

**Synthese und immunologische Evaluierung
von Antitumor-Impfstoffen aus dem
epithelialen tumorassoziierten Mucin MUC1**

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

Anton Kaiser
geboren in Lahnstein
Mainz, im September 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von Februar 2007 bis September 2009
am Institut für Organische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Horst Kunz angefertigt

Es gibt keine alleinwissendmachende Methode der Wissenschaft!

Wir müssen versuchsweise mit den Dingen verfahren,
bald böse, bald gut gegen sie sein und Gerechtigkeit,
Leidenschaft und Kälte nacheinander für sie haben.

Friedrich Nietzsche

In Erinnerung an meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1 Krebs	1
1.2 Antitumor-Impfstoffe auf Mucin MUC1 Basis	2
2. Zielsetzung	11
3. Allgemeiner Teil	
3.1 Retrosynthese von Glycopeptid-Antitumorvakzinen	15
3.2 Synthese der glycosylierten Aminosäure-Bausteine	21
3.2.1 Darstellung von <i>N</i> -Acetylgalactosamin-Threonin- und -Serin-Bausteinen	21
3.2.2 Synthese der Sialyl-T _N -Antigen-Bausteine	25
3.2.3 Synthese des <i>Thomson-Friedenreich</i> -Antigen-Bausteins	30
3.2.4 Synthese des 2,3-Sialyl-T-Antigen-Bausteins	33
3.2.5 Synthese des 2,6-Sialyl-T-Antigen-Bausteins	36
3.2.6 Synthetische Studien zur Entwicklung eines <i>C</i> -glycosidischen Sialyl-T _N -Antigens	38
3.3 Synthese funktionalisierter MUC1-Glycopeptid-Antigene	43
3.3.1 MUC1-Glycopeptid-Antigene	43
3.3.2 Peptid- und Glycopeptidfestphasensynthese	44
3.3.3 Allgemeines Protokoll der Festphasenpeptid- und Glycopeptidsynthese	51
3.3.4 Synthese von Amino-funktionalisierten MUC1-Glycopeptid-Antigenen	53
3.3.5 Geplante Synthese von Thiol-funktionalisierten MUC1-Glycopeptid- Antigenen	58
3.3.6 Synthese eines dimeren Sialyl-T _N -MUC1-Glycopeptids	64
3.4 Synthese und immunologische Evaluierung von MUC1-Glycopeptid-Protein-Konjugaten	67
3.4.1 Protein-Antigen-Konjugate	67
3.4.2 MUC1-Glycopeptid-Protein-Konjugate	68
3.4.3 Mit Quadratsäureestern funktionalisierte MUC1-Glycopeptide	70
3.4.4 BSA-Glycopeptid-Konjugate	71
3.4.5 Vakzine aus Tetanus-Toxoid und MUC1-Glycopeptid-Antigenen	74
3.4.6 Immunologische Evaluierung des Tetanus-Toxoid-MUC1- Sialyl-T _N - Glycopeptid-Konjugats	83
3.4.7 Immunologische Evaluierung des Tetanus-Toxoid-MUC1-TF- Glycopeptid-Konjugats	86
	85

3.5 Synthese und immunologische Evaluierung von octameren MUC1-Glycopeptid-Antigenen	88
3.5.1 Dendrimere Glycopeptide	88
3.5.2 Synthese von octameren MUC1-Glycopeptiden	90
3.5.3 Immunologische Evaluierung von octameren MUC1-Glycopeptiden	96
3.5.4 Synthese eines immunkompatibelen octameren MUC1-Glycopeptids	99
3.6 Synthese und immunologische Evaluierung von MUC1-Glycopeptid-Mitogen-Konjugaten	102
3.6.1 Glycopeptid-Mitogen-Konjugate	102
3.6.2 Synthese von Pam ₃ Cys-OH	104
3.6.3 Synthese des TLR2-Agonisten Pam ₃ CysSerLysLysLysLys	106
3.6.4 Synthese des Lysin-PTMSE-Systems	107
3.6.5 Festphasen-Lipopeptidsynthese des geschützten TLR2-Agonisten	110
3.6.6 Synthese von MUC1-Glycopeptid-TLR2-Agonist-Konjugaten	111
3.6.7 Immunologische Evaluierung der MUC1-Glycopeptid-TLR2-Agonist-Konjugate	114
3.7 Synthese von oligotopen MUC1-Glycopeptid-Vakzin-Konjugaten	116
3.7.1 Heterotop-Konjugate	116
3.7.2 Synthese eines MUC1-Glycopeptid-OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -Konjugats	117
3.7.3 Synthese eines Lipo-MUC1-Glycopeptid-OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -Konjugats	119
3.7.4 Synthese eines TLR2-Agonist-MUC1-Glycopeptid-Tetanus-Toxoid-Konjugats	123
4. Zusammenfassung	127
5. Experimenteller Teil	139
5.1 Allgemeines und Messgeräte	139
5.2 Synthesen zu Kapitel 3.2	145
5.3 Synthesen zu Kapitel 3.3	183
5.4 Synthesen zu Kapitel 3.4	223
5.5 Synthesen zu Kapitel 3.5	236
5.6 Synthesen zu Kapitel 3.6	248
5.7 Synthesen zu Kapitel 3.7	267
6. Literaturverzeichnis	277
7. Anhang	286

Abkürzungsverzeichnis

α	spezifischer Drehwert
Abb.	Abbildung
absol.	absolut
Ac	Acetyl-
Ac ₂ O	Acetanhydrid
AcOH	Essigsäure
Ala, A	Alanin
arom.	aromatisch
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
Ausb.	Ausbeute
Äquiv.	Äquivalente
arom.	aromatisch
b	breit
BB	Breitband-Entkopplung
Ber.	Berechnet
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Bovine Serum Albumin
c	Konzentration
COSY	Correlated Spectroscopy
Cys, C	Cystein
δ	chemische Verschiebung
d	Tag
d, dd, ddd	Dublett, Dublett von Dublett, Dublett von Dublett von Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dt	Dublett von Triplett
ESI-MS	Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
Et	Ethyl
EtOAc	Ethylacetat
Fa.	Firma
FD-MS	Field-desorption-Massenspektrometrie
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
Gal	D-Galactose
Gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat

HMPB	4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxybutansäure
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
i. Hochvak.	im Hochvakuum
i. Vak.	im Vakuum
IIDQ	1-Isobutyloxycarbonyl-2-isobutyloxy-1,2-dihydrochinolin
Ile, I	Isoleucin
kDa	Kilo-Dalton
J	Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
Leu, L	Leucin
Lit.	Literatur
Lsg.	Lösung
M	Molarität
m	Multipllett
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight
MBHA	<i>p</i> -Methylbenzhydrylamid
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
MS	Massenspektrum
NaOMe	Natriummethanolat
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Nuclear magnetic resonance
org.	organisch
Phe, F	Phenylalanin
pos	positiv
ppm	parts per million
Pro, P	Prolin
q	Quartett
quant.	quantitativ
R	Rest
Raumtemp.	Raumtemperatur
R _f	Retentionsfaktor für Dünnschichtchromatogramme
RP	Reversed phase
R _t	Retentionszeit
s	Singulett
Sdp.	Siedepunkt
Schmp.	Schmelzpunkt
Ser, S	Serin
t	Triplett
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N, N, N', N'-tetramethyl-uroniumtetrafluoroborat

<i>t</i> Bu	<i>tert.</i> -Butyl
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
Thr, T	Threonin
TIS	Triisopropylsilan
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Val, V	Valin
Xaa	Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl

1. Einleitung

1.1 Krebs

Im späten 19. Jahrhundert fanden *E. Smith* und *G. Elbers* Papyri aus der Zeit um 1600 v. Chr., in denen die alten Ägypter von einer Krankheit berichteten, die uns heute unter dem Namen *Krebs* geläufig ist.¹ Selbst mehr als 3500 Jahre danach konnte die Menschheit immer noch nicht Herr über diese Krankheit werden.² Trotz aufwendiger Forschungen zu diesem Themenbereich ist Krebs nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen. In Deutschland beispielsweise ist Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Unter Krebs wird das Auftreten einer unkontrollierten Proliferation entarteter Körperzellen, ausgelöst durch eine Störung des genetisch geregelten Gleichgewichts zwischen Zellzyklus und Apoptose, verstanden, was zur Folge hat, dass eine bösartige Neoplasie gesundes Gewebe verdrängen und zerstören kann. Bis zu 20% aller Krebserkrankungen weltweit werden derzeit auf infektiöse Agenzien wie Viren, Bakterien und Parasiten zurückgeführt. Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung eines Impfstoffs gegen Gebärmutterhalskrebs, welcher durch humane Papillomviren (HPV) ausgelöst wird (Nobelpreis für Medizin 2008).³ Grundsätzlich wird zwischen malignen epithelialen Tumoren (Karzinomen) und malignen mesenchymalen Tumoren (Sarkomen) unterschieden. Die häufigsten beim Menschen auftretenden Krebsarten sind: Brust-, Lungen-, Darm- und Prostatakrebs. Brust- und Prostatakrebs stellen hierbei das jeweilige Pendant zum Geschlecht dar. In Abb. 1.1 ist die prozentuale Verteilung der einzelnen Krebsarten für beide Geschlechter des Menschen dargestellt.

Aufgrund der Tatsache, dass Krebs durch eine genetische Störung ausgelöst wird, kann prinzipiell jedes Gewebe davon befallen werden. Die Anforderungen an eine Heilung bestehen darin, dass maligne Zellen abgetötet werden, ohne dabei gesundes Gewebe zu beschädigen. Grundsätzlich gibt es dafür drei Möglichkeiten: Chirurgische Entfernung, Bestrahlungs- und Chemotherapie.^{4,5,6,7,8} Durch eine Kombination aus diesen drei Therapieformen lassen sich derzeit Heilungsraten von 30–40% erzielen. Allerdings fehlt allen

¹ B. Nosse, *Chem. Unserer Zeit* **2006**, *40*, 164.

² G. T. Diamandopoulos, *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 1595.

³ H. zur Hausen, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5910.

⁴ J. N. Blattman, P. D. Greenberg, *Science* **2004**, *305*, 200.

⁵ Z. Yu, N. P. Restifo, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 289.

⁶ J. A. Berzofsky, M. Terabe, S. Oh, I. M. Belayakov, J. D. Ahlers, J. E. Janik, J. C. Morris, *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1515.

⁷ I. Espinoza-Delgado, *The Oncologist* **2002**, *7*, 20.

⁸ S. J. Danishefsky, J. A. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882.

drei Therapiemöglichkeiten die nötige Selektivität, so dass es fast immer auch zur Zerstörung von gesundem Gewebe kommt. Dadurch wird das gesamte Immunsystem stark geschwächt, was schließlich zum Tode führen kann.

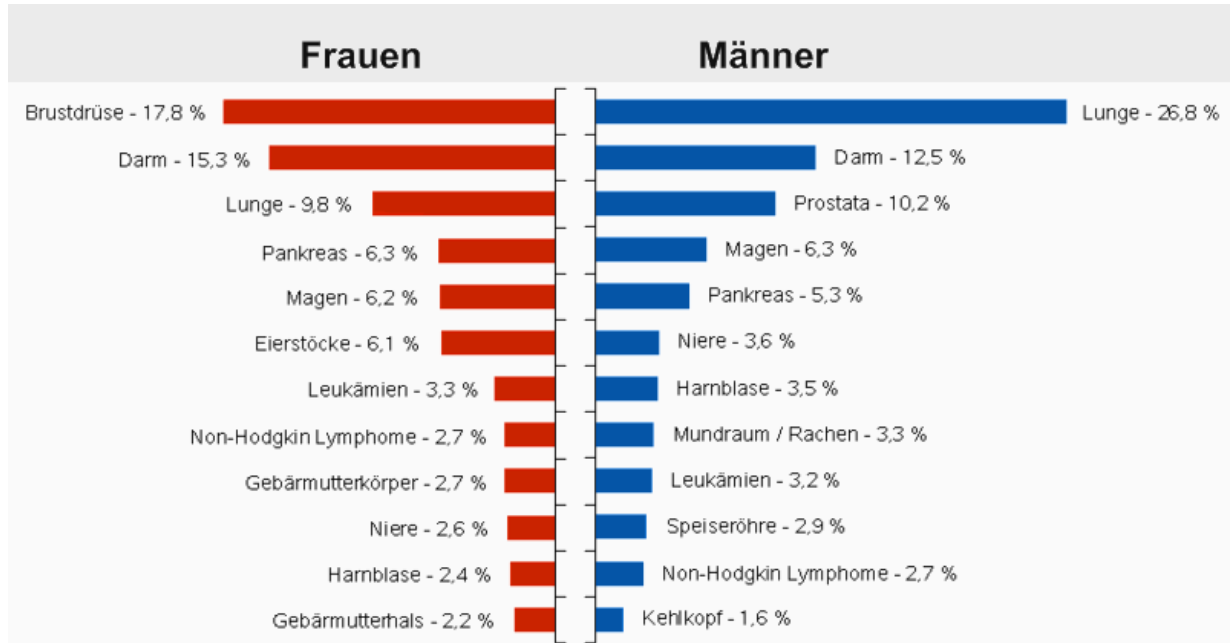


Abb. 1.1: Prozentuale Verteilung der Krebserkrankungen in Deutschland

1.2 Antitumor-Impfstoffe auf Mucin MUC1 Basis

Ist ein Organ von Krebs infiziert, verändert sich das Gewebe im Verlauf des unkontrollierten Zellwachstums auf charakteristische Weise (Tumor-Bildung). Dieser Tumor wird vom Immunsystem grundsätzlich als fremd erkannt. Der Körper versucht, die unkontrollierte Proliferation zu bekämpfen, allerdings ähneln die Tumorzellen zu sehr den gesunden körpereigenen Zellen, so dass eine effiziente Immunreaktion ausbleibt.

Die Krebsimmuntherapie^{9,10,11,12} mit Hilfe von Antitumor-Vakzinen stellt eine vielversprechende Alternative zu den existierenden Therapieformen dar. Hierbei wird mit Hilfe von synthetischen Vakzinen, das menschliche Immunsystem mit dem Ziel aktiviert, den Tumor selektiv zu bekämpfen. Im Gegensatz zu antiviralen oder antibakteriellen Vakzinen, die ausschließlich prophylaktisch einsetzbar sind,³ sollten Antitumorimpfstoffe in der aktiven Therapie einsetzbar sein. Das ultimative Anwendungsziel sollte nicht nur die Induktion einer

⁹ M. S. Mitchell, *Int. Immunopharmacol.* **2003**, 3, 1051.

¹⁰ P. Moingeon, *Vaccine* **2001**, 19, 1305.

¹¹ Z. Yu, N. P. Restifo, *J. Clin. Invest.* **2002**, 110, 289.

¹² E. Jäger, D. Jäger, A. Knuth, *Int. J. Cancer* **2003**, 106, 817.

selektiven, permanenten Immunantwort gegen die malignen Zellen sein, sondern auch den direkten Angriff auf zirkulierende metastasierende Tumorzellen ermöglichen. Des Weiteren kann durch das immunologische Gedächtnis des adaptiven Immunsystems einem möglichen Wiederausbruch der Krankheit vorgebeugt werden.

Bei der zellvermittelten Immunantwort der adaptiven Immunität spielen die T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle. Unterschieden werden prinzipiell zwei Typen von T-zellvermittelten Immunantworten:

Die MHC-Klasse-I- (Haupthistokompatibilitätskomplex 1; major histocompatibility complex) und die MHC-Klasse-II-restringierte Immunantwort. In beiden Fällen erkennen T-Zellen mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors Peptidfragmente, die auf der Zelloberfläche vom MHC-Komplex präsentiert werden. Im Fall der MHC-I Antwort werden Peptidepitope von $CD8^+$ -T-Zellen erkannt, der MHC-II-Komplex wird selektiv von $CD4^+$ -T-Zellen erkannt.

Cytotoxische T-Zellen exprimieren als prägendes Charakteristikum ein $CD8$ -Molekül auf der Zelloberfläche und erkennen so selektiv den MHC-I-Antigen-Komplex der infizierten Zelle, was deren Zelltod zur Folge hat (Abb. 1.2).

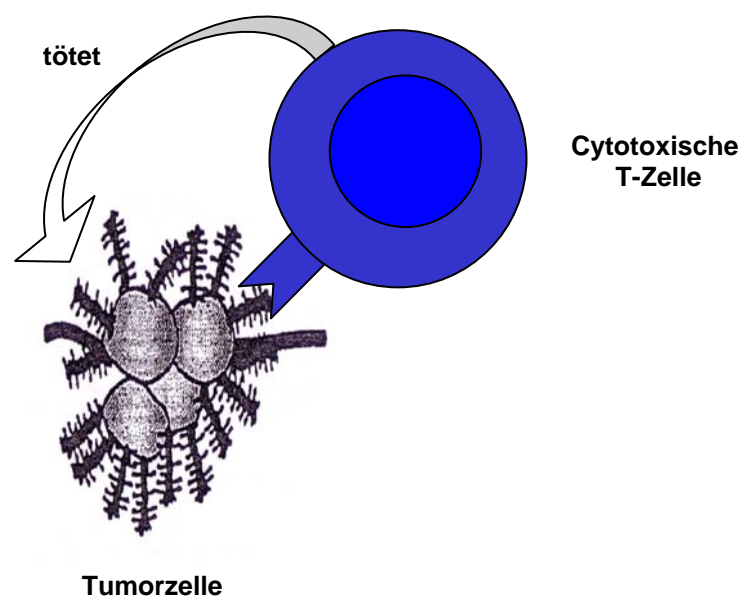


Abb. 1.2: MHC-I-restringierte Immunantwort

MHC-II-Moleküle werden von T_H1 - oder T_H2 -Zellen erkannt. Die T_H1 -zellvermittelte Immunantwort aktiviert Makrophagen. Die T_H2 -zellvermittelte Immunantwort aktiviert B-Zellen, und es kommt zur Antikörperproduktion. Antikörper können Antigene selektiv erkennen (z.B. auf Tumorzellen) und binden. Diese Umhüllung durch Antikörper wird

Opsonisierung genannt und hat zur Folge, dass das Antigen für die Phagozyten (Makrophagen und neutrophile Zellen) als körperfremd erkannt wird und lysiert werden kann (Abb. 1.3).¹³

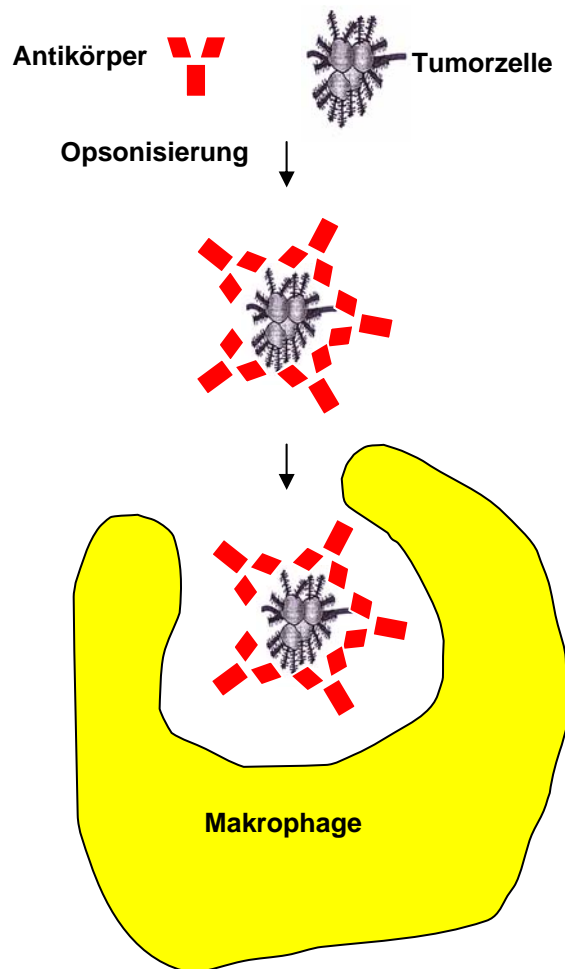


Abb. 1.3: Lyse von Tumorzellen nach MHC-II-Immunantwort

Für die Entwicklung einer Antitumorvakzine ist es von essentieller Bedeutung, die hohe Selektivität des Immunsystems auszunutzen. Antikörper müssen maligne Zellen erkennen, ohne benigne Zellen zu beeinträchtigen, was die Auslösung einer Autoimmunreaktion zur Folge hätte. Um diese hohe Spezifität zu erreichen, bedarf es eines geeigneten Unterscheidungskriteriums, welches die Tumorzelle eindeutig von der Normalzelle differenziert. Eine solche für die Unterscheidung geeignete Zielstruktur repräsentiert das auf Karzinomen stark exprimierte Mucin MUC1.^{14,15,16,17,18,19,20,21,22}

¹³ C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *Immunologie*, 5. Auflage **2001**, Spektrum Akademischer Verlag.

¹⁴ S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. M. Burchell, L. Pemberton, E. Lalani, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15286.

Mucine sind hochmolekulare filamentartige Glycoproteine, welche auf Epithelzelloberflächen vermehrt vorkommen und 200-800 nm in das Lumen hineinragen.²³ Charakteristisch ist ihr sehr hoher Kohlenhydratanteil der 50 bis 90 Gewichtsprozent ausmacht.^{24,25,26} Allgemein besitzen alle Mucine im Proteinteil ein gemeinsames Kriterium, sie enthalten eine variable Anzahl (ca. 20-150) sogenannter *tandem repeats* (repetitive Sequenzeinheiten; *variable number of tandem repeats*, VNTR). Diese charakteristischen Sequenzeinheiten bestehen aus einer Folge von 12-20 Aminosäuren die für jede Mucinart unterschiedlich ist. Generell sind diese Mucinsequenzen reich an Prolin und den potentiell *O*-glycosylierten Aminosäuren Serin und Threonin, welche den hohen extrazellulären Saccharidanteil ermöglichen.²⁷ Diese Merkmale führen dazu, dass der Glycoproteinteil der Mucine eine starre langgestreckte Konformation einnimmt, die auf der apicalen, dem Lumen zugewandten Seite der Zelle lokalisiert ist. Das epitheliale Mucin MUC1 wurde erstmals mittels monoklonaler muriner Antikörper (SM3) gegen Fetttröpfchen aus humaner Milch identifiziert.²⁸ Es wurde später in seiner tumorassoziierten Form auf fast allen Krebszellen nachgewiesen. Die repetitiven Wiederholungseinheiten bestehen aus 20 Aminosäuren der Sequenz HGVT SAPDTRPAPGSTAPPA und beinhalten somit fünf potentielle *O*-Glycosylierungsstellen. Die Anzahl der kumulierten *tandem repeat*-Segmente schwankt von 25-125 jeweils aufgrund des vererbten Polymorphismus des MUC1-codierten Genabschnitts.^{29,30}

In den Kompartimenten des *Golgi*-Apparates werden im Anschluss an die ribosomale Proteinbiosynthese die komplexen Oligosaccharidseitenketten aufgebaut.³¹ Der jeweilige Glycosylierungsgrad ist gewebe- und zellspezifisch und hängt stark vom Entwicklungsstand

¹⁵ J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1455, 301.

