

# **Synthese von tumorassoziierten Glycopeptiden basierend auf der epithelialen Struktur des MUC1**

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

Fauziya Syed  
Geboren in Wiesbaden

Mainz, 2012





Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit  
von August 2006 bis Juli 2012  
am Institut für Organische Chemie  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz  
unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Horst Kunz angefertigt.



Für meine Familie



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Krebs .....	1
1.2 Tumorassoziierte Antigene (TAA) .....	3
1.3 Mucine .....	3
1.4 MUC1 und Krebs .....	7
1.5 Vakzine .....	10
1.6 Festphasensynthese.....	11
1.7 Säuren-und Basenlabilität der O-Glycopeptide .....	15
<b>2 Zielsetzung .....</b>	<b>17</b>
<b>3 Syntheseplanung .....</b>	<b>21</b>
3.1 Einbau der Kohlenhydratstruktur in das Glycopeptid .....	21
3.2 Peptidsynthese .....	24
<b>4 Allgemeiner Teil .....</b>	<b>27</b>
4.1 Synthese des T <sub>N</sub> -Antigens .....	27
4.2 Synthese des Sialyl-T <sub>N</sub> -Antigens.....	34
4.3 Synthese des T-Antigens .....	39
4.4 Synthese des (2,6)-Sialyl-T-Antigens.....	43
4.5 Synthese des (2,3)-Sialyl-T-Antigens.....	45
4.6 Die B-Zell-Aktivierung <sup>[98-100]</sup> .....	49
4.7 Immunantwort.....	50
4.8 Synthese des Triethylenglycolspacers .....	53
4.9 Das Immunoadjuvant Pam <sub>3</sub> CysOH.....	54
4.10 Synthese von Pam <sub>3</sub> CysOH.....	57
4.11 Das allgemeine Protokoll der Festphasensynthese .....	58
4.12 Nebenreaktionen bei der Festphasensynthese .....	63
4.13 Synthese der mit Quadratsäureester umgesetzte MUC1-Konjugate.....	65
4.14 Festphasensynthese von Pam <sub>3</sub> Cys-Ser-(Lys) <sub>4</sub> .....	69
4.15 Synthese von Heterotop-Konjugaten .....	73
4.16 Synthese der OVA <sub>323-339</sub> -MUC1-Konjugate .....	74
4.17 Glycopeptiddendrimere <sup>[155-156]</sup> .....	81
4.18 MAP.....	81
4.19 Die Synthese von octameren MUC1-Glycopeptiden .....	83



4.20	Diskussion der immunologischen Ergebnisse .....	88
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>105</b>
6.1	Allgemeines und Messgeräte .....	105
6.2	Synthese des T <sub>N</sub> -Antigen-Bausteins .....	113
6.3	Synthese des Sialyl-T <sub>N</sub> -Antigens .....	123
6.4	Synthese des T-Antigen-Konjugates.....	130
6.5	Synthese des T-Antigens .....	135
6.6	Synthese des (2,6)-Sialyl-T-Antigens .....	138
6.7	Synthese des 2,3-Sialyl-T-Antigens.....	142
6.8	Darstellung des Triethylglycolspacers .....	149
6.9	Synthese von Pam <sub>3</sub> CysOH .....	153
6.10	Festphasenpeptid- und -glycopeptidsynthesen .....	159
6.11	Darstellung der Glycopeptide basierend auf der MUC1-Struktur und Spacer .....	160
6.12	Darstellung der Quadratsäuremonoester .....	164
6.13	Darstellung der BSA-und TTox-Konjugate .....	166
6.14	Darstellung der Mitogen-Konjugate.....	169
6.15	Darstellung der OVA-Spacer-MUC1-Konjugate.....	173
6.16	Dendrimer-Synthese .....	182
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>185</b>
<b>8</b>	<b>Spektrenanhang.....</b>	<b>191</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Darstellung der Vakzin-Antwort.....	2
Abbildung 1.2: Normales und tumorassoziiertes MUC.....	6
Abbildung 1.3: Vergleich einer gesunden und malignen Epithelzelle.....	8
Abbildung 1.4: Die O-Glycosylierung von Proteinen.....	9
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Peptidfestphasensynthese.....	12
Abbildung 1.6: Kupplungsadditiv HOBt und HOAt.....	14
Abbildung 1.7: Kupplungsreagenzien O-HBTU und O-HATU.....	14
Abbildung 1.8: Kupplungsreagenzien N-HBTU und N-HATU.....	15
Abbildung 1.9: Säurelabilität der Glycopeptide.....	15
Abbildung 1.10: Basenlabilität der Glycopeptide.....	16
Abbildung 2.1: Zielstruktur aus der extrazellulären Tandem Repeat Einheit.....	17
Abbildung 2.2: MUC1 - Sequenz mit der glycosylierten Aminosäure in der PDTRP-Region.....	18
Abbildung 2.3: Kohlenhydrat-Antigene, die in die MUC1-Struktur eingebaut werden.....	18
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Tumorstoffe.....	19
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Mitogen-Konjugate.....	19
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Dendrimers.....	20
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Synthese von Disacchariden. <sup>[57]</sup> .....	21
Abbildung 3.2: Schema der dargestellten Antigen-Threonin-Konjugate.....	23
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Festphasensynthese.....	25
Abbildung 4.1: Synthese des 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha,\beta$ -D-galactosylnitrat.....	28
Abbildung 4.2: Redoxreaktion der Azidonitratisierung.....	28
Abbildung 4.3: Postulierter Reaktionsmechanismus nach Lemieux.....	28
Abbildung 4.4: Nukleophile Substitution der Nitratgruppe zum $\alpha$ -Galactosylbromid.....	29
Abbildung 4.5: Darstellung der mit Fmoc- und tert-Butylester-geschützten Aminosäure.....	29
Abbildung 4.6: Darstellung der einfach ( <b>11</b> ) und doppelt geschützten Aminosäure ( <b>12</b> ).....	30
Abbildung 4.7: Glycosylierung von Fmoc-Thr-OtBu ( <b>11</b> ) mit Galactosylbromid ( <b>8</b> ).....	30
Abbildung 4.8: Reduktive N-Acetylierung.....	31
Abbildung 4.9: Selektive De-O-acetylierung durch Zemplén-Verseifung.....	31
Abbildung 4.10: Reaktionsmechanismus der Zemplén-Verseifung <sup>[75]</sup> .....	32
Abbildung 4.11: Wanderung der Acetylgruppen.....	32
Abbildung 4.12: Nebenreaktion bei der Zemplén-Deblockierung.....	33
Abbildung 4.13: Darstellung des T <sub>N</sub> -Antigen-Festphasenbausteins.....	33
Abbildung 4.14: Die Bildung des Glycals ( <b>23</b> ).....	34
Abbildung 4.15: Synthese des Sialindonors.....	35
Abbildung 4.16: Synthese von Methylsulfenylbromid.....	36
Abbildung 4.17: Darstellung des Sialindonors und Umsetzung zum Glycosid.....	36

Abbildung 4.18: Reaktionskontrolle durch den Nitrileffekt.....	37
Abbildung 4.19: Synthese des 2,6-Sialyl-T <sub>N</sub> -Bausteins. ....	38
Abbildung 4.20: Darstellung des Sialyl-T <sub>N</sub> -Bausteins (40).....	39
Abbildung 4.21: Blockierung der 4- und 6-Hydroxylfunktion. ....	40
Abbildung 4.22: Synthese des Galactosyldonors.....	41
Abbildung 4.23: Synthese des T-Antigen-Konjugats unter Helferich-Bedingungen.....	41
Abbildung 4.24: Basenunterstützte Bildung des Orthoesters 49. ....	42
Abbildung 4.25: Säurekatalysierte Abspaltung der Benzylidenacetalschutzgruppe. ....	43
Abbildung 4.26: Sialylierung zum (2,6)-Sialyl-T-Antigen.....	43
Abbildung 4.27: Die Bildung des β-Nitrilium-Konjugats. ....	44
Abbildung 4.28: Deblockierung des tert-Butylesters.....	45
Abbildung 4.29: O-Deacetylierung des T-Antigen-Konjugats. ....	46
Abbildung 4.30: Sialylierung zum (2,3)-T-Antigen (54).....	47
Abbildung 4.31: Abspaltung der Benzylidenacetal-Schutzgruppe.....	47
Abbildung 4.32: Acetylierung zum vollständig geschützten (2,3)-Sialyl-T-Antigen.....	48
Abbildung 4.33: (2,3)-Sialyl-T-Antigen für die Festphasensynthese.....	48
Abbildung 4.34: Aktivierung der B-Zellen durch die Wechselwirkung mit T <sub>H</sub> -Zellen. ....	49
Abbildung 4.35: Der Carrier-Effekt. ....	51
Abbildung 4.36: Konjugation zwischen B-und T-Zell-Epitop.....	53
Abbildung 4.37: Synthese des Triethylenglycolspacers 64. ....	54
Abbildung 4.38: Die Struktur von Pam <sub>3</sub> CysOH ( <b>73</b> ). ....	55
Abbildung 4.39: Struktur des Pam <sub>3</sub> Cys-Ser-(Lys) <sub>4</sub> .....	55
Abbildung 4.40: Fragmentkondensation des MUC1-Glycopeptides mit Pam <sub>3</sub> Cys(Lys) <sub>4</sub> . ....	57
Abbildung 4.41: Synthese von Pam <sub>3</sub> CysOH ( <b>73</b> ). ....	58
Abbildung 4.42: Übersicht der mit Schutzgruppen versehenen Aminosäuren.....	59
Abbildung 4.43: Fmoc-Abspaltung mit Piperidin. ....	60
Abbildung 4.44: Aktivierung der Carbonsäure mit HBTU. ....	61
Abbildung 4.45: Einsatz von TIPS als Kationenscavenger. ....	62
Abbildung 4.46: Enantiomerisierung via Oxazolone Bildung.....	63
Abbildung 4.47: Diketopiperazin-Bildung. ....	64
Abbildung 4.48: Bildung des Aspartimids. ....	64
Abbildung 4.49: Reaktionsschema der Festphasensynthese der Glycopeptide <b>74</b> und <b>75</b> . ...	65
Abbildung 4.50: Deblockieren der Glycopeptide.....	66
Abbildung 4.51: Darstellung der Quadratsäuremonoamide ( <b>80, 81</b> ).....	67
Abbildung 4.52: Darstellung der BSA/TTox-Konjugate. ....	68
Abbildung 4.53: Synthese von Pam <sub>3</sub> Cys-Ser-(Lys) <sub>4</sub> ( <b>85</b> ).....	69
Abbildung 4.54: Festphasensynthese des OVA-Spacer-MUC1-Spacer-Grundgerüsts ( <b>88</b> )...	70
Abbildung 4.55: Fragmentkondensation zu ( <b>90</b> ). ....	72
Abbildung 4.56: Beispiel eines möglichen Heterotop-Konjugates. ....	73

Abbildung 4.57: Synthese der Heterokonjugats ( <b>91</b> ). .....	75
Abbildung 4.58: Deacetylierung mit wässriger NaOH zum entschützten Glycopeptid ( <b>90</b> ). ...	76
Abbildung 4.59: Synthese der T-Antigen sialierten Glycopeptide ( <b>93, 94, 95</b> ). .....	77
Abbildung 4.60: Acetyl- und Benzylesterabspaltung unter basischen Bedingungen. ....	78
Abbildung 4.61: Deblockierung der sialylierten Glycopeptide ( <b>97, 98</b> ). .....	80
Abbildung 4.62: Darstellung des octameren und tetrameren Lysin-Cores.....	82
Abbildung 4.63. Synthese des Glycodendrimers ( <b>100</b> ). .....	84
Abbildung 4.64: Deblockieren des Glycodendrimers ( <b>101</b> ). .....	86
Abbildung 4.65: ESI-MS-Spektrum des Dendrimers ( <b>100</b> ). .....	87
Abbildung 4.66: Ausschnitt aus dem <sup>1</sup> H-NMR des octameren Glycopeptids.....	88
Abbildung 4.67: Schematische Darstellung des ELISA-Verfahrens. ....	89
Abbildung 4.68: Reduktion des farblosen ABTS-Farbstoffes zum grünen Radikal.....	91
Abbildung 4.69: Diagramm 1 Beschichtung der Mikrotiterplatte mit MUC1(20)Thr <sup>11</sup> ST <sub>N</sub> -BSA. .....	92
Abbildung 4.70: Diagramm 2 des ELISA-Verfahrens, Beschichtung der Mikrotiterplatte mit MUC1(20)Thr <sup>11</sup> T <sub>N</sub> -BSA. ....	93
Abbildung 4.71:Diagramm 3 des ELISA-Verfahrens, Beschichtung der Mikrotiterplatte mit (MUC1(20)Thr <sup>18</sup> ST <sub>N</sub> ) <sub>8</sub> . .....	95
Abbildung 5.1: Darstellung der synthetisierten Festphasenbausteine. ....	98
Abbildung 5.2: Reaktionsschema der sialylierten Strukturen. ....	99
Abbildung 5.3: Tandem Repeat der MUC1-Sequenz.....	100
Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Impfstoff-Konjugate. ....	100
Abbildung 5.5: BSA/TTox-Konjugate mit Quadratsäure als bifunktionaler Linker.....	101
Abbildung 5.6: Darstellung des Lysin-Cores. ....	101
Abbildung 5.7: Peptidrückgrat des Dendrimers. ....	102
Abbildung 5.8: Schematische Darstellung des Dendrimers. ....	102
Abbildung 5.9: Antiseren von Maus 5 und 8. ....	103
Abbildung 5.10: Konjugation des Pam <sub>3</sub> CKKKK-OH mit H <sub>2</sub> N-Spacer-B-Zell-Spacer-T-Zell-Epitop. .....	103



# Abkürzungsverzeichnis

[ $\alpha$ ]	spezifischer Drehwert
absol.	absolut
ABTS	2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
AK	Antikörper
arom.	aromatisch
AS	Aminosäure
ax	axial
BB	Breitband
BCR	B-Cell Receptor, B-Zell-Rezeptor
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
Bzn	Benzyliden
c	Konzentration
CAN	Cerammoniumnitrat
CFA	Complete Freund's Adjuvant, vollständiges Freund'sches Adjuvant
COSY	Correlated Spectroscopy
d, dd	Dublett, Dublett von Dublett
$\delta$	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie
DC	Dendritische Zellen

DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
dest.	destilliert
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Ethylacetat
EE	Essigsäureethylester
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eq	äquatorial
eq.	Äquivalente
ESI-MS	Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
Et	Ethyl
Fmoc	9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl-methoxy-carbonyl
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxy-carbonyl-succinimidylcarbonat
Gal	D-Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
ges.	gesättigt
h	Stunde
HATU	<i>O</i> -(7-Aza-benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
<sup>13</sup> C <sub>Hex</sub>	Cyclohexan
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation

---

HOAt	1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
<i>i</i> Pr	Isopropyl
i. Vak.	im Vakuum
i. Hochvak.	im Hochvakuum
J	Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin, Hämocyanin der Schlüssellochnapfschnecke
konz.	konzentriert
$\lambda$	Wellenlänge
lat.	lateinisch
Lit.	Literaturangabe
m	Multipllett
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MAP	Multiple Antigen Peptides
mbar	Millibar
Me	Methyl
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
M	Molarität



MS	Massenspektrometrie
MS	Molsieb
NeuNAc	Neuraminsäure
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OTf	Trifluormethansulfonat, Triflat
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
<i>p</i>	<i>para</i>
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphate Buffered Saline
Ph	Phenyl
PHP	Polyhydroxybenzol
Pmb	<i>para</i> -Methoxybenzyliden
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-
ppm	parts per million
q	Quartett
quant.	quantitativ
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
RP	Reverse Phase
Raumtemp.	Raumtemperatur
s	Singulett
SA	Streptavidin
SA-HPO	Streptavidine-horse raddish peroxidase

---

$s_b$	breites Singulett
SG	Schutzgruppe
Schmp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCR	T-Cell Receptor, T-Zell Rezeptor
Tentagel	Polyethylenglycol-Polystyrol-Copolymer
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TLR	Toll like receptor
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOF	Time of Flight
Trt	Trityl
<i>p</i> -TsOH	para-Toluolsulfonsäure
UV	Ultraviolett

<b>Aminosäure</b>	<b>Ein- Buchstaben- Code</b>	<b>Drei- Buchstaben- Code</b>
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Aspartat	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamat	E	Glu
Glutamin	Q	Gln
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Lysin	K	Lys
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs

Unter Krebs (Karzinom, Cancer) versteht man eine krankhafte Veränderung von Zellen, die atypische oder bösartige Gewächse bilden. Es kommt zu einer unkontrollierten Vermehrung der Krebszellen, weil sie sich häufiger und schneller als gesunde Zellen teilen. Die malignen Tumore verbreiten sich nicht nur auf umliegende Zellen, sondern können über Blut- oder Lymphsysteme an entfernteren Stellen des Körpers als Metastasen auftreten. Die unkontrollierte Zellproliferation verdrängt dadurch gesundes Gewebe und zerstört es.<sup>[1]</sup> Krebserkrankungen sind den Menschen seit prähistorischer Zeit bekannt<sup>[2]</sup> und stellen nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar.<sup>[3]</sup> Damit ist die Bekämpfung von Krebs eine große Herausforderung.

Um Krebs zu bekämpfen, bedient sich die Krebstherapie diverser Methoden, die auch miteinander kombiniert werden können. Bei den drei Haupttherapien handelt es sich um die operative Tumorentfernung, die Chemotherapie und die Strahlentherapie. Ein Problem der operativen Tumorentfernung ist, dass die malignen Tumore nicht immer vollständig entfernt werden und die Metastasen weiterwachsen können. Bei der Chemo- und Strahlentherapie wird auch gesundes Gewebe durch die Behandlung beeinflusst, was zu cytotoxischen Nebenwirkungen führen kann. Die durchschnittliche Heilungsrate bezogen auf alle Krebsarten liegt bei 30 bis 40 Prozent. Um den Krebs erfolgreicher bekämpfen zu können, wird nach alternativen Therapiemöglichkeiten gesucht, welche eine selektive und starke antitumorale Wirkung bei Tumorzellen aufweisen. Die Schwierigkeit einer effizienten Tumorthherapie ist, dass erkranktes Gewebe aus körpereigenen Zellen aufgebaut ist und vom Immunsystem nicht als fremd wahrgenommen wird. Das Immunsystem muss folglich zwischen malignen und gesunden Zellen differenzieren, damit eine Therapie erfolgreich angewendet werden kann.<sup>[4]</sup>

Eine Stimulierung des Immunsystems, um Krankheiten wie Krebs zu bekämpfen, kann eine alternative Behandlungstherapie darstellen und wird zu einem wichtigen Forschungspunkt in der onkologischen Forschung. Durch eine Vakzinierung soll das Immunsystem selbst gegen

die Tumorzellen aktiv werden. Erste Anfänge der Immuntherapie im Jahr 1798 gehen auf *Edward Jenner* zurück, der die erste erfolgreiche Vakzination zum Schutz gegen Infektionskrankheiten durchführte, so dass ein Weg für die Entwicklung moderner Impfstoffe geöffnet wurde. Bei der Tumor-Immuntherapie wird durch den Impfstoff eine Immunantwort induziert (Abbildung 1.1). Sie basiert auf der Theorie, dass Tumore spezifische Antigene enthalten. Diese Antigene werden erkannt, wenn sie durch ein intaktes Immunsystem präsentiert und prozessiert werden.<sup>[5]</sup> Ein Vorteil der Vakzine ist die selektive Immunantwort, die gezielt Tumorzellen angreift. Dadurch wird gesundes Gewebe nicht angegriffen und zerstört. Die synthetisierten Vakzine dürfen nicht toxisch sein und sollten eine toleranzbrechende tumorspezifische Immunantwort gegen Tumore und Metastasen auslösen. Ein weiterer Vorteil ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, so dass weitere Tumore oder metastasierende Tumore bekämpft werden.<sup>[6]</sup> Eine Zielstruktur stellt das auf den Epithelzellen exprimierte Mucin MUC1 dar. Da MUC1 vom Organismus selbst gebildet wird, stellt MUC1 auch tumorassoziierte Antigenstrukturen (sogenannte "Eigen-Antigene") dar, die durch immunsuppressive Mechanismen vor einem Angriff durch das Immunsystem des Körpers geschützt sind.

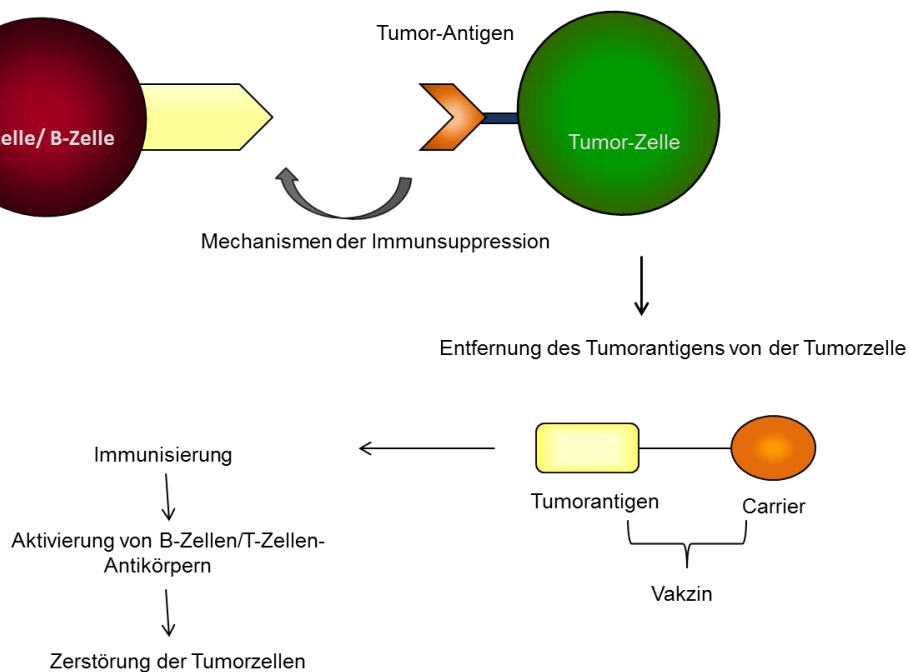


Abbildung 1.1: Darstellung der Vakzin-Antwort.

## 1.2 Tumorassoziierte Antigene (TAA)

An der Oberfläche von Tumorzellen befinden sich charakteristische Molekülstrukturen, die tumorassoziierte Antigene genannt werden. Während Bakterien, Viren oder sonstige Pathogene als körperfremdes Material erkannt werden, ist der Körper nicht in der Lage, die tumorassoziierten Antigene als Gefahr wahrzunehmen, weil sie körpereigene Strukturen sind. Das Immunsystem muss eine Unterscheidung zwischen körperfremdem und körpereigenem Material treffen, um einen Angriff auf körpereigenes Material zu verhindern, was zu Autoimmunerkrankungen führen kann. Diese einerseits lebenswichtige Toleranz geht einher mit dem Risiko des Wachstums von malignen Zellen.

Auf der Oberfläche von Tumorzellen werden die tumorassoziierten Antigene in deutlich erhöhter Zahl exprimiert. Als Molekülstruktur werden häufig Kohlenhydratstrukturen von Oberflächenglycoproteinen gefunden, die auf malignen Zellen veränderte Glycosylierungsmuster aufweisen.<sup>[7-8]</sup>

In den letzten Jahren erlangte MUC1 größeres Interesse, weil ein von der Norm abweichendes Glycosylierungsmuster und eine Überexpression in malignen Zellen diverser Epithelgewebe entdeckt wurde. So sind nicht nur die veränderten Kohlenhydratstrukturen selbst für viele antigene Unterschiede zwischen malignen und benachbarten Zellen verantwortlich. Vielmehr führt eine u.a. fehlerhafte Galactosylierung zu einer vermehrten Exposition des Peptidgerüsts.<sup>[9]</sup>

## 1.3 Mucine

Mucine (lat. *mucus*, Schleim) gehören einer Klasse hochmolekularer und weit verbreiteter Glycoproteine<sup>[10]</sup> an. Glycoproteine nehmen eine bedeutende Rolle in vielen biologisch relevanten Prozessen ein.<sup>[11-12]</sup> Sie sind an der interzellulären Kommunikation, der Regulation des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Zelladhäsion beteiligt. Die membranständigen Adhäsionsmoleküle auf Tumorzellen ermöglichen das Anbinden an Endothelzellen und initiieren den Eintritt der Tumorzelle in gesundes Gewebe, so dass Glycoproteine auch an der Bildung von Metastasen beteiligt sind. Darüber hinaus wird neben der Steuerung des

zellulären Transportes von Proteinen durch die Zellmembran auch die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Proteinen durch deren Kohlenhydratanteil entscheidend beeinflusst. Die Stoffklasse der Glycoproteine ist durch solche Proteine charakterisiert, an deren Proteingerüst eine oder mehrere Oligosaccharidseitenketten kovalent gebunden sind. Die Kohlenhydratstrukturen beeinflussen die Proteine, indem sie sie vor proteolytischem Abbau schützen, die Konformation beeinflussen und die physikochemischen Eigenschaften hinsichtlich der Löslichkeit, elektrischen Ladung und Größe verändern.

Mucine zeichnen sich durch einen hohen Gewichtsanteil der Kohlenhydratseitenketten (50 – 80 %) aus sowie durch serin-, threonin- und prolinreiche Sequenzen. Eine Vielzahl von Epithelzellen exprimieren Mucine. Sie kommen z.B. in den Schleimhautsekreten des Verdauungs- und Bronchialtraktes sowie der Genitalregion vor. Bis heute sind 17 verschiedene humane Mucine (MUC 1-17) charakterisiert,<sup>[13]</sup> die man in sekretorische und membrangebundene Vertreter unterteilen kann. Beide Mucinklassen üben eine Schutzfunktion aus, indem z.B. die sekretorischen Mucine ein viskoses, über Disulfidbrücken verknüpftes oligomeres Mucinsekret ausbilden, welches die Epithelzellen des respiratorischen, gastrointestinalen und reproduktiven Traktes vor externen Reizen bzw. Angriffen schützt. Die membrangebundenen Mucine sind hingegen über eine hydrophobe Domäne in der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran verankert und üben so als Bestandteil der Glycocalyx eine Schutzfunktion für die darunter liegenden Zellen aus. Membrangebundene Mucine sind zudem an Zelladhäsionsprozessen und als Zelloberflächensensoren an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt.<sup>[14]</sup>

Zu den membrangebundenen Mucinen gehören MUC1, MUC3, MUC4 und MUC12, während MUC2, MUC5 und MUC7 zu den sekretorischen Mucinen zählen. Neben den hohen Kohlenhydratanteilen ist ein weiteres gemeinsames Merkmal aller Mucine der Aufbau einer zentralen Kernstruktur mit einer variablen Zahl sich wiederholender Aminosäure-Sequenzeinheiten, die als Tandem Repeat (TR) bezeichnet werden. Obgleich die Aminosäuresequenz für jede Mucinart charakteristisch ist, sind diese TR-Einheiten durch einen hohen Gehalt an Serin, Prolin und Threonin gekennzeichnet. Die Spezifität der Mucine wird zudem nicht nur durch den Aufbau, sondern auch durch die Reihenfolge der Tandem-Repeat-Einheit (*variable numbers of tandem repeat*, VNTR) festgelegt. Zudem weisen diese Bereiche einen hohen Anteil an meist komplexen oligomeren Kohlenhydratseitenketten auf,

wobei als potentielle *O*-Glycosylierungsstellen bevorzugt Threonin und Serin auftreten. Das Glycosylierungsmuster der Mucine ist nicht nur gewebs- und zellspezifisch, sondern auch abhängig vom jeweiligen Entwicklungsstand der Zelle.<sup>[15]</sup>

Die Biosynthese der Mucine ist ein hochkomplexer Vorgang. Im Anschluss an die ribosomale Proteinbiosynthese werden in verschiedenen Kompartimenten des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates Kohlenhydratstrukturen, basierend auf acht verschiedenen Kernstrukturen (Core 1 bis Core 8) aufgebaut (Tabelle 1.1).<sup>[16]</sup> Lösliche und auf Zelloberflächen vorhandene Glycoproteine beinhalten meist sialylierte Core 1-Strukturen, die als Thomson-Friedenreich (TF)-Antigen bezeichnet werden. Ebenso wie die T<sub>N</sub>-Antigenstruktur kann am TF-Antigen an der 6-Position sialyliert werden. Zusätzlich findet an der 3-Position der Galactose eine Glycosylierung mit Sialinsäure statt. Diese beiden Strukturen werden als STF-Antigen zusammengefasst. Die Core-Strukturen 3, 4, 5, 7 und 8 wurden nur in humanen Mucinen gefunden. Die Core 5-Struktur tritt bei verschiedenen Mucinen auf, kommt aber auch im humanen Adenocarcinom vor<sup>[17]</sup>, während die Core 6-Struktur in humanen Glycoproteinen gefunden wurde<sup>[18]</sup> und die Core 7-Strukturen auf den *O*-Glycoproteinen des Speicheldrüsensekretes des Rindes vorkommt.<sup>[19]</sup>

<b>Core 1</b>	D-Gal-β(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Thr/Ser
<b>Core 2</b>	D-Gal-β(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Thr/Ser   β(1-6) D-Glc-NAc
<b>Core 3</b>	D-GlcNAc-β(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Thr/Ser
<b>Core 4</b>	D-GlcNAc-β(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Thr/Ser   β(1-6) D-Glc-NAc
<b>Core 5</b>	D-GalNAc-α(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Thr/Ser
<b>Core 6</b>	D-GlcNAc-β(1-6)-D-GalNAc-α(1-O)-Thr/Ser
<b>Core 7</b>	D-GalNAc-α(1-6)-D-GalNAc-α(1-O)-Thr/Ser
<b>Core 8</b>	D-Gal-α(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Thr/Ser

Tabelle 1.1: Die Core Strukturen.



Die posttranslationale Modifikation beginnt im *cis*-Golgi-Apparat. Hier erfolgt zunächst die selektive Verknüpfung von *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) mit Serin- oder Threoninresten, so dass eine *O*-glycosidische Bindung entsteht. Die Verknüpfung wird durch eine Gruppe von GalNAc-Transferasen mit hoher Spezifität katalysiert.<sup>[7, 9]</sup> In normalen Zellen werden die Saccharidseitenketten beim Durchlaufen des Golgi-Apparates schrittweise verlängert. So führt die Galactosylierung durch eine  $\beta$ 1,3-Galactosyltransferase zu einer Core 1-Struktur, das als Substrat für eine  $\beta$ 1,6-*N*-Acetylglucosamintransferase (C2GnT-I) dient.<sup>[12, 20]</sup> Dabei wird zunächst durch Übertragung von *N*-Acetylglucosamin die Core 2-Struktur ( $\beta$ Gal-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\beta$ GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 6)] $\alpha$ GalNAc) gebildet, die mithilfe verschiedener Glycosyltransferasen in komplexe *N*-Acetylglucosaminketten überführt wird. Im *trans*-Golgi-Apparat wird schließlich das Kettenwachstum durch Anknüpfung von Sialinsäure oder Fucose sowie durch Sulfatierung terminiert.<sup>[21]</sup>

Während in Mucinen gesunder Epithelzellen überwiegend auf der Core 2-Einheit basierende Oligosaccharidstrukturen beobachtet werden, die das Peptidrückgrat effektiv verhüllen, treten bei malignen Zellen abweichende Glycosylierungsmuster auf, deren verkürzte Kohlenhydratseitenkette auf eine fehlerhafte Aktivität verschiedener Glycosyltransferasen zurückzuführen ist (Abbildung 1.2).

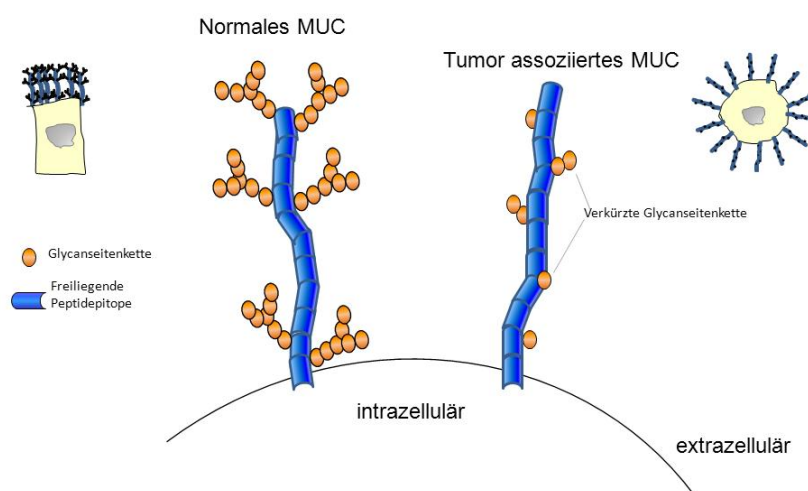


Abbildung 1.2: Normales und tumorassoziiertes MUC.

## 1.4 MUC1 und Krebs

MUC1 wurde als erstes Mucin von *Shimizu* und *Yamauchi* durch Einsatz monoklonaler muriner Antikörper gegen Fetttröpfchen in humaner Milch identifiziert.<sup>[22]</sup> MUC1 stellt ein transmembranständiges Glycoprotein dar, dessen extrazelluläre Domäne aus sich wiederholenden Aminosäuresequenzen besteht. Jede dieser Tandem Repeat-Einheiten enthält 20 Aminosäuren der Sequenz (G V I S A P D I R P A P G S I A P P A H)<sub>n</sub> und damit fünf potenzielle Glycosylierungsstellen.<sup>[23]</sup> Die Anzahl *n* der Tandem Repeat-Einheiten liegt im Bereich von 25 bis 125 und basiert auf einem vererbten Polymorphismus des MUC1-codierenden Genabschnittes.<sup>[24]</sup> MUC1 wird in Form eines Transmembran-Heterodimers exprimiert, dessen unterschiedlich große Monomere nicht kovalent miteinander verbunden sind. Die größere Einheit des Dimers umfasst die Tandem-Repeat-Einheiten. Der hohe Prolinanteil und die große Anzahl der komplexen Kohlenhydratseitenketten begünstigen eine starre langgestreckte Konformation des Peptidgerüsts, die weit in den extrazellulären Raum reicht und damit über die Glycocalyx in das Lumen hineinragt.<sup>[25]</sup> Das kleinere der MUC1-Peptidfragmente hingegen besteht aus der Transmembranregion sowie einer kurzen cytoplasmatischen Domäne, deren Interaktion mit dem Cytoskelett und dessen zahlreichen potenziellen Phosphorylierungsstellen auf eine Beteiligung von MUC1 an Signaltransduktionsprozessen hinweist.<sup>[26]</sup>

Das Mucin MUC1 wird nicht nur in Krebszellen charakteristisch verändert, sondern dessen Überexpression trägt entscheidend zur Entwicklung, Ausbreitung und zum Wachstum von Tumoren bei. So befindet sich MUC1 in gesunden Epithelzellen nur auf der apicalen, d.h. dem Lumen zugewandten Seite der Zelloberfläche. Diese Polarisation ist in der Tumorzelle aufgehoben (Abbildung 1.3).<sup>[27]</sup> Die im Vergleich zur Normalzelle deutlich erhöhte Expression des MUC1 führt zu einer Dominanz auf der gesamten Oberfläche der Tumorzelle. Die langgestreckte Struktur des Proteins und dessen hoher Sialinsäureanteil bewirken zudem eine sterische und elektrostatische Abschirmung der Oberfläche von Tumorzellen. Infolgedessen werden E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte blockiert sowie Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Wechselwirkungen destabilisiert, so dass ein Ablösen aus dem Zellverband und damit die Bildung metastasierender Zellen begünstigt wird.<sup>[28]</sup>

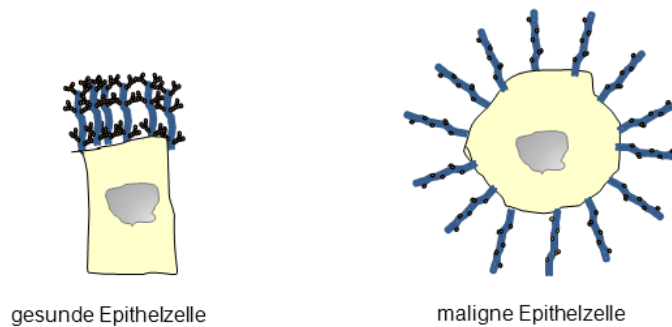
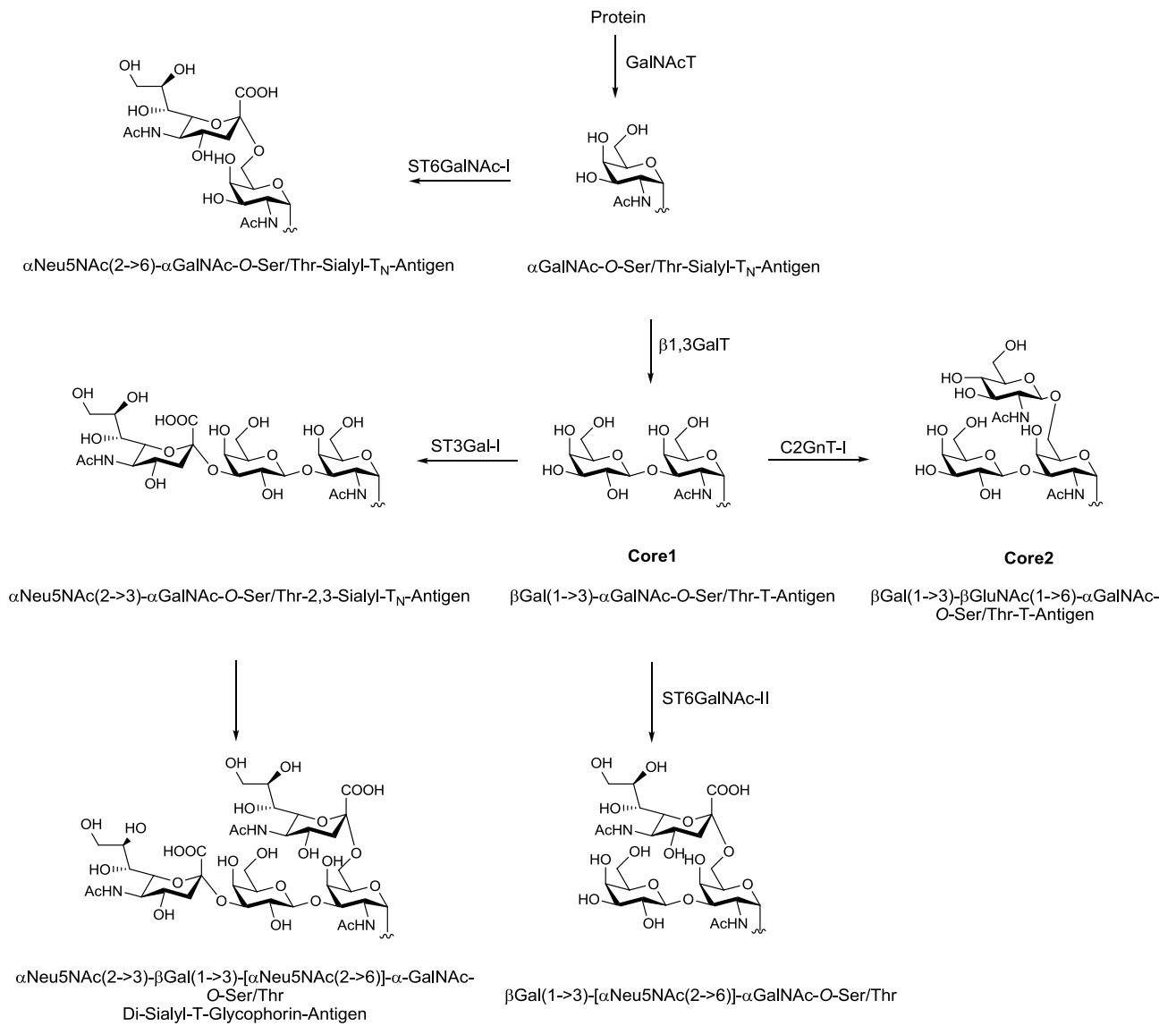


Abbildung 1.3: Vergleich einer gesunden und malignen Epithelzelle.

MUC1 besitzt darüber hinaus eine immunsuppressive Wirkung, indem die Adhäsion von natürlichen Killerzellen und cytotoxischen T-Zellen durch Maskierung anderer geeigneter Oberflächenantigene eingeschränkt wird.<sup>[29]</sup> Das humane Immunsystem kann daher nur in geringem Maße effektiv zur Vernichtung MUC1 exprimierender Zellen beitragen.<sup>[30]</sup> MUC1 liegt auf der apicalen Seite der gesunden Epithelzellen. Bei den meisten Karzinomen findet eine Überexpression des Mucins statt. Daraus resultiert, dass das Mucin auf der gesamten Zelloberfläche vorzufinden ist, was somit den ersten Schritt zur Bildung von metastierenden Zellen bildet.

So werden durch eine stark reduzierte oder fehlende Expression der  $\beta$ 1,6-N-Acetylglucosamintransferase in Krebszelllinien keine komplexen auf der Core 2-Struktur beruhenden Oligosaccharidseitenketten mehr gebildet. Eine gleichzeitig erhöhte Aktivität verschiedener Sialyltransferasen bewirkt zudem eine vorzeitige Sialylierung des Glycoproteins und damit einen Abbruch des Glycankettenwachstums, was zur Bildung der sogenannten tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigenstrukturen führt.<sup>[31]</sup> Wird zu Beginn der Proteinbiosynthese das  $T_N$ -Antigen (N-Acetylgalactosamin) aufgrund der erhöhten Aktivität der  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase ST6GalNAc-I sialyliert, wird das tumorassoziierte Sialyl- $T_N$ -Antigen erhalten, welches auf Zellen von Darm-, Magen-, Ovarial- und Mammakarzinomen vorzufinden ist.<sup>[29-30, 32]</sup> Analog resultiert bei einer stark verminderten C2GnT-I-Aktivität eine verstärkte Bildung der Core I- Struktur (TF-Antigen), die anschließend durch weitere überexprimierte Sialyltransferasen in die beiden regioisomeren (2,3)-Sialyl-T- und (2,6)-Sialyl-T-Antigenstrukturen überführt werden kann (Abbildung 1.4).



GalNAcT: UDP-*N*-Acetyl-D-galactosamin: Polypeptid *N*-Acetylgalactosaminyltransferasen

ST3Gal-I: CMP-Neu5NAc-Gal-1,3-GalNAc-R-2,3-Sialyltransferase-I

$\beta$ -1,3-GalT: Core 1 1,3 Galactosyltransferase

C2GnT-I: Core 2 1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase-I

ST6GalNAc-I: CMP-Neu5NAc: GalNAc-R 2,6 Sialyltransferase-I

ST6GalNAc-II: CMP-Neu5NAc: GalNAc-R 2,6 Sialyltransferase

Abbildung 1.4: Die O-Glycosylierung von Proteinen.

Zur Übersicht sind die wichtigen Kohlenhydrat-Antigene, die bei Tumoren exprimiert werden, in der Tabelle 1.2 dargestellt.

Antigen	Struktur	Expression bei
T <sub>N</sub> -Antigen	$\alpha$ GalNAc	Tumoren der humanen Epithelzellen
T-Antigen	$\beta$ Gal-1,3- $\alpha$ GalNAc	Tumoren des Brustgewebes
Sialyl-T <sub>N</sub> -Antigen	$\alpha$ NeuNAc-2,6- $\alpha$ GalNAc	Brust-, Prostata-, Eierstockkarzinomen
$\alpha$ -2,6-Sialyl-T-Antigen	$\alpha$ NeuNAc-2,3- $\beta$ Gal-1,3- $\alpha$ GalNAc	Darmkarzinomen
$\alpha$ -2,3-Sialyl-T-Antigen	$\beta$ Gal-1,3-[ $\alpha$ NeuNAc-2,6] $\alpha$ GalNAc	Dickdarm und Brustkrebs
Sialyl-Lewis X Antigen	$\alpha$ NeuNAc-2,3- $\beta$ Gal-1,4-[ $\alpha$ Fuc-1,3] $\beta$ GlcNAc	Magen- und Darmkarzinom
Sialyl-Lewis A Antigen	$\alpha$ NeuNAc-2,3- $\beta$ Gal-1,3-[ $\alpha$ Fuc-1,4] $\beta$ GlcNAc	Dickdarmadenokarzinomen

Tabelle 1.2: Übersicht der exprimierten Antigene.

## 1.5 Vakzine

Während virale oder bakterielle Vakzine präventiv zur Bekämpfung von Infektionen eingesetzt werden, erfolgt der Einsatz von Krebsvakzinen nicht prophylaktisch, sondern bei der akuten Behandlung bzw. als subsidiäre Therapie. Dabei ist das Ziel der etablierten Krebsvakzine nicht die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen den primären Tumor, sondern vielmehr ein Angriff auf Metastasen und zirkulierende Tumorzellen.<sup>[33]</sup> Das Ziel der Entwicklung von Anti-Tumorstoffen ist, die Toleranz des Immunsystems gegenüber den tumorassoziierten Antigenen zu brechen und eine starke körpereigene Immunantwort gegen diese auszulösen. Dabei sollte nach Möglichkeit eine widerstandsfähige von T-Helferzellen vermittelte Antikörperproduktion ausgelöst werden und eine starke cytotoxische T-Zellantwort initiiert werden.<sup>[34]</sup> Neben den cytotoxischen T-Lymphocyten sind vor allem die spezifischen Antikörper für die komplementvermittelte Lyse von Tumorzellen und die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses wichtig.<sup>[35]</sup> Wie bereits erwähnt, stellt MUC1 eine herausragende Zielstruktur für die Entwicklung von Krebsvakzinen dar.

Immunologische Studien haben jedoch gezeigt, dass die neoantigenen Kohlenhydratstrukturen nicht für eine hinlängliche humorale und zelluläre Immunantwort ausreichen. Für eine effektive Prozessierung der Antigene und ausreichende Stimulierung der Immunantwort haben sich hingegen MUC1-Glycopeptidfragmente, die neben den tumorassoziierten Antigenen auch Peptidepitope der nativen Proteinsequenz beinhalten, etabliert. So stellen diese Peptidfragmente nicht nur zusätzliche Antigene dar, die im Vergleich zu Kohlenhydraten zumeist auch höhere Antikörperaffinitäten aufweisen, sondern sie bewirken auch einer clusterartige dreidimensionale Präsentation der Antigenstrukturen ähnlich der Zelloberfläche. Rezeptoren, die über Kohlenhydratbindungsstellen verfügen, können zudem die Bindung derartiger kombinierter Glycopeptidstrukturen verstärken, woraus z.B. die Stimulation des Immunsystems gefördert wird.<sup>[36]</sup>

## 1.6 Festphasensynthese

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts synthetisierte *Emil Fischer* das erste Peptid und prägte den Namen dieser Verbindungsklasse.<sup>[37]</sup> Eine gezielte Verknüpfung zweier Aminosäuren unter Bildung eines Dipeptides wird durch die selektive Blockierung der Carboxylgruppe der einen und durch die Blockierung der Aminofunktion der anderen Aminosäure erreicht. Nach Aktivierung der freien Carboxylgruppe kann die Peptidbindung selektiv gebildet werden und die Schutzgruppen können anschließend entfernt werden. Das Rückgrat (backbone) einer Peptidkette wird durch die sich wiederholende Gruppierung  $-NH-CO-CHR-$  gebildet. Die damalige Synthese von Peptiden war nicht nur ein sehr zeitintensiv, sondern auch stark abhängig von den nicht voraussehbaren Löslichkeitseigenschaften der gebildeten Peptidintermediate.

Die Einführung der Festphasensynthese (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) durch *Merrifield* war ein entscheidender Schritt zur Vereinfachung des Aufbaus der Peptide und stellte einen entscheidenden Meilenstein in der Peptidchemie dar.<sup>[38]</sup> Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass das eine Ende des Peptides kovalent an einen Linker gebunden ist und anschließend schrittweise verlängert wird. Der Linker stellt die Verbindung zu einem unlöslichem polymeren Träger her, der aus einem mit 1 % versetztes Divinylbenzol

vernetztem Polystyrol besteht. Die zu synthetisierende Peptidkette ist unlöslich und erlaubt schnelles Waschen und Filtrieren. Nicht umgesetzte lösliche Reagenzien und entstandene lösliche Nebenprodukte werden nicht an den Linker gebunden und können nach jedem Syntheseschritt durch Filtration und Waschen entfernt werden. Die Peptidkette wird durch sukzessives Abspalten der aminoterminalen Schutzgruppe und Kondensation mit der freien Carboxylgruppe einer aminoterminal geschützten Aminosäure verlängert. Anschließend wird der *N*-Terminus deblockiert und die nächste Aminosäure gebunden (Abbildung 1.5). Damit verläuft die chemische Festphasensynthese in entgegengesetzter Richtung zur Biosynthese (chemisch: C-Terminus nach N-Terminus, biochemisch: N-Terminus nach C-Terminus).

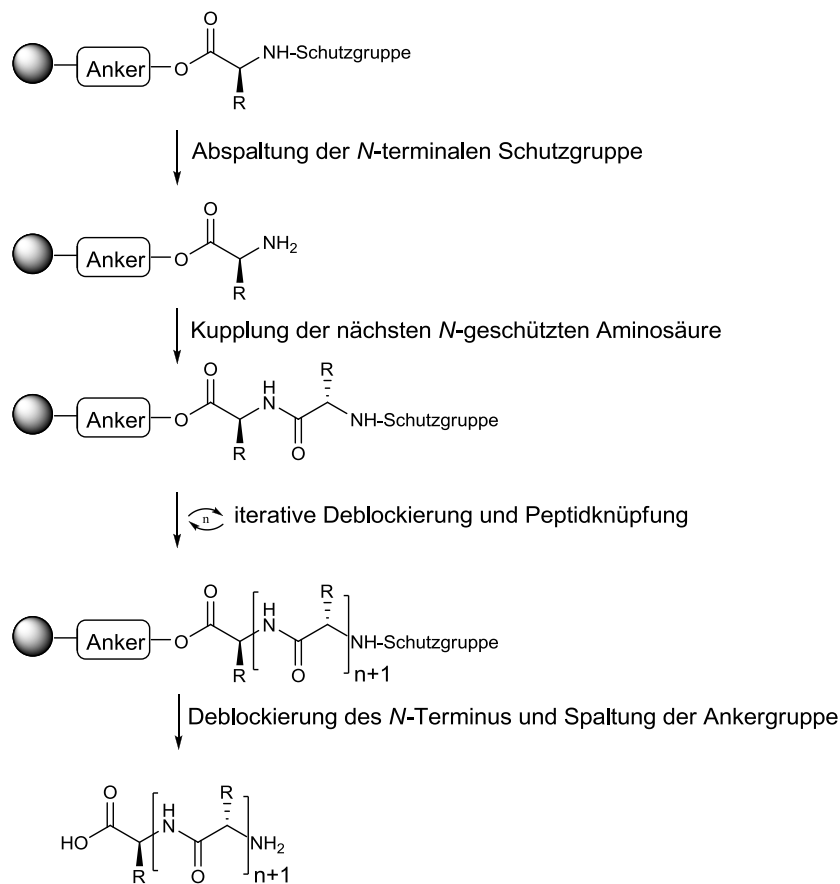


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Peptidfestphasensynthese.

Unter geeigneten Reaktionsbedingungen lässt sich das Peptid leicht vom Ankersystem abspalten, ohne dass das Peptid selbst angegriffen wird. Auch ist die Wahl des Linkersystems entscheidend. Das Linkersystem muss sich unter den Bedingungen der Festphasensynthese

inert verhalten und gleichermaßen muss auch die Abspaltung des Peptides vom Polymer racemisierungsfrei ablaufen.

Die Festphasensynthese ist ein automatisierter vielstufiger Prozess, in dem die Zwischenstufen praktikabel und vollständig aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden, so dass man ohne langwierige Kristallisationsversuche auskommt.

Bei der Wahl des polymeren Trägers muss auf eine Spaltbarkeit vom Peptid geachtet werden. Beim Harz sind die Quell-Eigenschaften und die Beladung wichtig. Gute Quelleigenschaften steigern die Ausbeute und erleichtern die Reaktionen, weil die Reagenzien direkt an den Reaktionsort gelangen. Die Anbindung der ersten Aminosäure an den polymeren Träger erfolgt über eine Ankergruppe. Sie ist das Bindeglied zum Träger. In der *Fmoc*-Strategie werden Linker eingesetzt, die unter sauren Bedingungen gespalten werden, aber basenstabil sind. So wird z.B. der Wang-Anker<sup>[39-40]</sup> (*p*-Hydroxybenzylalkohol, PHB) verwendet, der mit Trifluoressigsäure gespalten wird, wobei auch alle säurelabilen Seiten-kettenschutzgruppen entfernt werden, was weitere Reinigungsschritte erspart. Für die Blockierung des *N*-Terminus der Aminosäuren werden in der Regel zwei Synthesestrategien verwendet:

- *Boc*-Strategie
- *Fmoc*-Strategie

Bei der *Boc*-Strategie wird die *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc) als temporäre Schutzgruppe für die Aminofunktion eingesetzt.<sup>[41-42]</sup> Die Abspaltung erfolgt im sauren Medium durch Trifluoressigsäure. Ein Nachteil bei dieser Schutzgruppenmanipulation ist, dass viele glycosidische Bindungen säureempfindlich sind,<sup>[43]</sup> und dass es zu hohen Ausbeuteverlusten aufgrund der Spaltung der Peptidbindungen während der wiederholten Säurebehandlungen kommen kann. Die Seitenkettenfunktionalitäten der verwendeten Aminosäuren muss durch orthogonale Schutzgruppen blockiert sein,<sup>[44]</sup> wobei üblicherweise hydrogenolytisch abspaltbare Benzyl-Schutzgruppen verwendet werden.

Als temporäre Schutzgruppe für die  $\alpha$ -Aminofunktion kommt ebenso die Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe (*Fmoc*) zum Einsatz.<sup>[45]</sup> Die Abspaltung der *Fmoc*-Gruppe erfolgt im basischen Medium durch sekundäre Basen wie Piperidin oder Morpholin.<sup>[46]</sup> Aufgrund der milden Reaktionsbedingungen kommt es bei der *Fmoc*-Strategie zu weniger



Nebenreaktionen, so dass sie häufiger angewendet wird. Die Aminosäuren werden mit säurelabilen Schutzgruppen wie *tert*-Butyl- oder Tritylether versehen.

Die Aktivierung der Carbonsäurefunktion kann nach verschiedenen Methoden erfolgen. So können Aktivester hergestellt werden oder die Aktivierung erfolgt *in situ* während der Reaktion.<sup>[47]</sup> Die Aktivierungsreagenzien sollen leicht einsetzbar und reaktiv sein. Die Kupplungen müssen mit hoher Ausbeute stattfinden, ohne dass es zu einer Racemisierung der Aminosäuren oder zu Nebenreaktionen kommt.

Zwei gebräuchliche Kupplungsadditive in der Peptidsynthese sind 1-Hydroxy-benzotriazol (HOBt) und 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol (HOAt).<sup>[47]</sup> Der Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazol als Additiv senkt die Racemisierungstendenz und erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit (Abbildung 1.6).<sup>[47-48]</sup>

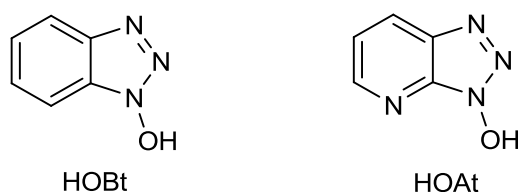


Abbildung 1.6: Kupplungsadditiv HOBt und HOAt.

Als Kupplungsreagenzien mit diesen Additiven werden Uroniumsalze wie z.B. HBTU (*O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat) und HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) eingesetzt (Abbildung 1.7).<sup>[49]</sup>

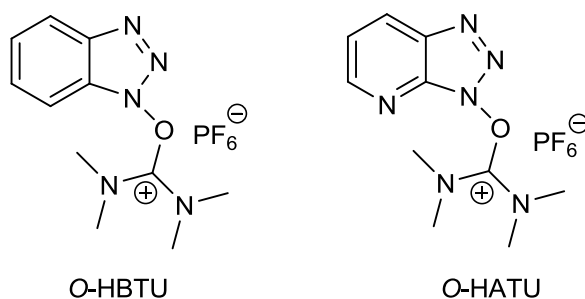


Abbildung 1.7: Kupplungsreagenzien O-HBTU und O-HATU.

Durch Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass die Verbindungen als Guanidiniumsalz (*N*-Form) vorliegen (Abbildung 1.8).

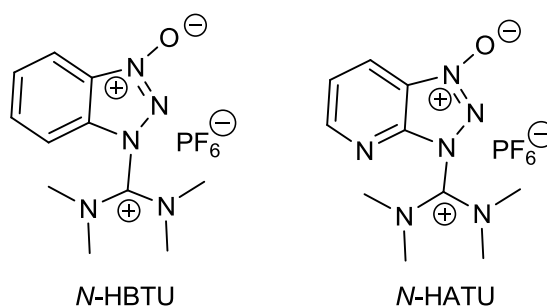


Abbildung 1.8: Kupplungsreagenzien *N*-HBTU und *N*-HATU.

Die Uronium-Form beider Kupplungsreagenzien bildet sich in Gegenwart von Protonen. HATU ist das effektivere, aber auch teure Uroniumsalz.

## 1.7 Säuren-und Basenlabilität der *O*-Glycopeptide

*O*-Glycopeptide sind aufgrund der acetalischen Struktur ihrer Glycosidbindung potentiell säurelabil. Durch Anlagerung eines Protons an den Ringsauerstoff oder an den Sauerstoff der Glycosidbindung wird das Glycopeptid in Gegenwart von Wasser in eine Hydroxyaminosäure und ein Glycosylkation gespalten (Abbildung 1.9).<sup>[50]</sup>

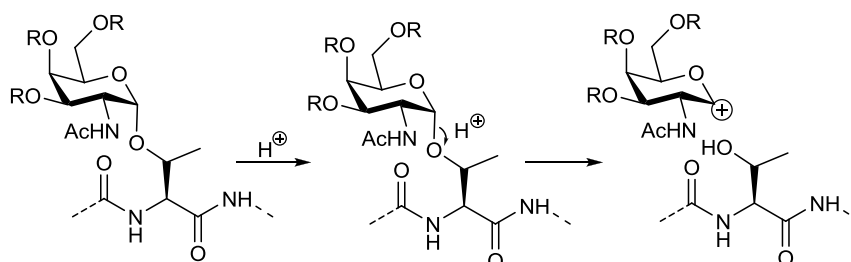


Abbildung 1.9: Säurelabilität der Glycopeptide.

Die Säurelabilität ist von verschiedenen Faktoren wie den Aminosäureseitenketten und Kohlenhydratstrukturen abhängig. Die Kohlenhydratstrukturen unterscheiden sich deutlich in ihrer Säurelabilität. Beispielsweise ist die Fucosid-Bindung deutlich säurelabiler als die

entsprechende Galactosid-Bindung.<sup>[51]</sup> Die *O*-Schutzgruppen am Zuckerbaustein üben einen großen Einfluss auf die Stabilität aus. Der stabilisierende Effekt der *O*-Acetylschutzgruppe auf die Intersaccharid-Bindung kommt durch die leichte Protonierung der Carbonylsauerstoffatome zustande. Durch Coulomb-Abstoßung werden so weitere Protonierungen der Intersaccharid- und Ringsauerstoffatome verhindert und damit die Saccharid-Spaltung.<sup>[52]</sup>

Bei einer zu hohen Basenkonzentration kann eine Racemisierung der Aminosäuren erfolgen bzw. an Serin- und Threoninglycosiden eine  $\beta$ -Eliminierung eintreten. Das Proton am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der glycosylierten Aminosäure wird durch eine Base abstrahiert, so dass sich ein Enolat anion bildet. Die Abspaltung des Zuckerbausteins führt zu einer  $\alpha$ -Aminosäureacrylsäurestruktur (Abbildung 1.10).<sup>[53-54]</sup>

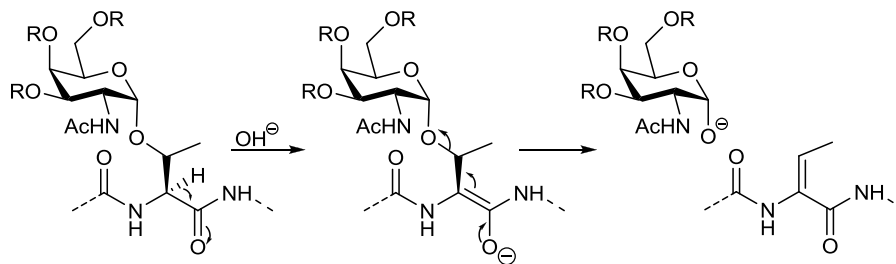


Abbildung 1.10: Basenlabilität der Glycopeptide.

## 2 Zielsetzung

Ziel der Synthesen tumorassoziierter Vakzine ist es, eine selektive Immunantwort gegen maligne Tumorzellen auszulösen. Dafür werden dem Immunsystem typische Zelloberflächen-strukturen als Haptene präsentiert. Damit wäre das Immunsystem in der Lage, eine selektive Immunantwort gegen die Haptene auszulösen und damit die Tumorzelle anzugreifen, ohne gesundes Gewebe zu schädigen. Die Problematik liegt darin, dass neben tumorassozierten Glycanmustern auch normale gesunde Glycanmuster in den Glycoproteinen der Zellmembran vorliegen. Die „gesunden“ Glycanmuster initiieren Antikörper, die zu einer Autoimmunreaktion führen. Deswegen ist die Synthese einer strukturell eindeutigen Oberflächenglycoproteinstruktur, die eine Tumorzelle präsentiert, entscheidend für die Auslösung einer selektiven Immunantwort, die sich nur gegen Tumorzellen richtet, da eine Isolierung eines strukturell eindeutigen Glycoproteins aus Tumorzellen nicht möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen synthetisch exakt definierte Glycopeptidantigene aus der extrazellulären repetitiven Sequenz des epithelialen Mucin MUC1 hergestellt werden, damit sie als tumorassozierte Antigene gegen Krebs eingesetzt werden können. Eine selektive Modifizierung soll die Grundlage für die vollsynthetisch dargestellten Antitumorvakzine bilden. Damit soll eine Induktion sowohl einer zellulären als auch einer MHC-restringierten Immunantwort ermöglicht werden.

Als Zielsequenz dient die aus 20 Aminosäuren bestehende Tandem Repeat-Region des MUC1, die das Peptidpitop PDTRP als immunodominante Region enthält (Abbildung 2.1).

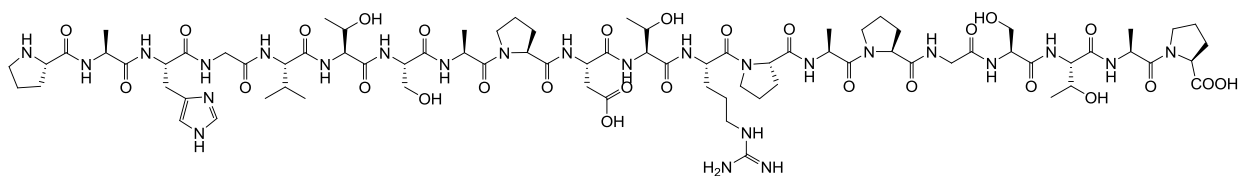


Abbildung 2.1: Zielstruktur aus der extrazellulären Tandem Repeat Einheit.

In der immunodominanten Region sollen die in der Einleitung beschriebenen sialylierten tumorassoziierten Kohlenhydratantigene eingebaut werden (Abbildung 2.2).

Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-**Thr**(glycosyliert)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro

Abbildung 2.2: MUC1 - Sequenz mit der glycosylierten Aminosäure in der PDTRP-Region.

Als Saccharidstrukturen werden das T<sub>N</sub>-Antigen, das Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen und die beiden regioisomeren Sialyl-T-Antigene eingebaut (Abbildung 2.3).

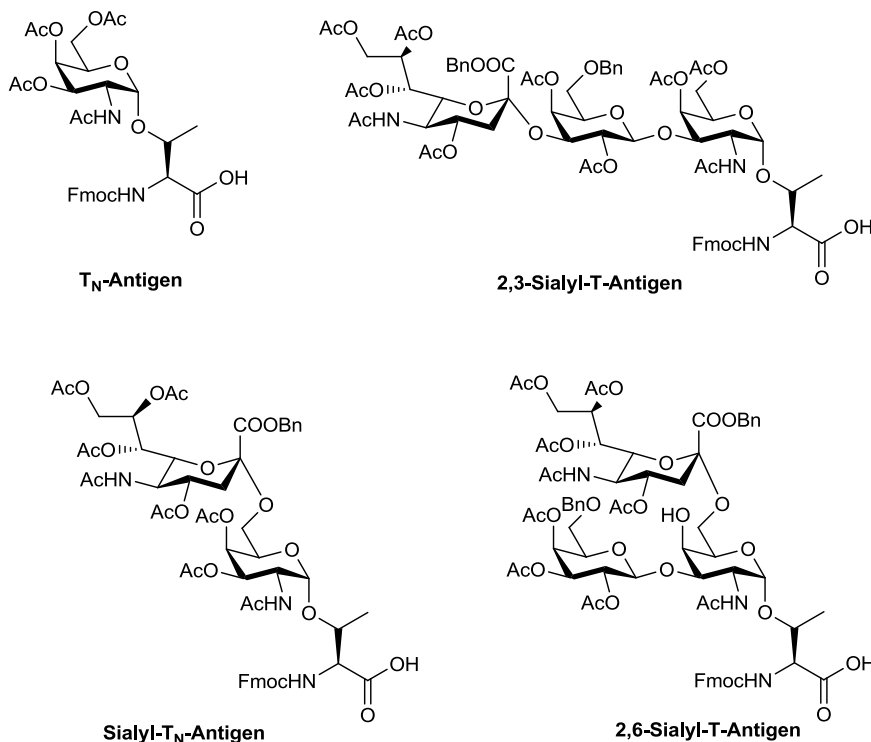


Abbildung 2.3: Kohlenhydrat-Antigene, die in die MUC1-Struktur eingebaut werden.

Wie immunologische Tests zeigten, besitzt das Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen die größte Tumorspezifität. Es sollte daher das größte therapeutische Potential zeigen. Die Glycosylierung soll in der immunodominanten Region (PDTRP) an der Aminosäure Threonin erfolgen. Die immundominante Region nimmt eine zentrale Funktion in der MUC1-Sequenz ein. Auch wenn der Saccharid-Baustein einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit der Impfstoff-Konjugate hat, ist die räumliche Konformation des Peptides bedeutsam. Die immundominante Region PDTRP weist einen  $\beta$ -Turn bzw. ein Typ II- $\beta$ -Turn auf.<sup>[55-56]</sup> Während die MUC1-Sequenz gestreckt vorliegt, bildet die PDTRP-Region eine knauf-ähnliche

Struktur und ragt in den Raum hinein. Diese Knäuf-Konformation tritt im Gegensatz zur restlichen Sequenz räumlich stark hervor und kann so von verschiedenen Antikörpern leicht angegriffen werden. Von daher ist das Interesse groß, in der immunodominanten Region zu glycosylieren, um festzustellen, welchen Einfluss der Kohlenhydrat-Baustein auf die immunodominante Region hat und schlussendlich auf die Impfstoff-Konjugate. Zusätzlich ist eine Konjugation der Glycopeptidstrukturen an T-Helferzell-Epitopen und mit Carrier-Proteinen geplant (Abbildung 2.4).

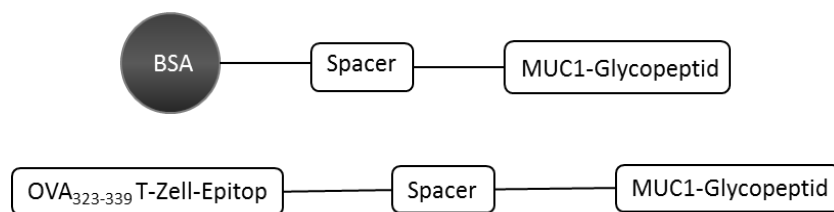


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Tumorvakzine.

Die Verknüpfung zwischen B-Zell-Epitop und T-Zell-Epitop erfolgt in einer synthetischen Vakzine über einen nicht immunogenen Spacer, der als Platzhalter dient. Als Spacer wird ein Triethylenglycol verwendet, der eine flexible räumliche Trennung der Epitope bewirkt. Die räumliche Trennung soll eine konformationelle Beeinflussung zwischen den Epitopen vermeiden. Der Spacer wird über eine Amidbindung in das Molekül eingeführt und bietet im Vergleich zu esterartigen Verknüpfungen einen Stabilitätsvorteil während der Deblockierungsschritte. Als T-Zell-Epitop wird eine Peptidsequenz aus Ovalbumin (OVA<sub>323-339</sub>) verwendet, und als Carrierprotein wird BSA (Rinderserumalbumin) eingesetzt.

Eine weitere Synthesemöglichkeit für Vakzine ist die Konjugation von Antigenen an ein Mitogen wie es die Toll-like-Rezeptoren darstellen (Abbildung 2.5).

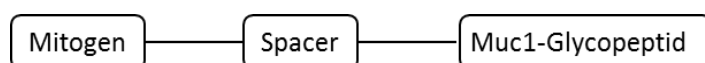


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Mitogen-Konjugate.

Ein Nachteil der Mitogen-Konjugate ist der hohe präparative Aufwand und die relativ aufwendige Isolierung. Eine Entwicklung dendrimärer Glycopeptiden wäre eine

vielversprechende Alternative. Über einen Oligolysin-Kern lassen sich dendrimere Glycopeptidantigene aufbauen, die ein geeignetes Vakzin darstellen (Abbildung 2.6).

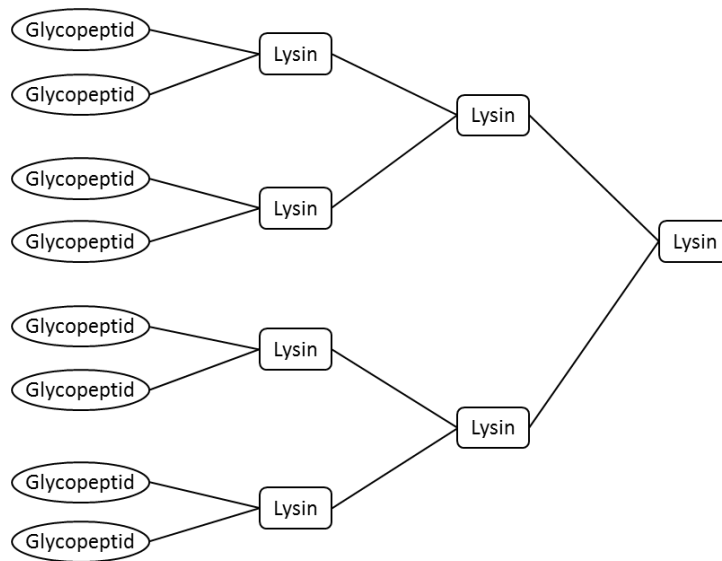


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Dendrimers.

## 3 Syntheseplanung

### 3.1 Einbau der Kohlenhydratstruktur in das Glycopeptid

Ein wichtiger Schritt in der Synthese von Glycopeptiden ist der Einbau der Kohlenhydratstruktur in das Peptidgrundgerüst. Hierbei wird die Synthese so konzipiert, dass die synthetisch hergestellte glycosylierte Aminosäure in der entsprechenden Position in die aufzubauende Peptidsequenz eingeführt wird. Die Glycosidsynthese erfordert die Umwandlung des Kohlenhydrats in einen Glycosyldonor und dessen anschließende Umsetzung mit einem Glycosylakzeptor zum entsprechenden Disaccharid (Abbildung 3.1).

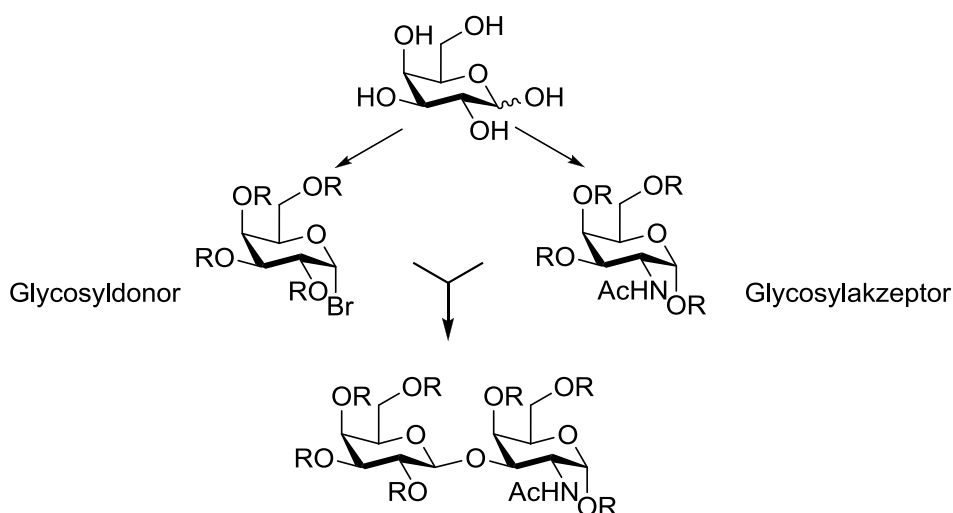


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Synthese von Disacchariden.<sup>[57]</sup>

Entscheidende Faktoren für den Erfolg der Oligosaccharidsynthese sind die ausgewählten Schutzgruppen, die die Selektivität und die Ausbeute stark beeinflussen. Aufgrund der Polyfunktionalität der Zielmoleküle muss die Wahl der Schutzgruppen sorgsam getroffen werden. Die Schutzgruppenwahl muss sowohl den Ansprüchen der Oligosaccharid- als auch der Festphasenpeptidsynthese genügen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine lineare Syntheseroute ausgearbeitet werden, die, angelehnt an die Biosynthese der Mucin-O-Glycane von gemeinsamen Vorstufen zu den komplexen Antigenstrukturen führen soll. Ein Baustein dieser biomimetischen Synthese ist das T<sub>N</sub>-Antigen-Threonin-Konjugat, das sich als Baustein in die Festphasensynthese setzen lässt. Die Blockierung der freien Hydroxylfunktionen erfolgt durch die Acetylschutzgruppen.



Diese Schutzgruppen bietet den Vorteil, dass sie die glycosidischen Bindungen gegen Säure stabilisiert,<sup>[52]</sup> was die Verwendung von Trifluoressigsäure ermöglicht, die zum Spalten der säurelabilen Anker und Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren erforderlich ist. Die Aminofunktion wird in diesen Synthesen mit der Fluorenyl-methoxycarbonylgruppe geschützt, was einen direkten Einbau in das Peptidgrundgerüst erlaubt, weil die Festphasensynthese der Peptide nach *Fmoc*-Strategie vorgenommen wird. Die Carboxylfunktion als *tert*-Butylester-Schutzgruppe geschützt und bleibt während des Aufbaus permanent blockiert. Vor dem Einbau in das Peptid wird diese Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure deblockiert. Glycosylierungen sind anspruchsvolle Reaktionen, bei denen die Regio- und Stereoselektivität gesteuert werden muss. Der Saccharidbaustein wird zahlreichen Schutzgruppenmanipulationen unterworfen, um die Hydroxylfunktionen selektiv zu blockieren. Die Hydroxylfunktionen werden als Acetate, Ether und Acetale blockiert. Sie lassen sich bezüglich ihrer Reaktivität unterscheiden. Die primäre Hydroxylfunktion in 6-Position hat eine größere Reaktivität als die Hydroxylfunktionen in 3- und 4-Position. Sie ist auch sterisch gut zugänglich. Eine anschließende Sialylierung des T<sub>N</sub>-Antigen-Threonin-Konjugats mit dem entsprechenden Neuraminsäure-Donor führt selektiv zum Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen-Threonin-Konjugat, das nach dem Spalten des *tert*-Butylesters in die Festphasensynthese eingesetzt werden kann.

Das T<sub>N</sub>-Antigen kann als zentraler Baustein in mehreren Glycosylierungsreaktionen eingesetzt werden. Durch Deblockieren in 4- und 6-Position liegen die freien Hydroxylgruppen vor und der T<sub>N</sub>-Antigen-Baustein kann anschließend durch eine 3-β-Galactosylierung in das T-Antigen überführt werden. Das T-Antigen dient als Grundstruktur, um die regioisomeren (2,3)- und (2,6)-Sialyl-T-Antigen-Konjugate zu gewinnen. Nach selektiven Schutzgruppenmanipulationen kann die Sialylierung an der 6-Position der *N*-Acetylgalactosamineinheit durchgeführt werden, so dass das (2,6)-Sialyl-T-Antigen erhalten wird. Eine Sialylierung in der 3-Position der Galactoseeinheit führt zum (2,3)-Sialyl-T-Antigen. Hierbei werden die 2'-, 3'- und 4'-Hydroxyfunktion von den Schutzgruppen befreit. Durch die sterische Hinderung der 2'- und 4'-Hydroxyfunktionen durch die Nachbargruppen und eine erhöhte Reaktivität der äquatorialen 3'-Hydroxyfunktion kommt es zur selektiven Sialylierung in drei Position (Abbildung 3.2).

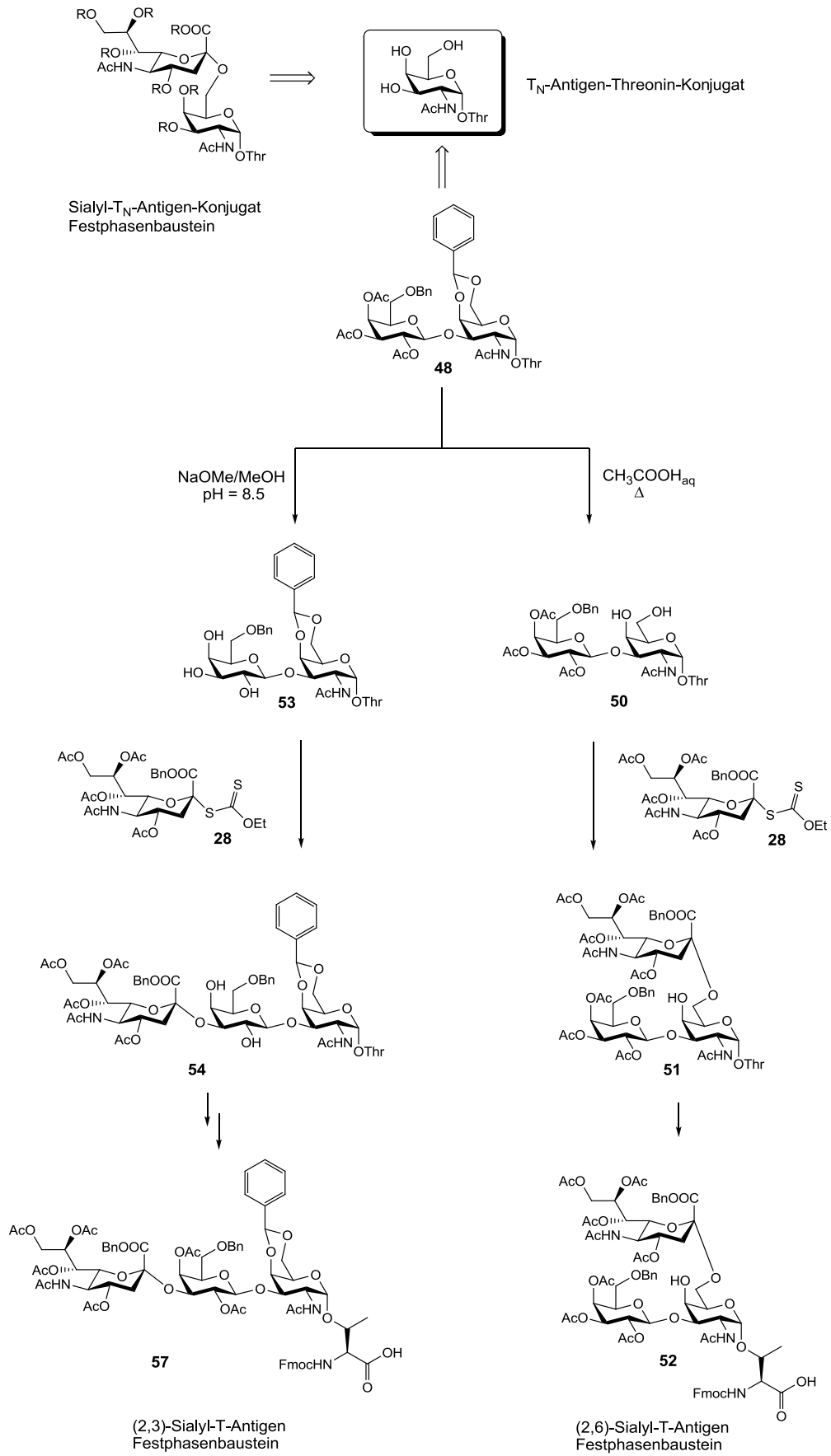


Abbildung 3.2: Schema der dargestellten Antigen-Threonin-Konjugate.

