$} {2.12}, Pro₅ ^{$\beta\alpha$} {2.11}, Gln ^{γ} {2.11}), 2.06 – 1.61 (m, 37H, Pro₄ ^{$\beta\alpha$} {2.04}, Pro₃ ^{$\beta\alpha$} {2.01}, Pro₂ ^{$\beta\alpha$} {1.99}, Val₁ ^{β} {1.98}, Val₂ ^{β} {1.96}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{γ} {1.95 – 1.77}, Glu₁ ^{$\beta\alpha$} {1.92}, Glu₂ ^{$\beta\alpha$} {1.90}, Gln ^{$\beta\alpha$} {1.87}, 1.87, 1.86 (2 x CH₃-Ac), Pro₁ ^{$\beta\beta$} {1.83}, 1.81 (CH₃-Ac), Pro₃ ^{$\beta\beta$} {1.78}, Gln ^{$\beta\beta$} {1.76}, Glu₁ ^{$\beta\beta$} {1.75},

Glu₂^{βb} {1.74}, Pro_(4,5)^{βb} {1.74}, Pro₂^{βb} {1.72}, Arg^{βa} {1.70}, Lys^{βa} {1.68}), 1.58 – 1.43 (m, 7H, Lys^{βb} {1.55}, Arg^γ {1.53}, Arg^{βb} {1.52}, H_{3_{ax}}-Sia {1.51}, Lys^δ {1.50}), 1.35 – 1.22 (m, 2H, Lys^γ {1.28}), 1.18 (d, 9H, ³J_{Alaβ,Alaα} = 6.8 Hz, Ala_(2,3,4)^β), 1.13 (d, 3H, ³J_{Alaβ,Alaα} = 6.9 Hz, Ala₁^β), 1.07 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 6.2 Hz, Thr₂^γ), 0.99 (d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 6.1 Hz, Thr₁^γ), 0.91 – 0.85 (m, 3H, Val₁^{γa} {0.87}), 0.85 – 0.79 (m, 9H, {0.84, d, 6H, ³J_{Valγa,Valβ} = 6.8 Hz, Val₁^{γb}, Val₂^{γa}}, 0.82 {d, 3H, ³J_{Valγb,Valβ} = 6.8 Hz, Val₂^{γb}}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-d₆): [δ/ppm] = 174.12, 173.92, 173.88, 173.30, 172.45, 171.93, 171.83, 171.66, 171.63, 171.45, 171.38, 171.30, 171.20, 171.14, 171.06, 170.44, 170.37, 170.30, 170.17, 170.02, 169.94, 169.68, 169.61, 169.51, 169.41, 168.80 (C=O), 156.70 (C=N-Guan), 133.19 (C2-Imidazol), 128.97 (C5-Imidazol), 116.68 (C4-Imidazol), 104.32 (C1-Gal'), 97.85 (C2-Sia), 97.46 (C1-GalN), 76.80 (C3-GalN), 75.95 (C5-Gal'), 73.13 (C6-Sia), 72.92 (C3-Gal'), 71.09 (C8-Sia), 70.29 (C2-Gal'), 69.21 (C5-GalN), 69.19 (C5-Spa, C6-Spa), 68.52 (C8-Spa), 68.13 (C7-Sia), 67.65 (C4-Gal'), 67.64 (C4-GalN), 66.83 (Thr₁^β), 66.56 (Thr₂^β), 66.44 (C3-Spa, Ser_{ST}^{βab}), 66.42 (C4-Sia), 62.76 (C6-GalN), 62.65 (C9-Sia), 61.46 (Ser₂^β), 60.16 (C6-Gal'), 58.66 (Pro₃^α), 58.62 (Pro₂^α), 58.09 (Pro₁^α), 57.98 (Thr₂^α), 57.64 (Val₁^α), 57.60 (Thr₁^α), 57.53 (Val₂^α), 57.31 (Pro₄^α), 57.15 (Pro₅^α), 54.58 (Ser₂^α), 52.54 (Gln^α), 52.14 (Lys^α), 52.05 (Ser_{ST}^α), 51.93 (C5-Sia), 51.52 (Glu_(1,2)^α), 50.99 (His^α), 49.96 (Asp₂^α), 49.73 (Asn^α), 49.62 (Arg^α), 49.14 (Asp₁^α), 47.98 (Ala₂^α), 47.43 (C2-GalN), 46.37 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 45.87 (Ala₄^α), 45.72 (Ala₃^α), 45.63 (Ala₁^α), 41.61 (Gly₂^α), 41.48 (Gly₁^α), 40.37 (C3-Sia), 40.17 (Arg^δ), 38.33 (Lys^ε), 38.21 (C9-Spa), 36.63 (Asn^β), 35.34 (Asp_(1,2)^β), 35.32 (C2-Spa), 30.90 (Gln^γ), 30.78 (Val₁^β), 30.58 (Lys^β), 30.21 (Val₂^β), 29.79 (Glu_(1,2)^γ), 28.67 (Pro_(3,4)^β), 28.56 (Pro₂^β), 28.22 (Pro₁^β), 28.09 (Arg^β), 27.68 (Pro₅^β), 27.06 (Gln^β), 27.04 (Glu_(1,2)^β), 26.69 (His^β), 26.20 (Lys^δ), 24.18 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 24.12 (Arg^γ), 22.58, 22.39, 22.31 (3 x CH₃-Ac), 21.87 (Lys^γ), 19.12 (Thr₁^γ), 18.91 (Val₁^{γa}), 18.86 (Thr₂^γ), 18.86 (Val₁^{γb}), 17.83 (Val₂^{γab}), 16.81 (Ala_(2,3,4)^β), 16.58 (Ala₁^β).

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1743.71 ([M+2H]²⁺, ber.: 1743.80).

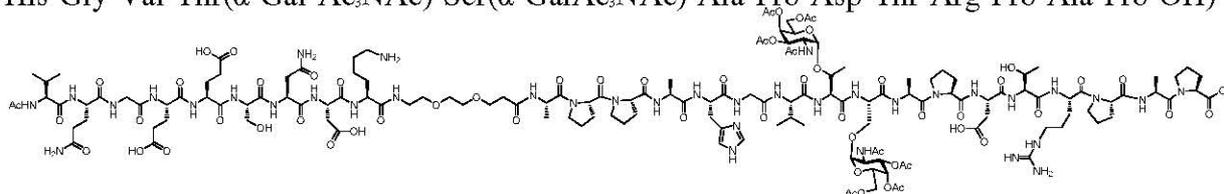
1163.00 ([M+3H]³⁺, ber.: 1162.87).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1743.2993 ([M+3H]³⁺, ber.: 1743.3004).

C₁₄₄H₂₂₉N₃₇O₆₃ (3486.57)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyl-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (167)**

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -Gal-Ac₃NAC)-Ser(α -GalAc₃NAC)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 130 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Pro versehenen Polystyrol-Harzes **137** (Beladung: 0.77 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäuren **17** und **14** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 105.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAC)-OH (**17**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 24.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HOAt und 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 8 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert. Die Fmoc-Schutzgruppe wird durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Direkt im Anschluss erfolgt die Kupplung mit 107.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Thr(α -GalAc₃NAC)-OH (**14**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 24.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HOAt und 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP, wobei die Lösung 12 h geschüttelt wird (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Valin und Glycin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die restlichen fünf Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Anbindung des Diethylglycolspacers erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung aus 160.0 mg (0.600 mmol, 4.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 167.0 mg (0.439 mmol, 4.39 Äquiv.) HATU, 62.0 mg (0.456 mmol, 4.56 Äquiv.) HOAt und 89.0 mg (0.880 mmol, 8.80 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP, wobei 16 h geschüttelt wird (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Im letzten Teilschritt die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die restlichen neun Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt, wobei für L-Lysin eine Doppelkupplung durchgeführt wird. Im letzten Teilschritt wird die terminale

Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und ein doppeltes Capping durchgeführt. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 462 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 332$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz im Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer Lösung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Lösung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (342 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 21.35$ min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-12), $R_t = 43.30$ min (Gerät 2, Säule: Luna-1, Gradient: Präp-6).

Ausbeute: 100 mg (28.7 μmol , 29 %); farbloses Lyophilisat $[\alpha]_D^{23} = -51.0$ ($c = 1.00$, MeOH).

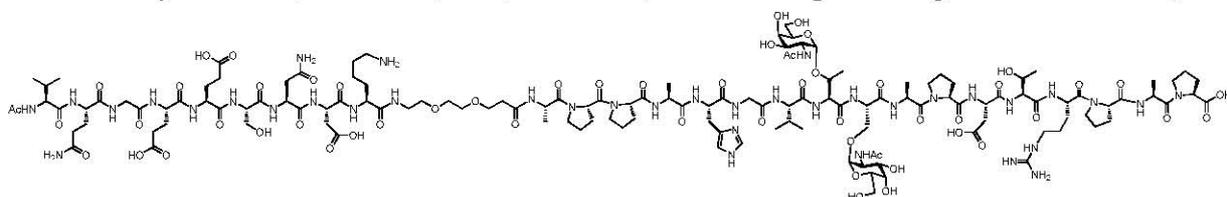
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1163.53$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1163.54).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1177.8510$ ($[M+H+2Na]^{3+}$, ber.: 1177.8557).

$C_{147}H_{227}N_{37}O_{61}$ (3488.59)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyglycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginy-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidylglycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (173)**

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser(α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



50 mg (14.3 μmol) des Konjugats **167** werden in 20 ml Methanol unter Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 12 h bei pH 9.5 gerührt und der Reaktionsfortschritt durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz auf 10.5 gehalten. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Der gelbe

Rückstand (59 mg) wird durch präparative RP-HPLC gereinigt. $R_t = 35.26$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 28.92$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 38 mg (11.7 μmol , 82 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -43.8$ ($c = 1.00$, MeOH).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC] (DMSO-*d*₆): [δ /ppm] = 8.95 (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.28 – 8.19 (m, 4H, NH-Asn {8.24}, NH-Asp_(1,2) {8.24}, NH-Gly₁ {8.24}), 8.17 – 8.00 (m, 12H, Ala₄ {8.17}, NH-Ser_{TN} {8.17}, NH-Gln {8.15}, NH-Ala₃ {8.12}, NH-Gly₂ {8.11}, NH-Ala₁ {8.10}, NH-His {8.10}, NH-Thr_{TN} {8.09}, NH-Ala₂ {8.07}, NH-Glu₂ {8.07}, NH-Val_(1,2) {8.07}), 7.99 – 7.90 (m, 3H, NH-Arg {7.97}, NH-Ser₂ {7.95}, NH-Glu₁ {7.93}), 7.85 (d, 1H, ³J_{NH,Lys α} = 8.4 Hz, NH-Lys), 7.70 – 7.59 (m, 3H, NH-Spa {7.67}, NH-Lys ^{ϵ} {7.64}), 7.51 – 7.44 (m, 1H, NH-Gua {7.47}), 7.38 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.34 (d, 1H, ³J_{NH,Thr α} = 7.5 Hz, Thr₁), 7.25 (dp, 1H, ³J_{NH,H2} \approx 11.0 Hz, NH-GalN^{Ser}), 7.06 (d, 1H, ³J_{NH,H2} \approx 10.6 Hz, NH-GalN^{Thr}), 4.80 – 4.40 (m, 14H, H1-GalN^{Thr} {4.72}, H1-GalN^{Ser} {4.59}, His ^{α} {4.57}, Asn ^{α} {4.56}, Asp₁ ^{α} {4.55}, Pro₅ ^{α} {4.54}, Ala₁ ^{α} {4.51}, Thr_{TN} ^{α} {4.51}, Arg ^{α} {4.50}, Ala₄ ^{α} {4.47}, Asp₂ ^{α} {4.47}, Pro₄ ^{α} {4.47}, Ser_{TN} ^{α} {4.47}, Ala₃ ^{α} {4.45}), 4.37 – 3.83 (m, 17H, Pro₃ ^{α} {4.34}, Glu_(1,2) ^{α} {4.30}, Ser₂ ^{α} {4.30}, Pro₂ ^{α} {4.29}, Val₁ ^{α} {4.28}, Pro₁ ^{α} {4.21}, Thr₁ ^{α} {4.20}, Gln ^{α} {4.17}, Ala₂ ^{α} {4.15}, Lys ^{α} {4.15}, Thr_{TN} ^{β} {4.14}, Val₂ ^{α} {4.13}, H2-GalN^{Ser} {4.05}, H2-GalN^{Thr} {3.97}, Thr₁ ^{β} {3.93}, Gly₁^{oa} {3.88}), 3.80 – 3.40 (m, 33H, Gly₂^{oa} {3.76}, Gly₁^{ob} {3.74}, Gly₂^{ob} {3.72}, H4-GalN^{Ser/Thr} {3.69}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{δ} {3.69 – 3.45}, H5-GalN^{Thr} {3.64}, H3-GalN^{Thr} {3.61}, Ser_{TN} ^{β ab} {3.61}, Ser₂ ^{β a} {3.59}, H3-Spa {3.57}, H5-GalN^{Ser} {3.57}, H3-GalN^{Ser} {3.56}, Ser₂ ^{β b} {3.53}, H6_a-GalN^{Ser/Thr} {3.50}, H5-Spa {3.46}, H6-Spa {3.46}, H6_b-GalN^{Ser/Thr} {3.43}), 3.37 (t, 2H, ³J_{H8,H9} = 6.0 Hz, H8-Spa), 3.24 – 3.15 (m, 2H, H9-Spa {3.18}), 3.14 – 3.04 (m, 3H, His ^{β a} {3.12}, Arg ^{δ} {3.09}), 2.96 (dd, 1H, ³J_{His β b,His α} \approx 7.8 Hz, ²J_{His β b,His β a} \approx 14.6 Hz, His ^{β b}), 2.83 – 2.65 (m, 4H, Lys ^{ϵ} {2.75}, Asp₂ ^{β a} {2.73}, Asp₁ ^{β a} {2.71}), 2.60 (dd, 1H, ³J_{Asn β a,Asn α} \approx 6.8 Hz, ²J_{Asn β a,Asn β b} \approx 15.8 Hz, Asn ^{β a}), 2.56 – 2.42 (m, 3H, Asp_(1,2) ^{β b} {2.51}, Asn ^{β b} {2.46}), 2.41 – 2.31 (m, 2H, H2-Spa {2.34}), 2.31 – 2.20 (m, 4H, Glu_(1,2) ^{γ} {2.26}), 2.17 – 2.08 (m, 4H, Pro₁ ^{β a} {2.13}, Gln ^{γ} {2.11, t, 2H, ³J_{Gln γ ,Gln β} = 7.8 Hz}, Pro₅ ^{β a} {2.11}), 2.07 – 1.64 (m, 37H, Pro₃ ^{β a} {2.02}, Pro_(2,4) ^{β a} {1.98}, Val₁ ^{β} {1.98}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{γ} {1.95 – 1.80}, Val₂ ^{β} {1.95}, Gln ^{β a} {1.92}, Glu_(1,2) ^{β a} {1.91}, 1.87, 1.85 (3 x CH₃-Ac), Pro_(1,5) ^{β b} {1.80}, Pro_(3,4) ^{β b} {1.79}, Gln ^{β b} {1.77}, Glu_(1,2) ^{β b} {1.76}, Pro₂ ^{β b} {1.76}, Arg ^{β a} {1.73}, Lys ^{β a} {1.68}), 1.62 – 1.44 (m, 6H, Lys ^{β b} {1.54}, Arg ^{β b} {1.52}, Arg ^{γ} {1.51}, Lys ^{δ} {1.51}), 1.34 – 1.26 (m, 2H, Lys ^{γ} {1.28}), 1.25 – 1.15 (m, 9H, Ala₄ ^{β} {1.22}, Ala_(2,3) ^{β} {1.18, d, 6H, ³J_{Ala β ,Ala α} = 6.8 Hz}), 1.13 (d, 6H, {d, 3H, ³J_{Ala β ,Ala α} \approx 6.5 Hz, Ala₁ ^{β} }, {d, 3H, ³J_{Thr γ ,Thr β} \approx 6.5 Hz, Thr_{TN} ^{γ} }), 0.99 (d, 3H, ³J_{Thr γ ,Thr β} = 6.2 Hz, Thr₁ ^{γ}), 0.90 (d, 3H,

$^3J_{\text{Val}^{\gamma\text{a}}, \text{Val}^{\beta}} = 6.5 \text{ Hz}$, $\text{Val}_1^{\gamma\text{a}}$, 0.87 – 0.80 (m, 9H, {0.84, d, $^3J_{\text{Val}^{\gamma\text{a}}, \text{Val}^{\beta}} = 6.5 \text{ Hz}$, $\text{Val}_1^{\gamma\text{b}}$ }, $\text{Val}_2^{\gamma\text{a}}$ {0.84}, 0.82 {d, $^3J_{\text{Val}^{\gamma\text{b}}, \text{Val}^{\beta}} = 6.5 \text{ Hz}$, $\text{Val}_2^{\gamma\text{b}}$ }).

100.9 MHz- ^{13}C -NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO- d_6): [δ/ppm] = 174.09, 173.26, 171.93, 171.61, 171.42, 171.35, 171.26, 171.03, 170.53, 170.41, 170.27, 170.16, 169.66, 169.38, 168.79, 168.72 (C=O), 156.68 (C=N-Guan), 133.65 (C2-Imidazol), 129.00 (C5-Imidazol), 117.11 (C4-Imidazol), * (C1-GalN^{Thr}), 97.82 (C1-GalN^{Ser}), 73.57 (Thr_{TN} ^{β}), 71.37 (C5-GalN^{Ser}), 71.32 (C5-GalN^{Thr}), 69.43 (C5-Spa, C6-Spa), 68.73 (C8-Spa), 68.35 (C3-GalN^{Thr}), 68.06 (C3-GalN^{Ser}), 68.04 (C4-GalN^{Ser/Thr}), 66.80 (Thr₁ ^{β}), 66.60 (Ser_{TN} ^{β}), 66.59 (C3-Spa), 61.56 (Ser₂ ^{β}), 60.47 (C6-GalN^{Ser/Thr}), 58.99 (Pro₃ ^{α}), 58.76 (Pro₂ ^{α}), 58.25 (Pro₁ ^{α}), 58.13 (Pro₄ ^{α}), 57.96 (Val₂ ^{α}), 57.44 (Thr₁ ^{α}), 57.22 (Pro₅ ^{α}), 57.20 (Val₁ ^{α}), 55.65 (Thr_{TN} ^{α}), 54.73 (Ser₂ ^{α}), 52.42 (Gln ^{α}), 52.41 (Lys ^{α}), 51.92 (Ser_{TN} ^{α}), 51.69 (Glu_(1,2) ^{α}), 51.37 (His ^{α}), 50.63 (Asp_(1,2) ^{α}), 49.75 (Arg ^{α}), 49.59 (Asn ^{α}), 49.12 (C2-GalN^{Thr}), 49.07 (C2-GalN^{Ser}), 48.05 (Ala₂ ^{α}), 46.69, 46.42 (Pro_(1,2,3,4,5) ^{δ}), 46.14 (Ala₄ ^{α}), 45.89 (Ala₁ ^{α}), 45.84 (Ala₃ ^{α}), 42.09 (Gly₁ ^{α}), 41.80 (Gly₂ ^{α}), 40.52 (Arg ^{δ}), 38.47 (Lys ^{δ}), 38.32 (C9-Spa), 36.70 (Asn ^{β}), 35.69 (C2-Spa), 35.67 (Asp_(1,2) ^{β}), 31.08 (Gln ^{γ}), 31.05 (Val₁ ^{β}), 30.44 (Lys ^{β}), 30.18 (Val₂ ^{β}), 30.15 (Glu_(1,2) ^{γ}), 28.88 (Pro₄ ^{β}), 28.67 (Pro₂ ^{β}), 28.36 (Pro_(1,3) ^{β}), 27.63 (Gln ^{β}), 27.61 (Pro₅ ^{β}), 27.50 (Glu_(1,2) ^{β}), 27.38 (Arg ^{β}), 27.04 (His ^{β}), 26.27 (Lys ^{δ}), 24.41 (Arg ^{γ}), 24.36 (Pro_(1,2,3,4,5) ^{γ}), 22.74, 22.58 (3 x CH₃-Ac), 22.05 (Lys ^{γ}), 19.27 (Val₁ ^{γa}), 19.17 (Thr₁ ^{γ}), 18.79 (Val₂ ^{γa}), 18.53 (Thr_{TN} ^{γ}), 18.20 (Val₁ ^{γb}), 18.06 (Val₂ ^{γb}), 16.74 (Ala₁ ^{β}), 16.82 (Ala_(2,3) ^{β}), 16.66 (Ala₄ ^{β}).

Werte mit einem * konnten nicht ermittelt werden.

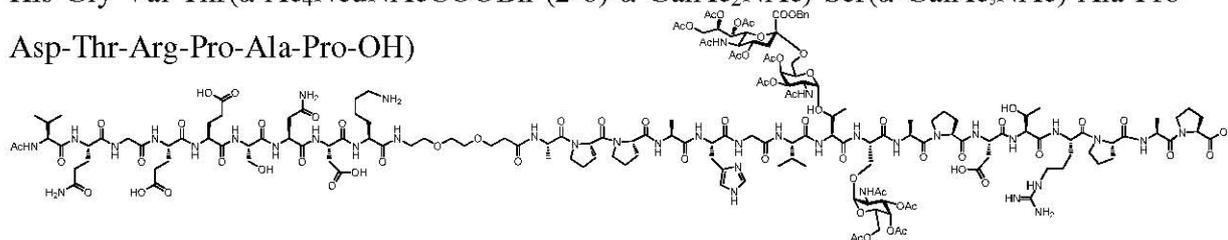
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1079.52 ([M+3H]³⁺, ber.: 1079.51).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1618.2632 ([M+2H]²⁺, ber.: 1618.2660).

C₁₃₅H₂₁₅N₃₇O₅₅ (3236.37)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyl-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (168)**

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂Nac)-Ser(α -GalAc₃Nac)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 136 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Pro versehenen Polystyrol-Harzes **137** (Beladung: 0.74 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der automatisierten Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäuren **17** und **27** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 131.0 mg (0.200 mmol, 2.00 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -GalAc₃Nac)-OH (**17**), 83.0 mg (0.218 mmol, 2.18 Äquiv.) HATU, 31.0 mg (0.228 mmol, 2.28 Äquiv.) HOAt, 44.0 mg (0.435 mmol, 4.35 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 8 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin abgespalten mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Direkt im Anschluss erfolgt die Kupplung mit 189 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂Nac)-OH (**27**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 24.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HOAt und 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP. Die Lösung wird 12 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand), danach abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Valin und Glycin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die folgenden fünf Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Anbindung des Diethylglycolspacers erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung aus 120.0 mg (0.300 mmol, 3.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 126.0 mg (0.331 mmol, 3.31 Äquiv.)

HATU, 47.0 mg (0.345 mmol, 3.45 Äquiv.) HOAt, 66.0 mg (0.652 mmol, 6.52 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP. Die Lösung wird 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand), danach abfiltriert, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und die Kupplung ein zweites Mal mit 80.0 mg (0.200 mmol, 2.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 84.0 mg (0.221 mmol, 3.31 Äquiv.) HATU, 31.0 mg (0.228 mmol, 2.28 Äquiv.) HOAt und 45.0 mg (0.445 mmol, 4.45 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP ausgeführt. Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Lysin und L-Asparaginsäure wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die restlichen sieben Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Das terminale L-Valin wird durch doppeltes Capping acetyliert. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 519 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 383$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz im Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (346 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC.

$R_t = 19.31$ min und 20.36 min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-11), $R_t = 27.87$ min und 29.77 min (Gerät 2, Säule: Luna-2, Gradient: Semipräp-6).

Ausbeute: 162 mg (40.5 μ mol, 41 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -56.8$ ($c = 1.00$, MeOH).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1332.97$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1332.93).

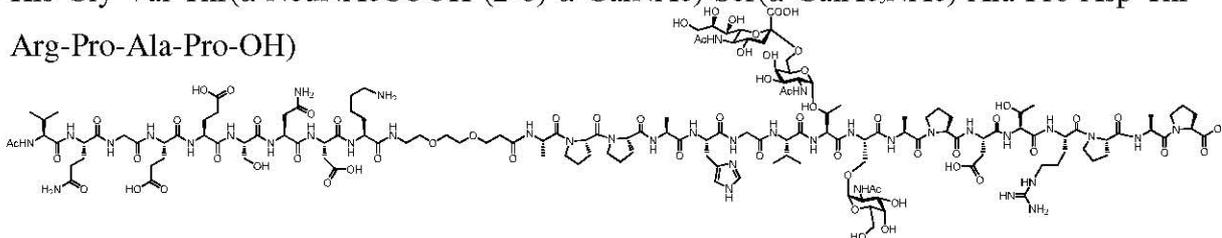
999.97 ($[M+4H]^{4+}$, ber.: 999.95).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1332.2532$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1332.2591).

C₁₇₁H₂₅₆N₃₈O₇₂ (3996.07)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyl-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanyl-amido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (**175**)**

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -NeuNAcCOOH-(2-6)- α -GalNAc)-Ser(α -GalAc₃NAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



64 mg (16.0 μ mol) des glycosylierten Konjugats **168** werden in 30 ml Methanol mit 0.5 ml Essigsäure sowie 35 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle versetzt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird 36 h bei Raumtemp. unter 1 bar Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Reaktionsumsatz wird durch analytische RP-HPLC vor dem Abbruch überprüft. Die Wasserstoffatmosphäre wird gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über eine Kartusche mit C18-Säulenmaterial filtriert. Die kleine Säule wird mehrmals mit reinem Methanol gespült und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (70 mg) wird einige Male mit Toluol kodestilliert und ohne Reinigung der nachfolgenden Reaktion unterworfen. $R_t = 45.26$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1).

C₁₆₄H₂₅₀N₃₈O₇₂ (3905.95)

Das rohe Peptid wird in 30 ml Methanol gelöst und unter Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natrium-methanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 50 h bei einem pH-Wert zwischen 10.0 – 10.5 gerührt und der Reaktionsfortschritt durch analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des Peptids (78 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC.

$R_t = 27.33$ min und 29.05 min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 26.56$ min und 29.02 min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 38 mg (10.8 μ mol, 68 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{21} = -41.3$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): $[\delta/ppm] = 8.89$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.32 – 8.19 (m, 4H, NH-Asn {8.26}, NH-Asp_(1,2) {8.26}, NH-Gly₁ {8.24}), 8.18 –

8.02 (m, 12H, NH-Gln {8.17}, NH-Ala₄ {8.16}, NH-Ser_{TN} {8.16}, NH-Gly₂ {8.12}, NH-Ala_(2,3) {8.10}, NH-Thr₂ {8.10}, NH-Val₁ {8.10}, NH-Ala₁ {8.09}, NH-Glu₂ {8.09}, NH-His {8.08}, NH-Sia {8.04}), 8.00 – 7.90 (m, 3H, NH-Arg {7.98}, NH-Glu₁ {7.96}, NH-Ser₂ {7.95}), 7.89 – 7.83 (m, 2H, NH-Val₂ {7.87}, NH-Lys {7.85}), 7.73 – 7.61 (m, 3H, NH-Spa {7.67}, NH-Lys^ε {7.66}), 7.58 – 7.52 (m, 1H, NH-Gua {7.54}), 7.37 (s, 1H, H_{4AR}-His), 7.35 (d, 1H, ³J_{NH,Thrα} = 8.3 Hz, NH-Thr₁), 7.26 (d, 1H, ³J_{NH,H2} ≈ 11.2 Hz, NH-GalN^{TN}), 6.98 (s_b, 1H, NH-GalN^{STN}), 4.74 – 4.67 (m, 1H, H1-GalN^{STN} {4.73}), 4.62 – 4.41 (m, 13H, H1-GalN^{TN} {4.60}, His^α {4.56}, Asn^α {4.55}, Asp₁^α {4.55}, Pro₅^α {4.55}, Ala₁^α {4.52}, Thr_{STN}^α {4.52}, Arg^α {4.48}, Ala₄^α {4.47}, Ser_{TN}^α {4.46}, Val₁^α {4.46}, Asp₂^α {4.45}, Ala₃^α {4.44}), 4.39 – 4.24 (m, 5H, Pro₃^α {4.34}, Glu_(1,2)^α {4.30}, Pro₄^α {4.30}, Ser₂^α {4.29}), 4.24 – 4.09 (m, 8H, Pro₂^α {4.21}, Gln^α {4.20}, Thr₁^α {4.20}, Thr_{STN}^β {4.19}, Pro₁^α {4.16}, Ala₂^α {4.15}, Val₂^α {4.14}, Lys^α {4.12}), 4.05 (td, 1H, ³J_{H2,H3} = ³J_{H2,NH} = 11.2 Hz, ³J_{H2,H1} ≈ 3.2 Hz, H2-GalN^{TN}), 3.98 – 3.85 (m, 3H, H2-GalN^{STN} {3.93}, Thr₁^β {3.93}, Gly₁^{oa} {3.88}), 3.84 – 3.24 (m, 42H, H5-GalN^{STN} {3.79}, Gly₂^{oa} {3.77}, H6_a-GalN^{STN} {3.73}, Gly₁^{ob} {3.73}, Gly₂^{ob} {3.70}, H4-GalN^{TN} {3.70}, Pro₅^δ {3.65}, H4-GalN^{STN} {3.64}, H9_a-Sia {3.62}, Ser_{TN}^{βab} {3.61}, H8-Sia {3.61}, Pro₄^δ {3.59}, Ser₂^{βa} {3.59}, H3-GalN^{STN} {3.58}, H5-GalN^{TN} {3.57}, H3-Spa {3.57}, H3-GalN^{TN} {3.56}, H4-Sia {3.55}, H6_b-GalN^{STN} {3.53}, Ser₂^{βb} {3.52}, H6_a-GalN^{TN} {3.51}, Pro_(2,3)^δ {3.51}, Pro₁^δ {3.48}, H5-Sia {3.48}, H5-Spa {3.47}, H6-Spa {3.47}, H6_b-GalN^{TN} {3.43}, H9_b-Sia {3.41}, H8-Spa {3.38}, H6-Sia {3.34}, H7-Sia {3.32}), 3.22 – 3.15 (m, 2H, H9-Spa {3.19}), 3.15 – 3.03 (m, 3H, His^{βa} {3.09}, Arg^δ {3.09}), 2.97 (dd, 1H, ³J_{Hisβb,Hisα} = 8.3 Hz, ²J_{Hisβb,Hisβa} = 13.6 Hz, His^{βb}), 2.80 – 2.67 (m, 4H, Lys^ε {2.77}, Asp₁^{βa} {2.72}, Asp₂^{βa} {2.71}), 2.60 (dd, 1H, ³J_{Asnβa,Asnα} = 6.6 Hz, ²J_{Asnβa,Asnβb} = 15.8 Hz, Asn^{βa}), 2.55 – 2.42 (m, 4H, Asp₁^{βb} {2.51}, H3_{aq}-Sia {2.51}, Asp₂^{βb} {2.50}, Asn^{βb} {2.45, dd, 1H, ³J_{Asnβb,Asnα} = 6.2 Hz, ²J_{Asnβa,Asnβb} = 15.6 Hz, Asn^{βa}}), 2.41 – 2.29 (m, 2H, H2-Spa {2.34}), 2.28 – 2.21 (m, 4H, Glu_(1,2)^γ {2.26}), 2.16 – 2.08 (m, 4H, Pro₂^{βa} {2.15}, Pro₅^{βa} {2.13}, Gln^γ {2.12}), 2.09 – 1.64 (m, 40H, Pro₃^{βa} {2.02}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {1.98 – 1.81}, Val₁^β {1.98}, Pro₄^{βa} {1.97}, Val₂^β {1.93}, Glu₁^{βa} {1.90}, Gln^{βa} {1.88}, 1.88, 1.87 (2 x CH₃-Ac), Glu₂^{βa} {1.87}, 1.85 (2 x CH₃-Ac), Pro₁^{βa} {1.85}, Pro₂^{βb} {1.81}, Pro₃^{βb} {1.77}, Gln^{βb} {1.76}, Pro₁^{βb} {1.75}, Glu₁^{βb} {1.74}, Pro_(4,5)^{βb} {1.74}, Glu₂^{βb} {1.73}, Arg^{βa} {1.71}, Lys^{βa} {1.69}), 1.60 – 1.42 (m, 7H, Lys^{βb} {1.57}, Arg^{βb} {1.53}, Arg^γ {1.52}, Lys^δ {1.49}, H3_{ax}-Sia {1.47}), 1.35 – 1.24 (m, 2H, Lys^γ {1.29}), 1.24 – 1.10 (m, 15H, Ala₄^β {1.20}, Ala_(2,3)^β {1.17, d, 6H, ³J_{Alaβ,Alaα} = 7.0 Hz,}, Thr_{STN}^γ {1.13}, Ala₁^β {1.12, d, 3H, ³J_{Alaβ,Alaα} = 7.0 Hz}), 0.99 (d, 3H, ³J_{Thry,Thrβ} = 6.2 Hz, Thr₁^γ), 0.90 (d, 3H, ³J_{Valγa,Valβ} = 6.6 Hz, Val₁^{γa}), 0.85 – 0.79 (m, 9H, {0.84, d, 6H, ³J_{Valγa,Valβ} = 6.7 Hz, Val₁^{γb}, Val₂^{γa}}, {0.81, d, 3H, ³J_{Valγb,Valβ} = 6.8 Hz, Val₂^{γb}}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (DMSO-d₆): [δ/ppm] = 174.12, 173.89, 173.34, 173.31, 172.44, 172.06, 171.98, 171.94, 171.84, 171.64, 171.57, 171.46, 171.39, 171.30, 171.20, 171.14, 171.08, 170.45, 170.39, 170.31, 170.18, 170.09, 170.02, 169.99, 169.94, 169.69, 169.63, 169.55, 169.41, 168.91, 168.80 (C=O), 156.74 (C=N-Guan), 133.71 (C2-Imidazol), 129.07 (C5-Imidazol), 117.64 (C4-Imidazol), * (C2-Sia), 99.42 (C1-GalN^{STN}), 98.42 (C1-GalN^{TN}), 76.11 (Thr^β_{STN}), 73.88 (C6-Sia), 71.89 (C5-GalN^{TN}), 71.88 (C8-Sia), 70.26 (C5-GalN^{STN}), 69.97 (C5-Spa, C6-Spa), 69.20 (C4-GalN^{STN}), 68.84 (C7-Sia), 68.81 (C3-GalN^{STN}), 68.70 (C4-GalN^{TN}), 68.67 (C3-GalN^{TN}), 68.67 (C4-Sia), 68.35 (C8-Spa), 67.37 (Ser^β_{TN}), 67.17 (C3-Spa), 66.21 (Thr^β₁), 64.27 (C6-GalN^{STN}), 63.33 (C9-Sia), 62.13 (Ser^β₂), 61.00 (C6-GalN^{TN}), 59.53 (Pro^α₃), 59.43 (Pro^α₄), 58.93 (Pro^α₂), 58.33 (Pro^α₁), 57.93 (Pro^α₅), 57.86 (Val^α₂), 57.60 (Thr^α₁), 57.29 (Val^α₁), 56.09 (Thr^α_{STN}), 55.30 (Ser^α₂), 52.92 (Lys^α), 52.79 (C5-Sia), 52.56 (Gln^α), 52.46 (Ser^α_{TN}), 51.93 (His^α), 51.84 (Glu_(1,2)^α), 50.33 (Arg^α), 50.09 (Asp^α₂), 49.97 (Asp^α₁), 49.64 (Asn^α), 49.64 (C2-GalN^{STN}), 49.59 (C2-GalN^{TN}), 48.79 (Ala^α₂), 46.94 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.51 (Ala_(3,4)^α), 46.40 (Ala^α₁), 42.40 (Gly^α₂), 42.36 (Gly^α₁), 41.22 (C3-Sia), 40.97 (Arg^δ), 39.12 (Lys^ε), 39.00 (C9-Spa), 37.36 (Asn^β), 36.09 (Asp_(1,2)^β), 36.08 (C2-Spa), 31.73 (Gln^γ), 31.33 (Lys^β), 30.84 (Val^β₁), 30.53 (Glu_(1,2)^γ), 30.25 (Val^β₂), 29.44 (Pro^β₃), 29.26 (Pro^β₄), 29.04 (Pro^β₁), 28.87 (Arg^β), 28.81 (Pro^β₂), 28.30 (Pro^β₅), 27.83 (Glu_(1,2)^β), 27.53 (His^β), 27.45 (Gln^β), 26.91 (Lys^δ), 24.88 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 24.86 (Arg^γ), 23.33, 23.01 (4 x CH₃-Ac), 22.54 (Lys^γ), 19.93 (Thr^γ₁), 19.65 (Val^{γa}₁), 19.61 (Val^{γb}₂), 19.48 (Val^{γb}₁), 19.21 (Val^{γa}₂), 19.02 (Thr^γ_{STN}), 17.55 (Ala_(2,3)^β), 17.31 (Ala^β₁), 17.12 (Ala^β₄).

Werte mit einem * konnten nicht ermittelt werden.

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1775.33 ([M+H+Na]²⁺, ber.: 1775.31).

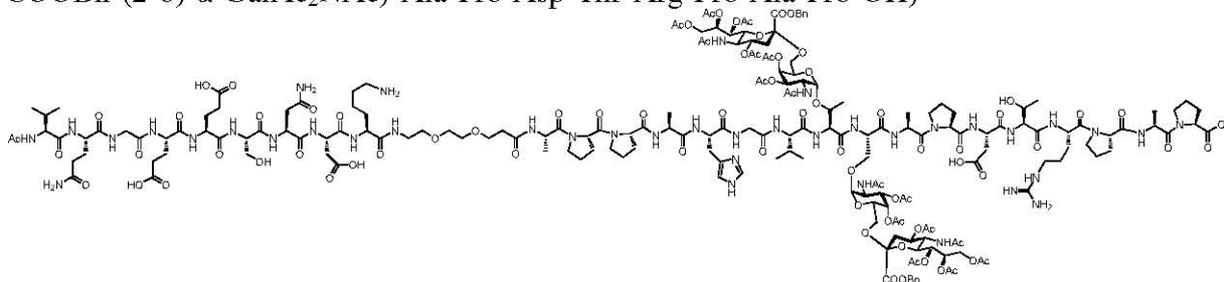
1191.21 ([M+2H]²⁺, ber.: 1191.20).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1785.8030 ([M+2Na]²⁺, ber.: 1785.7957).

C₁₄₆H₂₃₂N₃₈O₆₃ (3527.62)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyl-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (169)**

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 135 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Pro versehenen Polystyrol-Harzes **137** (Beladung: 0.74 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäuren **31** und **27** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptid-synthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 186.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OH (**31**), 76.0 mg (0.200 mmol, 2.00 Äquiv.) HATU, 28.5 mg (0.209 mmol, 2.09 Äquiv.) HOAt, 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Direkt im Anschluss erfolgt die Doppelkupplung mit 189 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OH (**27**), 76.0 mg (0.200 mmol, 2.00 Äquiv.) HATU, 28.5 mg (0.209 mmol, 2.09 Äquiv.) HOAt, 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP. Es wird 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand), danach abfiltriert, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und die Kupplung wiederholt. Sowohl für die darauf folgenden sieben Aminosäuren als auch für den Diethylenglycolspacer erfolgt eine Doppelkupplung. Die Anbindung des Diethylenglycolspacers erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung aus 120.0 mg (0.300 mmol, 3.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 144.0 mg

(0.79 mmol, 3.79 Äquiv.) HATU, 54.0 mg (0.396 mmol, 3.96 Äquiv.) HOAt, 76.0 mg (0.751 mmol, 7.51 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP. Es wird 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand), danach abfiltriert, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und die Kupplung wiederholt. Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die restlichen neun Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll doppelt gekuppelt. Das terminale L-Valin wird durch doppeltes Capping acetyliert. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 475 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 340$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz im Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (345 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 29.17$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 46.15$ min und 47.17 min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 70 mg (15.5 μmol , 16 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -50.5$ ($c = 1.00$, MeOH).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1502.01$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1501.99).

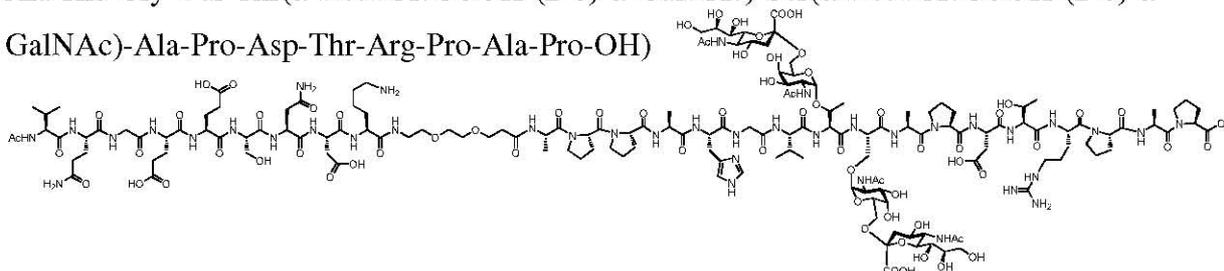
1126.76 ($[M+4H]^{4+}$, ber.: 1126.74).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1501.3164$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1501.3171).

$C_{195}H_{285}N_{39}O_{83}$ (4503.56)

N-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyl-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (**176**)

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -NeuNAcCOOH-(2-6)- α -GalNAc)-Ser(α -NeuNAcCOOH-(2-6)- α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



70 mg (15.5 μ mol) des glycosylierten Konjugats **169** werden in 35 ml Methanol mit 0.5 ml Essigsäure sowie 40 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle versetzt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird 27 h bei Raumtemp. unter 1 bar Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Reaktionsumsatz wird durch analytische RP-HPLC vor Abbruch überprüft. Danach wird die Wasserstoffatmosphäre gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über eine Kartusche mit C18-Säulenmaterial filtriert. Die kleine Säule wird mehrmals mit reinem Methanol gespült und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (50 mg) wird einige Male mit Toluol kodestilliert und ohne Reinigung der nachfolgenden Reaktion unterworfen. $R_t = 37.28$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1441.95$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1441.94).

1081.57 ($[M+4H]^{4+}$, ber.: 1081.72).

C₁₈₁H₂₇₃N₃₉O₈₃ (4323.32)

Das rohe Glycopeptid wird in 25 ml Methanol gelöst und unter Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natrium-methanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 36 h bei einem pH-Wert zwischen 9.5 – 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt über die analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des Peptids (76 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 35.33$ min

(Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 27.67$ min und 29.78 min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 31 mg (8.1 μmol , 52 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{21} = -41.9$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): $[\delta/\text{ppm}] = 8.95$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), 8.31 – 7.90 (m, 20H, NH-Gly₁ {8.26}, NH-Asn {8.25}, NH-Asp_(1,2) {8.25}, NH-Gln {8.16}, NH-Ala₂ {8.15}, NH-Ala₃ {8.13}, NH-Ser_{STN} {8.13}, NH-Ala₄ {8.11}, NH-Gly₂ {8.11}, NH-His {8.10}, NH-Ala₁ {8.09}, NH-Thr_{STN} {8.09}, NH-Glu₂ {8.08}, NH-Val₁ {8.07}, 2 x NH-Sia {8.06}, NH-Arg {7.96}, NH-Glu₁ {7.95}, NH-Ser {7.95}), 7.90 – 7.82 (m, 2H, NH-Val₂ {7.86}, NH-Lys {7.85}), 7.70 – 7.61 (m, 3H, NH-Spa {7.67}, NH-Lys^ε {7.65}), 7.53 – 7.47 (m, 2H, NH-Gua {7.48}), 7.39 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.35 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 7.2$ Hz, NH-Thr₁), 7.21 (d, 1H, ³ $J_{\text{NH,H2}} \approx 8.6$ Hz, NH-GalN^{Ser}), 6.97 (s_b, 1H, NH-GalN^{Thr}), 4.73 (s_b, 1H, H1-GalN^{Thr}), 4.61 – 4.40 (m, 14H, His^α {4.57}, H1-GalN^{Ser} {4.56}, Asn^α {4.55}, Asp₁^α {4.54}, Pro₅^α {4.53}, Ala₁^α {4.51}, Ala₄^α {4.51}, Thr_{STN}^α {4.51}, Pro₄^α {4.50}, Val₁^α {4.50}, Arg^α {4.48}, Asp₂^α {4.46}, Ala₃^α {4.44}, Ser_{STN}^α {4.43}), 4.39 – 4.25 (m, 5H, Pro₃^α {4.34}, Pro₂^α {4.30}, Ser₂^α {4.29}, Glu_(1,2)^α {4.28}), 4.24 – 4.10 (m, 7H, Pro₁^α {4.22}, Gln^α {4.19}, Thr₁^α {4.19}, Thr_{STN}^β {4.17}, Ala₂^α {4.14}, Lys^α {4.13}, Val₂^α {4.12}), 4.07 – 4.00 (m, 1H, H2-GalN^{Ser} {4.04}), 3.99 – 3.86 (m, 3H, H2-GalN^{Thr} {3.94}, Thr₁^β {3.93}, Gly₁^{αa} {3.91}), 3.80 – 3.41 (m, 41H, H5-GalN^{Thr} {3.77^{**}}, Gly₂^{αa} {3.75}, Gly₁^{αb} {3.73}, H5-GalN^{Ser} {3.73^{**}}, H4-GalN^{Thr} {3.70^{**}}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.69 – 3.42}, H6_a-GalN^{Ser/Thr} {3.68^{**}}, Gly₂^{αb} {3.67}, H4-GalN^{Ser} {3.65^{**}}, H3-GalN^{Thr} {3.61}, Ser_{STN}^{βab} {3.61}, 2 x H8-Sia {3.60}, 2 x H9_a-Sia {3.60}, Ser₂^{βa} {3.57}, H3-GalN^{Ser} {3.55}, 2 x H4-Sia {3.55}, H3-Spa {3.55}, 2 x H5-Sia {3.51}, Ser₂^{βb} {3.51}, H6_b-GalN^{Ser/Thr} {3.47}, H5-Spa {3.47}, H6-Spa {3.47}, 3.42 – 3.28 (m, 5H, 2 x H9_b-Sia {3.38}, H8-Spa {3.37}, 2 x H6-Sia {3.33}, 2 x H7-Sia {3.31}), 3.21 – 3.15 (m, 2H, H9-Spa {3.17}), 3.14 – 3.03 (m, 3H, His^{βa} {3.10}, Arg^δ {3.08}), 2.98 (dd, 1H, ³ $J_{\text{His}\beta\text{b},\text{His}\alpha} = 7.4$ Hz, ² $J_{\text{His}\beta\text{b},\text{His}\beta\text{a}} = 13.1$ Hz, His^{βb}), 2.81 – 2.67 (m, 4H, Lys^ε {2.75}, Asp₁^{βa} {2.70}, Asp₂^{βa} {2.69}), 2.60 (dd, 1H, ³ $J_{\text{Asn}\beta\text{a},\text{Asn}\alpha} = 6.3$ Hz, ² $J_{\text{Asn}\beta\text{a},\text{Asn}\beta\text{b}} = 15.5$ Hz, Asn^{βa}), 2.54 – 2.43 (m, 5H, Asp₁^{βb} {2.50}, Asp₂^{βb} {2.48}, 2 x H3_{aq}-Sia {2.49}, Asn^{βb} {2.45, dd, 1H, ³ $J_{\text{Asn}\beta\text{b},\text{Asn}\alpha} = 6.2$ Hz, ² $J_{\text{Asn}\beta\text{a},\text{Asn}\beta\text{b}} = 15.4$ Hz, Asn^{βa}}), 2.42 – 2.29 (m, 2H, H2-Spa {2.33}), 2.33 – 2.19 (m, 4H, Glu_(1,2)^γ {2.25}), 2.18 – 2.08 (m, 4H, Pro₁^{βa} {2.12}, Gln^γ {2.11}, Pro₅^{βa} {2.11}), 2.07 – 1.64 (m, 43H, Pro₄^{βa} {2.03}, Pro₃^{βa} {2.00}, Val₁^β {1.97}, Pro₂^{βa} {1.96}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {1.95 – 1.80}, Val₂^β {1.93}, Glu_(1,2)^{βa} {1.91}, 1.89, 1.88, 1.87 (4 x CH₃-Ac), Gln^{βa} {1.87}, 1.85 (CH₃-Ac), Pro₄^{βb} {1.83}, Pro₁^{βb} {1.81}, Gln^{βb} {1.77}, Pro₅^{βb} {1.76}, Pro₃^{βb} {1.75}, Pro₂^{βb} {1.74}, Glu_(1,2)^{βb} {1.73}, Arg^{βa} {1.69}, Lys^{βa} {1.67}), 1.59 – 1.43 (m, 8H, Lys^{βb} {1.55}, Arg^{βb} {1.52}, Arg^γ {1.51}, 2 x H3_{ax}-Sia {1.50}, Lys^δ

{1.49}), 1.30 – 1.24 (m, 2H, Lys^γ {1.27}), 1.23 – 1.16 (m, 9H, Ala₄^β {1.21}, Ala_(2,3)^β {1.18}), 1.16 – 1.10 (m, 6H, Thr_{STN}^γ {1.14}, Ala₁^β {1.12}), 0.99 (d, 3H, ³J_{Thr^γ,Thr^β} = 6.0 Hz, Thr₁^γ), 0.91 (d, 3H, ³J_{Val^{γa},Val^β} = 6.2 Hz, Val₁^{γa}), 0.87 – 0.80 (m, 9H, 0.84 {d, 6H, ³J_{Val^{γa},Val^β} = 6.7 Hz, Val₁^{γb}, Val₂^{γa}}, 0.82 {d, 3H, ³J_{Val^{γb},Val^β} = 6.8 Hz, Val₂^{γb}}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 174.13, 174.11, 173.87, 173.30, 172.47, 171.97, 171.93, 171.88, 171.83, 171.65, 171.62, 171.52, 171.44, 171.40, 171.38, 171.30, 171.19, 171.13, 171.07, 170.44, 170.39, 170.38, 170.30, 170.17, 170.01, 169.99, 169.95, 169.93, 169.67, 169.61, 169.54, 169.39, 168.79 (C=O), 156.68 (C=N-Guan), 133.31 (C2-Imidazol), 128.95 (C5-Imidazol), 116.79 (C4-Imidazol), 98.76 (C1-GalN^{Thr}), 97.86 (2 x C2-Sia), 97.53 (C1-GalN^{Ser}), 75.51 (Thr_{STN}^β), 73.33 (2 x C6-Sia), 71.15 (2 x C8-Sia), 69.96^{**} (C5-GalN^{Ser}), 69.42^{**} (C5-GalN^{Thr}), 69.21 (C5-Spa, C6-Spa), 68.61 (C8-Spa), 68.38 (C3-GalN^{Thr}), 68.16^{**} (C4-GalN^{Ser}), 68.13 (2 x C7-Sia), 67.86^{**} (C4-GalN^{Thr}), 67.85 (C3-GalN^{Ser}), 67.85 (2 x C4-Sia), 66.53 (C3-Spa), 66.49 (Thr₁^β), 66.34 (Ser_{STN}^β), 62.76 (C6-GalN^{Ser/Thr}), 62.68 (2 x C9-Sia), 61.50 (Ser₂^β), 58.79 (Pro₄^α), 58.76 (Pro₃^α), 58.65 (Pro₂^α), 58.09 (Pro₁^α), 57.56 (Val₂^α), 57.44 (Thr₁^α), 57.14 (Val₁^α), 57.11 (Pro₅^α), 56.28 (Thr_{STN}^α), 54.52 (Ser₂^α), 52.57 (Gln^α), 52.13 (Lys^α), 52.08 (2 x C5-Sia), 51.49 (Glu_(1,2)^α), 51.47 (Ser_{STN}^α), 51.06 (His^α), 49.67 (Asp₂^α), 49.66 (Asp₁^α), 49.63 (Asn^α), 49.60 (Arg^α), 48.96 (C2-GalN^{Thr}), 48.67 (C2-GalN^{Ser}), 48.09 (Ala₂^α), 46.17 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 45.72 (Ala₃^α), 45.68 (Ala_(1,4)^α), 41.59 (Gly₁^α), 41.58 (Gly₂^α), 40.27 (2 x C3-Sia), 40.19 (Arg^δ), 38.32 (Lys^ε), 38.22 (C9-Spa), 36.57 (Asn^β), 35.30 (C2-Spa), 35.28 (Asp_(1,2)^β), 30.96 (Gln^γ), 30.65 (Val₁^β), 30.56 (Lys^β), 29.86 (Val₂^β), 29.80 (Glu_(1,2)^γ), 28.69 (Pro_(3,4)^β), 28.41 (Pro₂^β), 28.20 (Pro₁^β), 28.08 (Arg^β), 27.75 (Pro₅^β), 27.11 (Glu_(1,2)^β), 27.07 (Gln^β), 26.60 (His^β), 26.13 (Lys^δ), 24.14 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 24.10 (Arg^γ), 22.53, 22.33 (5 x CH₃-Ac), 21.90 (Lys^γ), 19.17 (Thr₁^γ), 18.87 (Val₁^{γa}), 18.58 (Val₁^{γb}), 18.30 (Thr_{STN}^γ), 18.03 (Val₂^{γa}), 17.81 (Val₂^{γb}), 16.58 (Ala_(2,3)^β), 16.57 (Ala₁^β), 16.56 (Ala₄^β).

Werte mit ^{**} sind mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

ESI-MS (positiv): [m/z] = 1273.95 ([M+3H]³⁺, ber.: 1273.97),

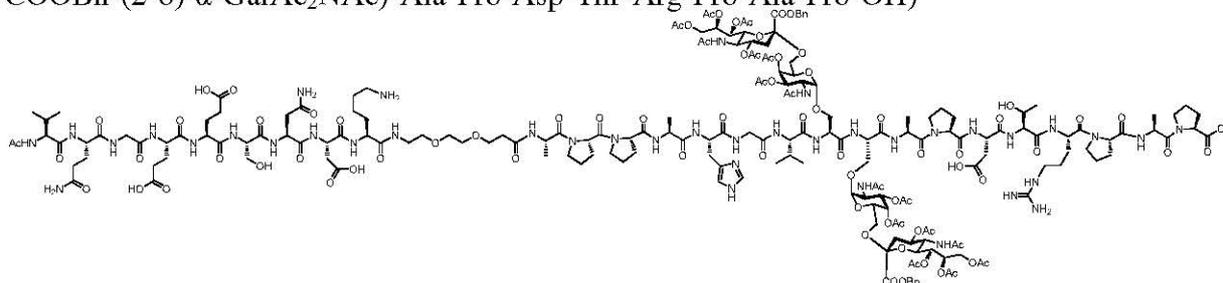
955.58 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 955.44).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1273.2426 ([M+3H]³⁺, ber.: 1273.2436).

C₁₅₇H₂₄₉N₃₉O₇₁ (3818.88)

***N*-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyl-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (170)**

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 135 mg (0.10 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Pro versehenen Polystyrol-Harzes **137** (Beladung: 0.74 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Die Kupplung der beiden glycosylierten Aminosäuren **31** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 186.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OH (**31**), 76.0 mg (0.200 mmol, 2.00 Äquiv.) HATU, 28.5 mg (0.209 mmol, 2.09 Äquiv.) HOAt und 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert. Die Fmoc-Schutzgruppe wird durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Direkt im Anschluss erfolgt die Doppelkupplung mit 186.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OH (**31**), 76.0 mg (0.200 mmol, 2.00 Äquiv.) HATU, 28.5 mg (0.209 mmol, 2.09 Äquiv.) HOAt und 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP. Es wird 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und die Kupplung wiederholt. Nach der Doppelkupplung werden nicht umgesetzte Aminogruppen mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Valin, Glycin, L-Histidin und L-Alanin wird eine Doppelkupplung

durchgeführt. Die restlichen drei Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Anbindung des Diethylenglycolspacers erfolgt in einer Doppelkupplung halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung bestehend aus 120.0 mg (0.300 mmol, 3.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 144.0 mg (0.79 mmol, 3.79 Äquiv.) HATU, 54.0 mg (0.396 mmol, 3.96 Äquiv.) HOAt und 76.0 mg (0.751 mmol, 7.51 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP. Es wird 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand), danach abfiltriert, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und die Kupplung wiederholt. Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Lysin und L-Asparaginsäure wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die restlichen sieben Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Das terminale L-Valin wird durch doppeltes Capping acetyliert. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 502 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 367$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz in einen Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer Lösung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (346 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC.

$R_t = 14.22$ min (Gerät 1, Säule: Luna-1, Gradient: Ana-1), $R_t = 32.63$ min und 33.62 min (Gerät 2, Säule: Luna-2, Gradient: Semipräp-8).

Ausbeute: 21 mg (4.7 μ mol, 9 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -46.1$ ($c = 1.00$, MeOH).

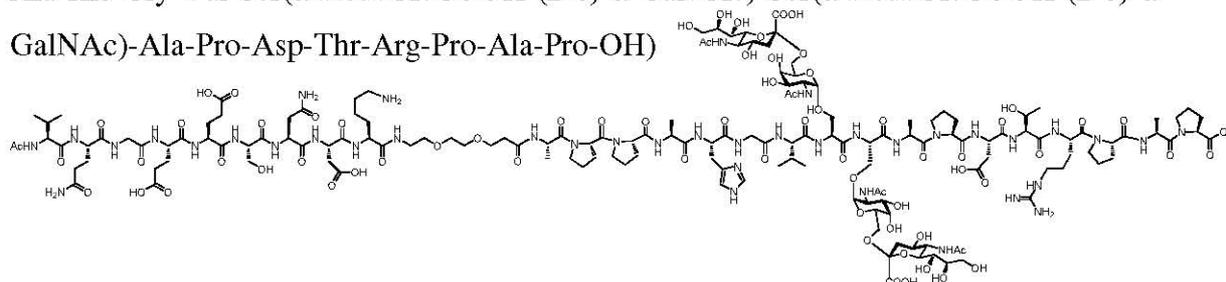
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1497.27$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1497.31).

1123.21 ($[M+4H]^{4+}$, ber.: 1123.24).

$C_{194}H_{283}N_{39}O_{83}$ (4489.53)

N-Acetyl-L-valyl-L-glutaminyl-glycyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-lysin-9-amido-4,7-dioxa-nonanylamido-*N*-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (**178**)

(Ac-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Ser(α -NeuNAcCOOH-(2-6)- α -GalNAc)-Ser(α -NeuNAcCOOH-(2-6)- α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)



21 mg (4.7 μ mol) des glycosylierten Konjugats **170** werden in 15 ml einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung mit einem pH-Wert von 10.5 gelöst und durch Zugabe einer Natriumhydroxid-Stammlösung auf pH 11.0 nachreguliert. Der Reaktionsfortschritt wird über die analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe wässriger Natriumhydroxid-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz bei 11.0 gehalten. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des Peptids (46 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 34.51$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 28.00 - 32.00$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 8 mg (2.1 μ mol, 49 %); farbloses Lyophilisat.

Auf eine weitere Charakterisierung wird aufgrund der geringen Ausbeute verzichtet.

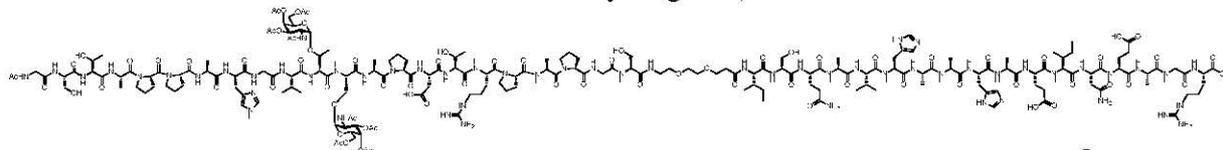
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1269.19$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1269.24).

C₁₅₆H₂₄₇N₃₉O₇₁ (3804.85)

5.10.3.2 Die Synthese von MUC1 Ova_(323–339)-Konjugaten

***N*-Acetyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-L-isoleucyl-L-seryl-L-glutamyl-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-asparaginyll-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (**180**)**

(Ac-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalAc₃NAc)-Ser(α -GalAc₃NAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)



Ausgehend von 313 mg (0.05 mmol der Startamino­säure) des mit Tentagel[®] R PHB-Arg(Pmc) Fmoc versehenen Polystyrol-Harzes **179** (Beladung: 0.16 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Die Anbindung des Diethylglycolspacers erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 120.0 mg (0.300 mmol, 6.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 126.0 mg (0.331 mmol, 6.62 Äquiv.) HATU, 47.0 mg (0.345 mmol, 6.90 Äquiv.) HOAt und 66.0 mg (0.652 mmol, 7.04 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Serin und Glycin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die folgenden acht Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäuren **17** und **14** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung bestehend aus 65.0 mg (0.099 mmol, 1.98 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAc)-OH (**17**), 42.0 mg (0.110 mmol, 2.21 Äquiv.) HATU, 16.0 mg (0.118 mmol, 2.35 Äquiv.) HOAt und 23.0 mg (0.227 mmol, 4.55 Äquiv.) NMM in 1.5 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe

durch Piperidin abgespalten mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Direkt im Anschluss erfolgt die Kupplung der zweiten glycosylierten Aminosäure mit einer Lösung aus 67.0 mg (0.100 mmol, 2.00 Äquiv.) Fmoc-Thr(α -GalAc₃NAc)-OH (**14**), 42.0 mg (0.110 mmol, 2.21 Äquiv.) HATU, 16.0 mg (0.118 mmol, 2.35 Äquiv.) HOAt und 23.0 mg (0.227 mmol, 4.55 Äquiv.) NMM in 1.5 ml NMP, wobei die Lösung 12 h geschüttelt wird (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Für die folgenden Aminosäuren L-Valin und Glycin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die restlichen acht Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Im letzten Teilschritt wird die terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und ein doppeltes Capping ausgeführt. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 603 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 290$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz im Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer Lösung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (286 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 40.57$ min (Gerät 2, Säule: Luna-2, Gradient: Semipräp-9).

Ausbeute: 61 mg (13.1 μ mol, 26 %); farbloses Lyophilisat $[\alpha]_D^{27} = -33.1$ ($c = 1.00$, MeOH).

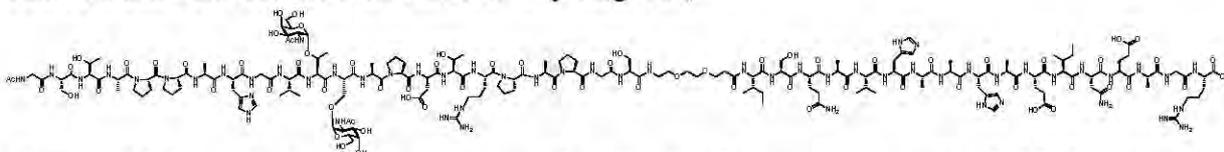
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1549.39$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1549.40).

1162.05 ($[M+4H]^{4+}$, ber.: 1162.05).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1549.0696$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1549.0696).

$C_{196}H_{306}N_{56}O_{75}$ (4646.86)

***N*-Acetyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-L-isoleucyl-L-seryl-L-glutamyl-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-asparaginyll-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (**186**)**
(Ac-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser(α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)



61 mg (13.1 μ mol) des glycosylierten Konjugats **180** werden in 40 ml Methanol unter Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 18 h bei pH 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt über die analytische RP-HPLC verfolgt. Durch Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Der gelbe Rückstand (88 mg) wird durch präparative RP-HPLC gereinigt. $R_t = 26.38$ min und 26.68 min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 34.02 - 36.50$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 36 mg (8.2 μ mol, 62 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -45.2$ ($c = 1.00$, MeOH).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC] (DMSO-*d*₆): $[\delta/ppm] = 8.96$ (s, 3H, 3 x H_{2Ar}-His), 8.34 – 8.25 (m, 2H, NH-Asn {8.31}, NH-Glu₂ {8.30}), 8.25 – 7.92 (m, 26H, NH-Ala₂ {8.22}, NH-Ala₃ {8.20}, NH-Gly₂ {8.19}, NH-Asp {8.18}, NH-His₃ {8.18}, NH-Gly_(3,4) {8.14}, NH-Thr_{TN} {8.14}, NH-Ala₄ {8.13}, NH-Arg₁ {8.12}, NH-His_(1,2) {8.08}, NH-Gly₁ {8.06}, NH-Glu₁ {8.06}, NH-Val₁ {8.06}, NH-Ala₇ {8.02}, NH-Ser_(1,2) {8.02}, NH-Ala₅ {8.01}, NH-Gln {8.01}, NH-Ala₈ {8.00}, NH-Ser_{TN} {8.00}, NH-Ala₉ {7.97}, NH-Ala₆ {7.96}, NH-Arg₂ {7.95}, NH-Ser₃ {7.94}), 7.90 – 7.81 (m, 2H, NH-Spa {7.85}, NH-Ala₁ {7.83}), 7.75 – 7.70 (m, 3H, NH-Ile₂ {7.75}, NH-Val₂ {7.75}, NH-Thr₂ {7.71}), 7.67 (d, 1H, ³ $J_{NH,Ile\alpha} = 9.0$ Hz, NH-Ile₁), 7.62 – 7.57 (m, 2H, NH-Gua_(1,2) {7.59}), 7.39 – 7.34 (m, 4H, 3 x H_{4Ar}-His {7.36}, NH-Thr₁ {7.35}), 7.25 (d, 1H, ³ $J_{NH,H2} = 9.8$ Hz, NH-GalN^{Ser}), 7.10 (d, 1H, ³ $J_{NH,H2} \approx 9.5$ Hz, NH-GalN^{Thr}), 4.73 – 4.37 (m, 18H, H1-GalN^{Thr} {4.70}, H1-GalN^{Ser} {4.60}, His₃ ^{α} {4.57}, Asp ^{α} {4.56}, Ser ^{α} _{TN} {4.55}, His_(1,2) ^{α} {4.54}, Pro₃ ^{α} {4.54},

Arg_1^α {4.53}, Asn^α {4.53}, Pro_2^α {4.51}, $\text{Thr}_{\text{TN}}^\alpha$ {4.50}, Arg_2^α {4.49}, Ala_1^α {4.47}, Ala_7^α {4.45}, $\text{Ala}_{(4,5)}^\alpha$ {4.44}, Ser_1^α {4.37}), 4.36 – 4.13 (m, 19H, Pro_4^α {4.31}, Glu_2^α {4.29}, Ala_8^α {4.26}, Pro_5^α {4.26}, $\text{Ser}_{(2,3)}^\alpha$ {4.25}, Ala_3^α {4.24}, Ala_6^α {4.22}, Gln^α {4.22}, Glu_1^α {4.22}, Val_1^α {4.22}, Ala_2^α {4.21}, Pro_1^α {4.20}, $\text{Ile}_{(1,2)}^\alpha$ {4.19}, Thr_1^α {4.18}, Ala_9^α {4.17}, Thr_2^α {4.16}, $\text{Thr}_{\text{TN}}^\beta$ {4.16}), 4.10 – 3.90 (m, 5H, $\text{H}_2\text{-GalN}^{\text{Ser}}$ {4.08}, Thr_2^β {4.04}, Val_2^α {4.02}, $\text{H}_2\text{-GalN}^{\text{Thr}}$ {3.96}, Thr_1^β {3.92}), 3.81 – 3.41 (m, 42H, Gly_1^{oa} {3.77}, $\text{Gly}_{(3,4)}^{\text{ob}}$ {3.72}, $\text{Ser}_{\text{TN}}^{\beta\text{ab}}$ {3.71}, $\text{Gly}_2^{\text{aab}}$ {3.70}, $\text{H}_4\text{-GalN}^{\text{Ser/Thr}}$ {3.68}, $\text{Pro}_{(1,2,3,4,5)}^\delta$ {3.68 – 3.41}, Gly_1^{ob} {3.67}, $\text{H}_5\text{-GalN}^{\text{Ser/Thr}}$ {3.62}, $\text{Ser}_1^{\beta\text{a}}$ {3.62}, $\text{H}_3\text{-GalN}^{\text{Thr}}$ {3.61}, $\text{Ser}_{(2,3)}^{\beta\text{a}}$ {3.60}, $\text{H}_3\text{-Spa}$ {3.58}, $\text{H}_3\text{-GalN}^{\text{Ser}}$ {3.56}, $\text{Ser}_{(2,3)}^{\beta\text{b}}$ {3.56}, $\text{H}_6\text{-GalN}^{\text{Ser/Thr}}$ {3.53}, $\text{Ser}_1^{\beta\text{b}}$ {3.53}, $\text{H}_5\text{-Spa}$ {3.47}, $\text{H}_6\text{-Spa}$ {3.47}, $\text{H}_6\text{-GalN}^{\text{Ser/Thr}}$ {3.45}), 3.38 (t, 2H, $^3J_{\text{H}_8, \text{H}_9} \approx 6.2$ Hz, $\text{H}_8\text{-Spa}$), 3.23 – 3.16 (m, 2H, $\text{H}_9\text{-Spa}$ {3.20}), 3.13 – 3.03 (m, 7H, $\text{Arg}_{(1,2)}^\delta$ {3.09}, $\text{His}_{(1,2,3)}^{\beta\text{a}}$ {3.09}), 3.01 – 2.91 (m, 3H, $\text{His}_{(1,2,3)}^{\beta\text{b}}$ {2.96}), 2.72 (dd, 1H, $^3J_{\text{Asp}^{\beta\text{a}}, \text{Asp}^\alpha} = 6.4$ Hz, $^2J_{\text{Asp}^{\beta\text{a}}, \text{Asp}^{\beta\text{b}}} = 16.6$ Hz, $\text{Asp}^{\beta\text{a}}$), 2.60 (dd, 1H, $^3J_{\text{Asn}^{\beta\text{a}}, \text{Asn}^\alpha} = 7.7$ Hz, $^2J_{\text{Asn}^{\beta\text{a}}, \text{Asn}^{\beta\text{b}}} = 15.5$ Hz, $\text{Asn}^{\beta\text{a}}$), 2.48 – 2.32 (m, 4H, $\text{H}_2\text{-Spa}$ {2.45}, $\text{Asp}^{\beta\text{b}}$ {2.45}, $\text{Asn}^{\beta\text{a}}$ {2.41}, $\text{H}_2\text{-Spa}$ {2.34}), 2.29 – 2.19 (m, 4H, $\text{Glu}_{(1,2)}^\gamma$ {2.23}), 2.16 – 2.08 (m, 3H, $\text{Pro}_3^{\beta\text{a}}$ {2.12}, Gln^γ {2.11}), 2.07 – 1.64 (m, 40H, $\text{Pro}_2^{\beta\text{a}}$ {2.07}, $\text{Pro}_5^{\beta\text{a}}$ {2.04}, $\text{Pro}_4^{\beta\text{a}}$ {2.03}, $\text{Pro}_1^{\beta\text{a}}$ {1.99}, $\text{Pro}_{(1,2,3,4,5)}^\gamma$ {1.97 – 1.79}, $\text{Glu}_{(1,2)}^{\beta\text{a}}$ {1.93}, Val_1^β {1.93}, Val_2^β {1.91}, $\text{Gln}^{\beta\text{a}}$ {1.90}, 1.88, 1.85 (2 x $\text{CH}_3\text{-Ac}$), $\text{Pro}_5^{\beta\text{b}}$ {1.84}, $\text{Pro}_2^{\beta\text{b}}$ {1.82}, 1.81 ($\text{CH}_3\text{-Ac}$), $\text{Arg}_{(1,2)}^{\beta\text{a}}$ {1.76}, $\text{Pro}_{(3,4)}^{\beta\text{b}}$ {1.76}, $\text{Glu}_{(1,2)}^{\beta\text{b}}$ {1.72}, $\text{Gln}^{\beta\text{b}}$ {1.71}, $\text{Ile}_{(1,2)}^\beta$ {1.68}, $\text{Pro}_1^{\beta\text{b}}$ {1.70}), 1.63 – 1.35 (m, 8H, $\text{Arg}_{(1,2)}^{\beta\text{b}}$ {1.60}, $\text{Arg}_{(1,2)}^\gamma$ {1.46}, $\text{Ile}_{(1,2)}^{\gamma\text{a}}$ {1.39}), 1.27 – 1.11 (m, 30H, Ala_9^β {1.25}, Ala_7^β {1.23}, Ala_8^β {1.22}, $\text{Ala}_{(5,6)}^\beta$ {1.19}, Ala_4^β {1.18}, $\text{Ala}_{(2,3)}^\beta$ {1.17}, Ala_1^β {1.16}, $\text{Thr}_{\text{TN}}^\gamma$ {1.16}), 1.11 – 0.96 (m, 8H, $\text{Ile}_{(1,2)}^{\gamma\text{b}}$ {1.06}, 1.02 {d, 3H, $^3J_{\text{Thr}_1^\gamma, \text{Thr}_2^\beta} = 6.3$ Hz, Thr_2^γ }), 0.99 {d, 3H, $^3J_{\text{Thr}_1^\gamma, \text{Thr}_2^\beta} = 6.2$ Hz, Thr_1^γ }), 0.90 (d, 3H, $^3J_{\text{Val}_1^\gamma, \text{Val}_2^\beta} = 6.9$ Hz, $\text{Val}_1^{\gamma\text{a}}$), 0.87 – 0.74 (m, 21H, $\text{Val}_1^{\gamma\text{b}}$ {0.84}, $\text{Ile}_2^{\gamma\text{Me}}$ {0.83}, $\text{Val}_2^{\gamma\text{ab}}$ {0.80}, $\text{Ile}_{(1,2)}^\delta$ {0.79}, $\text{Ile}_1^{\gamma\text{Me}}$ {0.79}).

100.7 MHz- ^{13}C -NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO- d_6): [δ/ppm] = 174.34, 173.97, 172.62, 172.53, 172.46, 172.44, 172.43, 172.37, 172.35, 172.07, 171.98, 171.73, 171.44, 171.18, 171.11, 170.88, 170.87, 170.86, 170.78, 170.75, 170.71, 170.57, 170.55, 170.48, 170.22, 170.04, 170.01, 170.00, 169.97, 169.79, 169.73, 169.71, 169.67, 169.49, 169.32, 168.82, 168.74, 168.72, 168.64 (C=O), 156.74 (C=N-Guan), 133.76 (3 x C2-Imidazol), 129.04 (3 x C5-Imidazol), 117.06 (3 x C4-Imidazol), 99.14 (C1-GalN^{Thr}), 98.18 (C1-GalN^{Ser}), 75.09 (Thr_{TN}^β), 71.53 (C5-GalN^{Ser/Thr}), 69.10 (C5-Spa, C6-Spa), 69.02 (C3-GalN^{Thr}), 68.58 (C8-Spa), 68.51 (C3-GalN^{Ser}), 68.47 (C4-GalN^{Ser/Thr}), 67.20 (Ser_{TN}^β), 66.49 (C3-Spa), 66.31 (Thr₁^β), 65.88 (Thr₂^β), 61.24 (C6-GalN^{Ser/Thr}), 61.23 (Ser_(1,2,3)^β), 59.29 (Pro₅^α), 58.81 (Pro₂^α),

58.80 (Pro₄^α), 58.06 (Val₂^α), 57.99 (Thr₂^α), 57.68 (Thr₁^α), 57.27 (Val₁^α), 57.22 (Pro₃^α), 56.46 (Pro₁^α), 55.29 (Thr_{TN}^α), 54.81 (Ser_(2,3)^α), 54.45 (Ser₁^α), 51.42 (Glu₂^α), 51.40 (Gln^α, Glu₁^α, Ile_(1,2)^α), 51.09 (His_(1,2,3)^α), 50.95 (Ser_{TN}^α), 49.79 (Arg₂^α), 49.56 (Asn^α), 49.52 (C2-GalN^{Thr}), 49.37 (C2-GalN^{Ser}), 49.22 (Arg₁^α), 49.07 (Asp^α), 48.62 (Ala₈^α), 48.02 (Ala₂^α), 47.97 (Ala₃^α), 47.95 (Ala₉^α), 47.91 (Ala₆^α), 46.34 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 45.96 (Ala₁^α), 45.93 (Ala₇^α), 45.85 (Ala_(4,5)^α), 41.68 (Gly_(1,2,3,4)^α), 40.03 (Arg_(1,2)^δ), 38.22 (C9-Spa), 36.59 (Asn^β), 36.47 (Ile_(1,2)^β), 35.49 (C2-Spa), 35.48 (Asp^β), 30.97 (Gln^γ), 29.99 (Val₂^β), 29.91 (Val₁^β), 29.75 (Glu_(1,2)^γ), 28.93 (Pro₂^β), 28.78 (Pro₅^β), 28.69 (Pro₄^β), 28.54 (Pro₁^β), 27.66 (Arg_(1,2)^β), 27.27 (Pro₃^β), 27.12 (Gln^β, Glu_(1,2)^β), 26.76 (His_(1,2,3)^β), 24.67 (Arg_(1,2)^γ), 24.10 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 23.92 (Ile_(1,2)^γ), 23.41, 22.35 (3 x CH₃-Ac), 19.53 (Thr₂^γ), 19.22 (Thr₁^γ), 19.38 (Thr_{TN}^γ), 18.85 (Val₁^{γa}), 18.24 (Val₂^{γab}), 17.94 (Val₁^{γb}), 17.41 (Ala_(7,8,9)^β), 17.36 (Ala_(1,2,3,4,5,6)^β), 14.95 (Ile_{CH₃,2}^γ), 14.88 (Ile_{CH₃,1}^γ), 10.67 (Ile_(1,2)^δ).

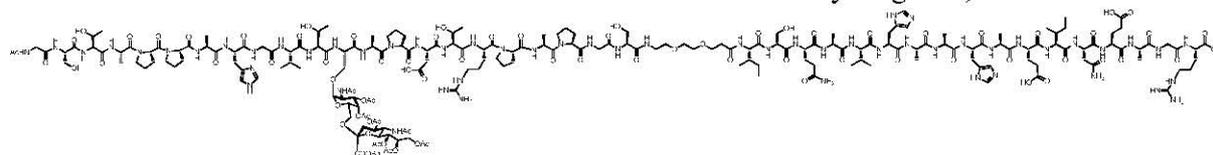
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1465.72$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1465.71).

1099.65 ($[M+4H]^{4+}$, ber.: 1099.54).

C₁₈₄H₂₉₄N₅₆O₆₉ (4394.64)

***N*-Acetyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-L-isoleucyl-L-seryl-L-glutamyl-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-asparagyl-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (182)**

(Ac-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)



Ausgehend von 125 mg (0.1 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Arg(Pmc) versehenen Polystyrol-Harzes **181** (Beladung: 0.8 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Die Anbindung des Diethylenglycolspacers erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung bestehend aus 160.0 mg (0.400 mmol, 4.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**),

167.0 mg (0.439 mmol, 4.39 Äquiv.) HATU, 62.0 mg (0.456 mmol, 4.56 Äquiv.) HOAt und 89.0 mg (0.880 mmol, 8.80 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP. Anschließend wird die Lösung 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Serin und Glycin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die folgenden acht Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure **31** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 186.0 mg (0.160 mmol, 1.60 Äquiv.) Fmoc-Ser(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OH (**31**), 67.0 mg (0.176 mmol, 1.76 Äquiv.) HATU, 25.0 mg (0.184 mmol, 1.84 Äquiv.) HOAt und 36.0 mg (0.356 mmol, 3.56 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Nicht umgesetzte Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe wird durch Piperidin abgespalten, mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Valin und Glycin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die restlichen acht Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Im letzten Teilschritt wird die terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Ein doppeltes Capping schließt die Peptidsynthese ab. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 519 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 394$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz im Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (360 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 55.80$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 91 mg (19 μ mol, 19 %); farbloses Lyophilisat $[\alpha]_D^{26} = -44.4$ ($c = 1.00$, MeOH).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1609.29$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1609.43).

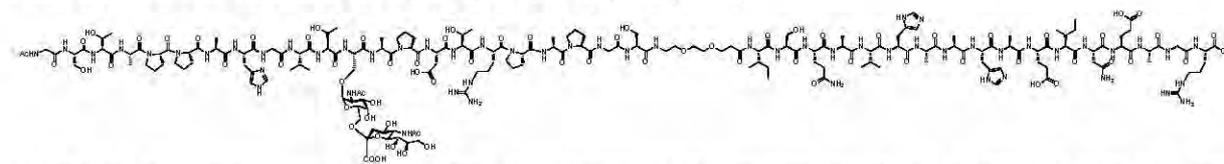
1207.34 ($[M+4H]^{4+}$, ber.: 1207.07).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1608.4174$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1608.4239).

$C_{206}H_{316}N_{56}O_{78}$ (4825.04)

***N*-Acetyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-L-isoleucyl-L-seryl-L-glutaminyl-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-asparaginyll-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (187)**

(Ac-Val-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α -NeuNAcCOOH-(2-6)- α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)



40 mg (8.3 μ mol) des glycosylierten Konjugats **182** werden in 30 ml Methanol mit 0.5 ml Essigsäure und 40 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle versetzt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird 48 h bei Raumtemp. unter 1 bar Wasserstoffatmosphäre gerührt. Danach wird die Wasserstoffatmosphäre gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über eine Kartusche mit C18-Säulenmaterial filtriert. Die kleine Säule wird mehrmals mit reinem Methanol gespült und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (34 mg) wird einige Male mit Toluol kodestilliert und ohne Reinigung der nachfolgenden Reaktion unterworfen.

C₁₉₉H₃₁₀N₅₆O₇₈ (4734.92)

Das rohe Peptid wird in 15 ml Methanol gelöst und unter Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natrium-methanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 30 h bei pH 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt über die analytische RP-HPLC verfolgt. Durch weitere Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des rohen Peptids (76 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. R_t = 26.52 min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), R_t = 35.53 min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 26 mg (5.7 μ mol, 67 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -49.4$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): $[\delta/\text{ppm}] = 8.97$ (s, 3H, 3 x H_{2A1}-His), 8.37 – 8.30 (m, 2H, NH-Asn {8.34}, NH-Glu₂ {8.32}), 8.28 – 8.14 (m, 9H, NH-Ala₇ {8.25}, NH-Ala₃ {8.24}, NH-Gly₁ {8.24}, NH-Asp {8.21}, NH-Gly₄ {8.21},

NH-His₃ {8.21}, NH-Ala₈ {8.19}, NH-Gly₃ {8.18}, NH-Ala₆ {8.16}), 8.13 – 7.92 (m, 16H, NH-His_(1,2) {8.12}, NH-Glu₁ {8.10}, NH-Arg₁ {8.09}, NH-Ala_(2,9) {8.08}, NH-Gly₂ {8.08}, NH-Val₁ {8.05}, NH-Ser_(1,2) {8.02}, NH-Gln {8.01}, NH-Ser₃ {8.01}, NH-Ala₅ {8.00}, NH-Arg₂ {8.00}, NH-Ser_{STN} {8.00}, NH-Thr₃ {7.95}), 7.90 (t, 1H, $^3J_{\text{NH,H9}} = 4.8$ Hz, NH-Spa), 7.85 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Ala}\alpha} = 6.9$ Hz, NH-Ala₁), 7.79 – 7.72 (m, 4H, NH-Ile₂ {7.76}, NH-Sia {7.76}, NH-Val₂ {7.75}, NH-Thr₂ {7.74}), 7.70 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,Ile}\alpha} = 8.4$ Hz, NH-Ile₁), 7.61 – 7.48 (m, 3H, NH-Gua₁ {7.61}, NH-Ala₄ {7.53}, NH-Gua₂ {7.52}), 7.40 – 7.29 (m, 4H, 3 x H_{4Ar}-His {7.38}, NH-Thr₁ {7.35}), 7.28 (d, 1H, $^3J_{\text{NH,H2}} \approx 9.0$ Hz, NH-GalN), 4.65 – 4.08 (m, 35H, H1-GalN {4.63}, His_(1,2,3)^α {4.57}, Asp^α {4.56}, Arg₁^α {4.53}, Asn^α {4.53}, Pro₃^α {4.53}, Ala₇^α {4.51}, Ala₁^α {4.49}, Arg₂^α {4.48}, Ser_{STN}^α {4.48}, Ala₅^α {4.47}, Ala₆^α {4.45}, Ser_(1,2)^α {4.39}, Thr₃^α {4.38}, Val₁^α {4.33}, Pro₄^α {4.31}, Glu₂^α {4.30}, Pro₂^α {4.29}, Ala₈^α {4.27}, Pro₅^α {4.27}, Ser₃^α {4.27}, Ala₃^α {4.22}, Gln^α {4.22}, Pro₁^α {4.22}, Glu₁^α {4.20}, Ile_(1,2)^α {4.20}, Thr₁^α {4.19}, Ala₄^α {4.18}, Thr₂^α {4.18}, Ala₉^α {4.17}, Ala₂^α {4.14}), 4.08 – 3.84 (m, 6H, H2-GalN {4.06}, Thr₂^β {4.04}, Val₂^α {4.04}, Thr₃^β {3.97}, Thr₁^β {3.94}, Gly₁^{αα} {3.90}), 3.81 – 3.41 (m, 40H, Gly_(2,3)^{αα} {3.77}, Gly₁^{ob} {3.74}, H6_a-GalN {3.72}, Gly₄^{αab} {3.72}, Ser_{TN}^{βab} {3.71}, H5-GalN {3.68}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.68 – 3.42}, H4-GalN {3.67}, Gly_(2,3)^{ob} {3.67}, H9_a-Sia {3.66}, H8-Sia {3.65}, Ser_(1,2,3)^{βa} {3.60}, H3-Spa {3.58}, H3-GalN {3.57}, H4-Sia {3.57}, H5-Sia {3.52}, Ser_(1,2,3)^{βb} {3.52}, H6_b-GalN {3.49}, H5-Spa {3.47}, H6-Spa {3.47}), 3.41 – 3.29 (m, 5H, H9_b-Sia {3.41}, H8-Spa {3.37, t, 2H, $^3J_{\text{H8,H9}} \approx 6.3$ Hz}, H6-Sia {3.36}, H7-Sia {3.34}), 3.22 – 3.17 (m, 2H, H9-Spa {3.19}), 3.15 – 3.03 (m, 7H, Arg_(1,2)^δ {3.09}, His_(1,2,3)^{βa} {3.08}), 3.01 – 2.91 (m, 3H, His_(1,2,3)^{βb} {2.96}), 2.72 (dd, 1H, $^3J_{\text{Asp}\beta\text{a,Asp}\alpha} = 6.7$ Hz, $^2J_{\text{Asp}\beta\text{a,Asp}\beta\text{b}} = 17.0$ Hz, Asp^{βa}), 2.63 – 2.54 (m, 2H, Asn^{βa} {2.60}, H3_{aq}-Sia {2.58}), 2.48 – 2.32 (m, 4H, H2_a-Spa {2.46}, Asp^{βb} {2.45}, Asn^{βa} {2.42}, H2_b-Spa {2.36}), 2.31 – 2.17 (m, 4H, Glu_(1,2)^γ {2.24}), 2.16 – 2.07 (m, 3H, Pro₃^{βa} {2.13}, Gln^γ {2.11}), 2.07 – 1.62 (m, 40H, Pro₅^{βa} {2.03}, Pro₄^{βa} {2.01}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.00 – 1.79}, Val₁^β {1.99}, Pro₂^{βa} {1.98}, Glu_(1,2)^{βa} {1.92}, Pro₁^{βa} {1.91}, Val₂^β {1.90}, Gln^{βa} {1.89}, 1.85 (2 x CH₃-Ac), Pro₄^{βb} {1.83}, 1.81 (CH₃-Ac), Arg₁^{βa} {1.74}, Gln^{βb} {1.73}, Pro₃^{βb} {1.72}, Pro_(2,5)^{βb} {1.71}, Glu_(1,2)^{βb} {1.70}, Arg₂^{βa} {1.69}, Ile₂^β {1.68}, Pro₁^{βb} {1.68}, Ile₁^β {1.65}), 1.62 – 1.35 (m, 9H, Arg₁^{βb} {1.59}, Arg₂^γ {1.53}, Arg₂^{βb} {1.52}, H3_{ax}-Sia {1.51}, Arg₁^γ {1.46}, Ile₂^{γa} {1.40}, Ile₁^{γa} {1.38}), 1.29 – 1.11 (m, 27H, Ala₉^β {1.24}, Ala₈^β {1.21}, Ala_(3,5,6,7)^β {1.18}, Ala₂^β {1.17}, Ala₄^β {1.16}, Ala₁^β {1.15}), 1.11 – 0.94 (m, 11H, Ile₂^{γb} {1.08}, Thr₃^γ {1.04}, Ile₁^{γb} {1.03}, Thr₂^γ {1.02}, 0.99 {d, 3H, $^3J_{\text{Thr}\gamma,\text{Thr}\beta} = 6.2$ Hz, Thr₁^γ}), 0.89 – 0.74 (m, 24H, Val₁^{γa} {0.85}, Ile₂^{γMe} {0.82}, Val₁^{γb} {0.81}, Val₂^{γab} {0.81}, Ile_(1,2)^δ {0.79}, Ile₁^{γMe} {0.78}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-d₆): [δ/ppm] = 174.15, 174.13, 173.98, 173.35, 172.75, 172.47, 172.27, 172.15, 171.92, 171.79, 171.70, 171.40, 171.09, 170.97, 170.74, 170.69, 170.25, 169.92, 169.86, 169.81, 169.69, 169.46, 169.42, 169.38, 169.26, 169.19, 168.81 (C=O), 156.65 (C=N-Guan), 133.76 (3 x C2-Imidazol), 128.99 (3 x C5-Imidazol), 117.04 (3 x C4-Imidazol), 98.13 (C2-Sia), 97.07 (C1-GalN), 73.29 (C6-Sia), 71.07 (C8-Sia), 69.37 (C5-Spa, C6-Spa), 68.76 (C8-Spa), 68.66 (C5-GalN), 68.11 (C7-Sia), 67.70 (C4-Sia), 67.48 (C3-GalN), 67.47 (C4-GalN), 66.71 (Thr₁^β), 66.70 (C3-Spa), 66.63 (Thr₃^β), 66.62 (Ser_{TN}^β), 66.10 (Thr₂^β), 62.56 (C9-Sia), 62.12 (C6-GalN), 61.49 (Ser_(1,2,3)^β), 59.48 (Pro₅^α), 58.97 (Pro₄^α), 58.88 (Pro₂^α), 57.93 (Thr₂^α), 57.70 (Thr₃^α), 57.70 (Val₁^α), 57.60 (Thr₁^α), 57.40 (Pro₃^α), 56.80 (Val₂^α), 56.53 (Pro₁^α), 55.08 (Ser₃^α), 54.65 (Ser_(1,2)^α), 52.22 (Gln^α), 51.98 (Ile_(1,2)^α), 51.92 (Ser_{TN}^α), 51.90 (C5-Sia), 51.84 (Glu₂^α), 51.54 (Glu₁^α), 51.09 (His_(1,2,3)^α), 49.79 (Arg₂^α), 49.42 (Asn^α), 49.41 (Arg₁^α), 49.17 (Asp^α), 48.41 (Ala₉^α), 48.41 (C2-GalN), 48.30 (Ala₂^α), 48.29 (Ala₃^α), 48.21 (Ala₈^α), 46.50 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.33 (Ala₁^α), 46.22 (Ala₇^α), 46.17 (Ala_(4,5)^α), 46.12 (Ala₆^α), 41.89 (Gly_(2,3,4)^α), 41.77 (Gly₁^α), 40.36 (C3-Sia), 40.19 (Arg_(1,2)^δ), 38.51 (C9-Spa), 36.88 (Asn^β), 36.81 (Ile_(1,2)^β), 35.66 (C2-Spa), 35.52 (Asp^β), 31.25 (Gln^γ), 30.60 (Val₁^β), 30.20 (Val₂^β), 29.96 (Glu_(1,2)^γ), 28.97 (Pro₅^β), 28.87 (Pro₄^β), 28.15 (Arg₂^β), 28.11 (Arg₁^β), 27.70 (Gln^β), 27.57 (Pro₃^β), 27.37 (Pro₁^β), 27.24 (Glu_(1,2)^β), 27.06 (Pro₂^β), 26.93 (His_(1,2,3)^β), 24.86 (Arg_(1,2)^γ), 24.35 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 24.15 (Ile₂^γ), 23.96 (Ile₁^γ), 22.56, 22.36 (3 x CH₃-Ac), 19.68 (Thr₂^γ), 19.42 (Thr₁^γ), 19.22 (Thr₃^γ), 19.13 (Val₁^{γa}), 18.03 (Val₁^{γb}), 18.03 (Val₂^{γab}), 17.77 (Ala₈^β), 17.53 (Ala₉^β), 17.51 (Ala_(2,3,6,7)^β), 16.85 (Ala_(1,4)^β), 16.79 (Ala₅^β), 15.23 (Ile_{CH₃,2}^γ), 15.03 (Ile_{CH₃,1}^γ), 10.91 (Ile_(1,2)^δ).

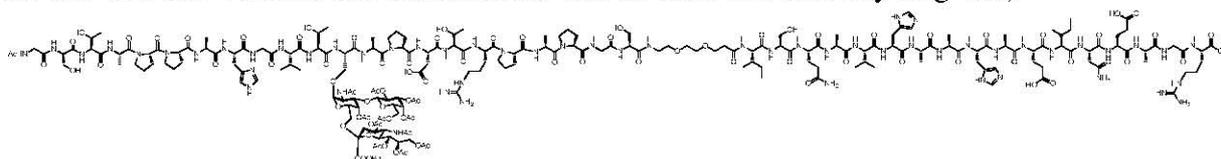
ESI-MS (positiv): [m/z] = 1495.08 ([M+3H]³⁺, ber.: 1495.06).

1121.25 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1121.29).

C₁₈₇H₂₉₈N₅₆O₇₂ (4482.70)

***N*-Acetyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-L-isoleucyl-L-seryl-L-glutaminyll-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-asparaginyll-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (183)**

(Ac-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser[α -3-(β -Ac₄Gal)-(α -Ac₄NeuNAc-COOBn-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂-CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)



Ausgehend von 125 mg (0.1 mmol der Startaminosäure) des mit 2-CT-Arg(Pmc) versehenen Polystyrol-Harzes **181** (Beladung: 0.80 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut, wobei für die erste Aminosäure Glycin eine Doppelkupplung erfolgt. Die Anbindung des Diethylenglycolspacers erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers mit einer Lösung bestehend aus 160.0 mg (0.400 mmol, 4.00 Äquiv.) FmocNH-Dispa-CO₂H (**63**), 167.0 mg (0.439 mmol, 4.39 Äquiv.) HATU, 62.0 mg (0.456 mmol, 4.56 Äquiv.) HOAt sowie 89.0 mg (0.880 mmol, 8.80 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP, die 16 h geschüttelt wird (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Im letzten Teilschritt wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten, mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die darauf folgenden zwei Aminosäuren L-Serin und Glycin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die weiteren acht Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure **49** erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung bestehend aus 292.0 mg (0.200 mmol, 2.00 Äquiv.) Fmoc-Ser[α -3-(β -Ac₄Gal)-(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6))- α -GalNAc]-OH (**49**), 95.0 mg (0.25 mmol, 2.5 Äquiv.) HATU, 35.0 mg (0.26 mmol, 2.60 Äquiv.) HOAt, 51.0 mg (0.51 mmol, 5.10 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Nicht umgesetzte Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert, die Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin abgespalten, mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die darauf folgenden Aminosäuren L-Valin und Glycin wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Die restlichen acht Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Im letzten Teilschritt wird vom terminalen Glycin die

Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und ein doppeltes Capping durchgeführt. Das polymergebundene Peptid wird in eine 6 ml Spritze mit Spritzenfilter überführt und i. Hochvak. getrocknet. Es werden 428 mg eines Peptidpolymer-Adduktes ($\Delta = 303$ mg Rohpeptid) erhalten. Zur Abspaltung des Peptids wird das Harz im Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) 1 h in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (297 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC.

$R_t = 34.92$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 52.69$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-4).

Ausbeute: 97 mg (18.9 μmol , 19 %); farbloses Lyophilisat $[\alpha]_D^{24} = -33.4$ ($c = 1.00$, MeOH).

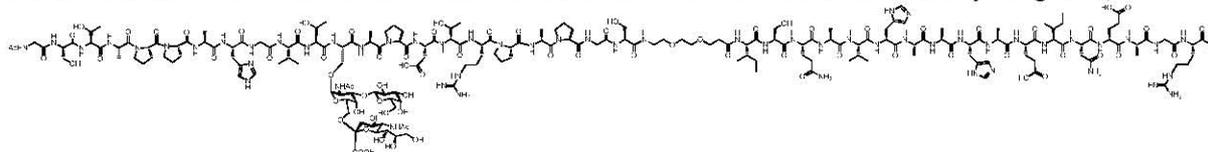
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1707.48$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1707.46).

1280.73 ($[M+4H]^{4+}$, ber.: 1280.60).

$\text{C}_{221}\text{H}_{334}\text{N}_{56}\text{O}_{84}$ (5119.34)

***N*-Acetyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-L-isoleucyl-L-seryl-L-glutaminyl-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-asparaginyll-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (188)**

(Ac-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser[α -3-(β -Gal)-(α -NeuNAcCOOH-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-HN-($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_2$ (CH_2) $_2$ -CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH])



69 mg (13.5 μmol) des glycosylierten Konjugats **183** werden in 50 ml Methanol gelöst und mit 0.5 ml Essigsäure und 70 mg Palladium (10 %) auf Aktivkohle versetzt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird 72 h bei Raumtemp. unter 1 bar Wasserstoffatmosphäre gerührt. Danach wird die Wasserstoffatmosphäre gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über einer Kartusche mit C18-Säulenmaterial filtriert. Die kleine Säule wird mehrmals mit reinem

Methanol gespült und das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand (58 mg) wird einige Male mit Toluol kodestilliert und ohne Reinigung der nachfolgenden Reaktion unterworfen.

$C_{207}H_{322}N_{56}O_{84}$ (4939.10)

Das rohe Peptid wird anschließend in 25 ml Methanol gelöst und unter kontinuierlicher Kontrolle des pH-Wertes mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt. Die Lösung wird 36 h bei einem pH-Wert von 10.0 gerührt und der Reaktionsfortschritt über die analytische RP-HPLC verfolgt. Durch weitere Zugabe methanolischer Natriummethanolat-Lösung wird der pH-Wert bis zum vollständigen Umsatz nachreguliert. Anschließend neutralisiert man die Reaktionsmischung durch Zugabe konz. Essigsäure, entfernt Essigsäure und die Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit 50 ml Toluol. Die Reinigung des rohen Peptids (89 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 27.43$ min (Gerät 3, Säule: A-1, Gradient: A-1), $R_t = 36.27$ min (Gerät 3, Säule: SP-1, Gradient: SP-1).