¹⁶ F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, 10, 439.

¹⁷ S. J. Gendler, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, 6, 339.

¹⁸ J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, T. Plunkett, R. Graham, I. Corra, D. Miles, M. Smith, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2002**, 7, 209.

¹⁹ F.-G. Hanisch, *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, 33, 705.

²⁰ S. Yonezawa, M. Goto, N. Yamada, M. Higashi, M. Nomoto, *Proteomics* **2008**, 8, 3329.

²¹ A. M. Vlad, J. C. Kettel, N. M. Alajez, C. A. Carlos, O. J. Finn, *Adv. Immunol.* **2004**, 82, 249.

²² R. Sangha, C. Butts, *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 4652.

²³ J. Hilkins, M. J. L. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, 17, 359.

²⁴ J. R. Gum Jr., *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, 23, 795.

²⁵ I. Carlstedt, J. R. Davies, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, 25, 214.

²⁶ T. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cummings, *J. Cell Biol.* **2008**, 182, 531.

²⁷ F.-G. Hanisch, *Biol. Chem.* **2001**, 382, 143.

²⁸ J. Burchell, S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, A. Girling, A. Lewis, R. Mills, D. Lamport, *Cancer Res.* **1987**, 47, 5476.

²⁹ D. M. Swallow, S. J. Gendler, B. Griffiths, G. Corney, J. Taylor-Papadimitriou, *Nature* **1987**, 328, 82.

³⁰ K. Engelmann, S. E. Baldus, F.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 27764.

³¹ T. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cummings, *J. Cell Biol.* **2008**, 182, 531.

der Zelle ab.³² Die selektive Glycosylierung der Serin und Threonin Seitenkettenfunktionen des MUC1 erfolgt zunächst im *cis-Golgi* durch eine *N*-Acetylgalactosamintransferase (GalNAcT) zur T_N-Antigen-Struktur (Abb. 1.4).^{33,34} Mucinmoleküle in normalen Zellen erfahren beim weiteren Durchlaufen des *Golgi*-Apparates eine Galactosylierung (β 1,3GalT) der *N*-Acetylgalactosamineinheiten zur sogenannten *Core1*-Struktur (β Gal(1 \rightarrow 3)- α GalNAc; T-Antigen). Diese *Core1*-Struktur dient als Substrat für darauffolgende β 1,6-*N*-Acetylglucosamintransferasen (C2GnT-1), welche die *Core2*-Struktur (β Gal(1 \rightarrow 3)-(β GlcNAc-(1 \rightarrow 6)-) α GalNAc) aufbauen.^{35,36} Die *Core2*-Struktur wird dann durch weitere Glycosyltransferasen in komplexe oligomere *N*-Acetylglucosamin-Ketten überführt.

Im *trans-Golgi* kann dieses Kettenwachstum beeinflusst werden, indem die Ketten durch Anbindung von Fucose, Neuraminsäure oder Sulfatierung terminiert werden.³⁷ Die entstehenden Strukturen sind dann keine Substrate mehr für Glycosyltransferasen. Auf den benignen Epithelzellen trägt das Mucin MUC1, resultierend aus, dem normalen Biosyntheseweg, lange Oligosaccharide mit *Core2*-Strukturen, die den hohen Kohlenhydratanteil von 50-90% ausmachen. Dieser hohe Glycosylierungsgrad verhüllt das Peptidrückgrat vollständig und macht es für Erkennungsprozesse jeglicher Art unzugänglich. Das gesunde epitheliale MUC1 wird als starres gestrecktes Gerüst charakterisiert, mit der Folge, dass es nur auf der apicalen dem Lumen zugewandten Seite vorkommt. Karzinome sind jedoch meist runde bis ovale Gebilde. Daraus lässt sich schließen, dass Glycoproteine in veränderter Weise auf der gesamten Oberfläche exprimiert sein müssen.³⁸ Dieser Polaritätsverlust hat seine Ursache in einer fehlerhaften Enzymaktivität im *trans-Golgi*, die zu terminierten Kohlenhydratseitenketten führt.³⁶

In vielen Krebszelllinien ist die β 1,6-*N*-Acetylglucosamintransferase (C2GnT-1) sehr stark herunterreguliert (z.B. Brustkrebszelllinie T47D),^{39,40} was zur Folge hat, dass die *Core2*-Struktur nicht ausgebildet wird.⁴¹ Des Weiteren wurden bei solchen Zelllinien (Brustkrebszelllinien: T47D, MCF7) stark erhöhte Sialinsäuregehalte beobachtet, was auf

³² M. A. Trap, H. Clausen, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1780, 546.

³³ J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, 6, 355.

³⁴ I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 67.

³⁵ F.-G. Hanisch, G. Uhlenbruck, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 872.

³⁶ F.-G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbruck, *Glycoconjugate J.* **1990**, 7, 524.

³⁷ I. Brockhausen, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, 31, 6318.

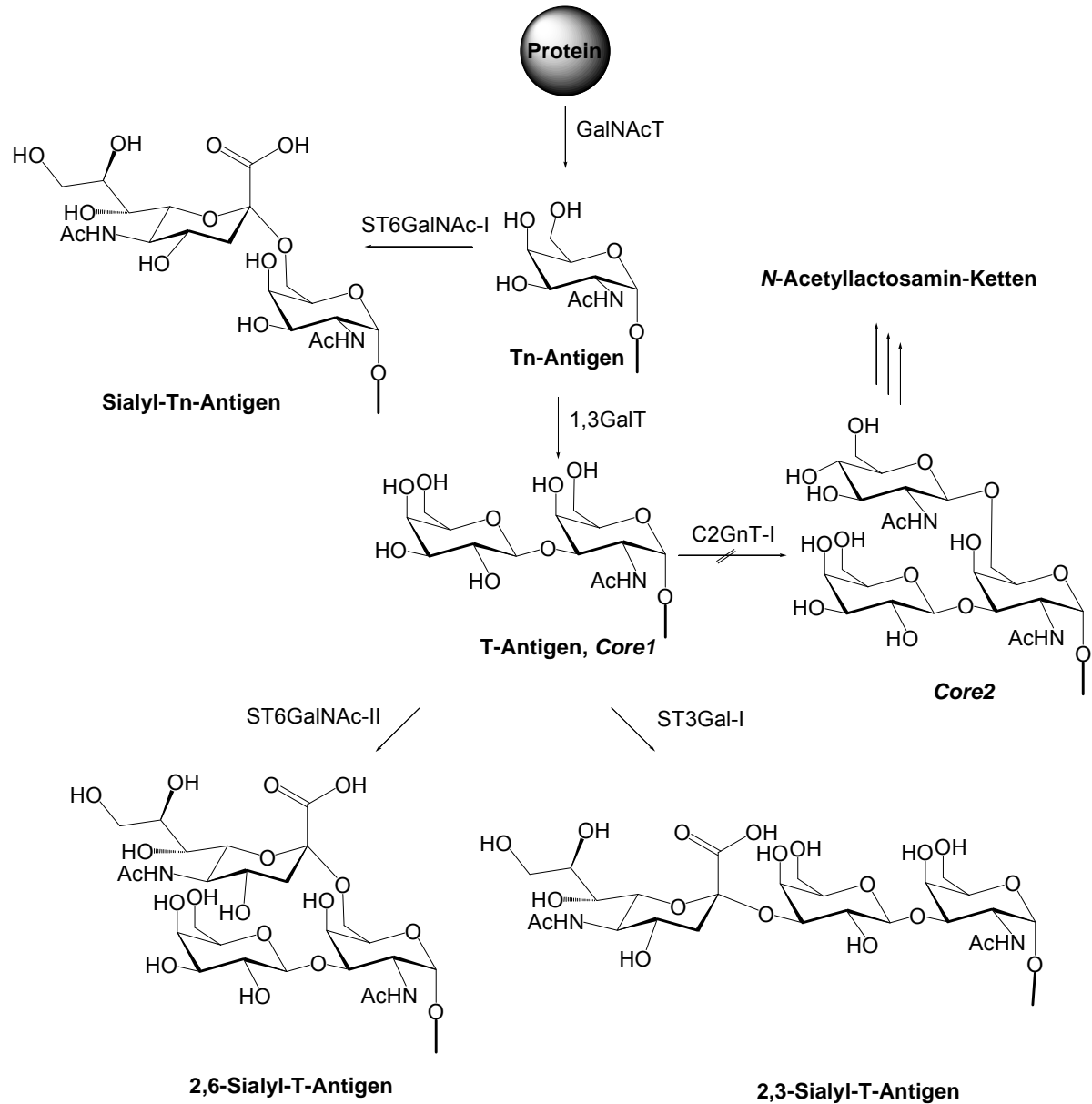
³⁸ S. Zotter, P. C. Hageman, A. Lossnitzer, W. J. Mooi, J. H. M. Hilgers, *Cancer Rev.* **1988**, 11-12, 55.

³⁹ S. Wilkie, G. Picco, J. Foster, D. M. Davies, S. Julien, L. Cooper, S. Arif, S. J. Mather, J. Taylor Papadimitriou, J. M. Burchell, J. Maher, *J. Immunol.* **2008**, 180, 4902.

⁴⁰ S. Müller, F.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 26103.

⁴¹ I. Brockhausen, J. M. Yang, J. M. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 607.

stark erhöhte Sialyltransferase-Aktivität (ST6GalNAc-I; ST6GalNAc-II; ST3Gal-I) schließen lässt. Diese beiden enzymatischen Unterschiede zwischen normaler Zelle und Tumorzelle führen zur Ausbildung der sogenannten tumorassoziierten Antigenstrukturen (Abb. 1.4).⁴²



GalNAcT: *N*-Acetylgalactosamintransferase

β 1,3GalT: β 1,3-Galactosyltransferase

C2GnT-I: β 1,6-*N*-Acetylglucosamintransferase-I

ST6GalNAc-I: α 2,6-Sialyltransferase-I

ST6GalNAc-II: α 2,6-Sialyltransferase-II

ST3Gal-I: α 2,3-Sialyltransferase-I

Abb. 1.4: Tumorassoziierte *O*-Glycosylierung des Mucin MUC1

⁴² P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1336.

Eine frühzeitige Sialylierung des *N*-Acetylgalactosamins durch die α 2,6-Sialyltransferase (ST6GalNAc-I)^[43] führt zum Sialyl-T_N-Antigen, welches besonders in Magen-, Darm-, Ovarial- und Mammakarzinomen exprimiert wird.^{44,45,46,47,48}

Die starke Herunterregulierung der *N*-Acetylglucosamintransferase (C2GnT-I) führt unter anderem zu einer erhöhten Expression des *Thomsen-Friedenreich*-Antigens (*Core1*-Struktur, T-Antigen)^{49,50} auf Brustkrebsgewebe.⁵¹ Die *Core1*-Struktur ist gleichzeitig ein geeignetes Substrat für die Sialyltransferasen ST6GalNAc-II und ST3Gal-I, welche im Stadium der Tumorzellentwicklung stark überexprimiert sind. So entstehen durch Sialylierung der T-Antigen-Struktur die tumorassoziierten regioisomeren (2,6)-Sialyl-T- und (2,3)-Sialyl-T-Antigene, die speziell auf Leukocyten vertreten sind.^{52,53} Insbesondere das (2,3)-Sialyl-T-Antigen wurde vermehrt auf der Brustkrebszelllinien,⁴⁰ sowie auf Magenkarzinoma⁵⁴ und auch auf Dickdarmkrebszellen⁵⁵ gefunden.

Alle oben genannten Indizien sprechen dafür, dass aufgrund unterschiedlicher Enzymaktivitäten, der Kohlenhydratanteil auf Tumorzellen verändert ist. Es kommt zur Expressierung von stark verkürzten Oligosaccharidseitenketten (Abb.1.5).

Des Weiteren werden dem Immunsystem durch die verkürzten Kohlenhydratketten, prägende Peptidpitope zugänglich. Eines dieser sogenannten immundominanten Epitope ist die *tandem repeat* Teilsequenz PDTRP,⁵⁶ welche von mehreren aus Tumorzellisolaten hergestellten monoklonalen Antikörpern erkannt wurde. Diese Peptidsequenz kann auf Tumorzellen

⁴³ Y. Ikehara, N. Kojima, N. Kurosawa, T. Kudo, M. Kono, S. Nishihara, S. Issiki, K. Morozumi, S. H. Itzkowitz, T. Tsuda, S. I. Nishimura, S. Tsuji, H. Narimatsu, *Glycobiology* **1999**, *9*, 1213.

⁴⁴ S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 197.

⁴⁵ H. Inoue, *Obstet. Gynecol.* **1990**, *75*, 1031.

⁴⁶ I. Takahashi, I. Maehara, T. Kusumoto, M. Yoshida, Y. Kakej, H. Kusumoto, M. Furusawa, K. Sugimachi, *Cancer* **1993**, *72*, 1836.

⁴⁷ R. Soares, A. Marinho, F. Schmitt, *Pathol. Res. Pract.* **1996**, *192*, 1182.

⁴⁸ S. Julien, G. Picco, R. Sewell, A.-S. Vercoutter-Edouart, M. Tarp, D. Miles, H. Clausen, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, *British J. Cancer* **2009**, *100*, 1746.

⁴⁹ V. Friedenreich, *The Thomsen Hemagglutination Phenomenon*, Levin and Munksgaard, Copenhagen, **1930**.

⁵⁰ F. J. Irazoqui, G. A. Nores, *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 433.

⁵¹ G. F. Springer, W. A. Fry, R. R. Desai, R. A. Semerdjan, H. Tegtmeyer, C. G. Neybert, E. F. Scanlon, *Cancer Detect. Preven.* **1985**, *8*, 95.

⁵² M. Fukuda, S. R. Carlsson, J. C. Klock, A. Dell, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 12796.

⁵³ M. Fukuda, S. Tsuboi, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *205*.

⁵⁴ N. Marcos, T. A. Cruz, F. Silva, R. Almeida, L. David, U. Mandel, H. Clausen, S. v. Mensdorff-Pouilly, C. Reis, *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, *51*, 761.

⁵⁵ D. Baeckström, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11503.

⁵⁶ J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691.

offenbar eine *turn*-Konformation^{57,58} annehmen, welche durch die Art der Glycosylierung der MUC1-Sequenz induziert wird.⁵⁹

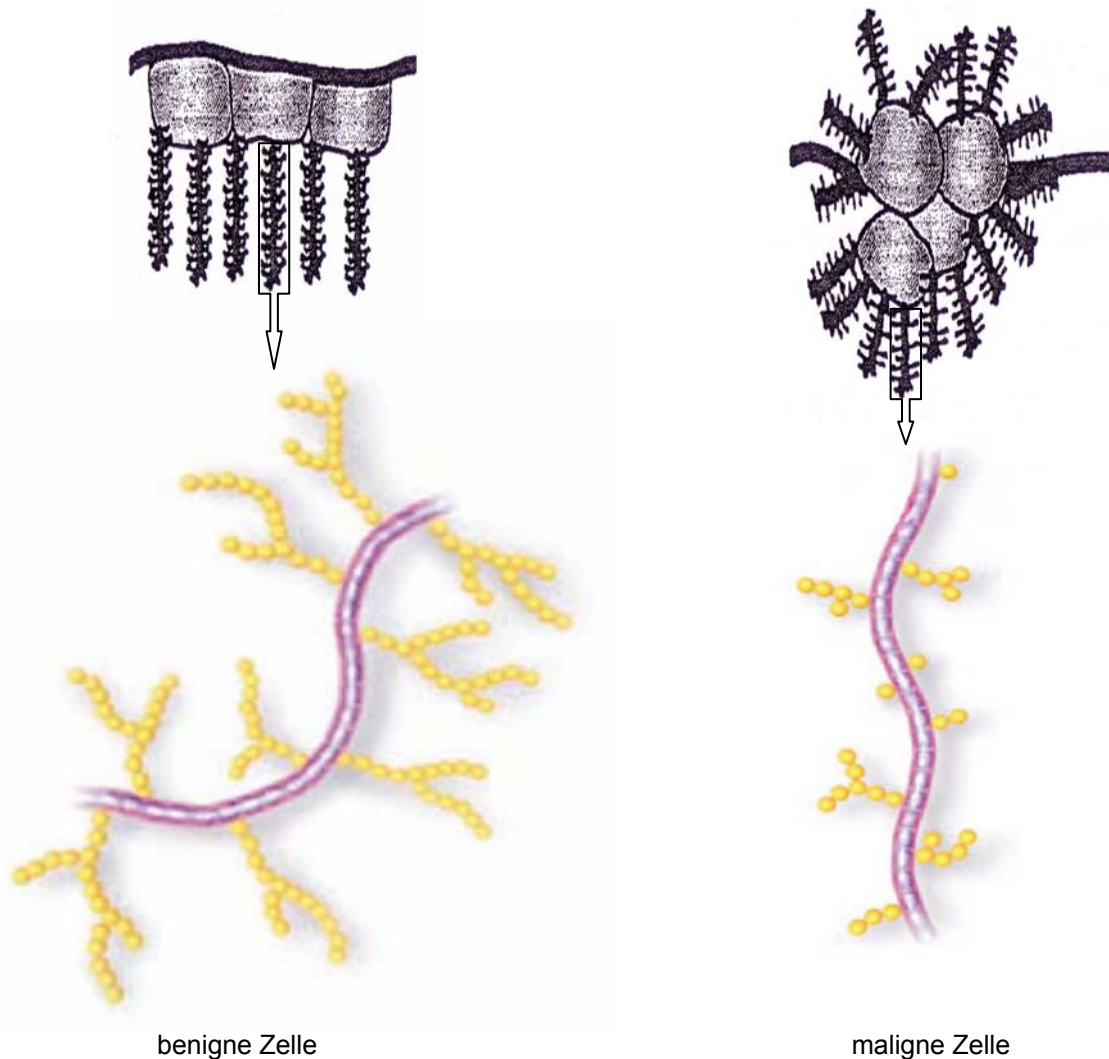


Abb. 1.5: MUC1 auf benignen und malignen Zellen

Diese *turn*-Konformation wird als immundominant charakterisiert. Allerdings wird berichtet, dass die Immunität steigt, wenn das Threonin der PDTRP Domäne nicht glycosyliert ist.⁶⁰ Ein weiteres immundominantes Epitop stellt die GSTA Sequenz dar. Hierbei wurde bemerkt, dass die glycosylierte Peptidstruktur immunogener wirkt und über den monoklonalen Antikörper SM3 nachgewiesen werden kann.^{61,62} Der Sequenzabschnitt APDTRPAP repräsentiert ein

⁵⁷ J. D. Fontenot, S. V. Mariappan, P. Catasti, N. Domenech, O. J. Finn, G. Gupta, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, *13*, 245.

⁵⁸ J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montenaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5386.

⁵⁹ S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheidt, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981.

⁶⁰ U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662.

⁶¹ M. A. Trap, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, *17*, 197.

CD8⁺-T-Zell-Epitop und sollte bei Immunisierungen mit dem MUC1-*tandem repeat*-Peptid zu einer cytotoxischen T-Zellantwort führen.

All diese spezifischen Veränderungen der Oberflächenglycoproteine auf malignen Zellen im Vergleich zu benignen Zellen sollten es ermöglichen, spezifische, gegen Tumorgewebe gerichtete Antikörperreaktionen durch Immunisierung zu induzieren. Um dieses Ziel zu erreichen ist es notwendig, mit hoch definierten Strukturen, die aus Glycopeptidtotalsynthesen hervorgehen, die Immunisierungen vorzunehmen.^{63,64,65,66,67}

⁶² U. Westerlind, H. Schröder, A. Hobel, N. Gaidzik, A. Kaiser, C. M. Niemeyer, E. Schmitt, H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, DOI: 10.1002/ange.200902963.

⁶³ S. Dziadek, H. Kunz, *Chem. Rec.* **2004**, *3*, 308.

⁶⁴ T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz, *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 491.

⁶⁵ A. Liakatos, H. Kunz, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2007**, *9*, 35.

⁶⁶ A. L. Sørensen, C. A. Reis, M. A. Trap, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, *16*, 96.

⁶⁷ S. Wittrock, H. Kunz, *BioTec Zeitschrift für Biotechnologie* **2006**, 34.

2. Zielsetzung

Um die hohe Selektivität des Immunsystems für die Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen zu nutzen, müssen für Tumorzellen typische Zelloberflächenstrukturen als Haptene präsentiert werden. Eine gezielte Immunantwort gegen diese Haptene sollte die Tumorzellen angreifen, ohne dabei gesundes Gewebe zu zerstören. Alle Versuche mittels Tumorzellisolaten gegen Tumorzellen selektive Immunreaktionen hervorzurufen, schlugen bisher fehl. Es wurden von den induzierten Antikörpern zwar Tumorzellen erkannt, es fand aber auch stets eine Anbindung an normale Epithelzellen statt. Die Ursache dieser Misserfolge liegt wahrscheinlich in der Mikroheterogenität der Zelloberflächenglycoproteine von Zellisolaten, so dass in diesen Membranglycoproteinen immer neben tumorassoziierten auch normale Glycanmuster vorliegen. Letztere induzieren Antikörper, die zu einer Autoimmunreaktion führen. Um diese Probleme zu umgehen, müssen strukturell eindeutige, d. h. totalsynthetisch hergestellte Oberflächenglycoproteine, die eine Tumorzelloberfläche imitieren, in einer Antitumor-Vakzine präsentiert werden.