## 3.2 Peptidsynthese

Die Isolierung der Glycopeptidstrukturen aus biologischen Systemen oder die Synthese über gen- und biotechnologischen Methoden liefern keine Glycopeptide mit definierter Glycanstruktur. Die Mengen der gentechnisch hergestellten Glycopeptide wären zu gering für nachfolgende Experimente und Untersuchungen. Ein Vorteil der vollsynthetischen Darstellung der tumorassoziierten Antigene ist der Aufbau von exakt definierten Glycopeptidstrukturen, die im präparativen Maßstab gewonnen werden können. Zudem ermöglichen zahlreiche Modifikationen und Funktionalisierungen der tumorassoziierten Antigene eine größere Variation der spezifischen Glycopeptid-Vakzine. Da Glycoproteine an sehr vielen biologischen Prozessen beteiligt sind,<sup>[58-59]</sup> besteht breites Interesse an Synthesen von Modellverbindungen, die die Struktur biologisch relevanter Glycoproteine widerspiegeln.<sup>[60-65]</sup> Die Komplexität der Moleküle erfordert durchdachte Syntheserouten, bei denen der Aufbau des Oligosaccharidgerüsts und auch der des Peptidrückgrates berücksichtigt werden muss. Die sensiblen Bindungen liegen z. B. in Acetalen vor. Sie sind charakteristisch säurelabil. Auch müssen die basenempfindlichen glycosidischen Bindungen berücksichtigt werden, um Eliminierungen zu vermeiden.

Die Synthese von Glycopeptiden kann sowohl in Lösung als auch an fester Phase durchgeführt werden. Ein Vorteil der automatisierten Festphasensynthese ist der Aufbau des Peptidgrundgerüsts an einem polymeren Träger. Überschüssige Reagenzien können nach jedem Syntheseschritt durch Waschen und Filtrieren entfernt werden, während das Peptid am polymeren Träger verbleibt und Schritt für Schritt aufgebaut werden kann. Langwierige Kristallisationen bzw. aufwendige Reinigungsschritte entfallen in der Festphasensynthese. Das Peptidgrundgerüst wird durch die Anwendung eines Überschusses an der Fmoc-Aminosäure und Reagenzien in kurzer Zeit und in guten Ausbeuten auf effiziente Weise dargestellt. Die Peptidstrukturen wurden durch automatisierte Festphasensynthese an einer festen Matrix nach Merrifield aufgebaut.<sup>[38, 66]</sup> Während bei der Biosynthese das Protein vom *N*-Terminus zum *C*-Terminus aufgebaut wird, wird bei der vollsynthetischen Darstellung das Peptid vom *C*-Terminus zum *N*-Terminus aufgebaut. Folglich wird der *C*-Terminus der ersten Aminosäure über die Carboxylfunktion und den Anker an die feste Phase gebunden. Der Linker (Anker) dient als Bindeglied zwischen Peptid und polymerem Träger und muss wie der polymere Träger vom Peptid abspaltbar sein. Das Linkermolekül kann vor der

Startaminosäure an das Harz gekuppelt werden oder bereits mit der Startaminosäure beladen werden. Der Aufbau des Peptides erfolgt in drei Reaktionszyklen nach der etablierten *Fmoc*-Strategie. Im ersten Reaktionsschritt wird das temporär *Fmoc*-geschützte harzgebundene Peptid bzw. die Aminosäure von der Schutzgruppe befreit, so dass das freie Amin im zweiten Reaktionszyklus unter Verwendung der Kupplungsreagenzien mit der nächsten *Fmoc*-Aminosäure verknüpft werden kann. Im dritten Reaktionsschritt werden nicht umgesetzte Aminogruppen in einem Cappingschritt mit Acetanhydrid und Pyridin acetyliert, um unerwünschte Fehlsequenzen zu vermeiden. Durch analog weitere Reaktionszyklen wird das Peptid aufgebaut (Abbildung 3.3).

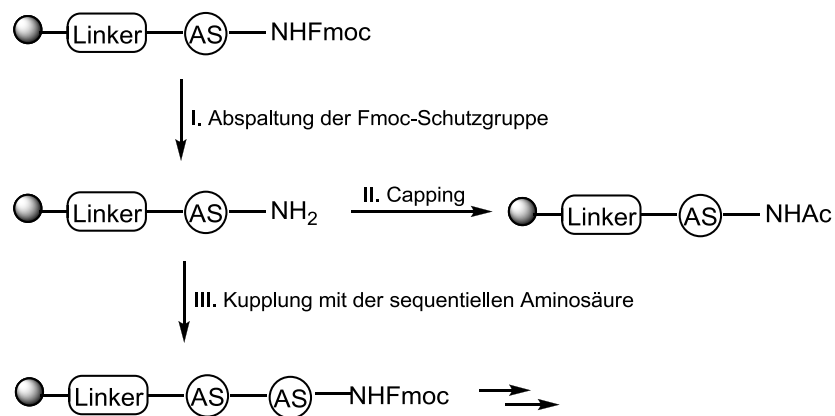


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Festphasensynthese.

Nach der Kupplung der letzten Aminosäure wird das Glycopeptid vom Anker des polymeren Trägers abgespalten.

Um die freie Carboxylfunktion mit einem freien Amin erfolgreich zu verknüpfen, ist ihre Aktivierung notwendig. Für die Aktivierung werden in der Festphasensynthese Uronium- oder Phosphoniumsalze als Kupplungsreagenzien eingesetzt. Die Verwendung von Uronium- und Phosphoniumsalze führt, verglichen mit Carbodiimiden, zu einer höheren Reaktivität, weniger Nebenreaktionen und zu einer geringeren Racemisierungstendenz der Aminosäure. Auch kommt es beim Einsatz der Phosphoniumsalze nicht zur Bildung von Harnstoffderivaten. Die schwerlöslichen Harnstoffderivate könnten bei der Peptidsynthese nicht abfiltriert werden, so dass Probleme bei der Trennung vom polymeren gebundenen

Peptid entstehen würden. Als Kupplungsadditiv werden 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) eingesetzt, so dass intermediär HOBt-oder HOAt-Aktivester gebildet werden, die die Racemisierung minimieren (Abbildung 1.6, Seite 14).

Bei der Festphasenpeptidsynthese müssen Nebenreaktionen vermieden werden. Eine Nebenreaktion ist die Umlagerung von Asparaginsäurederivaten zu Aspartimiden. Durch die Base wird das Amidproton der C-terminal benachbarten Aminosäure deprotoniert, worauf anschließend der Amid-Stickstoff nukleophil an der geschützten  $\beta$ -Carboxylfunktion der Asparaginsäure angreift, so dass es zur Ausbildung eines Aspartimids kommt (Abbildung 4.48, Seite 64).

Bei der *Fmoc*-Strategie kann eine Diketopiperazinbildung auftreten. Eine basenkatalysierte intramolekulare Aminolyse führt zur Bildung eines Diketopiperazins (Abbildung 4.47, Seite 64) Die Diketopiperazinbildung wird durch Sequenzen begünstigt, die Prolin, Alanin und Glycin als Startaminosäuren beinhalten. Durch eine sterisch anspruchsvolle Ankergruppe (z.B. die Trityllinker) kann die Diketopiperazinbildung unterdrückt werden.

Bei Festphasensynthesen mit Peptiden, die mehr als 25 Aminosäuren enthalten, muss auf konformationelle Effekte in der Peptidkette geachtet werden. Die konformationelle Beeinflussung der Reaktivität am Ende der Peptidstränge kann auf Peptidfaltung zurückzuführen sein. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die freie Aminofunktion, die mit der nächsten Aminosäure gekuppelt werden soll, sich in einem Turn-Over-Bereich befindet und damit nicht zugänglich für die nächste Aminosäurekupplung ist. Da im Rahmen dieser Dissertation Peptide hergestellt werden, die einerseits aus 20 Aminosäuren bestehen, die das B-Zell-Epitop bilden, und zum anderen Teil aus 17 Aminosäuren der OVA<sub>323-339</sub>-Sequenz bestehen, welche das T-Zell-Epitop bilden, sind konformationelle Beeinflussungen nicht auszuschließen. Zudem ist zu beachten, dass die glycosylierte Aminosäure sich in der immundominanten Region (*PDTRP*) der MUC1-Sequenz befindet, die eine bestimmte räumliche Anordnung (Turn) einnimmt und für die Immunantwort entscheidend ist.

Die Verknüpfung zwischen B-Zell- und T-Zell-Epitop erfolgt über einen Triethylenglycolspacer. Der Triethylenglycolspacer dient dazu, die Epitope räumlich voneinander zu trennen, so dass die konformationelle Beeinflussung minimiert wird. Die Anknüpfung erfolgt über eine stabile Amidbindung.

## 4 Allgemeiner Teil

### 4.1 Synthese des T<sub>N</sub>-Antigens

Als zentraler Baustein für den Aufbau von Mucinen-Glycopeptiden dient das *N*-Acetylgalactosamin-Threonin-Konjugat, das der Akzeptor in weiteren Glycosylierungsreaktionen ist. Dazu wird zunächst Threonin *O*-glycosidisch an das *N*-Acetylgalactosamin gebunden. Die Synthese erfolgt nach einer literaturbekannten Strategie.<sup>[67]</sup>

D-Galactose (**1**) wird im ersten Schritt in einer Mischung aus Pyridin/Acetanhydrid (2:1) mit einer katalytischen Menge Perchlorsäure umgesetzt, so dass die peracetylierte 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-galactose (**2**) in quantitativer Ausbeute erhalten wird. Anschließend wird 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-galactose (**2**) mit 33%-igem Bromwasserstoff in Eisessig in 2,3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-D-galactosylbromid überführt, wobei selektiv das Glycosylbromid (**3**) in quantitativer Ausbeute isoliert wird. Damit ist ein zentraler Baustein zugänglich, der einen geeigneten Donor für die Glycosylierung des mit einer *N*-Fmoc-Gruppe und als *tert*-Butylester blockierten Threonins (**11**) darstellt. Das Bromid wird zusammen mit der 2-Acetoxygruppe durch Zink in einer von *N*-Methylimidazol unterstützten Reaktion zu 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**4**) eliminiert.<sup>[68]</sup> In einer Azidonitratisierung nach *Lemieux*<sup>[69]</sup> wird das Galactal (**4**) mit Cerammoniumnitrat und Natriumazid umgesetzt. Es wird eine Azidogruppe in 2-Position und eine Nitratgruppe in 1-Position eingeführt. Durch Umsetzen des Galactals (**4**) mit trockenem Cer(IV)ammoniumnitrat und Natriumazid in absoluten Acetonitril bei -25 °C wird die Azidogruppe in einer regio- und stereoselektiven Reaktion eingeführt. Die Reaktion erfolgt unter Argonatmosphäre unter starkem Rühren, wobei die orangefarbene Reaktionsmischung sich nach sonnengelb verfärbt. Bei der Azidonitratisierung wird ein Anomerengemisch von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha,\beta$ -D-galactosylnitrat (**5**) in einer Ausbeute von 43 % erhalten (Abbildung 4.1).

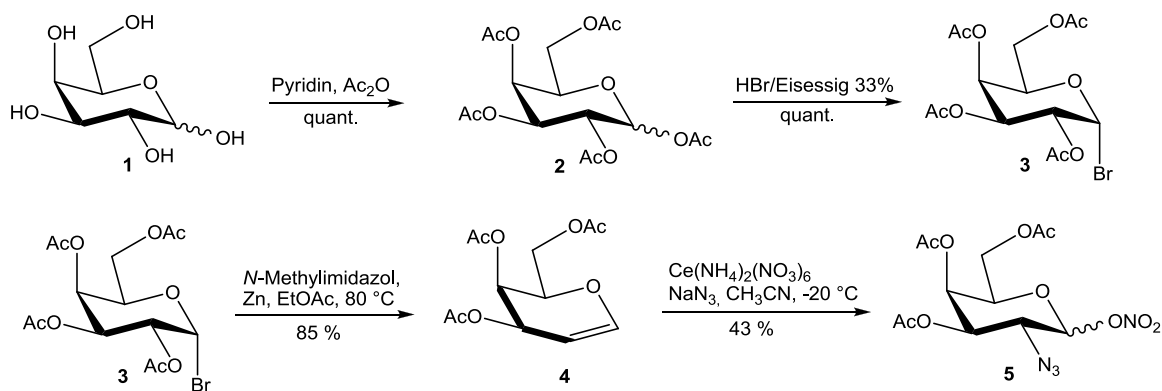


Abbildung 4.1: Synthese des 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha,\beta$ -D-galactosylnitrat.

Nach dem vom *Lemieux* vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus <sup>[69]</sup> abstrahiert das starke Oxidationsmittel Cer(IV) ein Elektron aus dem Azidanion und wird zum Cer(III)-Ion reduziert (Abbildung 4.2).

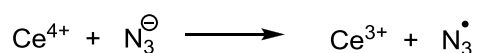


Abbildung 4.2: Redoxreaktion der Azidonitratisierung.

Das entstehende Azidradikal greift die Doppelbindung des Galactals (**4**) an, wobei ein Radikal (**6**) entsteht. Dieses wird durch weiteres Cer(IV)-Ion zum Oxycarbeniumion (**7**) oxidiert. Das Oxycarbeniumion (**7**) ist durch die delokalisierte positive Ladung stabilisiert, was der Grund für die hohe Regioselektivität der Reaktion ist. Das Nitration kann nukleophil am anomeren Zentrum angreifen, wobei das 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha,\beta$ -D-galactosylnitrat (**5**) als Anomerengemisch resultiert (Abbildung 4.4).

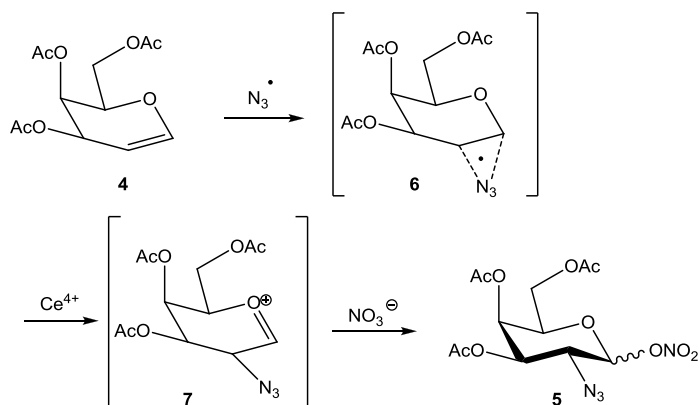


Abbildung 4.3: Postulierter Reaktionsmechanismus nach *Lemieux*.

Eine Trennung der beiden Anomere (**5**) ist für den weiteren Syntheseverlauf nicht notwendig, so dass das Gemisch im nächsten Reaktionsschritt mit wasserfreiem Lithiumbromid in absolutem Acetonitril umgesetzt wird. Die hierbei ablaufende nukleophile Substitution der Nitratgruppe gegen ein Bromion führt aufgrund des anomeren Effektes ausschließlich zur Bildung des gewünschten  $\alpha$ -Galactosylbromids (**8**) mit einer Ausbeute von 77 % (Abbildung 4.4).

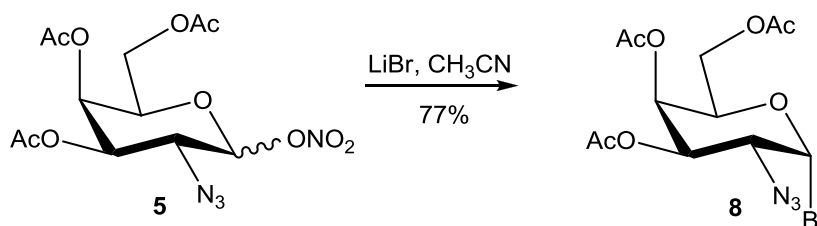


Abbildung 4.4: Nukleophile Substitution der Nitratgruppe zum  $\alpha$ -Galactosylbromid.

Als Glycosylakzeptor dient *N*-Fmoc-Threonin-*tert*-butylester. Zunächst wird L-Threonin (**9**) durch Umsetzung mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) an der Aminofunktion blockiert.<sup>[70]</sup> Das isolierte Fmoc-Thr-OH-Derivat (**10**) wird anschließend mit einem aus *tert*-Butanol und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) hergestellten *O-tert*-Butylisoharnstoff in einer Kupfer(I)chlorid-katalysierten Reaktion in den Galactosylakzeptor Fmoc-Thr-OtBu (**11**) in einer Ausbeute von 52 % überführt (Abbildung 4.5).<sup>[71-72]</sup>

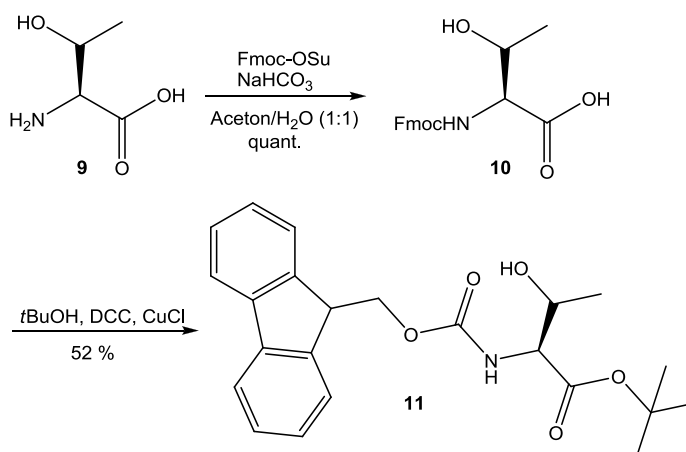


Abbildung 4.5: Darstellung der mit Fmoc- und *tert*-Butylester-geschützten Aminosäure.



Eine Reaktionskontrolle ist entscheidend bei dieser Veresterung. Lange Reaktionszeiten und hohe Reaktionstemperaturen führen zu dem thermodynamisch stabileren doppelt *tert*-butylierten Produkt (**12**), bei dem neben der Estergruppe auch die  $\beta$ -Hydroxyfunktion als *tert*-Butylether blockiert wird. Gebildete Mengen dieses unerwünschten Nebenproduktes lassen sich zwar mühelos säulenchromatographisch vom Produkt (**11**) abtrennen, führen aber zu Ausbeuteverlusten (Abbildung 4.6).

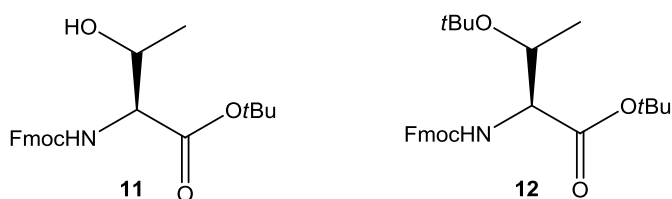


Abbildung 4.6: Darstellung der einfach (**11**) und doppelt geschützten Aminosäure (**12**).

Die Glycosylierung zum Galactosamin-Threonin-Konjugat basiert auf einer von *Paulsen* und *Hölck* entwickelten Methode,<sup>[67, 71, 73]</sup> bei der das 2-Azido-2-desoxy- $\alpha$ -galactosylbromid (**8**) in einem Lösungsmittelgemisch von absol. Toluol und absol. Dichlormethan (1:1) mit Silbercarbonat und Silberperchlorat-Hydrat aktiviert wird (Abbildung 4.7). Das Wasser aus dem Silberperchlorat-Hydrat wird durch mehrmaliges Kodestillieren mit Toluol entfernt. Es wird aufgrund des fehlenden Nachbargruppeneffektes in hoher Stereoselektivität und mit einer Ausbeute von 75 % das  $\alpha$ -Galactosid (**13**) erhalten.<sup>[71-73]</sup> Geringe Anteile des  $\beta$ -Anomers werden nach der folgenden Stufe säulenchromatographisch an Kieselgel abgetrennt.

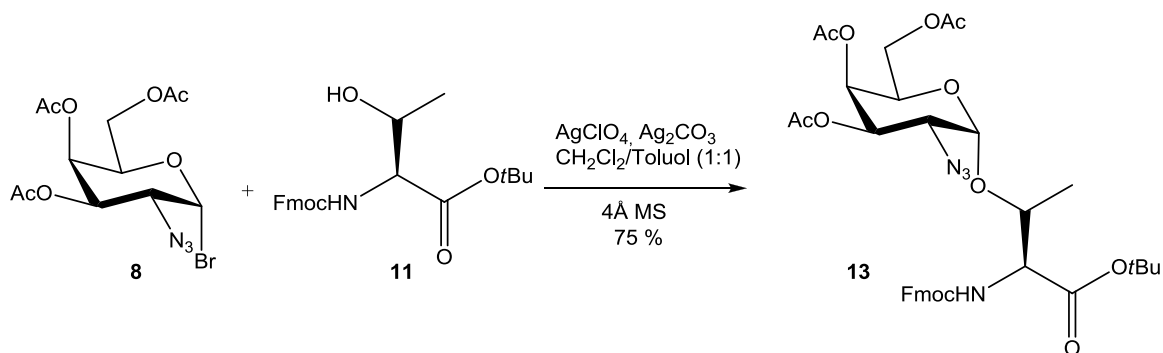


Abbildung 4.7: Glycosylierung von *Fmoc*-Thr-*OtBu* (**11**) mit Galactosylbromid (**8**).

Die Azidofunktion des Anomerengemisch (**13**) wird mit aktiviertem Zink in einem Lösungsmittelgemisch von Tetrahydrofuran, Acetanhydrid und Essigsäure (3:2:1) reduziert, wobei parallel die *N*-Acetylierung erfolgt.<sup>[74]</sup> Die Aktivierung des Zinks erfolgt durch Zugabe von Salzsäure, anschließendem schnellen Waschen mit Wasser und Trocknen mit Isopropanol und Tetrahydrofuran. Das entstandene Acetamid (**14**) kann mit einer Ausbeute von 55 % isoliert werden, wobei das  $\beta$ -Anomer bei der Säulenchromatographie entfernt wird (Abbildung 4.8).

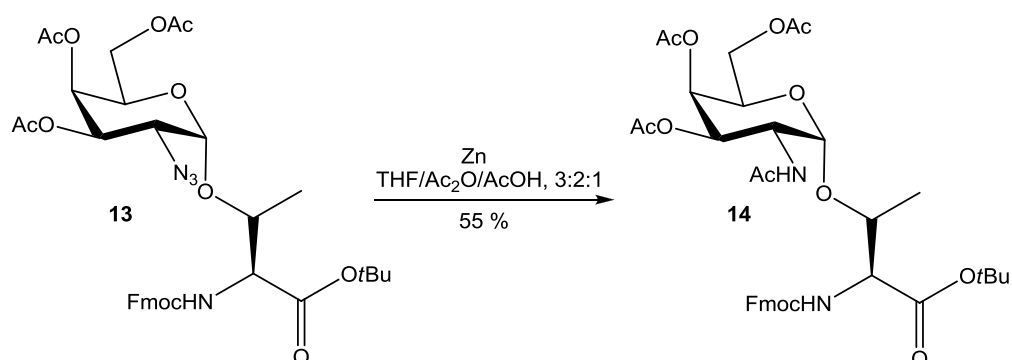


Abbildung 4.8: Reduktive *N*-Acetylierung.

Anschließend werden die Acetylgruppen selektiv durch Umesterung in Methanol<sup>[67, 75]</sup> mit katalytischem Natriummethanolat abgespalten (Abbildung 4.9). Wegen der basenlabilen Fmoc-Gruppe darf ein pH-Wert von 8.5 nicht überschritten werden,<sup>[67]</sup> da sonst die Fmoc-Gruppe oder das Kohlenhydrat durch  $\beta$ -Eliminierung abgespalten wird. Unter sorgfältiger Kontrolle des pH-Wertes wird das T<sub>N</sub>-Antigen-Threonin-Konjugat (**15**) in einer Ausbeute von 78 % erhalten.

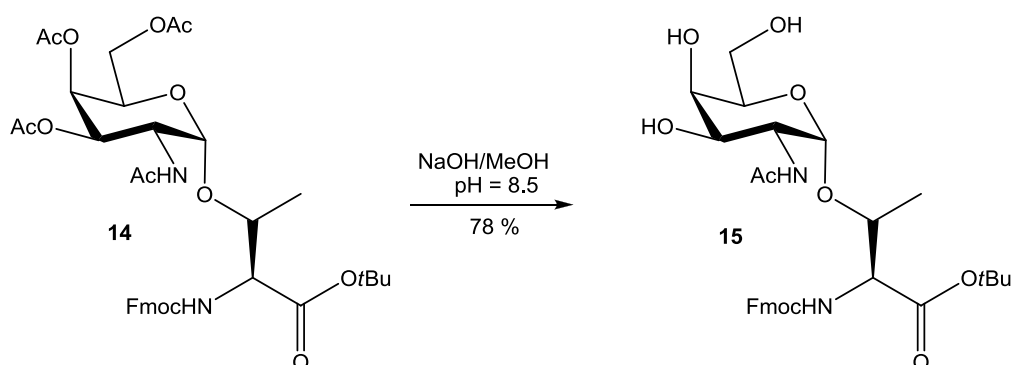


Abbildung 4.9: Selektive De-O-acetylierung durch Zemplén-Verseifung.

Bei der Methanolyse der Acetatreste findet der Angriff zuerst an der primären Esterfunktion in 6-Position des Zuckerbausteins (**16**) statt. Die Abspaltung erfolgt durch Umesterung mit einer einprozentigen Natriummethanolatlösung in Methanol. Das Alkoholat greift nukleophil die Carbonylgruppe des Acetates an und wird anschließend mit Methanol unter Abspaltung von Essigsäuremethylester zum Zwischenprodukt (**17**) protoniert (Abbildung 4.10).

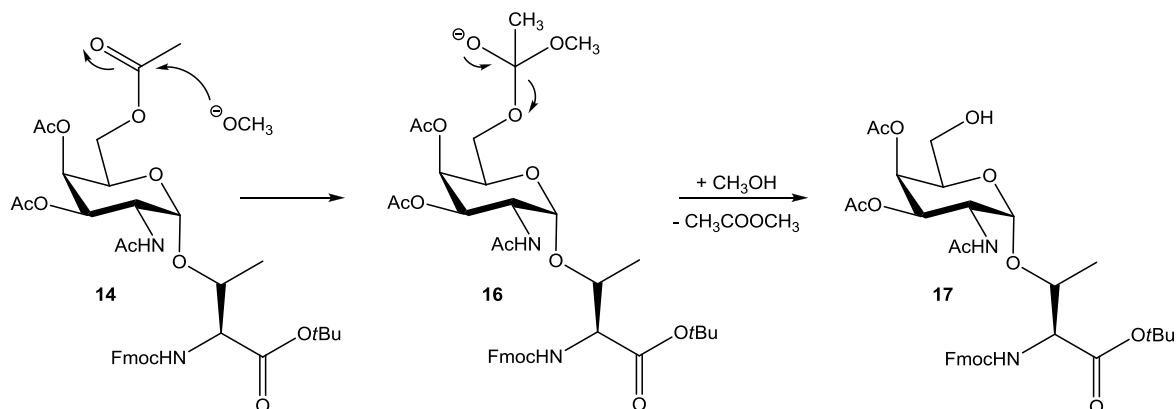


Abbildung 4.10: Reaktionsmechanismus der Zemplén-Verseifung<sup>[75]</sup>.

Teilacetylierte Zucker (**17**) neigen zur Umlagerung von Acetylgruppen an benachbarte freie OH-Gruppen (Abbildung 4.11). Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt bis nur ein Produkt (**15**) nachgewiesen werden kann.

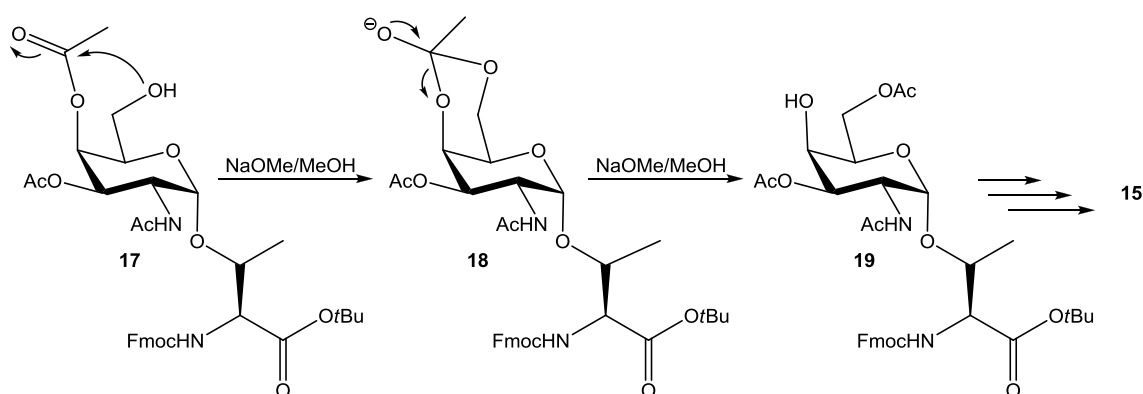


Abbildung 4.11: Wanderung der Acetylgruppen.

Die pH-Kontrolle und das Nachregulieren des pH-Wertes sind entscheidend bei dieser Reaktion.<sup>[67]</sup> Ist der pH-Wert zu niedrig, findet die Abspaltung der Acetat-Gruppe nicht statt. Bei einem pH-Wert, der größer als 8.5 ist, kann die basenlabile Fmoc-Gruppe abgespalten werden, was zu einem geringen Teil nicht vermieden werden kann (Abbildung 4.12). Das

freie Amin (**21**) kann isoliert werden und anschließend durch Reaktion mit Fmoc-OSu in Acetonitril/Dichlormethan selektiv in das Produkt (**15**) überführt werden.

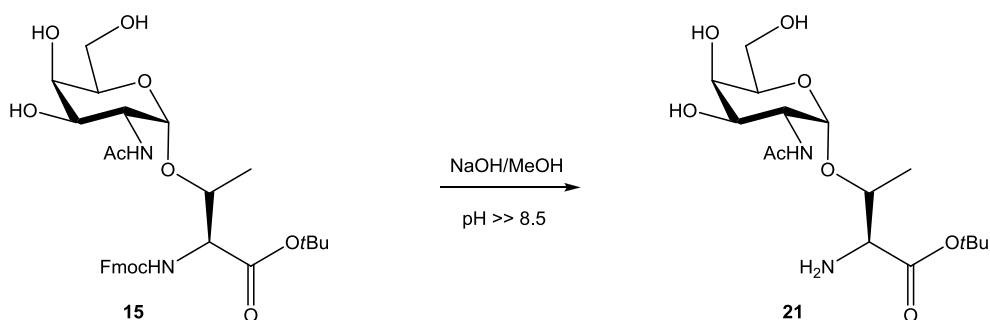


Abbildung 4.12: Nebenreaktion bei der Zemplén-Deblockierung.

Ist der pH-Wert deutlich höher als 8.5, kann außer der Spaltung der Fmoc-Gruppe durch  $\beta$ -Eliminierung der gesamte Kohlenhydratrest in einer E1cB- $\beta$ -Eliminierung abgespalten werden.

Um den  $T_N$ -Antigen-Baustein in die Festphasensynthese einsetzen zu können, wird der *tert*-Butylester des vollständig mit Schutzgruppen versehene Baustein *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-metoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**14**) acidolytisch mit TFA und Anisol als Kationenfänger gespalten, so dass der Baustein (**22**) erhalten wird (Abbildung 4.13).

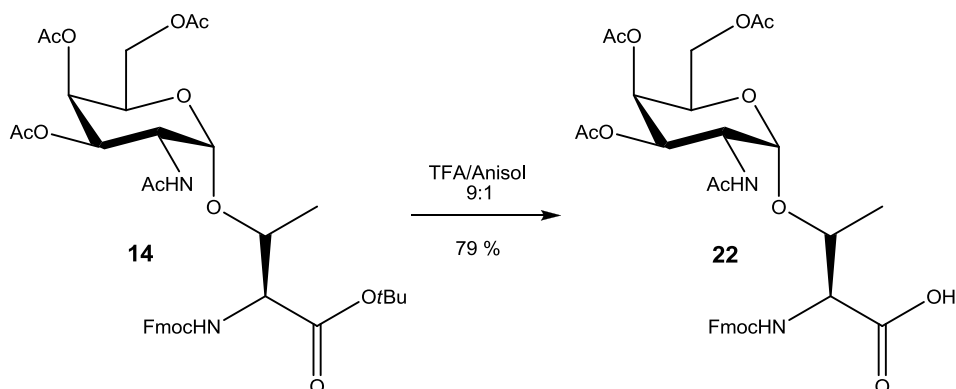


Abbildung 4.13: Darstellung des  $T_N$ -Antigen-Festphasenbausteins.

## 4.2 Synthese des Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigens

Um das Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen darzustellen, muss in 6-Position der Schlüsselverbindung (**15**) die Sialinsäure eingeführt werden. Der Glycosyldonor für die Sialylierung kann Austrittsgruppen wie Phosphite<sup>[76]</sup> oder Xanthogenate<sup>[77]</sup> enthalten. Bei den Sialylierungen wird in dieser Arbeit das Ethylxanthogenat der Sialinsäure als Glycosyldonor (**23**) eingesetzt. Als Schutzgruppe für die Carboxylfunktion wird eine Estergruppe eingeführt. Es wird ein Benzylester gewählt, der unter neutralen hydrogenolytischen Bedingungen abgespalten werden kann.

Die besondere Struktur der Neuraminsäure stellt bei den Sialylierungsreaktionen im Vergleich zu den anderen Glycosylierungsreaktionen eine größere Herausforderung dar. Die Ausbeuten sind prägnant niedriger als bei anderen Glycosylierungen.<sup>[78]</sup> Es tritt eine sterische Hinderung aufgrund der benachbarten Esterfunktion am anomeren Zentrum ein, die den Angriff des Nucleophils kompliziert. Zudem haben die elektronischen Effekte der Carboxylfunktion eine destabilisierende Auswirkung auf das sich bildende Glycosylkation, das sich durch die Aktivierung mit einem Promotor bildet. Folglich kann sich ein Proton in 3-Position abspalten, so dass das entsprechende Eliminierungsprodukt (**23**) gebildet wird (Abbildung 4.14).

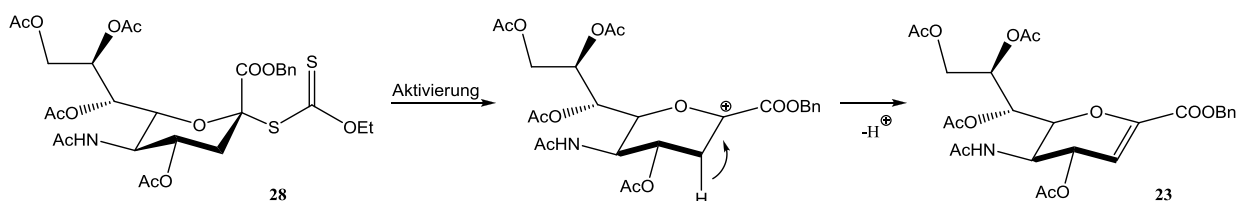


Abbildung 4.14: Die Bildung des Glycals (**23**).

Das Fehlen eines Substituenten in der 3-Position erschwert die stereoselektive Sialylierung. Es fehlt ein Nachbargruppeneffekt, der das anomere Zentrum beeinflusst und eine stereoselektive Reaktion bewirkt. Deswegen muss ein anderer Weg gewählt werden, um die Stereochemie zu kontrollieren, was in einem späteren Abschnitt diskutiert wird (Abbildung 4.18, Seite 37).

Die Synthese des Sialindonors erfolgt aus der Neuraminsäure nach einer aus der Literatur bekannten Strategie in vier Stufen.<sup>[77]</sup>

Die Neuraminsäure (**24**) wird zunächst mit Acetanhydrid in Pyridin (Lösungsmittelverhältnis, 2:1) peracetyliert. Das entstandene Anomerengemisch (**25**) wird ohne weitere Reinigung als Rohprodukt in den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt und mit Cäsiumcarbonat umgesetzt. Das entstandene Cäsiumsalz kann mit Benzylbromid zum Benzylester (**26**) umgesetzt werden.<sup>[79]</sup> Anschließend erfolgt durch die Zugabe von Acetylchlorid und einer katalytischen Menge Wasser die Umsetzung zum Glycosylchlorid (**27**). Das Chlorid (**27**) wird mit Kaliummethylxanthogenat zum Glycosyldonor (**28**) umgesetzt, wobei selektiv das  $\alpha$ -Xanthogenat gebildet werden kann (Abbildung 4.15).

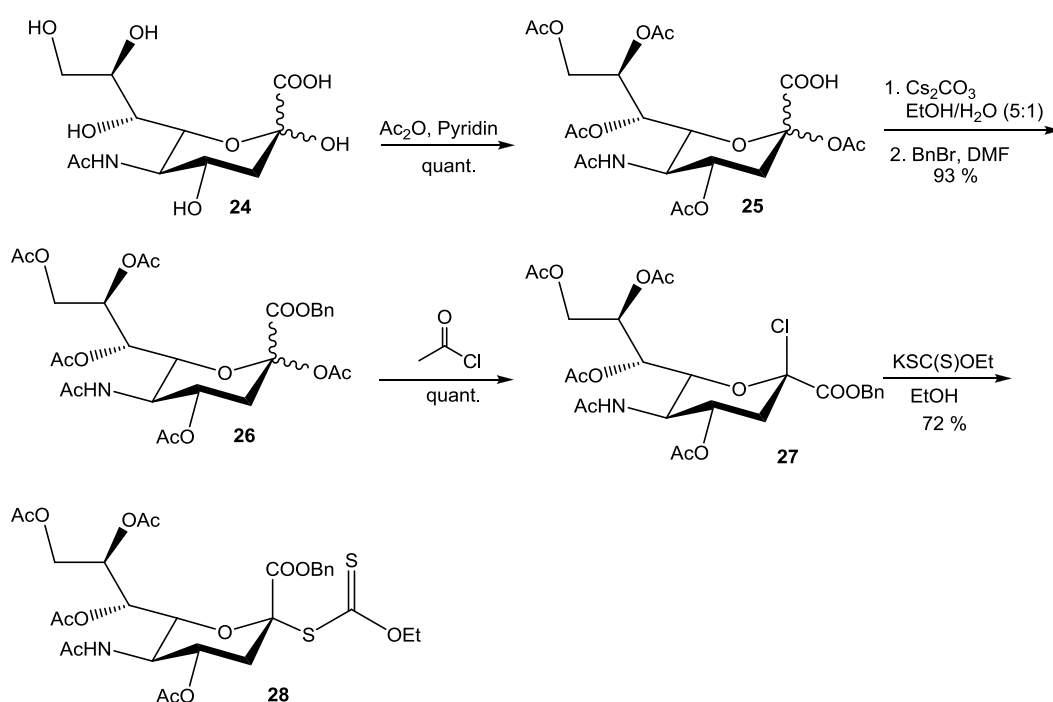


Abbildung 4.15: Synthese des Sialindonors.

Das  $\alpha$ -Xanthogenat geht selbst noch nicht eine Sialylierung ein, sondern es muss noch aktiviert werden. Seine Aktivierung erfolgt mit äquimolaren Mengen Methylsulfonyltriflat (MeSOTf)<sup>[80]</sup>, doch werden oft auch andere thiophile Promotoren eingesetzt wie zum Beispiel Phenylsulfonyltriflat (PheSOTf)<sup>[81]</sup>, Dimethyl(methylthio)sulfoniumtriflat (DMTST)<sup>[82-83]</sup> oder *N*-Iodsuccinimid (NIS)<sup>[84-85]</sup>.

Der thiophile Promotor wird *in situ* unter Lichtausschluss aus der Reaktion von wasserfreiem Silber(I)-triflat mit Methylsulphenylbromid (**31**) gebildet, das selbst aus Dimethyldisulfid (**29**) und Brom (**30**) hergestellt wurde (Abbildung 4.16).

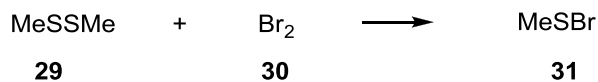


Abbildung 4.16: Synthese von Methylsulphenylbromid.

Das Methylsulphenyltriflat (**32**) koordiniert an den Thiano-Schwefel des Xanthogenats, so dass die entstehende Abgangsgruppe (**34**) austreten kann. Es entsteht ein intermediäres Oxycarbeniumion (**35**), das den Glycosyldonor darstellt. Das Lösungsmittel Acetonitril kann intermediär an das Oxycarbeniumion koordiniert werden (**36**), so dass die Reaktion mit dem Galactosylakzeptor zum gewünschten Glycosid (**37**) führt (Abbildung 4.17).

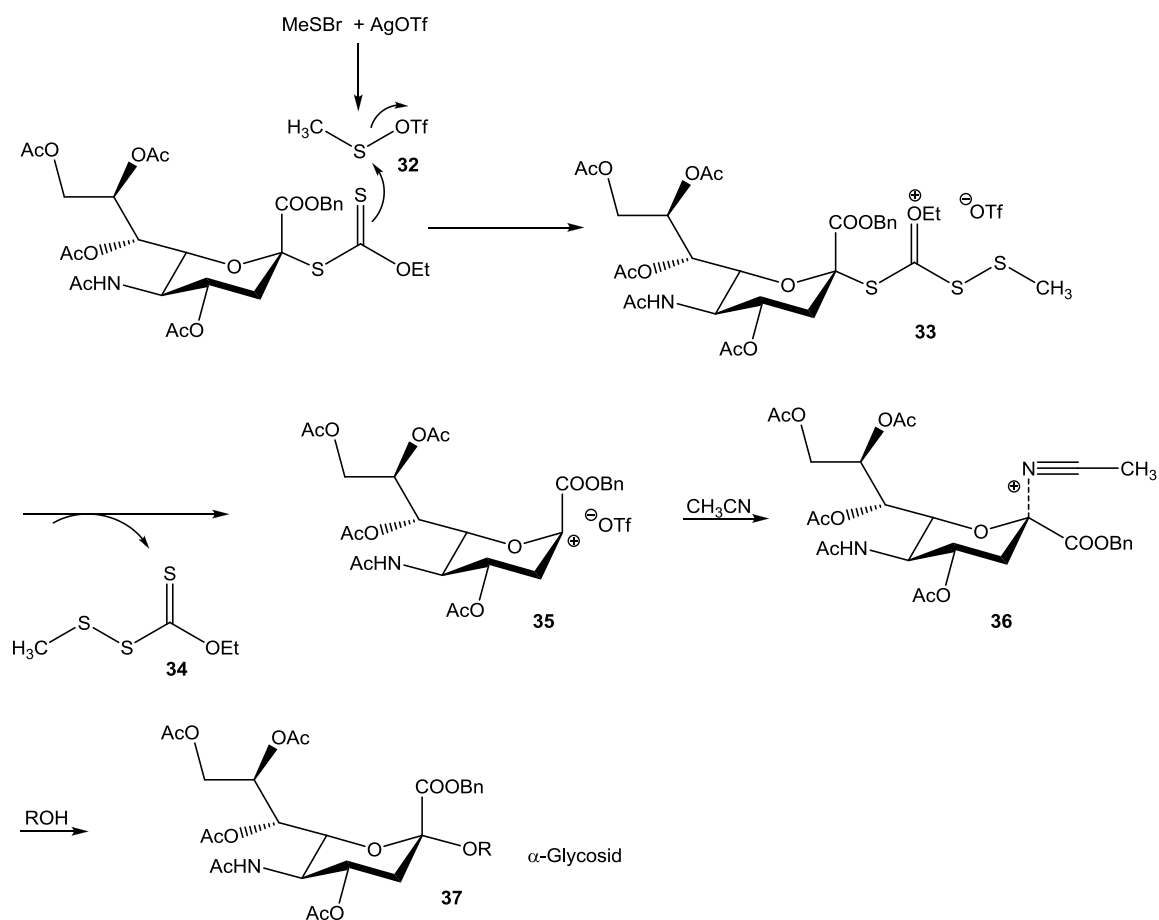


Abbildung 4.17: Darstellung des Sialindonors und Umsetzung zum Glycosid.

Die Stereochemie der Sialylierung kann über die Temperatur und die Wahl des Lösungsmittels kontrolliert werden.<sup>[86-87]</sup> Bei dem Einsatz von Lösungsmitteln, die eine Nitrilgruppe beinhalten, kann die Nitrilgruppe an das intermediäre Oxycarbeniumion koordinieren. Dabei kann sowohl das axiale als auch das äquatoriale Nitriliumkation gebildet werden, wobei beide Konformationen miteinander im Gleichgewicht stehen. Bei höheren Temperaturen findet eine thermodynamische Reaktionskontrolle statt, und es bildet sich das thermodynamisch stabilere äquatoriale  $\alpha$ -Nitriliumion. Der nukleophile Angriff des Akzeptors erfolgt von der  $\beta$ -Seite und es bildet sich das  $\beta$ -Sialosid.

Die kinetische Reaktionskontrolle findet bei tiefen Temperaturen statt und verschiebt das Gleichgewicht der Reaktion zum axialen  $\beta$ -Nitriliumion. Der nukleophile Angriff des Alkohols kann nur von der  $\alpha$ -Seite erfolgen, so dass stereoselektiv das  $\alpha$ -Sialosid gebildet wird (Abbildung 4.18).

So kann der Nitrileffekt ausnutzt werden, um die Reaktion zu dirigieren und damit das gewünschte  $\alpha$ -Sialosid zu erhalten. Die Sialylierung wird bei tiefen Temperaturen ( $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durchgeführt. Acetonitril dient als Lösungsmittel. Damit das Reaktionsgemisch nicht einfriert, erfolgt die Zugabe von Dichlormethan.

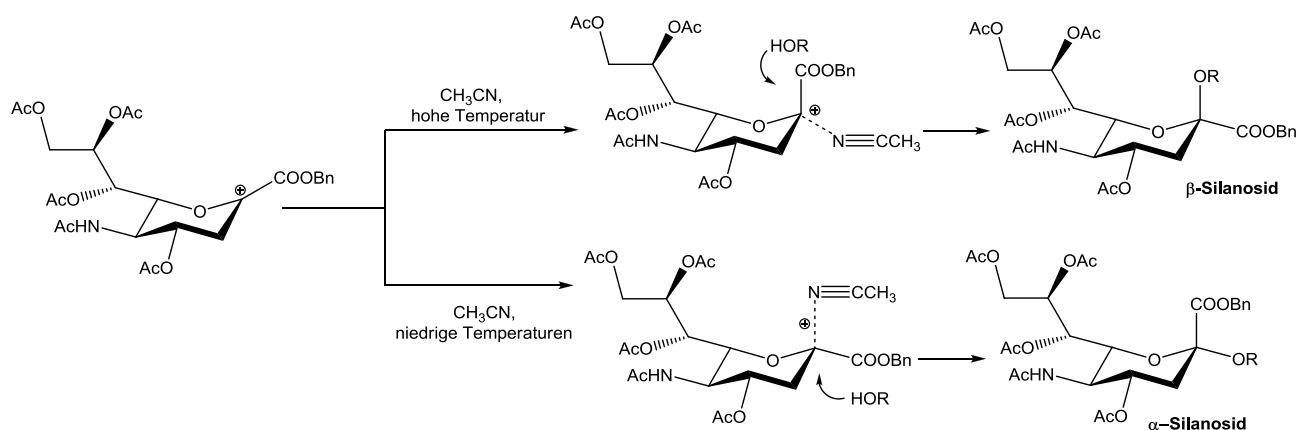


Abbildung 4.18: Reaktionskontrolle durch den Nitrileffekt.



Für die Sialylierung wird der Akzeptor (**15**) mit 2.5 Äquivalenten Sialinsäurexanthogenatbaustein (**28**) umgesetzt. Die Reaktion wird zum einen durch die Lösungsmittel Acetonitril/Dichlormethan und zum anderen durch die Temperatur von  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  kontrolliert, so dass stereoselektiv das  $\alpha$ -Sialosid (**38**) entsteht (Abbildung 4.19).

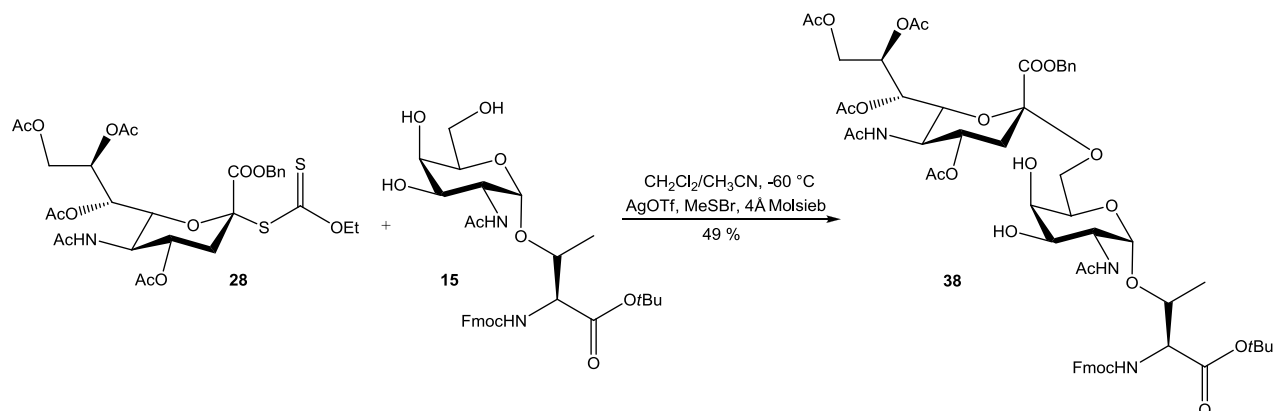


Abbildung 4.19: Synthese des 2,6-Sialyl- $T_N$ -Bausteins.

Der Akzeptor hat in der 6-Position eine primäre Alkoholfunktion, die im Vergleich zu den Hydroxyfunktionen in 3- und 4-Position chemisch reaktiver und sterisch weniger gehindert ist. Aus diesem Grund müssen die 3- und 4-Hydroxyposition nicht mit Schutzgruppen versehen werden. Die Reaktion verläuft in einem hohen Maße stereo- und regioselektiv.

Während der Sialylierung kann aus dem Silbertriflat Trifluormethansulfonsäure entstehen, die bei höheren Temperaturen den säurelabilen *tert*-Butylester des  $T_N$ -Konjugats spalten kann. Um die Entstehung der Säure zu vermeiden, wird das Reaktionsgemisch vor Erwärmen auf Raumtemperatur mit *Hünig*-Base versetzt, wodurch die Trifluormethansulfonsäure als Salz abgefangen wird.

Um den Sialyl- $T_N$ -Baustein in der Festphasensynthese einsetzen zu können, muss die Verbindung (**38**) an der Carboxylfunktion deblockiert werden. Dazu werden die freien Hydroxylgruppen mit Acetanhydrid/Pyridin acetyliert. Anschließend wird der *tert*-Butylester mit Trifluoressigsäure und Anisol, welches als Kationenscavenger dient, gespalten, so dass der in die Festphasenglycopeptidsynthese einsetzbare Baustein (**40**) mit 80 % Ausbeute erhalten wird (Abbildung 4.20).

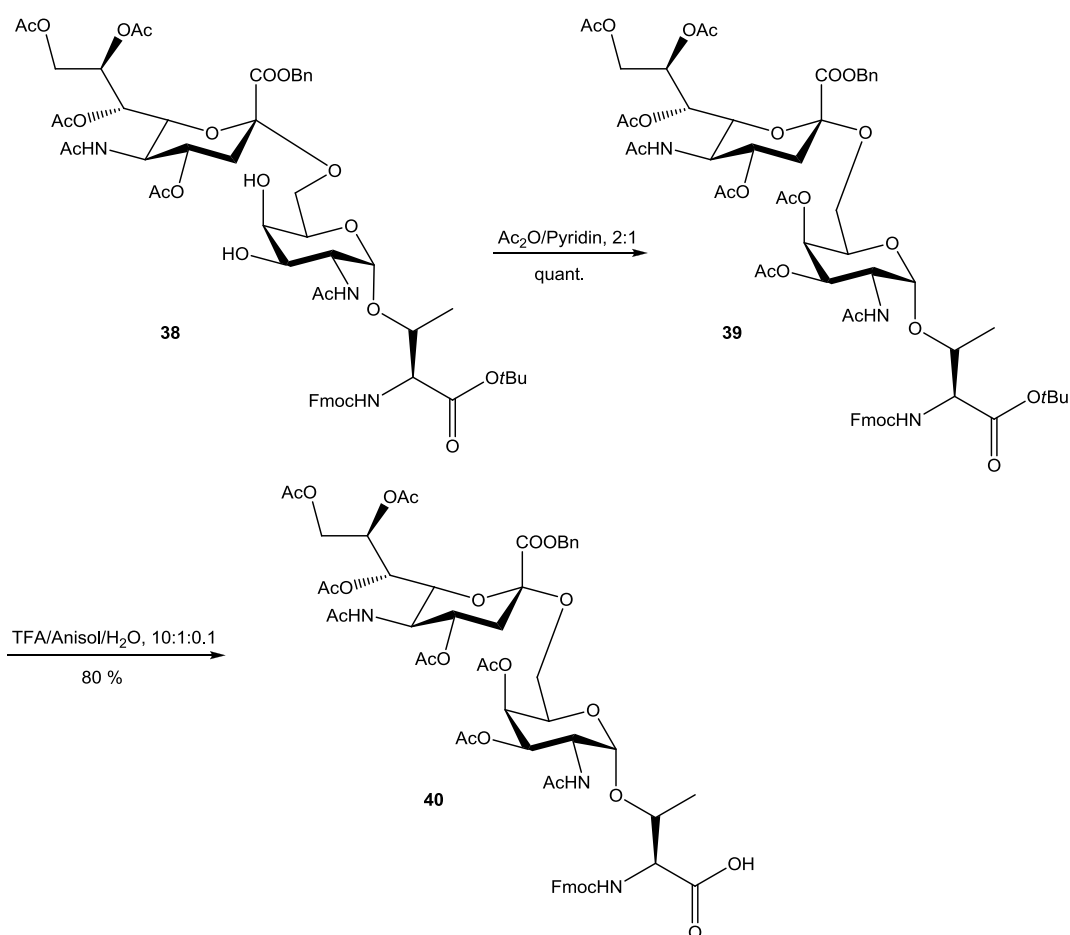


Abbildung 4.20: Darstellung des Sialyl-T<sub>N</sub>-Bausteins (40).

### 4.3 Synthese des T-Antigens

Für die Synthese der sialylierten Thomsen-Friedenreich-Antigen-Strukturen ist das T-Antigen selbst ein wichtiger Schlüsselbaustein. Zunächst muss eine Blockierung der 4- und 6-Hydroxyfunktionen des Galactosamin im Konjugat (**15**) erfolgen. Es wird Benzylidenacetal als Schutzgruppe eingeführt, wobei zunächst mit katalytischen Mengen *p*-Toluolsulfonsäure (pH = 4) eine Methoxygruppe aus dem Benzaldehyddimethylacetal (**42**) abgespalten wird. Die Benzylidenacetal-Schutzgruppe bildet sich durch Angriff der primären Hydroxyfunktion des Konjugats (**15**) (Abbildung 4.21).<sup>[88]</sup> Das entstandene Produkt (**41**) trägt an der 3-Position eine freie Hydroxyfunktion, die als Akzeptor für die Galactosylierung dient.

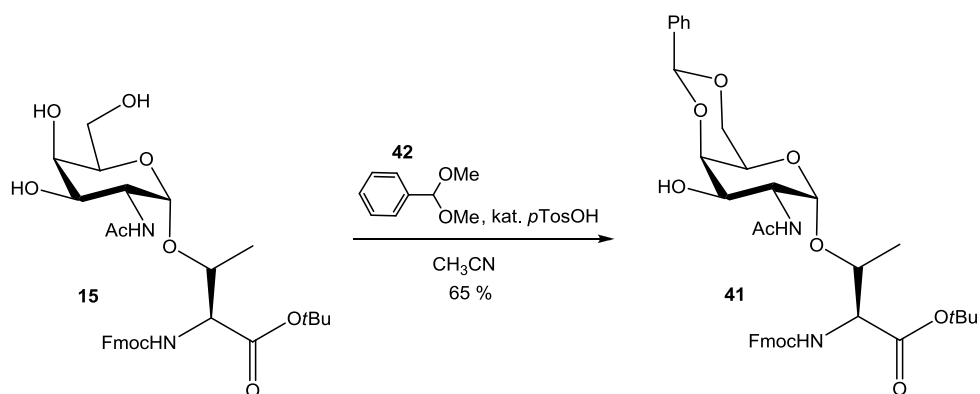


Abbildung 4.21: Blockierung der 4- und 6-Hydroxyfunktion.

Die Synthese des Galactosyldonors erfolgt nach einer literaturbekannten Strategie<sup>[89-90]</sup> ausgehend von D-Galactose (**1**), die mit Aceton in Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure als Katalysator zu 1,2;3,4-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranose (**43**) umgesetzt wird. Das bei der Reaktion entstehende Wasser wird durch den Zusatz von wasserfreiem Kupfersulfat gebunden. Das Rohprodukt kann ohne weitere Reinigung in die nächste Reaktion eingesetzt werden. Die primäre 6-Hydroxyfunktion von (**43**) wird mit Natriumhydrid deprotoniert und mit Benzylbromid zum Benzylether (**44**) alkyliert. Die säurelabilen Isopropylidengruppen werden mit 80%-iger wässriger Essigsäure bei 85 °C gespalten, so dass 6-O-Benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (**45**) entsteht. Die freien Hydroxylgruppen werden durch Acetanhydrid in Pyridin in einer von DMAP katalysierten Reaktion<sup>[91]</sup> acetyliert, und es wird das vollständig geschützte Galactosederivat (**46**) erhalten. Um den Baustein für eine Glycosylierung nutzbar zu machen, muss eine Umsetzung mit 33%-iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig bei einer Temperatur bei 0 °C erfolgen. Nach zügiger Flashchromatographie wird der empfindliche Galactosyldonor 2,3,4-Tri-O-acetyl-6-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid (**47**) erhalten (Abbildung 4.22).<sup>[92]</sup>

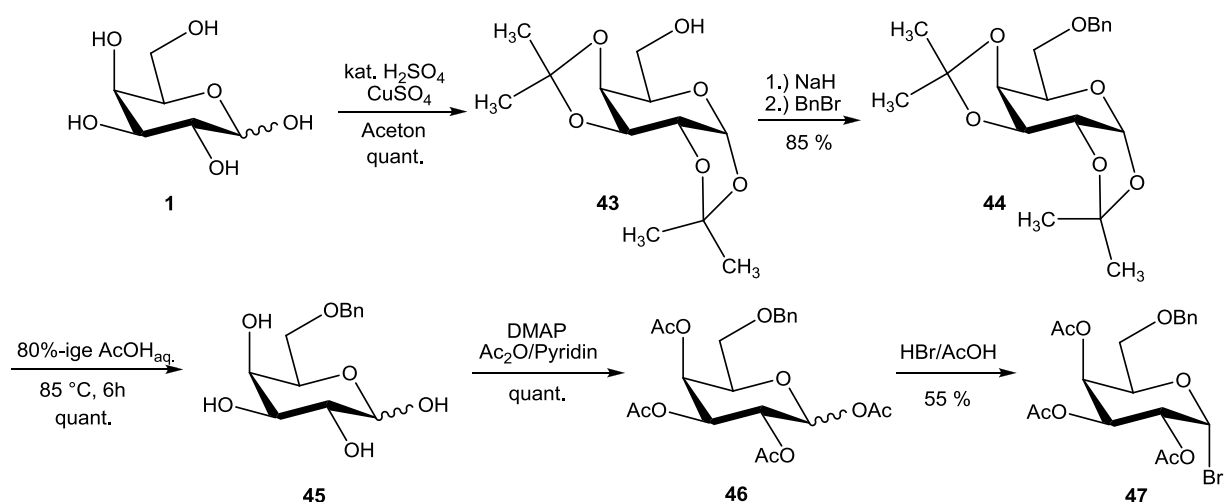


Abbildung 4.22: Synthese des Galactosyldonors.

Die stereoselektive Glycosylierung erfolgt nach *Helferich*<sup>[93]</sup>. Glycosylhalogenide können nach der klassischen *Koenigs-Knorr*-Reaktion mit Silbersalzen als Promotoren aktiviert werden<sup>[94]</sup>, doch haben Arbeiten<sup>[61, 95-96]</sup> der Arbeitsgruppe Kunz gezeigt, dass eine Glycosylierung unter *Helferich*-Bedingungen die bessere Wahl ist. Die Glycosylierung erfolgt durch Galactosylbromid (**47**) an der 3-Hydroxyfunktion des Galactosylakzeptors (**41**). Als Aktivierungsmittel und um den entstehenden Bromwasserstoff als Quecksilber(II)bromid abzufangen, wird Quecksilber(II)-cyanid in einer Lösungsmittelmischung aus Nitromethan und Dichlormethan in einem 3:2 Verhältnis eingesetzt, so dass das T-Antigen-Konjugat (**48**) erhalten wird (Abbildung 4.23).

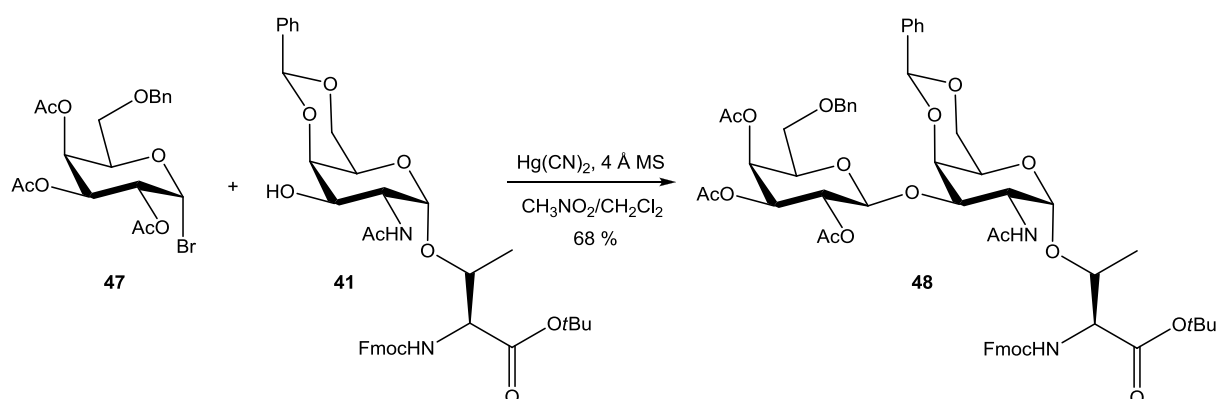


Abbildung 4.23: Synthese des T-Antigen-Konjugats unter Helferich-Bedingungen.

Mit hoher Stereoselektivität wird das  $\beta$ -Anomer gebildet. Hierbei wird der Nachbargruppeneffekt der Acetyl-gruppe in 2-Position des Galactosyldonors ausgenutzt. Das Quecksilbersalz dient als Promotor und leitet den Austritt des anomeren Bromids ( $\text{Br}^-$ ) ein. Das gebildete Oxycarbeniumion liegt im Gleichgewicht mit einem Acyloxoniumion-Intermediat, das durch die Mitwirkung der Estergruppierung entsteht. Der nukleophile Angriff der Alkoholfunktion des Glycosylakzeptors kann am C1 des Glycosyldonors erfolgen, so dass unter einer 1,2-trans-orientierten glycosidischen Bindung das  $\beta$ -Anomer entsteht.

Der nukleophile Angriff des Glycosylakzeptors kann auch ladungskontrolliert am Dioxoleniumkohlenstoff erfolgen, so dass ein Orthoester (**49**) gebildet würde (Abbildung 4.24). Basische Reaktionsbedingungen begünstigen die Bildung des Orthoesters (**49**), was aber bei der Reaktionsführung nicht beobachtet wurde, weil das Cyanid dieses Dioxoleniumion reversibel abfängt.

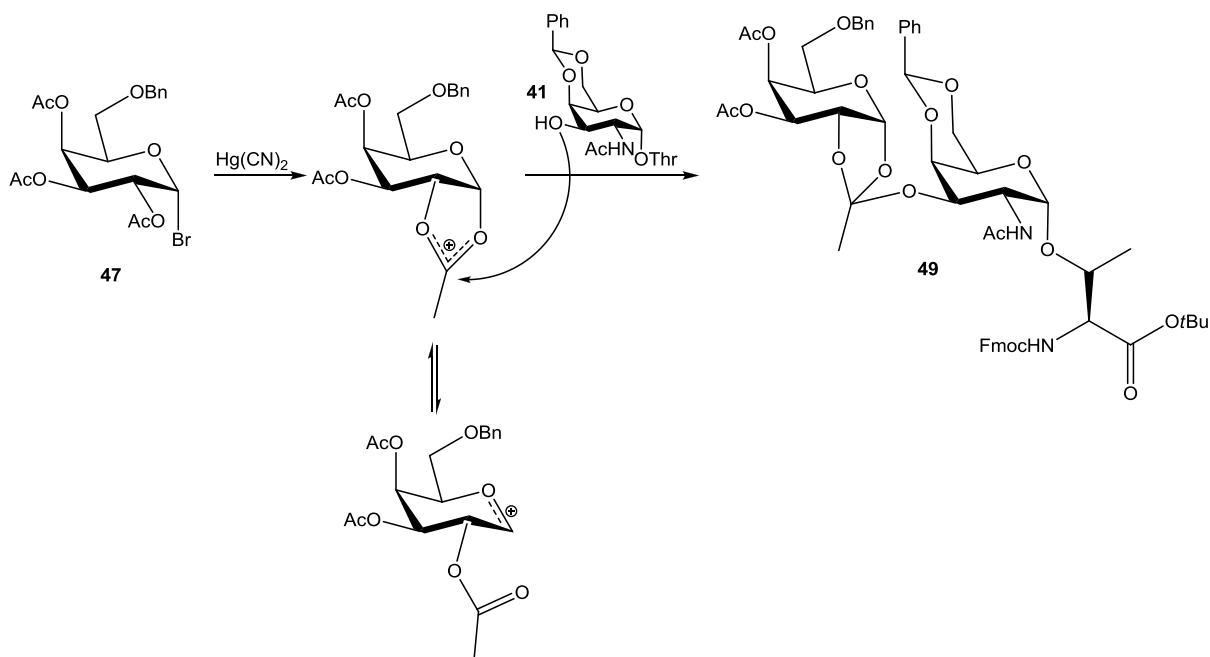


Abbildung 4.24: Basenunterstützte Bildung des Orthoesters **49**.

Der vollständig blockierte T-Antigen-Baustein (**48**) ist eine geeignete Vorstufe für die Synthese des (2,6)-Sialyl-T-Antigens. Um eine Sialylierung der primären Hydroxylfunktion in 6-Position durchführen zu können, muss die säurelabile Acetalschutzgruppe in 4- und 6-Position abgespalten werden. Dafür die Abspaltung müssen Reaktionsbedingungen gewählt werden, die den säurelabilen *tert*-Butylesters nicht angreifen. Eine Spaltung des

Benzylidenacetals wird mit 80%-iger wässriger Essigsäure bei einer Reaktionstemperatur von 85 °C ohne die Abspaltung des *tert*-Butylesters erreicht, so dass die anschließende Sialylierung der primären Hydroxylfunktion in 6-Position zum (2,6)-Sialyl-T-Konjugat erfolgen kann (Abbildung 4.25).

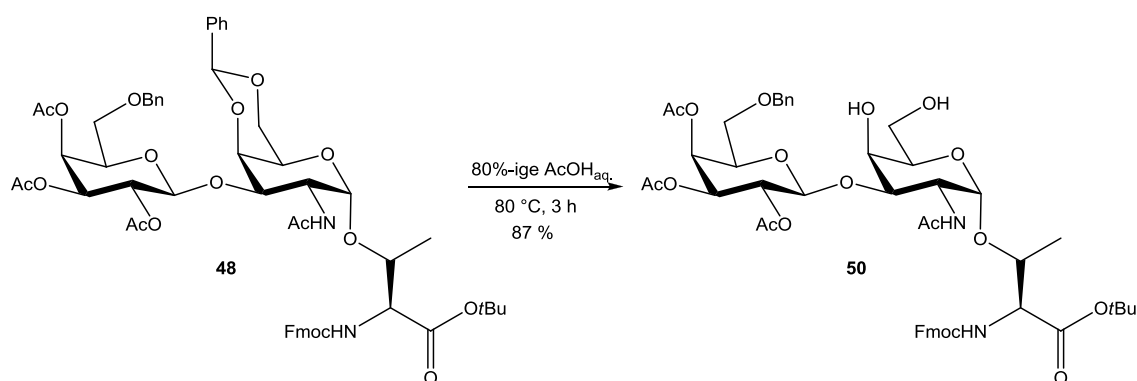


Abbildung 4.25: Säurekatalysierte Abspaltung der Benzylidenacetalschutzgruppe.

#### 4.4 Synthese des (2,6)-Sialyl-T-Antigens

Das entstandene Produkt (**50**) steht somit für die Sialylierung zur Verfügung und kann mit dem Xanthogenat (**28**) des *N*-Acetylneuraminsäurebenzylesters als Glycosyldonor umgesetzt werden (Abbildung 4.26).

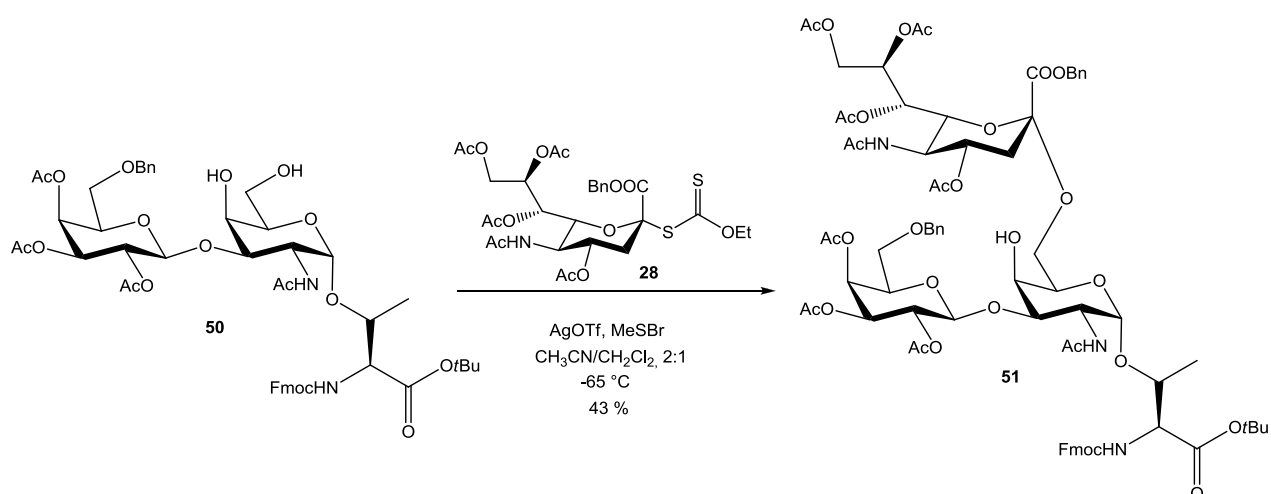


Abbildung 4.26: Sialylierung zum (2,6)-Sialyl-T-Antigen.

Der Donor wird wieder im leichten Überschuss von 2.3 Äquivalenten eingesetzt. Die Aktivierung des *N*-Acetylsäurebenzylesters erfolgt mit *in situ* gebildeten Methylsulfonyltriflat als Promotor und führt zum  $\alpha$ -Sialosid (**51**).

Um das kinetisch kontrollierte  $\alpha$ -Produkt (**51**) zu erhalten, wird die Reaktion bei tiefer Temperatur ( $T = -65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Dichlormethan (2:1) durchgeführt. Geringe Anteile des  $\beta$ -Sialosids werden an der HPLC getrennt. Als Nebenprodukt entsteht zudem durch  $\beta$ -Eliminierung das aus dem Donor gebildete Glycal der Sialinsäure, welches säulenchromatographisch vom  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sialosid abgetrennt werden kann. Die freie Hydroxylgruppe in der 4-Position weist eine geringe Aktivität und ist sterisch abgeschirmt, so dass an der freien OH-Position keine Sialylierung erfolgt.

Die Sialylierung von primären Hydroxyfunktionen verlaufen mit geringer Stereoselektivität als sekundäre Hydroxyfunktionen. Die primäre Hydroxylfunktion weist eine deutlich höhere Aktivität als die sekundäre Hydroxygruppe auf. Im Idealfall bildet sich das intermediäre  $\beta$ -Nitrilium-Konjugat (Abbildung 4.27) aus, so dass dieses Intermediat die Stereoselektivität in Richtung des  $\alpha$ -Sialosids lenkt.

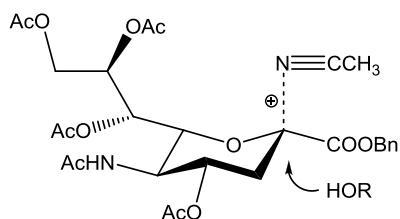


Abbildung 4.27: Die Bildung des  $\beta$ -Nitrilium-Konjugats.

Um den Baustein (**51**) in die Festphasensynthese einsetzen zu können, muss der *tert*-Butylester gespalten werden. Die Deblockierung wird durch ein Gemisch von Trifluoressigsäure, Anisol und Wasser im Verhältnis 9:1:1 erreicht. Das Anisol wird als Kationenscavenger eingesetzt, um Alkylierungen zu vermeiden. Nach der Säulenchromatographie an Kieselgel wird der (2,6)-Sialyl-Baustein (**52**) in einer Ausbeute von 84 % erhalten (Abbildung 4.28).

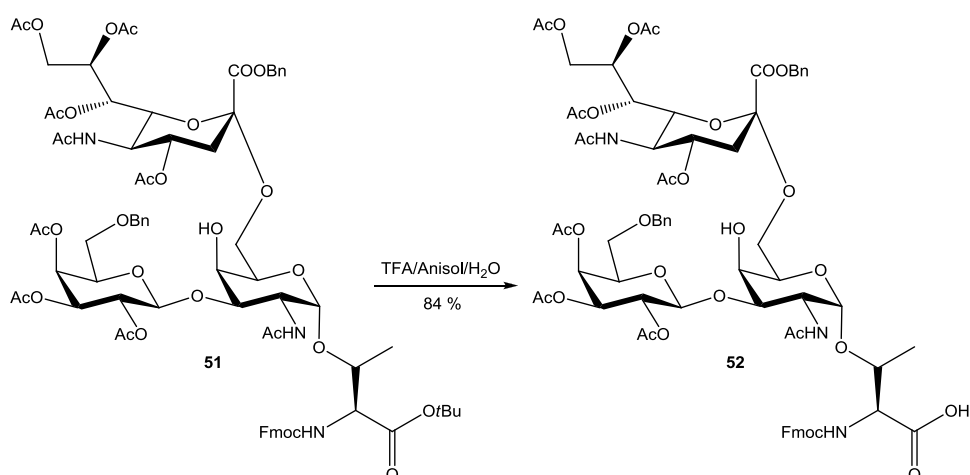


Abbildung 4.28: Deblockierung des *tert*-Butylesters.

## 4.5 Synthese des (2,3)-Sialyl-T-Antigens

Für die Synthese des (2,3)-Sialyl-T-Antigens dient das selektiv 3- $\beta$ -galactosylierte  $T_N$ -Threonin-Konjugat (**15**) ein zentraler Baustein. Zunächst ist die Blockierung der 4- und 6-Hydroxyfunktion des Galactosamins notwendig. Sie erfolgt durch Bildung des Benzylidenacetals, wodurch eine saure Abspaltung der Schutzgruppe ohne Angriff auf die *tert*-Butylschutzgruppe möglich wird. Für eine Sialylierung an 3-Position muss eine selektive *O*-Deacetylierung am Galactosylbaustein erfolgen. Die *O*-Deacetylierung erfolgt mit Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 8,5, da bei einem höheren pH-Wert die Ablösung der Fmoc-Gruppe eintreten kann. Die Abspaltung der Acetylschutzgruppen wird im Vergleich zum  $T_N$ -Threonin-Baustein erschwert. Beim  $T_N$ -Threonin-Baustein erfolgt die Abspaltung der Acetylgruppe zunächst in 6-Position, so dass die Hydroxylgruppe in der 6-Position als primärer Alkohol frei vorliegt. Somit kann eine Wanderung der Acetylschutzgruppe von der 3- und 4-Position zur 6-Position eintreten, wodurch die Abspaltung an der primären OH-Gruppe begünstigt ist. Im Vergleich dazu liegt beim T-Antigen-Konjugat (**48**) in 6-Position ein Benzylether vor, der die Abspaltung der Acetylgruppen erschwert. Die Abspaltung der Acetylgruppen muss also direkt von den sekundären Hydroxyfunktionen erfolgen, was deutlich die Abspaltung erschwert (Abbildung 4.29).



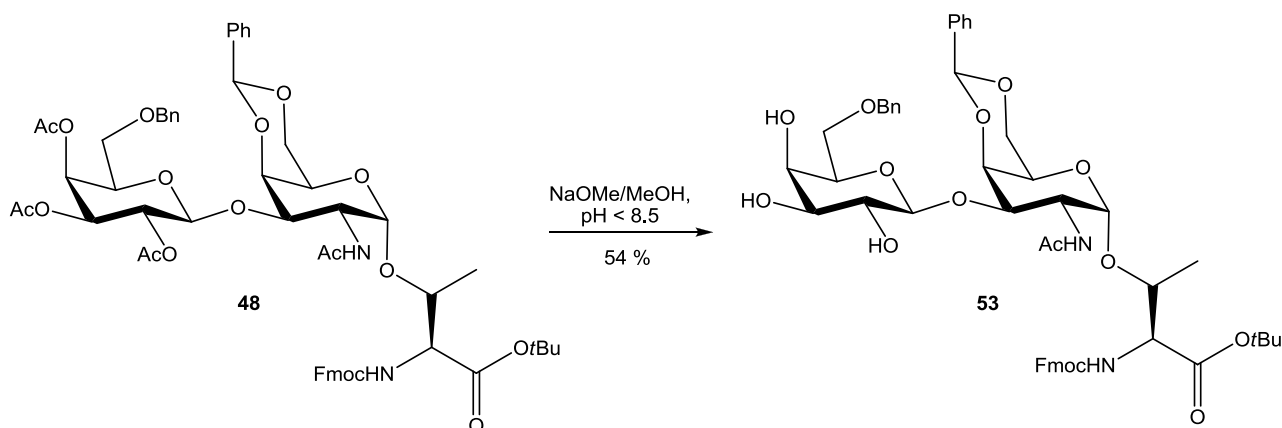


Abbildung 4.29: O-Deacetylierung des T-Antigen-Konjugats.

Bei der Deblockierung des Galactosylbausteins erfolgt auch bei strenger Kontrolle des pH-Wertes mindestens teilweise eine Abspaltung der Fmoc-Gruppe. Nach der Aufarbeitung des Produktes wurde nach der Säulenchromatographie nicht vollständig deacetyliertes Produkt erhalten, welches wiederholt mit einer frisch angesetzten Natriummethanolat-Lösung behandelt wurde, so dass der deblockierte Galactosyl-Baustein (**53**) in einer Ausbeute von 54 % erhalten wird.