Ausbeute: 28 mg (6.1 μ mol, 45 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -48.4$ ($c = 1.00$, MeOH).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (DMSO-*d*₆): [δ/ppm] = 8.96 (s, 3H, 3 x H_{2Ar}-His), 8.38 – 8.29 (m, 2H, NH-Asn {8.34}, NH-Glu₂ {8.31}), 8.29 – 7.96 (m, 26H, NH-Gly₁ {8.26}, NH-Ala₇ {8.24}, NH-His₃ {8.21}, NH-Ala_(3,5,8) {8.19}, NH-Gly₄ {8.18}, NH-Ala₆ {8.16}, NH-Ser_{ST} {8.16}, NH-Thr₃ {8.16}, NH-Asp {8.11}, NH-His_(1,2) {8.11}, NH-Glu₁ {8.10}, NH-Ala₂ {8.09}, NH-Gly_(2,3) {8.09}, NH-Ala₉ {8.07}, NH-Ser₃ {8.04}, NH-Val₁ {8.04}, NH-Gln {8.02}, NH-Ser_(1,2) {8.01}, NH-Ala₄ {8.00}, NH-Arg_(1,2) {7.99}), 7.95 – 7.88 (m, 1H, NH-Spa {7.90}), 7.85 (d, 1H, ³J_{NH,Ala α} = 7.0 Hz, NH-Ala₁), 7.83 – 7.73 (m, 4H, NH-Sia {7.77}, NH-Ile₂ {7.76}, NH-Thr₂ {7.76}, NH-Val₂ {7.76}), 7.70 (d, 1H, ³J_{NH,Ile α} = 8.4 Hz, NH-Ile₁), 7.61 – 7.49 (m, 2H, NH-Gua₁ {7.56}, NH-Gua₂ {7.52}), 7.42 – 7.30 (m, 4H, 3 x H_{4Ar}-His {7.37}, NH-Thr₁ {7.33}), 7.26 (d, 1H, ³J_{NH,H2} \approx 8.9 Hz, NH-GalN), 4.65 – 4.10 (m, 37H, H1-GalN {4.62}, His_(1,2,3) ^{α} {4.58}, Asp ^{α} {4.54}, Arg₁ ^{α} {4.53}, Asn ^{α} {4.53}, Pro₃ ^{α} {4.53}, Arg₂ ^{α} {4.49}, Ala₁ ^{α} {4.48}, Ala₆ ^{α} {4.44}, Ser_{ST} ^{α} {4.44}, Thr₃ ^{α} {4.44}, Ser₁ ^{α} {4.39}, Ser₂ ^{α} {4.38}, Pro₄ ^{α} {4.32}, Glu₂ ^{α} {4.30}, Pro₂ ^{α} {4.29}, Ser₃ ^{α} {4.29}, Val₁ ^{α} {4.29}, Ala_(5,8) ^{α} {4.27}, Ala₃ ^{α} {4.26}, Pro_(1,5) ^{α} {4.26}, Ala_(4,7) ^{α} {4.24}, H1-Gal' {4.24}, Gln ^{α} {4.23}, Ile₂ ^{α} {4.21}, Glu₁ ^{α} {4.20}, Ile₁ ^{α} {4.20}, Thr₁ ^{α} {4.19}, Ala₉ ^{α} {4.18}, H2-GalN {4.18}, Thr₂ ^{α} {4.17}, Ala₂ ^{α} {4.15}), 4.08 – 3.86 (m, 5H, Thr₂ ^{β} {4.05}, Val₂ ^{α} {4.04}, Thr₃ ^{β} {3.98}, Thr₁ ^{β} {3.92}, Gly₁ ^{$\alpha\alpha$} {3.89}), 3.82 – 3.42 (m, 43H, Gly_(2,3) ^{$\alpha\alpha$} {3.75}, Gly₁ ^{$\alpha\beta$} {3.72}, Gly₄ ^{$\alpha\beta$} {3.72}, H5-GalN {3.70}, H6_a-GalN {3.69}, Gly_(2,3) ^{$\alpha\beta$} {3.68}, H3-GalN {3.66}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{δ} {3.66 – 3.44}, H4-GalN {3.63}, Ser₂ ^{$\beta\alpha$} {3.63}, H8-Sia {3.62}, H4-Gal' {3.60}, Ser₁ ^{$\beta\alpha$} {3.60}, H9_a-Sia {3.60}, Ser₃ ^{$\beta\alpha$} {3.59}, H4-Sia {3.58}, Ser_{ST} ^{$\beta\alpha\beta$} {3.57}, H3-Spa {3.57}, Ser₃ ^{$\beta\beta$} {3.56},

Ser₁^{βb} {3.54}, H6_a-Gal' {3.52}, Ser₂^{βb} {3.52}, H5-Sia {3.52}, H5-Spa {3.47}, H6-Spa {3.47}, H6_b-Gal' {3.46}, H6_b-GalN {3.45}), 3.41 – 3.29 (m, 7H, H9_b-Sia {3.40}, H8-Spa {3.37}, H6-Sia {3.34}, H2-Gal' {3.33}, H5-Gal' {3.33}, H7-Sia {3.32}), 3.26 (m_c, 1H, H3-Gal'), 3.23 – 3.16 (m, 2H, H9-Spa {3.20}), 3.15 – 3.02 (m, 7H, Arg_(1,2)^δ {3.08}, His_(1,2,3)^{βa} {3.08}), 3.00 – 2.91 (m, 3H, His_(1,2,3)^{βb} {2.96}), 2.74 (dd, 1H, ³J_{Aspβa,Aspα} = 5.6 Hz, ²J_{Aspβa,Aspβb} = 17.2 Hz, Asp^{βa}), 2.65 – 2.55 (m, 2H, Asn^{βa} {2.60}, H3_{aq}-Sia {2.58}), 2.50 – 2.31 (m, 4H, H2_a-Spa {2.47}, Asp^{βb} {2.45}, Asn^{βa} {2.42}, H2_b-Spa {2.36}), 2.30 – 2.17 (m, 4H, Glu_(1,2)^γ {2.24}), 2.17 – 2.08 (m, 3H, Pro₃^{βa} {2.13}, Gln^γ {2.11}), 2.07 – 1.64 (m, 40H, Pro_(1,5)^{βa} {2.04}, Pro₄^{βa} {2.02}, Val₁^β {2.01}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.00 – 1.75}, Pro₂^{βa} {1.98}, Val₂^β {1.91}, Gln^{βa} {1.90}, Glu_(1,2)^{βa} {1.90}, 1.85 (2 x CH₃-Ac), Pro_(1,5)^{βb} {1.83}, 1.82 (CH₃-Ac), Arg₁^{βa} {1.75}, Gln^{βb} {1.74}, Pro₃^{βb} {1.74}, Pro₄^{βb} {1.73}, Glu_(1,2)^{βb} {1.71}, Pro₂^{βb} {1.71}, Arg₂^{βa} {1.69}, Ile₂^β {1.69}, Ile₁^β {1.68}), 1.62 – 1.35 (m, 9H, Arg₁^{βb} {1.59}, H3_{ax}-Sia {1.57}, Arg₂^{βb} {1.48}, Arg_(1,2)^γ {1.47}, Ile_(1,2)^{γa} {1.39}), 1.29 – 1.11 (m, 27H, Ala₉^β {1.24, d, 3H, ³J_{Alaβ,Alaα} = 7.3 Hz}, Ala₈^β {1.22, d, 3H, ³J_{Alaβ,Alaα} = 7.3 Hz}, Ala₅^β {1.19}, Ala_(4,6,7)^β {1.18}, Ala_(2,3)^β {1.17}, Ala₁^β {1.15}), 1.11 – 0.93 (m, 11H, Ile₂^{γb} {1.08}, Thr₃^γ {1.06}, Ile₁^{γb} {1.05}, Thr₂^γ {1.02, d, 3H, ³J_{Thrγ,Thrβ} = 5.6 Hz}, 0.98 {Thr₁^γ}), 0.90 – 0.74 (m, 24H, Val₁^{γa} {0.86}, Ile₂^{γMe} {0.82}, Val₁^{γb} {0.82}, Val₂^{γab} {0.80}, Ile₁^{γMe} {0.79}, Ile_(1,2)^δ {0.79}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (DMSO-d₆): [δ/ppm] = 174.17, 174.15, 174.00, 173.36, 172.78, 172.55, 172.46, 172.29, 172.17, 171.82, 171.42, 171.17, 171.13, 171.11, 171.00, 170.98, 170.77, 170.71, 170.43, 170.26, 170.15, 170.01, 169.94, 169.89, 169.85, 169.53, 169.48, 169.40, 169.21, 168.89, 168.83 (C=O), 156.72, 156.70 (C=N-Guan), 133.36 (3 x C2-Imidazol), 129.02 (3 x C5-Imidazol), 116.77 (3 x C4-Imidazol), 104.48 (C1-Gal'), 98.41 (C2-Sia), 97.76 (C1-GalN), 76.75 (C3-GalN), 75.87 (C5-Gal'), 73.43 (C6-Sia), 72.78 (C3-Gal'), 71.17 (C8-Sia), 70.45 (C2-Gal'), 69.51 (C5-GalN), 69.43 (C5-Spa, C6-Spa), 68.84 (C8-Spa), 68.18 (C7-Sia), 67.73 (C4-GalN), 67.58 (C4-Gal'), 66.81 (C3-Spa), 66.81 (Ser_{ST}^β), 66.76 (Thr₁^β), 66.72 (C4-Sia), 66.71 (Thr₃^β), 66.26 (Thr₂^β), 62.88 (C6-GalN), 62.48 (C9-Sia), 61.55 (Ser_(1,2,3)^β), 60.28 (C6-Gal'), 59.60 (Pro₅^α), 59.03 (Pro₄^α), 58.96 (Pro₂^α), 58.07 (Val₂^α), 58.05 (Thr₂^α), 57.67 (Val₁^α), 57.59 (Thr₁^α), 57.49 (Pro₃^α), 57.44 (Thr₃^α), 56.63 (Pro₁^α), 55.14 (Ser₃^α), 54.76 (Ser_(1,2)^α), 52.29 (Gln^α), 52.07 (Ser_{ST}^α), 51.84 (Glu₂^α), 51.83 (C5-Sia), 51.62 (Ile_(1,2)^α), 51.62 (Glu₁^α), 51.30 (His_(1,2,3)^α), 49.83 (Arg₂^α), 49.55 (Asn^α), 49.43 (Arg₁^α), 48.39 (Ala₉^α), 49.38 (Asp^α), 48.36 (Ala₂^α), 48.27 (Ala₇^α), 48.19 (Ala_(3,5,8)^α), 47.75 (C2-GalN), 46.52 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 46.21 (Ala₁^α), 46.18 (Ala_(4,6)^α), 41.93 (Gly_(2,3,4)^α), 41.79 (Gly₁^α), 40.31 (C3-Sia), 40.27 (Arg_(1,2)^δ), 38.58 (C9-Spa), 36.91 (Ile₂^β), 36.89 (Asn^β), 36.73 (Ile₁^β), 35.75 (C2-Spa), 35.72 (Asp^β), 31.36 (Gln^γ), 30.67 (Val₁^β), 30.12 (Val₂^β), 30.05 (Glu_(1,2)^γ), 29.03 (Pro_(1,4,5)^β),

28.79 (Pro₂^β), 28.15 (Arg₂^β), 28.11 (Arg₁^β), 27.86 (Gln^β), 27.59 (Pro₃^β), 27.18 (Glu_(1,2)^β), 26.90 (His_(1,2,3)^β), 24.96 (Arg_(1,2)^γ), 24.35 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 24.15 (Ile₂^γ), 23.96 (Ile₁^γ), 22.76, 22.46 (3 x CH₃-Ac), 19.77 (Thr₂^γ), 19.45 (Thr₁^γ), 19.19 (Val₁^{γa}), 19.11 (Thr₃^γ), 18.63 (Val₁^{γb}), 18.13 (Val₂^{γab}), 17.83 (Ala₈^β), 17.60 (Ala₉^β), 17.51 (Ala_(4,5,6,7)^β), 17.04 (Ala_(2,3)^β), 16.80 (Ala₁^β), 15.26 (Ile_{CH_{3,2}}^γ), 15.10 (Ile_{CH_{3,1}}^γ), 10.98 (Ile_(1,2)^δ).

ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 1563.79 ([M+H+2Na]³⁺, ber.: 1563.73).

1172.68 ([M+2H+2Na]⁴⁺, ber.: 1172.80).

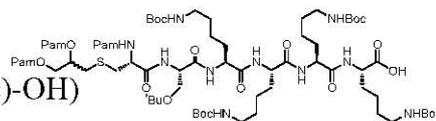
C₁₉₃H₃₀₈N₅₆O₇₇ (4644.84)

5.11 Die Synthese von MUC1-Glycopeptid-Lipidkonjugaten durch Fragmentkondensation

5.11.1 Festphasensynthese eines Mitogen-Pentapeptids

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-*L*-cystyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl (190)**

(Pam₃Cys-Ser(O^tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH)



Ausgehend von 129 mg (0.10 mmol der Startamino-säure) des mit Lys(Boc)-(2-CT) versehenen Polystyrol-Harzes **189** (Beladung: 0.78 mmol/g) wird das Peptid nach dem allgemeinen Protokoll der Festphasensynthese (vgl. Seite 303) aufgebaut. Dabei erfolgt für die erste Aminosäure L-Lysin eine Doppelkupplung, die folgenden Aminosäuren L-Lysin, L-Lysin und L-Serin werden einfach gekuppelt. Die Kupplung vom Pam₃Cys-OH (**77**) erfolgt halbautomatisch im Reaktor des Peptidsynthesizers. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 228.0 mg (0.25 mmol, 2.50 Äquiv.) Pam₃Cys-OH (**77**), 104.0 mg (0.27 mmol, 2.74 Äquiv.) HATU, 39.0 mg (0.29 mmol, 2.87 Äquiv.) HOAt und 56.0 mg (0.55 mmol, 5.54 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP/CH₂Cl₂ (2:1) versetzt und 16 h geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Danach wird abfiltriert und mit NMP sowie Dichlormethan gewaschen. Nicht umgesetzte Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz blockiert. Im letzten Schritt wird mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Abspaltung des Lipopeptids wird das Harz in einen Festphasenreaktor (6 ml Spritze mit Spritzenfilter) nach Merrifield überführt und 1 h in 6 ml einer Mischung aus 4 ml Hexafluoroisopropanol und 16 ml Dichlormethan geschüttelt. Das Produkt wird vom Harz

abgetrennt, wobei das Harz dreimal mit 4 ml der genannten Mischung gespült wird. Die vereinigten Filtrate werden mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit, wobei zur Vermeidung einer erhöhten Säurekonzentration während des Einengens mehrfach Toluol zugegeben wird. Es werden 180 mg eines farblosen Feststoffes erhalten, der in Dioxan aufgenommen wird und durch Gefriertrocknung lyophilisiert wird. Das erhaltene Lyophilisat wird ohne Reinigung in Fragmentkondensationsreaktionen eingesetzt.

Ausbeute: 178 mg (0.09 mmol, 91 %); farbloses Lyophilisat.

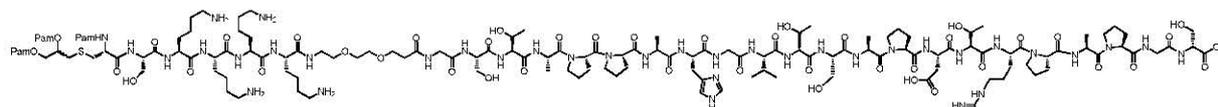
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1989.58$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1989.42).

$C_{105}H_{196}N_{10}O_{21}S$ (1966.80)

5.11.2 Die Synthese von Pam₃Cys-MUC1-Glycopeptid-Konjugaten

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-*L*-cystyl-*L*-seryl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-histidyl-glycyl-*L*-valyl-*L*-threonyl-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-serin (192)**

(Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CO-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



45.8 mg (23.29 μ mol, 1.20 Äquiv.) Pam₃Cys-Ser(O^tBu)-(Lys(Boc))₄-OH (**190**) werden mit 11 mg (28.90 μ mol, 1.49 Äquiv.) HATU, 4 mg (29.40 μ mol, 1.51 Äquiv.) HOAt, 6 mg (59.30 μ mol, 3.06 Äquiv.) NMM in 1 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid 30 min bei Raumtemp. voraktiviert. Die Lösung des Aktivesters wird anschließend zu 60 mg (19.41 μ mol) des Peptids **148** gegeben. Man spült mit 1 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid nach und rührt die Lösung 48 h bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wird i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (129 mg) wird anschließend dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 37.48$ min (Gerät 3, Säule: A-2, Gradient: A-3), $R_t = 31.68$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-5).

Ausbeute: 77 mg (23.29 μ mol, 79 %); farbloser, amorpher Feststoff.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2532.25$ ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 2532.07).

1688.52 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 1688.38).

$C_{258}H_{430}N_{38}O_{57}S_2$ (5040.53)

Das erhaltene vollgeschützte Peptid **191** wird anschließend 1 h in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser bei Raumtemp. gerührt. Im Anschluss wird mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (172 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Lipopeptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 43.33$ min (Gerät 3, Säule: A-2, Gradient: A-2), $R_t = 41.65$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-6).

Ausbeute: 39 mg (10.5 μ mmol, 69 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -76.5$ ($c = 1.00$, H_2O).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC] (D_2O): [δ/ppm] = 8.51 (s, 1H, H_{2Ar} -His), 7.21 (s, 1H, H_{4Ar} -His), CH-Glyceryl {^{*}}, Cys ^{α} {4.83^{}}, 4.72 – 4.05 (m, 29H, Asp ^{α} {4.60}, His ^{α} {4.58}, Arg ^{α} {4.52}, Ala₄ ^{α} {4.48}, Ala₃ ^{α} {4.46}, Ser₄ ^{α} {4.45}, Ala₂ ^{α} {4.42}, Ser₃ ^{α} {4.34}, Pro_(4,5) ^{α} {4.31}, Ser₂ ^{α} {4.30}, Pro₃ ^{α} {4.30}, Thr₃ ^{α} {4.30}, Ser₁ ^{α} {4.29}, OCH_{2a}-Glyceryl {^{*}}, Pro_(1,2) ^{α} {4.28}, Thr₂ ^{α} {4.25}, Thr₁ ^{α} {4.20}, Ala₁ ^{α} {4.12}, Val ^{α} {4.11}, OCH_{2b}-Glyceryl {^{*}}, Lys₁ ^{α} {^{*}}, Lys₂ ^{α} {^{*}}, Lys₃ ^{α} {^{*}}, Lys₄ ^{α} {^{*}}, Thr₃ ^{β} {4.11}, Thr₂ ^{β} {4.09}, Thr₁ ^{β} {4.05}), 3.96 – 3.43 (m, 33H, Gly₁ ^{αa} {3.93}, Gly₂ ^{αb} {3.89}, Gly₃ ^{αa} {3.86}, Gly₃ ^{αb} {3.84}, Ser₁ ^{βa} {3.80}, Gly₁ ^{αb} {3.79}, Ser₁ ^{βb} {3.77}, Ser₄ ^{βa} {3.76}, Ser₂ ^{$\beta a b$} {3.74}, Ser₄ ^{βb} {3.73}, Ser₃ ^{βa} {3.72}, Ser₃ ^{βb} {3.71}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{δa} {3.70}, H3-Spa {3.66}, H6-Spa {3.58}, H5-Spa {3.54}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{δb} {3.52}, H8-Spa {3.48}, Cys ^{βa} {3.48^{**}}), 3.34 – 3.06 (m, 7H, Cys ^{βb} {3.28}, His ^{βa} {3.16}, Arg ^{δ} {3.09}, His ^{βb} {3.07}, H9-Spa {^{*}}), 2.94 – 2.66 (m, 12H, Lys_(1,2,3,4) ^{ϵ} {2.88}, Asp ^{βa} {2.78}, SCH₂-Glyceryl {^{*}}, Asp ^{βb} {2.71}), 2.50 (t, 2H, ³ $J_{H_2,H_3} = 6.3$ Hz, H2-Spa), 2.28 – 1.09 (m, 146H, 3 x CH₂ ^{α} -Pam {^{*}}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{βa} {2.22 – 2.12}, Val ^{β} {1.99}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{γ} {1.98 – 1.84}, Pro_(1,2,3,4,5) ^{βb} {1.85 – 1.73}, Arg ^{βa} {1.75^{**}}, Lys_(1,2,3,4) ^{$\beta a b$} {^{*}}, 3 x CH₂ ^{β} -Pam {^{*}}, Arg ^{βb} {1.61^{**}}, Lys_(1,2,3,4) ^{δ} {1.60 – 1.50}, Arg ^{γ} {1.56}, Lys_(1,2,3,4) ^{γ} {1.32}, 3 x (CH₂)₁₂ {^{*}}, Ala_(3,4) ^{β} {1.24}, Ala_(1,2) ^{β} {1.21}), 1.07 (d, 9H, ³ $J_{Thr\gamma,Thr\beta} = 7.0$ Hz, Thr_(1,2,3) ^{γ}), 0.96 – 0.71 (m, 15H, Val ^{αa} {0.83}, Val ^{βb} {0.82}, 3 x CH₃-Pam {m, 9H, 0.77 – 0.69}).**

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (D_2O): [δ/ppm] = 177.32, 176.74, 174.85, 174.75, 174.55, 174.44, 174.40, 173.73, 173.69, 173.12, 172.98, 172.85, 172.68, 172.02, 171.90, 171.60, 171.46, 171.34, 171.19, 170.86, 170.59, 170.57, 170.47 (C=O), ^{*} (C=N-Guan), 133.47 (C2-Imidazol), 128.19 (C5-Imidazol), 117.12 (C4-Imidazol), ^{*} (CH-Glyceryl), 69.44 (C6-Spa), 69.30 (C5-Spa), 68.70 (C8-Spa), 66.97 (Thr_(1,2,3) ^{β}), 66.48 (C3-Spa), ^{*} (CH₂-Glyceryl), 61.31 (Ser_(1,4) ^{β}), 61.16 (Ser₂ ^{β}), 61.12 (Ser₃ ^{β}), 60.44 (Pro_(4,5) ^{α}), 60.15 (Pro_(1,2) ^{α}), 59.43 (Val ^{α}), 58.85 (Pro₃ ^{α}), 58.79 (Thr_(1,2,3) ^{α}), 56.08 (Ser_(1,2) ^{α}), 55.33 (Ser₄ ^{α}), 55.29 (Ser₃ ^{α}), ^{*} (Lys_(1,2,3,4) ^{α}), 52.28 (His ^{α}), ^{*} (Cys ^{α}), 51.09 (Arg ^{α}), 50.34 (Asp ^{α}), 49.55 (Ala₁ ^{α}), 47.67

(Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 47.61 (Ala_(2,3,4)^α), 42.36 (Gly₁^α), 42.32 (Gly₂^α), 42.16 (Gly₃^α), 40.43 (Arg^δ), * (C9-Spa), 39.08 (Lys_(1,2,3,4)^ε), * (Cys^β), * (C2-Pam, NHCO), 35.97 (Asp^β), 35.60 (C2-Spa), * (2 x C2-Pam), * (SCH₂-Glyceryl), * (3 x C14-Pam), 30.22 (Val^β), 29.51 (Arg^β), 29.22 (Pro_(1,2,3,4,5)^β), * (3 x C4 – C13-Pam), * (Lys_(1,2,3,4)^β), 26.27 (His^β), 26.26 (Lys_(1,2,3,4)^δ), * (C3-Pam), 24.67 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), * (2 x C3-Pam), 24.00 (Arg^γ), * (3 x C15-Pam), 21.92 (Lys_(1,2,3,4)^γ), 18.70 (Thr_(1,2,3)^γ), 17.94 (Val^{γb}), 17.76 (Val^{γa}), 16.21 (Ala₁^β), 15.82 (Ala₂^β), 15.32 (Ala_(3,4)^β), 13.88 (3 x C16-Pam).

* Werte konnten aufgrund der beschränkten Löslichkeit nicht ermittelt werden.

Werte mit ** sind mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

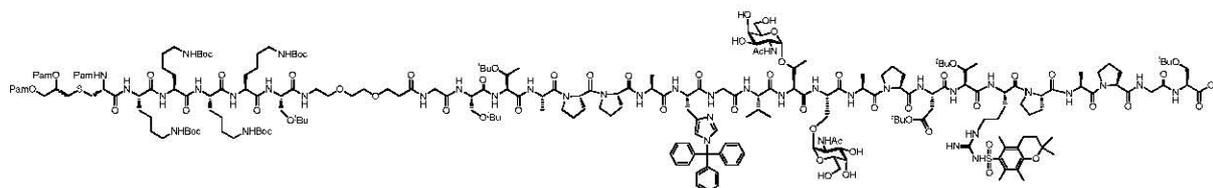
ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 1228.10 ([M+3H]⁺, ber.: 1228.08).

1233.81 ([M+3H+O_{ox. Schwefel}]⁺, ber.: 1233.75).

C₁₇₃H₃₀₂N₃₈O₄₆S (3682.54)

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-*L*-cystyl-*L*-seryl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*N*^{Im}-trityl-*L*-histidyl-glycyl-*L*-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-*O*-*tert*-butyl-serin (193)**

(Pam₃Cys-Ser(^tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CO-Gly-Ser(^tBu)-Thr(^tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser(α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



49.4 mg (25.10 μ mol, 1.70 Äquiv.) Pam₃Cys-Ser(^tBu)-(Lys(Boc))₄-OH (**190**) werden mit 12.0 mg (31.60 μ mol, 2.14 Äquiv.) HATU, 4.4 mg (32.30 μ mol, 2.19 Äquiv.) HOAt, 7.1 mg (54.90 μ mol, 3.72 Äquiv.) NMM in 1 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid 30 min voraktiviert. Die Lösung des Aktivesters wird anschließend zu 50 mg (14.77 μ mol) des Glycopeptids **156** gegeben. Man spült mit 0.5 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid nach und rührt die Lösung 16 h bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wird i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (137 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol

kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 45.57$ min (Gerät 3, Säule: A-2, Gradient: A-4), $R_t = 28.87$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-5).

Ausbeute: 74 mg (13.87 μ mol, 94 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -6.0$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 8.01$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), NH-Gly₁ {^{*}}, NH-Gly₂ {^{*}}, NH-Gly₃ {^{*}}, NH-Thr₁ {^{*}}, NH-Thr₂ {^{*}}, NH-Thr₃ {^{*}}, NH-Ser₁ {^{*}}, NH-Ser₂ {^{*}}, NH-Ser₃ {^{*}}, NH-Ser₄ {^{*}}, NH-Ala₁ {^{*}}, NH-Ala₂ {^{*}}, NH-Ala₃ {^{*}}, NH-Ala₄ {^{*}}, NH-His {^{*}}, NH-Val {^{*}}, NH-Asp {^{*}}, NH-Arg {^{*}}, NH-Lys₁ {^{*}}, NH-Lys₂ {^{*}}, NH-Lys₃ {^{*}}, NH-Lys₄ {^{*}}, NH-Cys {^{*}}, 7.44 – 7.36 (m, 10H, H_{meta}-Trt {7.42}, H_{para}-Trt {7.42}, H_{4Ar}-His {7.46}), 7.10 (m_c, 6H, H_{ortho}-Trt), 5.21 (m, 1H, CH-Glyceryl), 4.96 (m_c, 1H, Cys^α), 4.90 – 4.14 (m, 33H, H1-GalN^{Thr} {^{*}}, Arg^α {^{*}}, His^α {^{*}}, Ala₄^α {4.63}, Ala₂^α {4.62}, Ala₁^α {4.60}, Ser₃^α {^{*}}, H1-GalN^{Ser} {^{*}}, Val^α {^{*}}, Pro₅^α {^{*}}, Pro₄^α {^{*}}, Asp^α {4.48^{**}}, Pro₃^α {^{*}}, Thr₃^α {4.46}, Thr₂^α {4.43}, Pro₂^α {^{*}}, Thr₁^α {4.38}, Pro₁^α {^{*}}, Ser₂^α {^{*}}, 4.34 (m_c, 1H, OCH_{2a}-Glyceryl), Ser₁^α {^{*}}, Thr₃^β {4.25}, Lys_(1,2,3,4)^α {4.23}, Thr₁^β {4.19}, Ala₃^α {4.14}, Thr₂^β {4.14}, 4.14 (m_c, 1H, OCH_{2b}-Glyceryl), 4.14 – 2.95 (m, 58H, H2-GalN^{Ser} {^{*}}, Gly₃^α {4.00}, H2-GalN^{Thr} {^{*}}, Gly_(1,2)^α {3.95}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.83 – 3.46}, H3-Spa {3.77}, Ser_(1,2,3,4)^{βa} {3.74}, H8-Spa {3.73}, H4-GalN^{Ser/Thr} {^{*}}, H5-GalN^{Ser/Thr} {^{*}}, H3-GalN^{Ser/Thr} {^{*}}, Ser_(1,2,3,4)^{βb} {3.61}, H6-Spa {3.59}, H5-Spa {3.52}, H6_{ab}-GalN^{Ser/Thr} {^{*}}, H9-Spa {3.43}, Lys_(2,3,4)^ε {3.16}, Cys^{βa} {3.14}, Arg^δ {3.10}, His^{βab} {^{*}}, Cys^{βb} {3.06}, Lys₁^ε {3.03}, 2.81 – 2.72 (m, 2H, SCH₂-Glyceryl {2.76}), 2.72 – 2.44 (m, 11H, H4-Pmc {2.64}, H2-Spa {2.57}, 2 x CH₃-Pmc {2.56}, Asp^{βa} {2.48^{**}}), 2.41 – 2.19 (m, 8H, Asp^{βb} {2.34}, 3 x CH₂^α-Pam, {2.34}, Val^β {2.21}), 2.18 – 1.72 (m, 41H, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.18 – 1.88^{**}}, H9a-Pmc {2.12}, 2 x CH₃-Ac {2.02}, Pro_(1,2,3,4,5)^β {2.00 – 1.71^{**}}, CH₃-Ac {1.97}, Arg^{βa} {1.92^{**}}, 1.82 (t, 2H, ³J_{H3-Pmc,H4-Pmc} = 6.9 Hz, H3-Pmc), Lys_(1,2,3,4)^{βab} {1.82}, Arg^{βb} {1.78^{**}}), 1.70 – 0.80 (m, 219H, 3 x CH₂^β-Pam {1.70 – 1.55}, Lys_(1,2,3,4)^δ {1.55}, Arg^γ {1.54}, 1.44 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.43 (s_b, 36H, 4 x CH₃-Boc), Ala₄^β {1.39}, Ala₃^β {1.36}, Lys_(1,2,3,4)^γ {1.35}, Ala_(1,2)^β {1.32}, 1.32 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.32 (m_c, 6H, H2a-Pmc), 3 x H15-Pam {1.31}, 1.27 (s_b, 66H, 3 x (CH₂)₁₁-Pam), 1.22 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.19 (s, 9H, CH₃-^tBu), Thr₃^γ {1.15}, Thr₂^γ {1.14}, Thr₁^γ {1.08}, 1.13 (s, 9H, CH₃-^tBu), 0.87 (t_p, 9H, ³J_{H16,H15} ≈ 6.8 Hz, 3 x CH₃-Pam), Val^{γab} {0.87}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (CDCl₃): $[\delta/\text{ppm}] = 176.43$, 173.48 (C=O), 153.50 (C7-Pmc), 139.83 (3 x C_{ipso}-Trt), 136.06 (C10-Pmc), * (C5-Pmc), * (C5-Imidazol), 129.74 (C2-Imidazol), 129.61 (3 x C_{ortho}-Trt), 128.95, 128.08 (3 x C_{meta}-Trt, 3 x C_{para}-Trt), 124.12 (C9-Pmc), * (C4-Imidazol), 118.33 (C6-, C8-Pmc), * (C1-GalN^{Thr}), * (C1-GalN^{Ser}), 81.91 (C-^tBu), 78.93 (C-^tBu-Boc), 77.75 (C_{qua}-Trt), 74.32 (C-^tBu), 73.81 (C2-Pmc), 73.80 (C-^tBu), 73.73 (C-^tBu), 73.65 (C-^tBu), * (C5-GalN^{Ser/Thr}), 69.89 (C6-Spa^I), 69.74 (C5-Spa^I),

69.67 (CH-Glycerol), 66.39 (Thr₃^β), * (C3-GalN^{Thr}), * (C4-GalN^{Ser/Thr}), * (C3-GalN^{Ser}), 67.04 (C3-Spa), * (Thr₁^β), * (Thr₂^β), 66.75 (C8-Spa), 63.44 (CH₂-Glycerol), 60.97 (Ser_(1,2,3,4)^β), * (C6-GalN^{Ser/Thr}), * (Thr₃^α), * (Pro₁^α), * (Pro₂^α), * (Pro_(4,5)^α), * (Pro₃^α), * (Thr₁^α), * (Thr₂^α), * (Val^α), * (Cys^α), 54.45 (Lys_(1,2,3,4)^α), * (Ser₁^α), * (Ser₂^α), * (His^α), * (Ser₃^α), * (Ser₄^α), * (Arg^α), * (C2-GalN^{Ser}), * (C2-GalN^{Thr}), * (Asp^α), 47.49 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), * (Ala₃^α), 45.68 (Ala_(1,2,4)^α), 43.31 (Gly_(1,2,3)^α), 43.25 (Lys_(1,2,3,4)^ε), 40.42 (Arg^δ), 39.31 (C9-Spa), * (Cys^β), 36.39 (C2-Spa), 36.19** (Asp^β), 34.25 (Lys_(1,2,3,4)^δ), 34.18 (3 x C2-Pam), 32.76 (C3-Pmc), 32.67 (SCH₂-Glycerol), 31.97 (3 x C14-Pam), 30.94 (Val^β), 30.50 (Arg^β), 30.50 (Pro_(1,2,3,4,5)^β), 30.50 (Lys_(1,2,3,4)^β), 29.69 (3 x (C4 – C13-Pam)), 28.43 (12 x CH₃-Boc), 28.43, 27.64, 27.44, 27.37, 26.77 (5 x CH₃-^tBu), * (His^β), 26.77 (2 x C2a-Pmc), 25.20 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 25.14 (Arg^γ), 25.01 (3 x C3-Pam), 22.93, 22.83 (2 x CH₃-Ac), 22.66 (3 x C15-Pam), 22.66 (Lys_(1,2,3,4)^γ), 21.44 (C4-Pmc), 20.32 (Thr₃^γ), 19.82 (Val^{γab}), 19.19 (Thr_(1,2)^γ), 18.96 (Ala₃^β), 17.63 (C6a-, C8a-Pmc), 16.95 (Ala₁^β), 16.84 (Ala₂^β), 16.51 (Ala₄^β), 14.14 (3 x C16-Pam), 12.20 (C9a-Pmc).

* Werte konnten aufgrund der beschränkten Löslichkeit nicht ermittelt werden.

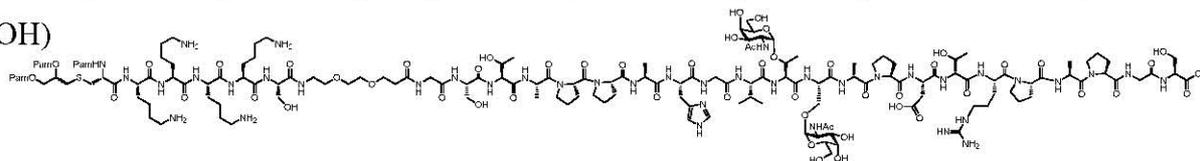
Werte mit ** sind mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1791.80$ ($[M+2H+K]^{3+}$, ber.: 1791.72).

1343.80 ($[M+3H+K]^{4+}$, ber.: 1343.79).

C₂₆₆H₄₄₀N₄₀O₆₇S₂ (5334.70)

N-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-*L*-cystyl-*L*-seryl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-9-amido-4,7-dioxanonanilamido-*N*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-histidyl-glycyl-*L*-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-serin (**194**) (Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CO-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser(α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



Das erhaltene partiell geschützte Lipopeptid **193** wird 1 h in 6 ml einer Lösung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser bei Raumtemp. gerührt. Im Anschluss wird mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (114 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 38.12$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-6), $R_t = 31.04$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-7).

Ausbeute: 36 mg (8.8 μ mol, 60 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -84.7$ ($c = 1.00$, H₂O).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (D₂O): [δ /ppm] = 8.50 (s, 1H, H_{2Ar}-His), 7.21 (s, 1H, H_{4Ar}-His), CH-Glyceryl {^{*}}, Cys ^{α} {^{*}}, 4.80 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 4.1 Hz, H1-GalN^{Thr}), 4.77 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 3.7 Hz, H1-GalN^{Ser}), 4.64 – 4.34 (m, 13H, Asp ^{α} {4.61}, His ^{α} {4.60}, Pro₅ ^{α} {4.58}, Arg ^{α} {4.52}, Ser ^{α} _{TN} {4.52}, Thr ^{α} _{TN} {4.51}, Ala₂ ^{α} {4.48}, Ala₃ ^{α} {4.45}, Ser₂ ^{α} {4.45}, OCH_{2a}-Glyceryl {^{*}}, Ser_(3,4) ^{α} {4.41}, Ala₄ ^{α} {4.39}), 4.33 – 3.41 (m, 60H, Pro₃ ^{α} {4.31}, Pro₂ ^{α} {4.29}, Pro₄ ^{α} {4.28}, Pro₁ ^{α} {4.27}, Thr₁ ^{α} {4.25}, Lys₄ ^{α} {4.21}, Thr ^{β} _{TN} {4.21}, Val ^{α} {4.20}, Thr₂ ^{α} {4.19}, OCH_{2b}-Glyceryl {^{*}}, Lys₃ ^{α} {4.16}, Lys_(1,2) ^{α} {4.13}, Ala₁ ^{α} {4.12}, Thr₂ ^{β} {4.12}, Thr₁ ^{β} {4.08}, H2-GalN^{Ser} {4.03}, H2-GalN^{Thr} {3.96}, Gly_(1,2,3) ^{α} {3.93 – 3.75}, H5-GalN^{Thr} {3.87}, Ser_(3,4) ^{βa} {3.86}, H4-GalN^{Ser/Thr} {3.83}, Ser ^{βa} _{TN} {3.79}, Ser_(3,4) ^{βb} {3.78}, H3-GalN^{Ser} {3.77}, H5-GalN^{Ser} {3.75}, H3-GalN^{Thr} {3.74}, H6_a-GalN^{Ser/Thr} {3.74}, Ser₂ ^{βab} {3.73}, Pro_(1,2,3) ^{δa} {3.72}, Pro_(4,5) ^{δa} {3.70}, H3-Spa {3.67}, Ser ^{βb} _{TN} {3.66}, H8-Spa {3.64}, H6_b-GalN^{Ser/Thr} {3.60}, Pro_(1,2,3) ^{δb} {3.53}, H5-Spa {3.53}, H6-Spa {3.53}, Pro_(4,5) ^{δb} {3.47}), 3.34 – 3.20 (m, 2H, Cys ^{βa} {3.33^{**}}, Cys ^{βb} {3.22^{**}}), 3.21 – 3.03 (m, 6H, His ^{βa} {3.16, dd, 1H, ³J_{His βa ,His α} \approx 6.1 Hz, ²J_{His βa ,His βb} \approx 11.9 Hz}, Arg ^{δ} {3.09}, H9-Spa {3.09}, His ^{βb} {3.07}), 2.90 – 2.79 (m, 11H, Lys_(1,2,3,4) ^{ϵ} {2.85}, Asp ^{βa} {2.83}, SCH₂-Glyceryl {^{*}}), 2.76 (dd, 1H, ³J_{Asp βb ,Asp α} \approx 7.0 Hz, ²J_{Asp βb ,Asp βa} \approx 18.0 Hz, Asp ^{βb}), 2.50 (m_c, 2H, H2-Spa), 2.25

– 1.00 (m, 160H, 3 x CH₂^α-Pam {^{*}}, Pro₅^{β^a} {2.23}, Pro₂^{β^a} {2.18}, Pro₃^{β^a} {2.17}, Pro₄^{β^a} {2.15}, Pro₁^{β^a} {2.13}, Val^β {1.98}, 1.91, 1.90 (2 x CH₃-Ac), Pro_(1,2,3,4,5)^γ {1.90}, Pro₂^{β^b} {1.84}, Pro₃^{β^b} {1.83}, Pro₁^{β^b} {1.78}, Pro₅^{β^b} {1.76}, Pro₄^{β^b} {1.73}, Lys_(1,2,3,4)^{β^a} {1.73}, Arg^{β^a} {1.68}, 3 x CH₂^β-Pam {^{*}}, Lys_(1,2,3,4)^{β^b} {1.62}, Arg^{β^b} {1.60}, Lys_(1,2,3,4)^δ {1.55}, Arg^γ {1.52}, Lys_(1,2,3,4)^γ {1.31}, 3 x (CH₂)₁₂ {1.29 – 1.06^{**}}, Ala₄^β {1.27}, Ala₃^β {1.25}, Ala₂^β {1.22}, Ala₁^β {1.21}, Thr₂^γ {1.21}, Thr_{TN}^γ {1.15}, Thr₁^γ {1.06}), 0.96 – 0.71 (m, 15H, Val^{γ^{ab}} {0.84}, 3 x CH₃-Pam {m, 9H, 0.73}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (D₂O): [δ/ppm] = 174.79, 174.26, 173.89, 173.72, 173.65, 173.49, 173.43, 173.06, 172.66, 172.49, 172.17, 171.88, 171.31, 171.18, 170.96, 170.84, 170.03 (C=O), 156.62 (C=N-Guan), 133.12 (C2-Imidazol), 128.22 (C5-Imidazol), 117.04 (C4-Imidazol), 98.85 (C1-GalN^{Thr}), 97.81 (C1-GalN^{Ser}), 76.91 (Thr_{TN}^β), 71.18 (C5-GalN^{Thr}), 71.14 (C5-GalN^{Ser}), ^{*} (CH-Glyceryl), 69.28 (C5-Spa), 68.67 (C6-Spa), 68.36 (C4-GalN^{Ser/Thr}), 67.99 (C3-GalN^{Thr}), 67.86 (C3-GalN^{Ser}), 67.60 (Ser_{TN}^β), 66.97 (Thr_(1,2)^β), 66.93 (C8-Spa), 66.47 (C3-Spa), ^{*} (CH₂-Glyceryl), 61.16 (C6-GalN^{Ser/Thr}), 61.15 (Ser_(3,4)^β), 61.06 (Ser₂^β), 60.47 (Pro_(1,2,3,4)^α), 58.91 (Val^α), 58.85 (Thr_(1,2)^α), 58.52 (Pro₅^α), 56.97 (Thr_{TN}^α), 55.22 (Ser₂^α), 55.08 (Ser_(3,4)^α), 53.55 (Lys_(1,2)^α), 53.46 (Lys₃^α), 53.44 (Lys₄^α), 52.83 (Ser_{TN}^α), 52.12 (His^α), ^{*} (Cys^α), 51.05 (Arg^α), 50.01 (Asp^α), 49.54 (C2-GalN^{Ser}), 49.53 (C2-GalN^{Thr}), 49.48 (Ala₁^α), 47.65 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 47.59 (Ala_(2,3)^α), 47.49 (Ala₄^α), 42.22 (Gly_(1,2,3)^α), 40.44 (Arg^δ), 40.44 (C9-Spa), 39.02 (Lys_(1,2,3,4)^ε), 38.86^{} (Cys^β), ^{*} (C2-Pam, NHCO), 35.52 (C2-Spa), 35.11 (Asp^β), ^{*} (2 x C2-Pam), ^{*} (SCH₂-Glyceryl), ^{*} (3 x C14-Pam), 30.61 (Arg^β), 30.20 (Val^β), 29.24 (Pro_(1,2,3,4,5)^β), 27.46 (Lys_(1,2,3,4)^β), 26.41 (His^β), 26.17 (Lys_(1,2,3,4)^δ), 25.98^{**} (3 x (C4 – C13-Pam)), ^{*} (C3-Pam), ^{*} (2 x C3-Pam), 24.63 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 23.97 (Arg^γ), 23.13 (2 x CH₃-Ac), ^{*} (3 x C15-Pam), 22.07 (Lys_(1,2,3,4)^γ), 18.76 (Thr_(1,2)^γ), 18.33 (Thr_{TN}^γ), 18.24 (Val^{γ^{bb}}), 17.76 (Val^{γ^{ba}}), 16.08 (Ala₁^β), 15.14 (Ala_(2,3,4)^β), 13.44 (3 x C16-Pam).**

ESI-MS (positiv): [m/z] = 2045.24 ([M+2H]²⁺, ber.: 2045.20).

1363.49 ([M+3H]³⁺, ber.: 1363.47).

1022.99 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1023.10).

^{*} Werte konnten aufgrund der beschränkten Löslichkeit nicht ermittelt werden.

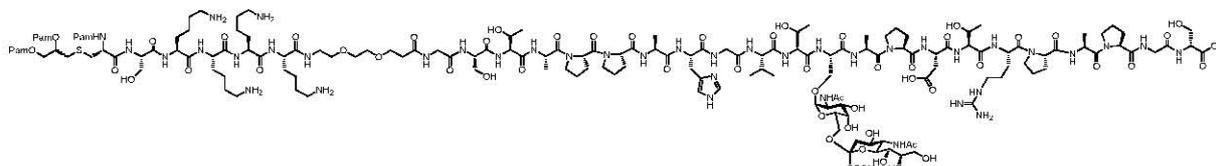
Werte mit ^{**} sind mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1363.1333 ([M+3H]³⁺, ber.: 1363.1334).

C₁₈₉H₃₂₈N₄₀O₅₆S (4088.93)

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-*L*-cystyl-*L*-seryl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-histidyl-glycyl-*L*-valyl-*L*-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-serin (195)**

(Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CO-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α -NeuNAcCOOH-(2-6)- α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



47.7 mg (24.08 μ mol, 1.70 Äquiv.) Pam₃Cys-Ser(O^tBu)-(Lys(Boc))₄-OH (**190**) werden mit 11.5 mg (30.20 μ mol, 2.14 Äquiv.) HATU, 4.3 mg (31.60 μ mol, 2.23 Äquiv.) HOAt und 6.9 mg (53.40 μ mol, 3.77 Äquiv.) *N*-Ethyl-diisopropylamin in 1 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid 1 h bei Raumtemp. voraktiviert. Die Lösung des Aktivesters wird anschließend zu 50 mg (14.16 μ mol) des partiell geschützten Glycopeptids **157** gegeben. Man spült mit 1 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid nach und rührt die Lösung 16 h bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wird i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit und der gelbe Rückstand (138 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Das erhaltene partiell geschützte rohe Peptid wird anschließend 70 min in einer Mischung aus 8.0 ml Trifluoressigsäure, 1.0 ml Triisopropylsilan und 1.0 ml destilliertem Wasser bei Raumtemp. gerührt. Im Anschluss wird mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (254 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Lipopeptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 25.07$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-5).

Ausbeute: 34 mg (8.1 μ mol, 58 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -92.6$ ($c = 1.00$, H₂O).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (D₂O): [δ /ppm] = 8.60 (s, 1H, H_{2Ar}-His), 7.30 (s, 1H, H_{4Ar}-His), CH-Glyceryl {^{*}}, Cys ^{α} {^{*}}, 4.75 (m_c, 1H, H1-GalN), 4.64 – 3.23 (m, 76H, Asp ^{α} {4.60}, His ^{α} {4.59}, Pro₄ ^{α} {4.59}, Arg ^{α} {4.52}, Ser ^{α} _{STN} {4.51}, Ala₄ ^{α} {4.49}, Ala₂ ^{α} {4.48}, Ala₃ ^{α} {4.46}, Ser₃ ^{α} {4.45}, Ser_(1,2) ^{α} {4.34}, OCH_{2a}-Glyceryl {^{*}}, Pro₃ ^{α} {4.31}, Thr₃ ^{α} {4.29}, Pro₂ ^{α} {4.29}, Pro₁ ^{α} {4.27}, Pro₅ ^{α} {4.27}, Thr₂ ^{α} {4.25}, Thr₁ ^{α} {4.20}, Lys₁ ^{α} {4.16}, Lys_(2,3) ^{α} {4.13}, Ala₁ ^{α} {4.12}, Lys₄ ^{α} {4.11}, Val ^{α} {4.11}, Thr_(1,2,3) ^{β} {4.09}, OCH_{2b}-Glyceryl {^{*}}, H2-GalN {4.03}, H9_a-Sia {3.99}, Gly_(1,2,3) ^{α} {3.94 – 3.78}, Ser_(1,2) ^{βa} {3.86}, H4-GalN {3.84}, Ser ^{βa} _{STN} {3.83}, Ser_(1,2) ^{βb} {3.77}, Ser₃ ^{βa} {3.76}, H5-GalN {3.76},

H8-Sia {3.76}, H6_a-GalN {3.75}, H3-GalN {3.74}, Ser₃^{βb} {3.73}, H5-Sia {3.71}, Pro_(1,2)^δ {3.70}, H3-Spa {3.68}, H9_b-Sia {3.68}, H8-Spa {3.67}, Ser_{STN}^{βb} {3.63}, H6-Sia {3.60}, H6-Spa {3.58}, H4-Sia {3.56}, Pro₃^δ {3.54}, H5-Spa {3.53}, H6_b-GalN {3.50}, Pro_(4,5)^δ {3.50}, H7-Sia {3.43}, Cys^{βa} {3.37^{**}}, 3.21 – 3.03 (m, 7H, His^{βa} {3.17}, H9-Spa {3.09}, Arg^δ {3.08}, Cys^{βb} {3.08^{**}}, His^{βb} {3.08}), 2.97 – 2.68 (m, 12H, Lys_(1,2,3,4)^ε {2.87}, Asp^{βa} {2.81}, SCH₂-Glyceryl {^{*}}, Asp^{βb} {2.75}), 2.72 – 2.65 (mc, 1H, H3_{aq}-Sia {2.61}), 2.59 (t, 2H, ³J_{H2,H3} = 6.5 Hz, H2-Spa), 2.40 – 1.00 (m, 160H, 3 x CH₂^α-Pam {^{*}}, Pro_(1,2,3,4,5)^{βa} {2.17}, Val^β {1.99}, 1.90 (2 x CH₃-Ac), Pro_(1,2,3,4,5)^γ {1.90}, Pro_(1,2,3,4)^{βb} {1.83}, Pro₅^{βb} {1.74}, Arg^{βa} {1.71}, Lys_(1,2,3,4)^{βa} {1.70}, 3 x CH₂^β-Pam {^{*}}, Arg^{βb} {1.62}, Lys_(1,2,3,4)^{βb} {1.61}, Lys_(1,2,3,4)^δ {1.56}, Arg^γ {1.56}, H3_{ax}-Sia {1.56}, Lys_(1,2,3,4)^γ {1.33}, 3 x (CH₂)₁₂ {^{*}}, Ala₄^β {1.26}, Ala₃^β {1.25}, Ala_(1,2)^β {1.21}, Thr₂^γ {1.08}, Thr₃^γ {1.09}, Thr₁^γ {1.06}), 0.90 – 0.66 (m, 15H, Val^{γab} {0.91}, 3 x CH₃-Pam {0.73, m, 9H}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (D₂O): [δ/ppm] = 174.86, 174.74, 174.45, 174.14, 173.83, 173.77, 173.52, 173.47, 173.19, 173.02, 172.62, 172.14, 171.83, 171.34, 171.17, 170.96, 170.24 (C=O), 156.62 (C=N-Guan), 133.19 (C2-Imidazol), 128.20 (C5-Imidazol), 117.06 (C4-Imidazol), 99.92 (C2-Sia), 97.59 (C1-GalN), 72.76 (C6-Sia), 71.64 (C5-GalN), 71.59 (C8-Sia), ^{*} (CH-Glyceryl), 69.50 (C6-Spa), 69.32 (C5-Spa), 68.42 (C4-GalN), 68.07 (C4-Sia), 68.05 (C7-Sia), 67.66 (C3-GalN), 66.96 (Thr_(1,2,3)^β), 66.91 (Ser_{STN}^β), 66.57 (C8-Spa), 66.50 (C3-Spa), 63.65 (C9-Sia), ^{*} (CH₂-Glyceryl), 62.57 (C6-GalN), 61.47 (Ser_(1,2)^β), 61.33 (Ser₃^β), 60.58 (Pro₃^α), 60.20 (Pro₂^α), 59.36 (Val^α), 59.35 (Pro₅^α), 58.82 (Thr₁^α), 58.81 (Thr₂^α), 58.74 (Pro₁^α), 58.60 (Pro₄^α), 56.85 (Thr₃^α), 55.74 (Ser_(1,2)^α), 55.19 (Ser₃^α), 53.76 (Lys_(1,2,3,4)^α), 52.93 (Ser_{STN}^α), 52.20 (His^α), ^{*} (Cys^α), 51.76 (C5-Sia), 51.08 (Arg^α), 50.06 (Asp^α), 49.57 (C2-GalN), 49.51 (Ala₁^α), 47.68 (Pro_(1,2)^δ), 47.63 (Pro₃^δ), 47.61 (Pro_(4,5)^δ), 47.57 (Ala_(2,3,4)^α), 42.22 (Gly_(1,2,3)^α), 40.46 (Arg^δ), 40.46 (C9-Spa), 40.22 (C3-Sia), 39.04 (Lys_(1,2,3,4)^ε), ^{*} (Cys^β), ^{*} (C2-Pam, NHCO), 35.56 (C2-Spa), 35.36 (Asp^β), ^{*} (2 x C2-Pam), ^{*} (SCH₂-Glyceryl), ^{*} (3 x C14-Pam), 30.52 (Arg^β), 30.12 (Val^β), 29.35 (Pro₅^β), 29.23 (Pro_(1,2,3,4)^β), 27.41 (Lys_(1,2,3,4)^β), 26.36 (His^β), 26.22 (Lys_(1,2,3,4)^δ), ^{*} (3 x (C4 – C13-Pam), ^{*} (C3-Pam), ^{*} (2 x C3-Pam), 24.62 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 23.97 (Arg^γ), 22.05 (2 x CH₃-Ac), ^{*} (3 x C15--Pam), 22.01 (Lys_(1,2,3,4)^γ), 18.71 (Thr_(1,2,3)^γ), 17.99 (Val^{γab}), 16.18 (Ala_(1,2)^β), 15.25 (Ala_(3,4)^β), 13.80 (3 x C16-Pam).

^{*} Werte konnten aufgrund der beschränkten Löslichkeit nicht ermittelt werden.

Werte mit ^{**} sind mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2097.18$ ($[M+2H+O_{\text{Ox. Schwefel}}]^{2+}$, ber.: 2097.21).

1398.45 ($[M+3H+O_{\text{Ox. Schwefel}}]^{3+}$, ber.: 1398.47).

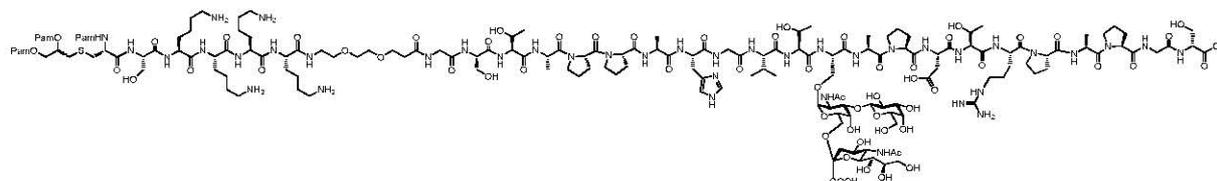
1048.97 ($[M+4H+O_{\text{Ox. Schwefel}}]^{4+}$, ber.: 1049.11).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1397.7980$ ($[M+3H+O_{\text{Ox. Schwefel}}]^{3+}$, ber.: 1397.8037).

$C_{192}H_{332}N_{40}O_{59}S$ (4176.99)

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-*L*-cystyl-*L*-seryl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-histidyl-glycyl-*L*-valyl-*L*-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-serin (196)**

(Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CO-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser[α -3-(β -Gal)-(α -NeuNAcCOOH-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



30.0 mg (15.28 μmol , 1.70 Äquiv.) Pam₃Cys-Ser(O^tBu)-(Lys(Boc))₄-OH (**190**) werden mit 7.0 mg (18.41 μmol , 2.05 Äquiv.) HATU, 3.0 mg (22.04 μmol , 2.45 Äquiv.) HOAt, 4.5 mg (34.8 μmol , 3.87 Äquiv.) *N*-Ethyldiisopropylamin in 1 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid 30 min voraktiviert. Die Lösung des Aktivesters wird anschließend zu 31 mg (8.99 μmol) des Peptids **159** gegeben. Man spült mit 1 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid nach und rührt die Lösung 16 h bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wird i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (111 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kdestilliert. Das erhaltene partiell geschützte rohe Peptid wird anschließend 70 min in einer Mischung aus 8.0 ml Trifluoressigsäure, 1.0 ml Triisopropylsilan und 1.0 ml destilliertem Wasser bei Raumtemp. gerührt. Im Anschluss wird mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (83 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kdestilliert. Die Reinigung des Lipopeptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 22.18 - 27.36$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-7). Ausbeute: 24 mg (5.5 μmol , 62 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -82.7$ ($c = 1.00$, H₂O).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (D₂O): $[\delta/\text{ppm}] = 8.61$ (s, 1H, H_{2AR}-His), 7.31 (s, 1H, H_{4AR}-His), CH-Glyceryl {^{*}}, Cys ^{α} {^{*}}, 4.84 (m_c, 1H, H1-GalN), 4.72 –

4.13 (m, 30H, His^α {4.69}, Pro₁^α {4.68}, Asp^α {4.66}, Arg^α {4.59}, Ala₂^α {4.58}, Ser_{ST}^α {4.58}, Ala₃^α {4.56}, Ala₄^α {4.55}, Ser₄^α {4.54}, Thr₂^α {4.46}, OCH_{2a}-Glyceryl {^{*}}, Thr₃^α {4.43}, H1-Gal' {4.42}, Pro_(2,3)^α {4.39}, Pro₄^α {4.38}, Pro₅^α {4.36}, Thr₁^α {4.35}, Ser₂^α {4.33}, Lys₄^α {4.30}, H2-GalN {4.27}, Lys₃^α {4.27}, Lys₂^α {4.24}, Lys₁^α {4.22}, Ala₁^α {4.21}, Thr₁^β {4.21}, Val^α {4.21}, Ser₁^α {4.20}, Thr₂^β {4.20}, Thr₃^β {4.19}), 4.12 – 3.40 (m, 52H, H_{9a}-Sia {4.08, dd, 1H, ³J_{H_{9a},H₈} = 3.7 Hz, ²J_{H_{9a},H_{9b}} ≈ 13.4 Hz, H_{9a}-Sia}, OCH_{2b}-Glyceryl {^{*}}, Gly_(1,2,3)^α {4.02 – 3.94}, H3-GalN {3.97}, H4-GalN {3.97}, Ser₁^{βab} {3.89}, Ser₂^{βa} {3.89}, H4-Gal' {3.86}, Ser₂^{βb} {3.86}, H_{6a}-GalN {3.85}, H5-GalN {3.84}, Ser₄^{βab} {3.84}, Ser₃^{βab} {3.82}, H_{6a}-Gal' {3.80}, Pro_(1,2)^δ {3.80}, H5-Sia {3.78}, H3-Spa {3.77}, H_{9b}-Sia {3.76}, H8-Spa {3.73}, H6-Sia {3.68}, H6-Spa {3.67}, H4-Sia {3.64}, Pro₃^δ {3.63}, H5-Spa {3.63}, H5-Gal' {3.60}, H_{6b}-GalN {3.60}, H3-Gal' {3.58}, Pro_(4,5)^δ {3.58}, H_{6b}-Gal' {3.56}, H7-Sia {3.52}, Cys^{βa} {3.50^{**}}, H2-Gal' {3.48}, H8-Sia {3.47}), 3.26 (m_c, 1H, His^{βa}), 3.20 – 3.11 (m, 6H, Arg^δ {3.19}, H9-Spa {3.19}, Cys^{βb} {3.18^{**}}, His^{βb} {3.18}), 3.04 – 2.90 (m, 8H, Lys_(1,2,3,4)^ε {2.97}), 2.88 – 2.80 (m, 2H, Asp^{βa} {2.85}, Asp^{βb} {2.82}), SCH₂-Glyceryl {^{*}}, 2.73 – 2.66 (m_c, 1H, H_{3aq}-Sia {2.70}), 2.59 (m_c, 2H, H2-Spa), 2.38 – 1.06 (m, 161H, 3 x CH₂^α-Pam {^{*}}, Pro₁^{βa} {2.34}, Pro_(2,3)^{βa} {2.28}, Pro_(4,5)^{βa} {2.24}, Val^β {2.09}, 1.99, 1.97 (2 x CH₃-Ac), Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.00}, Pro₄^{βb} {2.00}, Pro_(2,3)^{βb} {1.93}, Pro₁^{βb} {1.87}, Pro₅^{βb} {1.85}, Lys_(1,2,3,4)^{βab} {1.78}, 3 x CH₂^β-Pam {^{*}}, Arg^{βab} {1.74}, Arg^γ {1.66}, Lys_(1,2,3,4)^δ {1.66}, H_{3ax}-Sia {1.64}, Lys_(1,2,3,4)^γ {1.42}, 3 x (CH₂)₁₁ {^{*}}, Ala_(3,4)^β {1.34}, Ala₂^β {1.32}, Ala₁^β {1.31}, 3 x C15-Pam {1.24}, Thr₃^γ {1.19}, Thr₂^γ {1.18}, Thr₁^γ {1.16}), 0.96 – 0.80 (m, 15H, Val^{γab} {0.93}, 3 x CH₃-Pam (m, 9H, {0.84})).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (D₂O): [δ/ppm] = 176.11, 174.99, 174.74, 174.68, 174.46, 174.45, 174.10, 174.05, 173.14, 172.25, 172.02, 171.84, 171.54, 171.20, 171.03 (C=O), 156.64 (C=N-Guan), 133.46 (C2-Imidazol), 128.20 (C5-Imidazol), 117.35 (C4-Imidazol), 104.74 (C1-Gal'), ^{*} (C2-Sia), 97.93 (C1-GalN), 77.26 (C3-GalN), 74.92 (C5-Gal'), 72.51 (C3-Gal'), 72.43 (C6-Sia), 72.39 (C8-Sia), 71.73 (C5-GalN), 70.60 (C2-Gal'), ^{*} (CH-Glyceryl), 69.51 (C6-Spa), 69.50 (C4-GalN), 69.41 (C5-Spa), 68.58 (C4-Gal'), 68.12 (C7-Sia), 67.91 (C4-Sia), 67.03 (Thr_(1,2,3)^β), ^{*} (Ser_{ST}^β), 66.73 (C8-Spa), 66.53 (C3-Spa), 63.77 (C9-Sia), 63.41 (C6-Gal'), ^{*} (CH₂-Glyceryl), 62.69 (C6-GalN), 61.73 (Ser_(1,2,4)^β), 60.57 (Pro_(2,3,4)^α), 60.05 (Pro₅^α), 59.43 (Val^α), 59.02 (Thr₃^α), 58.93 (Thr₁^α), 58.65 (Pro₁^α), 58.65 (Thr₂^α), 55.35 (Ser₄^α), 53.75 (Lys_(1,2,3,4)^α), 53.75 (Ser₁^α), 53.47 (Ser₂^α), 53.25 (Ser_{ST}^α), 52.25 (His^α), ^{*} (Cys^α), 51.86 (C5-Sia), 51.12 (Arg^α), 50.81 (Asp^α), 49.60 (Ala₁^α), 48.10 (C2-GalN), 47.75 (Pro_(1,2)^δ), 47.67 (Pro_(3,4,5)^δ), 47.64 (Ala_(2,3)^α), 47.56 (Ala₄^α), 42.40 (Gly_(1,2,3)^α), 40.57 (C3-Sia), 40.48 (Arg^δ), 40.48 (C9-Spa), 40.47^{} (Cys^β), 39.14 (Lys_(1,2,3,4)^ε), ^{*}**

(C2-Pam, NHCO), 36.46 (Asp^β), 35.68 (C2-Spa), * (2 x C2-Pam), * (SCH₂-Glyceryl), * (3 x C14-Pam), 30.61 (Arg^β), 30.15 (Val^β), 29.35 (Pro_(1,2,3,4,5)^β), 27.39 (Lys_(1,2,3,4)^β), 26.33 (Lys_(1,2,3,4)^δ), 26.24 (His^β), * (3 x (C4 – C13-Pam), * (C3-Pam), * (2 x C3-Pam), 24.65 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 23.99 (Arg^γ), 22.21, 22.08 (2 x CH₃-Ac), * (3 x C15-Pam), 22.12 (Lys_(1,2,3,4)^γ), 18.87 (Thr₁^γ), 18.76 (Thr_(2,3)^γ), 18.24, 17.81 (Val^{γab}), 16.22 (Ala₁^β), 15.41 (Ala₂^β), 15.40 (Ala_(3,4)^β), 13.94 (3 x C16-Pam).

* Werte konnten aufgrund der beschränkten Löslichkeit nicht ermittelt werden.

Werte mit ** sind mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2178.16$ ($[M+2H+O_{Ox. Schwefel}]^{2+}$, ber.: 2178.23).

1452.44 ($[M+3H+O_{Ox. Schwefel}]^{3+}$, ber.: 1452.49).

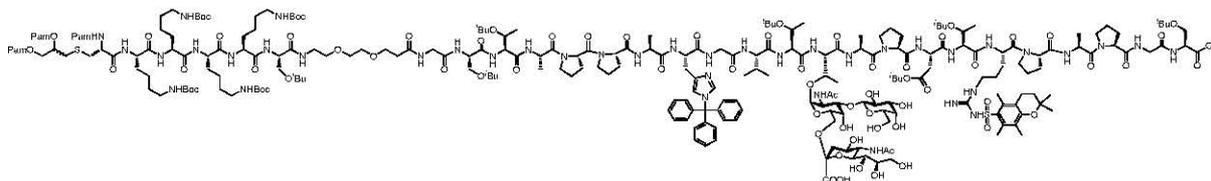
1089.46 ($[M+4H+O_{Ox. Schwefel}]^{4+}$, ber.: 1089.62).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1451.8159$ ($[M+3H+O_{ox. Schwefel}]^{3+}$, ber.: 1451.8214).

C₁₉₈H₃₄₂N₄₀O₆₄S (4339.13)

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-*L*-cystyl-*L*-seryl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*N*^{1m}-trityl-*L*-histidyl-glycyl-*L*-valyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(β-*D*-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-*D*-glycero-α-*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]-α-*D*-galactopyranosyl]-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-*O*-*tert*-butyl-serin (197)**

(Pam₃Cys-Ser(^tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CO-Gly-Ser(^tBu)-Thr(^tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(^tBu)-Thr[α-3-(β-Gal)-(α-NeuNAc-COOH-(2-6))-α-GalNAc]-Ala-Pro-Asp(O^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



64.7 mg (32.90 μmol, 1.70 Äquiv.) Pam₃Cys-Ser(O^tBu)-(Lys(Boc))₄-OH (**190**) werden mit 14.5 mg (38.13 μmol, 1.97 Äquiv.) HATU, 5.5 mg (40.41 μmol, 2.09 Äquiv.) HOAt, 9.5 mg (73.50 μmol, 3.80 Äquiv.) *N*-Ethyl-diisopropylamin in 1 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid 30 min voraktiviert. Die Lösung des Aktivesters wird anschließend zu 67 mg (19.34 μmol) des partiell geschützten Glycopeptids **160** gegeben. Es wird mit 1 ml absol.

N,N-Dimethylformamid nachgespült und die Lösung 16 h bei Raumtemp. gerührt. Das Rohprodukt wird i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (161 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Das erhaltene vollgeschützte rohe Peptid wird anschließend mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und ohne weitere Charakterisierung der nächsten Stufe unterworfen. $R_t = 27.20 - 31.00$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-5).

Ausbeute: 56 mg (10.3 μmol , 53 %); farbloses Lyophilisat.

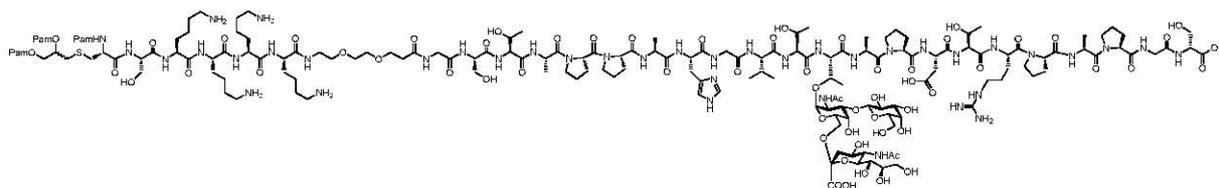
ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2707.10$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 2707.12).

1805.05 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1805.08).

$C_{261}H_{450}N_{40}O_{75}S_2$ (5412.72)

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-*L*-cystyl-*L*-seryl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-histidyl-glycyl-*L*-valyl-*L*-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-serin (198)**

(Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CO-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Thr[α -3-(β -Gal)-(α -NeuNAcCOOH-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



Das gereinigte, partiell geschützte Lipopeptid **197** wird in einer Mischung aus 8.0 ml Trifluoressigsäure, 1.0 ml Triisopropylsilan und 1.0 ml destilliertem Wasser 70 min bei Raumtemp. gerührt. Im Anschluss wird mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (75 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 25.50 - 31.10$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-7).

Ausbeute: 29 mg (6.7 μmol , 34 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -78.6$ ($c = 1.00$, H₂O).

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2177.20$ ($[M+2H]^+$, ber.: 2177.24).

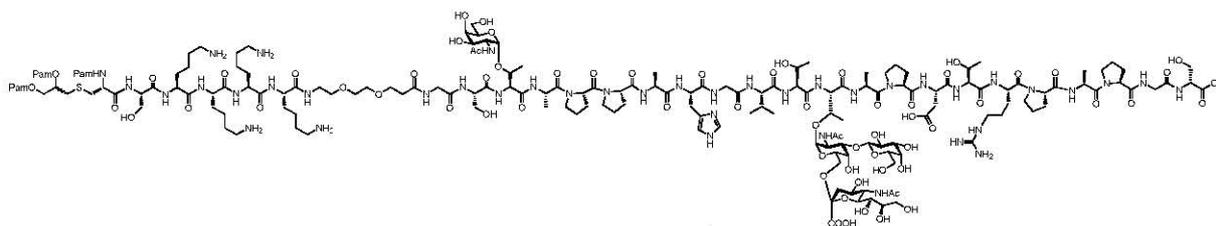
1451.81 ($[M+3H]^+$, ber.: 1451.81).

1088.98 ($[M+4H]^+$, ber.: 1089.12).

$C_{199}H_{344}N_{40}O_{64}S$ (4353.16)

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-*L*-cystyl-*L*-seryl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-9-amido-4,7-dioxanonanilamido-*N*-glycyl-*L*-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-histidyl-glycyl-*L*-valyl-*L*-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(β -*D*-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -*D*-galactopyranosyl]-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-serin (199)**

(Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CO-Gly-Ser-Thr(α -GalNAc)-Ala-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Thr[α -3-(β -Gal)-(α -NeuNAcCOOH-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



28.1 mg (14.29 μ mol, 1.70 Äquiv.) Pam₃Cys-Ser(O^tBu)-(Lys(Boc))₄-OH (**190**) werden mit 7.0 mg (18.41 μ mol, 2.19 Äquiv.) HATU, 2.5 mg (18.37 μ mol, 2.19 Äquiv.) HOAt und 4.0 mg (30.90 μ mol, 3.68 Äquiv.) *N*-Ethyl-diisopropylamin in 0.5 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid 30 min voraktiviert. Die Lösung des Aktivesters wird anschließend zu 30 mg (8.40 μ mol) des Peptids **161** gegeben. Man spült mit 0.5 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid nach und rührt die Lösung 16 h bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wird i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (71 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Das erhaltene partiell geschützte rohe Lipopeptid wird anschließend in einer Mischung aus 8.0 ml Trifluoressigsäure, 1.0 ml Triisopropylsilan und 1.0 ml destilliertem Wasser 70 min bei Raumtemp. gerührt. Im Anschluss wird mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (80 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Lipopeptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 22.0 - 26.5$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-7).

Ausbeute: 23 mg (5.1 μ mol, 61 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -89.7$ ($c = 1.00$, H₂O).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (D₂O): $[\delta/ppm] = 8.60$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), 7.30 (s, 1H, H_{4Ar}-His), CH-Glyceryl {^{*}}, 4.92 – 4.85 (m, 2H, H1-GalN^{TN} {4.89}, H1-GalN^{2,6-ST} {4.88}), 4.72 – 4.42 (m, 15H, His ^{α} {4.69}, Asp ^{α} {4.68}, Ser₃ ^{α} {4.62}, Arg ^{α} {4.60}, Pro₅ ^{α} {4.60}, Cys ^{α} {4.56^{*}}, Thr₂ ^{α} {4.55}, Ala_(2,3,4) ^{α} {4.54}, Thr_{2,6-ST} ^{α} {4.53}, Thr ^{α} _{TN} {4.52}, Ser_(1,2) ^{α} {4.47}, OCH_{2a}-Glyceryl {^{*}}, 4.42 – 4.12 (m, 17H, H1-Gal' {4.39}, Pro₄ ^{α}

{4.39}, Pro_(2,3)^α {4.37}, Pro₁^α {4.32}, Thr_{2,6-ST}^β {4.30}, Thr₁^α {4.27}, Thr_{TN}^β {4.27}, Lys_(1,2,3,4)^α {4.22}, Ala₁^α {4.20}, Val^α {4.20}, H₂-GalN^{2,6-ST} {4.18}, Thr₁^β {4.17}, Thr₂^β {4.15}), 4.12 – 3.41 (m, 56H, H_{9a}-Sia {4.08, dd, 1H, ³J_{H_{9a},H₈} = 3.7 Hz, ²J_{H_{9a},H_{9b}} ≈ 13.2 Hz, H_{9a}-Sia}, OCH_{2b}-Glyceryl {^{*}}, H₂-GalN^{TN} {4.05}, Gly_(1,2,3)^α {4.01 – 3.87}, H₃-GalN^{2,6-ST} {3.95}, Ser_(1,2)^{βa} {3.94}, H₄-GalN^{2,6-ST} {3.86}, Ser_(1,2)^{βb} {3.85}, H₅-GalN^{2,6-ST} {3.84}, H_{6a}-GalN^{2,6-ST} {3.84}, H₅-GalN^{TN} {3.84}, Ser₃^{βab} {3.84}, H₄-Gal' {3.83}, H₃-GalN^{TN} {3.81}, H₄-GalN^{TN} {3.81}, Pro_(4,5)^δ {3.79}, H₅-Sia {3.78}, H_{9b}-Sia {3.76}, H_{6a}-GalN^{TN} {3.74}, H₃-Spa {3.74}, H₈-Spa {3.73}, H_{6a}-Gal' {3.72}, H₆-Sia {3.68}, H₆-Spa {3.66}, H₄-Sia {3.64}, Pro_(2,3)^δ {3.63}, H₅-Spa {3.62}, H₅-Gal' {3.60}, H_{6b}-GalN^{TN} {3.60}, H_{6b}-GalN^{2,6-ST} {3.59}, Pro₁^δ {3.57}, H_{6b}-Gal' {3.57}, H₃-Gal' {3.56}, H₇-Sia {3.51}, H₂-Gal' {3.46}, H₈-Sia {3.46}, Cys^{βa} {3.45^{**}}, 3.29 (m_c, 1H, His^{βa}), 3.20 – 3.11 (m, 5H, Arg^δ {3.17}, H₉-Spa {3.17}, Cys^{βb} {3.16^{**}}, His^{βb} {3.16}), 3.01 – 2.82 (m, 12H, Lys_(1,2,3,4)^ε {2.95}), Asp^{βa} {2.92}, Asp^{βb} {2.87}, SCH₂-Glyceryl {^{*}}), 2.68 – 2.63 (m, 1H, H_{3aq}-Sia {2.66}), 2.62 – 2.54 (m, 2H, H₂-Spa {2.59}), 2.40 – 1.00 (m, 167H, 3 x CH₂^α-Pam {^{*}}, Pro₅^{βa} {2.29}, Pro₄^{βa} {2.27}, Pro₁^{βa} {2.26}, Pro_(2,3)^{βa} {2.23}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.09 – 1.92}, Val^β {2.07}, 2.01, 1.99, 1.96 (3 x CH₃-Ac), Pro₄^{βb} {1.93}, Pro₂^{βb} {1.92}, Pro₁^{βb} {1.87}, Pro₃^{βb} {1.83}, Pro₅^{βb} {1.82}, Lys_(1,2,3,4)^{βa} {1.81}, Lys_(1,2,3,4)^{βb} {1.73}, 3 x CH₂^β-Pam {^{*}}, Arg^{βab} {1.70}, Arg^γ {1.64}, Lys_(1,2,3,4)^δ {1.64}, H_{3ax}-Sia {1.63}, Lys_(1,2,3,4)^γ {1.40}, 3 x (CH₂)₁₁ {^{*}}, Ala_(3,4)^β {1.32}, Ala_(1,2)^β {1.30}, 3 x C₁₅-Pam {1.24}, Thr_{TN}^γ {1.24}, Thr_{2,6-ST}^γ {1.21}, Thr₂^γ {1.20}, Thr₁^γ {1.14}), 0.97 – 0.73 (m, 15H, Val^{γab} {0.91}, 3 x CH₃-Pam {m, 9H, 0.83}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (D₂O): [δ/ppm] = 174.85, 174.76, 174.74, 174.69, 174.40, 174.36, 174.01, 173.91, 173.79, 173.61, 173.48, 173.44, 173.03, 172.57, 172.53, 172.44, 171.92, 171.86, 171.59, 171.33, 171.17, 171.13, 170.92, 170.59, 170.51 (C=O), 156.60 (C=N-Guan), 133.31 (C₂-Imidazol), 128.19 (C₅-Imidazol), 117.24 (C₄-Imidazol), 104.85 (C₁-Gal'), * (C₂-Sia), 98.95 (C₁-GalN^{TN}), 98.77 (C₁-GalN^{2,6-ST}), 77.28 (C₃-GalN^{2,6-ST}), 76.64 (Thr_{TN}^β), 75.95 (Thr_{2,6-ST}^β), 75.05 (C₅-Gal'), 72.61 (C₈-Sia), 72.59 (C₆-Sia), 72.56 (C₃-Gal'), 71.59 (C₅-GalN^{2,6-ST}), 71.59 (C₅-GalN^{TN}), 70.57 (C₂-Gal'), * (CH-Glyceryl), 69.60 (C₆-Spa), 69.41 (C₅-Spa), 68.60 (C₄-GalN^{TN}), 68.56 (C₄-Gal'), 68.55 (C₄-GalN^{2,6-ST}), 68.34 (C₃-GalN^{TN}), 68.26 (C₇-Sia), 68.16 (C₄-Sia), 67.20 (Thr₂^β), 66.85 (Thr₁^β), 66.75 (C₈-Spa), 66.55 (C₃-Spa), 63.83 (C₉-Sia), * (CH₂-Glyceryl), 63.55 (C₆-Gal'), 62.97 (C₆-GalN^{2,6-ST}), 61.53 (Ser_(1,2)^β), 61.39 (Ser₃^β), 60.85 (C₆-GalN^{TN}), 60.70 (Pro₄^α), 60.17 (Pro_(2,3)^α), 60.07 (Pro₁^α), 59.41 (Val^α), 58.98 (Thr₁^α), 58.60 (Thr₂^α), 58.54 (Thr_{2,6-ST}^α), 58.32 (Pro₅^α), 56.98 (Thr_{TN}^α), 55.51 (Ser_(1,2)^α), 55.06 (Ser₃^α), 55.01^{} (Cys^α), 53.67 (Lys_(1,2,3,4)^α),**

52.33 (His^α), 51.89 (C5-Sia), 51.11 (Arg^α), 50.09 (Asp^α), 49.51 (Ala^α), 49.49 (C2-GalN^{TN}), 48.39 (C2-GalN^{2.6-ST}), 47.81 (Pro_(4,5)^δ), 47.79 (Pro₁^δ), 47.69 (Pro_(2,3)^δ), 47.54 (Ala_(2,3,4)^α), 43.59** (Cys^β), 42.33 (Gly_(1,2,3)^α), 40.54 (Arg^δ), 40.48 (C9-Spa), 40.14 (C3-Sia), 39.14 (Lys_(1,2,3,4)^ε), * (C2-Pam, NHCO), 35.70 (C2-Spa), 35.23 (Asp^β), * (2 x C2-Pam), * (SCH₂-Glyceryl), * (3 x C14-Pam), 30.66 (Arg^β), 30.30 (Val^β), 29.32 (Pro_(1,2,3,4,5)^β), 27.47 (Lys_(1,2,3,4)^β), 26.41 (His^β), 26.21 (Lys_(1,2,3,4)^δ), * (3 x (C4 – C13-Pam)), * (C3-Pam), * (2 x C3-Pam), 24.70 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 24.02 (Arg^γ), 22.42, 22.22, 22.17 (3 x CH₃-Ac), * (3 x C15-Pam), 22.08 (Lys_(1,2,3,4)^γ), 18.91 (Thr₁^γ), 18.72 (Thr₂^γ), 18.72 (Thr_{2.6-ST}^γ), 18.56 (Thr^γ_{TN}), 17.94 (Val^{γab}), 15.98 (Ala_(1,2)^β), 15.36 (Ala_(3,4)^β), 13.89 (3 x C16-Pam).

* Werte konnten aufgrund der beschränkten Löslichkeit nicht ermittelt werden.

Werte mit ** sind mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2286.74$ ($[M+MeCN+2H+O_{Ox. Schwefel}]^{2+}$, ber.: 2286.78).

1524.83 ($[M+MeCN+3H+O_{Ox. Schwefel}]^{3+}$, ber.: 1524.86).

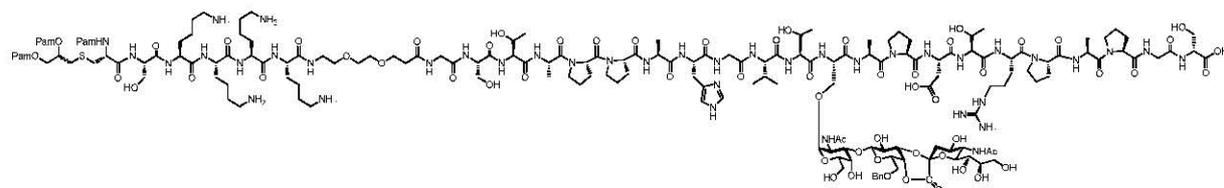
1143.75 ($[M+MeCN+4H+O_{Ox. Schwefel}]^{4+}$, ber.: 1143.89).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1524.1851$ ($[M+MeCN+3H+O_{Ox. Schwefel}]^{3+}$, ber.: 1524.1863).

C₂₀₅H₃₅₄N₄₀O₆₉S (4515.30)

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-*L*-cystyl-*L*-seryl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-9-amido-4,7-dioxanonanylamido-*N*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-histidyl-glycyl-*L*-valyl-*L*-threonyl-*O*-[2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-(6-*O*-benzyl-3-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]-(1_{NeuNAc}→4_{Gal}-lacton)- β -*D*-galactopyranosyl)- α -*D*-galactopyranosyl]-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-serin (200)**

(Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser[α -NeuNAcCOOH-(2-3)-(1_{NeuNAc}→4_{Gal}-lacton)-(β -6-*O*-BnGal)- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



30.2 mg (15.33 μ mol, 2.00 Äquiv.) Pam₃Cys-Ser(O^tBu)-(Lys(Boc))₄-OH (**190**) werden mit 7.3 mg (19.20 μ mol, 2.5 Äquiv.) HATU, 2.7 mg (19.84 μ mol, 2.59 Äquiv.) HOAt, 4.5 mg (34.80 μ mol, 4.54 Äquiv.) *N*-Ethyl-diisopropylamin in 1.0 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid 30 min voraktiviert. Die Lösung des Aktivesters wird anschließend zu 29 mg (7.67 μ mol) des

Peptids **162** gegeben. Man spült mit 0.5 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid nach und rührt die Lösung 16 h bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wird i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (73 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Das erhaltene partiell geschützte, rohe Lipopeptid wird anschließend in einer Mischung aus 8.0 ml Trifluoressigsäure, 1.0 ml Triisopropylsilan und 1.0 ml destilliertem Wasser 70 min bei Raumtemp. gerührt. Im Anschluss wird mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (83 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Lipopeptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 26.00 - 29.60$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-7).

Ausbeute: 22 mg (3.8 μmol , 45 %); farbloses Lyophilisat.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2161.22$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 2161.23).

1441.17 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1441.16).

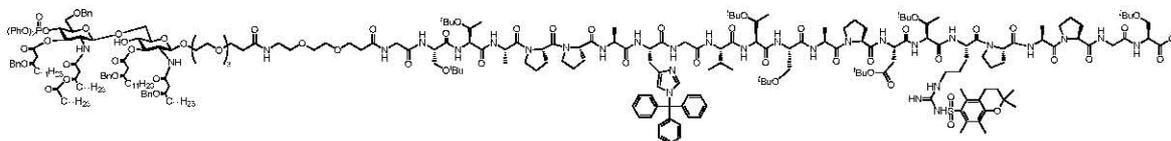
1081.00 ($[M+4H]^{4+}$, ber.: 1081.12).

$\text{C}_{198}\text{H}_{340}\text{N}_{40}\text{O}_{63}\text{S}$ (4321.11)

5.11.3 Die Synthese von MUC1-Glycopeptid-Glycophosphorlipid-Konjugaten (AS595)

4,7,10,12-Tetraoxadodecanoyl-(6-*O*-[4-(diphenylphosphat)-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-((*R*)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosid)-9-amino-4,7-dioxanonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{lm}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (201)

(β -6-[β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((*R*)-3-(dodecanoyloxy)tetradecanoyl)]-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-O-Spa-COHN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^tBu)-Thr(^tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(^tBu)-Ser(^tBu)-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



39.6 mg (17.79 μ mol, 1.10 Äquiv.) AS595-Spa-CO₂H (**136**) werden mit 9.0 mg (23.67 μ mol, 1.46 Äquiv.) HATU, 4.0 mg (29.40 μ mol, 1.82 Äquiv.) HOAt und 4.0 mg (39.50 μ mol, 2.45 Äquiv.) NMM in 1 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid 30 min bei Raumtemp. voraktiviert. Die Lösung des Aktivesters wird anschließend zu 50.0 mg (16.17 μ mol) des partiell geschützten Peptids **148** gegeben. Man spült viermal mit 0.5 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid nach und rührt die Lösung 24 h bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wird i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und anschließend lyophilisiert. Die Reinigung des rohen Peptids (105 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 32.18$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-5).

Ausbeute: 46 mg (8.7 μ mol, 54 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -15.6$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 8.18$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), 7.87 (m_c, 1H, NH-Ala₄), 7.50 (m_c, 1H, NH-Thr₂), NH-Gly₁ { * }, NH-Gly₂ { * }, NH-Gly₃ { * }, NH-Ser₁ { * }, NH-Ser₂ { * }, NH-Ser₃ { * }, NH-Thr₁ { * }, NH-Ala₁ { * }, NH-Ala₂ { * }, NH-Ala₃ { * }, NH-His { * }, NH-Val { * }, NH-Asp { * }, NH-Arg { * }, 7.44 – 7.36 (m, 10H, H_{meta}-Trt { 7.40 }, H_{para}-Trt

{7.40}, NH-Thr₃ {7.36}), 7.34 – 7.19 (m, 24H, H_{Ar}-Ph), 7.19 – 7.05 (m, 13H, H_{Ar}-Ph, NH-Spa {7.11}, H_{ortho}-Trt {7.08}), 7.00 – 6.96 (sb, 1H, H_{4Ar}-His {6.98}), 6.93 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 9.8 Hz, NH-GlcN^I), NH-GlcN^{II} { * }, 5.47 (t, 1H, ³J_{H3,H2} ≈ ³J_{H3,H4} = 10.2 Hz, H3-GlcN^{II}), 5.08 – 4.99 (m, 2H, H_{3-II}^{II} {5.05}, H3-GlcN^I {5.01}), 4.91 (d, 1H, ³J_{H1,H2} = 7.7 Hz, H1-GlcN^{II}), 4.77 (q, 1H, ³J_{H4,H3} ≈ ³J_{H4,H5} ≈ 9.8 Hz, H4-GlcN^{II}), 4.68 – 4.12 (m, 28H, Ala₄^α {4.67}, Asp^α {4.66}, Ala₁^α {4.62}, Val^α {4.60}, Ser₂^α {4.56}, Ala₂^α {4.55}, Ser₃^α {4.53}, CH₂-Bn {4.52}, Pro₅^α {4.50}, Pro₄^α {4.49}, CH₂-Bn {4.47}, Pro₃^α {4.45}, His^α {4.44**}, Arg^α { * }, H1-GlcN^I {4.43}, Pro_(1,2)^α {4.42}, Ser₁^α {4.39}, Bn-CH₂-O {4.37}, CH₂-Bn {4.33}, Thr₃^α {4.31}, Thr₂^α {4.28}, Thr₁^α {4.25}, Thr₃^β {4.20}, Ala₃^α {4.18}, Thr_(1,2)^β {4.14}), 4.11 – 3.88 (m, 8H, Gly₁^α {4.10}, H_{6a}-GlcN^I {4.05}, Gly_(2,3)^α {3.95}, H2-GlcN^I {3.91}), 3.87 – 3.15 (m, 48H, Ser₃^{βa} {3.84}, H_{3-I}^I {3.83}, H_{3-II}^I {3.82}, H_{6b}-GlcN^I {3.77}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.75 – 3.48}, Ser_(1,2)^{βa} {3.74}, Ser₃^{βb} {3.73}, H3-Spa {3.73}, H8-Spa {3.71}, H5-GlcN^{II} {3.71}, H3-Spa^{II} {3.71}, H_{3-I}^{II} {3.70}, CH₂-Spa^{II} {3.64}, H_{6a}-GlcN^{II} {3.64}, H2-GlcN^{II} {3.61}, CH₂-Spa^{II} {3.59}, H6-Spa {3.59}, H5-Spa {3.57}, H4-GlcN^I {3.57}, CH₂-Spa^{II} {3.57}, Ser₂^{βb} {3.56}, H_{6b}-GlcN^{II} {3.55}, CH₂-Spa^{II} {3.50}, Ser₁^{βb} {3.47}, His^{βa} {3.46}, CH₂-Spa^{II} {3.45}, H5-GlcN^I {3.40}, CH₂-Spa {3.39}, H9-Spa {3.37}, His^{βb} {3.19}), 2.85 – 2.20 (m, 24H, Asp^{βa} {2.80}, Asp^{βb} {2.73}, H_{2a-I}^I {2.64}, H4-Pmc {2.63}, H_{2a-I}^{II} {2.53}, H2-Spa {2.53}, CH₃-Pmc {2.53}, CH₃-Pmc {2.52}, H_{2b-I}^{II} {2.46}, H2-Spa {2.44}, H_{2b-I}^I {2.43}, H_{2a-II}^I {2.36}, H_{2b-II}^I {2.28}, H_{2a-II}^{II} {2.28}, CH_{16-II}^{II}-CO₂ {2.27}, H_{2b-II}^{II} {2.23}), 2.15 – 1.70 (m, 28H, Val^β {2.16}, Pro_(1,2,3,4,5)^β {2.12 – 1.89}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.12 – 1.88}, H9a-Pmc {2.09}, 1.81 (t, ³J_{H3-Pmc,H4-Pmc} = 6.8 Hz, H3-Pmc), Arg^β { * }, 1.64 – 0.99 (m, 190H, H_{17-II}^{II}-CO₂, {1.57}, H_{4-I}^I {1.52}, H_{4-II}^{II} {1.50}, H_{4-II}^I {1.48}, H_{4-I}^{II} {1.46}, 1.41 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.38 – 0.98 (m, (CH₂)₄₄), Ala₄^β {1.36}, Arg^γ {1.33**}, Ala₃^β {1.32}, 1.30 (sb, 6H, H2a-Pmc), Ala₂^β {1.28}, Ala₁^β {1.26}, 1.23 (2 x s, 18H, CH₃-^tBu), 1.20 (2 x s, 18H, CH₃-^tBu), 1.16 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.12 (s, 9H, CH₃-^tBu), Thr_(2,3)^γ {1.07}, Thr₁^γ {1.03}), 0.97 – 0.82 (m, 21H, Val^{γab} {0.92}, H_{14-I}^I, H_{14-II}^I, H_{14-I}^{II}, H_{14-II}^{II}, H_{26-II}^{II} {0.87}).

100.6 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = * (C7-Pmc), * (6 x C_{ipso}-Ph), * (3 x C_{ipso}-Trt), * (C10-Pmc), * (C5-Pmc), * (C2-Imidazol), * (C5-Imidazol), 129.94 (C_{o,m,p}-Ph), 129.85 (C_{ortho}-Trt), 129.67, 129.40 (C_{o,m,p}-Ph), 129.29 (C_{meta}-Trt, C_{para}-Trt), 128.95, 128.85, 128.53, 128.51, 128.49, 128.48, 128.43, 128.41, 128.05, 127.89, 127.86, 127.84, 127.73, 127.71, 127.68, 127.64, 125.69, 120.35, 120.34, 120.31, 120.29 (C_{o,m,p}-Ph), * (C4-Imidazol), * (C6-, C8-Pmc), 102.14 (C1-GlcN^I), 101.32 (C1-GlcN^{II}), * (C-^tBu), * (C_{qua}-Trt), 76.16 (C_{3-I}^I,

C_{3-II}^I , 75.64 (C_{3-I}^{II}), 75.54 ($C3-GlcN^I$), 75.03 ($C4-GlcN^{II}$), 74.94 ($C5-GlcN^I$), * ($C2-Pmc$),
 73.94 ($C5-GlcN^{II}$), 73.66 ($Bn-CH_2-O$), 72.53 ($C3-GlcN^{II}$), 71.34, 71.31, 71.23 (3 x CH_2-Bn),
 71.00 (C_{3-II}^{II}), 70.75, 70.36, 70.35, 70.32 (4 x CH_2-Spa^{II}), 70.32 ($C5-Spa^I$), 70.24 ($C6-Spa^I$),
 70.24, 70.16 (2 x CH_2-Spa^{II}), 68.52 ($C6-GlcN^{II}$), 68.48 ($C6-GlcN^I$), 67.32 ($C3-Spa^{II}$), 67.32
 ($C3-Spa^I$, $C8-Spa^I$), 67.25** ($C4-GlcN^I$), 66.60 (Thr_3^β), 66.59 ($Thr_{(1,2)}^\beta$), 61.57 (Ser_3^β), 61.50
 (Ser_2^β), 61.44 (Ser_1^β), 61.05 (Pro_5^α), 61.04 (Pro_3^α), 61.00 ($Pro_{(1,2)}^\alpha$), 60.99 (Pro_4^α), 59.65
 (Val^α), 59.01 (Thr_1^α), 58.99 (Thr_2^α), 58.92 (Thr_3^α), 55.83 ($C2-GlcN^{II}$), 54.13** (His^α), 54.13**
 (Ser_1^α), 53.96 ($C2-GlcN^I$), 53.86 (Ser_3^α), 53.42 (Ser_2^α), 50.96 (Ala_1^α), 50.92 (Ala_3^α), 50.86
 (Ala_4^α), * (Arg^α), * (Asp^α), 47.88 (Ala_2^α), 47.75 ($Pro_{(1,2,3,4,5)}^\delta$), 43.56 ($Gly_{(2,3)}^\alpha$), 43.43 (Gly_1^α),
 41.75 (C_{2-II}^{II}), 41.70 (C_{2-II}^I), * (Arg^δ), 39.66 (C_{2-I}^I), 39.40 ($C9-Spa^I$), 39.06 (C_{2-I}^{II}), 36.77
 ($C2-Spa^I$), 36.75 ($C2-Spa$), 37.31** (Asp^β), 34.68 (CH_{16-II}^{II}), 34.61 (C_{4-I}^I , C_{4-II}^I , C_{4-I}^{II} , C_{4-II}^{II}),
 33.07 ($C3-Pmc$), 32.26 (4 x $C12$, $C24$), 30.45 (Val^β), 30.04 (4 x ($C6 - C11$) + $C18 - C23$), *
 (Arg^β), 28.91 ($Pro_{(1,2,3,4,5)}^\beta$), 28.45, 28.36, 28.28, 28.15, 27.81 (7 x CH_3-tBu), 27.05 (His^β),
 27.04 (2 x $C2a-Pmc$), 26.11, 26.09, 25.99, 25.53 (C_{5-I}^I , C_{5-II}^I , C_{5-I}^{II} , C_{5-II}^{II}), 25.47 ($Pro_{(1,2,3,4,5)}^\gamma$), *
 (Arg^γ), 25.10 (C_{17-II}^{II}), 22.99 (4 x $C13$, $C25$), 21.67 ($C4-Pmc$), 19.31 ($Val^{\gamma a}$), 19.11 ($Thr_{(2,3)}^\gamma$),
 19.06 (Thr_1^γ), 19.05 ($Val^{\gamma b}$), 18.33, 17.85 ($C6a-$, $C8a-Pmc$), 17.80 (Ala_1^β), 17.53 (Ala_2^β),
 17.17 (Ala_3^β), 17.07 (Ala_4^β), 14.58 (4 x $C14$, $C26$), 12.39 ($C9a-Pmc$).

* Werte konnten aufgrund der beschränkten Löslichkeit nicht ermittelt werden.

Werte mit ** sind mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2661.13$ ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 2661.06).

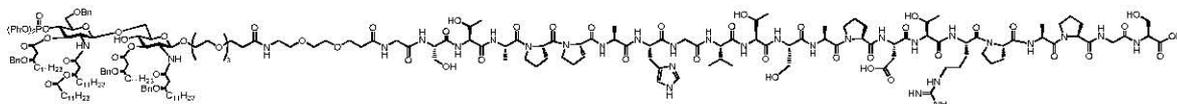
1774.09 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 1774.04).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1773.3751$ ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 1773.3720).

$C_{282}H_{433}N_{30}O_{62}PS$ (5298.66)

4,7,10,12-Tetraoxadodecanoyl-(6-O-[4-(diphenylphosphat)-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-2-((R)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosyl]-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-benzyloxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosid)-9-amino-4,7-dioxanonanylamido-N-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin (202)

(β-6-[β-4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((R)-3-(dodecanoyloxy)-tetradecanoyl]-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-O-Spa-COHN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



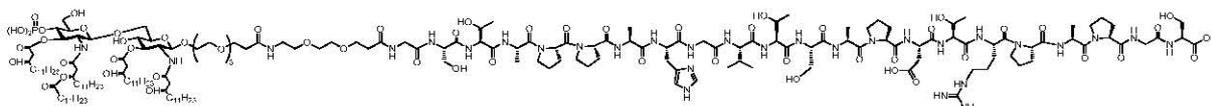
46 mg (8.7 μmol) des komplett geschützten Glycolipidkonjugates **201**, 12 mg Triethylsilan (103.0 μmol, 11.9 Äquiv.) und 5 ml Ameisensäure werden 7 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend verdünnt man mit 20 ml Toluol und entfernt die Ameisensäure sowie Toluol im Hochvakuum. Der Rückstand (37 mg) wird mit 20 ml Dioxan lyophilisiert.

Rohausbeute: 37 mg (8.4 μmol, 97 %); farbloses Lyophilisat.

C₂₂₁H₃₄₅N₃₀O₅₉P (4397.24)

4,7,10,12-Tetraoxadodecanoyl-(6-O-[4-phosphat-3-O-((R)-3-hydroxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosyl]-3-O-((R)-3-hydroxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-hydroxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosid)-9-Amino-4,7-dioxanonanylamido-N-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin (203)

(β-6-[β-4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(OH)tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(dodecanoyloxy)-tetradecanoyl]-3-((R)-3-(OH)tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(OH)tetradecanoyl)-O-Spa-COHN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



37 mg (8.41 μmol) des partiell deblockierten Glycolipidkonjugates **202** werden in einer Mischung aus 20.0 ml Tetrahydrofuran und 2.25 ml Essigsäure gelöst und mit 70 mg

Palladium (10 %) auf Aktivkohle versetzt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird 23 h bei 3 bar Wasserstoffatmosphäre und Raumtemp. gerührt. Danach wird die Wasserstoffatmosphäre gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über eine Kartusche mit Hyflo[®] filtriert. Es wird mehrmals mit reinem Ethylacetat und einem Toluol/Chloroform-Gemisch nachgespült. Der Rückstand wird einige Male mit Toluol kodestilliert und ohne Reinigung und Charakterisierung der nachfolgenden Reaktion unterworfen.

Ausbeute: 32 mg (7.9 μmol , 94 %); farbloses Wachs.

$\text{C}_{193}\text{H}_{321}\text{N}_{30}\text{O}_{59}\text{P}$ (4036.75)

32 mg (7.9 μmol) des rohen Glycolipidkonjugates **203a** werden in einer Mischung aus 2.25 ml Essigsäure, 20.0 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 30 mg Platin(IV)-oxid versetzt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Fluten mit Argon wird gründlich entgast. Der Ansatz wird 18 h bei 5 bar Wasserstoffatmosphäre und Raumtemp. gerührt. Danach wird die Wasserstoffatmosphäre gegen eine Argonatmosphäre ausgetauscht und die Mischung über einen Spritzenfilter filtriert. Der Filterkuchen mit dem elementaren Platin wird mit einer Mischung aus 42 ml Chloroform, 6 ml Methanol, 0.5 ml Triethylamin und 0.5 ml Wasser gewaschen. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal wiederholt, das Filtrat i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit und der Rückstand wird einige Male mit Toluol kodestilliert. Der farblose Rückstand (47 mg) wird anschließend mittels präparativer RP-HPLC gereinigt. $R_t = 49.65$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-7), $R_t = 39.12$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-5).

Ausbeute: 13 mg (3.4 μmol , 42 %); farbloses Lyophilisat.