In der vorliegenden Arbeit soll durch gezielte Synthese exakt definierter, tumorassoziiierter Glycopeptidantigene aus der extrazellulären repetitiven Sequenz des epithelialen Mucins MUC1 geeignete Karzinomoberflächenimitate hergestellt werden. Diese Antigene sollen dann in Verknüpfung mit immunstimulierenden Komponenten als vollsynthetische Antitumorvakzine für eine gezielte Krebsimmuntherapie eingesetzt werden können. Vakzine aus MUC1-Glycopeptiden konnten schon erfolgreich zur Erzeugung einer hochselektiven Immunantwort in transgenen Mäusen verwendet werden.^{68,60} Zur Weiterentwicklung dieses Ansatzes muss nach geeigneten Impfverfahren gesucht werden, um diese induzierte Immunreaktion auf das humane System übertragbar zu machen.

Als Zielstruktur dient die aus 20 Aminosäuren bestehende vollständige *tandem repeat*-Sequenz des MUC1, welche an der Flanke der immundominanten Domäne (PDTRP) mit einer der tumorassoziierten Saccharidstrukturen glycosyliert wird (Abb. 2.1).

⁶⁸ S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803.

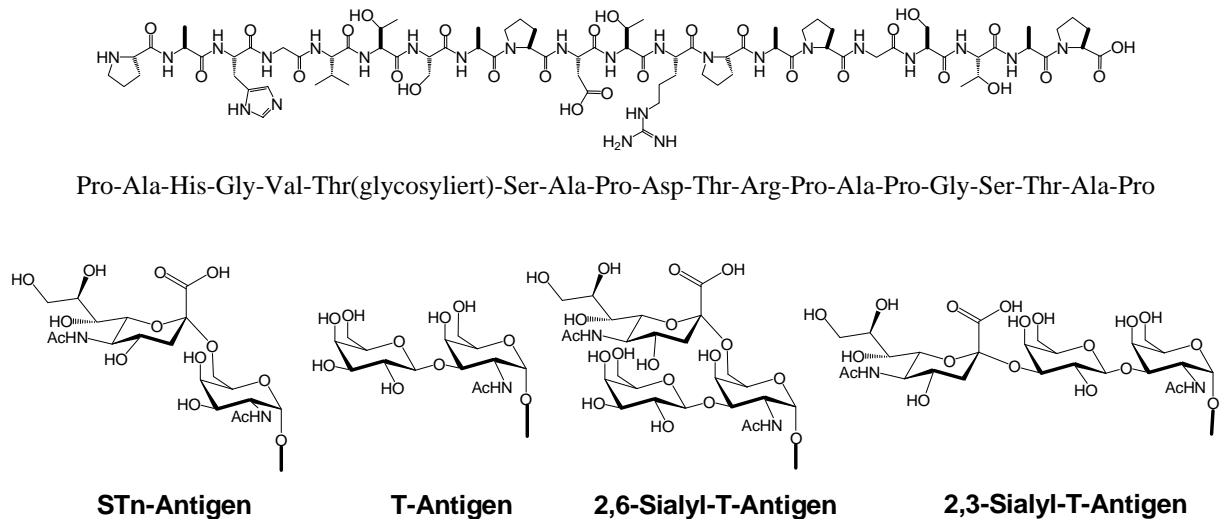


Abb. 2.1: MUC1 tandem repeat-Sequenz und die tumorassoziierten Saccharid-Antigene

Zur Induktion einer effektiven Immunantwort ist es notwendig, die Glycopeptidantigene mit sogenannten „Immunostimulanzien“ in immunogene Formen zu überführen. Tumorassoziierte Glycopeptide sind selbst Antigene, sie werden vom Immunsystem als nicht fremd angesehen, was zum Ausbleiben einer Immunantwort führt. Geeignete Stimulanzien sind immunogene Carrier-Proteine, T-Helferzell-Peptidpitope und Mitogene.

Die kovalente Verknüpfung von Haptenen mit Carrier-Proteinen repräsentiert die älteste aller Methoden zur Generierung von Vakzin-Konjugaten.^{69,70} Nach Prozessierung dieser Konjugate durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) werden nicht nur Antigenfragmente, sondern auch T-Zell-Peptidpitope des Trägerproteins über MHC-II-Komplexe präsentiert. Hierdurch werden T_H2-Zellen aktiviert, welche die B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung anregen, was zur Antikörperproduktion führt.

Die vollsynthetisch hergestellten Glycopeptide sollen daher chemoselektiv an Rinderserumalbumin (BSA) oder Tetanus-Toxoid (TTox) über einen nicht immunogenen Abstandhalter angebunden werden, um so robuste Immunantworten gegen das Hapten zu erzielen (Abb. 2.2).

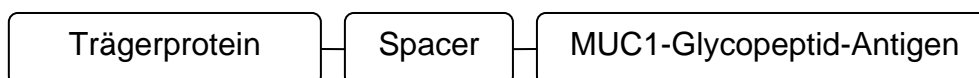


Abb. 2.2: Vakzin-Konjugat aus Trägerprotein und MUC1-Glycopeptid

⁶⁹ S. Muller in *synthetic peptides as antigens*; (Ed.: S. Pillai, P. C. van der Vliet), Elsevier: Amsterdam, **1999**, 28, 79.

⁷⁰ V. P. Butler Jr., S. M. Beiser, *Adv. Immun.* **1973**, 17, 255.

Die Konjugation mit definierten T-Helferzell-Peptidepitopen ermöglicht die gezielte Aktivierung von T_H2 -Zellen, was dann zu einer humoralen, MHC-II-restringierten Immunreaktion (siehe oben) führen sollte. Diese Methode hat den Vorteil, dass man den Aufbau des Peptidepitops direkt in die Glycopeptidfestphasensynthese integrieren kann und so vollsynthetisch in großen Mengen (100 mg-Maßstab) zu Heterotop-Vakzinen gelangt (Abb. 2.3).^{60,68}

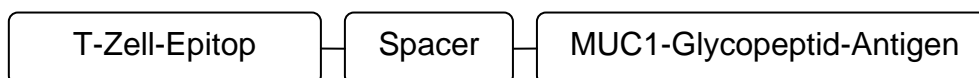


Abb. 2.3: Heterotop-Vakzine

Des Weiteren könnte die Konjugation von Antigenen an ein Mitogen, wie es die Toll-like-Rezeptor-Agonisten darstellen, eine erfolgsversprechende Variante zur Herstellung von Vakzinen sein (Abb. 2.4).⁷¹

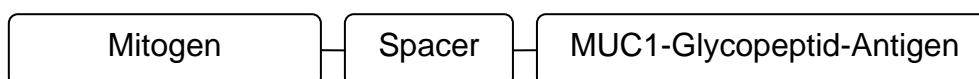


Abb. 2.4: Mitogen-Konjugate

Von synthetischer Seite sind Konjugationsreaktionen mit erheblichem präparativem Aufwand verbunden. Um diesen Nachteil zu vermeiden, wäre die Entwicklung von dendrimeren Glycopeptiden eine potentielle Alternative.⁷² Durch Multivalenz lassen sich aus Antigenen Immunogene formen, indem über einen Oligolysin-Kern dendrimere Glycopeptidantigene aufgebaut werden können (Abb. 2.5). Diese Strukturen sollten auch vollsynthetisch an der festen Phase zu erzeugen sein und so erhebliche Mengen an dendrimeren Glycopeptiden liefern. Im Idealfall sind diese Konstrukte immunogen genug, um eine geeignete Vakzine darzustellen.

⁷¹ T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5985.

⁷² J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5409.

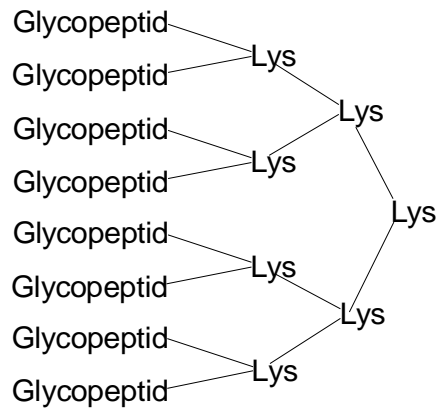


Abb. 2.5: Dendrimere Glycopeptid-Vakzine

Die praktische Anwendbarkeit der vollsynthetischen Antitumorimpfstoffe soll in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. E. Schmitt am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in Experimenten an Mäusen überprüft werden. Die immunologischen Erkenntnisse, die aus diesen Studien hervorgehen, sollten entscheidenden Aufschluss darüber geben, welche Vakzin-Kombinationen für eine aktive Tumorthherapie anwendbar sind.

3. Allgemeiner Teil

3.1 Retrosynthese von Glycopeptid-Antitumorvakzinen

Im Vergleich zur Isolierung aus biologischem Material oder zur biotechnologischen Erzeugung von Verbindungen eröffnet die chemische Totalsynthese die Möglichkeit, einheitliche, klar definierte Strukturen in großen Mengen zu erzeugen. Des Weiteren erlaubt die chemische Synthese von Leitstrukturen, eine schnelle und gezielte Modifikation des Zielmoleküls, um so dessen Erkennung in biologischen Systemen auf struktureller Basis variieren und optimieren zu können. Aus den so beeinflussten Wirkungen lassen sich Schlussfolgerungen bezüglich der biologischen Prozesse und der Wechselwirkungen ziehen, was gerade bei Glycoproteinen bisher selten geschehen ist.^{73,74,75,76,77,78,79}

Glycopeptid-Antitumorvakzine^{63,64,65,67} können strukturell aus drei wesentlichen Bestandteilen zusammengesetzt werden: Einem Glycopeptidepitop, welches die Oberfläche von Tumorzellen imitieren soll,^{80,81,82,83} einem immunologisch unwirksamen Abstandhalter, der im Stande ist, die Epitope voneinander zu trennen, ohne die biologische Funktion zu stören, und einer immunstimulierenden Komponente, welche notwendig ist, da tumorassoziierte Glycopeptidepitope selbst Antigene repräsentieren, welche dem Immunsystem bekannt sind und somit allein keine effiziente Immunreaktion auslösen^{84,85,86,87} (Abb. 3.1.1).

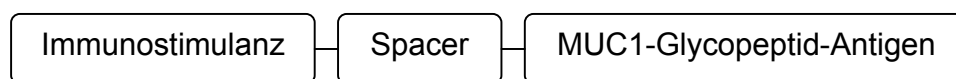


Abb. 3.1.1: Exemplarische Darstellung einer synthetischen Vakzine

⁷³ R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683.

⁷⁴ P. M. Rudd, T. Elliott, P. Creswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek, *Science* **2001**, *291*, 2370.

⁷⁵ H. Kunz, M. Schultz, *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, *1*, (Eds.: B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, 267.

⁷⁶ H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495.

⁷⁷ O. Seitz, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 214.

⁷⁸ G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2839.

⁷⁹ H. Kunz, M. Schultz, *Glycopeptides and Related Compounds* (Eds.: D. G. Large, C. D. Warren), M. Dekker, Inc., New York, **1997**.

⁸⁰ T. Kjeldsen, H. Clausen, S. Hirohashi, T. Ogawa, H. Iijama, S.-I. Hakomori, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 2214.

⁸¹ H. Kunz, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 563.

⁸² T. F. Ørntroft, H. N. Harving, N. C. Langkilde, *Int. J. Cancer* **1990**, *45*, 666.

⁸³ B. Kuberan, R. J. Linhardt, *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 653.

⁸⁴ C. Leclerc, G. Przewlocki, M.-P. Schultz, L. Chedid, *Eur. J. Immunol.* **1987**, *17*, 269.

⁸⁵ B. Agrawal, M. J. Krautz, M. J. Raddish, B. M. Longenecker, *Nat. Med.* **1988**, *4*, 43.

⁸⁶ A. K. Chan, D. C. Lockhart, W. Von Bernstorff, R. A. Spanjaard, H.-G. Joo, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure, *Int. J. Cancer* **1999**, *82*, 721.

⁸⁷ Z.-H. Jiang, R. R. Kogenty, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1423.

Prinzipiell soll die Synthese von Glycopeptid-Impfstoffen an der festen Phase erfolgen.^{88,89} Nach dem Aufbau an der festen Phase folgt die immunkompatible Verknüpfung mit dem Immunstimulanz über ein Spacermolekül. Je nachdem welches immunstimulierende Epitop zur Anwendung kommen soll, muss zunächst die Synthese desselben so erfolgen, dass eine spätere Konjugation möglich ist.

Bei der Synthese von Glycopeptiden haben sich die festphasengestützten Methoden bewährt.⁹⁰ Der entscheidende Vorteil der Festphasensynthese ist der lineare Aufbau an einem polymeren Träger, der es ermöglicht, in iterativen Schritten Polypeptide herzustellen und durch einfache Filtration von sämtlichen Reagenzien zu separieren.⁹¹ Der Wegfall einzelner Reinigungsschritte macht die Festphasensynthese zur Methode der Wahl, um komplexe Glycopeptide effizient zu synthetisieren und anschließend schnell in hochreiner Form zugänglich zu machen. Um ein Maximum an Automatisierbarkeit zu erreichen, soll die Festphasensynthese nach *Fmoc*-Strategie durchgeführt werden.^{92,93,94} Diese Strategie hat sich unter anderem deshalb durchgesetzt, weil das *Fmoc*-Abspaltungsprodukt (Abb. 3.1.2) photometrisch detektiert werden kann und somit eine permanente Verfolgung der Synthese möglich ist.

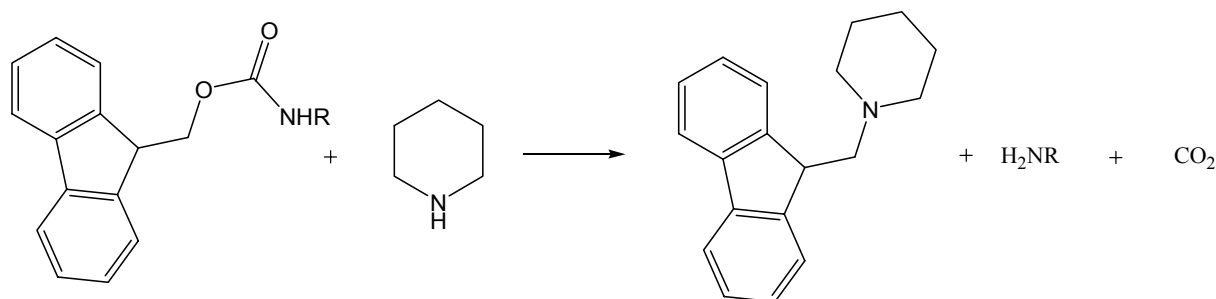


Abb. 3.1.2: *Fmoc*-Abspaltung

Bei der Anwendung der *Fmoc*-Strategie ist zu beachten, dass es unter den basischen Abspaltungsbedingungen (Piperidin/DMF)⁹⁵ insbesondere auf der Dipeptidstufe zur

⁸⁸ H. Kunz, B. Dombo, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 732.

⁸⁹ H. Kunz, *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 1223-1232.

⁹⁰ H. Kunz, W. Kosch, J. März, M. Ciommer, W. Günther, C. Unverzagt, *Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis and Related Technologies* (Ed. R. Epton) Intercept Ltd., Andover, U. K., **1992**, 171.

⁹¹ R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.

⁹² L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748.

⁹³ J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Macofske, C. D. Chang, *Int J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35.

⁹⁴ C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246.

⁹⁵ B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1939.

Diketopiperazinbildung kommen kann (Abb. 3.1.3). Diese verläuft über eine basenkatalysierte intramolekulare Aminolyse, die unter Cyclisierung zum Abbruch des Peptidstranges führt.

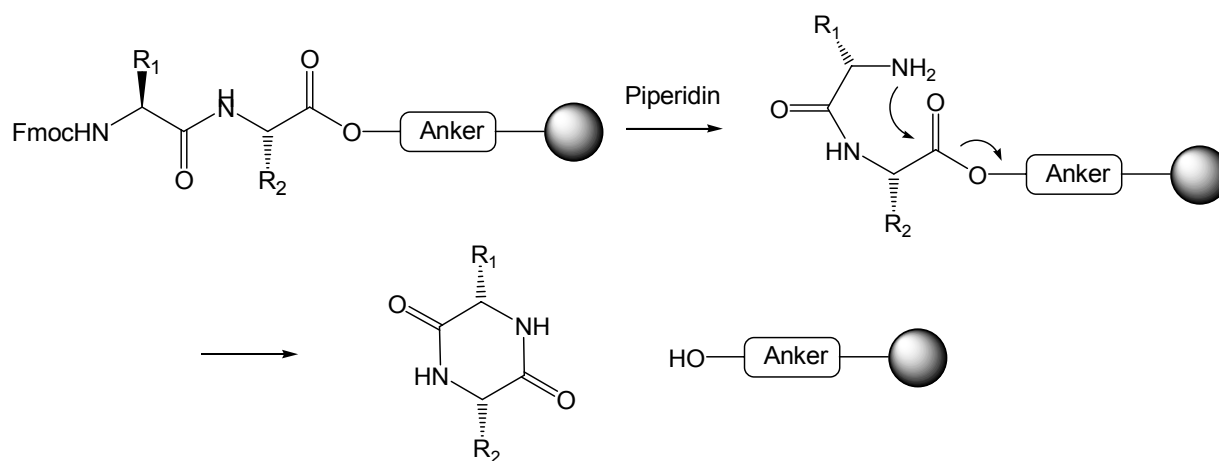


Abb. 3.1.3: Diketopiperazinbildung

Um diese Nebenreaktion zu unterbinden, hat es sich bewährt, eine möglichst voluminöse Ankergruppe⁹⁶ einzusetzen. Der Trityl-Anker^{97,98} hat sich in der MUC1-Glycopeptidsynthese als besonders effizient erwiesen.^{61,99} Im Gegensatz dazu steht der Wang-Anker,¹⁰⁰ der sterisch nicht genügend anspruchsvoll ist und Diketopiperazinbildung zulässt. Dies geschieht vorzugsweise bei Sequenzen, die mit Glycin, Prolin oder Alanin beginnen. Eine weitere häufig beobachtete basenkatalysierte Nebenreaktion ist die Aspartimidumlagerung. Hierbei greift ein deprotonierter Amid-Stickstoff an der Carboxylseitenkette der Asparaginsäure an, was zum Verlust der Seitenkettenschutzgruppe führt. Bei einer Hydrolyse des Aspartimids können zwei Produkte entstehen, zum einen das α -Aspartyl-Peptid **A** und zum andern das Isomere β -Isoaspartyl-Peptid **B** (Abb.3.1.4).

⁹⁶ F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091.

⁹⁷ T. M. Fyles, C. C. Leznoff, *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 1328.

⁹⁸ J. M. Frechet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 3055.

⁹⁹ K. Baumann, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3494.

¹⁰⁰ S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328.

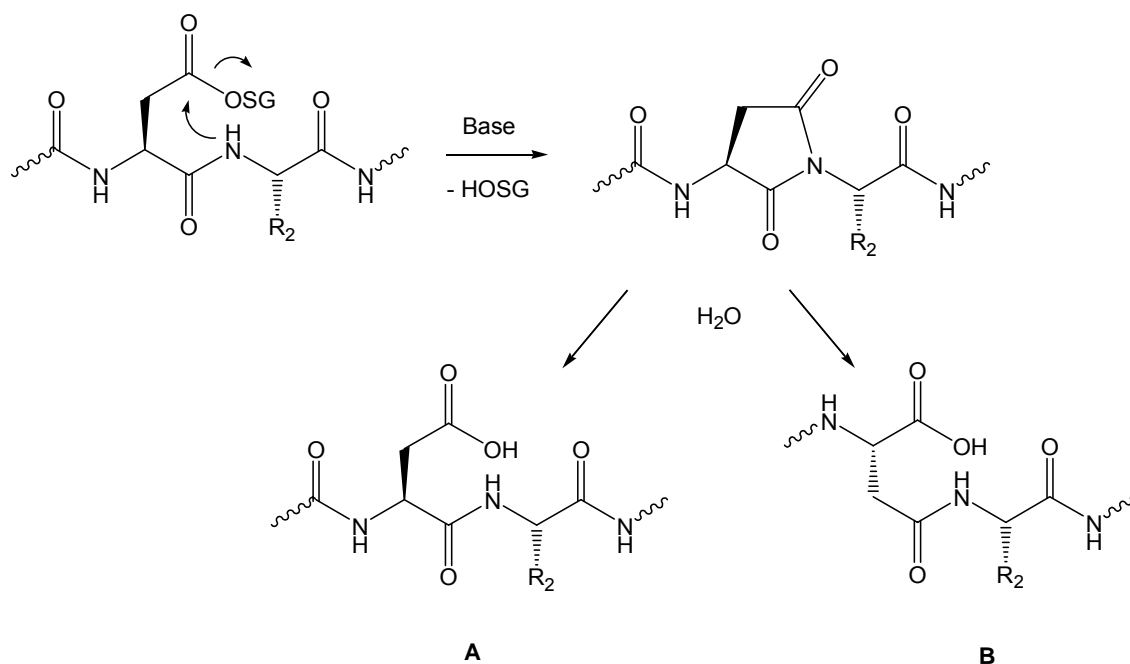


Abb. 3.1.4: Aspartimidumlagerung

Diese Nebenreaktion kann auch acidolytisch induziert werden und ist sequenzabhängig. Durch Verwendung der sperrigen *tert*-Butyl-Schutzgruppe^{101,102} an der Asparaginsäureseitenkette sollte dieser unerwünschte Effekt weitgehend unterbunden werden. Solche intramolekularen Cyclisierungen kommen auch in der Natur bei Proteinen vor, z. B. entsteht das Fluorophor des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) durch eine intramolekulare Amidbindung zwischen der Amidgruppe eines Glycins und der Carboxylgruppe eines Serins.¹⁰³

Der entscheidende Schritt einer jeden Glycopeptidsynthese ist zweifelsohne die Einführung der Glycanseitenkette. Dafür sollen vorgefertigte glycosylierte *N*-Fmoc-geschützte Aminosäurebausteine zum Einsatz kommen, die in der automatisierten Peptidsynthese eingesetzt werden (Abb. 3.1.5).^{104,105}

¹⁰¹ G. W. Anderson, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 3359.