Die nachfolgende Sialylierung zum (2,3)-Sialyl-Antigen erfolgt regio- und stereoselektiv an der 3'-OH-Funktion des Galactosylrestes.<sup>[97]</sup> Bei der Sialylierung wird das Sialinsäurexanthogenat (**28**) als Sialyldonor mit einem Überschuss von 2.5 Äquivalenten eingesetzt und mit dem T-Antigen-Baustein als Akzeptor mit *in situ* hergestelltem Methylsulphenylbromid als Promotor und Silbertriflat im Lösungsmittelgemisch von Acetonitril und Dichlormethan (2:1) zum (2,3)-Sialyl-Antigen (**54**) umgesetzt (Abbildung 4.30). Die Glycosylierung läuft mit einer sehr hohen Stereoselektivität ab. Ursache hierfür sind sterische und elektronische Effekte, die eine größere Reaktivität der 3'-OH-Funktion verursachen, so dass die Reaktion im höchstem Maße regioselektiv abläuft. Es wird das (2,3)-Sialyl-T-Antigen in einem  $\alpha:\beta$  Verhältnis von 98:2 erhalten. Die im Vergleich zur primären reaktionsträgere sekundäre Hydroxylgruppe liefert bei der Sialylierung eine wesentlich größere  $\alpha$ -Selektivität.

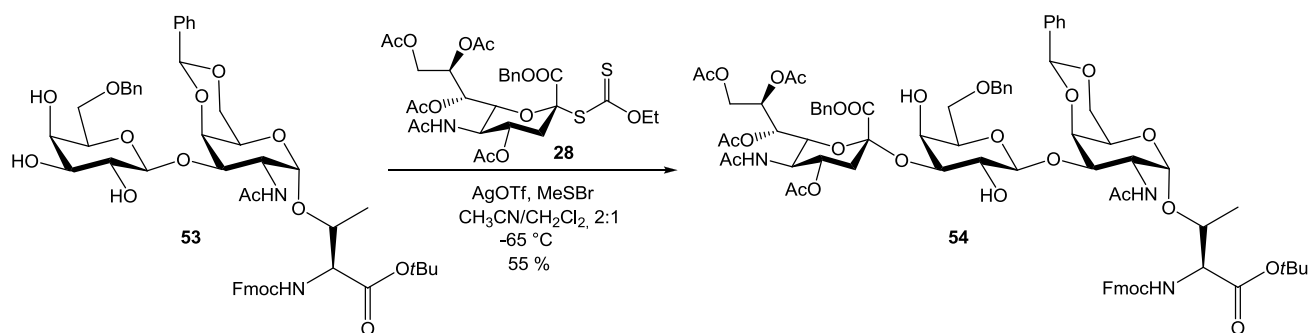


Abbildung 4.30: Silylierung zum (2,3)-T-Antigen (**54**).

Um den Baustein in der Peptidsynthese einsetzen zu können, müssen noch einige Schutzgruppenmanipulationen durchgeführt werden. Die Abspaltung der Benzylidenacetal-Schutzgruppe erfolgt unter säurekatalysierten Bedingungen mit 80%-iger Essigsäure bei 80 °C in einer Ausbeute von 81 % (Abbildung 4.31).

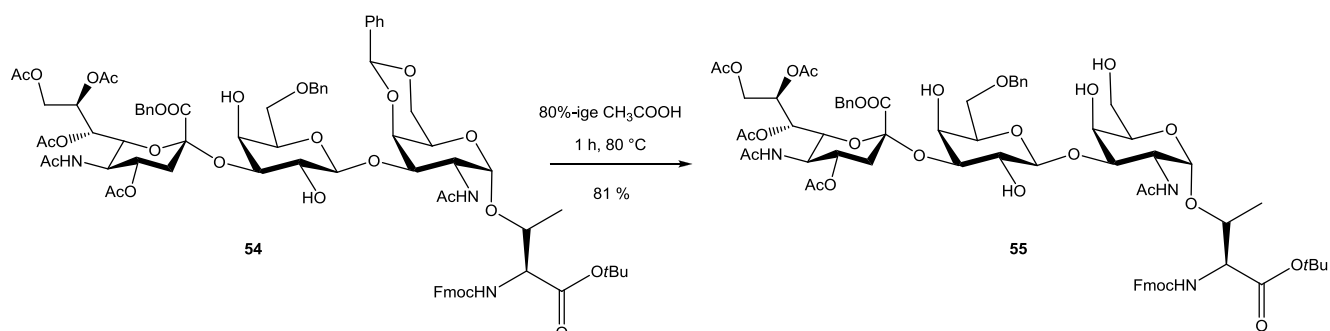


Abbildung 4.31: Abspaltung der Benzylidenacetal-Schutzgruppe.

Im nächsten Reaktionsschritt werden die freien Hydroxylgruppen mit Acetanhydrid und Pyridin (2:1) und *N,N*-Dimethylaminopyridin unter *Steglich*-Bedingungen<sup>[91]</sup> acetyliert, so dass der vollständig blockierte Baustein (**56**) in einer Ausbeute von 75 % erhalten wird (Abbildung 4.32).

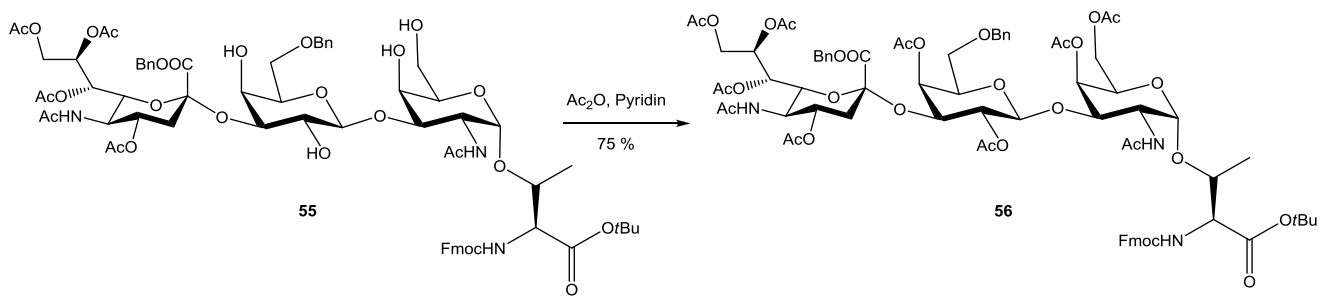


Abbildung 4.32: Acetylierung zum vollständig geschützten (2,3)-Sialyl-T-Antigen.

Im letzten Reaktionsschritt erfolgt die acidolytische Spaltung des *tert*-Butylesters mit Trifluoressigsäure und Anisol als Kationenfänger, wodurch der Baustein (**57**) für die Festphasenpeptidsynthese erhalten wird (Abbildung 4.33).

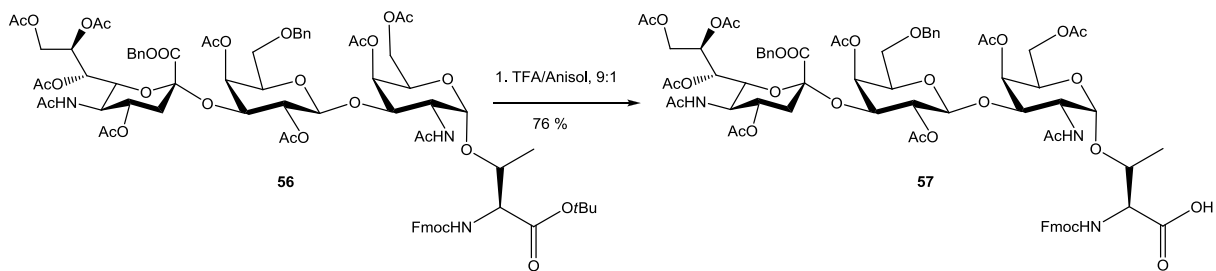


Abbildung 4.33: (2,3)-Sialyl-T-Antigen für die Festphasensynthese.

## 4.6 Die B-Zell-Aktivierung [98-100]

B-Zellen werden durch T-Helfer-2-Zellen ( $T_H^2$ ) aktiviert. Im lymphatischen Gewebe kommt es aufgrund der hohen Dichte zu der Interaktion von antigenspezifischen B-Zellen mit den entsprechenden antigenspezifischen  $T_H^2$  bei thymusabhängigen Antigenen. Diese gekoppelte Erkennung (*linked recognition*) unterstützt, die Selbsttoleranz des Immunsystems zu gewährleisten (Abbildung 4.34).

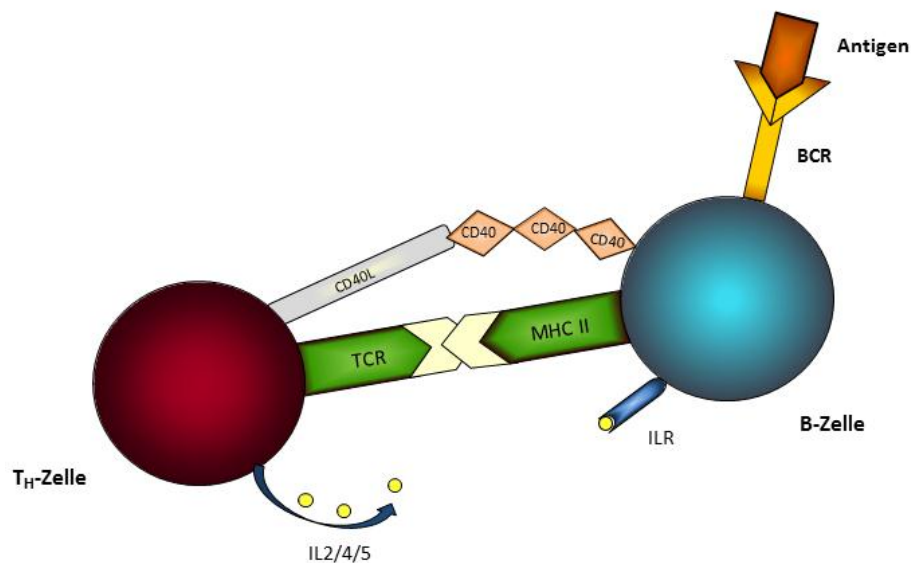


Abbildung 4.34: Aktivierung der B-Zellen durch die Wechselwirkung mit  $T_H^2$ -Zellen.

Die B-Zelle kann über ihren Rezeptor (BCR) Antigene binden und Peptide dieser Antigene im Verbund mit dem MHC II-Komplex auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Trifft die antigenspezifische  $T_H^2$ -Zelle auf die B-Zelle, kann die B-Zelle durch die  $T_H^2$ -Zelle aktiviert werden. Die B-Zelle benötigt zwei Signale, um von der T-Zelle aktiviert zu werden. Das erste Signal wird induziert über die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den MHC II/Peptid-Komplex der B-Zelle. Das zweite kostimulatorische Signal erfolgt durch die Bindung des CD40L auf der  $T_H^2$  an CD 40-Komplex der B-Zelle. Nach diesem kostimulatorischem Signal tritt die B-Zelle in die klonale Expansion ein. Die Bindung von CD40L an CD40 bewirkt zudem, dass die Expression von B7 erhöht wird, was kostimulierende Signale bei T-Zellen auslöst. Auf der B-Zelle wird die Expression von Interleukin-Rezeptoren (z.B. IL-4) induziert. Bei der T-Zelle wird IL-2 sezerniert, um die B-Zelle zur Proliferation anzuregen. Die von der  $T_H^2$  sezernierten Cytokine IL-4 (initiale Aktivierung der Proliferation der B-Zellen) und IL-6 stimulieren die

Differenzierung der B-Zelle zu einer Antikörper sezernierenden Plasmazelle. Des Weiteren scheinen auch die Tumornekrosefaktoren  $\alpha$  und  $\beta$  der Proliferation der B-Zelle beteiligt zu sein. Nach der Aktivierung der B-Zelle entstehen Antikörper produzierende Plasmazellen und B-Gedächtniszellen.

## 4.7 Immunantwort

Eine primäre Immunantwort erfordert drei Zelltypen: die APC (antigenpräsentierende Zelle), eine  $T_H^2$ -Zelle und eine B-Zelle. Interaktionen zwischen einer antigenpräsentierenden Zelle und einer  $T_H^2$ -Zelle induzieren die Erkennung von MHC II-gebundenen Peptiden seitens des T-Zellrezeptors und CD4.

Bei der sekundären Immunantwort übernimmt die B-Zelle zwei Aufgaben. Sie agiert als APC und sezerniert B7; zudem fungiert sie als Effektorzelle durch das von der T-Zelle sezernierte IL-4 und wird zur Zelldifferenzierung und klonalen Expansion angeregt. Haptene sind unvollkommene niedermolekulare Antigene, die sich zwar mit den entsprechenden Antikörpern verbinden können, für gewöhnlich aber selbst nicht in der Lage sind, eine Immunantwort zu induzieren. Bindet ein Hapten an einen hochmolekularen Träger, wie z.B. ein Carrier-Protein, so kann es zu einem vollständigen Antigen werden und eine Immunantwort auslösen. <sup>[101-103]</sup>

Gedächtnis-B-Zellen können spezifisch an B-Zell-Epitope über ihre Ig-Rezeptoren binden. Anschließend wird dieses Epitop durch rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen und mit abgebauten Peptiden assoziiert und auf der Oberfläche präsentiert. Die  $T_H$ -Gedächtniszellen, die klonal für Carrier-Epitope auf dem Antigen programmiert sind, können diese Klasse II-assoziierten Carrier über den T-Zell-Rezeptor erkennen. Das anschließende kostimulatorische Signal bewirkt die Sezernierung von IL-4, was die B-Zelle stimuliert. Es sind zwei Signale notwendig, um die B-Zelle in eine Effektorzelle umzuwandeln. Als erstes muss der antigenspezifische Ig-Rezeptor belegt und kreuzvernetzt sein und zweitens muss IL-4 von der T-Zelle ausgeschüttet werden.

Für die Antikörper-Produktion gegen T-abhängige Antigene ist die T-Zell/B-Zell Interaktion für die primäre und sekundäre Antwort erforderlich. Diese T-Zell/B-Zell abhängige Interaktion wird Carrier-Effekt genannt (Abbildung 4.35).

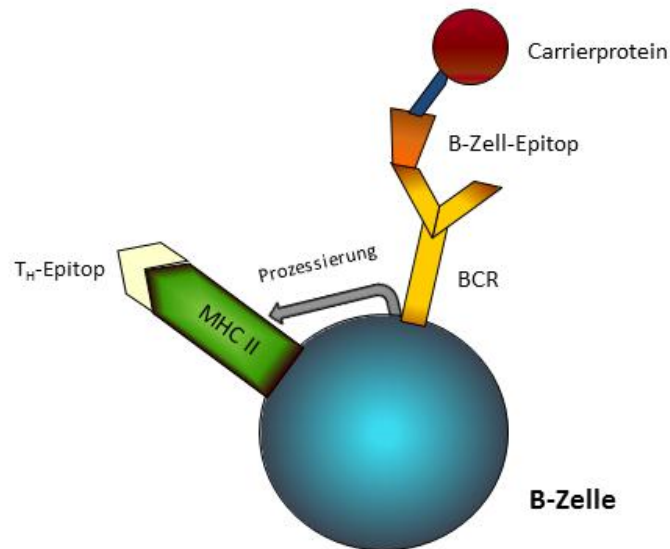


Abbildung 4.35: Der Carrier-Effekt.

Diese Carrier-Konjugate können als immobilisierte Antigene in Immunoassays eingesetzt werden. Kurze Peptide können nicht als immobilisierte Antigene eingesetzt werden, da sie aufgrund ihrer unzureichenden Bindung nur unvollkommen an die Polystyroloberfläche von Mikrotiterplatten binden.<sup>[104]</sup>

Als Trägerproteine können z.B. KLH<sup>[105]</sup> (keyhole limpet hemocyanin), Tetanus Toxoid<sup>[106-107]</sup> oder BSA<sup>[108]</sup> (bovine serum albumine) genutzt werden. Der Carrier KLH ruft selbst eine starke Immunantwort hervor. Aufgrund der hohen Molmasse von ca. 3.000.000-7.000.000 g mol<sup>-1</sup> und der tetrameren Struktur wird die massenspektrometrische Analyse der Konjugate erschwert. Deswegen wird in dieser Arbeit BSA als Trägerprotein eingesetzt. BSA gehört zur Gruppe der globulären Proteine und übernimmt mehrere Aufgaben. Die Hauptaufgabe ist die Regulierung des pH-Wertes des Blutes. Es fungiert aber ebenso als Proteinreserve und Trägerprotein, an den sich eine Vielzahl von Liganden binden kann. Das Protein BSA besteht aus 582 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 66433 g mol<sup>-1</sup>. Die Primärstruktur bildet 17 intramolekulare Disulfidbrückenbindungen aus, die zu neun

Loops führen, die drei äquivalente globuläre Domänen bilden. Die Sekundärstruktur besteht zu 70 % aus  $\alpha$ -Helices, enthält aber keine  $\beta$ -Faltblätter. Die Aminosäuren bestehen aus 100 aciden Resten (59 Glu, 41 Asp), zwei Tryptophan-Resten und 99 basischen Resten (59 Lys, 23 Arg, 17 His).<sup>[108-109]</sup> Die Anbindung der Haptene erfolgt über die Amingruppen, unter denen 30-35 gut zugänglich auf der Außenseite des Proteins liegen. Das Trägerprotein kann durch kovalente Bindung an das Hapten über unspezifische Reagenzien wie Glutaraldehyd oder Diazoniumverbindungen erfolgen. Ein Nachteil ist, dass hierbei keine definierten Konjugate synthetisiert werden, da die Kupplungsreagenzien viele Nebenreaktionen mit den funktionellen Gruppen des Peptids eingehen können. Durch den Einsatz von hydrophilen Carbodiimiden wird eine Amidbindung zwischen einer Carboxylgruppe des Haptens und der Aminfunktion des Proteins erhalten. Besitzt das Hapten mehrere funktionelle Gruppen, die mit dem Carbodiimid reagieren können, führt auch diese Methode nicht zu einem definierten Konjugat. Die in den Wiederholungseinheiten vorkommende Asparaginsäure in der MUC 1-Sequenz ist z.B. in der Lage, mit dem Carbodiimid zu reagieren. In Tabelle 4.1 werden mögliche Reaktionen gezeigt.

<i>Kupplungsreagenz</i>	<i>Reaktion</i>	<i>Anwendung bei</i>	<i>Nicht anwendbar bei</i>
Carbodiimide	Amidbindung aus einer Carboxylgruppe des Haptens und einer Amingruppe des Proteins	N-terminale Amine  C-terminale Carboxylgruppen	Asparaginsäure Glutaminsäure Lysin
Glutaraldehyd	Ausbildung einer Schiffischen Base aus Aminen, Thiolen, Indolen und Hydroxylfunktionen	N-terminale Amine  N- oder C-terminales Cystein	Cystein Lysin

*Tabelle 4.1: Mögliche Konjugatbildung.*

Die Verwendung von homo- oder heterobifunktionellen Reagenzien kann zu spezifischen Konjugaten führen.<sup>[110]</sup> Häufig sind die bifunktionellen Konjugate jedoch nicht geeignet, da diese selbst eine immunogene Antwort auslösen. Es kommt zur unerwünschten Bildung von Antikörpern gegen die Linkerstruktur, so dass kaum eine Immunantwort gegen das Hapten gerichtet ist. Deswegen muss eine Linkerstruktur gewählt werden, die keine Bildung von Antikörpern hervorruft.

## 4.8 Synthese des Triethylenglycolspacers

Um eine Verknüpfung zwischen T-Zell und B-Zell-Epitop herzustellen, wird ein Abstandhalter benötigt. Dieser Abstandhalter soll die charakteristische Konformation des jeweiligen Epitops bewahren (Abbildung 4.36). Die Verknüpfung soll daher über einen flexiblen nicht immunogenen Spacer erfolgen. Die Konjugate zwischen B- und T-Zellepitop sind als Heterotope definiert.

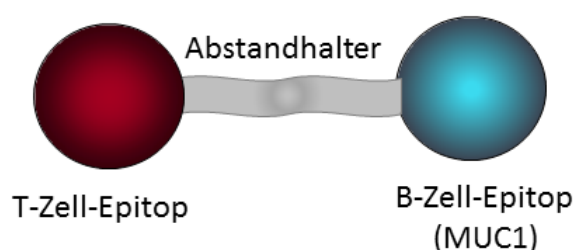


Abbildung 4.36: Konjugation zwischen B- und T-Zell-Epitop.

Nach literaturbekannter Strategie wird ein Triethylenglycolspacer als Aminosäureanalogon hergestellt.<sup>[111]</sup> Das Triethylenglycol (**58**) wird in absoluten Tetrahydrofuran mit Acrylsäure-*tert*-butylester (**59**) in einer Hetero-Michael-Addition in einer Ausbeute von 88 % zum 12-Hydroxy-4,7,9-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (**60**) umgesetzt. Anschließend wird die Hydroxyfunktion des 12-Hydroxy-4,7,9-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (**60**) mit Mesylchlorid und Triethylamin in Dichlormethan in eine gute Abgangsgruppe überführt, die dann mit Natriumazid nukleophil substituiert wird, wodurch 12-Azido-4,7,9-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (**61**) in einer Ausbeute von 46 % erhalten wird.

Die Hydrierung des Azids mit Wasserstoff über Raney-Nickel ergibt 12-Amino-4,7,9-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (**62**) mit 85 % Ausbeute. Anschließend liefert die Umsetzung mit Fmoc-OSu in Aceton/Wasser (1:1) in quantitativer Ausbeute den *N*-geschützten Spaceraminosäureester (**63**). Der *tert*-Butylester des Spacerbausteins wird acidolytisch mit Trifluoressigsäure und Anisol (10:1) deblockiert, so dass man *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,9-dioxa-nonansäure (**64**) in einer Ausbeute von 85 % erhält (Abbildung 4.37).<sup>[111]</sup> Der Spacerbaustein kann direkt in die Festphasensynthese eingesetzt werden und ermöglicht den Aufbau von Epitop-Konjugaten.



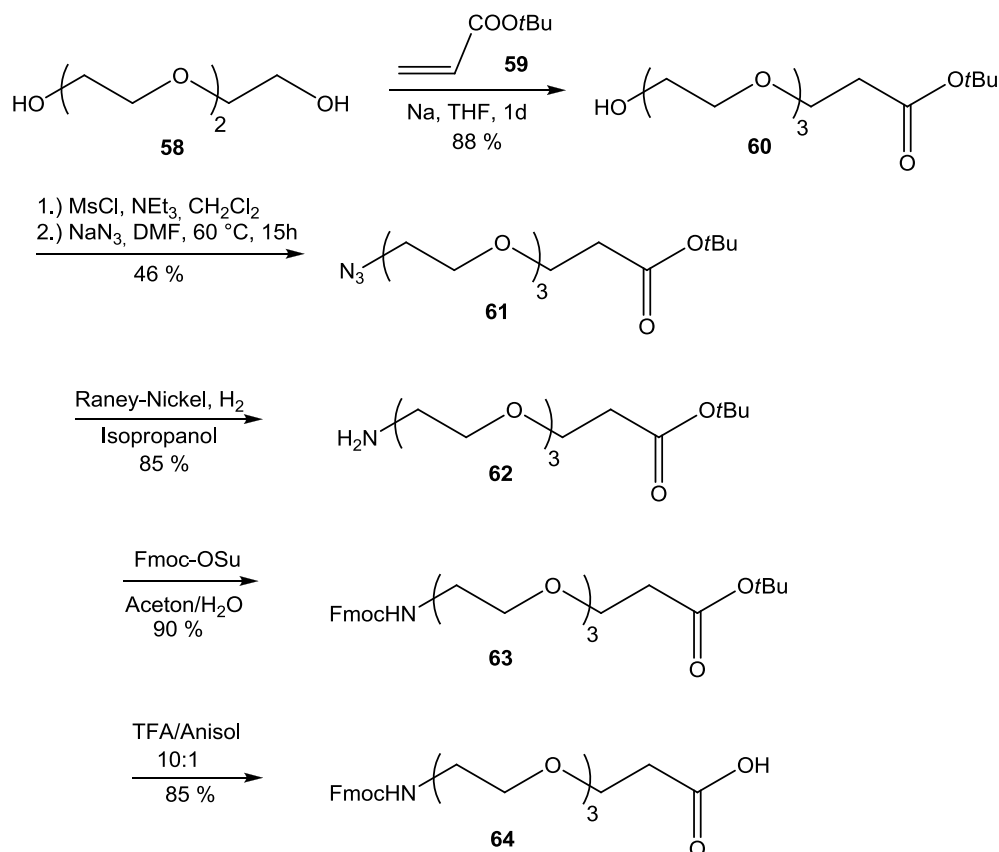


Abbildung 4.37: Synthese des Triethylglycolspacers 64.

## 4.9 Das Immunoadjuvant Pam<sub>3</sub>CysOH

In der Außenmembran von *E. coli* sind Lipoproteine gefunden worden, die B-Lymphocyten und Makrophagen aktivieren.<sup>[112]</sup> Diese Lipoproteine sind starke Mitogene für Lymphocyten verschiedener Spezies. Mitogene ermöglichen die Aktivierung von B- und/oder T-Zellen ohne dass ein antigenspezifischer Weg besprochen werden muss. Als Beispiel sei *Concanavalin A* (Con A, aus Rhizinusbohnen) erwähnt, dass die Mehrzahl aller T-Zellen unabhängig von ihrer Spezifität aktiviert. Die Bindung des Mitogens an die Oberflächenrezeptoren der T-Zelle verursacht die Aktivierung der T-Zellen. Der *N*-Terminus dieser Lipoproteine kann mit *S*-(Dihydroxypropyl)-cystein verknüpft werden. Das Cystein ist das Linkersystem für drei Fettsäuren, wobei die Palmitinsäure Hauptbestandteil dieser Fettsäuren ist. Das synthetische Derivat *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3-bispalmitoyloxy-(2*R*)-propyl)-*R*-cystein (Pam<sub>3</sub>Cys) ist die kleinste biologische Komponente,<sup>[113]</sup> die in der Lage ist, B-Zellen zu aktivieren, so dass es bei Immunisierungen eingesetzt werden kann (Abbildung 4.38).<sup>[114]</sup>

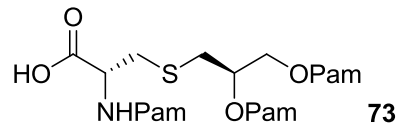


Abbildung 4.38: Die Struktur von Pam<sub>3</sub>CysOH (73).

Durch Verknüpfen eines Antigens wird ein chemisch eindeutig niedermolekulares definiertes Konjugat erhalten, das wie ein Carrier-Antigen-Konjugat wirken kann. Das Konjugat hat amphiphile Eigenschaften und wird durch die drei Fettsäurereste in der Lipidschicht der Zellwand verankert, wodurch eine Akkumulierung und Präsentation der Antigene auf der Zelloberfläche stattfinden kann, was eine Stimulierung der Lymphocyten verursacht.<sup>[115]</sup> Die Länge der Fettsäureketten hat nur einen geringen Einfluss. Es hat sich aber gezeigt, dass der Einsatz von drei Acylketten sehr gute biologische Aktivität aufweist. Die Peptidsequenz kann bezüglich der Aminosäuresequenz und der Länge variiert werden, ohne dass Verluste der biologischen Aktivität befürchtet werden müssen. Die biologische Aktivität des Pam<sub>3</sub>Cys lässt sich durch Anbinden von bestimmten Aminosäuren steigern. Es hat sich gezeigt, dass das Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> die größte biologische Aktivität aufweist (Abbildung 4.39).<sup>[116-119]</sup>

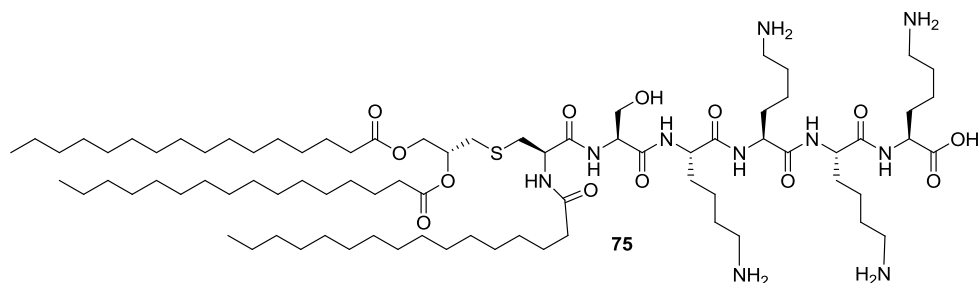


Abbildung 4.39: Struktur des Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>.

Das Hexapeptid Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> ist außerdem ein TLR2-Agonist (toll like receptor).<sup>[120]</sup> Die Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind abgeleitet von einem Protein des *Drosophila melanogaster* namens Toll.<sup>[121]</sup> Bis heute sind zehn TLR-Klassen bekannt (TLR1-TLR10).<sup>[122-123]</sup> Die TLR bestehen aus Proteinen, die Toll ähneln, woraus sich auch der Name „Toll-like“ ableitet. Sie gehören zu der Gruppe der PRR (Pattern Recognition Receptors) des angeborenen Immunsystems, die die PAMP-Strukturen (Pathogen Associated Molecular Patterns) erkennen. PAMP-Strukturen kommen ausschließlich auf pathogenen Mikroorganismen wie

Bakterien, Viren und Pilzen vor und steuern nach der Erkennung die Aktivierung der spezifischen Signalwege. Nach der Anbindung des Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> an den TLR2-Rezeptor wird die Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen induziert, wodurch die adaptive Immunantwort unterstützt und über den MHC-II Komplex die Antikörperproduktion initiiert wird.<sup>[120]</sup> Die Verknüpfung des Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> mit einem B-Zell-Epitop aus dem MUC1-Glycopeptid-Rückgrat kann zu einer selektiven Immunantwort führen.<sup>[124-125]</sup> Lipopeptid-Konjugate haben sich auch als Immunoadjuvantien bewährt.<sup>[126]</sup> Eine kovalente Anbindung des Glycopeptids an Proteine oder Peptide kann über Strukturen wie Micellen oder Liposomen induzieren, die bei Immunisierungen einen Depot-Effekt bewirken. Der Depot-Effekt bewirkt eine verlangsamte Verteilung des Impfstoffes in der Blutbahn, was auf eine geringere Löslichkeit des Konjugats in Wasser zurückzuführen ist. Bei Anwendung von Vakzinen, die gut in Wasser löslich sind, wird der Depot-Effekt mit dem kompletten Freund-Adjuvant initiiert. Das Freund-Adjuvant ist ein effektives Adjuvant zum Auslösen einer Immunreaktion, hat aber den Nachteil, dass es nicht mehr beim Menschen angewendet werden darf. Die Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>-Konjugate sind damit eine interessante Alternative zur Entwicklung humaner Vakzine, bei denen die Konjugate eingesetzt werden, um Immunantworten zu induzieren.<sup>[127-128]</sup> Deswegen sollen synthetische Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>-Konjugate hergestellt werden, die über einen nicht immunogenen Spacer, der als Abstandhalter eingesetzt wird, mit dem MUC1-Glycopeptid verknüpft werden. Das MUC1-Glycopeptid wird am Festphasenpeptidsynthesizer aufgebaut, der Spacer manuell gekuppelt und anschließend die Fmoc-Gruppe abgespalten. Die Abspaltung vom Harz erfolgt mit Trifluoressigsäure/TIPS/Wasser im Volumenverhältnis von 9:1:0.1 unter kräftigem Schütteln im Merrifield-Reaktor. Auch die Synthese des Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> erfolgt linear im Festphasenpeptidsynthesizer. Das Produkt wird vom Harz mit Trifluoressigsäure/TIPS/Wasser (9:1:0.1) abgespalten, so dass das Mitogen mit einem freiem C-Terminus erhalten wird. Die zwei Bausteine können in einer Fragmentkondensation (Abbildung 4.40) verknüpft werden.

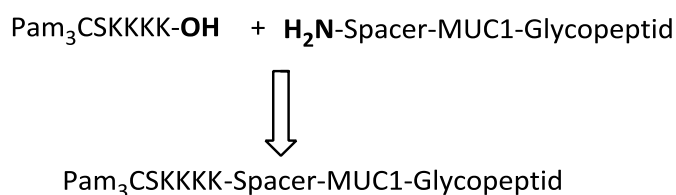
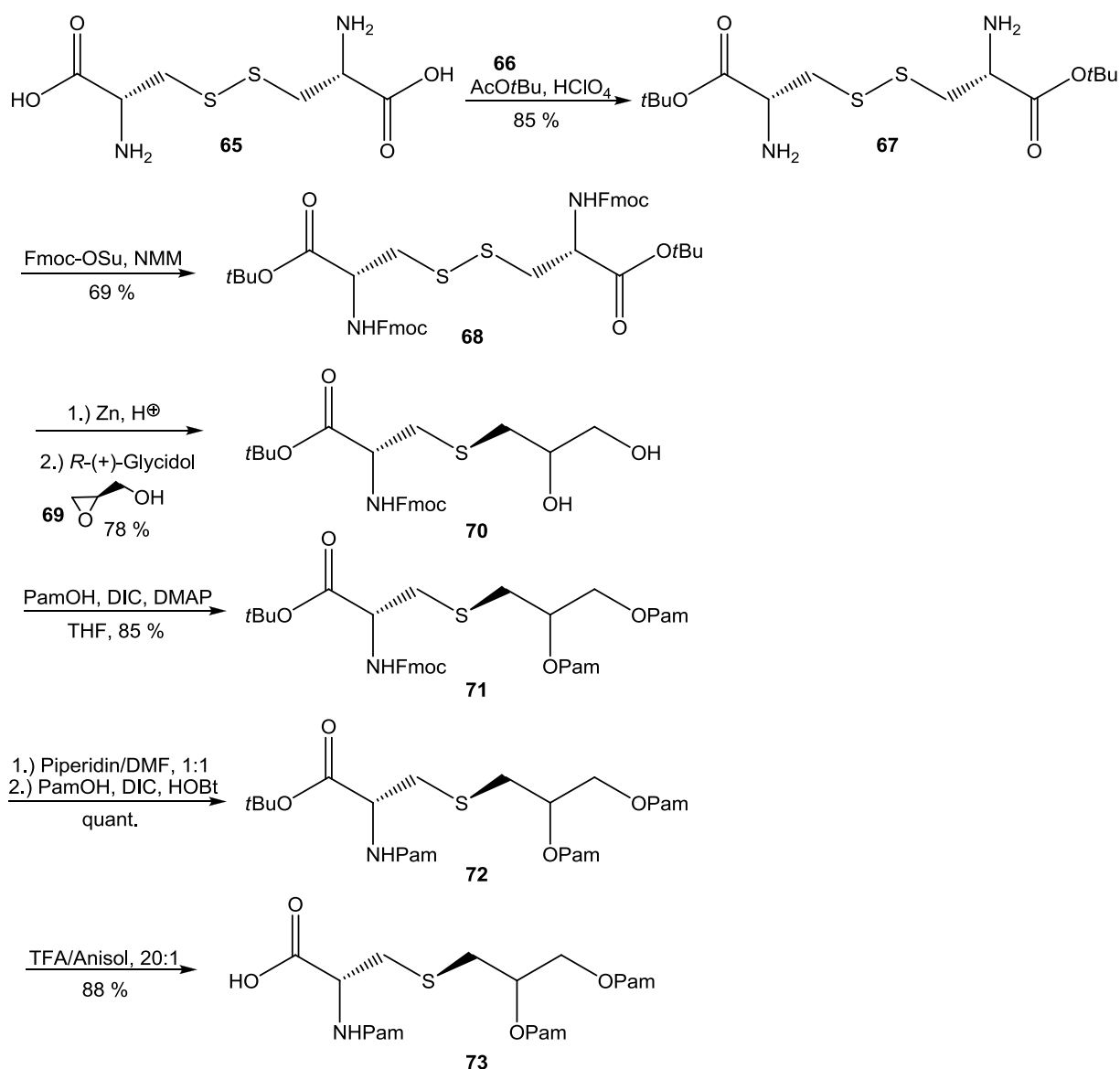


Abbildung 4.40: Fragmentkondensation des MUC1-Glycopeptides mit  $\text{Pam}_3\text{Cys(Lys)}_4$ .

## 4.10 Synthese von $\text{Pam}_3\text{CysOH}$

Nach einer literaturbekannten Strategie<sup>[129]</sup> wird in sechs Stufen ausgehend von L-Cystin (**65**) das Mitogen *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3)-bispalmitoyloxy-(2*R*)-propyl)-(*R*)-cystein (**73**) hergestellt (Abbildung 4.41).

Zunächst werden die Carboxylfunktionen des L-Cystins (**65**) mit Essigsäure-*tert*-butylacetat (**66**) und katalytischen Mengen Perchlorsäure in den *tert*-Butylester (**67**) überführt.<sup>[130-131]</sup> Anschließend wird die freie Aminofunktion mit *Fmoc*-OSu in THF (**68**) in einer Ausbeute von 69 % blockiert.<sup>[116]</sup> Die Disulfid-Brücke wird unter sauren Bedingungen reaktiv mit Zink gespalten, so dass das Thiol erhalten wird. Die Thiolgruppe wird in 78 % mit (*R*)-(+)-Glycidol (**69**) in den entsprechenden Thioether (**70**) überführt. Lipopeptide mit (*R*)-(+)-Glycidol (**69**) weisen eine höhere Aktivität als das *S*-Diastereomer auf, so dass (*R*)-(+)-Glycidol eingesetzt wird.<sup>[129]</sup> Die freien Hydroxylfunktionen werden anschließend mit den Fettsäuren verestert. Im vorliegenden Fall werden durch *Steglich*-Veresterung (DIC, kat. DMAP) die Palmitinsäureester eingeführt, so dass der Baustein (**71**) in einer Ausbeute von 85 % erhalten wird. Mit Piperidin/DMF wird *Fmoc*-Schutzgruppe entfernt, so dass auch die Aminofunktion mit Palmitinsäure unter Einwirken der Kupplungsreagenzien HOBt und DIC in DMF und in quantitativer Ausbeute in das Amid (**72**) überführt wird. Anschließend erfolgt die acidolytische Spaltung des *tert*-Butylesters mit TFA/Anisol in einem (Volumenverhältnis: 20:1) in quantitativer Ausbeute. Der  $\text{Pam}_3\text{Cys}$ -Festphasenbaustein (**73**) wird in sechs Stufen erhalten. Optimierungen am Festphasenbaustein durch Ersatz der Palmitinester durch Ether oder Ersatz des Schwefels durch andere Heteroatome führt zu Aktivitätsverlusten.<sup>[116]</sup>

Abbildung 4.41: Synthese von Pam<sub>3</sub>CysOH (73).

## 4.11 Das allgemeine Protokoll der Festphasensynthese

Die Glycopeptidsynthese erfolgt an einem Peptidsynthesizer der Firma *Perkin Elmer* (Modell ABI 433A) nach der *Fmoc*-Strategie. Die basenlabile Fmoc-Gruppe<sup>[132]</sup> ist eine der wichtigsten Schutzgruppen für die Aminofunktion darstellt. Als polymere Träger dienen in dieser Arbeit ausschließlich TentaGel-S-Harze der Firma *Rapp*. Interner Träger in der feste Phase ist ein Polystyrol-Harz, welches in vielen organischen Lösungsmitteln quillt. Um die Löslichkeit zu begrenzen, wird ein mit 1–2 % Divinylbenzol querverknüpftes Copolymer verwendet. Der

polymere Träger trägt einen Linker, der die Anknüpfung und anschließende Abspaltung der Aminosäuren ermöglicht, wobei die säurelabilen Wang-Anker<sup>[39]</sup> und Trityl-Anker eingesetzt wurden. Die Wang-Anker waren mit den C-terminalen Fmoc-Arg(Pmc) oder Fmoc-Pro beladen, der Trityl-Anker mit Prolin. Kleine Beladungsdichten verringern störende Wechselwirkungen zwischen den Peptidsträngen, so dass zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen oder Faltblattstrukturen vermieden werden können.<sup>[133]</sup> Die Beladungsdichte der Harze liegt zwischen 0.19 mmol/g und 0.23 mmol/g.

Die Aminosäuren wurden als *N*-terminal Fmoc-geschützte Derivate eingesetzt, die mit säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen versehen sind.<sup>[134]</sup> Die Hydroxylfunktion von Threonin und Serin wird mit *tert*-Butylether versehen, Glutaminsäure wird als *tert*-Butylester und die Seitenkette von Glutamin wird durch die Tritylgruppe blockiert. Die Guanindinfunktion der Aminosäure Arginin wird mit der 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-Schutzgruppe (Pmc)<sup>[135-136]</sup> versehen (Abbildung 4.42). Die Seitenketten-Schutzgruppen der Aminosäuren lassen sich durch Trifluoressigsäure entfernen. Die Trifluoressigsäure spaltet auch den Linker zum polymeren Träger, so dass das Rohpeptid in einem Reaktionsschritt isoliert werden kann.

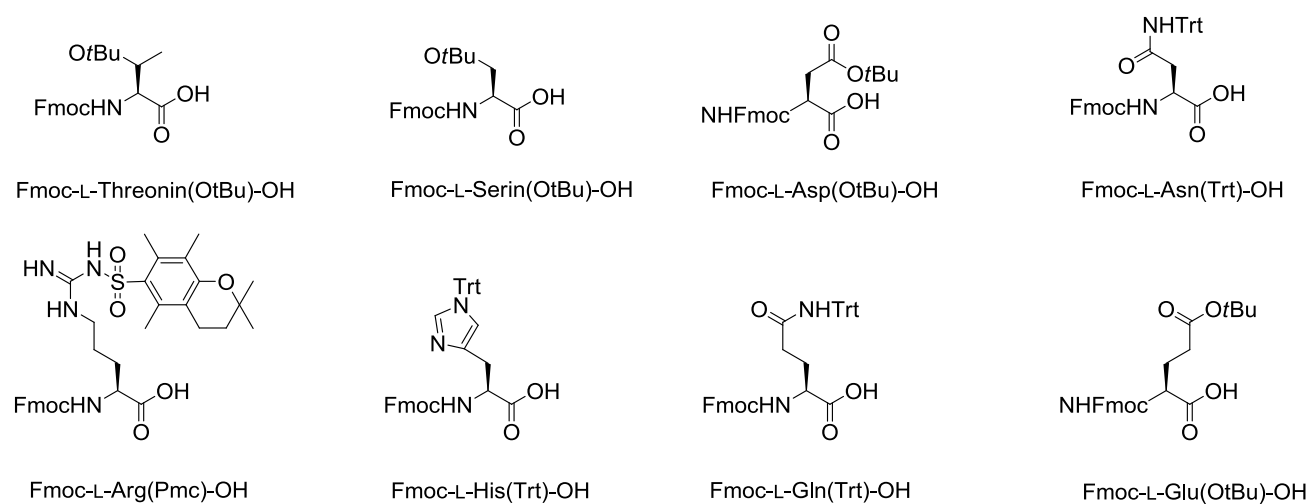


Abbildung 4.42: Übersicht der mit Schutzgruppen versehenen Aminosäuren.

Der Syntheszyklus der Festphasensynthese startet mit der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch eine 20%-ige Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon. Eine gute Durchmischung der Reagenzien wird durch starkes Schütteln erreicht. Die Abspaltung

ist in 2 bis 2.5 min abgeschlossen und der Zyklus wird dreimal wiederholt. Die Spaltung erfolgt nach einem  $E1_{cB}$ -Reaktionsmechanismus. Das acide Proton an der Schutzgruppe Fmoc (C9) wird durch Piperidin abstrahiert, woraufhin und anschließend Kohlenstoffdioxid und Dibenzofulven eliminiert werden. Piperidin dient auch als Scavenger und bildet ein Dibenzofulven-Piperidin-Addukt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe kann durch UV-Absorptionsmessung verfolgt werden und das Addukt nachgewiesen werden (Abbildung 4.43). Der Absorptionskoeffizient ist proportional zur Fmoc-Konzentration und damit ein wichtiger Indikator für die vorangegangene Kupplung. Das Abspaltungsprotokoll bietet damit einen wichtigen Nachweis für den Syntheseverlauf und dient als signifikante Reaktionskontrolle.

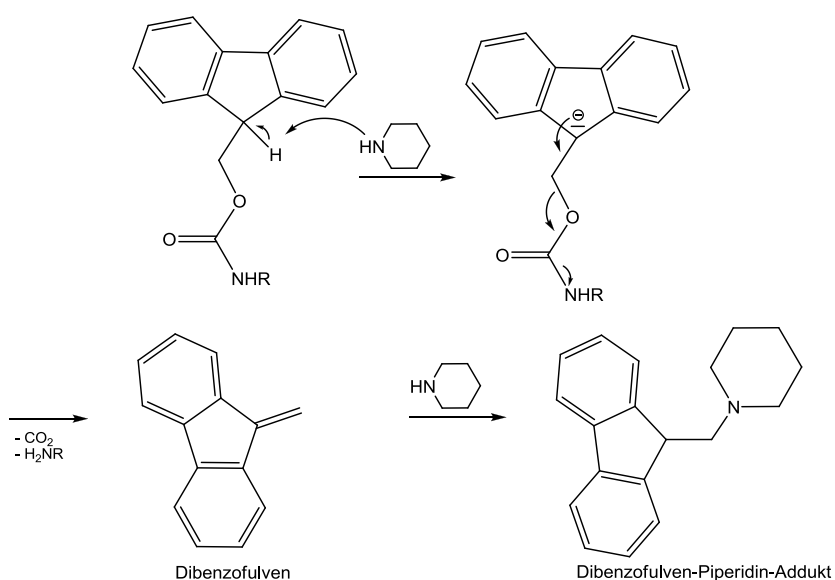


Abbildung 4.43: Fmoc-Abspaltung mit Piperidin.

Die Aminosäurederivate werden in Kartuschen eingewogen, wobei von dem Aminosäurebaustein zehn Äquivalente eingesetzt werden. Die Kupplungen der unglycosylierten Aminosäuren werden mit den Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt (Abbildung 1.7, Seite 14) unter Zugabe von Hünig-Base aktiviert. Die Kupplungszeiten betragen jeweils 30 Minuten. Die Aminosäure wird durch das Kupplungsreagenz HBTU zu einem *O*-Acylharnstoff (76) aktiviert, der im Gleichgewicht mit den Edukten steht. Der *O*-Acylharnstoff (76) wird mit HOBt schnell in einen HOBt-Reaktivester (77) überführt. Der Reaktivester reagiert mit der Aminogruppe der *N*-terminalen Aminosäure des harzgebundenen Peptids unter Aminolyse zum Amid. Hünigs Base dient zur Deprotonierung

der Carbonsäure und erhöht die Nukleophilie. Das Kupplungsadditiv HOBt beschleunigt die Bildung des Aktivesters und senkt die Racemisierungsgefahr der Aminosäure (Abbildung 4.44).

Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure erfolgt manuell und dauert acht Stunden. Die Aminosäure wird mit HATU, HOAt und *N*-Methylmorpholin aktiviert, anschließend in eine Kartusche überführt und mit NMP verdünnt.

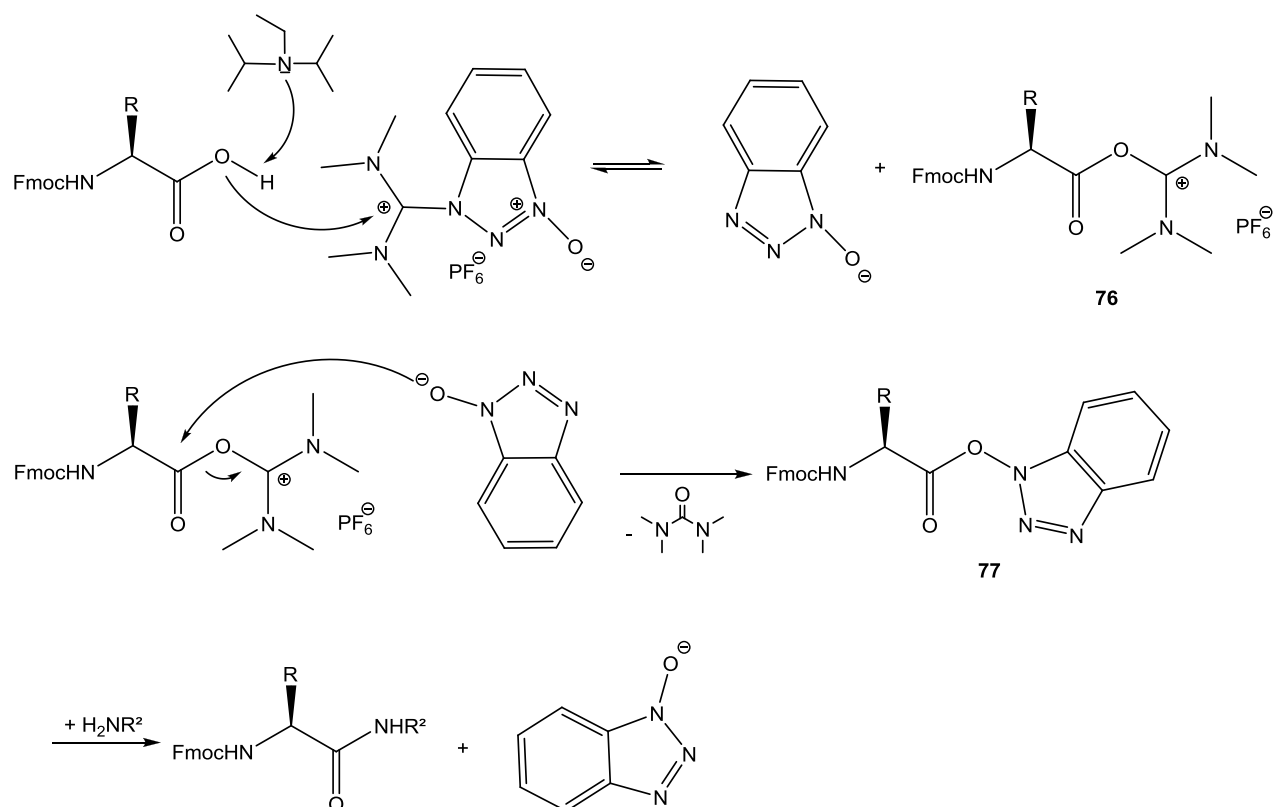


Abbildung 4.44: Aktivierung der Carbonsäure mit HBTU.

Nach jedem Kupplungsschritt erfolgt ein Capping der nicht umgesetzten Aminofunktion mit Acetanhydrid in Pyridin. Durch Capping wird die Bildung von unerwünschten Fehlsequenzen vermieden, die sich auch nur um eine Aminosäure von der gewünschten Sequenz unterscheidet. Eine Trennung von Fehlsequenzen von der Zielsequenz ist dann nicht möglich aufgrund der ähnlichen physikochemischen Eigenschaften. Die Acetylierung verhindert ein Wachsen der Fehlsequenz und das Abbruchpeptid kann nach beendeter Durchführung mittels HPLC von der Zielsequenz abgetrennt werden.



Die Reaktionslösung wird nach jedem Reaktionsschritt durch Filtration entfernt und das Harz sorgfältig gewaschen. Das Glycopeptid wird iterativ aus den Aminosäuren und glycosylierten Aminosäuren aufgebaut.

Die Abspaltung der synthetisierten Glycopeptide vom Harz erfolgt in einem Gemisch von Trifluoressigsäure, Wasser und einem Kationenscavenger. Durch die Trifluoressigsäure werden gleichzeitig die säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen der Aminosäuren abgespalten. Dabei entstehen intermediär Kationen, die eine Alkylierung der Aminosäuren verursachen können. Der Zusatz des Kationenscavengers verhindert diese Alkylierung. Als Scavenger wird Triisopropylsilan eingesetzt.<sup>[137-138]</sup> Das Triisopropylsilan kann unter sauren Bedingungen als Hydriddonor fungieren, so dass zum Beispiel das *tert*-Butylkation abgefangen werden kann (Abbildung 4.45). Die Reaktion ist irreversibel, und es kann nach Deblockierung und nach Reaktion mit dem Kationenfänger zu keinen weiteren Reaktionen mit dem Peptid kommen.

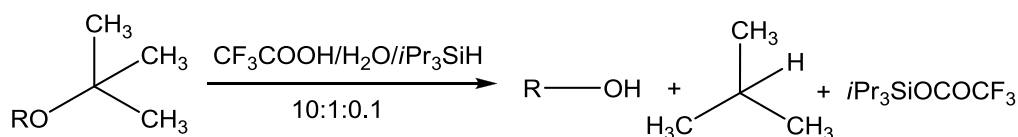


Abbildung 4.45: Einsatz von TIPS als Kationenscavenger.

Alle natürlichen L-Aminosäuren außer Glycin weisen am  $\alpha$ -C-Atom ein chirales Zentrum auf, wobei Isoleucin und Threonin auch ein chirales Zentrum in der Seitenkette tragen. Die biologischen Eigenschaften von Proteinen und Peptiden sind entscheidend abhängig von der Konfiguration der Aminosäuren, so dass es sehr wichtig ist, die Stereozentren während der Peptidsynthese zu erhalten und Racemisierungen<sup>[139]</sup> zu vermeiden.

In den optisch aktiven Aminosäuren ist das Wasserstoffatom am  $\alpha$ -Zentrum acide und kann basisch abstrahiert werden, so dass es zu einer Epimerisierung des Peptids kommen kann. Bei der Aktivierung der Carboxylgruppe während der Festphasensynthese steigt die Acidität des Protons am chiralen Zentrum, so dass es zu einer Racemisierung führen kann.

Ein Racemisierung kann auch bei einer Deprotonierung und Ringöffnung des Oxazolone-Intermediates eintreten, was durch einen Angriff der aktivierten Carboxylgruppe auf die benachbarte Amidbindung entsteht (Abbildung 4.46).

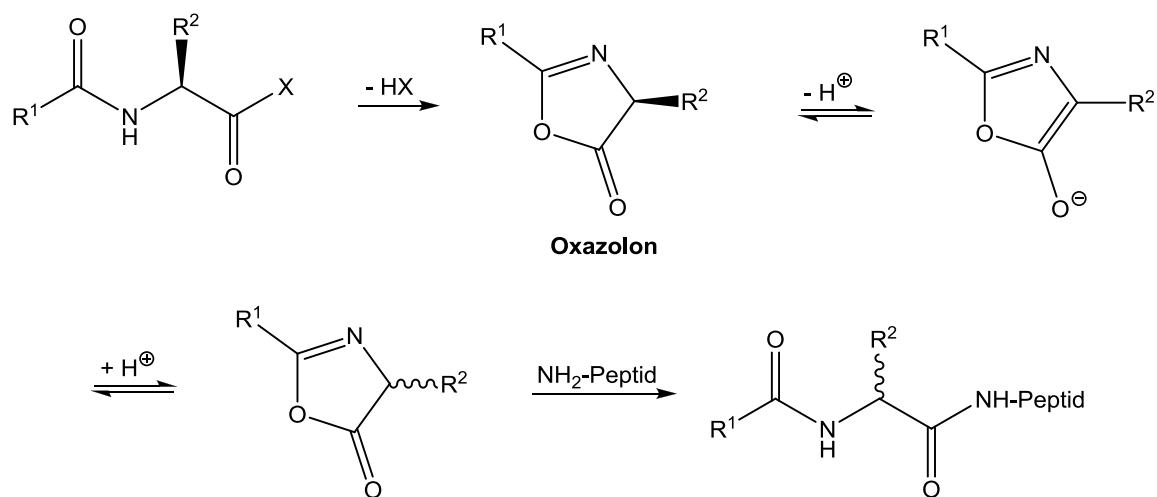


Abbildung 4.46: Enantiomerisierung via Oxazolone Bildung.

Die Bildung von Oxazolonen wird bei C-terminal aktivierten Peptiden oder acylierten Aminosäuren beobachtet. Durch Einsatz von sterisch gehinderten tertiären Basen wie *Hünigs* Base oder *N*-Methylmorpholin oder durch Anwendung der Urethan-Schutzgruppe vermeidet man weitgehend die Oxazolone-Bildung, wodurch die Racemisierung unterdrückt wird.<sup>[140]</sup> Die Verwendung von HOBt oder HOAt senkt die Racemisierungstendenz. Ein Vergleich der beiden Kupplungsadditive zeigt, dass HOAt die Racemisierungstendenz noch stärker senkt als HOBt, da beim Einsatz von HOAt der reaktivere OAt-Aktivester gebildet wird, der in der nächsten Aminosäurekupplung schneller umgesetzt wird, so dass die Racemisierung verhindert wird.<sup>[141]</sup>

## 4.12 Nebenreaktionen bei der Festphasensynthese

Während der Festphasensynthese können neben Racemisierung oder unvollständiger Peptidkupplung weitere Nebenreaktionen eintreten. Die Diketopiperazinbildung ist eine

Nebenreaktion. Diketopiperazine treten bei der Cyclisierung von Dipeptidestern mit freien Aminogruppen auf (Abbildung 4.47). Hierbei findet eine intramolekulare Aminolyse statt, so dass das am Polymer gebundene Peptid unter Bildung des Diketopiperazin vom polymeren Träger gelöst wird.

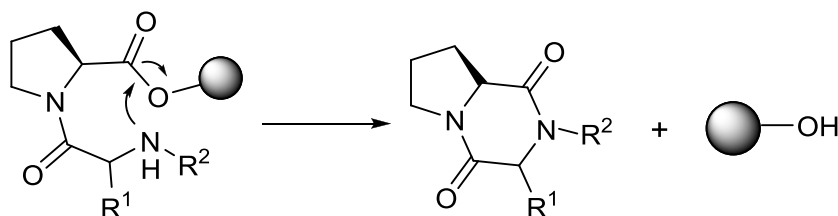


Abbildung 4.47: Diketopiperazin-Bildung.

Die Diketopiperazinbildung wird begünstigt bei den Startsequenzen Glycin-Prolin, Tyrosin-Prolin und Prolin-Prolin. Durch die Wahl von sterisch anspruchsvollen Ankergruppen, wie z.B. den Tritylanker oder den PTMSEL-Linker, wird die Reaktion unterdrückt.<sup>[142]</sup>

Eine weitere Nebenreaktion bei der Festphasensynthese und der Abspaltung vom Harz ist die Aspartimidbildung. Die Base abstrahiert das Amidproton der C-terminal benachbarten Aminosäure, so dass der deprotonierte Amid-Stickstoff nukleophil den  $\gamma$ -Kohlenstoff der Asparaginsäure angreift und sich das Aspartimid ausbildet (Abbildung 4.48). Das Aspartimid kann in manchen Fällen nach Spaltung vom polymeren Träger isoliert werden.

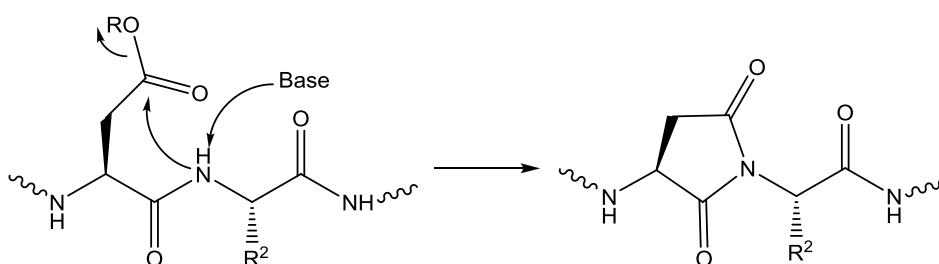


Abbildung 4.48: Bildung des Aspartimids.

Für den nukleophilen Angriff ist eine bestimmte Lage des Amidstickstoffs zum  $\gamma$ -Kohlenstoff der Asparaginsäure nötig. Deswegen tritt die Aspartimidbildung bei speziellen Aminosäuresequenzen häufig wie, Asp-Gly, Asp-Ser, Asp-Asn(Trt), Asp-Thr(OtBu) und Asp-Ala, auf.<sup>[143]</sup> Die Schutzgruppe für Asparaginsäure hat einen entscheidenden Einfluss. Der *tert*-Butylester kann die Aspartimidbildung größtenteils verhindern.<sup>[144]</sup>

## 4.13 Synthese der mit Quadratsäureester umgesetzte MUC1-Konjugate

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll an einem mit Fmoc-Prolin vorbeladenen Trityl-Harz. Die Glycosyl-Threonin-Bausteine (**22**, **40**) werden jeweils in 1.8 Äquivalenten eingesetzt und mit den Kupplungsreagenzien HATU/HOAt aktiviert (Abbildung 4.49).

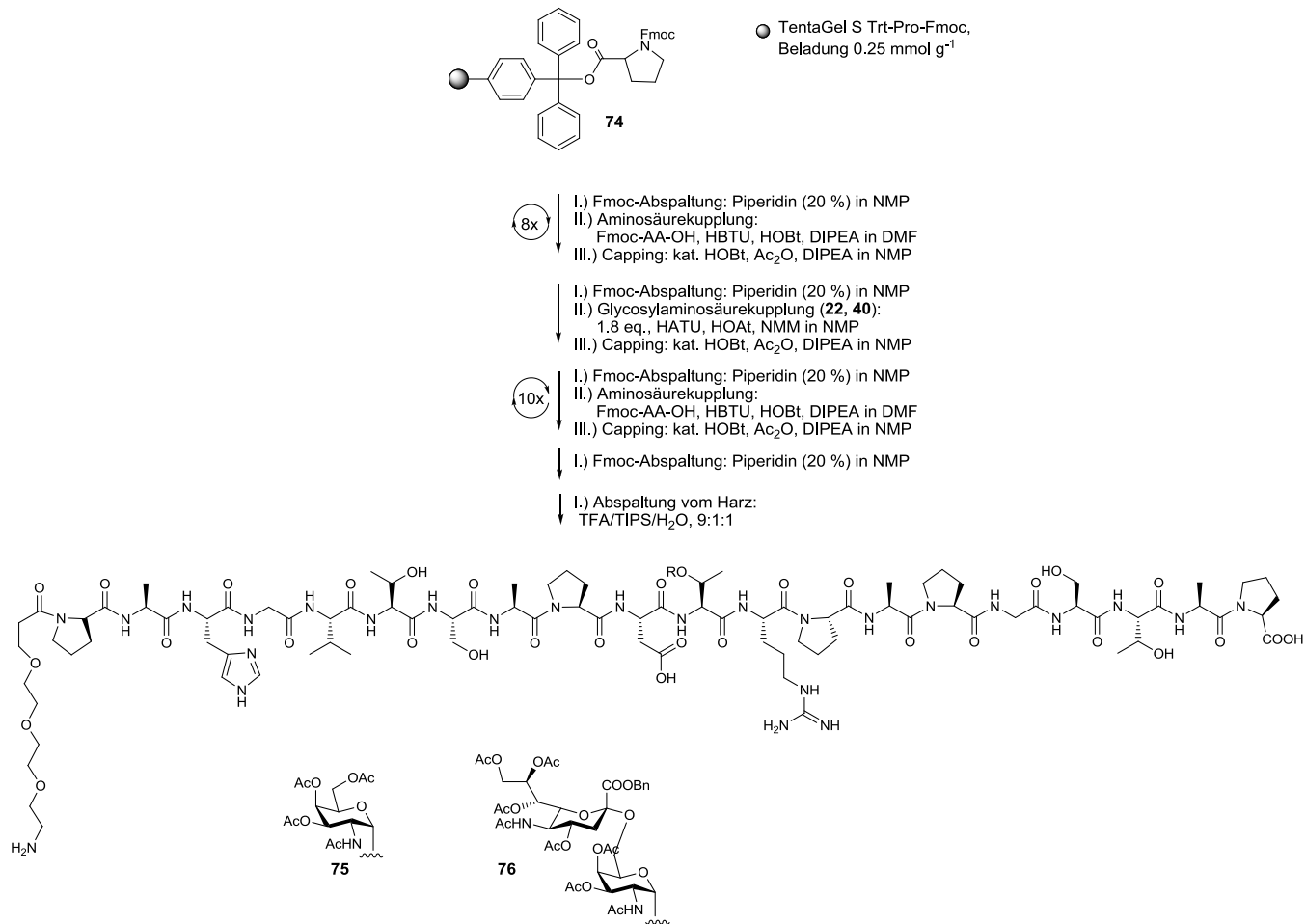


Abbildung 4.49: Reaktionsschema der Festphasensynthese der Glycopeptide **74** und **75**.

Nach der Abspaltung vom Harz wird das rohe Glycopeptid mit wässriger NaOH (pH = 11.5, 100 mg NaOH-Plätzchen/500 mL Wasser) drei Tage bei Raumtemp. gerührt, um die Ester zu verseifen.

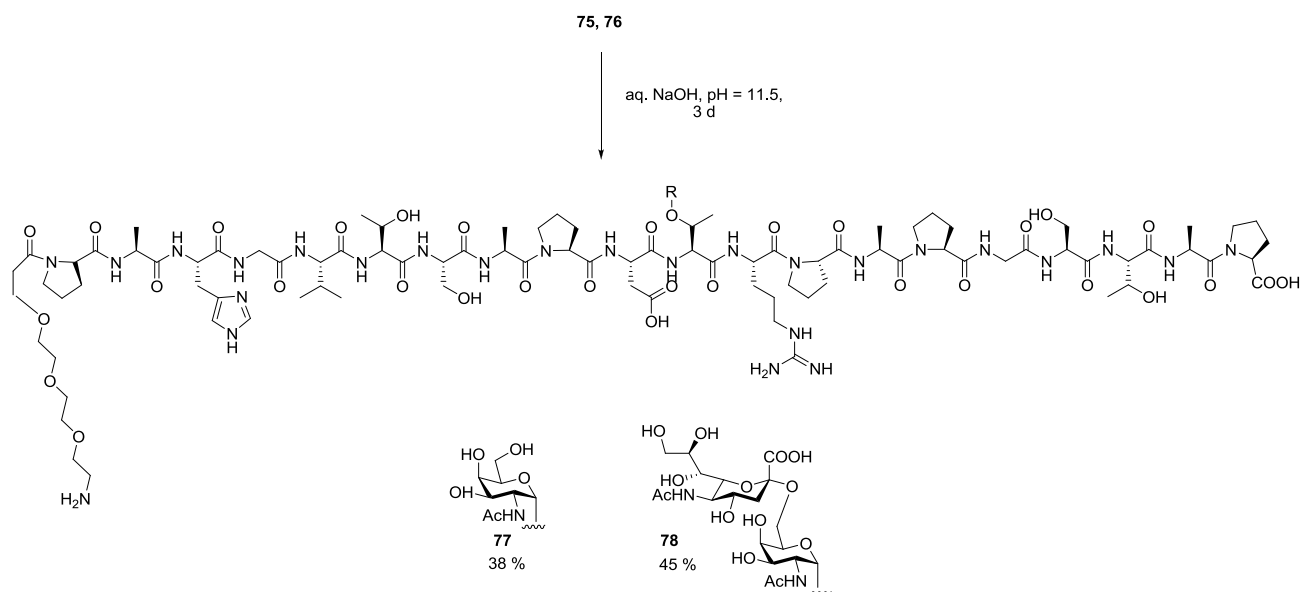


Abbildung 4.50: Deblockieren der Glycopeptide.

In der Literatur finden sich zahlreiche Konjugationsmöglichkeiten<sup>[145-150]</sup>, nach denen das MUC1-Peptid mit einem Protein verknüpft werden könnte, wobei viele Formen aufgrund der hohen Immunität der Spacer- bzw. Linkermoleküle nicht zweckmäßig sind. Die Konjugation von B-Zell und T-Zell-Epitop erfolgt nach einer von *Tietze* entwickelten Strategie, die bei niedermolekularen Glycosiden und Glycopeptiden angewendet werden kann.<sup>[151-152]</sup> Hierbei wird die hohe Selektivität bei Reaktionen von Nucleophilen mit Quadratsäurediestern genutzt. Die Aminofunktion des Spacers, welches aus einem Oligoethylenglycol-Abstandhalter dargestellt wird, dient als Nukleophil (siehe auch Kapitel 4.8). Die freie Aminfunktion des Oligoethylenglycol-Spacers vom vollständig deblockierten Glycopeptid wird in einem Lösungsmittelgemisch Ethanol/Wasser (1:1) bei einem pH-Wert von 8 mit 3,4-Diethoxy-3-cyclobutene-1,2-dion (**79**) in die Quadratsäuremonoesteramide (**80**, **81**) in 45 bzw. 33 % Ausbeute überführt (Abbildung 4.51).

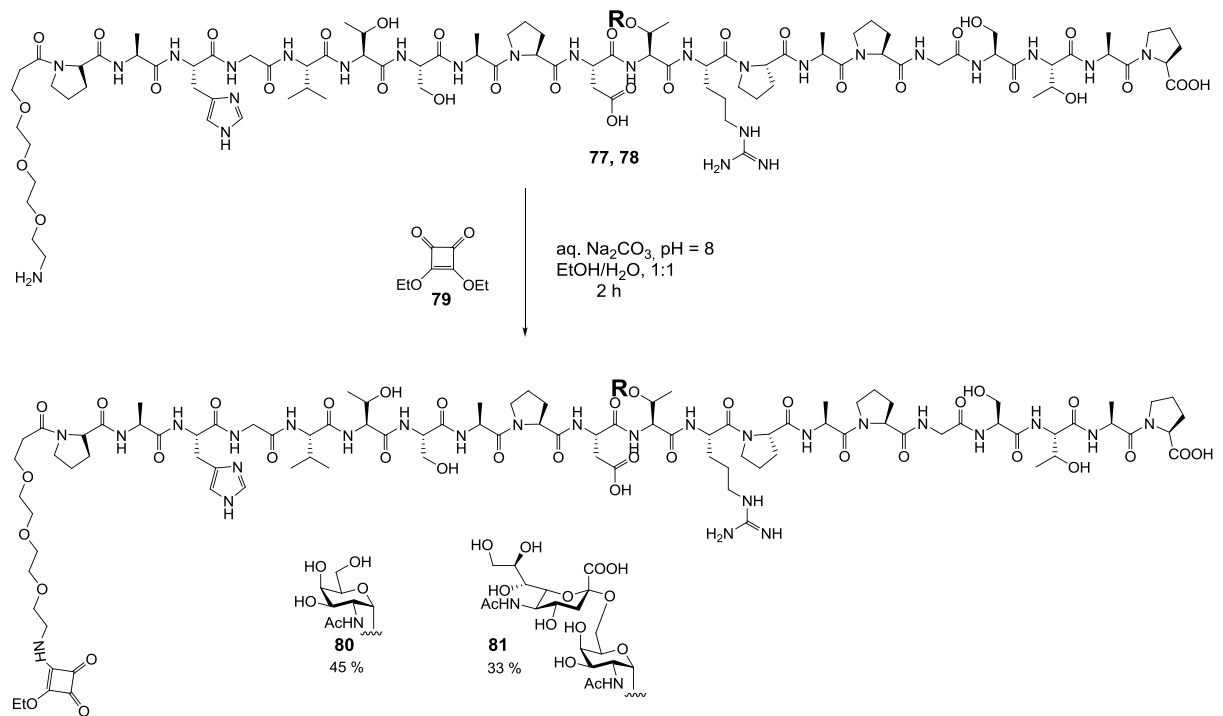


Abbildung 4.51: Darstellung der Quadratsäuremonoamide (**80**, **81**).

Eine Anbindung dieser der Quadratsäuremonoesteramide ist nun an die Lysin-Seitenketten des Carriers möglich. Als Carrier-Protein wird zum einen Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt, da dies zu den niedermolekularen Proteinen mit einer Molmasse von 66500 g mol<sup>-1</sup> gehört. Als weiteres Carrier-Protein dient Tetanus-Toxoid, das ein stark immunogenes Carrierprotein darstellt und eine starke Immunantwort bei Tieren und Menschen hervorruft. Die Verknüpfung zwischen BSA/TTox und den Quadratsäuremonoamiden erfolgt in einer Natriumphosphatpuffer-Lösung (pH = 9.5), die drei Tage bei Raumtemperatur gerührt wird (Abbildung 4.52). Anschließend wird die Reaktionslösung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDA) überführt und dreimal mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 90 mL aufgefüllt. Unter leichtem Überdruck werden die gelösten Salze und nicht gekuppelten Glycopeptid-Monosäureamide ausgewaschen. Der Vorgang wird zweimal wiederholt, so dass in der Ultrafiltrationsanlage anschließend nur noch das BSA/TTox-Konjugat vorliegt, welches anschließend lyophilisiert wird.

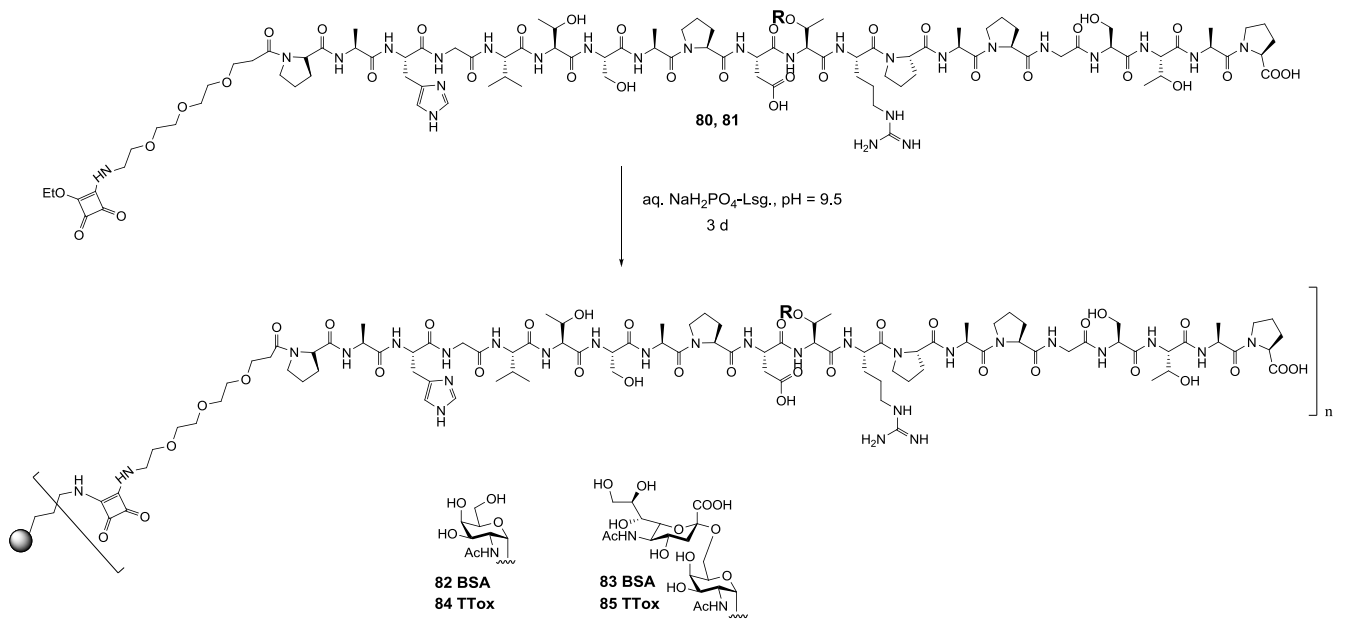


Abbildung 4.52: Darstellung der BSA/TTox-Konjugate.

## 4.14 Festphasensynthese von Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>

Die Synthese von Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> erfolgt am Peptidsynthesizer. Als Harz wird ein TentaGel S Trt-Lys(Boc)-Fmoc (**84**) eingesetzt, welches eine Beladungsdichte von 0.23 mmol/g hat (Abbildung 4.53).

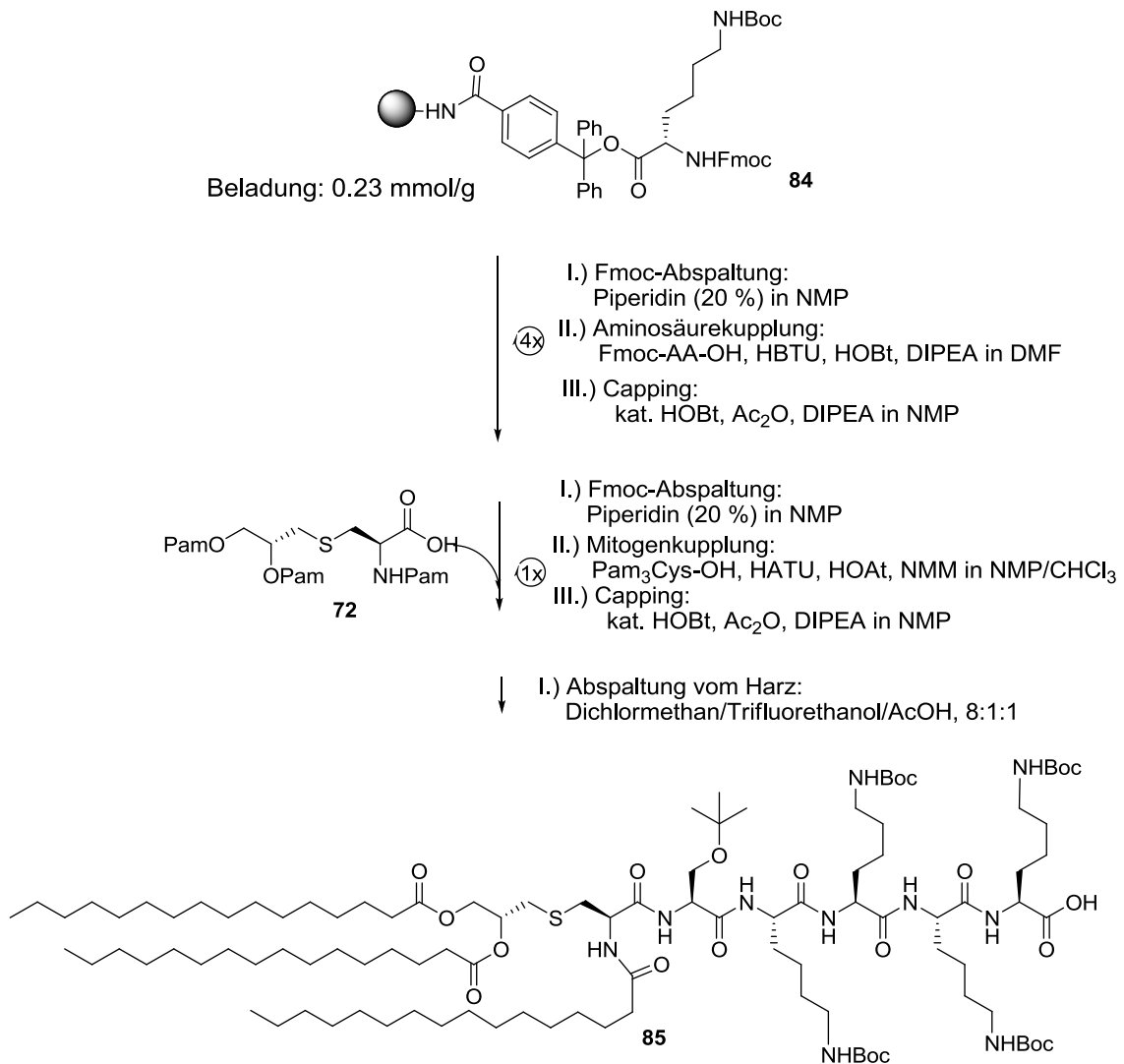
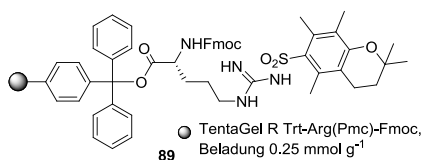


Abbildung 4.53: Synthese von Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> (**85**)

Die Synthese hat ein vollständig synthetisches Vakzin OVA-MUC1-Glycopeptid zum Ziel. Hierbei wird das T-Zell-Epitop über einen Abstandhalter an das MUC1-Grundgerüst gebunden. Um eine stärkere Immunantwort zu erhalten, wird an die MUC1-Struktur ein zusätzlicher Abstandhalter gebunden (Abbildung 4.54).