NMR: Aufgrund von Unlöslichkeit nicht möglich, die Verbindung neigt zu Agglutination.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = \text{negativ}$

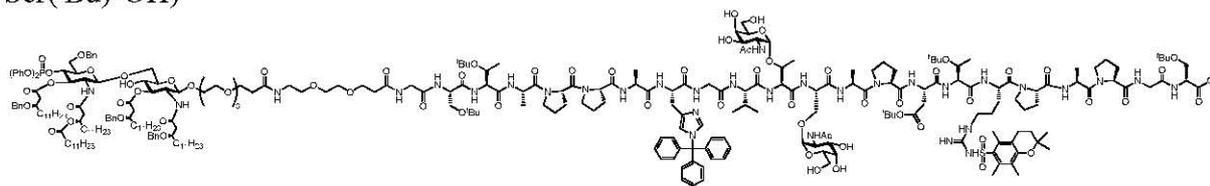
ESI-MS (negativ): $[m/z] = \text{negativ}$

MALDI-TOF (Sinapinsäure, positiv/negativ) = negativ

$\text{C}_{181}\text{H}_{313}\text{N}_{30}\text{O}_{59}\text{P}$ (3884.56)

4,7,10,12-Tetraoxadodecanoyl-(6-*O*-[4-(diphenylphosphat)-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-((*R*)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosid)-9-Amino-4,7-dioxanonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{Im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (204)

(β -6-[β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((*R*)-3-(dodecanoyloxy)-tetradecanoyl)]-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-*O*-Spa-COHN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^tBu)-Thr(^tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser(α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



77.0 mg (34.60 μ mol, 1.5 Äquiv.) AS595-Spa-CO₂H (**136**) werden mit 16.5 mg (43.40 μ mol, 1.88 Äquiv.) HATU, 6.2 mg (45.60 μ mol, 1.98 Äquiv.) HOAt und 10.0 mg (77.00 μ mol, 3.36 Äquiv.) *N*-Ethyl-diisopropylamin in 1 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid 40 min bei Raumtemp. voraktiviert. Die Lösung des Aktivesters wird anschließend zu 78.0 mg (23.04 μ mol) des Peptids **156** gegeben. Man spült zweimal mit 0.5 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid nach und rührt die Lösung 16 h bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wird i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und anschließend lyophilisiert. Die Reinigung des lipopeptids (246 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 50.5 - 56.5$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-7).

Ausbeute: 63 mg (11.3 μ mol, 49 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -4.7$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, HMBC, TOCSY] (CDCl₃): $[\delta/ppm] = 8.00$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), NH-Gly₁ { * }, NH-Gly₂ { * }, NH-Gly₃ { * }, NH-Thr₂ { * }, NH-Thr₃ { * }, NH-Ser₁ { * }, NH-Ser₂ { * }, NH-Ser₃ { * }, NH-Ala₁ { * }, NH-Ala₂ { * }, NH-Ala₃ { * }, NH-Ala₄ { * }, NH-His { * }, NH-Val { * }, NH-Asp { * }, NH-Arg { * }, 7.44 – 7.36 (m, 11H, H_{meta}-Trt {7.42}, H_{para}-Trt {7.42}, NH-Thr₁ {7.42} H_{4Ar}-His {7.41}), 7.33 – 7.20 (m, 24H, H_{Ar}-Ph), 7.20 – 7.03 (m, 13H, H_{Ar}-Ph, NH-Spa^I {7.13}, H_{ortho}-Trt {7.09}), 6.88 (d, 1H, ³J_{NH,H2} = 8.3 Hz, NH-GlcN^I),

6.58 – 6.49 (m, 1H, NH-GlcN^{II} {6.53}), 5.48 (t_p, 1H, $^3J_{H3,H2} \approx ^3J_{H3,H4} = 9.7$ Hz, H3-GlcN^{II}), 5.08 – 4.97 (m, 2H, H_{3-II}^{II} {5.06}, H3-GlcN^I {5.01}), 4.96 (d, 1H, $^3J_{H1,H2} = 7.7$ Hz, H1-GlcN^{II}), 4.83 (m_c, 1H, H1-GalN^{Thr}), 4.76 (dd, 1H, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H4,H5} = 9.1$ Hz, H4-GlcN^{II}), 4.68 – 4.14 (m, 31H, Ala_(1,2)^α {4.64}, Arg^α {4.64}, Ala₃^α {4.60}, Ser₃^α {4.60}, H1-GalN^{Ser} {4.60}, CH₂-Bn {4.54}, Pro₅^α {4.52}, Val^α {4.52}, Ala₄^α {4.51}, Pro₄^α {4.50^{**}}, Pro₃^α {4.47}, CH₂-Bn {4.46}, H1-GlcN^I {4.46}, Pro₂^α {4.43}, Thr₃^α {4.43^{**}}, Pro₁^α {4.37}, Bn-CH₂-O {4.37}, Ser₂^α {4.35}, CH₂-Bn {4.34}, Ser₁^α {4.25}, Thr_(1,2)^α {4.23}, Thr₂^β {4.23^{**}}, H2-GalN^{Ser} {4.20}, Thr₁^β {4.16}, Asp^α {^{*}}), 4.11 – 3.88 (m, 11H, H_{6a}-GlcN^I {4.08}, His^α {4.07^{**}}, Gly_(1,2,3)^α {4.04 – 3.93}, Thr₃^β {3.99}, H2-GlcN^I {3.95}, H3-GalN^{Ser} {3.93^{**}}), 3.88 – 3.18 (m, 62H, Ser₁^{βa} {3.88}, H_{3-I}^I {3.85}, H_{3-II}^I {3.85}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.85 – 3.47}, H_{6b}-GlcN^I {3.80}, Ser₁^{βb} {3.79}, H3-Spa^I {3.76}, H_{3-I}^{II} {3.76}, Ser₂^{βa} {3.74}, H5-GlcN^{II} {3.73}, H2-GalN^{Thr} {3.72}, H3-Spa^{II} {3.71}, H8-Spa^I {3.71}, H4-GlcN^I {3.62}, H_{6a}-GlcN^{II} {3.61}, H2-GlcN^{II} {3.60}, CH₂-Spa^{II} {3.60}, Ser₃^{βa} {3.60}, H5-Spa^I {3.60}, Ser₃^{βb} {3.57}, Ser₂^{βb} {3.55}, H_{6b}-GlcN^{II} {3.55}, CH₂-Spa^{II} {3.56^{**}}, H6-Spa^I {3.53}, CH₂-Spa^{II} {3.53}, CH₂-Spa^{II} {3.50^{**}}, CH₂-Spa^{II} {3.45}, H5-GlcN^I {3.41}, CH₂-Spa {3.41}, His^{βab} {3.40}, H9-Spa^I {3.38}, Arg^δ {3.22^{**}}, H3-GalN^{Thr} {^{*}}, H4-GalN^{Ser/Thr} {^{*}}, H5-GalN^{Ser/Thr} {^{*}}, H_{6ab}-GalN^{Ser/Thr} {^{*}}), 2.72 – 2.17 (m, 24H, H_{2a-I}^I {2.65}, Asp^{βa} {2.64}, H4-Pmc {2.64}, H_{2a-I}^{II} {2.56}, H2-Spa^I {2.55}, 2 x CH₃-Pmc {2.54}, H_{2b-I}^{II} {2.48}, H2-Spa^{II} {2.48}, H_{2b-I}^I {2.45}, Asp^{βb} {2.44}, H_{2a-II}^I {2.40}, H_{2a-II}^{II} {2.30}, CH_{16-II}^{II}-CO₂ {2.30}, H_{2b-II}^I {2.29}, H_{2b-II}^{II} {2.21}), 2.20 – 1.78 (m, 29H, Val^β {2.20}, Pro_(1,2,3,4,5)^β {2.20 – 1.87}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.15 – 1.85}, H9a-Pmc {2.12}, 2.03, 2.00 (2 x CH₃-Ac), 1.83 (t, 2H, $^3J_{H3-Pmc,H4-Pmc} = 6.7$ Hz, H3-Pmc), Arg^β {^{*}}), 1.72 – 1.06 (m, 172H, H_{17-II}^{II}-CO₂ {1.58}, H_{4-I}^I {1.57}, H_{4-I}^{II} {1.50}, H_{4-II}^I {1.48}, H_{4-II}^{II} {1.46}, 1.44 – 1.11 (m, (CH₂)₄₄), 1.44 (s, 9H, CH₃-^tBu), Ala₄^β {1.43}, Arg^γ {1.38}, Ala₃^β {1.37}, Ala₂^β {1.35}, 1.33 (m_c, 6H, H2a-Pmc), Ala₁^β {1.32}, Thr₃^γ {1.23}, 1.22 (2 x s, 18H, CH₃-^tBu), 1.20 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.14 (s, 9H, CH₃-^tBu), Thr_(1,2)^γ {1.12}), 1.05 – 0.86 (m, 21H, Val^{γab} {0.92}, H_{14-I}^I, H_{14-II}^I, H_{14-I}^{II}, H_{14-II}^{II}, H_{26-II}^{II} {0.93 – 0.86}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC, HMBC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 174.04, 173.52, 172.75, 172.24, 172.21, 172.06, 171.28, 170.99, 170.02 (C=O), 155.47 (C7-Pmc), 139.63 (3 x C_{ipso}-Trt), 136.52 (C10-Pmc), 135.86 (C5-Pmc), ^{*} (C5-Imidazol), 129.96, 129.95 (C_{o,m,p}-Ph), 129.61 (C2-Imidazol), 129.52 (3 x C_{ortho}-Trt), 129.42, 128.94, 128.55, 128.48 (C_{o,m,p}-Ph), 128.43 (3 x C_{meta}-Trt, 3 x C_{para}-Trt), 128.42, 128.41, 128.38, 127.96, 127.91, 127.86, 127.84, 127.82, 127.72, 127.68, 127.65, 127.38 (C_{o,m,p}-Ph), 125.13 (C9-Pmc), 120.92 (C4-Imidazol), 118.87 (C6-, C8-Pmc), 101.74 (C1-GlcN^I), 101.30 (C1-GalN^{Thr}), 100.90 (C1-GalN^{Ser}), 100.80

(C1-GlcN^{II}), 82.11 (C-^tBu), 77.26 (C_{qua}-Trt), 75.81 (C_{3-I}^I, C_{3-II}^I), 75.20 (C3-GlcN^I), 74.79 (C-^tBu), 74.75 (C5-GlcN^I), 74.66 (C4-GlcN^{II}), 74.43 (C2-Pmc), 74.38 (C-^tBu), 74.34 (C_{3-I}^{II}), 73.74 (C-^tBu), 73.70 (C5-GlcN^{II}), 73.34 (Bn-CH₂-O), 72.21 (C3-GlcN^{II}), * (C5-GalN^{Ser/Thr}), 71.07, 70.93, 70.87 (3 x CH₂-Bn), 70.53 (C_{3-II}^{II}), 70.51, 70.33 (2 x CH₂-Spa^{II}), 70.06 (C5-Spa^I, CH₂-Spa^{II}), 70.04, 70.00 (2 x CH₂-Spa^{II}), 69.77 (C6-Spa^I, CH₂-Spa^{II}), 69.74 (Thr₃^β), 69.69^{**} (C3-GalN^{Thr}), 69.64 (C8-Spa^I), * (C4-GalN^{Ser/Thr}), * (C3-GalN^{Ser}), 68.19 (C6-GlcN^I), 68.05^{**} (C6-GlcN^{II}), 67.67 (C4-GlcN^I), 67.02 (C3-Spa^{II}), 66.70 (C3-Spa^I), 66.26 (Thr₂^β), 66.14 (Thr₁^β), 61.65 (Ser₁^β), 61.28 (Ser₂^β), 61.22 (Ser₃^β), * (C6-GalN^{Ser/Thr}), 60.76 (Thr₃^α), 60.66 (Pro₁^α), 60.64 (Pro₂^α), 60.53 (Pro_(4,5)^α), 60.52 (Pro₃^α), 58.93 (Thr_(1,2)^α), 57.62 (Val^α), 56.75^{**} (Ser₁^α), 55.48 (C2-GlcN^{II}), 54.45 (Ser₂^α), 53.73^{**} (His^α), 53.73 (C2-GlcN^I), 53.14 (Ser₃^α), 53.10 (Arg^α), 52.31^{**} (C2-GalN^{Ser}), 50.37 (C2-GalN^{Thr}), * (Asp^α), 47.49 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 47.42 (Ala₄^α), 47.30 (Ala_(1,2,3)^α), 43.38 (Gly₁^α), 43.35 (Gly₂^α), 43.31 (Gly₃^α), 41.49 (C_{2-II}^I), 41.42 (C_{2-II}^{II}), 41.30 (Arg^δ), 39.44 (C_{2-I}^I), 39.22 (C9-Spa^I), 39.18 (C_{2-I}^{II}), 38.97 (Asp^β), 36.48 (C2-Spa^{II}), 36.37 (C2-Spa^I), 34.47 (CH_{16-II}^{II}), 34.23 (C_{4-I}^I, C_{4-II}^I, C_{4-I}^{II}, C_{4-II}^{II}), 32.58 (C3-Pmc), 32.00 (4 x C12, C24), 29.84 (Val^β), 29.69 (4 x (C6 - C11) + C18 - C23), 29.45 (Arg^β), 28.67 (Pro₂^β), 28.63 (Pro_(1,3,4)^β), 28.56 (Pro₅^β), 28.21, 27.95, 27.36, 27.33 (4 x CH₃-^tBu), 26.74 (2 x C2a-Pmc), 26.55 (His^β), 25.35, 25.33, 25.26, 25.20 (C_{5-I}^I, C_{5-II}^I, C_{5-I}^{II}, C_{5-II}^{II}), 25.26 (Arg^γ), 25.12 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 25.05 (C_{17-II}^{II}), 22.75, 22.68 (2 x CH₃-Ac), 22.63 (4 x C13, C25), 21.39 (C4-Pmc), 19.54 (Thr_(1,2)^γ), 19.05 (Val^{γab}), 18.39 (Thr₃^γ), 17.46 (C6a-, C8a-Pmc), 17.20 (Ala₁^β), 16.79 (Ala₃^β), 16.75 (Ala₂^β), 16.74 (Ala₄^β), 14.13 (4 x C14, C26), 12.17 (C9a-Pmc).

* Werte konnten aufgrund der beschränkten Löslichkeit nicht ermittelt werden.

Werte mit ^{**} sind mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 2797.12 ([M+2H]²⁺, ber.: 2797.09).

1865.06 ([M+3H]³⁺, ber.: 1865.06).

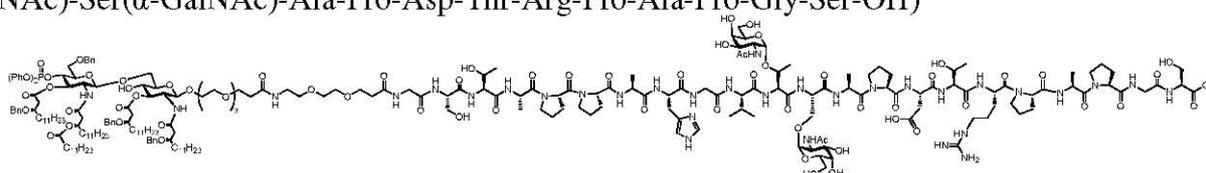
1398.72 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1398.80).

HR-ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 1871.3807 ([M+2H+Na]³⁺, ber.: 1871.3833).

C₂₉₀H₄₄₃N₃₂O₇₂PS (5592.83)

4,7,10,12-Tetraoxadodecanoyl-(6-O-[4-(diphenylphosphat)-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-2-((R)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosyl]-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-benzyloxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosid)-9-Amino-4,7-dioxanonanylamido-N-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin (205)

(β-6-[β-4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((R)-3-(dodecanoyloxy)-tetradecanoyl)]-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-O-Spa-COHN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α-GalNAc)-Ser(α-GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



56 mg (10.0 μmol) des partiell geschützten Glycolipidkonjugates **204** werden in einer Mischung aus 8.0 ml Trifluoressigsäure, 1.0 ml Wasser und 1.0 ml Triisopropylsilan 70 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend verdünnt man mit 20 ml Toluol und entfernt die Lösungsmittel im Hochvakuum. Der Rückstand wird mit 20 ml Dioxan lyophilisiert. Das partiell deblockierte Rohpeptid (51 mg) wird als farbloses Lyophilisat erhalten, welches durch präparative RP-HPLC gereinigt wird. $R_t = 29.6 - 34.2$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-5), $R_t = 44.90 - 50.50$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-7), $R_t = 29.60 - 34.20$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-5).

Ausbeute: 30 mg (6.3 μmol, 62 %); farbloses Lyophilisat.

NMR: Aufgrund von Unlöslichkeit nicht möglich.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2402.42$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 2402.33).

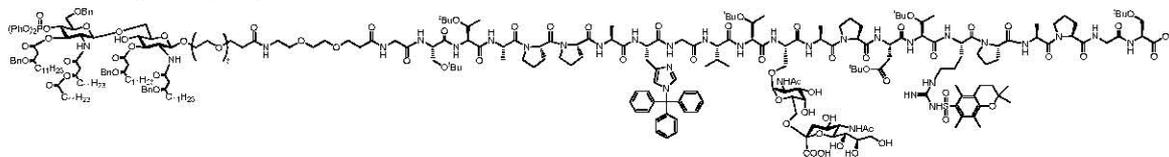
1601.94 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1601.88).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1601.2162$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1601.2159).

C₂₃₇H₃₇₁N₃₂O₆₉P (4803.63)

4,7,10,12-Tetraoxadodecanoyl-(6-*O*-[4-(diphenylphosphat)-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-((*R*)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosid)-9-amino-4,7-dioxanonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-*N*^{Im}-trityl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (206)

(β -6-[β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((*R*)-3-(dodecanoyloxy)-tetradecanoyl)]-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-*O*-Spa-COHN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^tBu)-Thr(^tBu)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(^tBu)-Ser(α -NeuNAcCOOH-(2-6)- α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp(^tBu)-Thr(^tBu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^tBu)-OH)



70.9 mg (31.90 μ mol, 1.5 Äquiv.) AS595-Spa-CO₂H (**136**) werden mit 15.5 mg (40.80 μ mol, 1.92 Äquiv.) HATU, 5.6 mg (41.10 μ mol, 1.94 Äquiv.) HOAt, 9.0 mg (69.60 μ mol, 3.28 Äquiv.) *N*-Ethyl-diisopropylamin in 1 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid 40 min voraktiviert. Die Lösung des Aktivesters wird anschließend zu 75.0 mg (21.25 μ mol) des partiell geschützten Glycopeptids **157** gegeben. Man spült zweimal mit 0.5 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid nach und rührt die Lösung 16 h bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wird i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und anschließend lyophilisiert. Die Reinigung des rohen Peptids (209 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 48.50 - 54.23$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-7).

Ausbeute: 61 mg (10.6 μ mol, 50 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = -11.4$ ($c = 1.00$, CHCl₃).
600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, TOCSY] (DMSO-*d*₆): $[\delta/ppm] = 8.10^{**}$ (s_b, 1H, NH-GlcN^{II}), 8.07 (s, 1H, H_{2Ar}-His), NH-Gly₁ {^{*}}, NH-Gly₂ {^{*}}, NH-Gly₃ {^{*}}, NH-Ser₁ {^{*}}, NH-Ser₂ {^{*}}, NH-Ser₃ {^{*}}, NH-Thr₁ {^{*}}, NH-Thr₂ {^{*}}, NH-Thr₃ {^{*}}, NH-Ala₁ {^{*}}, NH-Ala₂ {^{*}}, NH-Ala₃ {^{*}}, NH-Ala₄ {^{*}}, NH-His {^{*}}, NH-Val {^{*}}, NH-Asp {^{*}}, NH-Arg {^{*}}, 7.48 – 7.34 (m, 10H, H_{4Ar}-His {7.48}, H_{meta}-Trt {7.40}, H_{para}-Trt {7.40}), 7.34 – 7.20 (m, 24H, H_{Ar}-Ph), 7.19 – 7.02 (m, 13H, NH-Spa^I {7.19}, H_{ortho}-Trt {7.08}, H_{Ar}-Ph), 6.94 (m_c, 1H,

NH-GlcN^I), 5.47 (t_p, 1H, $^3J_{H_3,H_2} \approx ^3J_{H_3,H_4} \approx 9.1$ Hz, H3-GlcN^{II}), 5.08 – 4.91 (m, 3H, H_{3-II}^{II} {5.06}, H3-GlcN^I {5.01}, 4.92 {d, 1H, $^3J_{H_1,H_2} \approx 6.9$ Hz, H1-GlcN^{II}}), 4.82 – 4.04 (m, 34H, H4-GlcN^{II} {4.80}, His^α {4.77**}, H1-GalN {4.76}, Asp^α {4.69}, Pro₅^α {4.69}, Ala₁^α {4.68}, Ala₃^α {4.63}, Arg^α {4.58}, Pro₄^α {4.58}, Ser₁^α {4.58}, Val^α {4.58}, Ser₃^α {4.55}, Ala₄^α {4.54}, CH₂-Bn {4.52}, Pro₃^α {4.49}, CH₂-Bn {4.47}, Pro₂^α {4.44}, H1-GlcN^I {4.43}, Pro₁^α {4.41}, Bn-CH₂-O {4.35}, Ser₂^α {4.35}, CH₂-Bn {4.34}, Thr₁^α {4.25}, Thr_(2,3)^α {4.23}, Thr_(1,3)^β {4.23}, Ala₂^α {4.20}, Thr₂^β {4.15}, H_{6a}-GlcN^I {4.08}, H2-GalN {4.07**}), 4.04 – 3.86 (m, 7H, Gly_(1,2,3)^α {3.99 – 3.90}, H2-GlcN^I {3.97}), 3.86 – 3.10 (m, 66H, H_{3-I}^I {3.86}, H_{3-II}^I {3.85}, Ser₃^{βa} {3.84}, H_{6b}-GlcN^I {3.77}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.77 – 3.46}, H3-Spa^I {3.75}, Ser₂^{βa} {3.74}, Ser₁^{βa} {3.73}, H_{3-I}^{II} {3.73}, H5-GlcN^{II} {3.73}, H3-Spa^{II} {3.72}, H8-Spa^I {3.71}, H_{6a}-GlcN^{II} {3.63}, Ser₁^{βb} {3.63}, H2-GlcN^{II} {3.61}, H4-GlcN^I {3.61}, His^{βa} {3.59}, H3-GalN {3.58**}, CH₂-Spa^{II} {3.58**}, H6-Spa^I {3.58}, H5-Spa^I {3.57}, CH₂-Spa^{II} {3.57**}, H_{6b}-GlcN^{II} {3.55}, Ser₂^{βb} {3.54}, CH₂-Spa^{II} {3.51}, CH₂-Spa^{II} {3.50**}, Ser₃^{βb} {3.48}, CH₂-Spa^{II} {3.46}, H5-GlcN^I {3.41}, H7-Sia {3.39**}, H6-Sia {3.38**}, CH₂-Spa {3.38}, H9-Spa^I {3.37}, His^{βb} {3.36}, Arg^δ {3.15**}, H4-GalN {^{*}}, H5-GalN {^{*}}, H_{6ab}-GalN {^{*}}, H4-Sia {^{*}}, H5-Sia {^{*}}, H8-Sia {^{*}}, H_{9ab}-Sia {^{*}}), 2.70 – 2.17 (m, 25H, Asp^{βa} {2.66**}, H4-Pmc {2.65}, H_{2a-I}^I {2.64}, H_{2a-I}^{II} {2.55}, H2-Spa^I {2.55}, Asp^{βb} {2.53**}, 2 x CH₃-Pmc {2.51}, H_{2b-I}^{II} {2.48}, H2-Spa^{II} {2.48}, H_{2b-I}^I {2.44}, H_{2a-II}^I {2.39}, H_{2a-II}^{II} {2.30}, CH_{16-II}^{II}-CO₂ {2.29}, H_{2b-II}^I {2.28}, H_{2b-II}^{II} {2.21}, Val^β {2.21}), 2.20 – 1.78 (m, 33H, Pro_(1,2,3,4,5)^β {2.16 – 1.85}, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.16 – 1.87}, H9a-Pmc {2.10}, Arg^{βa} {2.01**}, 1.98 (2 x CH₃-Ac), Arg^{βb} {1.85**}, 1.84 (m_c, 2H, H3-Pmc)), 1.66 – 1.02 (m, 181H, H_{17-II}^{II}-CO₂, {1.57}, H_{4-I}^I {1.56}, H_{4-I}^{II} {1.50}, H_{4-II}^I {1.48}, H_{4-II}^{II} {1.48}, 1.41 (s, 9H, CH₃-^tBu), Arg^γ {1.40}, 1.40 – 1.15 (m, (CH₂)₄₄), Ala₁^β {1.39}, Ala₂^β {1.35}, Ala₃^β {1.32}, Ala₄^β {1.31}, 1.31 (s_b, 6H, H2a-Pmc), 1.27 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.20 (2 x s, 9H, CH₃-^tBu), 1.16 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.12 (s, 9H, CH₃-^tBu), Thr₃^γ {1.11}, Thr₂^γ {1.07}, Thr₁^γ {1.03}), 1.00 – 0.83 (m, 21H, Val^{γab} {0.96}, H_{14-I}^I, H_{14-II}^I, H_{14-I}^{II}, H_{14-II}^{II}, H_{26-II}^{II} {0.91 – 0.84}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 174.06, 172.08, 171.05 (C=O), 155.64 (C7-Pmc), 139.63 (3 x C_{ipso}-Trt), 136.71 (C10-Pmc), 135.54 (C5-Pmc), * (C5-Imidazol), 130.00, 129.97 (C_{o,m,p}-Ph), * (C2-Imidazol), 129.95 (3 x C_{ortho}-Trt), 129.42 (C_{o,m,p}-Ph), 129.41 (3 x C_{meta}-Trt, 3 x C_{para}-Trt), 128.96, 128.55, 128.49, 128.44, 128.41, 128.06, 128.04, 127.91, 127.86, 127.84, 127.77, 127.73, 127.66, 127.39 (C_{o,m,p}-Ph), 125.08 (C9-Pmc), 120.32 (C4-Imidazol), 118.82 (C6-, C8-Pmc), 102.20 (C1-GlcN^I), 101.59**

(C1-GalN), 101.31 (C1-GlcN^{II}), 82.00 (C-^tBu), 77.26 (C_{qua}-Trt), 76.23 (C_{3-I}^I), 75.86 (C_{3-I}^{II}), 75.67 (C3-GlcN^I), 75.35 (C_{3-II}^I), 75.19 (C5-GlcN^I), 75.19^{**} (C6-Sia), 75.14 (C4-GlcN^{II}), 75.00 (C-^tBu), 74.55 (C2-Pmc), 74.43 (C-^tBu), 74.15 (C5-GlcN^{II}), 73.84 (C-^tBu), 73.83 (C-^tBu), 73.82 (Bn-CH₂-O), 72.66 (C3-GlcN^{II}), * (C8-Sia), 71.63, 71.57, 71.36 (3 x CH₂-Bn), 71.12 (C_{3-II}^{II}), 70.74, 70.51 (3 x CH₂-Spa^{II}, C5-Spa^I), 70.50 (CH₂-Spa^{II}), 70.34 (CH₂-Spa^{II}), 70.24 (C6-Spa^I), 70.22 (CH₂-Spa^{II}), * (C5-GalN), 69.61 (C8-Spa^I), * (C4-GalN), 68.65 (C6-GlcN^I), * (C4-Sia), 68.48 (C6-GlcN^{II}), 68.38 (C4-GlcN^I), 68.31^{**} (C3-GalN), 68.11^{**} (C7-Sia), 67.49 (C3-Spa^{II}, C3-Spa^I), 66.72 (Thr_(1,3)^β), 66.71 (Thr₂^β), * (C6-GalN), * (C9-Sia), 61.63 (Ser_(1,3)^β), 61.56 (Ser₂^β), 61.10 (Pro₁^α), 60.99 (Pro₃^α), 60.98 (Pro₂^α), 60.97 (Pro_(4,5)^α, Val^α), 59.29 (Thr_(2,3)^α), 59.28 (Thr₁^α), 55.97 (C2-GlcN^{II}), 54.70 (Ser₂^α), 54.14 (C2-GlcN^I), 53.62^{**} (His^α), 53.48 (Ser_(1,3)^α), * (C5-Sia), 50.76 (Arg^α), 50.69 (Asp^α), 50.45 (Ala₂^α), 48.93 (C2-GalN), 47.93 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 47.78 (Ala₄^α), 47.75 (Ala₃^α), 47.67 (Ala₁^α), 43.85 (Gly₃^α), 43.70 (Gly_(1,2)^α), 41.96 (C_{2-II}^I), 41.83 (C_{2-II}^{II}), 41.78 (Arg^δ), * (C3-Sia), 39.93 (C_{2-I}^I), 39.74 (C9-Spa^I), 39.63 (C_{2-I}^{II}), 36.91 (C2-Spa^{II}), 36.83 (C2-Spa^I), 36.79 (Asp^β), 34.95 (CH_{16-II}^{II}), 34.76 (C_{4-I}^I), 34.74 (C_{4-II}^I, C_{4-II}^{II}), 34.70 (C_{4-I}^{II}), 33.05 (C3-Pmc), 32.48 (4 x C12, C24), 30.84 (Val^β), 30.09 (4 x (C6 - C11) + C18 - C23), 29.98 (Arg^β), 29.36 (Pro_(1,2,3,4,5)^β), 28.70, 28.40, 28.08, 28.06 (4 x CH₃-^tBu), 27.86^{**} (His^β), 27.30 (2 x C2a-Pmc), 25.77, 25.71, 25.69, 25.68 (C_{5-I}^I, C_{5-II}^I, C_{5-I}^{II}, C_{5-II}^{II}), 25.90 (Arg^γ), 25.61 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 25.54 (C_{17-II}^{II}), 23.21 (2 x CH₃-Ac), 23.06 (4 x C13, C25), 21.85 (C4-Pmc), 19.90 (Thr₃^γ), 19.51 (Thr₂^γ), 19.46 (Val^{γab}), 19.22 (Thr₁^γ), 18.19 (C6a-, C8a-Pmc), 17.80 (Ala₂^β), 17.56 (Ala₁^β), 17.40 (Ala₄^β), 17.28 (Ala₃^β), 14.59 (4 x C14, C26), 12.67 (C9a-Pmc).

* Werte konnten aufgrund der beschränkten Löslichkeit nicht ermittelt werden.

Werte mit ^{**} sind mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 2869.30 ([M+2H]²⁺, ber.: 2869.51).

1913.20 ([M+3H]³⁺, ber.: 1913.09).

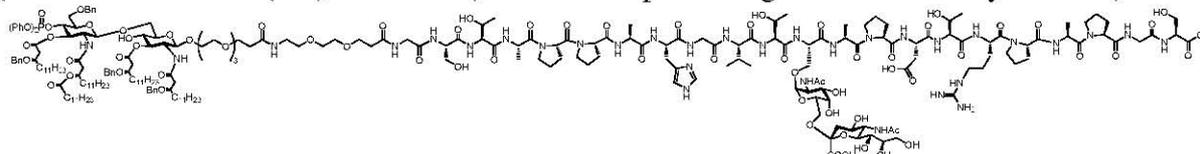
1435.03 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1435.07).

HR-ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 1912.0884 ([M+3H]³⁺, ber.: 1912.0822).

C₂₉₇H₄₅₅N₃₂O₇₅PS (5737.00)

4,7,10,12-Tetraoxadodecanoyl-6-O-[4-(diphenylphosphat)-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-2-((R)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosyl]-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-benzyloxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosid)-9-Amino-4,7-dioxanonanylamido-N-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin (207)

(β-6-[β-4-((PhO)₂PO)-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((R)-3-(dodecanoyloxy)-tetradecanoyl)]-3-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((R)-3-(BnO)tetradecanoyl)-O-Spa-COHN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-(α-NeuNAcCOOBn-(2-6)-α-GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



60 mg (10.5 μmol) des partiell geschützten Glycolipidkonjugates **206** werden in einer Mischung aus 8.0 ml Trifluoressigsäure, 1.0 ml Wasser und 1.0 ml Triisopropylsilan 70 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend verdünnt man mit 20 ml Toluol und entfernt die Reagenzien sowie Toluol im Hochvakuum. Der Rückstand wird mit 20 ml Dioxan lyophilisiert. Das partiell deblockierte Rohpeptid (53 mg) wird als farbloses Lyophilisat erhalten, welches anschließend mittels präparativer RP-HPLC gereinigt wird.

$R_t = 31.40 - 35.85$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-5).

Ausbeute: 29 mg (5.9 μmol, 56 %); farbloses Lyophilisat.

NMR: Aufgrund von Unlöslichkeit nicht möglich

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2446.66$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 2446.33).

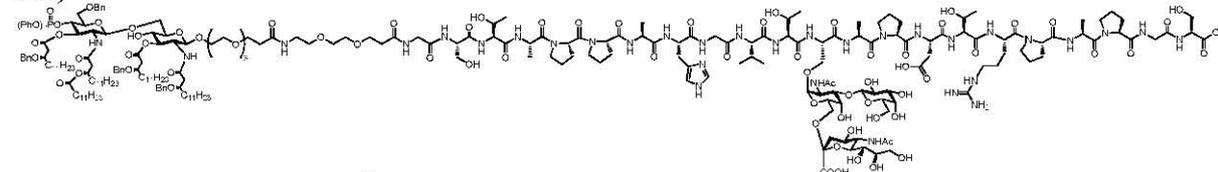
1631.44 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1631.56).

1223.70 ($[M+4H]^{4+}$, ber.: 1223.92).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1630.5553$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1630.5546).

C₂₄₀H₃₇₅N₃₂O₇₂P (4891.69)

4,7,10,12-Tetraoxadodecanoyl-(6-O-[4-(diphenylphosphat)-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-2-((R)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosyl]-3-O-((R)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((R)-3-benzyloxytetradecanoylamino)-β-D-glucopyranosid)-9-amino-4,7-dioxanonanylamido-N-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-O-[2-acetamido-3-O-(β-D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]-α-D-galactopyranosyl]-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin (208)



39 mg (17.53 μmol, 1.35 Äquiv.) AS595-Spa-CO₂H (**136**) werden mit 7.7 mg (20.25 μmol, 1.56 Äquiv.) HATU, 2.85 mg (20.94 μmol, 1.61 Äquiv.) HOAt und 5.0 mg (38.70 μmol, 2.98 Äquiv.) *N*-Ethyl-diisopropylamin in 0.5 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid 105 min voraktiviert. Die Lösung des Aktivesters wird anschließend zu 48.0 mg (13.00 μmol) des Peptids **159** gegeben. Man spült zweimal mit 0.5 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid nach und rührt die Lösung 16 h bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wird i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert und anschließend lyophilisiert.

C₃₀₃H₄₆₅N₃₂O₈₀PS (5899.14)

Das erhaltene partiell geschützte Lipopeptid (124 mg) wird anschließend in 6 ml einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml destilliertem Wasser 1 h bei Raumtemp. gerührt. Im Anschluss wird mit Toluol versetzt und i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand (158 mg) wird dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des rohen Peptids erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. R_t = 34.7 – 40.0 min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-5).

Ausbeute: 23 mg (4.6 μmol, 36 %); farbloses Lyophilisat.

NMR: Aufgrund von Unlöslichkeit nicht möglich.

ESI-MS (positiv): [*m/z*] = 2527.93 ([M+2H]²⁺, ber.: 2527.86).

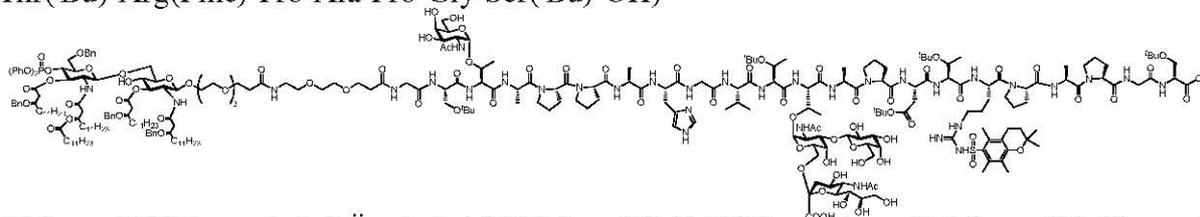
1685.61 ([M+3H]³⁺, ber.: 1685.24).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1684.5753$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1684.5722).

$C_{246}H_{385}N_{32}O_{77}P$ (5053.83)

4,7,10,12-Tetraoxadodecanoyl-(6-*O*-[4-(diphenylphosphat)-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-((*R*)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosid)-9-Amino-4,7-dioxanonanylamido-*N*-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*'-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-*O*-*tert*-butyl-serin (209)

(β -6-[β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((*R*)-3-(dodecanoyloxy)-tetradecanoyl)]-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-O-Spa-COHN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser(^{*t*}Bu)-Thr(α -GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(^{*t*}Bu)-Thr[α -3-(β -Gal)-(α -NeuNAcCOOH-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp(^{*t*}Bu)-Thr(^{*t*}Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(^{*t*}Bu)-OH)



44.5 mg (19.94 μ mol, 1.5 Äquiv.) AS595-Spa-CO₂H (**136**) werden mit 9.0 mg (23.67 μ mol, 1.78 Äquiv.) HATU, 3.3 mg (24.25 μ mol, 1.82 Äquiv.) HOAt und 6.0 mg (46.40 μ mol, 3.49 Äquiv.) *N*-Ethyl-diisopropylamin in 0.7 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid 105 min voraktiviert. Die Lösung des Aktivesters wird anschließend zu 48.0 mg (13.29 μ mol) des Peptids **161** gegeben. Man spült zweimal mit 0.5 ml absol. *N,N*-Dimethylformamid nach und rührt die Lösung 16 h bei Raumtemperatur. Das Rohprodukt wird i. Vak. bzw. i. Hochvak. von Reagenzien und Lösungsmitteln befreit. Der gelbe Rückstand wird dreimal mit 50 ml Toluol kdestilliert und anschließend lyophilisiert. Die Reinigung des rohen Peptids (122 mg) erfolgt mittels präparativer RP-HPLC. $R_t = 48.7 - 58.1$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-7).

Ausbeute: 59 mg (10.1 μ mol, 76 %); farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D^{24} = +1.5$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

600 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY, TOCSY] (DMSO-*d*₆): $[\delta/ppm] = 8.06$ (s, 1H, H_{2Ar}-His), NH-Gly₁ { * }, NH-Gly₂ { * }, NH-Gly₃ { * }, NH-Ser₁ { * }, NH-Ser₂ { * }, NH-Ser₃ { * }, NH-Thr₁

{*}, NH-Thr₂ {*}, NH-Thr₃ {*}, NH-Ala₁ {*}, NH-Ala₂ {*}, NH-Ala₃ {*}, NH-Ala₄ {*}, NH-His {*}, NH-Val {*}, NH-Asp {*}, NH-Arg {*}, 7.45 (s, 1H, H_{4Ar}-His), 7.35 – 7.19 (m, 24H, H_{Ar}-Ph), 7.19 – 7.07 (m, 7H, NH-Spa^I {7.13**}, H_{Ar}-Ph), 7.02 (m_c, 1H, NH-GlcN^I), 6.86** (s_b, 1H, NH-GlcN^{II}), 5.44 (t_p, 1H, ³J_{H3,H2} ≈ ³J_{H3,H4} ≈ 9.1 Hz, H3-GlcN^{II}), 5.08 – 4.98 (m, 2H, H^{II}_{3-II} {5.06}, H3-GlcN^I {5.04}), 4.93 – 4.73 (m, 5H, 4.88 (d, ³J_{H1,H2} ≈ 6.9 Hz, H1-GlcN^{II}), H1-Gal' {4.85}, H4-GlcN^{II} {4.80}, H1-GalN^{2,6-ST} {4.76}, H1-GalN^{TN} {4.73}), 4.65 – 4.15 (m, 31H, Ser₁^α {4.57}, Ser₂^α {4.55**}, His^α {*}, Asp^α {*}, CH₂-Bn {4.53}, Pro₅^α {*}, Ala₁^α {*}, Ala₃^α {*}, Arg^α {*}, Pro₄^α {*}, Val^α {*}, Ser₃^α {*}, Ala₄^α {*}, Pro₃^α {*}, CH₂-Bn {4.47}, Pro₂^α {*}, H1-GlcN^I {4.44}, Pro₁^α {*}, Thr₁^β {4.38**}, Bn-CH₂-O {4.36}, CH₂-Bn {4.35}, Thr₁^α {*}, Thr_(2,3)^α {*}, Ala₂^α {*}, Thr₁^β {4.18}, Thr₂^β {*}), 4.14 – 3.10 (m, 87H, H_{6a}-GlcN^I {4.08}, H2-GalN^{2,6-ST} {*}, H2-GalN^{TN} {*}, Gly_(1,2,3)^α {3.94}, Ser₁^{βa} {3.93}, H2-GlcN^I {3.88}, H^I_{3-I} {3.85}, Ser₃^{βa} {*}, H4-GalN^{2,6-ST} {*}, H^I_{3-II} {3.82}, H_{6b}-GlcN^I {3.81}, Pro_(1,2,3,4,5)^δ {3.80 – 3.50}, H5-GalN^{2,6-ST} {*}, H_{6a}-GalN^{TN} {*}, H^{II}_{3-I} {3.76}, H5-GalN^{TN} {*}, H3-Spa^I {3.74}, Ser₁^{βb} {3.74}, Ser₂^{βa} {3.74}, H3-Spa^{II} {3.73}, H2-GlcN^{II} {3.72}, H5-GlcN^{II} {3.72}, H8-Spa^I {3.71}, H4-GalN^{TN} {*}, CH₂-Spa^{II} {3.65**}, H6-Spa^I {3.65}, Ser₂^{βb} {3.63}, H4-Gal' {*}, H_{6b}-GalN^{TN} {*}, H8-Sia {*}, H_{9a}-Sia {*}, H4-GlcN^I {3.61}, CH₂-Spa^{II} {3.60**}, H5-Spa^I {3.60}, H_{6a}-GlcN^{II} {3.59}, His^{βa} {*}, H3-GalN^{TN} {*}, H4-Sia {*}, H_{6a}-Gal' {*}, H3-GalN^{2,6-ST} {*}, 2 x CH₂-Spa^{II} {3.51}, H_{6a}-GalN^{2,6-ST} {*}, H5-Sia {*}, Ser₃^{βb} {*}, H_{6b}-GlcN^{II} {3.43}, H_{6b}-GalN^{2,6-ST} {*}, H_{6b}-Gal' {*}, H5-GlcN^I {3.42}, CH₂-Spa^{II} {3.41}, H_{9b}-Sia {*}, H₉-Spa^I {3.38}, His^{βb} {*}, CH₂-Spa {3.34}, H2-Gal' {*}, H6-Sia {*}, H7-Sia {*}, H5-Gal' {*}, H3-Gal' {*}, Arg^δ {3.14**}), 2.70 – 2.17 (m, 25H, H4-Pmc {2.65}, Asp^{βa} {2.63**}, H^I_{2a-I} {2.63}, H^{II}_{2a-I} {2.60}, H2-Spa^I {2.54}, Asp^{βb} {2.54**}, 2 x CH₃-Pmc {2.54}, H2-Spa^{II} {2.49}, H^{II}_{2b-I} {2.44}, H^I_{2b-I} {2.44}, H^I_{2a-II} {2.38}, H^{II}_{2ab-II} {2.34}, H^I_{2b-II} {2.31}, CH^{II}_{16-II}-CO₂ {2.28}, Val^β {*}), 2.20 – 1.78 (m, 36H, Pro_(1,2,3,4,5)^γ {2.17 – 1.90}, Pro_(1,2,3,4,5)^β {2.11 – 1.82}, H_{9a}-Pmc {2.12}, 2.04 (CH₃-Ac), Arg^{βa} {2.02**}, 2.00, 1.98 (2 x CH₃-Ac), Arg^{βb} {1.82**}, 1.82 (m_c, 2H, H3-Pmc), 1.66 – 1.02 (m, 172H, H^{II}_{17-II}-CO₂, {1.61}, H^I_{4-I} {1.56}, H^{II}_{4-I} {1.49}, H^I_{4-II} {1.48}, H^{II}_{4-II} {1.47}, Ala₄^β {*}, Ala₃^β {*}, Ala₂^β {1.45}, Arg^γ {1.43}, 1.43 (s, 9H, CH₃-^tBu), Ala₁^β {1.41}, 1.40 – 1.15 (m, (CH₂)₄₄), 1.32 (s_b, 6H, H2a-Pmc), 1.27 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.20 (s, 9H, CH₃-^tBu), Thr₃^γ {1.17}, 1.16 (s, 9H, CH₃-^tBu), 1.12 (s, 9H, CH₃-^tBu), Thr₂^γ {1.07}, Thr₁^γ {1.02}), 0.99 – 0.79 (m, 21H, Val^{γab} {0.97}, H^I_{14-I}, H^I_{14-II}, H^{II}_{14-I}, H^{II}_{14-II}, H^{II}_{26-II} {0.88 – 0.79}).

150.9 MHz-¹³C-NMR [BB, HMQC] (CDCl₃): [δ/ppm] = 154.75 (C7-Pmc), 136.89 (C10-Pmc), 135.83 (C5-Pmc), * (C5-Imidazol), 130.02, 129.97, 129.85, 129.73 (C_{o,m,p}-Ph),

129.64 (C2-Imidazol), 128.27, 127.81, 125.60 (C_{o,m,p}-Ph), 124.20 (C9-Pmc), 120.22 (C_{o,m,p}-Ph), 118.96 (C4-Imidazol), * (C6-, C8-Pmc), 106.90** (C1-Gal'), 101.83 (C1-GlcN^I), 101.38 (C1-GalN^{2,6-ST}), 101.31 (C1-GalN^{TN}), 101.23 (C1-GlcN^{II}), 82.06 (C-^tBu), 75.87 (C_{3-II}^I), 75.69 (C_{3-I}^I), * (C5-Gal'), 75.25 (C_{3-I}^{II}), * (C6-Sia), 75.03 (C3-GlcN^I), 74.71 (C5-GlcN^I), 74.64 (C4-GlcN^{II}), * (C2-Pmc), 74.42 (C-^tBu), * (C3-GalN^{2,6-ST}), 74.01 (C-^tBu), 73.68 (C-^tBu), 73.66 (C5-GlcN^{II}), 73.35 (Bn-CH₂-O), * (C3-Gal'), 72.33 (C3-GlcN^{II}), * (C8-Sia), * (C2-Gal'), 71.02, 70.99, 70.88 (3 x CH₂-Bn), * (C5-GalN^{TN}), 70.63 (C_{3-II}^{II}), 70.34 (CH₂-Spa^{II}), 70.34 (C6-GlcN^{II}), 70.22 (CH₂-Spa^{II}), 70.02, 69.90 (3 x CH₂-Spa^{II}, C5-Spa^I, C6-Spa^I), * (C5-GalN^{2,6-ST}), * (C4-GalN^{2,6-ST}), * (C4-Gal'), * (C4-Sia), * (C3-GalN^{TN}), * (C4-GalN^{TN}), 68.13 (C6-GlcN^I), * (C7-Sia), 67.69 (C4-GlcN^I), 67.17 (C3-Spa^{II}, C3-Spa^I), * (Thr₃^β), * (Thr₂^β), * (Thr₁^β), 66.57 (C8-Spa^I), * (C6-GalN^{TN}), * (C6-GalN^{2,6-ST}), * (C9-Sia), * (Ser₃^β), * (Ser₂^β), 61.26 (Ser₁^β), * (C6-Gal'), * (Pro₅^α), * (Pro₄^α), * (Pro₃^α), * (Pro₂^α), * (Pro₁^α), * (Val^α), * (Thr₃^α), * (Thr₂^α), * (Thr₁^α), 55.07 (C2-GlcN^{II}), * (Ser₃^α), 53.74 (C2-GlcN^I), * (His^α), 53.01 (Ser_(1,2)^α), * (C5-Sia), * (Arg^α), * (Asp^α), * (C2-GalN^{TN}), * (C2-GalN^{2,6-ST}), * (Ala₄^α), * (Ala₃^α), * (Ala₂^α), * (Ala₁^α), 47.67 (Pro_(1,2,3,4,5)^δ), 43.31 (Gly_(1,2,3)^α), 41.42 (C_{2-II}^I), 41.39 (C_{2-II}^{II}), 41.21 (Arg^δ), * (C3-Sia), 39.41 (C_{2-I}^I), 39.31 (C_{2-I}^{II}), 39.24 (C9-Spa^I), 38.73 (C2-Spa^I), 36.34 (C2-Spa^{II}), 36.25 (Asp^β), 34.50 (CH_{16-II}^{II}), 34.26 (C_{4-I}^I), 34.23 (C_{4-II}^I, C_{4-I}^{II}, C_{4-II}^{II}), 32.63 (C3-Pmc), 32.00 (4 x C12, C24), * (Val^β), 29.69 (4 x (C6 – C11) + C18 – C23), 29.32 (Arg^β), 29.21 (Pro_(1,2,3,4,5)^β), 28.70, 28.40, 28.08, 28.06, 27.94 (5 x CH₃-^tBu), * (His^β), 26.78 (2 x C2a-Pmc), 25.94 (Arg^γ), 25.31, 25.24, 25.20 (C_{5-I}^I, C_{5-II}^I, C_{5-I}^{II}, C_{5-II}^{II}), 25.05 (C_{17-II}^{II}), 25.03 (Pro_(1,2,3,4,5)^γ), 22.74 (4 x C13, C25), 22.71, 22.70, 22.68 (3 x CH₃-Ac), 21.38 (C4-Pmc), 19.34 (Thr₂^γ), 19.23 (Val^{γab}), 19.22 (Thr₁^γ), 18.51 (Ala₂^β), 18.47 (Thr₃^γ), 17.24 (Ala₁^β), 17.17 (C6a-, C8a-Pmc), * (Ala₄^β), * (Ala₃^β), 14.19 (4 x C14, C26), 12.15 (C9a-Pmc).

* Werte konnten aufgrund der beschränkten Löslichkeit nicht ermittelt werden.

Werte mit ** sind mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

ESI-MS (positiv): $[m/z] = 2909.56$ ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 2909.61).

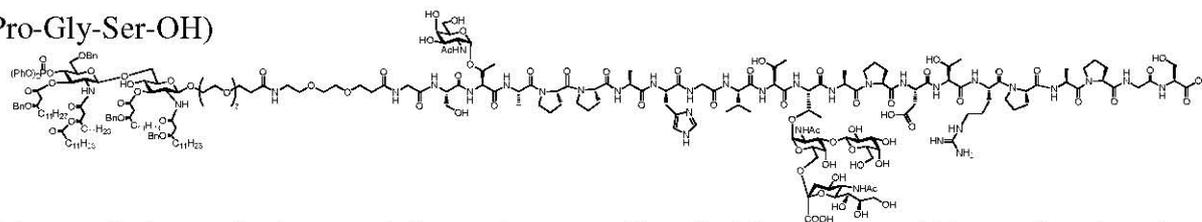
1940.02 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1940.08).

HR-ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1939.0780$ ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1939.0741).

C₂₈₉H₄₅₈N₃₃O₈₅PS (5817.94)

4,7,10,12-Tetraoxadodecanoyl-(6-*O*-[4-(diphenylphosphat)-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-((*R*)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosyl]-3-*O*-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoyl)-2-desoxy-2-((*R*)-3-benzyloxytetradecanoylamino)- β -D-glucopyranosid)-9-amino-4,7-dioxanonanylamido-*N*-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-[2-acetamido-3-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)- α -D-galactopyranosyl]-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-serin (210)

(β -6-[β -4-((PhO)₂PO)-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-6-Bn-GlcNH-((*R*)-3-(dodecanoyloxy)-tetradecanoyl)]-3-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-GlcNH-((*R*)-3-(BnO)tetradecanoyl)-*O*-SpaCOHN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr(α -GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Thr[α -3-(β -Gal)-(α -NeuNAcCOOH-(2-6))- α -GalNAc]-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



56 mg (9.6 μ mol) des partiell geschützten Glycolipidkonjugates **209** werden in einer Mischung aus 8.0 ml Trifluoressigsäure, 1.0 ml Wasser und 1.0 ml Triisopropylsilan 70 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend verdünnt man mit 20 ml Toluol und entfernt die Reagenzien sowie Toluol i. Hochvakuum. Der Rückstand wird mit 20 ml Dioxan lyophilisiert. Das partiell deblockierte Rohpeptid (51 mg) wird als farbloses Lyophilisat erhalten, welches anschließend mittels präparativer RP-HPLC gereinigt wird. $R_t = 29.7 - 38.5$ min (Gerät 3, Säule: SP-2, Gradient: SP-5).

Ausbeute: 15 mg (2.9 μ mol, 30 %); farbloses Lyophilisat.

NMR: Aufgrund von Unlöslichkeit nicht möglich

ESI-MS (positiv): [m/z] = 2636.33 ([$M+2H$]²⁺, ber.: 2636.41).

1757.88 ([$M+3H$]³⁺, ber.: 1757.94).

HR-ESI-MS (positiv): [m/z] = 1756.9398 ([$M+3H$]³⁺, ber.: 1756.9372).

C₂₅₅H₄₀₀N₃₃O₈₂P (5271.05)

5.12 Die Synthese von Neoglycoproteinen

5.12.1 Konjugation von glycosylierten Heptadecapeptiden an Rinderserumalbumin (BSA)

BSA-(Squarat-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α -GalNHAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)_n (214)

16 mg (7.52 μ mol, 100.0 Äquiv.) des monoglycosylierten Heptadecapeptids **211** und 5 mg (0.075 μ mol) Rinderserumalbumin (BSA) (**213**) werden in einem 7 ml Schlenkkolben in 1.4 ml einer wässrigen Lösung aus 65 mg Natriumdihydrogenphosphat pro 1 ml Wasser (pH-Wert = 9.5) gelöst. Die Lösung wird 3 d beim Raumtemp. gerührt. Anschließend wird mit Wasser verdünnt und die Lösung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30000 Da) überführt, um Salze und nicht gekuppelte Glycopeptidmoleküle zu entfernen. Man wiederholt die Ultrafiltration sechsmal mit jeweils 50 ml Milliporwasser. Nach Gefriertrocknung erhält man ein farbloses Lyophilisat.

Ausbeute: 8.0 mg; farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF (Sinapinsäure, positiv), m/z: 99281.80 = 15 Moleküle (**211**) pro BSA-Molekül.

m/z: 96793.59 = 14 Moleküle (**211**) pro BSA-Molekül.

m/z: 95238.48 = 13 Moleküle (**211**) pro BSA-Molekül.

m/z: 77981.73 = 5 Moleküle (**211**) pro BSA-Molekül.

BSA-(Squarat-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser(α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)_n (215)

15 mg (6.43 μ mol, 95.0 Äquiv.) des doppelglycosylierten Heptadecapeptids **212** und 4.5 mg (0.067 μ mol) Rinderserumalbumin (BSA) (**213**) werden in einem 7 ml Schlenkkolben in 1.4 ml einer wässrigen Lösung aus 65 mg Natriumdihydrogenphosphat pro 1 ml Wasser (pH-Wert = 9.5) gelöst. Die Lösung wird 3 d beim Raumtemp. gerührt. Die Aufarbeitung und Isolierung wird analog zur vorherigen Verbindung durchgeführt.

Ausbeute: 8.3 mg; farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF (Sinapinsäure, positiv), m/z : 92958.34 = 10 Moleküle (**212**) pro BSA-Molekül.
 m/z : 90387.70 = 9 Moleküle (**212**) pro BSA-Molekül.
 m/z : 85050.32 = 7 Moleküle (**212**) pro BSA-Molekül.
 m/z : 83178.62 = 6 Moleküle (**212**) pro BSA-Molekül.

5.12.2 Konjugation von glycosylierten Docosapeptiden an Rinderserumalbumin (BSA)

BSA-(Squarat-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser(α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)_n (217**)**

16 mg (5.88 μ mol, 98.0 Äquiv.) des doppelglycosylierten Docosapeptids **216** und 4 mg (0.060 μ mol) Rinderserumalbumin (BSA) (**213**) werden in einem 6 ml Schlenkkolben in 1.4 ml einer wässrigen Lösung aus 65 mg Natriumdihydrogenphosphat pro 1 ml Wasser (pH-Wert = 9.5) gelöst. Die Lösung wird 3 d beim Raumtemp. gerührt. Anschließend wird mit Wasser verdünnt und die Lösung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30000 Da) überführt, um Salze und nicht gekuppelte Glycopeptidmoleküle zu entfernen. Man wiederholt die Ultrafiltration sechsmal mit jeweils 50 ml Milliporwasser. Nach Gefriertrocknung erhält man ein farbloses Lyophilisat.

Ausbeute: 8.3 mg; farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF (Sinapinsäure, positiv), m/z : 99520.96 = 12 Moleküle (**216**) pro BSA-Molekül.
 m/z : 97742.23 = 11 Moleküle (**216**) pro BSA-Molekül.
 m/z : 95186.42 = 10 Moleküle (**216**) pro BSA-Molekül.
 m/z : 77181.82 = 4 Moleküle (**216**) pro BSA-Molekül.

BSA-(Squarat-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(α -NeuNAcCOOH-(2-6)- α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)_n (219**)**

10 mg (3.56 μ mol, 47.5 Äquiv.) des monoglycosylierten Docosapeptids **218** und 5.0 mg (0.075 μ mol) Rinderserumalbumin (BSA) (**213**) werden in einem 5 ml Schlenkkolben in 1.0 ml einer wässrigen Lösung aus 65 mg Natriumdihydrogenphosphat pro 1 ml Wasser (pH

= 9.5), gelöst. Die Lösung wird 3 d beim Raumtemp. gerührt. Die Aufarbeitung und Isolierung erfolgt analog zur vorherigen Verbindung.

Ausbeute: 7.6 mg; farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF (Sinapinsäure, positiv), m/z: 97494.03 = 11 Moleküle (**218**) pro BSA-Molekül.

m/z: 91791.98 = 9 Moleküle (**218**) pro BSA-Molekül.

m/z: 89294.74 = 8 Moleküle (**218**) pro BSA-Molekül.

m/z: 87223.10 = 6 Moleküle (**218**) pro BSA-Molekül.

5.12.3 Konjugation des glycosylierten Docosapeptids an Tetanus-Toxoid (TTox)

TTox-(Squarat-HN-(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₂CONH-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser(α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)_n (221)

4.5 mg (1.58 μ mol, 116.0 Äquiv.) des doppelglycosylierten Docosapeptids **216** und 2 mg (0.014 μ mol) Tetanus-Toxoid (TTox) (**220**) werden in einem 4 ml Schlenkkolben in 0.8 ml einer wässrigen Lösung aus 65 mg Natriumdihydrogenphosphat pro 1 ml Wasser (pH-Wert = 9.5), gelöst. Die Lösung wird 3 d beim Raumtemp. gerührt. Anschließend wird mit Wasser verdünnt und die Lösung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30000 Da) überführt, um Salze und nicht gekuppelte Glycopeptidmoleküle zu entfernen. Man wiederholt die Ultrafiltration sechsmal mit jeweils 50 ml Milliporwasser. Nach Gefriertrocknung erhält man ein farbloses Lyophilisat.

Ausbeute: 4.5 mg, farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF (Sinapinsäure, positiv), m/z: 196811.17 = 17 Moleküle (**210**) pro TTox-Molekül.

m/z: 191750.33 = 15 Moleküle (**210**) pro TTox-Molekül.

m/z: 170191.05 = 7 Moleküle (**210**) pro TTox-Molekül

m/z: 164925.14 = 5 Moleküle (**210**) pro TTox-Molekül

6 Literaturverzeichnis

- [1] S. A. Hoption Cann, J. P. van Netten, C. van Netten, *Postgrad. Med. J.* **2003**, *79*, 672-680.
- [2] Dr. P. Kaatsch, Dr. C. Spix, Prof. Dr. A. Katalinic, Dr. S. Hentschel, *Krebs in Deutschland 2007/2008*, Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin, **2012**.
- [3] R. Luengo-Fernandez, J. Leal, A. Gray, R. Sullivan, *The Lancet Oncology* **2013**, *14*, 1165-1174.
- [4] M. Neller, in *Die Welt*, www.welt.de/116746107, (**26.11.2013**).
- [5] E. Grundmann, *Das ist Krebs: Entwicklungen, Erkenntnisse, Erfolge*, Zuckschwerdt Verlag, **2007**.
- [6] H. Stamatidis-Smidt, C. Beitel, H. Hausen, O. D. Wiestler, H. J. Gebest, *Thema Krebs*, Springer, **2006**.
- [7] H.-J. Schmoll, *Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie*, Springer, **2006**.
- [8] M. Burnet, *BMJ* **1957**, *1*, 841-847.
- [9] G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, R. D. Schreiber, *Nat Immunol* **2002**, *3*, 991-998.
- [10] K. Murphy, *Janeway's Immunobiology, Eighth Edition*, **2011**.
- [11] R. Herberman, *Mechanisms of Cytotoxicity by NK Cells*, Elsevier Science, **1985**.
- [12] K. Kärre, *Scand. J. Immunol.* **2002**, *55*, 221-228.
- [13] A. Böcking, V. Zylka-Menhorn, *Dtsch Arztebl International* **2011**, *108*, 2604-2606.
- [14] A. L. Angiolillo, C. Sgadari, D. D. Taub, F. Liao, J. M. Farber, S. Maheshwari, H. K. Kleinman, G. H. Reaman, G. Tosato, *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 155-162.
- [15] J. H. Dufour, M. Dziejman, M. T. Liu, J. H. Leung, T. E. Lane, A. D. Luster, *J. Immunol.* **2002**, *168*, 3195-3204.
- [16] I. Algarra, A. García-Lora, T. Cabrera, F. Ruiz-Cabello, F. Garrido, *Cancer Immunol. Immun.* **2004**, *53*, 904-910.
- [17] H. T. Khong, N. P. Restifo, *Nat Immunol* **2002**, *3*, 999-1005.
- [18] Dr. med. S. Häusler, www.aerztekammer-bw.de/10aerzte/20fortbildung/20praxis/75gynaekologie/1102.pdf, (**22.11.2013**).
- [19] J. Goldie, A. Coldman, *Cancer Treat Rep* **1979**, *63*, 1727-1733.
- [20] O. Rixe, T. Fojo, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 7280-7287.
- [21] B. Nosse, *Chem. Unserer Zeit* **2006**, *40*, 164-172.
- [22] B. A. Chabner, T. G. Roberts, *Nat Rev Cancer* **2005**, *5*, 65-72.
- [23] E. Mutschler, *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Wiss. Verlag-Ges., **2001**.
- [24] M. J. Piccart-Gebhart, *New Engl J Med* **2006**, *354*, 2177-2179.
- [25] W. Voigt, A. Dietrich, H.-J. Schmoll, *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *35*, 134-143.
- [26] I. Ott, R. Gust, *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *35*, 124-133.
- [27] U. Meyer, *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *35*, 104-109.
- [28] *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Wiley, **2006**.
- [29] www.pei.de/DE/arzneimittel/immunglobuline-monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper-inhalt.html?nn=3257580, (**20.11.2013**).
- [30] www.krebsinformationsdienst.de/behandlung/monoklonale-antikoerper.php, (**28.11.2013**).
- [31] A. Dalglish, H. Pandha, *Adv. Cancer Res.* **2006**, *96*, 175-190.
- [32] B. J. Van den Eynde, P. van der Bruggen, *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, *9*, 684-693.
- [33] R. H. Vonderheide, *Oncogene* **2002**, *21*, 674-679.

- [34] Fan Yang, Xiao-Feng Yang, *Cell Mol Immunol* **2005**, *2*, 331-341.
- [35] S. A. Rosenberg, *Nature* **2001**, *411*, 380-384.
- [36] www.cancerimmunity.org/peptide/, (10.04. 2013).
- [37] J. R. Gum Jr., *Biochem. Soc. T.* **1995**, *23*, 795-799.
- [38] I. Carlstedt, J. R. Davies, *Biochem. Soc. T.* **1997**, *25*, 214-219.
- [39] S. J. Gendler, *J. Mammary Gland Biol.* **2001**, *6*, 339-353.
- [40] W. J. Lennarz, D. Lane, *Encyclopedia of Biological Chemistry, e-only*, Elsevier Science, **2013**.
- [41] J. R. Gum Jr., *Am. J. Resp. Cell Mol.* **1992**, *7*, 557-564.
- [42] I. Brockhausen, *BBA-Gen. Subjects* **1999**, *1473*, 67-95.
- [43] S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, E. N. Lalani, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15286-15293.
- [44] J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *BBA-Mol. Basis Dis.* **1999**, *1455*, 301-313.
- [45] S. von Mensdorff-Pouilly, F. G. Snijdewint, A. A. Verstraeten, R. H. Verheijen, P. Kenemans, *Int J Biol Markers* **2000**, *15*, 343-356.
- [46] F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439-449.
- [47] J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, T. Plunkett, R. Graham, I. Correa, D. Miles, M. Smith, *J. Mammary Gland Biol.* **2002**, *7*, 209-221.
- [48] A. M. Vlad, J. C. Kettel, N. M. Alajez, C. A. Carlos, O. J. Finn, *Adv. Immunol.* **2004**, *82*, 249-293.
- [49] S. J. Williams, D. J. Munster, R. J. Quin, D. C. Gotley, M. A. McGuckin, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1999**, *261*, 83-89.
- [50] N. Moniaux, F. Escande, S. K. Batra, N. Porchet, A. Laine, J.-P. Aubert, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4536-4544.
- [51] S. J. Williams, M. A. McGuckin, D. C. Gotley, H. J. Eyre, G. R. Sutherland, T. M. Antalis, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4083-4089.
- [52] S. J. Williams, D. H. Wreschner, M. Tran, H. J. Eyre, G. R. Sutherland, M. A. McGuckin, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18327-18336.
- [53] L. T. Pallesen, L. Berglund, L. K. Rasmussen, T. E. Petersen, J. T. Rasmussen, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 2755-2763.
- [54] B. W. T. Yin, A. Dnistrian, K. O. Lloyd, *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 737-740.
- [55] J. R. Gum Jr., S. C. Crawley, J. W. Hicks, D. E. Szymkowski, Y. S. Kim, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2002**, *291*, 466-475.
- [56] J. Hilkens, M. J. L. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 359-363.
- [57] P. Pandey, S. Kharbanda, D. Kufe, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 4000-4003.
- [58] J. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol.* **2001**, *6*, 355-364.
- [59] I. Brockhausen, *Biochem. Soc. T.* **2003**, *31*, 318-325.
- [60] J. Hilgers, S. Zotter, P. Kenemans, *Cancer Reviews* **1988**, *11/12*, 1-10.
- [61] S. Zotter, P. C. Hageman, A. Lossnitzer, W. J. Mooi, J. Hilgers, *Cancer Reviews* **1988**, *11/12*, 55-101.
- [62] S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 197-204.
- [63] M. Inoue, H. Ogawa, K. Nakanishi, O. Tanizawa, K. Karino, J. Endo, *Obstet Gynecol* **1990**, *75*, 1032-1036.
- [64] I. Takahashi, Y. Maehara, T. Kusumoto, M. Yoshida, Y. Kakeji, H. Kusumoto, M. Furusawa, K. Sugimachi, *Cancer* **1993**, *72*, 1836-1840.
- [65] J. Heimburg-Molinaro, M. Lum, G. Vijay, M. Jain, A. Almogren, K. Rittenhouse-Olson, *Vaccine* **2011**, *29*, 8802-8826.

- [66] M. Fukuda, S. R. Carlsson, J. C. Klock, A. Dell, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 12796-12806.
- [67] S. Müller, K. Alving, J. Peter-Katalinic, N. Zachara, A. A. Gooley, F.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18165-18172.
- [68] N. T. Marcos, A. Cruz, F. Silva, R. Almeida, L. David, U. Mandel, H. Clausen, S. v. Mensdorff-Pouilly, C. A. Reis, *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, *51*, 761-771.
- [69] D. Baeckström, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11503-11509.
- [70] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5386-5394.
- [71] J. D. Fontenot, S. V. Santhana Mariappan, P. Catasti, N. Domenech, O. J. Finn, G. Gupta, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, *13*, 245-260.
- [72] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981-4993.
- [73] M. A. Tarp, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, *17*, 197-209.
- [74] U. Westerlind, H. Schröder, A. Hobel, N. Gaidzik, A. Kaiser, C. M. Niemeyer, E. Schmitt, H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8413-8417.
- [75] J. Gong, V. Apostolopoulos, D. Chen, H. Chen, S. Koido, S. J. Gendler, I. F. McKenzie, D. Kufe, *Immunology* **2000**, *101*, 316-324.
- [76] P. Mukherjee, A. R. Ginardi, T. L. Tinder, C. J. Sterner, S. J. Gendler, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 848-855.
- [77] J. Wesseling, S. W. van der Valk, J. Hilkens, *Mol Biol Cell* **1996**, *7*, 565-577.
- [78] J. Wesseling, S. W. van der Valk, H. L. Vos, A. Sonnenberg, J. Hilkens, *J. Cell Biol.* **1995**, *129*, 255-265.
- [79] G. A. Banat, O. Christ, B. Cochlovius, H. B. Pralle, M. Zöller, *Cancer Immunol. Immun.* **2001**, *49*, 573-586.
- [80] Y. Kim, A. Varki, *Glycoconjugate J* **1997**, *14*, 569-576.
- [81] D. Boraschi, A. Tagliabue, *Methods* **1999**, *19*, 108-113.
- [82] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803-7808.
- [83] R. Sangha, C. Butts, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4652s-4654s.
- [84] C. Schimanski, M. Mohler, M. Schon, E. van Cutsem, R. Greil, W. Bechstein, S. Hegewisch-Becker, G. von Wichert, M. Vohringer, M. Heike, V. Heinemann, M. Peeters, S. Kanzler, S. Kasper, F. Overkamp, J. Schroder, D. Seehofer, F. Kullmann, B. Linz, I. Schmidtman, V. Smith-Machnow, I. Gockel, H. Lang, P. Galle, *BMC Cancer* **2012**, *12*, 144.
- [85] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 618-621.
- [86] B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8777-8778.
- [87] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473-1482.
- [88] N. Bézay, *Dissertation* **2000**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [89] C. Brocke, *Dissertation* **2003**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [90] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976-980.
- [91] E. Vowinkel, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 16-22.
- [92] G. Braum, *Dissertation* **1991**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [93] M. Schultz, H. Kunz, *Tetrahedron-Asymmetr.* **1993**, *4*, 1205-1220.
- [94] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 629-631.
- [95] A. P. Kozikowski, J. Lee, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 863-870.
- [96] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129-132.
- [97] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.
- [98] W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957-981.
- [99] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89-107.
- [100] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Liebigs Ann Chem* **1982**, *1982*, 1121-1131.

- [101] I. Takahashi, Y. Maehara, T. Kusumoto, S. Kohnoe, Y. Kakeji, H. Baba, K. Sugimachi, *Br. J. Cancer* **1994**, *69*, 163-166.
- [102] R. Soares, F. Schmitt, *Int. J. Surg. Pathol.* **1999**, *7*, 59.
- [103] S. Zhang, H. S. Zhang, C. Cordon-Cardo, V. E. Reuter, A. K. Singhal, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 50-56.
- [104] K. Ryuko, O. Iwanari, S. Nakayama, K. Iida, M. Kitao, *Cancer* **1992**, *69*, 2368-2378.
- [105] J. L. Werther, S. Rivera-MacMurray, H. Bruckner, M. Tatematsu, S. H. Itzkowitz, *Br. J. Cancer* **1994**, *69*, 613-616.
- [106] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 366-369.
- [107] H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115-116.
- [108] O. Kanie, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 501-506.
- [109] A. Hasegawa, H. Ohki, T. Nagahama, H. Ishida, M. Kiso, *Carbohydr. Res.* **1991**, *212*, 277-281.
- [110] R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, *1990*, 694-696.
- [111] G.-J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4539-4566.
- [112] T. Martin, R. Brescello, A. Toepfer, R. Schmidt, *Glycoconjugate J* **1993**, *10*, 16-25.
- [113] A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35-42.
- [114] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379-382.
- [115] A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 317-322.
- [116] K. Furuhata, K. Komiyama, H. Ogura, T. Hata, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 255-259.
- [117] P. J. Garegg, *Adv Carbohydr. Chem. Bi.* **1997**, *52*, 179-205.
- [118] F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, c13-c17.
- [119] P. Fügedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1986**, *149*, C9-C12.
- [120] A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1990**, *195*, 303-308.
- [121] G. H. Veeneman, S. H. van Leeuwen, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331-1334.
- [122] P. Konradsson, U. E. Udodong, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4313-4316.
- [123] G. Zemplén, A. Kunz, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1923**, *56*, 1705-1710.
- [124] G. Springer, *Science* **1984**, *224*, 1198-1206.
- [125] F. J. Irazoqui, G. A. Nores, *Curr. Cancer Drug Tar.* **2003**, *3*, 433-443.
- [126] C. Schindlbeck, U. Jeschke, S. Schulze, U. Karsten, W. Janni, B. Rack, S. Krajewski, H. Sommer, K. Friese, *Breast Cancer Res. Treat.* **2007**, *101*, 17-25.
- [127] S. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, C. Fernandez, M. Diani, D. Verbel, S. Danishefsky, P. Livingston, H. Scher, *Cancer Immunol. Immun.* **2005**, *54*, 694-702.
- [128] O. T. Schmidt, in *Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. II* (Eds.: R. L. Whistler, M. L. Wolfrom, J. N. BeMiller), Academic Press Inc., New York, London, **1963**, pp. 318 – 325.
- [129] H. Herzner, *Dissertation* **2001**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [130] C. Filser, *Diplomarbeit* **2001**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- [131] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis, in Methods in Carbohydrate Chemistry*, 3. ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, **1999**.
- [132] X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6569-6578.
- [133] G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 602-615.
- [134] M. Lergenmüller, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 1381-1394.
- [135] M. E. Evans, *Carbohydr. Res.* **1972**, *21*, 473-475.
- [136] R. R. Schmidt, J. Michell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1980**, *19*, 731-732.
- [137] R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 212-235.
- [138] T. Reipen, *Dissertation* **2003**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

- [139] T. Reipen, H. Kunz, *Synthesis* **2003**, *16*, 2487-2502.
- [140] J. Banoub, D. R. Bundle, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 2091-2097.
- [141] K. Baumann, *Dissertation* **2009**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [142] B. Helferich, K.-F. Wedemeyer, *Liebigs Ann Chem* **1949**, *563*, 139-145.
- [143] B. Helferich, K. Weis, *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 314-321.
- [144] C. Brocke, H. Kunz, *Synlett* **2003**, *2003*, 2052-2056.
- [145] H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, *125*, 47-64.
- [146] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5229-5232.
- [147] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5233-5236.
- [148] H. Hori, T. Nakajima, Y. Nishida, H. Ohru, H. Meguro, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6317-6320.
- [149] U. Dabrowski, H. Friebolin, R. Brossmer, M. Supp, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 4637-4640.
- [150] D. J. M. van der Vleugel, W. A. R. van Heeswijk, J. F. G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.* **1982**, *102*, 121-130.
- [151] S. Dziadek, *Dissertation* **2005**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [152] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11-15.
- [153] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-2871.
- [154] A. Kuhn, *Dissertation* **2005**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [155] S. Heiner, *Dissertation* **2006**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [156] J. M. Harris, *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry*, Springer, Plenum Press, **1992**.
- [157] S. Keil, *Dissertation* **2000**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [158] R. Sen, D. Baltimore, *Cell* **1986**, *47*, 921-928.
- [159] C. A. Janeway, *Immunologie*, 5 ed., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, **2002**.
- [160] P. C. Schmidt, *Fiedler Encyclopedia of Excipients*, Editio Cantor, **2007**.
- [161] A. M. Didierlaurent, S. Morel, L. Lockman, S. L. Giannini, M. Bisteau, H. Carlsen, A. Kielland, O. Vosters, N. Vanderheyde, F. Schiavetti, D. Larocque, M. Van Mechelen, N. Garçon, *J. Immunol.* **2009**, *183*, 6186-6197.
- [162] C. Exley, *J. Alzheimers Dis.* **2007**, *12*, 313-315.
- [163] C. Exley, P. Siesjö, H. Eriksson, *Trends Immunol.* **2010**, *31*, 103-109.
- [164] C. Exley, *Vaccine* **2011**, *29*, 9289.
- [165] C. Exley, *Vaccine* **2012**, *30*, 2042.
- [166] R. K. Gherardi, M. Coquet, P. Cherin, L. Belec, P. Moretto, P. A. Dreyfus, J.-F. Pellissier, P. Chariot, F.-J. Authier, *Brain* **2001**, *124*, 1821-1831.
- [167] T. K. Chowdhury, A. K. Weiss, *Concanavalin A* Plenum Press, New York, **1975**.
- [168] K. A. Weyer, W. Schaefer, F. Lottspeich, H. Michel, *Biochemistry* **1987**, *26*, 2909-2914.
- [169] A. Herrmann, A. Schlösser, R. Schmid, E. Schneider, *Res. Microbiol.* **1996**, *147*, 733-737.
- [170] M. J. Gómez-Miguel, I. Moriyón, B. Alonso-Urmeneta, J. I. Riezu-Boj, R. Díaz, *Infect. Immun.* **1988**, *56*, 716-718.
- [171] P. F. Mühlrath, M. Kieß, H. Meyer, R. Süßmuth, G. Jung, *J. Exp. Med.* **1997**, 1951-1958.
- [172] G. Jung, C. Carrera, H. Brückner, W. G. Bessler, *Liebigs Ann Chem* **1983**, *1983*, 1608-1622.
- [173] V. Braun, H. Roterling, J. P. Ohms, H. Hagenmaier, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *70*, 601-610.
- [174] K.-H. Wiesmüller, W. Bessler, G. Jung, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1983**, *364*, 593.

- [175] W. G. Bessler, R. B. Johnson, K. Wiesmüller, G. Jung, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1982**, 363, 767.
- [176] W. G. Bessler, M. Cox, A. Lex, B. Suhr, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *J. Immunol.* **1985**, 135, 1900-1905.
- [177] P. Hoffmann, S. Heinle, U. F. Schade, H. Loppnow, A. J. Ulmer, H.-D. Flad, G. Jung, W. G. Bessler, *Immunobiology* **1988**, 177, 158-170.
- [178] R. Seifert, G. Schultz, M. Richter-Freund, J. Metzger, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, W. G. Bessler, S. Hauschildt, *Biochem. J.* **1990**, 267, 795-790.
- [179] V. B. F. Melchers, C. Galanos, *J. Exp. Med.* **1975**, 473-482.
- [180] M. V. Norgard, L. L. Arndt, D. R. Akins, L. L. Curetty, D. A. Harrich, J. D. Radolf, *Infect. Immun.* **1996**, 64, 3845-3852.
- [181] K.-H. Wiesmüller, W. G. Bessler, G. Jung, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1992**, 40, 255-260.
- [182] F. Reichel, A. M. Roelofsen, H. P. M. Geurts, T. I. Hämäläinen, M. C. Feiters, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7989-7997.
- [183] F. Wiedemann, R. Link, K. Pumpe, U. Jacobshagen, H. E. Schaefer, K.-H. Wiesmüller, R.-P. Hummel, G. Jung, W. Bessler, T. Böltz, *J. Pathol* **1991**, 164, 265-271.
- [184] Y. Y. A. Seth, H. Jacoby, J. C. Callery, S. M. Kaminsky, W. C. Koff, D. F. Nixon, N. L. Letvin, *AIDS Res. Hum. Retrov.* **2000**, 16, 337-343.
- [185] J. Metzger, G. Jung, W. G. Bessler, P. Hoffmann, M. Strecker, A. Lieberknecht, U. Schmidt, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1969-1974.
- [186] R. Spohn, U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, K.-H. Wiesmüller, *Vaccine* **2004**, 22, 2494-2499.
- [187] K. Dabbagh, D. B. Lewis, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2003**, 16, 199-204.
- [188] T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5985-5988.
- [189] S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nat Chem Biol* **2007**, 3, 663-667.
- [190] T. Buskas, P. Thompson, G.-J. Boons, *Chem. Commun.* **2009**, 5335-5349.
- [191] S. Ingale, M. A. Wolfert, T. Buskas, G.-J. Boons, *ChemBioChem* **2009**, 10, 455-463.
- [192] B. Frisch, A. Roth, F. Schuber, *Method Enzymol* **2003**, 373, 51-73.
- [193] A. Konur, A. Graser, I. Klamp, S. Kreiter, A. Selmi, M. Diken, C. Huber, Ö. Türeci, U. Sahin, *The Open Cancer Journal* **2008**, 15-24.
- [194] J. Kellner, M. Erhard, I. Schraner, U. Löscher, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1992**, 373, 51-55.
- [195] M. J. S. A. Amaral, M. A. Macedo, M. I. A. Oliveira, *J Chem Soc Perk T 1* **1977**, 205-206.
- [196] V. Swali, M. Matteucci, R. Elliot, M. Bradley, *Tetrahedron* **2002**, 58, 9101-9109.
- [197] O. Lüderitz, M. A. Freudenberg, C. Galanos, V. Lehmann, E. T. Rietschel, D. H. Shaw, in *Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. In Current Topics in Membranes and Transport* (Ed.: S. R. S. Razin), Academic Press, New York, **1982**, pp. 79-151.
- [198] J. F. Jeannin, *Lipid A in Cancer Therapy, Vol. 667* Springer Science + Business Media, New York, **2010**.
- [199] E. T. Rietschel, H. Brade, O. Holst, L. Brade, S. Müller-Loennies, U. Mamat, U. Zähringer, F. Beckmann, U. Seydel, K. Brandenburg, A. J. Ulmer, T. Mattern, H. Heine, J. Schletter, H. Loppnow, U. Schönbeck, H. D. Flad, S. Hauschildt, U. F. Schade, F. Padova, S. Kusumoto, R. R. Schumann, in *Pathology of Septic Shock, Vol. 216* (Eds.: E. T. Rietschel, H. Wagner), Springer Berlin Heidelberg, **1996**, pp. 39-81.
- [200] R. Medzhitov, C. A. Janeway Jr, *Curr. Opin. Immunol.* **1998**, 10, 12-15.
- [201] A. G. Johnson, *Clin. Microbiol. Rev.* **1994**, 7, 277-289.
- [202] C. R. H. Raetz, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, 59, 129-170.

- [203] E. T. Rietschel, T. Kirikae, F. U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A. J. Ulmer, U. Zähringer, U. Seydel, F. Di Padova, *The FASEB Journal* **1994**, *8*, 217-225.
- [204] E. T. Rietschel, H. Brade, L. Brade, K. Brandenburg, U. Schade, U. Seydel, U. Zähringer, C. Galanos, O. Lüderitz, O. Westphal, e. al., *Prog. Clin. Biol. Res.* **1987**, *59*, 25-53.
- [205] J. H. Krauss, U. Seydel, J. Weckesser, H. Mayer, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *180*, 519-526.
- [206] E. T. Rietschel, T. Kirikae, F. U. Schade, A. J. Ulmer, O. Holst, H. Brade, G. Schmidt, U. Mamat, H.-D. Grimmecke, S. Kusumoto, U. Zähringer, *Immunobiology* **1993**, *187*, 169-190.
- [207] O. Holst, H. Brade, in *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, Vol. I*, CRC Press., London, **1992**, pp. 136-170.
- [208] S. A. David, *J. Mol. Recognit.* **2001**, *14*, 370-387.
- [209] U. Seydel, H. Labischinski, M. Kastowsky, K. Brandenburg, *Immunobiology* **1993**, *187*, 191-211.
- [210] K. Takayama, D. H. Mitchell, Z. Z. Din, P. Mukerjee, C. Li, D. L. Coleman, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2241-2244.
- [211] D. L. Rosenstreich, S. N. Vogel, A. R. Jacques, L. M. Wahl, J. J. Oppenheim, *J. Immunol.* **1978**, *121*, 1664-1670.
- [212] S. D. Wright, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, R. A. Ramos, *J. Exp. Med.* **1989**, *170*, 1231-1241.
- [213] R. Schumann, Leong, G. Flaggs, P. Gray, S. Wright, J. Mathison, P. Tobias, R. Ulevitch, *Science* **1990**, *249*, 1429-1431.
- [214] S. M. Opal, P. J. Scannon, J.-L. Vincent, M. White, S. F. Carroll, J. E. Palardy, N. A. Parejo, J. P. Pribble, J. H. Lemke, *J. Infect. Dis.* **1999**, *180*, 1584-1589.
- [215] T. N. Kirkland, S. Viriyakosol, *Prog. Clin. Biol. Res.* **1998**, *397*, 79-87.
- [216] S. Wright, R. Ramos, P. Tobias, R. Ulevitch, J. Mathison, *Science* **1990**, *249*, 1431-1433.
- [217] R. J. Ulevitch, P. S. Tobias, *Annu. Rev. Immunol.* **1995**, *13*, 437-457.
- [218] N. Lamping, A. Hoess, B. Yu, T. C. Park, C. J. Kirschning, D. Pfeil, D. Reuter, S. D. Wright, F. Herrmann, R. R. Schumann, *J. Immunol.* **1996**, *157*, 4648-4656.
- [219] A. Tall, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 235-257.
- [220] M. A. Dentener, E. J. Von Asmuth, G. J. Francot, M. N. Marra, W. A. Buurman, *J. Immunol.* **1993**, *151*, 4258-4265.
- [221] M. R. Büttner, *Dissertation* **2005**, Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité.
- [222] R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, M. Kimoto, *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1777-1782.
- [223] R. Ramanathan, K. Lee, J. McKolanis, E. Hitbold, W. Schraut, A. Moser, E. Warnick, T. Whiteside, J. Osborne, H. Kim, R. Day, M. Troetschel, O. Finn, *Cancer Immunol. Immun.* **2005**, *54*, 254-264.
- [224] D. A. Johnson, D. S. Keegan, C. G. Sowell, M. T. Livesay, C. L. Johnson, L. M. Taubner, A. Harris, K. R. Myers, J. D. Thompson, G. L. Gustafson, M. J. Rhodes, J. T. Ulrich, J. R. Ward, Y. M. Yorgensen, J. L. Cantrell, V. G. Brookshire, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4640-4649.
- [225] K. Takayama, N. Qureshi, P. Mascagni, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 12801-12803.
- [226] M. Imoto, H. Yoshimura, N. Sakaguchi, S. Kusumoto, T. Shiba, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1545-1548.
- [227] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1763-1765.
- [228] S. Hanessian, P. Lavalley, *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 2975-2977.
- [229] J. Heberle, *Silylating Agents*, Second Edition ed., Fluka Chemie AG, Buchs, **1995**.

- [230] T. D. Nelson, R. D. Crouch, *Synthesis* **1996**, 1996, 1031-1069.
- [231] J. Banoub, P. Boullanger, D. Lafont, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1167-1195.
- [232] T. B. Windholz, D. B. R. Johnston, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 8, 2555-2557.
- [233] P. Boullanger, M. Jouineau, B. Bouammali, D. Lafont, G. Descotes, *Carbohydr. Res.* **1990**, 202, 151-164.
- [234] U. Ellervik, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1996**, 280, 251-260.
- [235] L. A. Carpino, *Accounts Chem. Res.* **1987**, 20, 401-407.
- [236] Y. Oikawa, K. Sugano, O. Yonemitsu, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2087-2088.
- [237] R. Noyori, T. Ohkuma, M. Kitamura, H. Takaya, N. Sayo, H. Kumobayashi, S. Akutagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5856-5858.
- [238] R. Noyori, T. Ohkuma, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 40-75.
- [239] R. Noyori, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2108-2123.
- [240] C. Diolez, S. R. Sarfati, L. Szabo, *J Chem Soc Perk T 1* **1985**, 0, 57-60.
- [241] S. Hatakeyama, H. Mori, K. Kitano, H. Yamada, M. Nishizawa, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 4367-4370.
- [242] T. Tsunoda, M. Suzuki, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 1357-1358.
- [243] T. Tsunoda, M. Suzuki, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 4679-4680.
- [244] O. R. Martin, W. Zhou, X. Wu, S. Front-Deschamps, S. Moutel, K. Schindl, P. Jeandet, C. Zbaeren, J. A. Bauer, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6000-6014.
- [245] W. Dullenkopf, J. C. Castro-Palomino, L. Manzoni, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **1996**, 296, 135-147.
- [246] G. Excoffier, D. Gagnaire, J.-P. Utille, *Carbohydr. Res.* **1975**, 39, 368-373.
- [247] J. Zhang, P. Kováč, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, 18, 461-469.
- [248] S. K. Chaudhary, O. Hernandez, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 99-102.
- [249] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 556-557.
- [250] P. J. Garegg, H. Hultberg, S. Wallin, *Carbohydr. Res.* **1982**, 108, 97-101.
- [251] M. P. DeNinno, J. B. Etienne, K. C. Duplantier, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 669-672.
- [252] M. Sakagami, H. Hamana, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 5547-5551.
- [253] S. S. Bhattacharjee, P. A. J. Gorin, *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 1195-1206.
- [254] W. Bannwarth, E. Küng, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4219-4222.
- [255] W. J. Christ, P. D. McGuinness, O. Asano, Y. Wang, M. A. Mullarkey, M. Perez, L. D. Hawkins, T. A. Blythe, G. R. Dubuc, A. L. Robidoux, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3637-3638.
- [256] Y. Watanabe, Y. Komoda, K. Ebisuya, S. Ozaki, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 255-256.
- [257] H. Yoshizaki, N. Fukuda, K. Sato, M. Oikawa, K. Fukase, Y. Suda, S. Kusumoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1475-1480.
- [258] Y. Hayakawa, H. Kato, M. Uchiyama, H. Kajino, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 2400-2402.
- [259] Y. Sakai, M. Oikawa, H. Yoshizaki, T. Ogawa, Y. Suda, K. Fukase, S. Kusumoto *, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 6843-6847.
- [260] P. Szabó, S. R. Sarfati, C. Diolez, L. Szabó, *Carbohydr. Res.* **1983**, 111, c9-c12.
- [261] S. Kusumoto, H. Yoshimura, M. Imoto, T. Shimamoto, T. Shiba, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 909-912.
- [262] S. Pawlenko, in *Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Vol. XIII/5* (Eds.: O. Bayer, E. Müller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1980**, p. 14.
- [263] K. K. Maiti, M. DeCastro, A.-B. M. Abdel-Aal El-Sayed, M. I. Foote, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 80-91.
- [264] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 8 überarbeitete und erweiterte Auflage ed., Thieme, Stuttgart, **2013**.
- [265] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, 92, 763-764.
- [266] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213-236.

- [267] R. R. Schmidt, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1257-1270.
- [268] R. R. Schmidt, W. Kinzy, *Adv Carbohydr. Chem. Bi.* **1994**, *50*, 21-123.
- [269] R. Appel, *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 863-874.
- [270] H. Kunz, C. Unverzagt, *J. prakt. Chem.* **1992**, *334*, 579-583.
- [271] B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1939-1944.
- [272] R. B. Merrifield, A. E. Bach, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4808-4816.
- [273] V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1269-1272.
- [274] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, 572-574.
- [275] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [276] R. R. Schmidt, W. Kinzy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-123.
- [277] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- [278] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J Chem Soc Chem Comm* **1994**, 201-203.
- [279] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 457-461.
- [280] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [281] J. Hiebl, H. Baumgartner, I. Bernwieser, M. Blanka, M. Bodenteich, K. Leitner, A. Rio, F. Rovenszky, D. P. Alberts, P. K. Bhatnagar, A. F. Banyard, K. Baresch, P. M. Esch, H. Kollmann, G. Mayrhofer, H. Weihtrager, W. Welz, K. Winkler, T. Chen, R. Patel, I. Lantos, D. Stevenson, K. D. Tubman, K. Undheim, *J. Peptide Res.* **1999**, *54*, 54-65.
- [282] R. Escher, P. Bünning, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 277-278.
- [283] F. Burkhart, M. Hoffmann, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1191-1192.
- [284] M. Wedel, A. Walter, F. P. Montforts, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 1681-1687.
- [285] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, **2001**.
- [286] S. Chandrasekaran, A. F. Kluge, J. A. Edwards, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3972-3974.
- [287] A. M. Vlad, S. Muller, M. Cudic, H. Paulsen, L. Otvos, F.-G. Hanisch, O. J. Finn, *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 1435-1446.
- [288] M. B. Deck, P. Sjölin, E. R. Unanue, J. Kihlberg, *J. Immunol.* **1999**, *162*, 4740-4744.
- [289] N. Serttas, *Dissertation* **2004**, Universität Hamburg.
- [290] G. Ragupathi, F. Koide, P. O. Livingston, Y. S. Cho, A. Endo, Q. Wan, M. K. Spassova, S. J. Keding, J. Allen, O. Ouerfelli, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2715-2725.
- [291] J. Zhu, Q. Wan, G. Ragupathi, C. M. George, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4151-4158.
- [292] T. Matsushita, H. Hinou, M. Fumoto, M. Kuroguchi, N. Fujitani, H. Shimizu, S.-I. Nishimura, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3051-3063.
- [293] S. Slovin, G. Ragupathi, C. Fernandez, M. Diani, M. Jefferson, A. Wilton, W. K. Kelly, M. Morris, D. Solit, H. Clausen, P. Livingston, H. Scher, *Cancer Immunol. Immun.* **2007**, *56*, 1921-1930.
- [294] J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691-696.
- [295] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624-7630.
- [296] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- [297] P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek, *Science* **2001**, *291*, 2370-2376.
- [298] K. Ohtsubo, J. D. Marth, *Cell* **2006**, *126*, 855-867.
- [299] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science* **2001**, *291*, 2357-2364.

- [300] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10153-10157.
- [301] H. Kunz, M. Schultz, *Recent Advances in the Synthesis of Glycopeptides*, M. Dekker, Inc., New York, **1997**.
- [302] J. B. Schwarz, S. D. Kuduk, X.-T. Chen, D. Sames, P. W. Glunz, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2662-2673.
- [303] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [304] M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077-3080.
- [305] E. Bayer, W. Rapp, *Chemistry of Peptides and Proteins* **1986**, *3*, 3 - 8.
- [306] S. Butz, S. Rawer, W. Rapp, U. Birsner, *Pept. Res.* **1994**, *7*, 20.
- [307] C. T. Bui, F. A. Rasoul, F. Ercole, Y. Pham, N. J. Maeji, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9279-9282.
- [308] W. Rapp, in *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries, A Handbook* (Ed.: G. Jung), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1996**, p. 425.
- [309] M. Meldal, F.-I. Auzanneau, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J Chem Soc Chem Comm* **1994**, 1849-1850.
- [310] J. C. Spetzler, V. Westphal, J. R. Winther, M. Meldal, *J. Peptide Sci.* **1998**, *4*, 128-137.
- [311] M. Meldal, I. Svendsen, *J Chem Soc Perk T 1* **1995**, 1591-1596.
- [312] R. Warras, in *Combinatorial Chemistry*, 1. ed. (Ed.: G. Jung), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [313] S.-S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [314] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005-4008.
- [315] M. Mergler, R. Nyfeler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4009-4012.
- [316] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
- [317] J. M. J. Fréchet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 3055-3056.
- [318] K. Barlos, D. Gatos, I. Kallitsis, D. Papaioannou, P. Sotiriou, *Liebigs Ann Chem* **1988**, *1988*, 1079-1081.
- [319] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946.
- [320] K. Barlos, D. Gatos, S. Kapolos, G. Papaphotiu, W. Schäfer, Y. Wenqing, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3947-3950.
- [321] K. Barlos, D. Gatos, W. Schäfer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 590-593.
- [322] S. Bräse, S. Dahmen, in *Handbook of Combinatorial Chemistry, Drugs, Catalysts, Materials* (Eds.: K. C. Nicolaou, R. Hanko, W. Hartwig), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**, pp. 66-68.
- [323] W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295-1300.
- [324] R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1982**, *20*, 451-454.
- [325] D. G. Mullen, G. Barany, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 491-494.
- [326] H.-G. Chao, M. S. Bernatowicz, P. D. Reiss, C. E. Klimas, G. R. Matsueda, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1746-1752.
- [327] R. Ramage, C. A. Barron, S. Bielecki, D. W. Thomas, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4105-4108.
- [328] M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 315-319.
- [329] H. Kunz, B. Dombo, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 732-734.
- [330] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 901-904.
- [331] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813-826.
- [332] B. Blankemeyer-Menge, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5871-5874.
- [333] F. Guibé, O. Dangles, G. Balavoine, A. Loffet, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2641-2644.

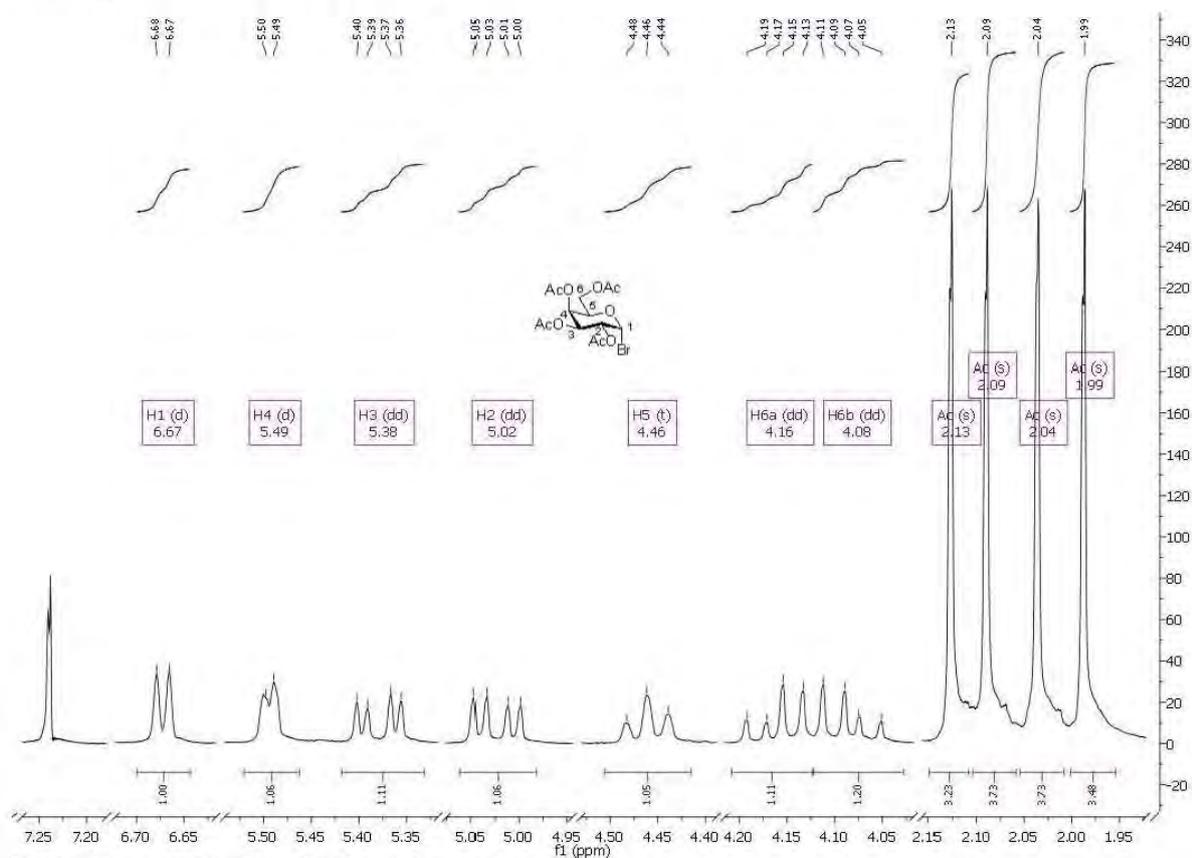
- [334] D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J Chem Soc Chem Comm* **1973**, 610-611.
- [335] F. S. Tjoeng, G. A. Heavner, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 355-359.
- [336] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 98-101.
- [337] G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180-6183.
- [338] F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686-4690.
- [339] J. P. Tam, W. F. Heath, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6442-6455.
- [340] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
- [341] E. Atherton, C. J. Logan, R. C. Sheppard, *J Chem Soc Perk T 1* **1981**, 538-546.
- [342] P. Schultheiß-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 64-64.
- [343] M. Rothe, J. Mazánek, *Liebigs Ann Chem* **1974**, *1974*, 439-459.
- [344] A. R. Battersby, J. C. Robinson, *J. Chem. Soc.* **1955**, 259-269.
- [345] M. Bodanszky, J. Martinez, *Synthesis* **1981**, *1981*, 333-356.
- [346] E. Nicolás, E. Pedroso, E. Giral, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 497-500.
- [347] S. Capasso, L. Mazzarella, F. Sica, A. Zagari, S. Salvadori, *J Chem Soc Chem Comm* **1992**, 919-921.
- [348] Y. Yang, W. V. Sweeney, K. Schneider, S. Thörnqvist, B. T. Chait, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9689-9692.
- [349] J. Lauer, C. Fields, G. Fields, *Lett Pept Sci* **1995**, *1*, 197-205.
- [350] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- [351] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- [352] V. Krchňák, J. Vágner, M. Lebl, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1988**, *32*, 415-416.
- [353] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739-2742.
- [354] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J Chem Soc Chem Comm* **1994**, 2559-2560.
- [355] H.-D. Jakubke, H. Jeschkeit, *Aminosäuren, Peptide, Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim, **1982**.
- [356] C. Schütt, B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*, 2. ed., Spektrum, Akad. Verlag, **2009**.
- [357] J. Neumann, *Immunbiologie: Eine Einführung*, Springer London, Limited, **2008**.
- [358] J. Banachereau, R. M. Steinman, *Nature* **1998**, *392*, 245-252.
- [359] S. Rivest, S. Lacroix, L. Vallières, S. Nadeau, J. Zhang, N. Laflamme, *P. Soc. Exp. Biol. Med.* **2000**, *223*, 22-38.
- [360] G. Antoni, R. Presentini, F. Perin, A. Tagliabue, P. Ghiara, S. Censini, G. Volpini, L. Villa, D. Boraschi, *J. Immunol.* **1986**, *137*, 3201-3204.
- [361] F. Horn, *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*, G. Thieme Verlag, **2009**.
- [362] L. Nencioni, L. Villa, A. Tagliabue, G. Antoni, R. Presentini, F. Perin, S. Silvestri, D. Boraschi, *J. Immunol.* **1987**, *139*, 800-804.
- [363] K. V. Rao, A. R. Nayak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 5519-5522.
- [364] A. Tagliabue, D. Boraschi, *Vaccine* **1993**, *11*, 594-595.
- [365] C. S. McCune, D. M. Marquis, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 1212-1215.
- [366] B. J. McFarland, A. J. Sant, T. P. Lybrand, C. Beeson, *Biochemistry* **1999**, *38*, 16663-16670.
- [367] T. Bickert, G. Wohlleben, M. Brinkman, C. Trujillo-Vargas, C. Ruehland, C. A. Reiser, J. Hess, K. Erb, *Med Microbiol Immunol* **2007**, *196*, 31-39.
- [368] A. L. Szymczak-Workman, C. J. Workman, D. A. A. Vignali, *J. Immunol.* **2009**, *182*, 5188-5192.
- [369] G. Johnsen, S. Elsayed, *Mol Immunol* **1990**, *27*, 821-827.