¹⁰² R. M. Valerio, P. F. Alewood, R. B. Johns, *Synthesis* **1988**, 786.

¹⁰³ R. Y. Tsien, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 5721.

¹⁰⁴ C. Brocke, H. Kunz, *Boorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 3085.

¹⁰⁵ S. Dziadek, C. G. Espinola, H. Kunz, *Aust. J. Chem.* **2003**, 56, 519.

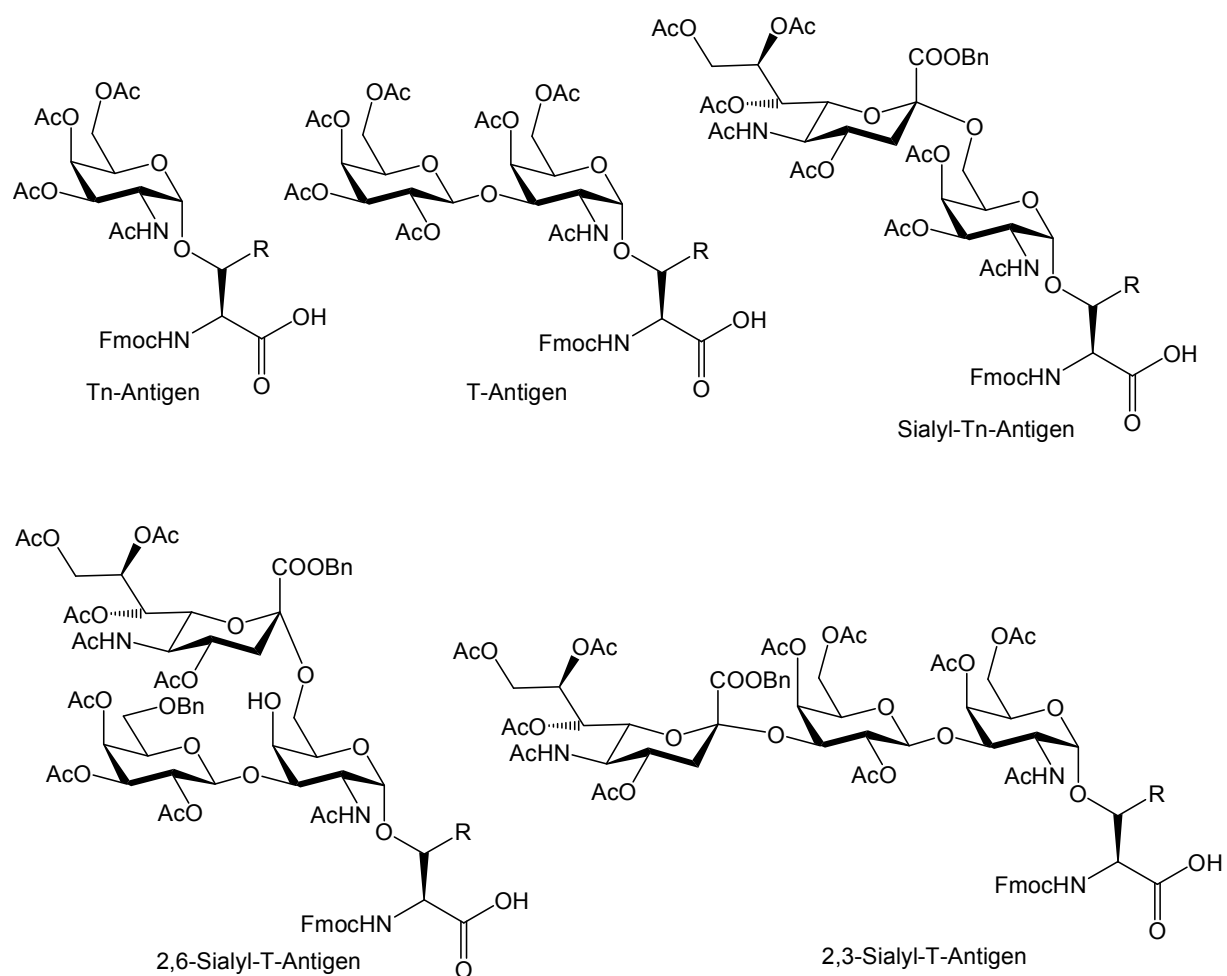


Abb. 3.1.5: glycosylierte Festphasenbausteine; R = H oder CH₃

Aufgrund der Polyfunktionalität der Zielmoleküle ist eine orthogonale Schutzgruppenstrategie nötig. Die Hydroxygruppen der Saccharide sollen vorzugsweise mit der unter basischen Bedingungen abspaltbaren Acetyl-Schutzgruppe blockiert werden.¹⁰⁶ Generell ist darauf zu achten, dass es bei der Entfernung von Schutzgruppen unter basischen Bedingungen nicht zu einer β -Eliminierung der glycosylierten Aminosäure kommt (Abb. 3.1.6).

¹⁰⁶ H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1763.

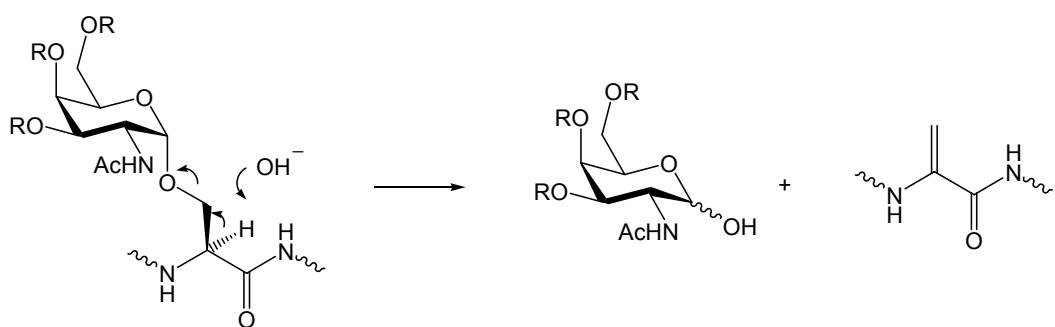


Abb. 3.1.6: β -Eliminierung von Glycopeptiden

Eine prinzipielle Verwendung von hydrogenolytisch spaltbaren Benzyl-Schutzgruppen^{107,108} ist auch denkbar. Ist die Synthese des Glycopeptids gelungen, wird mit einer Oligoethylenglycol-Spaceraminosäure verlängert. Je nachdem welche Art von Immunstimulanz eingeführt werden soll, kann diese Spacereinheit geeignet funktionalisiert werden. Wenn die immunstimulierende Komponente ein Peptidpitop ist, kann mit einer *Fmoc*-geschützten Spaceraminosäure^{109,110} die Synthese weitergeführt werden. Hierbei ist auf die oben beschriebenen Faktoren, die eine Peptidsynthese beeinflussen, zu achten. Soll eine Konjugation an ein Lipid oder Protein erfolgen, muss je nach Methode der Spacer chemoselektiv verändert werden, um eine effiziente Anbindung zu gewährleisten. Die verschiedenen Möglichkeiten zur Konjugation werden in den entsprechenden Kapiteln näher erläutert.

¹⁰⁷ S. Czernecki, C. Georggoulis, C. Provelenghiou, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 3535.

¹⁰⁸ K. Kanai, I. Sakamoto, S. Ogawa, T. Suami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 1529.

¹⁰⁹ O. Seitz, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1995**.

¹¹⁰ G. Fuchs, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1995**.

3.2 Synthese der glycosylierten Aminosäure-Bausteine

In Anlehnung an die biomimetrische Synthesestrategie werden alle tumorassoziierten Saccharidantigenbausteine in linearen Synthesen ausgehend von einem zentralen *N*-Acetylgalactosamin-Threonin- oder -Serin-Konjugat aufgebaut und nachfolgend in der Festphasensynthese eingesetzt.^{111,112,113,114,115,104}

3.2.1 Darstellung von *N*-Acetylgalactosamin-Threonin- und -Serin-Bausteinen

Die Synthese des *N*-Acetylgalactosamin-Aminosäure-Bausteins wird so durchgeführt, dass die *Fmoc*-Gruppe erhalten bleibt und *O*-Glycosylierungsreaktionen möglich sind.^{116,102,103} Zunächst werden L-Threonin (**1a**) und L-Serin (**1b**) so modifiziert, dass sie als Glycosylakzeptoren in einer von *Paulsen*¹¹⁷ entwickelten Glycosylierungsreaktion eingesetzt werden können. Dazu wird die freie Aminfunktion durch Umsetzung mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (*Fmoc*-OSu) mit der *Fmoc*-Schutzgruppe¹¹⁸ versehen. Das in 97%-iger Ausbeute erhaltene *Fmoc*-Thr-OH **2a** bzw. *Fmoc*-Ser-OH **2b** wird mit *tert*-Butanol in einer Cu(I)-katalysierten Veresterung unter Aktivierung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), zum Aminosäureester *Fmoc*-Thr-*Ot*Bu (**3a**) bzw. *Fmoc*-Ser-*Ot*Bu (**3b**) umgesetzt^{119,120} (Abb. 3.2.1.1).

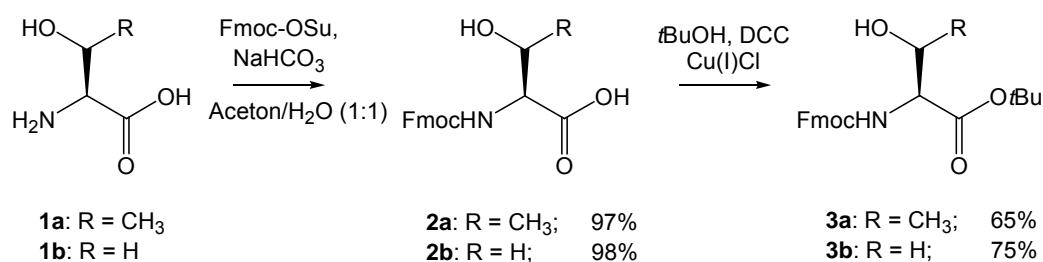


Abb. 3.2.1.1: Synthese der Galaktosylakzeptoren

¹¹¹ C. Brocke, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2003**.

¹¹² S. Dziadek, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.

¹¹³ A. Kuhn, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.

¹¹⁴ T. Becker, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2006**.

¹¹⁵ S. Wittrock, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2006**.

¹¹⁶ B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 629.

¹¹⁷ H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89.

¹¹⁸ A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976.

¹¹⁹ G. Braum, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1991**.

¹²⁰ H. Kunz, *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Ed.: S. Hanessian), M. Dekker, New York, **1997**, 265.

Zur Synthese des Galactosaminyldonors wird D-Galactose (**4**) in fünf Stufen zum 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid¹²¹ (**8**) umgesetzt. Hierfür müssen zunächst die freien OH-Gruppen der D-Galactose (**4**) mit Acetanhydrid und katalytischen Mengen an 70%-iger Perchlorsäure vollständig acetyliert werden. Nachfolgende Umsetzung zum α -anomeren Bromid **5** gelingt mit Phosphortribromid und katalytischen Mengen an Wasser. Dieses anomere Bromid **5** wird gemeinsam mit der 2-Acetoxygruppe durch mit Kupfersulfat aktiviertem Zn in einem Essigsäure-Wasser Gemisch (2:3) unter Bildung des 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactals^{122,123,124} (**6**) eliminiert. Das Galactal **6** wird in 84%-iger Ausbeute über drei Stufen ohne chromatographische Reinigung gewonnen (Abb. 3.2.1.2).

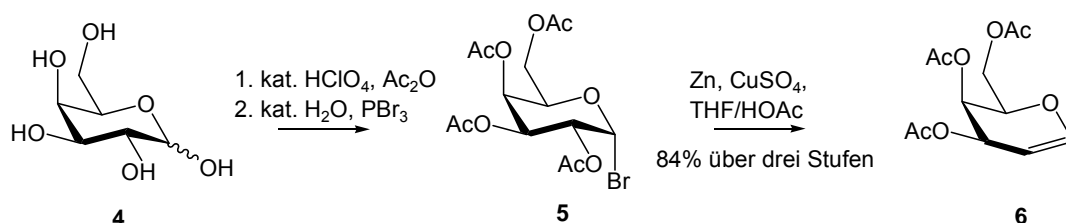


Abb. 3.2.1.2: Synthese von 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**6**)

Nachfolgend wird das Galactal **6** nach einer von *Lemieux*¹²⁵ eingeführten Methode azidonitratisiert. Hierbei wird mittels Cerammoniumnitrat und Natriumazid in einer Radikalreaktion die 2-Position mit einer Azidfunktion und die 1-Position des Galactopyranoserings mit einer Nitratfunktion versehen. Die Bildung des so entstehenden anomeren Gemischs von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galacto-pyranosylnitrat (**7**) wird mechanistisch wie folgt beschrieben:

Zunächst erzeugt das starke Oxidationsmittel Ce(IV) durch eine Elektronenabstraktion ein Azidradikal. Das Azidradikal kann dann die Doppelbindung des Galactals **6** unter Ausbildung eines radikalischen Zwischenproduktes angreifen. Dieses Radikal wird durch ein weiteres Ce(IV) zum Oxycarbeniumion oxidiert, das vom Nitratanion an der anomeren Position zum 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galacto-pyranosylnitrat (**7**) angegriffen wird (Abb. 3.2.1.3).

¹²¹ R.U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244.

¹²² J. Habermann, *Dissertation*, Universität Mainz, **1998**.

¹²³ R. Pfau, *Dissertation*, Universität Mainz, **2001**.

¹²⁴ J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129.

¹²⁵ R.U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Deutsche Patentanmeldung* **1978**, AZ: P 2816340.8.

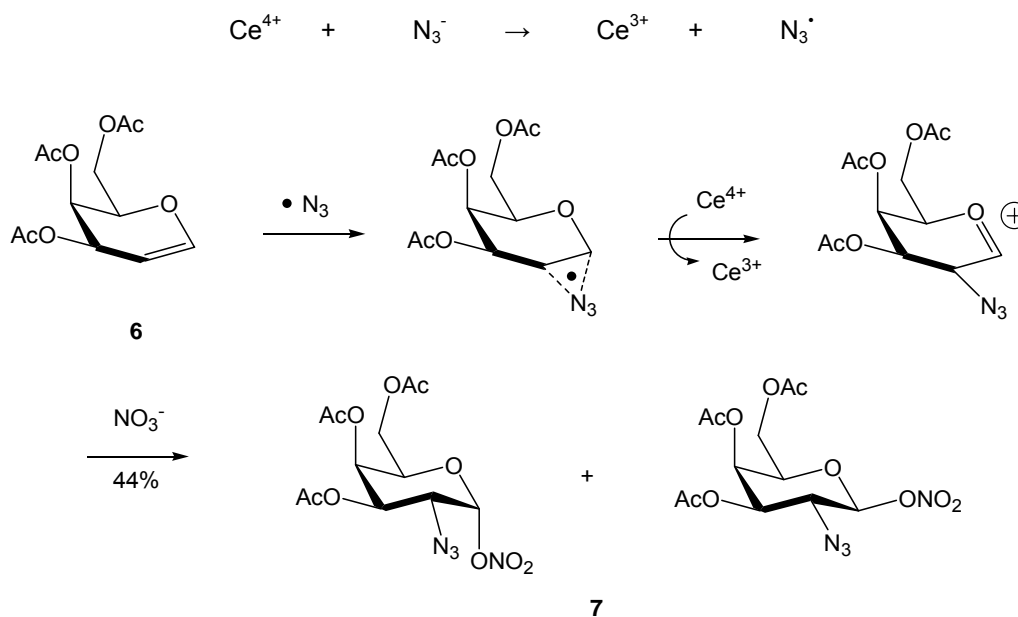


Abb. 3.2.1.3: Synthese und Mechanismus der Azidonitratisierung nach *Lemieux*

In der weiteren Synthese wird das Anomerengemisch **7** mit wasserfreiem Lithiumbromid zum Galactosyldonor 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (**8**) umgesetzt (Abb. 3.2.1.4). Beim nucleophilen Austausch des Nitrats gegen das Bromid wird aufgrund des anomeren Effekts fast ausschließlich (α/β , 9:1) das α -Anomer **8** gebildet.

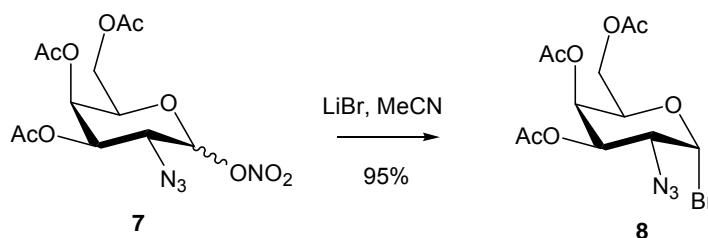


Abb. 3.2.1.4: Umsetzung zum Galactosyldonor **8**

Wegen der Neigung zur Hydrolyse wird 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (**8**) direkt in der folgenden Glycosylierungsreaktion^{126,127} eingesetzt. Durch Aktivierung mit Silbercarbonat und wasserfreiem Silberperchlorat wird die *Königs-Knorr*-Glycosylierung nach *Paulsen* durchgeführt.^{128,111} Das Fmoc-Ser-*O**t*Bu **3b** bzw. das Fmoc-Thr-*O**t*Bu **3b** wird in einer Mischung aus Toluol/Dichlormethan (1:1) mit 3,4,6-Tri-*O*-

¹²⁶ B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473.

¹²⁷ B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8777.

¹²⁸ W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *1901*, 957.

acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (**8**) zum Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu **9a** bzw. Fmoc-Ser(α Ac₃GalN₃)-OtBu (**9b**) umgesetzt (Abb. 3.2.1.5). Aufgrund des anomeren Effekts wird bevorzugt das α -Anomer **9a**, **9b** erhalten (α : β = 25:1).

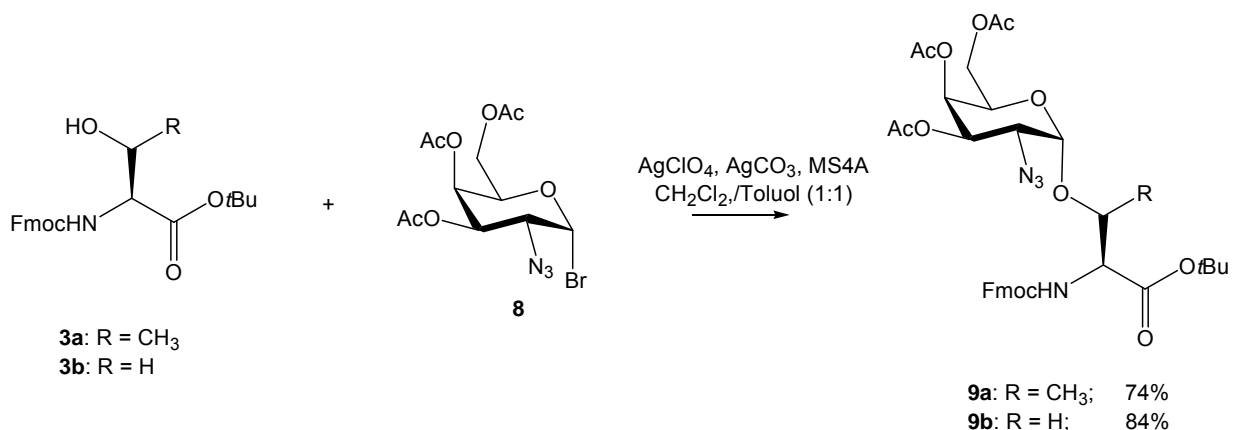


Abb. 3.2.1.5: Glycosylierung zum Fmoc-Thr/Ser(α Ac₃GalN₃)-OtBu (**9a**, **9b**)

Zur Vervollständigung der Synthese des *N*-Acetylgalactosamin-Threonin-Bausteins muss die 2-Azidgruppe in eine 2-*N*-Acetylgruppe überführt werden.¹²⁹ Dazu wird die Azidfunktion von **9a/9b** zunächst mit durch Kupfersulfat aktiviertem Zink reduziert und gleichzeitig in Tetrahydrofuran/Acetanhydrid/Essigsäure (3:2:1) *N*-acetyliert. Um die T_N-Antigen-Bausteine **10a/10b** für die Festphasenglycopeptidsynthese zu erhalten, wird der *tert.*-Butylester acidolytisch mit TFA gespalten^{130,131} (Abb. 3.2.1.6).

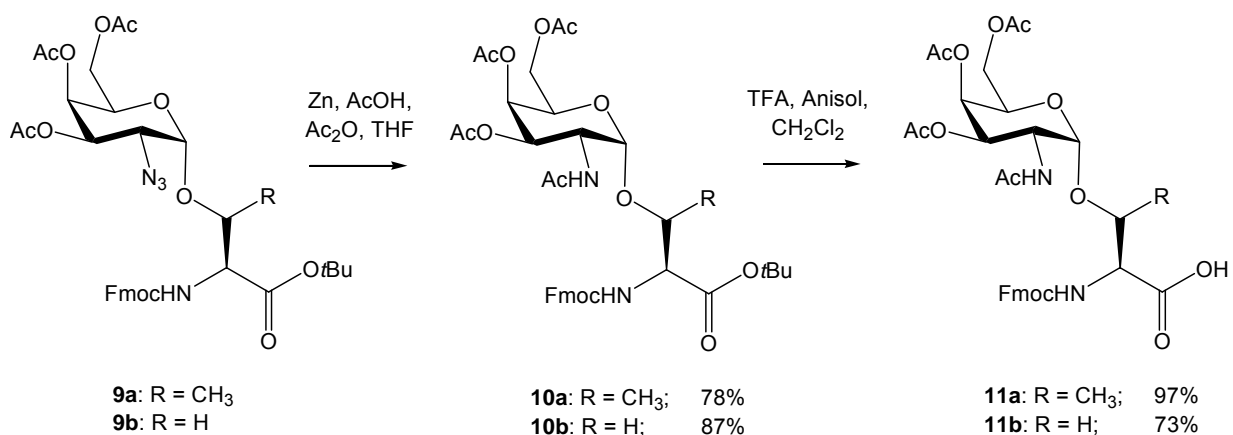


Abb. 3.2.1.6: Reduktive *N*-Acetylierung und acidolytische Esterhydrolyse

¹²⁹ E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc.*, Perkin Trans. 1 **1996**, 985.