- (16x) ↓ I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
II.) Aminosäurekupplung:  
Fmoc-AA-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF  
III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP
- ↓ I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
II.) Spacerkupplung:  
10 eq., HATU, HOAt, NMM in NMP  
III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP
- (9x) ↓ I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
II.) Aminosäurekupplung:  
Fmoc-AA-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF  
III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP
- ↓ I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
II.) Glycosylaminosäurekupplung (**22**):  
1.8 eq., HATU, HOAt, NMM in NMP  
III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP
- (10x) ↓ I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
II.) Aminosäurekupplung:  
Fmoc-AA-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF  
III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP
- ↓ I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
II.) Spacerkupplung:  
10 äq., HATU, HOAt, NMM in NMP  
III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP
- ↓ I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP

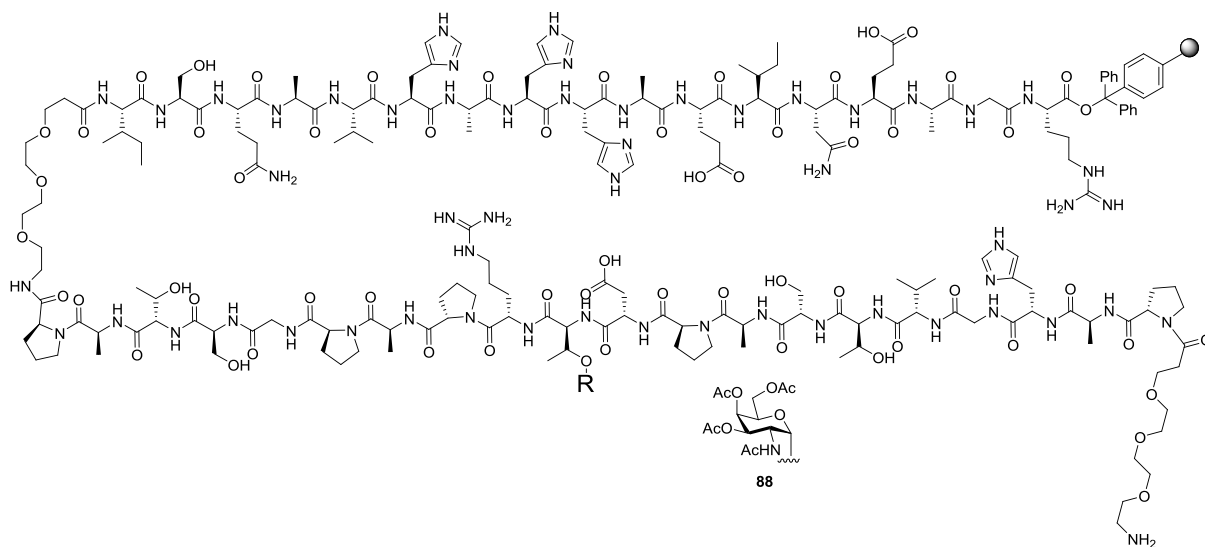


Abbildung 4.54: Festphasensynthese des OVA-Spacer-MUC1-Spacer-Grundgerütes (**88**).

Zur Synthese des Vakzin-Konjugats wird eine Fragmentkondensation des OVA-MUC1-Glycopeptids mit dem TLR2-Agonist Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> (**85**) vollzogen. Das deblockierte Glycopeptid-Antigen (**88**) wird in DMF gelöst und in den Merrifield-Reaktor überführt. In einer Kartusche wird das Boc-geschützte Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> (**85**) in DMF gelöst, mit

HATU/HOAt zum Aktivester umgesetzt und anschließend manuell zum Glycopeptid (**88**) gegeben. Die Reaktionslösung wird 8 h bei Raumtemp. geschüttelt. Anschließend werden die Schutzgruppen acidolytische mit Trifluoressigsäure/Wasser/Triisopropylsilan (9:1:0.1) gespalten (Abbildung 4.55).

Die Reaktion verläuft in niedriger Ausbeute. Die in der Fragmentkondensation eingesetzten Bausteine sind sterisch anspruchsvolle Moleküle, so dass eine Reaktion erschwert wird. Deswegen wurden die Reaktionsbedingungen variiert, und es wurden die Äquivalente des Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> von zwei auf vier Äquivalente erhöht sowie die Reaktionszeit auf 14 Stunden Rühren bei Raumtemperatur verlängert.

Eine NMR-Auswertung konnte nicht durchgeführt werden, da das Spektrum wegen Probenmangels nicht ausgewertet werden konnte. In einer massenspektrometrischen Analyse durch ESI-MS konnte das Produkt nachgewiesen werden.

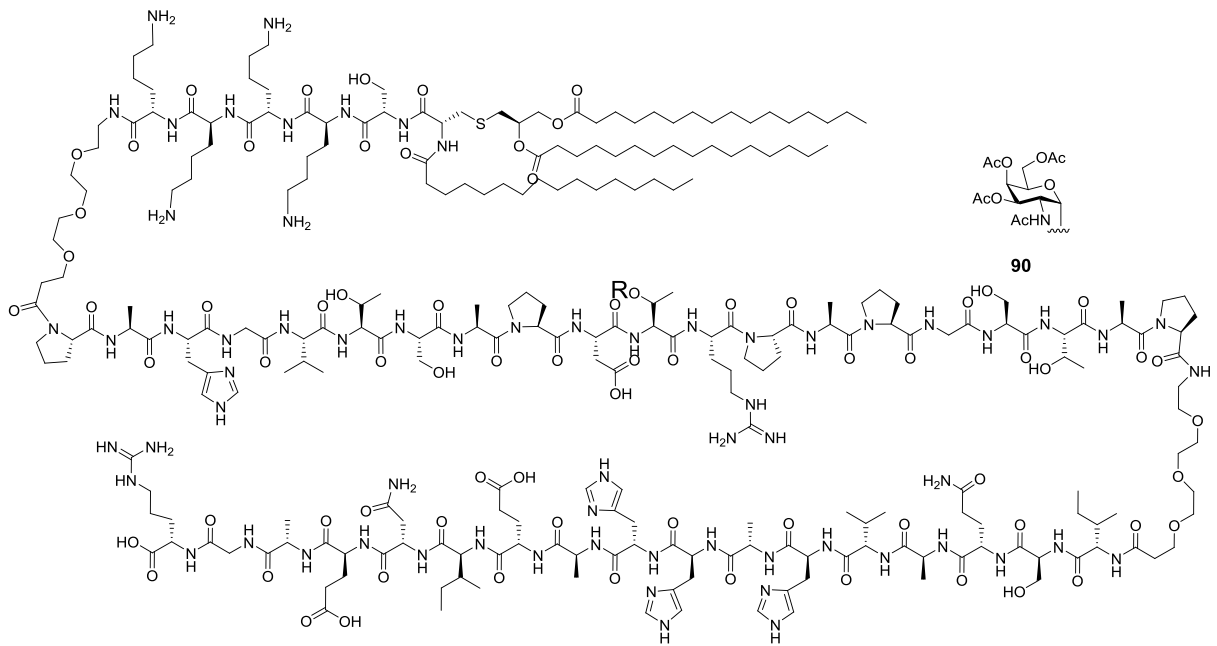
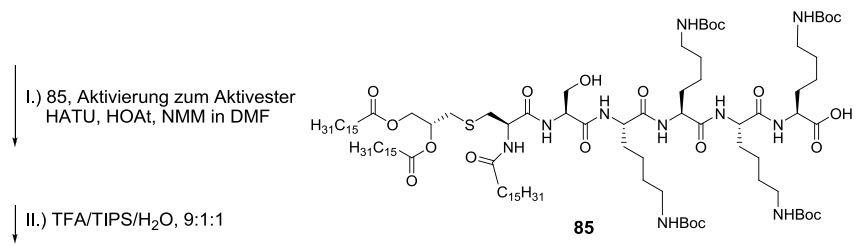
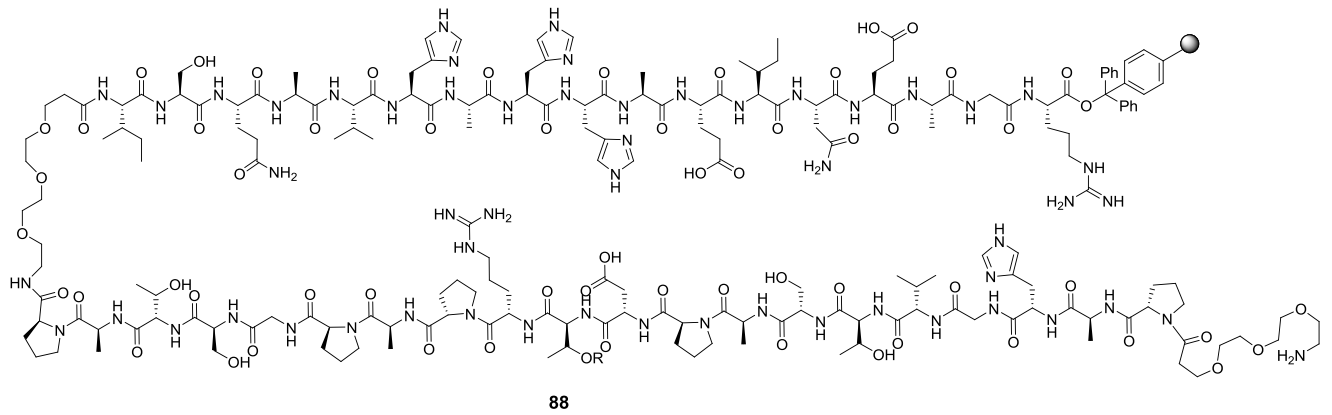


Abbildung 4.55: Fragmentkondensation zu (90).

## 4.15 Synthese von Heterotop-Konjugaten

Die vollsynthetische Darstellung eines Heterotop-Konjugates wird durch kovalente Verknüpfung zwischen einem T-Zell-Epitop-Peptid und einem B-Zell-Epitop-Glycopeptid erreicht, welche über einen zwischengeschalteten Triethylenglycolspacer erfolgt. Der Spacer dient als Abstandhalter und soll die gegenseitige konformationelle Beeinflussung der Epitopstrukturen ausschließen (Abbildung 4.56).

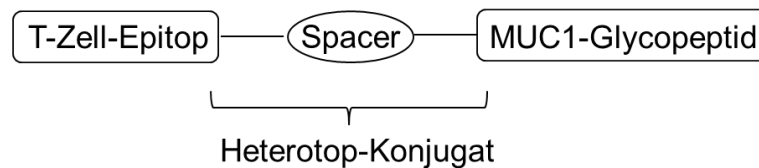


Abbildung 4.56: Beispiel eines möglichen Heterotop-Konjugates.

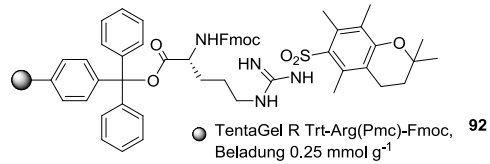
Das T-Zell-Spacer-B-Zell-Konjugat sollte fähig sein, im Wirt, hier in transgenen Mäusen, eine Immunantwort auszulösen und somit selektiv Antikörper gegen die tumorassoziierten Antigene zu bilden.<sup>[152-154]</sup>

Wenn eine Stimulierung durch T-Helferzell-Epitope vorliegt, werden neben B-Zell-Epitopen auch T<sub>H</sub>2-Epitope auf der Zelloberfläche gefunden, die über den MHC-II-Komplex präsentiert werden. Diese T<sub>H</sub>2-Epitope werden von T-Zellen erkannt, was zur Ausschüttung von Interleukinen führt, die die B-Zelle stimulieren. Die B-Zelle differenziert zur Plasmazelle und proliferiert. Die Selektivität der Immunantwort wird über das T-Zell-Epitop dirigiert, weil eine definierte Peptidsequenz verwendet wird und nicht verschiedene Teilsequenzen präsentiert werden.

## 4.16 Synthese der OVA<sub>323-339</sub>-MUC1-Konjugate

Die Synthese von Heterotop-Konjugaten ermöglicht es, eine humorale Immunantwort zu induzieren. Dabei wird ein MUC1-Glycopeptid-Antigen kovalent über einen Triethylenglycolspacer an eine Peptidsequenz des Ovalbumins gebunden. Die OVA<sub>323-339</sub>-Sequenz agiert als spezifisches T<sub>H</sub>2-Zellepitop und kann über die Immunglobulin-Rezeptoren an der Oberfläche von B-Zellen angebunden werden und anschließend über rezeptorvermittelte Endocytose in die B-Zelle internalisiert werden. Das OVA-Konjugat wird prozessiert und kann über MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche B-Zelle präsentiert werden. Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die T<sub>H</sub>2-Zellen von transgenen Mäusen den MHC-II-Komplex-OVA-Komplex erkennen und die B-Zelle zur Differenzierung zur Plasma-Zelle stimulieren und anschließend proliferieren, so dass Antikörper sezerniert werden.<sup>[152-153]</sup>

Im Peptidsynthesizer wird nach Fmoc-Standardprotokoll zuerst die OVA-Sequenz ausgehend von einem TentaGel R Arg(Pmc)Trt-Harz (**92**) synthetisiert. Anschließend erfolgt die Kupplung des Triethylenglycolspacers (**64**), bevor das MUC1-B-Zell-Epitop aufgebaut wird, das in der immunodominanten Domäne am Threonin verschiedene Glycosylaminosäuren enthält. Hierbei werden wie beim Triethylenglycolspacer die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt verwendet. Die restlichen Aminosäuren werden nach Standardprotokoll gekuppelt. Die N-terminale Aminosäure Prolin wird mit dem Capping-Reagenz acetyliert. Im nächsten Schritt erfolgt die simultane Abspaltung vom Harz und der Seitenkettenschutzgruppen, so dass das Heterotop-Glycopeptid vorliegt (Abbildung 4.57).



(16x) I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
 II.) Aminosäurekupplung:  
 Fmoc-AA-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF  
 III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP

I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
 II.) Spacerkupplung:  
 10 eq., HATU, HOAt, NMM in NMP  
 III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP

(9x) I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
 II.) Aminosäurekupplung:  
 Fmoc-AA-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF  
 III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP

I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
 II.) Glycosylaminosäurekupplung:  
 1.8 eq., HATU, HOAt, NMM in NMP  
 III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP

(10x) I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
 II.) Aminosäurekupplung:  
 Fmoc-AA-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF  
 III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP

I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
 II.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP

TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O

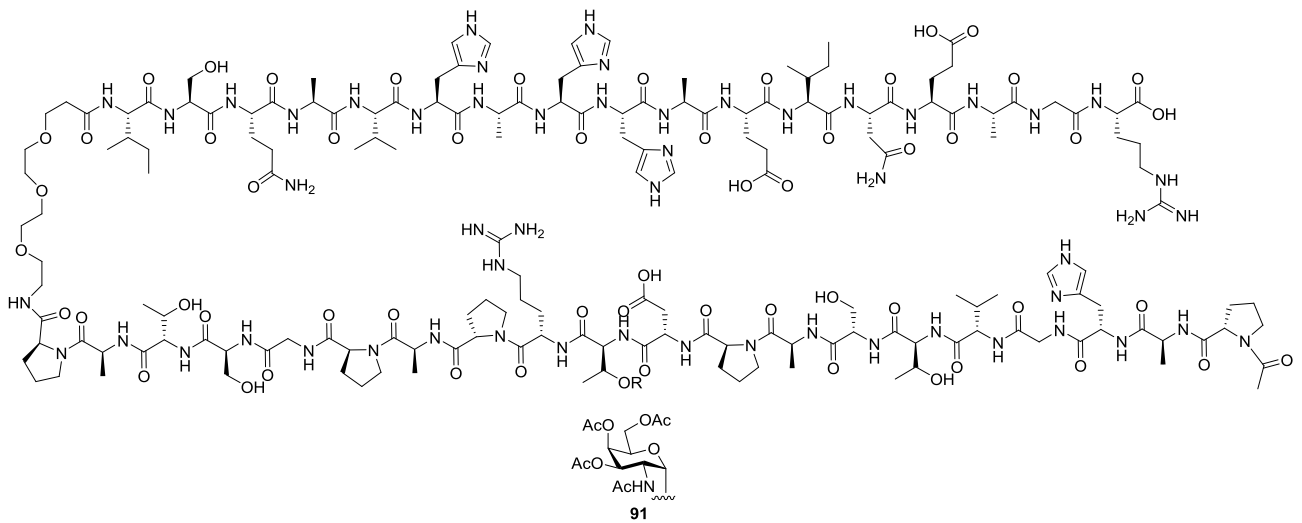


Abbildung 4.57: Synthese der Heterokonjugats (**91**).

Anschließend wird das Glycopeptid (**91**) mit wässriger NaOH (pH = 11.5, 100 mg NaOH-Plättchen/500 mL Wasser) behandelt, um die Acetylschutzgruppen zu entfernen. Dabei wird der pH-Wert der wässrigen Natronlauge auf 11.5 eingestellt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass der pH-Wert konstant auf 11.5 eingestellt wird und damit eine Deacetylierung ohne Racemisierung der Aminosäuren stattfindet (Abbildung 4.58). Nach der Deacetylierung wird mit 1 N Essigsäure neutralisiert und über RP-HPLC gereinigt.

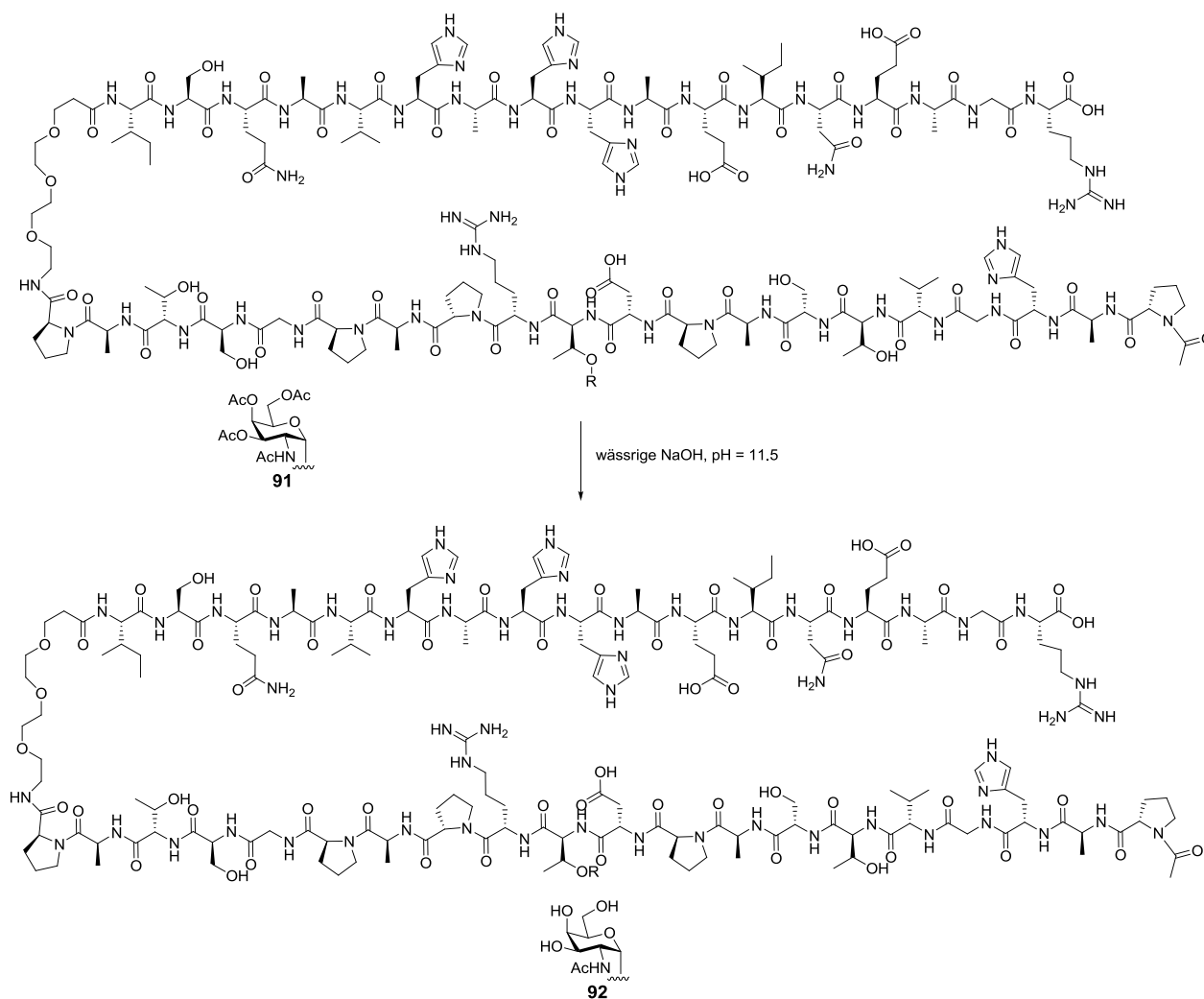
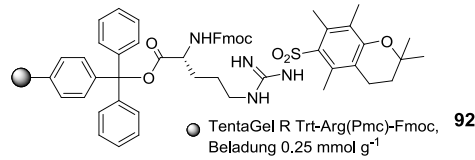


Abbildung 4.58: Deacetylierung mit wässriger NaOH zum entschützten Glycopeptid (**90**).

Anschließend erfolgt die Synthese der OVA<sub>323-339</sub>-MUC1-Konjugate mit sialylierten Kohlenhydraten, die analog zum T<sub>N</sub>-Glycopeptid aufgebaut werden (Abbildung 4.59).



(16x) I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
II.) Aminosäurekupplung:  
Fmoc-AA-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF  
III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP

I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
II.) Spacerkupplung:  
10 eq., HATU, HOAt, NMM in NMP  
III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP

(9x) I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
II.) Aminosäurekupplung:  
Fmoc-AA-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF  
III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP

I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
II.) Glycosylaminosäurekupplung:  
1.8 eq., HATU, HOAt, NMM in NMP  
III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP

(10x) I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
II.) Aminosäurekupplung:  
Fmoc-AA-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF  
III.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP

I.) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %) in NMP  
II.) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP

TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O

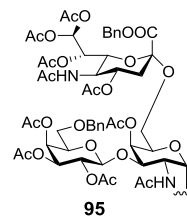
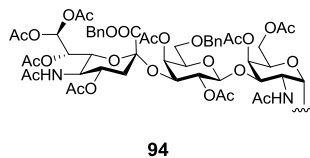
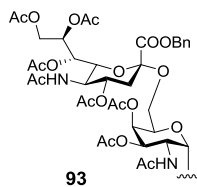
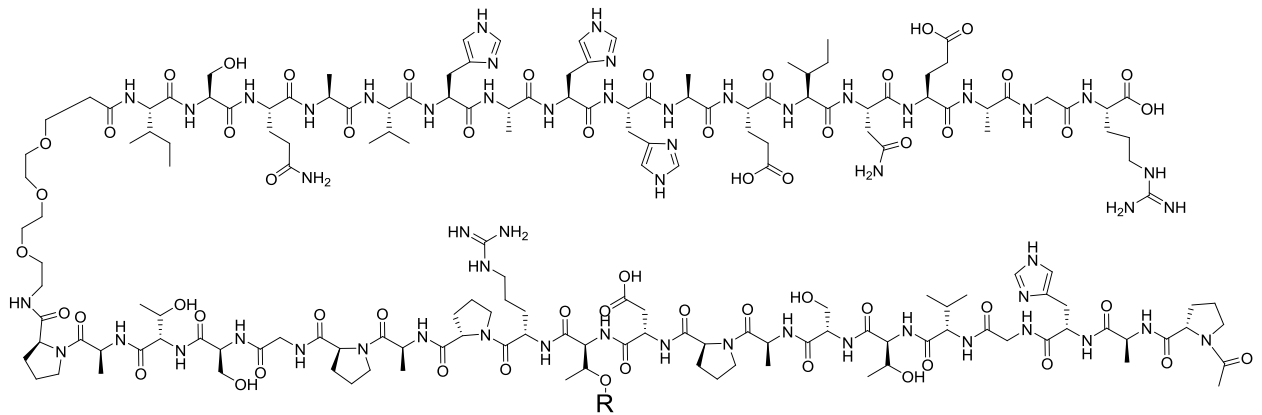


Abbildung 4.59: Synthese der T-Antigen sialierten Glycopeptide (**93**, **94**, **95**).

Im nächsten Reaktionsschritt werden die Saccharidschutzgruppen entfernt. Dabei erfolgt die Schutzgruppenentfernung beim Glycopeptid (**93**) mittels wässriger NaOH (100 mg NaOH-



Plätzchen/500 mL Wasser) und es wird 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reinigung erfolgt über RP-HPLC (Abbildung 4.60).

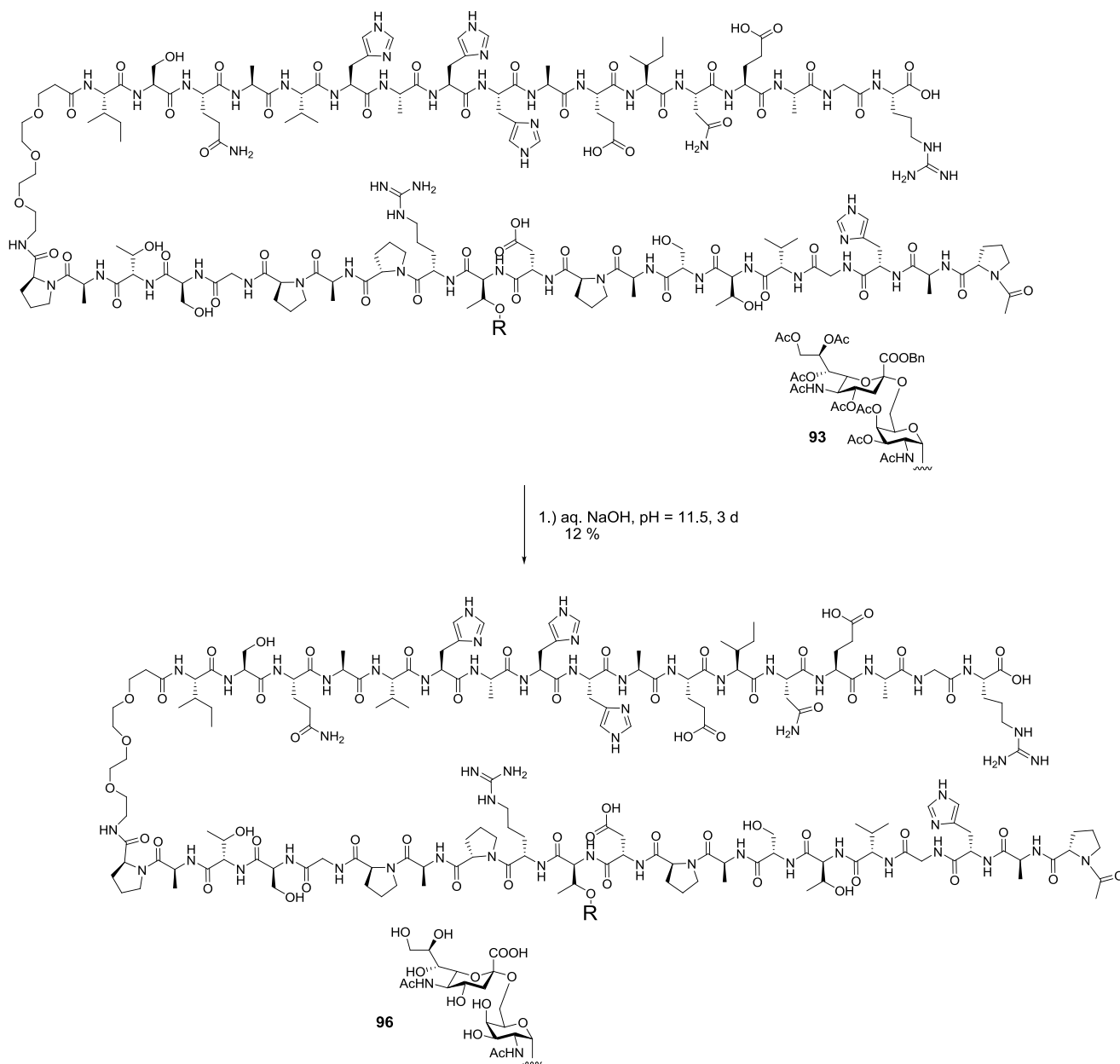


Abbildung 4.60: Acetyl- und Benzylesterabspaltung unter basischen Bedingungen.

Bei den Glycopeptiden (**94**) und (**95**) ist ein Benzylether als Schutzgruppe vorhanden. Hier müssen zunächst die Benzylether- und -ester hydrolytisch gespalten werden. Erst anschließend wird mit wässriger Natronlauge deacetyliert. Die hydrolytische Abspaltung des Benzylethers muss vor der Deacetylierung ausgeführt werden.. Bei umgekehrter Reihenfolge wäre die Carboxylfunktion der Neuraminsäure nach der

Deacetylierung frei und könnte bei der anschließenden hydrogenolytischen Spaltung des Benzylethers in Methanol in den Methylester überführt werden.

Bei der Abspaltung des Benzylethers- und esters werden die Glycopeptide (**94**, **95**) in entgastem Methanol gelöst und anschließend mit Palladium auf Aktivkohle in Wasserstoffatmosphäre hydriert. Hierbei wird Palladiumacetat verwendet, so dass das Palladium frisch gefällt wird und äußerst aktiv ist. Es wird 16 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach der Hydrierung wird mit wässriger NaOH (100 mg NaOH-Plätzchen/500 mL Wasser) bei Raumtemperatur gerührt. Die Reinigung erfolgt durch RP-HPLC (Abbildung 4.61). Sowohl das Glycopeptid (97) als auch das Glycopeptid (98) liegen in ionischer Form als Acetat vor. Eine Trennung des Glycopeptide vom Acetat als Gegenion kann nicht durch Ultrafiltration erreicht werden. Das Acetat-Gegenion beeinflusst stark das Signalverhältnis zum Glycopeptid in der NMR-Spektroskopie, so dass die Charakterisierung der Glycopeptide über ESI-Massenspektrometrie und MALDI-TOF-MS erfolgte.

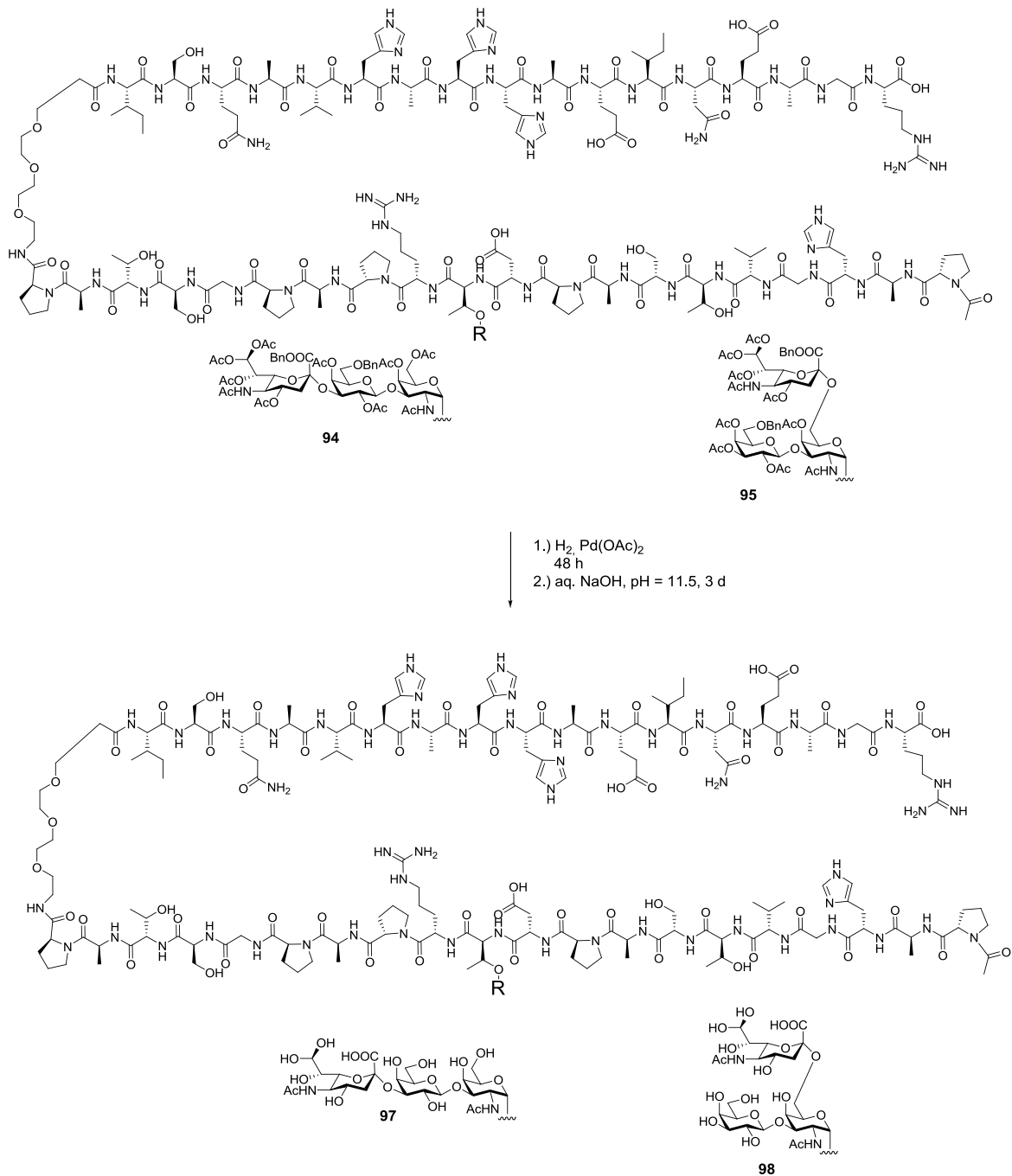


Abbildung 4.61: Deblockierung der sialylierten Glycopeptide (**97**, **98**).

## 4.17 Glycopeptiddendrimere<sup>[155-156]</sup>

Glycodendrimere (griech. *dendron*, Baum; *meros*, Teil)<sup>[157]</sup> sind oligomere Systeme, die Kohlenhydrate als Liganden präsentieren. Dendritische Strukturen wurden als erstes von *Vögtle* beschrieben<sup>[158]</sup>. Weiterführende Entwicklungen und Synthesen wurden von *Tomalia et al.* ausgeführt, doch die Synthese von Glycodendrimern wurde erstmals von *Roy* beschrieben und seitdem ausgebaut. Dendrimere sind definierte symmetrische Moleküle mit einer kleinen Polydispersität im Vergleich zu traditionellen Polymeren. Es werden viele verschiedene Funktionalitäten auf kleinem Raum angeordnet. Die Endgruppen bestimmen die chemischen und physikalischen Eigenschaften und machen sie einzigartig.<sup>[159]</sup> Durch ihren stark verzweigten Charakter weisen Glycodendrimere starke Analogie zu den natürlichen Glykokonjugaten.

## 4.18 MAP

Die Konjugation von Haptenen an Carrierproteinen ist eine erfolgreiche Strategie, um Immunantworten zu induzieren. Doch lösen hierbei die stark immunogenen Proteine eine gegen sie gerichtete Immunantwort aus. So sind die produzierten Antikörper gegen die Epitope des Carrierproteins gerichtet und nur ein geringer Anteil der Antikörper bildet die gegen das Hapten gerichtete Immunantwort. Folglich kann die Immunantwort des Trägerproteins die Immunantwort des Haptens überlagern und vollständig unterdrücken. Es wird von einer Immundominanz des Carrierproteins gesprochen.

Auch ist eine vollständige Analyse des Hapten-Carrier-Komplexes sehr schwierig. Die Konjugate sind chemisch nicht exakt definiert und sind über NMR-Spektroskopie nicht eindeutig charakterisierbar. Eine Auswertung kann allerdings durch Massenspektrometrie erfolgen.

Um diese Nachteile der Verwendung von Carrier-Proteinen zu umgehen, können auch die von *Tam* eingeführten MAPs (multiple antigen peptides) eingesetzt werden.<sup>[160-163]</sup> MAPs sind Dendrimere, die an Polylysinen aufgebaut wurden. Sie verfügen durch ihre verzweigte globuläre Struktur über unterschiedlich einstellbare Eigenschaften bezüglich ihrer Löslichkeit und Viskosität. Bei einer Funktionalisierung der Dendrimeroberfläche oder ihres Inneren können die Eigenschaften des Moleküls stark verändert werden. Bei der MAP-Strategie wird

als verzweigtes Grundgerüst ein Lysin-Core eingesetzt, welches wenig immunogen ist, so dass von ihm keine starke Immunantwort induziert wird. Lysin besitzt eine  $\alpha$ -Amino- und eine  $\varepsilon$ -Aminofunktion, welches für die Reaktionen zugänglich sind, so dass tetra- oder octa-funktionelle Lysin-Cores erhalten werden (Abbildung 4.62). Die Lysin-Carrier nehmen keine räumlich definierte Konformation ein, so dass keine exakte Voraussage über Charakter oder Interaktionen in der Struktur gemacht werden können. Die Interaktionen haben wahrscheinlich Einfluss auf antigenpräsentierende Zellen, da die Aggregation von Antigenen die Sekundärstruktur beeinflusst.

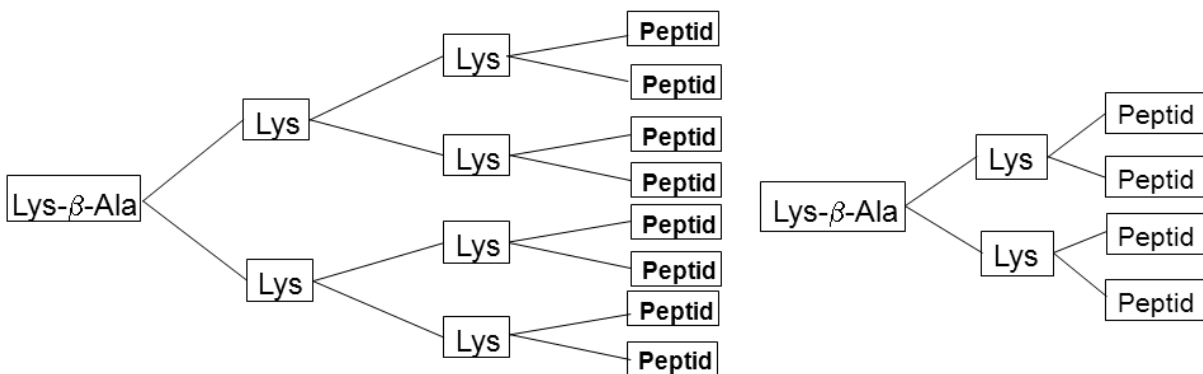


Abbildung 4.62: Darstellung des octameren und tetrameren Lysin-Cores.

MAPs werden über Festphasenpeptidsynthese dargestellt, haben eine definierte Struktur und können über NMR-Spektroskopie analysiert werden. Der Anteil der Kohlenhydratgerüste in auf MAP's präsentierten Glycopeptiden ist im Vergleich zum Carrierprotein höher, und das Lysin-Core macht im Vergleich zur Peptidsequenz nur einen geringen Anteil in der Masse aus.<sup>[164-165]</sup> In Immunassays können durch die multivalenten MAPs größere Empfindlichkeiten erreicht werden. Zudem ist die bei sehr hydrophilen Peptiden die unspezifische Bindung der MAPs an Titerplatten meistens stärker. Als immunogene Träger lösen MAPs eine Immunantwort aus, die aus reproduzierbaren Antikörper bestehen. Die Immunogenität wird zum einen durch eine stärkere Bindung an entsprechende Rezeptoren durch die Multivalenz der Dendrimere ermöglicht. Das Aktivierungssignal kann zusätzlich durch Quervernetzung der Oberflächenrezeptoren von Immunzellen verstärkt werden. Die T-Lymphozyten erkennen die auf den MHC I und MHC II präsentierten Peptidantigene. Bei der Antigenpräsentation werden auf dem MHC I-Komplex intrazelluläre Peptide präsentiert,

während auf MHC II-Komplexen extrazelluläre Antigene präsentiert werden. Bei MAPs findet die Antigenprozessierung- und präsentation der exogenen Antigene auf MHC I-Komplexen statt. Dieses wird als „*cross-presentation*“ bezeichnet.<sup>[166]</sup> Der exogene Weg ist von *Brevan* beschrieben worden.<sup>[167]</sup> Nach der rezeptorvermittelten Endocytose werden die Antigene in einer B-Zelle prozessiert, anschließend aus den endosomalen Kompartimenten in das Cytosol abgetreten und abschließend als Antigene von APCs auf dem MHC I-Komplex präsentiert.<sup>[166, 168-169]</sup> Bei starker Stimulierung werden CTL (cytolytische T-Zellen) ohne weitere Signale stimuliert, was auch *cross-priming* genannt wird. Die Aktivierung der CTLs erfolgt durch T<sub>H</sub>-spezifischen Mechanismus.

Die Anwendung der MAP-Methode zur Erzeugung von Vakzinen wurde für HIV<sup>[170-171]</sup> und Hepatitis<sup>[172]</sup> beschrieben.

## 4.19 Die Synthese von octameren MUC1-Glycopeptiden

Ziel der Arbeit war die Synthese eines octameren Glycopeptids, das der Tandem Repeat-Domäne des tumorassozierten epithelialen Mucins MUC1 entspricht. Ein solches Dendrimer sollte bezüglich seiner Immunogenität stark genug sein, um eine spezifische humorale Immunantwort gegen Glycopeptid-Partialstrukturen auszulösen.<sup>[160, 172]</sup>

Das dendrimere Glycopeptid wird an einem Oligolysin-Harz (**99**) von Novabiochem, Schwalbach nach einer linearen Festphasensynthese aufgebaut.<sup>[60]</sup> Die Zielstruktur soll eine vollständige MUC1-Tandem Repeat Sequenz enthalten, die an Thr<sup>18</sup> mit Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen (**40**) glycosyliert ist.

Die *Fmoc*-Schutzgruppen des *N*-Terminus des Harzes (**98**) werden mit Piperidin/NMP (1:4) abgespalten. Die acht freien Aminofunktionen werden im weiteren Verlauf simultan mit den entsprechenden *Fmoc*-Aminosäuren gekuppelt. Als Kupplungsreagenzien dienen HBTU und HOBT als Kupplungsadditiv. Bei dieser Synthese werden 20 Aminosäureäquivalente eingesetzt (Standard *FastMoc*-Protokoll sind 10 Aminosäureäquivalente). Der Sialyl-T<sub>N</sub>-Threonin-Baustein wird in vier Äquivalenten eingesetzt, wobei die reaktiveren

Kupplungsreagenzien HATU/HOAt angewendet werden. Die Vortex-Schüttelzeit benötigt in diesem acht Stunden.

Die Abspaltung des Glycopeptid vom Harz (**99**) erfolgt mit Trifluoressigsäure/Wasser/Triisopropylsilan (10:1:0.9), wobei gleichzeitig die säurelabilen Schutzgruppen der Aminosäureketten entfernt werden (Abbildung 4.63).

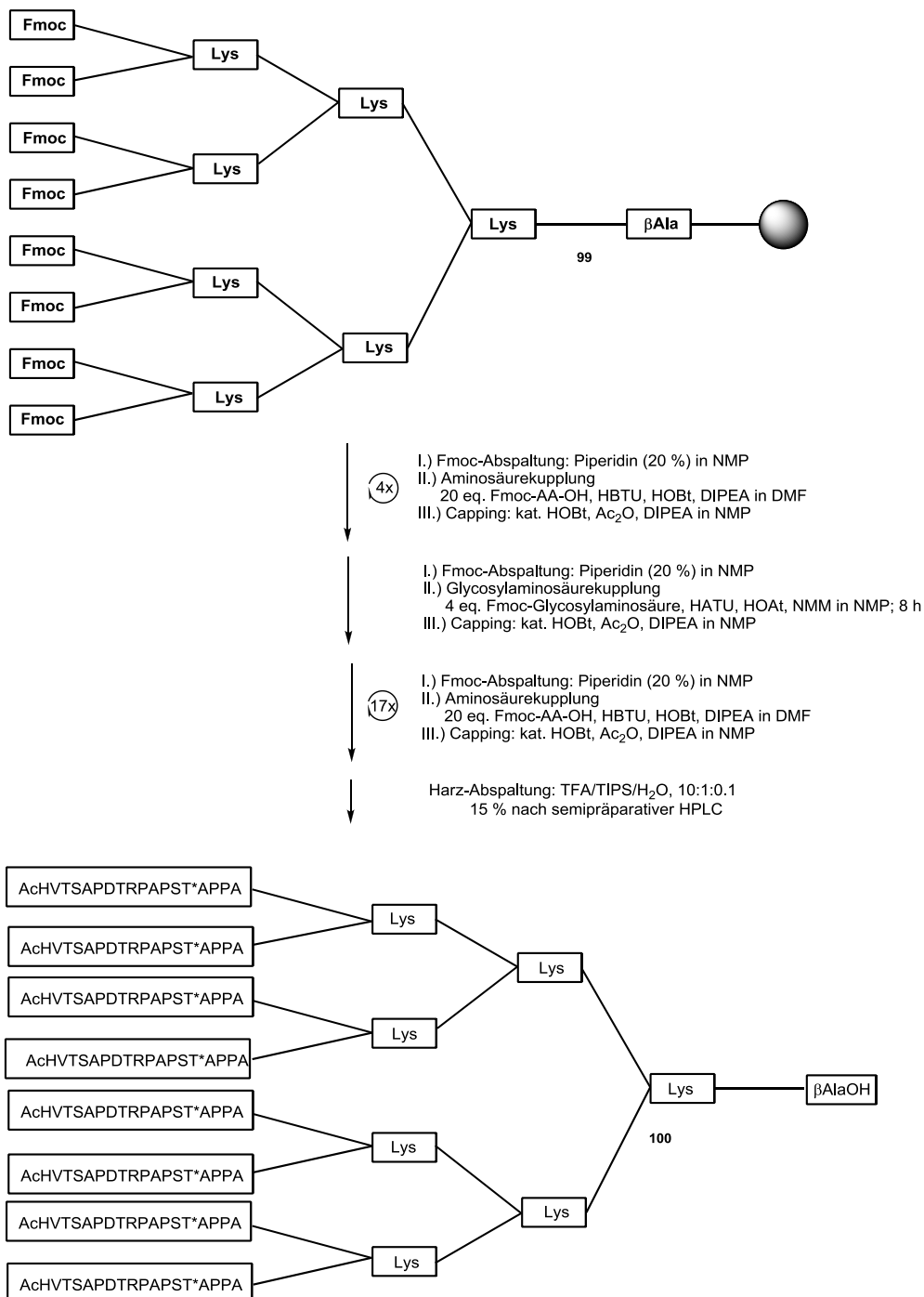


Abbildung 4.63. Synthese des Glycodendrimers (**100**).

Im letzten Reaktionsschritt werden die Acetyl- und Benzylesterschutzgruppen entfernt. Die Deblockierung erfolgt in wässriger Natriumhydroxid-Lösung bei einem pH-Wert von 11, der wegen der Gefahr von  $\beta$ -Eliminierung des Kohlenhydrats und Racemisierungsgefahr nicht überschritten werden darf. Die Reaktion wird durch analytische HPLC kontrolliert. Nach drei Tagen ist die Reaktion beendet. Nach der Reinigung durch semipräparative HPLC wird das Glycopeptid (**101**) in einer Ausbeute von 8 % über insgesamt 42 Stufen als farbloses Lyophilisat erhalten (Abbildung 4.64).



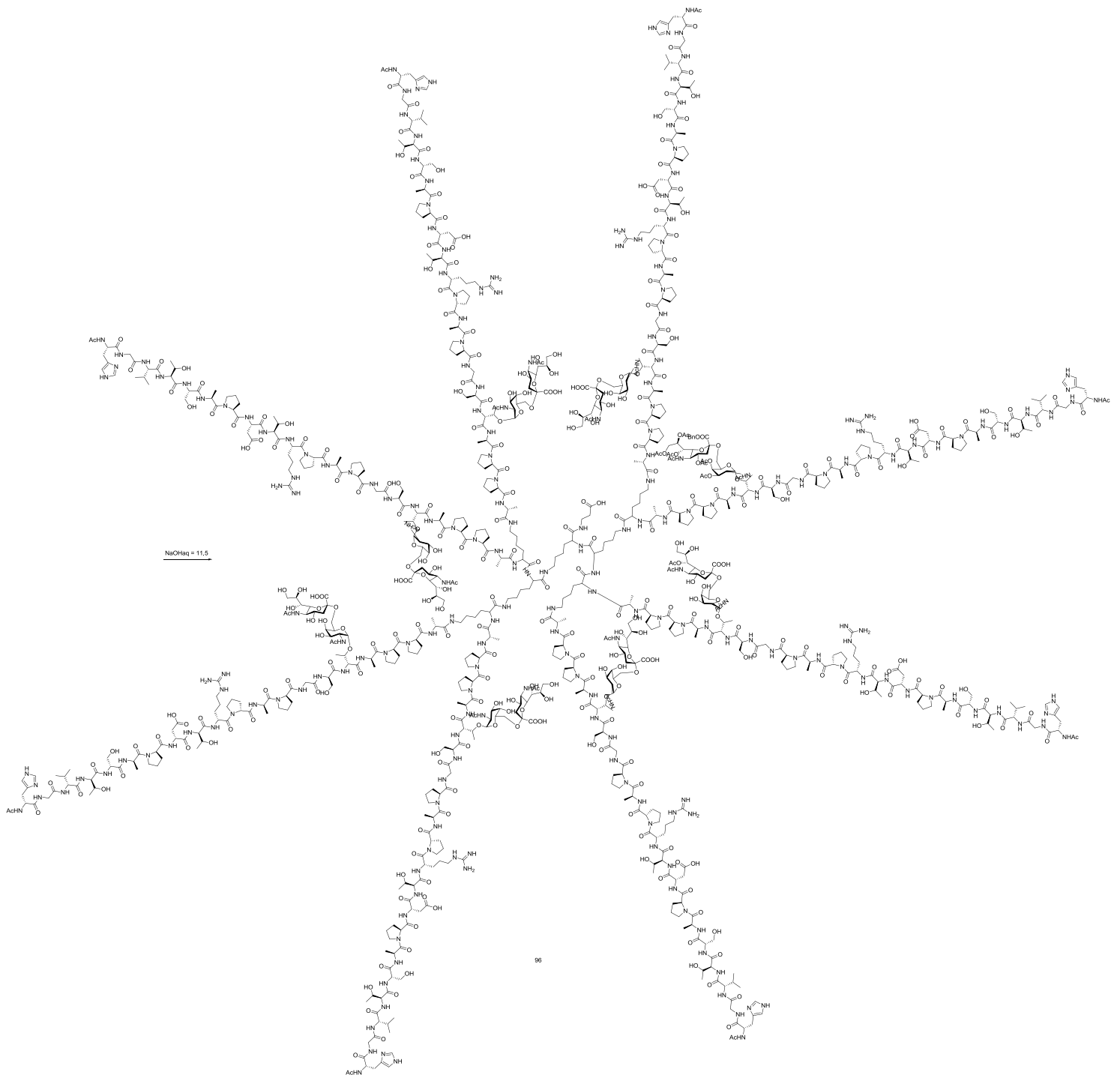


Abbildung 4.64: Deblockieren des Glycodendrimer (101).

In der semipräparativen HPLC zeigt sich zu Anfang einen breiter Peak im Chromatogramm. Die verschiedenen Protonierungsgrade des octameren Glycopeptids führen zu dieser Verbreiterung. Die Protonierungsgrade lassen sich unterdrücken, wenn das Glycopeptid in einer 0.1%-igen wässrigen Trifluoressigsäure eine Stunde bei Raumtemp. stehen gelassen wird.

Durch ESI-Massenspektrometrie konnte keine eindeutige Zuordnung der Struktur getroffen werden. Zwar konnte ein Spektrum aufgezeichnet werden, doch konnte keine Molekülmasse im ESI-Chromatogramm dem Molekül zugeordnet werden (Abbildung 4.65). Es liegt eine Fragmentverteilung im Bereich von 1147.98 bis 2022.28 m/z vor. Die octamere Struktur des Dendrimers führt zu dieser charakteristischen Fragmentverteilung, da einzelne Arme des Moleküls fragmentiert werden, so dass es zu dieser Molekülverteilung kommt.

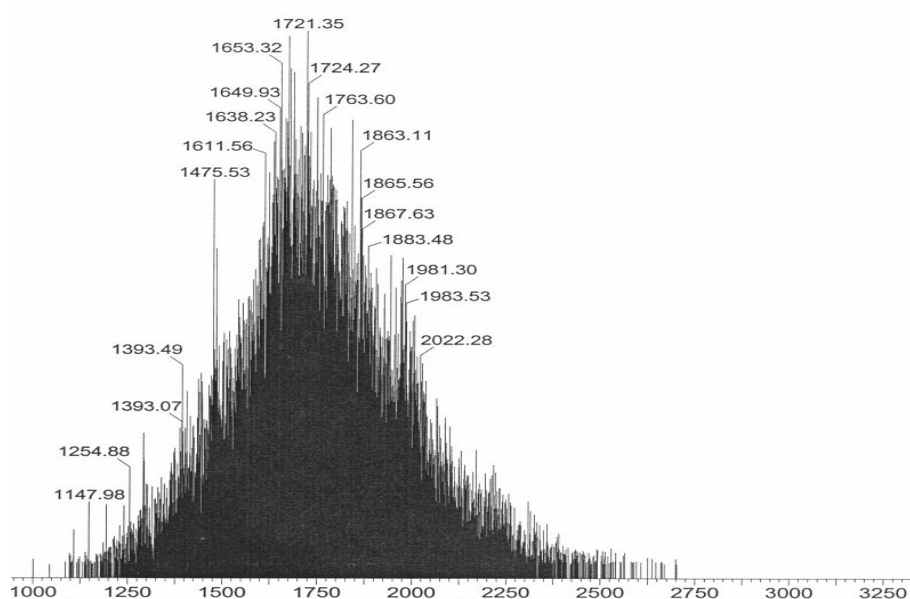


Abbildung 4.65: ESI-MS-Spektrum des Dendrimers (100).

Die Charakterisierung des Moleküls gelingt dagegen durch  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie. Die Auswertung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (400 MHz) des Dendrimers zeigt bei  $\delta = 2.69$  ppm ein Dublett. Das aufgelöste Signal weist daraufhin, dass die acht Glycopeptidseitenketten die gleiche konformative Umgebung haben sollten. Das breite Singulett bei  $\delta = 2.54$  ppm stellt die beiden Methylen-Gruppen des  $\beta$ -Alanins dar. Die Auflösung des Signals ist niedrig, da

sich die Methylengruppen in der Mitte des Oligo-Kerns befinden und dadurch abgeschirmt werden. Durch Integration beider isolierter Signale lässt sich ein Verhältnis von 8:4 Protonen ableiten, was beweist, dass die Verbindung als Octa-glycopeptid-Dendrimer vorliegt (Abbildung 4.66).

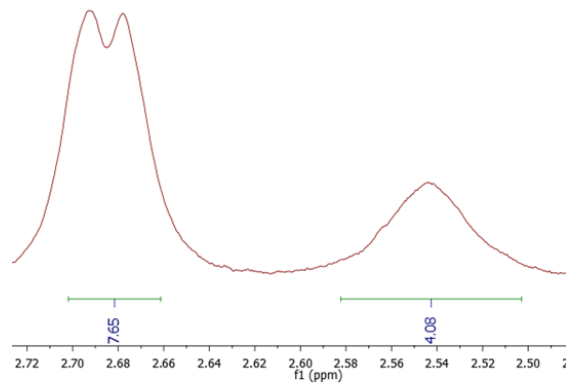


Abbildung 4.66: Ausschnitt aus dem <sup>1</sup>H-NMR des octameren Glycopeptids.

## 4.20 Diskussion der immunologischen Ergebnisse

Beim ELISA-Verfahren (enzyme linked immunosorbent assay) wird die Wechselwirkung zwischen immobilisiertem Antigen und von der Vakzine induziertem Antikörpern nachgewiesen basierend auf einer enzymvermittelten Reaktion, die photometrisch verfolgt werden kann (Abbildung 4.67).

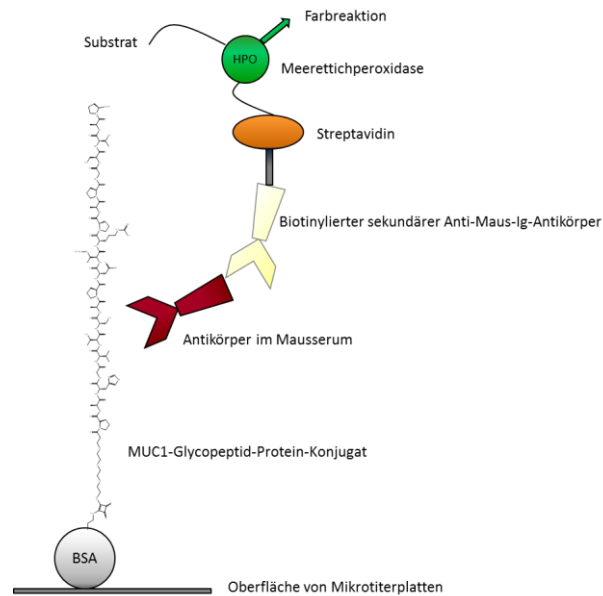
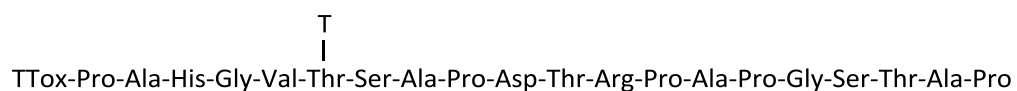


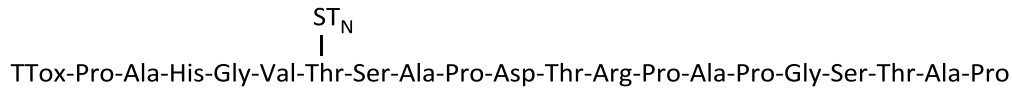
Abbildung 4.67: Schematische Darstellung des ELISA-Verfahrens.

Voraussetzung für das Immunoassay ist die Beschichtung der Mikrotiterplatte. Das BSA-Konjugat wird in wässriger Lösung auf Mikrotiterplatten aufgetragen. Dabei wird ein großer Teil dieses Neoglycoproteins adhäsiv an die Oberfläche gebunden. Es liegt somit als immobilisiertes Antigen vor, welches zum selektiven Antikörpernachweis dient. Wie in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe *Kunz*<sup>[153-154, 173-176]</sup> gezeigt wurde, wird in Mäusen durch synthetische MUC1-Glycopeptide-Vakzine eine humorale Immunantwort induziert. In mehreren vorhergegangenen Immunisierungen von Mäusen wurden Antiseren gewonnen, die in der vorliegenden Arbeit im ELISA-Verfahren eingesetzt werden. Die in dieser Arbeit synthetisierten BSA-Konjugate (**82**, **83**, **100**) wurden auf die Mikrotiterplatte aufgebracht und mit verschiedenen Antiseren aus den vorhergegangenen Testreihen auf eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung geprüft. Die Antiseren folgender Mäuse wurden im ELISA eingesetzt.

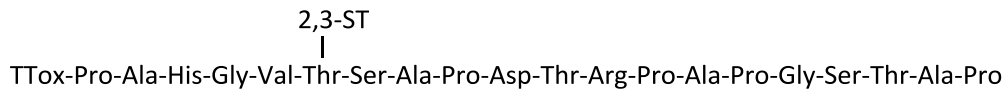
***Maus 7***: immunisiert mit MUC1(20)Thr<sup>6</sup>T-TTox<sup>[177]</sup>



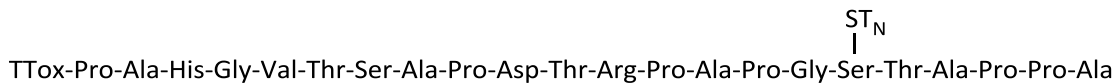
**Maus D2**: immunisiert mit MUC1(20)Thr<sup>6</sup>ST<sub>N</sub>-TTox<sup>[177]</sup>



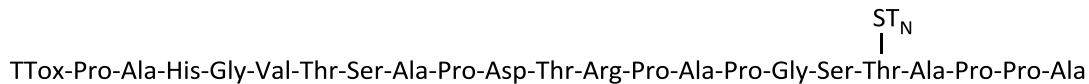
**Maus E2**: immunisiert mit MUC1(20)Thr<sup>6</sup>-2,3-ST-TTox<sup>[177]</sup>



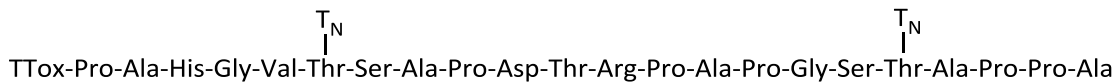
**Maus 5**: immunisiert mit MUC1(22)Ser<sup>17</sup>ST<sub>N</sub>-TTox<sup>[178]</sup>



**Maus 8**: immunisiert mit MUC1(22)Thr<sup>18</sup>ST<sub>N</sub>-TTox<sup>[178]</sup>



**Maus 11**: immunisiert mit MUC1(22)Thr<sup>6</sup>T<sub>N</sub>-Thr<sup>18</sup>T<sub>N</sub>-TTox<sup>[178]</sup>



Die Antikörper im Serum der jeweiligen Maus binden an das immobilisierte BSA-Antigen. Nach Inkubation und Waschen wird ein biotinylierter Anti-Maus-Ig-Antikörper aufgetragen, der die gegen das Glycopeptid-Antigen spezifischen und folglich gebundenen Maus-Antikörper erkennt. Um eine photometrische Messung des biotinylierten Anti-Maus-Antikörpers durchführen zu können, wird ein Streptavidin-Myeloperoxidase-Komplex zugegeben, der über das Biotin an diesen sekundären Antikörper bindet. Das farblose [2,2'-

Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)] wird durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ , katalysiert von der Meerrettich-Peroxydase, zum freien grünen Radikal oxidiert (Abbildung 4.68).

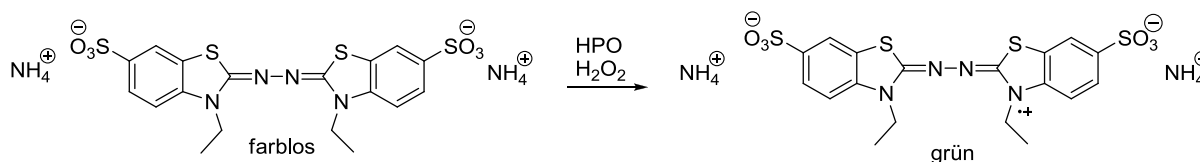


Abbildung 4.68: Reduktion des farblosen ABTS-Farbstoffes zum grünen Radikal.

Das stabile Radikal wird bei einer Wellenlänge  $\lambda = 410 \text{ nm}$  photometrisch bestimmt. Werden die gemessenen Absorptionswerte in einem Diagramm gegen die Verdünnung des Serums aufgetragen, kann eine Aussage über die Affinität (ausgedrückt in Verdünnung des induzierten Antiserums) der Antikörper gegen die tumorassoziierten Glycopeptide getroffen werden.

#### Auswertung der ELISA-Ergebnisse

Im ersten ELISA wird das MUC1(20)Thr<sup>11</sup>ST<sub>N</sub>-BSA (**83**) auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und mit den Seren der Maus 7 (immunisiert mit MUC1(20)Thr<sup>6</sup>T-TTox), der Maus D2 (immunisiert mit MUC1(20)Thr<sup>6</sup>ST<sub>N</sub>-TTox), der Maus E2 (immunisiert mit MUC1(20)Thr<sup>6</sup>-2,3-ST-TTox), der Maus 5 (immunisiert mit MUC1(22)Ser<sup>17</sup>ST<sub>N</sub>-TTox), der Maus 8 (immunisiert mit MUC1(22)Thr<sup>18</sup>ST<sub>N</sub>-TTox) und der Maus 11 (immunisiert mit MUC1(22)Thr<sup>6</sup>T<sub>N</sub>-Thr<sup>18</sup>T<sub>N</sub>-TTox) inkubiert. Im Diagramm 1 (Abbildung 4.70) ist zu erkennen, dass wegen der Glycosylierung in der immunodominanten Domäne in der immobilisierten Probe MUC1(20)Thr<sup>11</sup>ST<sub>N</sub>-BSA nur niedrige Affinitäten, d.h. schwache Wechselwirkungen zwischen immobilisiertem Antigen und den induzierten Antikörpern, festzustellen sind. Das deutet auf die Bedeutung der unterschiedlichen Positionen der Glycosylierung zwischen dem immobilisierten Antigen (**83**) und denjenigen in Vakzinen hin. Das Antigen (**83**) trägt die Glycosylierung in der immunodominanten Domäne, wie sie bei vorhergegangenen Immunisierungen in der Arbeitsgruppe Kunz noch nicht in Vakzinen eingesetzt worden war. Da anzunehmen ist, dass in den Antiseren Antikörper mit einer spezifischen Erkennung für die immundominante Domäne vorliegen, kann bei einer solchen strukturellen Veränderung

dieser, z.B. durch Glycosylierung, die Bindungsaffinität der Antikörper für diese Struktur abgeschwächt werden, was die geringe Absorption zur Folge hat.

Glycosylierungen haben einen Einfluss auf die Konformation des Peptidrückgrates. Je nach Position der Glycosylierung wird die räumliche Anordnung des Peptids der MUC1-Sequenz beeinflusst. Folglich kann das Saccharid sowohl selbst als auch über seine Wirkung auf die Peptidkette Einfluss auf die Antigenerkennung nehmen.

Die Wechselwirkung zwischen dem MUC1(20)Thr<sup>11</sup>ST<sub>N</sub>-BSA-Konjugat und den Seren von Maus 7, Maus 11 und Maus D2 sind im Vergleich zu den anderen Seren größer. Kennzeichnend ist, dass bei diesen Seren in der auslösenden Vakzine jeweils Position-6 der Muc1-Sequenz glycosyliert wurde. Anscheinend wurden hierbei Antikörper induziert, deren Bindungsspezifität näher an der Struktur (83) liegt, als bei den Antikörpern, die durch Vakzine mit Glycosylierung in Position 17 oder 18 induziert wurden (Antiseren Maus E2, 5 und 8).

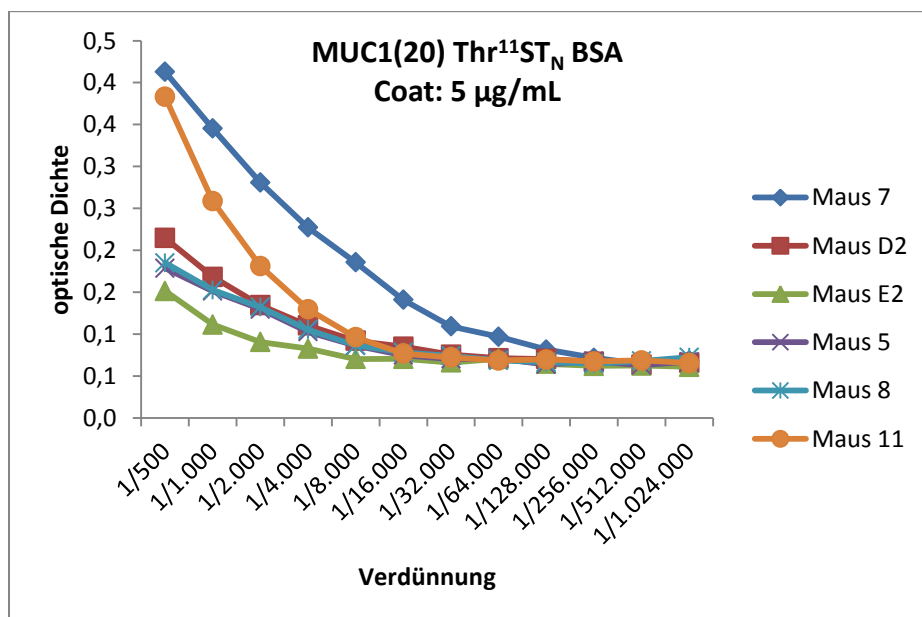


Abbildung 4.69: Diagramm 1 Beschichtung der Mikrotiterplatte mit MUC1(20)Thr<sup>11</sup>ST<sub>N</sub>-BSA.

Im zweiten Assay wird das MUC1(20)Thr<sup>11</sup>T<sub>N</sub>-BSA (**82**) auf die ELISA-Platte aufgetragen, das im Unterschied zu (**83**) mit einem Monosaccharid glycosyliert ist. In Diagramm 2 (Abbildung 4.70) ist das Ergebnis für die gleichen Antiseren zu sehen wie sie in den in Abbildung 4.69 gezeigten Versuchen eingesetzt wurden.

Auch hier ist nur eine geringe Affinität der Antiseren zu dem immobilisierten Antigen zu beobachten (siehe Auswertung der Elisa-Ergebnisse, Diagramm 1). Die stärkste Bindung ist wieder bei Antiseren der Mäuse 7 und 11 zu beobachten. Auffällig ist jedoch, dass eine deutliche Differenzierung zwischen der Bindungsaffinität der Seren von Maus 5 und 8 im Vergleich mit denen von Maus D2 und E2 zu beobachten ist. Alle vier Seren wurden zu Vakzinen induziert, welche sialylierte Saccharid-Antigene, jedoch in verschiedenen Positionen, tragen. Die komplexen Antigene der Vakzine von Maus D2 und E3 üben möglicherweise noch einen größeren konformativen Einfluss aus, als das T-Antigen bei Maus 7, so dass bei sonstiger Übereinstimmung doch die strukturellen Einflüsse zu anderen Antikörper-Epitopen führen.

Liegt das Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen in Position 17 oder 18 des Antigens in der Vakzine vor, legen die vorhergehenden Versuche nahe, dass größtenteils Antikörper mit einer Spezifität für die immundominante Domäne induziert wurden, die das Monosaccharid tolerieren und eine Bindung zulassen.

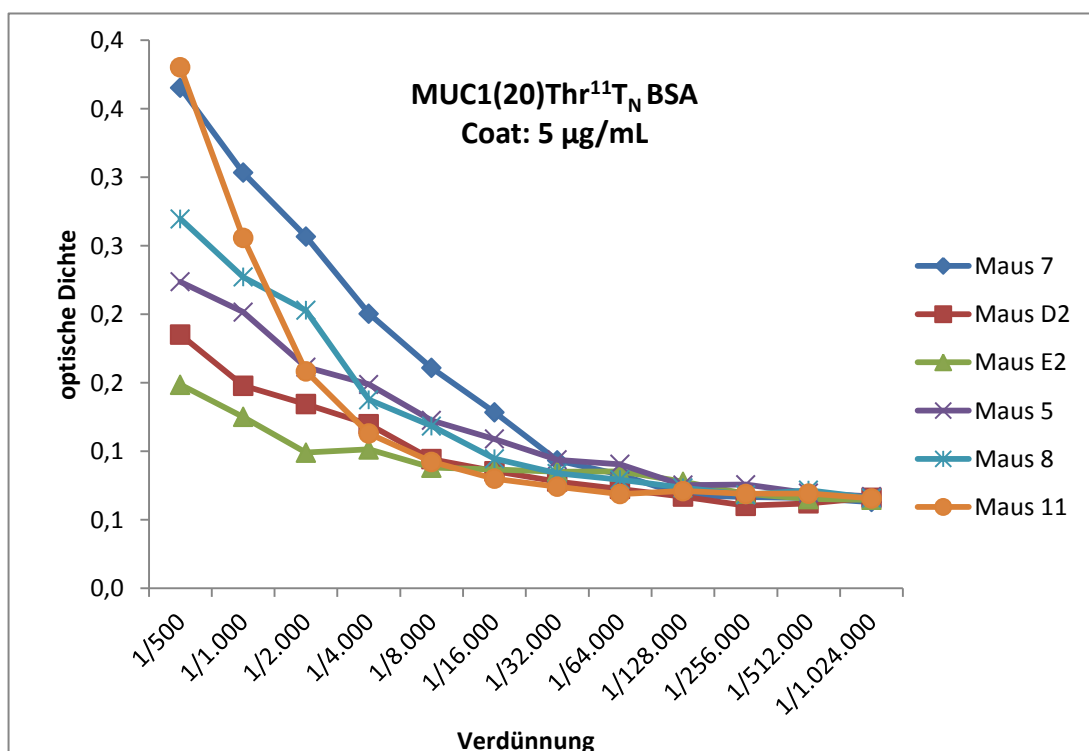


Abbildung 4.70: Diagramm 2 des ELISA-Verfahrens, Beschichtung der Mikrotiterplatte mit MUC1(20)Thr<sup>11</sup>T<sub>N</sub>-BSA.



Ein Faktor, der nicht vollständig eingeschätzt werden kann, ist die unterschiedliche Beladung der BSA-Proteine mit den Glycopeptiden. Auch aus einer niedrigen Beladung kann eine geringe Absorption resultieren. Theoretisch wird die Beladung der BSA-Proteine mit Glycopeptid über MALDI-TOF-Spektrometrie bestimmt. Aufgrund technischer Probleme im Linear-Modus des MALDI-TOF-Spektrometers konnte diese Messungen für die Konjugate (**83** und **82**) nicht durchgeführt werden.

Die Bindung der Antiseren an die untersuchten Konjugate (**83** und **82**) deuten darauf hin, dass durch die veränderte Position der Glycosylierung das bevorzugte Epitop *PDTRP* der MUC1-Sequenz so verändert wird, dass es durch MUC1-spezifische Antikörper nur schwach erkannt wird. Dieser markante Unterschied zu bisherigen Vakzinen zeigt, dass mit den synthetischen Glycopeptidantigen feine Strukturunterschiede immunologisch differenziert werden können, was für die Unterscheidung zwischen Tumorzellen und gesunden Zellen besonders bedeutsam ist. Diese Differenzierung zwischen Tumorzellen und normalen Zellen ist für die angestrebte Immuntherapie unerlässlich.

#### ELISA-Assay des Glycodendrimers

Im dritten Assay wird das Glycodendrimer (MUC1(20)Thr<sup>18</sup>ST<sub>N</sub>)<sub>8</sub> (**100**) auf die ELISA-Platte aufgetragen, und die Seren werden titriert. In Diagramm 3 (Abbildung 4.71) ist wieder die optische Dichte gegen die Verdünnung der Seren von Maus 7, Maus D2, Maus E2, Maus 5, Maus 8 und Maus 11 aufgetragen.

Deutlich wird dieses Dendrimer von Antiseren der Maus 7, 5 und 8 erkannt. Bisherige Ergebnisse haben gezeigt, dass das Antiserum von Maus 7 eine sehr große Erkennungsbreite für tumorassoziierte MUC1-Strukturen zeigt. Das gilt auch für die Seren, die durch Vakzine mit im C-terminalen Bereich glycosylierten Antigenen ausgelöst worden sind. Bei den restlichen Seren ist kaum bzw. keine Erkennung der Antigenstruktur erkennbar. Diese unterscheiden sich aber auch deutlich durch Position und Art der Glycosylierung oder mehrfach Glycosylierung von der Struktur der einzelnen MUC1-Sequenz des Dendrimers (**100**). Die Strukturen der Vakzine, mit denen Maus 5 und 8 behandelt wurden, ähneln der Struktur des Dendrimers. Sie haben in immunologischen Studien sehr gute Resultate

gezeigt.<sup>[179]</sup> Das vollsynthetische Dendrimer mit einer definierten Struktur bietet so einen möglichen Ersatz für die Proteinvakzine.

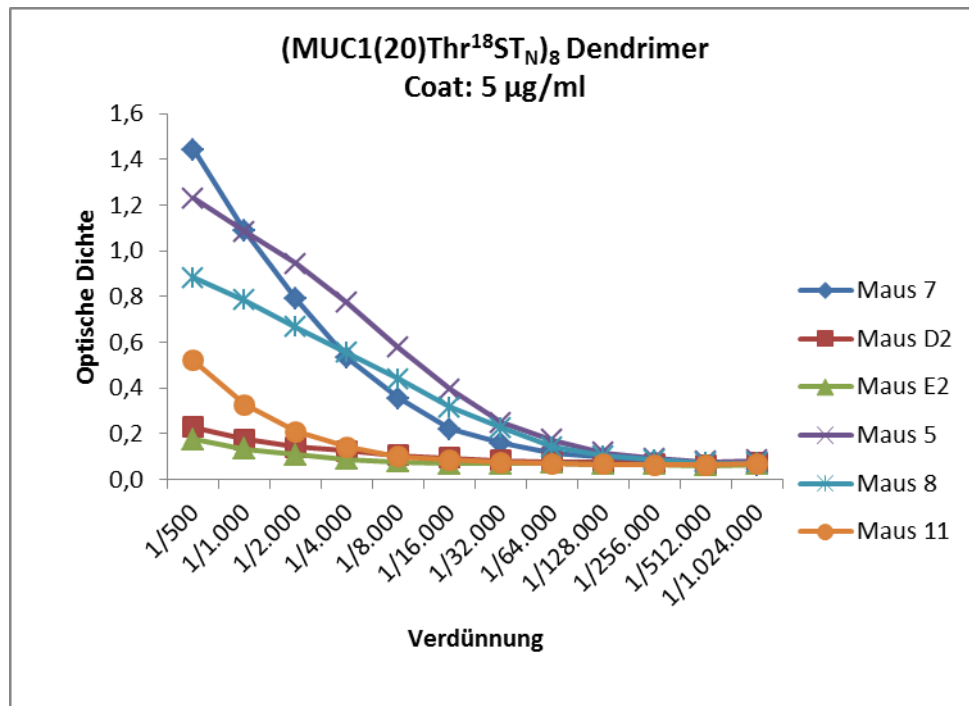


Abbildung 4.71: Diagramm 3 des ELISA-Verfahrens, Beschichtung der Mikrotiterplatte mit (MUC1(20)Thr<sup>18</sup>ST<sub>N</sub>)<sub>8</sub>.



## 5 Zusammenfassung

In epithelialen Tumorzellen zeigen Membranglycoproteine ein charakteristisch verändertes Glycosylierungsmuster. Dieses veränderte Glycosylierungsmuster wird durch eine veränderte Aktivität von Glycosyltransferasen hervorgerufen, wobei die Aktivität der  $\beta$ 1,6-*N*-Acetylglucosamintransferase besonders vermindert ist, während die Aktivitäten der Sialyltransferasen erhöht sind. Die veränderte Aktivität führt zur Expression von stark verkürzten und frühzeitig sialylierten Kohlenhydratseitenketten der mucinartigen Glycoproteine auf Tumorzellen, welche als tumorassoziierte Antigene bezeichnet werden. Im Gegensatz zur Situation bei normalem MUC1-Glycoprotein liegen wegen der tumorassoziierten Glycane im Proteinrückgrat Peptidepitope für das Immunsystem frei. Die tumorassoziierten Peptidepitope stellen eine wichtige Zielstruktur für eine potentielle selektive Immuntherapie dar. Das Ziel ist es, dass das Immunsystem zwischen den tumorassoziierten und den normal exprimierten Glycoproteinen unterscheiden kann, und damit in der Lage ist, eine selektiv gegen Tumorzellen gerichtete Immunantwort auszulösen. Daher ist eine Synthese von strukturell exakt definierten synthetischen Glycopeptiden und deren Einbau in Vakzine ein entscheidender Schritt für eine angestrebte Immuntherapie gegen Krebs. Ein Ziel dieser Arbeit war in diesem Zusammenhang die Synthese exakt definierter tumorassoziiertes Glycopeptide, wobei Peptide aus der Tandem Repeat-Domäne des MUC1 synthetisiert wurden. Die Darstellung erfolgte durch automatisierte Festphasensynthese. Die verschiedenen Saccharidantigene wurden als glycosylierte Aminosäurebausteine in die MUC1-Peptidsequenz eingebaut. Als Saccharidbausteine kamen das T<sub>N</sub>-Antigen sowie das Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen, das (2,6)-Sialyl-T- und das (2,3)-Sialyl-T-Antigen zur Anwendung. In der nachfolgenden Abbildung (Abbildung 5.1) wird der biomimetische (Retro)Syntheseweg für die glycosylierten Aminosäure-Konjugate dargestellt.