- [370] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662-7667.
- [371] K.-H. Wiesmüller, G. Jung, G. Hess, *Vaccine* **1989**, *7*, 29-33.
- [372] J. W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *Int. J. of Pept. Protein Res.* **1991**, *38*, 545 - 554.
- [373] J. Metzger, K.-H. Wiesmüller, R. Schaudé, W. G. Bessler, G. Jung, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1991**, *37*, 46-57.
- [374] H. Petra, W. Karl-Heinz, M. Jörg, J. Günther, B. W. G., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1989**, *370*, 575 - 582.
- [375] K. Deres, H. Schild, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, H.-G. Rammensee, *Nature* **1989**, *342*, 561-564.
- [376] T. Becker, *Dissertation* **2006**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [377] A. Kaiser, *Dissertation* **2012**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [378] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882-912.
- [379] B. L. Wilkinson, S. Day, L. R. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1673-1677.
- [380] U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 359-362.
- [381] U. Sprengard, *Dissertation* **1996**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [382] U. Sprengard, G. Kretzschmar, E. Bartnik, C. Hüls, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1104-1107.
- [383] S. Muller, H.V. van Regenmortel, *Synthetic Peptides as Antigens*, Elsevier Science, **1999**.
- [384] T. Peters Jr, *Adv. Protein Chem.* **1985**, *Volume 37*, 161-245.
- [385] J. R. Harris, J. Markl, *Micron* **1999**, *30*, 597-623.
- [386] H. Amir-Kroll, G. Nussbaum, I. R. Cohen, *J. Immunol.* **2003**, *170*, 6165-6171.
- [387] B. M. Diethelm-Okita, R. Raju, D. K. Okita, B. M. Contl-Fine, *J. Infect. Dis.* **1997**, *175*, 382-391.
- [388] L. C. Paoletti, M. R. Wessels, F. Michon, J. DiFabio, H. J. Jennings, D. L. Kasper, *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 4009-4014.
- [389] J. Dame, J. Williams, T. McCutchan, J. Weber, R. Wirtz, W. Hockmeyer, W. Maloy, J. Haynes, I. Schneider, D. Roberts, a. et, *Science* **1984**, *225*, 593-599.
- [390] F. Zavala, J. Tam, M. Hollingdale, A. Cochrane, I. Quakyi, R. Nussenzweig, V. Nussenzweig, *Science* **1985**, *228*, 1436-1440.
- [391] J. Mukherjee, A. Casadevall, M. D. Scharff, *J. Exp. Med.* **1993**, *177*, 1105-1116.
- [392] E. E. M. G. Loomans, A. P.-v. Ettekoven, H. P. J. Bloemers, W. J. G. Schielen, *Anal. Biochem.* **1997**, *248*, 117-129.
- [393] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579-602.
- [394] A. F. S. A. Habeeb, R. Hiramoto, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *126*, 16-26.
- [395] R. B. Mikkelsen, D. F. Wallach, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 7413-7416.
- [396] J. Sheehan, P. Cruickshank, G. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2525-2528.
- [397] T. H. Ji, *Method Enzymol* **1983**, *Volume 91*, 580-609.
- [398] T. H. Ji, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7841-7847.
- [399] T. Kitagawa, T. Shimozono, T. Aikawa, T. Yoshida, H. Nishimura, *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 1130-1135.
- [400] S. Yoshitake, M. Imagawa, E. Ishikawa, Y. Niitsu, I. Urushizaki, M. Nishiura, R. Kanazawa, H. Kurosaki, S. Tachibana, N. Nakazawa, H. Ogawa, *J. Biochem.* **1982**, *92*, 1413-1424.
- [401] O. Keller, J. Rudinger, *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 531-541.
- [402] T. Buskas, Y. Li, G.-J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3517-3524.

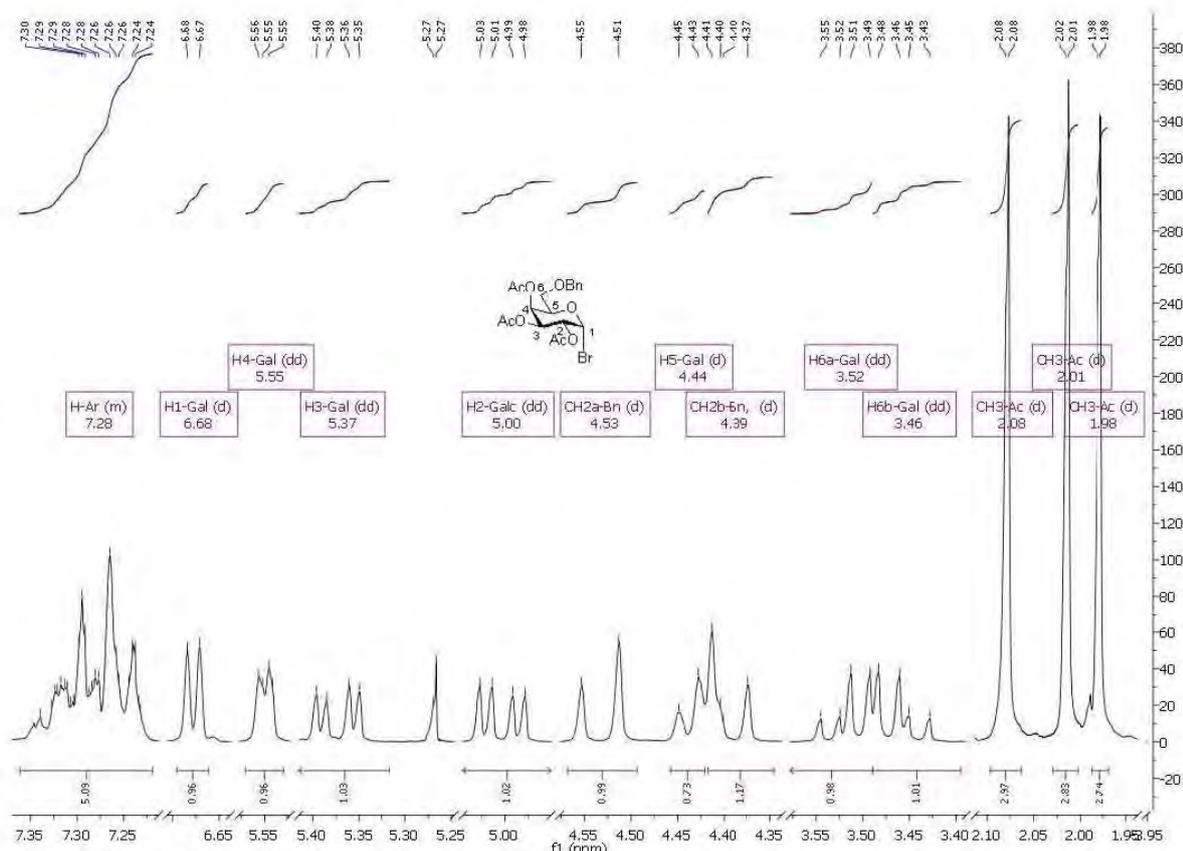
- [403] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1215-1221.
- [404] L. F. Tietze, C. Schroeter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H. J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 148-153.
- [405] F. W. Putnam, in *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*, Vol. 1, 2nd ed., Academic Press, New York, **1975**, pp. 141, 147.
- [406] R. G. Reed, F. W. Putnam, T. Peters, *Biochem. J.* **1980**, *191*, 867-860.
- [407] K. Hirayama, S. Akashi, M. Furuya, K. Fukuhara, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1990**, *173*, 639-646.
- [408] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, Z.-Y. Sun, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1719-1723.
- [409] S. G. Murphy, K. D. Miller, *J. Bacteriol.* **1967**, *94*, 580-585.
- [410] S. G. Murphy, *J. Bacteriol.* **1967**, *94*, 586-589.
- [411] B. Bizzini, A. Turpin, M. Raynaud, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1973**, *276*, 271-288.
- [412] U. Eisel, W. Jarausch, K. Goretzki, A. Henschen, J. Engels, U. Weller, M. Hudel, E. Habermann, H. Niemann, *Embo J* **1986**, *5*, 2495-2502.
- [413] <http://www.uniprot.org/uniprot/P04958>.
- [414] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551-7555.
- [415] N. Gaidzik, *Dissertation 2012*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [416] S. Wagner, *Dissertation 2014*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [417] V. Semmling, V. Lukacs-Kornek, C. A. Thaiss, T. Quast, K. Hochheiser, U. Panzer, J. Rossjohn, P. Perlmutter, J. Cao, D. I. Godfrey, P. B. Savage, P. A. Knolle, W. Kolanus, I. Forster, C. Kurts, *Nat Immunol* **2010**, *11*, 313-320.
- [418] C. Jacobs, P. Duewell, K. Heckelsmiller, J. Wei, F. Bauernfeind, J. Ellermeier, U. Kisser, C. A. Bauer, M. Dauer, A. Eigler, E. Maraskovsky, S. Endres, M. Schnurr, *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 897-907.
- [419] G. G. Meadows, *Integration/Interaction of Oncologic Growth*, Springer, **2006**.
- [420] F. Mosaffa, H. Lage, J. Afshari, J. Behravan, *Inflamm. Res.* **2009**, *58*, 669-676.
- [421] G. Forni, T. Musso, C. Jemma, D. Boraschi, A. Tagliabue, M. Giovarelli, *J. Immunol.* **1989**, *142*, 712-718.
- [422] G. Forni, M. Giovarelli, M. C. Bosco, P. Caretto, A. Modesti, D. Boraschi, *Int J Cancer Suppl* **1989**, *4*, 62-65.
- [423] S. North, C. Butts, *Expert Review of Vaccines* **2005**, *4*, 249-257.
- [424] D. D. Perrin, W. L. F. Amarego, "Purification of Laboratory Chemicals", Pergamon Press, Oxford, **1998**.
- [425] International Union of Pure and Applied Chemistry, International Union of Biochemistry, *Pure Appl. Chem* **1984**, Vol. 56, 595.
- [426] G. Braum, Dissertation thesis, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **1991**.
- [427] B. K. Shull, Z. Wu, M. Koreeda, *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*, 955-964.
- [428] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J Chem Soc Perk T 1* **1996**, 985-993.
- [429] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann Chem* **1989**, *1989*, 751-769.
- [430] C. Barth, O. Seitz, H. Kunz, *Z. Naturforsch.* **2004** *59*, 802-806
- [431] J. G. Schellinger, L. M. Danan-Leon, J. A. Hoch, A. Kassa, I. Srivastava, D. Davis, J. Gervay-Hague, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3230-3233.
- [432] H. Thoma, G. Spiteller, *Liebigs Ann Chem* **1983**, *1983*, 1237-1248.
- [433] J. Bauer, K. Brandenburg, U. Zähringer, J. Rademann, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7116-7124.

-
- [434] M. Utaka, H. Watabu, H. Higashi, T. Sakai, S. Tsuboi, S. Torii, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3917-3921.
- [435] M. Oikawa, S. Kusumoto, *Tetrahedron-Asymmetr.* **1995**, *6*, 961-966.
- [436] H. Paulsen, C. Krogmann, *Liebigs Ann Chem* **1989**, *1989*, 1203-1213.

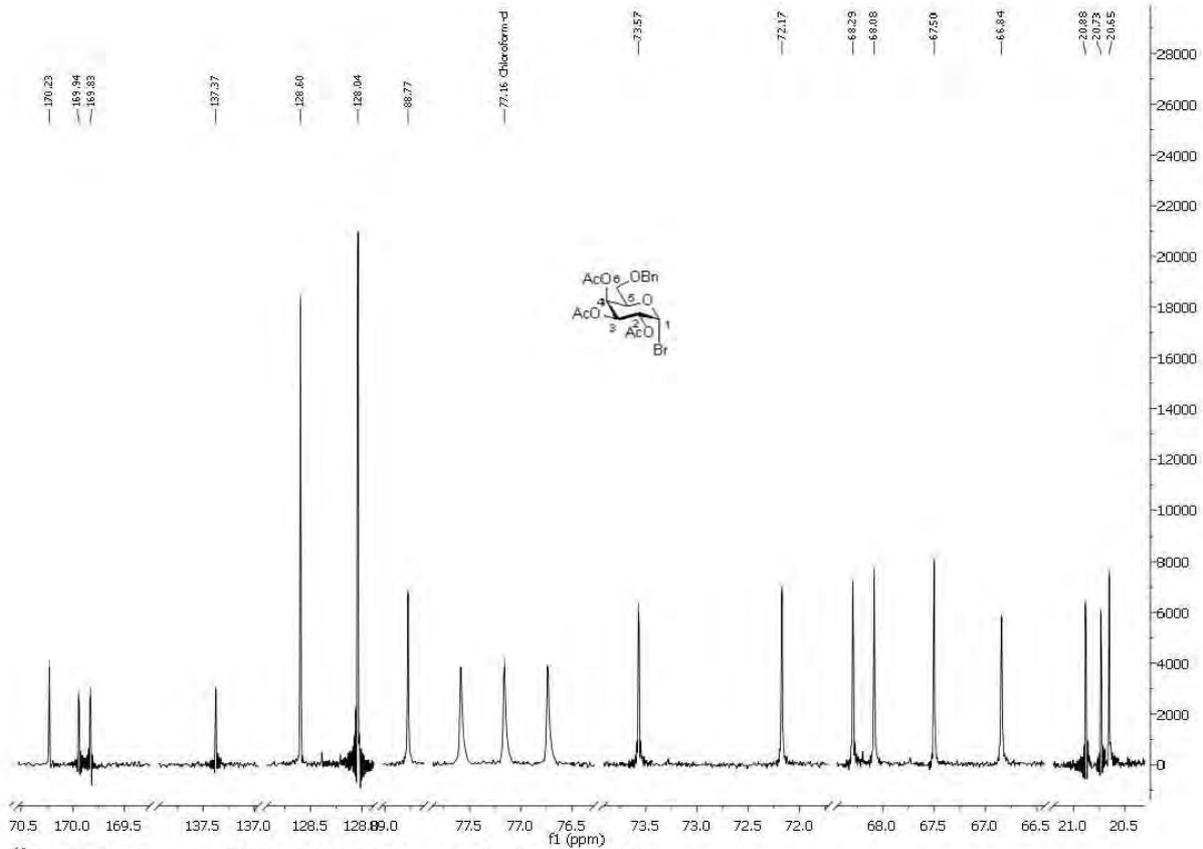
7 Spektrenanhang



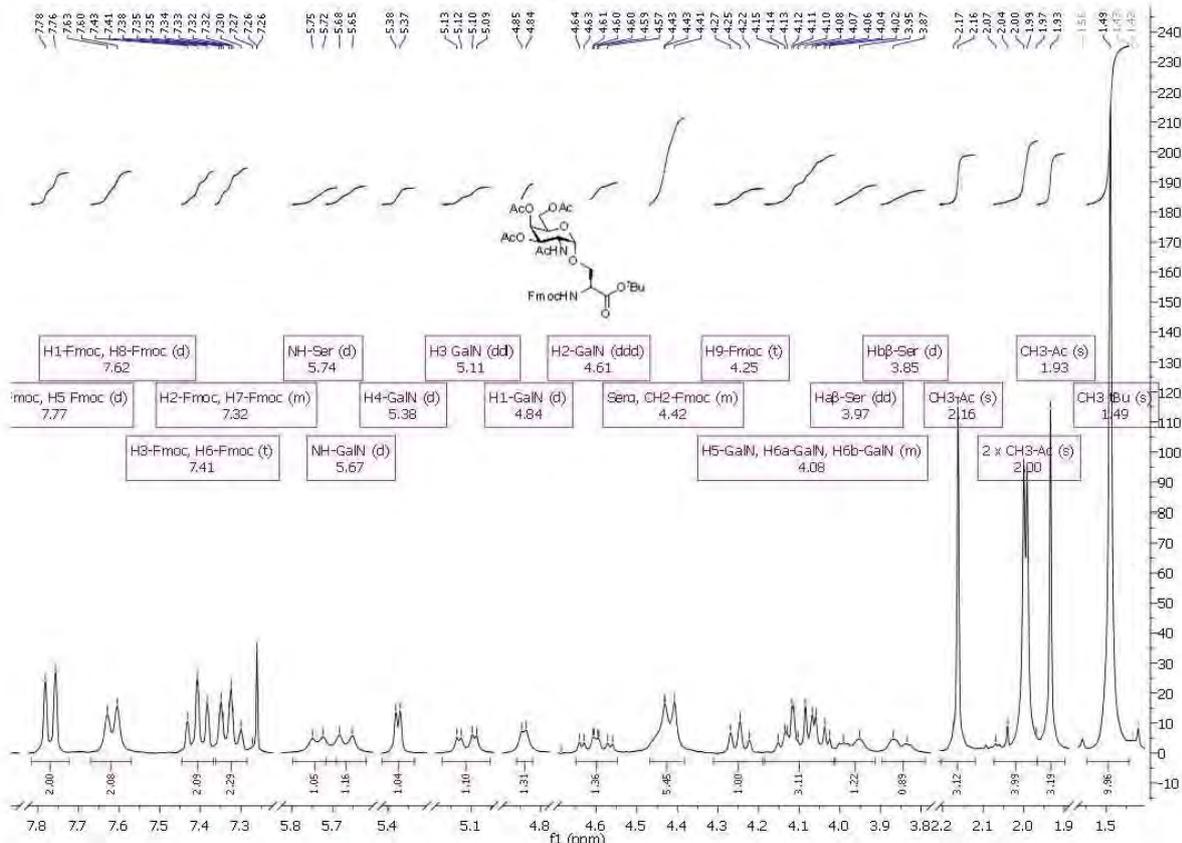
¹H-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) der Verbindung 8.



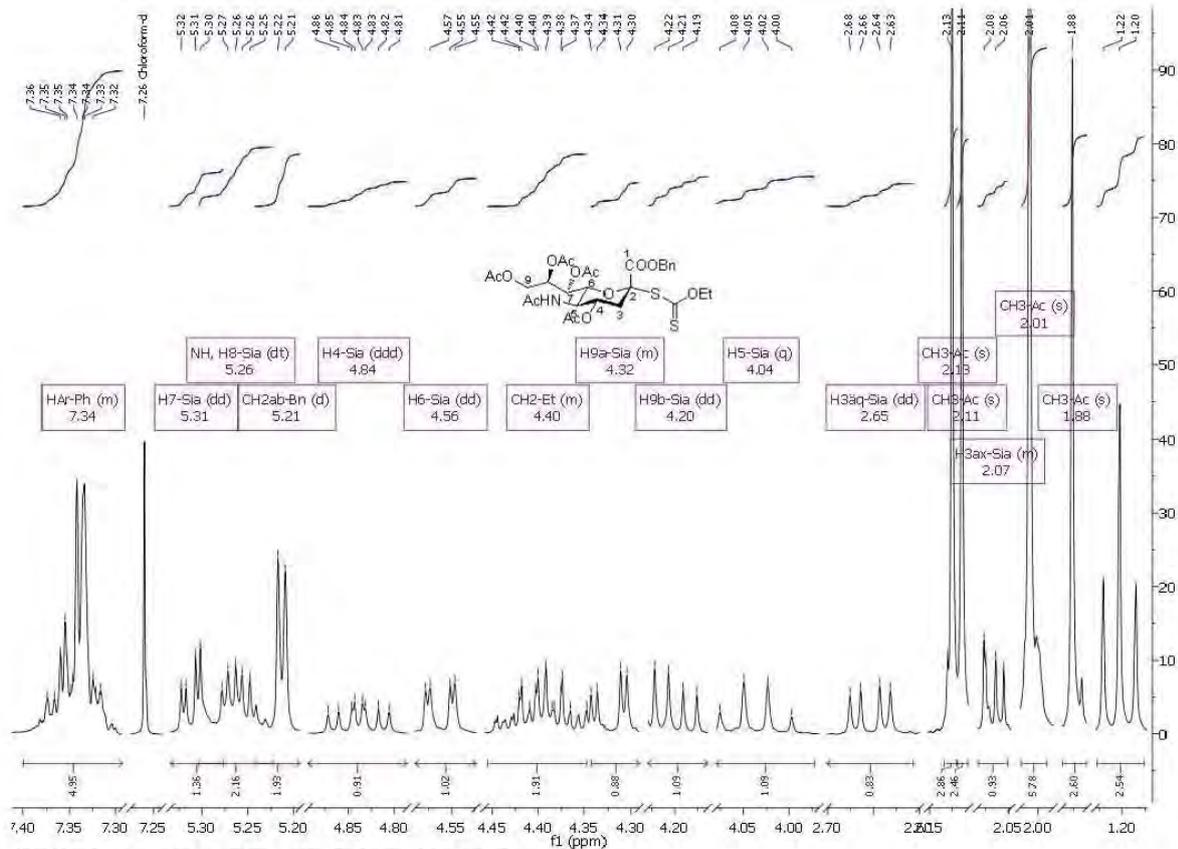
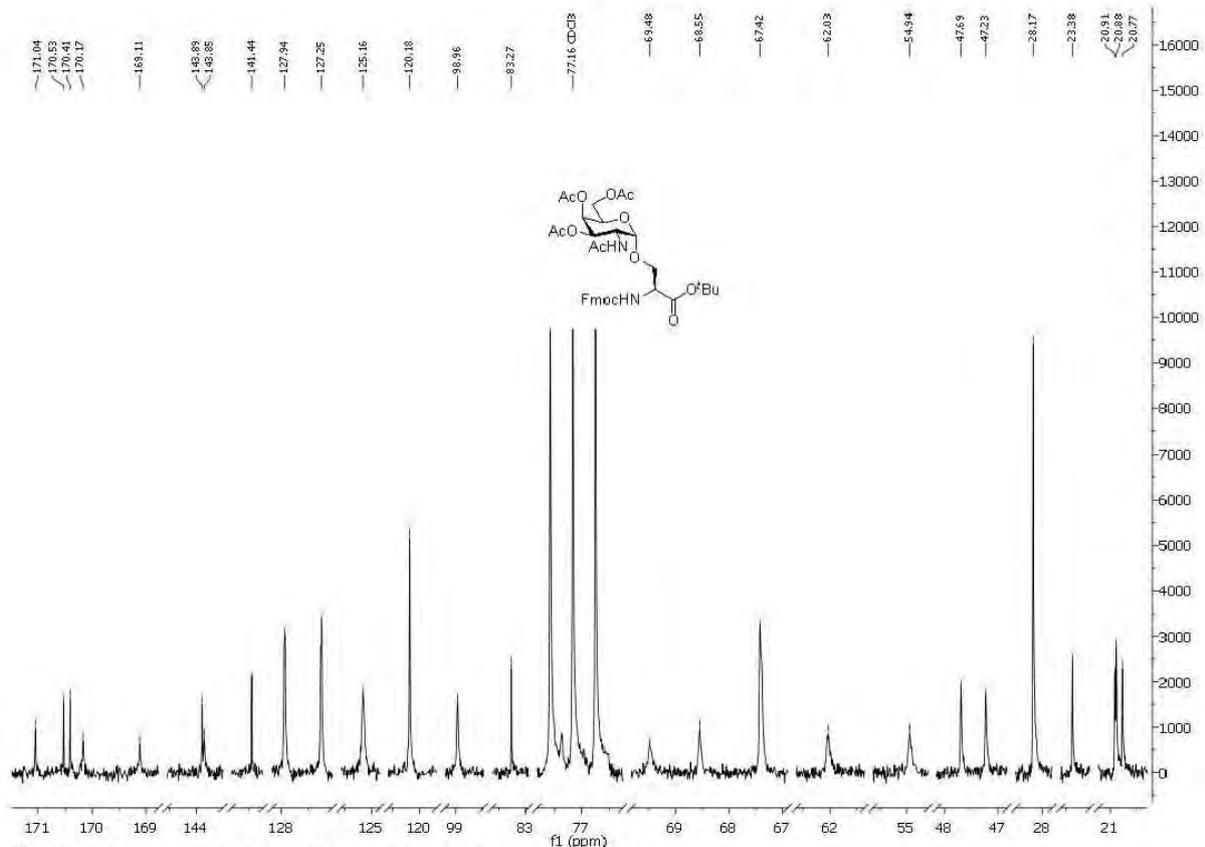
¹H-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) der Verbindung 36.

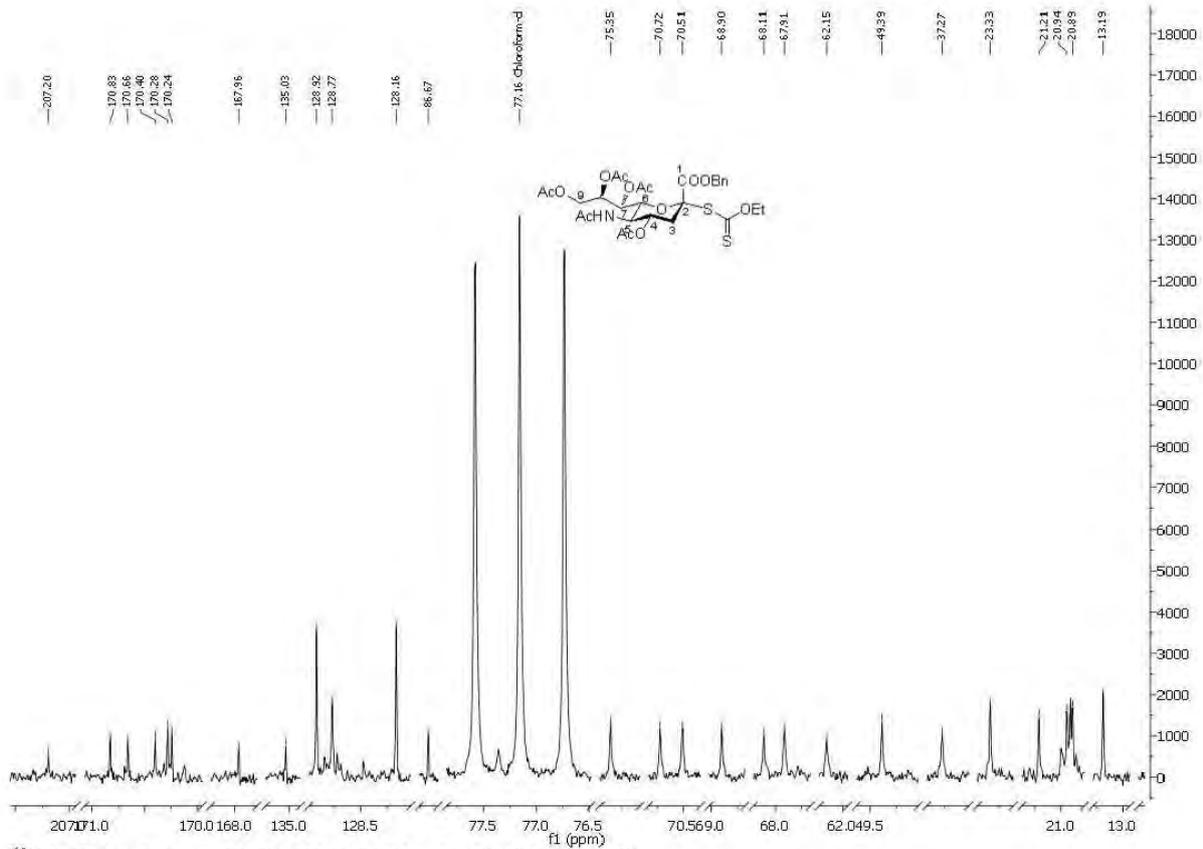


¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) der Verbindung 36.

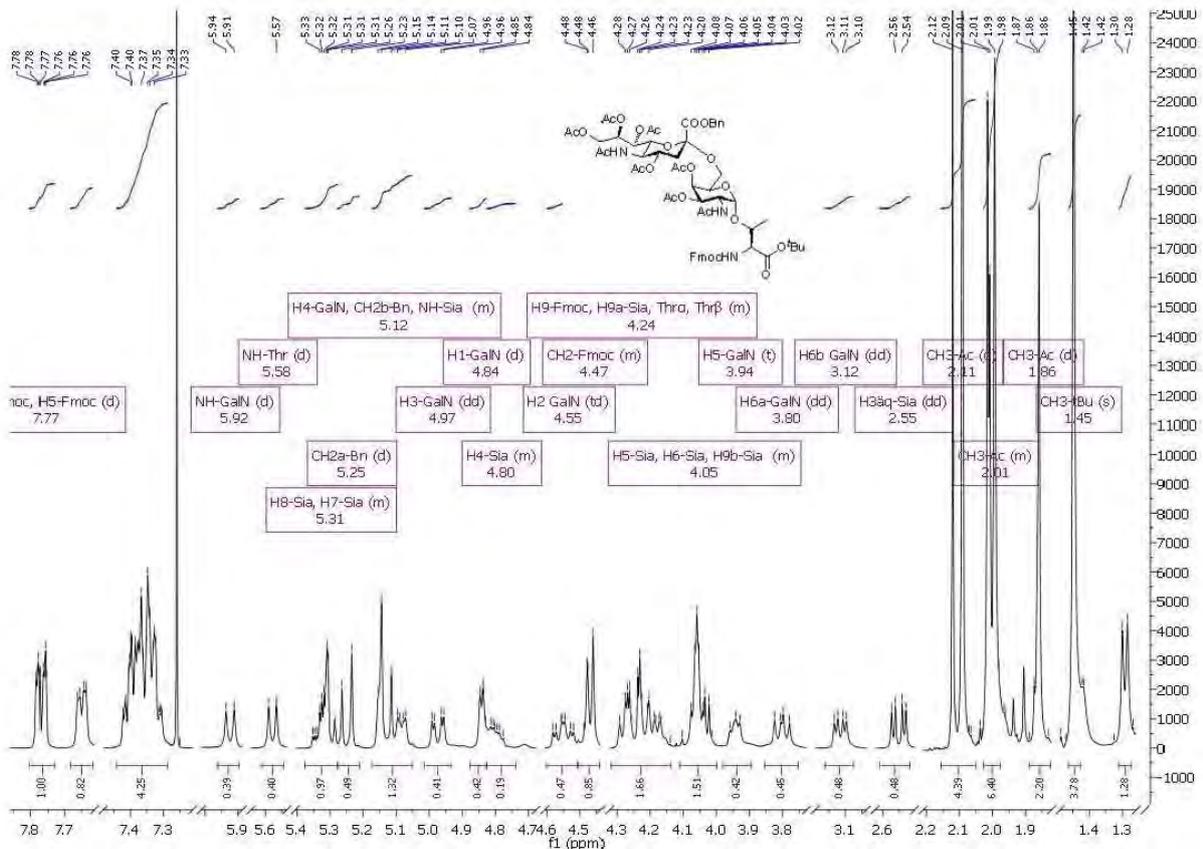


¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) der Verbindung 16.

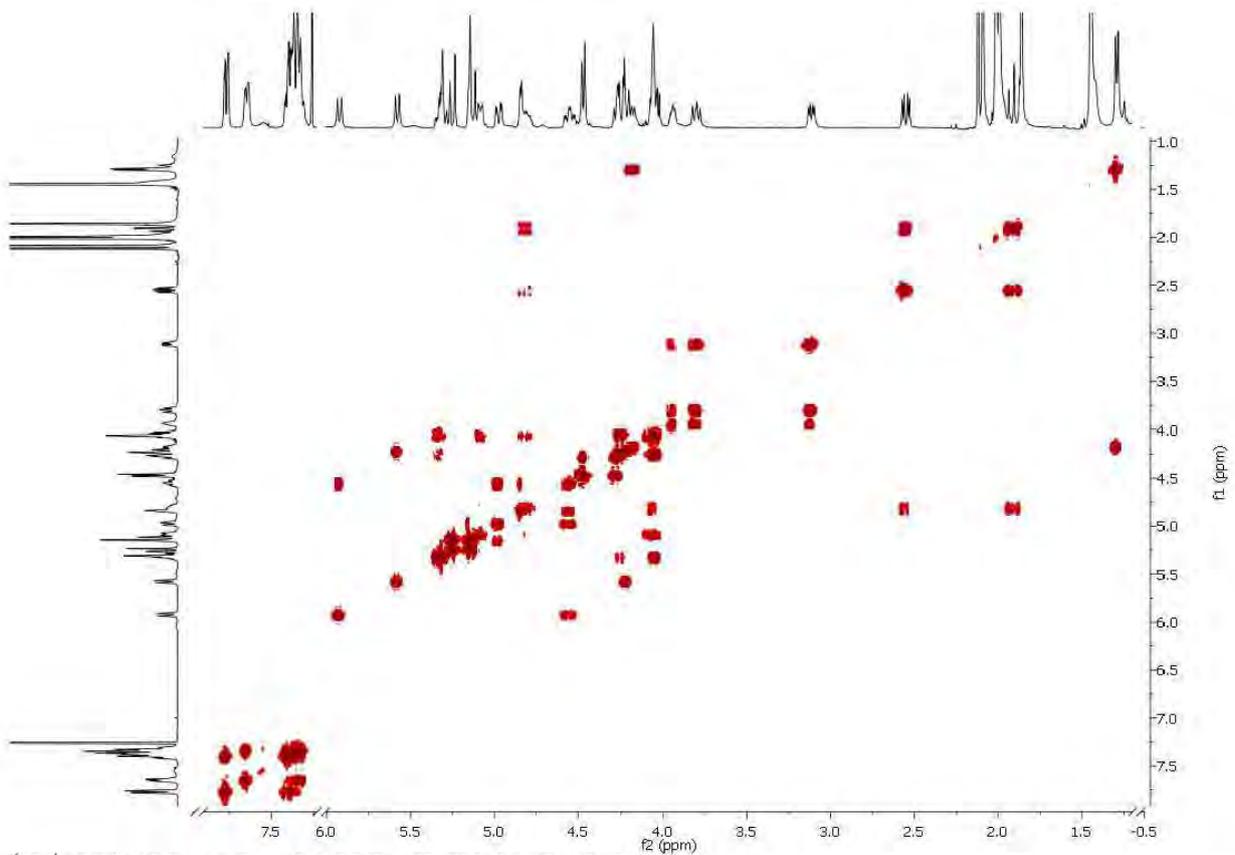
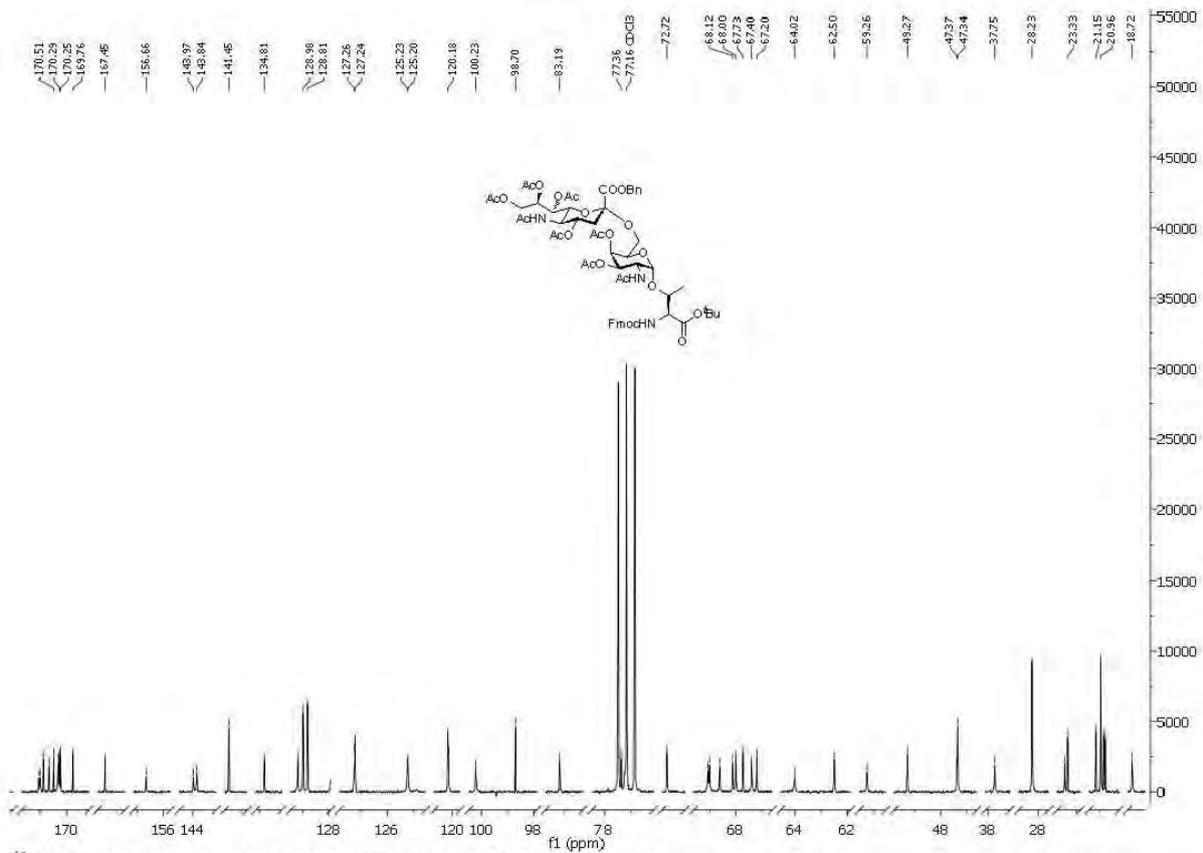


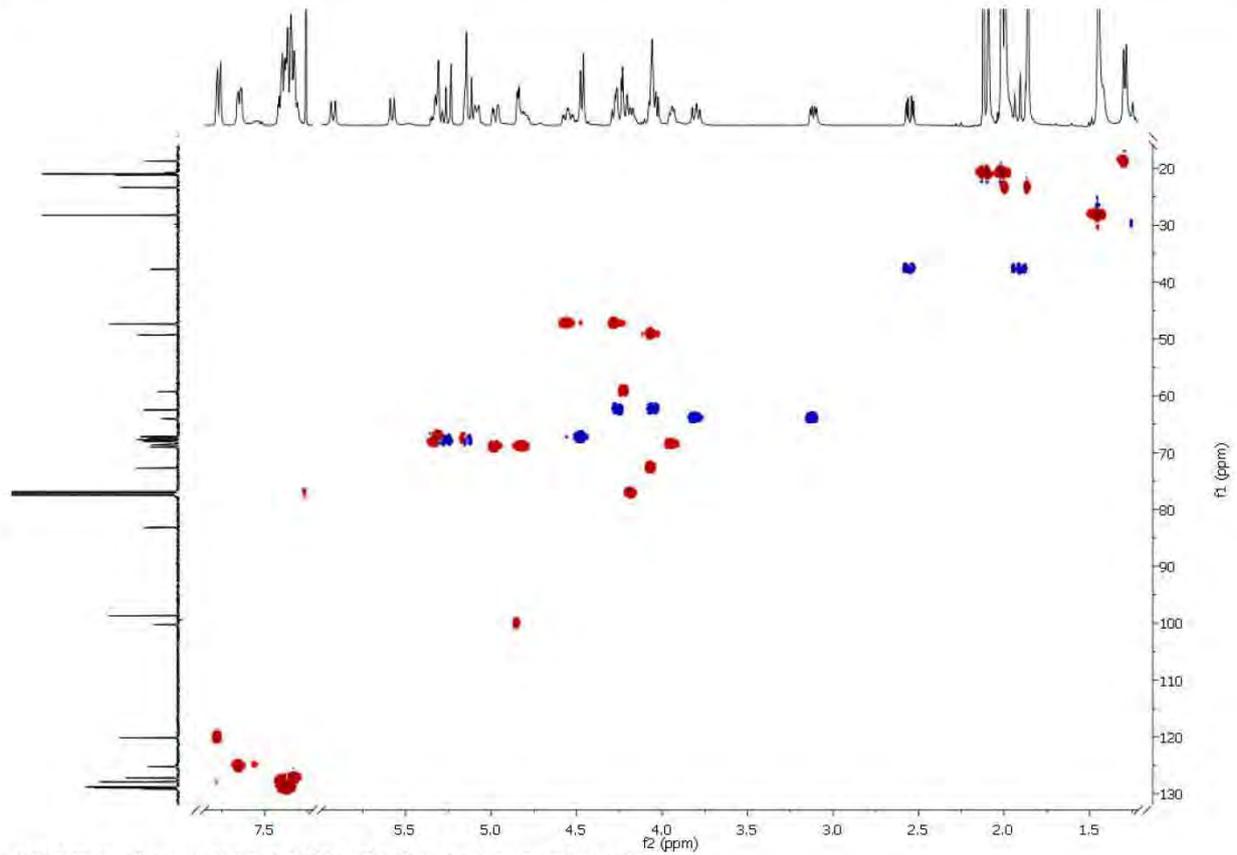


¹³C-BB-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) der Verbindung 22.

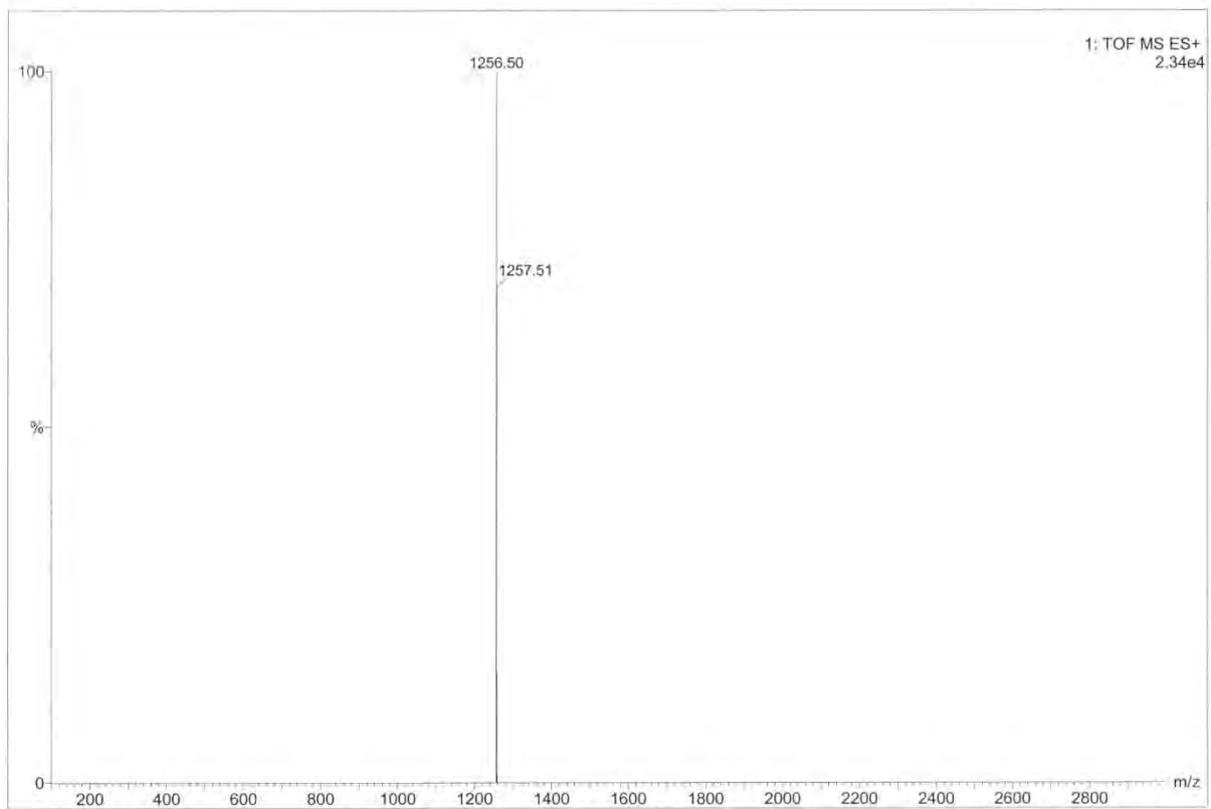


¹H-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der Verbindung 26.

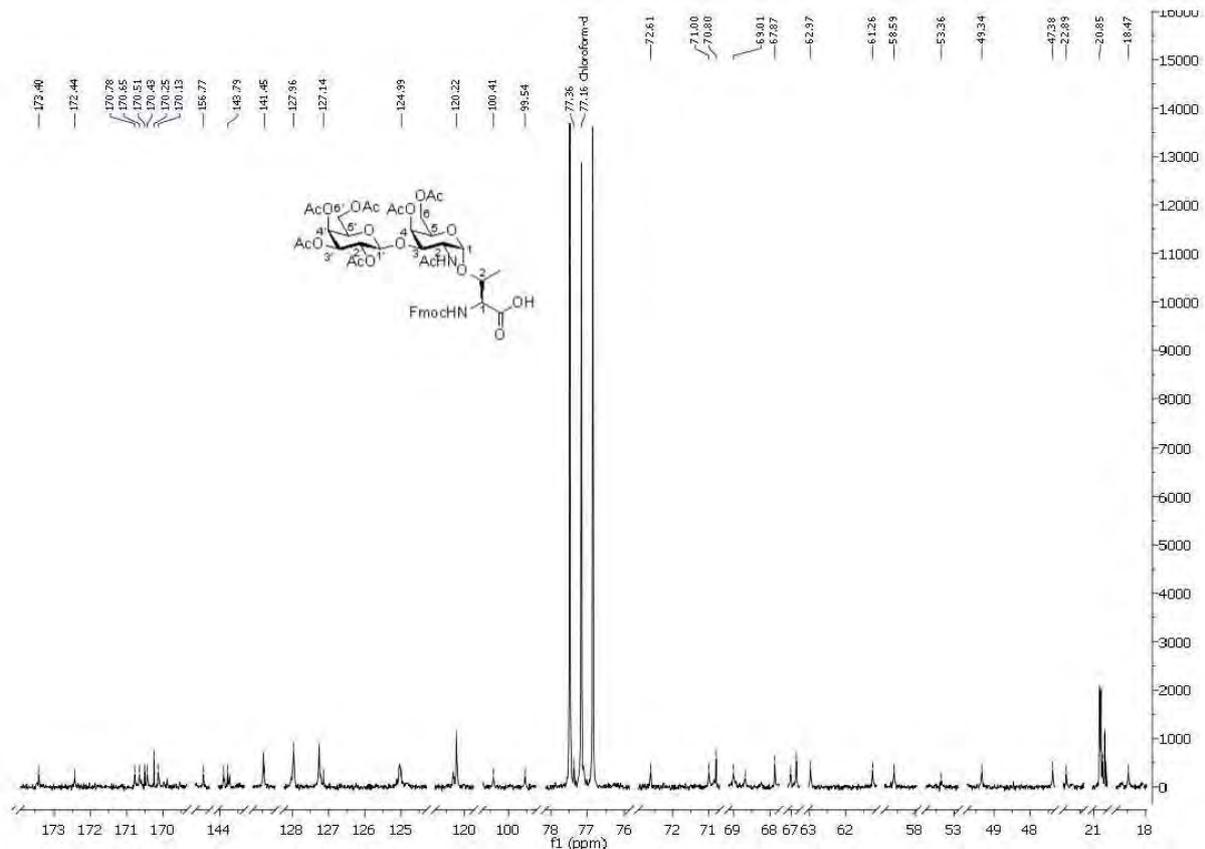
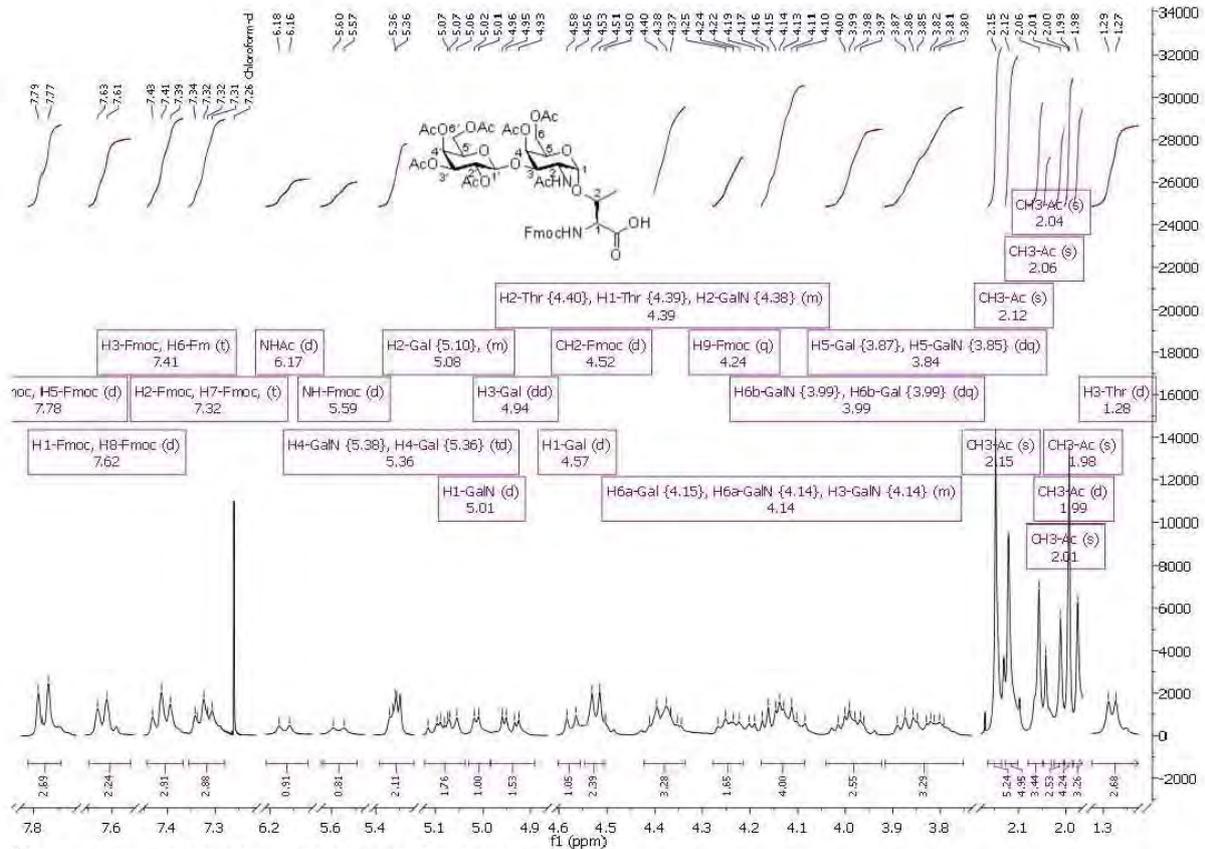


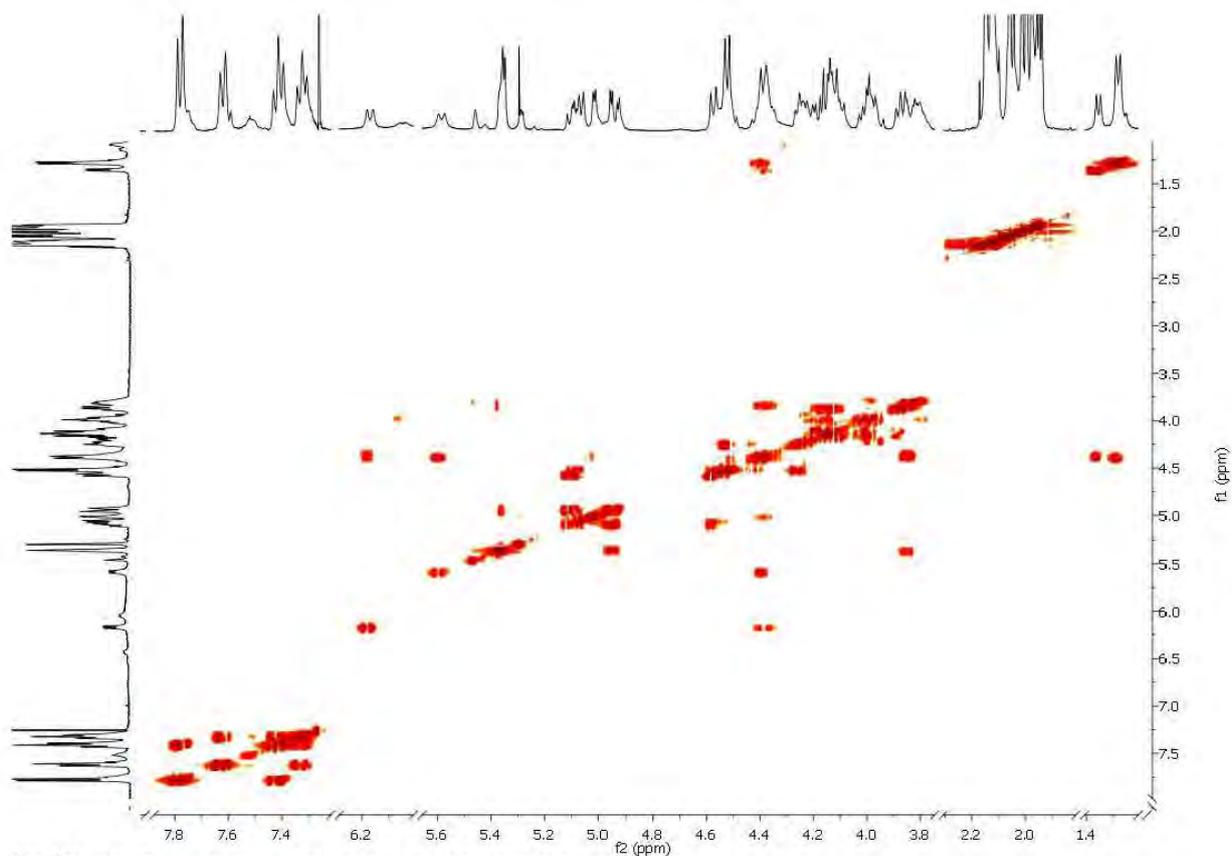


HSQC-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) der Verbindung 26.

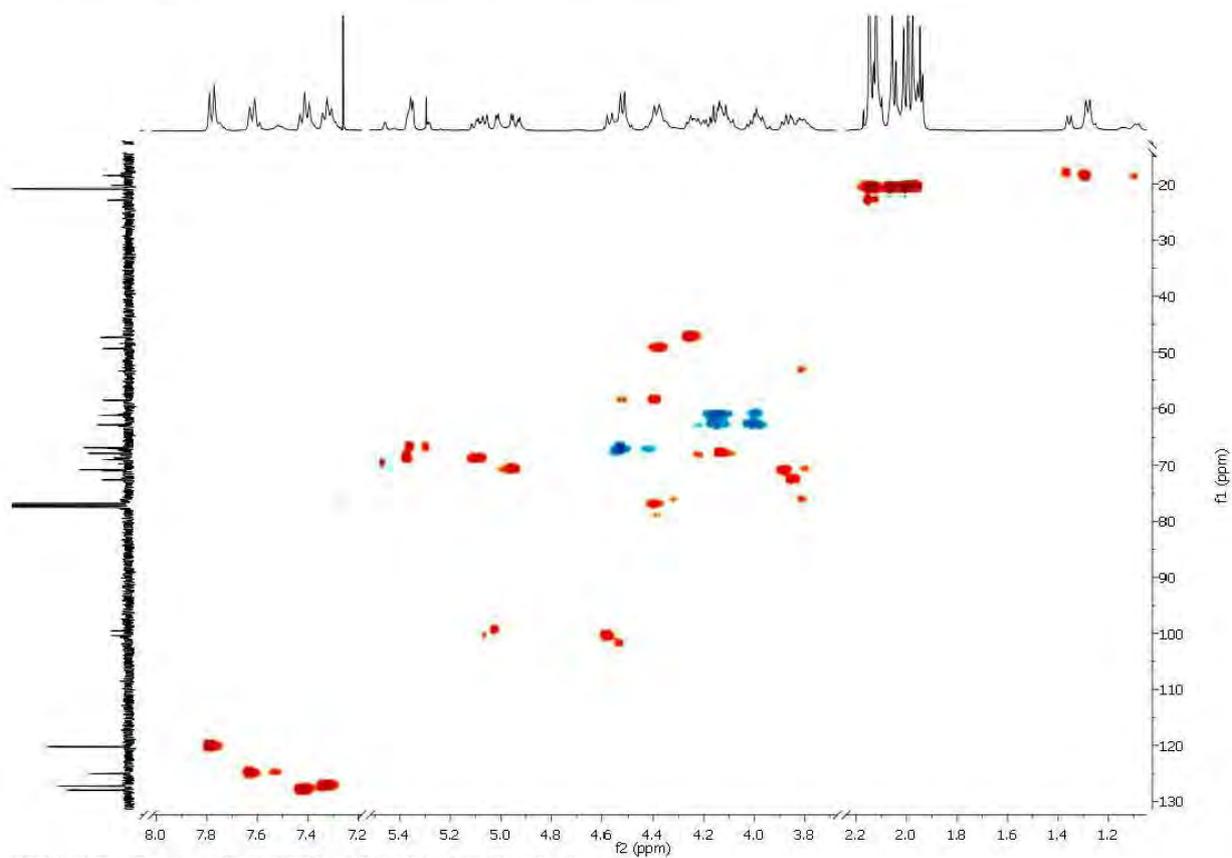


ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 26.

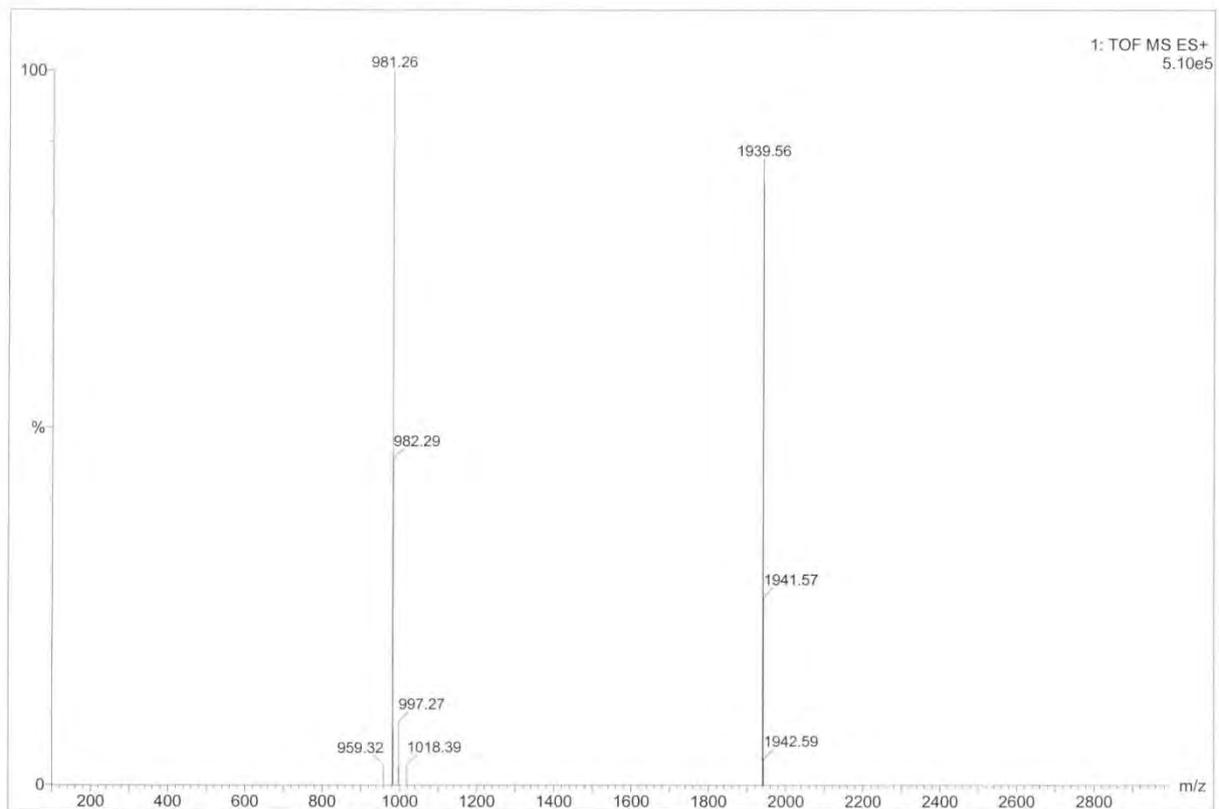




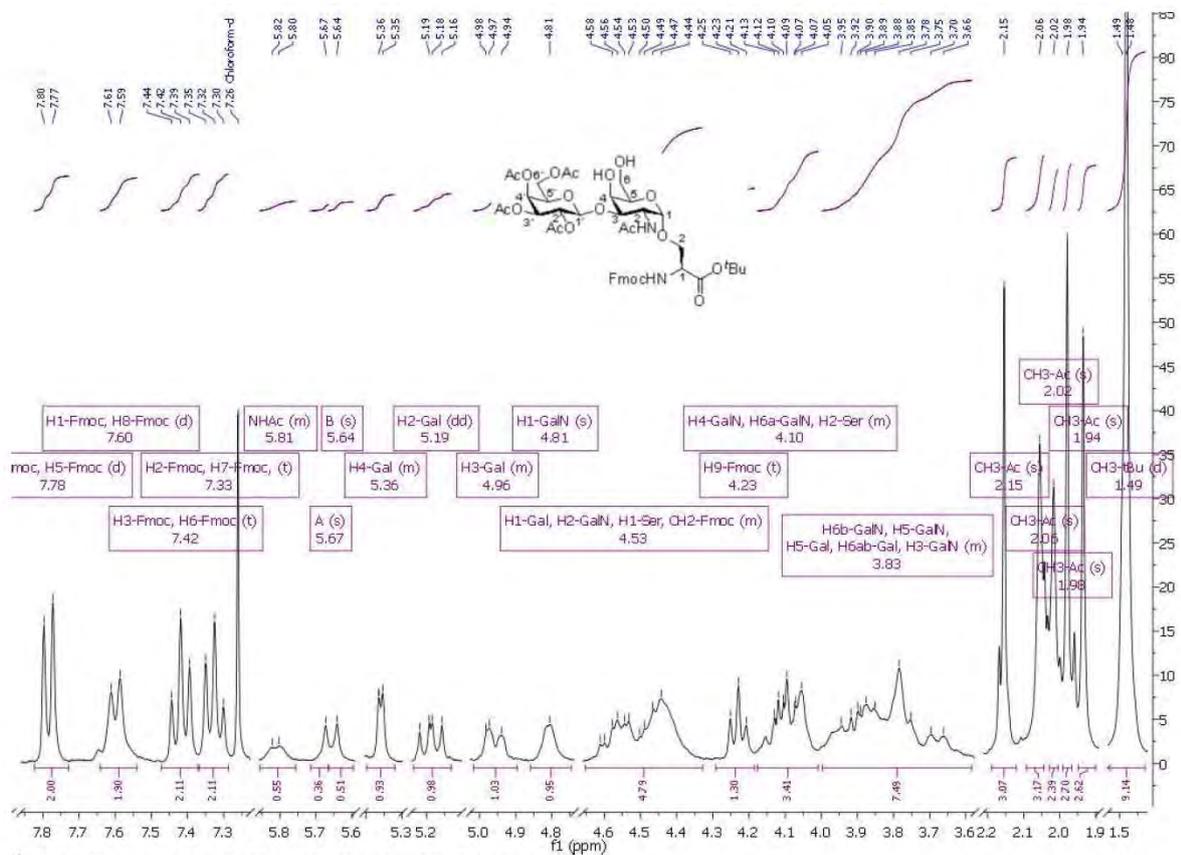
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der Verbindung 40.

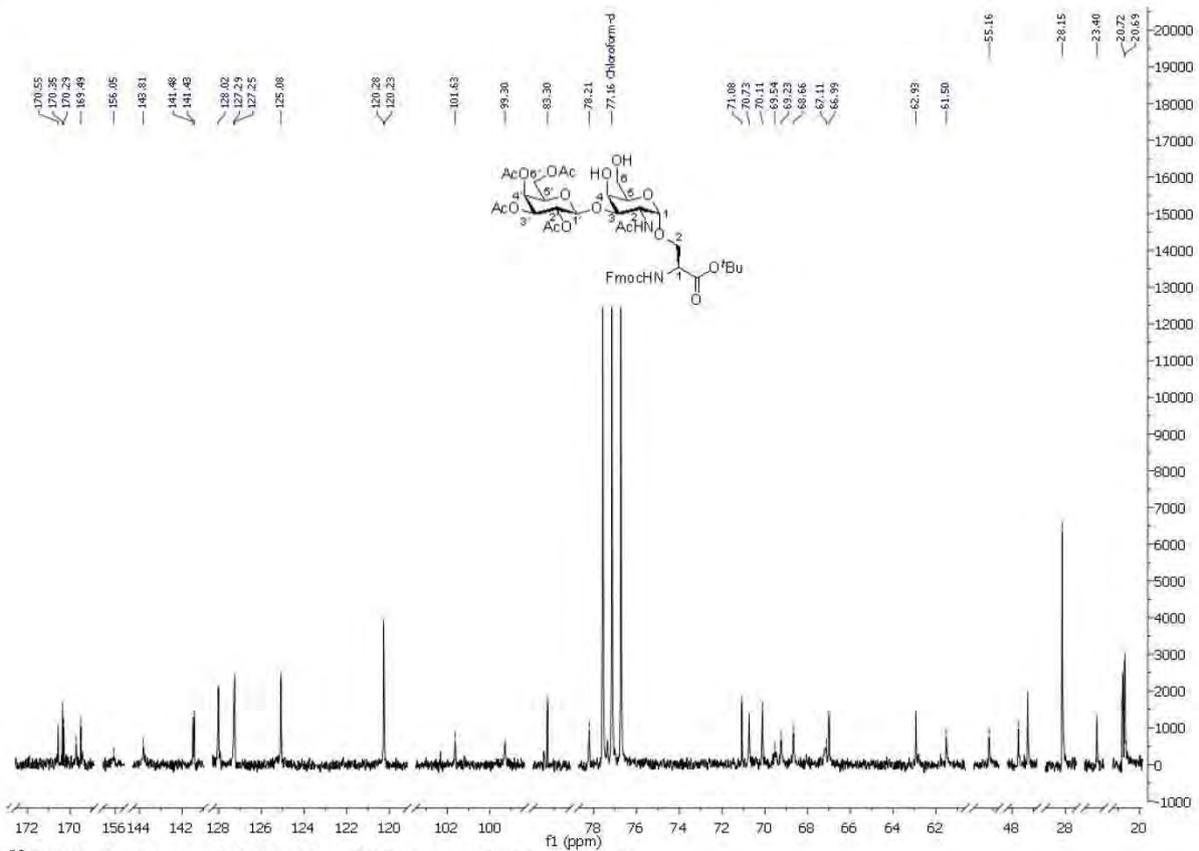


HSQC-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) der Verbindung 40.

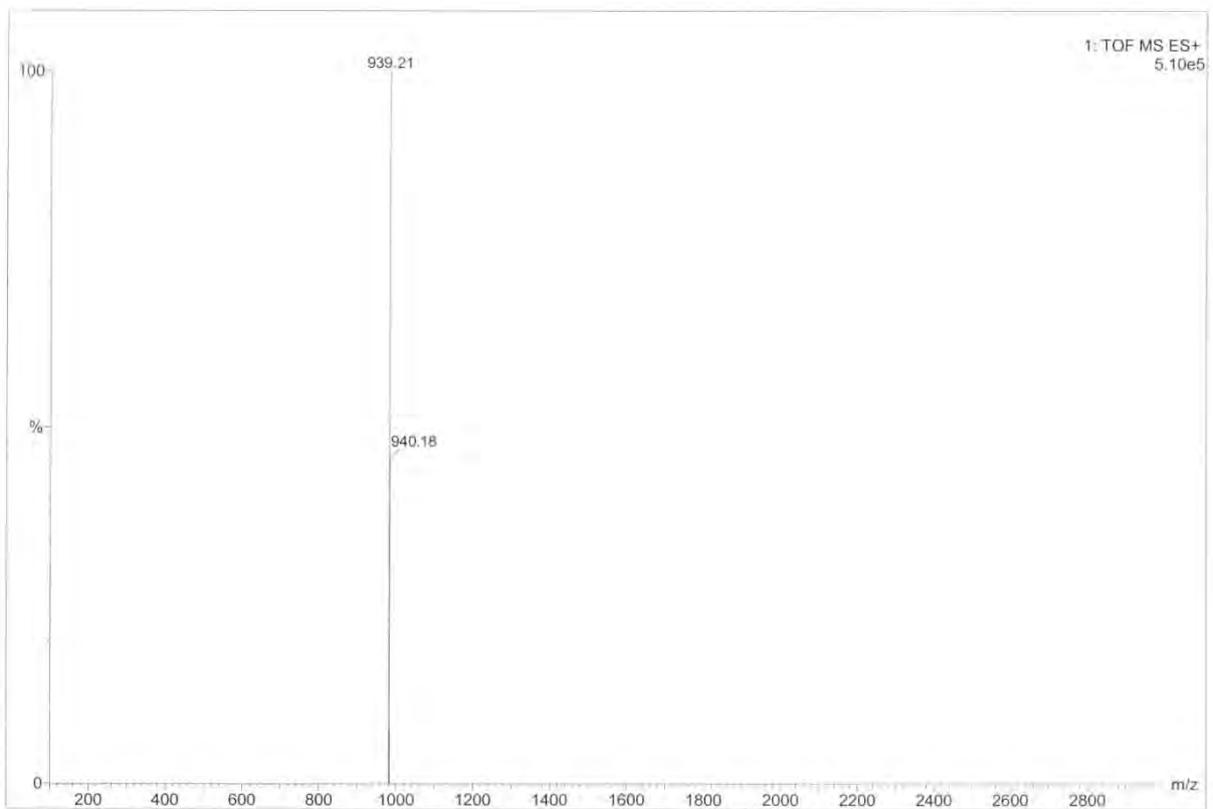


ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 40.

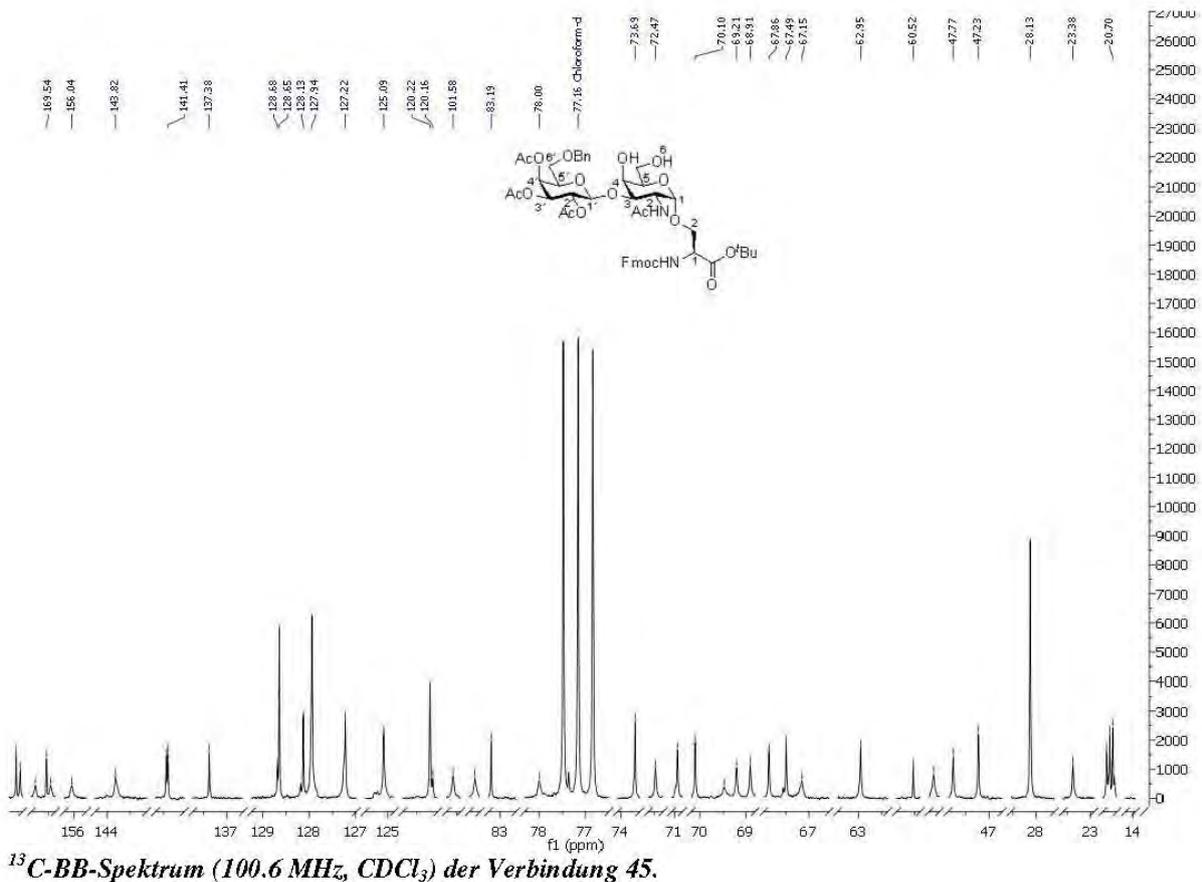
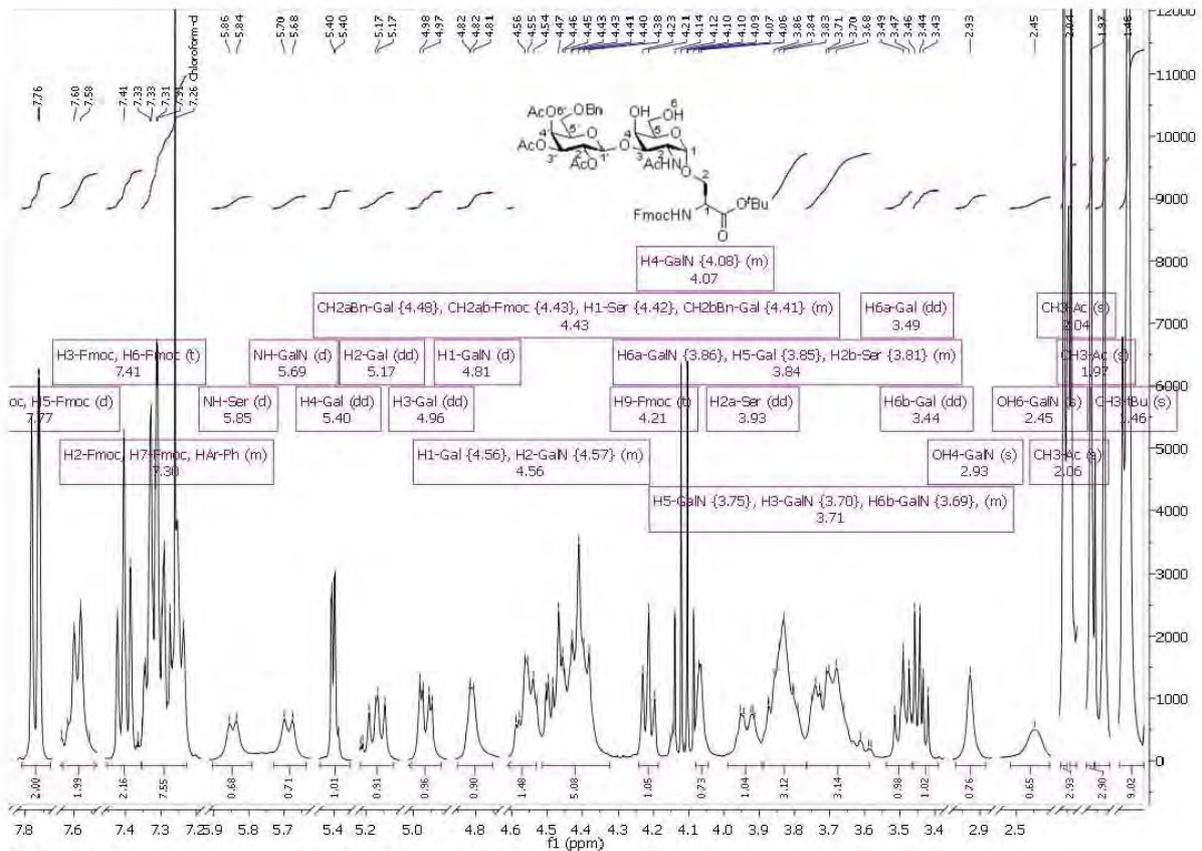
¹H-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) der Verbindung 43.

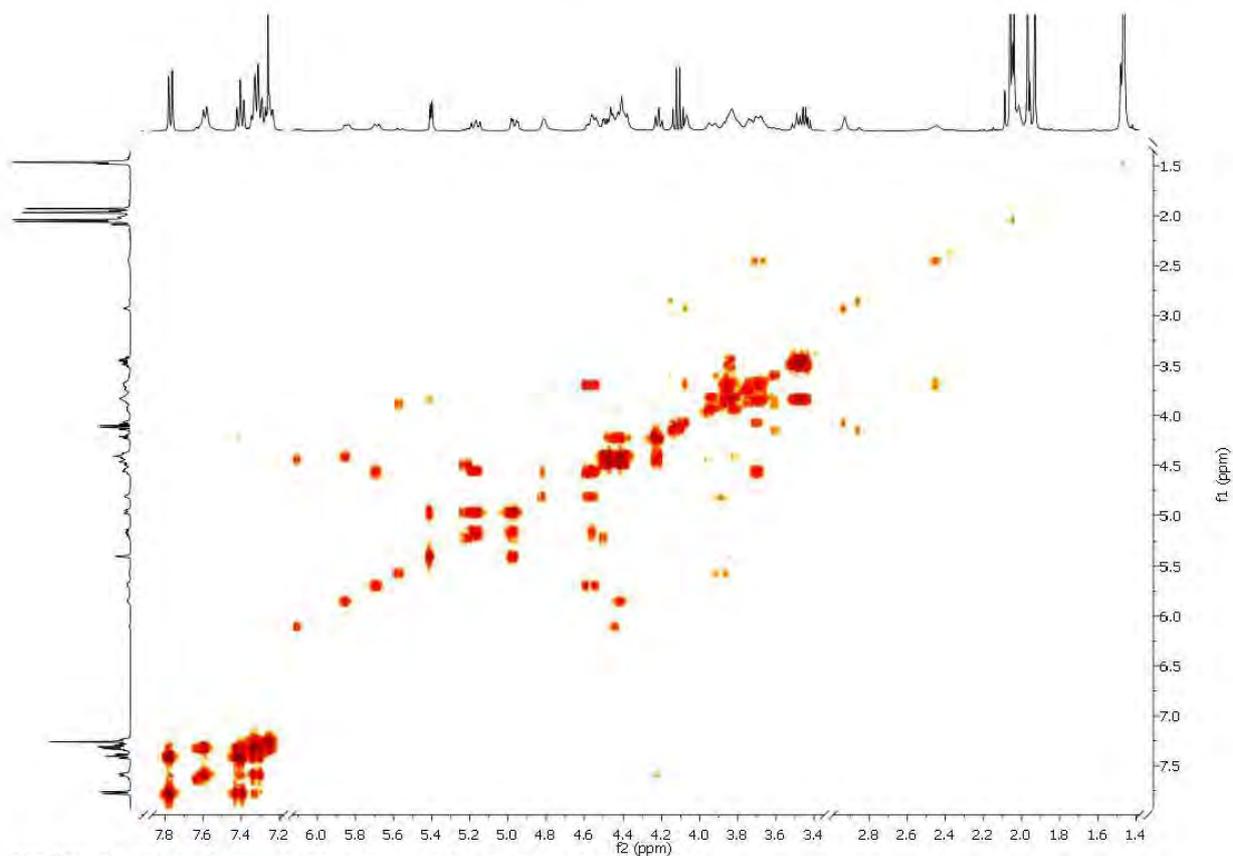


^{13}C -BB-Spektrum (75.5 MHz, CDCl_3) der Verbindung 43.

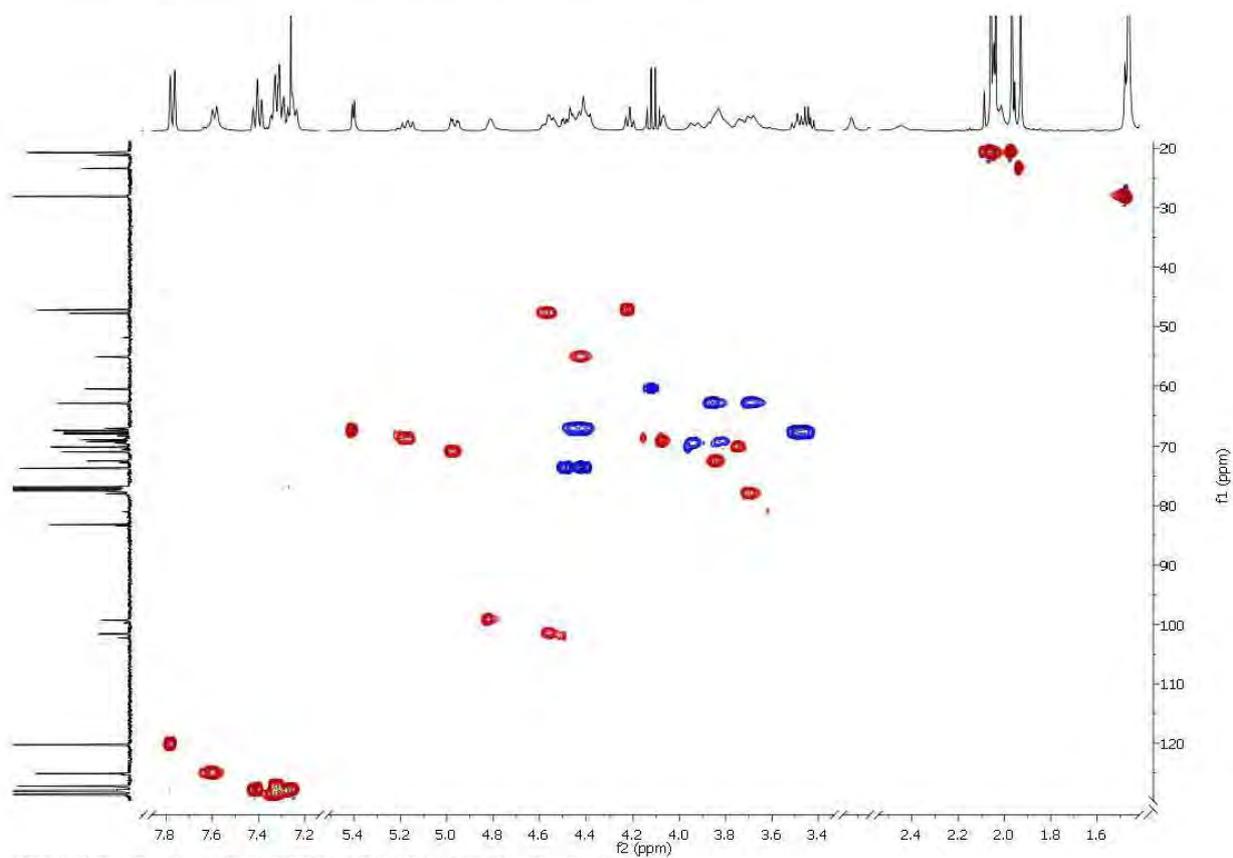


ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 43.

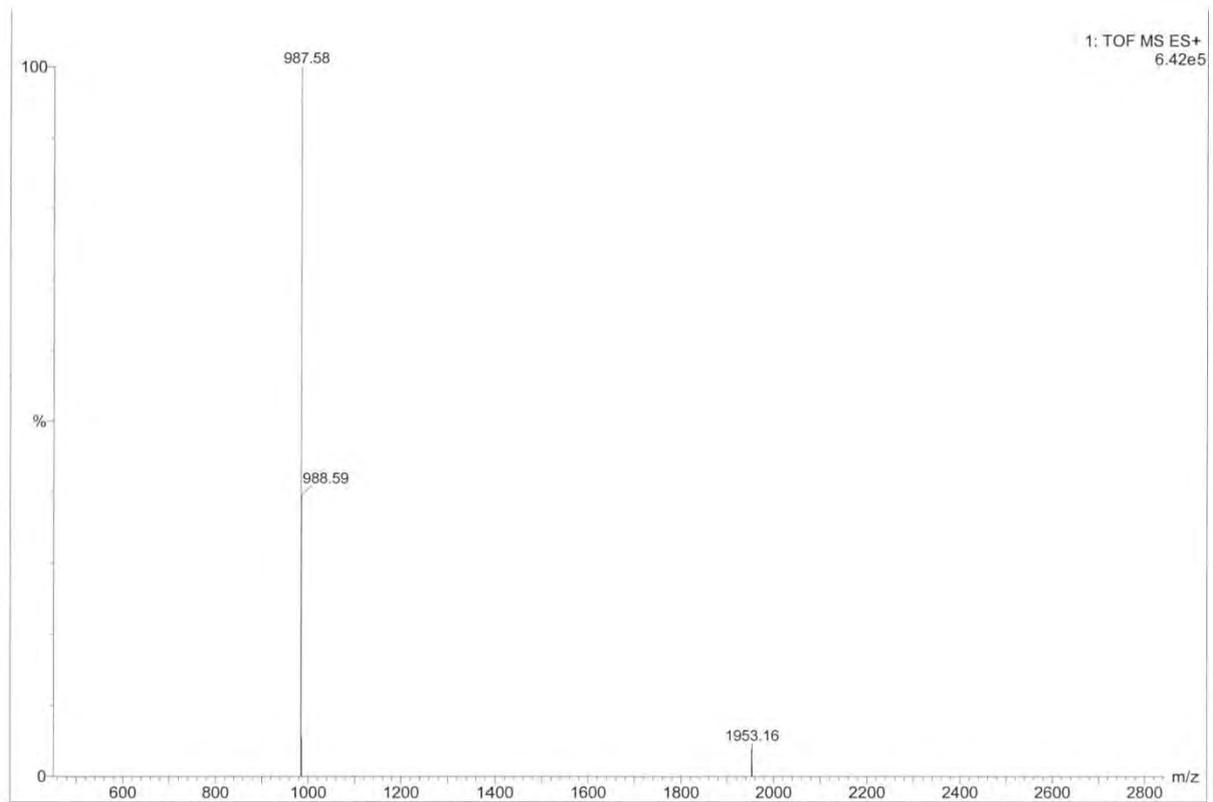




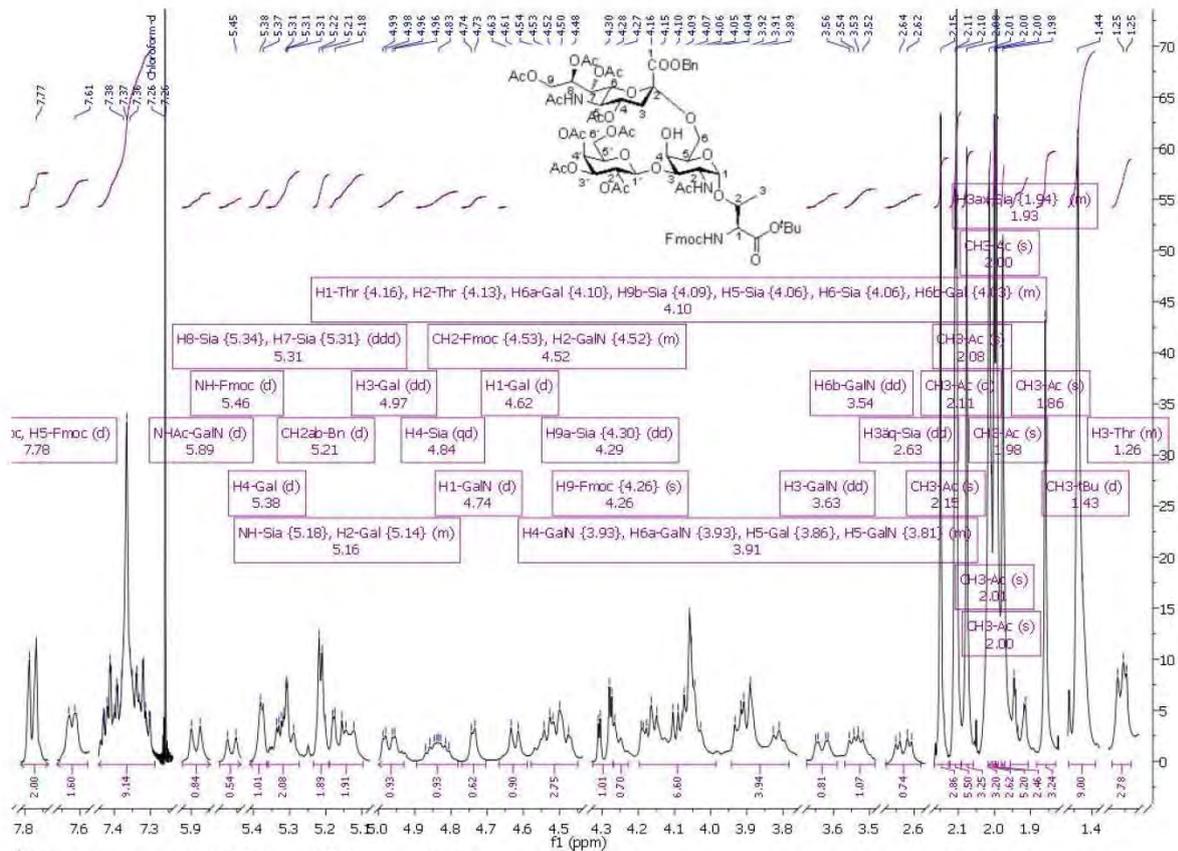
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der Verbindung 45.

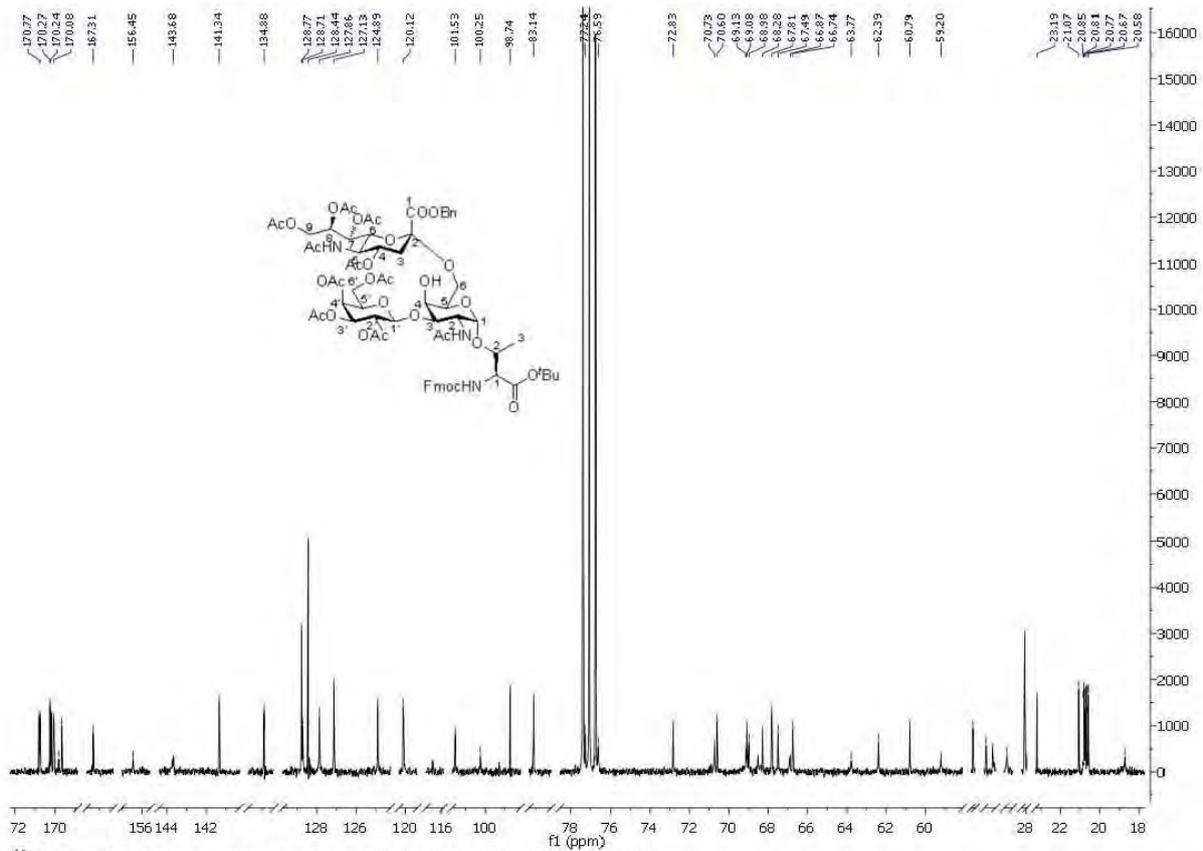


HSQC-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) der Verbindung 45.

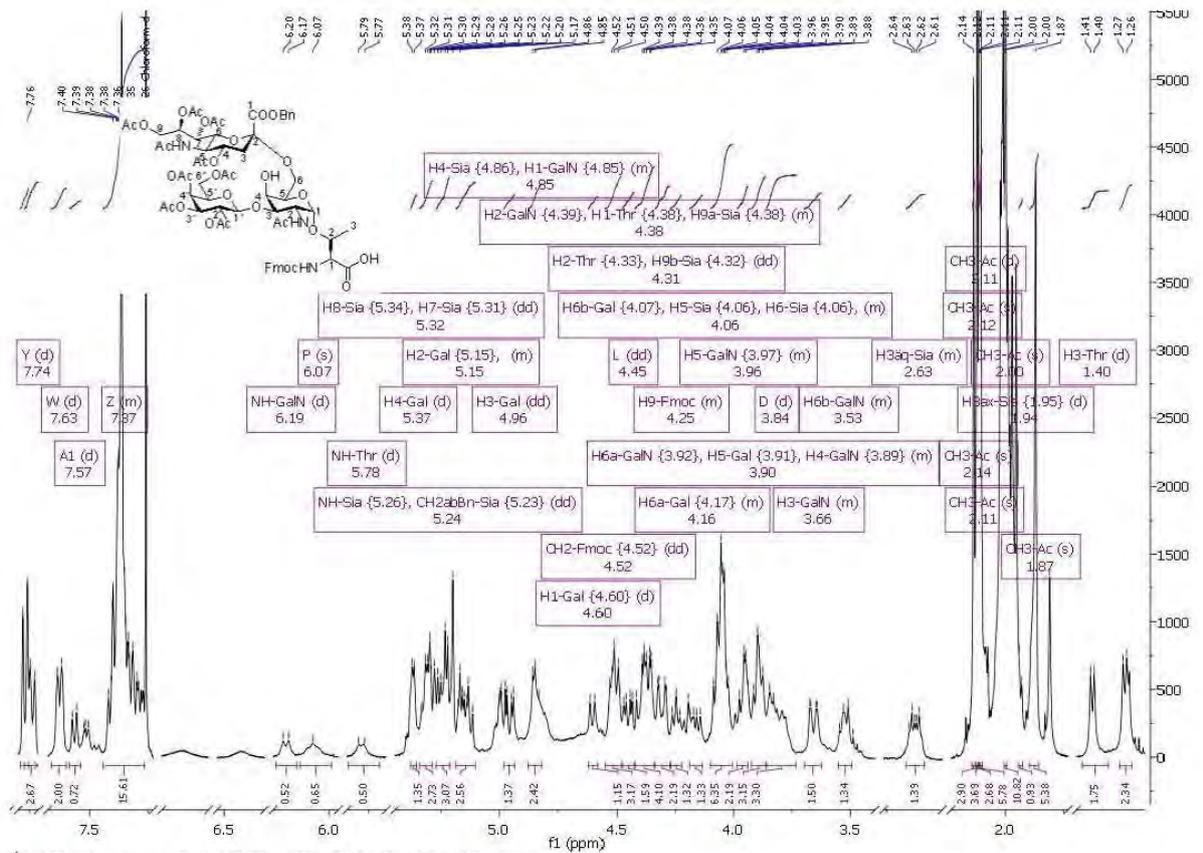


ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 45.

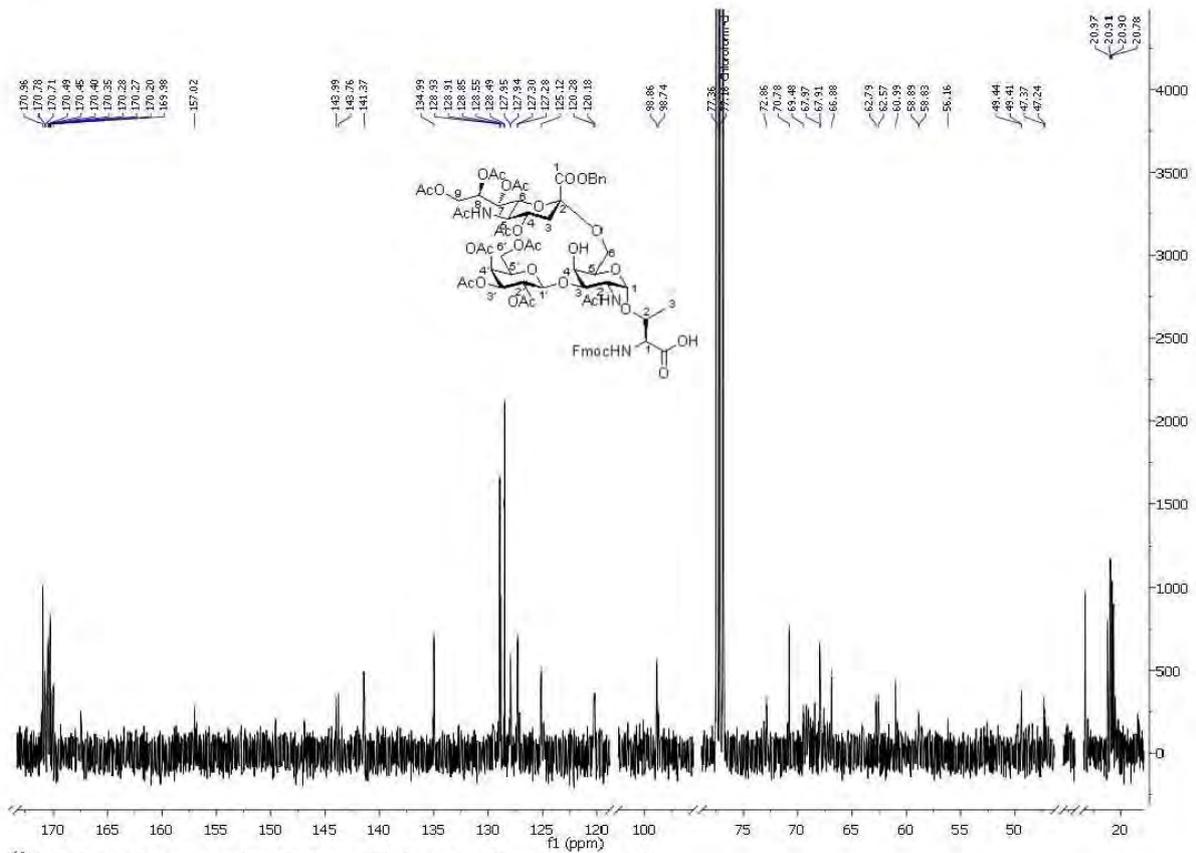
 ^1H -Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der Verbindung 46.