¹³⁰ D. B. Bryan, R. F. Hall, K. G. Holden, W. F. Huffman, J. G. Gleason, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 2353.

¹³¹ A. Mehta, R. Jaouhari, T. J. Benson, K. T. Douglas, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5441.

3.2.2 Synthese der Sialyl-T_N-Antigen-Bausteine

Um die universellen Bausteine der tumorassoziierten Antigenstrukturen **10a** bzw. **10b** zu Sialyl-T_N-Antigen-Bausteinen¹³² umzusetzen, müssen letztere in geeignete Galactosylakzeptoren überführt werden. Hierfür ist es ausreichend, die Acetylenschutzgruppen in 3-, 4- und 6-Position selektiv abzuspalten. Dies geschieht nach der Umesterungsmethode von Zemplén¹³³ mit katalytischen Mengen an Natriummethanolat in Methanol (Abb. 3.2.2.1), wobei der pH-Wert die Marke von pH = 8.5 nicht überschreiten sollte, da sonst die basenlabile *Fmoc*-Schutzgruppe abgespalten wird. Eine teilweise Entfernung der *Fmoc*-Einheit findet allerdings immer statt, da die *Fmoc*-Gruppe schon mit katalytischen Mengen an Base deblockiert werden kann. Eine Möglichkeit zur Minderung dieses Effekts ist eine Verkürzung der Reaktionszeit. Optimierungen bezüglich der Reaktionszeiten erwiesen sich allerdings als schwierig, weshalb nach einer Deacetylierung anschließend eine Wiedereinführung der *Fmoc*-Gruppe mit *Fmoc*-OSu in Dioxan/Wasser durchgeführt wurde.^{112, 114, 115}

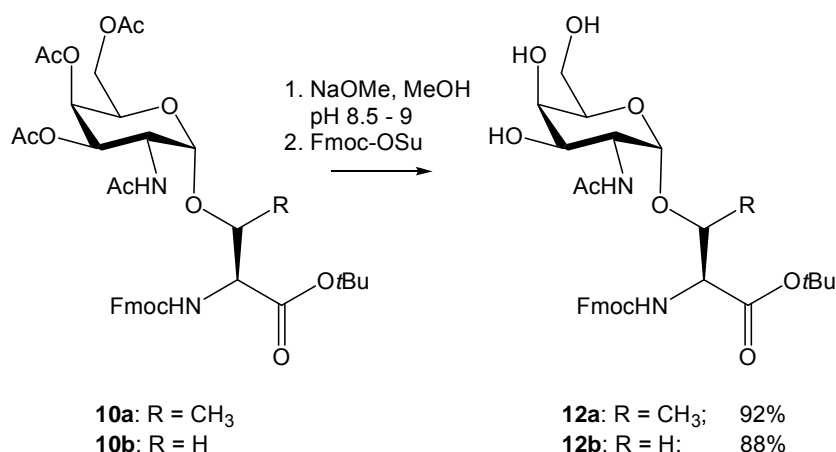


Abb. 3.2.2.1: Zemplén-Umesterung

Ausgehend von den dargestellten Galactosylakzeptoren **12a**, **12b** soll die 6-Position stereo- und regioselektiv mit einem Sialyldonor α -glycosyliert werden. Die Synthese des entsprechenden Sialyldonors geht von der *N*-Acetyl-D-neuraminsäure (**13**) aus, die im ersten Schritt vollständig acetyliert wird. Dies geschieht mit Acetanhydrid/Pyridin (2:1). Im Anschluss wird das

¹³² B. Liebe, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1997.

¹³³ G. Zemplén, A. Kunz, *Chem. Ber.* **1923**, 56, 1705.

Rohprodukt zum Benzylester umgesetzt^{134,132} (Abb. 3.2.2.2), welcher über das Cäsiumsalz durch nucleophile Substitution gebildet wird.¹³⁵

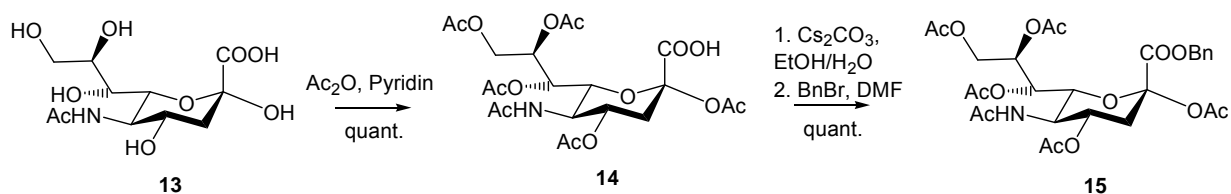


Abb. 3.2.2.2: Acetylierung der Hydroxygruppen und Benzylierung der Säuregruppe der *N*-Acetyl-D-neuraminsäure (13)

Die vollständig geschützte *N*-Acetylneuraminsäure (**15**) wird im Folgenden in das Xanthogenat¹³⁶ **17** als Donor umgewandelt. Es hat sich für die darauffolgenden Glycosylierungsreaktion als besonders geeignet erwiesen.¹²⁶ Dazu muss zunächst die Acetoxygruppe in 2-Position des Neuraminsäure-Derivats **15** durch Chlorid ersetzt werden. Dies geschieht mit Chlorwasserstoff, welcher *in situ* aus Acetylchlorid und katalytischen Mengen an Wasser erzeugt wird. Dieses Chlorid **16** kann ohne Reinigung mit Kaliumethylxanthogenat direkt zum Xanthogen **17** umgesetzt werden (Abb. 3.2.2.3).

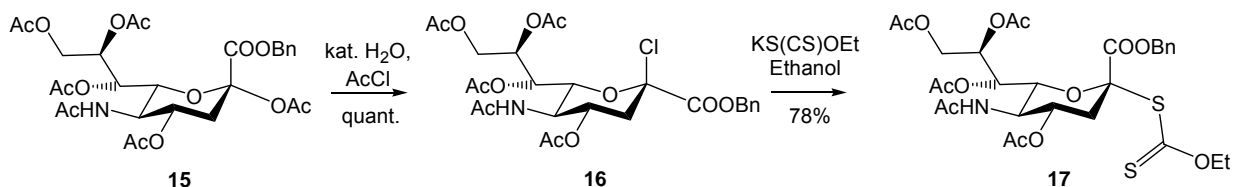


Abb. 3.2.2.3: Darstellung des Sialinsäuredonors (17)

Der Xanthogendonator **17** hat den Vorteil, dass man ihn leicht aktivieren kann. Die Aktivierung gelingt durch Methylsulfenyltriflat als thiophilen Promotor,^{137,138} der wiederum in einer frisch hergestellten Methylsulfenylbromid-Lösung mit Silbertriflat *in situ* gebildet wird. Das Schwefelatom des Methylsulfenyltriflats greift den Thiocarbonat-Schwefel unter Ausbildung

¹³⁴ S. Keil, *Dissertation*, Universität Mainz, 2000.

¹³⁵ J. C. Lee, Y. S. Oh, S. H. Cho, J. I. Lee, *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, 28, 480.

¹³⁶ A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, 187, 35.

¹³⁷ P. J. Garegg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1997**, 52, 177.

¹³⁸ F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, 177, c13.

einer Disulfidbrücke an. Im Anschluss wird die Abgangsgruppe eliminiert, und es bildet sich ein Sialylkation (Abb. 3.2.2.4).¹¹²

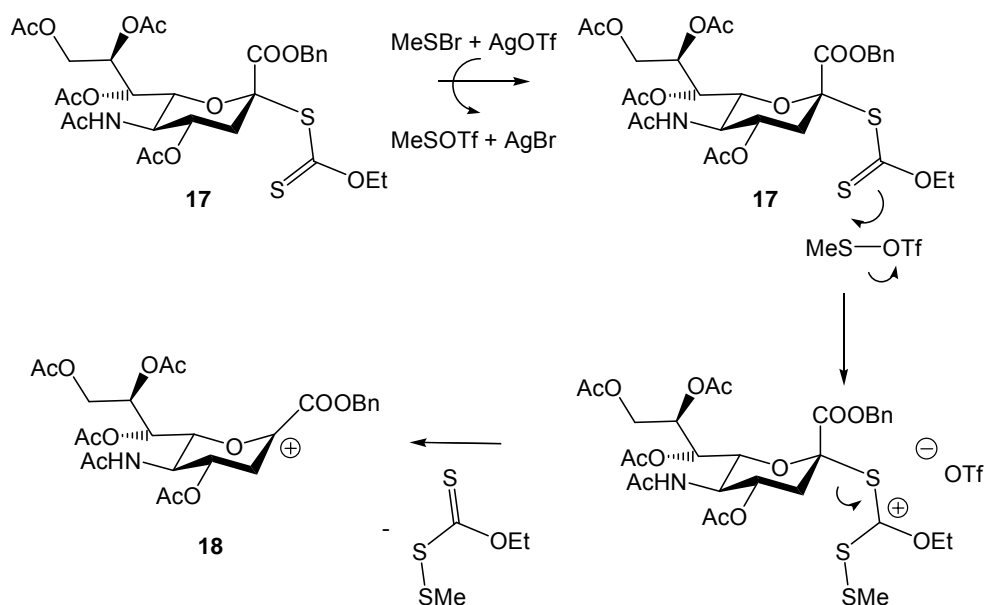


Abb. 3.2.2.4: Aktivierung des Sialinsäuredonors

Das Sialylkation greift stereo- und regioselektiv die 6-OH-Gruppe der Galaktosylakzeptoren **12a/12b** an. Parallel zur Glycosylierung kann das Sialylkation **18** auch eine Eliminierung erleiden. In diesem Fall kommt es zur Bildung des Glycals **19** (Abb. 3.2.2.5). Diese unerwünschte Nebenreaktion tritt bei Glycosylierungsreaktion mit Neuraminsäure-Donoren ständig auf.

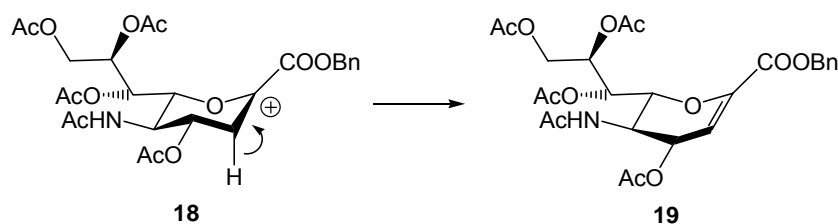


Abb. 3.2.2.5: Eliminierung zum Glycal 19

Die Stereoselektivität der vom Promotor induzierten Glycosylierung kann durch den so genannten Nitrileffekt und die Temperatur beeinflusst werden.^{139,140} Bei Verwendung des Lösemittels Acetonitril koordiniert die Nitrilgruppe an das Sialylkation **18**¹⁴¹ in axialer oder äquatorialer Ausrichtung. Dieses Gleichgewicht lässt sich durch geeignete Temperaturwahl in die gewünschte Richtung lenken. Bei tiefen Temperaturen (d.h. unter kinetischer Kontrolle) ist die Bildung des axialen β -Nitrilium-Addukts bevorzugt, bei höheren Temperaturen (d.h. unter thermodynamischer Kontrolle) das äquatoriale α -Nitrilium-Addukt (Abb. 3.2.2.6).¹⁴² Um in der Folgereaktion das α -Sialosid zu erzeugen, wird das unter kinetischer Kontrolle gebildete axiale β -Nitrilium-Addukt als Sialosyldonor eingesetzt.

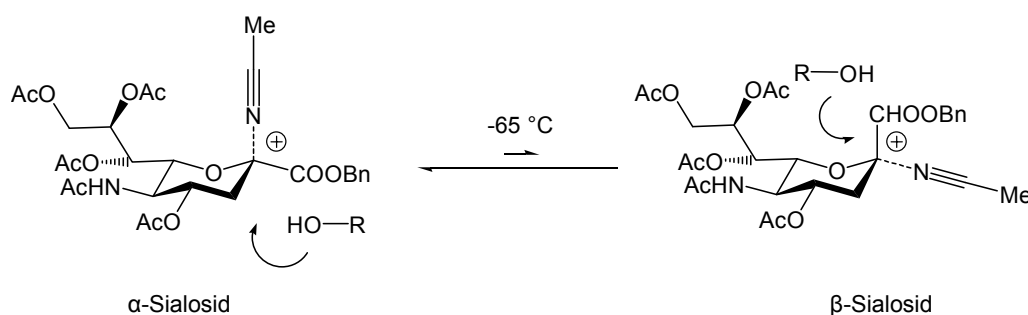


Abb. 3.2.2.6: Nitrileffekt

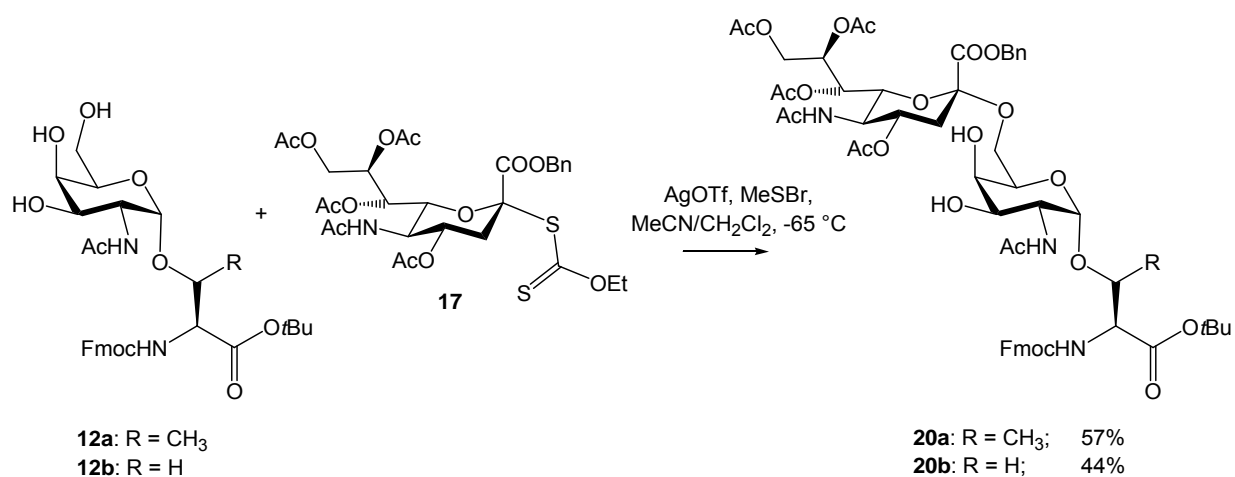
Die Regioselektivität der Glycosylierung wird auf die geringere sterische Hinderung und die erhöhte Reaktivität der primären 6-OH-Gruppe der Galactosylakzeptoren **12a/12b** zurückgeführt. Die α -Sialylierung erfolgt mit 2.5 Äquiv. Neuraminsäuredonor **17** und 1 Äquiv. der Galactosylakzeptoren **12a/12b** im Lösemittelgemisch Acetonitril/Dichlormethan (2:1) bei einer Temperatur von -65 °C . Zu der Lösung wird zunächst Silbertriflat zugefügt und im Anschluss langsam Methylsulfenylbromid zugetropft. Durch diese Reaktionsführung wird eine Ausbeute von 57% an α -Sialosid **20a**¹¹² und 44% an α -Sialosid **20b**¹¹³ erhalten (Abb. 3.2.2.7).

¹³⁹ H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 115.

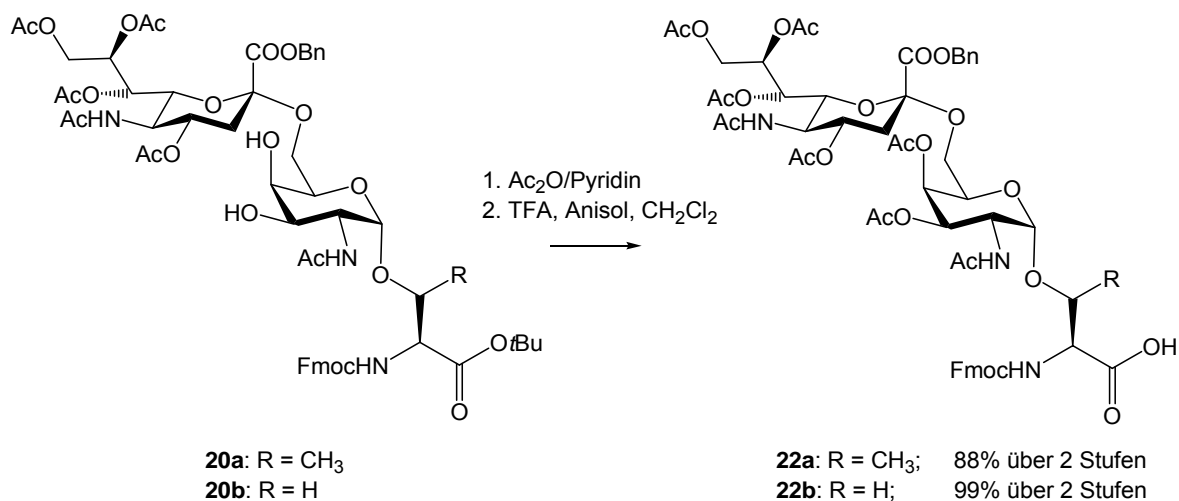
¹⁴⁰ O. Kanie, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, 7, 501.

¹⁴¹ R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett.* **1990**, 694.

¹⁴² H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 115.

Abb. 3.2.2.7: Sialylierung zum ST_N-Antigen 20a/20b

Um diese ST_N-Antigen-Bausteine in der Festphasenglycopeptidsynthese einsetzen zu können, müssen die freien Hydroxylgruppen an Position 3 und 4 mit Acetanhydrid/Pyridin (2:1) und katalytischen Mengen DMAP acetyliert werden.^{113,143} Anschließend folgt die Freilegung der Säurefunktion, um zu den ST_N-Aminosäurebaustein-Analoga **22a/22b** für die Festphasensynthese zu gelangen. Hierzu wird mit Trifluoressigsäure, der 5% des Kationen-Scavengers Anisol zugesetzt ist, der *tert*-Butylester in nahezu quantitativen Ausbeuten gespalten (Abb. 3.2.2.8).

Abb. 3.2.2.8: Darstellung der ST_N-Antigen-Glycopeptid-Bausteine 22a/22b

¹⁴³ B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556.

3.2.3 Synthese des Thomson-Friedenreich-Antigen-Bausteins

Als nächstes soll das Thomson-Friedenreich-Antigen als geeigneter Festphasenbaustein eingebaut werden.^{113,115} Gleichzeitig soll das T-Antigen-Disaccharid als Vorläufer für die Gewinnung der regioisomeren 2,3- und 2,6-Sialyl-T-Festphasenbausteine hergestellt werden.¹¹² Um das T-Antigen¹⁴⁴ aufzubauen muss eine selektive 3- β -Galactosylierung des T_N-Threonin-Konjugats **12a** erfolgen. Dieses wird zunächst an den Positionen 4 und 6 selektiv als Benzylidenacetal geschützt.¹⁴⁵ Hierzu wird **12a** mit Benzaldehyddimethylacetal in Gegenwart katalytischer Mengen *p*-Toluol-sulfonsäure umgesetzt, um die freie 3-Position im Glycosylakzeptor **23** zu erhalten (Abb. 3.2.3.1).

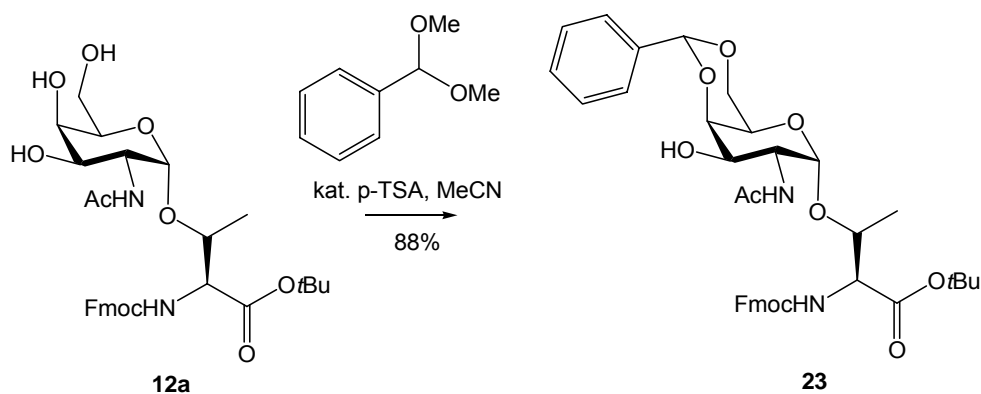


Abb. 3.2.3.1: Synthese des Glycosylakzeptor **23**

Die Glycosylierung der 3-OH-Gruppe von **12a** soll nach einer Methode von *Helferich*¹⁴⁶ durchgeführt werden. Hierbei werden Glycosylbromide als Donoren eingesetzt und unter Aktivierung mit Hg(CN)₂ zum entsprechenden Disaccharid geknüpft. Im vorliegenden Fall sollte eine Acetyl-Schutzgruppe in der 2-Position über Nachbargruppeneffekt die β -Selektivität sicherstellen.^{147,148,149}

Die Synthese eines T-Antigen-Festphasenbausteins kann nach dem oben beschriebenen Verfahren mit dem Glycosyldonor **5** und dem Akzeptor **23** durchgeführt werden. Nach der *Helferich*-Glycosylierung erhält man das vollständig geschützte T-Antigen Konstrukt in 72%-iger Ausbeute.¹¹³ Um aus dem Disaccharid **24** einen in der Festphasenglycopeptidsynthese

¹⁴⁴ M. Leuck and H. Kunz, *J. prakt. Chem.* **1997**, 339, 322.