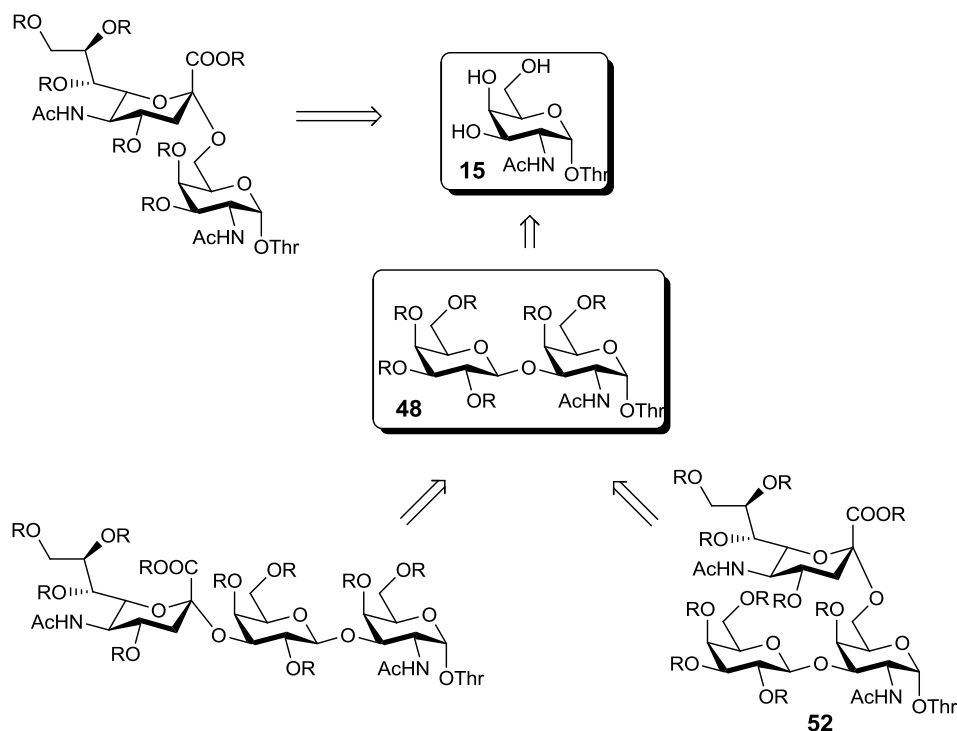


Abbildung 5.1: Darstellung der synthetisierten Festphasenbausteine.

Zentrale Bausteine der Syntheseroute sind das  $T_N$ -Antigen und das T-Antigen-Konjugat, aus denen die sialylierten Glycosylaminosäuren über Schutzgruppenmanipulationen und Sialylierung dargestellt werden. Aus dem  $T_N$ -Antigen wird durch regio- und stereoselektive Sialylierung das Sialyl- $T_N$ -Antigen erhalten. Mittels einer 3- $\beta$ -Galactosylierung des  $T_N$ -Threonin-Konjugats (**15**) wurde das Disaccharid (**48**) synthetisiert. Nach selektiver Deacetylierung im Galactosylrest konnte eine regio- und stereoselektive Sialylierung an der freiliegenden 3'-OH Funktion des Akzeptors (**53**) durchgeführt werden, wobei als Donor das Xanthogenat der *N*-Acetylneuraminsäure (**28**) eingesetzt wurde, welches mit Methylsulfonyltriflat aktiviert wurde. Die alternative Deblockierung des *N*-Acetylgalactosamins unter Abspaltung des Benzylidenacetals in 4- und 6-Position liefert ein Disaccharid (**50**), das für eine alternative Sialylierung in 6-Position zur Verfügung steht, so dass der (2,6)-Sialyl-T-Threonin-Baustein (**51**) erhalten wird. Durch die Abspaltung des *tert*-Butylesters wird die freie Säure (**52**) gewonnen, die in der Festphasensynthese eingesetzt werden kann (Abbildung 5.2).

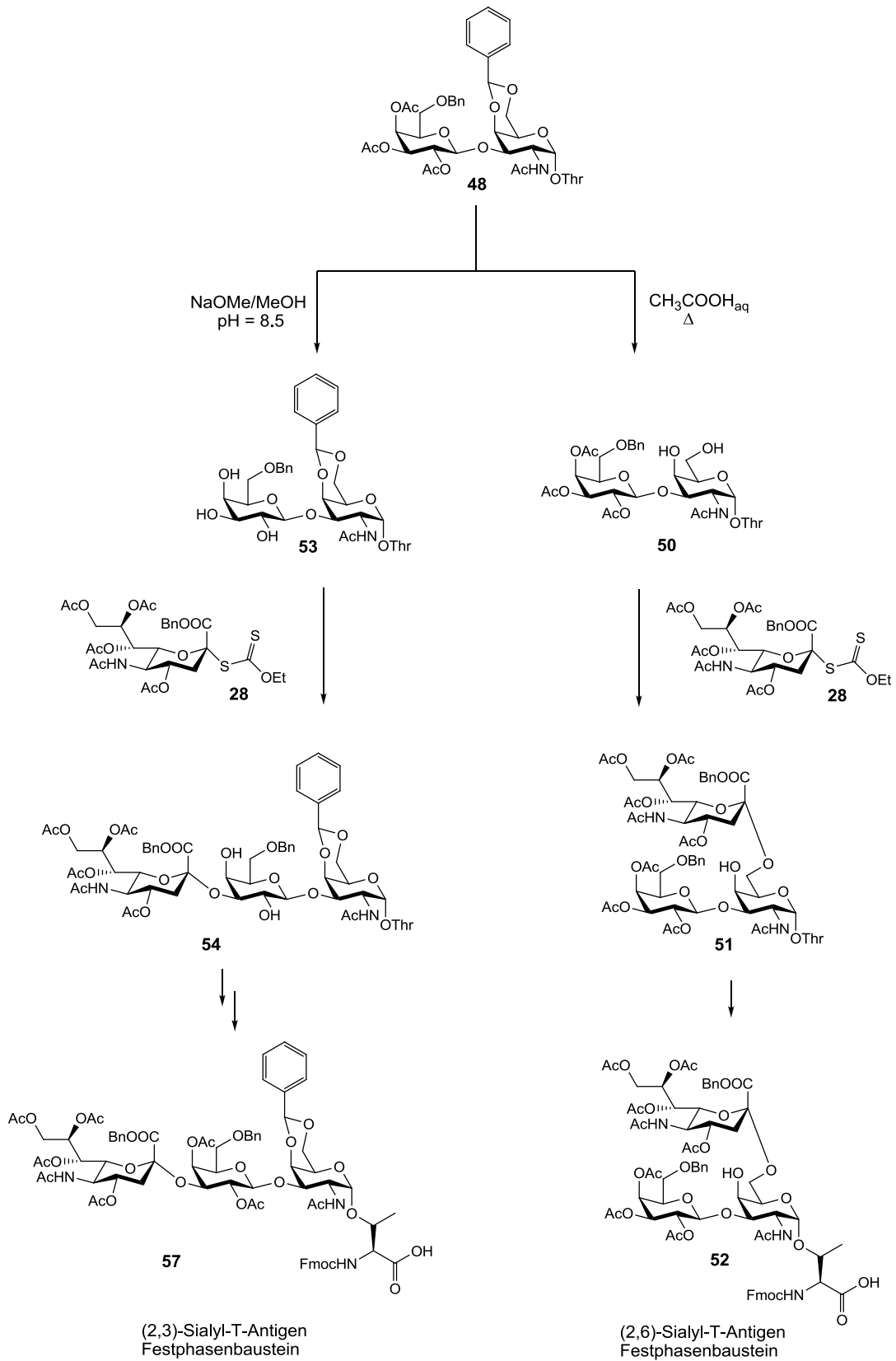


Abbildung 5.2: Reaktionsschema der sialylierten Strukturen.

Durch die automatische Festphasensynthese wurde die vollständige Tandem Repeat-Sequenz des Mucins MUC1 synthetisiert, wobei die glycosylierte Aminosäure jeweils in der immunodominanten Domäne (Thr<sup>11</sup>) eingebaut wurde, so dass eine kleine Glycopeptid-Strukturbibliothek erhalten wurde (Abbildung 5.3).

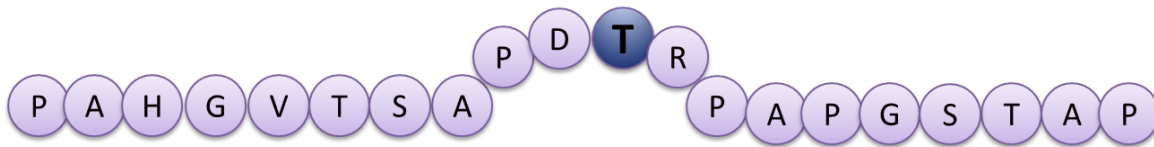


Abbildung 5.3: Tandem Repeat der MUC1-Sequenz.

Um durch die Glycopeptidantigene eine genügende Immunantwort auszulösen, werden die synthetisierten tumorassoziierten Antigene mit immunstimulierenden Epitopen verknüpft. In dieser Arbeit dienten zur Kombination mit den MUC1-Glycopeptiden als T-Zell-Epitop die Ovalbumin-OVA<sub>323-339</sub>-Sequenz und Rinderserumalbumin (BSA). Die Verknüpfung zwischen B-Zell-Epitop und T-Zell-Epitop erfolgte über einen nicht immunogenen Spacer (Abbildung 5.4).

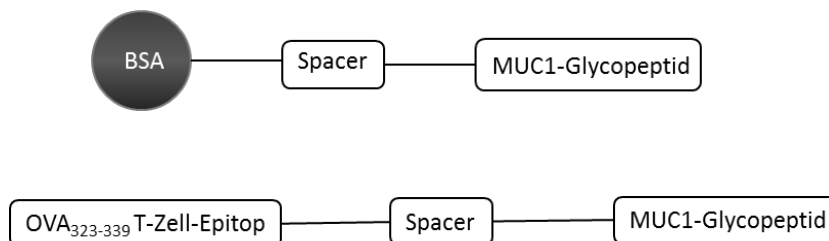


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Impfstoff-Konjugate.

Die synthetischen MUC1-Glycopeptide wurden über die Reaktion mit Quadratsäureestern an das Trägerprotein BSA gekuppelt. Der Quadratsäurediester diente als heterobifunktionaler Linker, der bei einem pH-Wert = 8 mit der terminalen Aminofunktion des Glycopeptids in das Monamid des Quadratsäureesters überführt wird (Abbildung 5.5).

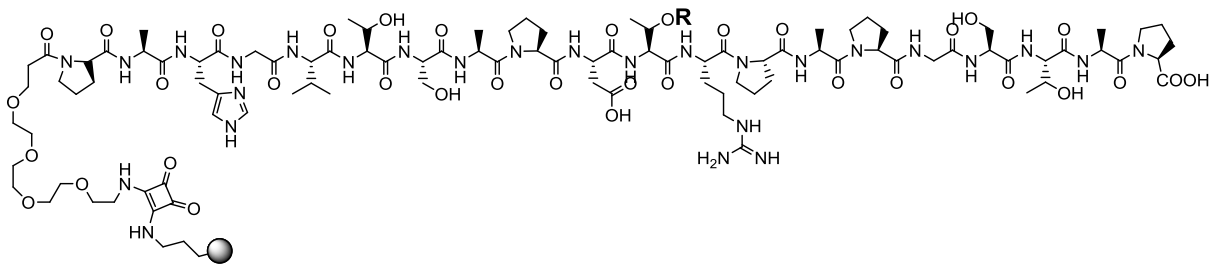


Abbildung 5.5: BSA/TTTox-Konjugate mit Quadratsäure als bifunktioneller Linker.

Die ersten immunologischen Auswertungen der BSA-Konjugate mittels ELISA haben gezeigt, dass die bei den hergestellten Varianten vorliegende Glycosylierung in der immunodominanten Region zu einer schwachen Wechselwirkung zwischen dem auf der Mikrotiterplatte präsentierten Antigen und den Antikörpern führt, die durch Vakzine mit MUC1-Glycopeptiden, die an anderen Positionen die Glycane tragen, induziert worden waren. Das Glycopeptid Muc1(20)Thr<sup>11</sup>ST<sub>N</sub>-BSA (**83**) zeigte eine stärkere Wechselwirkung mit Antikörpern, die durch in Position 6 glycosylierte MUC1-Vakzine gewonnen wurden. Beim Glycopeptid Muc1(20)Thr<sup>11</sup>T<sub>N</sub>-BSA (**82**) ist im Vergleich zum sialylierten Glycopeptid (**83**) die Wechselwirkung mit allen verfügbaren Antisera noch schwächer (siehe Seite 90-92).

Neben den OVA- und BSA-Konjugaten wurden dendrierte Glycopeptide (multiple antigenic peptides, MAPs) hergestellt. Ausgehend von Lysin wurde ein festphasengebundenes tetrameres Oligo-Lysin aufgebaut (Abbildung 5.6), welches anschließend in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt wurde.

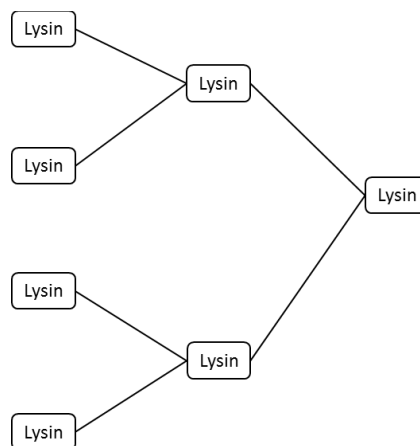


Abbildung 5.6: Darstellung des Lysin-Cores.



In diesem Dendrimer wurde simultan die Peptidsequenz aus der MUC1-Sequenz (His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala) mit dem 2,6-Sialyl-T<sub>N</sub>-Baustein als glycosylierten Aminosäurebaustein gebildet (Abbildung 5.7).

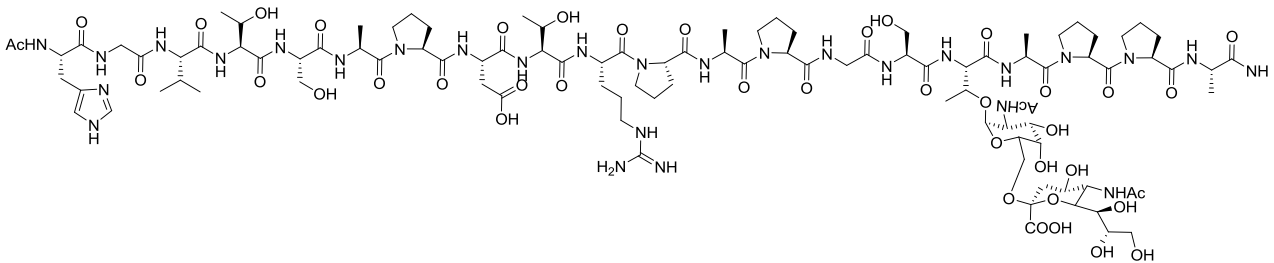


Abbildung 5.7: Peptidrückgrat des Dendrimers.

Acht Peptidstränge entstanden so im Festphasenpeptidsynthesizer. Nach dem Ablösen vom Harz und dem Abspalten der Schutzgruppen wurde das Dendrimer erhalten, welches in immunologischen Studien getestet werden kann (Abbildung 5.8),.

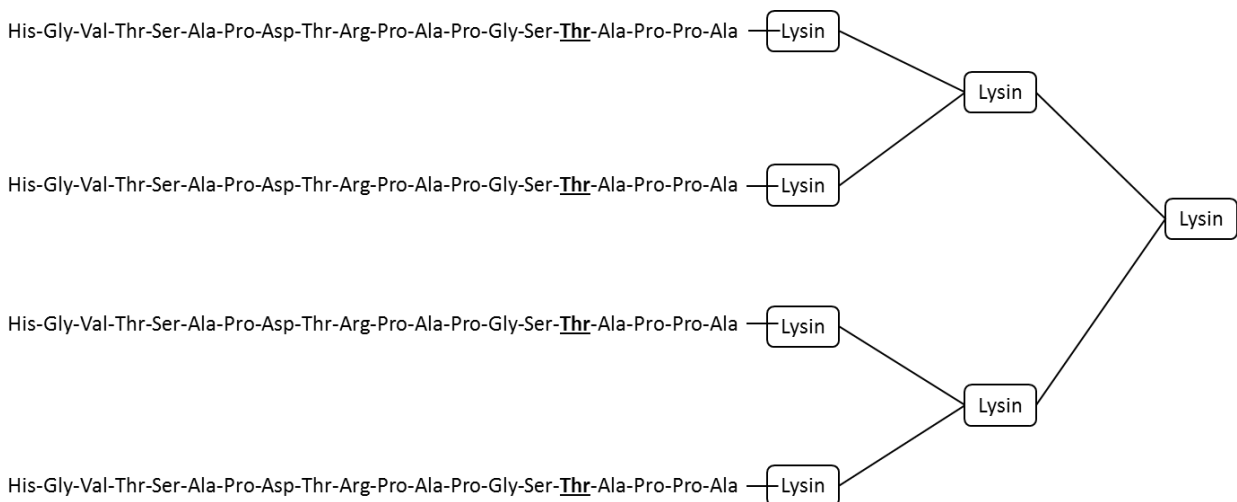
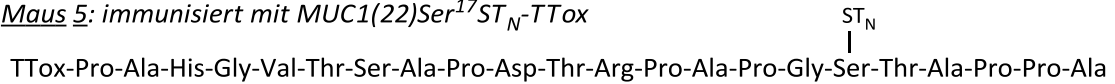


Abbildung 5.8: Schematische Darstellung des Dendrimers.

Im immunologischen Assay zeigte sich das Dendrimer (**101**) als selektive Erkennungsstruktur. Es reagierte als Antigen bevorzugt mit Antiseren, die durch an Ser<sup>17</sup> bzw. Thr<sup>18</sup> glycosylierte MUC1-Glycopeptidantigene induziert worden waren (Abbildung 5.9).

Maus 5: immunisiert mit MUC1(22)Ser<sup>17</sup>ST<sub>N</sub>-TTox



Maus 8: immunisiert mit MUC1(22)Thr<sup>18</sup>ST<sub>N</sub>-TTox

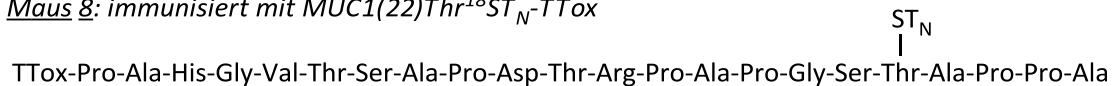


Abbildung 5.9: Antiseren von Maus 5 und 8.

Um Immunisierungen durchführen zu können, die auf das komplette Freund's-Adjuvanz verzichten, wurde auf den TLR2-Agonisten Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> zurückgegriffen. Dazu wurde ein tumorassoziiertes deblockiertes OVA-Spacer-MUC1-Glycopeptid in einer Fragmentkondensation mit dem TLR2-Agonisten Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> über einen Spacer konjugiert (Abbildung 5.10). Die Synthese und Isolierung verlief mit geringer Ausbeute, so dass die Charakterisierung der Substanz nur über ESI-MS möglich war.

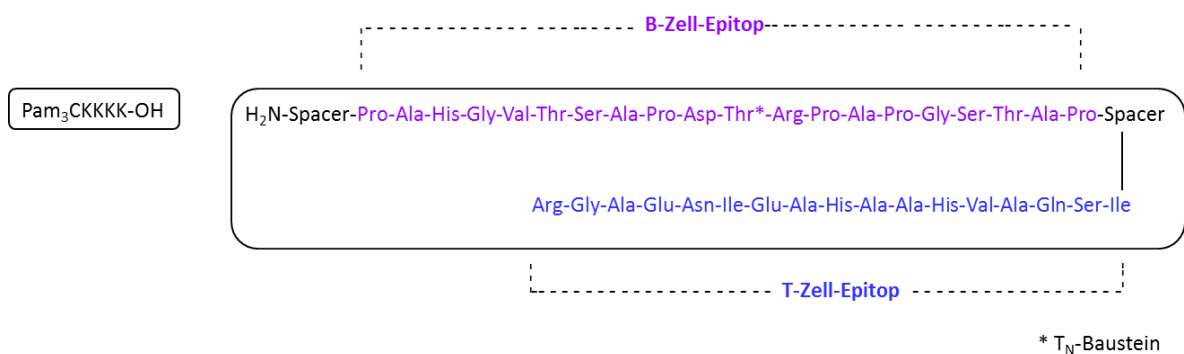


Abbildung 5.10: Konjugation des Pam<sub>3</sub>CKKKK-OH mit H<sub>2</sub>N-Spacer-B-Zell-Spacer-T-Zell-Epitop.



# 6 Experimenteller Teil

## 6.1 Allgemeines und Messgeräte

### Lösungsmittel

Lösungsmittel der Qualität p.a wurden von der Firma Acros Organics, Geel (Belgien) bezogen. Absolute Lösungsmittel werden nach den literaturbekannten Verfahren gewonnen.<sup>[180]</sup>

### Dünnschichtchromatographie

Zur dünnschichtchromatographischen Reaktionskontrolle wurden mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> beschichtete Aluminium-Fertigplatten ohne Konzentrierungszone der Firma Merck, Darmstadt, verwendet. Die Detektion der Produkte erfolgte mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sowie mit Hilfe folgender Färbereagenzien:

- Zucker-Reagenz (Mischung von 2 N Schwefelsäure in Ethanol und 2%-iger ethanolischer *p*-Methoxyphenol-Lösung im Volumenverhältnis 1:1)
- Seebach-Reagenz (Lösung aus 1 g Cer(IV)sulfat-Tetrahydrat und 2.5 g Molybdätophosphorsäure in 94 mL dest. Wasser und 6 mL konz. Schwefelsäure)
- Ninhydrin-Reagenz (Lösung aus 1.5 g Ninhydrin in 500 mL Methanol und 15 mL Essigsäure)

Es wurde nach Eintauchen der DC-Platten in die entsprechende Lösungen durch Erhitzen mit einem Heißluftföhn entwickelt.

### Chromatographie

Präparative chromatographische Trennungen unter Normaldruck wurden mit Kieselgel der Korngröße 0.064-0.200 mm der Firma ICN Biomedicals, Eschwege, durchgeführt. Zur Flash-

Säulenchromatographie wurde Kieselgel der Korngröße 0.032-0.063 mm (Firma Merck) verwendet. Als Laufmittel wurden, falls nicht anders angegeben, Cyclohexan/Ethylacetat-Gemische benutzt, die in der Regel durch Redestillation der Eluate früherer Chromatographien gewonnen wurden. Durch Zusatz der polaren bzw. unpolaren Komponente wurde das Laufmittelgemisch so eingestellt, dass sich für die zu isolierende Substanz ein  $R_f$ -Wert von 0.1 bis 0.3 ergibt. Die jeweiligen Zusammensetzungen der Lösungsmittelgemische sind stets in Volumenverhältnissen angegeben. Die zur Chromatographie benutzte Menge an Kieselgel entspricht jeweils der 100-fachen Menge der zu reinigenden Rohsubstanz.

### **Massenspektrometrie**

ESI-Spektren wurden mit einem Navigator 1 ESI-Massenspektrometer (Fa. Thermo Quest) in der Regel mit einer Zylinderspannung von 25 V gemessen. Zur Probeninjektion wurde ein Basic-Marathon Autosampler (Fa. Spark) mit einer 20  $\mu\text{L}$  Probenschleife und nachgeschalteten Flowsplitter (Splitterverhältnis 10:1) verwendet. Die aufgetragene Probenkonzentration beträgt 0.1  $\text{mg mL}^{-1}$  in Acetonitril.

Bei den Massenspektren ist der angegebene Wert für  $m/z$  derjenige des intensivsten Signals des Isotopenmusters.

MALDI TOF-MS-Analysen wurden mit einem Flugzeit-Massenspektrometer von Axima-CFR Kratos Analytical (*Shimadzu Group Company, UK*) im Reflektor- oder linearen Modus bei einer Zylinderspannung von 20 kV durchgeführt. Die Proben wurden in einem Lösungsmittelgemisch Millipore-Wasser<sub>0.1%TFA</sub>/Acetonitril (MALDI-Grade) im Verhältnis 1:1 in einer Konzentration von 5-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  gelöst. Jeweils 5  $\mu\text{L}$  der zu messenden Substanz wurden in einem Eppendorf®-Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend im Verhältnis 1:1 mit einer Matrixlösung gemischt. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (dhb) für Molekülmassen unter 10.000  $\text{g mol}^{-1}$  verwendet (Konzentration: 20  $\text{mg mL}^{-1}$  in Wasser/Acetonitril, 1:1). Für Molekülmassen > 10.000  $\text{g mol}^{-1}$  wurde als Matrix Sinapinsäure eingesetzt (Konzentration: 20  $\text{mg mL}^{-1}$  in Wasser/Acetonitril, 1:1). Die Spektren wurden im

negativen Modus aufgenommen. Die Massenskala wurde extern mittels vergleichbarer chemischer Substanzen kalibriert.

### Drehwerte

Die spezifischen Drehwerte werden mit einem *Perkin-Elmer* Polarimeter 241 bei den Wellenlängen  $\lambda = 546 \text{ nm}$  und  $\lambda = 578 \text{ nm}$  gemessen und auf die Natrium-D-Linie ( $\lambda = 589.5 \text{ nm}$ ) extrapoliert. Der Drehwert besitzt für den Größenwert als Hilfsmaßeinheit Grad ( $^{\circ}$ ), um die Änderung des Winkels des linear polarisierten Lichtes beim Durchgang durch die Probe anzugeben. Lösungsmittel, Konzentration und Temperatur sind bei den einzelnen Verbindungen vermerkt.

### NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten gemessen:

- Bruker AC 300 für 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR und 75.5 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR
- Bruker AMX 400 für 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR und 100.6 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR

Als Referenz diente das Signal des Lösungsmittels ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta = 7.26 \text{ ppm}$ ,  $\delta = 77.0 \text{ ppm}$  oder  $\text{DMSO}$   $\delta = 2.50 \text{ ppm}$ ,  $\delta = 39.5 \text{ ppm}$ )<sup>[181]</sup>. Zur Auswertung der Spektren wurde die NMR-Software Bruker XWin NMR und MestReNova verwendet.

Die Zuordnung der Protonen und Kohlenstoffsignale erfolgte unter Anwendung von COSY-, TOCSY-, HSQC- und HMBC-Experimenten. Die schriftliche Interpretation der Saccharid-NMR-Spektren erfolgte nach folgendem Schema: die Atome des D-Galactosamin wurden ohne Apostroph gekennzeichnet, die der D-Galactose mit einfachem Apostroph (') und die der N-Acetylneuraminsäure durch zweifache Apostrophierung (") gekennzeichnet.

## Festphasensynthese

Die Festphasensynthesen wurden mit einem Perkin-Elmer ABI 433A Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt, der zur Kontrolle der Syntheseverläufe für die Fmoc-Abspaltung mit einem externen *Perkin-Elmer 200* UV/VIS-Detektor der Firma *Applied Biosystems* versehen ist. Die verwendeten Lösungsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen: DMF: Firma *Roth*, Karlsruhe und NMP: Firma *SDS*, Rastatt.

Die Harze wurden von der Firma *Rapp Polymere*, Tübingen geliefert. Die unglycosylierten Aminosäurebausteine wurden von der Firma *Orpegen Pharma*, Heidelberg oder *Calbiochem Novabiochem AG*, Löffelfingen, Schweiz geliefert.

Zuerst wird in den iterativen Syntheseschritten die Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung einer 20%-igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon (NMP) abgespalten. Zur vollständigen Fmoc-Abspaltung wird der Reaktionsschritt dreimal für jeweils 2.5 min wiederholt. Das gebildete Dibenzofulven-Piperidin-Addukt wird durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 301$  nm detektiert, um die Fmoc-Abspaltung zu kontrollieren. Die anschließenden Aminosäurekupplungen erfolgen mit einer Reaktionslösung von 1 mmol der Fmoc-geschützten Aminosäure, 1 mmol HBTU, 1 mmol 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 2 mmol Hünigs Base in DMF. Nach jedem Kupplungsschritt werden verbleibende Aminofunktionen acetyliert in einer Lösung aus 0.5 M Acetanhydrid, 0.125 M Hünigs Base und 0.015 M HOBt in NMP (Capping-Reagenz). Nach jedem Syntheseschritt wird der polymere Träger anschließend mit NMP gespült. Nach Abschluss der Synthese wird das Harz mit Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

BSA (Fettsäure- und Globulin frei, A 0281) wurde von der Firma *Sigma Aldrich Biochemicals*, Taufkirchen bezogen.

Tetanus-Toxoid wurde von der Firma *CLS Behring*, Marburg bezogen und im Natriumchlorid-Puffer (17 mg Tetanus-Toxoid/mL) eingesetzt.

Die Ultrafiltration wurde in einer Stirred Ultrafiltration Cell der Firma *Millipore Corporation*, Bedford, USA durchgeführt. Bei den Ultrafiltrationen wurden Membranen aus Polyethersulfonen der Durchlässigkeit 10 kDa und 30 kDa eingesetzt. Die Membranen wurden maximal dreimal verwendet.

### **Analytische HPLC**

Die analytische HPLC wurde mit einer Knauer Maxi Star K 1000 Gradienten-Pumpe, einem Knauer 4-Kanal-Entgaser sowie einem Knauer Diodenarraydetektor DAD K2800 durchgeführt. Als Software wurde ChromGate der Firma *Knauer*, Berlin verwendet. Es wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min gearbeitet. Als Eluent dienten Wasser/Acetonitril-Gemische, denen, falls vermerkt, 0.1 % Trifluoressigsäure zugesetzt wurde. Die Detektion der Produkte erfolgte bei einer Wellenlänge  $\lambda = 214$  nm und  $\lambda = 254$  nm. Als stationäre Phase wurde eine RP-Säule der Firma *Phenomenex*, Aschaffenburg verwendet (Luna 5  $\mu$  C18, 250 x 4.6 mm). Die angewandten Gradienten sind in der jeweiligen Synthesevorschrift der Verbindungen beschrieben.

### **Präparative HPLC**

Die präparative HPLC wurde mit zwei Ministar K500-Pumpen und einem variablen Wellenlängenmonitor von *Knauer* durchgeführt. Es wurde eine Flussrate von 10 mL min<sup>-1</sup> eingestellt. Die Detektion der Produkte erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 214$  nm und  $\lambda = 254$  nm. Als Eluent dienten Wasser/Acetonitril-Gemische, denen falls vermerkt 0.1% Trifluoressigsäure zugesetzt wurde. Als stationäre Phase wurde eine RP-Säule der Firma *Phenomenex*, Aschaffenburg, verwendet (Luna 5  $\mu$  C18 (2), 250 x 21.2 mm). Die angewandten Gradienten sind in der jeweiligen Synthesevorschrift der Verbindungen beschrieben.

### **Allgemeine Vakzin-Formulierung:**

Materialien:

CFA (vollständiges Freund's-Adjuvans): Bacto Adjuvant Complete Freund, Control. 645230 (0638-60), Firma *Difco*.



IFA (unvollständiges Freund's-Adjuvans): Bacto Adjuvant Incomplete Freund, 263910 LOT:142577 LA (0639-60), Firma Difco.

Synthetische MUC1-Vakzine in PBS1x,  $c = 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  bzw.  $0.4 \text{ mg mL}^{-1}$ .

**A:** In einem Szintillationsröhrchen werden 1 mL CFA und 1 mL PBS1x-Lösung 8 min unter Eiskühlung mit einem Ultraturax gerührt, bis die Emulsion eine viskose Konsistenz annimmt. Zur Entfernung von Luft wird 1 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Die Vakzin-Formulierung wird bis zur Injektion auf Eis gekühlt.

**B:** Es wird gemäß Vorschrift **A** unter Verwendung von 1 mL CFA und 1 mL einer Lösung der synthetischen MUC1-Vakzine in einer Pufferlösung PBS1x-Lösung verfahren ( $c = 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ )  $\rightarrow$  ( $c(\text{MUC1-Vakzine}) = 0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

**C:** Es wird nach Vorschrift **A** unter Verwendung von 1 mL IFA und 1 mL PBS1x-Lösung vorgegangen.

**D:** Unter Verwendung von 1 mL IFA und 1 mL einer Lösung der synthetischen MUC1-Vakzine in PBS1x-Lösung ( $c = 0.4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wird die Vakzin-Formulierung gemäß Vorschrift **A** hergestellt  $\rightarrow$  ( $c(\text{MUC1-Vakzine}) = 0.20 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

## ELISA-Materialien

Mikrotiter-Platten Immuno-Plate F96 MaxiSorp (Nunc, Wiesbaden).

Coating-Puffer:  $0.1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung,  $\text{pH} = 9.3$ .

Wasch-Puffer: PBS + Tween<sup>®</sup> 20 (1/100); Tween<sup>®</sup> 20: PolyethylenglycolSORBITAN-Monolaurat (nicht ionisches Detergenz).

Citrat-Puffer: 40 mM Citronensäure, 60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -Lösung,  $\text{pH} = 4.4$ - $4.5$ /ABTS/ $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lsg. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzylthiazolin-6-sulfonsäure)-

Diammoniumsalz (Sigma),  $c(\text{ABTS}) = 1 \text{ mg mL}^{-1}$  Citrat-Puffer; Zugabe von 25  $\mu\text{L}$  einer 0.3%-igen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung in Citrat-Puffer  $\text{mL}^{-1}$  ABTS-Lösung.

SA-HPO: Streptavidin-Horseradish Peroxidase in PBS1x-Lösung + 1 % Gelatine, Verdünnung: 1:10000 einer Stammlösung.

Die Absorption des gebildeten grünen Radikalkations wird bei  $\lambda = 410 \text{ nm}$  in einem ImmunoReader MJ2000 (InterMed) gemessen.

Durchführung des Assays:

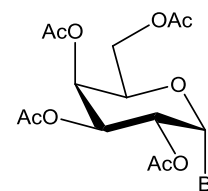
1. Auftragen des Coats auf die Mikrotiterplatte (50  $\mu\text{L}$ /Well)  
In jedes Well der Mikrotiterplatte werden 50  $\mu\text{L}$  Substrat in Coating-Puffer gegeben (Konzentration des Coating-Puffers: 2.5-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Es wird 15 h bei +4 °C oder eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Mikrotiterplatten werden dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen und ausgeklopft.
2. Blocken (100  $\mu\text{L}$ /Well)  
Es werden jeweils 100  $\mu\text{L}$  Blockpuffer in jedes Well der Mikrotiterplatten gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Mikrotiterplatten ausgeklopft.
3. Titration der Seren (50  $\mu\text{L}$ /Well)  
Es werden 50  $\mu\text{L}$  Blockpuffer in jedes Well vorgelegt. Es erfolgt die Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  vorverdünntem Serum in das Well A1-H1 und anschließend wird dieses titriert und im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die letzten 50  $\mu\text{L}$  aus dem Well A12-H12 werden verworfen. Es wird 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Mikrotiterplatten werden dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen und ausgeklopft.
4. Sekundärantikörper (50  $\mu\text{L}$ /Well)  
Es werden jeweils 50  $\mu\text{L}$  Sekundärantikörper in Blockpuffer in jedes Well gegeben und 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Mikrotiterplatten werden dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen und ausgeklopft.
5. SA-HPO (50  $\mu\text{L}$ /Well)  
Es werden jeweils 50  $\mu\text{L}$  Streptavidin-Meerrettichperoxidase in Blockpuffer (Verdünnung 1/10.000) in jedes Well der Mikrotiterplatte gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen und ausgeklopft.
6. ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50  $\mu\text{L}$ /Well)

ES werden jeweils 50  $\mu\text{L}$  einer Lösung aus ABTS ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und Wasserstoffperoxid (30%-ig, 1/4000-fach verdünnt) in Citratpuffer in jedes Well pipettiert. Nach 5 Minuten erfolgt die photometrische Messung.

## 6.2 Synthese des T<sub>N</sub>-Antigen-Bausteins

### 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid <sup>[182]</sup> (**3**)

( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>GalBr)

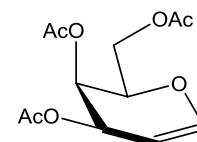


Eine Suspension von 0.50 g (2.80 mmol) D-Galactose (**1**) in 225 mL Acetanhydrid wird mit 0.8 mL Perchlorsäure (60 %) versetzt. Danach werden portionsweise weitere 24.50 g (136.01 mmol) D-Galactose (**1**) zugegeben, wobei die Reaktionstemperatur durch gelegentliche Kühlung auf ca. 25-30 °C gehalten wird. Nach beendeter Zugabe wird die Reaktionslösung drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es werden 113 mL HBr in Eisessig (33 %) innerhalb von 70 min hinzugegeben und die Reaktionsmischung anschließend weitere 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnung mit 225 mL Chloroform wird vorsichtig mit 150 mL Eiswasser hydrolysiert und mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Die organische Phase wird fünfmal mit je 75 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 75 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Hochvak. entfernt. Das resultierende Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung und Charakterisierung umgehend in der nachfolgenden Reaktion umgesetzt.

Rohausbeute: 43.2 g (105.1 mmol, 76 %), gelb-braunes Öl, R<sub>f</sub> = 0.48 (PE/EE, 2:1).

C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>BrO<sub>9</sub> (M = 410.02 g mol<sup>-1</sup>) [411.20 g mol<sup>-1</sup>]

### 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-galactal<sup>[183]</sup> (**4**)



Es werden 93.0 g (1.5 mol) Zink-Staub, der zuvor durch Aufschlämmen in verd. Salzsäure (2 N) aktiviert, mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Diethylether getrocknet wurde, in 650 mL Ethylacetat suspendiert. Die Suspension wird mit 9.6 mL (10.0 g, 0.12 mol) 1-Methylimidazol versetzt und zum Sieden erhitzt, bevor innerhalb von zwei Stunden eine Lösung von 50.0 g (0.12 mol) rohem  $\alpha$ Ac<sub>4</sub>GalBr (**3**) in 200 mL Ethylacetat unter kräftigem Rühren zugetropft wird. Die Reaktionsmischung wird weitere zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt und nach dem Abkühlen über Hyflo<sup>®</sup> filtriert, bevor das Filtrat dreimal mit 100 mL verd. Salzsäure (2 N) und zweimal mit jeweils 100 mL einer ges.

Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen wird. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel:  $^c$ Hex/EE, 4:1).

Ausbeute: 28.3 g (0.1 mol, 85 %), gelblich viskoses Öl,  $[\alpha]_D^{22} = -18$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f = 0.42$  (PE/EE, 2:1).

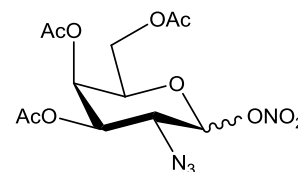
$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$  (M = 272.25 g mol $^{-1}$ ) [272.09 g mol $^{-1}$ ]

ESI-MS (positiv), m/z: 295.2 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 295.2, 235.2 ( $[\text{M}-\text{AcOH}+\text{Na}]^+$ , ber.: 235.2).

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 6.46 (d, 1H,  $J_{\text{H}1,\text{H}2} = 6.0$  Hz, H1), 5.54 (d, 1H,  $J_{\text{H}3,\text{H}4} = 2.1$  Hz, H3), 5.42 (d, 1H,  $J_{\text{H}4,\text{H}3} = 2.4$  Hz, H4), 4.72 (d, 1H,  $J_{\text{H}2,\text{H}1} = 6.3$  Hz, H2), 4.32 (t, 1H,  $J_{\text{H}5,\text{H}6} = 7.0$  Hz, H5), 4.26-4.17 (m, 2H,  $\text{H}_{6\text{a},\text{b}}$ ), 2.12, 2.08, 2.02 (3s, 9H, 3x  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

### 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranosylnitrat<sup>[69]</sup> (**5**)

( $\alpha/\beta\text{Ac}_3\text{GalN}_3\text{-ONO}_2$ )



Es werden 11.26 g (41.36 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**4**) in 200 mL absol. Acetonitril unter einer Argon-Atmosphäre gelöst. Bei  $-25$  °C werden unter Rühren 72.6 g (132.4 mmol) Cer(IV)-ammoniumnitrat (CAN) und 4.30 g (66.14 mmol) Natriumazid im Argon-Gegenstrom zugegeben. Es wird über Nacht bei  $-25$  °C unter Argon gerührt. Anschließend wird die intensiv gelbe Reaktionsmischung mit 200 mL eiskaltem Diethylether verdünnt und unter Eiskühlung mit 200 mL Eiswasser versetzt. Die organische Phase wird zügig dreimal mit je 200 mL dest. Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das resultierende Rohprodukt wird sofort durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel:  $^c$ Hex/EE, 4:1) gereinigt. Man erhält ein Anomerengemisch, welches für die nachfolgende Reaktion jedoch nicht weiter aufgetrennt werden muss.

Ausbeute: 6.69 g (17.8 mmol, 43 %), schwach gelber Feststoff,  $R_f = 0.20$  ( $^c$ Hex/EE, 2:1).

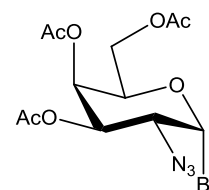
$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_{10}$  (M = 376.28 g mol $^{-1}$ ) [376.09 g mol $^{-1}$ ].

ESI-MS (positiv),  $m/z$ : 399.3 ( $[M+Na]^+$ , ber.: 399.3).

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 6.32 (d, 1H,  $J_{H1\alpha,H2\alpha} = 6.0$  Hz, H1) 5.60 (d, 1H,  $J_{H1\beta,H2\beta} = 9.2$  Hz, H2 $\beta$ ), 5.44-5.36 (m, 2H, H4 $\alpha$ ,H4 $\beta$ ), 5.25 (dd, 1H,  $J_{H3\alpha,H4\alpha} = 4.1$  Hz,  $J_{H3\alpha,H2\alpha} = 7.0$  Hz, H3 $\alpha$ ), 5.15 (dd, 1H,  $J_{H3\beta,H4\beta} = 2.6$  Hz,  $J_{H3\beta,H2\beta} = 9.5$  Hz, H3 $\beta$ ), 4.36-4.27 (m, 1H, H5 $\alpha$ ), 4.20-4.07 (m, 6H, H2 $\alpha$ , H5 $\beta$ , H6 $_{a,b\alpha}$ , H6 $_{a,b\beta}$ ), 3.86 (dd, 1H,  $J_{H2\beta,H1\beta} = 4.4$  Hz,  $J_{H2\beta,H3\beta} = 10.7$  Hz, H2 $\beta$ ), 2.13-2.04 (m, 18H, 6x  $CH_3CO$ ).

### 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid<sup>[69]</sup> (8)

( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-Br)



Man suspendiert unter kräftigem Rühren 7.50 g (86.36 mmol) trockenes Lithiumbromid in 70 mL absol. Acetonitril und versetzt dieses unter Argon-Atmosphäre langsam mit einer Lösung von 4.40 g (11.69 mmol)  $\alpha,\beta$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-ONO<sub>2</sub> (5), das in 20 mL absol. Acetonitril gelöst wurde. Es wird 15 h bei Raumtemperatur unter einer Argon-Atmosphäre gerührt, bevor die Reaktionsmischung mit 135 mL Dichlormethan verdünnt wird. Überschüssiges Lithiumbromid wird abfiltriert und das erhaltene Filtrat zweimal mit je 90 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 90 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Hochvak. entfernt. Das resultierende Rohprodukt wird zügig durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 4:1) gereinigt. Aufgrund der geringen Stabilität wird das Produkt zügig in der nächsten Reaktion umgesetzt.

Ausbeute: 3.56 g (9.03 mmol, 77 %), gelbes Öl,  $R_f = 0.20$  (<sup>c</sup>Hex/EE, 2:1).

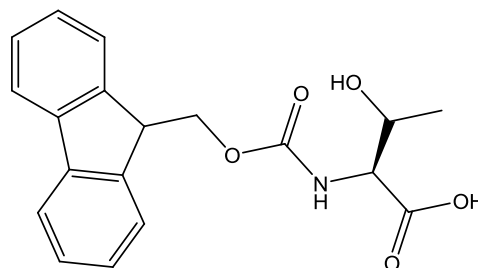
$C_{12}H_{16}N_3O_7Br$  ( $M = 394.18$  g mol<sup>-1</sup>) [ $393.04$  g mol<sup>-1</sup>].

ESI (positiv),  $m/z$ : 314.0 ( $[M-Br-H]^+$ , ber.: 314.1), 415.9 ( $[M+Na]^+$ , ber.: 416.0).

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 6.44 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 3.7$  Hz, H1), 5.65 (s<sub>b</sub>, 1H, H5), 5.30 (dd, 1H,  $J_{H3,H2} = 10.7$  Hz,  $J_{H3,H4} = 2.9$  Hz, H3), 4.46 (t, 1H,  $J_{H4,H5} = 6.2$  Hz, H4), 4.24-4.08 (m, 2H, H6 $_{a,b}$ ), 4.00 (dd, 1H,  $J_{H2,H3} = 10.7$  Hz,  $J_{H2,H1} = 3.7$  Hz, H2), 2.17, 2.04, 2.03 (3s, 9H, 3x  $CH_3CO$ ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-threonin<sup>[70]</sup>****(10)**

(Fmoc-Thr-OH)

Eine Lösung von 17.70 g (148.59 mmol) L-Threonin **(9)**

und 12.50 g (148.59 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 800 mL Aceton/Wasser (1:1) wird unter Rühren portionsweise mit 50.0 g (148.2 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)methoxycarbonylsuccinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit konz. Salzsäure bis pH = 2 angesäuert und das Aceton i. Vak. abdestilliert. Das Produkt wird dreimal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert und die organische Phase wird zweimal mit jeweils 200 mL verd. Salzsäure (1 N) und 200 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit 40 mL Toluol und anschließend zweimal mit Dichlormethan kodestilliert, um Reste von Salzsäure zu entfernen.

Ausbeute: 47.9 g (140.4 mmol, quant.), farbloser, amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 2.33$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>), Lit.<sup>[184]</sup>:  $[\alpha]_D^{23} = 1.12$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>).

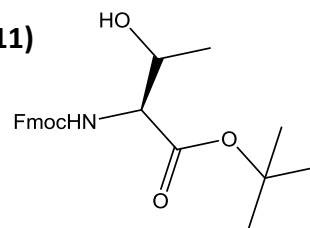
C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub> (M = 341.36 g mol<sup>-1</sup>) [341.13 g mol<sup>-1</sup>].

ESI (positiv), m/z: 364.3 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 364.1).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 7.69 (d, 2H, J<sub>H4,H3</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = 7.3 Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.54 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 7.4 Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.40-7.22 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 4.44-4.31 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>), 4.13 (t, 1H, J<sub>H9,CH2</sub> = 6.8 Hz, H9-Fmoc), 1.31 (d, 3H, J<sub>Tγ,Tβ</sub> = 6.3 Hz, T<sup>γ</sup>).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester<sup>[185]</sup> (11)**

(Fmoc-Thr-OtBu)



Eine Mischung aus 120.0 g (581.6 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid, 24.50 g (757.0 mmol) *tert*-Butanol und 1.30 g (13.13 mmol) wasserfreiem Kupfer(I)chlorid wird unter Argon-Atmosphäre und Lichtausschluss vier Tage gerührt. Anschließend wird die dunkelgrüne Reaktionsmischung mit 40 mL absol. Dichlormethan verdünnt. Es wird eine Lösung von 59.6 g (174.60 mmol) Fmoc-Thr-OH (10) in 110 mL absol. Dichlormethan innerhalb einer Stunde zugetropft und die Reaktionsmischung wird eine weitere Stunde gerührt. Während der Reaktion ausgefallener Harnstoff wird über einen Büchner-Trichter abfiltriert und der Rückstand mehrmals mit eiskaltem Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt, wobei weiterer Harnstoff auskristallisiert und abgetrennt werden kann. Danach wird die Lösung dreimal mit jeweils 100 mL einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in wenig Essigsäureethylester aufgenommen und über Nacht bei  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, wobei weiterer Harnstoff auskristallisiert. Nach erneuter Filtration wird das Rohprodukt durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 4:1) gereinigt und schließlich aus Diethylether/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 25.0 g (62.9 mmol, 36 %), blass gelber Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = -11.2$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),

Lit.<sup>[184]</sup>:  $[\alpha]_D^{23} = -11.4$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f = 0.32$  (<sup>c</sup>Hex/EE, 2:1).

$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_5$  (M = 397.46 g mol<sup>-1</sup>) [397.19 g mol<sup>-1</sup>].

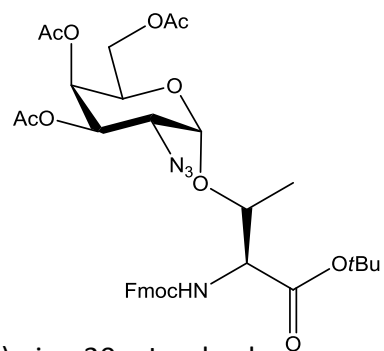
ESI-MS (positiv), m/z: 420.5 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 420.2), 364.3 ( $[\text{M}-t\text{Bu}+\text{Na}+\text{H}]^+$ , ber.: 364.2).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 7.75 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.7$  Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.4$  Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.41-7.24 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.56 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 8.5$  Hz, NH-Urethan), 4.39 (d, 2H,  $J_{\text{H}_9,\text{CH}_2} = 7.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 4.28-4.19 (m, 3H, H9-Fmoc, T <sup>$\alpha$</sup> , T <sup>$\beta$</sup> ), 2.05 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1,\text{OH}} = 5.1$  Hz, OH), 1.47 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.23 (d, 3H,  $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.3$  Hz, T <sup>$\gamma$</sup> ).



***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester<sup>[95, 186]</sup> (**13**)**

(Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>)-OtBu)



Eine Lösung von 3.80 g (9.56 mmol) Fmoc-Thr-OtBu (**11**) in 30 mL absol.

Dichlormethan und 25 mL absol. Toluol wird zusammen mit 8.5 g gepulvertem Molsieb (4Å) eine Stunde unter Argon-Atmosphäre gerührt. Die Suspension wird auf 0 °C abgekühlt, bevor unter Lichtausschluss 3.10 g (11.24 mmol) trockenes Silbercarbonat zugegeben werden. Zur Reaktionsmischung wird eine Lösung von 0.40 g (1.93 mmol) Silberperchlorat in 12 mL absol. Toluol hinzugefügt und eine Stunde bei 0 °C gerührt. Dann wird innerhalb von 30 min eine Lösung von 3.98 g (10.1 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -*D*-galactopyranosylbromid (**8**) in 60 mL absol. Dichlormethan und absol. Toluol (1:1) zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wird weitere 16 h unter Lichtausschluss gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgt dünnschichtchromatographisch. Bei unvollständigem Reaktionsumsatz erfolgt Zugabe von 2.0 g (7.25 mmol) trockenem Silbercarbonat und 0.25 g (1.21 mmol) Silberperchlorat im Argon-Gegenstrom unter Lichtausschluss, bis schließlich  $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>Br vollständig umgesetzt ist (zwei Tage). Anschließend wird die gelbe Reaktionsmischung mit 70 mL Dichlormethan verdünnt und über Hyflo® filtriert. Das Filtrat wird zweimal mit jeweils 75 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit jeweils 75 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das resultierende Rohprodukt wird durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 5:3) gereinigt.

Ausbeute: 5.4 g (7.6 mmol, 75 %), farbloser amorpher Feststoff;  $[\alpha]_D^{22} = 68.0$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>),

Lit.<sup>[186]</sup>:  $[\alpha]_D^{22} = 79.8$  ( $c = 0.99$ , CHCl<sub>3</sub>),  $R_f = 0.23$  (PE/EE, 3:1).

C<sub>35</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub> (M = 710.73 g mol<sup>-1</sup>) [710.28 g mol<sup>-1</sup>].

ESI (positiv), m/z: 733.0 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 733.3), 677.3 ([M-tBu+H+Na]<sup>+</sup>, ber.: 677.2).

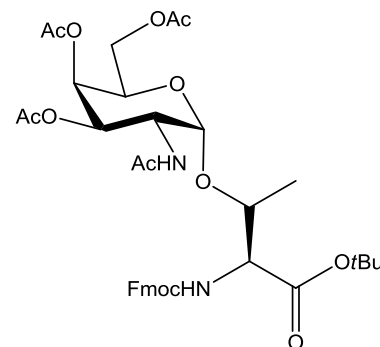
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 7.75 (d, 2H,  $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.3$  Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.61 (d, 2H,  $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$  Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.40-7.24 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.63

(d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.5$  Hz, NH-Urethan), 5.45 (m, 1H, H4), 5.33 (dd, 1H,  $J_{\text{H}3,\text{H}4} = 3.3$  Hz,  $J_{\text{H}3,\text{H}2} = 11.4$  Hz, H3), 5.09 (d, 1H,  $J_{\text{H}1,\text{H}2} = 3.7$  Hz, H1), 4.48-4.20 (m, 6H, H5, H6<sub>a,b</sub>, H9-Fmoc, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>), 4.18-4.07 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 3.62 (dd, 1H,  $J_{\text{H}2,\text{H}1} = 3.7$  Hz,  $J_{\text{H}2,\text{H}1} = 11.4$  Hz, H2), 2.15, 2.09, 2.03 (3xs, 9H, 3xCH<sub>3</sub>CO), 1.48 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.34 (d, 3H,  $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.6$  Hz, T<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 170.3, 169.9, 169.8, 169.2 (4C, 4xC=O), 156.8 (1C, C=O (Urethan)), 143.8 (2C, C1a, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a, C5a-Fmoc), 127.7 (2C, C3-,C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.3 (2C, C1-, C8-Fmoc), 119.9 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.2 (1C, C1), 82.9 (1C, C<sub>q</sub> (tBu)), 77.6 (1C, T<sup>β</sup>), 68.0, 67.5, 67.0 (4C, C3, C4, C5, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 61.8 (1C, C6), 59.2 (1C, T<sup>α</sup>), 57.7 (1C, C2), 47.1 (1C, CH(Fmoc)), 27.9 (3C, CH<sub>3</sub>(tBu)), 20.6 (3C, 3xCH<sub>3</sub> (Ac)), 18.9 (1C, T<sup>γ</sup>).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester<sup>[184]</sup> (**14**)**

(Fmoc-Thr(αAc<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu)



In 300 mL einer Mischung aus THF, Acetanhydrid und Essigsäure (3:2:1) werden 5.40 g (7.60 mmol) Fmoc-Thr(αAc<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>)-OtBu (**13**) gelöst und dieses mit 3.2 g (48.94 mmol) Zink-Staub versetzt, der zuvor durch Aufschlämmen in 300 mL einer 2%-igen Kupfersulfat-Lösung aktiviert, mit Wasser gewaschen und mit Diethylether getrocknet wurde. Die Reaktionsmischung wird 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 450 mL THF verdünnt und über Hyflo® filtriert. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Reste von Essigsäure und Acetanhydrid werden i. Vak. fünfmal mit Toluol und zweimal mit Dichlormethan durch Kodestillation entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird in 150 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit jeweils 150 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie zweimal mit jeweils 100 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das resultierende Rohprodukt wird durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.1 g (7.2 mmol, 45 %), farbloser amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 63.8$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  
Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = 62.4$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f = 0.34$  (PE/EE, 1:3).

$\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{13}$  ( $M = 726.77 \text{ g mol}^{-1}$ ) [ $726.30 \text{ g mol}^{-1}$ ].

ESI (positiv),  $m/z$ : 749.5 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 749.3), 693.5 ( $[\text{M}-t\text{Bu}+\text{H}+\text{Na}]^+$ , ber.: 693.3), 364.3  
( $[\text{M}-\text{Ac}_3\text{GalNAc}-t\text{Bu}+\text{H}+\text{Na}]^+$ , ber.: 364.1), 352.3 ( $[\text{M}-\text{Fmoc}-\text{Thr}-\text{OtBu}+\text{H}+\text{Na}]^+$ , ber.: 352.1).

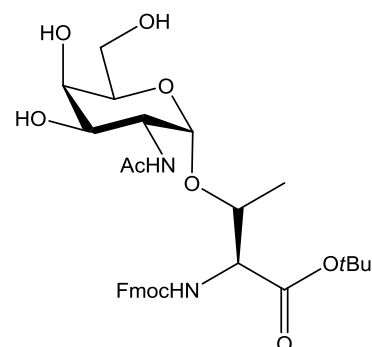
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 7.76 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.4$  Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.62  
(d, 2H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 6.0$  Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.42-7.29 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.90  
(d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.5$  Hz, NH-Fmoc), 5.43 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.2$  Hz, GalNAc), 5.37 (m, 1H, H4), 5.08  
(dd, 1H,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 2.9$  Hz,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 11.4$  Hz, H3), 4.88 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.3$  Hz, H1), 4.65-4.57 (m, 1H,  
H2), 4.45-4.41 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 4.26-4.06 (m, 6H, H5,  $\text{H}_{6\text{a,b}}$ , H9-Fmoc,  $\text{T}^\alpha$ ,  $\text{T}^\beta$ ), 2.15 (s, 3H,  
 $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -AcNH), 1.98 ((s, 6H, 2x  $\text{CH}_3\text{OAc}$ ), 1.44 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.30 (d, 3H,  
 $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.2$  Hz,  $\text{T}^\gamma$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 171.0, 170.4, 170.3, 170.0 (5C, 4x C=O (Ac), C=O  
(Ester)), 156.8 (1C, C=O (Urethan)), 143.7 (2C, C1a, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a, C5a-Fmoc),  
127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.0 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0, 119.9  
(2C, C4-, C5-Fmoc), 99.9 (1C, C1), 83.2 (1C,  $\text{C}_q$  (tBu)), 77.6 (1C,  $\text{T}^\beta$ ), 68.7, 67.3 (4C, C3, C4, C5,  
 $\text{CH}_2$ -Fmoc), 62.1 (1C, C6), 58.9 (1C,  $\text{T}^\alpha$ ), 47.3, 47.2 (2C, C2, CH(Fmoc)), 28.1 (3C,  $\text{CH}_3$ (tBu)),  
23.2, 22.9, 20.7 (3C, 3x $\text{CH}_3$  (OAc)), 18.5 (1C,  $\text{T}^\gamma$ ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester<sup>[186]</sup> (**15**)**

(Fmoc-Thr( $\alpha$ GalNAc)-OtBu)

Eine Lösung von 1.0 g (1.4 mmol) Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu (**13**) in 15 mL absol. Methanol wird tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%-igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht ist. Der pH-Wert wird alle 30 min kontrolliert. Die Reaktionskontrolle erfolgt



dünnschichtchromatographisch, wobei die Zugabe der 1%-igen Natriummethanolat-Lösung so oft wiederholt wird, bis sich das Edukt vollständig umgesetzt hat.

Nach vollständiger Deacetylierung wird mit saurem Ionenaustauscher *Amberlyst IR 120* neutralisiert. Man filtriert und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Rohprodukt wird durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE/Methanol, 25:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.64 g (1.1 mmol, 77.5 %), farbloser amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 32.4$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), Lit.<sup>[186]</sup>:  $[\alpha]_D^{23} = 40.2$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f = 0.21$  (EE/Methanol, 20:1).

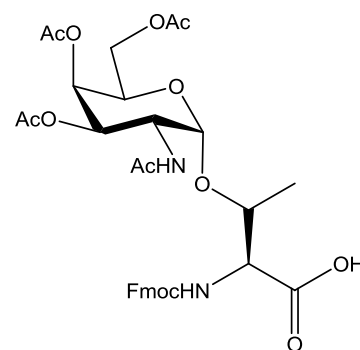
$\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{10}$  ( $M = 600.66 \text{ g mol}^{-1}$ ) [ $600.27 \text{ g mol}^{-1}$ ].

ESI (positiv),  $m/z$ : 623.4 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 623.3), 567.5 ( $[\text{M}-t\text{Bu}+\text{H}+\text{Na}]^+$ , ber.: 567.2), 364.3 ( $[\text{M}-\text{Ac}_3\text{GalNAc}-t\text{Bu}+\text{H}+\text{Na}]^+$ , ber.: 364.1).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 7.74 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.4 \text{ Hz}$ , H4-, H5-Fmoc), 7.58 (d, 2H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.4 \text{ Hz}$ , H1-, H8-Fmoc), 7.40-7.29 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.86 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{CH}} = 7.7 \text{ Hz}$ , NH(GalNAc)), 5.70 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{CH}} = 9.5 \text{ Hz}$ , NH-Fmoc), 4.85 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.3 \text{ Hz}$ , H1), 4.42-4.39 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 4.25-4.02 (m, 4H, H2, H3, H4, OH), 3.87-3.80 (m, 6H, H5, H6<sub>a,b</sub>, H9-Fmoc,  $\text{T}^\alpha$ ,  $\text{T}^\beta$ ), 2.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -AcNH), 1.43 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.26 (d, 3H,  $J_{\text{T}^\gamma,\text{T}^\beta} = 7.2 \text{ Hz}$ ,  $\text{T}^\gamma$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 172.0, 170.8 (5C, 4x C=O (Ac)), 156.6 (1C, C=O (Urethan)), 143.5 (2C, C1a, C8a-Fmoc), 141.2 (2C, C4a, C5a-Fmoc), 127.6 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.2 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.1 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0, 119.9 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.7 (1C, C1), 83.3 (1C, C<sub>q</sub> (tBu)), 77.6 (1C,  $\text{T}^\beta$ ), 68.4, 67.3 (4C, C3, C4, C5,  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 62.2 (1C, C6), 59.0 (1C,  $\text{T}^\alpha$ ), 47.4, 47.3 (2C, C2, CH(Fmoc)), 28.0 (3C,  $\text{CH}_3$ (tBu)), 23.0, 22.9, 20.7 (3C, 3x  $\text{CH}_3$  (OAc)), 18.5 (1C,  $\text{T}^\gamma$ ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin<sup>[95]</sup> (**22**)**



Es werden 1.5 g (2.07 mmol) Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu (**14**) in 20 mL Dichlormethan gelöst. Anschließend erfolgt die Zugabe von 45 mL TFA und 4.5 mL Anisol und es wird 3 h bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels

Dünnschichtchromatographie (Dichlormethan/MeOH/AcOH, 10:1:0.1). Nach beendeter Reaktion wird die Lösung mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit Toluol kodestilliert, um Säurereste zu entfernen. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE/MeOH, 15:1).

Ausbeute: 1.10 g (1.6 mmol, 79 %), farbloser amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 70.4$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>), Lit.<sup>[95]</sup>:  $[\alpha]_D^{23} = 67.1$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>),  $R_f = 0.21$  (EE/Methanol, 20:1).

C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> (M = 670.66 g mol<sup>-1</sup>) [670.24 g mol<sup>-1</sup>].

ESI (positiv), m/z: 693.4 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 693.3).

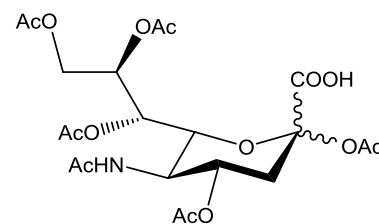
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 7.75 (d, 2H,  $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$  Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2H,  $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$  Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.40-7.29 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.60 (d, 1H,  $J_{NH,CH} = 7.6$  Hz, NH(GalNAc)), 5.70 (d, 1H,  $J_{NH,CH} = 9.5$  Hz, NH-Fmoc), 5.40 (d, 1H, H4), 5.18-5.14 (m, 1H, H1), 4.79-4.73 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, H2), 4.40-4.05 (m, 6H, H5, H6<sub>a,b</sub>, H9-Fmoc, T <sup>$\alpha$</sup> , T <sup>$\beta$</sup> ), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-AcNH), 1.26 (d, 3H,  $J_{T^\gamma,T^\beta} = 7.2$  Hz, T <sup>$\gamma$</sup> ).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 172.0, 171.8 (5C, 4x C=O (Ac)), 156.6 (1C, C=O (Urethan)), 143.5 (2C, C1a, C8a-Fmoc), 141.2 (2C, C4a, C5a-Fmoc), 127.6 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.2 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.1 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0, 119.9 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.7 (1C, C1), 83.3 (1C, C<sub>q</sub> (tBu)), 77.6 (1C, T <sup>$\beta$</sup> ), 68.4, 67.3 (4C, C3, C4, C5, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 62.2 (1C, C6), 59.0 (1C, T <sup>$\alpha$</sup> ), 47.4, 47.3 (2C, C2, CH(Fmoc)), 23.0, 22.9, 20.7 (3C, 3x CH<sub>3</sub> (OAc)), 18.5 (1C, T <sup>$\gamma$</sup> ).

### 6.3 Synthese des Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigens

#### 5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid<sup>[187]</sup> (**25**)

( $\alpha,\beta$ Ac<sub>5</sub>NeuNAcCOOH)



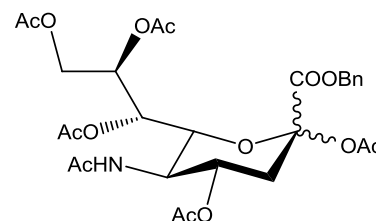
Es werden 8.1 g (26.2 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure (**24**) in 120 mL Pyridin gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend werden langsam 60 mL Acetanhydrid zugetropft. Es wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird fünfmal mit Toluol kodestilliert und anschließend dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das so erhaltene Rohprodukt kann ohne weitere Reinigung in die nächste Synthese eingesetzt werden.

Ausbeute: 13.6 g (26.2 mmol, quant.), brauner Feststoff,  $R_f = 0.29$  (CHCl<sub>3</sub>/EtOH, 1:3).

C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>14</sub> (M = 519.45 g mol<sup>-1</sup>) [519.16 g mol<sup>-1</sup>].

#### Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid<sup>[187]</sup> (**26**)

( $\alpha,\beta$ Ac<sub>5</sub>NeuNAcCOOBn)



Zu einer Lösung von 13.6 g (26.2 mmol)  $\alpha,\beta$ Ac<sub>5</sub>NeuNAcCOOH (**25**) in 40 mL Ethanol wird eine Lösung von 4.37 g (13.1 mmol) Cäsiumcarbonat in 8 mL Ethanol zugetropft, so dass eine Gasentwicklung entsteht. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird die Reaktionslösung 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Ethanol i. Vak. abgezogen. Das Wasser wird azeotrop mit Toluol und anschließend mit Dichlormethan entfernt. Der Rückstand wird in 75 mL DMF aufgenommen, anschließend werden langsam 28 mL (235.7 mmol) Benzylbromid zugetropft, und es wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Hochvak. entfernt und der Rückstand in 50 mL Ethylacetat aufgenommen. Das ausgefallene Cäsiumbromid wird abfiltriert und der Filtrerrückstand mehrmals mit Ethylacetat gewaschen. Das Filtrat wird

i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und das so erhaltene Rohprodukt wird durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 1:10).

Ausbeute: 11.65 g (19.11 mmol), gelber amorpher Feststoff,  $R_f = 0.49$  (EE).

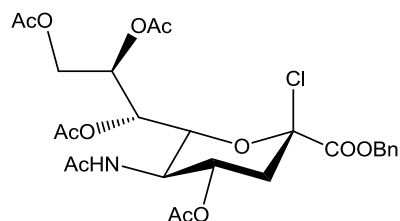
$C_{28}H_{35}NO_{14}$  ( $M = 609.58 \text{ g mol}^{-1}$ ) [ $609.21 \text{ g mol}^{-1}$ ].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 7.93-7.50 (m, 5H, H<sub>Ar</sub>-Bn), 5.42-5.00 (m, 6H, H4'', H6'', H7'', H8'', OCH<sub>2</sub>-Bn), 4.42 (dd, 1H,  $J_{H9a'',H8''} = 2.9 \text{ Hz}$ ,  $J_{H9a'',H9b''} = 12.5 \text{ Hz}$ , H9<sub>a</sub>''), 4.19-4.03 (m, 2H, H5'', H9<sub>b</sub>''), 2.52 (dd, 1H,  $J_{H3eq'',H3ax''} = 13.4 \text{ Hz}$ ,  $J_{H3eq'',H4''} = 5.1 \text{ Hz}$ ), 2.10, 2.08, 1.99, 1.86 (s, 19H, 6x CH<sub>3</sub>-Ac, H3<sub>ax</sub>'').

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 170.9, 170.8, 170.6, 170.2 (C=O), 168.3 (C1''), 165.5, 165.3 (C=O), 134.8 (C<sub>quart</sub>-Bn), 128.7, 128.6, 128.5, 127.9 (C-Bn), 96.1 (C2'' $\beta$ ), 72.2, 71.7, 70.7, 70.6, 70.5, 69.2 (C4'', C6'', C7'', C8'', OCH<sub>2</sub>-Bn, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 61.9 (C9''), 49.3 (C5''), 36.1 (C3''), 23.1 (NHAc), 20.8, 20.7 (Ac).

**Benzyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2-chlor-3,5-dideoxy- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid<sup>[187]</sup> (27)**

( $\beta$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBnCl)

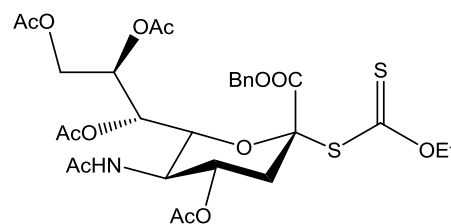


Es wird zu 11.7 g (19.1 mmol)  $\alpha,\beta$ Ac<sub>5</sub>NeuNAcCOOBn (**25**) langsam eine auf 0 °C abgekühlte Lösung aus 30.3 mL (33.3 g, 42.4 mmol) Acetylchlorid, welches mit 0.3 mL Wasser versetzt worden war, zugetropft. Die Reaktionslösung wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel Acetylchlorid wird anschließend i. Vak. entfernt und der Rückstand wird mehrmals mit Toluol und abschließend mit Dichlormethan kodestilliert, um Säurereste zu entfernen. Das so erhaltene Rohprodukt kann ohne weiteren Reinigungsschritt in die nächste Reaktion eingesetzt werden.

Ausbeute: 12.75 g (21 mmol, quant.), rötlich amorpher Feststoff,  $R_f = 0.45$  (EE)

$C_{26}H_{32}ClNO_{12}$  ( $M = 519.45 \text{ g mol}^{-1}$ ) [ $519.16 \text{ g mol}^{-1}$ ].

**O-Ethyl-S-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)]-onatdithiocarbonat<sup>[187]</sup> (28)**



( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBnXan)

Es werden 11.2 g (19.1 mmol)  $\beta$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBnCl (**27**) in 180 mL absol. Ethanol gelöst und mit 5.22 g (32.6 mmol) Kaliummethylxanthogenat versetzt. Die Lösung wird unter Lichtausschluss und unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach 12 h wird die Reaktionslösung durch Zugabe von Dichlormethan verdünnt und dreimal mit 100 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 7:1).

Ausbeute: 7.96 g (11.85 mmol, 54.5 %), leicht gelblicher amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 40.9$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.<sup>[184]</sup>:  $[\alpha]_D^{23} = 41.9$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), R<sub>f</sub> = 0.34 (EE).

C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>13</sub>S (M = 671.74 g mol<sup>-1</sup>), [671.17 g mol<sup>-1</sup>].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 7.33 (s, 5H, H<sub>ar</sub>-Bn), 5.48-5.23 (m, 3H, H7'', H8'', NH), 5.19 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>-Bn), 4.82 (td, 1H, J<sub>H4'',H5''</sub> = 4.4 Hz, J<sub>H4'',H3''</sub> = 11.0 Hz, H4''), 4.53 (m, 1H, H6''), 4.43-3.96 (m, 4H, H9'', OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H5''), 2.63 (dd, 1H, J<sub>H3eq'',H4ax</sub> = 13.2 Hz, J<sub>H3eq'',H4''</sub> = 4.8 Hz, H<sub>3eq''</sub>), 2.09-1.85 (s, 19H, 6x CH<sub>3</sub>-Ac, H<sub>3ax''</sub>), 1.28-1.20 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 207.1 (C=S), 170.7, 170.6, 170.5, 170.4, 170.2, 170.2 (C=O), 167.9 (C1''), 134.8 (C<sub>quart</sub>-Bn), 128.7, 128.6, 128.5, 127.9 (C-Bn), 86.5 (C2''), 75.3, 70.8, 70.7, 70.6, 70.3, 69.1 (C4'', C6'', C7'', C8'', OCH<sub>2</sub>-Bn, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 61.9 (C9''), 49.3 (C5''), 37.1 (C3''), 23.08 (NHAc), 21.0, 20.8, 20.7 (CO-Ac), 14.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).



***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -glycero-*D*-galacto-2-nonulo-pyranosyl)-onat]- $\alpha$ -*D*-galactopyranosyl}-*L*-threonin-*tert*-butylester<sup>[186-187]</sup> (**38**)**

Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ GalNAc)-OtBu

Herstellung einer 1.6 M Lösung von Methylsulfenylbromid in 1,2-Dichlorethan (**31**)<sup>[165]</sup>:

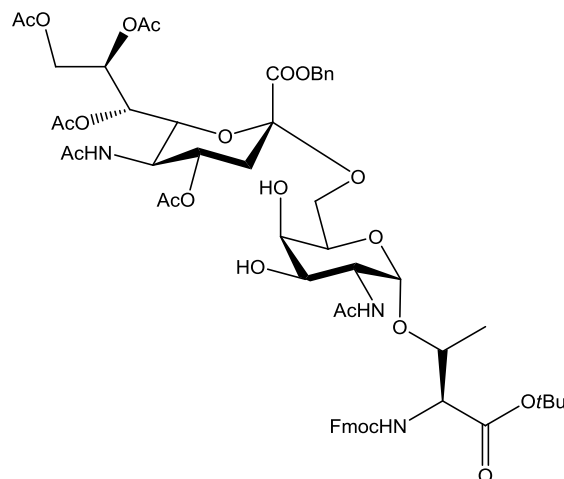
Es werden unter Lichtausschluss 410  $\mu$ L (7.99 mmol) Brom (**30**) in eine Lösung von 709  $\mu$ L (7.99 mmol) Dimethyldisulfid (**31**) in 10 mL absol. Dichlorethan getropft. Anschließend wird 14 h unter Argonatmosphäre gerührt.

Glycosylierungsreaktion: Es werden 1.24 g (2.06 mmol) Fmoc-Thr( $\alpha$ GalNAc)-OtBu (**15**) und 3.47 g (5.16 mmol)  $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBnXan (**28**) in 40 mL absol. Acetonitril und 23 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 5 g ausgeheiztem pulverisiertem Molsieb (3Å) versetzt. Die Reaktionsmischung wird eine Stunde unter Argonatmosphäre gerührt, bevor die Zugabe von 1.33 g (5.16 mmol, 2.5 eq.) trockenem Silbertriflat erfolgt. Die Reaktionsmischung wird auf -65 °C abgekühlt und es werden in einem Zeitraum von 45 min 3.22 mL (5.16 mmol) einer auf 0 °C abgekühlten 1.6 M Lösung von Methylsulfenylbromid (**31**) in absol. 1,2-Dichlorethan zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 4 h bei -65 °C gerührt und anschließend mit 730  $\mu$ L (526 mg, 5.16 mmol) Diisopropylethylamin neutralisiert. Es wird weitere 15 min bei einer Reaktionstemperatur von -65 °C gerührt und langsam auf 10 °C erwärmt. Die Reaktionsmischung wird mit 180 mL Dichlormethan verdünnt und über Hyflo® filtriert. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE $\rightarrow$ EE/EtOH, 60:1).

Ausbeute: 1.18 g (1.02 mmol, 50 %), farbloser amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 12.0$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>),  $R_f = 0.26$  (EE/EtOH, 10:1).

C<sub>57</sub>H<sub>71</sub>N<sub>3</sub>O<sub>22</sub> (M = 1150.18 g mol<sup>-1</sup>), [1149.45 g mol<sup>-1</sup>].

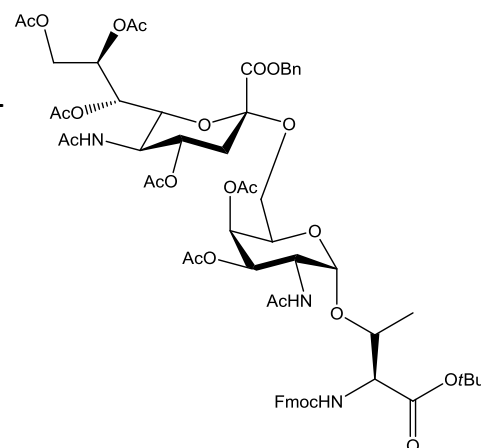
ESI-MS (positiv), m/z: 1172.5 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1172.5), 1116.5 ([M-tBu+H+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1116.4), 490.2 ([Neu2en5enAc<sub>4</sub>COOBn+H]<sup>+</sup>, ber.: 490.1).



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY, HSQC, HMBC),  $\delta$  (ppm): 7.77 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.3$  Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.75 (d, 2H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.3$  Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.43-7.29 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x H<sub>Ar</sub>-Bn), 6.71 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 7.8$  Hz, NH-GalNAc), 5.49 (d, 1H,  $J_{\text{NH-Fmoc},\text{T}\alpha} = 9.4$  Hz, NH-Fmoc), 5.37 (d, 1H,  $J_{\text{H}7'',\text{H}8''} = 2.5$ , H7''), 5.32 (d, 1H,  $J_{\text{H}8'',\text{H}7''} = 1.5$ , H8''), 5.25 (d, 1H,  $J_{\text{H}_a,\text{H}_b} = 12.1$  Hz, CH<sub>2</sub>-Bn<sub>a</sub>), 5.18 (d, 1H,  $J_{\text{H}_b,\text{H}_a} = 12.1$  Hz, CH<sub>2</sub>-Bn<sub>b</sub>), 4.89-4.82 (m, 1H, H4''), 4.80 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.7$ , H1), 4.38 (d, 2H,  $J_{\text{CH}_2,\text{H}_9} = 6.7$  Hz, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.35 (dd, 1H,  $J_{\text{H}9a'',\text{H}8''} = 2.6$  Hz,  $J_{\text{H}9a'',\text{H}9b''} = 11.9$  Hz, H9<sub>a</sub>''), 4.27-4.03 (m, 7H, H2, T<sup>α</sup>, H6'', H9-Fmoc, H9<sub>b</sub>'', T<sup>β</sup>, H5'') 3.95-3.90 (m, 1H, H6<sub>a</sub>), 3.76-3.72 (m, 3H, H3, H4, H5), 3.51 (dd, 1H,  $J_{\text{H}6b,\text{H}6a} = 10.4$  Hz,  $J_{\text{H}6b,\text{H}5} = 4.4$  Hz, H6<sub>b</sub>), 2.60 (dd, 1H,  $J_{\text{H}3\text{eq}'',\text{H}3\text{ax}''} = 12.8$  Hz,  $J_{\text{H}3\text{eq}'',\text{H}4''} = 4.6$  Hz, H3<sub>eq</sub>''), 2.12, 2.11, 2.09, 2.02 (s, 18H, NHAc, OAc), 1.46 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.22 (d, 3H,  $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.4$  Hz, T<sup>γ</sup>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , HSQC, HMBC),  $\delta$  (ppm): 173.8, 171.5, 171.1, 171.0, 170.5, 170.4 (C=O-Acetat), 167.6 (C1''), 156.6 (C=O-Urethan), 143.9, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.5 (C4a-, C5a-Fmoc), 134.9 (C<sub>quart.</sub>-Bn), 129.0, 128.9, 128.8 (C<sub>Ar</sub>-Bn), 127.9 (C3-, C6-Fmoc), 127.2 (C2-, C7-Fmoc), 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 99.8 (C1), 98.9 (C2''), 83.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 77.5 (T<sup>β</sup>), 69.4, 69.1 (C5, C7''), 68.6 (C4), 68.0 (C4), 67.7 (CH<sub>2</sub>-Bn), 67.3 (C8''), 64.7 (C6), 62.7 (C9''), 59.2 (T<sup>α</sup>), 51.1 (C2), 49.7 (C5''), 47.4 (C9-Fmoc), 37.6 (C3''), 29.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.3, 23.0, 21.2, 21.0, 20.9 (CH<sub>3</sub>-Ac), 18.9 (T<sup>γ</sup>).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*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- $\alpha$ -glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)-onat]- $\alpha$ -*D*-galactopyranosyl]-*L*-threonin-*tert*-butyl-ester** <sup>[187]</sup>(39)



Fmoc-Thr( $\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn-2}\rightarrow\text{6}$ )- $\alpha\text{Ac}_2\text{GalNAc}$ -OtBu

Es werden 586.1 mg (0.51 mmol) Fmoc-Thr( $\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn-2}\rightarrow\text{6}$ )- $\alpha\text{GalNAc}$ -OtBu (**38**) in 9 mL Pyridin gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 4.5 mL Acetanhydrid zugetropft und 30 min unter Eiskühlung und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird 30 mL Dichlormethan verdünnt und überschüssiges Acetanhydrid wird durch Zugabe von Eiswasser hydrolysiert. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird dreimal mit jeweils 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen

Phasen werden zweimal mit jeweils 30 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit jeweils 20 mL Toluol und Dichlormethan kodestilliert, um Säurereste zu entfernen. Die Reinigung erfolgt über Flash-Chromatographie (Laufmittel: EE).