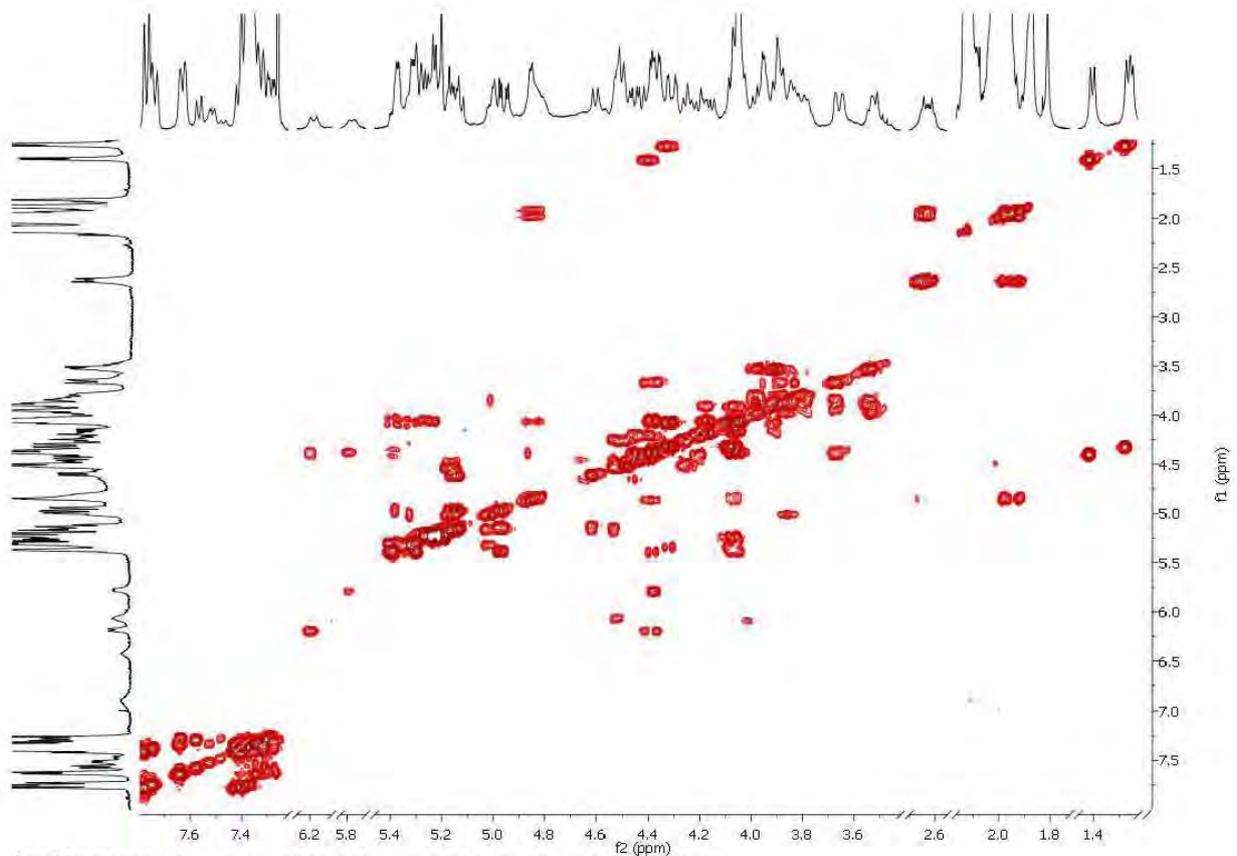
¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) der Verbindung 46.



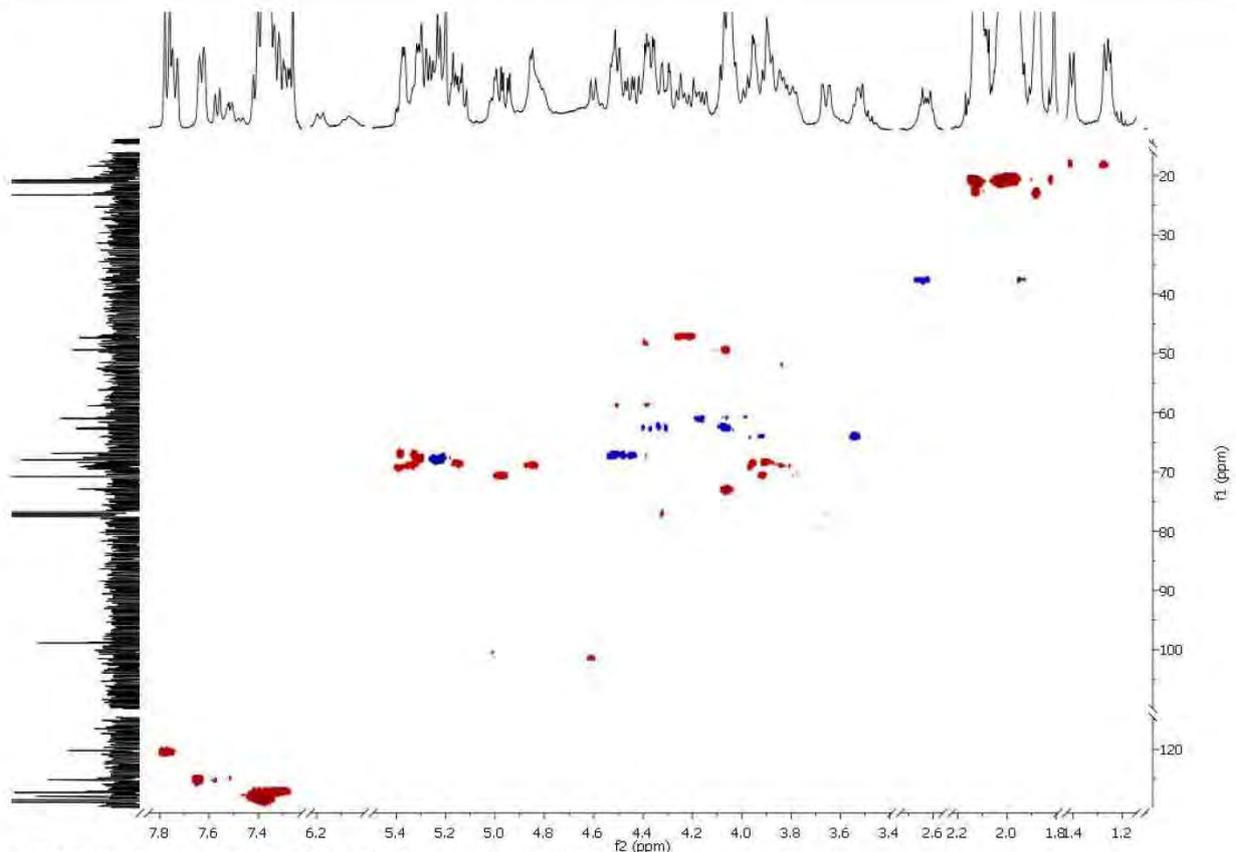
¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der Verbindung 47.



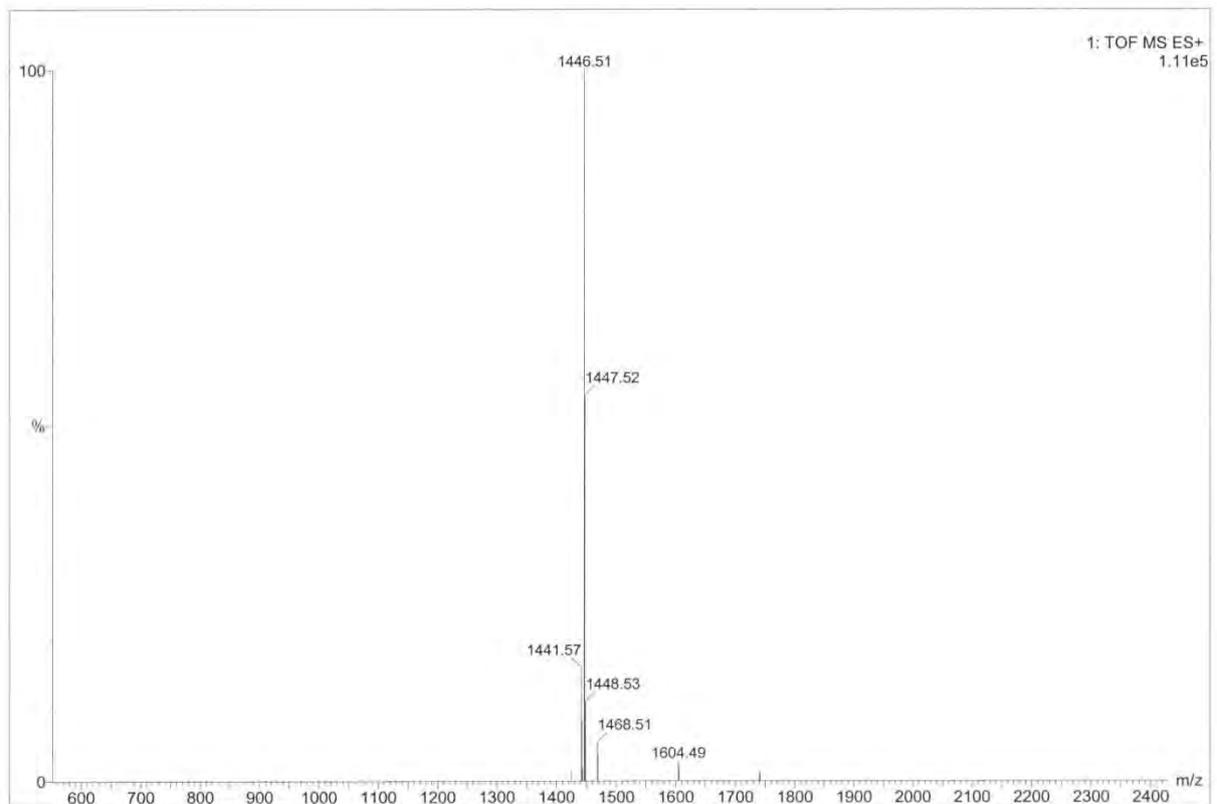
¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) der Verbindung 47.



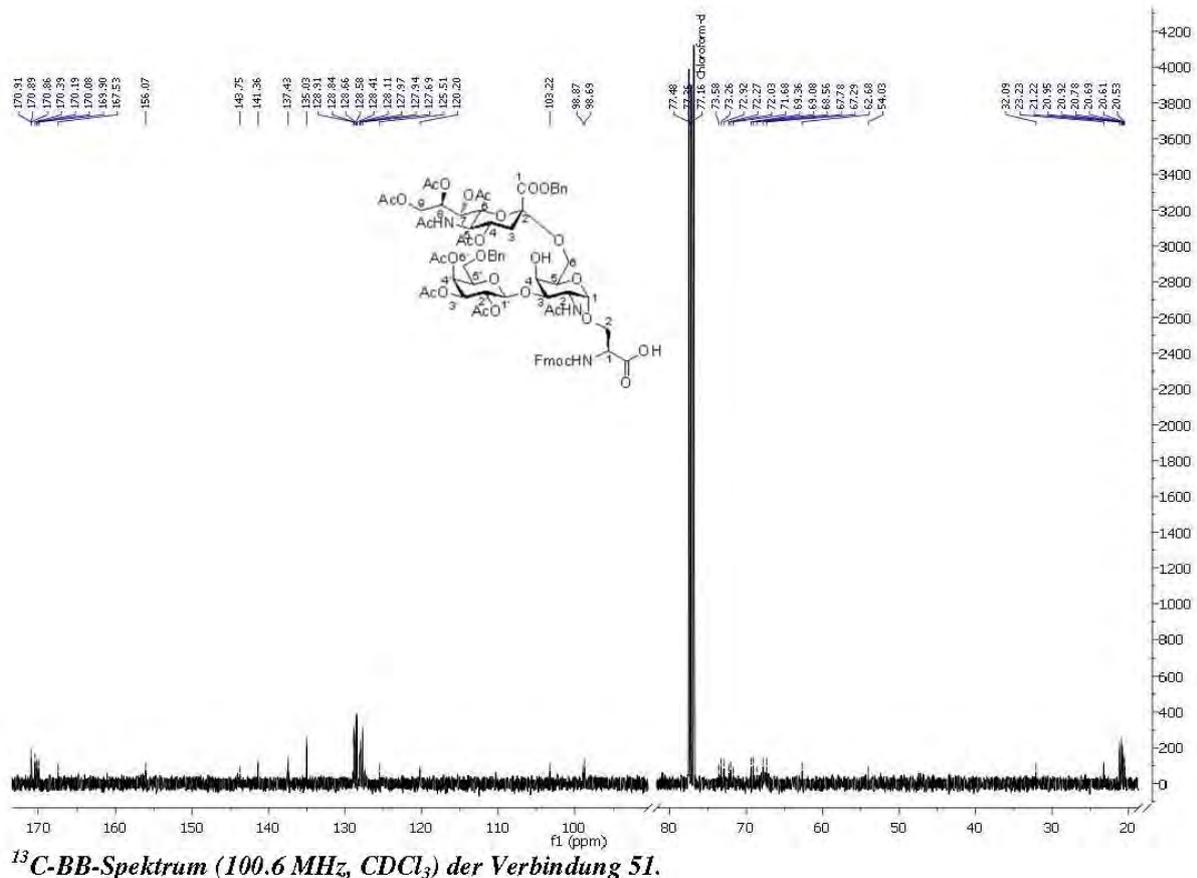
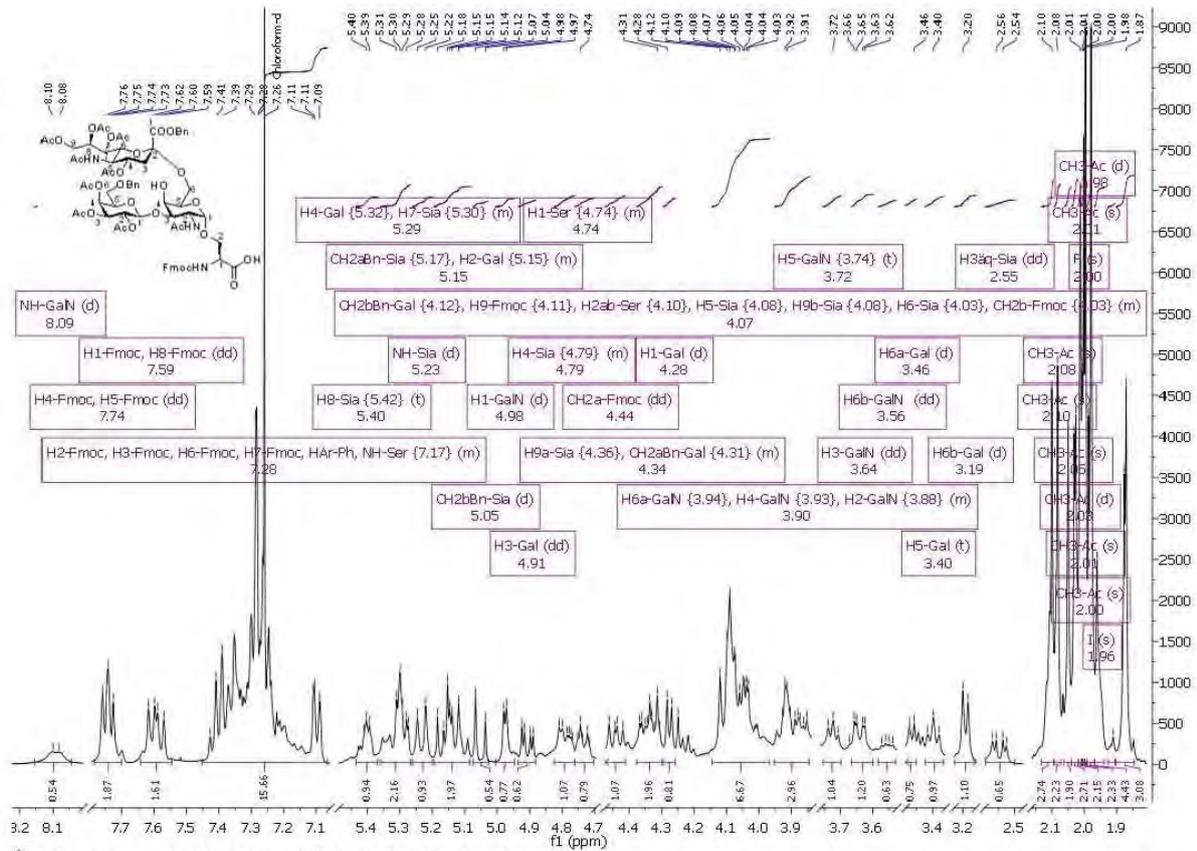
¹H-¹H-COSY-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der Verbindung 47.

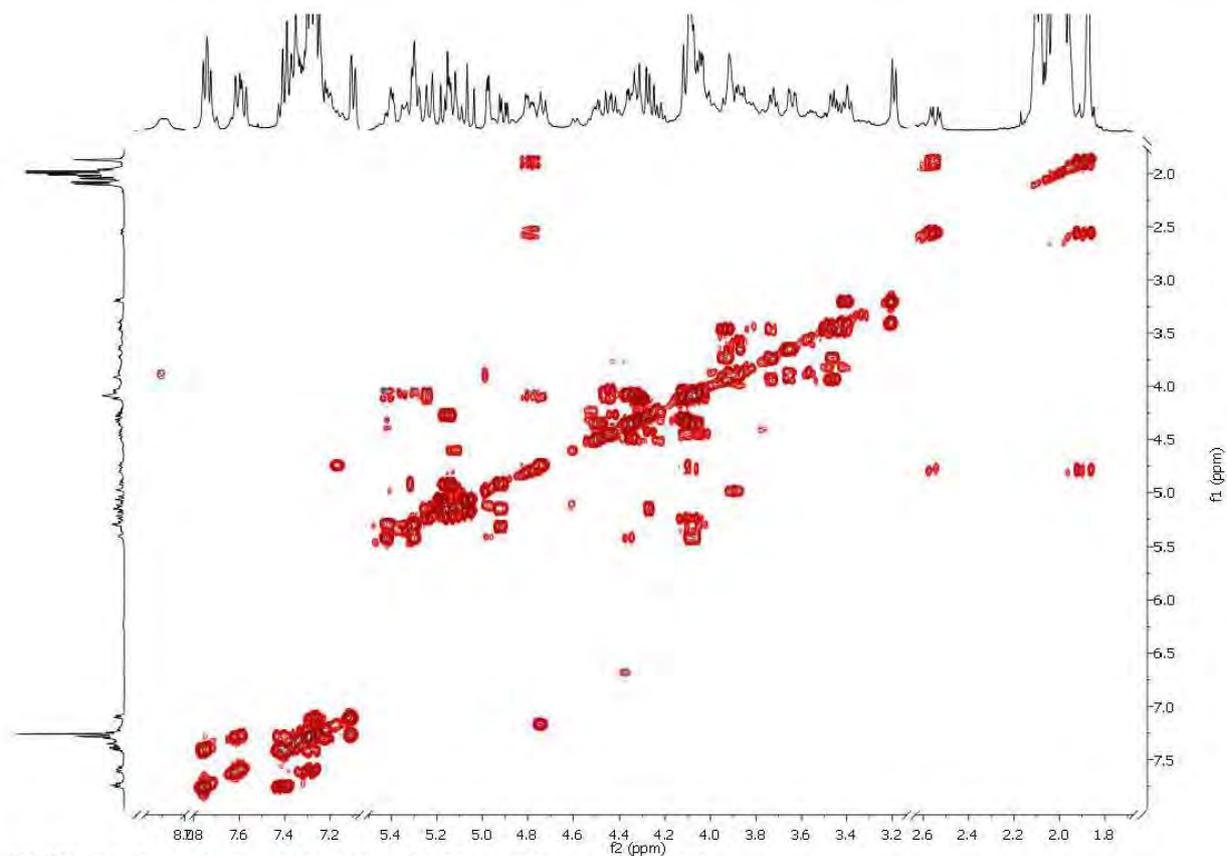


HSQC-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) der Verbindung 47.

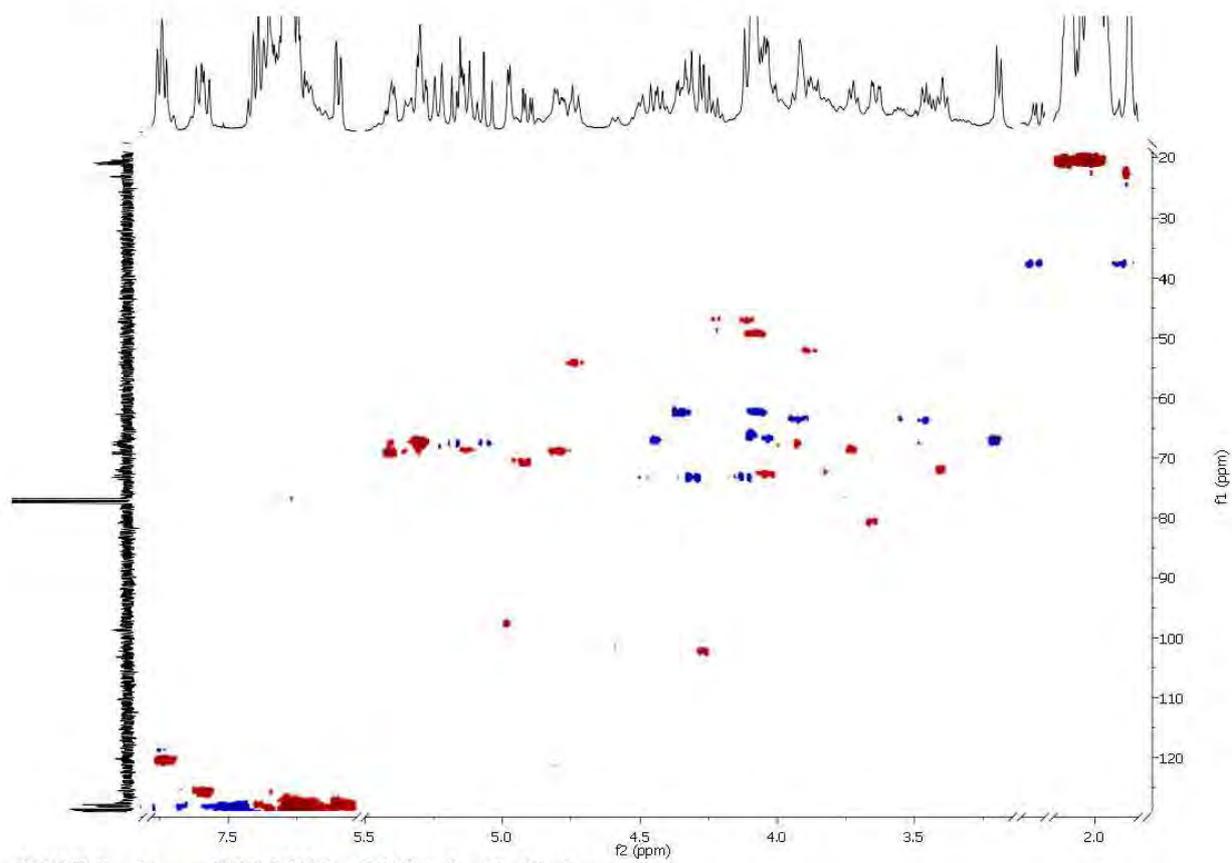


ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 47.

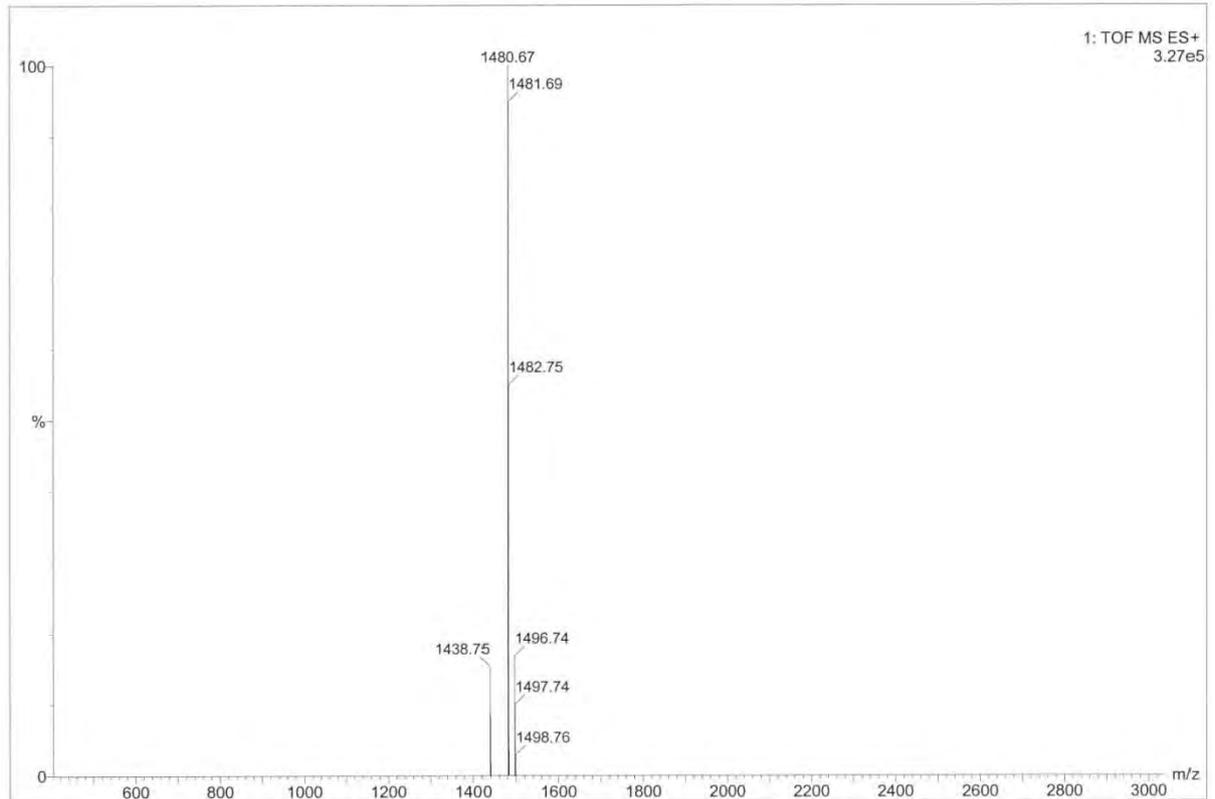




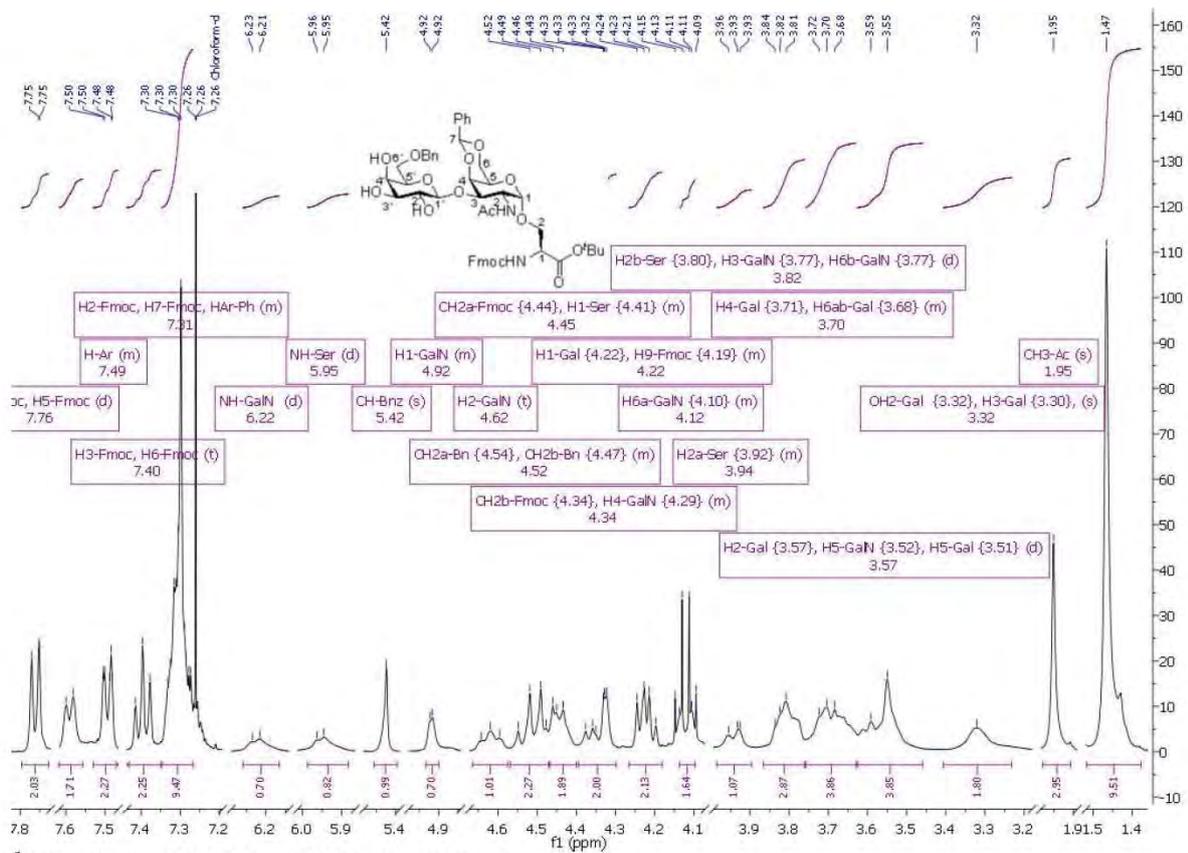
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der Verbindung 51.

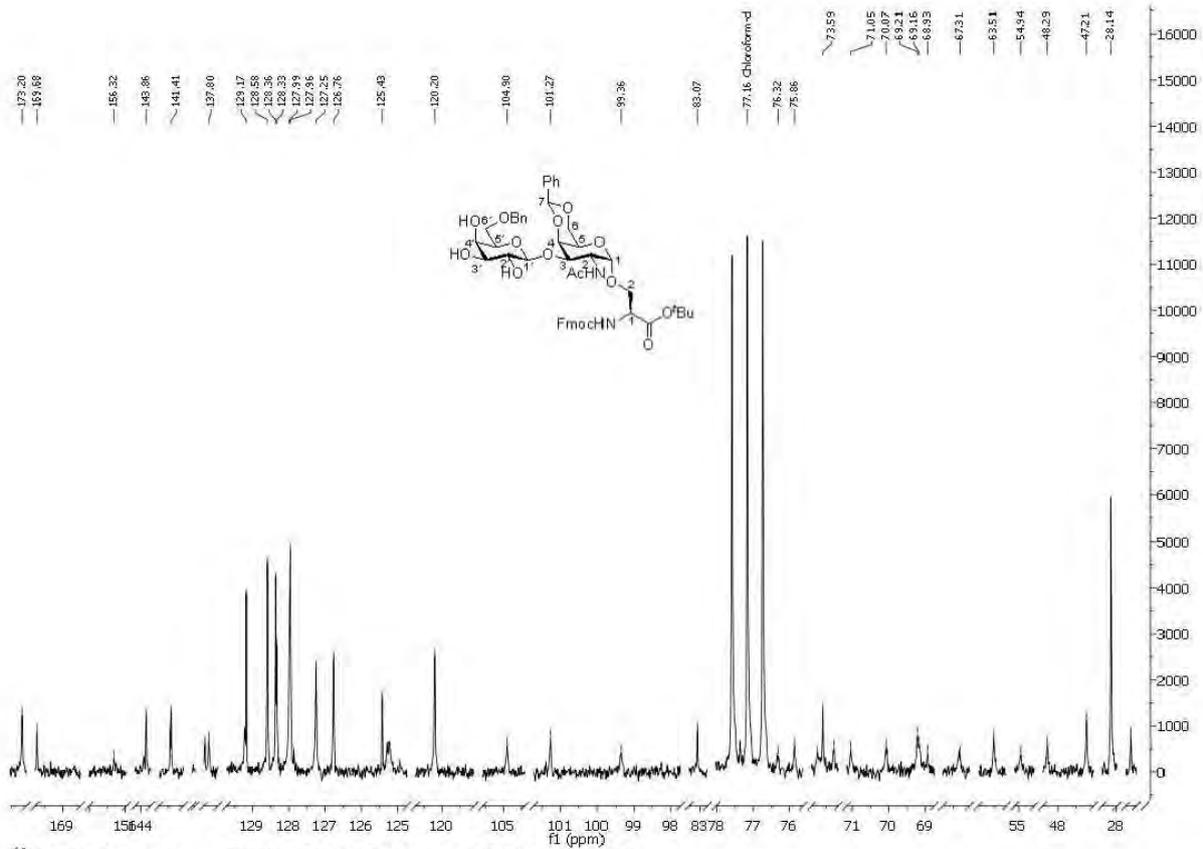


HSQC-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) der Verbindung 51.

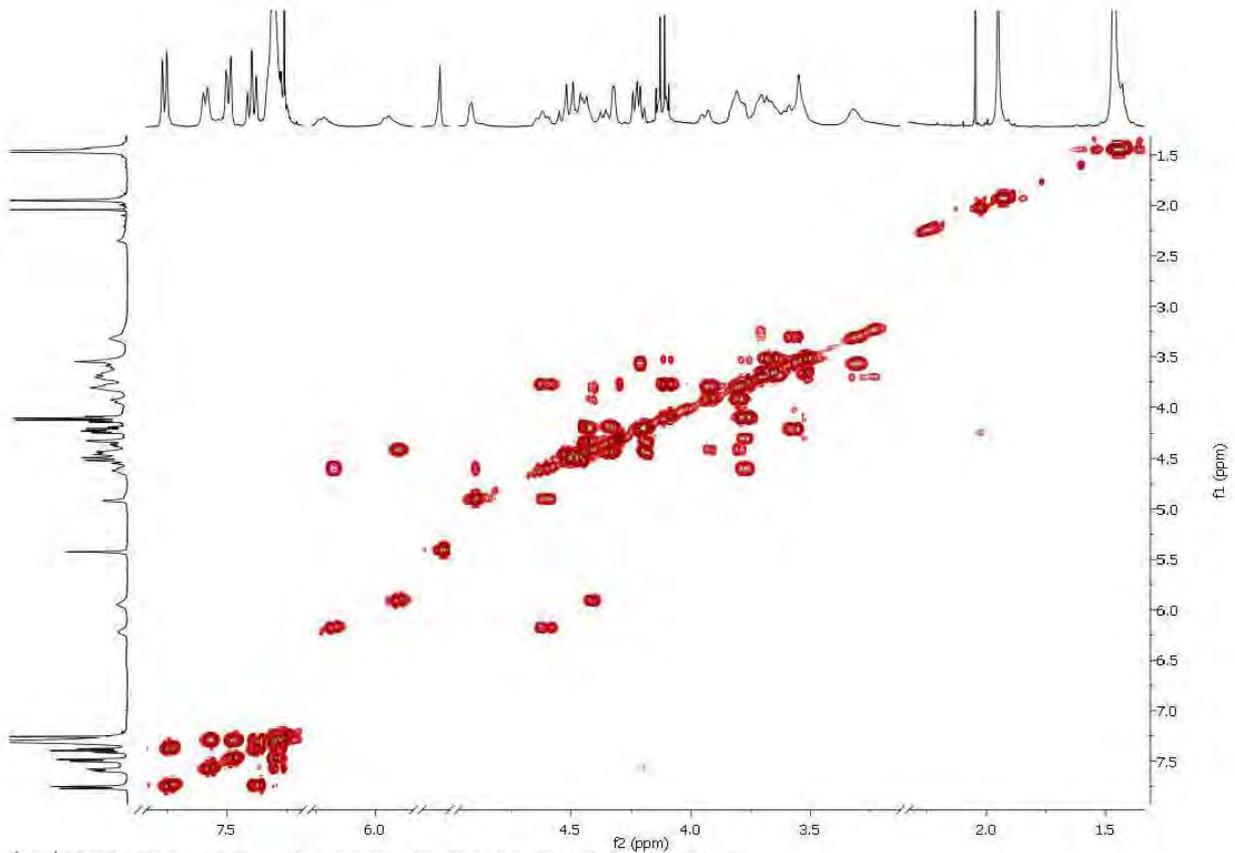


ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 51.

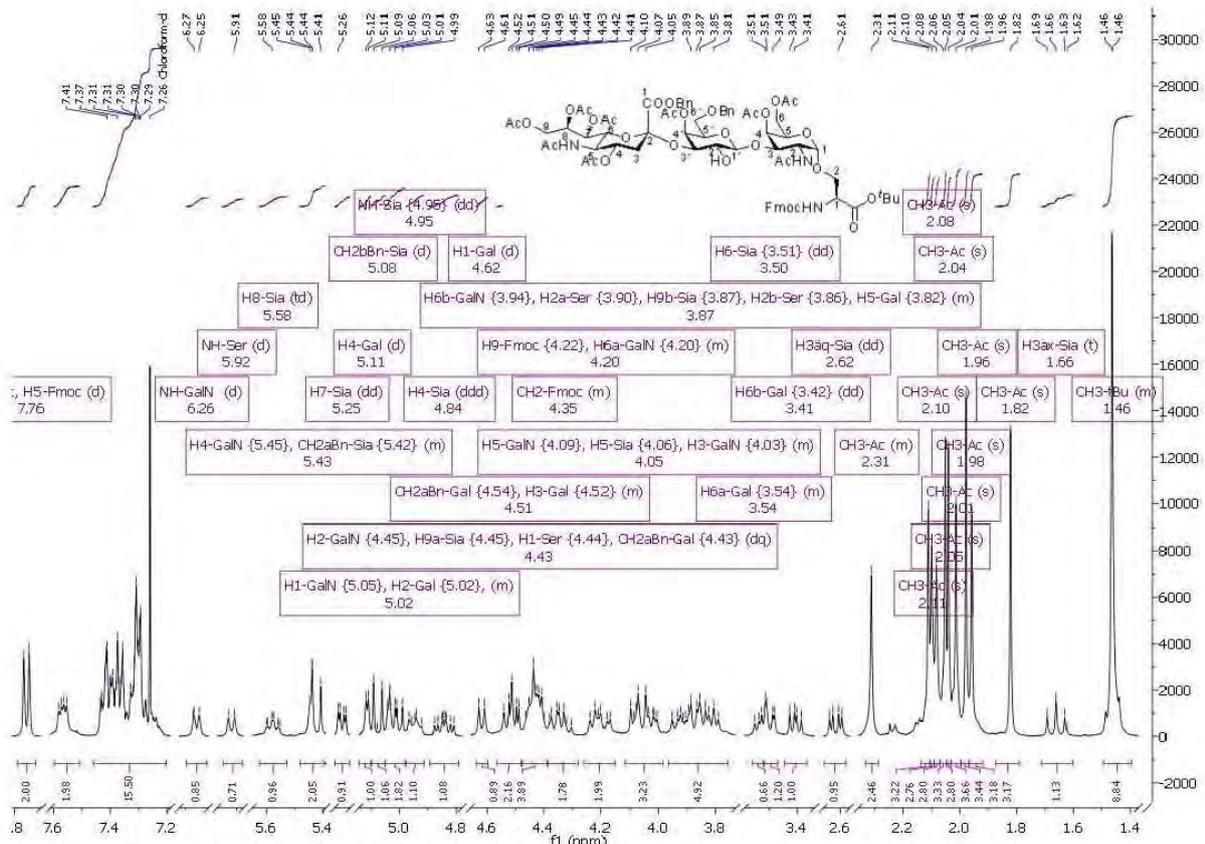




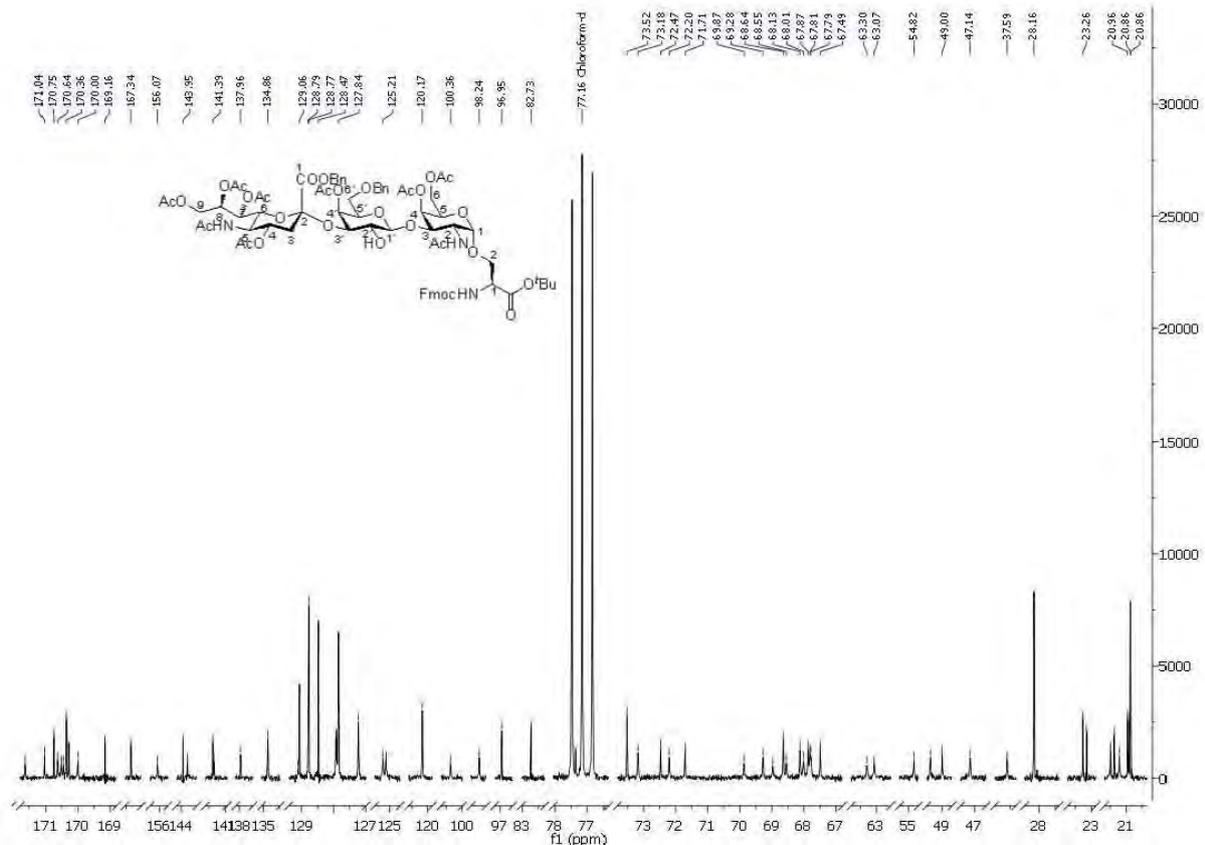
^{13}C -BB-Spektrum (75.5 MHz, CDCl_3) der Verbindung 52.



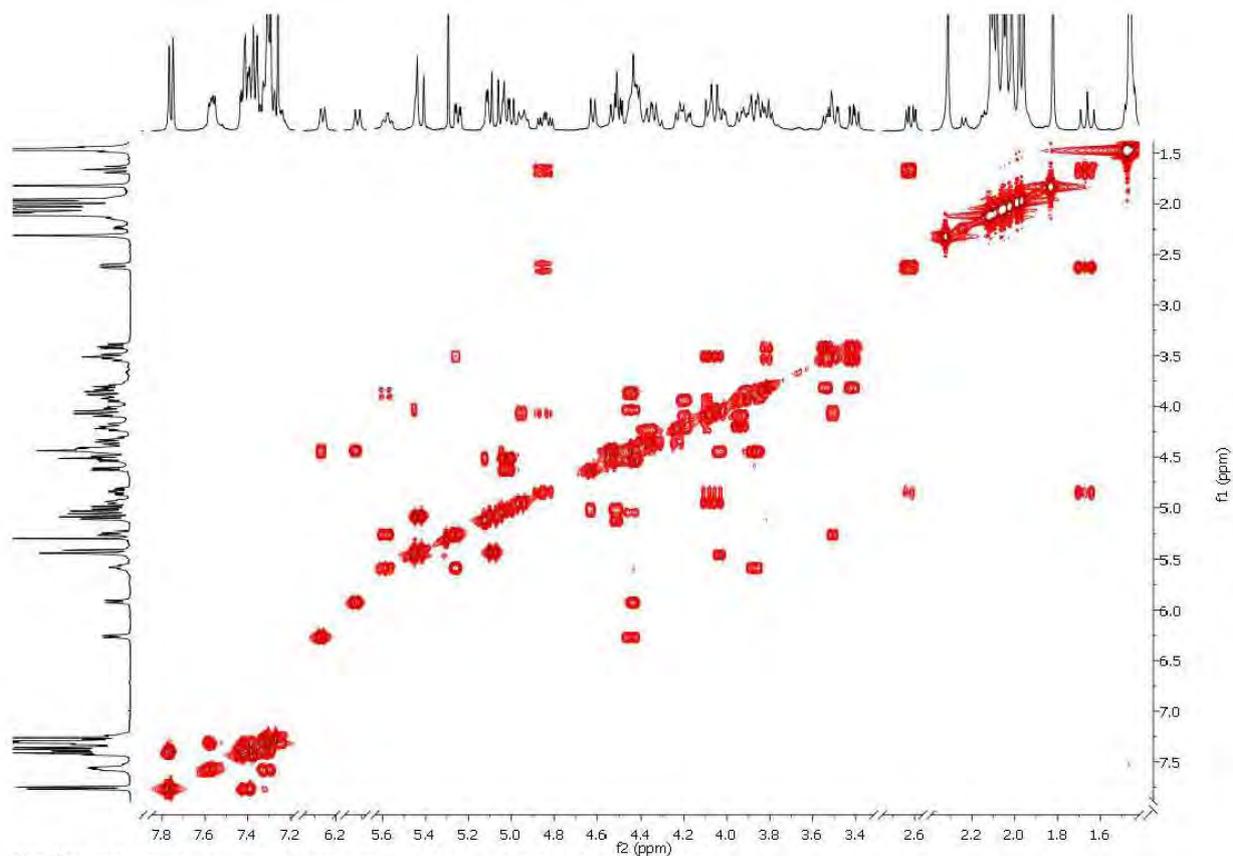
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der Verbindung 52.



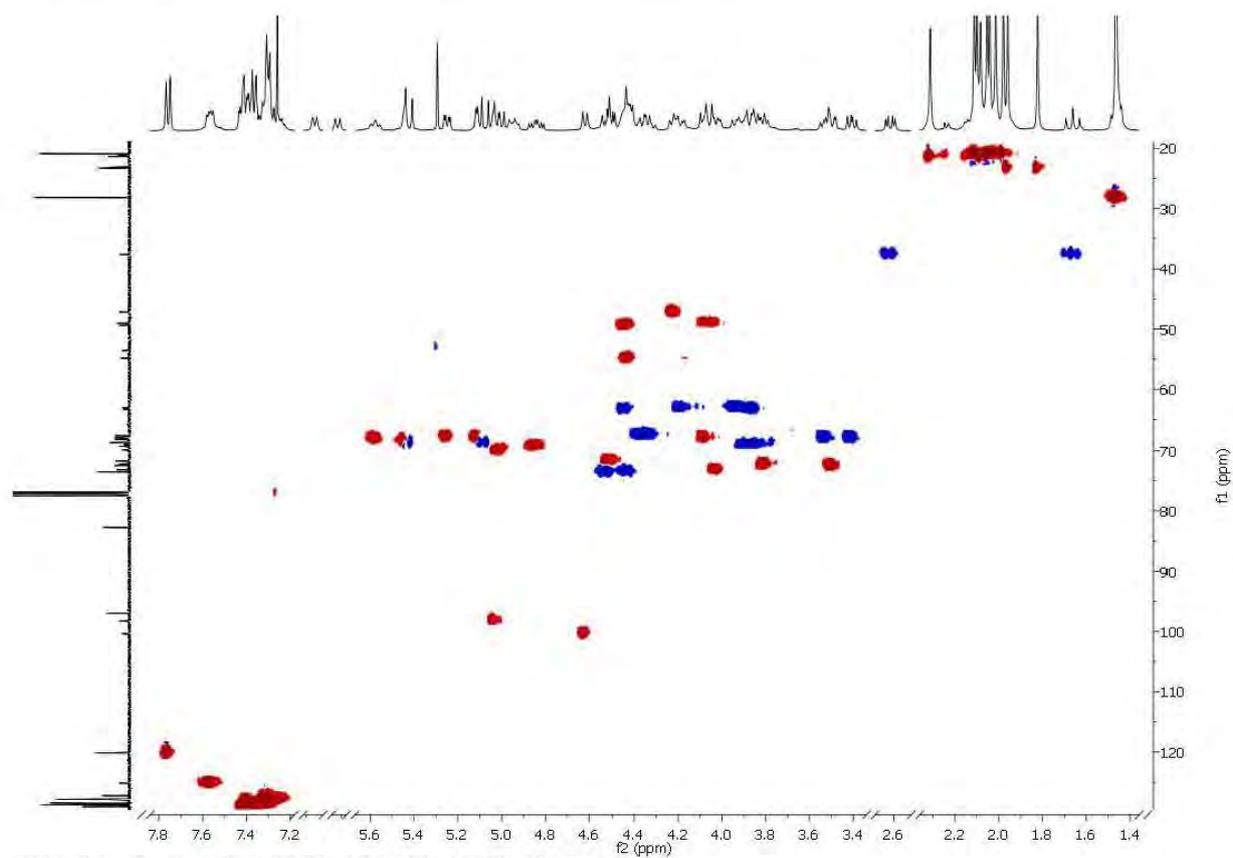
^1H -Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der Verbindung 55.



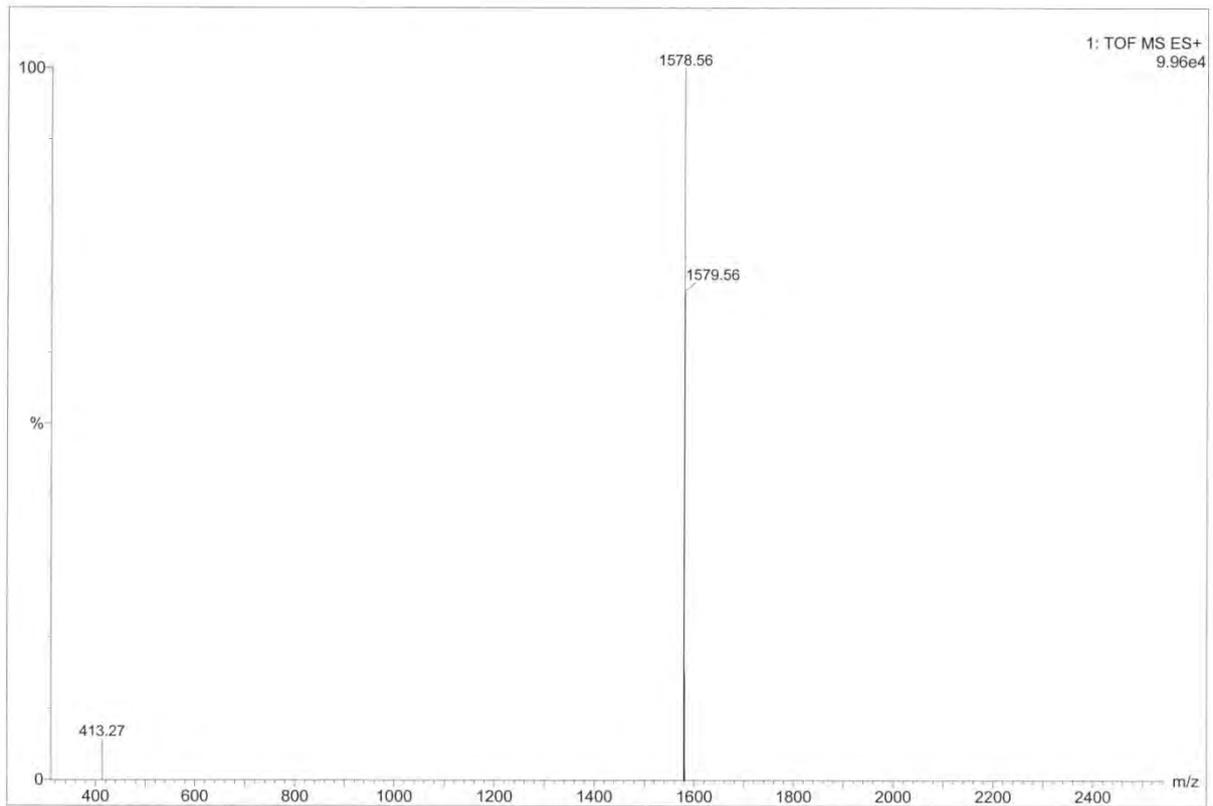
^{13}C -BB-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) der Verbindung 55.



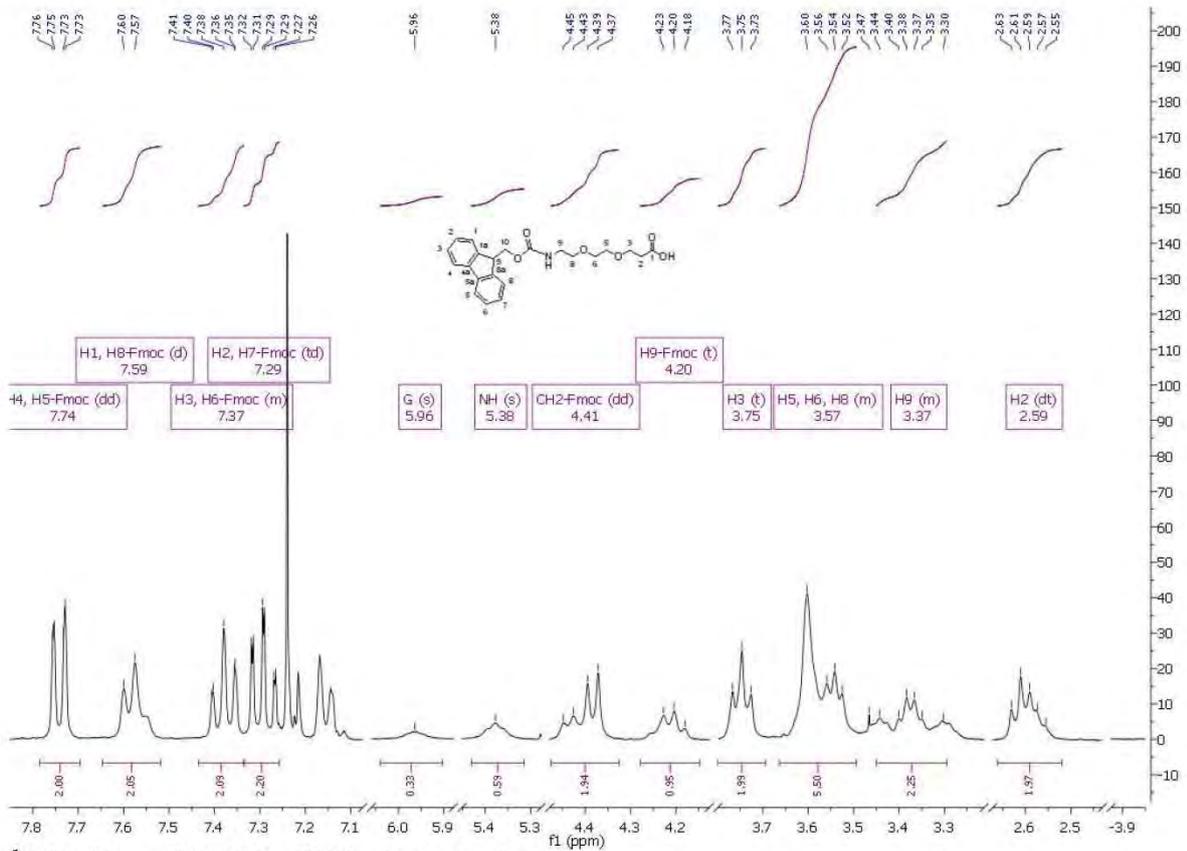
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der Verbindung 55.



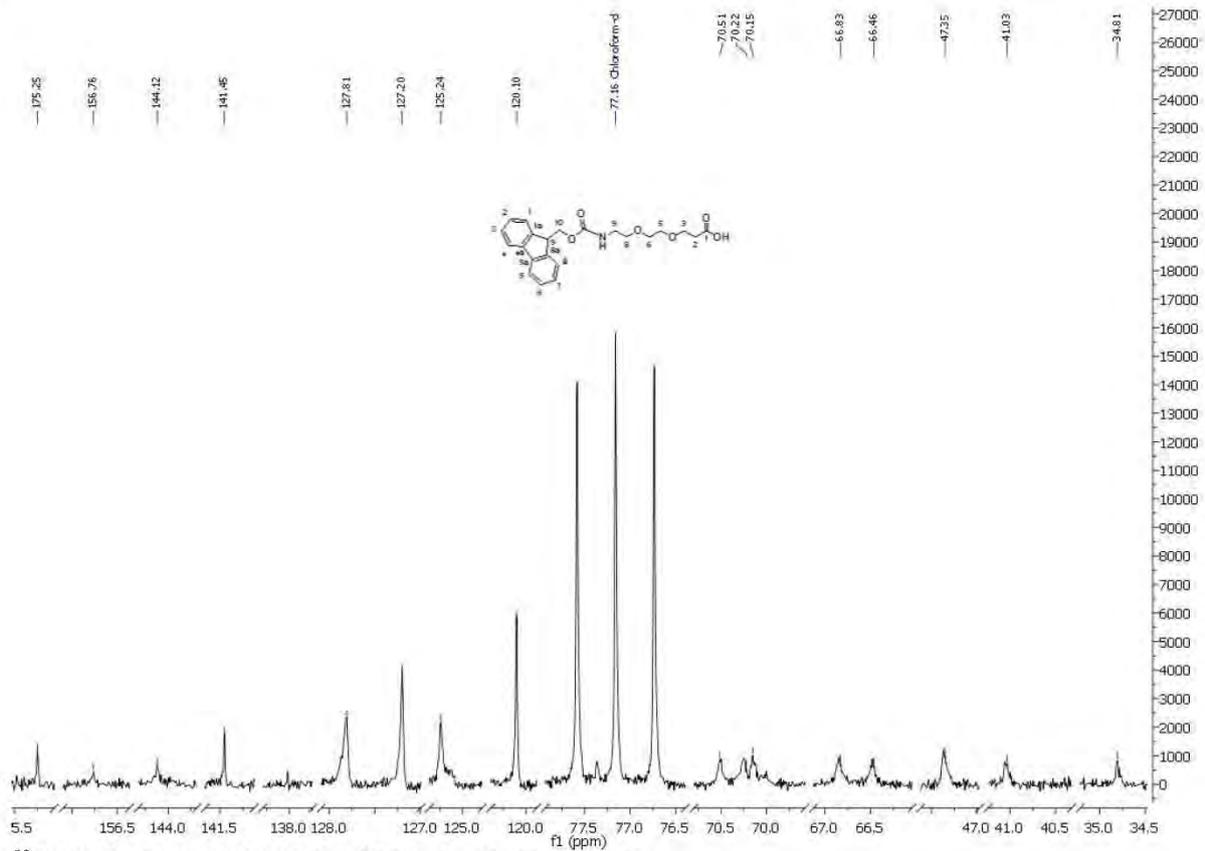
HSQC-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) der Verbindung 55.



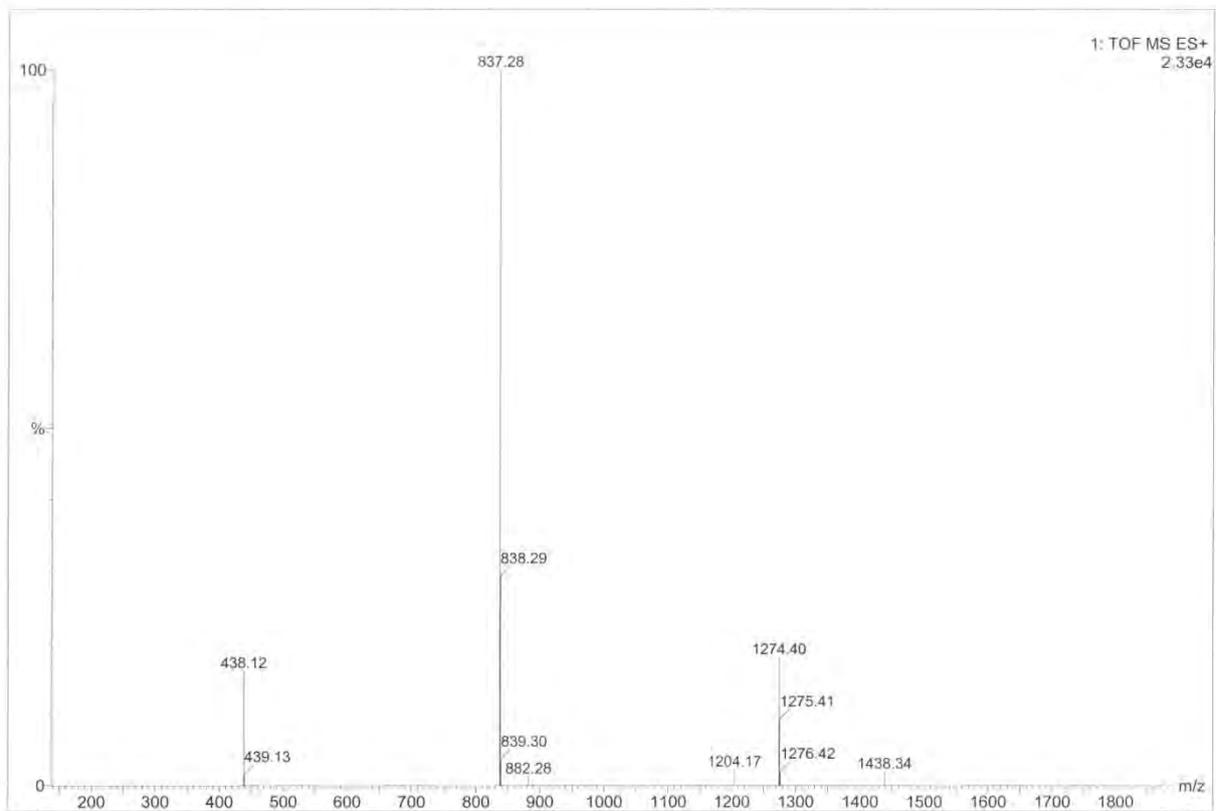
ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 55.



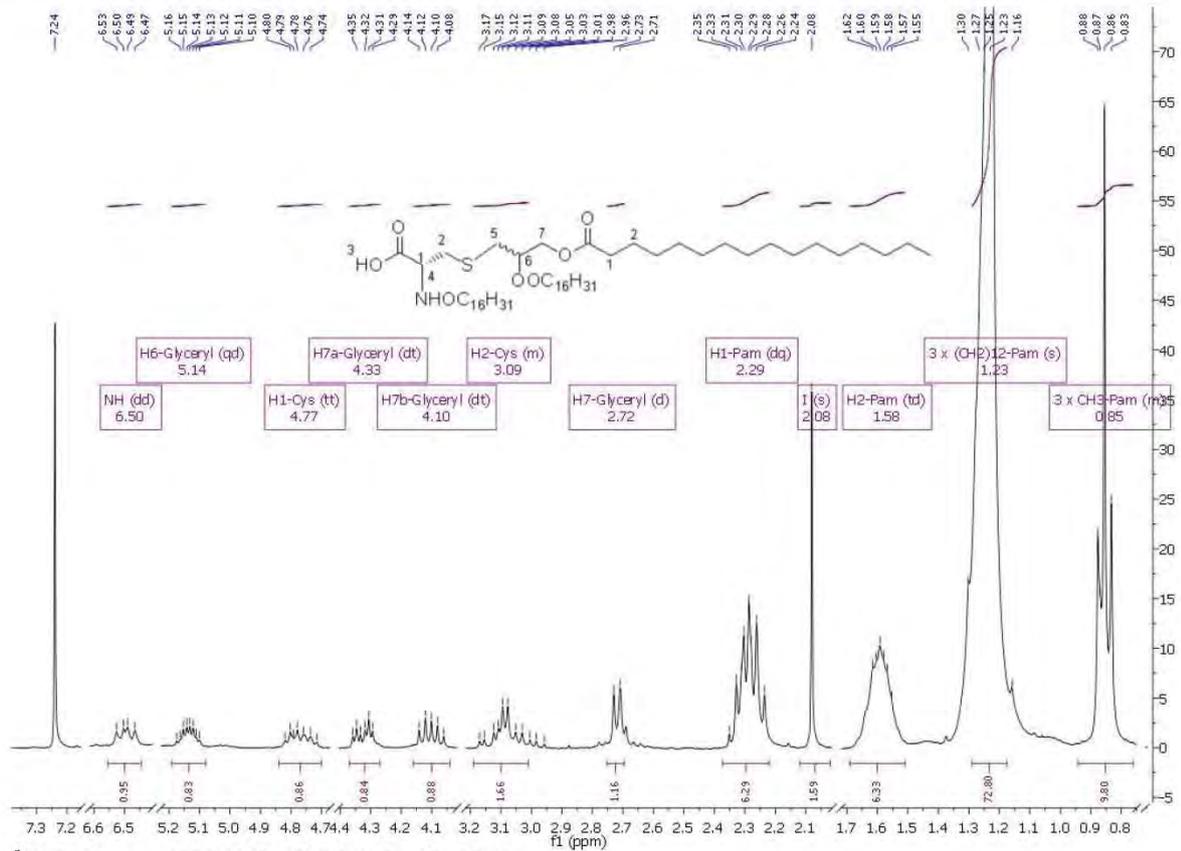
^1H -Spektrum (300 MHz, CDCl_3) der Verbindung 63.



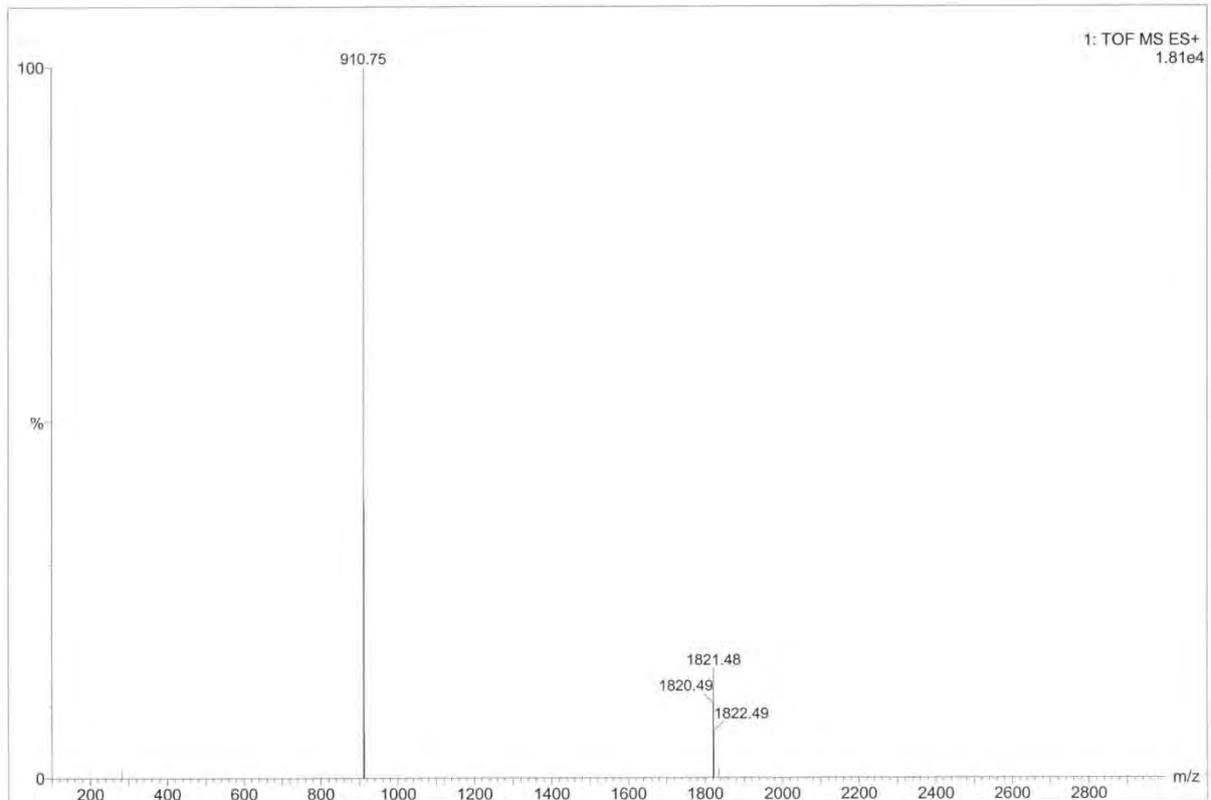
¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃) der Verbindung 63.



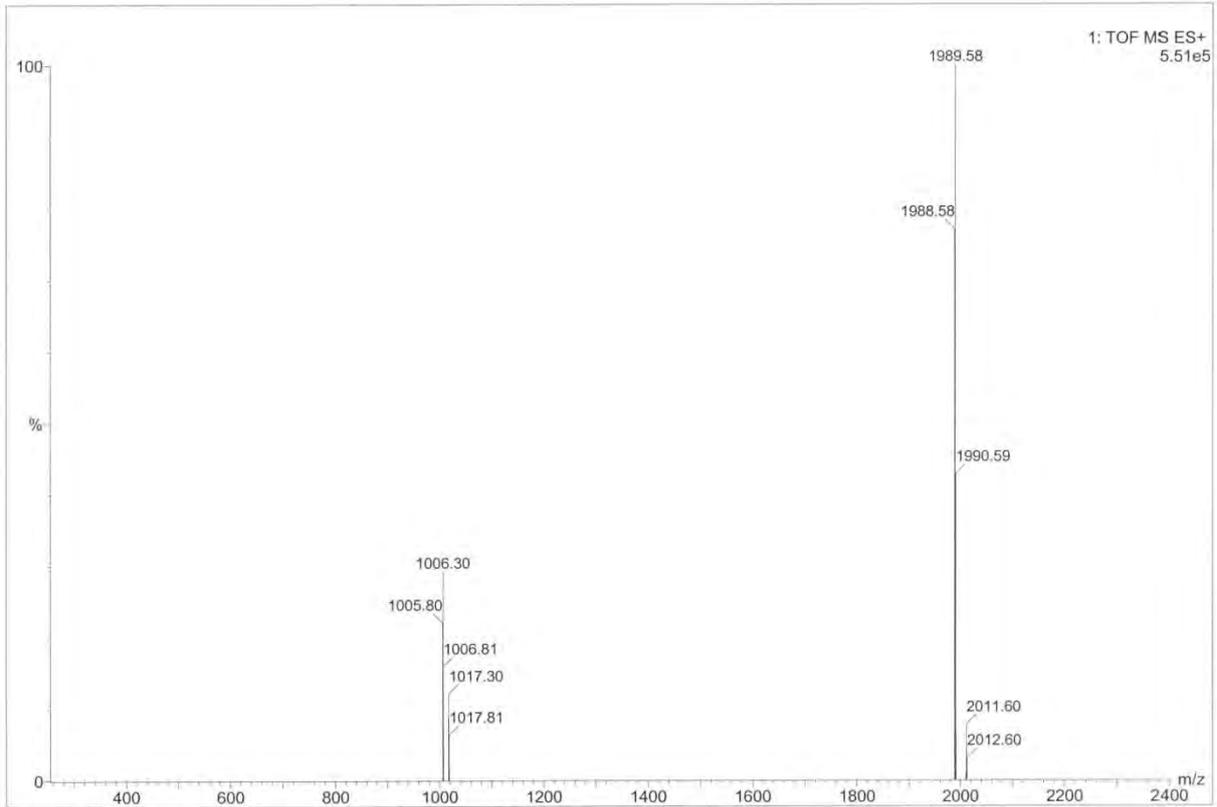
ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 63.



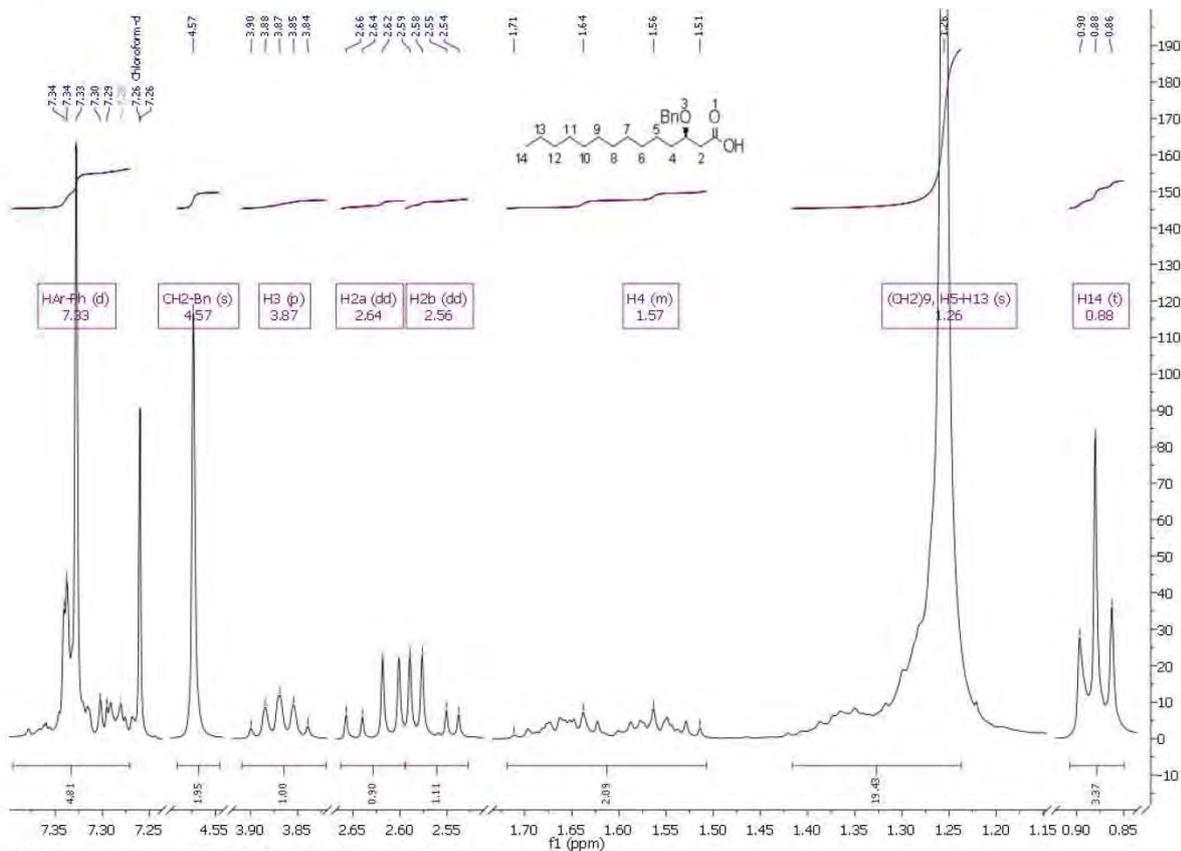
¹H-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) der Verbindung 77.

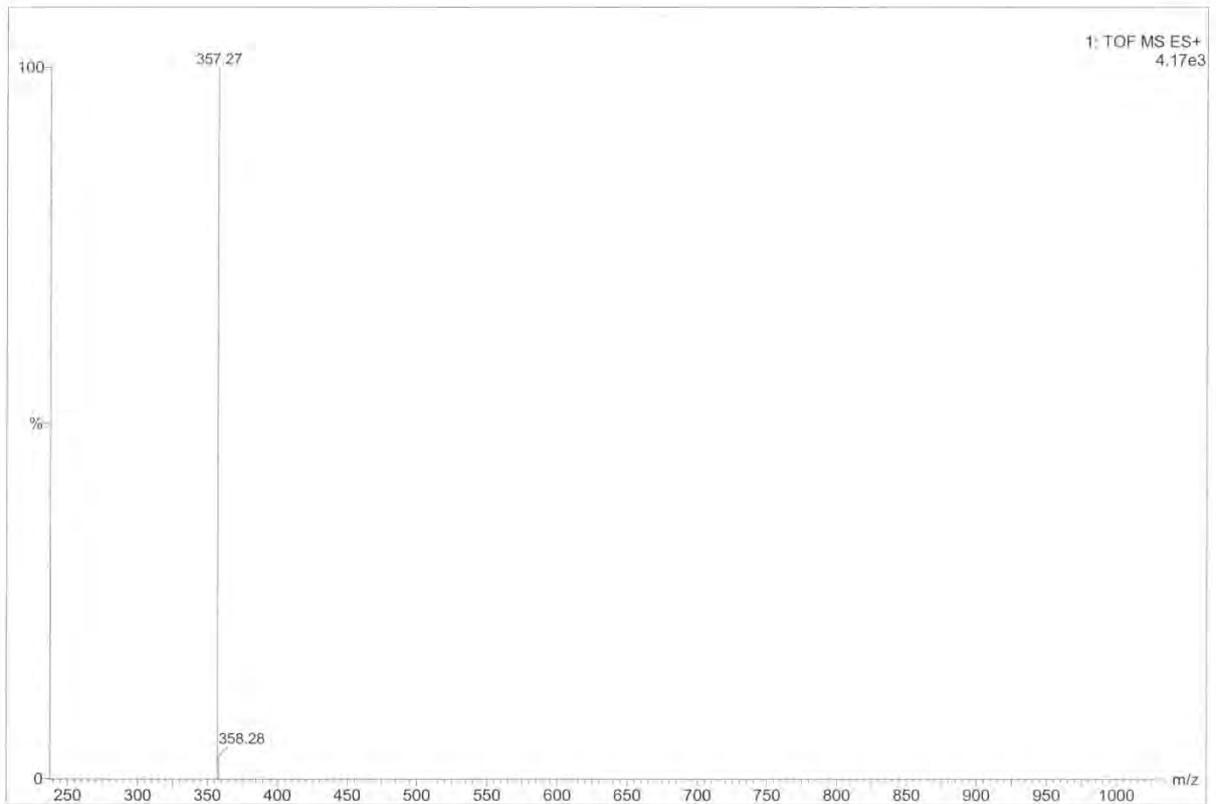
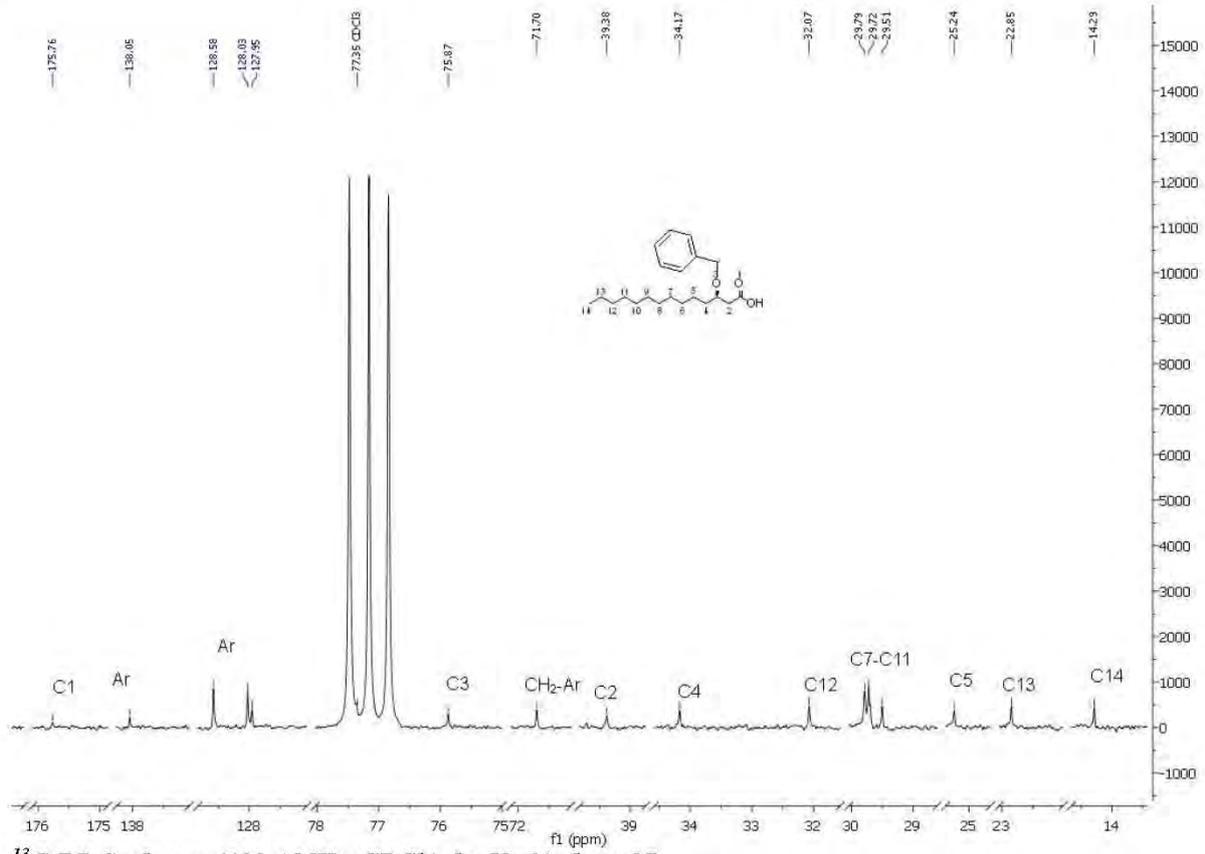


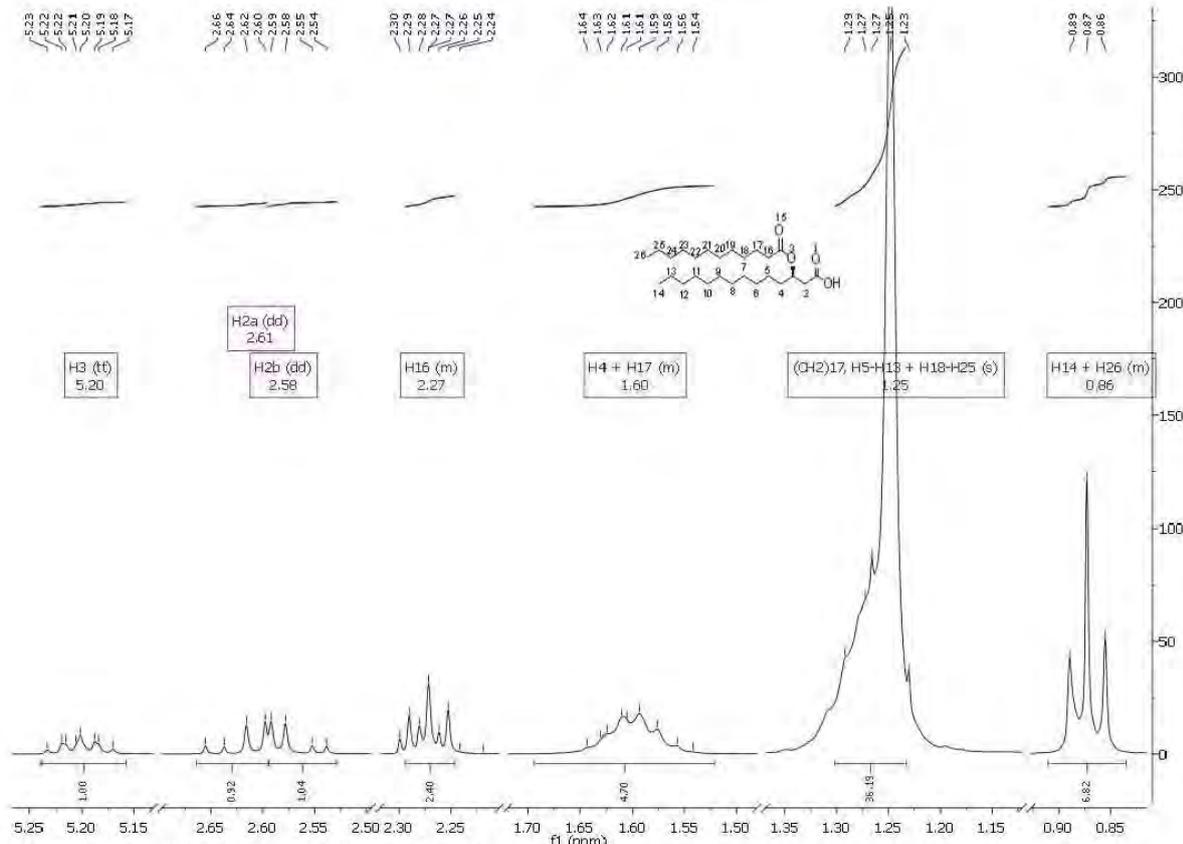
ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 77.



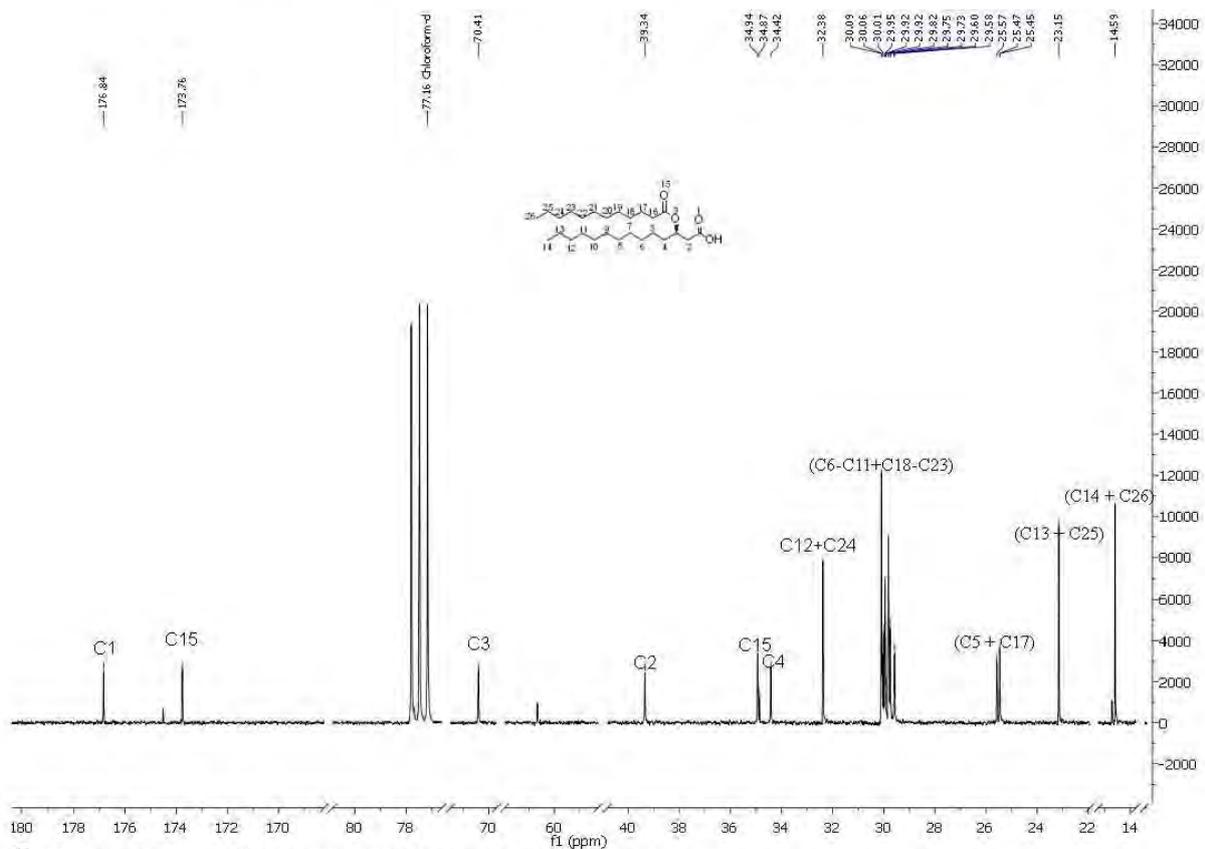
ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 190.

¹H-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der Verbindung 87.

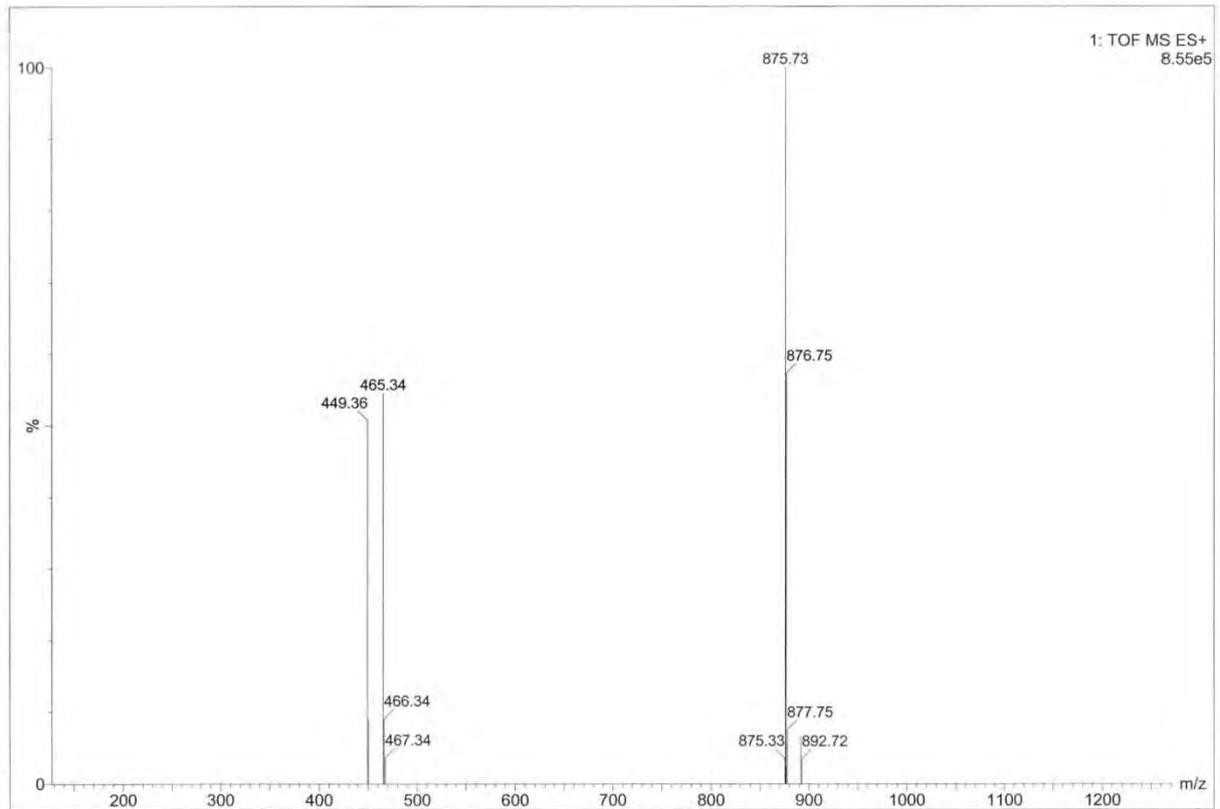




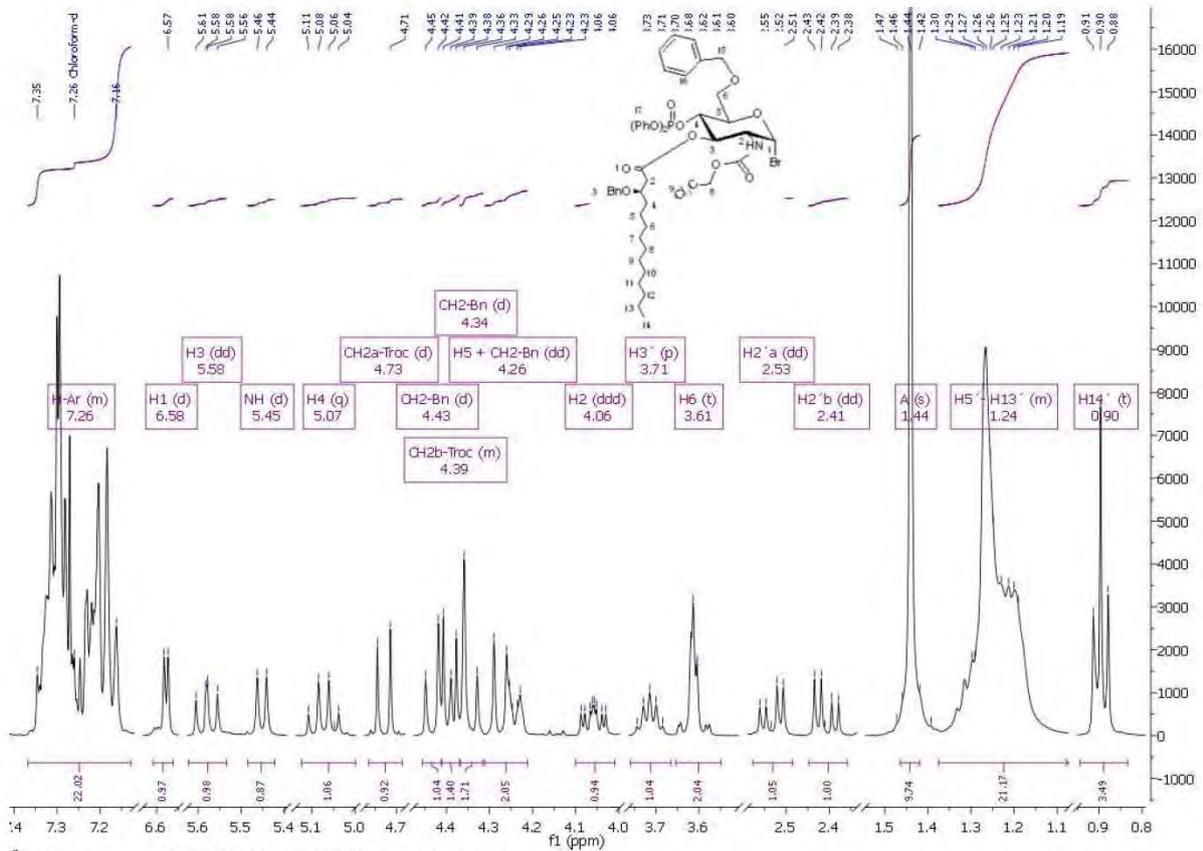
¹H-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der Verbindung 91.



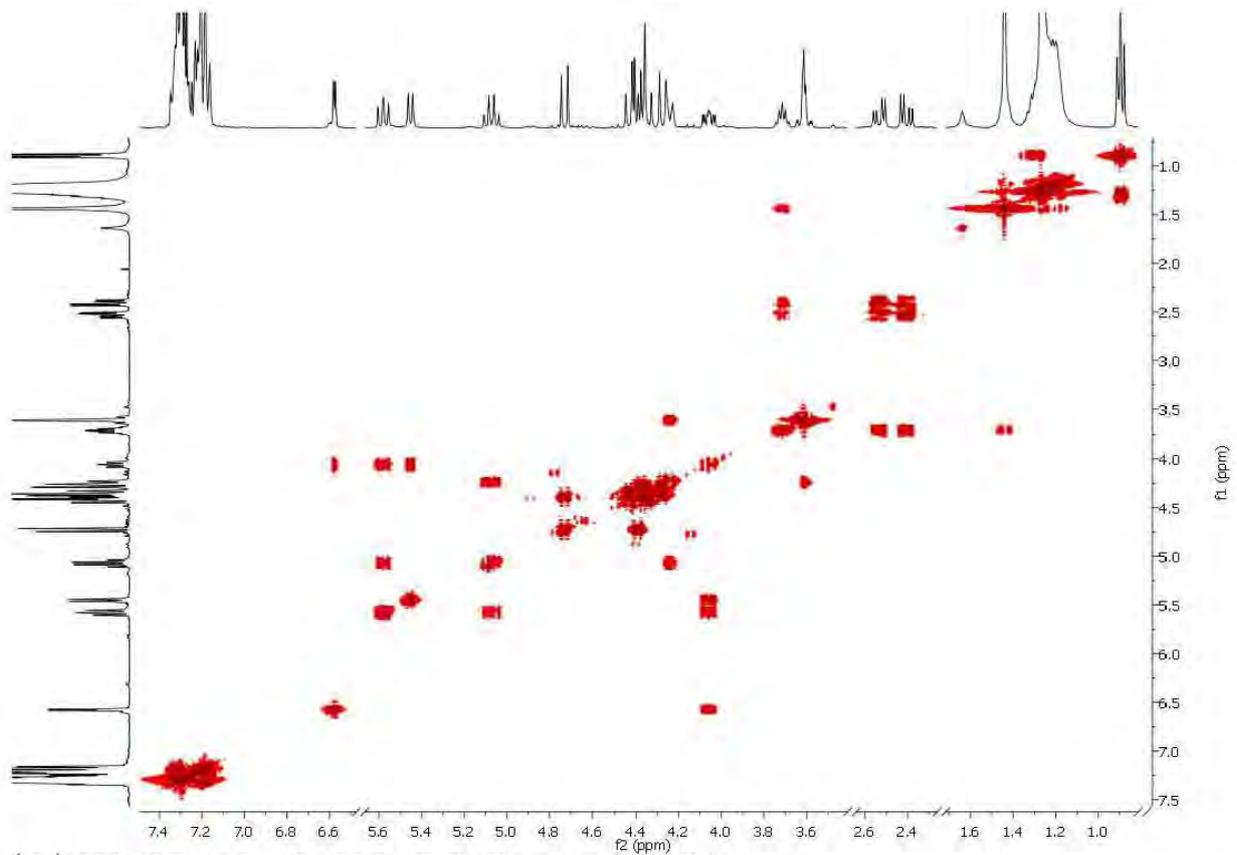
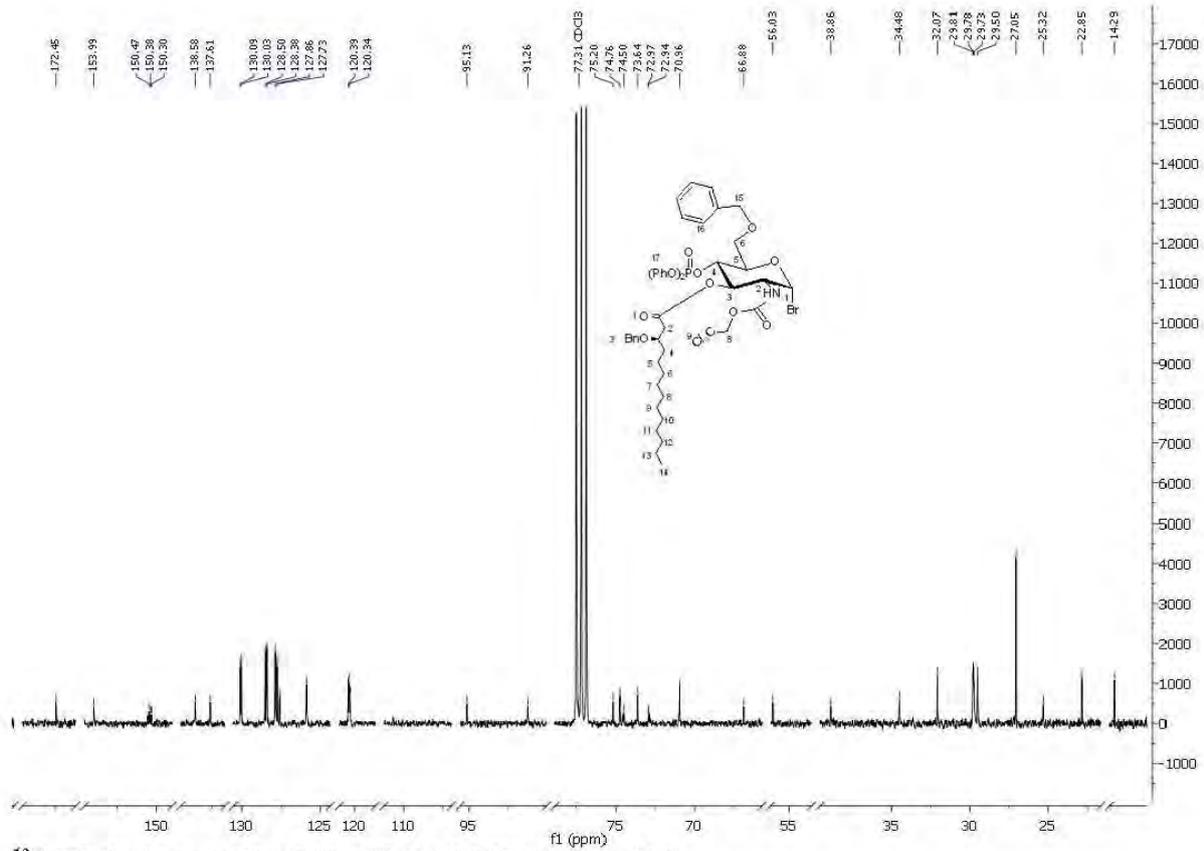
¹³C-BB-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) der Verbindung 91.