¹⁴⁵ S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 880.

¹⁴⁶ B. Helferich, F. Wedemeyer, *Liebigs Ann. Chem.* **1949**, 563, 139.

¹⁴⁷ T. Reipen, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2002**.

¹⁴⁸ T. Reipen, H. Kunz, *Synthesis* **2003**, 2487.

¹⁴⁹ N. Bézay, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.

einsetzbaren *Fmoc*-T-Antigen-Baustein zu erhalten, werden die säurelabilen Benzyliden- und *tert*-Butyl-Schutzgruppen mit TFA entfernt und anschließend die freien 4- und 6-Hydroxygruppen mit Acetanhydrid in Pyridin und katalytischen Mengen DMAP acetyliert. Der erhaltene vollständig geschützte *Fmoc*-funktionalisierte T-Antigen-Baustein **25** mit freiem C-Terminus kann im Folgenden direkt in der Festphasen-Vakzinsynthese eingesetzt werden (Abb. 3.2.3.2).

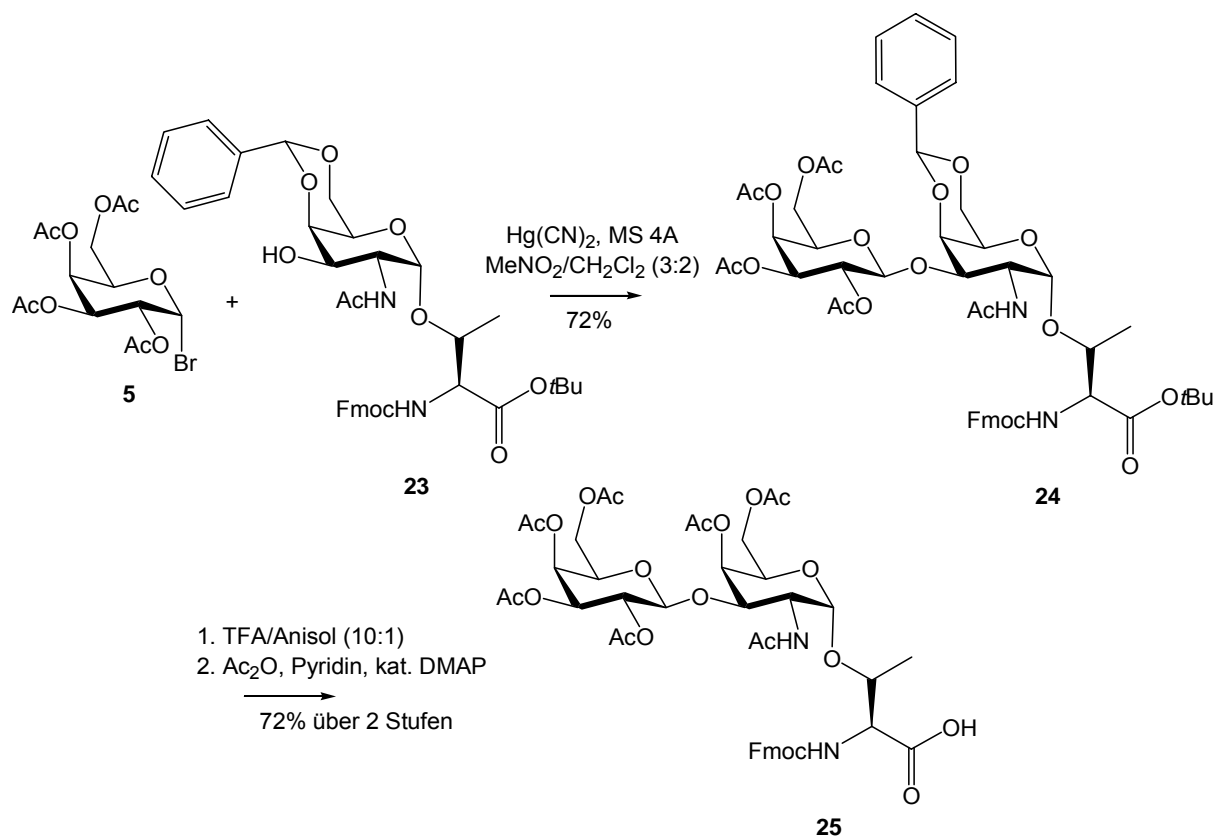


Abb. 3.2.3.2: Synthese des T-Antigen-Festphasenbausteins **25**

In Anbetracht dessen, dass das T-Antigen auch als Ausgangssubstanz für die Synthese der regioisomeren sialylierten 2,3- und 2,6-Sialy-T-Antigene dienen soll, muss der Akzeptor **23** mit einer Galactoseeinheit glycosyliert werden, die eine spätere selektive Sialylierung ermöglicht. Hierzu muss zunächst ein geeigneter Galactose-Donor synthetisiert werden.

Ausgehend von D-Galactose **4** wird in fünf Stufen ein Galactosylbromid-Donor **30**, der in 6-Position eine hydrogenolytisch spaltbare Benzylethergruppe trägt, dargestellt.^{150,151} Dazu wird D-Galactose **4** in Aceton mit katalytischen Mengen Schwefelsäure und Kupfersulfat als

¹⁵⁰ H. Herzner, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2001**.

¹⁵¹ C. Filser, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.

Wasserrfänger in 1,2,3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**26**) überföhrt, welche mit Benzylbromid in DMF zum Benzylether **27** umgesetzt wird.¹⁵² Nachdem die 6-Position selektiv blockiert ist, werden die Isopropyliden-Gruppen in 80%iger Essigsäure bei 85 °C entfernt und durch Acetylschutzgruppen ersetzt. Um das Galactose-Derivat **29** in einen für die Glycosylierung nach *Helferich* geeigneten Bromid-Donor zu überföhren, wird es mit einer 33%-igen Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig geröhrt, um das α -Galactosylbromid **30** in 55%-iger Ausbeute zu erhalten (Abb. 3.2.3.3).

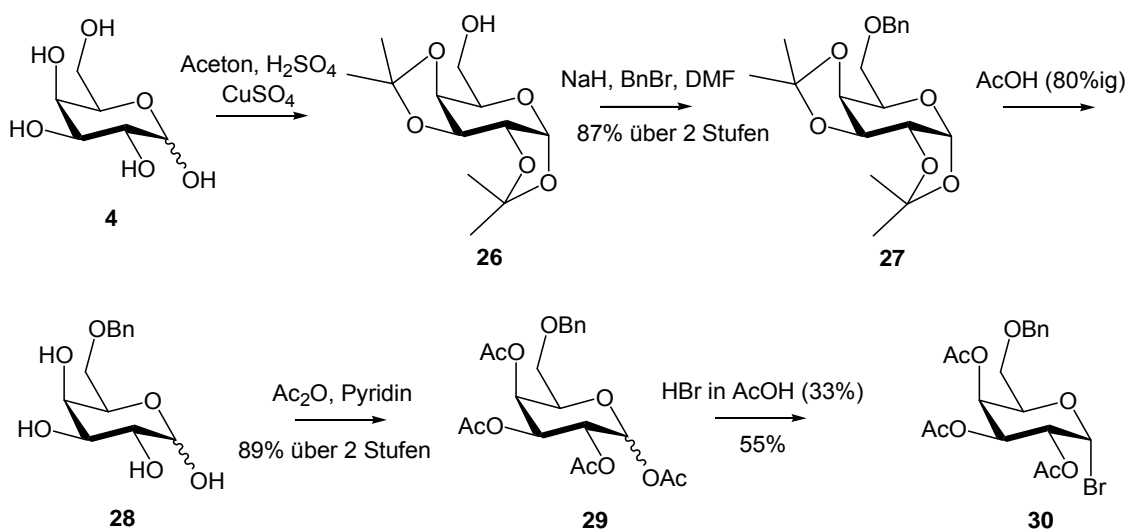


Abb. 3.2.3.3: Synthese des α -Galactosylbromids **30**

Die stereoselektive Galactosylierung des an der 3-Hydroxyfunktion ungeschützten Akzeptors **23** erfolgt ebenfalls unter den oben genannten *Helferich*-Bedingungen¹⁴⁶ bei Raumtemperatur mit Galactosylbromid **30** unter Aktivierung mit Hg(CN)₂ in einer Mischung aus Nitromethan und Dichlormethan und föhrt mit 93%-iger Ausbeute zum T-Antigen-Threonin-Konjugat **31** (Abb. 3.2.3.4).^{111,112}

¹⁵² X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6569.

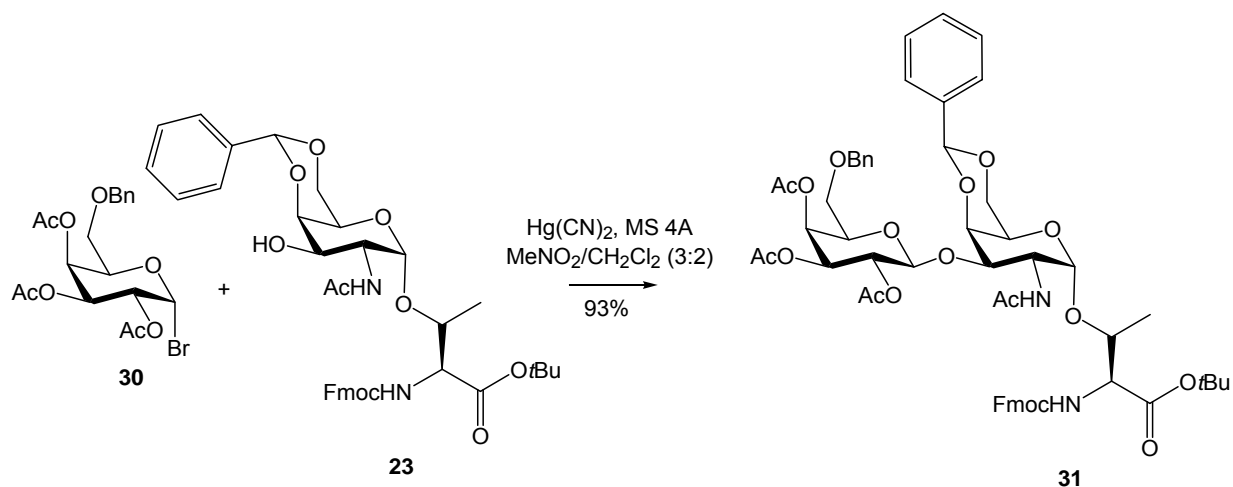


Abb. 3.2.3.4: Synthese des T-Antigen Synthesevorläufers **31**

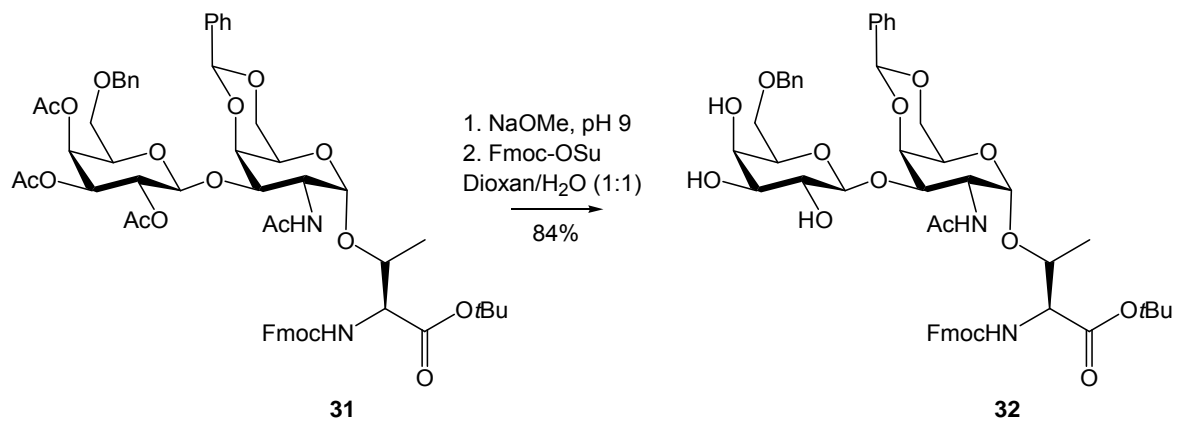
Der vollständig geschützte T-Antigen-Baustein **31** ist eine geeignete Vorstufe für die Synthesen sowohl zum 2,3- als auch zum 2,6-Sialyl-T-Antigen-Threonin-Konjugat.^{104,153,154} Nach Deacetylierung der Hydroxylgruppen in 2'-, 3'- und 4'-Position der Galactoseeinheit durch Umesterung unter *Zemplén*-Bedingungen wird die regioselektive Sialylierung der 3'-Position möglich. Zugleich liefert die acidolytische Öffnung des Benzilydenacetals die Freilegung der nucleophileren 6-Position an der *N*-Acetylgalactoseeinheit, welche selektiv zum 2,6-Sialyl-T-Antigen umgesetzt werden kann.

3.2.4 Synthese des 2,3-Sialyl-T-Antigen-Bausteins

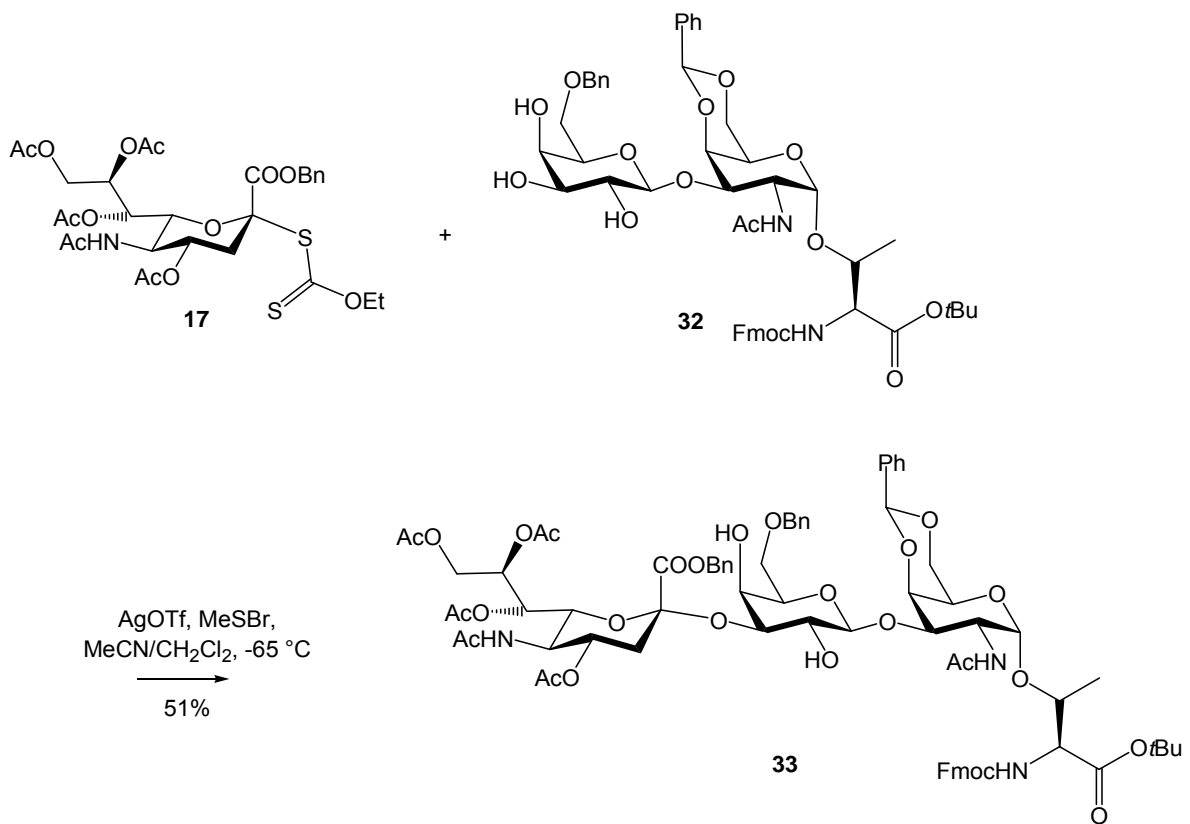
Wie im obigen Kapitel besprochen, eröffnet der universelle T-Antigen-Baustein **31** die Möglichkeit zur selektiven *O*-Deacetylierung der 2'-, 3'- und 4'-Position der Galactoseeinheit auch in Gegenwart der basenlabilen *Fmoc*-Schutzgruppe. Die teilweise Deblockierung der *Fmoc*-Einheit wurde auch hier beobachtet, weshalb die Wiedereinführung der *Fmoc*-Gruppe mit *Fmoc*-OSu im Dioxan/Wasser Gemisch durchgeführt wurde.^{112,114,115} So konnte der Sialylakzeptor **32** in einer Gesamtausbeute von 84% gewonnen werden (Abb. 3.2.4.1).

¹⁵³ S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Chemistry Eur. J.* **2004**, *10*, 4150.

¹⁵⁴ S. Dziadek, H. Kunz, *Synlett* **2003**, 1623.

Abb. 3.2.4.1: Synthese des 2,3-Sialyl-T-Akzeptors **32**

Die reaktivste nucleophile Position des T-Antigen-Konjugats **32** ist die 3'-OH-Funktion, welche man, ohne weitere Schutzgruppenmanipulationen durchführen zu müssen, stereo- und regioselektiv sialylieren kann. Die Kontrolle der Stereoselektivität erfolgt erneut über den Nitrileffekt und liefert unter kinetischer Reaktionsführung bei -65 °C das α -Sialosid **33**.

Abb. 3.2.4.2: Sialylierung zum 2,3-ST-Antigen-Baustein **33**

Die Sialylierung des Akzeptors **32** erfolgt unter Verwendung des *in situ* erzeugten Promotors Methylsulfonyltriflat mit zwei Äquivalenten des Xanthogenat-Donors **17** in einer Mischung aus Acetonitril und Dichlormethan (2:1) bei einer Temperatur von -65°C . Die durch sterische und elektronische Effekte begünstigte Glycosylierung liefert das 2,3-Sialyl-T-Antigen **33** in einer Ausbeute von 51% (Abb. 3.2.4.2).

Um das noch mit der Benzyliden-Schutzgruppe versehene 2,3-Sialyl-T-Antigen-Derivat **33** in einen für die Glycopeptidfestphasensynthese geeigneten Baustein umzuwandeln, sind einige Schutzgruppenmanipulationen nötig. Die acidolytisch spaltbaren tert-Butyl- und Benzyliden-Schutzgruppen werden mit TFA gespalten. Anschließend werden die freien OH-Gruppen im Molekül mit Acetanhydrid in Pyridin und katalytischen Mengen DMAP acetyliert. Nach diesen Umsetzungen wird der für die Festphasensynthese von Glycopeptid-Antigenen einsetzbare 2,3-Sialyl-T-Antigen-Baustein **34**¹⁵³ mit freiem C-Terminus in 76%-iger Ausbeute über zwei Stufen erhalten (Abb. 3.2.4.3).

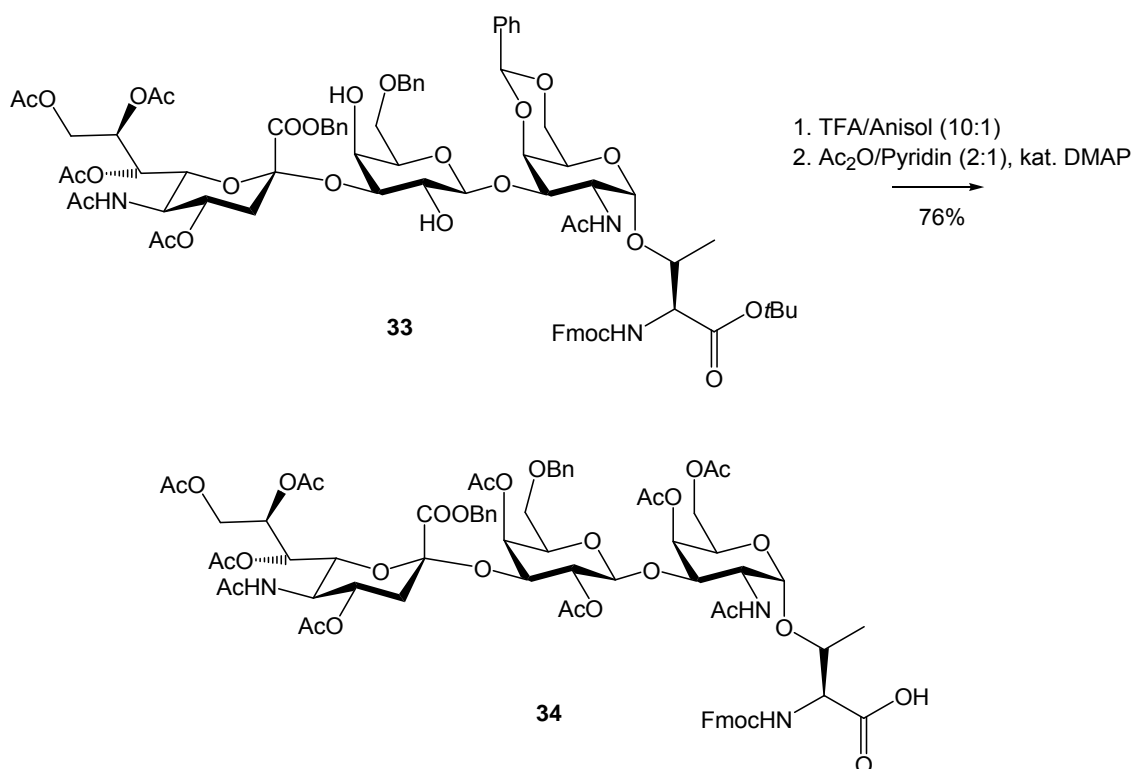


Abb. 3.2.4.3: Schutzgruppenmanipulationen zum 2,3-ST-Antigen-Baustein **34**

3.2.5 Synthese des 2,6-Sialyl-T-Antigen-Bausteins

Die stereoselektive Sialylierung der 6-OH-Gruppe wurde bereits bei der Synthese des Sialyl-T_N-Antigen erfolgreich demonstriert und soll in gleicher Weise auch am T-Antigen-Baustein **31** nach chemoselektiver Entfernung der Benzylidenschutzgruppe durchgeführt werden.¹⁵⁵ Dazu wird **31** in 80%-iger Essigsäure 1.5 h bei 80 °C gerührt, um so in 4- und 6-Position der Galactosamineinheit die freien Hydroxygruppen zu erhalten (Abb. 3.2.5.1).