Ausbeute: 0.502 g (0.407 mmol, 80 %), farbloser amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 25.2$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f = 0.36$  (EE).

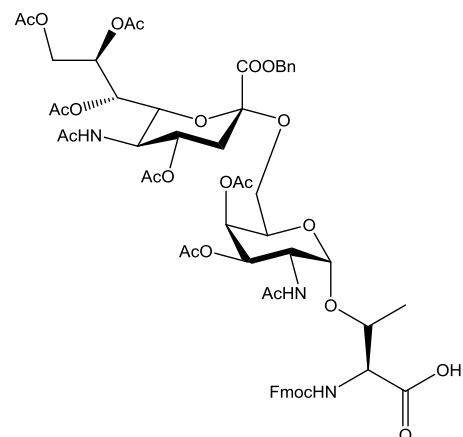
$\text{C}_{61}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_{24}$  ( $M = 1234.25 \text{ g mol}^{-1}$ ),  $[1233.47 \text{ g mol}^{-1}]$ .

ESI-MS (positiv),  $m/z$ : 1256.5 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 1256.5), 1200.4 ( $[\text{M}-t\text{Bu}+\text{H}+\text{Na}]^+$ , ber.: 1200.4), 512.2 ( $[\text{Neu}2\text{en}5\text{enAc}_4\text{COOBn}+\text{Na}]^+$ , ber.: 512.2), 490.2 ( $[\text{Neu}2\text{en}5\text{enAc}_4\text{COOBn}+\text{H}]^+$ , ber.: 490.2).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY),  $\delta$  (ppm): 7.75 (d, 2H,  $J_{\text{H}4,\text{H}3} = J_{\text{H}5,\text{H}6} = 7.4 \text{ Hz}$ , H4-, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2H,  $J_{\text{H}1,\text{H}2} = J_{\text{H}8,\text{H}7} = 6.9 \text{ Hz}$ , H1-, H8-Fmoc), 7.42-7.25 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x  $\text{H}_{\text{Ar-Bn}}$ ), 5.97 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{H}2} = 9.8 \text{ Hz}$ , NH-GalNAc), 5.65 (d, 1H,  $J_{\text{NH-Fmoc},\text{T}\alpha} = 9.4 \text{ Hz}$ , NH-Fmoc), 5.37 (d, 1H,  $J_{\text{H}7'',\text{H}8''} = 2.5$ , H7''), 5.34-5.19 (m, 3H, H7'', H8'',  $\text{CH}_2\text{-Bn}_a$ ), 5.17-5.06 (m, 2H, H4,  $\text{CH}_2\text{-Bn}_b$ ), 4.95 (d, 1H,  $J_{\text{H}1,\text{H}2} = 3.1 \text{ Hz}$ , H1), 4.83-4.71 (m, 2H, H4'', H3), 4.57-4.41 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ , H2,  $\text{T}^\beta$ ), 4.28-4.10 (m, 4H, H6'', H9a'', H9-Fmoc,  $\text{T}^\alpha$ ), 4.08-3.96 (m, 3H, H5, H5'', H9b''), 3.83-3.69 (m, 1H, H6a), 3.10 (dd, 1H,  $J_{\text{H}5,\text{H}6b} = 4.1 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{H}6b,\text{H}6a} = 10.4 \text{ Hz}$ , H6b), 2.53 (dd, 1H,  $J_{\text{H}3\text{eq}'',\text{H}3\text{ax}''} = 12.9 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{H}3\text{eq}'',\text{H}4''} = 4.6 \text{ Hz}$ , H3eq''), 2.14, 2.10, 2.07, 2.05, 2.03, 1.99, 1.97, 1.93, 1.89, 1.84 (s, 25H, NHAc, OAc, H3ax''), 1.42 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.27 (d, 3H,  $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.2 \text{ Hz}$ ,  $\text{T}^\gamma$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , HSQC, HMBC),  $\delta$  (ppm): 170.8, 170.6, 170.4, 170.2, 169.8 (C=O-Acetat), 167.3 (C1''), 156.5 (C=O-Urethan), 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 134.7 ( $\text{C}_{\text{quart.}}\text{-Bn}$ ), 129.0, 128.8, 127.8 ( $\text{C}_{\text{Ar-Bn}}$ ), 127.8 (C3-, C6-Fmoc), 127.2 (C2-, C7-Fmoc), 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 100.1 (C1), 98.6 (C2''), 83.0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 77.4 ( $\text{T}^\beta$ ), 72.6, 68.9, 68.5, 68.1, 67.9, 67.6, 67.2, 67.1 (C3, C4, C5, C4'', C6'', C8'',  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 64.4, 62.4 (C6, C9''), 59.2 ( $\text{T}^\alpha$ ), 49.1 (C5''), 47.2 (C9-Fmoc), 37.6 (C3''), 28.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 23.3, 23.2, 21.0, 20.8, 20.7, 20.6 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 18.6 ( $\text{T}^\gamma$ ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*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- $\alpha$ -glycero-*D*-galacto-2-nonulo-pyranosyl)-onat]- $\alpha$ -*D*-galactopyranosyl]-*L*-threonin<sup>[187]</sup> (**40**)**



Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH

Zu einer Lösung von 482.8 mg (0.410 mmol) Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OtBu (**39**) in 7 mL Dichlormethan werden langsam 732  $\mu$ L Anisol und 7.3 mL Trifluoressigsäure zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt und der Rückstand viermal mit jeweils 20 mL Toluol kodestilliert und anschließend zweimal mit jeweils 20 mL Dichlormethan. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE $\rightarrow$ EE/MeOH, 5:1).

Ausbeute: 0.379 g (0.322 mmol, 79 %), farbloser amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 29.7$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>),  $R_f = 0.27$  (EE/MeOH, 2:1).

C<sub>57</sub>H<sub>67</sub>N<sub>3</sub>O<sub>24</sub> (M = 1178.15 g mol<sup>-1</sup>), [1177.41 g mol<sup>-1</sup>].

ESI-MS (positiv),  $m/z$ : 1238.6 ([M-H+Na+K]<sup>+</sup>, ber.: 1238.5), 1222.6 ([M-H+2Na]<sup>+</sup>, ber.: 1222.4), 1216.5 ([M+K]<sup>+</sup>, ber.: 1216.5), 1200.6 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1200.4).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY),  $\delta$  (ppm): 7.70 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$  Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.62-7.50 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.41-7.26 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x H<sub>Ar</sub>-Bn), 5.42-5.24 (m, 3H, H7'', H8'', CH<sub>2</sub>-Bn<sub>a</sub>), 5.23-5.10 (m, 2H, H4, CH<sub>2</sub>-Bn<sub>b</sub>), 5.09-4.98 (m, 1H, H3), 4.85-4.73 (m, 1H, H4''), 4.55-4.15 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, T <sup>$\beta$</sup> , H2, H6'', H9<sub>a</sub>'', H9-Fmoc, T <sup>$\alpha$</sup> ), 4.14-3.93 (m, 3H, H5, H5'', H9<sub>b</sub>''), 3.82-3.60 (m, 1H, H6<sub>a</sub>), 3.23-3.15 (m, 1H, H6<sub>b</sub>), 2.53 (d, 1H,  $J_{H3eq,H3ax} = 11.9$  Hz, H3<sub>eq</sub>), 2.15, 2.07, 2.05, 2.02, 1.97, 1.94, 1.83 (7x s, 25H, NHAc, OAc), 1.23 (d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$  Hz, T <sup>$\gamma$</sup> ).

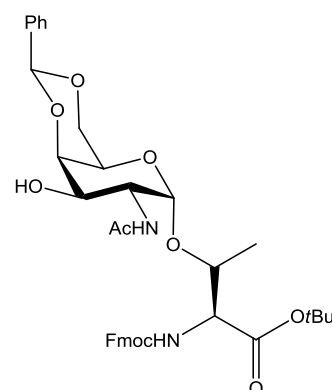
<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HSQC, HMBC),  $\delta$  (ppm): 173.6, 173.0, 172.9, 172.0, 171.8, 171.6, 171.4 (C=O-Ac), 169.1 (C1''), 159.9 (C=O-Urethan), 145.8, 145.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 142.9 (C4a-, C5a-Fmoc), 135.7 (C<sub>quart.</sub>-Bn), 130.0, 129.8, 129.5 (C<sub>Ar</sub>-Bn), 128.8 (C3-, C6-Fmoc), 128.3 (C2-, C7-Fmoc), 126.5, 126.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 100.1 (C1), 99.4 (C2''),

77.7 ( $T^{\beta}$ ), 73.5, 70.1, 69.7, 68.1, 67.9, 67.6, 67.2, 67.1 (C3, C4, C5, C4'', C6'', C8'', CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH<sub>2</sub>-Bn), 65.6, 64.4 (C6, C9''), 61.2 ( $T^{\alpha}$ ), 49.2 (C5''), 47.2 (C9-Fmoc), 38.2 (C3''), 23.3, 23.2, 21.0, 20.8, 20.7, 20.6 (CH<sub>3</sub>-Ac), 19.5 ( $T^{\gamma}$ ).

## 6.4 Synthese des T-Antigen-Konjugates

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester<sup>[188]</sup> (**41**)**

(Fmoc-Thr-( $\alpha$ -4,6-*O*-Bzl-GalNAc)-OtBu)



Eine Lösung von 1.91 g (3.18 mmol) Fmoc-Thr( $\alpha$ GalNAc)-OtBu (**15**) und 1.95 mL (12.94 mmol, 1.97 g) Benzaldehyddimethylacetal (**42**,  $\alpha,\alpha$ -Dimethoxytoluol) in 80 mL Acetonitril (HPLC grade) wird mit einer halben Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure\*Monohydrat versetzt, bis ein pH-Wert von 4.5 erreicht ist. Das Reaktionsgemisch wird bei 40 °C und 250 mbar gerührt, wobei der pH-Wert schließlich durch weitere Zugabe von *p*-Toluolsulfonsäure auf pH = 3 erniedrigt wird. Nach zwei Tagen ist die Reaktion abgeschlossen und es wird mit Triethylamin neutralisiert. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.36 g (1.98 mmol, 65 %), farbloser amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 58.3$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>), Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = 61.3$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>),  $R_f = 0.35$  (PE/EE, 3:1).

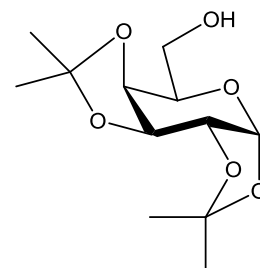
C<sub>38</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub> (M = 688.76 g mol<sup>-1</sup>) [688.30 g mol<sup>-1</sup>].

ESI (positiv), m/z: 689.9 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 689.3), 711.2 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 711.3), 727.2 ([M+K]<sup>+</sup>, ber.: 724.4), 633.2 ([M-*t*Bu+2H]<sup>+</sup>, ber.: 633.2).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 7.75 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.4$  Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.0$  Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.51-7.46 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.43-7.26 (m, 7H, H2-, H7-Fmoc,  $\text{H}_{\text{Ar-Bn}}$ ), 6.58 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 8.8$  Hz, NH(GalNAC)), 5.68 (m, 1H, Bn-H), 5.52 (s, 1H, NH-Fmoc), 4.92 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 2.9$  Hz, H1), 4.47-4.41 (m, 3H, H2,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 4.25-4.00 (m, 6H, H5, H6<sub>a,b</sub>, H9-Fmoc,  $\text{T}^\alpha$ ,  $\text{T}^\gamma$ ), 3.86-3.83 (d, 1H,  $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 10.3$  Hz, H3), 3.67 (s, 1H, H4), 2.08 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-AcNH}$ ), 1.43 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ), 1.26 (d, 3H,  $J_{\text{T}^\gamma,\text{T}^\beta} = 7.2$  Hz,  $\text{T}^\gamma$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 172.3, 169.9, 169.8, 169.2 (5C, 4x C=O (Ac), C=O (Ester)), 156.8 (1C, C=O (Urethan)), 143.8 (2C, C1a, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a, C5a-Fmoc), 127.7 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.3 (2C, C1-, C8-Fmoc), 119.9 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.2 (1C, C1), 82.9 (1C, C<sub>q</sub> (tBu)), 77.6 (1C,  $\text{T}^\beta$ ), 68.0, 67.5, 67.0 (4C, C3, C4, C5,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 61.8 (1C, C6), 59.2 (1C,  $\text{T}^\alpha$ ), 57.7 (1C, C2), 47.1 (2C, C2, CH(Fmoc)), 27.9 (3C,  $\text{CH}_3(\text{tBu})$ ), 20.6 (3C, 3x  $\text{CH}_3$  (OAc)), 18.9 (1C,  $\text{T}^\gamma$ ).

### 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranose<sup>[90]</sup> (43)

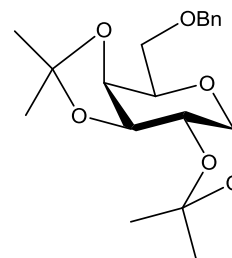


Es werden 30.0 g (0.17 mol) D-Galactose (**1**) und 67.0 g (0.42 mol) wasserfreies Kupfersulfat in 500 mL Aceton mit 4 mL konz. Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration des Kupfersulfats wird die Reaktionslösung mit Calciumhydroxid neutralisiert. Anschließend wird über Hyflo® filtriert und das Aceton i. Vak. entfernt. Das Produkt wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 44.5 g (0.17 mol, quant.), gelbes Öl,  $R_f = 0.33$  ( $^c\text{Hex/EA}$ , 2:1).

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$  (M = 260.28 g mol<sup>-1</sup>) [260.13 g mol<sup>-1</sup>].

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 5.57 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 4.8$  Hz, H1), 4.61 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 2.2$  Hz,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 7.7$  Hz, H3), 4.33 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 2.2$  Hz,  $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 5.2$  Hz, H2), 4.25 (m, 1H, H4), 3.89-3.70 (m, 3H, H5, H6<sub>a,b</sub>), 1.53, 1.45 (2x s, 6H, 2x  $\text{CH}_3$ ), 1.33 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ).

**6-O-Benzyl-1,2:3,4-di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranose**<sup>[90, 92, 189]</sup> **(44)**


Es werden 44.5 g (0.17 mol) 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranose (**43**) in 300 mL DMF gelöst und auf 0 °C abgekühlt.

Anschließend werden unter Argonatmosphäre 11.0 g (0.28 mol) einer 60%-igen Dispersion von Natriumhydrid in Mineralöl zugegeben. Die Reaktionslösung wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und eine Stunde gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung wieder auf 0 °C abgekühlt und es werden langsam 32.6 mL (47.0 g, 0.28 mol) Benzylbromid in 50 mL DMF zugetropft. Es wird 12 h gerührt und anschließend überschüssiges Natriumhydrid langsam mit 10 mL Methanol vernichtet. Das Lösungsmittel wird i. Hochvak. entfernt und der Rückstand in 300 mL Dichlormethan aufgenommen. Es wird dreimal mit jeweils 100 mL Wasser gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird viermal mit jeweils 20 mL Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt über Flash-Säulenchromatographie (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 10:1)

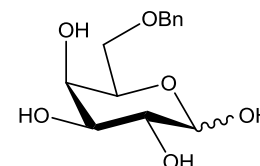
Ausbeute: 44.6 g (0.13 mol, quant.), gelbes Öl,  $R_f = 0.23$  (<sup>c</sup>Hex/EE, 5:1).

$C_{19}H_{26}O_6$  (M = 350.41 g mol<sup>-1</sup>) [350.17 g mol<sup>-1</sup>].

ESI-MS (positiv), m/z: 373.1 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 373.2).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 7.36-7.12 (m, 5H, H<sub>ar</sub>-Bn), 5.54 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 6.0$  Hz, H1), 4.64-4.52 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-Bn, H3), 4.32-4.25 (m, 2H, H2, H4), 3.99 (t, 1H,  $J_{H5,H6a} = J_{H5,H6b} = 6.3$  Hz, H5), 3.73-3.60 (m, 2H, H<sub>6a,b</sub>), 1.54, 1.45 (2s, 2x 3H, 2x CH<sub>3</sub>), 1.33 (m, 6H, 2x CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 138.33 (C-Ar<sub>ipso</sub>), 128.3-127.1 (CH-Bn), 109.2, 108.5 (C<sub>quart.</sub>-Isopropyliden), 96.4 (C1-Gal), 73.3 (CH<sub>2</sub>-Bn), 71.2 (C3), 70.7 (C2), 70.6 (C4), 68.9 (C6), 66.9 (C5), 26.1, 25.9, 24.9, 24.5 (4x CH<sub>3</sub>).

**6-O-Benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (45)** $(\alpha,\beta\text{-6-Bn-Gal})$ 

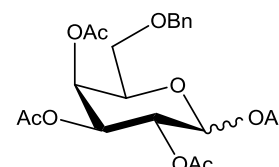
Es werden 44.6 g (128 mmol) 6-O-Benzyl-1,2:3,4-di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranose (**44**) in 800 mL 60%-iger Essigsäure gelöst und vier Stunden bei 85 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Hochvak. entfernt und der Rückstand viermal mit jeweils 25 mL Toluol kodestilliert. Das Anomerengemisch kann ohne weitere Reinigung in die nächste Reaktion eingesetzt werden.

Ausbeute: 32.6 g (quant.), braunes Öl.

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_6$  (M = 270.28 g mol<sup>-1</sup>) [270.11 g mol<sup>-1</sup>].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 7.31 (s, 5H, H<sub>Ar</sub>-Bn), 5.55 (d, 1H, H1, J<sub>H1,H2</sub> = 4.7 Hz), 4.65-4.53 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-Bn, H3), 4.33-4.30 (m, 2H, H2, H4), 4.10 (t, 1H, H5, J<sub>H5,H6a</sub> = J<sub>H5,H6b</sub> = 9.2 Hz), 4.00-3.61 (m, 2H, H6<sub>a,b</sub>), 1.54, 1.45 (2s, 2x 3H, 2x CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 138.3 (C-Ar<sub>ipso</sub>), 128.3-127.5 (CH-Bn), 109.2, 108.5 (C<sub>quart.</sub>-Isopropyliden), 96.4 (C1-Gal), 73.3 (CH<sub>2</sub>-Bn), 71.2 (C3), 70.7 (C2), 70.6 (C4), 68.9 (C6), 66.9 (C5), 26.01, 26.0, 24.9, 24.5 (4x CH<sub>3</sub>).

**1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (46)** $(\alpha,\beta\text{-Ac}_4\text{-6-Bn-Gal})$ 

Es werden 32.6 g (0.12 mol) 6-O-Benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (**45**) in 300 mL Pyridin gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Es wird eine katalytische Spatelspitze *N,N*-Dimethylaminopyridin hinzugegeben und langsam 150 mL Acetanhydrid zugetropft. Anschließend wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel Acetanhydrid und Pyridin werden i. Hochvak. entfernt und das Rohprodukt fünfmal mit jeweils 25 mL Toluol und abschließend zweimal mit jeweils 25 mL Dichlormethan kodestilliert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt über Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel. Das Anomerengemisch kann in die nächste Reaktion eingesetzt werden.

Ausbeute: 48.2 g (0.11 mol, quant.), gelbes Öl.

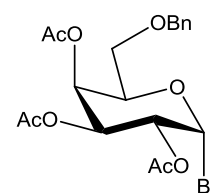


$C_{21}H_{26}O_{10}$  (M = 438.43 g mol<sup>-1</sup>) [438.15 g mol<sup>-1</sup>].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 7.33-7.25 (m, 10H, H<sub>Ar</sub>-Bn), 6.34 (d, 1H, J<sub>H1α,H2α</sub> = 2.6 Hz, H1α), 5.67 (d, 1H, J<sub>H1β,H2β</sub> = 8.5 Hz, H1β), 5.54 (m, 1H, H3α), 5.48 (d, 1H, J<sub>H1β,H2β</sub> = 2.6 Hz, H3β), 5.32-5.26 (m, 3H, H2α, H4α, H4β), 5.03 (dd, 1H, J<sub>H2β,H1β</sub> = 3.3 Hz, J<sub>H2β,H1β</sub> = 10.7 Hz, H2β), 4.54-4.34 (m, 4H, 2x CH<sub>2</sub>-Bn), 4.29-4.25 (m, 1H, H5α), 3.99-3.94 (m, 1H, H5β), 3.56-3.51 (m, 1H, H6β), 3.44-3.40 (m, 1H, H6α), 2.12-1.96 (m, 24H, 8x CH<sub>3</sub> (Ac)).

### 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-O-benzyl-α-D-galactosylbromid<sup>[190]</sup> (47)

(α-Ac<sub>4</sub>-6-O-Bn-GalBr)



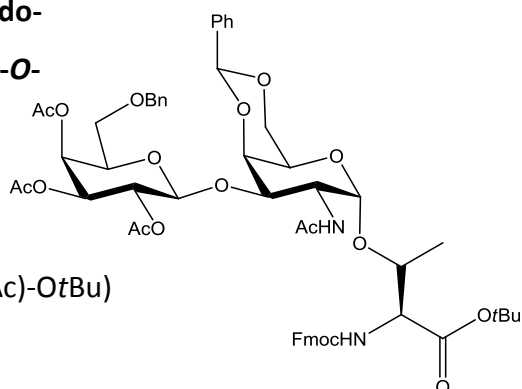
Es werden 5.09 g (11.6 mmol) 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-O-benzyl-α,β-D-galactopyranose (46) in 40 mL absol. Dichlormethan unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend werden 35 mL Bromwasserstoff in Eisessig (33 %) in einem Zeitraum von 40 min zugetropft und 30 min unter Eiskühlung gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 25 mL Dichlormethan verdünnt und mit Eiswasser hydrolysiert. Die organische Phase wird zügig mit jeweils 150 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und einmal mit 150 mL einer 10%-igen Natriumthiosulfat-Lösung. Anschließend wird die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird ohne Reinigung direkt in die nächste Reaktion eingesetzt.

Ausbeute: 4.3 g (9.36 mmol, 80 %), braunes Öl, R<sub>f</sub> = 0.5 (c<sub>Hex</sub>/EE, 4:1).

$C_{19}H_{23}BrO_8$  (M = 459.29 g mol<sup>-1</sup>) [458.06 g mol<sup>-1</sup>].

## 6.5 Synthese des T-Antigens

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-β-*D*-galactopyranosyl])-L-threonin-*tert*-butylester<sup>[184, 191]</sup> (**48**)**



(Fmoc-Thr(βAc<sub>3</sub>-6-*O*-Bn-Gal(1→3)-α4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu)

Es werden 0.86 g (1.25 mmol) Fmoc-Thr(α4,6-*O*-Bzn-GalNHAc)-OtBu (**41**) in 20 mL absol. Nitromethan/Dichlormethan (3:2) gelöst und eine Stunde unter Argonatmosphäre mit 2.5 g frisch ausgeheiztem Molekularsieb (3Å, Kugeln) gerührt. Zu der Reaktionsmischung werden 0.75 g (3.0 mol) Hg(CN)<sub>2</sub> zugegeben. Anschließend werden 1.4 g (3.3 mol) αAc4,6-*O*-Bn-GalBr (**47**) in 5 mL absol. CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>/Dichlormethan (3:2) gelöst und mit einer Kanüle zu der Reaktionsmischung getropft. Der Reaktionsverlauf wird mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 1:1) verfolgt. Nach 4 h und 14 h wird jeweils eine Spatelspitze Hg(CN)<sub>2</sub> zugegeben. Nach zwei Tagen wird die Reaktionsmischung über Hyflo<sup>®</sup> filtriert und mit Dichlormethan gespült. Die organische Phase wird zweimal mit jeweils 150 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 150 mL einer ges. Natriumiodid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 1:1).

Ausbeute: 1.02 g (0.96 mol, 77 %), farbloser amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 58.3$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = 59.3$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), R<sub>f</sub> = 0.35 (PE/EE, 3:1).

C<sub>57</sub>H<sub>65</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub> (M = 1066.13 g mol<sup>-1</sup>) [1065.42 g mol<sup>-1</sup>].

ESI-MS (positiv), m/z: 1089.4 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1089.4).

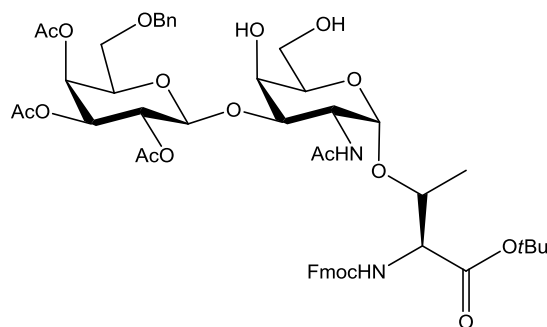
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J<sub>H3,H4</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = 7.4 Hz), 7.60 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H7, H8</sub> = 7.0 Hz), 7.52 (d, 2H, H<sub>Ar</sub>-Bzn, J<sub>H<sub>a</sub>,H<sub>b</sub></sub> = 6.7 Hz), 7.45-7.16

(m, 12H, H<sub>2</sub>-, H<sub>3</sub>-, H<sub>6</sub>-, H<sub>7</sub>-Fmoc, H<sub>Ar</sub>-Bzn (3H), H<sub>Ar</sub>Bn (5H)), 5.97 (d, 1H, NH-Fmoc,  $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 8.6$  Hz), 5.81 (d, 1H, NH-GalNAc,  $J_{\text{NH},\text{H}2} = 9.0$  Hz), 5.57-5.34 (m, 2H, CH-Bzn {s, 5.50}, H<sub>4</sub>' {d, 5.41,  $J_{\text{H}3',\text{H}4'} = 2.7$  Hz}), 5.11 (m, 1H, H<sub>2</sub>'), 5.00-4.86 (m, 2H, H<sub>3</sub>' {4.96}, H<sub>1</sub> {4.91}), 4.73-4.57 (m, 2H, H<sub>1</sub>' {4.67}, H<sub>2</sub> {4.66}), 4.55-4.36 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Fmoc {4.48}, CH<sub>2</sub>-Bn {4.38}), 4.32-3.99 (m, 5H, T<sup>α</sup> {4.29}, H<sub>4</sub> {4.27}, H<sub>9</sub>-Fmoc {4.24}, T<sup>β</sup> {4.18}, H<sub>6a</sub> {4.14}), 3.95-3.79 (m, 3H, H<sub>6b</sub> {3.89}, H<sub>5</sub>' {3.86}, H<sub>3</sub> {3.82}), 3.63-3.43 (m, 3H, H<sub>5</sub> {3.59}, H<sub>6a</sub> {4.14}, H<sub>6b</sub> {3.89}), 2.06, 2.05, 1.98, 1.95 (4x s, 12H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.43 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 1.23 (s, 3H T<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 170.3, 170.2, 170.1, 169.7, 169.7, 169.4 (C=O), 156.3 (C=O-Urethan), 143.7 (C<sub>1a</sub>-, C<sub>8a</sub>-Fmoc), 141.3 (C<sub>4a</sub>-, C<sub>5a</sub>-Fmoc), 137.6, 137.5 (C<sub>q</sub>-Bn, C<sub>q</sub>-Bzn), 128.7, 128.5, 128.1, 127.9, 126.2 (C<sub>Ar</sub>-Bn, C<sub>Ar</sub>-Bzn), 127.9, 127.8 (C<sub>3</sub>-, C<sub>6</sub>-Fmoc), 101.65 (C<sub>1</sub>'), 100.6 (CH-Bzn), 100.3 ((C<sub>1</sub>), 83.2 (C<sub>q</sub>-*t*Bu), 76.2 (T<sup>β</sup>), 75.5 (C<sub>4</sub>), 74.8 (C<sub>3</sub>), 73.5 (CH<sub>2</sub>-Bn), 72.2 (C<sub>5</sub>'), 71.2 (C<sub>3</sub>'), 69.0 (C<sub>6</sub>), 68.9 (C<sub>2</sub>'), 68.0 (C<sub>6</sub>'), 67.6 (C<sub>4</sub>'), 66.9 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 63.7 (C<sub>5</sub>), 59.1 (T<sup>α</sup>), 47.9 (C<sub>2</sub>), 47.2 (C<sub>9</sub>-Fmoc), 28.0 (CH<sub>3</sub>-*t*Bu), 23.5 (CH<sub>3</sub>-NHAc), 21.1, 20.7, 20.6 (3x CH<sub>3</sub>-OAc), 18.9 (T<sup>γ</sup>).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galacto-pyranosyl])-L-threonin-*tert*-butylester<sup>[184]</sup> (50)**

(Fmoc-Thr( $\beta$ -6-*O*-Bn-Gal(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu)



Es werden 1.02 g (0.96 mmol) Fmoc-Thr( $\beta$ Ac<sub>3</sub>-6-*O*-Bn-Gal(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu (**48**) in 25 mL 80%-iger wässriger Essigsäure gelöst und anschließend drei Stunden bei 80 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird auf 40 °C abgekühlt und mit Toluol verdünnt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgt über Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 1:4).

Ausbeute: 0.82 g (0.84 mol, 87 %), farbloser amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 28.7$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>),  
Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = 34.9$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), R<sub>f</sub> = 0.15 (C<sub>6</sub>Hex/EE, 1:8).

C<sub>50</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub> (M = 979.03 g mol<sup>-1</sup>), [978.40 g mol<sup>-1</sup>].

ESI-MS (positiv), m/z: 945.7 ([M-tBu+H+Na]<sup>+</sup>, ber.: 945.3), 1001.8 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1001.4).

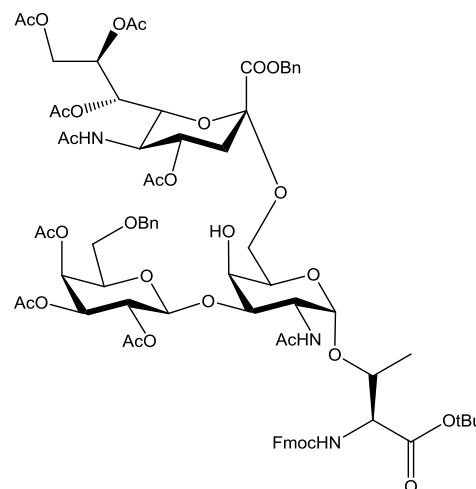
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H<sub>4</sub>-, H<sub>5</sub>-Fmoc, J<sub>H<sub>3</sub>,H<sub>4</sub></sub> = J<sub>H<sub>5</sub>,H<sub>6</sub></sub> = 7.4 Hz), 7.60 (d, 2H, H<sub>1</sub>-, H<sub>8</sub>-Fmoc, J<sub>H<sub>1</sub>,H<sub>2</sub></sub> = J<sub>H<sub>7</sub>,H<sub>8</sub></sub> = 7.0 Hz), 7.45-7.16 (m, 9H, H<sub>2</sub>-, H<sub>3</sub>-, H<sub>6</sub>-, H<sub>7</sub>-Fmoc, H<sub>Ar</sub>Bn (5H)), 5.97 (d, 1H, NH-Fmoc, J<sub>NH,Tα</sub> = 8.6 Hz), 5.51 (d, 1H, NH-GalNAc, J<sub>NH,H<sub>2</sub></sub> = 9.0 Hz), 5.39 (d, 1H, H<sub>4</sub>' , J<sub>H<sub>3</sub>',H<sub>4</sub>'</sub> = 2.9 Hz), 5.23-5.08 (m, 1H, H<sub>2</sub>' ), 5.00-4.90 (m, 1H, H<sub>3</sub>' ), 4.80 (s<sub>b</sub>, 1H, H<sub>1</sub>), 4.64-4.33 (m, 6H, H<sub>1</sub>' , H<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.29-3.98 (m, 5H, H<sub>9</sub>-Fmoc, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>, H<sub>4</sub>), 3.94-3.56 (m, 5H, H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>, H<sub>5</sub>' , H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>), 3.55-3.35 ( m, 2H, H<sub>6</sub>'<sub>a</sub>, H<sub>6</sub>'<sub>b</sub>), 2.05, 2.04, 1.98, 1.95 (4xs, 12H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.43 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-tBu), 1.24 (s<sub>b</sub>, 3H, T<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 170.2, 170.1, 169.7 (C=O), 156.37 (C=O-Urethan), 143.7 (C<sub>1a</sub>-, C<sub>8a</sub>-Fmoc), 141.3 (C<sub>4a</sub>-, C<sub>5a</sub>-Fmoc), 137.6, 137.5 (C<sub>q</sub>-Bn), 128.7, 128.5, 128.4 (C<sub>Ar</sub>-Bn), 127.8, 127.7 (C<sub>3</sub>-, C<sub>6</sub>-Fmoc), 127.1 (C<sub>2</sub>-, C<sub>7</sub>-Fmoc), 125.2, 124.9 (C<sub>1</sub>-, C<sub>8</sub>-Fmoc), 120.1 (C<sub>4</sub>-, C<sub>5</sub>-Fmoc), 101.7 (C<sub>1</sub>' ), 100.3 ((C<sub>1</sub>), 83.2 (C<sub>q</sub>-tBu), 76.1 (T<sup>β</sup>), 76.1 (C<sub>3</sub>), 73.58 (CH<sub>2</sub>-Bn), 72.2 (C<sub>5</sub>' ), 71.2 (C<sub>3</sub>' ), 69.5, 69.0 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>), 68.9 (C<sub>2</sub>' ), 68.1 (C<sub>6</sub>' ), 67.6 (C<sub>4</sub>' ), 66.9 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 63.7 (C<sub>5</sub>), 59.1 (T<sup>α</sup>), 47.9 (C<sub>2</sub>), 47.2 (C<sub>9</sub>-Fmoc), 28.0 (CH<sub>3</sub>-tBu), 23.5 (CH<sub>3</sub>-NHAc), 21.1, 20.7, 20.6 (3x CH<sub>3</sub>-OAc), 18.9 (T<sup>γ</sup>).

## 6.6 Synthese des (2,6)-Sialyl-T-Antigens

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onate]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester<sup>[184]</sup> (**51**)**

Fmoc-Thr( $\beta$ Ac<sub>3</sub>-6-Bn-Gal(1 $\rightarrow$ 3)-  
[ $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn(2 $\rightarrow$ 6)] $\alpha$ GalNAc)-OtBu



Es werden 0.82 g (0.84 mmol) Fmoc-Thr( $\beta$ -6-*O*-Bn-Gal(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu (**50**) und 1.29 g (1.92 mmol)  $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBnXan (**28**) in 60 mL absol. Acetonitril/absol. Dichlormethan (2:1) gelöst, 3 g ausgeheiztes Molsiebpulver 3 Å zugegeben und eine Stunde unter Argonatmosphäre gelöst. Die Reaktionsmischung wird auf -65 °C abgekühlt. Nun erfolgt die Zugabe von 493 mg (1.92 mmol) wasserfreiem Silbertriflat. In einem Zeitraum von 25 min werden unter Lichtausschluss 1.2 mL (1.92 mmol) einer 1.6 M Methylsulfenylbromid-Lösung (**29**) in absol. Dichlorethan, die zuvor in einem Eis/Kochsalzbad gut gekühlt wurde, zugetropft. Die Mischung wird 4 h bei -65 °C gerührt und anschließend durch Zugabe von wenigen Tropfen Diisopropylethylamin neutralisiert. Es wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt, mit Dichlormethan verdünnt und über Hyflo® filtriert. Das Filtrat wird i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und Rückstand durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE), so dass ein Anomerengemisch erhalten wird. Die Trennung des Anomerengemisch erfolgt durch die präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Wasser/Acetonitril, Gradient (50:50) $\rightarrow$ (20:80) in 60 min  $\rightarrow$ (0:100) in 100 min, R<sub>t</sub> ( $\alpha$ -Anomer) = 58.3 min, R<sub>t</sub> ( $\beta$ -Anomer) = 65.1 min.

Ausbeute:  $\alpha$ -Anomer 557 mg (0.36 mmol, 43 %), farbloser amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 18.4$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.<sup>[184]</sup>:  $[\alpha]_D^{23} = 12.2$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), R<sub>f</sub> = 0.15 (EE)

$\beta$ -Anomer 192 mg (0.13 mmol, 15 %), farbloser Feststoff

$C_{76}H_{93}N_3O_{30}$  ( $M = 1528.55 \text{ g mol}^{-1}$ ) [ $1527.58 \text{ g mol}^{-1}$ ].

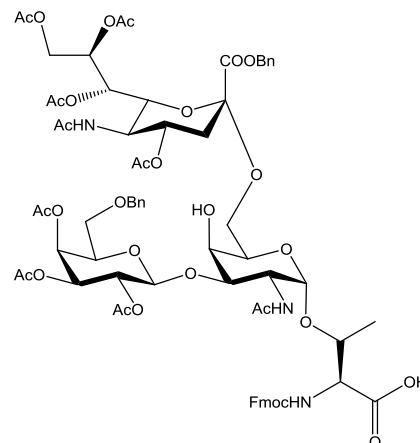
ESI-MS (positiv),  $m/z$ : 1551.3 ( $[M+Na]^+$ , ber.: 1550.5).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 7.75 (d, 2H,  $J_{H_3,H_4} = J_{H_5,H_6} = 7.4 \text{ Hz}$ , H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2H,  $J_{H_1,H_2} = J_{H_7,H_8} = 7.0 \text{ Hz}$ , H1-, H8-Fmoc), 7.45-7.16 (m, 14H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc,  $H_{Ar}Bn$  (10H)), 5.97 (d, 1H,  $J_{NH,T\alpha} = 8.6 \text{ Hz}$ , NH-Fmoc), 5.51 (m, 2H, NH-GalNAc), 5.39-5.24 (m, 2H, H8'', H7''), 5.23-5.06 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-COOBn}$ , H2', NH-NeuAc), 5.00-4.90 (m, 1H, H3'), 4.86-4.77 (m, 1H, H4''), 4.72 (d, 1H,  $J_{H_1,H_2} = 2.9 \text{ Hz}$ , H1), 4.64-4.31 (m, 6H, H1', H2,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4.29-4.19 (m, 2H, H9<sub>a</sub>'', H9-Fmoc), 4.18-4.00 (m, 5H, T <sup>$\alpha$</sup> , T <sup>$\beta$</sup> , H9<sub>b</sub>'', H5'', H6''), 3.94-3.73 (m, 4H, H4, H6<sub>a</sub>, H5', H5), 3.65-3.57 (m, 1H, H3), 3.55-3.46 (m, 2H, H6<sub>b</sub>, H6<sub>a</sub>'), 3.45-3.37 (m, 1H, H6<sub>b</sub>'), 2.57 (dd, 1H,  $J_{H_3eq,H_3ax} = 12.6 \text{ Hz}$ ,  $J_{H_3eq,H_4} = 4.3 \text{ Hz}$ ), 2.09, 2.08, 2.05, 2.03, 1.99, 1.98, 1.95 (7x s, 24H, 8x  $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 1.90 (m, 1H, H3<sub>ax</sub>''), 1.84 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ), 1.43 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{-tBu}$ ), 1.24 (d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.1 \text{ Hz}$ , T <sup>$\gamma$</sup> ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 170.2, 169.9, 169.7, 169.6, 169.4, 167.2 (C=O), 166.4 (C1''), 155.7 (C=O-Urethan), 143.1 (C1a-, C8a-Fmoc), 140.6 (C4a-, C5a-Fmoc), 136.7 (C<sub>q</sub>-Bn (C6')), 134.1 (C<sub>q</sub>-Bn (C1'')), 127.7, 127.4 (C<sub>Ar</sub>-Bn), 127.2 (C2-, C7-Fmoc), 127.1 (C<sub>Ar</sub>-Bn), 126.3 (C3-, C6-Fmoc), 124.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 100.7 (C1'), 99.5 (C1), 98.1 (C2''), 82.4 (C<sub>q</sub>-tBu), 76.6 (C3), 75.8 (T <sup>$\beta$</sup> ), 72.6 ( $\text{CH}_2\text{-Bn(C6')}$ ), 71.9 (C6''), 71.4 (C5'), 70.0 (C3'), 68.5 (C8''), 68.2 (C5), 68.1 (C6'), 68.0 (C4''), 67.9 (C2'), 67.5 (C4), 66.9 ( $\text{CH}_2\text{-Bn (C1'')}$ ), 66.6 (C4'), 66.5 (C7''), 66.5 (C6'), 66.3 ( $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 63.1 (C6), 61.7 (C9''), 58.1 (T <sup>$\alpha$</sup> ), 48.6 (C5''), 46.9 (C2), 46.6 (C9-Fmoc), 36.7 (C3''), 27.4 ( $\text{CH}_3\text{-tBu}$ ), 22.5, 22.4 ( $\text{CH}_3\text{-NHAc}$ ), 20.2, 20.1, 20.0, 19.8 (3x  $\text{CH}_3\text{-OAc}$ ), 17.9 (T <sup>$\gamma$</sup> ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galacto-pyranosyl)-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin (52)**

Fmoc-Thr( $\beta$ Ac<sub>3</sub>-6-Bn-Gal(1 $\rightarrow$ 3)-  
[ $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn(2 $\rightarrow$ 6)] $\alpha$ GalNAc)-OH



Es werden 557 mg (0.36 mmol) Fmoc-Thr( $\beta$ Ac<sub>3</sub>-6-Bn-Gal(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn(2 $\rightarrow$ 6)] $\alpha$ GalNAc)-OH (**51**) in einer Mischung aus 5 mL Dichlormethan, 5 mL Trifluoressigsäure und 0.5 mL Anisol gelöst und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit 30 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit jeweils 30 mL Toluol kodestilliert und anschließend zweimal mit jeweils 30 mL Dichlormethan. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE/EtOH, 5:1).

Die Trennung der Anomere gelingt durch präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, (Acetonitril/Wasser)<sub>0.1% TFA</sub>, Gradient (60:40)  $\rightarrow$  (70:30), 30 min,  $\lambda$  = 254 nm,  $R_t$  = 40.0 min).

Ausbeute: 381 mg (0.26 mmol, 72 %), farbloser amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 30.1$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>),  $R_f = 0.45$  (EE/EtOH, 2:1), Analytische HPLC (Phenomenex Luna, (Acetonitril/Wasser)<sub>0.1% TFA</sub>, Gradient (60:40)  $\rightarrow$  (70:30), 24 min,  $\lambda = 254$  nm,  $R_t = 40.0$  min).

C<sub>72</sub>H<sub>85</sub>N<sub>3</sub>O<sub>30</sub> (M = 1472.45 g mol<sup>-1</sup>), [1471.52 g mol<sup>-1</sup>].

ESI-MS (positiv), m/z: 1495.1 [(M+Na)<sup>+</sup>, ber.: 1494.5].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY, HMQC),  $\delta$  (ppm): 7.75 (d, 2H,  $J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.4$  Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.0$  Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.43-7.12(m, 14H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H<sub>Ar</sub>Bn (10H)), 5.73 (d, 1H,  $J_{NH,T\alpha} = 8.0$  Hz, NH-Fmoc), 5.48 (m, 1H, NH-GalNAc), 5.39-5.24 (m, 2H, H8'', H7''), 5.23-5.06 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-COOBn, H2', NH-NeuAc), 5.00-4.90 (m, 1H, H3'), 4.86-4.77 (m, 1H, H4''), 4.72 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 2.9$  Hz, H1), 4.64-4.31 (m, 6H, H1', H2, CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.29-4.19 (m, 2H, H9<sub>a</sub>'', H9-Fmoc), 4.18-4.00 (m, 5H, T <sup>$\alpha$</sup> , T <sup>$\beta$</sup> , H9<sub>b</sub>'', H5'', H6''), 3.94-3.73 (m, 4H, H4, H6<sub>a</sub>, H5', H5), 3.65-3.57 (m, 1H, H3), 3.55-3.46 (m, 2H,

H<sub>6b</sub>, H<sub>6a'</sub>), 3.45-3.37 (m, 1H, H<sub>6b'</sub>), 2.57 (dd, 1H,  $J_{H3eq,H3ax} = 12.6$  Hz,  $J_{H3eq,H4} = 4.3$  Hz), 2.09, 2.08, 2.05, 2.03, 1.99, 1.98, 1.95 (7x s, 24H, 8x CH<sub>3</sub>-Ac), 1.90 (m, 1H, H<sub>3ax''</sub>), 1.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.43 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-tBu), 1.24 (d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.1$  Hz, T<sup>γ</sup>).

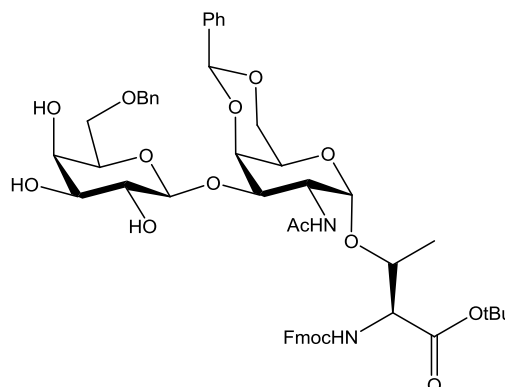
<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 170.2, 169.9, 169.7, 169.6, 169.4, 167.2 (C=O), 166.4 (C1''), 155.7 (C=O-Urethan), 143.1 (C1a-, C8a-Fmoc), 140.6 (C4a-, C5a-Fmoc), 136.7 (C<sub>q</sub>-Bn (C6')), 134.1 (C<sub>q</sub>-Bn (C1'')), 127.7, 127.4 (C<sub>Ar</sub>-Bn), 127.2 (C2-, C7-Fmoc), 127.1 (C<sub>Ar</sub>-Bn), 126.3 (C3-, C6-Fmoc), 124.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 100.7 (C1'), 99.5 (C1), 98.1 (C2 ''), 82.4 (C<sub>q</sub>-tBu), 76.6 (C3), 75.8 (T<sup>β</sup>), 72.6 (CH<sub>2</sub>-Bn(C6')), 71.9 (C6''), 71.4 (C5'), 70.0 (C3'), 68.5 (C8''), 68.2 (C5), 68.1 (C6'), 68.0 (C4''), 67.9 (C2'), 67.5 (C4), 66.9 (CH<sub>2</sub>-Bn (C1'')), 66.6 (C4'), 66.5 (C7''), 66.5 (C6'), 66.3 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 63.1 (C6), 61.7 (C9''), 58.1 (T<sup>α</sup>), 48.6 (C5''), 46.9 (C2), 46.6 (C9-Fmoc), 36.7 (C3''), 27.4 (CH<sub>3</sub>-tBu), 22.5, 22.4 (CH<sub>3</sub>-NHAc), 20.2, 20.1, 19.8 (3x CH<sub>3</sub>-OAc), 17.9 (T<sup>γ</sup>).



## 6.7 Synthese des 2,3-Sialyl-T-Antigens

*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[6-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butyl-ester<sup>[184]</sup> (**53**)

(Fmoc-Thr(β6-Bn-Gal(1→3)-α4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu)



Es werden 1.2 g (1.28 mmol) Fmoc-Thr(βAc<sub>3</sub>-6-Bn-Gal(1→3)-α-4,6-OBzn-GalNAc)-*Ot*Bu (**48**) in 25 mL absol. Methanol gelöst und dazu wird tropfenweise

vorsichtig eine 1%-ige Natriummethanolat-Lösung in Methanol gegeben bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht ist. Der pH-Wert wird regelmäßig kontrolliert und mit einer 1%-igen Natriummethanolat-Lösung nachreguliert. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt und nach der vollständigen Deacetylierung mit 1 N Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird zweimal mit jeweils 150 mL Dichlormethan extrahiert und die organische Phase wird zweimal mit jeweils 150 mL 1 N HCl und 200 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wird anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung erfolgt über Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE→EE/EtOH, 80:1).

Ausbeute: 650 mg (0.69 mmol, 54 %), farbloser, amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 65.4$  ( $c = 1.00$ , CHCl<sub>3</sub>),  $R_f = 0.39$  (Toluol/Ethanol, 4:1).

C<sub>51</sub>H<sub>60</sub>N<sub>2</sub>O<sub>15</sub> (M = 941.03 g mol<sup>-1</sup>) [940.40 g mol<sup>-1</sup>].

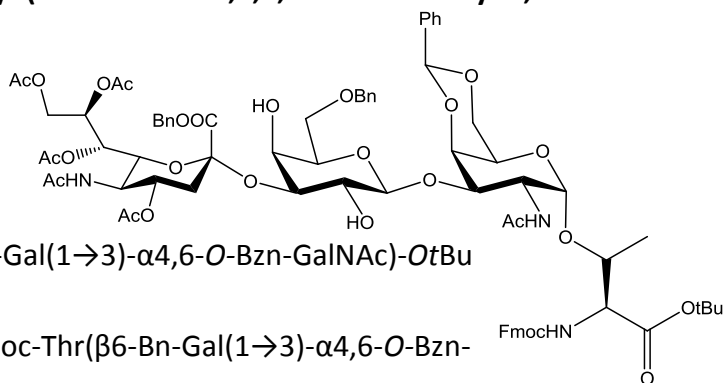
ESI-MS (positiv), m/z: 963.5 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 963.4).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 7.75 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$  Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.59 (d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$  Hz, H1-, H8- Fmoc), 7.49 (d, 2H,  $J_{Ha,Hb} = 6.6$  Hz, H<sub>Ar</sub>-Bzn), 7.42-7.23 (m, 12H, H3-, H6-, H2-, H7-Fmoc, H<sub>Ar</sub>-Bzn (3H), H<sub>Ar</sub>-Bn (5H)), 6.40 (d, 1H,  $J_{NH,H2} = 9.2$  Hz, NHGalNAc), 5.81 (d, 1H,  $J_{NH,T\alpha} = 9.2$  Hz, NH-Fmoc), 5.42 (s, 1H, CH-Bzn), 4.90 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 2.9$  Hz, H1), 4.68-4.42 (m, 5H, H2, CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.31-4.00 (m, 6H, H4, H1',

H9-Fmoc, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>, H6<sub>a</sub>), 3.93-3.44 (m, 8H, H3, H6<sub>b</sub>, H3', H4', H5', H5, H6<sub>a</sub>', H6<sub>b</sub>'), 3.42-3.29 (m, 1H, H2'), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.41 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-tBu), 1.24 (d, 3H, J<sub>T<sup>γ</sup>,T<sup>β</sup></sub> = 4.8 Hz, T<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>, DEPT), δ (ppm): 173.1 (COOH), 172.3 (C=O), 156.6 (C=O-Urethan), 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.1, 137.6 (C<sub>q</sub>-Bn, C<sub>q</sub>-Bzn), 128.9, 128.1, 126.7 (C<sub>Ar</sub>-Bzn), 128.4, 127.8 (C<sub>Ar</sub>-Bn), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.0 (C1- C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 105.4 (CH-Bzn), 101.1 (C1'), 100.6 (C1), 83.2 (C<sub>q</sub>-tBu), 77.4 (T<sup>β</sup>), 76.7 (C4), 75.8 (C3), 73.7 (C5'), 73.5 (CH<sub>2</sub>-Bn), 73.4 (C3'), 70.8 (C2'), 70.0 (C6), 69.0 (C6'), 68.9 (C4'), 67.1 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 63.6 (C5), 59.1 (T<sup>α</sup>), 48.2 (C2), 47.2 (C9-Fmoc), 28.1 (CH<sub>3</sub>-tBu), 23.4 (CH<sub>3</sub>-Ac), 19.1 (T<sup>γ</sup>).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[6-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl-3-*O*-{benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (54)**



Fmoc-Thr(αAc<sub>4</sub>NeuAcCOOBn-(2→3)-β6-Bn-Gal(1→3)-α4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu

Es werden 971 mg (1.03 mmol) Fmoc-Thr(β6-Bn-Gal(1→3)-α4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu (**53**) und 1.75 g (2.6 mmol) αAc<sub>4</sub>NeuNAcCOOBnXan (**28**) in einer Mischung aus 30 mL absol. Acetonitril und 15 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 1.5 g ausgeheiztem gepulvertem Molekularsieb (3 Å) unter Lichtausschluss eine Stunde in einer Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wird auf -65 °C abgekühlt und die Reaktionsmischung mit 0.67 g (2.6 mmol) wasserfreiem Silbertriflat versetzt. Innerhalb von 30 min werden 1.6 mL (2.6 mmol) einer 1.6 M Methylsulphenylbromid-Lösung (**29**) in absol. 1,2-Dichlorethan unter Lichtausschluss zugetropft. Die Mischung wird 3.5 h bei -65 °C gerührt und anschließend durch Zugabe von 235 µL DIPEA neutralisiert. Es wird auf 0 °C langsam erwärmt und mit 30 mL Dichlormethan verdünnt und über Hyflo<sup>®</sup> filtriert. Das Filtrat wird i. Vak. vom Lösungsmittel befreit, und der Rückstand wird durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE→EE/EtOH, 40:1) gereinigt.

Ausbeute: 850 mg (0.57 mmol, 55 %), farbloser, amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = 27.8$  (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>), R<sub>f</sub> = 0.15 (EE), R<sub>t</sub> = 26.8 min (Phenomenex Luna-C18, Gradient: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (60:40) → (90:10) in 40 min).

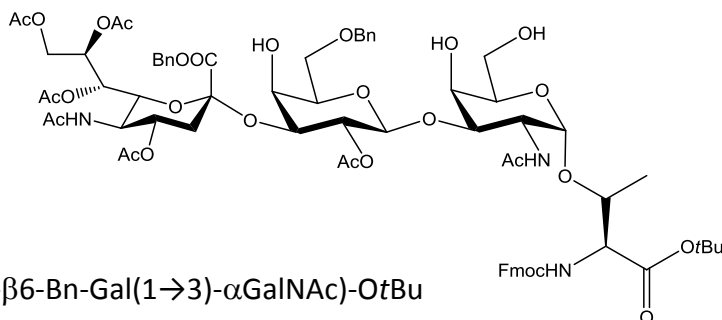
C<sub>77</sub>H<sub>91</sub>N<sub>3</sub>O<sub>27</sub> (M = 1490.55 g mol<sup>-1</sup>) [1489.58 g mol<sup>-1</sup>].

ESI-MS (positiv), m/z: 1512.7 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1512.6).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY, HMQC), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, J<sub>H4,H3</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = 7.5 Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.58 (dd, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 7.6 Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.49 (d, 2H, J<sub>Ha,Hb</sub> = 5.8 Hz, H<sub>Ar</sub>-Bzn), 7.42-7.34 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.31-7.22 (m, 15H, H2-, H7-Fmoc, H<sub>Ar</sub>-Bzn (3H), H<sub>Ar</sub>-Bn (10H)), 6.59 (d, 1H, J<sub>NH,H2</sub> = 9.4 Hz, NH-GalNac), 6.10 (d, 1H, J<sub>NH,Tα</sub> = 9.8 Hz, T<sub>NH</sub>), 5.45 (s, 1H, CH-Bzn), 5.39 (t, 1H, J<sub>H8'',H9''</sub> = 6.6 Hz, H8''), 5.26-5.09 (m, 2H, H7'', NH-NeuNac), 5.15 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.98 (d, 1H, J<sub>H1,H2</sub> = 3.5 Hz, H1), 4.90-4.79 (m, 1H, H4''), 4.72-4.61 (m, 1H, H2), 4.55 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.46-4.03 (m, 10H, H9a''{4.45}, CH<sub>2</sub>-Fmoc {4.36, 4.34}, T<sup>β</sup> {4.31}, H4 {4.26}, T<sup>α</sup> {4.25}, H9-Fmoc {4.20}, H1' {4.14}, H6<sub>a</sub> {4.13}, H5'' {4.04}), 3.99-3.84 (m, 4H, H6'' {3.93}, H9<sub>b</sub>'' {3.92}, H3' {3.90}, H6<sub>b</sub> {3.87}), 3.69-3.50 (m, 4H, H3 {3.69}, H2' {3.58}, H6<sub>a</sub>' {3.57}, H5 {3.56}), 3.55-3.39 (m, 2H, H6<sub>b</sub>' {3.52}, H5' {3.41}), 3.24 (s, 1H, H4'), 2.78 (sb, 1H, OH), 2.71 (dd, 1H, J<sub>H3<sub>eq</sub>'',H3<sub>ax</sub>''</sub> = 12.7 Hz, J<sub>H3<sub>eq</sub>'',H2''</sub> = 4.3 Hz, H3<sub>eq</sub>''), 2.36 (s, 1H, OH), 2.03-2.00 (m, 1H, H3<sub>ax</sub>''), 2.09, 2.07, 2.02, 2.00, 1.92, 1.82 (6x s, 18H, 6x CH<sub>3</sub>-Ac), 1.42 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-tBu), 1.24 (d, 3H, J<sub>Tγ,Tβ</sub> = 6.0 Hz, T<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HMQC), δ (ppm): 171.5, 170.9, 170.8, 170.2, 170.1, 169.8, 167.8 (C=O), 156.8 (C=O-Urethan), 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.1, 137.5 (C<sub>q</sub>-Bzn), 134.2 (C<sub>q</sub>-Bn), 129.0, 128.8, 128.7, 128.4, 127.5 (C<sub>Ar</sub>-Bn), 128.8, 128.0, 126.4 (C<sub>Ar</sub>-Bzn), 127.8 (C3-, C6-Fmoc), 127.1, 127.0 (C2-, C7-Fmoc), 125.2, 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 106.6 (C1'), 101.0 (CH-Bzn), 100.5 (C1), 97.5 (C2''), 83.1 (C<sub>q</sub>-tBu), 78.2 (C3), 75.9, 75.2 (T<sup>β</sup>, C4, C3'), 73.6 (CH<sub>2</sub>-Bn), 73.4, 72.9 (C6'', C5'), 69.7 (C8'', C6'), 69.1 (C6), 68.6 (C4''), 68.2, 68.1 (CH<sub>2</sub>-Bn, C2', C4', C7''), 67.3 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 63.6 (C9''), 63.5 (C5), 59.2 (T<sup>α</sup>), 49.1 (C5''), 47.8 (C2), 47.1 (C9-Fmoc), 37.42 (C3''), 28.1 (CH<sub>3</sub>-tBu), 23.2, 23.1 (CH<sub>3</sub>-NHAc), 21.3, 21.2, 21.0, 20.8, 20.6 (CH<sub>3</sub>-OAc), 19.5 (T<sup>γ</sup>).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[6-*O*-benzyl-3-*O*-{benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester<sup>[184]</sup> (55)**



Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-(2→3)- $\beta$ 6-Bn-Gal(1→3)- $\alpha$ GalNAc)-OtBu

Es werden 850 mg (0.57 mmol) Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuAcCOOBn-(2→3)- $\beta$ 6-Bn-Gal(1→3)- $\alpha$ 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu (**54**) in 30 mL 80%-iger Essigsäure gelöst und eine Stunde bei 80 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit Toluol verdünnt und die Lösung i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird mit Toluol kodestilliert und das Rohprodukt durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE/EtOH, 20:1).

Ausbeute: 640 mg (0.46 mmol, 81 %), farbloser, amorpher Feststoff,  $R_f = 0.10$  (EE/MeOH, 10:1),  $[\alpha]_D^{22} = 13.4$  ( $c = 1.00$ , CHCl<sub>3</sub>), Lit.<sup>[184]</sup>:  $[\alpha]_D^{28} = 12.0$  ( $c = 1.00$ , CHCl<sub>3</sub>).

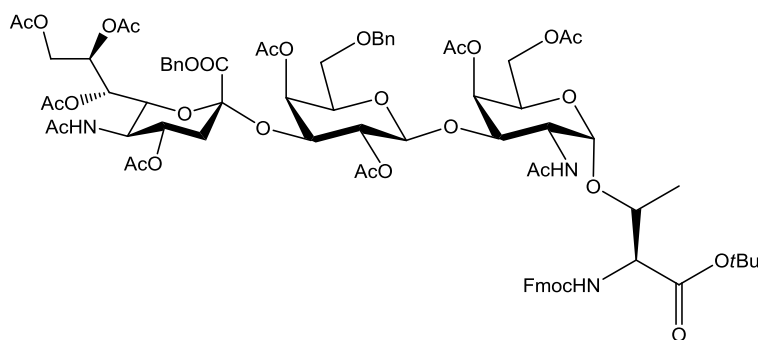
C<sub>70</sub>H<sub>87</sub>N<sub>3</sub>O<sub>27</sub> (M = 1402.44 g mol<sup>-1</sup>) [1401.55 g mol<sup>-1</sup>].

ESI-MS (positiv), m/z: 1421.1 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1424.5), 1440.9 ([M+K]<sup>+</sup>, ber.: 1440.7).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY),  $\delta$  (ppm): 7.74 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$  Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.57 (dd, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.6$  Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.46-7.22 (m, 14H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H<sub>Ar</sub>-Bn {10H}), 6.58 (s<sub>b</sub>, 1H, NH-GalNAc), 6.10 (d, 1H,  $J_{NH,T\alpha} = 9.6$  Hz, T<sub>NH</sub>), 5.45-5.43 (m, 1H, H8''), 5.15-5.00 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Bn {5.12, 5.10}, H7'' {5.06}, NHNeuNAc), 4.91 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 1.5$  Hz, H1), 4.90-4.79 (m, 1H, H4''), 4.60-4.44 (m, 4H, H9<sub>a</sub>'' {4.56}, H2 {4.52}, CH<sub>2</sub>-Bn {4.46}), 4.40-4.32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc {4.36, 4.34}), 4.28-4.20 (m, 1H, T <sup>$\beta$</sup> ), 4.20-4.09 (m, 4H, T <sup>$\alpha$</sup>  {4.19}, H1' {4.18}, H9-Fmoc {4.18}, H4 {4.14}), 4.05-3.98 (m, 1H, H5''), 3.97-3.94 (m, 1H, H6''), 3.90-3.85 (m, 2H, H6<sub>a</sub> {3.88}, H3' {3.86}), 3.80-3.60 (m, 4H, H5 {3.79}, H9<sub>b</sub>'' {3.75}, H6<sub>b</sub> {3.72}, H6<sub>b</sub> {3.72}, H2' {3.69}), 3.55-3.32 (m, 4H, H3 {3.52}, H6<sub>a</sub>' {3.49}, H6<sub>b</sub>' {3.44}, H5' {3.39}), 3.24-3.18 (m, 1H, H4'), 2.70 (dd, 1H,  $J_{H3eq'',H3ax''} = 12.7$  Hz,  $J_{H3eq'',H2''} = 4.3$  Hz, H3<sub>eq</sub>''), 2.10-1.88 (m, 19H, 4x CH<sub>3</sub>OAc, 1x CH<sub>3</sub>NAC, CH<sub>3</sub>NAC, H3<sub>ax</sub>'' {2.03}), 1.42 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-tBu), 1.24 (d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.0$  Hz, T <sup>$\gamma$</sup> ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , HMQC),  $\delta$  (ppm): 172.2, 171.8, 171.5, 171.0, 168.8 (C=O), 167.6 (C1''), 156.7 (C=O-Urethan), 144.5, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.8, 134.2 ( $\text{C}_q$  (2x Bn)), 128.9, 128.8, 128.7, 128.4, 128.2, 127.8, 127.7, 127.5 ( $\text{C}_{Ar}$  (2x Bn), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 127.1, 126.9 (C2-, C7-Fmoc), 125.2, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 124.9 (C4-, C5-Fmoc), 105.8 (C1'), 100.1 (C1), 97.6 (C2''), 80.7 (C3), 76.1 (C3'), 77.8 ( $\text{T}^\beta$ ), 73.5 ( $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 73.4 (C5'), 73.1 (C6''), 69.7 (C4), 69.5 (C5), 68.8 (C8''), 68.5 (C4''), 8.4 (C4'), 68.3 (C2'), 68.2 ( $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 67.9 (C7), 67.1 ( $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 63.5 (C9''), 62.9 (C6), 59.2 ( $\text{T}^\alpha$ ), 49.0 (C5''), 47.4 (C2), 47.1 (C9-Fmoc), 37.4 (C3''), 23.2 23.0 ( $\text{CH}_3\text{-NHAc}$ ), 21.1, 21.0, 20.7, 20.6 ( $\text{CH}_3$  (5x  $\text{CH}_3\text{-OAc}$ ), 19.5 ( $\text{T}^\gamma$ ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*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- $\alpha$ -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (56)**



Fmoc-Thr( $\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn}$ -(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -6-*O*-Bn-Gal(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha\text{Ac}_2\text{GalNAc}$ )-OtBu

Es werden 640 mg (0.46 mmol) Fmoc-Thr( $\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn}$ -(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -6-Bn-Gal(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha\text{GalNAc}$ )-OtBu (**55**) in 10 mL Pyridin gelöst und mit einer katalytischen Menge *N,N*-Dimethylaminopyridin versetzt. Die Reaktionslösung wird auf 0 °C abgekühlt und es werden langsam 5 mL Acetanhydrid zugegeben. Anschließend wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor mit 30 mL Toluol verdünnt wird. Die Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt und der Rückstand viermal mit jeweils 20 mL Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt über Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE).

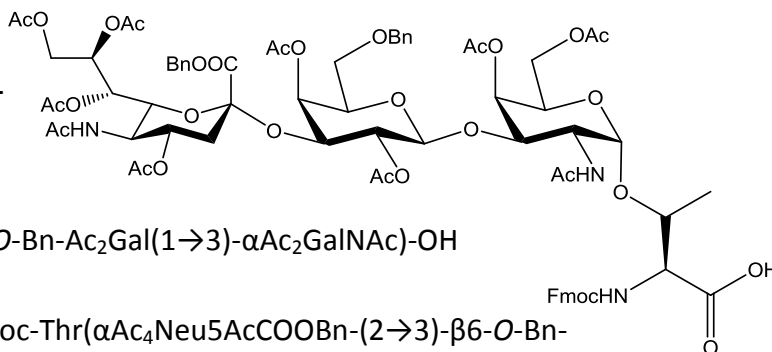
Ausbeute: 542 mg (0.35 mmol, 75 %), farbloser, amorpher Feststoff,  $R_f = 0.12$  (EE/Ethanol, 10:1),  $[\alpha]_D^{22} = 32.5$  ( $c = 1.00$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

$\text{C}_{78}\text{H}_{95}\text{N}_3\text{O}_{31}$  ( $M = 1570.59 \text{ g mol}^{-1}$ ) [ $1569.59 \text{ g mol}^{-1}$ ].

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY, HMQC),  $\delta$  (ppm): 7.75 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$  Hz, H<sub>4</sub>-, H<sub>5</sub>-Fmoc), 7.57 (dd, 2H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.6$  Hz, H<sub>1</sub>-, H<sub>8</sub>-Fmoc), 7.45-7.20 (m, 14H, H<sub>2</sub>-, H<sub>3</sub>-, H<sub>6</sub>-, H<sub>7</sub>-Fmoc, H<sub>Ar</sub>-Bn{10H}), 6.40 (s<sub>b</sub>, 1H, NH-GalNac), 5.90 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.6$  Hz, T<sub>NH</sub>), 5.53-5.43 (m, 1H, H<sup>8''</sup>), 5.42 (s, 1H, CH<sub>2a</sub>-Bn), 5.40-5.35 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 5.17 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_6'',\text{H}_7''} = 2.2$  Hz,  $J_{\text{H}_7'',\text{H}_8''} = 7.5$  Hz, H<sup>7''</sup>) 5.05 (d, 1H,  $J_{\text{H}_4',\text{H}_3'} = 3.12$  Hz, H<sub>4'</sub>), 5.02 (s, 1H, CH<sub>2b</sub>-Bn), 4.96-4.90 (m, 2H, H<sub>2'</sub>{4.94}, NHNeuNac), 4.89-4.72 (m, 2H, H<sub>1</sub> {4.88}, H<sub>4''</sub> {4.79}), 4.55-4.28 (m, 8H, H<sub>2</sub> {4.53}, CH<sub>2a</sub>-Bn {4.51}, H<sub>1</sub> {4.49}, CH<sub>2b</sub>-Bn {4.39}, H<sub>3'</sub> {4.38}, CH<sub>2</sub>-Fmoc {4.36}, H<sub>9a''</sub> {4.33}), 4.21-4.02 (m, 5H, T<sup>β</sup> {4.20}, T<sup>α</sup> {4.17}, H<sub>9</sub>-Fmoc {4.15}, H<sub>6a</sub> {4.09}, H<sub>5</sub> {4.04}), 3.99 (d, 1H,  $J_{\text{H}_4'',\text{H}_5''} = J_{\text{H}_5'',\text{H}_4''} = 10.4$  Hz, H<sup>5''</sup>), 3.95 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_5,\text{H}_6b} = 7.4$  Hz,  $J_{\text{H}_6a,\text{H}_6b} = 11.2$  Hz, H<sub>6b</sub>), 3.88-3.70 (m, 2H, H<sub>9b''</sub> {3.87}, H<sub>3</sub> {3.71}), 3.68-3.62 (m, 1H, H<sup>5'</sup>), 3.49 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_5',\text{H}_6a} = 6.0$  Hz,  $J_{\text{H}_6a',\text{H}_6b'} = 9.2$  Hz, H<sub>6a'</sub>), 3.45 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_5',\text{H}_6} = 6.6$  Hz,  $J_{\text{H}_6a',\text{H}_6b'} = 9.1$  Hz, H<sub>6'</sub>), 2.50 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_3\text{eq}'',\text{H}_3\text{ax}''} = 12.7$  Hz,  $J_{\text{H}_3\text{eq}'',\text{H}_2''} = 4.3$  Hz, H<sub>3eq''</sub>), 2.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.00-1.94 (m, 1H, H<sub>3ax''</sub>), 2.05, 2.03, 2.02, 2.00, 1.94, 1.82 (s, 18H, 6x CH<sub>3</sub>-Ac), 1.42 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-tBu), 1.24 (d, 3H,  $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.0$  Hz, T<sup>γ</sup>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , HMQC),  $\delta$  (ppm): 171.7, 171.6, 171.5, 171.0, 168.7, 167.2 (C=O), 156.7 (C=O-Urethan), 143.7, 143.6 (C<sub>1a</sub>-, C<sub>8a</sub>-Fmoc), 141.3, 141.2 (C<sub>4a</sub>-, C<sub>5a</sub>-Fmoc), 138.0, 135.0 (C<sub>q</sub> (2x Bn)), 128.9, 128.8, 128.7, 128.4, 128.2 (C<sub>Ar</sub> (2x Bn), C<sub>2</sub>-, C<sub>3</sub>-, C<sub>6</sub>-, C<sub>7</sub>-Fmoc), 126.1, 126.0 (C<sub>1</sub>-, C<sub>8</sub>-Fmoc), 120.0 (C<sub>4</sub>-, C<sub>5</sub>-Fmoc), 101.7 (C<sub>1'</sub>), 99.8 (C<sub>1</sub>), 96.9 (C<sub>2''</sub>), 83.0 (C<sub>q</sub>-tBu), 76.1 (T<sup>β</sup>), 74.2 (C<sub>3</sub>), 73.5 (CH<sub>2</sub>-Bn), 73.6 (C<sub>6''</sub>), 72.2 (C<sub>5'</sub>), 71.7 (C<sub>3'</sub>), 69.5 (C<sub>4</sub>), 69.2 (C<sub>2'</sub>), 69.0 (C<sub>4''</sub>), 68.6 (C<sub>8''</sub>, CH<sub>2</sub>-Bn), 68.0 (C<sub>5</sub>, C<sub>6'</sub>), 67.8 (C<sub>4'</sub>), 67.7 (C<sub>7''</sub>), 67.4 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 63.3 (C<sub>6</sub>), 63.3 (C<sub>9''</sub>), 59.2 (T<sup>α</sup>), 50.4 (C<sub>2</sub>), 48.9 (C<sub>5''</sub>), 48.6 (C<sub>2</sub>), 47.1 (C<sub>9</sub>-Fmoc), 37.5 (C<sub>3''</sub>), 28.1 (CH<sub>3</sub>-tBu), 23.3, 23.1 (CH<sub>3</sub>-NHAc), 21.4, 21.3, 21.0, 20.8, 20.7, 20.5 (8x CH<sub>3</sub>-OAc), 19.0 (T<sup>γ</sup>).

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*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-dideoxy- $\alpha$ -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin (57)**



Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>Neu5AcCOOBn-(2→3)- $\beta$ 6-*O*-Bn-Ac<sub>2</sub>Gal(1→3)- $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OH

Es werden 742 mg (0.47 mmol) (Fmoc-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>Neu5AcCOOBn-(2→3)- $\beta$ 6-*O*-Bn-Ac<sub>2</sub>Gal(1→3)- $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-*O*tBu) (**56**) in einer Mischung aus 8 mL Trifluoressigsäure und 0.5 mL Anisol gelöst und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit 50 mL Toluol verdünnt. Die Lösungsmittel werden i. Hochvak. entfernt. Das zurückbleibende Öl wird mit 50 mL einer Acetanhydrid/Pyridin-Mischung (1:2) und 20 mg DMAP bei 0 °C versetzt und 16 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Danach wird das Lösungsmittel i. Hochvak. entfernt, und es wird dreimal mit je 50 mL Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 100 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit jeweils 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung erfolgt über Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE/MeOH, 5:1).

Ausbeute: 541 mg (0.35 mmol, 76 %), farbloser, amorpher Feststoff,  $R_f = 0.34$  (EE/MeOH, 2:1),  $[\alpha]_D^{22} = 23.8$  ( $c = 1.00$ , CHCl<sub>3</sub>).

C<sub>74</sub>H<sub>87</sub>N<sub>3</sub>O<sub>31</sub> (M = 1514.48 g mol<sup>-1</sup>) [1513.53 g mol<sup>-1</sup>].

ESI-MS (positiv),  $m/z$ : 1537.1 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1536.5), 1553.0 ([M+K]<sup>+</sup>, ber.: 1552.6).

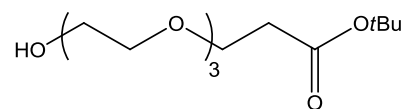
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, COSY, HMQC),  $\delta$  (ppm): 7.76 (d, 2H,  $J_{H_3,H_4} = J_{H_5,H_6} = 7.4$  Hz, H<sub>4</sub>-, H<sub>5</sub>-Fmoc), 7.72-7.68 (m, 2H, H<sub>1</sub>-, H<sub>8</sub>-Fmoc), 7.50-7.21 (m, 14H, H<sub>2</sub>-, H<sub>3</sub>-, H<sub>6</sub>-, H<sub>7</sub>-Fmoc, H<sub>A</sub>r {2x Bn, 10H}), 5.58-5.51 (m, 1H, H<sub>8</sub>"'), 5.45-5.31 (m, 3H, H<sub>4</sub> {5.44}, H<sub>7</sub>" {5.40}, CH<sub>2a</sub>-Bn {d,  $J_{H_a,H_b} = 12.2$  Hz}), 5.21 (d, 1H,  $J_{H_3',H_4'} = 3.1$  Hz, H<sub>4</sub>''), 5.16 (d, 1H,  $J_{H_a,H_b} = 12.1$  Hz, CH<sub>2b</sub>-Bn), 5.01-4.93 (m, 2H, H<sub>1</sub> {5.01}, H<sub>4</sub>" {4.98}), 4.85 (d, 2H,  $J_{H_2',H_3'} = 10.1$  Hz, H<sub>2</sub>''), 4.74 (d, 1H,  $J_{H_1',H_2'} = 7.6$  Hz, H<sub>1</sub>''), 4.65-4.39 (m, 6H, H<sub>3</sub>' {4.65}, CH<sub>2</sub>-Bn {4.62, 4.52}, CH<sub>2</sub>-Fmoc {4.59, 4.48}, T <sup>$\beta$</sup>  {4.40}), 4.38-4.29 (m, 2H, H<sub>2</sub> {4.34}, H<sub>9a</sub>" {4.29}), 4.26-4.19 (m, 2H, H<sub>9</sub>-Fmoc {4.26}, H<sub>5</sub>

{4.21}), 4.15-4.07 (m, 2H, T<sup>α</sup> {4.15}, H<sub>6a</sub> {4.12}), 4.06-3.94 (m, 4H, H<sub>3</sub> {4.05}, H<sub>9b</sub>" {4.03}, H<sub>6b</sub> {4.01}, H<sub>5</sub>" {3.97}), 3.91-3.86 (m, 1H, H<sub>5</sub>'), 3.79-3.77 (m, 1H, H<sub>6</sub>"'), 3.62 (dd, 1H, J<sub>H<sub>5</sub>',H<sub>6</sub>'a</sub> = 6.3 Hz, J<sub>H<sub>6</sub>'a,H<sub>6</sub>'b</sub> = 9.4 Hz, H<sub>6a</sub>'), 3.44 (dd, 1H, J<sub>H<sub>5</sub>',H<sub>6</sub>'b</sub> = 6.3 Hz, J<sub>H<sub>6</sub>'a,H<sub>6</sub>'b</sub> = 9.4 Hz, H<sub>6b</sub>'), 2.62 (dd, 1H, J<sub>H<sub>3ax</sub>",H<sub>3eq</sub>"</sub> = 12.7 Hz, J<sub>H<sub>3eq</sub>",H<sub>4</sub>"</sub> = 4.4 Hz, H<sub>3eq</sub>"'), 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.07 (s, 6H, CH<sub>3</sub> (2x Ac)), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 2.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ac), 1.56 (dd, 1H, J<sub>H<sub>3ax</sub>",H<sub>3eq</sub>"</sub> = 12.5 Hz, J<sub>H<sub>3ax</sub>",H<sub>4</sub>"</sub> = 12.1 Hz, H<sub>3ax</sub>"'), 1.26 (d, 3H, J<sub>Tβ,Tγ</sub> = 5.8 Hz, T<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CD<sub>3</sub>OD, HMQC), δ (ppm): 172.1, 171.8, 171.5, 171.0, 168.7 (C=O), 159.0 (C=O-Urethan), 145.4 (C1a-, C8a-Fmoc), 142.7 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.8, 134.7 (C<sub>q</sub> (2x Bn)), 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 128.9, 128.8, 128.2 (C<sub>Ar</sub> (2x Bn), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 126.1, 126.0 (C1-, C8-Fmoc), 121.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.7 (C1'), 100.3 (C1), 98.1 (C2"), 77.5 (T<sup>β</sup>), 74.9 (C3), 74.5 (CH<sub>2</sub>-Bn), 73.2 (C5'), 73.0 (C6"), 72.8 (C3'), 71.4 (C4, C2'), 70.9 (C4"), 69.8 (CH<sub>2</sub>-Bn), 69.4 (C4'), 69.3 (C6'), 69.0 (C8"), 68.8 (C5), 68.5 (C7"), 67.5 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 64.3 (C6), 63.5 (C9"), 61.2 (T<sup>α</sup>), 50.4 (C2), 49.2 (C5"), 48.8 (C9-Fmoc), 38.7 (C3"), 23.6, 22.7 (CH<sub>3</sub>-NHAc), 21.7, 21.3, 21.0, 20.78, 20.7, 20.5 (8x CH<sub>3</sub>-OAc), 19.5 (T<sup>γ</sup>).

## 6.8 Darstellung des Triethylenglycolspacers

### 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester<sup>[111]</sup> (60)



Zu einer Lösung von 25.6 mL wasserfreiem Triethylenglycol

(58) in 100 mL THF wird unter Argonatmosphäre 40 mg (0.9 mmol) Natrium hinzugefügt und solange bei Raumtemperatur gerührt, bis sich das Natrium vollständig gelöst hat. Anschließend fügt man 9.6 mL (166.00 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester (59) hinzu und lässt 16 h rühren. Das Reaktionsgemisch wird mit 1.6 mL 1 N HCl neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in 70 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und dreimal mit jeweils 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden mit 30 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat



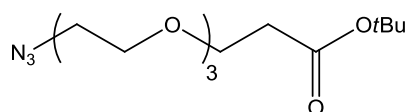
getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und durch nachfolgendes Trocknen i. Hochvak. erhält man das Produkt, das ohne weitere Reinigung umgesetzt werden kann.

Rohausbeute: 16.22 g (58.3 mmol, 88.3 %), hellgelbes Öl,  $R_f = 0.25$  (Laufmittel: EE).