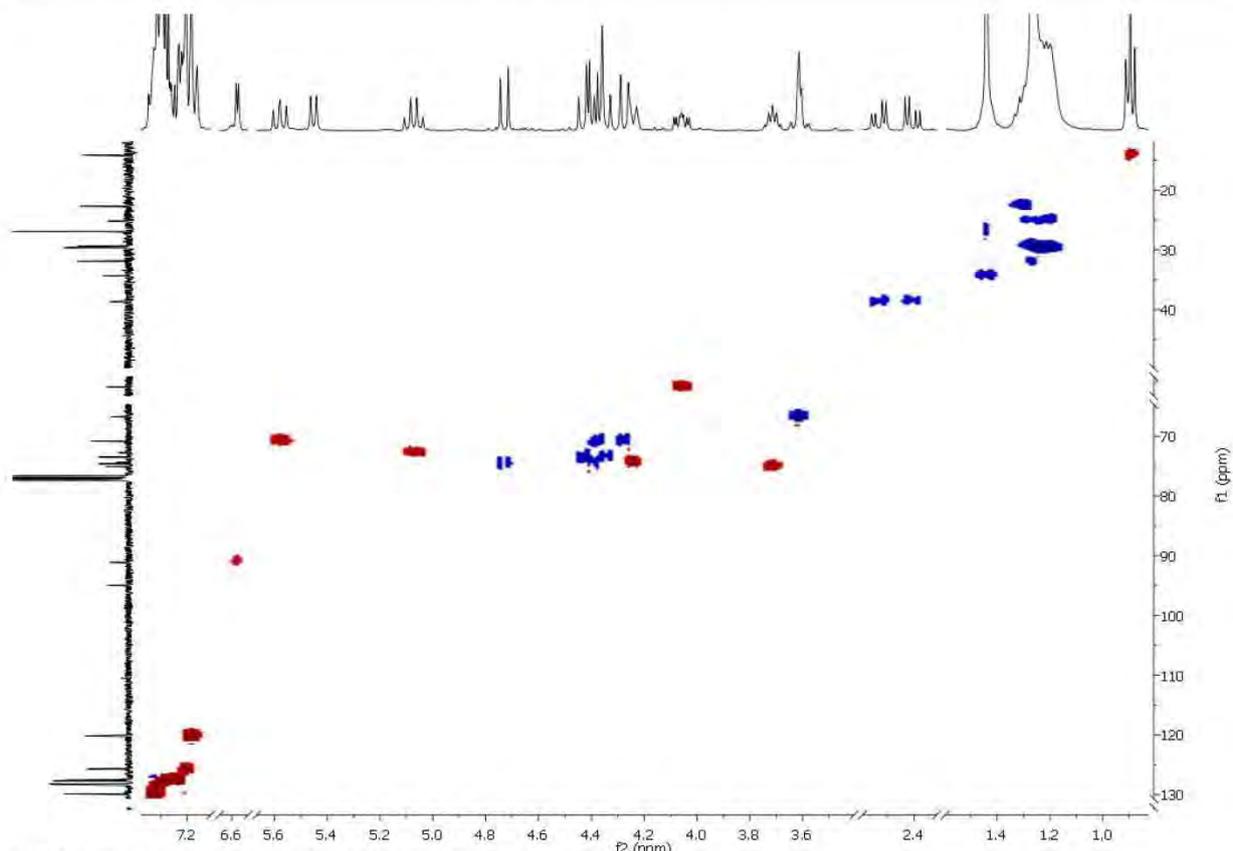


ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 91.

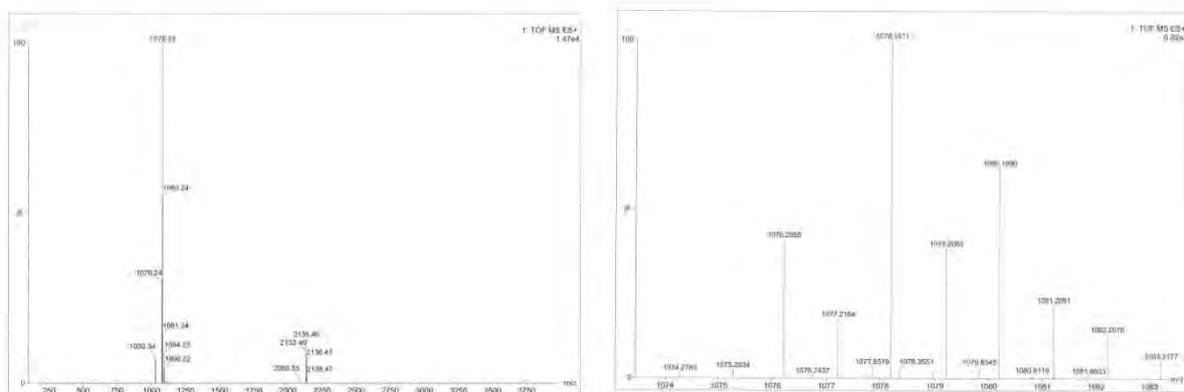


¹H-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der Verbindung 104.

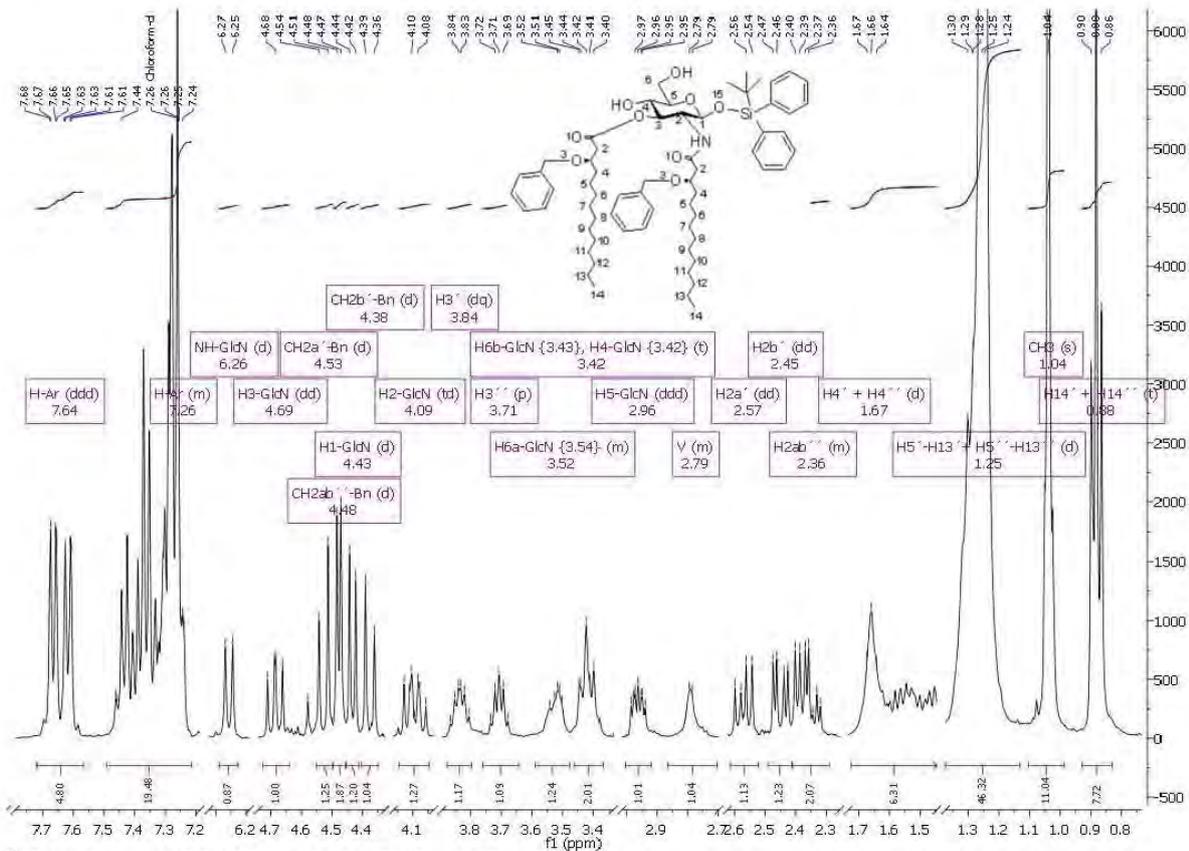




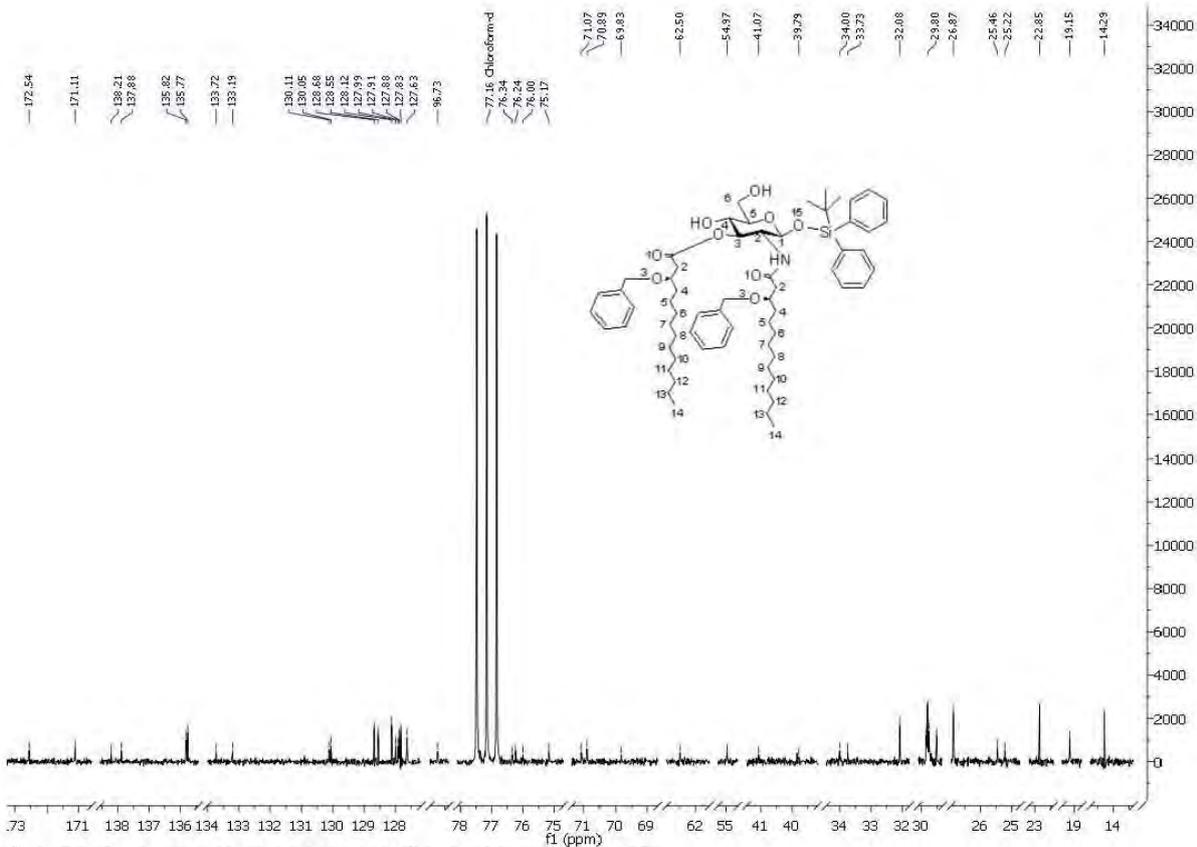
HSQC-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) der Verbindung 104.



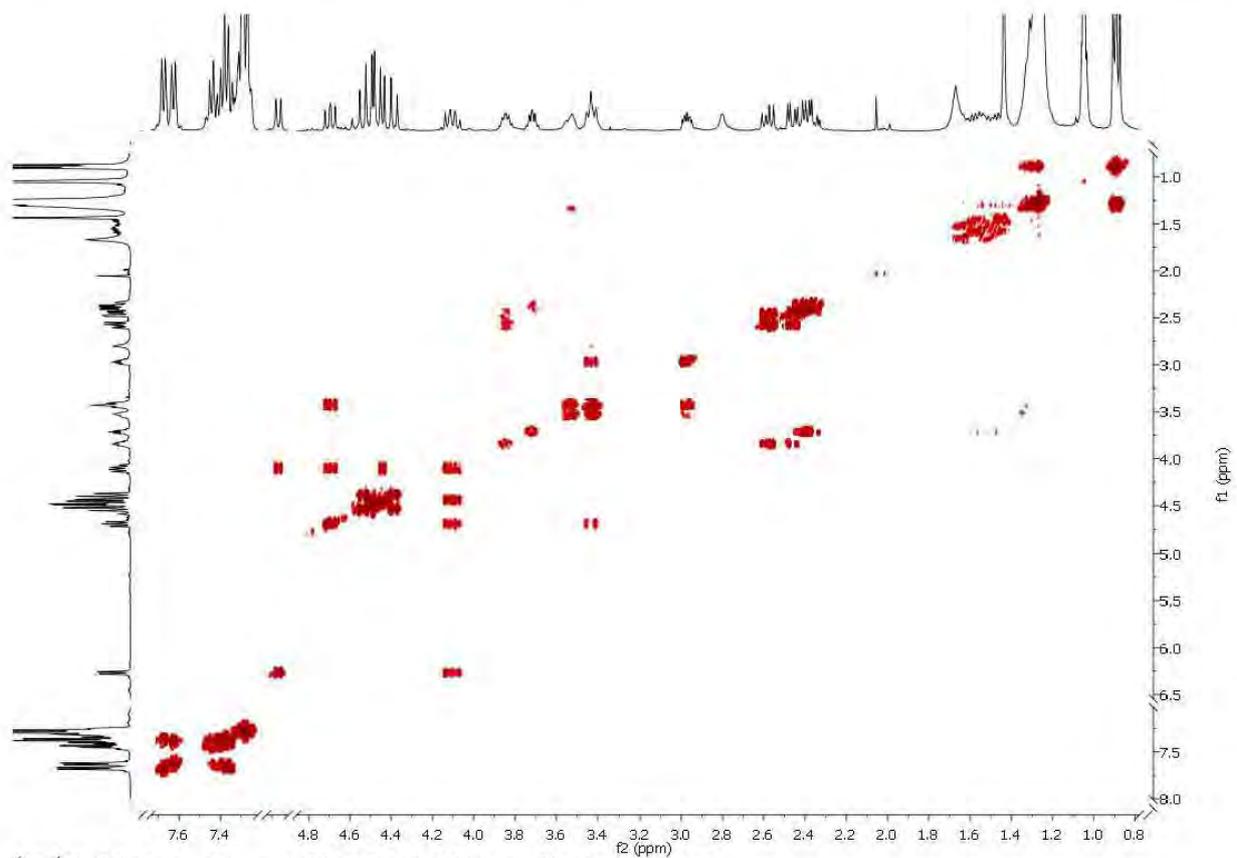
ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 104.



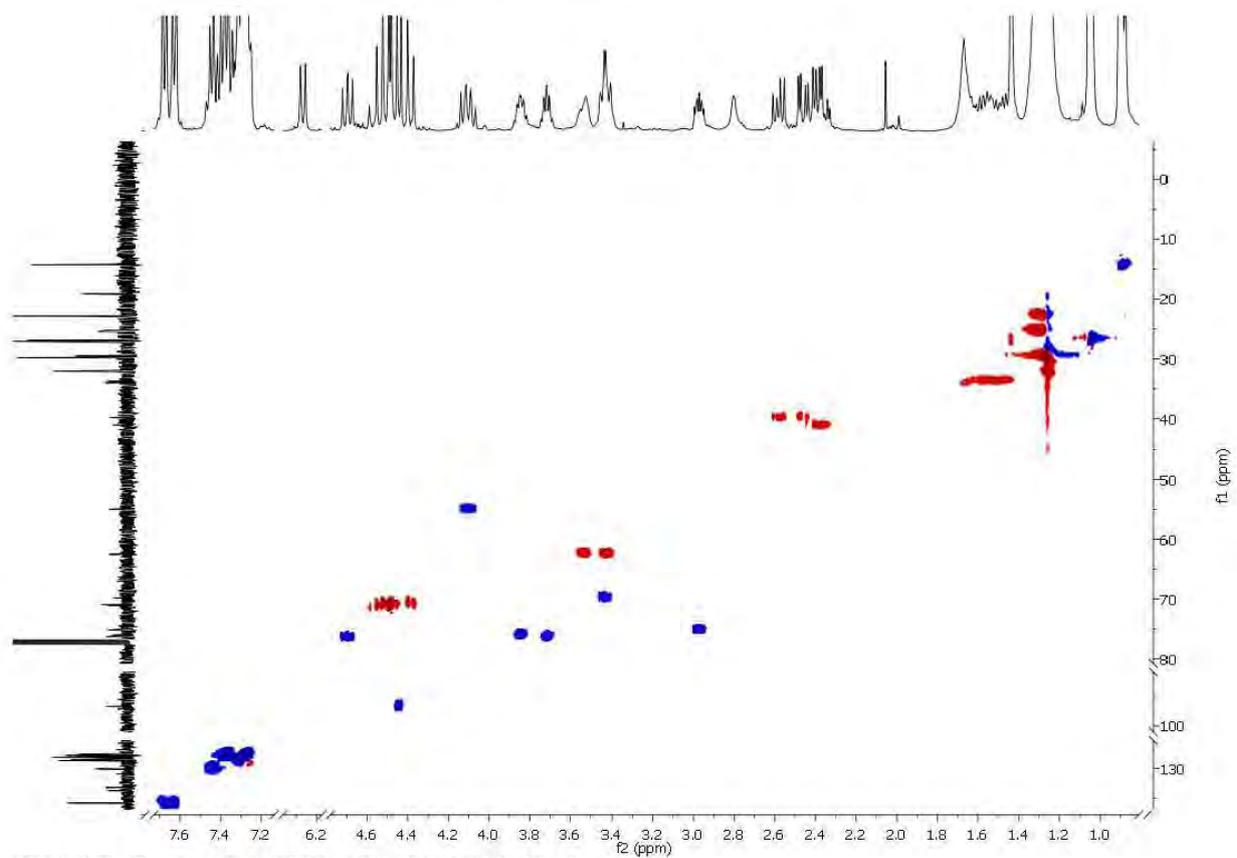
¹H-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der Verbindung 115.



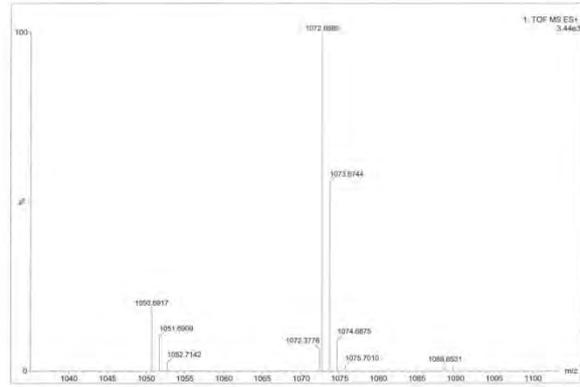
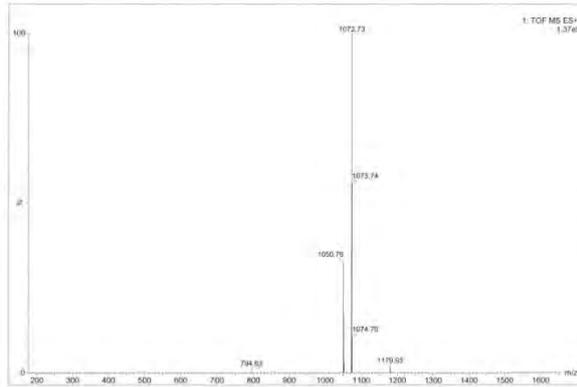
¹³C-BB-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) der Verbindung 115.



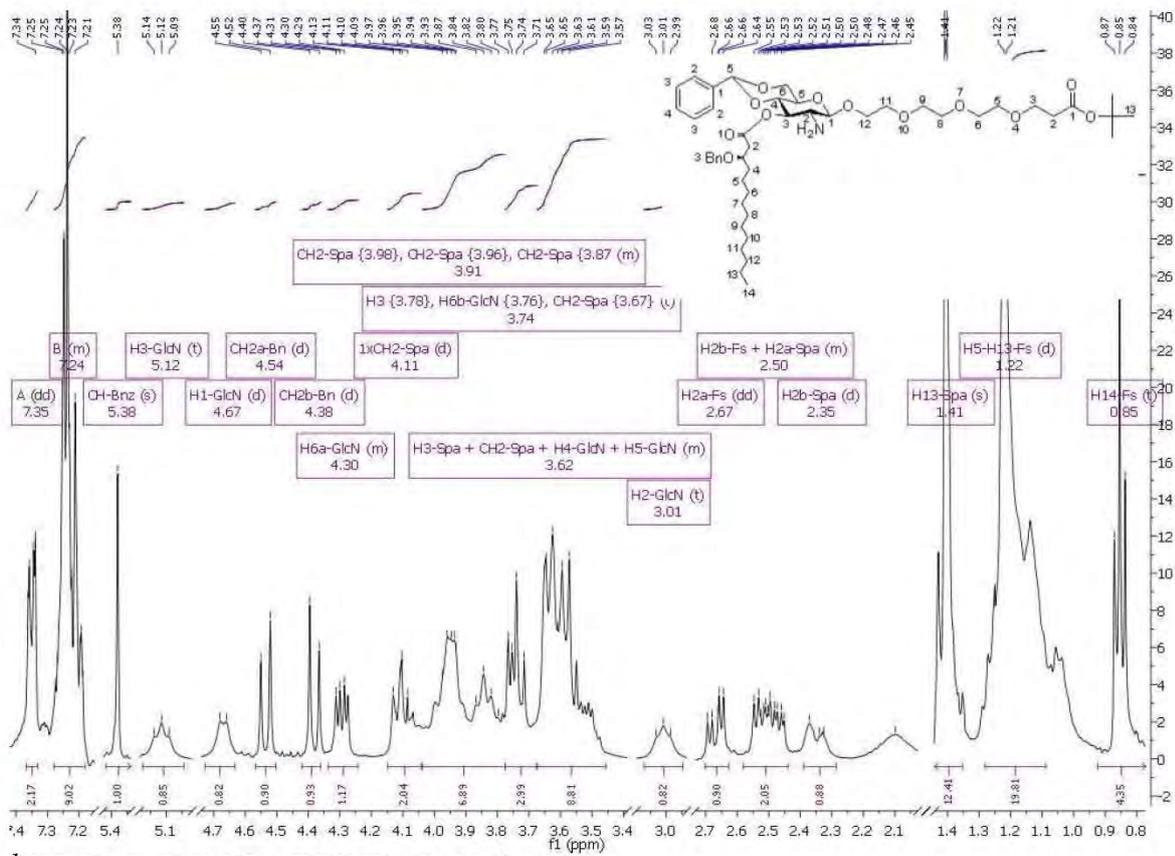
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der Verbindung 115.



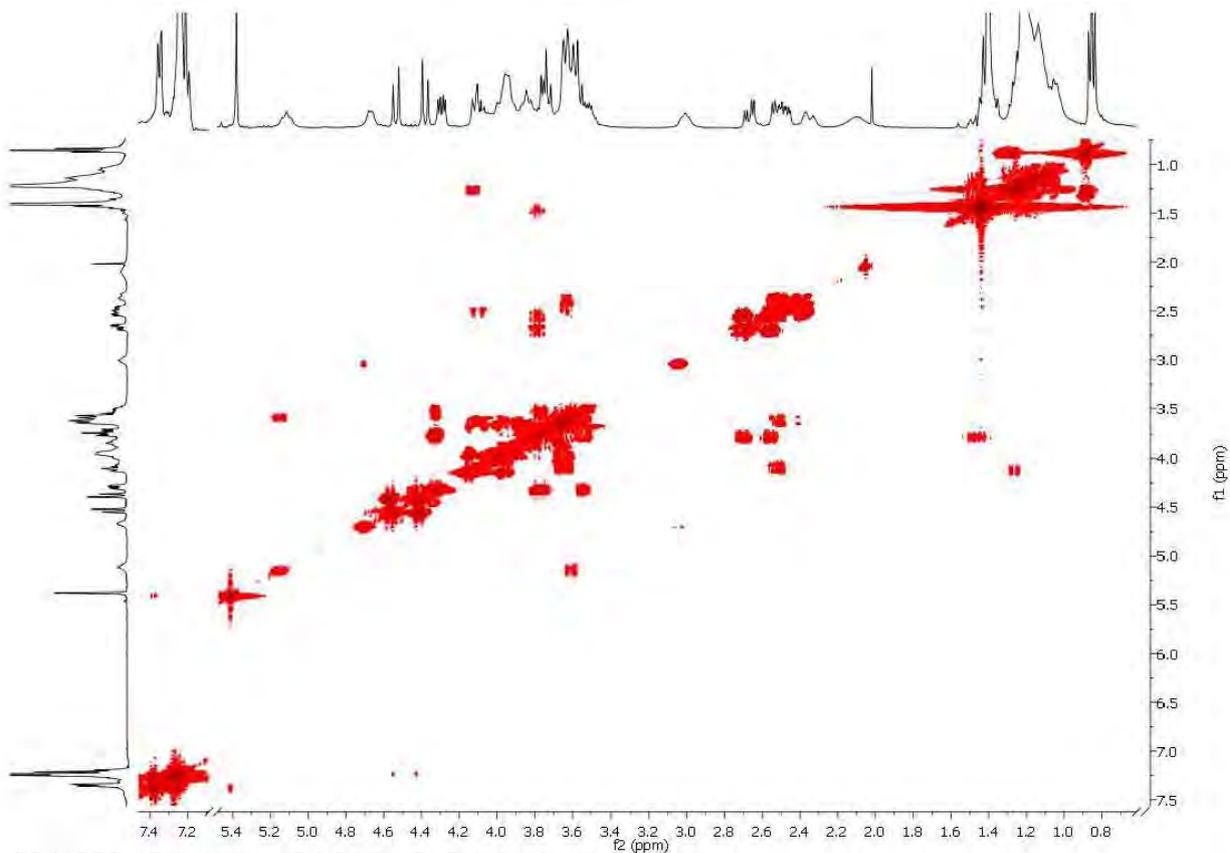
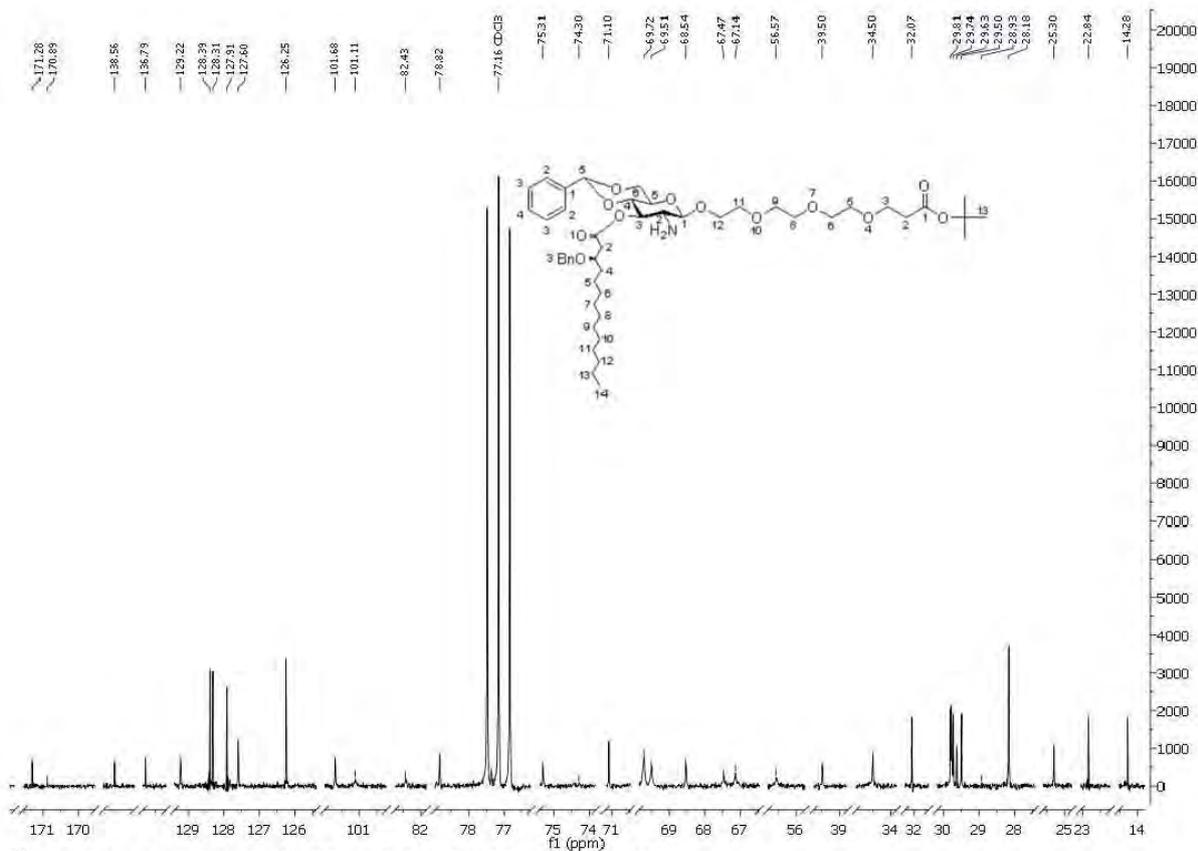
HSQC-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) der Verbindung 115.

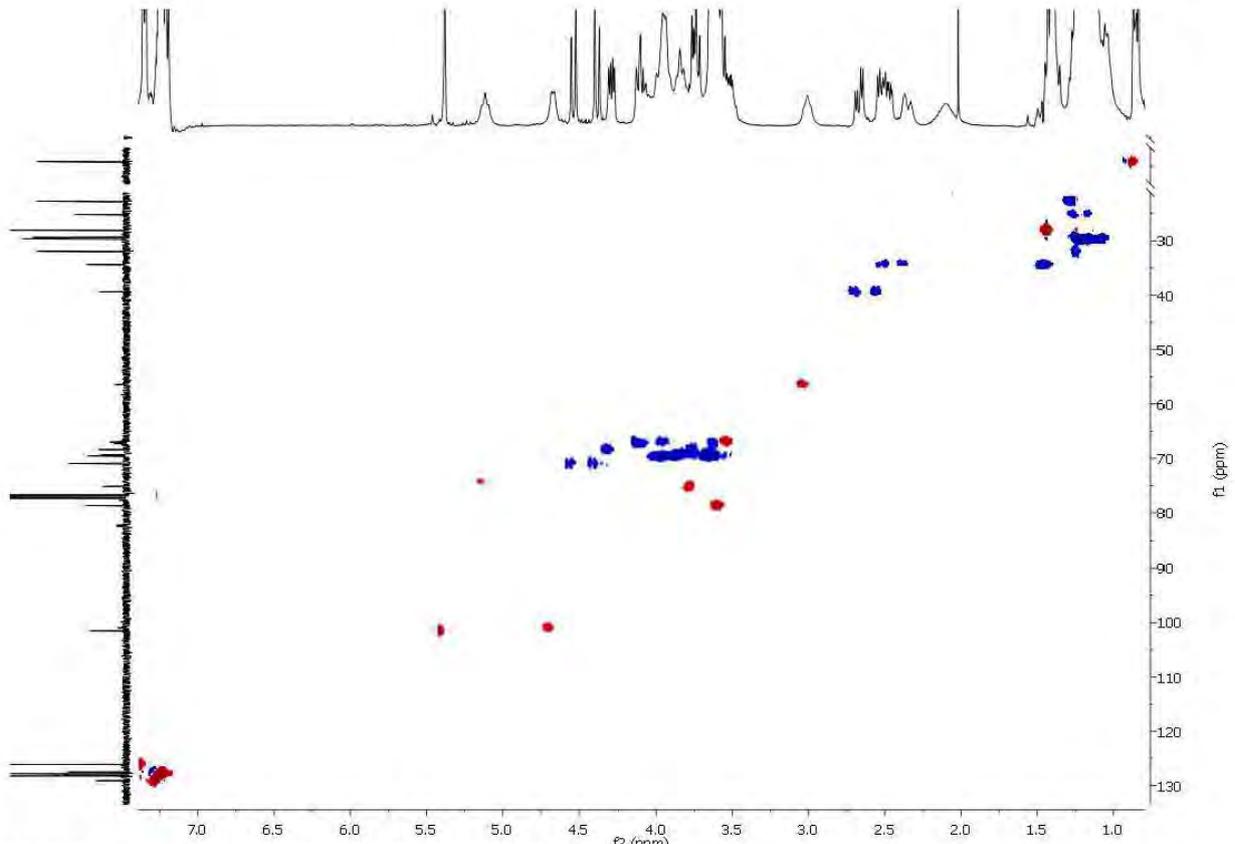


ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 115.

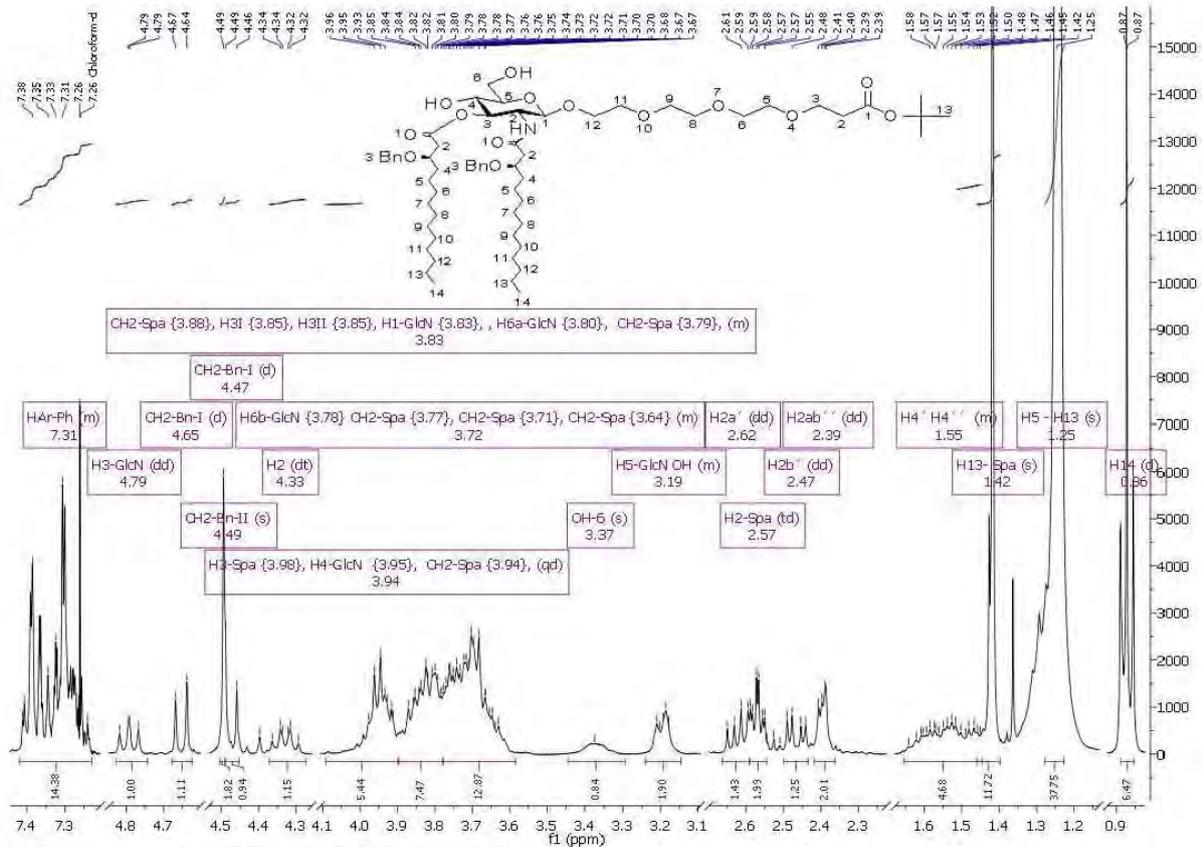


¹H-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der Verbindung 123.

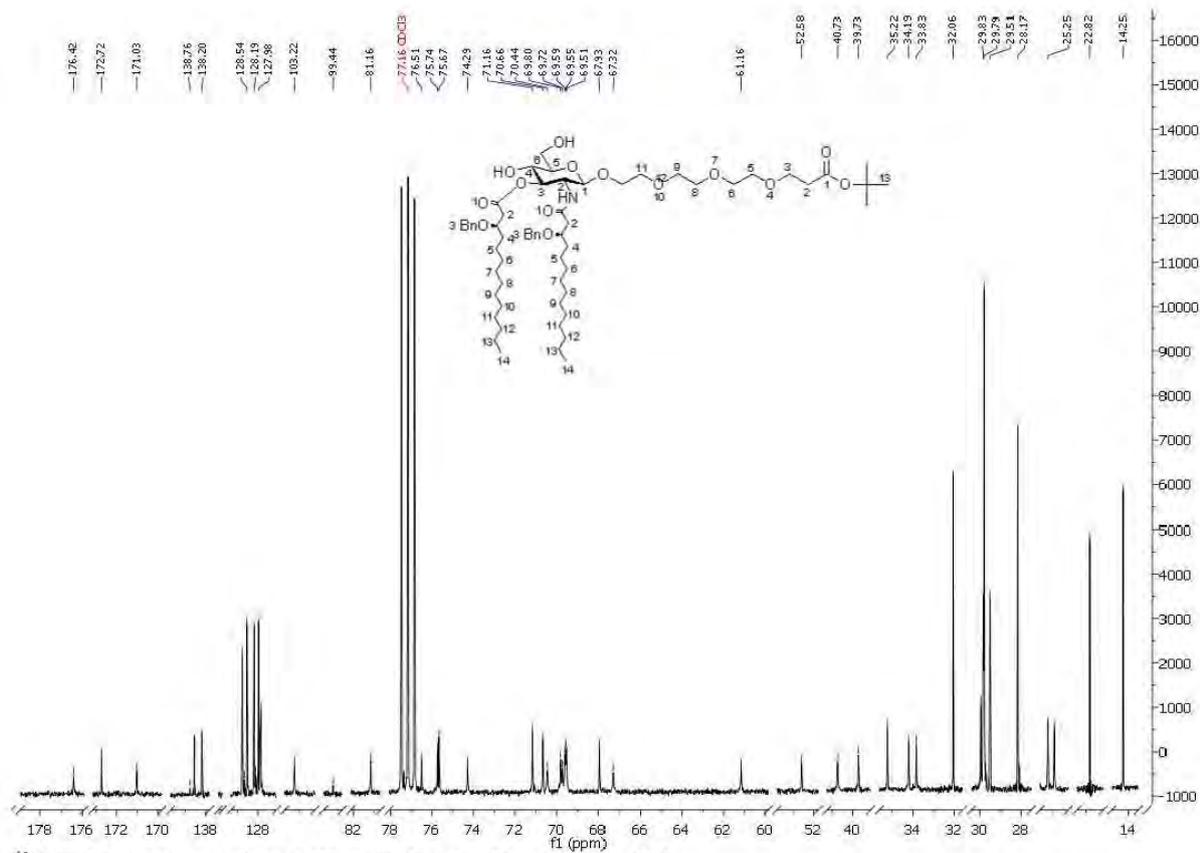




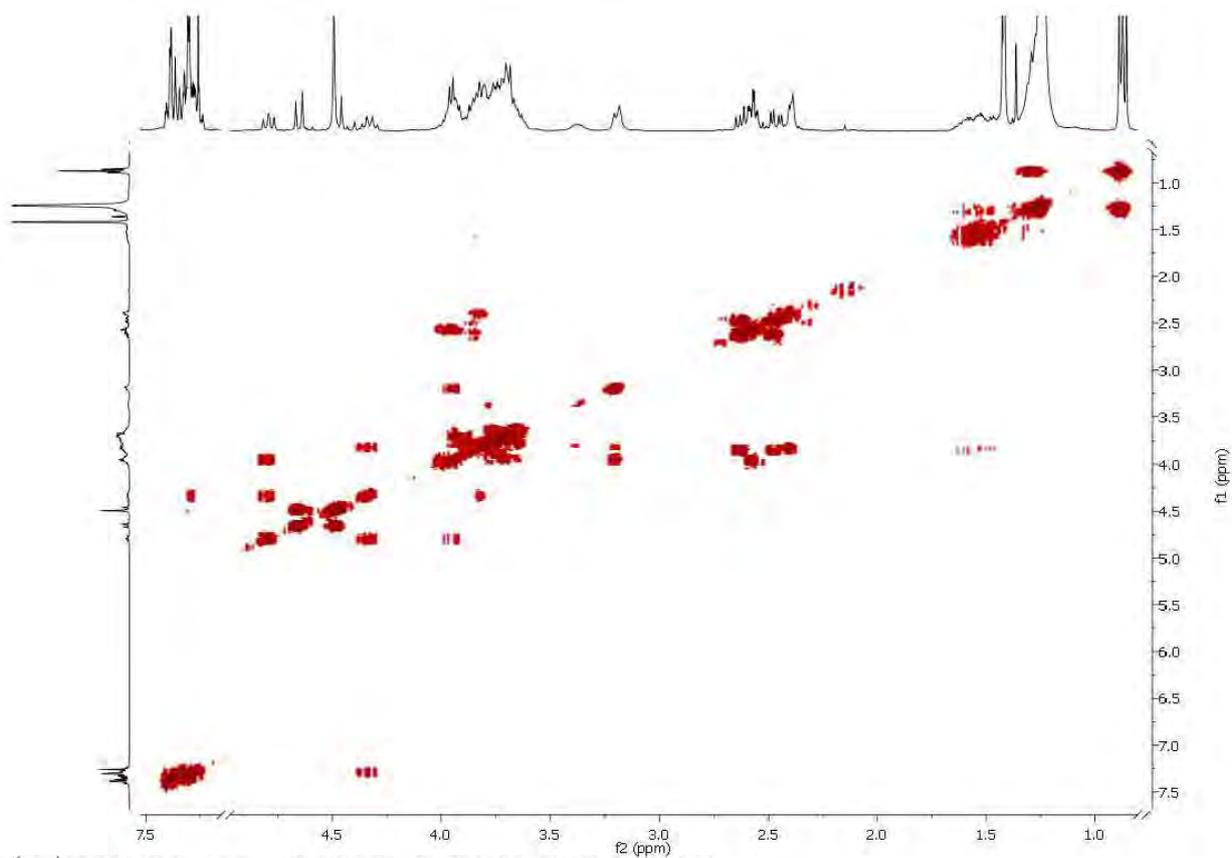
HSQC-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃) der Verbindung 123.



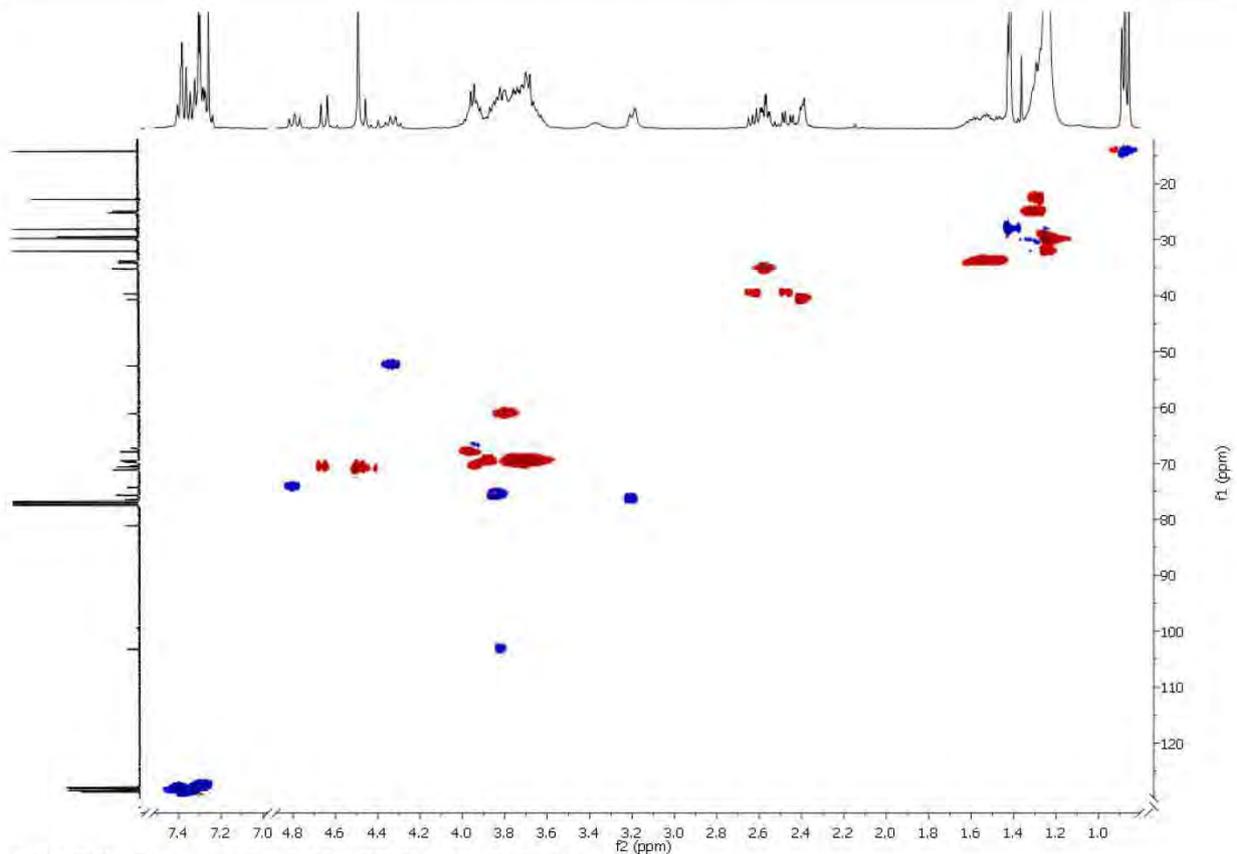
¹H-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der Verbindung 125.



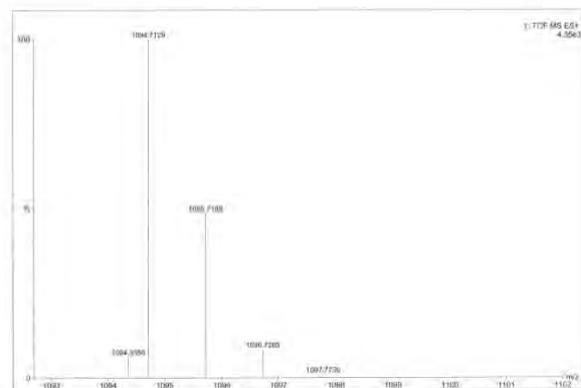
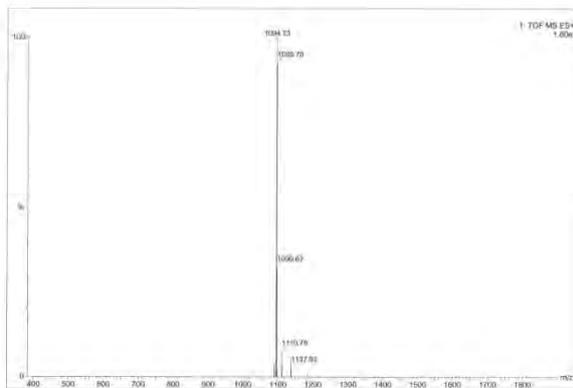
^{13}C -BB-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) der Verbindung 125.



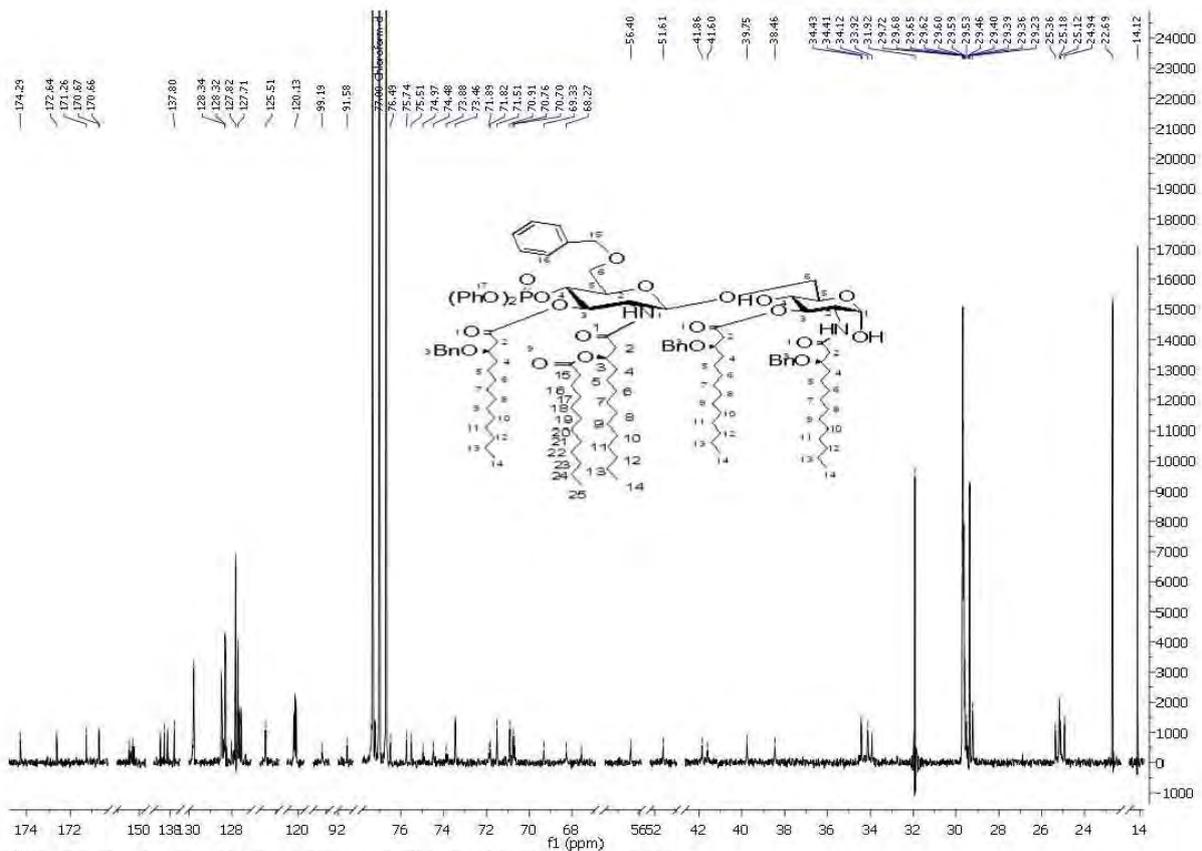
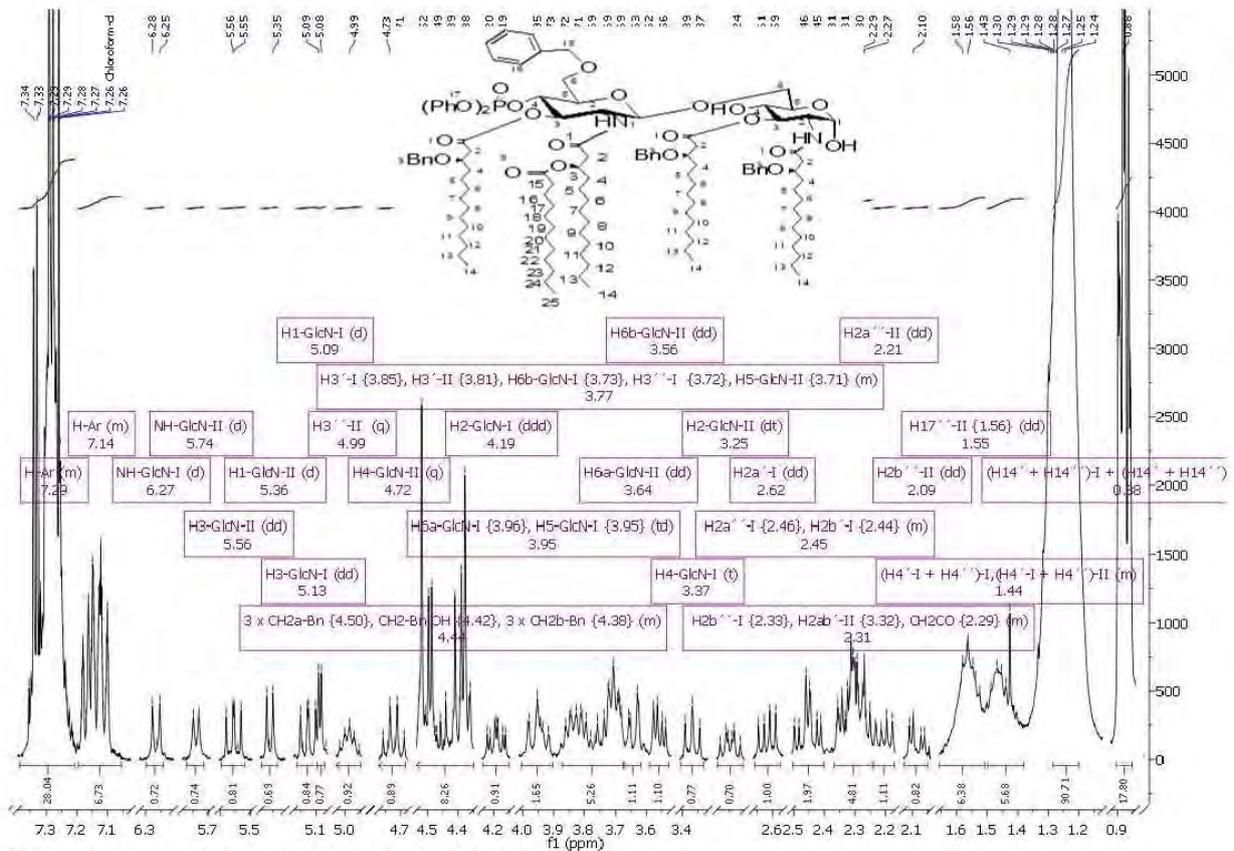
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der Verbindung 125.

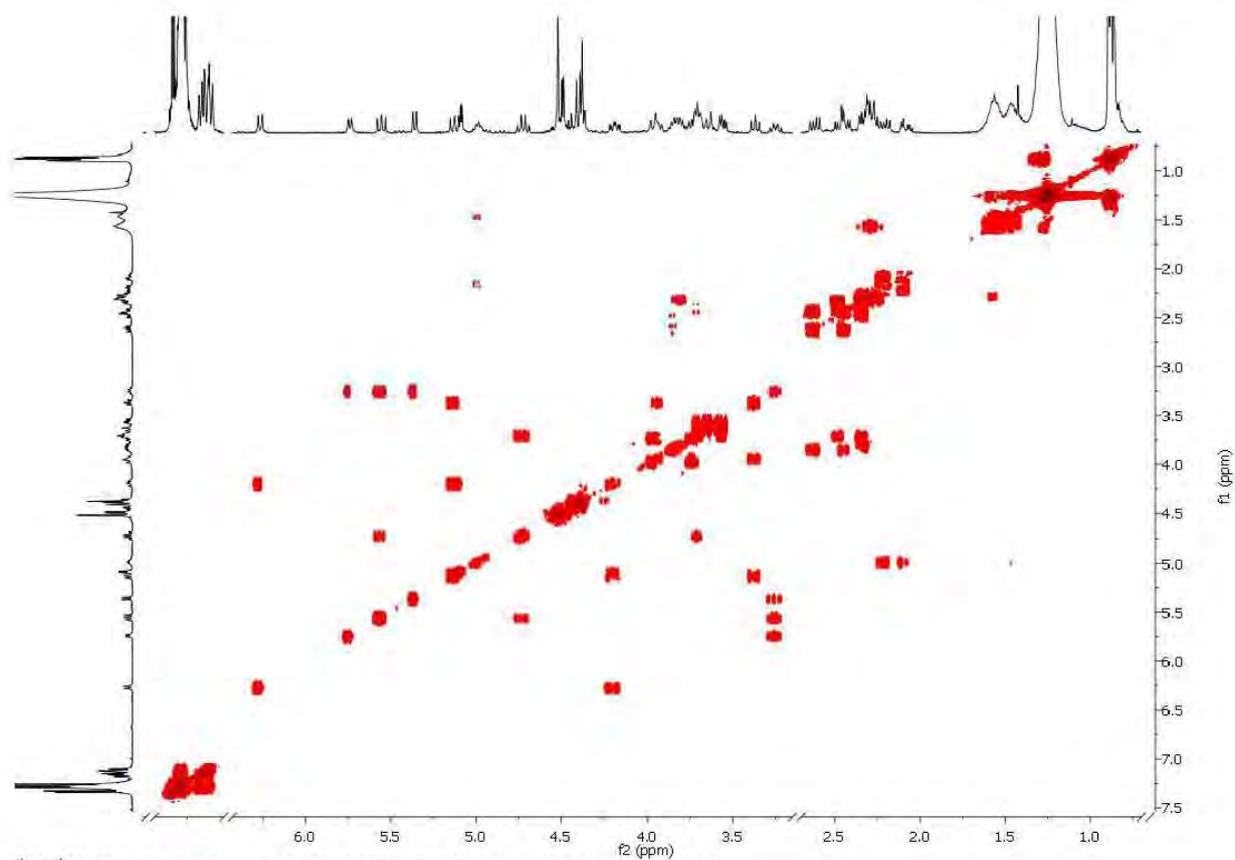


HSQC-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) der Verbindung 125.

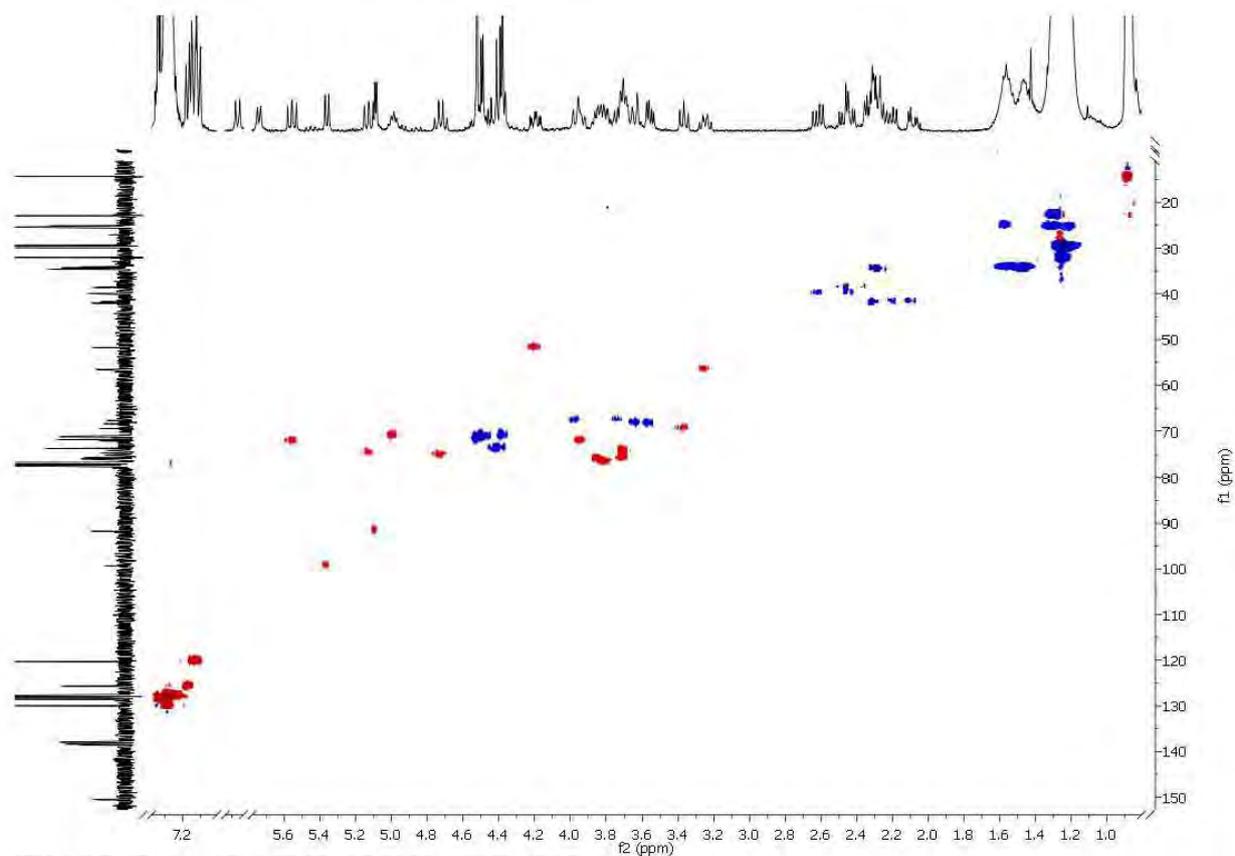


ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 125.

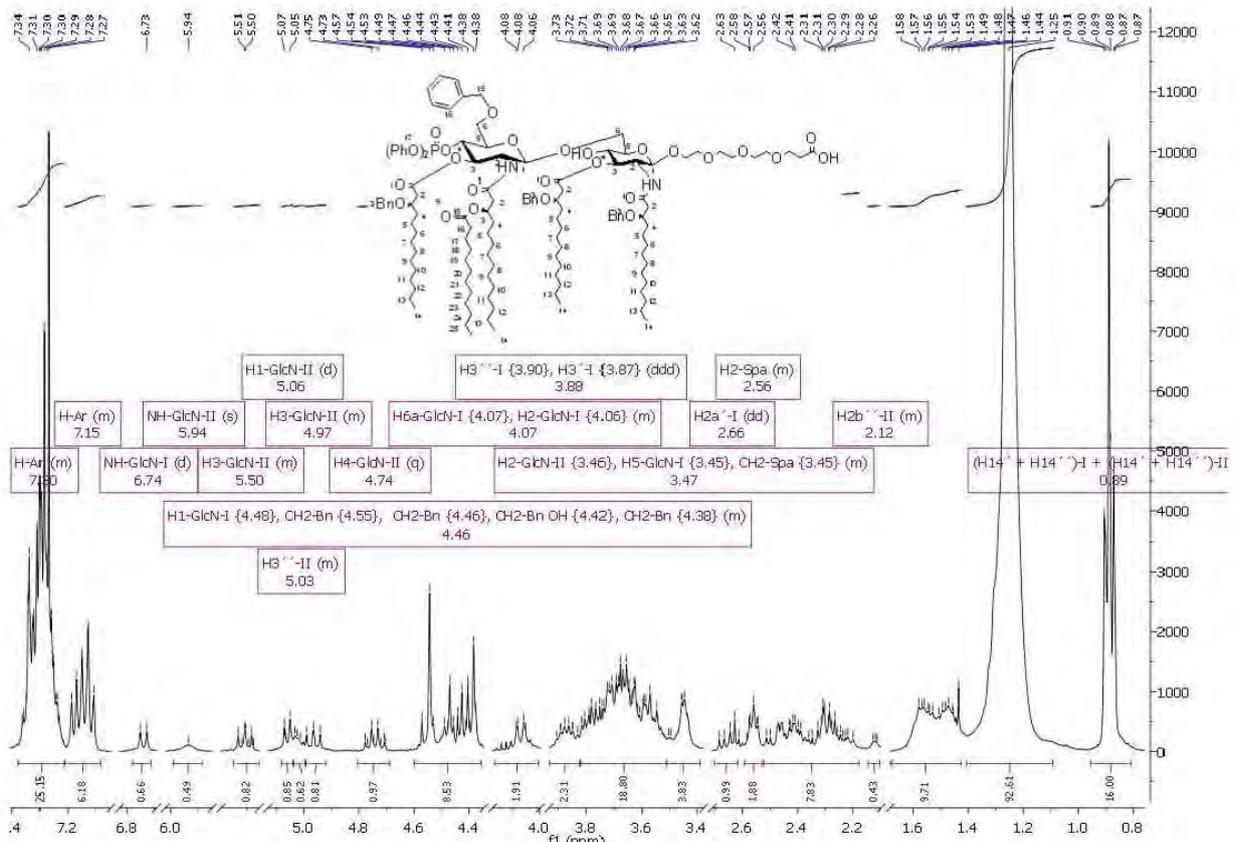




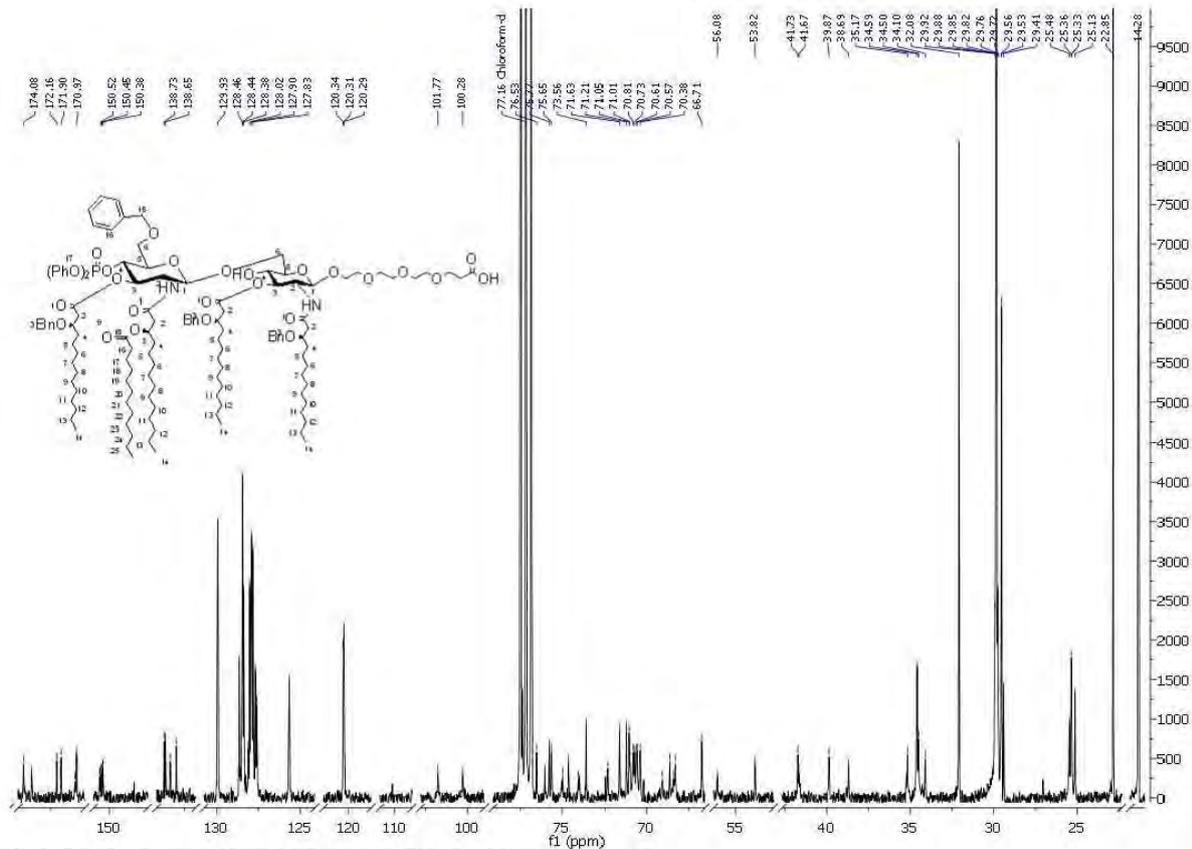
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der Verbindung 130.



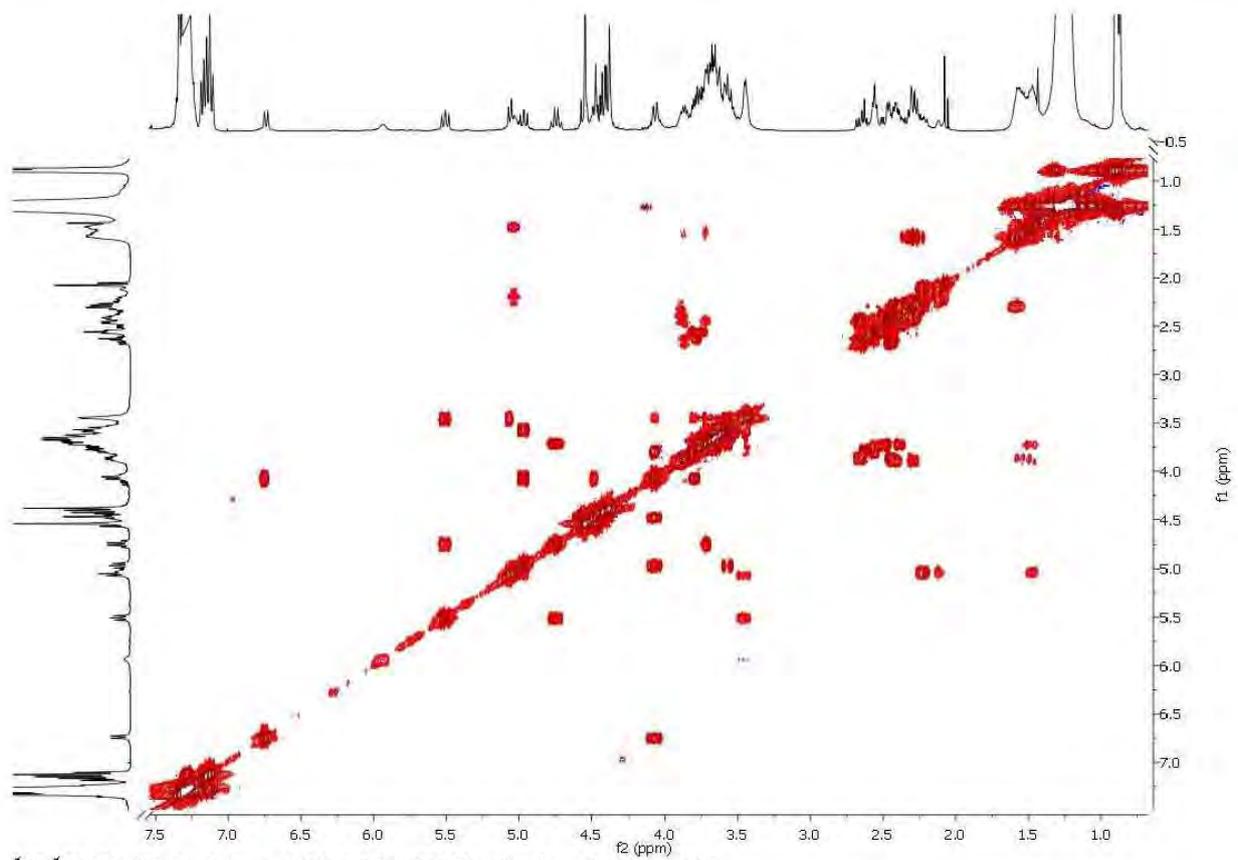
HSQC-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) der Verbindung 130.



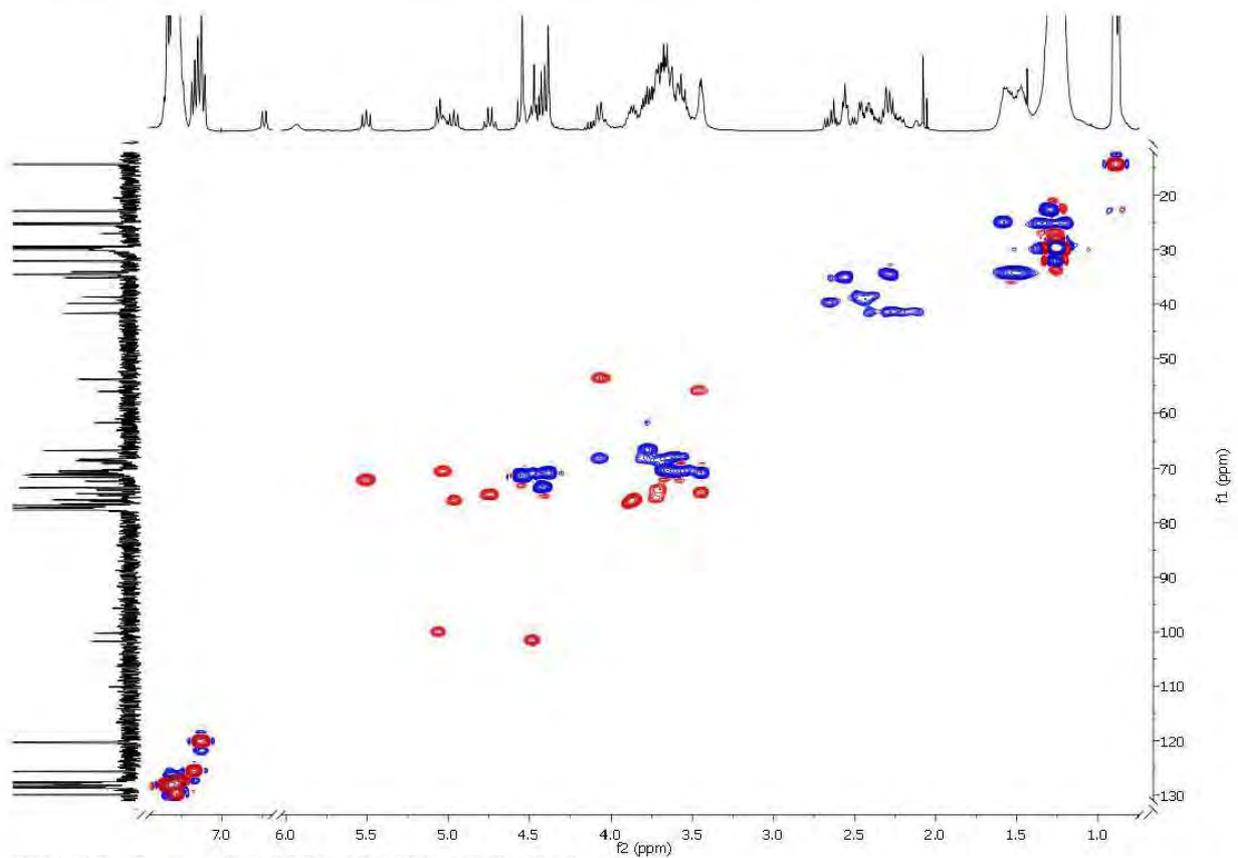
¹H-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der Verbindung 136.



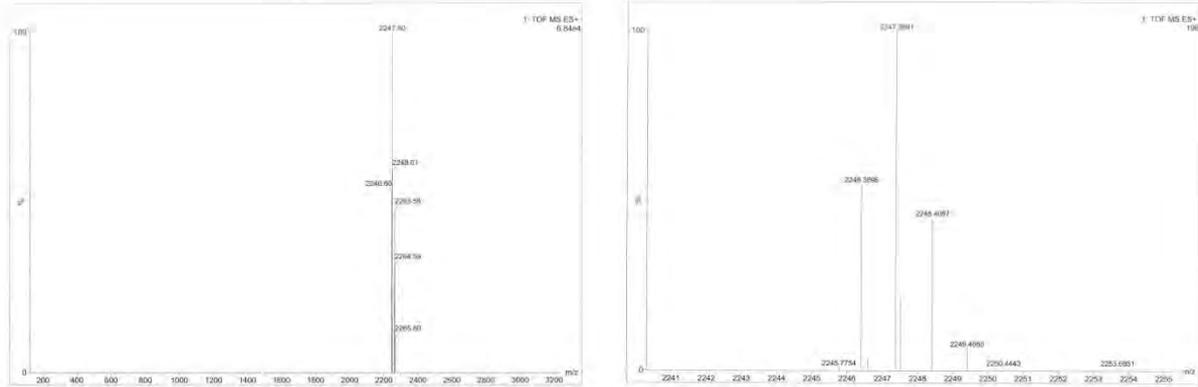
¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃) der Verbindung 136.



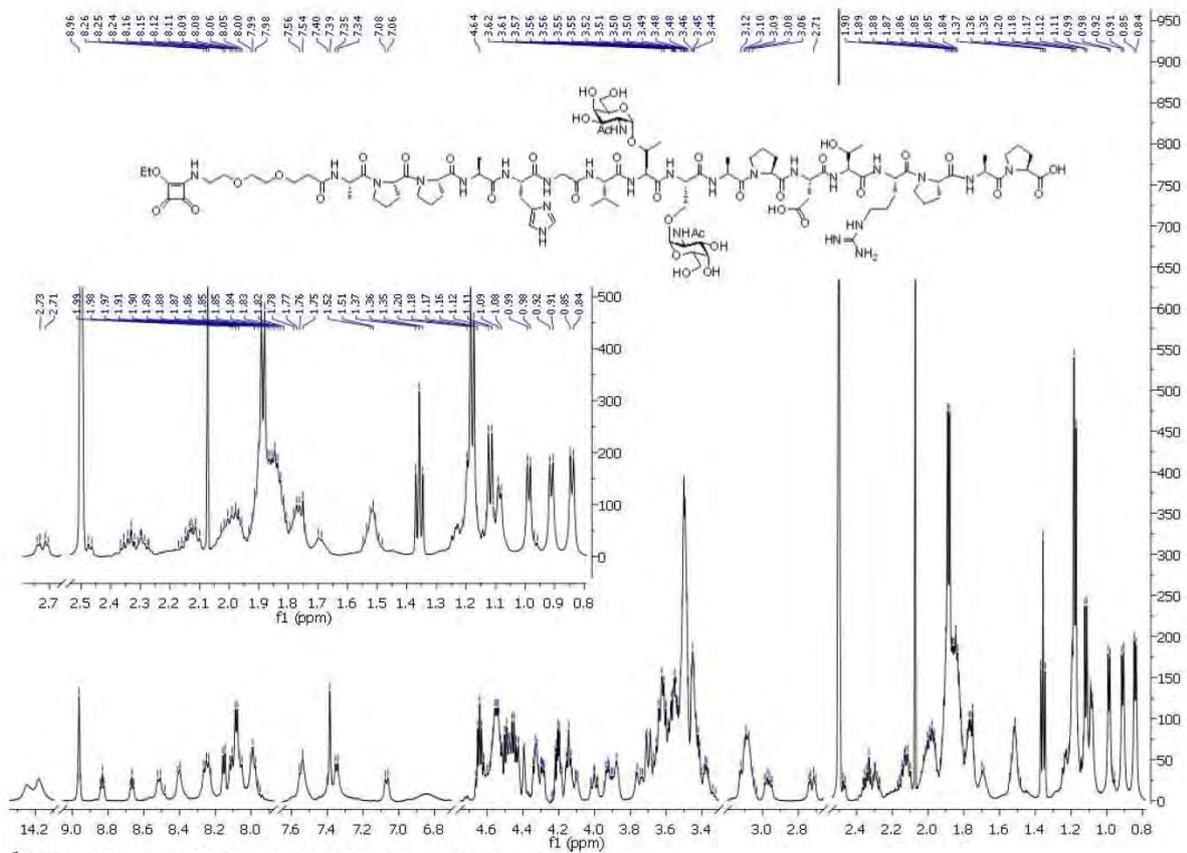
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der Verbindung 136.



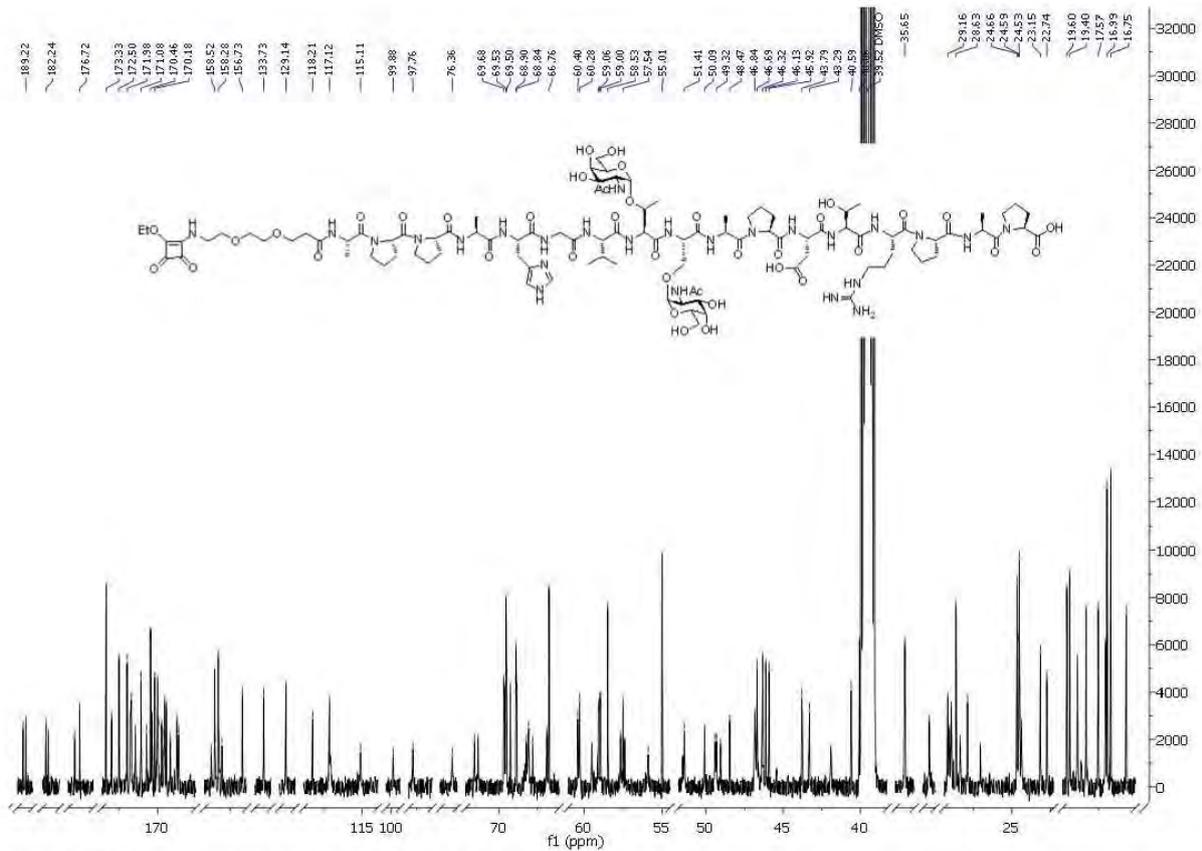
HSQC-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) der Verbindung 136.



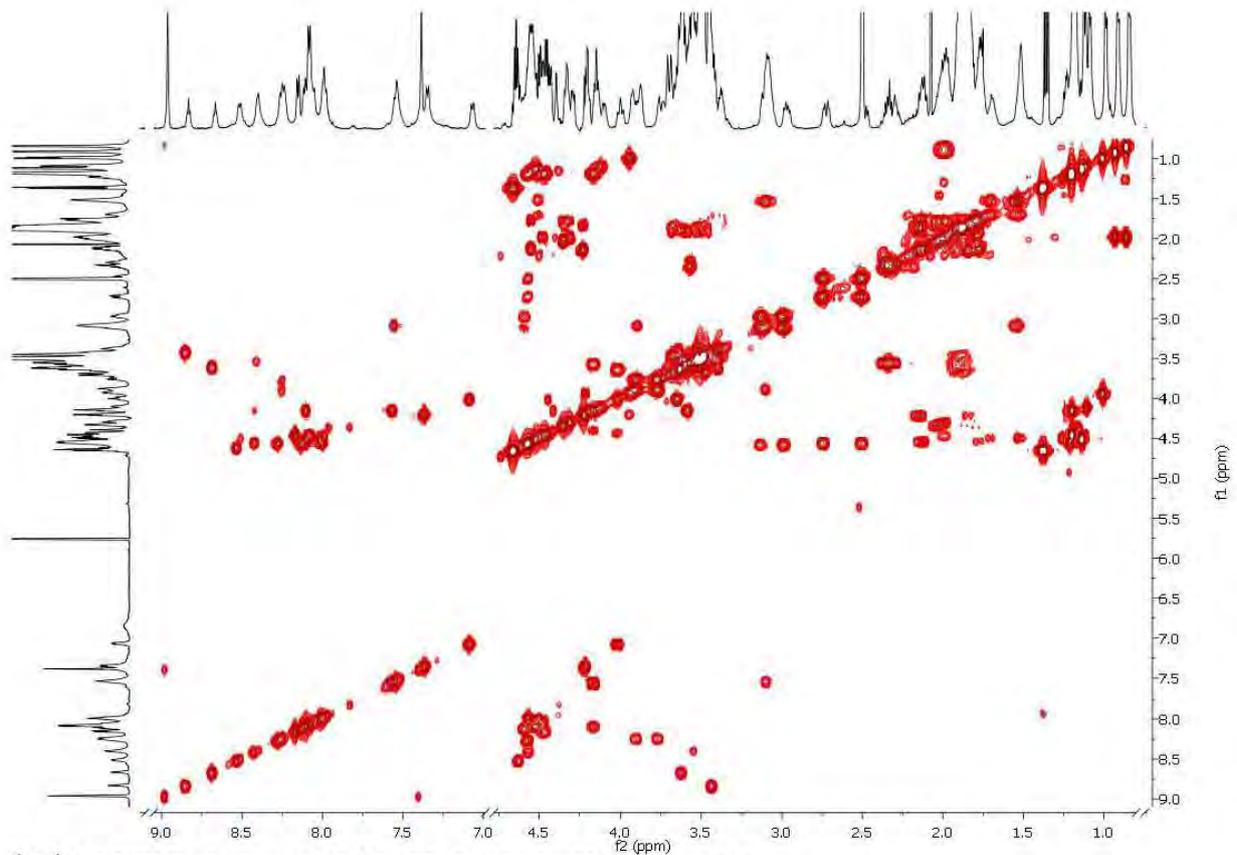
ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 136.



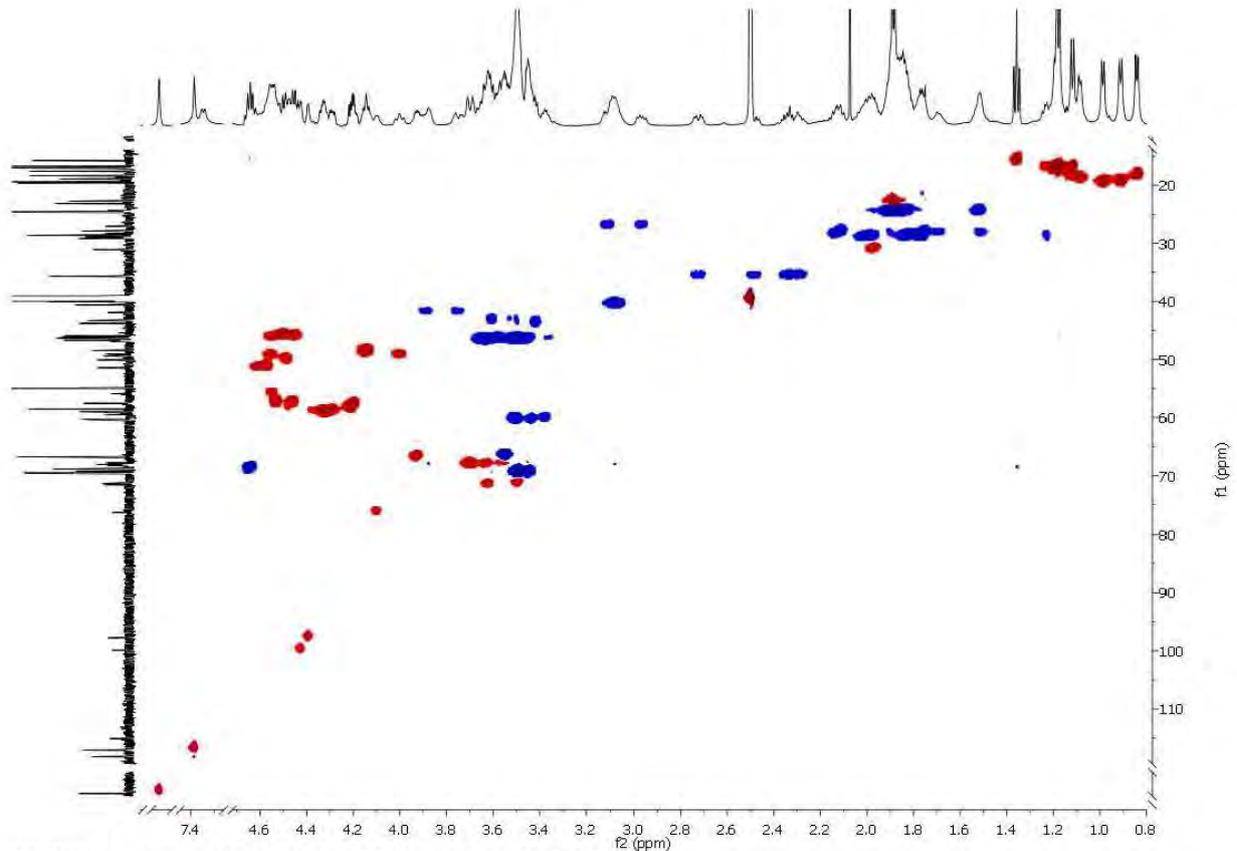
¹H-Spektrum (600 MHz, DMSO-d₆) der Verbindung 212.



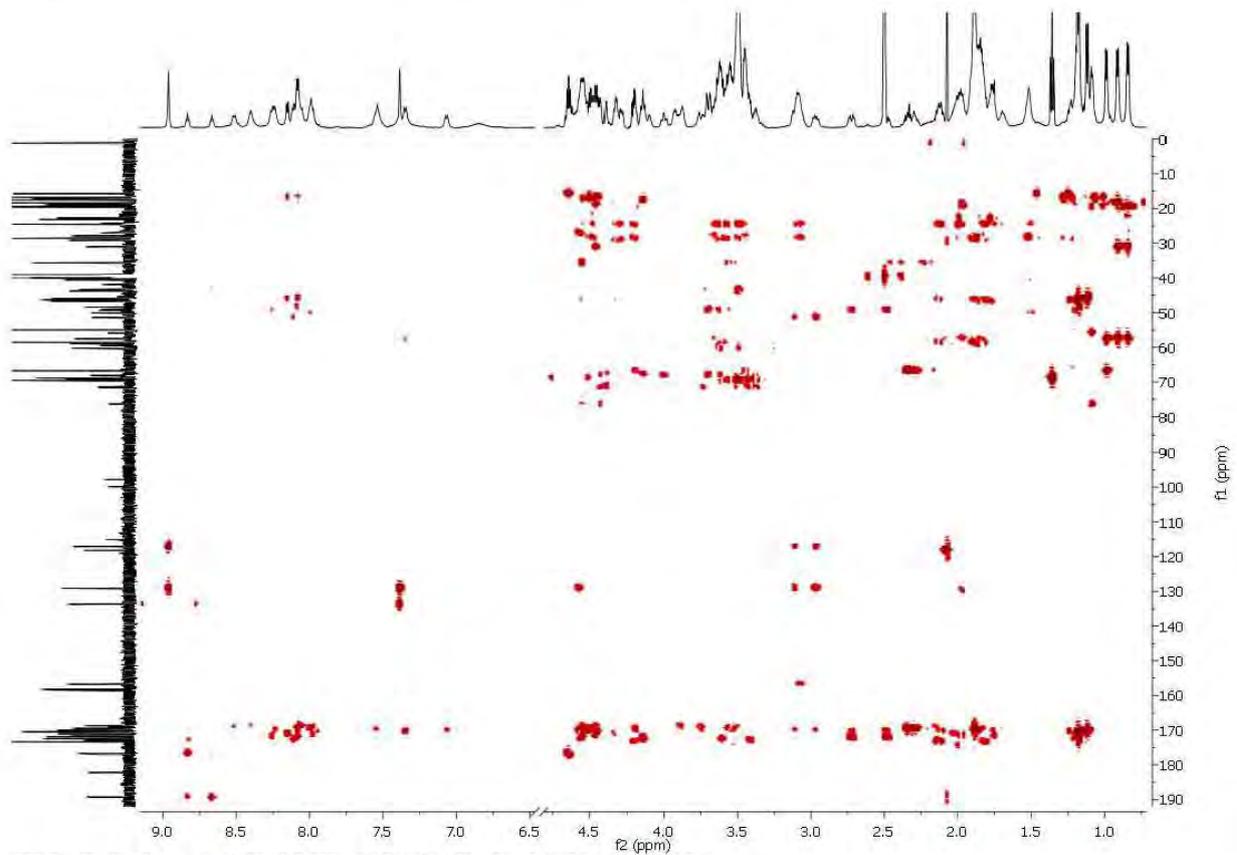
^{13}C -BB-Spektrum (150.9 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) der Verbindung 212.



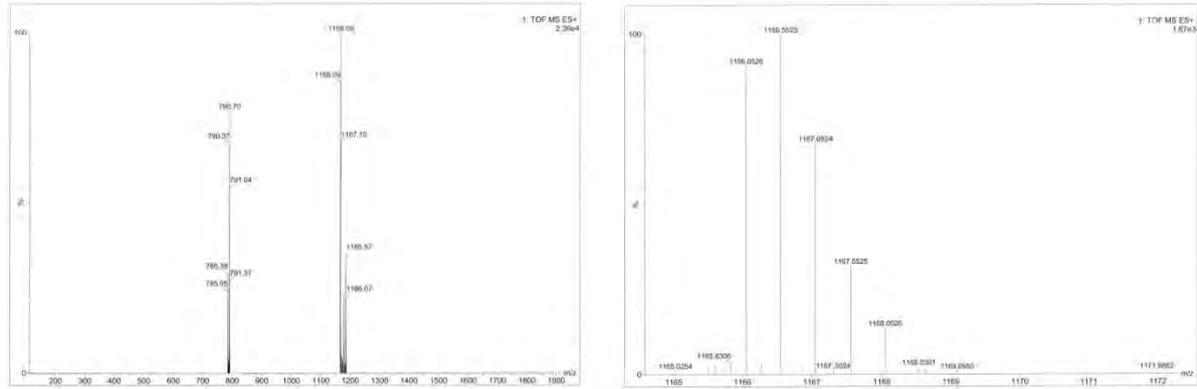
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) der Verbindung 212.



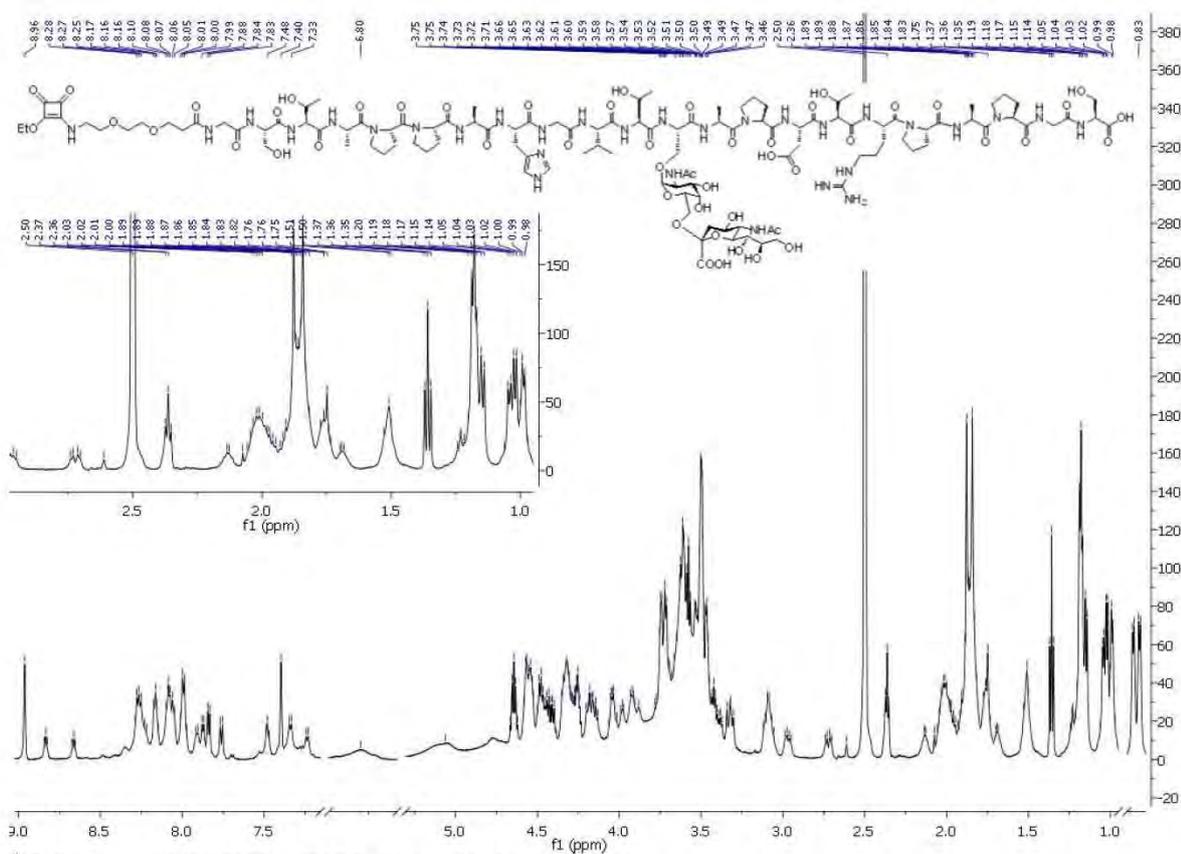
HSQC-Spektrum (150.9 MHz, DMSO- d_6) der Verbindung 212.