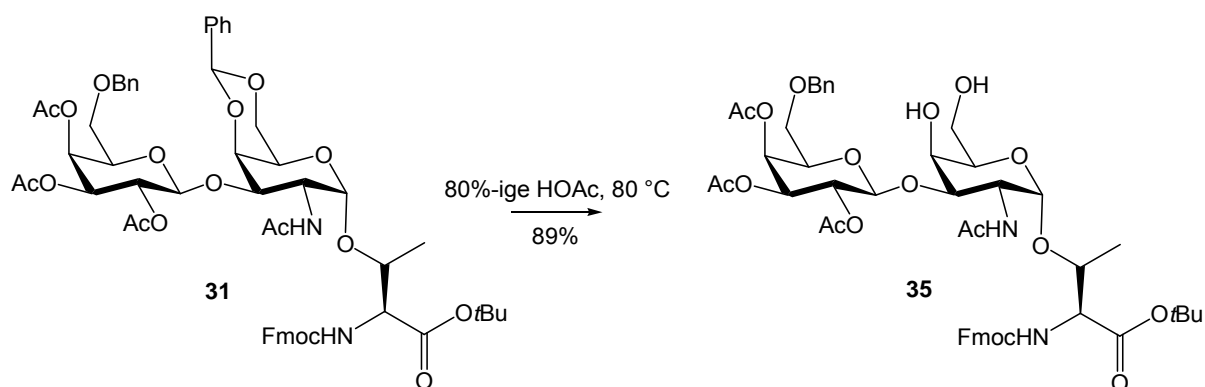
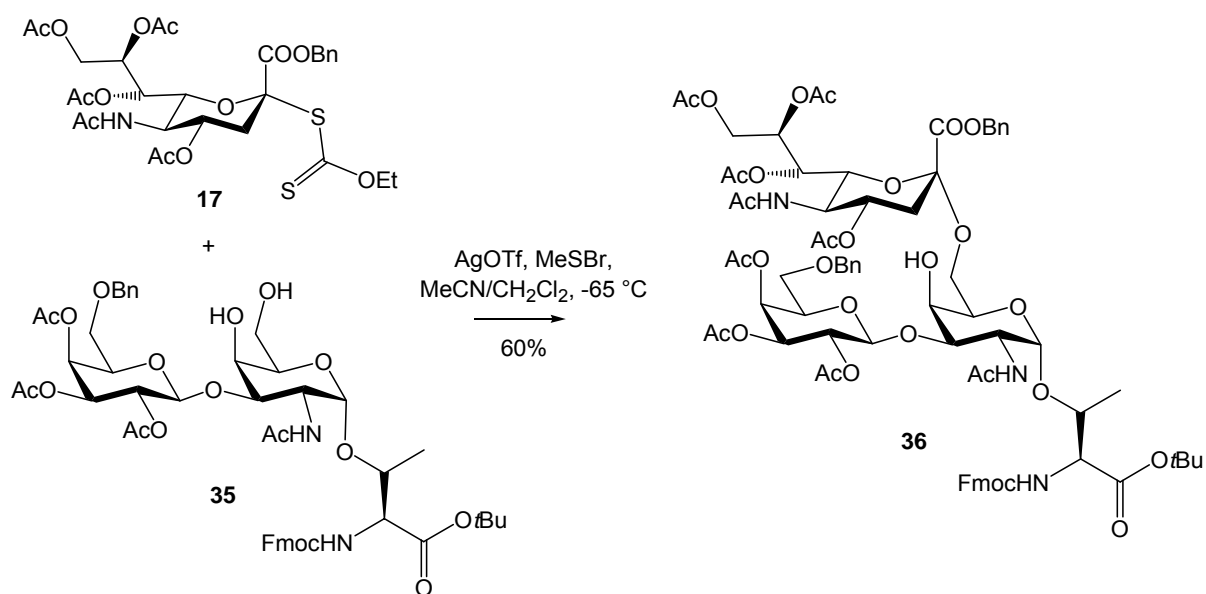


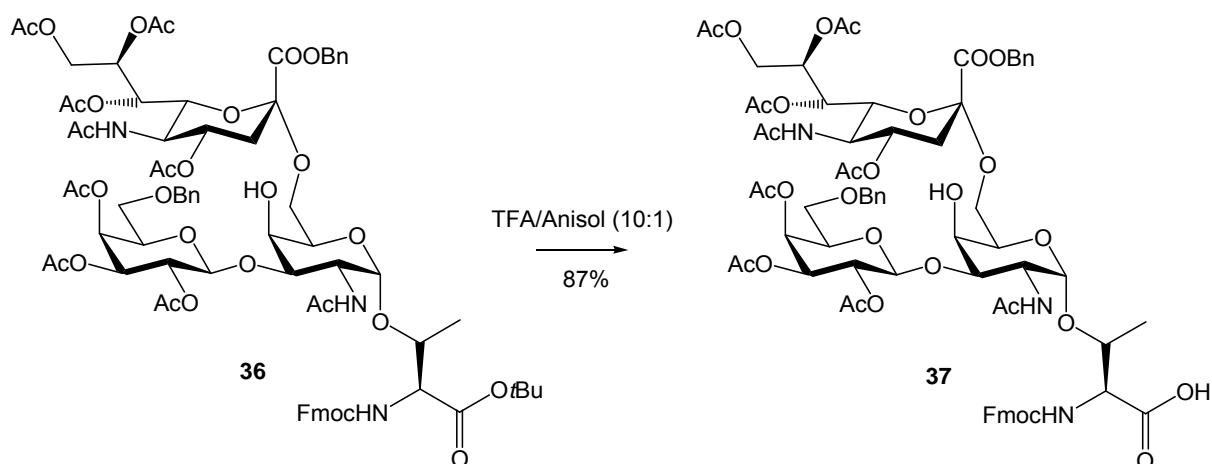
Abb. 3.2.5.1: Chemoselektive Benzylidenacetalspaltung

Der gewonnene Sialylakzeptor **35** wird nun in einer regioselektiven Glycosylierungsreaktion mit Xanthogenat **17** in das 2,6-Sialyl-T-Antigen-Konstrukt **36** überführt. Aufgrund der hohen Nucleophilie der primären 6-Hydroxyfunktion des T-Threonin-Konjugats **35** erfolgt ausschließlich Reaktion zum 2,6-ST-Antigen-Konjugat. Mit einem Überschuss von 2.5 Äquivalenten des Neuraminsäure donors **17** und unter Verwendung des *in situ* gebildeten Methylsulfonyltriflats als Promotor wird das Produkt **36** in 60%-iger Ausbeute erhalten. Die Reaktionsführung bei -65 °C stellt eine kinetische Kontrolle sicher, die zum 2,6-ST- α -Sialosid **36** führt. Neben dem α -Anomer **36** entsteht das nur mittels präparativer HPLC abtrennbare β -Anomer im Verhältnis: $\alpha/\beta = 10:1$ (Abb. 3.2.5.2).

¹⁵⁵ N. Mathieux, H. Paulsen, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 2359.

Abb. 3.2.5.2: Sialylierung zum 2,6-ST-Antigen-Baustein **36**

Um den vollständig blockierten Baustein **36** in ein für die Festphasenglycopeptidsynthese geeigneten Baustein zu überführen, wird schließlich der C-Terminus des 2,6-Sialyl-T-Derivats^{156,157} **37** durch Behandlung mit TFA acidolytisch freigesetzt. An dieser Stelle der Synthese wird vom unerwünschten β -Anomer mittels HPLC getrennt und der reine 2,6-Sialyl-T-Baustein **37** in einer Ausbeute von 87% isoliert (Abb. 3.2.5.3).

Abb. 3.2.5.3: Acidolyse zum 2,6-ST-Antigen-Baustein **37**

¹⁵⁶ C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 4, 525.

¹⁵⁷ A. Kuhn, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 458.

Auf die Acetylierung der sterisch gehinderten 4'-Hydroxyfunktion der Galactosamin-Einheit wurde verzichtet. Es hat sich bei früheren Glycopeptidsynthesen gezeigt, dass die spätere Deacetylierung an dieser Stelle höhere pH-Werte erfordert, was im Folgenden zu einer verstärkten β -Eliminierung, d. h. zum Verlust des Saccharidteils, führen könnte.¹¹³

3.2.6 Synthetische Studien zur Entwicklung eines C-glycosidischen Sialyl-T_N-Antigens

Alle tumorassoziierten Saccharidantigene sind O-glycosidisch an die Hydroxy-Seitenketten von Threonin oder Serin des Peptidrückrats gebunden.¹⁵⁸ Um Glycoprotein analoge Wirkstoffe effektiv einsetzen zu können, müssen sie ein Mindestmaß an metabolischer Stabilität aufweisen. Glycopeptide sind im Organismus den verschiedensten Glycosidasen ausgesetzt, was zur Folge hat, dass sie ständig einen Teil an Kohlenhydrat verlieren.^{159,160,161} Dieser Verlust führt zur Veränderung der Antigene in erheblichem Maße. In Folge dessen kann bei einer Anwendung als Antitumor-Vakzine die Aktivität und die Tumorselektivität verloren gehen. Um solche Faktoren auszuschalten, könnte man mehrere Möglichkeiten erörtern. Das Naheliegenste ist die Ausschaltung der Glycosidasen. Allerdings würde dieser nur schwer durchführbare Schritt zu mehreren Nebenreaktionen führen und so das Gleichgewicht eines ganzen Organismus stören. Eine andere Alternative besteht darin, die Glycopeptide gegen Glycosidasen resistent zu machen. Eine Möglichkeit, dies zu realisieren, besteht im Austausch der O-glycosidischen Verknüpfung durch andere Bindungen, wie beispielsweise die Schwefel- S, Stickstoff- N oder Kohlenstoff- C Bindung. Hierbei hat die Verwendung des Kohlenstoffs den Vorteil, dass er kein freies Elektronenpaar für eventuelle enzymatische Wechselwirkungen bereithält (Abb. 3.2.6.1).^{162,163,164,165,166}

¹⁵⁸ S. I. Hakamori, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 257.

¹⁵⁹ B. Kuberan, R. J. Linhardt, *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 653.

¹⁶⁰ N. Sharon, H. Lis, *Science* **1987**, *246*, 227.

¹⁶¹ R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683.

¹⁶² M. Postema, *C-Glycoside synthesis*, CRC, Boca Raton. **1995**.

¹⁶³ R. V. Weatherman, K. H. Mortell, M. Cheruenak, L. L. Kiessling, E. J. Toone, *Biochem.* **1996**, *35*, 3619.

¹⁶⁴ R. Ravishankar, A. Suroliya, M. Vijayan, S. Lim, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11297.

¹⁶⁵ C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kaijimoto, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 521.

¹⁶⁶ S. Howard, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10326.

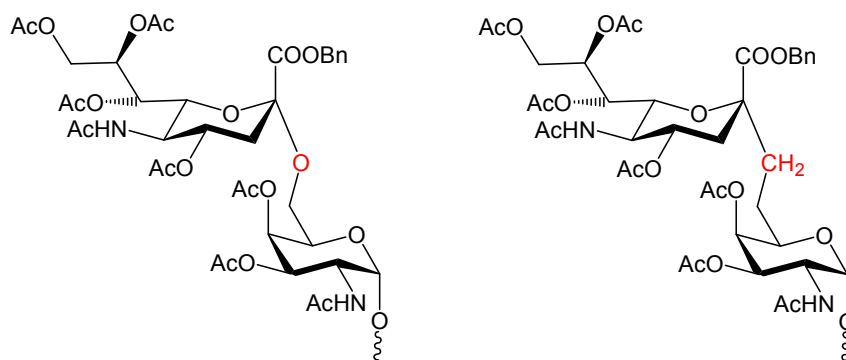


Abb. 3.2.6.1: *O*- und *C*-glycosidische verknüpfte Sialyl-T_N-Antigen

3.2.6.1 Synthese einer *C*-glycosidisch verknüpften Neuraminsäure

Zur Gewinnung eines enzymatisch stabilen Sialyl-T_N-Antigen-Bausteins soll eine geeignete *C*-Sialylierung dienen.^{167,168} Eine der wenigen Methoden, die dafür in Frage kommen scheint die Kupplung durch Samarium(II)iodid zu sein.^{169,170,171,172,173,174} Allgemein ist zu bemerken, dass es nicht viele literaturbekannte Möglichkeiten zur *C*-Sialylierung gibt.^{175,176,177} Dies mag an der komplexen Struktur der Neuraminsäure und an der Neigung von deren aktivierten Derivaten zur β -Eliminierung liegen. Auch ist der hohe Preis der Neuraminsäure ein limitierender Faktor. Um die SmI₂-*Barbier*¹⁷⁸-Glycosylierung^{179,180} zur Synthese eines *C*-Analogon des Sialyl-T_N-Antigen zu nutzen, wird zunächst ein geeigneter Neuraminsäuredonor und ein Galactosylakzeptor synthetisiert. Die Samarium-Kupplung soll zwischen einem Aldehyd (Galactosylakzeptor) und einem Sulfonyl-Donor stattfinden, was zur Bildung diastereomerer sekundärer Alkohole führt (Abb. 3.2.6.2).

¹⁶⁷ X. Yuan, R. J. Linhardt, *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1393.

¹⁶⁸ Q. Wang, M. Wolff, T. Polat, Y. Du, R. J. Linhardt, *Bioorg. Med. Lett.* **2000**, *10*, 941.

¹⁶⁹ K. C. Nicolaou, S. P. Ellery, J. S. Chen, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2.

¹⁷⁰ J. Namy, J. Collin, C. Bied, H. Kagan, *Synlett.* **1992**, 733.

¹⁷¹ D. Curran, T. Fevig, C. Jasperse, M. Totleben, *Synlett.* **1992**, 943.

¹⁷² G. Molander, J. McKie, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4112.

¹⁷³ P. de Pouilly, A. Chenede, J.-M. Mallet, P. Sinaÿ, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1993**, *130*, 256.

¹⁷⁴ D. Mazeas, T. Skrydstrup, J.-M. Beau, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 909.

¹⁷⁵ H. Paulsen, P. Matschulat, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 487.

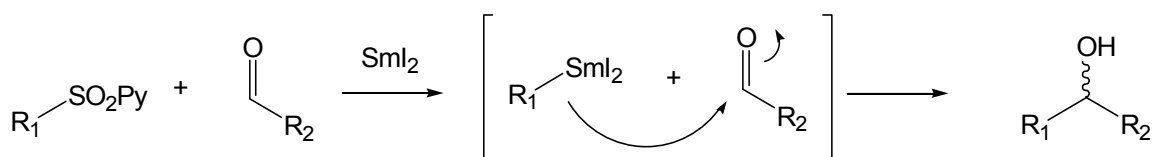
¹⁷⁶ K. Wallimann, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta.* **1991**, *74*, 1520.

¹⁷⁷ J. Nagy, M. Bednarski, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3953.

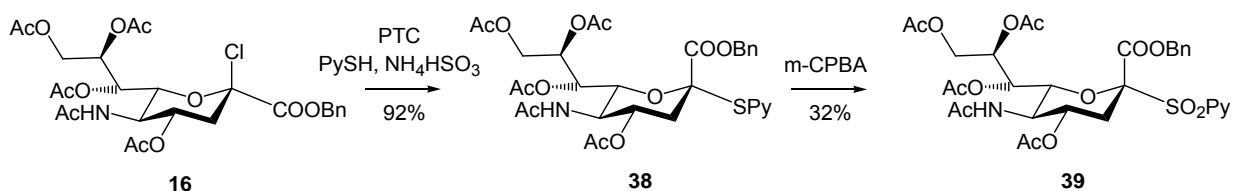
¹⁷⁸ C. Blomberg, *Concepts in Organic Chemistry*, Ed. K. Hafner, *31*, Springer-Verlag, Berlin **1993**.

¹⁷⁹ A. Malapelle, Z. Abdallah, G. Doisneau, J.-M. Beau, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 6016.

¹⁸⁰ I. R. Vlahov, P. I. Vlahov, R. J. Linhardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1480.

Abb. 3.2.6.2: SmI₂-induzierte Barbier-Reaktion

Zur Synthese des Neuraminsäuredonors wird von dem in Kap. 3.2.2 beschriebenen Neuraminsäurechlorid **16** ausgegangen, welches im ersten Schritt eine phasentransferkatalysierte (PTC) Glycosylierung mit Mercaptopyridin zum Thiosialosid **38** eingeht.¹⁸¹ Anschließende Oxidation mit *m*-CPBA liefert das Sulfon **39** in moderaten Ausbeuten (32%).¹³⁶ Für die niedrige Ausbeute der Oxidation ist die β -Eliminierung zum Glycal verantwortlich, die hier in erheblichen Maße eintritt (Abb. 3.2.6.3).

Abb. 3.2.6.3: Synthese des Neuraminsäuredonors **39**

Um nach einer SmI₂-Barbier-Glycosylierung mit dem Neuraminsäuresulfon **39** ein strukturelles Analogon zum ST_N-Antigen zu erhalten, welches eine Ethylen-Brücke enthält, muss der Galactoseakzeptor an der 6-Position um eine Methylene-Gruppe erweitert werden.¹⁸²

Ausgehend von der Isopropyliden-Galactose **26** wird in 6-Position über eine *Garegg-Samuelson*-Reaktion mit Iod eingeführt.¹⁸³ Hierzu wird das Acetonid **26** mit Triphenylphosphin, Imidazol und Iod in Toluol unter Rückfluss erhitzt. Anschließende *Kolbe*-Nitrilsynthese mit NaCN in DMSO liefert das Nitril **41**, welches mit DIBAL-H in Dichlormethan zum Heptosealdehyd **42** in 73%-iger Ausbeute umgesetzt wird (Abb. 3.2.6.4).¹⁸⁴

¹⁸¹ S. Cao, S. Meuneir, F. Andersson, M. Letellier, R. Roy, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 2303.

¹⁸² B. Kuberan, S. A. Sikkander, H. Tomiyama, R. J. Linhardt, *Angew. Chem.* **2003**, 117, 7803.

¹⁸³ P. J. Garegg, B. Samuelsson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1980**, 1, 2866.

¹⁸⁴ S. Hosokawa, M. Isobe, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 37.

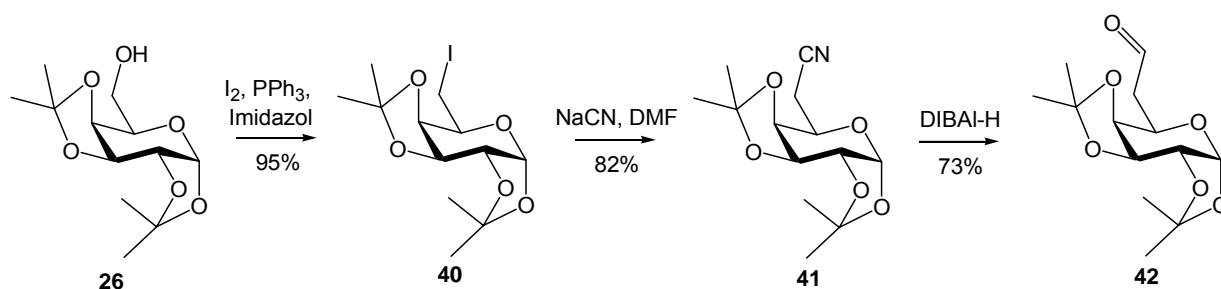
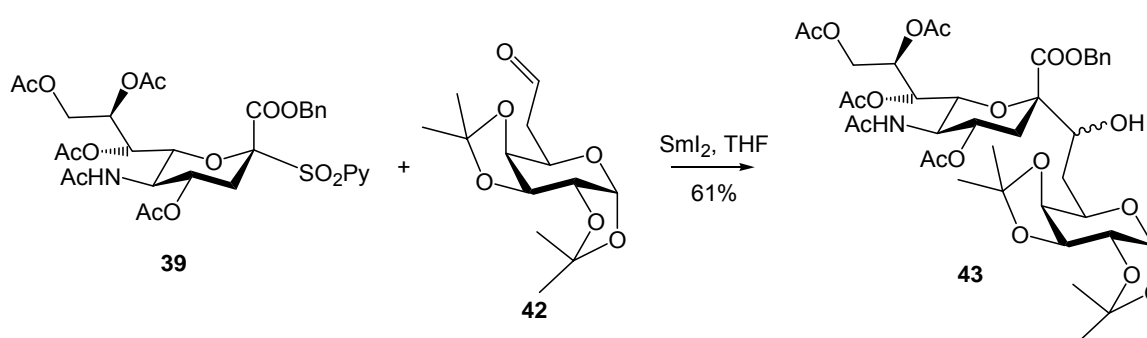


Abb. 3.2.6.4: Synthese des Galactoseakzeptors 42

Der Neuraminsäuredonor **39** und Galactoseakzeptors **42**, werden in THF gelöst und solange mit SmI_2 versetzt, bis die blaue Farbe des Samariums(II) erhalten bleibt. Da Samarium(III) in Lösung farblos ist, entfärbt sich die Lösung anfangs nach jeder Zugabe. Ist die Reaktion beendet, wird Sm(II) nicht mehr oxidiert und eine blaue Färbung bleibt bestehen.¹⁸⁵ Insgesamt wurden bei der Glycosylierung 3.5 Äquivalente Samarium(II)iodid benötigt und das Produkt **43** in 61%-iger Ausbeute isoliert (Abb. 3.2.6.5).