$C_{13}H_{26}O_6$  (M = 278.34 g mol<sup>-1</sup>), [278.17 g mol<sup>-1</sup>].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 3.63-3.49 (m, 14H, 3-CH<sub>2</sub>, 14-CH<sub>2</sub>, 5x -OCH<sub>2</sub>), 2.93 (s<sub>b</sub>, 1H, OH), 2.41 (t, 2H,  $J_{CH_2,CH_2} = 6.6$  Hz, 2-CH<sub>2</sub>), 1.35 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester**<sup>[111]</sup>  
(61)



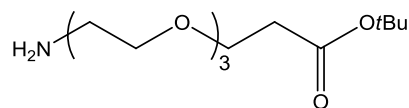
Eine Lösung von 16.22 g (58.3 mmol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (60) in 20 mL absol. Dichlormethan wird mit 20.0 mL (141.6 mmol) Triethylamin versetzt, bevor unter Eiskühlung 9.2 mL (119.50 mmol, 13.69 g) Mesylchlorid zugetropft werden. Anschließend wird die Eiskühlung entfernt und 16 h gerührt. Das gebildete Triethylaminhydrochlorid wird über Hyflo® filtriert und der Filtrückstand mit 150 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird zweimal mit jeweils 20 mL Eiswasser und einmal mit 20 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt.

Der Rückstand wird in 25 mL DMF aufgenommen und mit 23.35 g (359.37 mmol) Natriumazid versetzt. Es wird 15 h bei 60 °C gerührt. Das DMF wird i. Vak. entfernt und der Rückstand in 60 mL Wasser gelöst. Die wässrige Phase wird viermal mit jeweils 60 mL Diethylether extrahiert. Anschließend werden die organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das resultierende Rohprodukt wird durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE, 4:1).

Ausbeute: 8.05 g (26.54 mmol, 46 %), gelbes Öl,  $R_f = 0.34$  (PE/EE, 3:1).

$C_{13}H_{25}N_3O_5$  (M = 303.35 g mol<sup>-1</sup>), [303.18 g mol<sup>-1</sup>].

**12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester**<sup>[111]</sup>  
(62)



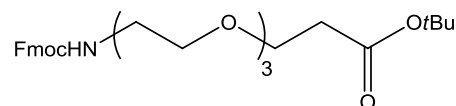
Man versetzt eine Suspension von 5.99 g einer Ni-Al-Legierung in 180 mL Wasser mit Natriumhydroxid-Plättchen bis bei weiterer Zugabe kein Schäumen mehr auftritt. Anschließend wird die Suspension zehn Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor man 30 min. auf 70 °C erwärmt. Die überstehende Lösung des gebildeten Raney-Nickels wird nach dem Erwärmen dekantiert und das gebildete Raney-Nickel wird mit Wasser neutral gewaschen und im Anschluss mehrmals mit Isopropanol getrocknet.

Zum Katalysator werden 8.05 g (26.54 mmol) 12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (61) in 60 mL Isopropanol hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird durch Anlegen eines leichten Vakuums mehrmals evakuiert und mit Argon belüftet, um den Sauerstoff zu entfernen. Anschließend wird mit Wasserstoff überschichtet und 78 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Das Raney-Nickel wird über Hyflo® abfiltriert und der Rückstand viermal mit jeweils 50 mL Isopropanol gewaschen. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und das erhaltene Rohprodukt durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 6.23 g (22.46 mmol, 85 %), gelbes Öl.

C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>7</sub> (M = 277.36 g mol<sup>-1</sup>), [277.19 g mol<sup>-1</sup>].

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester**<sup>[111]</sup> (63)



Eine Lösung von 5.55 g (20.01 mmol) 12-Amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (62) in 270 mL Aceton und Wasser (1:1) wird mit 1.68 g (6.07 mmol) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Unter starkem Rühren werden portionsweise 6.80 g (20.35 mmol) Fmoc-OSu zugegeben und die Suspension 32 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Suspension mit halbkonz. HCl auf pH = 6 angesäuert, wobei sich das Produkt als Öl abscheidet. Das Aceton wird i. Vak. abdestilliert und das Produkt viermal mit jeweils 50 mL Dichlormethan extrahiert. Anschließend wird die organische Phase zweimal mit jeweils 75 mL 1 N HCl und einmal mit 75 mL Wasser

gewaschen, bevor die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet wird. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und das Rohprodukt über Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 4:1).

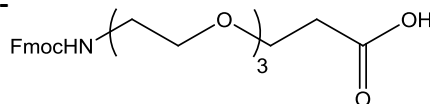
Ausbeute: 8.40 g (14.8 mmol, 74 %), gelbes Öl,  $R_f = 0.15$  (Dichlormethan/Methanol/Essigsäure, 50:1:0.5).

$C_{28}H_{37}NO_7$  (M = 499.60 g mol<sup>-1</sup>) [499.26 g mol<sup>-1</sup>].

ESI (positiv), m/z: 522.3 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 522.3), 466.2 ([M-tBu+Na]<sup>+</sup>, ber.: 466.2)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 7.74 (d, 2H,  $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$  Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2H,  $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$  Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.41-7.18 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.51 (s<sub>b</sub>, 1H, NH-Fmoc), 4.40 (d, 2H,  $J_{CH_2,CH} = 6.6$  Hz, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.20 (t, 1H,  $J_{H_9,CH_2} = 6.6$  Hz, H9-Fmoc), 3.73-3.54 (m, 12H, 6x OCH<sub>2</sub>), 3.39 (t, 2H,  $J_{CH_2,CH_2} = 5.1$  Hz, 12-CH<sub>2</sub>), 2.58 (t, 2H,  $J_{CH_2,CH_2} = 5.9$  Hz, 2-CH<sub>2</sub>), 1.41 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-tBu).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecansäure (64)**



Es werden 3.5 g (7.0 mmol) FmocHN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOtBu (**63**) in 30 mL Trifluoressigsäure 3 mL Wasser und 0.3 mL Anisol gelöst und 2 h gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 30 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird anschließend dreimal mit jeweils 30 mL Toluol und dreimal mit jeweils Dichlormethan kodestilliert. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol/Essigsäure, 50:1:0.5). Das Produkt wird fünfmal mit jeweils 30 mL Toluol und anschließend fünfmal mit jeweils 30 mL Dichlormethan kodestilliert.

Ausbeute: 2.8 g (6.31 mmol, quant.), gelbes Öl,  $R_f = 0.15$  (Dichlormethan/CH<sub>3</sub>OH/Essigsäure, 50:1:0.5).

$C_{24}H_{29}NO_7$  (M = 443.49 g mol<sup>-1</sup>) [443.19 g mol<sup>-1</sup>].

ESI (positiv), m/z: 466.2 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 466.2).

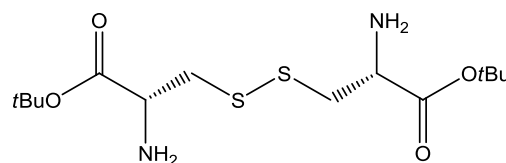
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 7.74 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.4$  Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.54 (t, 2H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.4$  Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.29 (td, 4H,  $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = J_{\text{H}_6,\text{H}_7} = J_{\text{H}_7,\text{H}_6} = 7.4$  Hz, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.51 (s<sub>b</sub>, 1H, NH-Fmoc), 4.22 (d, 2H,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 7.0$  Hz,  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 4.21 (t, 1H,  $J_{\text{H}_9,\text{CH}_2} = 6.7$  Hz, H9-Fmoc), 3.73-3.54 (m, 12H, 6x  $\text{OCH}_2$ ), 2.47 (t, 2H,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.8$  Hz, 12- $\text{CH}_2$ ), 1.42 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 175.2 (COOH), 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.0 (C2-, C7-Fmoc), 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 76.6 (11- $\text{CH}_2$ ), 70.5, 70.4, 70.3 (4x  $\text{OCH}_2$ ), 66.3 (3- $\text{CH}_2$ ), 47.2 (12- $\text{CH}_2$ ), 34.8 (2- $\text{CH}_2$ ).

## 6.9 Synthese von Pam<sub>3</sub>CysOH

### L-Cystin-di-*tert*-butylester<sup>[130]</sup> (**67**)

(H-Cys-OtBu)<sub>2</sub>



Es werden 45.0 g (0.45 mol, 28 mL) 70%-ige Perchlorsäure auf 0 °C abgekühlt, bevor portionsweise 15.0 g (62.4 mmol) L-Cystin (**65**) zugegeben werden. Anschließend werden 350 mL Essigsäure-*tert*-butylester (**66**) hinzugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur gerührt, wobei eine zähflüssige Masse entsteht. Nach 48 h bildet sich eine Lösung, die anschließend im Kühlschrank bei 4 °C für 12 h gelagert wird. Der farblose Feststoff wird abfiltriert und mit eiskaltem Diethylether gewaschen. Der Feststoff wird in Wasser aufgeschlämmt und langsam mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt bis ein pH-Wert von 8 erreicht ist. Die wässrige Phase wird dreimal mit jeweils 150 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und zweimal mit jeweils 100 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das Produkt kann ohne weitere Reinigung in die nächste Synthese eingesetzt werden.

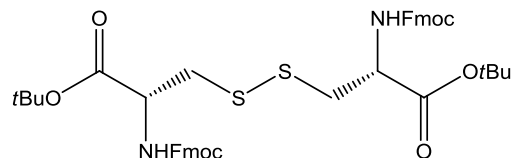
Ausbeute: 18.8 g (53.2 mmol, 85 %), gelbes Öl,  $[\alpha]_D^{22} = -21.4$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), Lit.<sup>[177]</sup>:  $[\alpha]_D^{24} = -23.19$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f = 0.19$  (EE).

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$  ( $M = 352.51$  g mol<sup>-1</sup>) [352.15 g mol<sup>-1</sup>].

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3.51 (t, 2H,  $J_{\text{H}\alpha,\text{CH}_2} = 6.4$  Hz, 2x  $\text{CH}\alpha$ ), 2.96-2.90 (m, 4H, 2x  $\text{CH}_2$ ), 2.65 ( $s_b$ , 4H, 2x  $\text{NH}_2$ ), 1.42 (s, 18H, 2x  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 172.9 (C=O), 80.7 ( $\text{C}_q$  (tBu)), 54.3 ( $\text{CHNH}_2$ ), 44.0 ( $\text{CH}_2\text{S}$ ), 27.8 ( $\text{CH}_3$  (tBu)).

***N,N'*-(Di-(9H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-cystin-di-*tert*-butylester<sup>[116]</sup> (68)**



Es werden 15.5 g (44.1 mmol) L-Cystin-di-*tert*-butylester

(67) in 160 mL absol. THF gelöst und portionsweise mit 44.4 g (118.6 mmol) *Fmoc*-OSu versehen. Anschließend werden 11.1 mL (10.2 g, 100.6 mmol) *N*-Methylmorpholin in 11 mL absol. THF zugegeben und diese Lösung langsam zu der Reaktionsmischung unter Argonatmosphäre zugetropft. Es wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel i. Vak. entfernt wird. Der Rückstand wird in 250 mL Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase zweimal mit jeweils 100 mL 5%-iger Citronensäure-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Dichlormethan/Methanol (1:4). Der farblose Feststoff wird mit kaltem *tert*-Butanol/Isopropanol (1:1) gewaschen und i. Vak. getrocknet.

Ausbeute: 24.25 g (30.4 mmol, 69 %), farbloser Feststoff,  $R_f = 0.42$  ( $^c$ Hex/EA, 1:2).

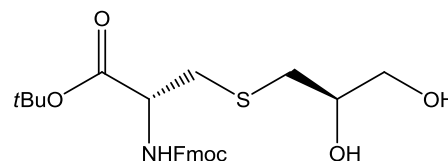
$\text{C}_{44}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$  ( $M = 796.99$  g mol $^{-1}$ ) [796.29 g mol $^{-1}$ ].

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 7.75 (d, 4H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.4$  Hz, 2x  $\text{H}_4$ -, 2x  $\text{H}_5$ -Fmoc), 7.58 (d, 4H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.4$  Hz, 2x  $\text{H}_1$ -, 2x  $\text{H}_8$ -Fmoc), 7.30 (m, 8H, 2x  $\text{H}_2$ -, 2x  $\text{H}_3$ -, 2x  $\text{H}_6$ -, 2x  $\text{H}_7$ -Fmoc), 5.65 ( $s_b$ , 2H, 2x  $\text{NH-Fmoc}$ ), 4.30 (d, 4H,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 7.3$  Hz, 2x  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 4.21 (t, 2H,  $J_{\text{H}_9,\text{CH}_2} = 6.7$  Hz, 2x  $\text{H}_9$ -Fmoc), 3.24-3.08 (m, 4H,  $J_{\text{CH}_2,\text{SH}\alpha} = 7.6$  Hz, 2x  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.44 (s, 18H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 169.8, 156.5 (C=O), 143.9 ( $\text{C}_{1a}$ -,  $\text{C}_{8a}$ -Fmoc), 141.5 ( $\text{C}_{4a}$ -,  $\text{C}_{5a}$ -Fmoc), 127.7 ( $\text{C}_3$ -,  $\text{C}_6$ -Fmoc), 127.0 ( $\text{C}_2$ -,  $\text{C}_7$ -Fmoc), 125.3 ( $\text{C}_1$ -,  $\text{C}_8$ -Fmoc), 119.9 ( $\text{C}_4$ -,  $\text{C}_5$ -Fmoc), 83.4 ( $\text{C}_q$  (tBu)), 67.4 ( $\text{CH}_2$ -Fmoc), 47.4 ( $\text{CHNH}_2$ ), 42.1 ( $\text{CH}_2\text{S}$ ), 28.0 ( $\text{CH}_3$  (tBu)).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-dihydroxy-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester<sup>[129]</sup> (70)**

Es werden 4.0 g (5.0 mmol) *N,N'*-(Di-(9*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*L*-cystin-di-*tert*-butylester (68) in 50 mL



absol. entgastem Dichlormethan gelöst und mit 2.3 g (35.7 mmol) Zinkstaub versetzt. Die Reaktionsmischung wird stark gerührt und es werden 17 mL einer Lösungsmittelmischung aus Methanol/konz. Salzsäure/konz. Schwefelsäure (100:7:1) zugegeben. Nach 30 min Rühren werden 1.9 g (1.7 mL, 25.7 mmol) (*R*)-(+)-Glycidol (69) zugetropft und anschließend 12 h bei 40 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wird i. Vak. eingengt und mit 6 mL 5%-iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung versetzt. Nach 18 h bei +4 °C wird die Mischung über Hyflo® filtriert und die organische Phase von der wässrigen Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird dreimal mit jeweils 100 mL Dichlormethan extrahiert und die organischen Phasen werden anschließend vereinigt und dreimal mit jeweils 50 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wird nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat i. Vak. entfernt und der Rückstand wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EA, 2:1).

Ausbeute: 1.85 g (3.9 mmol, 78 %), farbloser Feststoff,  $R_f = 0.38$  (<sup>c</sup>Hex/EA,1:2).

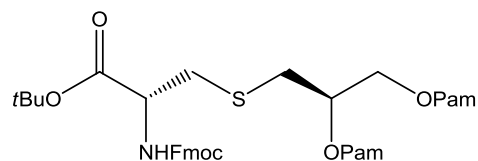
$C_{25}H_{31}NO_6S$  (M = 473.58 g mol<sup>-1</sup>), [473.19 g mol<sup>-1</sup>].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 7.75 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6}$  7.5 Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.58 (d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H8,H7}$  7.5 Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.38-7.31 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.65 (s<sub>b</sub>, 2H, NH-Fmoc), 4.50 (m, 1H, H $\alpha$ ), 4.36 (d, 2H,  $J_{CH_2,CH} = 6.7$  Hz, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.20 (t, 1H,  $J_{CH-Fmoc,CH_2-Fmoc} = 6.7$  Hz, CH-Fmoc), 3.76-3.74 (m, 1H, CHOH), 3.66 (m, 1H, HOCH<sub>2</sub>), 3.49 (dd, 1H,  $J_{HOCH_2,CHOH} = 5.9$  Hz,  $J_{HOCH_2,HOCH_2} = 10.9$  Hz, HOCH<sub>2</sub>), 3.04-2.88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>S), 2.88-2.86 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>), 2.62-2.60 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.46 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 143.7, 141.9 (C=O), 129.0 (C1a-.C8a-Fmoc), 128.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.0 (C2-, C7-Fmoc), 125.3 (C1-, C8-Fmoc), 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 83.3 (C<sub>q</sub> (tBu)), 70.4 (CHOH), 67.3 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 65.2 (CH<sub>2</sub>OH), 47.1 (CH-Fmoc), 36.8 (CH $\alpha$ ), 35.7 (CH<sub>2</sub>S), (CH<sub>3</sub> (tBu)).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester<sup>[129]</sup> (71)**

Es werden 1.85 g (3.9 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxy-carbonyl)-*S*-[2,3-dihydroxy-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (70) in 30 mL absol. THF



gelöst und 3.3 g (12.6 mmol) Palmitinsäure, 2.5 mL (16.2 mmol) DIC und 0.2 g (1.6 mmol) DMAP zugegeben. Unter Argonatmosphäre wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 2 mL Essigsäure wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt aus Dichlormethan/Methanol, 1:20 umkristallisiert.

Ausbeute: 3.14 g (3.3 mmol, 85 %), farbloser Feststoff,  $R_f = 0.29$  (<sup>c</sup>Hex/EE, 1:2), Schmp. = 40-42 °C.

$C_{57}H_{91}NO_8S$  ( $M = 950.40 \text{ g mol}^{-1}$ ), [949.65  $\text{g mol}^{-1}$ ].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 7.75 (d, 2H,  $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.5$  Hz, H<sub>4</sub>-, H<sub>5</sub>-Fmoc), 7.58 (d, 2H,  $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.5$  Hz, H<sub>1</sub>-, H<sub>8</sub>-Fmoc), 7.38-7.31 (m, 4H, H<sub>2</sub>-, H<sub>3</sub>-, H<sub>6</sub>-, H<sub>7</sub>-Fmoc), 5.65 (s<sub>b</sub>, 2H, NH-Fmoc), 5.17-5.11 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.48-4.50 (m, 1H, H $\alpha$ ), 4.36-4.10 (m, 5H, CH<sub>2</sub>(Fmoc), CH (Fmoc), OCH<sub>2</sub> (Glyceryl)), 3.03-3.00 (m, 2H, CH<sub>2</sub>S), 2.80-2.75 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>), 2.32-2.24 (m, 6H, 3x  $\alpha$ CH<sub>2</sub>(Pam)), 1.56-1.52 (m, 6H, 3x  $\beta$ CH<sub>2</sub>(Pam)), 1.48 (s, 9H, CH<sub>3</sub> (tBu)), 1.24 (s<sub>b</sub>, 48H, 2x (CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub> (Pam)), 0.86 (t, 6H,  $J_{CH_3,CH_2} = 6.7$  Hz, 2x CH<sub>3</sub> (Pam)).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 173.3, 173.1 (3C, C=O), 156.1 (Urethan, C=O), 143.7 (C1a-.C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.3 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 83.0 (C<sub>q</sub> ((tBu)), 70.4, 70.1 (CH (Glyceryl)), 67.3 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 63.3 (CH<sub>2</sub> (Glyceryl)), 54.3 (C $\alpha$ ), 47.1 (CH-Fmoc), 35.4 (C $\beta$ ), 34.3, 34.2, 34.1, 31.8 (Glyceryl), 28.1 (CH<sub>3</sub> (tBu)), 14.1 (3x CH<sub>3</sub>(Pam)).

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester<sup>[129]</sup> (72)**

Es werden 2.63 g (2.77 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (71) in 30 mL DMF/Piperidin (1:1) gelöst und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wird i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit jeweils 25 mL Toluol kodestilliert. Das freie Amin wird in 45 mL Dichlormethan/DMF (5:2) aufgenommen und mit 1.2 g (4.69 mmol) Palmitinsäure, 0.6 g (4.43 mmol) HOBt x H<sub>2</sub>O und 0.6 g (4.43 mmol) *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) versetzt und 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und dreimal mit jeweils 50 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung erfolgt über Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EE, 3:1).

Ausbeute: 3.14 g (2.6 mmol, quant.), farbloser Feststoff,  $R_f = 0.29$  (<sup>c</sup>Hex/EE, 1:2),  $[\alpha]_D^{22} = 1.72$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>), Lit.<sup>[177]</sup>:  $[\alpha]_D^{24} = 4.18$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>).

C<sub>58</sub>H<sub>111</sub>NO<sub>7</sub>S (M = 966.57 g mol<sup>-1</sup>), [965.81 g mol<sup>-1</sup>].

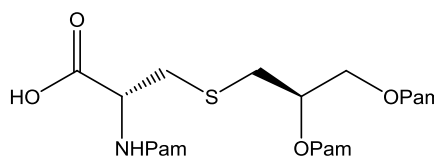
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 6.32-6.30 (m, 1H, NH), 5.12-5.10 (m, 1H, H $\alpha$ ), 4.70-4.67 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.32-4.20 (m, 1H, OCH<sub>2a</sub> (Glyceryl)), 4.10-4.08 (m, 1H, OCH<sub>2b</sub> (Glyceryl)), 3.10-3.00 (m, 2H, H $\beta$ ), 2.70 (d, 2H,  $J_{CH_2,CH} = 6.5$  Hz, SCH<sub>2</sub> (Glyceryl)), 2.32-2.20 (m, 6H, 3x  $\alpha$ CH<sub>2</sub>(Pam)), 1.65-1.55 (m, 6H, 3x  $\beta$ CH<sub>2</sub>(Pam)), 1.46 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Bu)), 1.24 (s<sub>b</sub>, 72H, 3x (CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>(Pam)), 0.84 (t, 9H,  $J_{CH_3,CH_2} = 6.4$  Hz, 3x CH<sub>3</sub>(Pam)).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 173.0, 172.9, 169.7 (4C, 4x C=O), 82.9 (C<sub>q</sub> ((*t*Bu))), 70.4, 70.1 (CH (Glyceryl)), 63.4 (1C, OCH<sub>2</sub>(Glyceryl)), 52.3 (C $\alpha$ ), 35.4 (C $\beta$ ), 36.5, 34.3, 34.2, 34.1, 31.8, 29.7, 29.6, 29.3, 24.9, 22.7 (42C, 3x (CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>(Pam)), 33.2(1C, SCH<sub>2</sub> (Glyceryl)), 28.1 (CH<sub>3</sub> (*t*Bu)), 14.1 (3x CH<sub>3</sub>(Pam)).



***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein<sup>[129]</sup> (**73**)**

Es werden 3.14 g (2.6 mmol) *N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyl-oxy)-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (**72**) in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit 1.5 mL Anisol



und 35 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wird 90 min bei Raumtemperatur gerührt und die Lösung wird anschließend mit 30 mL Toluol verdünnt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird dreimal mit jeweils 50 mL Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt über Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE).

Ausbeute: 2.09 g (2.3 mmol, 88 %.), farbloser Feststoff,  $R_f = 0.20$  (EE/AcOH, 10:0.1), Schmp. = 62 °C,  $[\alpha]_D^{22} = 5.58$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.<sup>[177]</sup>:  $[\alpha]_D^{23} = 4.18$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

C<sub>54</sub>H<sub>103</sub>NO<sub>7</sub>S (M = 910.46 g mol<sup>-1</sup>), [909.75 g mol<sup>-1</sup>].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 6.53 (d, 1H,  $J_{\text{NH,CH}} = 6.9$  Hz, NH), 5.16-5.11 (m, 1H, H $\alpha$ ), 4.73-4.71 (m, 1H, CH (Glycerol)), 4.32 (dd, 1H,  $J_{\text{CH}_2\text{-Gly,CH}_2\text{-Gly}} = 3.6$  Hz,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2\text{-Gly}} = 12.0$  Hz, OCH<sub>2a</sub> (Glycerol)), 4.14-4.06 (m, 1H, OCH<sub>2b</sub> (Glycerol)), 3.16-2.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>S), 2.72 (d, 2H,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}\alpha} = 6.5$  Hz, CH<sub>2</sub>), 2.38-2.16 (m, 6H, 3x  $\alpha$ CH<sub>2</sub>(Pam)), 1.62-1.52 (m, 6H, 3x  $\beta$ CH<sub>2</sub>(Pam)), 1.19 (s<sub>b</sub>, 72H, 3x (CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>(Pam)), 0.85 (t, 9H,  $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 6.6$  Hz, 3x CH<sub>3</sub>(Pam)).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 174.4, 174.2, 173.6, 172.8 (4C, 4x C=O), 70.4, 70.1 (CH (Glycerol)), 63.6 (1C, OCH<sub>2</sub>(Glycerol)), 52.0 (C $^\alpha$ ), 36.3 (C $^\beta$ ), 35.6, 34.8, 34.3, 32.9, 31.9, 29.7, 29.5, 29.3, 29.1, 28.9, 25.5, 25.3, 24.9, 24.8, 24.7, 24.3, 24.2, 24.0, 22.7 (42C, 3x (CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>(Pam)), 33.4 (1C, SCH<sub>2</sub> (Glycerol)), 14.1 (3x CH<sub>3</sub>(Pam)).

## 6.10 Festphasenpeptid- und -glycopeptidsynthesen

Die automatisierten Peptidsynthesen werden in einem Perkin-Elmer ABI 433A Peptidsynthesizer der Applied Biosystems durchgeführt. Es werden vorbeladene Tentagel-Harze wie das *Fmoc-Pro-Trt* und *Fmoc-Arg(Pmc)-Trt* (*Rapp Polymer*, Tübingen) verwendet. In iterativen Syntheseschritten wird die temporäre Fmoc-Schutzgruppe mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon (NMP) abgespalten (3 x 2.5 min). Dabei wird als Reaktionskontrolle die UV-Absorption des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts wird mit einem externen *Perkin-Elmer* Series 200 UV/Vis Detektor bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 301$  nm gemessen. Die anschließenden Kupplungen der Fmoc-Aminosäuren werden mit einer Lösung von 1 mmol des Fmoc-geschützten Aminosäurebausteins, 1 mmol HBTU, 1 mmol 1-Hydroxybenzotriazol und 2 mmol *N*-Ethyl-diisopropylamin (*Hünig* Base) in DMF unter starkem Schütteln (Vortex, 20-30 min) durchgeführt. Das Harz wird nach jedem Kupplungsschritt der Aminosäuren mit einer Lösung aus 0.5 M Acetanhydrid, 0.12 M Ethyl-diisopropylamin und 0.015 M 1-Hydroxybenzotriazol in NMP (Capping-Reagenz) behandelt, um freie nicht umgesetzte Aminogruppen zu acetylieren (Vortex, 5 min). Bei schwierigen Kupplungen erfolgt die Aminosäurekupplung zwei- oder mehrfach, wobei das Harz jeweils zweimal ohne zwischenzeitliche Acetylierung mit einer Lösung von 1 mmol der zu kuppelnden Fmoc-Aminosäure, 1 mmol HOAt, 1 mmol HATU und 2 mmol *N*-Ethyl-diisopropylamin in DMF behandelt wird. Nach jedem Synthesesyklus wird das Harz mit NMP gewaschen und nach dem abschließenden Syntheseschritt zusätzlich mit Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffgegenstrom getrocknet.

## 6.11 Darstellung der Glycopeptide basierend auf der MUC1-Struktur und Spacer

**Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (74)**

$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr}(\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc})\text{-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH}$

Ausgehend von 455 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Pro-*O*-Trt vorbeladenen Tentagel-Harzes (**75**) (Rapp Polymere, Beladung: 0.22 mmol g<sup>-1</sup>) erfolgt die Glycopeptidsynthese im Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll. Die Kupplung des Saccharids-Aminosäure-Konjugats (**22**) wird manuell im Reaktor des Peptidsynthesizers vorgenommen. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe des harzgebundenen Peptids durch 3 x 2.5 min Behandlung mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP entfernt. Eine Lösung von 141.0 mg (0.2 mmol, 2 eq.) des T<sub>N</sub>-Threonin-Konjugats (**22**), 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55  $\mu\text{L}$  (0.5 mmol, 5 eq.) NMM in 2 ml NMP wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt. Es wird 8 h stark geschüttelt (je 30 s Vortex, 30 s Pause). Eventuell noch verbliebene Aminogruppen werden acetyliert. Das Harz wird mit NMP gewaschen, und die restlichen Aminosäuren werden nach dem Standardverfahren im Synthesizer gekuppelt. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe an Glycin wird mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Die Kupplung des Spacers erfolgt manuell. Es werden 443.5 mg (1 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxadecansäure (**64**), aktiviert mit einer Lösung aus 1 mmol HBTU, 1 mmol HOBt und 2 mmol DIPEA in NMP, zum Harz gegeben. Die Kupplungszeit beträgt 20 Minuten. Nach Behandlung mit Capping-Reagenz wird die terminale Fmoc Schutzgruppe mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten, und das Harz wird gründlich mit NMP und Dichlormethan gewaschen. Die Abspaltung vom Harz erfolgt in einem Merrifield-Reaktor. Das Harz wird 1.5 h mit einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure, 1 mL Triisopropylsilan und 1 mL H<sub>2</sub>O geschüttelt. Anschließend wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 mL Toluol versetzt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 25 mL Toluol kodestilliert und die

Lösung schließlich i. Vak. eingeengt. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von 20 mL eisgekühltem Diethylether ausgefällt. Der Überstand wird abdekantiert und der Niederschlag in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohpeptid wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)<sub>0.1% TFA</sub>, (5:95)→(70:30), 80 min, λ = 214 nm, R<sub>t</sub> = 23.6 min) gereinigt.

Ausbeute: 60 mg (0.025 mmol, 25 %.), farbloses Lyophilisat, Phenomenex Luna, Gradient: (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)<sub>0.1% TFA</sub>, (5:95)→(70:30), 80 min, λ = 214 nm, R<sub>t</sub> = 23.6 min)

C<sub>103</sub>H<sub>163</sub>N<sub>27</sub>O<sub>40</sub> (M = 2419.55 g mol<sup>-1</sup>) [2418.16 g mol<sup>-1</sup>].

**Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-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-α-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (76)**

H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-(αAc<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-(2→6)-αAc<sub>2</sub>GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH

Ausgehend von 455 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt vorbeladenen Tentagel-Harzes (**74**) (Rapp Polymere, Beladung: 0.22 mmol g<sup>-1</sup>) erfolgt die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll. Die Kupplung des Glycosylaminosäure-Konjugats (**40**) wird manuell im Reaktor des Peptidsynthesizers vorgenommen. Hierzu wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe des harzgebundenen Peptids durch 3 x 2.5 min Behandlung mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP entfernt. Eine Lösung von 237 mg (0.2 mmol, 2 eq.) des Sialyl-T<sub>N</sub>-Threonin-Konjugats (**40**), 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55 μL (0.5 mmol, 5 eq.) NMM in 2 ml NMP wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und es wird 8 h stark geschüttelt (je 30 s Vortex, 30 s Pause). Eventuell noch verbliebene Aminogruppen werden acetyliert, das Harz wird mit NMP gewaschen, und die restlichen Aminosäuren werden nach dem Standardverfahren im Synthesizer gekuppelt. Die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe an Glycin wird mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Die Kupplung des Spacers erfolgt manuell. Es werden 443.5 mg (1 mmol) N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-

trioxadecansäure (**64**), aktiviert mit einer Lösung aus 1 mmol HBTU, 1 mmol HOBt und 2 mmol DIPEA in NMP, zum Harz gegeben. Die Kupplungszeit beträgt 20 Minuten. Nach Behandlung mit Capping-Reagenz wird die terminale Fmoc Schutzgruppe mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten, und das Harz wird gründlich mit NMP und Dichlormethan gewaschen. Die Abspaltung vom Harz erfolgt in einem Merrifield-Reaktor. Das Harz wird 1.5 h mit einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure, 1 mL Triisopropylsilan und 1 mL H<sub>2</sub>O geschüttelt. Anschließend wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 mL Toluol versetzt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 25 mL Toluol kodestilliert und die Lösung schließlich i. Vak. eingengt. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von 20 mL eisgekühltem Diethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird abdekantiert und in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohpeptid wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)<sub>0.1% TFA</sub>, (5:95)→(70:30), 80 min, λ = 214 nm, R<sub>t</sub> = 23.6 min) gereinigt.

Ausbeute: 35 mg (0.012 mmol, 12 %.), farbloses Lyophilisat, Phenomenex Luna, Gradient: (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)<sub>0.1% TFA</sub>, (5:95)→(70:30), 80 min, λ = 214 nm, R<sub>t</sub> = 23.6 min)

C<sub>127</sub>H<sub>192</sub>N<sub>28</sub>O<sub>51</sub> (M = 2927.04 g mol<sup>-1</sup>) [2925.33 g mol<sup>-1</sup>].

**Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (77)**

H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(αGalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH

Es werden 60 mg (0.025 mmol) des Glycopeptides H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(αAc<sub>3</sub>GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (**74**) in 250 mL wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH = 11.5, 100 mg NaOH-Plättchen/500 mL Wasser) gelöst. Der pH-Wert wird konstant gehalten. Nach vollständiger Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen wird mit 1 N Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird durch semi-präparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna, Gradient: (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)<sub>0.1% TFA</sub>, (5:95)→(70:30), 80 min, λ = 214 nm, R<sub>t</sub> = 9.6 min)

Ausbeute: 21 mg (0.009 mmol, 38 %.), farbloses Lyophilisat, Phenomenex Luna, Gradient:  $(\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O})_{0.1\% \text{ TFA}}$ , (5:95)→(70:30), 80 min,  $\lambda = 214 \text{ nm}$ ,  $R_t = 9.6 \text{ min}$

$\text{C}_{97}\text{H}_{157}\text{N}_{27}\text{O}_{37}$  (M = 2293.44 g mol<sup>-1</sup>) [2292.12 g mol<sup>-1</sup>].

**Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (78)**

$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-(}\alpha\text{NeuNAcCOOH-(2}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH}$

Es werden 35 mg (0.012 mmol) des Glycopeptides  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-(}\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{Ac}_2\text{GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (76)}$  in 250 mL wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH = 11.5, 100 mg NaOH-Plätzchen/500 mL Wasser) gelöst und der pH-Wert konstant gehalten. Nach vollständiger Abspaltung der Acetyl- und Benzyl-Schutzgruppen wird mit 1 N Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird durch semi-präparative HPLC gereinigt (Phenomenex Luna C18, Gradient:  $(\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O})_{0.1\% \text{ TFA}}$ , (5:95)→(70:30), 80 min,  $\lambda = 214 \text{ nm}$ ,  $R_t = 8.3 \text{ min}$ )

Ausbeute: 14 mg (0.005 mmol, 45 %.), farbloses Lyophilisat, Phenomenex Luna, Gradient:  $(\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O})_{0.1\% \text{ TFA}}$ , (5:95)→(70:30), 80 min,  $\lambda = 214 \text{ nm}$ ,  $R_t = 8.3 \text{ min}$

$\text{C}_{108}\text{H}_{174}\text{N}_{28}\text{O}_{45}$  (M = 2584.70 g mol<sup>-1</sup>) [2583.22 g mol<sup>-1</sup>].

## 6.12 Darstellung der Quadratsäuremonoester

### 1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxy-3,4-dion (79)

EtO-Squarat-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH

Es werden 0.96  $\mu$ L (1.1 mg, 0.0065 mmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (**80**) zu einer Lösung von 12.0 mg (0.0053 mmol) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (**77**) in 2.5 mL einer Mischung aus EtOH/H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:1 pipettiert. Es werden in einem Zeitraum von 5 min jeweils 5  $\mu$ L einer gesättigten Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung zugetropft, so dass ein pH-Wert von 8 erreicht wird. Die Reaktionslösung wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgt durch analytische RP-HPLC bis kein Edukt mehr vorhanden ist. Die Reaktionslösung wird mit 1 N Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in Millipore-Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Der Quadratsäuremonoester wird anschließend über semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, Gradient: (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN)<sub>0.1%TFA</sub>, 90:10 $\rightarrow$ 20:80 in 45 min,  $\lambda$  = 214 nm, R<sub>t</sub> = 15.2min).

Ausbeute: 4.8 mg (0.0019 mmol, 45 %), farbloser, amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = -28.6$  (c = 1.00, H<sub>2</sub>O), Phenomenex Luna C18, Gradient: (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN)<sub>0.1%TFA</sub>, 90:10 $\rightarrow$ 20:80 in 45 min,  $\lambda$  = 214 nm, R<sub>t</sub> = 15.2min.

C<sub>103</sub>H<sub>161</sub>N<sub>27</sub>O<sub>40</sub> (M = 2417.54 g mol<sup>-1</sup>) [2416.14].

ESI-MS (positiv), m/z: 1246.03 ([M+2K]<sup>2+</sup>, ber.: 1247.17), 838.88 ([M+2K+Na]<sup>3+</sup>, ber.: 839.11), 777.37 ([M-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>+2H+K]<sup>3+</sup>, ber.: 777.70).

**1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)-onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxy-3,4-dion (81)**

EtO-Squarat-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ NeuNAcCOOH-(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH

Es werden 0.90  $\mu$ L (1.1 mg, 0.0065 mmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (**80**) zu einer Lösung von 15.7 mg (0.0053 mmol) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ NeuNAcCOOH-(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ GalNAc))-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (**78**) in 4 mL einer Mischung aus EtOH/H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:1 pipettiert. Es werden in einem Zeitraum von 5 min jeweils 4  $\mu$ L einer gesättigten Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung zugetropft, so dass ein pH-Wert von 8 erreicht wird. Die Reaktionslösung wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktionskontrolle erfolgt über analytische RP-HPLC bis kein Edukt mehr vorhanden ist. Die Reaktionslösung wird mit 1 N Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in Millipore-Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Der Quadratsäuremonoester wird anschließend über semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, Gradient: (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN)<sub>0.1%TFA</sub>, 90:10 $\rightarrow$ 20:80 in 45 min,  $\lambda$  = 214 nm, R<sub>t</sub> = 17.4 min)-

Ausbeute: 9.0 mg (0.0033 mmol, 62 %), farbloser, amorpher Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = -21.2$  (c = 1.00, H<sub>2</sub>O), (Phenomenex Luna C18, Gradient: (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN)<sub>0.1%TFA</sub>, 90:10 $\rightarrow$ 20:80 in 45 min,  $\lambda$  = 214 nm, R<sub>t</sub> = 17.4 min).

C<sub>114</sub>H<sub>178</sub>N<sub>28</sub>O<sub>48</sub> (M = 2708.79 g/mol) [2707.23].

ESI-MS (positiv), m/z: 567.28 ([M+4Na+K]<sup>5+</sup>, ber.: 567.66), 282.30 ([M+5H+5Na]<sup>10+</sup>, ber.: 282.72).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm): 7.88 (d, 1H, J<sub>H<sub>2</sub>,NH</sub> = 8.24 Hz, H<sup>Im-H<sub>2</sub></sup>), 7.25 (d, 1H, J<sub>H<sub>4</sub>,NH</sub> = 8.92 Hz, H<sup>Im-H<sub>4</sub></sup>), 4.96 (d, 1H, J<sub>H<sub>1</sub>,H<sub>2</sub></sub> = 4.90 Hz, H<sub>1</sub>), 4.59-3.99 (m, 26H, D <sup>$\alpha$</sup>  {4.59}, CH<sub>2</sub>O-Squarat {4.58}, H <sup>$\alpha$</sup>  {4.57}, S<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.55}, S<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.49}, A<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.47}, A<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.46}, A<sub>3-4</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.43}, R <sup>$\alpha$</sup>  {4.42}, P<sub>1-5</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.42, 4.35, 4.29, 4.28, 4.28}, T<sub>STN</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.27}, T<sub>STN</sub> {4.21}, V <sup>$\alpha$</sup>  {4.09}, T<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.08}, T<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.06}, H<sub>6a</sub> {4.08}, H<sub>6b</sub> {4.07}, T<sub>2</sub> <sup>$\beta$</sup>  {4.01}, H<sub>2</sub> {4.01}, T<sub>1</sub> <sup>$\beta$</sup>  {4.00}), 3.97-3.58 (m, 36H, G<sub>1-2</sub> <sup>$\alpha\alpha$</sup>  {3.93}, G<sub>1-2</sub> <sup>$\alpha\beta$</sup>



{3.92}, S<sub>2</sub><sup>β</sup> {3.90}, D<sup>βa</sup> {3.88}, S<sub>1</sub><sup>β</sup> {3.87}, D<sup>βb</sup> {3.86}, H<sub>3</sub> {3.70}, 4x CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.79}, H<sub>5</sub> {3.75}, R<sup>δ</sup> {3.74}, P<sub>1-5</sub><sup>δ</sup> {3.65, 3.64, 3.59, 3.57, 3.56}, 3-CH<sub>2</sub>-Spacer {3.66}, H<sub>4</sub> {3.64}), 3.53-3.34 (m, 7H, H<sub>6</sub><sup>"</sup> {3.53}, H<sub>9a</sub><sup>"</sup> {3.53}, H<sub>4</sub><sup>"</sup> {3.52}, H<sub>7</sub><sup>"</sup> {3.51}, H<sub>9b</sub><sup>"</sup> {3.50}, H<sub>8</sub><sup>"</sup> {3.48}, H<sub>5</sub><sup>"</sup> {3.47}), 3.27-3.17 (m, 2H, H<sup>βa</sup> {3.21}, H<sup>βb</sup> {3.14}), 3.10-3.02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Spacer), 2.32-2.09 (m, 2H, H<sub>3eq</sub><sup>"</sup> {2.18}, CH<sub>2</sub>-Spacer {2.12}), 2.32-1.95 (m, 24H, R<sup>βa</sup> {1.99}, R<sup>βb</sup> {1.97}, P<sub>1-5</sub><sup>β</sup> {2.31, 2.22, 2.21, 2.27, 2.26}, P<sub>1-5</sub><sup>δ</sup> {2.00, 1.98, 1.97, 1.95}), 1.47, 1.46 (2xs, 6H, AcNH), 1.58-1.55 (m, 1H, H<sub>3ax</sub><sup>"</sup> {1.56}), 1.47-1.35 (m, 17H, A<sub>3,4</sub><sup>β</sup> {1.47}, A<sub>1,2</sub><sup>β</sup> {1.45}, R<sup>γ</sup> {1.46}, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-Squarat {1.37}), 1.33-1.28 (m, 1H, V<sup>β</sup> {1.33}), 1.18 (d, 3H, J<sub>Tγ,Tβ</sub> = 6.40 Hz, T<sub>STN</sub><sup>γ</sup>), 1.08 (d, 3H, J<sub>Tγ,Tβ</sub> = 6.24 Hz, T<sub>2</sub><sup>γ</sup>), 1.07 (d, 3H, J<sub>Tγ,Tβ</sub> = 6.24 Hz, T<sub>1</sub><sup>γ</sup>), 0.92-0.88 (m, 9H, V<sup>γ</sup> {0.89}).

<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, MeOD, HSQC, DEPT) δ (ppm): 189.0 (C=O-Squarat), 174.9, 174.8, 174.3, 174.1, 173.9, 173.5, 173.2, 172.9, 172.4, 172.3, 172.0, 171.9, 171.4, 171.2, 170.9, 170.8, 170.5, 170.2, 169.8, 169.5 (C=O, C=O-Acetyl, C<sup>1"</sup>), 155.6 (O-C=C-Squarat), 132.3 (C=C-N-Squarat), 133.3 (H<sub>2</sub>), 130.1 (H<sup>Im-C2</sup>), 120.1 (H<sup>Im-C4</sup>), 100.6 (C<sup>2"</sup>), 99.6 (C<sub>1</sub>), 77.58 (T<sub>STN</sub><sup>β</sup>), 68.1 (CH<sub>2</sub>-Spacer), 68.0 (C<sub>3</sub>), 67.9 (C<sup>7"</sup>), 68.2 (T<sub>2</sub><sup>β</sup>), 67.8 (T<sub>1</sub><sup>β</sup>), 67.7 (C<sup>8"</sup>), 67.5 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-Squarat), 67.3 (C<sub>4</sub>), 67.2 (C<sup>9"</sup>), 67.1 (C<sup>6"</sup>), 66.9 (C<sub>5</sub>), 66.8 (C<sup>4"</sup>), 62.4 (S<sub>2</sub><sup>β</sup>), 62.1 (S<sub>1</sub><sup>β</sup>), 61.8 (T<sub>2</sub><sup>α</sup>), 61.7 (T<sub>1</sub><sup>α</sup>), 61.5 (C<sub>6</sub>), 60.3, 60.1, 60.0 (P<sub>1-5</sub><sup>α</sup>), 59.8 (V<sup>α</sup>), 58.7 (T<sub>STN</sub><sup>α</sup>), 56.2 (S<sub>2</sub><sup>α</sup>), 56.1 (S<sub>1</sub><sup>α</sup>), 53.4 (C<sup>5"</sup>), 50.9 (H<sup>α</sup>), 49.4 (R<sup>α</sup>), 49.3 (D<sup>α</sup>), 49.2 (C<sub>2</sub>), 49.1, 49.0, 48.3 (A<sub>3-4</sub><sup>α</sup>, A<sub>1</sub><sup>α</sup>), 47.7, 47.6, 47.5, 47.4 (P<sub>1-5</sub><sup>δ</sup>), 42.5 (G<sub>2</sub><sup>α</sup>), 42.4 (G<sub>1</sub><sup>α</sup>), 42.0 (CH<sub>2</sub>-Spacer), 40.6 (R<sup>δ</sup>), 40.4 (C<sup>3"</sup>), 40.3 (CH<sub>2</sub>-Spacer), 40.0 (D<sup>β</sup>), 29.8 (V<sup>β</sup>), 30.1, 30.0, 29.9, 29.8 (P<sub>1-5</sub><sup>β</sup>), 29.6 (R<sup>β</sup>), 28.4 (H<sup>β</sup>), 25.2, 25.1, 24.9, 24.6 (P<sub>1-5</sub><sup>γ</sup>), 23.8 (R<sup>γ</sup>), 21.2, 20.9 (CH<sub>3</sub>-AcNH), 18.6 (T<sub>1</sub><sup>γ</sup>), 18.2 (T<sub>2</sub><sup>γ</sup>), 18.0 (V<sup>γ</sup>), 17.7 (T<sub>STN</sub><sup>γ</sup>), 15.4, 15.2, 15.1, 14.9 (A<sub>1-4</sub><sup>β</sup>), 14.9 (CH<sub>3</sub>-Squarat).

## 6.13 Darstellung der BSA-und TTox-Konjugate

### Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(αGalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH an BSA (82)

Es werden 3.0 mg (0.045 μL) Rinderserumalbumin (BSA) in 2 mL Pufferlösung (pH = 9.5, 65 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1 mL Wasser) gelöst und die Lösung zu 3 mg (1.24 μmol) EtO-Squarat-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(αGalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (**79**) gegeben. Es wird drei Tage bei konstantem pH-

Wert = 9.5 gerührt. Die Reinigung erfolgt durch Filtration in einer Ultrafiltrationsanlage, so dass nicht gekuppelte Glycopeptidmoleküle vom BSA-Konjugat getrennt werden (Membran 30 kDa). Es wird fünfmal mit 100 mL entionisiertem Wasser filtriert. Der Rückstand wird gefriergetrocknet und lyophilisiert.

Ausbeute: 8.9 mg farbloses Lyophilisat. Eine Beladung der BSA-Konjugate mit den MUC1-Glycopeptiden konnte aufgrund technischer Probleme des MALDI-Spektrometers nicht durchgeführt werden.

**Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ NeuNAcCOOH-(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH an BSA (83)**

Es werden 3.0 mg (0.045  $\mu$ L) BSA in 2 mL Pufferlösung (pH = 9.5, 65 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1 mL Wasser) gelöst und die Lösung wird zu 3 mg (1.11  $\mu$ mol) EtO-Squarat-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ NeuNAcCOOH-(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (**80**) gegeben. Es wird drei Tage bei konstantem pH-Wert = 9.5 gerührt. Die Reinigung erfolgt über Filtration in einer Ultrafiltrationsanlage, so dass nicht gekuppelte Glycopeptidmoleküle vom BSA-Konjugat getrennt werden (Membran 30 kDa). Es wird fünfmal mit 100 mL entionisiertem Wasser filtriert. Der Rückstand wird gefriergetrocknet und lyophilisiert.

Ausbeute: 3.0 mg farbloses Lyophilisat. Eine Beladung der BSA-Konjugate mit den MUC1-Glycopeptiden konnte aufgrund technischer Probleme des MALDI-Spektrometers nicht durchgeführt werden.

**Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(αGalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH an TTox (84)**

Es werden 3 mg (0.023 μmol) Tetanus Toxoid in 2 mL Pufferlösung (pH = 9.5, 65 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1 mL Wasser) gelöst und die Lösung zu 3 mg (1.24 μmol) EtO-Squarat-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(αGalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (**79**) gegeben. Es wird drei Tage bei konstantem pH-Wert = 9.5 gerührt. Die Reinigung erfolgt über Filtration in einer Ultrafiltrationsanlage, so dass nicht gekuppelte Glycopeptidmoleküle vom TTox-Konjugat getrennt werden (Membran 30 kDa). Es wird fünfmal mit 100 mL entionisiertem Wasser filtriert.

Der Rückstand wird gefriergetrocknet und lyophilisiert.

Ausbeute: 4.4 mg farbloses Lyophilisat.

**Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH an TTox (85)**

Es werden 3 mg (0.023 μmol) Tetanus Toxoid in 2 mL Pufferlösung (pH = 9.5, 65 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1 mL Wasser) gelöst und die Lösung wird zu 3 mg (1.11 μmol) EtO-Squarat-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (**81**) gegeben. Es wird drei Tage bei konstantem pH-Wert = 9.5 gerührt. Die Reinigung erfolgt über Filtration in einer Ultrafiltrationsanlage, so dass nicht gekuppelte Glycopeptidmoleküle vom TTox-Konjugat getrennt werden (Membran 30 kDa). Es wird fünfmal mit 100 mL entionisiertem Wasser filtriert. Der Rückstand wird gefriergetrocknet und lyophilisiert.

Ausbeute: 4.7 mg farbloses Lyophilisat.



ESI-MS (positiv), m/z: 679.01 ( $[M-C_{53}H_{100}NO_5S-4xBoc-tBu+K]^+$ , ber.: 678.47).

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 5.31 (m, 2H, CH-Glyceryl {5.14},  $H_\alpha$  {5.1}), 4.51-3.96 (m, 7H,  $CH_2$ -Glyceryl {4.38},  $S_\alpha$  {4.35}, 4x  $K^\alpha$  {4.27}), 3.81-3.39 (m, 1H,  $S^\beta$ ), 3.27-3.18 (m, 8H,  $K^\epsilon$ ), 3.09-2.90 (m, 2H,  $CH_2S$ ), 2.64 (m, 2H,  $H^\beta$ ), (m, 6H, 6x  $H_\alpha$ -Pam), 1.74-1.55 (m, 6H,  $H^\beta$ -Pam), 1.48-1.33 (m, 45H,  $tBu$  ( $CH_3$ ), Boc ( $CH_3$ )), 1.18-1.07 ((m, 102H,  $CH_2$ -Pam, 4x  $K^{\beta,\delta,\gamma}$ ), 0.85 (t, 9H,  $J_{CH_3-Pam, CH_2-Pam} = 6.7$  Hz,  $CH_3$ -Pam).

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 173.9, 172.0, 171.7 (C=O (Ester), C=O (Amid), 161.6, 158.4, 156.0 (C=O (Urethan)), 78.1 (CH-Glyceryl), 74.9 ( $S^\beta$ ), ), 75.6 ( $K^\alpha$ ), 64.5 ( $S^\alpha$ ), 64.1 ( $CH_2$ -Glyceryl), 63.8, 62.2 (Boc  $C(CH_3)$ ), 63.4 ( $tBu(C(CH_3))$ ), 53.1 ( $CH_2S$ -Glyceryl), 53.0 (CHNHPPam), 50.2 ( $K^\epsilon$ ), 48.9 ( $CH_2OPam$ ), 32.7, 32.2 ( $K^\alpha$ ), 28.5 ( $CH_2Pam$ ), 31.1 ( $CH_2S$ ), 29.5, 29.3, 28.5, 28.0 ( $CH_2$ -Pam,  $tBu$   $C(CH_3)$ ), Boc ( $C(CH_3)$ ,  $K^\delta$ ), 23.5, 23.2, 23.0, 22.6 ( $C^\alpha$ -Amid,  $K^\gamma$ ), 11.5 (3x  $CH_3$ Pam).

**Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylmido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-threonyl-L-seryl-glycyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-arginyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-aspartyl-L-prolyl-L-alanyl-L-seryl-L-threonyl-L-valyl-glycyl-L-histidyl-L-alanyl-L-prolyl-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-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 (90)**

$H_2N(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2CONH$ -Pro-Ala-Thr-Ser-Gly-Pro-Ala-Pro-Arg-Thr( $\alpha$ -GalNAc)-Asp-Pro-Ala-Ser-Thr-Val-Gly-His-Ala-Pro-NH( $CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2CONH$ -Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 526 mg (0.1 mmol) des TentaGel R PHB-Arg(Pmc)-Fmoc (**92**) (Beladung:  $0.19$  mmol  $g^{-1}$ ) in den Reaktor eingewogen. Die Kupplungszeit der 16 nachfolgenden Aminosäuren (1 mmol, 10 eq.) beträgt jeweils 20 Minuten. Die Kupplung des Linkers erfolgt manuell. Die Kupplung des Spacers erfolgt manuell. Es werden 443.5 mg (1 mmol) *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxadecansäure (**64**), aktiviert mit einer Lösung aus 1 mmol HBTU, 1 mmol HOBt und 2 mmol DIPEA in NMP, zum

Harz gegeben. Die Kupplungszeit beträgt 20 Minuten. Nach Behandlung mit Capping-Reagenz wird die terminale Fmoc Schutzgruppe mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten, und das Harz wird gründlich mit NMP und Dichlormethan gewaschen. Kupplung der nachfolgenden Aminosäuren erfolgt nach dem Standardprotokoll, bevor die Kupplung des T<sub>N</sub>-Bausteins (**22**) manuell erfolgt. Es werden 180 mg (0.27 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin (**22**) und 339 mg (0.45 mmol) HATU, 122 mg (0.45 mmol) HOAt und 195  $\mu$ L NMM in 2 mL NMP/Chloroform (1:3) gelöst und 8 h geschüttelt (30 sec Vortex, 30 sec Ruhepause). Anschließend wird die Lösung abfiltriert und mit NMP und Dichlormethan gewaschen. Das Capping-Reagenz acetyliert freie Aminogruppen, die nicht umgesetzt wurden. Die folgenden Fmoc-Aminosäuren werden nach Standardprotokoll gekuppelt und der Spacer wird manuell gekuppelt. Das Capping-Reagenz acetyliert freie Aminogruppen, die nicht umgesetzt wurden. Anschließend wird mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffgegenstrom getrocknet. Das Harz wird in einen Merrifield-Reaktor überführt und anschließend wird der polymere Träger mit Dichlormethan/Trifluorethanol/Essigsäure in einem Lösungsmittelverhältnis von 8:1:1 zwei Stunden geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit jeweils 20 mL Dichlormethan gewaschen. Die Dichlormethan-Phasen werden vereinigt und mit 50 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Anschließend erfolgt die Schutzgruppenabspaltung mit wässriger NaOH bei einem pH-Wert von 11.5 (100 mg NaOH-Plätzchen/500 mL Wasser) und es wird drei Tage gerührt. Anschließend wird mit 1 N Essigsäure neutralisiert, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand gefriergetrocknet. Es wird ein farbloser Feststoff erhalten, der ohne weitere Reinigung in die Fragmentkondensation eingesetzt wird.

Ausbeute: 12 mg (0.0028 mmol, 4 %), farbloser Feststoff.

C<sub>185</sub>H<sub>295</sub>N<sub>53</sub>O<sub>68</sub> (M = 4349.64 g mol<sup>-1</sup>), [4347.13].

ESI-MS (positiv), m/z: 1002.1 [(M-2x Imidazol-GalNAc+2Na+2K)<sup>4+</sup>, ber.: 1001.6).

***N*-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl]-L-cystyl-L-seryl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-threonyl-L-seryl-glycyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-arginyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-aspartyl-L-prolyl-L-alanyl-L-seryl-L-threonyl-L-valyl-glycyl-L-histidyl-L-alanyl-L-prolyl-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-isoileucyl-L-seryl-L-glutaminyll-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isoileucyl-L-asparaginyll-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-argin (90)**

(Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-Thr-Ser-Gly-Pro-Ala-Pro-Arg-Thr( $\alpha$ -GalNAc)-Asp-Pro-Ala-Ser-Thr-Val-Gly-His-Ala-Pro-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

Es werden 10 mg (5  $\mu$ mol) Pam<sub>3</sub>Cys-Ser(OtBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH (**88**) in 6 mg (15  $\mu$ mol) HATU, 2.1 mg (15  $\mu$ mol) HOAt in 2 mL DMF gelöst und mit 3.3  $\mu$ L (30  $\mu$ mol) NMM versetzt. Es wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eine Lösung von 12 mg (2.76  $\mu$ mol) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-Thr-Ser-Gly-Pro-Ala-Pro-Arg-Thr( $\alpha$ -GalNAc)-Asp-Pro-Ala-Ser-Thr-Val-Gly-His-Ala-Pro-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH (**90**) in 2 mL DMF zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 20 mL Wasser und die Probe wird gefriergetrocknet. Der gelb-braune Feststoff wird in 10 mL einer Lösung aus TFA/Wasser/TIPS (10:1:1) gelöst und 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt, um die Schutzgruppen abzuspalten. Das Wasser wird i. Hochvak. entfernt und der Rückstand dreimal mit jeweils 20 mL Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 15 mL Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: < 1 mg (max. 0.17  $\mu$ mol), brauner Feststoff.

C<sub>270</sub>H<sub>454</sub>N<sub>66</sub>O<sub>80</sub>S (M = 5936.95 g mol<sup>-1</sup>), [5933.32].

ESI-MS (positiv), m/z: 1239.92 [(M-Pam<sub>3</sub>CysSer+4H)]<sup>4+</sup>, ber.: 1239.71), 1172.83 [(M-Pam<sub>3</sub>CysSerLys<sub>3</sub>+2Na+2K)]<sup>4+</sup>, ber.: 1173.4).

## 6.15 Darstellung der OVA-Spacer-MUC1-Konjugate

*N*-Acetyl-L-prolyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-arginyl-L-proyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*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-asparagyl-L-glutaminyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (**91**)

Ac-Pro-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-( $\alpha$ GalNAc)-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll des Peptidsynthesizers. Es werden 526 mg (0.1 mmol) des TentaGel R PHB-Arg(Pmc)-Fmoc (**92**) (Beladung: 0.19 mmol g<sup>-1</sup>) in den Reaktor eingewogen. Die Kupplungszeit der folgenden 16 Fmoc-Aminosäuren (1 mmol, 10 eq.) beträgt jeweils 20 Minuten. Nach der Kupplung der Aminosäure L-Isoleucin wird die Spaceraminoäure manuell eingebaut. Dazu werden 444 mg (1 mmol) *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadecansäure (**64**) aktiviert mit einer Lösung aus 1 mmol HBTU, 1 mmol HOBT und 2 mmol DIPEA in NMP, in eine Kartusche eingewogen. Die Kupplungszeit beträgt 20 Minuten. Nach Behandlung mit Capping-Reagenz wird die terminale Fmoc Schutzgruppe mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Das Harz wird gründlich mit NMP und Dichlormethan gewaschen. Die nächsten neun Fmoc-Aminosäuren bis zur Glycosylaminoäure werden nach Standardprotokoll gekuppelt, bevor die Kupplung des T<sub>N</sub>-Bausteins (**22**) manuell im Peptidsynthesizer erfolgt. Es werden 180 mg (0.27 mmol) *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin (**22**) und 339 mg (0.45 mmol) HATU, 122 mg (0.45 mmol) HOAt und 195  $\mu$ L NMM in 2 mL NMP gelöst und 8 h geschüttelt (30 sec Vortex, 30 sec Ruhepause). Anschließend wird die Lösung abfiltriert und das Harz mit NMP und Dichlormethan gewaschen. Mit Capping-Reagenz werden freie Aminogruppen, die nicht umgesetzt wurden, acetyliert. Anschließend wird mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffgegenstrom getrocknet. Das Harz wird in einen Merrifield-Reaktor überführt und anschließend wird der polymere Träger mit TFA/Wasser/TIPS in einem Lösungsmittelverhältnis von 9:1:0.1 zwei Stunden geschüttelt und abgespalten. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit jeweils 5 mL TFA



gewaschen. Die TFA-Phasen werden vereinigt, mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Es wird ein farbloser Feststoff erhalten. Anschließend erfolgt die Schutzgruppenabspaltung unter basischen Bedingungen. Das Glycopeptid wird in 500 mL wässriger NaOH-Lösung (100 mg NaOH in 500 mL entionisiertem Wasser,  $c = 0.004 \text{ mol/L}$ ,  $\text{pH} = 11.5$ ) gelöst und drei Tage bei Raumtemp. gerührt. Es wird anschließend mit 1 N Essigsäure neutralisiert, ein Teil des Lösungsmittels i. Vak. entfernt und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC gereinigt;  $R_t = 11.3 \text{ min}$  (Phenomenex Luna, Gradient:  $(\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O})_{0.1\% \text{ TFA}}$  (20:80)→(50:50), 40 min,  $\lambda = 214 \text{ nm}$ ).

Ausbeute: 12 mg (0.0028 mmol, 4 %), farbloser Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = -58.8$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ),  $R_t = 11.3 \text{ min}$  (Phenomenex Luna, Gradient:  $(\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O})_{0.1\% \text{ TFA}}$  (20:80)→(50:50), 40 min,  $\lambda = 214 \text{ nm}$ ).

$\text{C}_{176}\text{H}_{279}\text{N}_{55}\text{O}_{62}$  ( $M = 4157.43 \text{ g mol}^{-1}$ ), [4155.04].

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO, COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm): 8.76 (s, 1H,  $\text{H}_1^{\text{Im-H}2}$ ), 8.74 (s, 2H,  $2x \text{H}^{\text{Im-H}2}$ ), 8.24-8.20 (m, 1H,  $3x \text{H}^{\text{Im-H}4}$ ), 8.37-7.80 (m, 31H,  $\text{E}^{\text{NH}}$  {8.32},  $\text{S}_1^{\text{NH}}$  {8.27},  $\text{N}^{\text{NH}}$  {8.21},  $\text{D}^{\text{NH}}$  {8.19},  $\text{S}_2^{\text{NH}}$  {8.16},  $\text{S}_3^{\text{NH}}$  {8.13},  $\text{T}_{\text{TN}}^{\text{NH}}$  {8.08},  $\text{T}_2^{\text{NH}}$  {8.07},  $5x \text{P}^{\text{NH}}$  {8.07, 8.05, 8.04, 8.01},  $\text{T}_3^{\text{NH}}$  {8.03},  $9x \text{A}^{\text{NH}}$  {8.00, 7.97, 7.90, 7.84},  $2x \text{R}^{\text{NH}}$  {7.92},  $\text{G}_1^{\text{NH}}$  {7.87},  $\text{G}_2^{\text{NH}}$  {7.85},  $\text{I}_1^{\text{NH}}$  {7.79},  $\text{I}_2^{\text{NH}}$  {7.78},  $\text{V}_1^{\text{NH}}$  {7.74},  $\text{V}_2^{\text{NH}}$  {7.70}), 5.10 (d, 1H,  $J_{\text{H}1,\text{H}2} = 3.4 \text{ Hz}$ , H1), 5.08 (d, 1H,  $J_{\text{H}3,\text{H}2} = 3.4 \text{ Hz}$ , H3) 4.66-3.97 (m, 46H, 10 OH,  $3x \text{AcNH}$ ,  $\text{H}_1^\alpha$  {4.60},  $\text{H}_2^\alpha$  {4.57},  $\text{H}_3^\alpha$  {4.56},  $\text{N}^\alpha$  {4.55},  $\text{D}^\alpha$  {4.53}, H4 {4.40},  $\text{Q}^\alpha$  {4.37},  $\text{S}_1^\alpha$  {4.30},  $\text{S}_2^\alpha$  {4.28},  $\text{S}_3^\alpha$  {4.27},  $9x \text{A}^\alpha$  {4.28, 4.27, 4.26, 4.25, 4.24},  $5x \text{P}^\alpha$  {4.25, 4.24, 4.23},  $\text{V}_1^\alpha$  {4.20},  $\text{V}_2^\alpha$  {4.18},  $\text{T}_{\text{TN}}^\alpha$  {4.27},  $\text{T}_1^\alpha$  {4.23},  $2x \text{R}^\alpha$  {4.21},  $\text{T}_2^\alpha$  {4.20},  $\text{I}_1^\alpha$  {4.00},  $\text{I}_2^\alpha$  {3.98}), 3.78-2.70 (m, 34H,  $\text{S}_1^{\beta\alpha}$  {3.76},  $\text{S}_2^{\beta\alpha}$  {3.74},  $\text{G}_1^\alpha$  {3.70},  $\text{G}_2^\alpha$  {3.65},  $\text{G}_3^\alpha$  {3.62},  $6x \text{OCH}_2\text{-Spacer}$  {3.57},  $\text{H}_{6a}$  {3.58},  $5x \text{P}^\delta$  {3.16, 3.15, 3.14, 3.13},  $\text{H}_{6b}$  {3.41},  $\text{S}_1^{\beta\beta}$  {3.34},  $\text{S}_2^\beta$  {3.15}, H5 {2.79},  $\text{H}^{\beta\alpha}$  {2.74, 2.73, 2.72}), 2.67 (d, 1H,  $J_{\beta,\alpha} = 6.8 \text{ Hz}$ ,  $\text{D}^{\beta\alpha}$ ), 2.67-2.45 (m, 7H, teilweise unter DMSO-Signal, 12- $\text{CH}_2\text{-Spacer}$ ,  $\text{H}^{\beta\beta}$  {2.55, 2.54, 2.53},  $\text{N}^{\beta\alpha}$  {2.51},  $\text{D}^{\beta\beta}$  {2.47},  $\text{N}^{\beta\beta}$  {2.45}), 2.33-2.32 (m, 2H,  $\text{Q}^\beta$  {2.32}), 2.26-2.01 (m, 9H,  $5x \text{P}^\beta$  {2.25, 2.23, 2.08, 2.07},  $\text{E}_1^{\gamma a}$  {2.21},  $\text{E}_2^{\gamma a}$  {2.18},  $\text{E}_1^{\gamma b}$  {2.12},  $\text{E}_2^{\gamma b}$  {2.12}), 2.00-1.87 (m, 23H, 2- $\text{CH}_2\text{-Spacer}$ ,  $3x \text{AcNH}$  {1.99, 1.98, 1.97},  $\text{V}_1^\beta$  {1.94},  $\text{V}_2^\beta$  {1.91},  $5x \text{P}^{\beta\beta}$  {1.90, 1.89, 1.88, 1.87}), 1.86-1.72 (m, 16H,  $\text{R}_1^{\gamma a}$  {1.79},  $\text{R}_2^\gamma$  {1.67},  $2x \text{R}^{\beta\beta}$  {1.50}), 1.69-1.20 (m, 31H,  $\text{R}_1^{\gamma b}$  {1.55},  $\text{I}_1^\delta$  {1.41},  $\text{I}_2^\delta$  {1.38},  $9x \text{A}^\beta$  {1.39, 1.33, 1.28, 1.27, 1.26,

1.25, 1.23}), 1.16-1.13 (m, 6H, 1.15 {d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$  Hz,  $T_{TN}^{\gamma}$ }, 1.14 {d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.0$  Hz,  $T_3^{\gamma}$ }), 0.88-0.73 (m, 24H, 0.88 {d, 6H,  $J_{\gamma,\beta} = 6.3$  Hz,  $V_1^{\gamma}$ },  $I_1^{\delta}$  {0.82}, 0.81 {d, 6H,  $J_{\gamma,\beta} = 7.1$  Hz,  $V_2^{\gamma}$ },  $I_2^{\delta}$  {0.80},  $I_1^{\gamma}$  {0.78},  $I_2^{\gamma}$  {0.76}).

$^{13}\text{C}$ -NMR (150.9 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ , 175.2, 174.3, 173.8, 173.3, 173.0, 172.4, 172.2, 172.1, 171.4, 171.3, 171.1, 170.4, 164.7, 164.2, 163.6, 163.0, 162.8, 159.5, 159.0 (C=O), 158.8, 158.5 (2x  $\text{R}^{\text{C=N}}$ ), 135.8, 135.7 (3x  $\text{H}^{\text{Im-C}2}$ ), 130.7, 127.8, 127.5 (3x  $\text{H}^{\text{Im-C}5}$ ), 122.1, 118.7, 118.2 (3x  $\text{H}^{\text{Im-C}4}$ ), 100.7 (C1), 71.1 ( $\text{T}_{\text{TN}}^{\beta}$ ), 70.8 (C4), 69.8 (4x  $\text{OCH}_2$ -Spacer), 69.7, 69.6 (C3, C5), 68.1 (11- $\text{CH}_2$ -Spacer), 65.4, 65.2 (3- $\text{CH}_2$ -Spacer,  $\text{T}_1^{\beta}$ ), 61.5 (C6), 59.5, 59.1, 59.0, 58.9, 58.8, 58.5, 58.3, 57.9, 57.5, 57.2, 56.8, 56.2, 55.8, 54.5, 53.8, 53.1, 52.0, 50.0, 49.6, 49.2, 47.9, 47.7, 47.6 (3x  $\text{S}^{\beta}$ , 9x  $\text{A}^{\alpha}$ ,  $\text{D}^{\alpha}$ , 3x  $\text{H}^{\alpha}$ , 2x  $\text{I}^{\alpha}$ ,  $\text{N}^{\alpha}$ , 5x  $\text{P}^{\alpha}$ , 5x  $\text{P}^{\delta}$ ,  $\text{Q}^{\alpha}$ , 2x  $\text{R}^{\alpha}$ , 3x  $\text{S}^{\alpha}$ ,  $\text{T}_{\text{TN}}^{\alpha}$ ,  $\text{T}_1^{\alpha}$ , 2x  $\text{V}^{\alpha}$ , C2 {47.7}), 42.8, 42.7, 42.6 (3x  $\text{G}^{\alpha}$ ), 40.8, 40.4, 40.2 (2x  $\text{R}^{\delta}$ ), 39.8 (12- $\text{CH}_2$ -Spacer), 37.2 ( $\text{I}^{\beta}$ ), 36.8 ( $\text{N}^{\beta}$ ), 36.5 (2- $\text{CH}_2$ -Spacer), 36.3 ( $\text{D}^{\beta}$ ), 31.2 ( $\text{E}_2^{\gamma}$ ), 30.8, 30.5, 29.6 ( $\text{E}_1^{\gamma}$ ,  $\text{Q}^{\gamma}$ , 2x  $\text{V}^{\beta}$ ), 29.3, 29.1, 29.0, 28.9, 28.4 (5x  $\text{P}^{\beta}$ ), 27.6 (2x  $\text{R}^{\beta}$ ), 26.0, 25.9, 25.1 (2x  $\text{E}^{\beta}$ , 3x  $\text{H}^{\beta}$ ,  $\text{Q}^{\beta}$ ), 24.6, 24.3, 24.2, 23.2 (2x  $\text{I}^{\gamma}$ , 5x  $\text{P}^{\gamma}$ , 2x  $\text{R}^{\gamma}$ ), 22.9, 22.8, 21.5 (2x  $\text{CH}_3$  (AcNH)), 18.8 ( $\text{T}_1^{\gamma}$ ), 18.6 ( $\text{V}_1^{\gamma\text{a}}$ ,  $\text{V}_2^{\gamma\text{a}}$ ), 18.5, 18.2, 17.8, 17.6, 17.3, 15.9, 15.4, 15.2 (9x  $\text{A}^{\beta}$ ,  $\text{T}_{\text{TN}}^{\gamma}$ , 2x  $\text{V}_2^{\gamma\text{b}}$  {18.0, 17.9}), 15.0 (2x  $\text{I}^{\gamma}$ ), 9.8, 9.6 (2x  $\text{I}^{\delta}$ ).

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl-onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-arginyl-L-proyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-isoleucyl-L-seryl-L-glutaminy-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-asparagyl-L-glutaminy-L-alanyl-glycyl-L-arginin (93)**

Ac-Pro-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-( $\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOH}$ -(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha\text{GalNAc}$ )-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese wird nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer vorgenommen. Es werden 526 mg (0.1 mmol) des TentaGel R PHB-

Arg(Pmc)-Fmoc (**92**) (Beladung:  $0.19 \text{ mmol g}^{-1}$ ) in den Reaktor eingewogen. Die Kupplungszeit der folgenden 16 Fmoc-Aminosäuren (1 mmol, 10 eq.) beträgt jeweils 20 Minuten. Nach der Kupplung der Fmoc-Aminosäure L-Isoleucin wird die Spaceraminosäure manuell eingebaut. Dazu werden 444 mg (1 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadecansäure (**64**) aktiviert mit einer Lösung aus 1 mmol HBTU, 1 mmol HOBt und 2 mmol DIPEA in NMP, in eine Kartusche eingewogen. Die Kupplungszeit beträgt 20 Minuten. Nach Behandlung mit Capping-Reagenz wird die terminale Fmoc Schutzgruppe mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten, und das Harz wird gründlich mit NMP und Dichlormethan gewaschen. Die nächsten neun Fmoc-Aminosäuren bis zur Glycosylaminosäure werden nach Standardprotokoll gekuppelt, bevor die Kupplung des  $\text{ST}_N$ -Bausteins (**40**) manuell im Peptidsynthesizer erfolgt. Es werden 235 mg (0.2 mmol) des Sialyl-Threonin-Konjugats (**40**) und 98 mg (0.25 mmol) HATU, 33 mg (0.25 mmol) HOAt und 55  $\mu\text{L}$  NMM in 2 mL NMP gelöst und 8 h geschüttelt (30 sec Vortex, 30 sec Ruhepause). Anschließend wird die Lösung abfiltriert und mit NMP und Dichlormethan gewaschen. Das Capping-Reagenz acetyliert freie Aminogruppen, die nicht umgesetzt wurden. Anschließend wird mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffgegenstrom getrocknet. Das Harz wird in einen Merrifield-Reaktor überführt und wird mit TFA/Wasser/TIPS in einem Lösungsmittelverhältnis von 9:1:0.1 zwei Stunden geschüttelt und abgespalten. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit jeweils 5 mL TFA gewaschen. Die TFA-Phasen werden vereinigt, mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Es wird ein farbloser Feststoff erhalten. Anschließend erfolgt die Schutzgruppenabspaltung unter basischen Bedingungen. Das Glycopeptid wird in 500 mL wässriger NaOH-Lösung (100 mg NaOH in 500 mL entionisiertem Wasser,  $c = 0.004 \text{ mol/L}$ ,  $\text{pH} = 11.5$ ) gelöst und drei Tage bei Raumtemp. gerührt. Es wird anschließend mit 1 N Essigsäure neutralisiert, ein Teil des Lösungsmittels i. Vak. entfernt und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC gereinigt;  $R_t = 14.3 \text{ min}$  (Phenomenex Luna, Gradient:  $(\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O})_{0.1\% \text{ TFA}} (20:80) \rightarrow (50:50)$ , 40 min,  $\lambda = 214 \text{ nm}$ ).

Ausbeute: 14 mg (0.0031 mmol, 3 %), farbloser Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = -85.9$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ),  $R_t = 14.3 \text{ min}$  (Phenomenex Luna, Gradient:  $(\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O})_{0.1\% \text{ TFA}} (20:80) \rightarrow (50:50)$ , 40 min,  $\lambda = 214 \text{ nm}$ ).

$C_{187}H_{296}N_{56}O_{70}$  (M = 4448.68 g mol<sup>-1</sup>), [4446.13].

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O, COSY, HSQC, HMBC, TOCSY),  $\delta$  (ppm): 8.58 (s, 2H, H<sup>lm-H2</sup>, H<sup>lm-NH</sup>), (s, 1H, H<sup>lm-H4</sup>), 4.73-4.03 (m, 31H, 4x P <sup>$\alpha$</sup>  {4.69, 4.68, 4.66, 4.65, 4.64}, 9x A <sup>$\alpha$</sup>  {4.57, 4.56, 4.54, 4.53, 4.49}, 2x R <sup>$\alpha$</sup>  {4.40}, P<sub>5</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.39}, N <sup>$\alpha$</sup>  {4.36}, S<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.34}, D <sup>$\alpha$</sup>  {4.32}, 2x S <sup>$\alpha$</sup>  {4.31}, T<sub>STN</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.36}, T<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.32}, T<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.29}, I<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.16}, V<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.22}, V<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.16}, 3x AcNH {4.15, 4.14, 4.13}, I<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.09}), 3.99-3.86 (m, 4H, H<sub>1</sub> {3.91}, S<sub>1</sub> <sup>$\beta$ a</sup> {3.88}, 2x S<sub>2</sub> <sup>$\beta$ a</sup> {3.86}), 3.85-3.67 (m, 15H, H<sub>2</sub> {3.84}, S<sub>1</sub> <sup>$\beta$ b</sup> {3.81}, S<sub>2</sub> <sup>$\beta$ b</sup> {3.80}, S<sub>3</sub> <sup>$\beta$ b</sup> {3.78}, D <sup>$\beta$ b</sup> {3.74}, 5x P <sup>$\delta$</sup>  {3.73, 3.72, 3.71}), 3.67-2.68 (m, 43H, H<sub>7</sub>" {3.67}, G<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {3.65}, G<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {3.62}, G<sub>3</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {3.60}, 6x OCH<sub>2</sub>-Spacer {3.56}, H<sub>4</sub>" {3.59}, H<sub>6a</sub> {3.58}, H<sub>3</sub> {3.50}, H<sub>6b</sub> {3.41}, H<sub>5</sub>" {3.40}, H<sub>5</sub> {3.39}, H<sub>6</sub>" {3.28}, 5x P <sup>$\gamma$</sup>  {3.16, 3.15, 3.14, 3.13}, S<sub>1</sub> <sup>$\beta$ a</sup> {3.10}, S<sub>2</sub> <sup>$\beta$</sup>  {3.09}, S<sub>1</sub> <sup>$\beta$ b</sup> {2.89}, H <sup>$\beta$ a</sup> {2.74, 2.73, 2.72, 2.70}, H <sup>$\beta$ b</sup> {2.55, 2.54, 2.53}), 2.58 (dd, 1H, J <sub>$\beta$ a, $\beta$ b</sub> = 16.8 Hz, J <sub>$\beta$ , $\alpha$</sub>  = 6.0 Hz, D <sup>$\beta$ a</sup>), 2.53-2.35 (m, 7H, 12-CH<sub>2</sub>-Spacer, N <sup>$\beta$ a</sup> {2.52}, D <sup>$\beta$ b</sup> {2.44}, N <sup>$\beta$ b</sup> {2.45}), 2.34 (t, 2H, J <sub>$\gamma$ , $\beta$</sub>  = 6.9 Hz, E<sub>1</sub> <sup>$\gamma$</sup> ), 2.33 (t, 1H, J <sub>$\beta$ , $\alpha$</sub>  = 7.4 Hz, V<sub>1</sub> <sup>$\beta$</sup> ), 2.32-2.20 (m, 7H, H<sub>3ax</sub>" {2.32}, Q <sup>$\beta$</sup>  {2.30}, 2.26 {t, 2H, J <sub>$\gamma$ , $\beta$</sub>  = 6.0 Hz, E<sub>2</sub> <sup>$\gamma$</sup> }, P <sup>$\beta$</sup>  {2.26}), 2.12-1.79 (m, 20H, 2-CH<sub>2</sub>-Spacer, V<sub>2</sub> <sup>$\beta$</sup>  {2.08}, V<sub>2</sub> <sup>$\beta$</sup>  {2.06}, H<sub>3eq</sub>" {1.96}, 5x P <sup>$\beta$</sup>  {1.94, 1.93, 1.92, 1.91, 1.90}, 3x AcNH {1.86, 1.85, 1.83}), 1.77-1.55 (m, 6H, 2x R <sup>$\gamma$</sup>  {1.79}, 2x R <sup>$\beta$ b</sup> {1.58}), 1.48-1.39 (m, 4H, I<sub>2</sub> <sup>$\gamma$</sup>  {1.46}, I<sub>1</sub> <sup>$\gamma$</sup>  {1.41}), 1.37-1.21 (m, 27H, 9x A <sup>$\beta$</sup>  {1.37, 1.35, 1.33, 1.31, 1.30, 1.29, 1.23}, 1.19-1.10 (m, 6H, 1.15 {d, 3H, J<sub>T $\gamma$ ,T $\beta$</sub>  = 6.5 Hz, T<sub>STN</sub> <sup>$\gamma$</sup> }, T<sub>3</sub> <sup>$\gamma$</sup>  {1.13}), 0.91-0.78 (m, 24H, 0.88 {dd, 6H, J <sub>$\gamma$ , $\gamma$</sub>  = 2.6 Hz, J <sub>$\gamma$ , $\beta$</sub>  = 6.6 Hz, V<sub>1</sub> <sup>$\gamma$</sup> }, I<sub>1</sub> <sup>$\delta$</sup>  {0.86}, 0.83 {dd, 6H, J <sub>$\gamma$ , $\gamma$</sub>  = 2.6 Hz, J <sub>$\gamma$ , $\beta$</sub>  = 6.6 Hz, V<sub>2</sub> <sup>$\gamma$</sup> }, I<sub>2</sub> <sup>$\delta$</sup>  {0.82}, I<sub>1</sub> <sup>$\gamma$</sup>  {0.81}, I<sub>2</sub> <sup>$\gamma$</sup>  {0.79}).