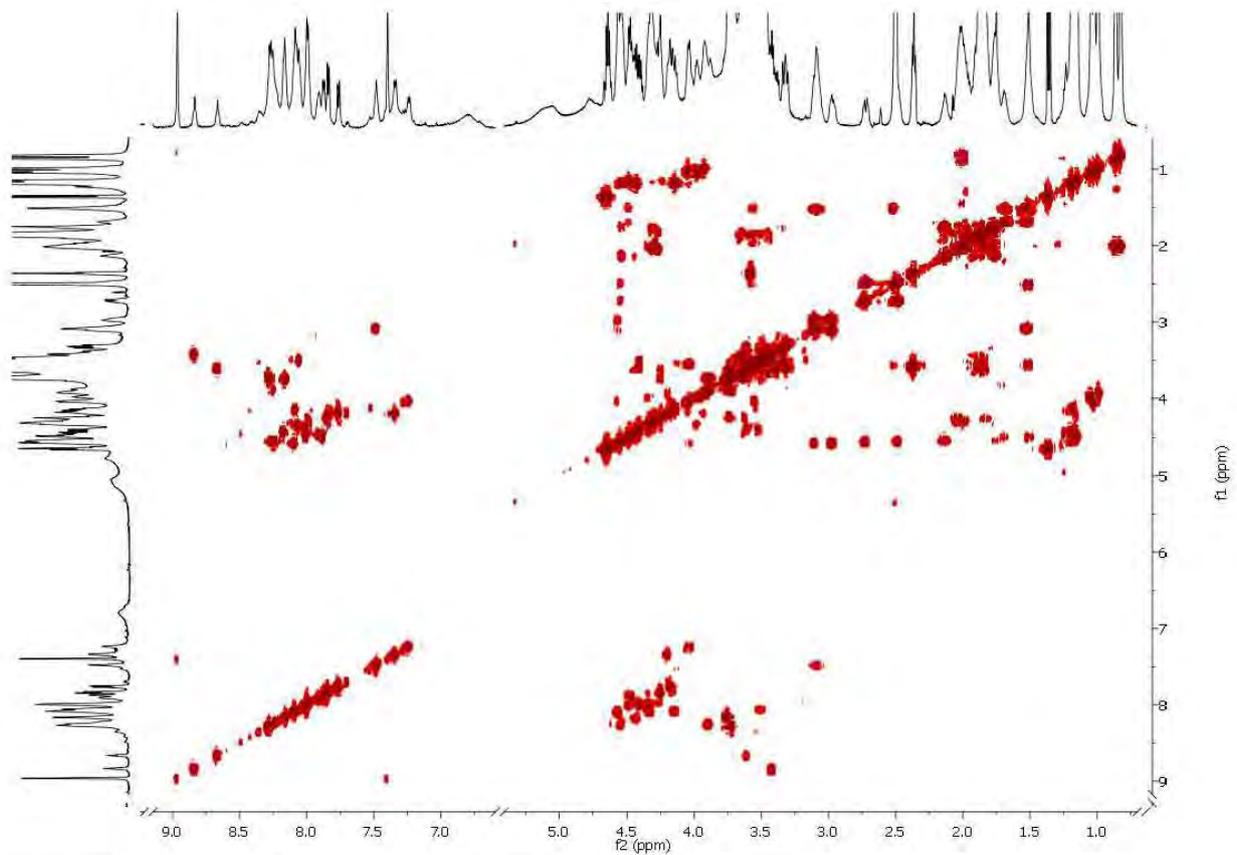
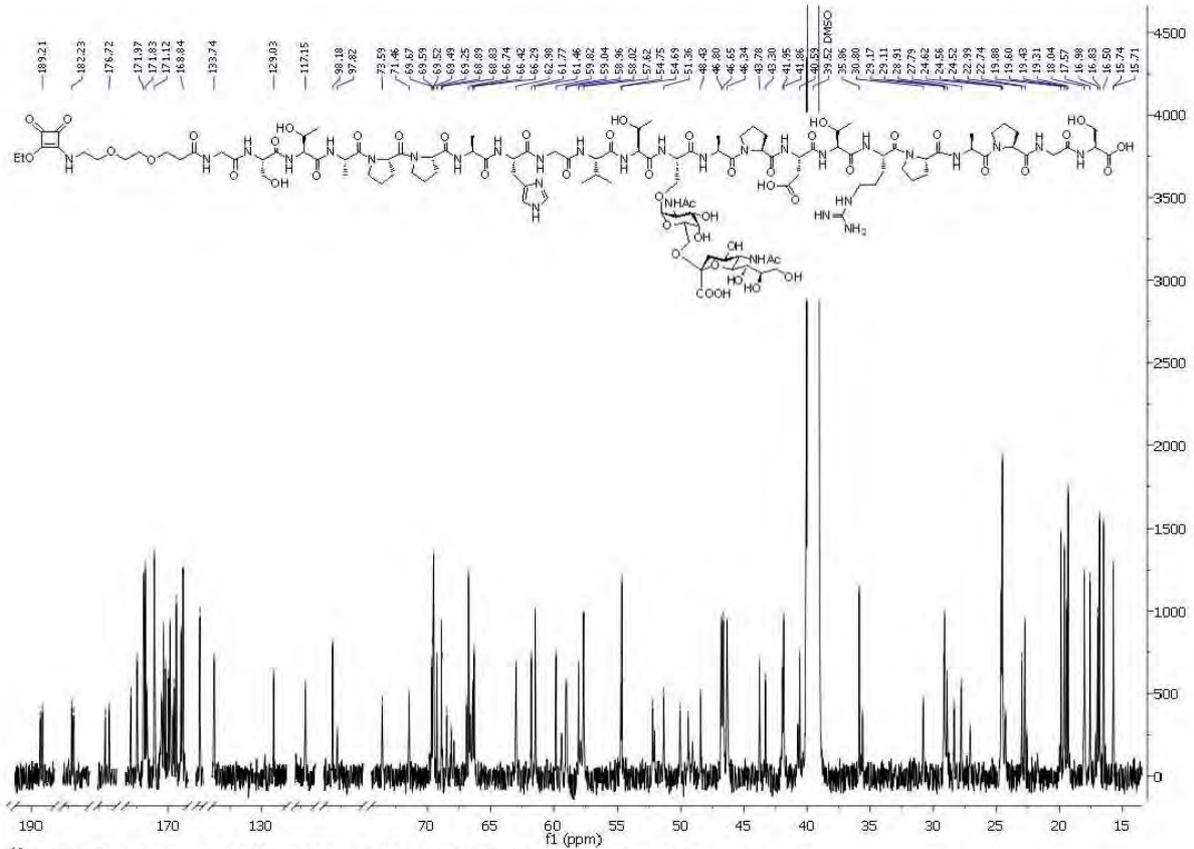
HMBC-Spektrum (150.9 MHz, DMSO- d_6) der Verbindung 212.

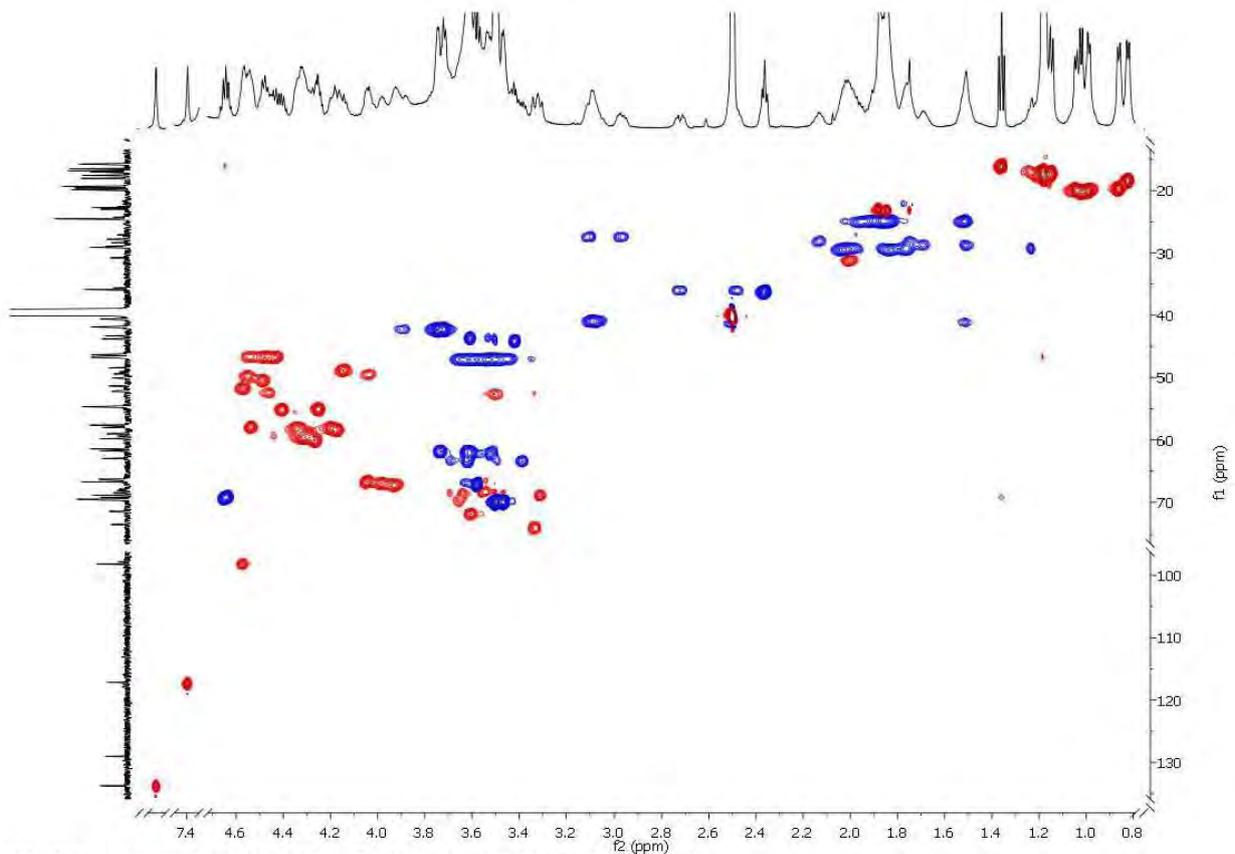


ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 212.

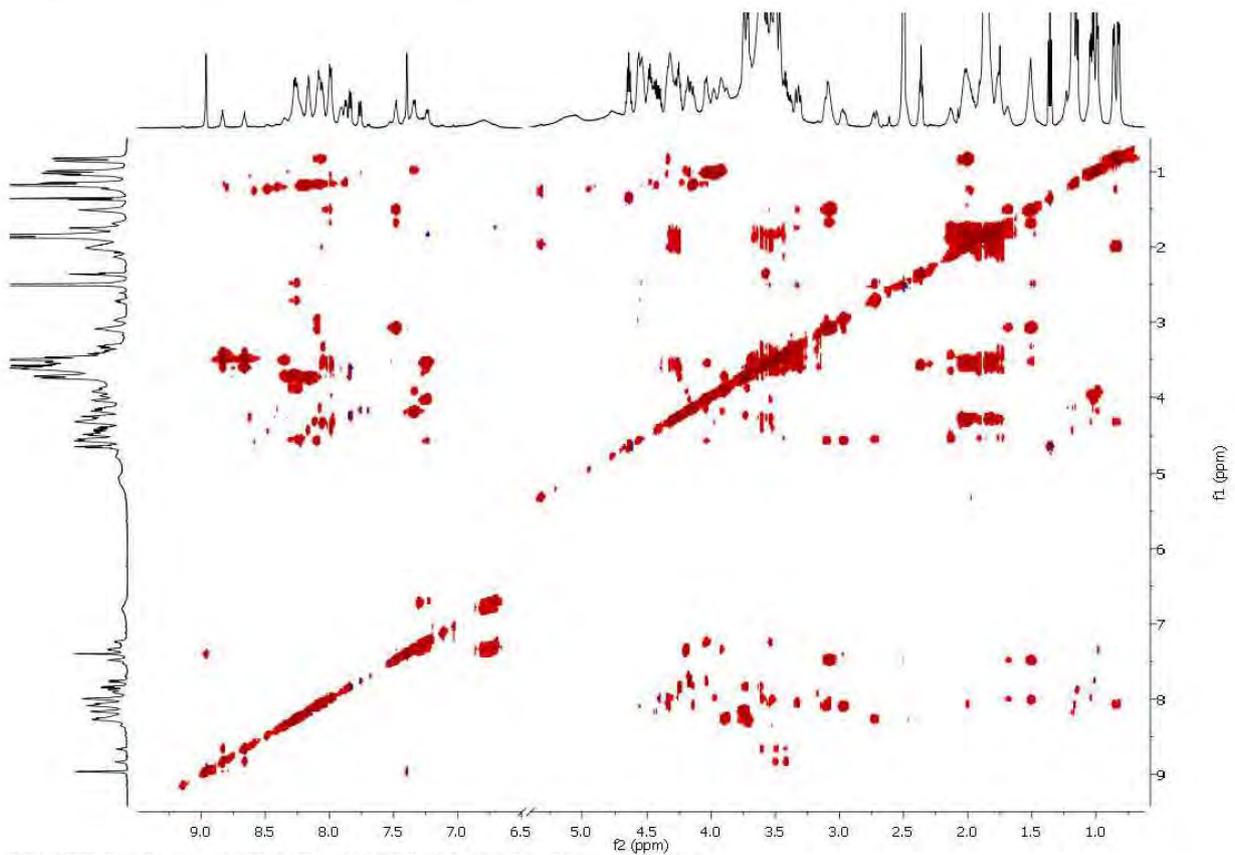


¹H-Spektrum (600 MHz, DMSO-d₆) der Verbindung 218.

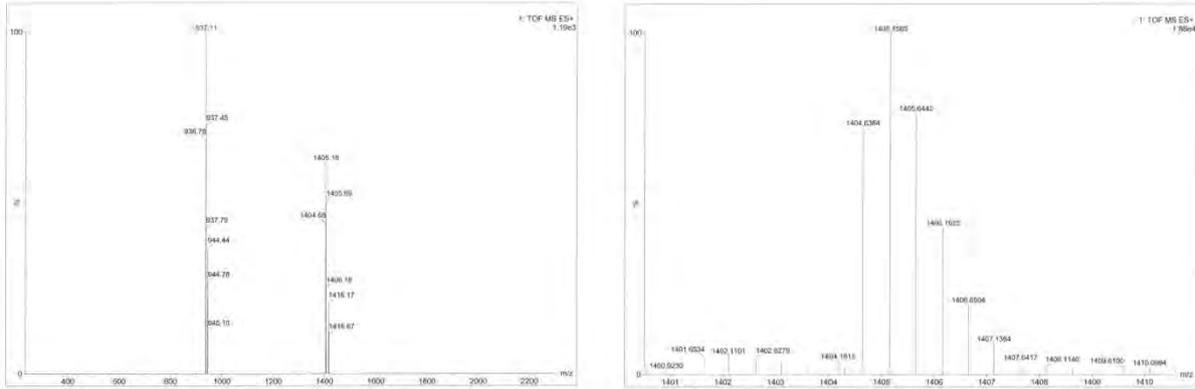




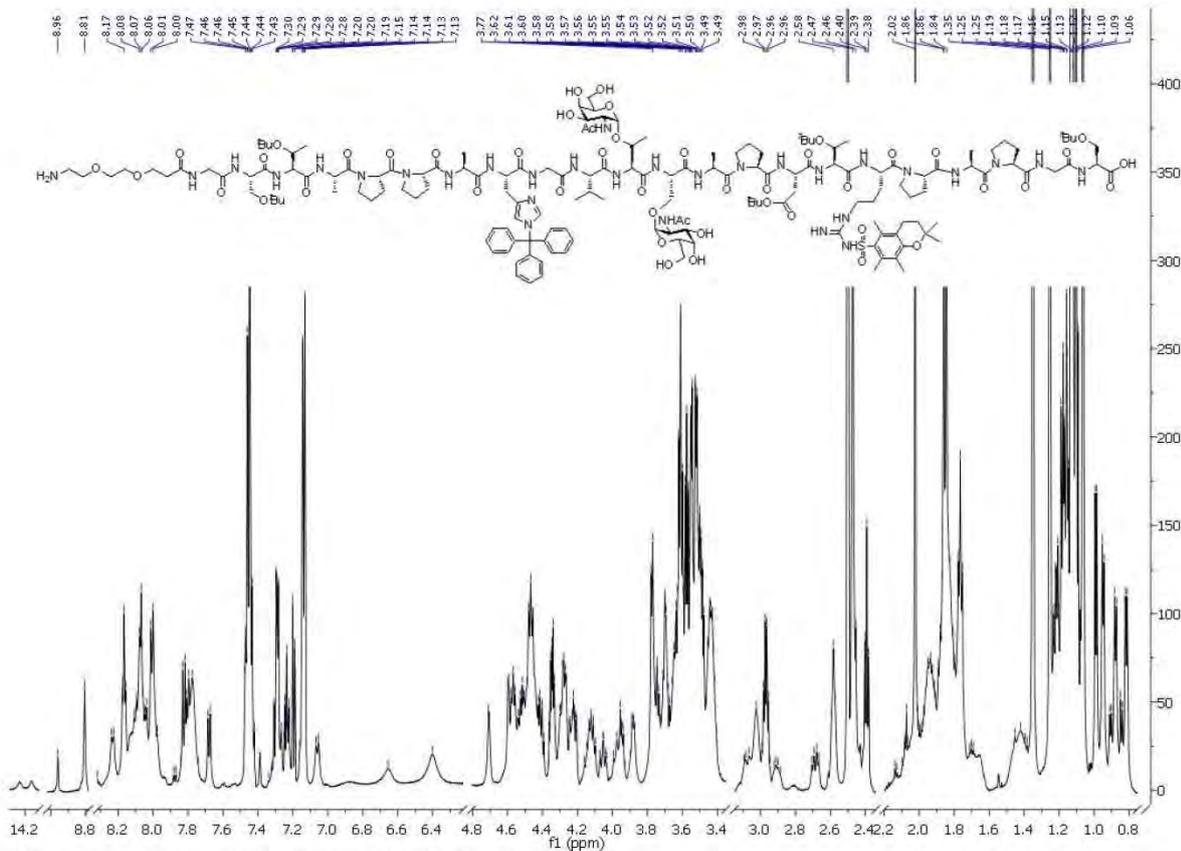
HSQC-Spektrum (150.9 MHz, DMSO- d_6) der Verbindung 218.



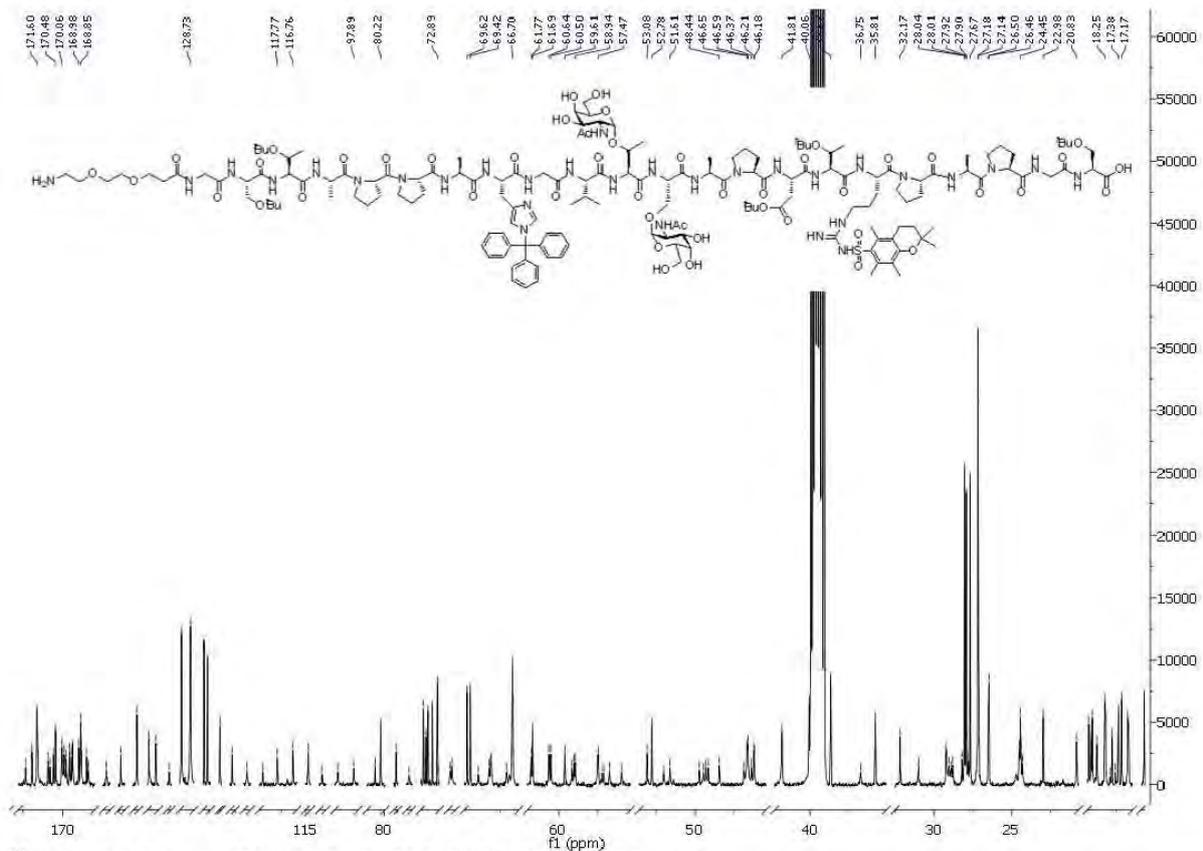
TOCSY-Spektrum (600 MHz, DMSO- d_6) der Verbindung 218.



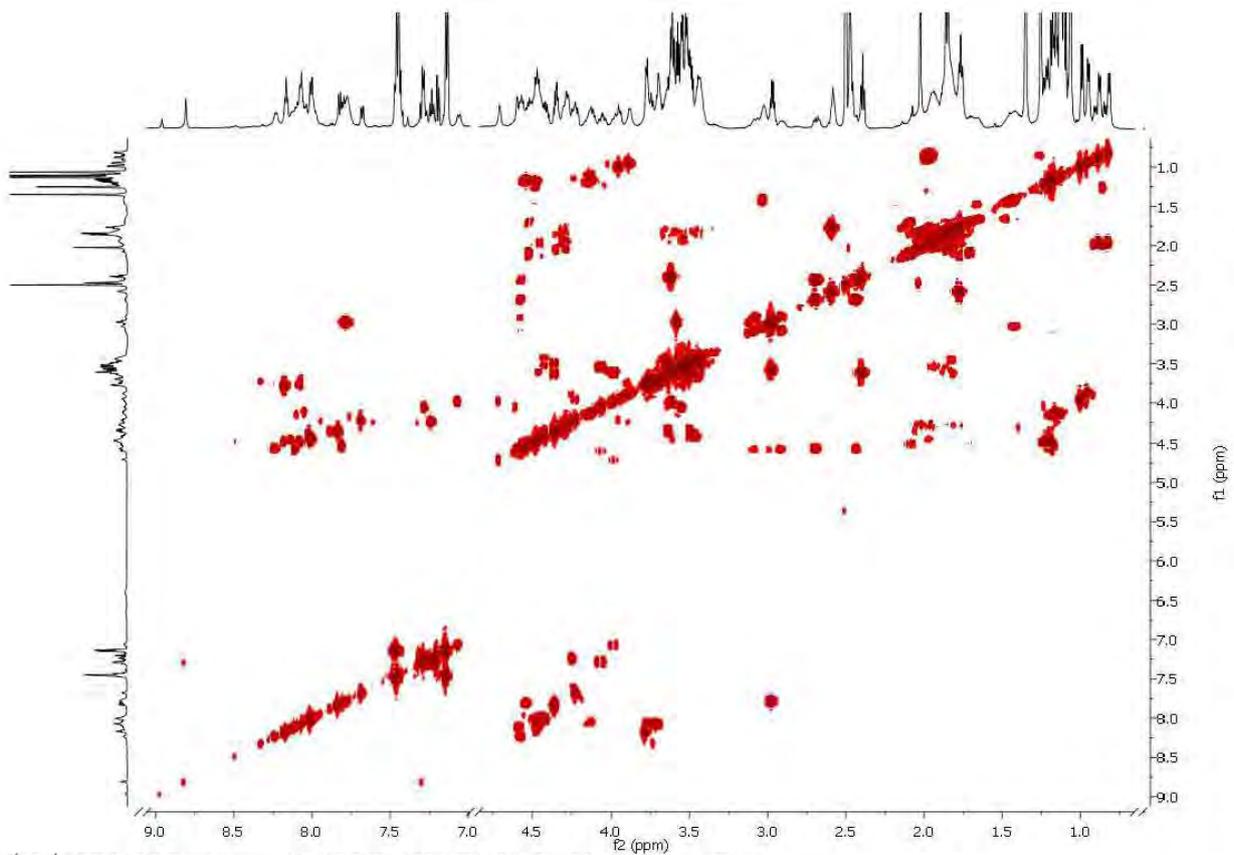
ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 218.



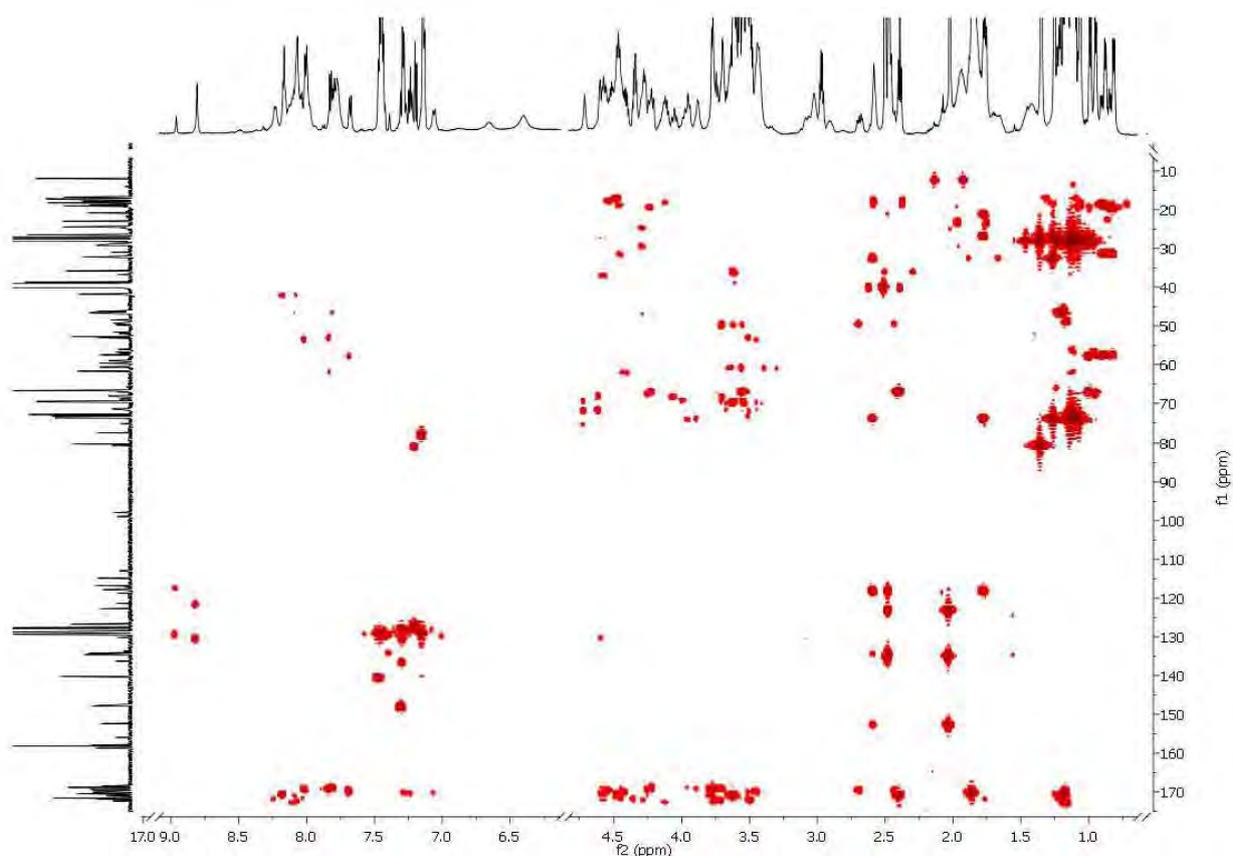
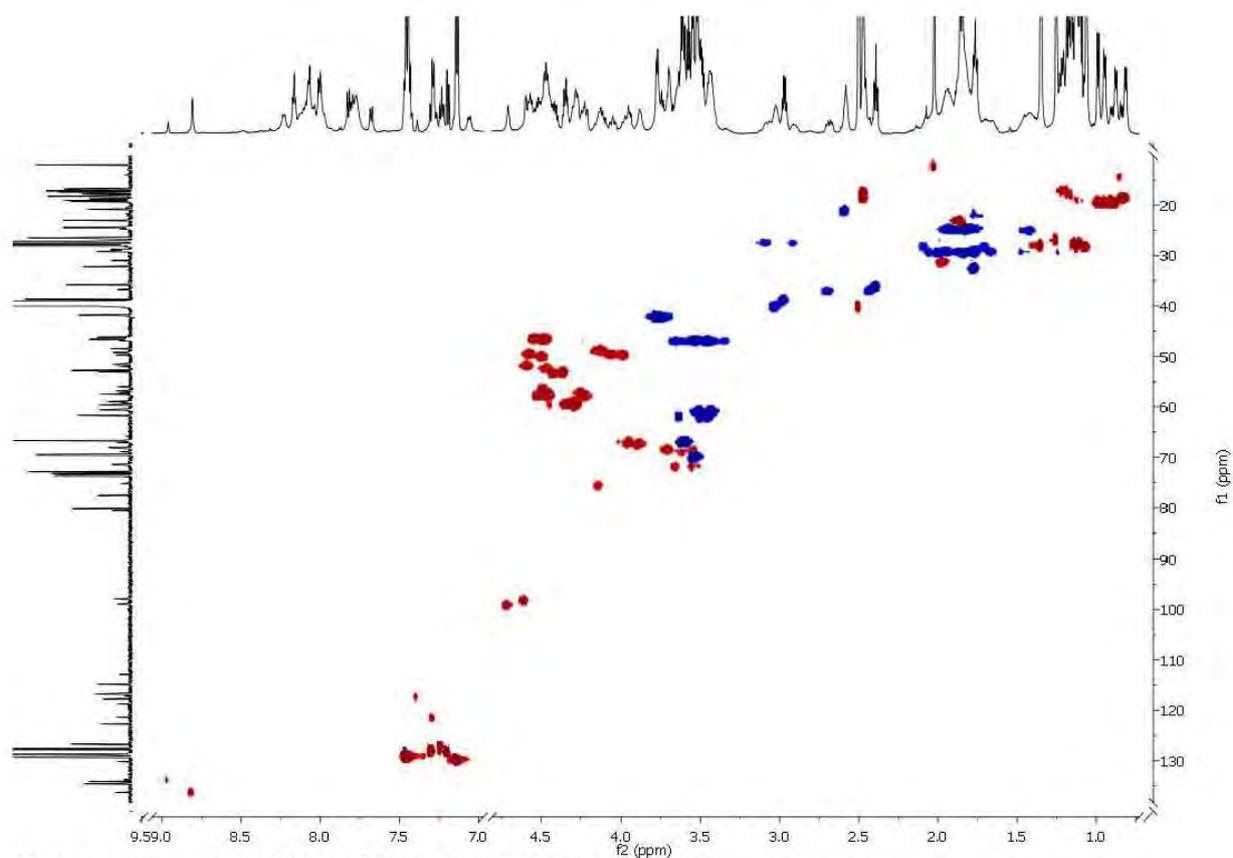
¹H-Spektrum (600 MHz, DMSO-d₆) der Verbindung 156.

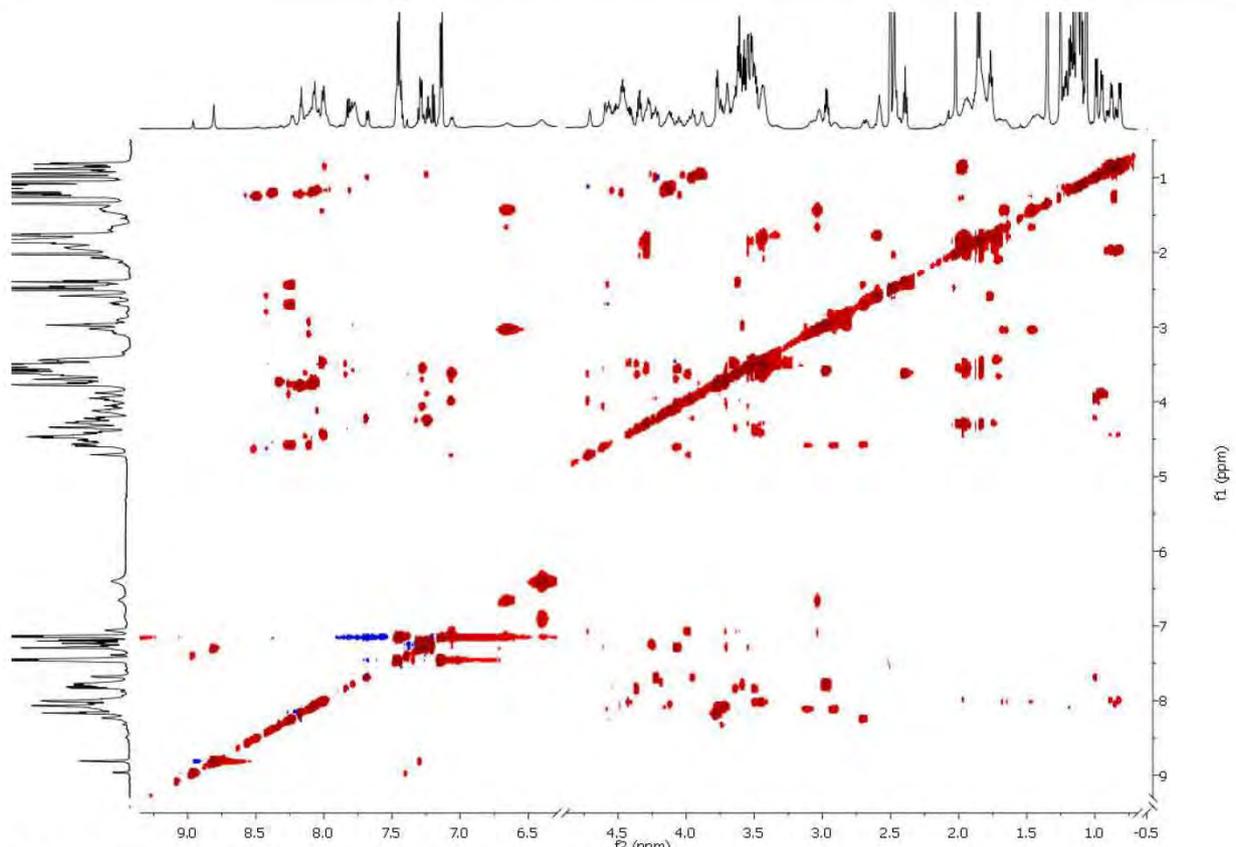


^{13}C -BB-Spektrum (150.9 MHz, DMSO-d_6) der Verbindung 156.

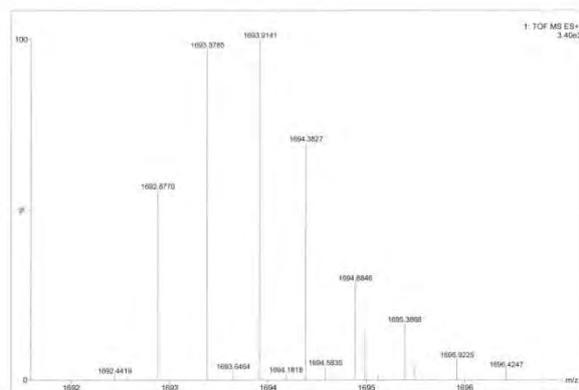
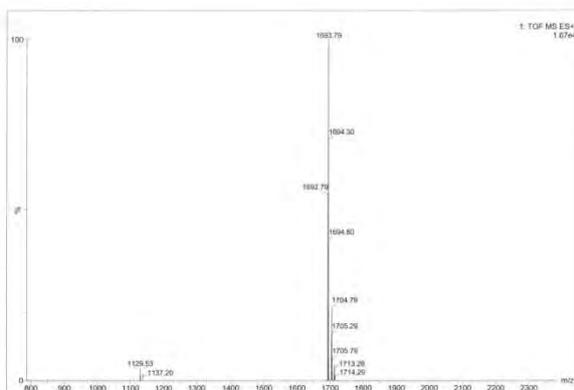


^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, DMSO-d_6) der Verbindung 156.

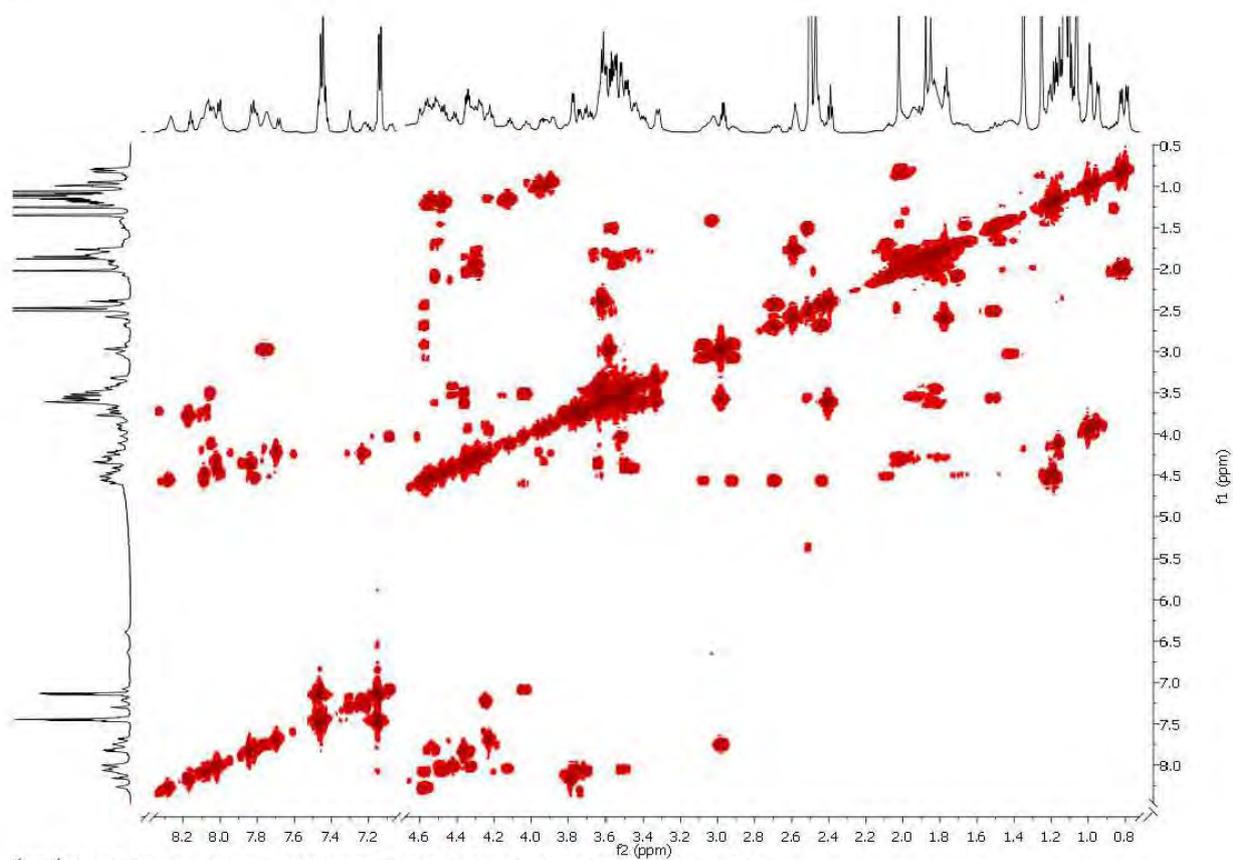




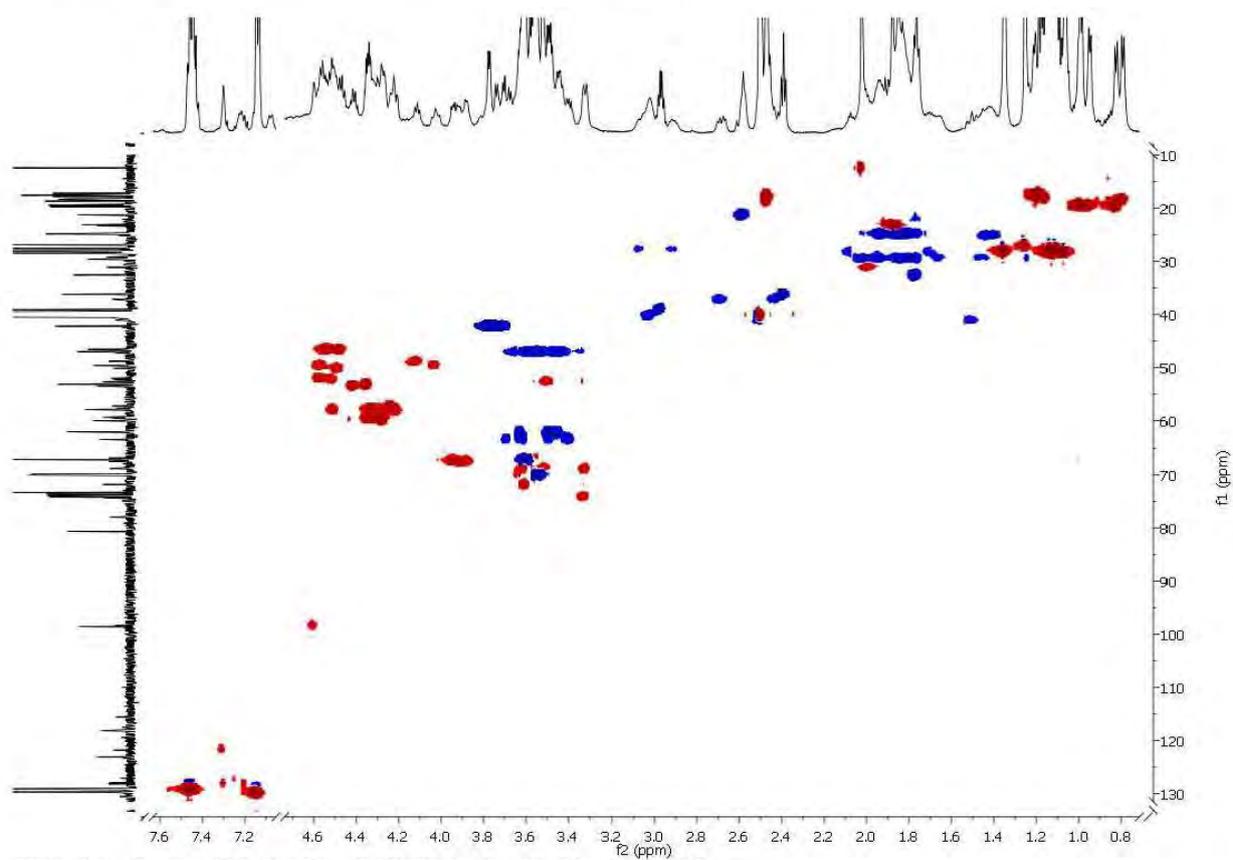
TOCSY-Spektrum (600 MHz, DMSO-d₆) der Verbindung 156.



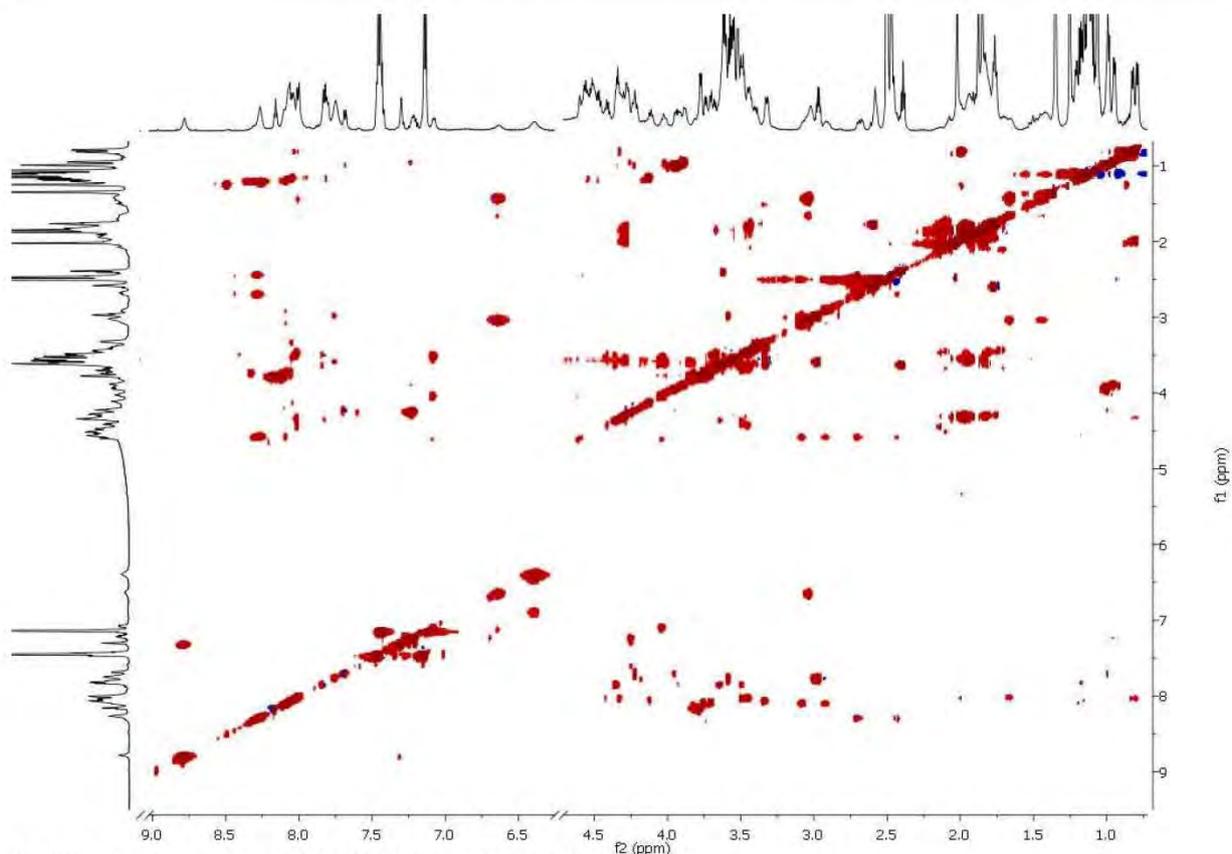
ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 156.



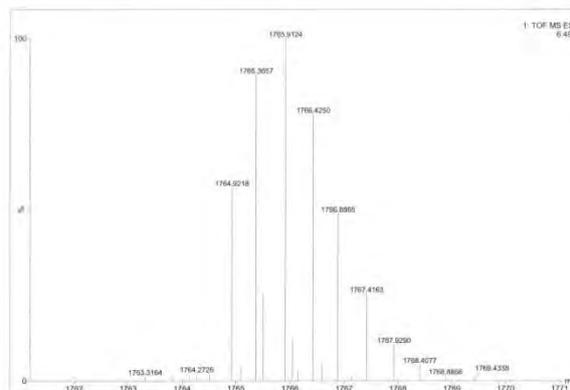
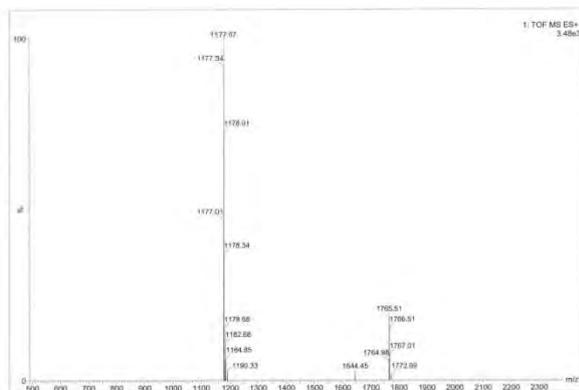
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, DMSO-d_6) der Verbindung 157.



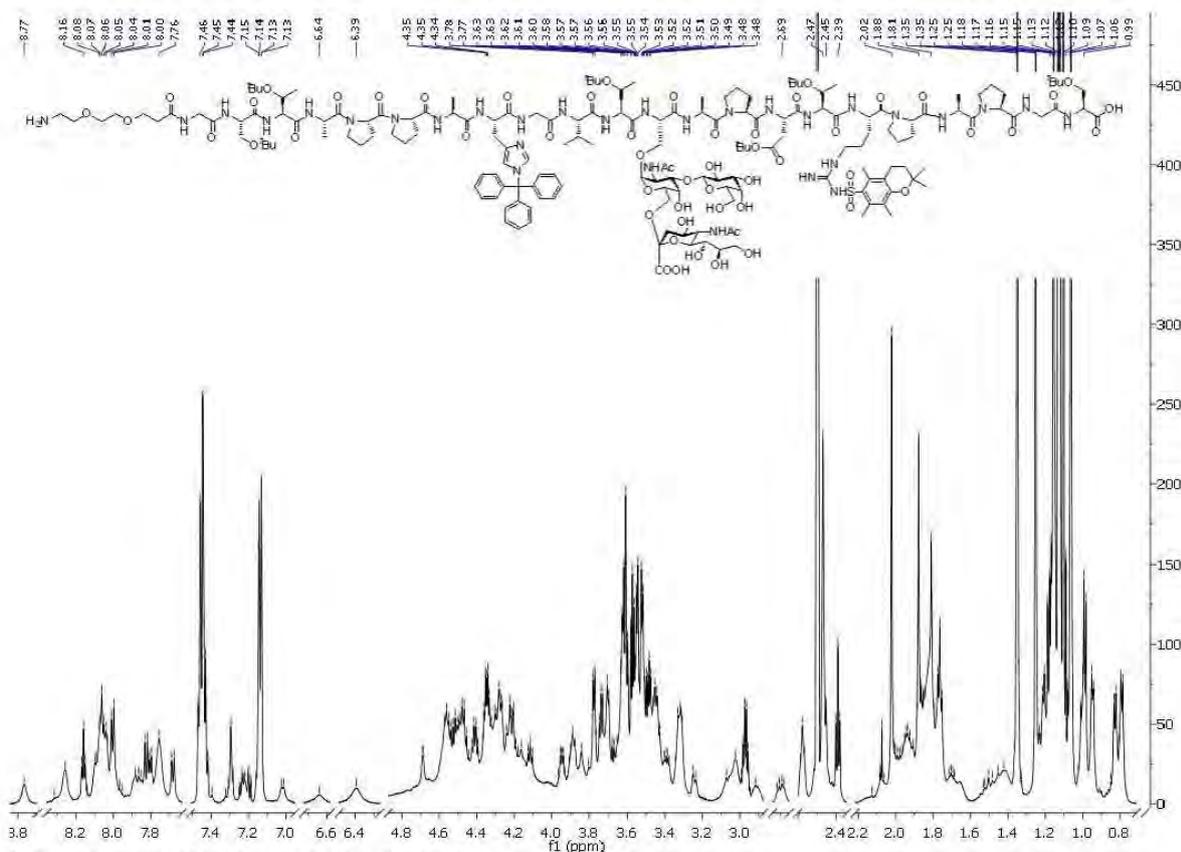
HSQC-Spektrum (150.9 MHz, DMSO-d_6) der Verbindung 157.



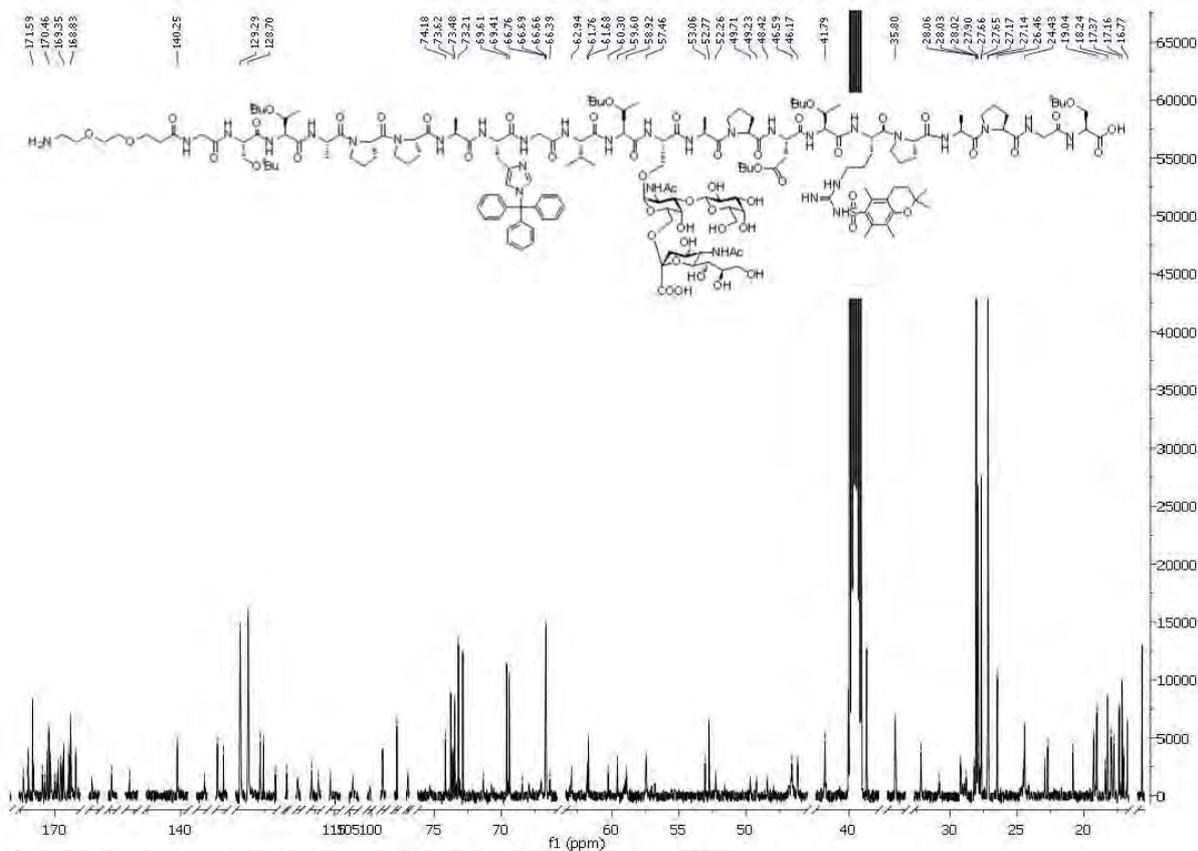
TOCSY-Spektrum (600 MHz, DMSO-d₆) der Verbindung 157.



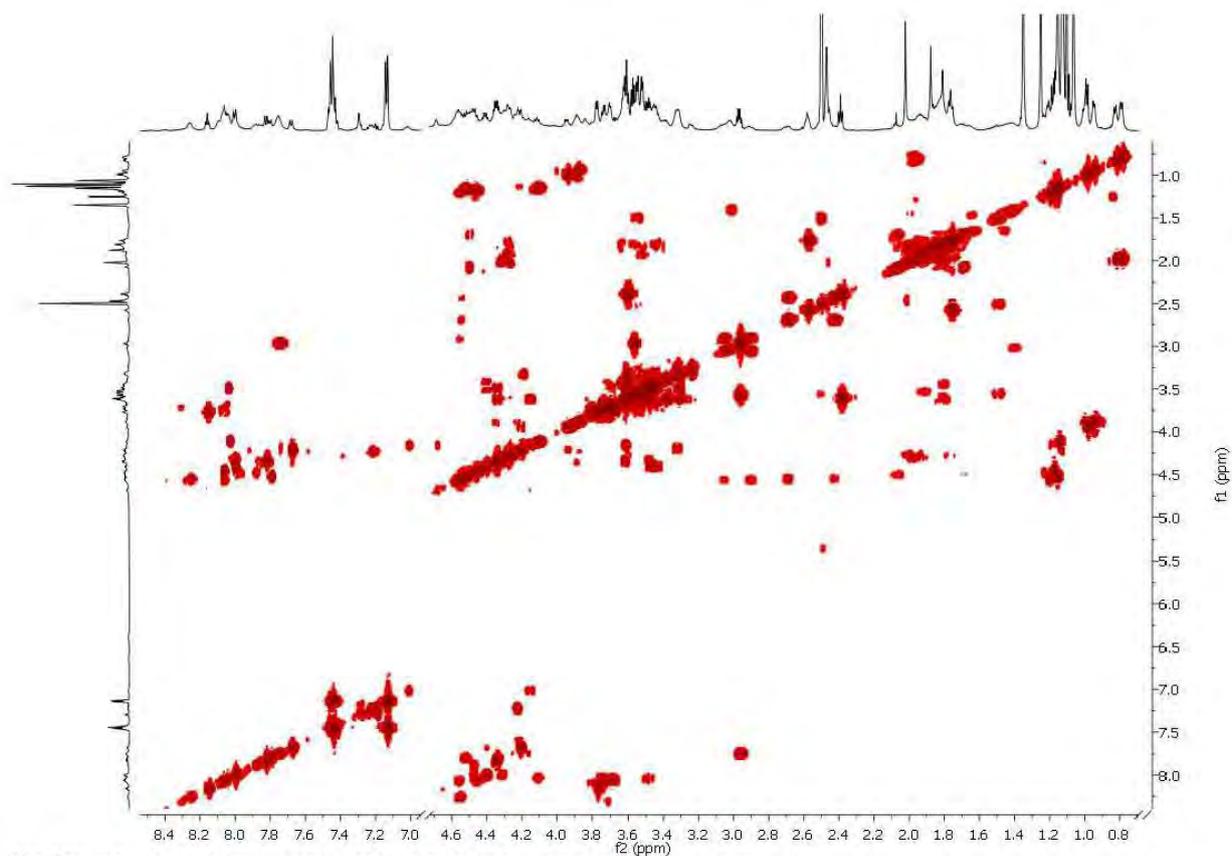
ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 157.



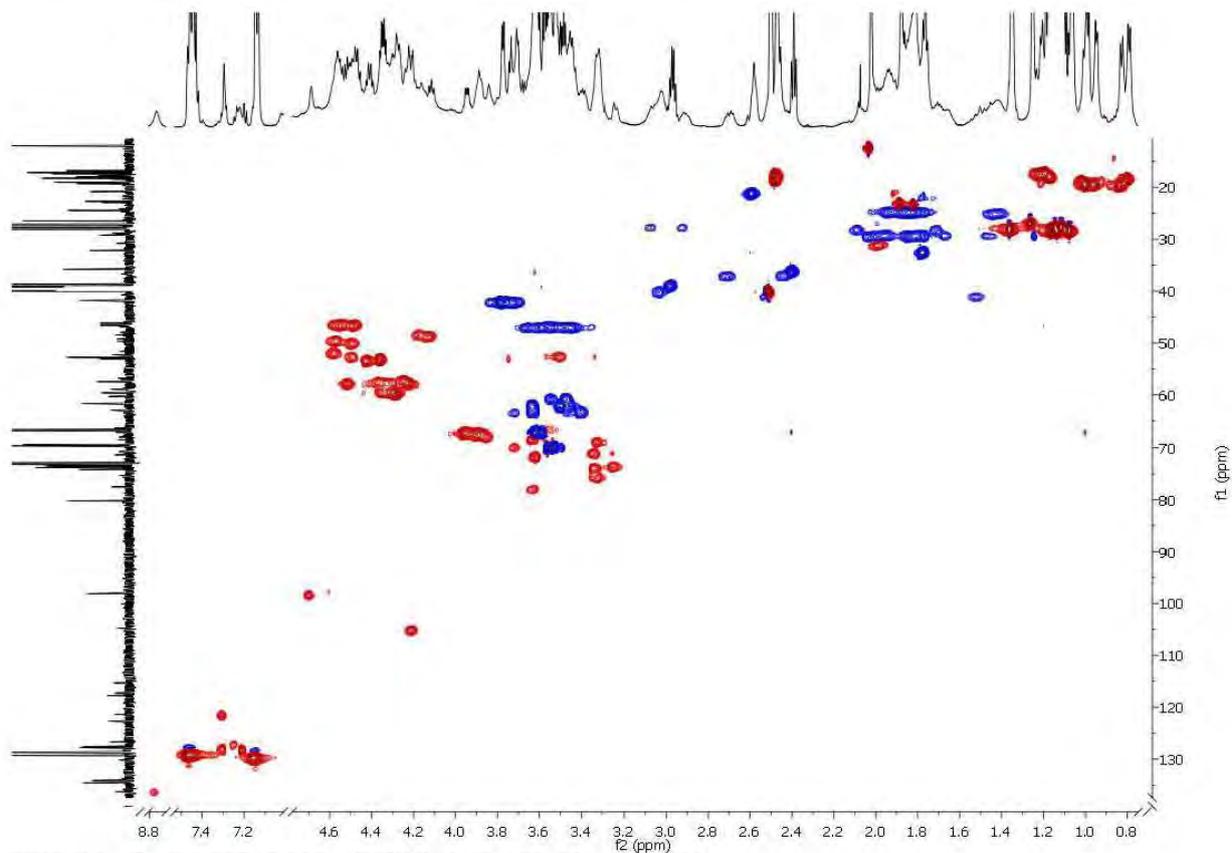
¹H-Spektrum (600 MHz, DMSO-d₆) der Verbindung 159.



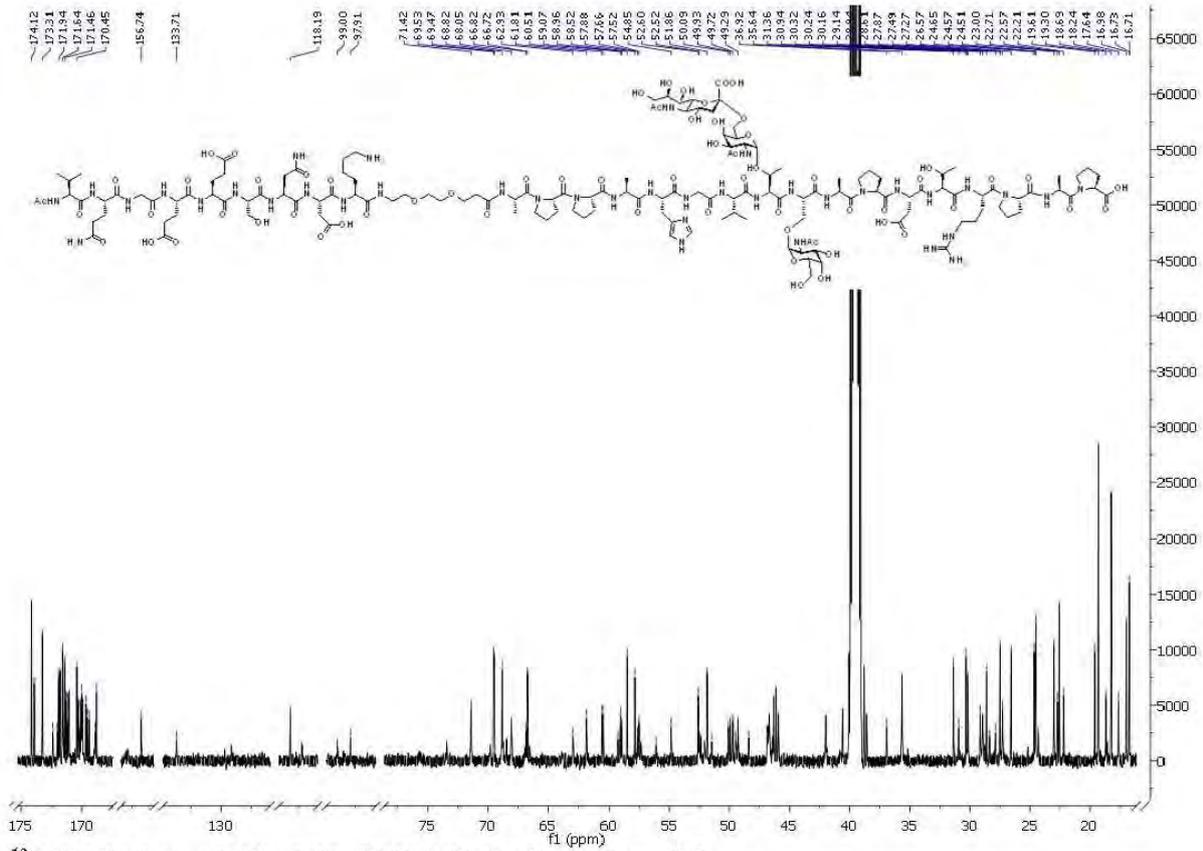
¹³C-BB-Spektrum (150.9 MHz, DMSO-d₆) der Verbindung 159.



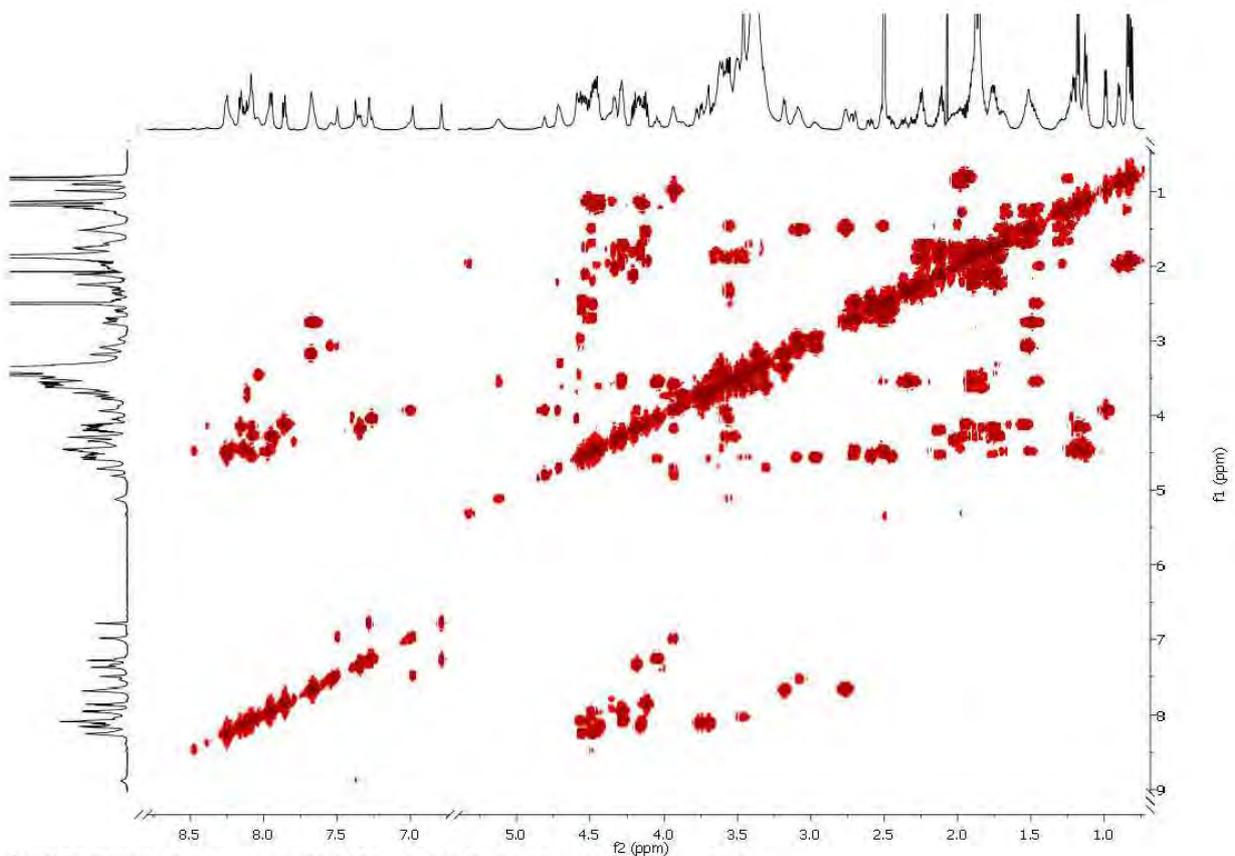
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, DMSO-d_6) der Verbindung 159.



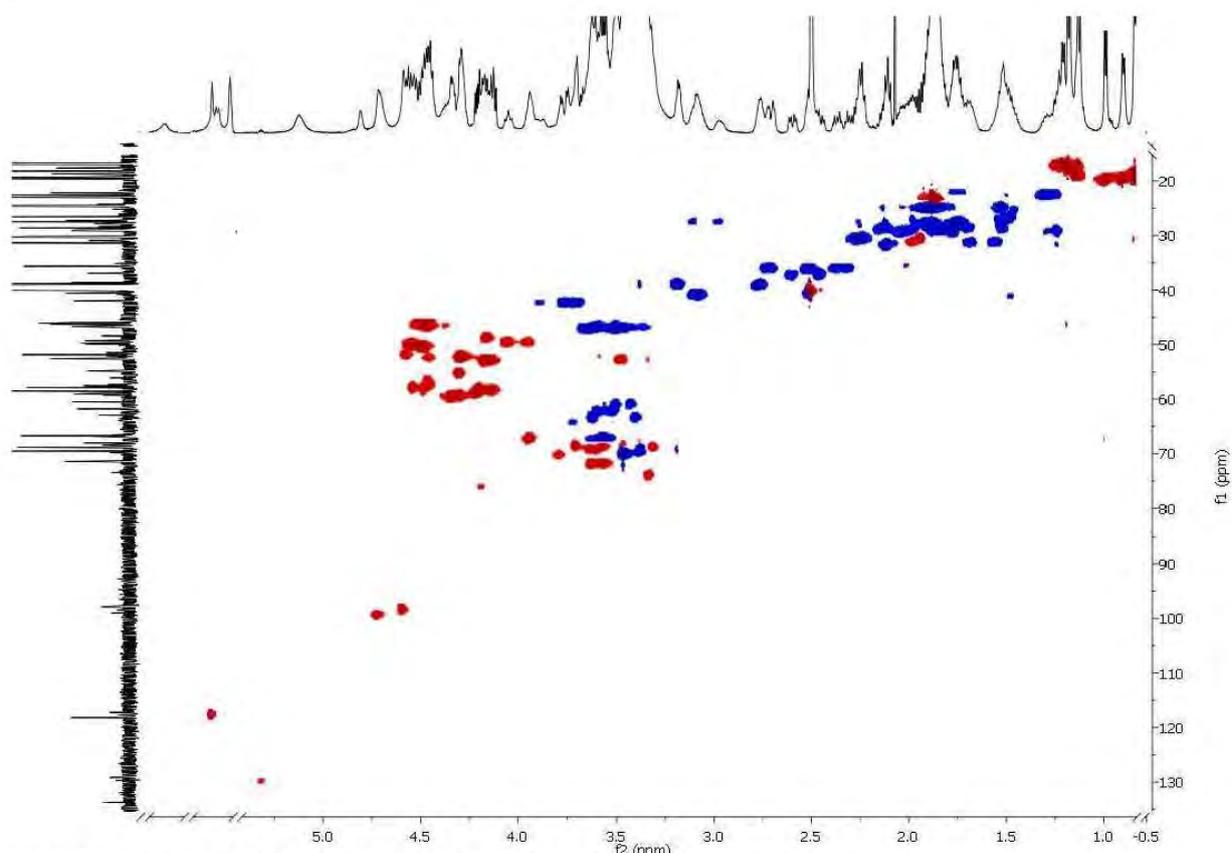
HSQC-Spektrum (150.9 MHz, DMSO-d_6) der Verbindung 159.



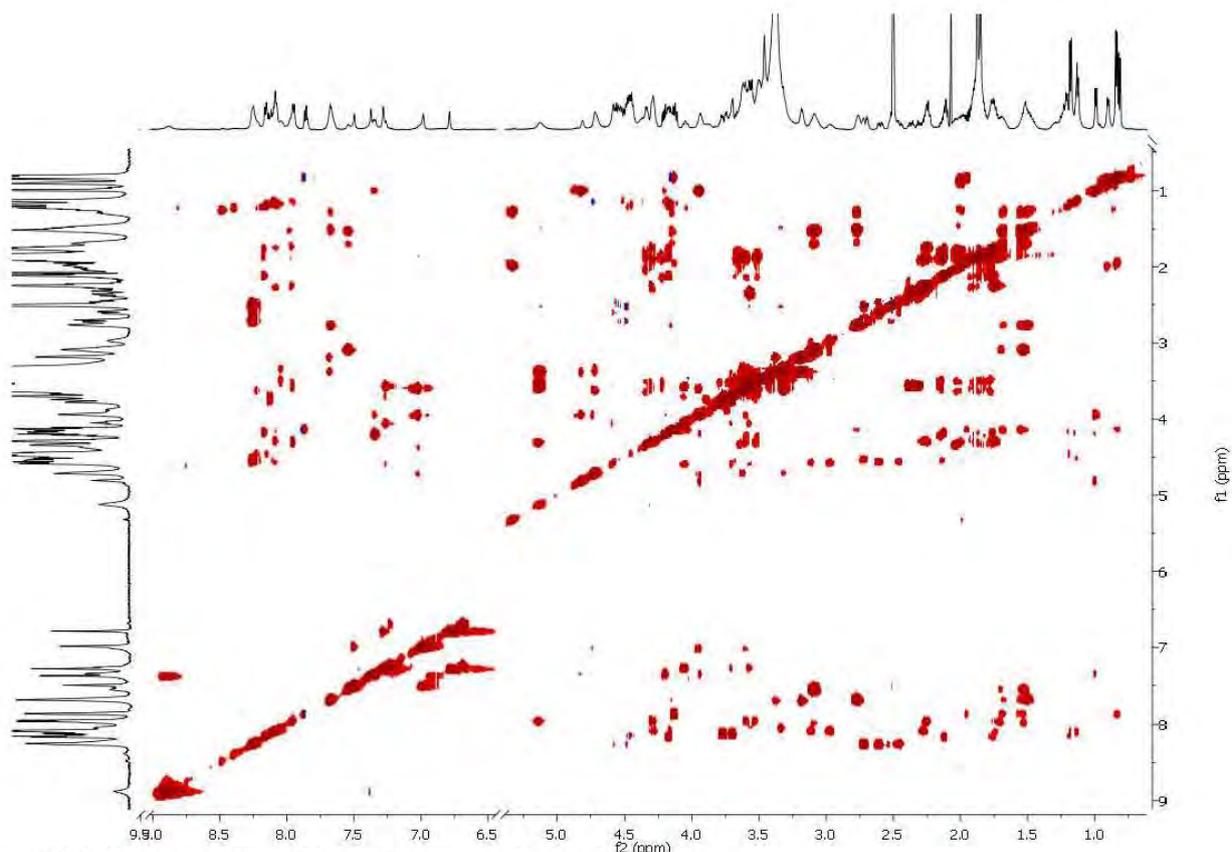
^{13}C -BB-Spektrum (150.9 MHz, DMSO-d_6) der Verbindung 175.



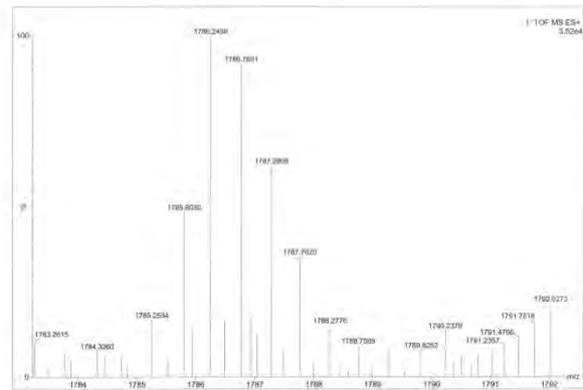
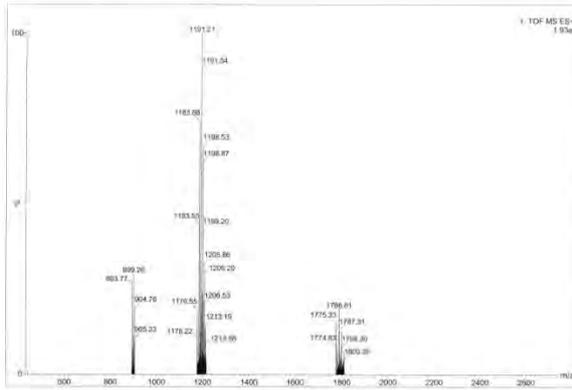
^1H - ^{13}C -COSY-Spektrum (600 MHz, DMSO-d_6) der Verbindung 175.



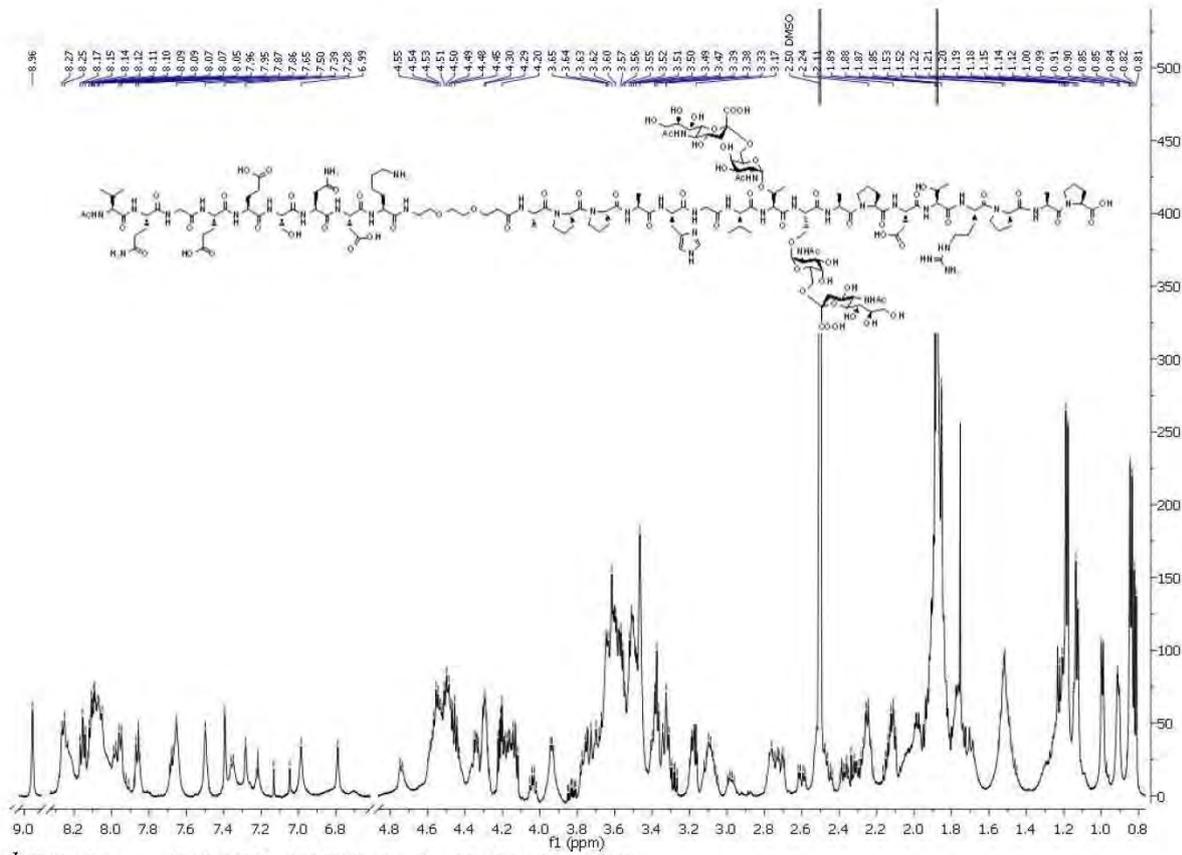
HSQC-Spektrum (150.9 MHz, DMSO- d_6) der Verbindung 175.



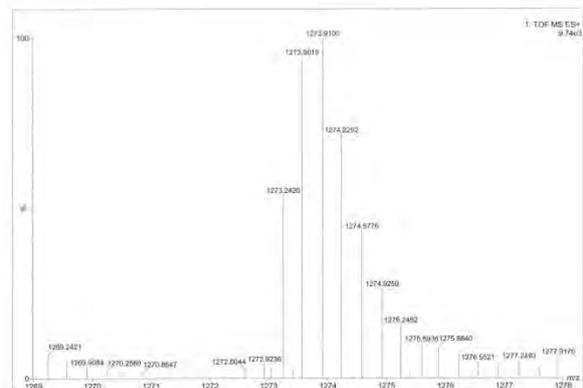
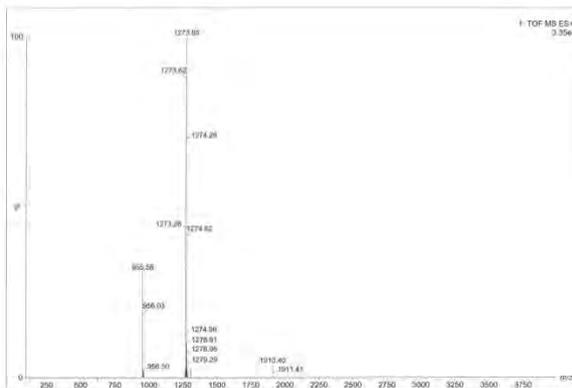
TOCSY-Spektrum (600 MHz, DMSO- d_6) der Verbindung 175.



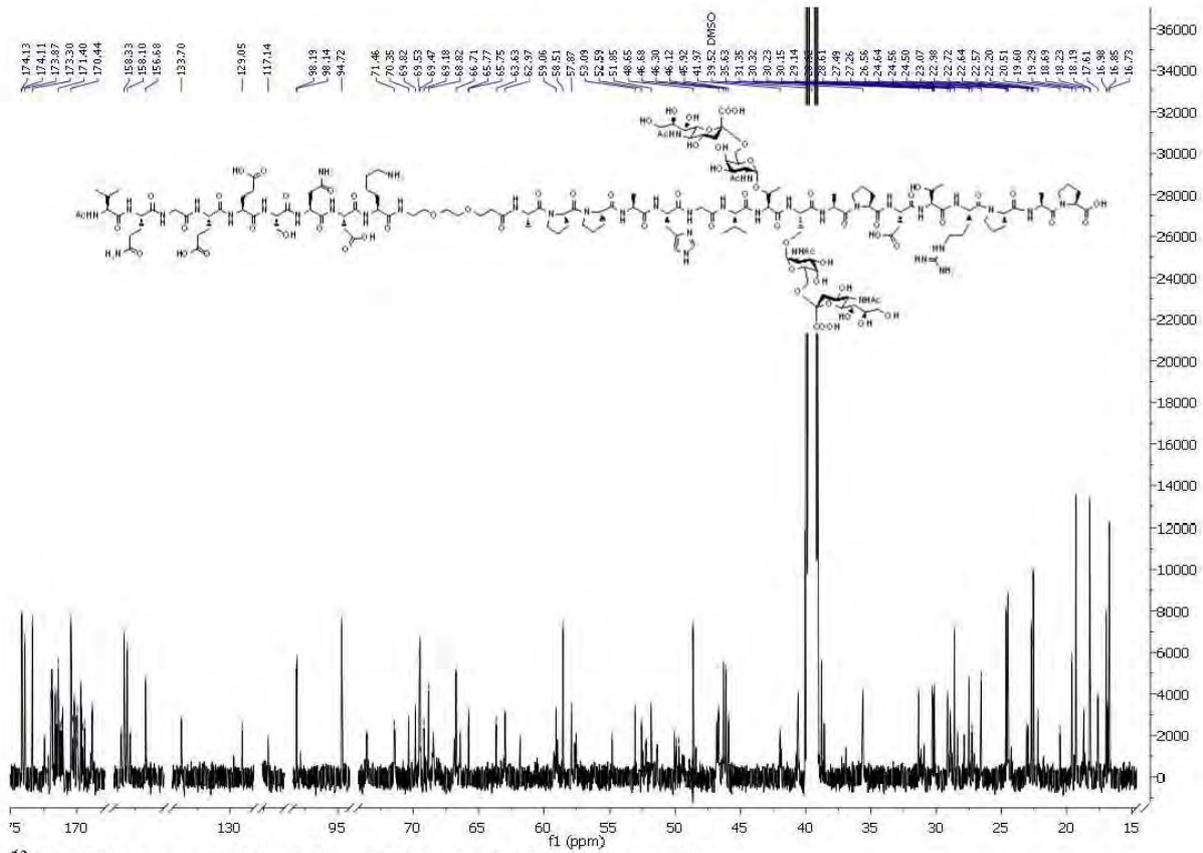
ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 175.



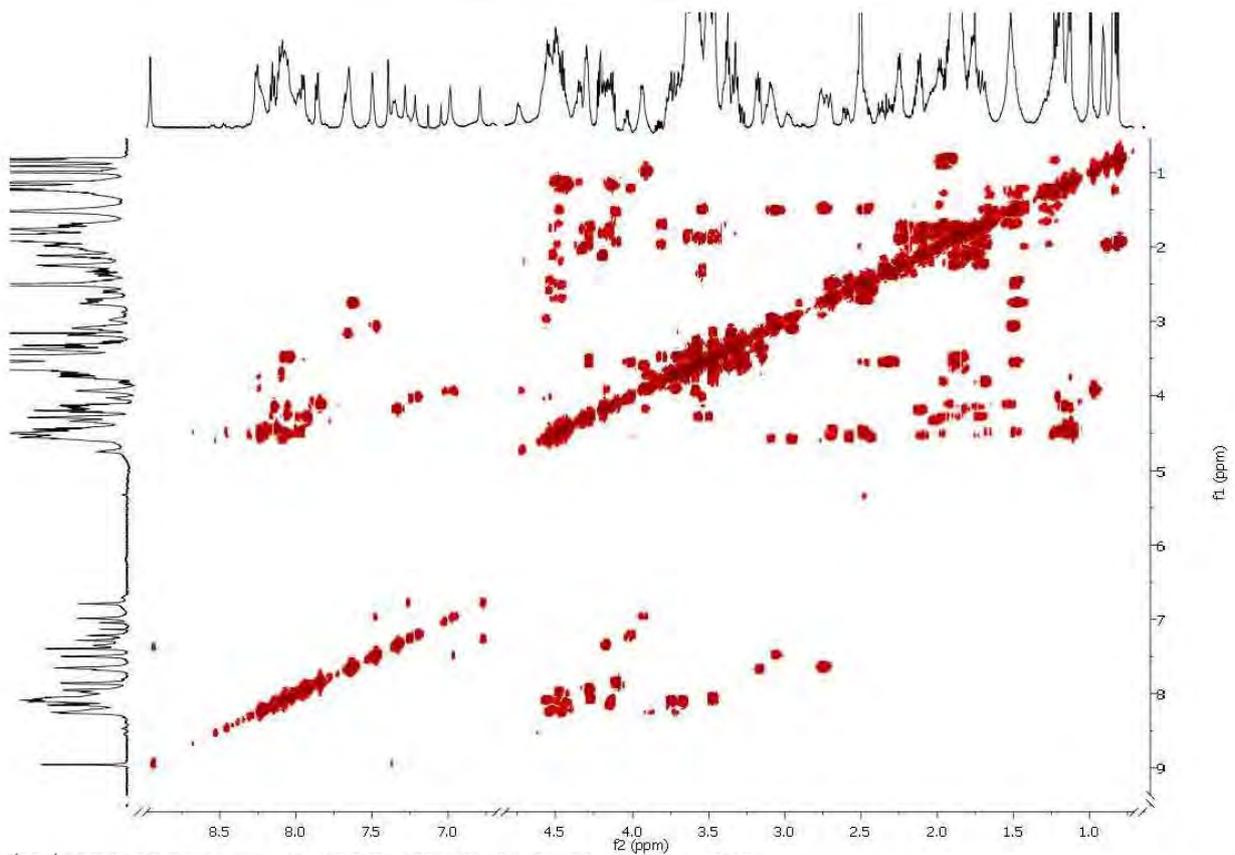
¹H-Spektrum (600 MHz, DMSO-d₆) der Verbindung 176.



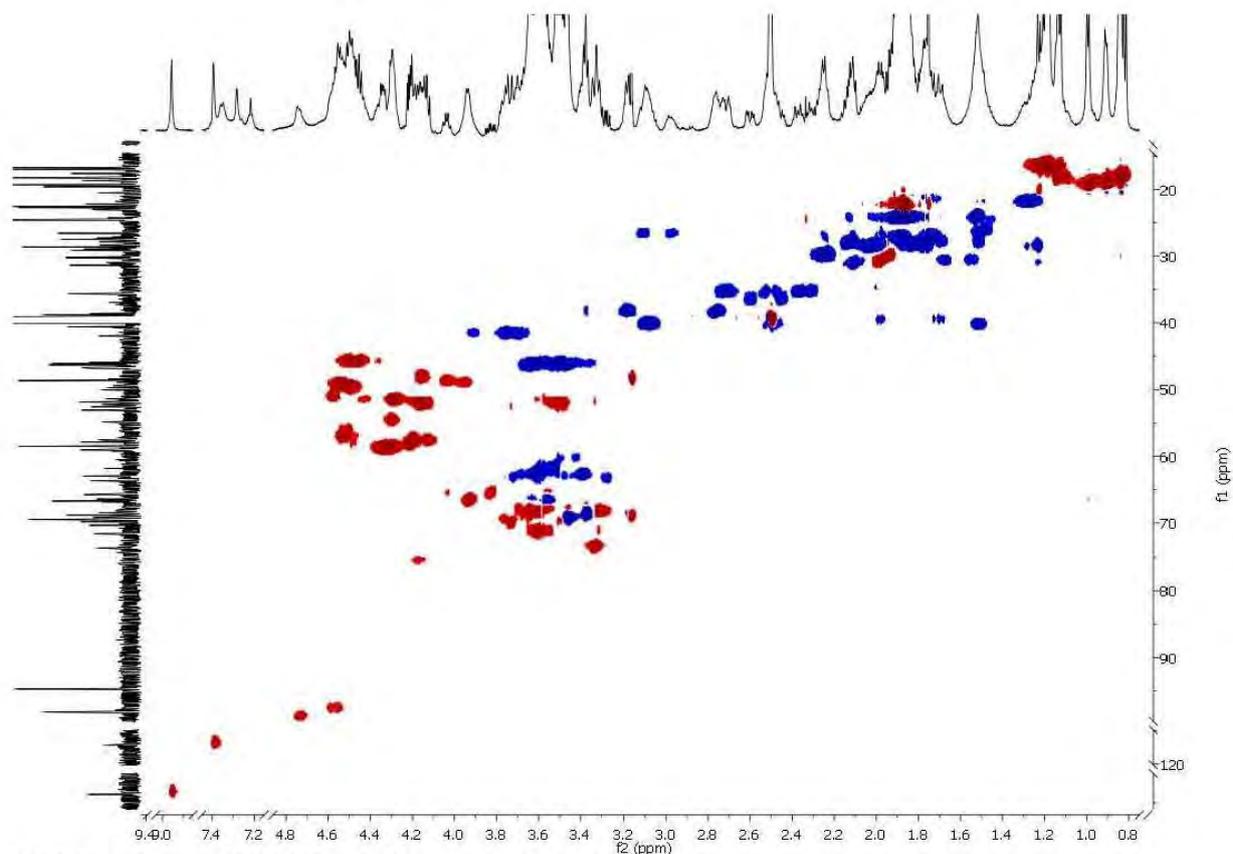
ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 176.



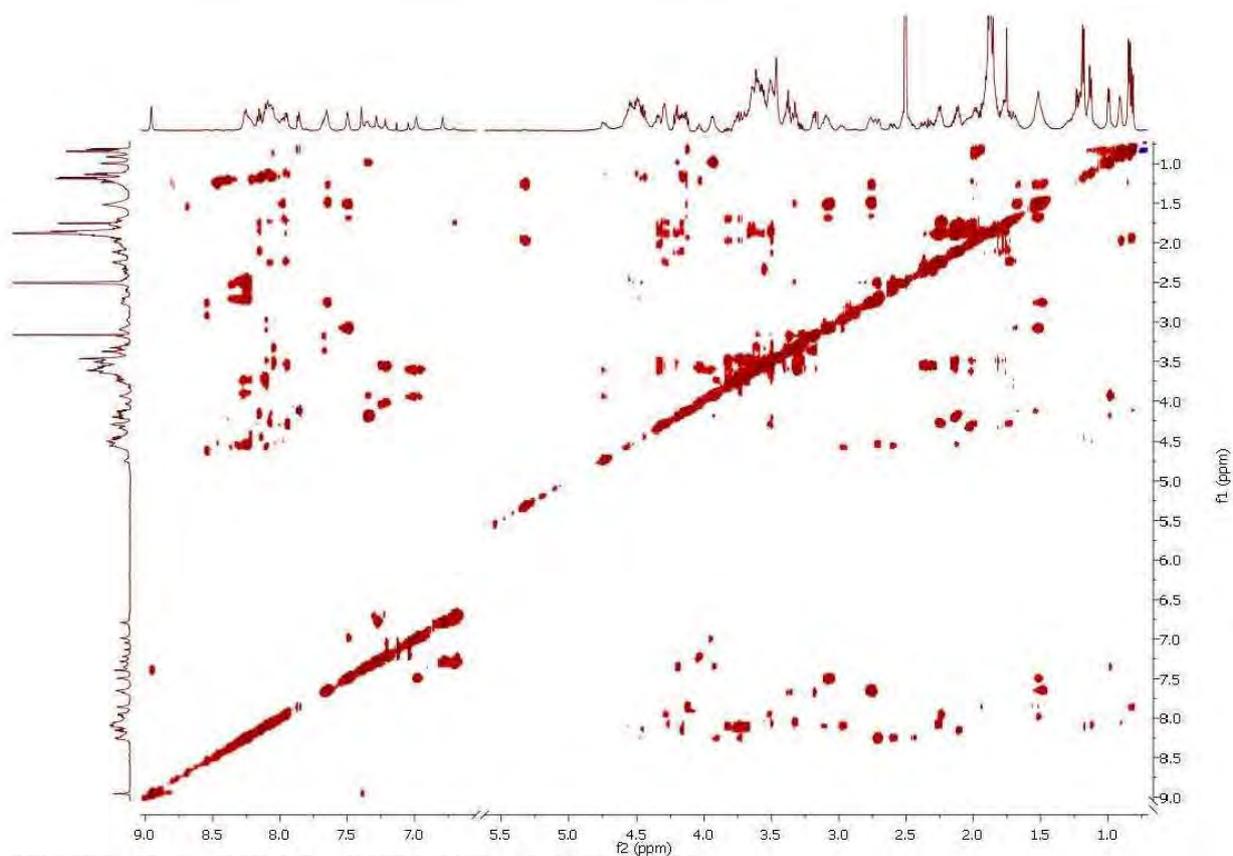
^{13}C -BB-Spektrum (150.9 MHz, DMSO- d_6) der Verbindung 176.



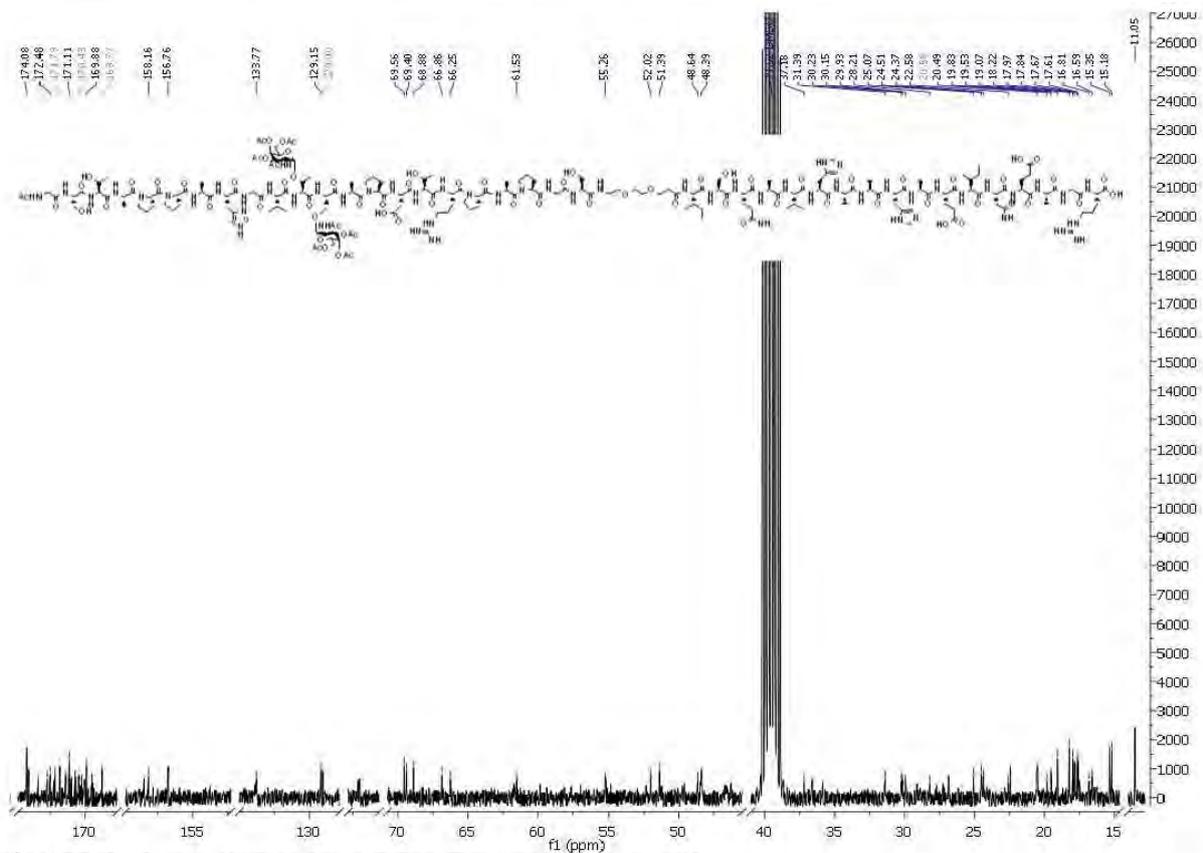
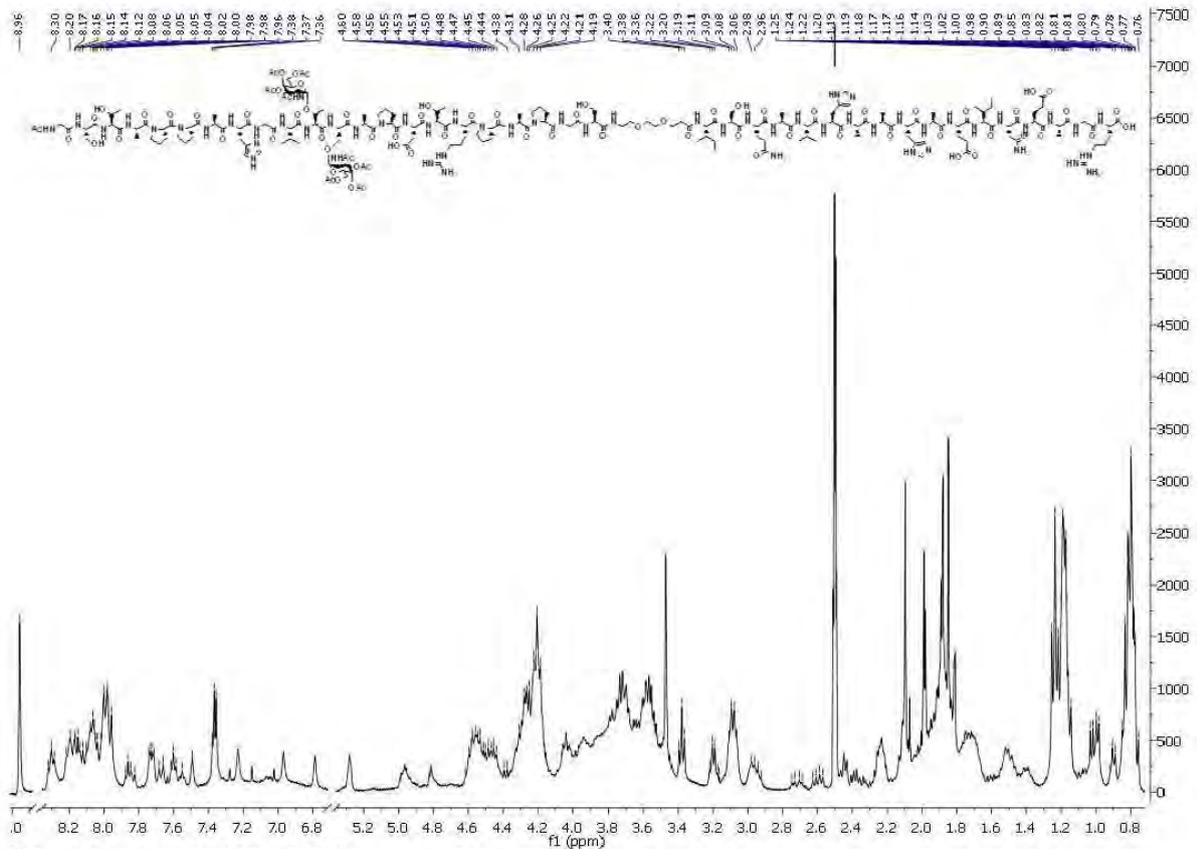
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, DMSO- d_6) der Verbindung 176.