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  177.5, 177.0, 176.79, 176.7, 175.4, 175.4, 175.0, 174.8, 174.6, 174.5, 174.2, 174.1, 173.3, 173.2, 173.1, 173.0, 172.9, 172.8, 172.7, 172.4, 172.2, 172.1, 171.9, 171.5, 171.2, 171.1, 170.4, 163.4, 163.3, 163.1, 163.0, 162.8, 162.6, 161.3, 161.2 (C=O), 156.7, 156.6 (2x R<sup>C=N</sup>), 136.1 (3x H<sup>lm-C2</sup>), 133.4, 128.3, 128.2 (3x H<sup>lm-C5</sup>), 119.2, 117.3, 117.2 (3x H<sup>lm-C4</sup>), 102.7 (C1"), 72.6 (T<sub>STN</sub> <sup>$\beta$</sup> ), 71.2 (C6"), 69.4 (C4), 69.3, 68.7 (4x OCH<sub>2</sub>-Spacer, C8"), 67.3 (C3, C5), 67.1 (11-CH<sub>2</sub>-Spacer), 66.6 (3-CH<sub>2</sub>-Spacer, C4", T<sub>1</sub> <sup>$\beta$</sup> ), 63.9 (C9"), 61.1 (C6), 60.9, 60.7, 60.6 (3x S <sup>$\beta$</sup> ), 60.2, 59.6, 58.8, 58.7, 58.6, 58.3, 56.4, 55.8, 55.5, 53.4, 53.1, 52.9, 52.7, 52.1, 50.3, 50.0, 49.6, 49.5, 48.7, 47.9, 47.7, 47.6 (9x A <sup>$\alpha$</sup> , D <sup>$\alpha$</sup> , 3x H <sup>$\alpha$</sup> , 2x I <sup>$\alpha$</sup> , N <sup>$\alpha$</sup> , 5x P <sup>$\alpha$</sup> , 5x P <sup>$\delta$</sup> , Q <sup>$\alpha$</sup> , 2x R <sup>$\alpha$</sup> , 3x S <sup>$\alpha$</sup> , T<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup> , T<sub>STN</sub> <sup>$\alpha$</sup> , 2x V <sup>$\alpha$</sup> , C5" {52.7}, C2 {48.7}), 42.3 (3x G <sup>$\alpha$</sup> ), 40.6, 40.5, 40.3 (2x R <sup>$\delta$</sup> ), 39.0 (12-CH<sub>2</sub>-Spacer), 38.8 (I <sup>$\beta$</sup> ), 36.3 (N <sup>$\beta$</sup> ), 36.1 (2-CH<sub>2</sub>-Spacer), 36.0 (D <sup>$\beta$</sup> ), 31.1 (E<sub>2</sub> <sup>$\gamma$</sup> ), 30.9, 29.8, 29.8, 29.7 (E<sub>1</sub> <sup>$\gamma$</sup> , Q <sup>$\gamma$</sup> , 2x V <sup>$\beta$</sup> ), 29.6, 29.5, 29.2, 29.1, 28.4 (5x P <sup>$\beta$</sup> ), 27.6, 26.4 (2x R <sup>$\beta$</sup> ), 26.2, 26.1, 25.9, 25.8 (2x E <sup>$\beta$</sup> , 3x H <sup>$\beta$</sup> , Q <sup>$\beta$</sup> ), 24.8, 24.7, 24.6, 24.5, 24.5, 24.3, 24.2, 23.7 (2x I <sup>$\gamma$</sup> , 5x P <sup>$\gamma$</sup> , 2x

R<sup>γ</sup>), 22.7, 22.0, 21.3 (2x CH<sub>3</sub> (AcNH)), 18.8 (T<sub>1</sub><sup>γ</sup>), 18.7 (V<sub>1</sub><sup>γa</sup>), 18.3 (V<sub>2</sub><sup>γa</sup>), 18.1, 17.8, 16.6, 16.5, 16.3, 16.2, 16.1, 16.0, 15.3 (T<sub>STN</sub><sup>γ</sup>, 9x A<sup>β</sup>, 2x V<sub>2</sub><sup>γb</sup> {18.0, 17.9}), 15.0, 14.9 (2x I<sup>γ</sup>), 10.2, 10.1 (2x I<sup>δ</sup>).

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-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- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- $\beta$ -D-galactopyranosyl)]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-isooleucyl-L-seryl-L-glutaminy-L-alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-alanyl-L-alanyl-L-histidyl-L-alanyl-L-glutamyl-L-isooleucyl-L-asparaginy-L-glutamyl-L-alanyl-glycyl-L-arginin (94)**

Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ Ac<sub>2</sub>GalBn-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 526 mg (0.1 mmol) des TentaGel *R* PHB-Arg(Pmc)-Fmoc (**92**) (Beladung: 0.19 mmol g<sup>-1</sup>) in den Reaktor eingewogen. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (1 mmol, 10 eq.) beträgt jeweils 20 Minuten. Die Kupplung des Spacers und der Glycosylaminosäure erfolgt manuell. Dabei wird die Fmoc-Schutzgruppe der letzten gekuppelten Aminosäure mit einer 20%-igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Es werden 161 mg (0.4 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadecansäure (**64**), 166 mg (0.4 mmol) HATU, 60 mg (0.4 mmol) HOAt, 95  $\mu$ L NMM in 2 mL NMP gelöst. Die Kupplungszeit beträgt 8 h und anschließend erfolgt die Kupplung der nächsten neun Aminosäuren nach Standardprotokoll. Zur Kupplung der Glycosylaminosäure werden 302 mg (0.2 mmol) des 2,3-Sialyl-T-Threonin Konjugats (**57**), 98 mg (0.25 mmol) HATU, 33 mg (0.25 mmol) HOAt und 55  $\mu$ L (0.5 mmol NMM in 2 mL NMP gelöst und anschließend 8 h geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Anschließend werden die restlichen Fmoc-Aminosäuren gekuppelt. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe am Prolin wird mit Piperidin gespalten und acetyliert. Das Harz wird mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffgegenstrom getrocknet. Die Abspaltung des Peptides erfolgt im

Merrifield-Reaktor in einem Lösungsmittelgemisch aus TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (10:1:1). Die Lösung wird 2 h geschüttelt, die Lösung abfiltriert und dreimal mit 5 mL TFA gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 30 mL Toluol versetzt und das LM wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit 25 mL Toluol kodestilliert. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Glycopeptid wird ohne weitere Reinigung in den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

Ausbeute: 80 mg (0.016 mmol, 16 %) farbloser Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = -59.60$  ( $c = 0.89$ , H<sub>2</sub>O).

C<sub>223</sub>H<sub>334</sub>N<sub>56</sub>O<sub>83</sub> (M = 5127.36 g mol<sup>-1</sup>), [5124.36].

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- $\beta$ -D-galactopyranosyl)]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*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 (95)**

Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-(2→6)- $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalBn-(1→3)- $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll im Peptidsynthesizer. Es werden 526 mg (0.1 mmol) des TentaGel R PHB-Arg(Pmc)-Fmoc (**92**) (Beladung: 0.19 mmol g<sup>-1</sup>) in den Reaktor eingewogen. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (1 mmol, 10 eq.) beträgt jeweils 20 Minuten. Die Kupplung des Spacer und der Glycosylaminosäure erfolgen manuell. Dabei wird die Fmoc-Schutzgruppe der letzten gekuppelten Aminosäure mit einer 20%-igen Lösung aus Piperidin in NMP entfernt. Es werden 161 mg (0.4 mmol) *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadecansäure (**64**), 166 mg (0.4 mmol) HATU, 60 mg (0.4 mmol) HOAt, 95  $\mu$ L NMM in 2 mL NMP gelöst. Die Kupplungszeit beträgt 8 h und anschließend erfolgt die Kupplung der nächsten neun Aminosäuren nach Standardprotokoll. Zur Kupplung der Glycosylaminosäure werden 302 mg (0.2 mmol) des 2,6-Sialyl-T-Threonin Konjugats (**52**), 98 mg (0.25 mmol)

HATU, 33 mg (0.25 mmol) HOAt und 55  $\mu$ L (0.5 mmol NMM in 2 mL NMP gelöst und anschließend 8 h geschüttelt (30 s Vortex, 30 s Stillstand). Anschließend erfolgt die Kupplung der restlichen Aminosäuren. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe am Prolin wird mit Piperidin abgespalten und acetyliert. Das Harz wird mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffgegenstrom getrocknet. Die Abspaltung des Peptides erfolgt im Merrifield-Reaktor in einem Lösungsmittelgemisch aus TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (10:1:1). Die Lösung wird 2 h geschüttelt, die Lösung abfiltriert und dreimal mit 5 mL TFA gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 30 mL Toluol versetzt und das LM wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit 25 mL Toluol kodestilliert. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Glycopeptid wird ohne weitere Reinigung in den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

Ausbeute: 115 mg (0.022 mmol, 22 %) farbloser Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = -36.89$  ( $c = 1.00$ , H<sub>2</sub>O).

C<sub>223</sub>H<sub>334</sub>N<sub>56</sub>O<sub>83</sub> (M = 5127.36 g mol<sup>-1</sup>), [5124.36].

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[3-O-((5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)}- $\beta$ -D-galactopyranosyl)]- $\alpha$ -D-galacto-pyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*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 (96)**

Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ NeuNAcCOOH-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

Hydrierung: Es werden 80 mg (0.02 mmol) Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ Ac<sub>2</sub>GalBn-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH werden in 30 mL Methanol gelöst und mit 2 Spatelspitzen Pd(OAc)<sub>2</sub> versetzt. Der Kolben wird anschließend dreimal mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und

jeweils mit Wasserstoff gefüllt. Man rührt 32 h unter Wasserstoffatmosphäre und filtriert im Anschluss über *Hyflo*<sup>®</sup>. Der Filtrerrückstand wird mit insgesamt 200 mL Methanol nachgespült. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt.  $R_t = 8.09$  min (Phenomenex Luna, Gradient: (CH<sub>3</sub>CN/ H<sub>2</sub>O)<sub>0.1% TFA</sub> (20:80)→(50:50), 40 min,  $\lambda = 214$  nm).

**Deacetylierung:** Das rohe Glycopeptid (max. 0.02 mmol) werden mit 60 mL wässriger NaOH-Lösung (100 mg NaOH in 500 mL entionisiertem Wasser,  $c = 0.004$  mol/L, pH = 11.5) gelöst und drei Tage bei Raumtemp. gerührt. Es wird anschließend mit 1 N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC gereinigt ( $R_t = 8.09$  min (Phenomenex Luna, Gradient: (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)<sub>0.1% TFA</sub> (20:80)→(50:50), 40 min,  $\lambda = 214$  nm).

Ausbeute: 66 mg (0.015 mmol), farbloses Rohprodukt.

C<sub>190</sub>H<sub>304</sub>N<sub>54</sub>O<sub>75</sub> (M = 4544.76 g mol<sup>-1</sup>) [4542.16 g mol<sup>-1</sup>].

ESI-MS (positiv), m/z: 430.9 ([M- $\alpha$ NeuNAcCOOH-(2→3)- $\beta$ Gal-(1→3)- $\alpha$ GalNAc+9H]<sup>9+</sup>, ber.: 430.9).

MALDI-MS (DHB): 2464.33 ([M-6H+4CH<sub>3</sub>COONa+Na+K]<sup>2+</sup>, ber.: 2464.11).

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[3-O-{(5-acetamido-3,5-didesoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- $\beta$ -D-galactopyranosyl)]- $\alpha$ -D-galacto-pyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*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 (97)**

Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ NeuNAcCOOH-(1→6)- $\beta$ Gal-(1→3)- $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

**Hydrierung:** 115 mg (0.023 mmol) Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-(2→3)- $\beta$ Ac<sub>2</sub>GalBn-(1→3)- $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-



Ala-Pro-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH werden in 80 mL Methanol gelöst und mit 4 Spatelspitzen Pd(OAc)<sub>2</sub> versetzt. Der Kolben wird anschließend dreimal mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und jeweils mit Wasserstoff gefüllt. Man rührt 32 h unter Wasserstoffatmosphäre und filtriert im Anschluss über *Hyflo*<sup>®</sup>. Der Filtrückstand wird mit insgesamt 200 mL Methanol nachgespült. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. R<sub>t</sub> = 10.9 min (Phenomenex Luna, Gradient: (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)<sub>0.1% TFA</sub> (20:80)→(50:50), 40 min, λ = 214 nm).

Deacetylierung: Das rohe Glycopeptid (39 mg, max. 0.008 mmol) werden mit 60 mL wässriger NaOH-Lösung (100 mg NaOH in 500 mL entionisiertem Wasser, c = 0.004 mol/L, pH = 11.5) gelöst und drei Tage bei Raumtemp. gerührt. Es wird anschließend mit 1 N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC gereinigt. R<sub>t</sub> = 9.30 min (Phenomenex Luna, Gradient: (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)<sub>0.1% TFA</sub> (20:80)→(50:50), 40 min, λ = 214 nm).

Ausbeute: 98.6 mg (0.022 mmol, quant.) farbloses Rohprodukt.

C<sub>190</sub>H<sub>304</sub>N<sub>54</sub>O<sub>75</sub> (M = 4544.76 g mol<sup>-1</sup>) [4542.16 g mol<sup>-1</sup>].

ESI-MS (positiv), m/z: 430.9 ([M-αNeuNAcCOOH-(2→3)-βGal-(1→3)-αGalNAc+9H]<sup>9+</sup>, ber.: 430.9).

MALDI-MS (DHB): 2463.85 ([M-6H+4CH<sub>3</sub>COONa+Na+K]<sup>2+</sup>, ber.: 2464.11).

## 6.16 Dendrimer-Synthese

*N*<sup>α</sup>, *N*<sup>ε</sup>-Tetrakis-(*N*<sup>α</sup>, *N*<sup>ε</sup>-bis-{{*N*-acetyl-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-seryl-L-threonyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulo-pyranosyl)-onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl]-L-lysyl)-L-lysyl)-L-Lysin-β-alanin<sup>[192]</sup> (101)

{{[Ac-HGVTSAPDTRTAPGST(α-NeuNHAcCOOH-(2,6)-α-GalNAc))APPA]<sub>2</sub>K<sub>2</sub>K<sub>2</sub>K-βA-OH}

Die automatisierte Peptidsynthese des Octa-glycopeptid-Dendrimers mit dem Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen tragenden MUC1-Eicosapeptid erfolgt im Synthesizer ausgehend von 125 mg {Fmoc-Lys(Fmoc)}<sub>2</sub>-Lys}<sub>2</sub>-Lys-β-alanyl-PHP-aminomethylpolystyrol (125 mg, Beladung: 0.04 mmol Fmoc = 0.05 mmol Peptid) (**100**). Die Kupplung der ersten vier Fmoc-Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll. Die Kupplung des Sialyl-T<sub>N</sub>-Threonyl-Bausteins geschieht halbautomatisch. Es wird zuerst die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe vom harzgebundenen Peptid abgespalten. Es werden 230 mg (0.20 mmol, 4 eq.) des Glycosylaminosäurebaustein (**40**) mit 97.5 mg (0.25 mmol, 5 eq.), 33 mg (0.25 mmol, 5 eq.) HOAt und 55 μL (0.5 mmol, 5 eq.) NMM in 2 mL NMP aktiviert und in den Synthesereaktor überführt. Das Harz wird 8 h stark geschüttelt (30 sec Vortex, 30 sec Stillstand). Die weiteren 15 Fmoc-Aminosäuren werden wieder vollautomatisch nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Nach der Kupplung der letzten Aminosäure wird die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und der *N*-Terminus mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen erfolgt in einem Merrifield-Festphasenreaktor in einer Lösung aus 10 mL TFA, 1 mL TIPS und 1 mL Wasser, wobei für zwei Stunden geschüttelt wird. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz wird dreimal mit jeweils 5 mL TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. fünfmal mit Toluol kodestilliert und anschließend dreimal mit Dichlormethan. Das Rohprodukt wird mit eiskaltem Diethylether versetzt und das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert und in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Die Entfernung der Kohlenhydratschutzgruppen erfolgt in 250 mL wässriger NaOH-Lösung bei einem pH-Wert von 11.5 (100 mg NaOH-Plätzchen/500 mL Wasser) und es wird drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wird durch HPLC verfolgt. Nach Neutralisation mit 1 N Essigsäure wird das Wasser i. Hochvak. entfernt und im Anschluss mittels semipräparativer HPLC gereinigt (Phenomenex Luna, Gradient: (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)<sub>0.1% TFA</sub> (5:95)→(20:80), 45 min, λ = 214 nm, R<sub>t</sub> = 6.2 min).

Ausbeute: 82.5 mg (0.004 mmol, 8 %), farbloser Feststoff,  $[\alpha]_D^{22} = -48.9$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Semipräparative HPLC Phenomenex Luna, Gradient: (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)<sub>0.1% TFA</sub> (5:95)→(20:80), 45 min, λ = 214 nm, R<sub>t</sub> = 6.2 min).

C<sub>1005</sub>H<sub>1491</sub>N<sub>231</sub>O<sub>385</sub> (M = 20614.55 g mol<sup>-1</sup>), [20602.66].

ESI-MS (positiv), m/z: Fragmentverteilung von 1147.98 bis 2022.28.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD, COSY, HSQC, TOCSY, HSQC, HMBC), δ (ppm): 8.82 (s, 8H, H<sub>1</sub><sup>Im-H2</sup>), 7.39 (s, 2H, H<sup>Im-H5</sup>), 4.69-4.19 (m, 154H, K<sup>α</sup> {4.70}, H<sup>α</sup> {4.66}, D<sup>α</sup> {4.65}, H1 {4.60, d, J<sub>H1,H2</sub> = 4.4 Hz}, S<sub>2</sub><sup>α</sup> {4.51}, S<sub>1</sub><sup>α</sup> {4.51}, T<sub>STn</sub><sup>α</sup> {4.48}, R<sup>α</sup> {4.43}, T<sub>2</sub><sup>α</sup> {4.31}, T<sub>1</sub><sup>α</sup> {4.28}, A<sub>2,3,4</sub><sup>α</sup> {4.28}, V<sup>α</sup> {4.24}, A<sub>1</sub><sup>α</sup> {4.23}), 4.05-3.48 (m, 157H, T<sub>1</sub><sup>β</sup> {4.09}, T<sub>2</sub><sup>β</sup> {4.07}, G<sub>1</sub><sup>α</sup> {3.97}, H<sub>2</sub> {3.93}, S<sub>2</sub><sup>β</sup> {3.92}, H<sub>7</sub>" {3.90}, S<sub>1</sub><sup>β</sup> {3.88, d, J<sub>Hβ,Hα</sub> = 4.0 Hz}, T<sub>STn</sub><sup>β</sup> {3.77, d, J<sub>Hβ,Hα</sub> = 4.0 Hz}, H<sub>4</sub> {3.73}, H<sub>5</sub> {3.71}, H<sub>6</sub>" {3.71}, P<sub>1-5</sub><sup>δ</sup> {3.68}, H<sub>3</sub> {3.67}, H<sub>8</sub>" {3.65}, H<sub>6b</sub> {3.62}, H<sub>6a</sub> {3.60}, H<sub>5</sub>" {3.49}, H<sub>9b</sub>" {3.48}, H<sub>4</sub>" {3.48}, H<sub>9a</sub>" {3.47}, 3.23-3.11 (m, 32H, 7x K<sup>ε</sup>, H<sup>βa</sup> {3.24}, H<sup>βb</sup> {3.12}, R<sup>δ</sup> {3.11, d, J<sub>Hδ,Hγ</sub> = 3.1 Hz}), 2.01, 1.99 (2x s, CH<sub>3</sub>NH), 2.94-2.86 (m, 8H, D<sup>βa</sup>), 2.69-2.68 (m, 8H, H<sub>3eq</sub>" ), 2.54 (sb, 4H, A<sup>β</sup>), 2.24-2.03 (m, 131H, P<sub>1-5</sub><sup>β</sup> {2.24, d, J<sub>Hβ,Hα</sub> = 4.1 Hz}, V<sup>β</sup> {2.16}, P<sub>1-5</sub><sup>α</sup> {2.12, 2.11, 2.10, 2.09}, CH<sub>3</sub>NH {2.03}), 1.99-1.45 (m, 165H, P<sub>1-5</sub><sup>γ</sup> {1.99}, R<sup>βa</sup> {1.92}, R<sup>βb</sup> {1.92}, K<sup>β</sup> {1.80, 1.79, 1.73, 1.70, 1.63}, H<sub>3ax</sub>" {1.74}, K<sup>δ</sup> {1.65, 1.63, 1.62, 1.61}, T<sub>STn</sub><sup>γ</sup> {1.53}, R<sup>γ</sup> {1.50}), 1.43-1.30 (m, 14H, 7x K<sup>γ</sup>), 1.26-1.18 (m, 144H, T<sub>2</sub><sup>γ</sup> {1.26}, A<sub>2,3,4</sub><sup>β</sup> {1.25}, A<sub>1</sub><sup>β</sup> {1.18}, T<sub>1</sub><sup>γ</sup> {1.17}), 1.00-0.98 (m, 48H, V<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, MeOD, HSQC, TOCSY, HSQC, HMBC), δ (ppm): 175.5, 175.2, 174.8, 174.5, 174.2, 174.1, 173.9, 173.6, 173.1, 172.9, 172.7, 172.4, 172.2, 172.1, 172.0, 171.8, 161.5, 161.3 (C=O, C=O-Acetyl, C1"), 158.2 (C=NH), 135.2 (H<sup>Im-H2</sup>), 130.8 (H<sup>Im-H5</sup>), 118.8 (H<sup>Im-H2</sup>), 100.1 (C1), 70.1 (S<sub>1</sub><sup>β</sup>), 73.8 (C6b), 69.2 (C6a), 68.9 (T<sub>STn</sub><sup>β</sup>) 68.9 (C9a"), 68.6 (C9b"), 69.4 (C4), 69.3 (C5"), 67.6 (C5), 67.4 (C4"), 67.3 (A<sub>2,3,4</sub><sup>α</sup>), 67.0 (A<sub>1</sub><sup>α</sup>), 66.0 (V<sup>α</sup>), 64.3 (C6"), 64.0 (S<sub>2</sub><sup>β</sup>), 63.8 (C8"), 63.4 (C7"), 63.3 (C3), 60.0 (T<sub>2</sub><sup>α</sup>), 59.9 (T<sub>1</sub><sup>α</sup>), 59.7 (T<sub>1</sub><sup>β</sup>), 59.8 (S<sub>2</sub><sup>α</sup>), 59.5 (S<sub>1</sub><sup>α</sup>), 58.6 (R<sup>α</sup>), 58.4 (T<sub>STn</sub><sup>α</sup>), 57.4 (T<sub>2</sub><sup>β</sup>), 56.1 (C1), 53.5 (C2), 51.1 (D<sup>α</sup>), 50.7 (H<sup>α</sup>), 47.6 (P<sub>1-5</sub><sup>δ</sup>), 42.9 (G<sup>α</sup>), 41.1 (H<sup>βa</sup>), 40.9 (H<sup>βb</sup>), 40.4 (C<sub>3eq</sub>" ), 39.3 (R<sup>δ</sup>), 34.6 (D<sup>β</sup>), 30.4 (V<sup>β</sup>), 29.4 (P<sub>1-5</sub><sup>β</sup>), 29.3 (R<sup>βb</sup>), 28.9 (R<sup>βa</sup>), 28.5 (R<sup>γ</sup>), 28.9 (C<sub>3ax</sub>" ), 28.8 (CH<sub>3</sub>NH), 28.3 (T<sub>STn</sub><sup>γ</sup>), 25.0, 24.8 (P<sub>1-5</sub><sup>α</sup>), 18.5 (T<sub>1</sub><sup>γ</sup>), 18.3 (T<sub>2</sub><sup>γ</sup>), 17.9 (V<sup>γb</sup>), 17.6 (V<sup>γa</sup>), 17.9 (A<sub>2,3,4</sub><sup>β</sup>), 17.6 (A<sub>1</sub><sup>β</sup>).

## 7 Literatur

- [1] W. Schulemann, *Angew. Chem.* **1940**, *53*, 342-345.
- [2] B. Schäfer, *Chem. unserer Zeit* **2011**, *45*, 32-46.
- [3] N. Becker, in *Praxis der Viszeralchirurgie Onkologische Chirurgie* (Eds.: J. R. Siewert, M. Rothmund, V. Schumpelick), Springer Berlin Heidelberg, **2010**, pp. 31-47.
- [4] B. Nosse, *Chem. unserer Zeit* **2006**, *40*, 164-172.
- [5] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882-912.
- [6] P. Moingeon, *Vaccine* **2001**, *19*, 1305-1326.
- [7] I. Brockhausen, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1999**, *1473*, 67-95.
- [8] S.-i. Hakomori, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 2405-2414.
- [9] J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, in *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, Vol. 6*, Springer Netherlands, **2001**, pp. 355-364.
- [10] P. L. Devine, I. F. C. McKenzie, *Bioessays* **1992**, *14*, 619-625.
- [11] A. Varki, *Glycobiology* **1993** *3* 97-130
- [12] H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 1-27.
- [13] F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439-449.
- [14] Y. Dong, M. D. Walsh, M. C. Cummings, R. G. Wright, S. K. Khoo, P. G. Parsons, M. A. McGuckin, *J. Pathol.* **1997**, *183*, 311-317.
- [15] S. von Mensdorff-Pouilly, F. G. M. Snijdewint, A. A. Verstraeten, R. H. M. Verheijen, P. Kenemans, *Int. J. Biol. Markers* **2000**, *15*, 343-356.
- [16] E. F. Hounsell, M. J. Davies, D. V. Renouf, *Glycoconjugate J.* **1996**, *13*, 19-26.
- [17] A. Kurosaka, H. Nakajima, I. Funakoshi, M. Matsuyama, T. Nagayo, I. Yamashina, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 11594-11598.
- [18] I. Brockhausen, J.-M. Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607-617.
- [19] W. Chai, E. F. Hounsell, G. C. Cashmore, J. R. Rosankiewicz, J. Feeney, A. M. Lawson, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *207*, 973-980.
- [20] F. G. Hanisch, G. Uhlenbruck, J. Peter-Katalinic, H. Egge, J. Dabrowski, U. Dabrowski, *J. Biol. Chem.* **1989** *264* 872-883
- [21] I. Brockhausen, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 318-325.
- [22] M. Shimizu, K. Yamauchi, *J. Biochem.* **1982**, *91*, 515-524.
- [23] J. S. Grinstead, R. R. Koganty, M. J. Krantz, B. M. Longenecker, A. P. Campbell, *Biochemistry-Us* **2002**, *41*, 9946-9961.
- [24] D. M. Swallow, S. Gendler, B. Griffiths, G. Corney, J. Taylor-Papadimitriou, M. E. Bramwell, **1987**, *328*, 82-84.
- [25] J. Hilkens, M. J. L. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci* **1992**, *17*, 359-363.
- [26] P. Pandey, S. Kharbanda, D. Kufe, *Cancer Res.* **1995** *55* 4000-4003
- [27] S. von Mensdorff-Pouilly, E. Petrakou, P. Kenemans, K. van Uffelen, A. A. Verstraeten, F. G. M. Snijdewint, G. J. van Kamp, D. J. Schol, C. A. Reis, M. R. Price, P. O. Livingston, J. Hilgers, *Int. J. Cancer* **2000**, *86*, 702-712.
- [28] G. Springer, *Science* **1984** *224* 1198-1206
- [29] Y. Ikehara, N. Kojima, N. Kurosawa, T. Kudo, M. Kono, S. Nishihara, S. Issiki, K. Morozumi, S. Itzkowitz, T. Tsuda, S.-I. Nishimura, S. Tsuji, H. Narimatsu, *Glycobiology* **1999** *9* 1213-1224
- [30] 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
- [31] J. Wesseling, S. W. v. d. Valk, H. L. Vos, A. Sonnenberg, J. Hilkens, *The Journal of Cell Biology* **1995**, *129*, 255-265.
- [32] I. Takahashi, Y. Maehara, T. Kusumoto, M. Yoshida, Y. Kakeji, H. Kusumoto, M. Furusawa, K. Sugimachi, *Cancer* **1993**, *72*, 1836-1840.
- [33] M. S. Mitchell, *International Immunopharmacology Combination immunotherapy* **2003**, *3*, 1051-1059.

- [34] A. M. Vlad, J. C. Kettel, N. M. Alajez, C. A. Carlos, O. J. Finn, in *Advances in Immunology, Vol. Volume 82* (Ed.: W. A. Frederick), Academic Press, **2004**, pp. 249-293.
- [35] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798-7803.
- [36] A. L. Sørensen, C. A. Reis, M. A. Tarp, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, *16*, 96-107.
- [37] E. Fischer, E. Fourneau, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **1901**, *34*, 2868-2877.
- [38] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [39] S.-S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [40] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2158.
- [41] G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180-6183.
- [42] F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686-4690.
- [43] A. J. Mort, D. T. A. Lamport, *Anal. Biochem.* **1977**, *82*, 289-309.
- [44] T. Greene, P. Wuts, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, **2007**.
- [45] C.-D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246-249.
- [46] L. A. Carpino, *Accounts of Chemical Research* **1987**, *20*, 401-407.
- [47] A. Speicher, T. Klaus, T. Eicher, *J. prakt. Chem./Chemiker-Zeitung* **1998**, *340*, 581-583.
- [48] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [49] 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.
- [50] L. P. Egan, J. R. Vercellotti, W. T. Lowry, *Carbohydr. Res.* **1972**, *23*, 261-273.
- [51] W. G. Overend, C. W. Rees, J. S. Sequeira, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1962**, 3429-3440.
- [52] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1763-1765.
- [53] P. Sjölin, M. Eloffsson, J. Kihlberg, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 560-565.
- [54] K. Wakabayashi, W. Pigman, *Carbohydr. Res.* **1974**, *35*, 3-14.
- [55] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5386-5394.
- [56] J. Schuman, A. P. Campbell, R. R. Koganty, B. M. Longenecker, *The Journal of Peptide Research* **2003**, *61*, 91-108.
- [57] X. Zhu, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1932-1967.
- [58] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- [59] P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek, *Science* **2001**, *291*, 2370-2376.
- [60] G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2839-2876.
- [61] C. Brocke, H. Kunz, *Biorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3085-3112.
- [62] S. Dziadek, H. Kunz, *The Chemical Record* **2004**, *3*, 308-321.
- [63] H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495-4538.
- [64] H. Kunz, M. Schult, B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinaý, in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Wiley-VCH Verlag GmbH, **2008**, pp. 267-304.
- [65] O. Seitz, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 214-246.
- [66] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801-812.
- [67] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 629-631.
- [68] S. Koto, K. Asami, M. Hirooka, K. Nagura, M. Takizawa, S. Yamamoto, N. Okamoto, M. Sato, H. Tajima, T. Yoshida, N. Nonaka, T. Sato, S. Zen, K. Yago, F. Tomonaga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 765-777.
- [69] R. Lemieux, R. M. Ratcliffe, in *Deutsche Patentanmeldung, Vol. AZ: P 2816340.8*, **1978**.
- [70] A. Paquet, *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* **1982**, *60*, 976-980.
- [71] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89-107.
- [72] H. Kunz, in *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Ed.: S. Hanessian), Marcel Dekker Publ., New York, **1997**, pp. 265-281.
- [73] B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8777-8778.
- [74] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 985-993.
- [75] G. Zemplén, A. Kunz, *Ber. dtsh. chem. Ges. (A and B Series)* **1923**, *56*, 1705-1710.

- [76] M. Yoshida, A. Uchimura, M. Kiso, A. Hasegawa, *Glycoconjugate J.* **1993**, *10*, 3-15.
- [77] A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35-42.
- [78] K. Okamoto, T. Goto, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 5835-5857.
- [79] K. Furuhashi, K. Komiyama, H. Ogura, T. Hata, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1991**, *39*, 255-259.
- [80] F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, c13-c17.
- [81] V. Martichonok, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1702-1706.
- [82] P. Fügedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1986**, *149*, C9-C12.
- [83] A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1990**, *195*, 303-308.
- [84] P. Konradsson, U. E. Udodong, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4313-4316.
- [85] G. H. Veeneman, S. H. van Leeuwen, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331-1334.
- [86] H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115-116.
- [87] R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, *1990*, 694,696.
- [88] S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 880-885.
- [89] H. Herzner, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2001**.
- [90] O. T. Schmidt, *Vol. II* (Eds.: R. L. Whistler, M. J. Wolfrom), Academic Press, New York, **1963**, pp. 318-325.
- [91] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556-557.
- [92] X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6569-6578.
- [93] B. Helferich, K.-F. Wedemeyer, *Liebigs Ann. Chem.* **1949**, *563*, 139-145.
- [94] W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **1901**, *34*, 957-981.
- [95] N. Bézay, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2000**.
- [96] T. Reipen, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2003**.
- [97] S. Dziadek, H. Kunz, *Synlett* **2003**, *2003*, 1623,1626.
- [98] C. Janeway, *Immunologie*, Spektrum, **2002**.
- [99] C. Schütt, B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*, Spektrum akademischer Verlag, **2006**.
- [100] L. Sompayrac, (Ed.: n. Edition), Blackwell Publishing, **2003**.
- [101] V. P. Butler Jr., S. M. Beiser, Volume 17 ed. (Ed.: F. J. D. a. H. G. Kunkel), Academic Press, **1973**, pp. 255-310.
- [102] B. F. Erlanger, in *Volume 70: Immunochemical Techniques Part A*, Volume 70 ed. (Ed.: J. J. L. Helen Van Vunakis), Academic Press, **1980**, pp. 85-104.
- [103] M. V. H. Van Regenmortel, S. Muller, Elsevier, **1999**.
- [104] E. E. M. G. Loomans, A. P. V. Petersen van Ettehoven, H. P. J. Bloemers, W. J. G. Schielen, *Anal. Biochem.* **1997**, *248*, 117-129.
- [105] K. E. van Holde, K. I. Miller, Volume 47 ed. (Ed.: F. M. R. C.B. Anfinsen, John T. Edsall and David S. Eisenberg), Academic Press, **1995**, pp. 1-81.
- [106] R. E. Huebner, M. Nicol, R. Mothupi, H. Käyhty, N. Mbelle, E. Khomo, K. P. Klugman, *Vaccine* **2004**, *23*, 802-806.
- [107] T. Nolan, S. Lambert, D. Robertson, H. Marshall, P. Richmond, C. Streeton, J. Poolman, D. Boutriau, *Vaccine* **2007**, *25*, 8487-8499.
- [108] T. Peters, *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 161-245.
- [109] P. F. Fox, A. L. Kelly, *Food Australia* **2003**, *5*, 231-234.
- [110] T. H. Ji, in *Enzyme Structure Part I*, Volume 91 ed. (Ed.: S. N. T. C.H.W. Hirs), Academic Press, **1983**, pp. 580-609.
- [111] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366-369.
- [112] V. Braun, K. Rehn, *Eur. J. Biochem.* **1969**, *10*, 426-438.
- [113] W. Bessler, M. Cox, A. Lex, B. Suhr, K. Wiesmuller, G. Jung, *J. Immunol.* **1985**, *135*, 1900-1905.
- [114] G. Jung, C. Carrera, H. Brückner, W. G. Bessler, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, *1983*, 1608-1622.
- [115] G. Jung, K.-H. Wiesmüller, G. Becker, H.-J. Bühring, W. G. Bessler, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 883-885.
- [116] J. Metzger, G. Jung, W. G. Bessler, P. Hoffmann, M. Strecker, A. Lieberknecht, U. Schmidt, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1969-1974.
- [117] J. Metzger, K.-H. Wiesmüller, R. Schaudé, W. G. Bessler, G. Jung, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 46-57.

- [118] A. Reitermann, J. Metzger, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, W. G. Bessler, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1989**, *370*, 343-352.
- [119] R. Seifert, G. Schultz, M. Richter-Freund, J. Metzger, K. H. Wiesmüller, G. Jung, W. G. Bessler, S. Hausschildt, *Biochem. J* **1990**, *267*, 795-802.
- [120] R. Spohn, U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, K.-H. Wiesmüller, *Vaccine* **2004**, *22*, 2494-2499.
- [121] C. Hashimoto, K. L. Hudson, K. V. Anderson, *Cell* **1988**, *52*, 269-279.
- [122] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C. A. Janeway, *Nature* **1997**, *388*, 394-397.
- [123] F. L. Rock, G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, J. F. Bazan, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 588-593.
- [124] D. P. Galonic, D. Y. Gin, *Nature* **2007**, *446*, 1000-1007.
- [125] S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 663-667.
- [126] B. Frisch, A. Roth, F. Schuber, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 373* (Ed.: D. Nejat), Academic Press, **2003**, pp. 51-73.
- [127] D. Krikorian, E. Panou-Pomonis, C. Voitharou, C. Sakarellos, M. Sakarellos-Daitsiotis, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 812-819.
- [128] S. D. C. Müller, M. R. Müller, M. Huber, U. v. d. Esche, C. J. Kirschning, H. Wagner, W. G. Bessler, K. Mittenbühler, *International Immunopharmacology* **2004**, *4*, 1287-1300.
- [129] 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.
- [130] M. J. S. A. Amaral, M. A. Macedo, M. I. A. Oliveira, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 205-206.
- [131] E. Taschner, C. Wasielewski, J. F. Biernat, *Liebigs Ann. Chem.* **1961**, *646*, 119-122.
- [132] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [133] E. Bayer, W. Rapp, *Vol. 3* (Eds.: V. W., B. E., O. Y.A., I. V.I.), de Gruyter, Berlin, **1986**, pp. 3-8.
- [134] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [135] J. Green, O. M. Ogunjobi, R. Ramage, A. S. J. Stewart, S. McCurdy, R. Noble, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4341-4344.
- [136] R. Ramage, J. Green, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2287-2290.
- [137] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739-2742.
- [138] A. Stierandová, N. F. Sepetov, G. V. Nikiforovich, M. Lebl, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 31-38.
- [139] W. C. Chan, P. D. White, (Ed.: B. D. Hames), Oxford Press, Oxford, **2000**.
- [140] F. M. F. Chen, R. Stainauer, N. L. Benoiton, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2939-2941.
- [141] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279-2282.
- [142] M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 315-319.
- [143] Y. Yang, W. V. Sweeney, K. Schneider, S. Thörnqvist, B. T. Chait, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9689-9692.
- [144] C.-D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. D. Haug, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, *15*, 59-66.
- [145] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 354-355.
- [146] H. Kunz, S. Birnbach, P. Wernig, *Carbohydr. Res.* **1990**, *202*, 207-223.
- [147] K. von dem Bruch, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 101-103.
- [148] J. Sheehan, P. Cruickshank, G. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2525-2528.
- [149] C. P. Stowell, Y. C. Lee, in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. Volume 37* (Eds.: R. S. Tipson, H. Derek), Academic Press, **1980**, pp. 225-281.
- [150] H. J. Gabius, A. Bardosi, *Prog. Histochem. Cytochem.* **1991**, *22*, 1-63.
- [151] L. F. Tietze, C. Schroeter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H. J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 148-153.
- [152] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798-7803.
- [153] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551-7556.
- [154] U. Westerlind, H. Schroder, A. Hobel, N. Gaidzik, A. Kaiser, C. M. Niemeyer, E. Schmitt, H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8263-8267.
- [155] P. Niederhafner, J. Šebestík, J. Ježek, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 2-43.
- [156] T. K. Lindhorst, *Nach. Chem. Tech. Lab.* **1996**, *44*, 1073-1079.

- [157] G. M. Dykes, *J. Chem. Tech. Biotech.* **2001**, *76*, 903-918.
- [158] F. Vogtle, E. Buhleier, W. Wehner, *Synthesis-Stuttgart* **1978**, 155-158.
- [159] M. W. Grinstaff, *Chemistry – A European Journal* **2002**, *8*, 2838-2846.
- [160] J. P. Tam, F. Zavala, *J. Immunol. Meth.* **1989**, *124*, 53-61.
- [161] J. P. Tam, *J. Immunol. Meth.* **1996**, *196*, 17-32.
- [162] P. Veprek, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 5-23.
- [163] P. Veprek, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 203-220.
- [164] S. Bay, R. Lo-Man, E. Osinaga, H. Nakada, C. Leclerc, D. Cantacuzene, *The Journal of Peptide Research* **1997**, *49*, 620-625.
- [165] F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, c13-c17.
- [166] W. R. Heath, F. R. Carbone, *Annual Review of Immunology* **2001**, *1*, 126-135.
- [167] M. J. Bevan, *J. Immunol.* **1976** *117* 2233-2238
- [168] S. Ota, T. Ono, A. Morita, A. Uenaka, M. Harada, E. Nakayama, *Cancer Res.* **2002** *62* 1471-1476
- [169] K. L. Rock, *Immunology Today* **1996**, *17*, 131-137.
- [170] B. Nardelli, Y. Lu, D. Shiu, C. Delpierre-Defoort, A. Profy, J. Tam, *J. Immunol.* **1992** *148* 914-920
- [171] J. P. Defoort, B. Nardelli, W. Huang, D. D. Ho, J. P. Tam, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1992** *89* 3879-3883
- [172] J. P. Tam, Y. A. Lu, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1989** *86* 9084-9088
- [173] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9977-9981.
- [174] A. Hoffmann-Roder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8498-8503.
- [175] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y. M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3688-3692.
- [176] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551-7555.
- [177] A. Kaiser, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2009**.
- [178] N. Gaidzik, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2011**.
- [179] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9977-9981.
- [180] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals, Vol. 4th*, Elsevier **1996**.
- [181] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [182] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129 - 132.
- [183] A. P. Kozikowski, J. Lee, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 863-870.
- [184] S. Dziadek, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2005**.
- [185] G. Braum, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **1991**.
- [186] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473-1482.
- [187] S. Keil, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2000**.
- [188] H. Paulsen, S. Peters, T. Bielfeldt, M. Meldal, K. Bock, *Carbohydr. Res.* **1995**, *268*, 17-34.
- [189] X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6569-6578.
- [190] M. Lergenmüller, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 1381-1394.
- [191] B. Helferich, J. Zirner, *Chem. Ber.* **1962**, *95*, 2604-2611.
- [192] T. Becker, A. Kaiser, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, *2009*, 1113,1122.

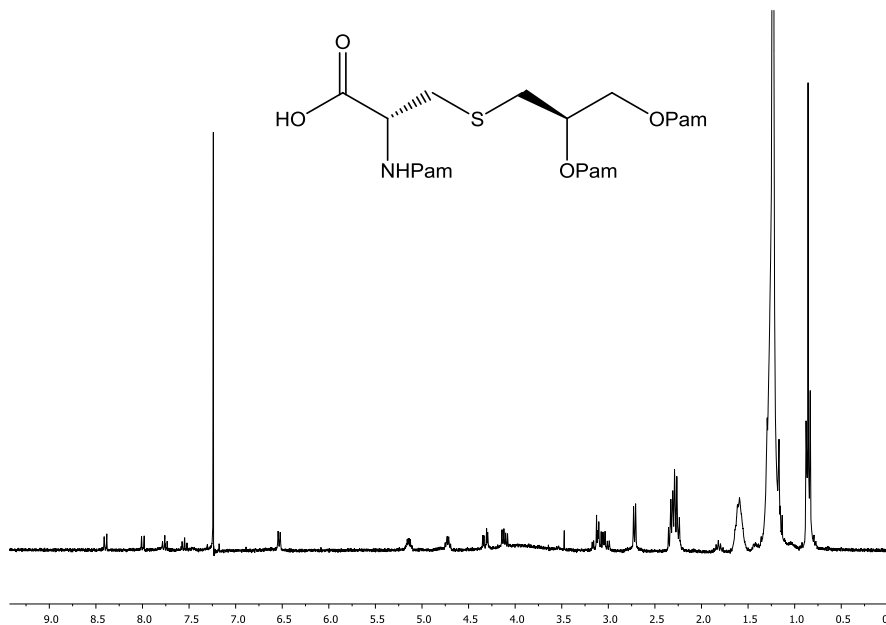




## 8 Spektrenanhang

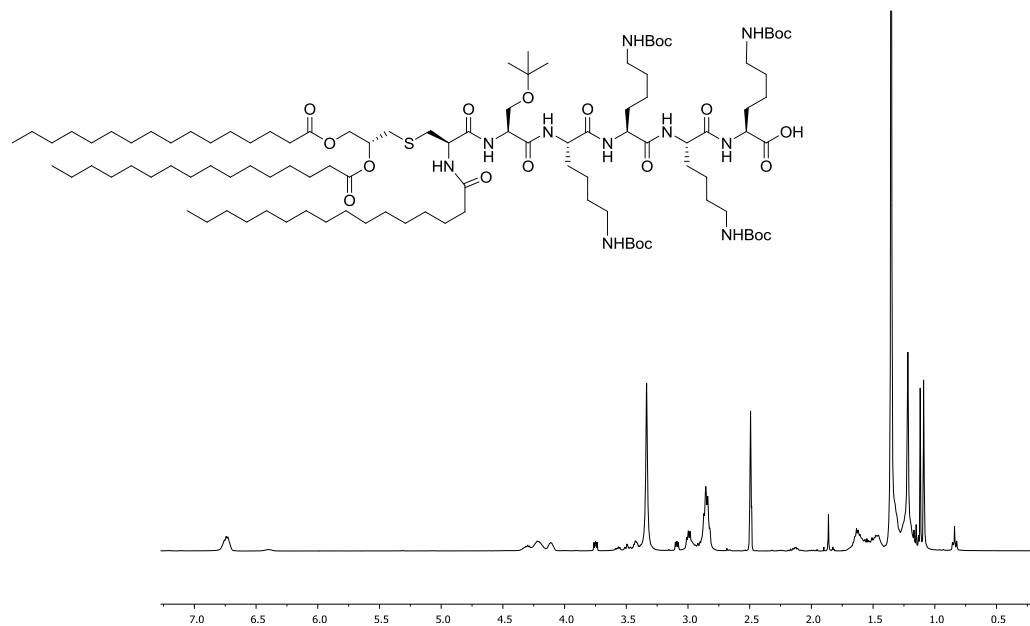
*N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein (**73**)

$^1\text{H-NMR}$ : 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$

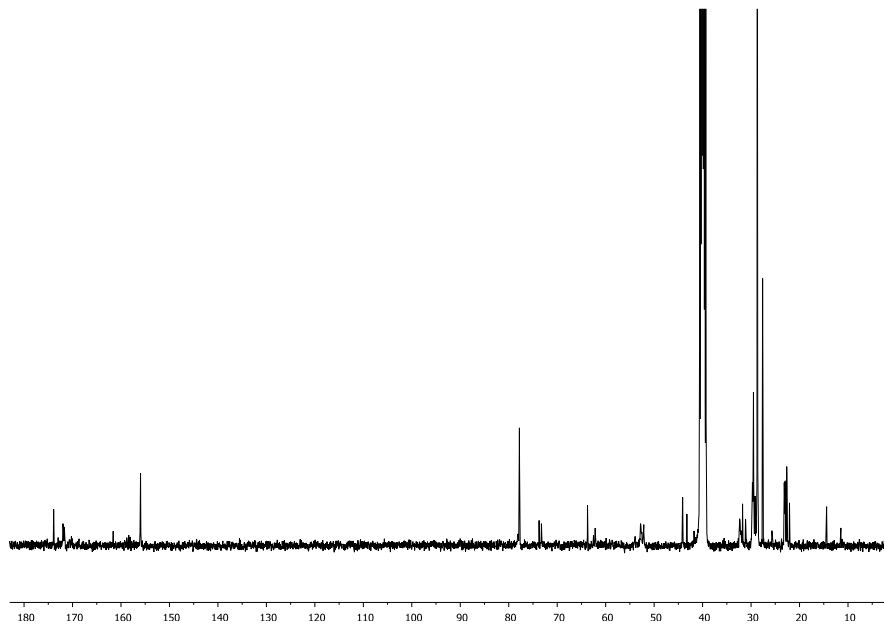
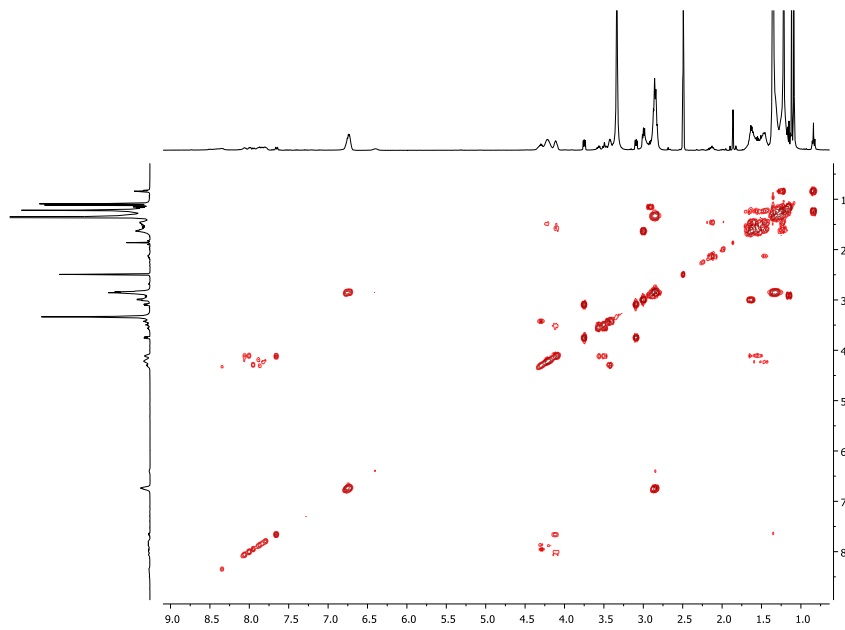


Pam<sub>3</sub>Cys-Ser(OtBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH (**88**)

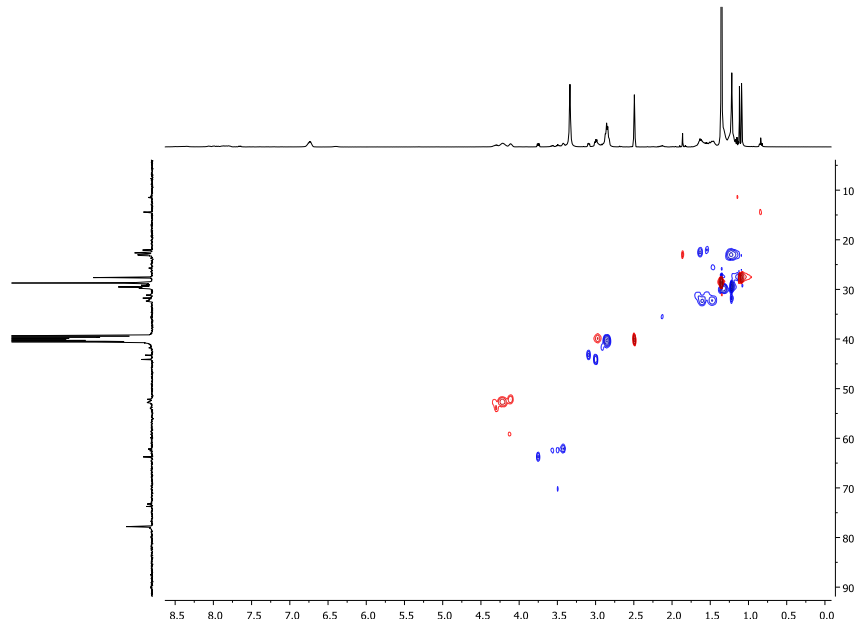
$^1\text{H-NMR}$ : 400 MHz, DMSO



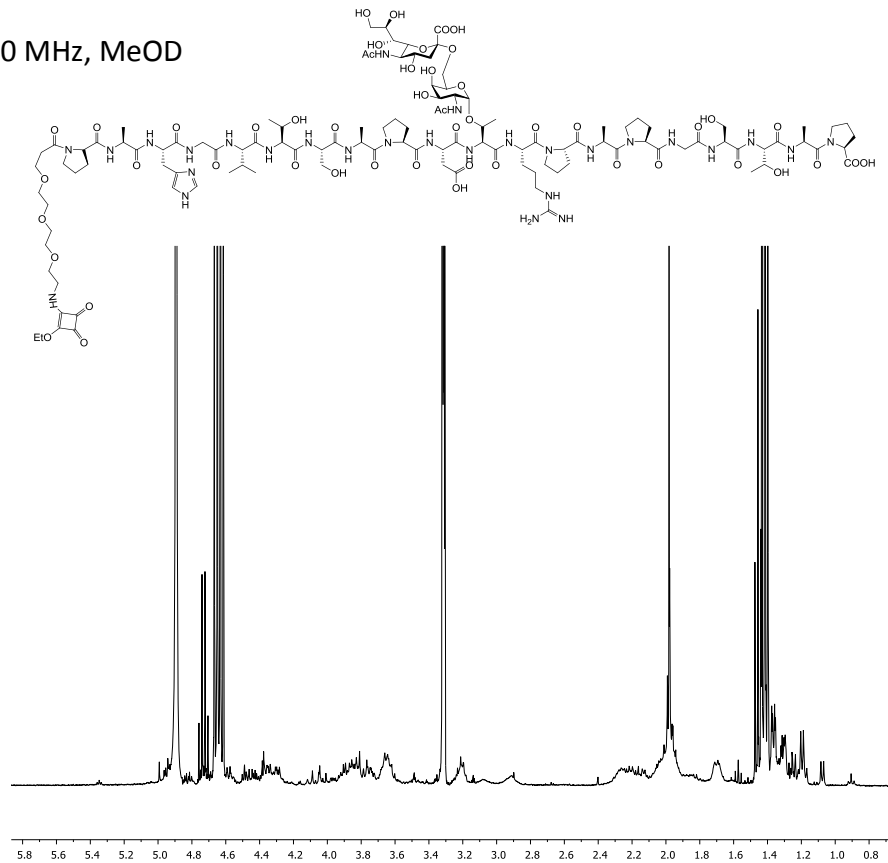
(88)

 $^{13}\text{C}$ -NMR: 400 MHz, DMSO $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY: 400 MHz, DMSO

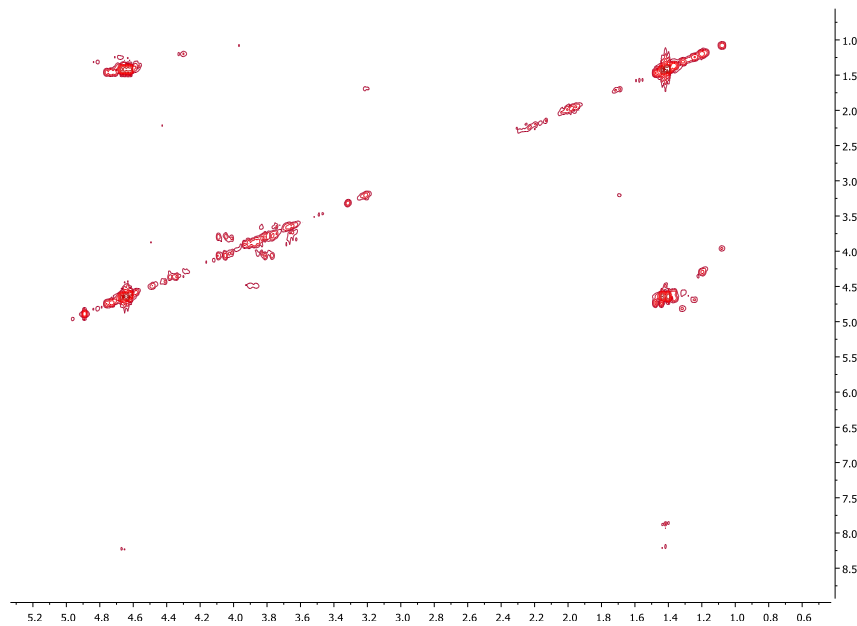
(88)

 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC: 400 MHz, DMSO

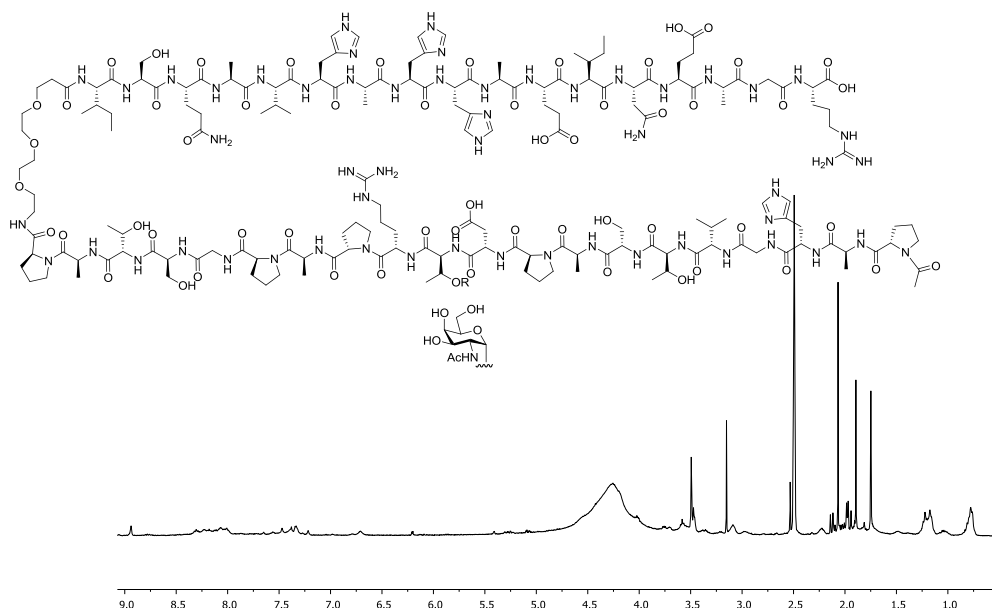
EtO-Squarat-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-  
Thr(NeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (**81**)

 $^1\text{H}$ -NMR: 400 MHz, MeOD

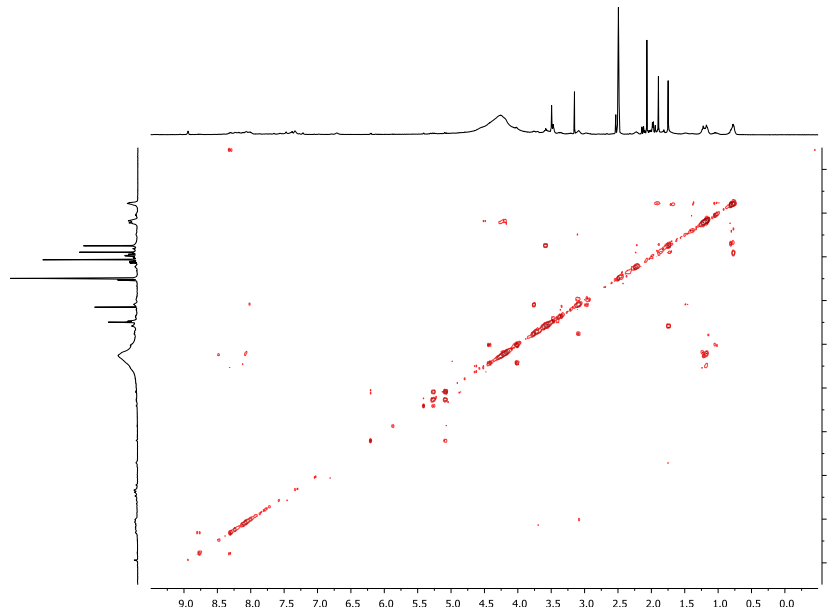
(81)

 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY: 400 MHz, MeOD

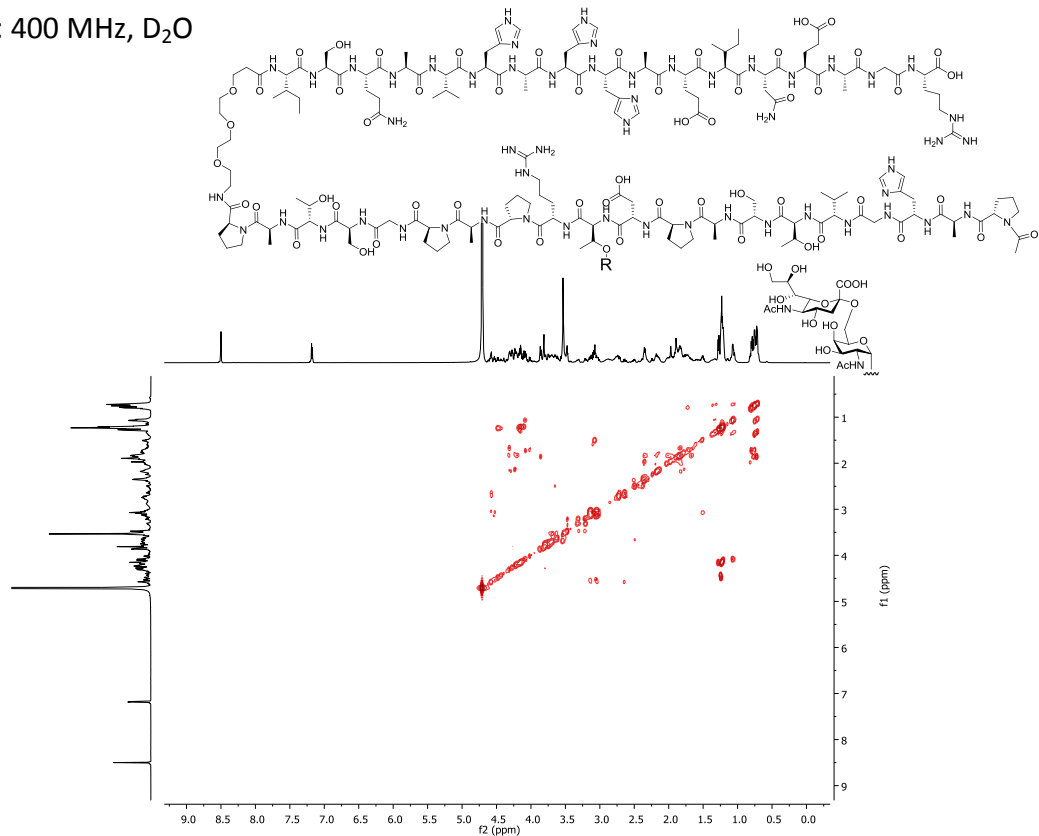
Ac-Pro-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-( $\alpha$ GalNAc)-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH (**91**)

 $^1\text{H}$ -NMR: 400 MHz, D<sub>2</sub>O

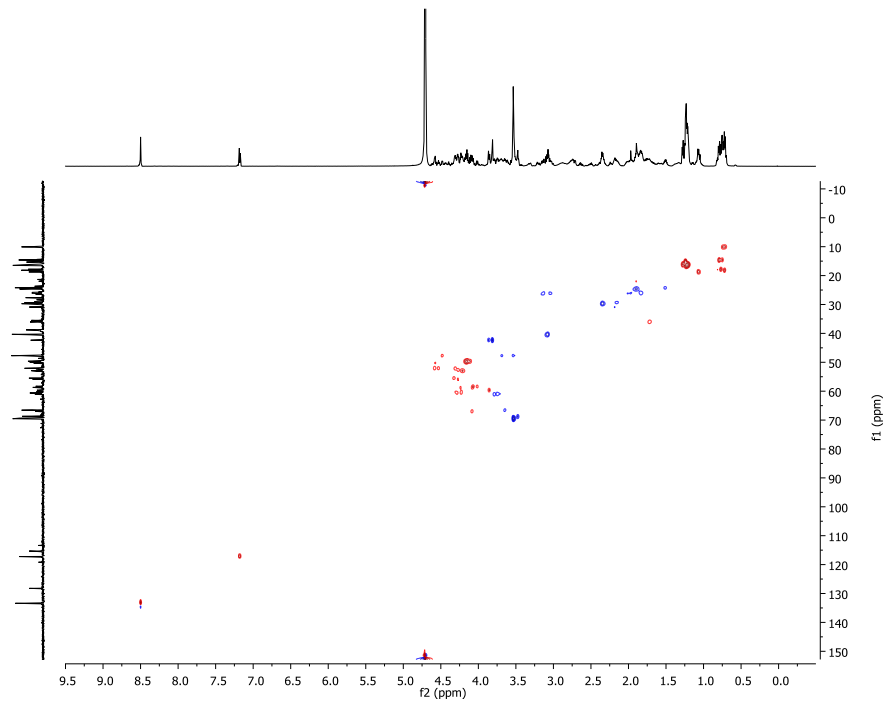
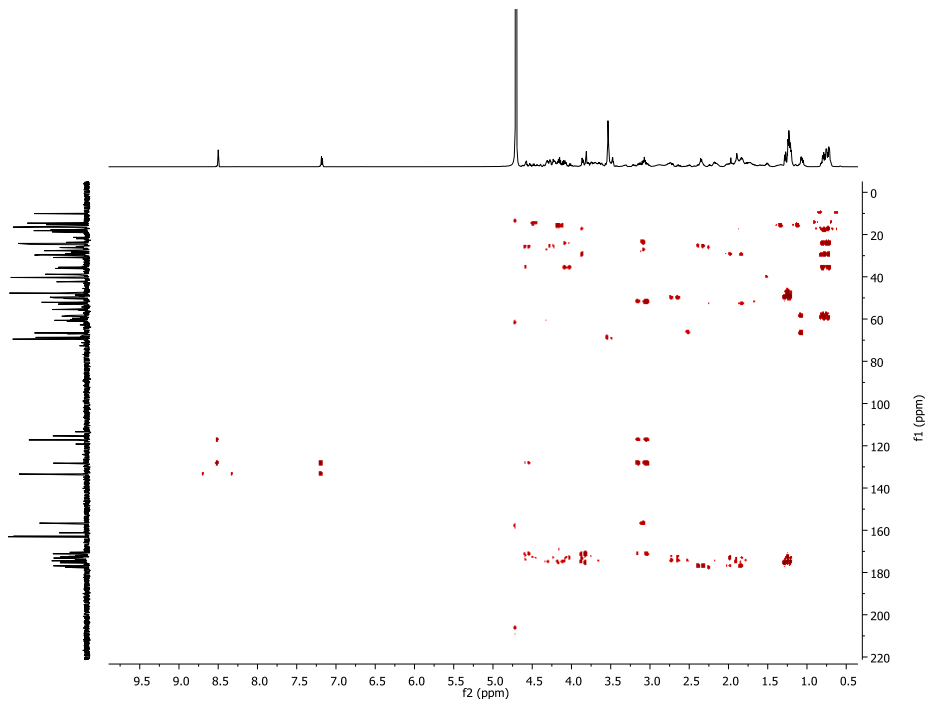
(91)

 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY: 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ 

Ac-Pro-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-( $\alpha\text{NeuNAcCOOH}$ -(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha\text{GalNAc}$ )-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH (**93**)

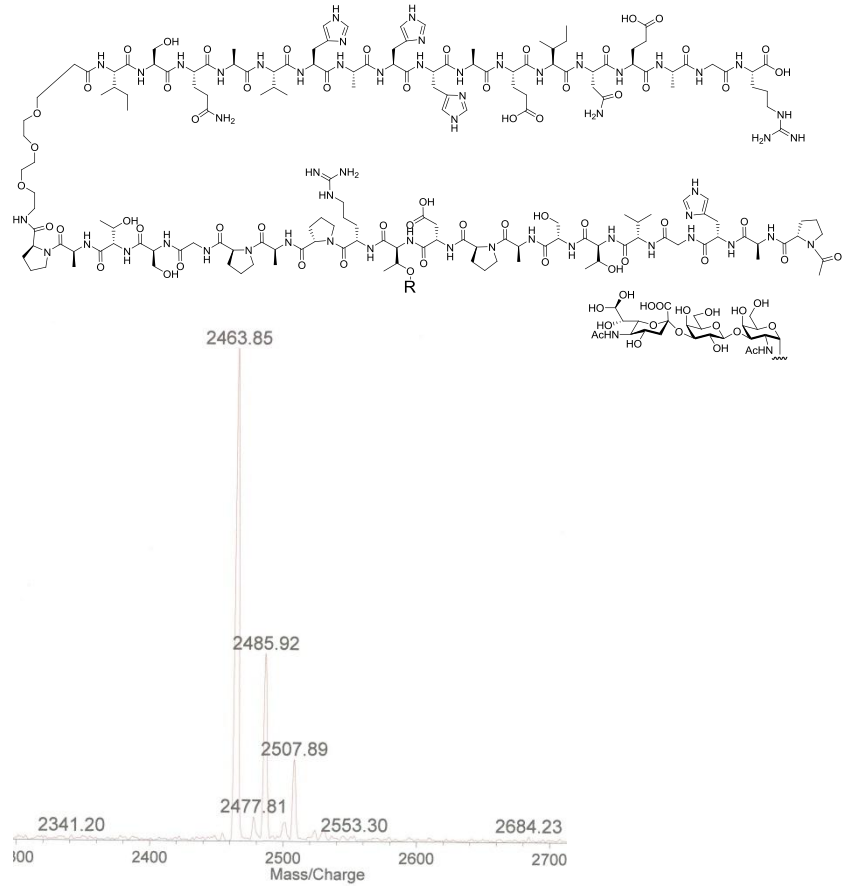
 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY: 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ 

(93)

 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC: 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC: 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ 

Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ NeuNAcCOOH-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH (**96**)

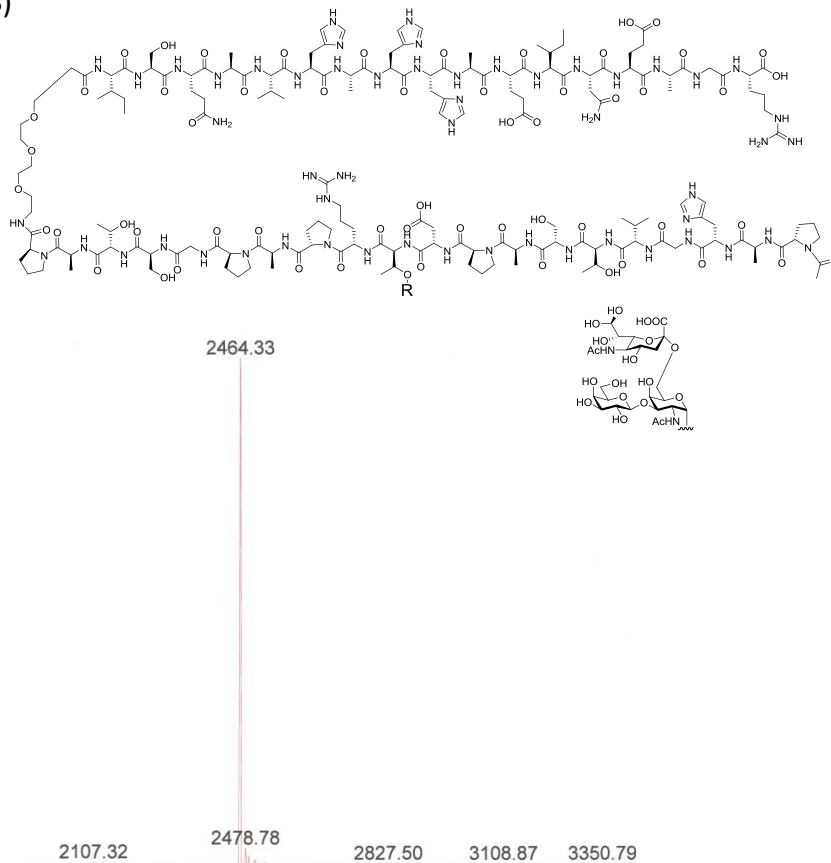
MALDI-TOF-MS (DHB)





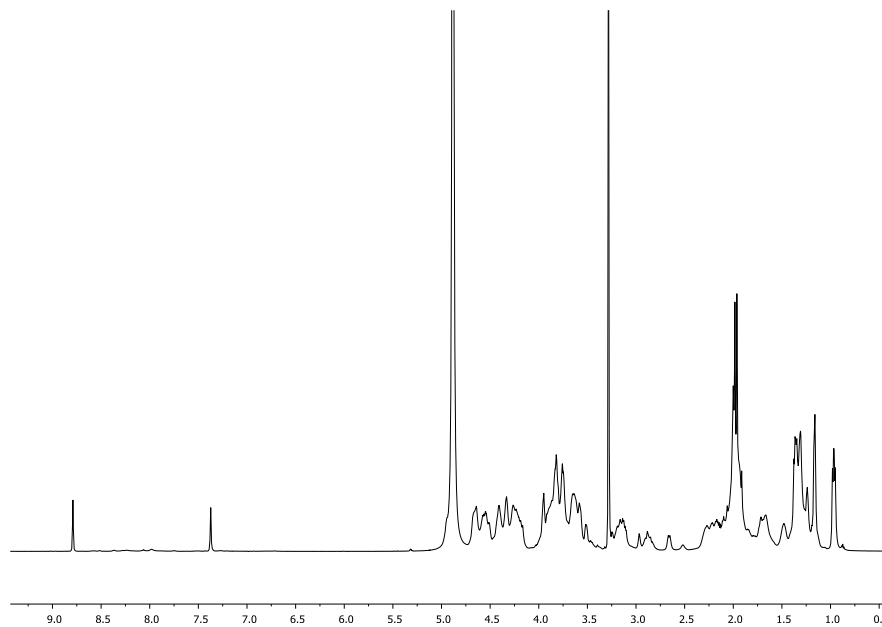
Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ NeuNAcCOOH-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH (**97**)

MALDI-TOF-MS (DHB)

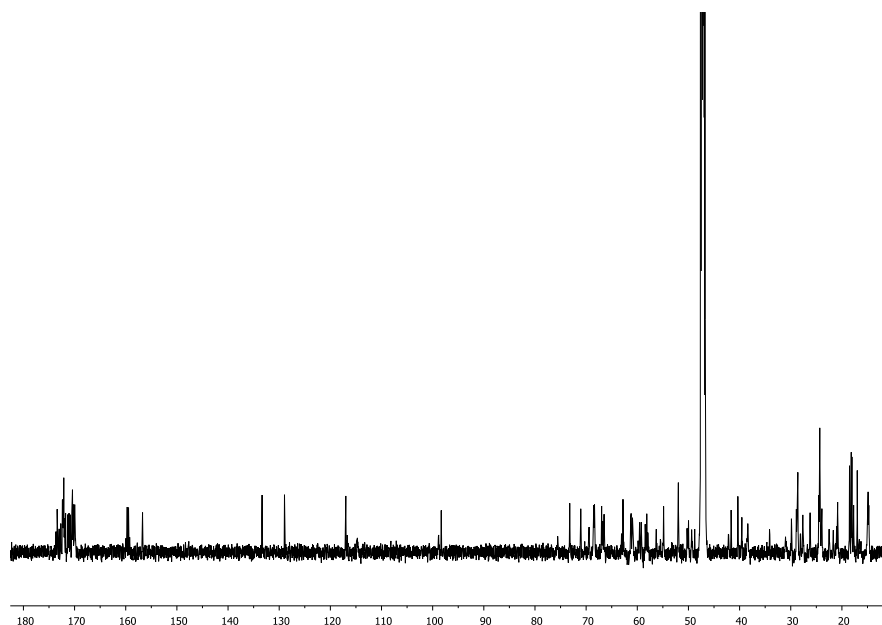


({[Ac-HGVTSAPDTRTAPGST( $\alpha$ -NeuNHAcCOOH-(2,6)- $\alpha$ GalNAc)APPA]<sub>2</sub>K)<sub>2</sub>K}<sub>2</sub>K- $\beta$ A-OH) (**101**)

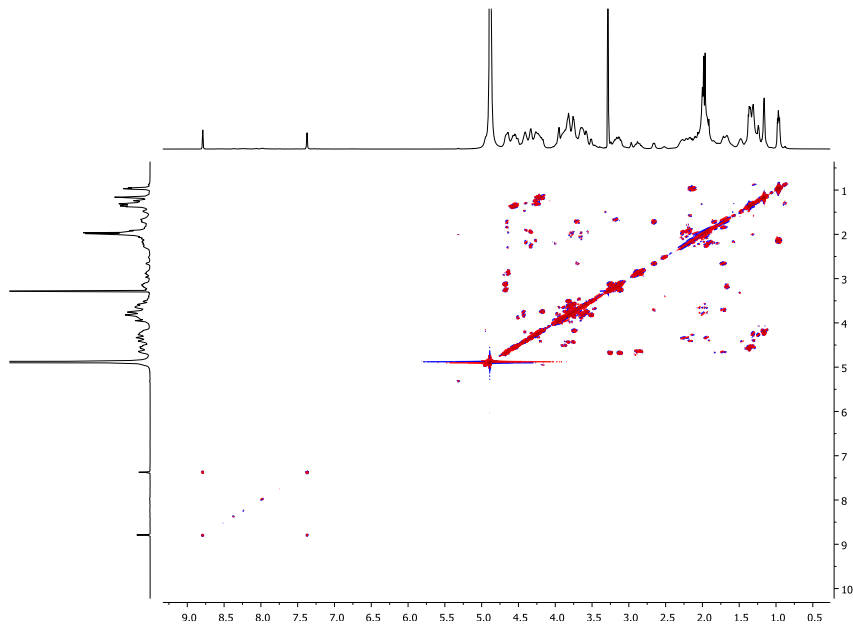
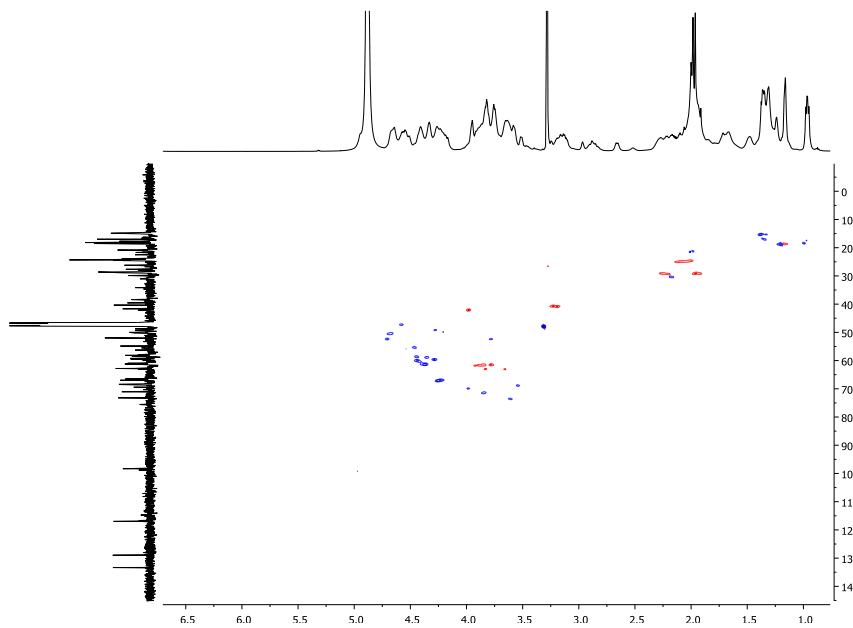
<sup>1</sup>H-NMR: 400 MHz, MeOD



<sup>13</sup>C-NMR: 400 MHz, MeOD



(101)

 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY: 400 MHz, MeOD $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC: 400 MHz, MeOD

(101)

 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC: 400 MHz, MeOD