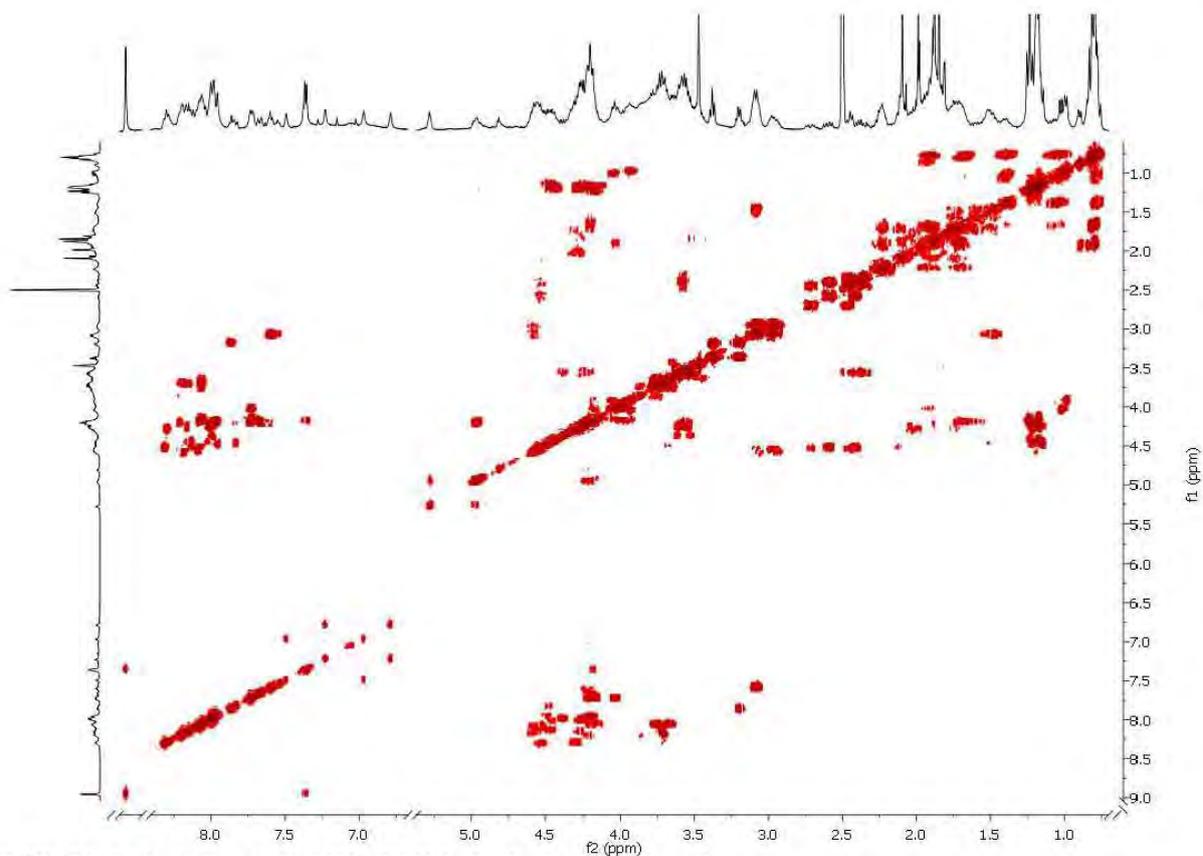


HSQC-Spektrum (150.9 MHz, DMSO- d_6) der Verbindung 176.

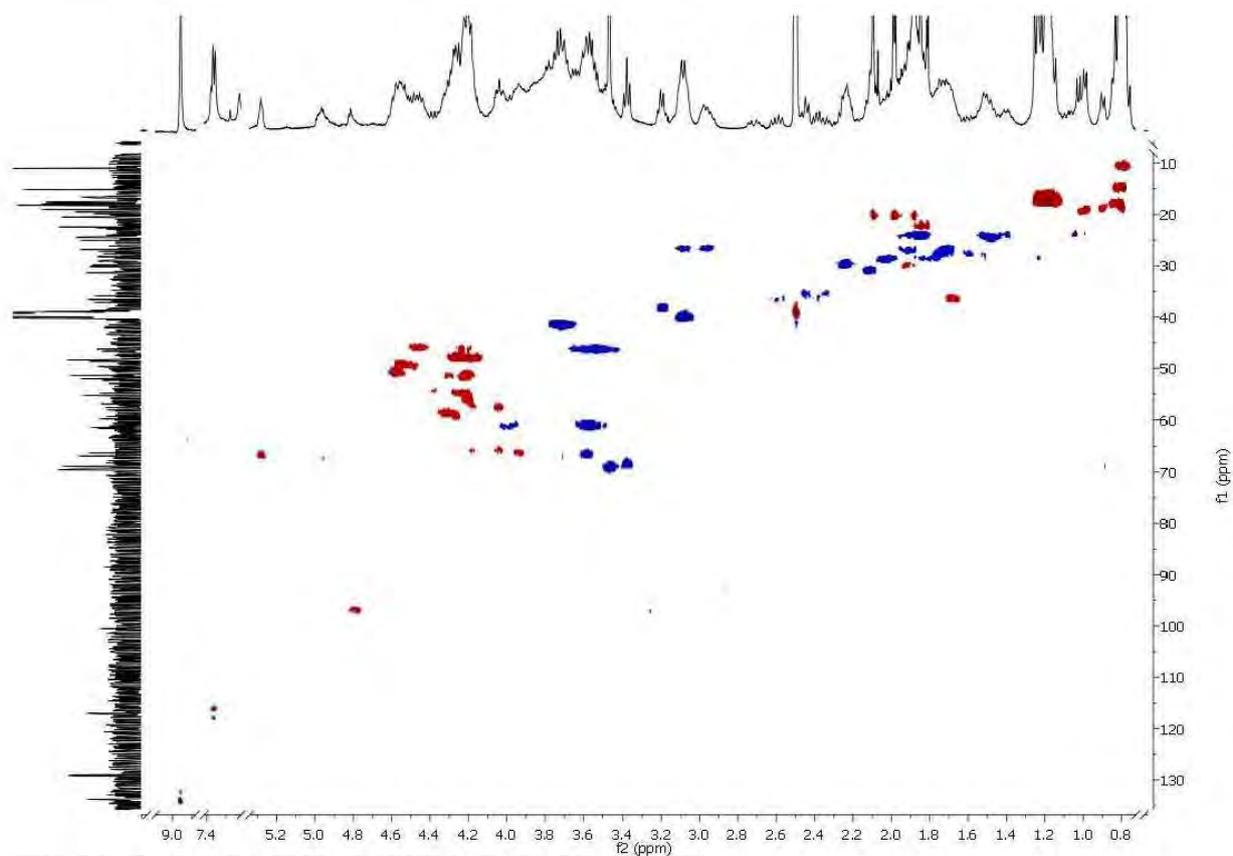


TOCSY-Spektrum (600 MHz, DMSO- d_6) der Verbindung 176.

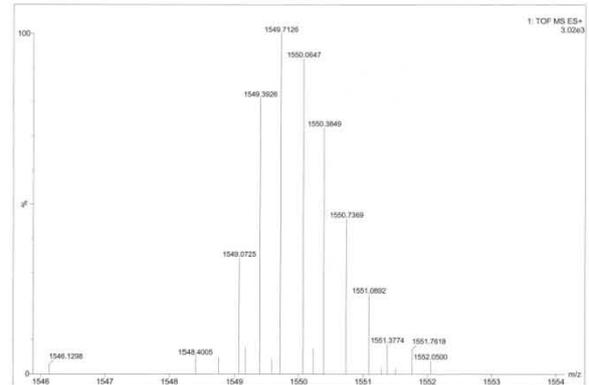
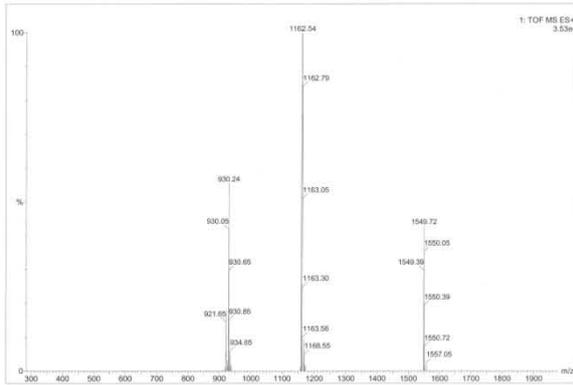




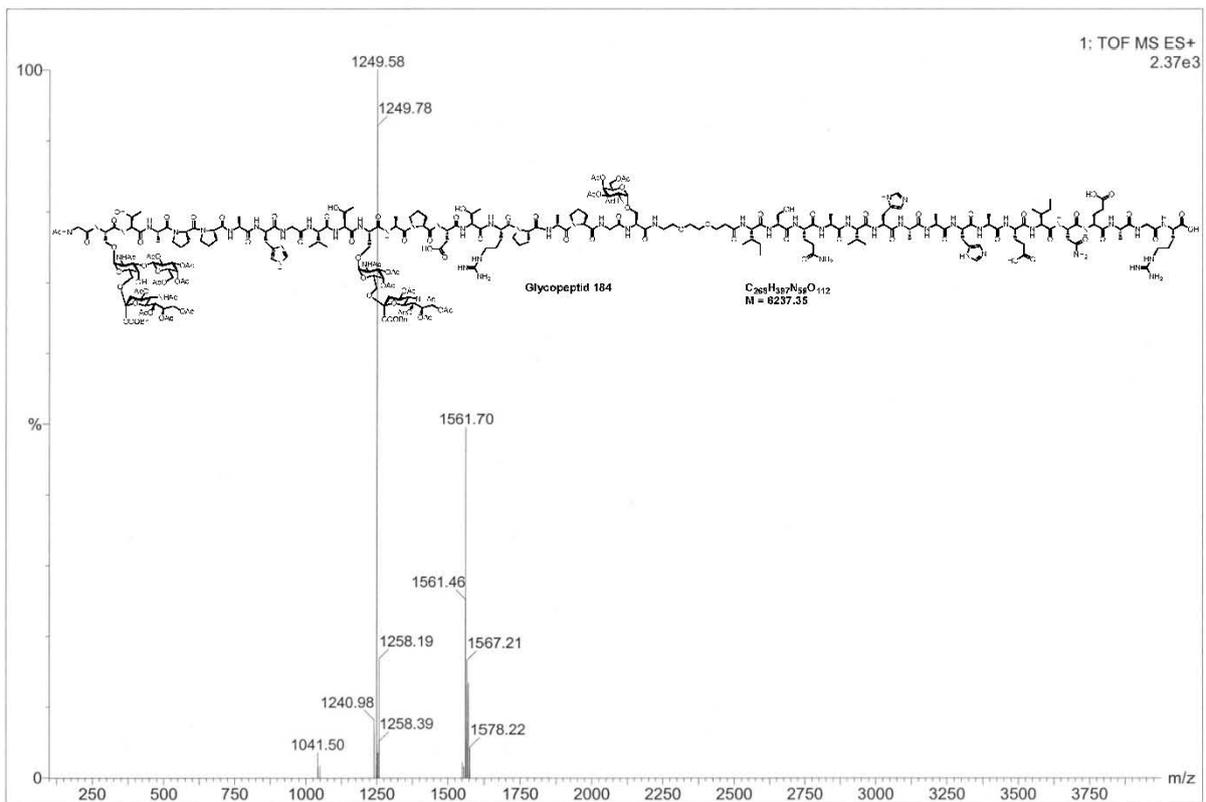
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, DMSO-d_6) der Verbindung 180.



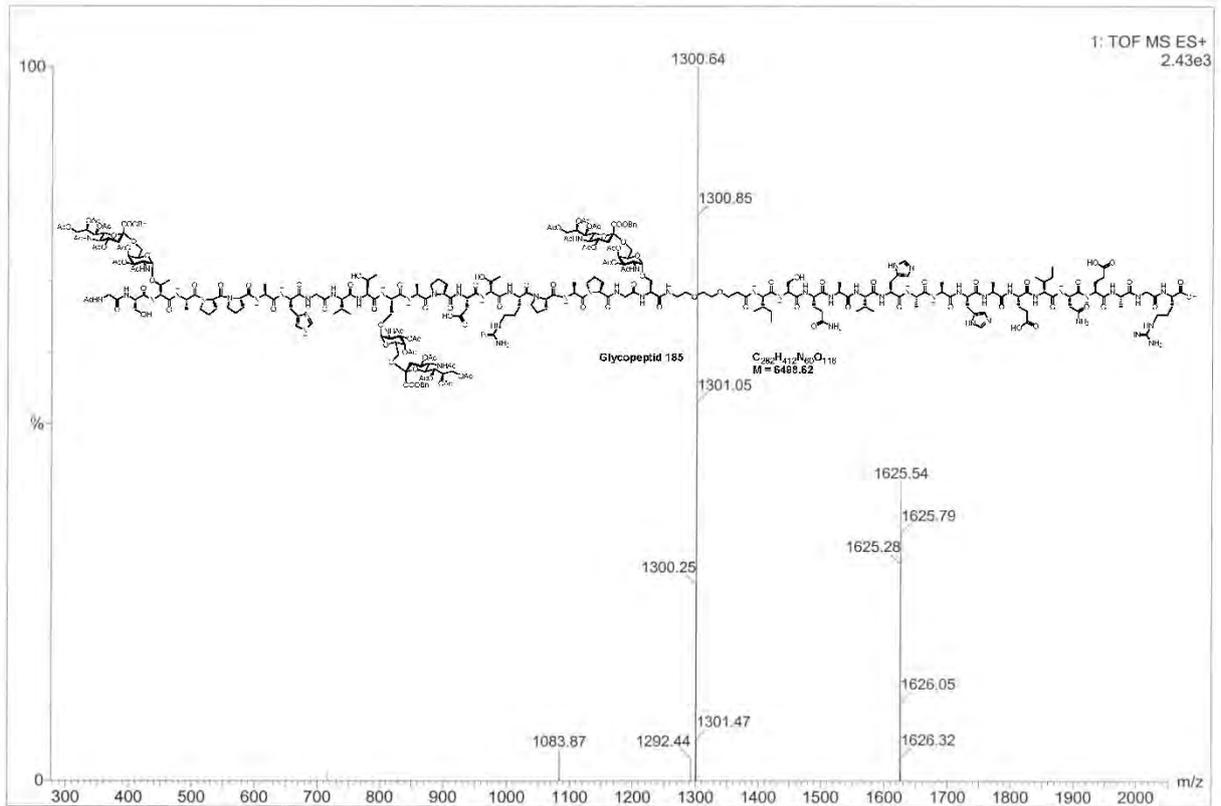
HSQC-Spektrum (100.6 MHz, DMSO-d_6) der Verbindung 180.



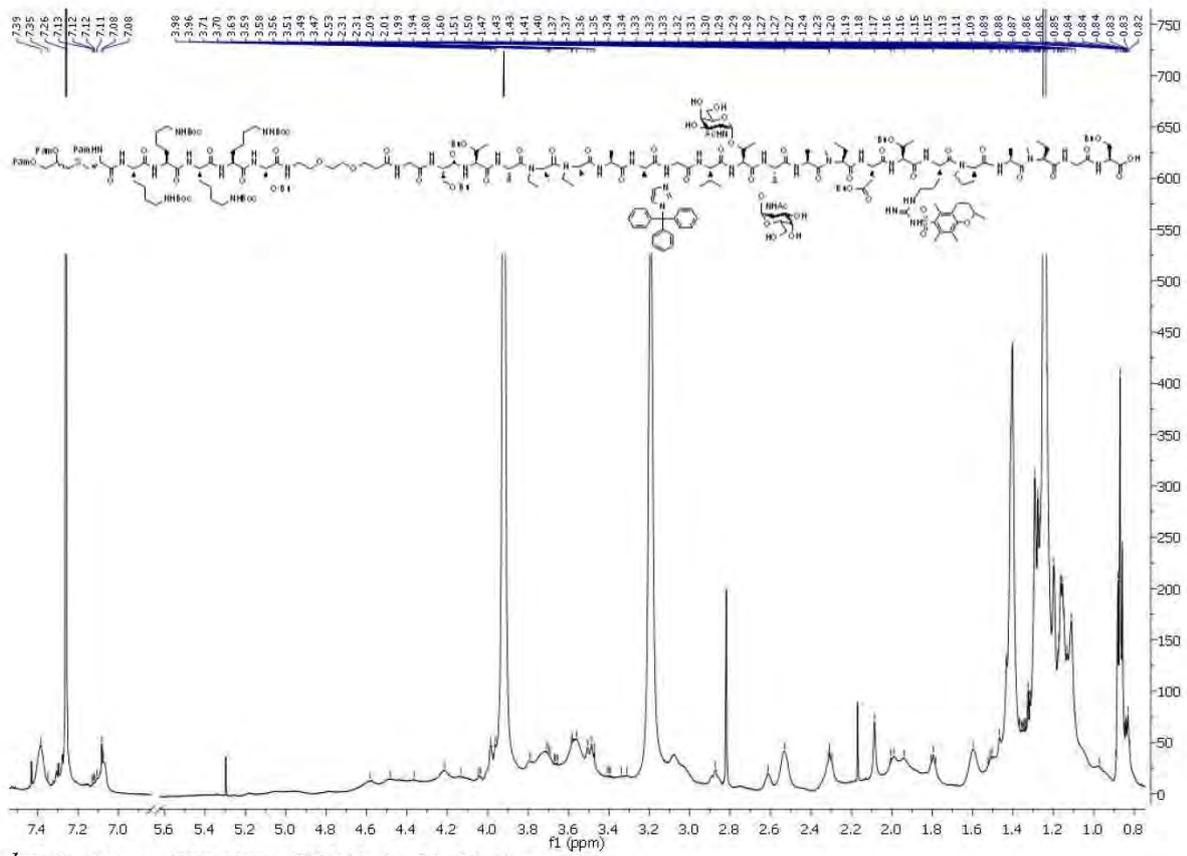
ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 180.



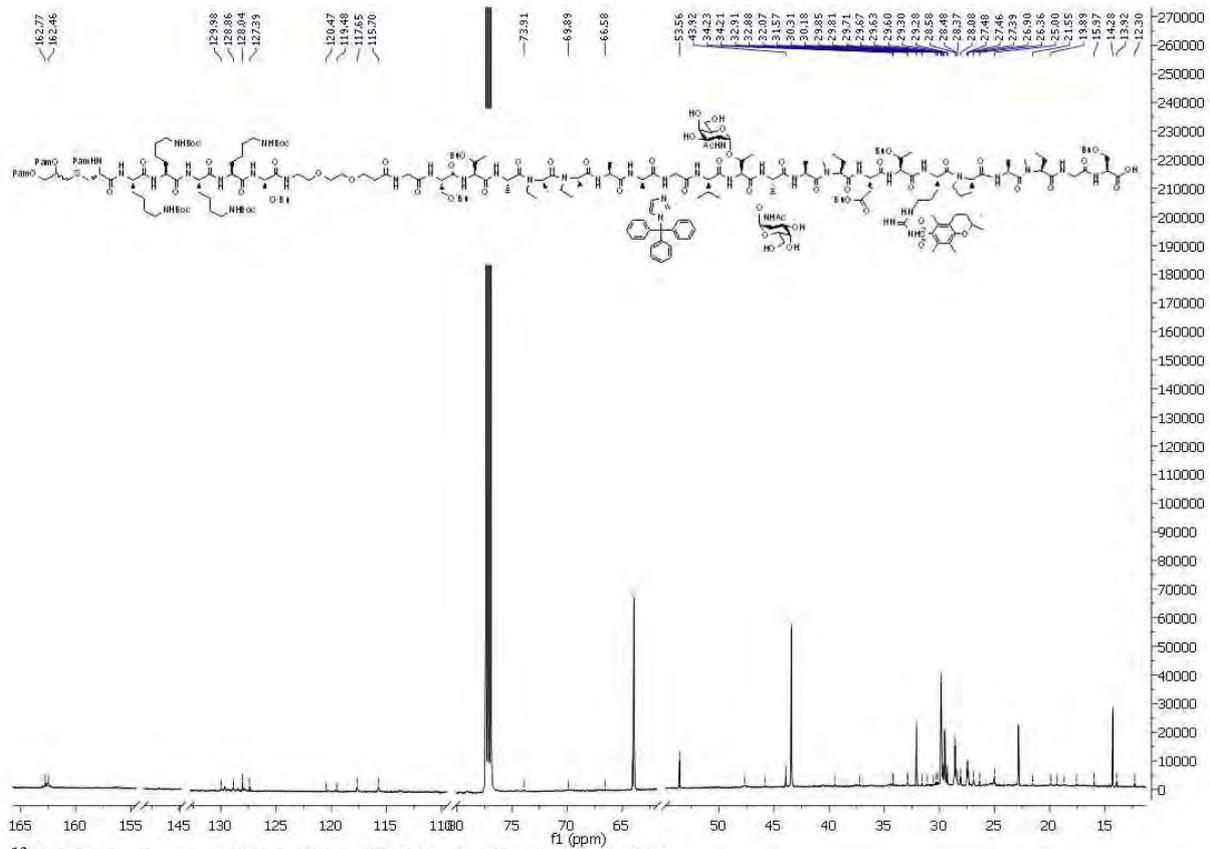
ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 184.



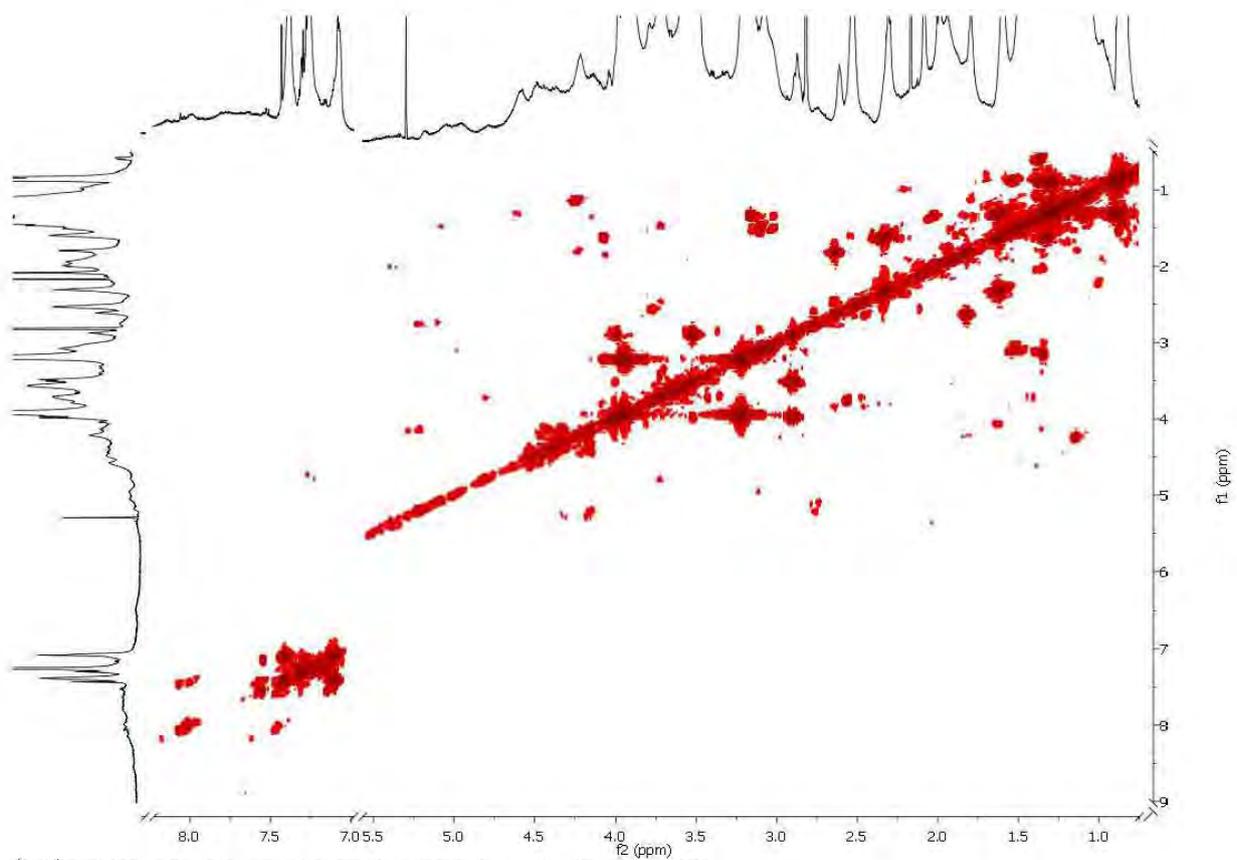
ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 185.



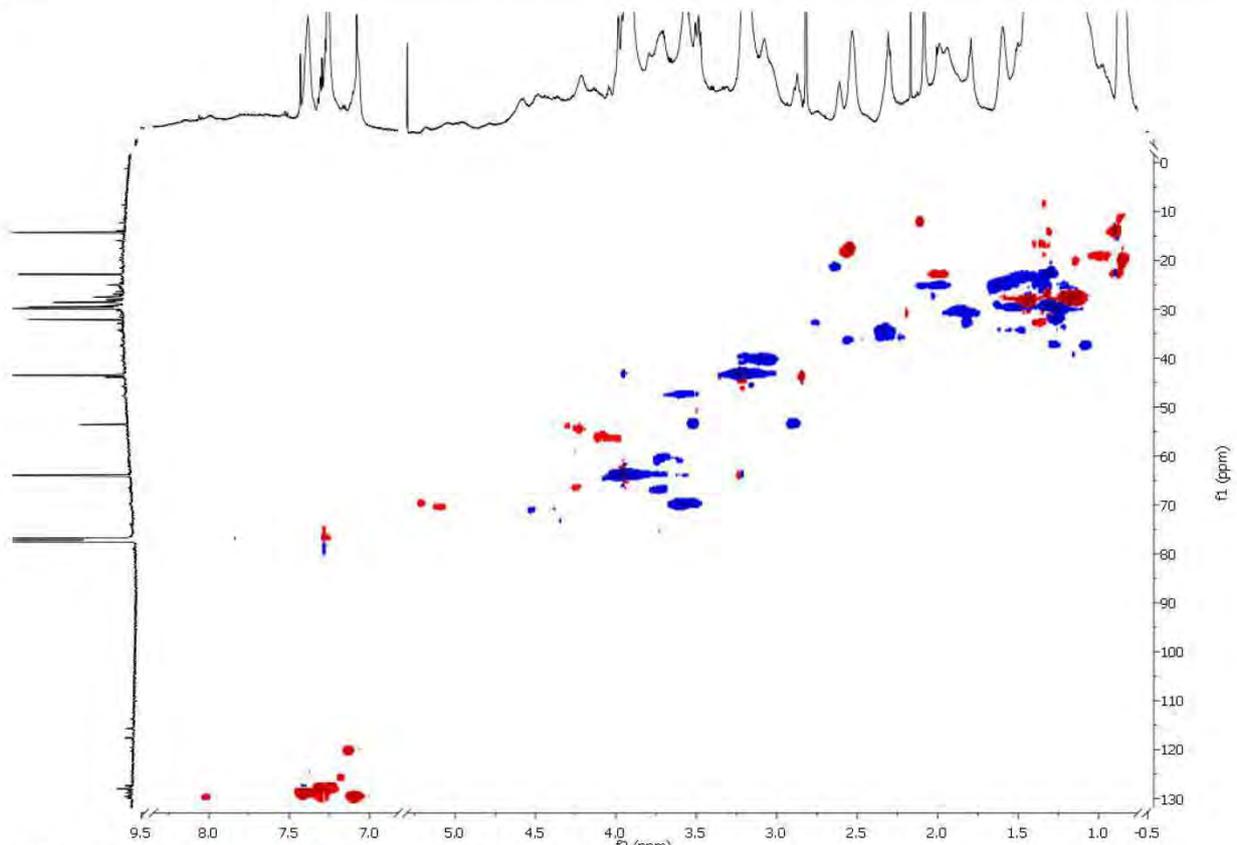
1H -Spektrum (600 MHz, $CDCl_3$) der Verbindung 193.



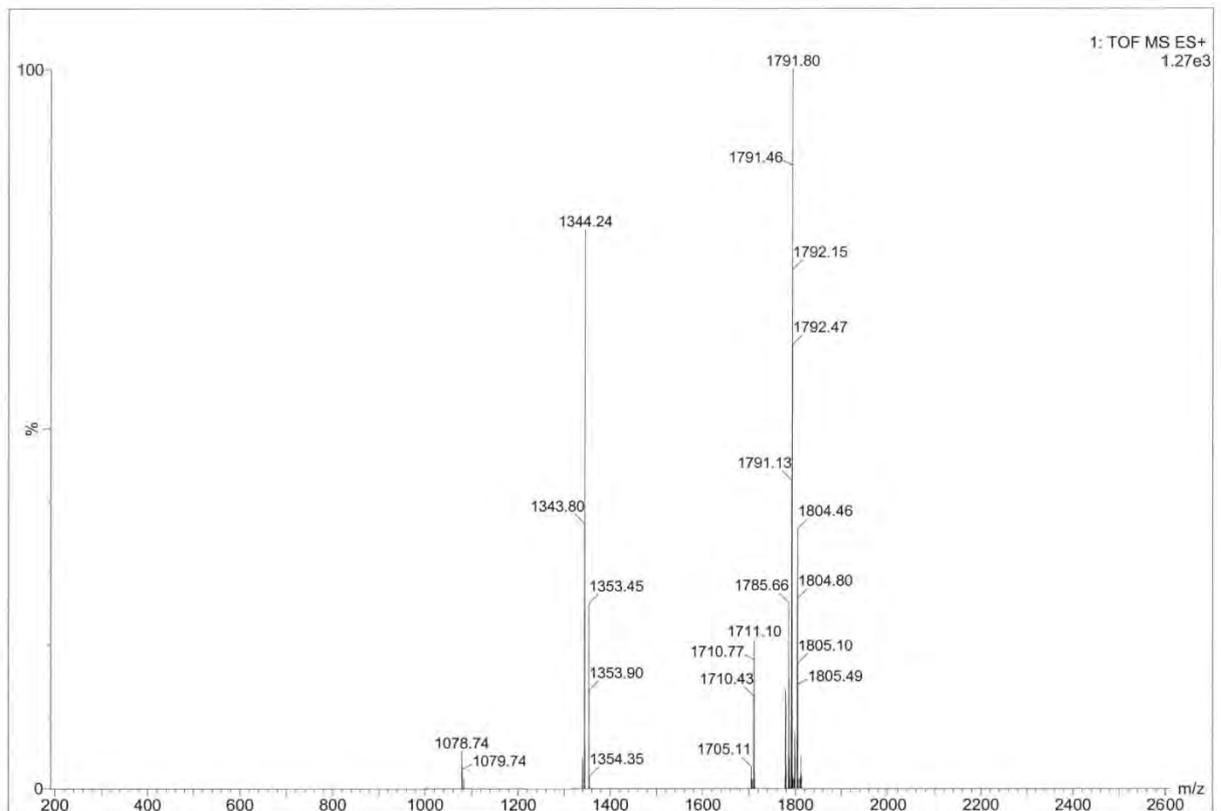
^{13}C -BB-Spektrum (150.9 MHz, CDCl_3) der Verbindung 193.



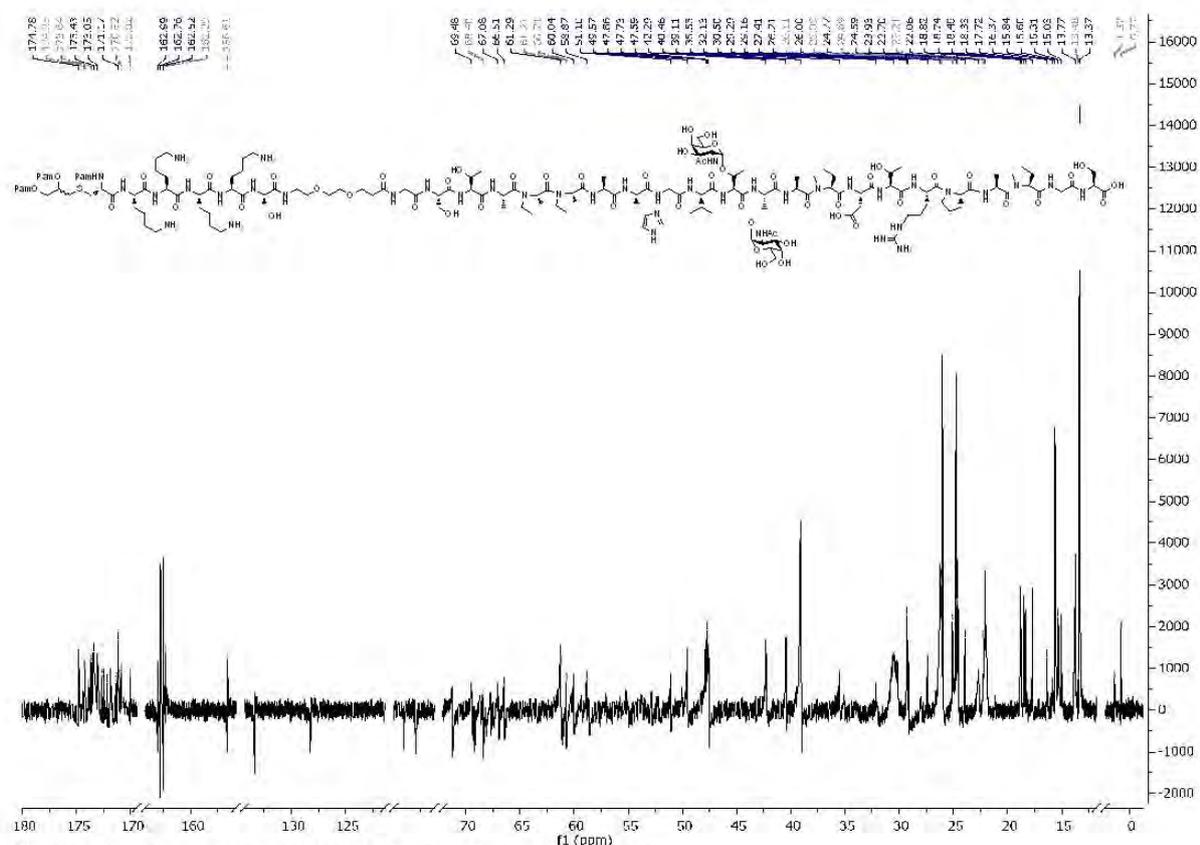
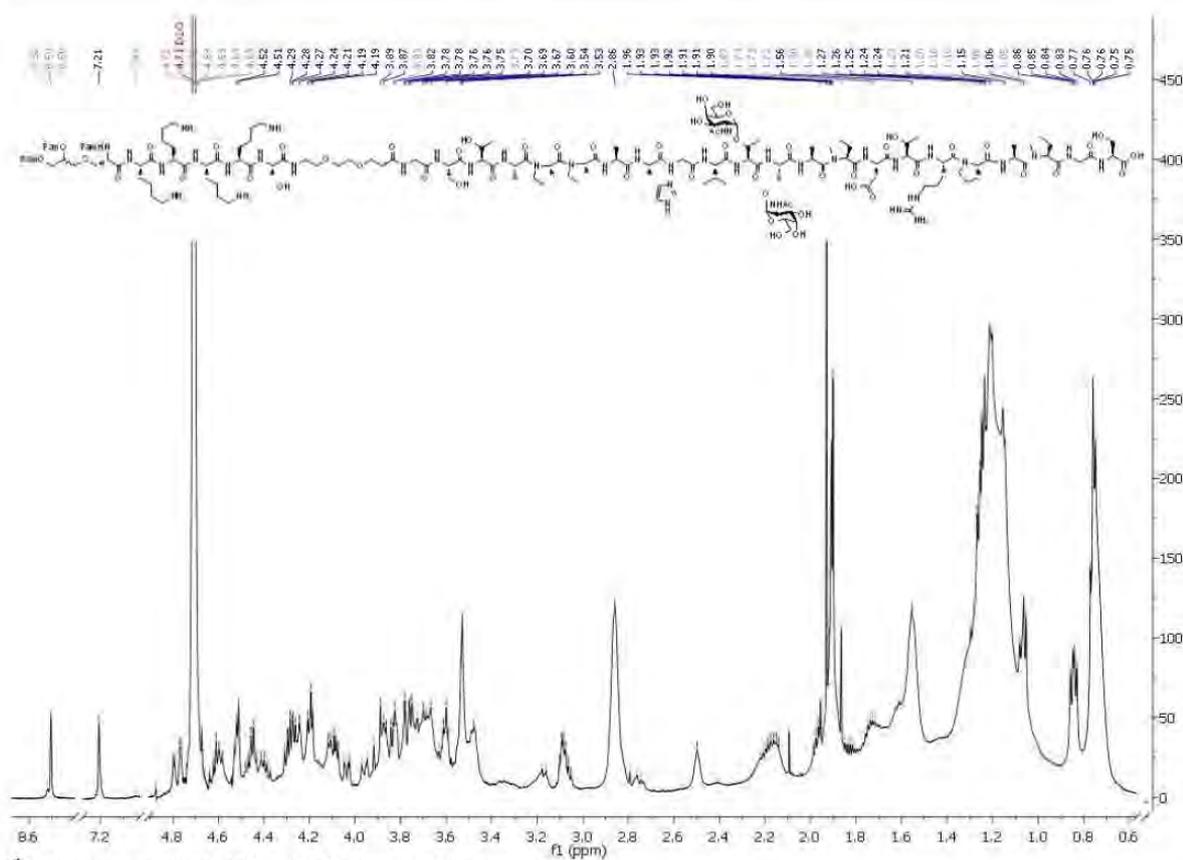
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) der Verbindung 193.

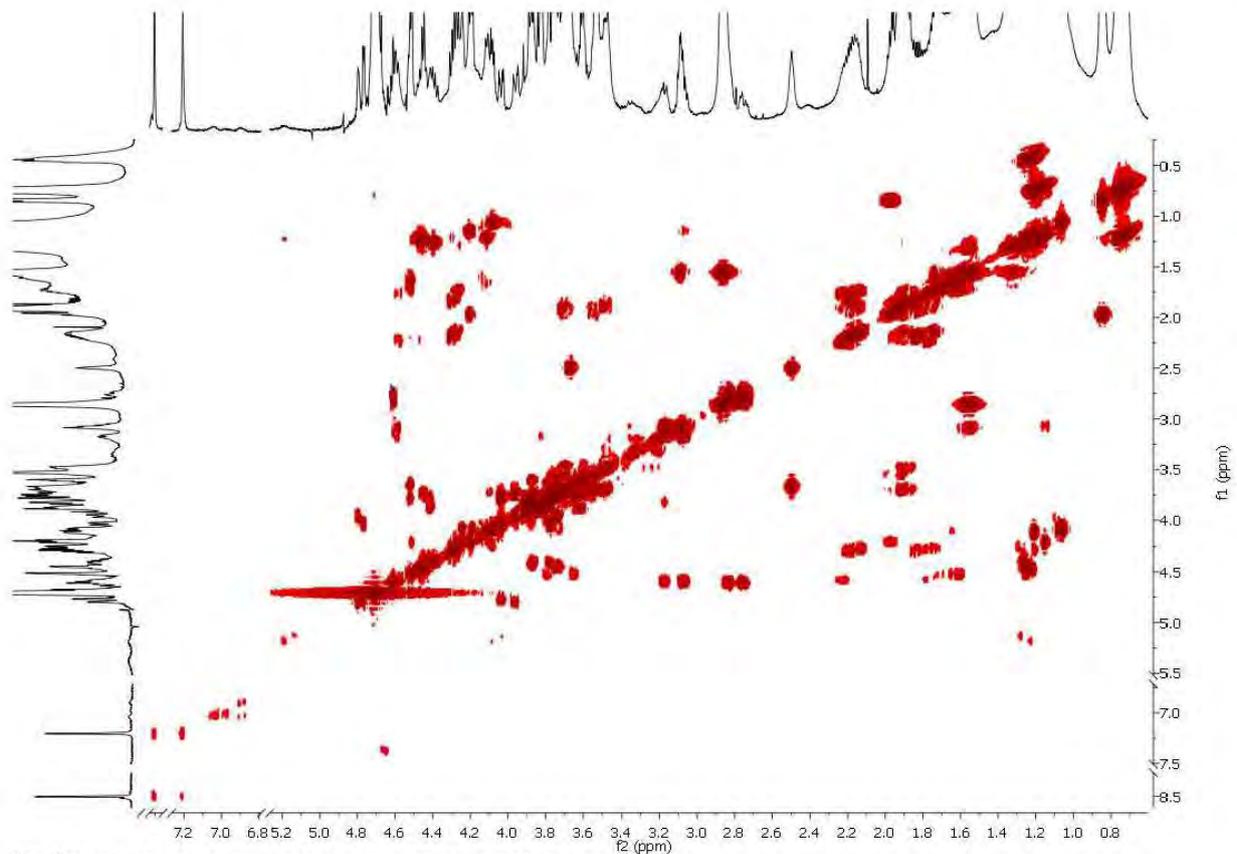


HSQC-Spektrum (150.9 MHz, CDCl₃) der Verbindung 193.

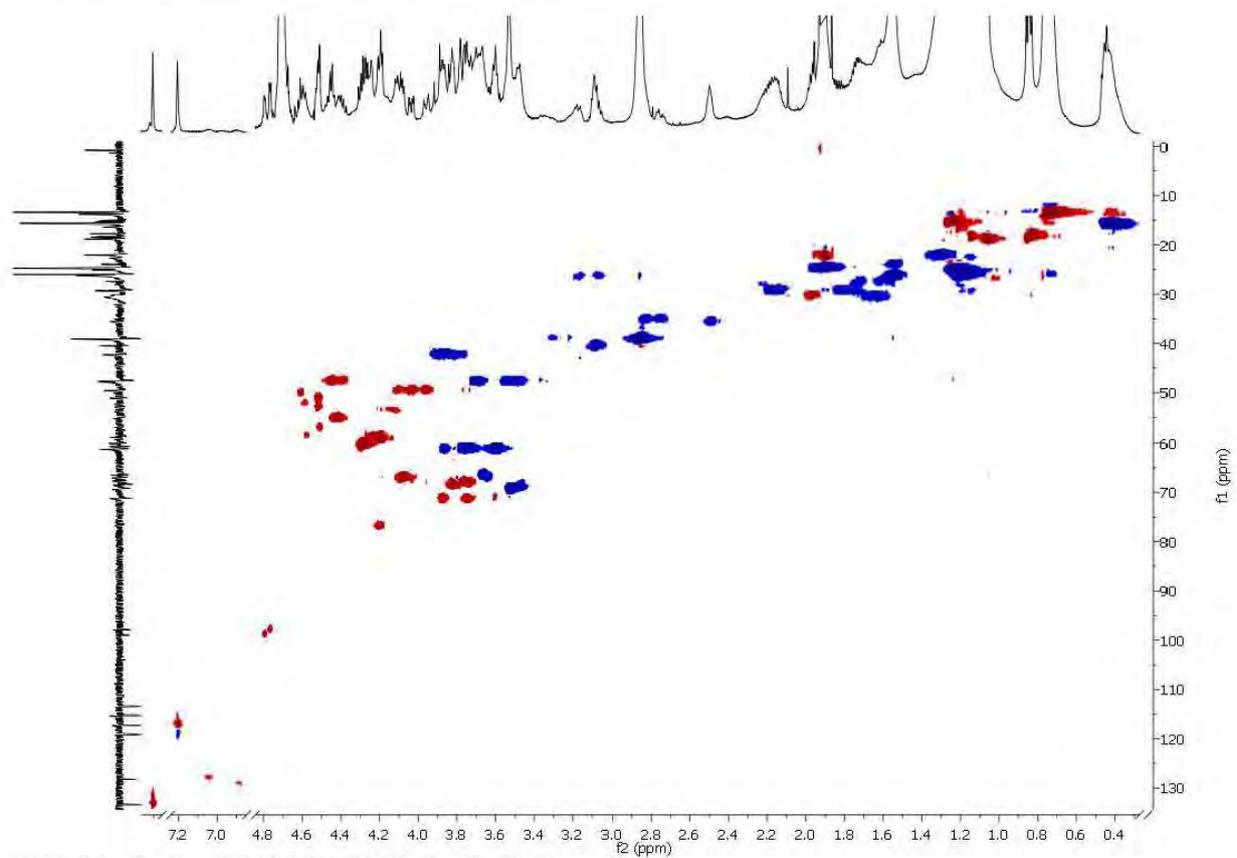


ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 193.

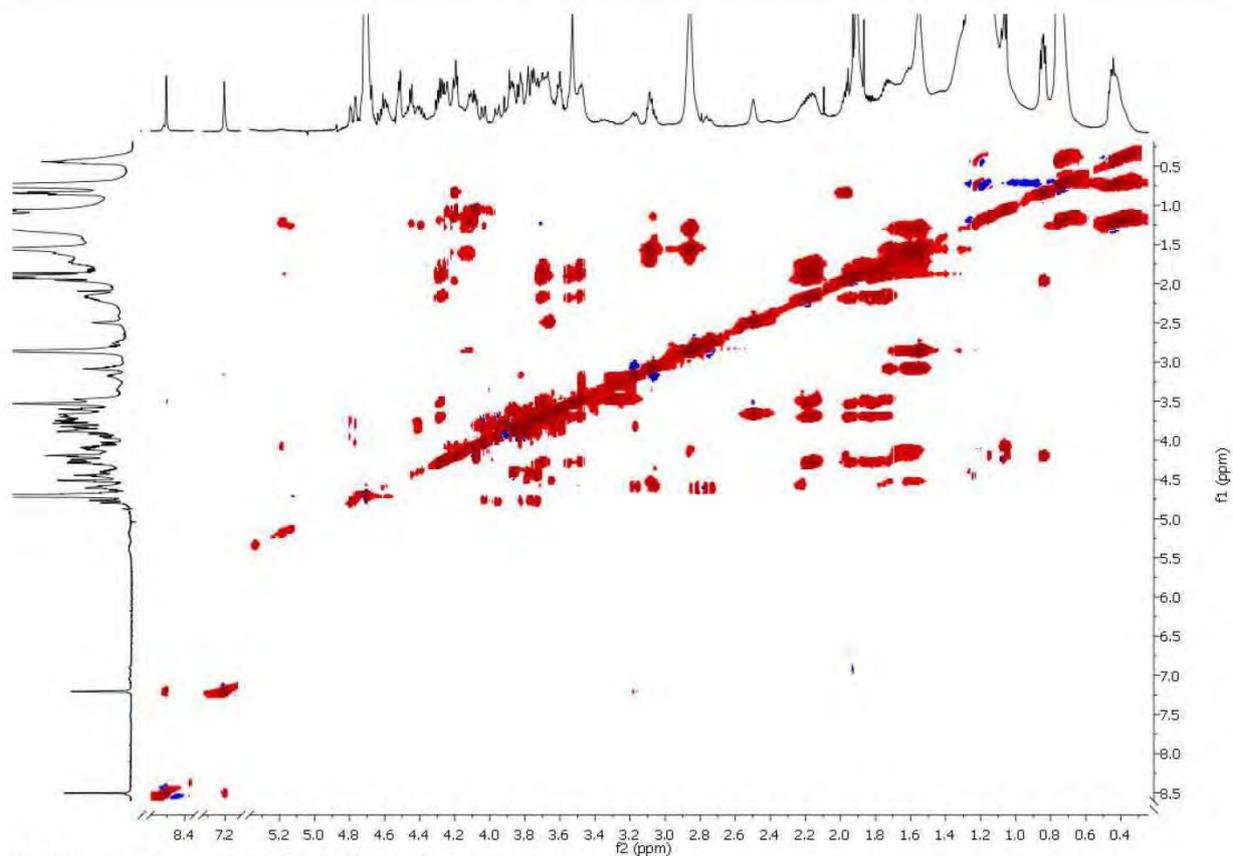




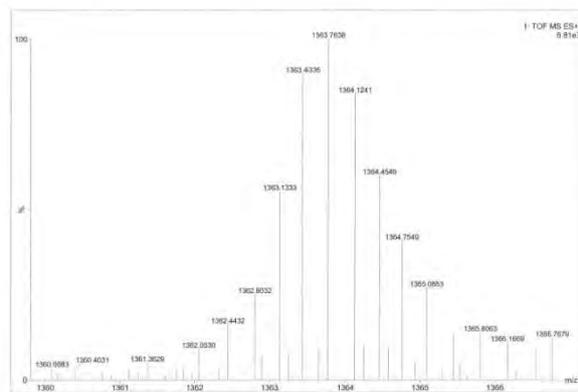
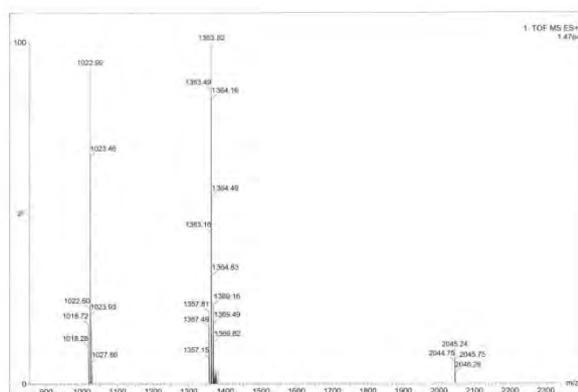
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, D_2O) der Verbindung 194.



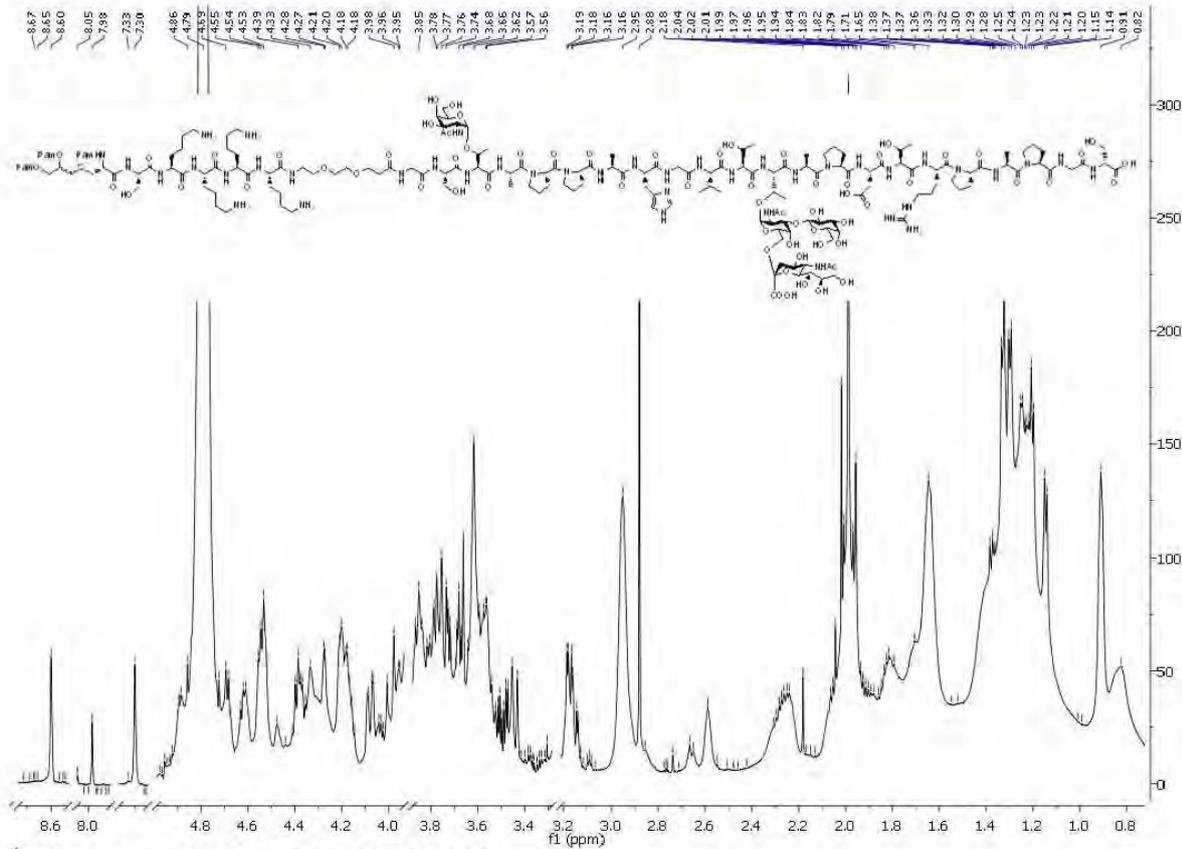
HSQC-Spektrum (150.9 MHz, D_2O) der Verbindung 194.



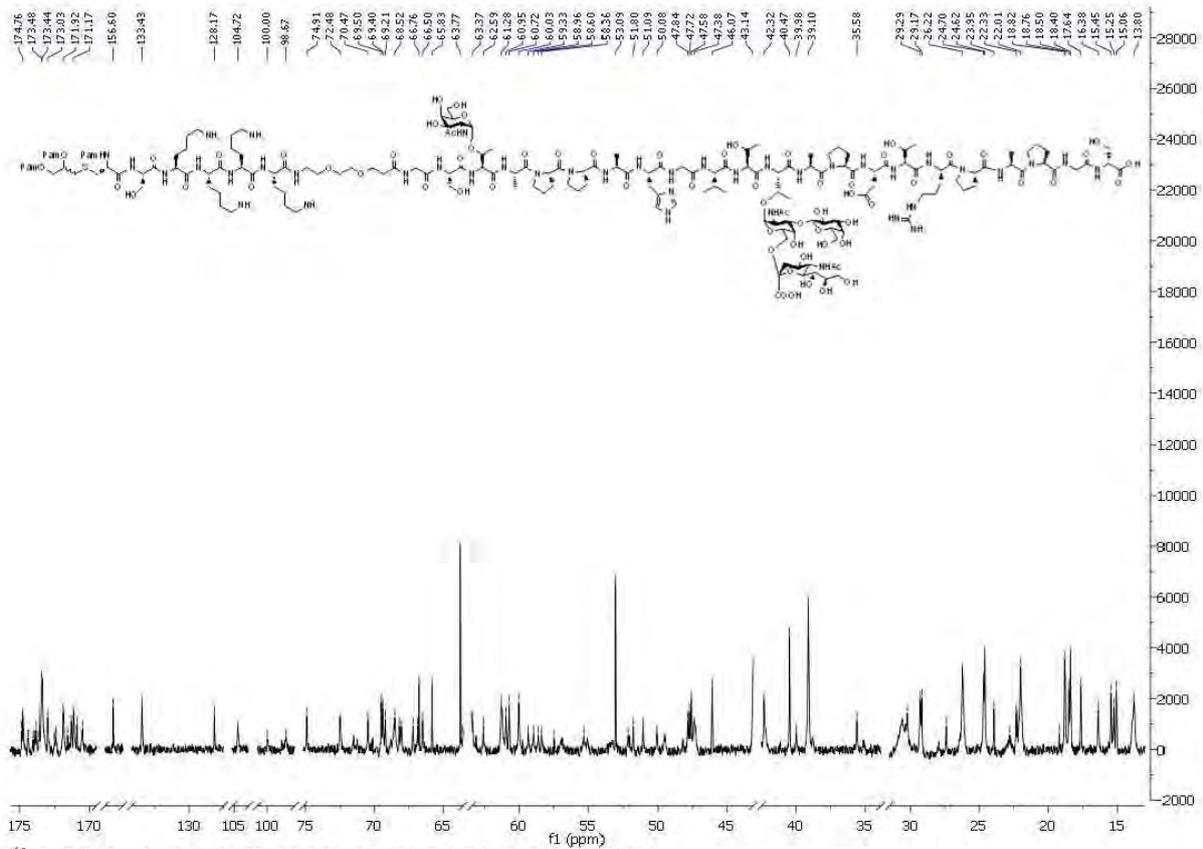
TOCSY-Spektrum (600 MHz, D_2O) der Verbindung 194.



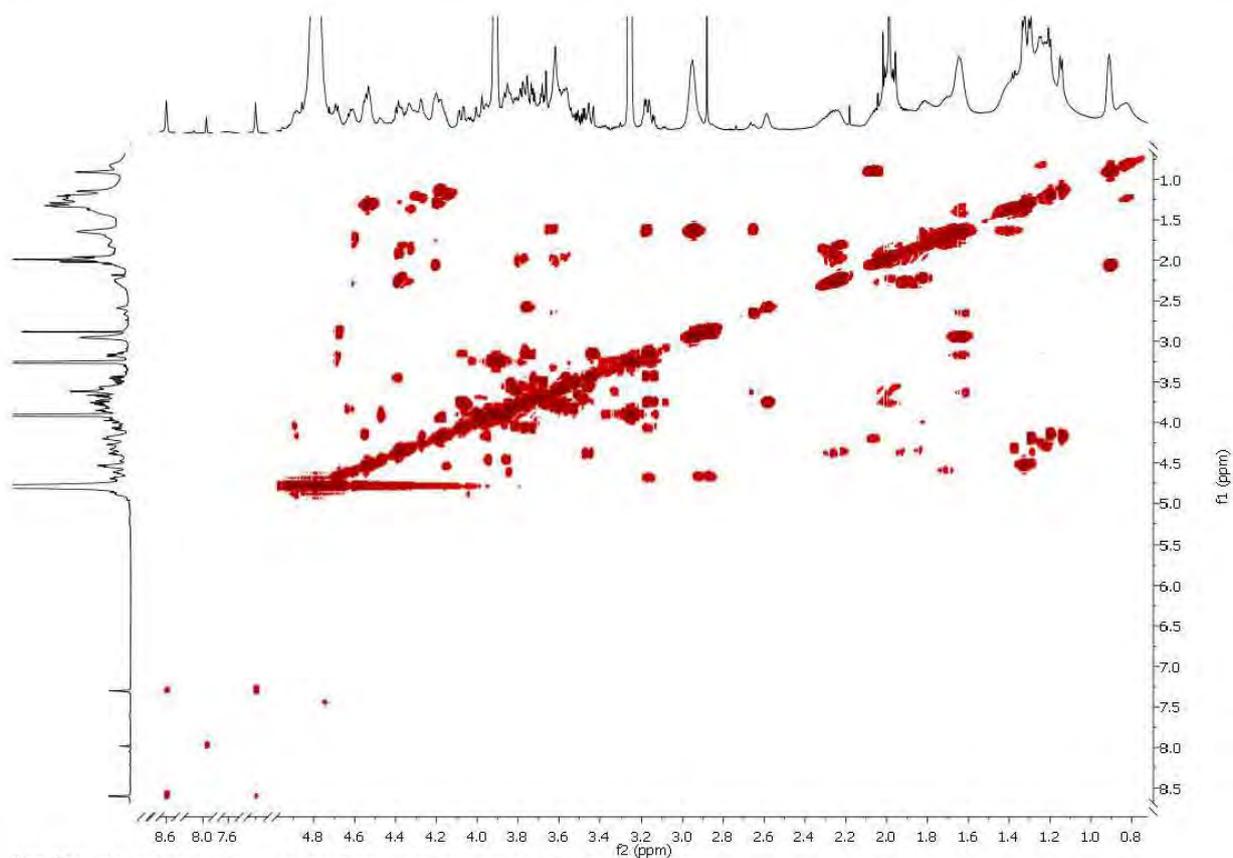
ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 194.



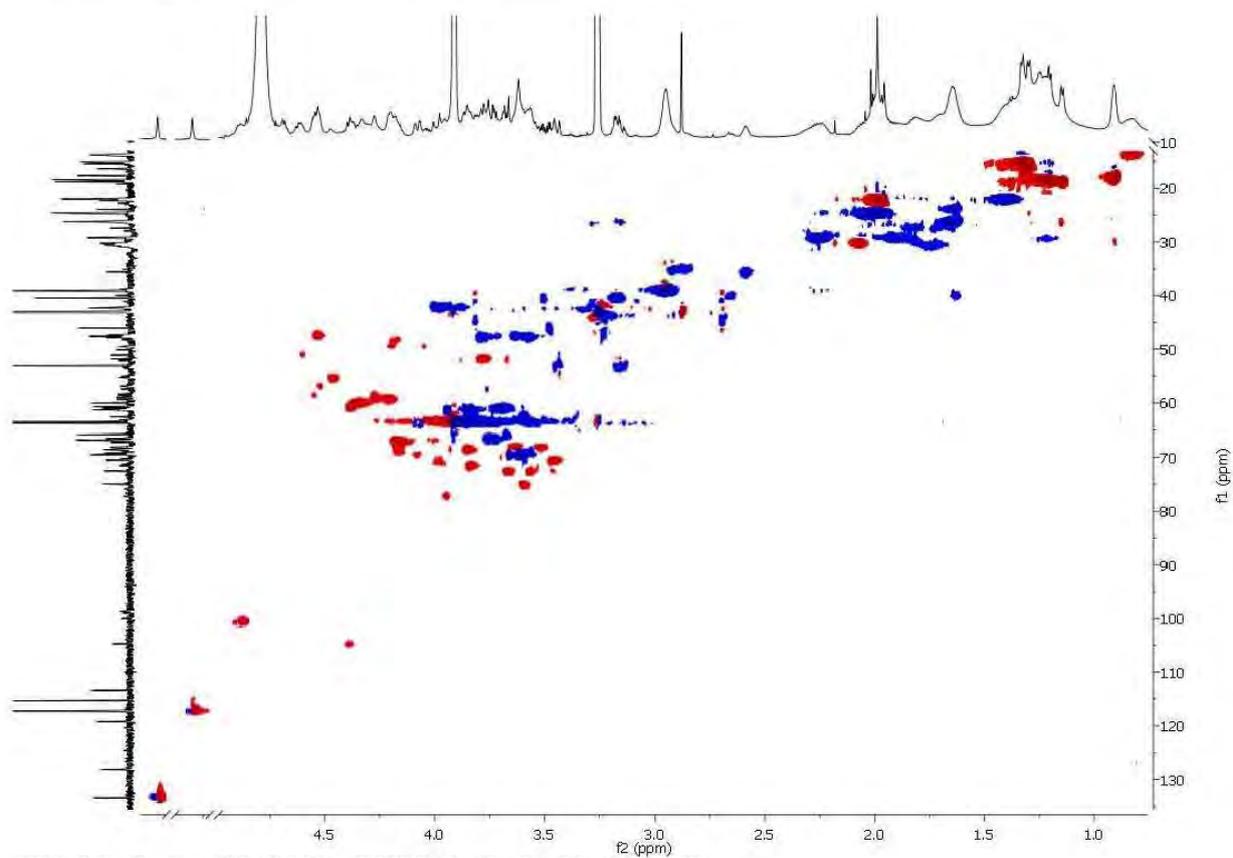
¹H-Spektrum (600 MHz, D₂O) der Verbindung 199.



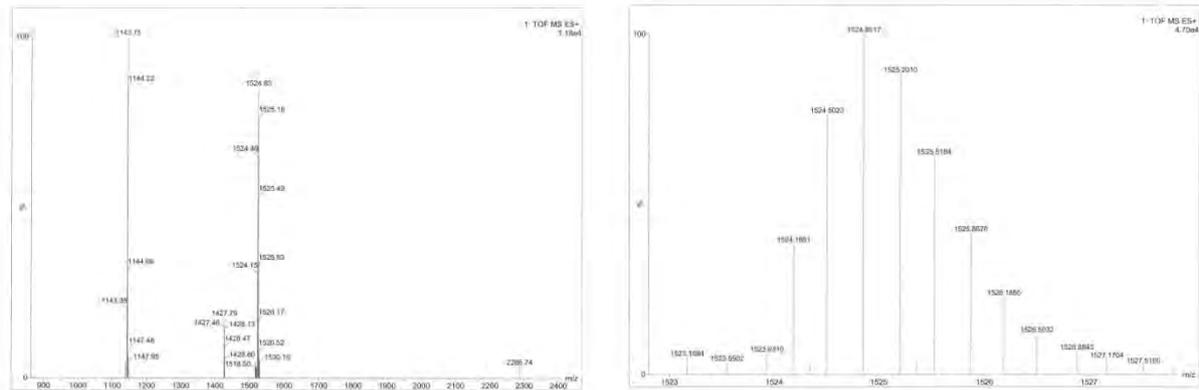
¹³C-BB-Spektrum (150.9 MHz, D₂O) der Verbindung 199.



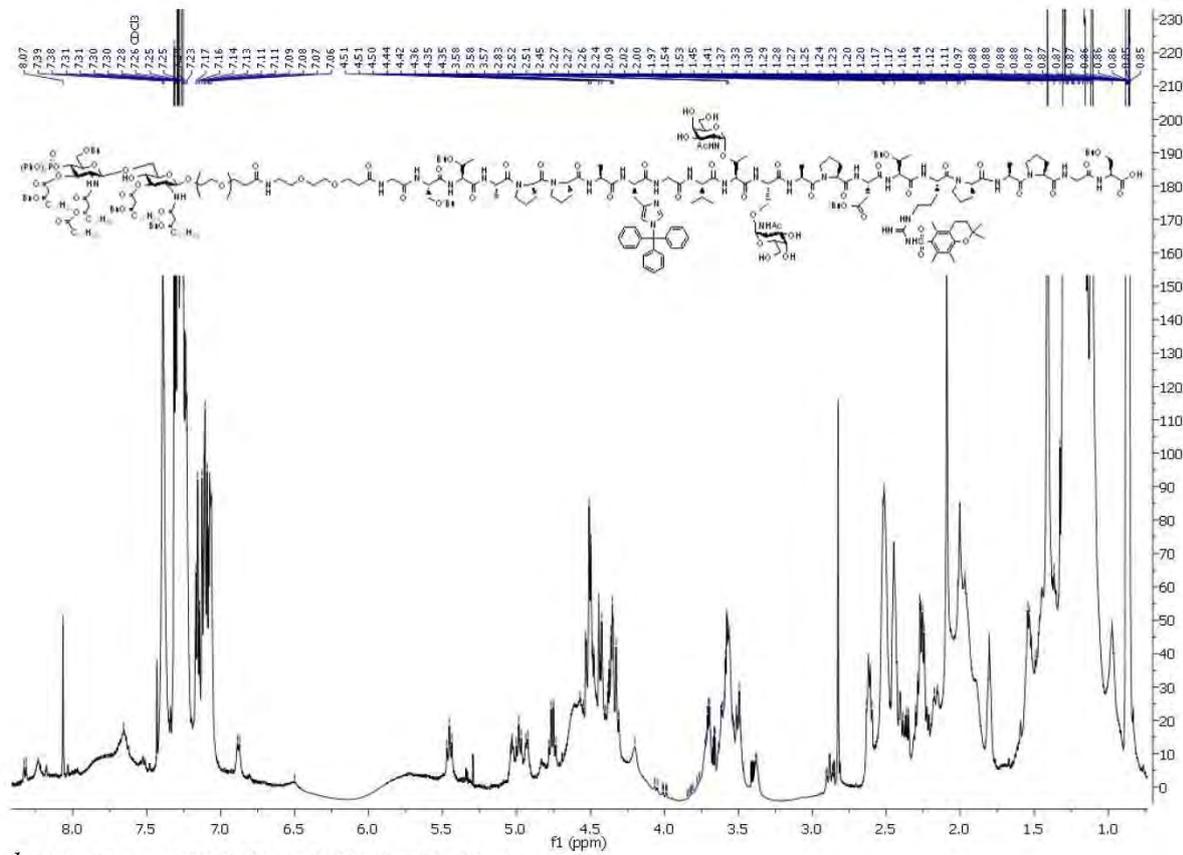
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, D_2O) der Verbindung 199.



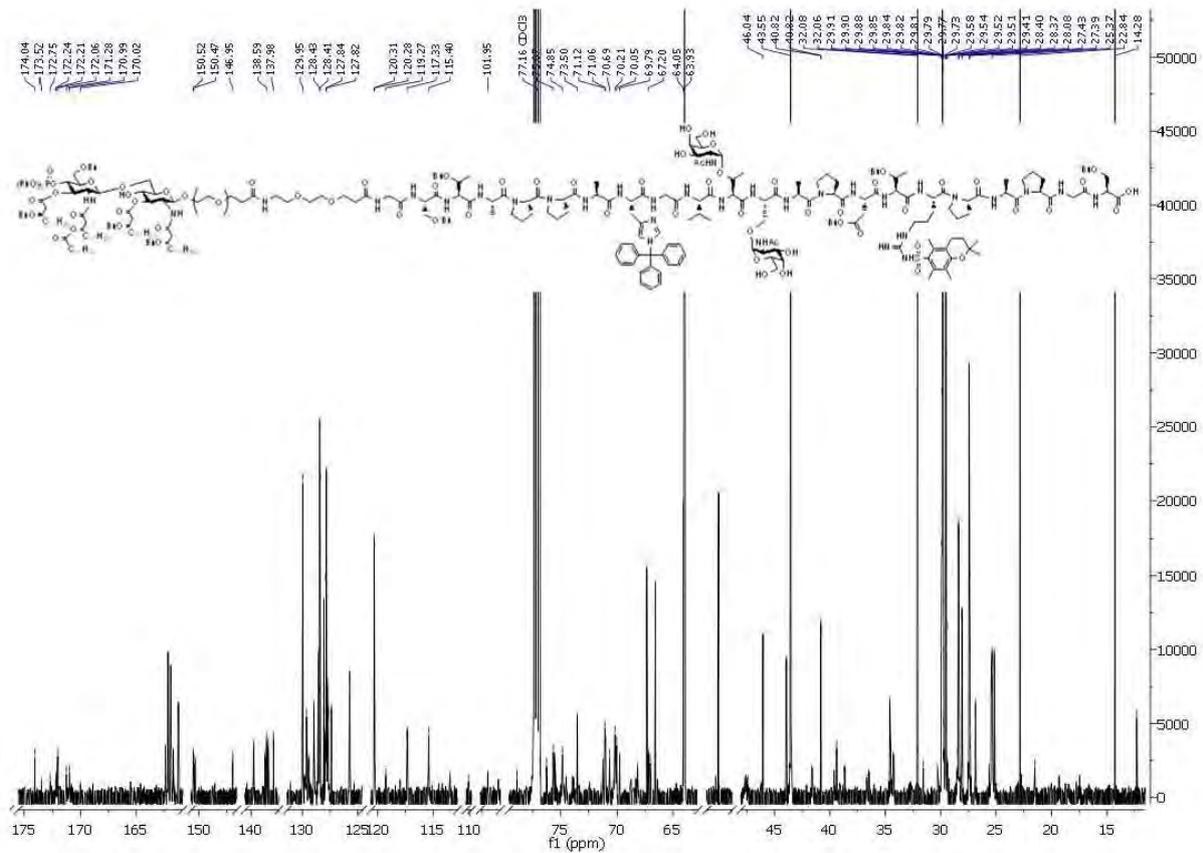
HSQC-Spektrum (150.9 MHz, DMSO-d_6) der Verbindung 199.



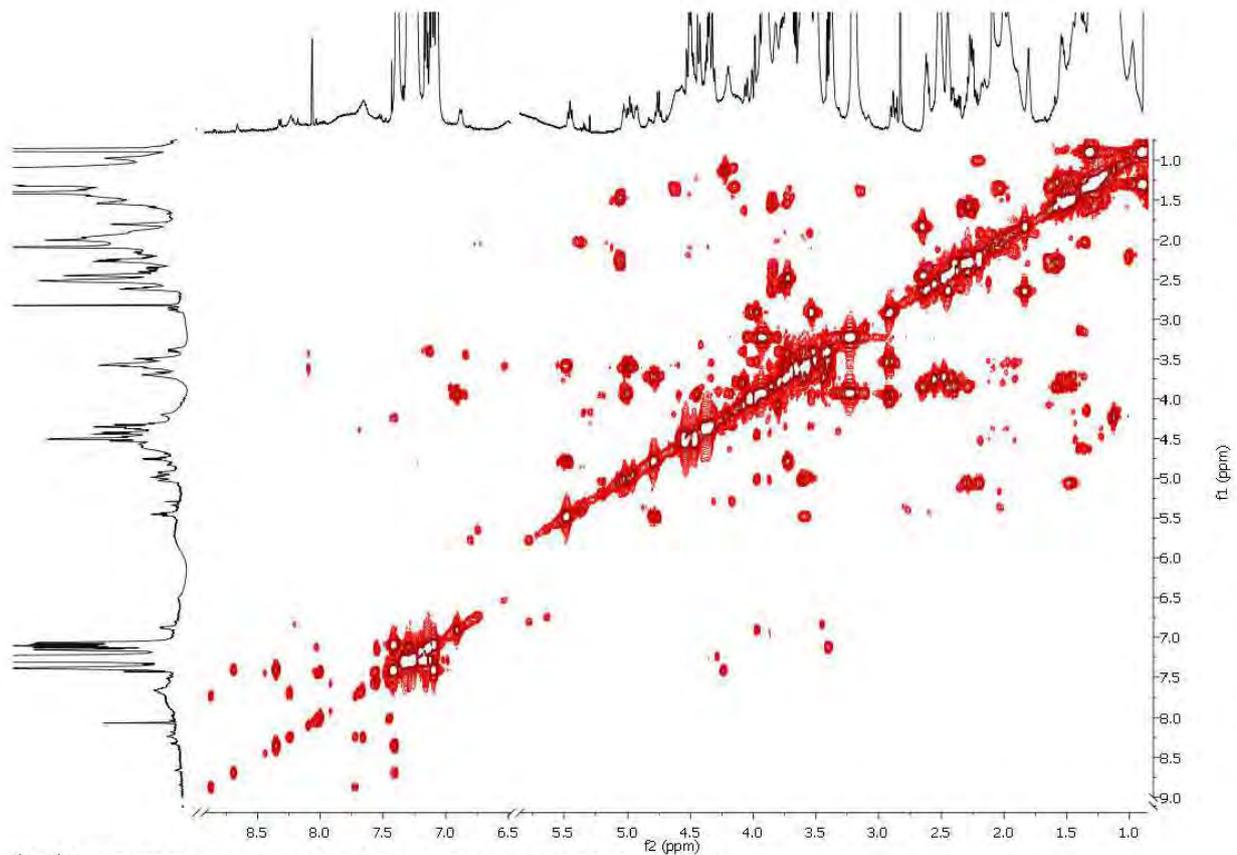
ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 199.



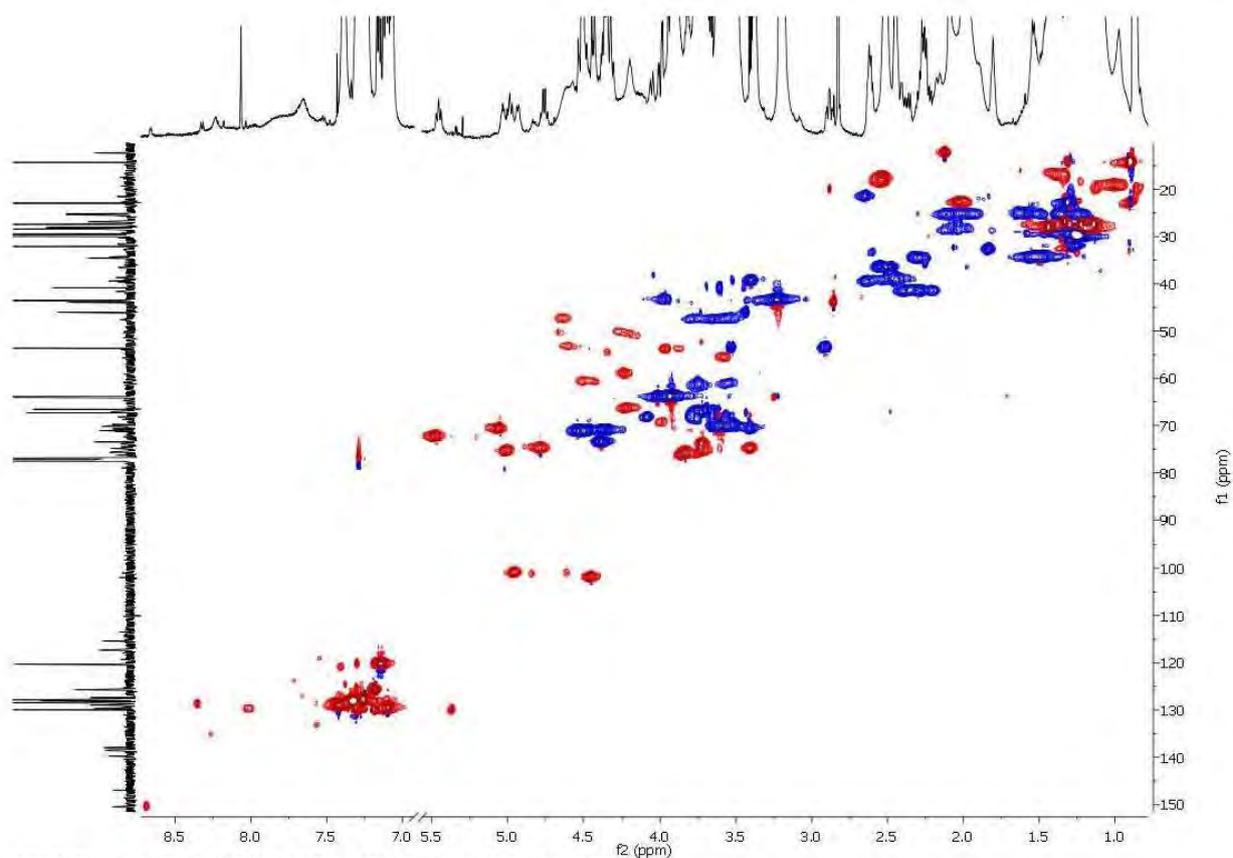
¹H-Spektrum (600 MHz, CDCl₃) der Verbindung 204.



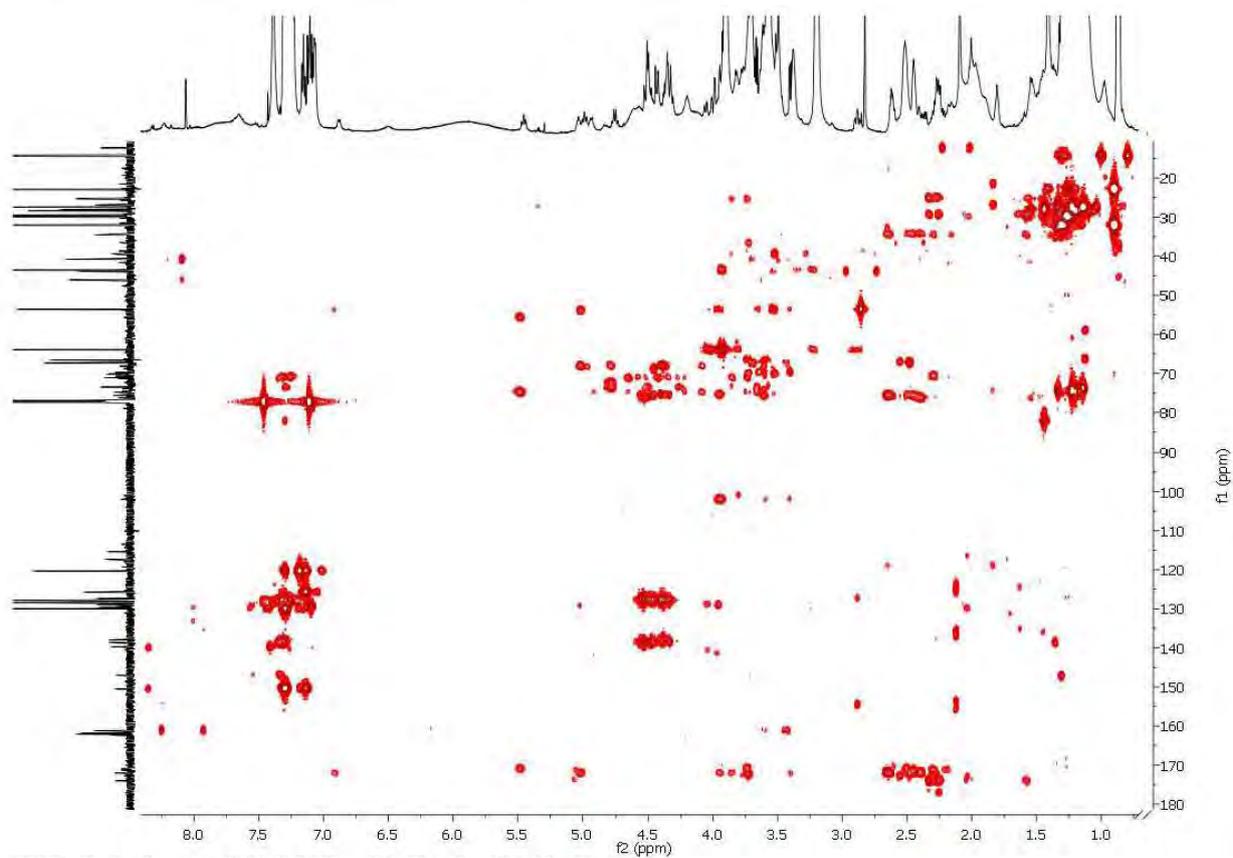
¹³C-NMR-Spektrum (150.9 MHz, CDCl₃) der Verbindung 204.



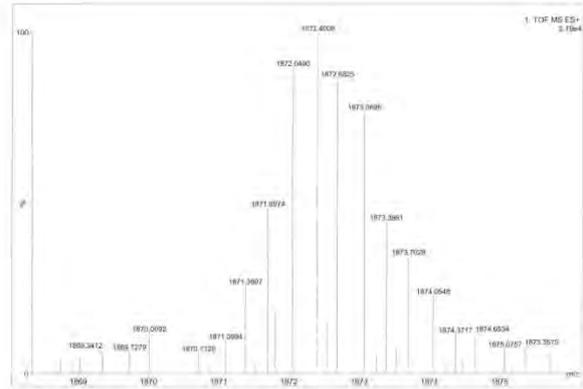
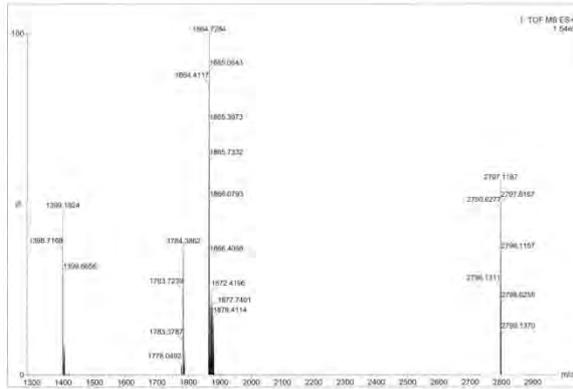
¹H-¹H-COSY-Spektrum (600 MHz, CDCl₃) der Verbindung 204.



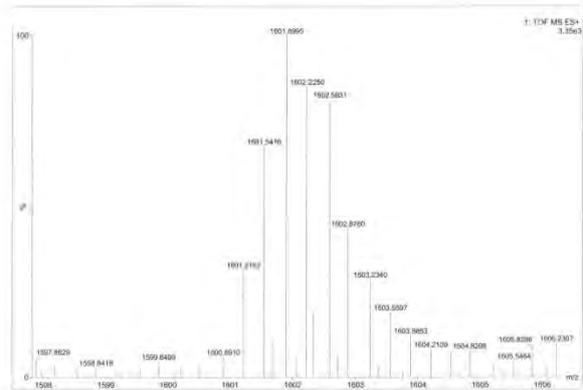
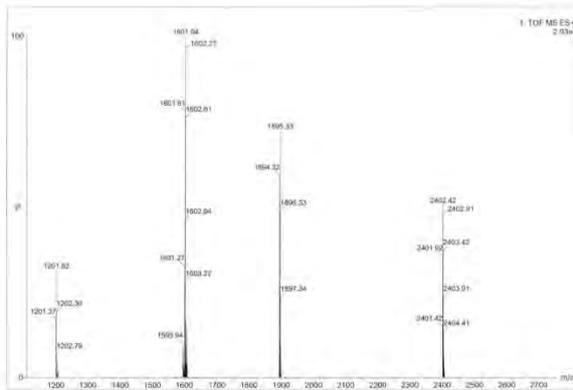
HSQC-Spektrum (150.9 MHz, CDCl₃) der Verbindung 204.



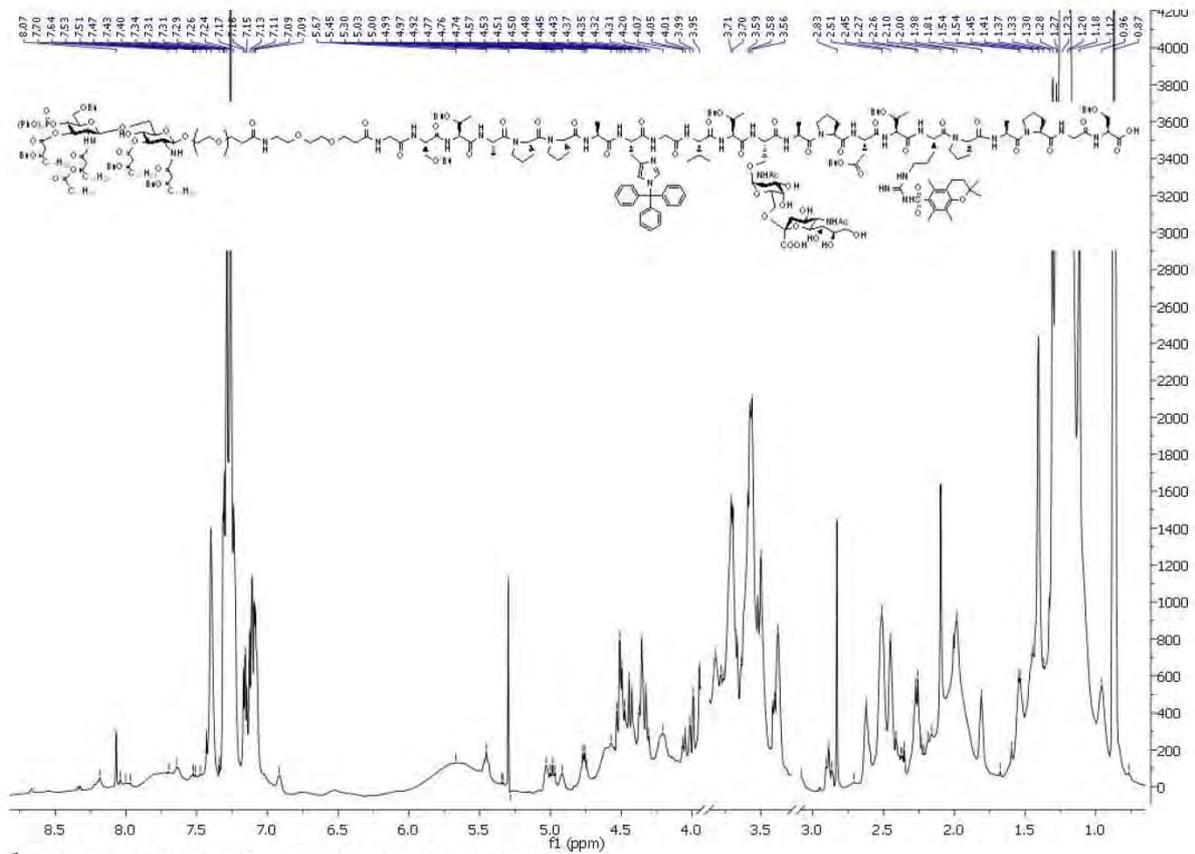
HMBC-Spektrum (150.9 MHz, CDCl₃) der Verbindung 204.

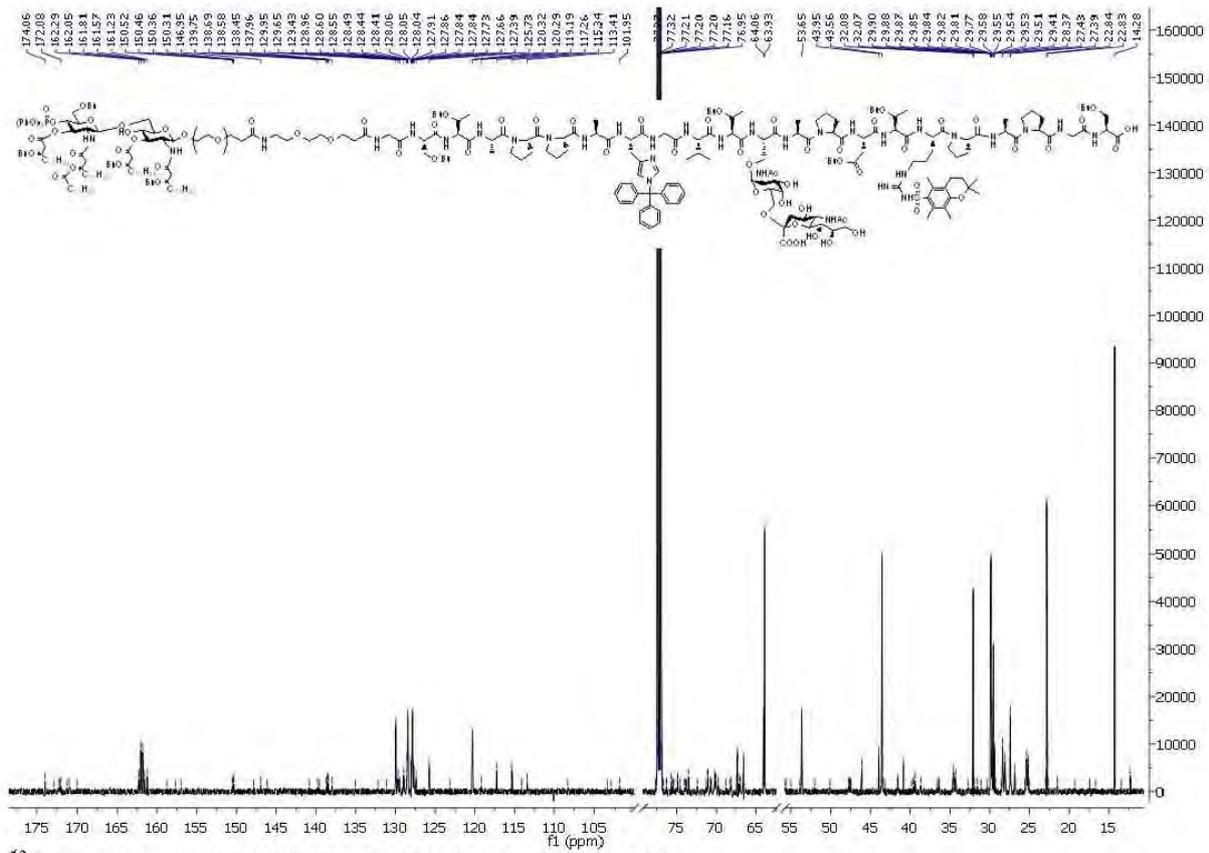


ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 204.

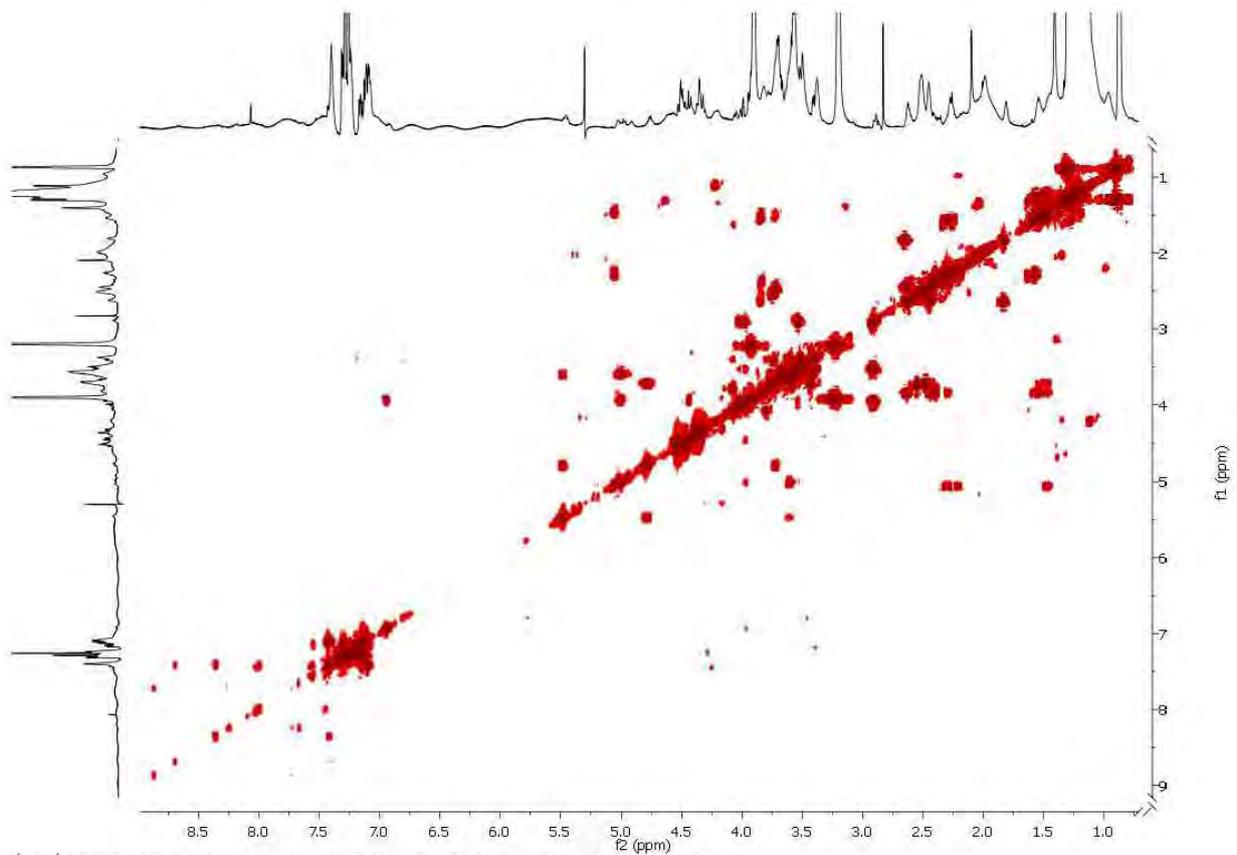


ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 205.

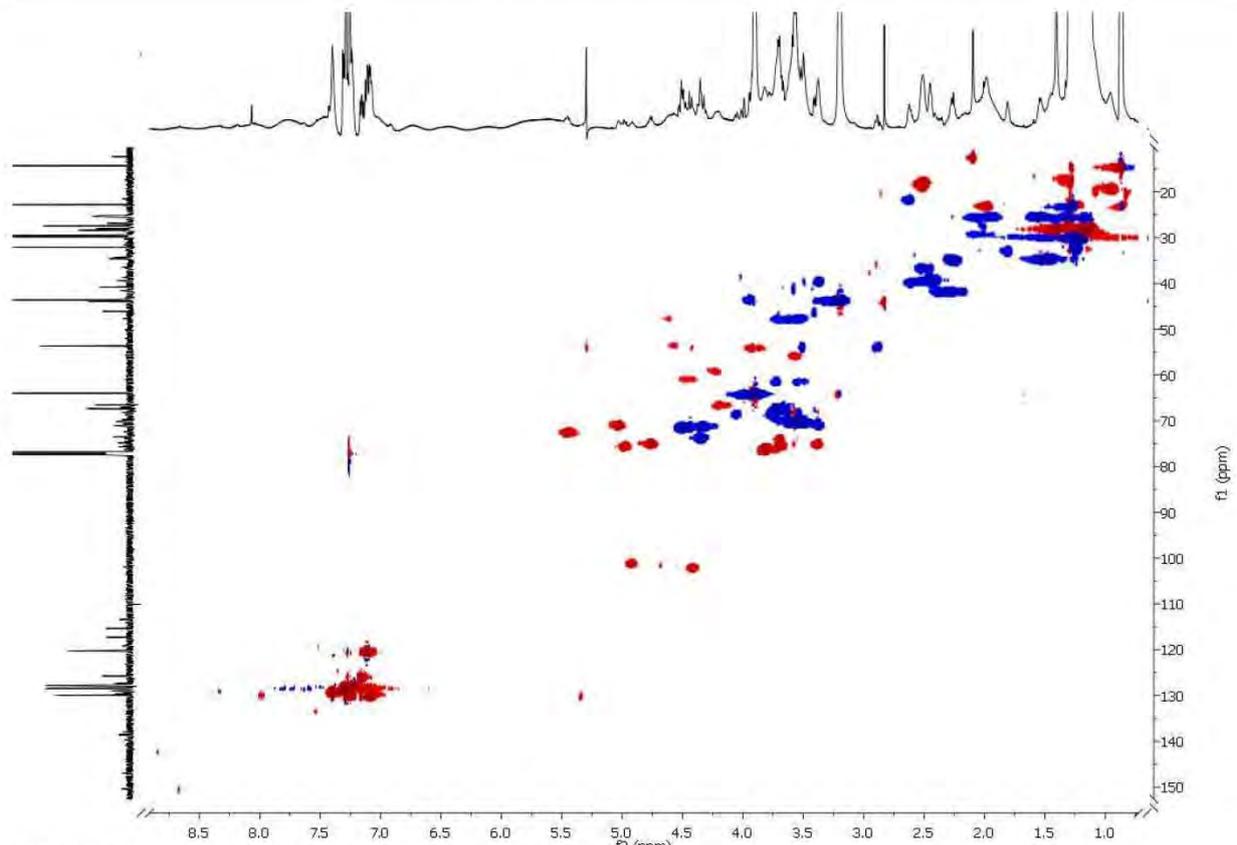




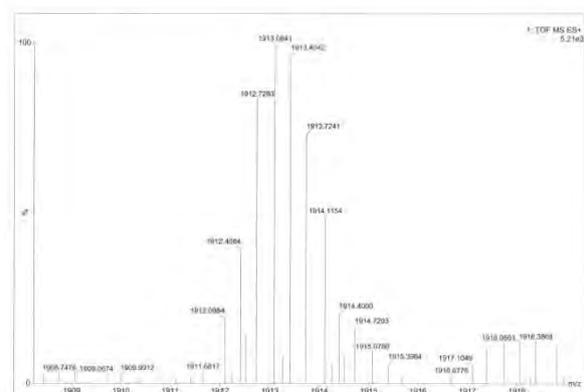
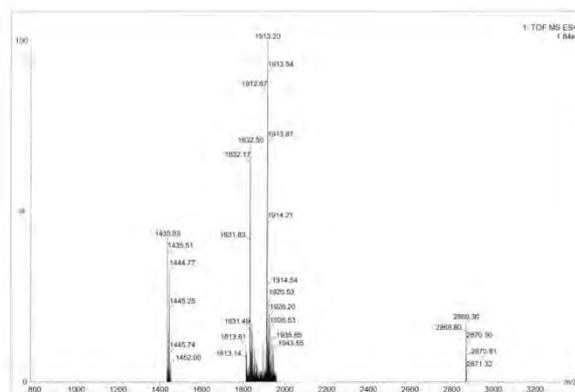
^{13}C -BB-Spektrum (150.9 MHz, CDCl_3) der Verbindung 206.



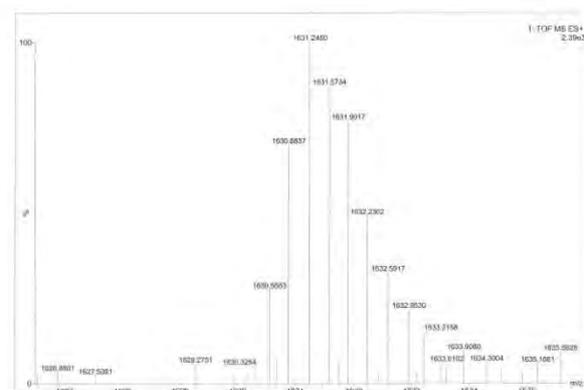
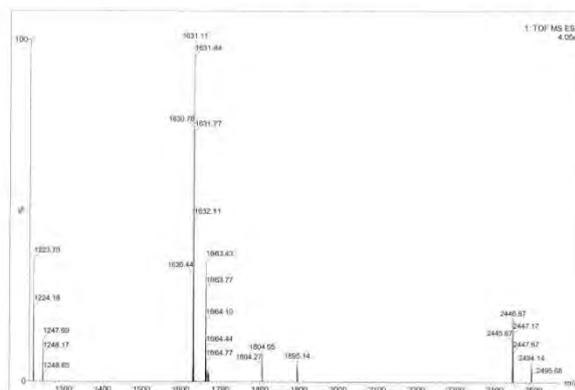
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) der Verbindung 206.



HSQC-Spektrum (150.9 MHz, CDCl₃) der Verbindung 206.



ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 206.



ESI-TOF und HR-ESI-TOF Massenspektrum der Verbindung 207.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. [REDACTED] danke ich für die Freiheiten bei der Bearbeitung meines Themas und für die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Bedanken möchte ich mich bei [REDACTED] und [REDACTED], die mich im Rahmen des vierwöchigen forschungsorientierten Praktikums unterstützt haben.

Den Mitgliedern der NMR-Abteilung sei für die Aufnahme der zweidimensionalen NMR-Spektren gedankt.

Ganz besonders möchte ich mich bei den Mitgliedern der Abteilung für Massenspektrometrie bedanken. Ohne die zahlreichen und kurzfristig erfolgten Messungen wäre die große Anzahl an Synthesen nicht möglich gewesen. Besonderer Dank gilt Herrn [REDACTED] für seine Hilfe und Geduld, besonders bei den schwierig zu vermessenen Lipiden, bei denen mehrfache Messungen notwendig waren. Frau Dr. [REDACTED] danke ich für die Aufnahmen der MALDI-TOF-Massenspektren.

Prof. Dr. [REDACTED] danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes von 2010 bis zur Fertigstellung der experimentellen Arbeit. Prof. Dr. [REDACTED] danke ich für die Möglichkeit der Benutzung der HPLC.

Bei [REDACTED] und [REDACTED] möchte ich mich für die Durchsicht der vorliegenden Arbeit bedanken. Danken möchte ich außerdem [REDACTED] für seine stete Hilfsbereitschaft bei den Bestellungen.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich unterstützt und Geduld aufgebracht haben.

Persönlichkeiten werden nicht durch schöne Reden geformt, sondern durch Arbeit und eigene Leistung.

(Albert Einstein)