Abb. 3.2.6.5: SmI_2 -induzierte C-Sialylierung

Das entstehende Produkt ist eine 1:1-Mischung der diastereomeren sekundären Alkohole **43**. Die Reduktion dieser sekundären Hydroxyfunktion soll nach der radikalischen *Barton-McCombie* Methode¹⁸⁶ durchgeführt werden. Zunächst wird Alkohol **43** mit Dithiodiimidazol in Toluol unter Mikrowellenbestrahlung verestert, um einen geeigneten Angriffspunkt für den Radikalinitiator AIBN zu erhalten. Anschließend wird mit der Wasserstoffdonorkomponente Tris(trimethylsilyl)silan in Toluol unter AIBN-Zusatz in der Mikrowelle radikalisch hydriert.¹⁸⁷ Das C-glycosidisch verknüpfte Sialyl-T_N-Antigen-Konstrukt **45** wird in 75%-iger Ausbeute isoliert (Abb. 3.2.6.6).

¹⁸⁵ J. F. Espinosa, M. Bruix, O. Jarretton, T. Skydstrup, J. M. Beau, J. J. Barbero, *Chemistry Eur. J.* **1999**, 5, 442.

¹⁸⁶ D. H. P. Barton, G. Bringmann, W. B. Motherwell, *Synthesis* **1980**, 68.

¹⁸⁷ M. Ballestri, C. Chatgililoglu, K. B. Clark, D. Griller, B. Giese, B. Kopping, *J. Org. Chem.* **2001**, 56, 678.

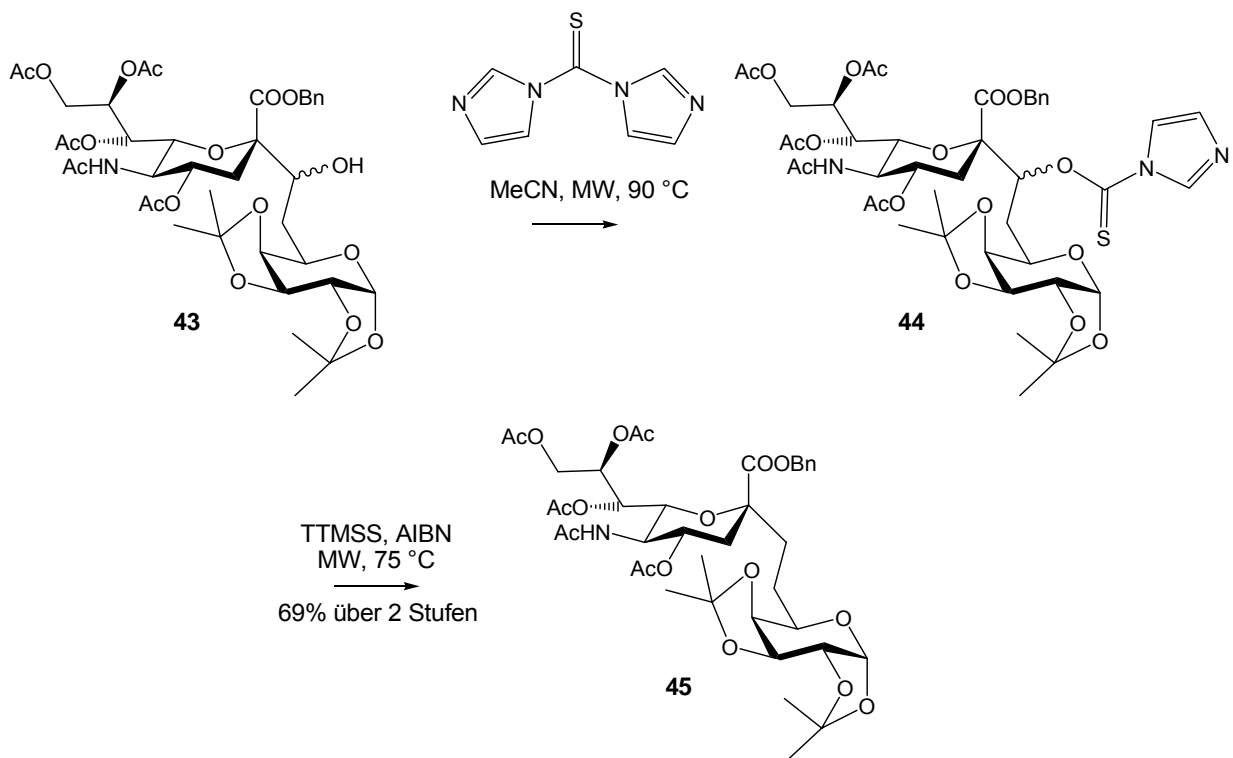


Abb. 3.2.6.6: Reduktion der diastereomeren Alkohole 43 zum Sialyl-T_N-C-Glycosid 45

Die oben beschriebene Methode ermöglicht den Zugang zu ethylenverbrückten Sialosiden, die bei der Entwicklung eines Sialyl-T_N-C-Glycosid-Festphasenbausteins zum Einsatz kommen können.

3.3 Synthese funktionalisierter MUC1-Glycopeptid-Antigene

3.3.1 MUC1-Glycopeptid-Antigene

Als Antigene bezeichnet man Molekülstrukturen, die von den B-Zellen und/oder von den T-Zellen spezifisch erkannt werden.^{188,189} Man unterscheidet den Begriff Antigen (wird vom Immunsystem erkannt) von Immunogen (wird erkannt und bewirkt die Synthese von Antikörpern). Kleine Moleküle sind zwar in der Lage, an einen für sie spezifischen Antikörper zu binden, sie sind jedoch zu klein, um die Bildung eines Antikörpers hervorzurufen.⁴² Ein wirksames Immunogen hat eine Molekularmasse von >10.000 g/mol. Kleine Moleküle, die nur aus sehr wenigen chemischen Gruppen bestehen, nennt man auch *Haptene*. Als Immunogene gelten zumeist hochmolekulare Verbindungen, wie Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide, Lipide oder andere biologische Makromoleküle. Die Spezifität des Antikörpers bezieht sich nur auf eine Teilstruktur des Antigenmoleküls. Diese „funktionelle Gruppe“ des Antigens wird *Epitop* genannt.

Das Mucin MUC1 enthält ein B-Zell-Epitop, welches für die Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen¹⁹ geeignet sein könnte. In der extrazellulären Domäne dieses Membranproteins besteht ein großer Abschnitt aus zahlreichen Wiederholungseinheiten, in denen fünf potentielle *O*-Glycosylierungsstellen liegen (Abb. 3.3.1).

-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr* -Ser* -Ala-Pro-Asp-Thr* -Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser* -Thr* -Ala-Pro-

Abb. 3.3.1: Wiederholungseinheit des MUC1

In epithelialen Tumorzellen ist wegen der starken Überexpression von MUC1 und der durch fehlerhafte Enzymaktivität gebildeten verkürzten Kohlenhydratstrukturen die gesamte Zelloberfläche gravierend verändert. Dieser Tatbestand liefert einen möglichen Ansatz zur Entwicklung von tumorselektiven Impfstoffen. Hierfür müssen die tumorassoziierten MUC1-Glycopeptidantigene vollsynthetisch aufgebaut werden.

¹⁸⁸ H. Kunz, *Pure & Appl. Chem.*, **1993**, 65, 1223.

¹⁸⁹ S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7798.

3.3.2 Peptid- und Glycopeptidfestphasensynthese

Definierte Glycopeptidstrukturen lassen sich durch Isolierung aus biologischen Systemen nur sehr schwer gewinnen. Um jedoch ein funktionierendes Vakzin zu entwickeln, ist die hohe Reinheit und exakte Definition einer Glycopeptidstruktur unabdingbar. Des Weiteren wünscht man sich eine genügend große Menge eines Impfstoffs, so dass die exakte chemische Synthese den einzigen Zugang zu solchen Strukturen bietet.

Zum Aufbau verschiedener Peptidstränge von einer Länge von 2 bis 20 Aminosäuren ist heute die Festphasensynthese nach *Merrifield* der ergiebigste Weg.^{91,190} Die größten Vorteile dieser Strategie liegen in der Geschwindigkeit, da bei der Synthese an einer Polymermatrix nach jedem Syntheszyklus nur abfiltriert und gewaschen werden muss. Herzstück dieser Synthesetechnik ist, dass die Startaminosäure an einem Harz gebunden vorliegt. Im Folgenden wird in iterativen Schritten eine *N*-geschützte Aminosäure an die freie, am Harz befindliche Aminofunktion gekuppelt. Der neu entstehende *N*-Terminus wird dann von seiner temporären Schutzgruppe befreit und mit der nächsten Aminosäure verknüpft. Durch diesen automatisierbaren Syntheszyklus lassen sich Oligopeptide der Länge 2 – 20 Aminosäuren rein und in angemessener Zeit herstellen.

Wie in Abbildung 3.3.2.1 zu erkennen ist, spielt die Blockierung und Deblockierung des *N*-Terminus eine entscheidende Rolle in der Festphasensynthese. Diesen Anforderungen werden nur wenige Schutzgruppen gerecht. In der automatisierten Synthese werden hauptsächlich zwei Verfahren angewandt, zum einen die *Boc*-Strategie und zum anderen die *Fmoc*-Strategie. Bei der *Boc*-Festphasensynthese kommt die säurelabile *tert*-Butyloxycarbonyl-(*Boc*)Gruppe^{191,192} als temporäre Aminoschutzgruppe zur Anwendung. Sie wird mittels 20-50%-iger Trifluoressigsäure abgespalten. Größter Nachteil dieser Vorgehensweise, im Hinblick auf die Glycopeptidfestphasensynthese ist, dass viele glycosidische Bindungen und auch einige Seitenkettenschutzgruppen polyfunktioneller Aminosäuren unter diesen sauren Bedingungen instabil sind.¹⁹³ Diese Nachteile führten dazu, dass sich die Synthese nach der *Fmoc*-Strategie^{194,195} durchgesetzt hat.

¹⁹⁰ G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 161.

¹⁹¹ F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4686.

¹⁹² G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 6180.

¹⁹³ A. J. Mort, D. T. Lampion, *Anal. Biochem.* **1977**, 82, 289.

¹⁹⁴ C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, 11, 246.

¹⁹⁵ J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. D. Chang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, 13, 35.

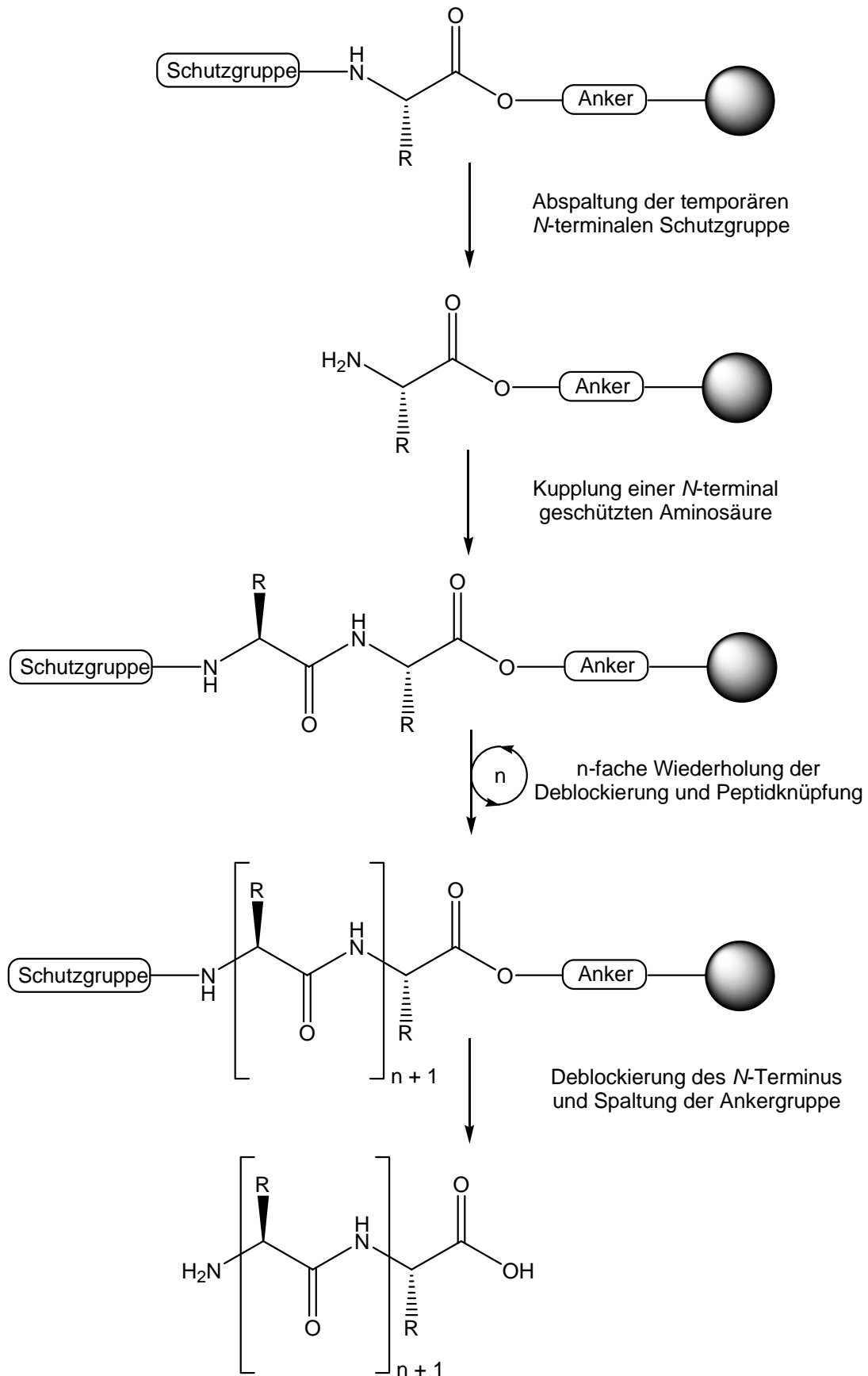


Abb. 3.3.2.1: Prinzip der sequentiellen Festphasenpeptidsynthese

Die basenlabile Fluorenylmethoxycarbonyl-(*Fmoc*)Gruppe^{92,196,197} ist sehr geeignet gerade für die Synthese komplexer Glycopeptidpitope, wenn man darauf achtet, dass keine baseninduzierte β -Eliminierung an *O*-Glycopeptiden eintritt. Ihre Spaltung erfolgt unter der Einwirkung von Basen wie Piperidin⁹⁵ oder Morpholin.¹⁹⁸ Nach der *Fmoc*-Methodik kann somit gewährleistet werden, dass die glycosidischen Bindungen und die durch säurelabile Schutzgruppen wie z.B. *tert*-Butyl-, Trityl- oder 2,2,5,7,8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonyl-Gruppe (*Pmc*) geschützten Seitenkettenfunktionen nicht angegriffen werden. Im Allgemeinen ist bei der Synthesepanung darauf zu achten, dass eine geeignete orthogonale Schutzgruppenstrategie¹⁹⁹ angewandt wird. Des Weiteren ist die Wahl des Ankersystems⁹⁶ von entscheidender Bedeutung. Nach erfolgter Festphasensynthese muss das Peptid vom polymeren Träger abgespalten werden. Dies sollte unter möglichst milden Reaktionsbedingungen geschehen, um die Amid- und Glycosid-Bindungen nicht zu gefährden und, falls gewünscht, die Schutzgruppen erhalten bleiben. Es gibt heute eine Vielzahl von Ankersystemen. Die wichtigsten von ihnen, die auch in der Peptidsynthese nach der *Fmoc*-Methode zum Einsatz kommen, werden im Folgenden besprochen.

Die am häufigsten verwendeten Anker sind die säurelabilen Anker. Sie haben den Vorteil, dass durch die sauren Abspaltungsbedingungen gleichzeitig auch säurelabile Seitenkettenschutzgruppen simultan abgespalten und so zusätzliche Syntheseschritte eingespart werden können. Ist dies unerwünscht, verursacht die Abspaltung unter Umständen Probleme. Die bekanntesten Vertreter dieser Ankerklasse sind: Merrifield-Harz, Wang-Harz,¹⁰⁰ SASRIN-Harz,²⁰⁰ Rink-Ester-Harz²⁰¹ und Trityl-Harz⁹⁸ (Abb. 3.3.2.2).

¹⁹⁶ L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3404.

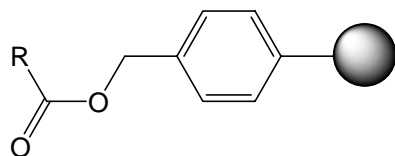
¹⁹⁷ L. A. Carpino, *Acc. Chem. Res.* **1987**, 20, 401.

¹⁹⁸ P. Schufheiss-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 64.

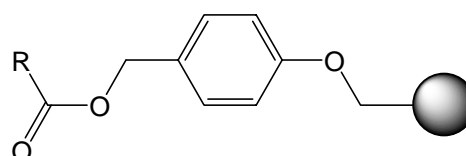
¹⁹⁹ T. W. Greene, P. G. Wuts, *Protective groups in organic synthesis*; 3rd ed.; Wiley: New York, **1999**.

²⁰⁰ M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4005.

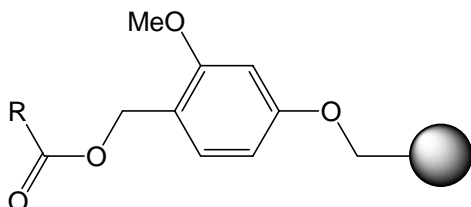
²⁰¹ H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1145.



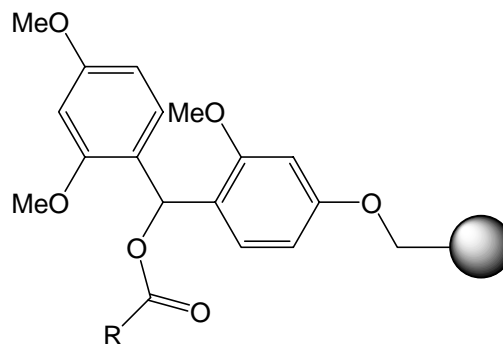
Merrifield-Harz: Spaltbar mit HF



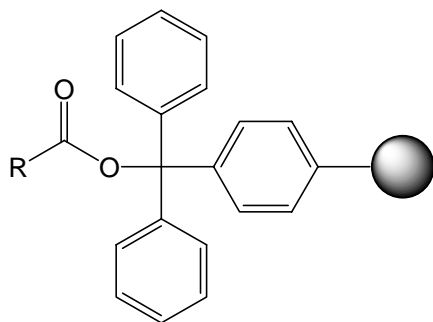
Wang-Harz: Spaltbar mit 50-90%iger TFA



SASRIN-Harz: Spaltbar mit 1%iger TFA



Rink-Harz: Spaltbar mit AcOH/DCM (1:9)



Trityl-Harz: Spaltbar mit TFA

Abb. 3.3.2.2: Säurelabile Ankersysteme

Das Pendant zu den säurelabilen Anker sind die basenlabilen Anker, welche die zweite Gruppe der bedeutenden Ankersysteme darstellt. Die klassischen basenlabilen Anker, wie der HMBA-Linker²⁰² oder der *Kaiser-Oxim-Linker*²⁰³ sind allerdings aufgrund ihrer zu drastischen Abspaltbedingungen nicht für die Synthese komplexer Peptidsequenzen geeignet, da Nebenreaktionen, wie Racemisierung und Aspartimidbildung, vermehrt auftreten (Abb. 3.3.2.3).

²⁰² R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, 20, 451.

²⁰³ W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1295.

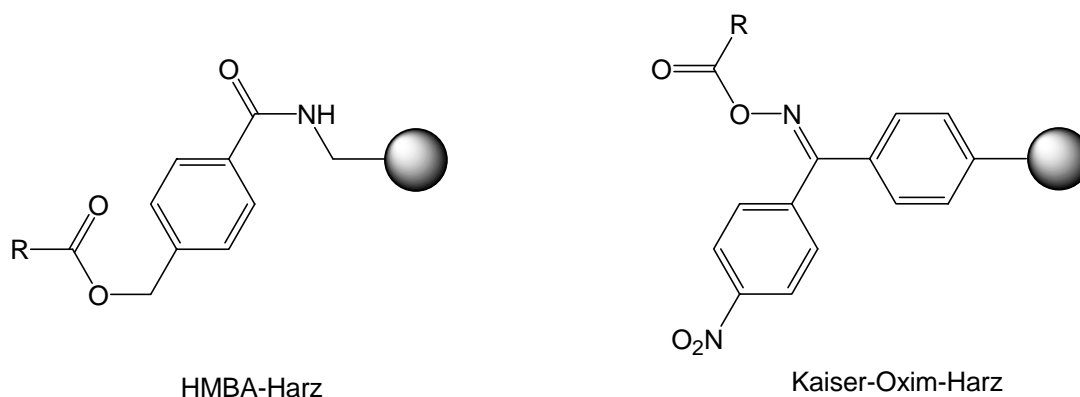


Abb. 3.3.2.3: Basenlabile Ankersysteme

Allerdings existiert eine kleine Gruppe von basenlabilen Ankersystemen, die unter Zusatz eines geeigneten Nucleophils gespalten werden können. Eine Spaltung unter nahezu neutralen Bedingungen gelingt in der Praxis mit Hilfe von fluoridlabilen Silylankersystemen. Eine solche Abspaltung ist für die Synthese vollständig blockierter komplexer Glycopeptide von Interesse. Die gängigsten Harze sind die Silylanker nach *Barany*²⁰⁴, *Ramage*²⁰⁵, *Chao*²⁰⁶ und *Kunz*.²⁰⁷ Hierbei sind die Silyllinkersysteme von *Barany*, *Ramage* und *Chao* in der Regel mit Tetrabutylammoniumfluorid-trihydrat in DMF oder THF spaltbar. Fluorid in diesen Lösungsmittelkombinationen ist allerdings deutlich basisch, so dass die bekannten, oben erwähnten Nebenreaktionen auftreten. Der Silylethyllinker nach *Kunz* hingegen wird mit Fluorid im Lösungsmittel Dichlormethan gespalten. Unter diesen relativ neutralen Bedingungen können basisch induzierte Nebenreaktionen vermieden werden (Abb. 3.3.2.4).

²⁰⁴ D. G. Mullen, G. Barany, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 491.

²⁰⁵ R. Ramage, C. A. Barron, S. Bielecki, D. W. Thomas, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 4105.

²⁰⁶ H.-G. Chao, M. S. Bernatowicz, P. D. Reiss, C. E. Klimas, G. R. Matsudea, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1746.

²⁰⁷ M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 315.

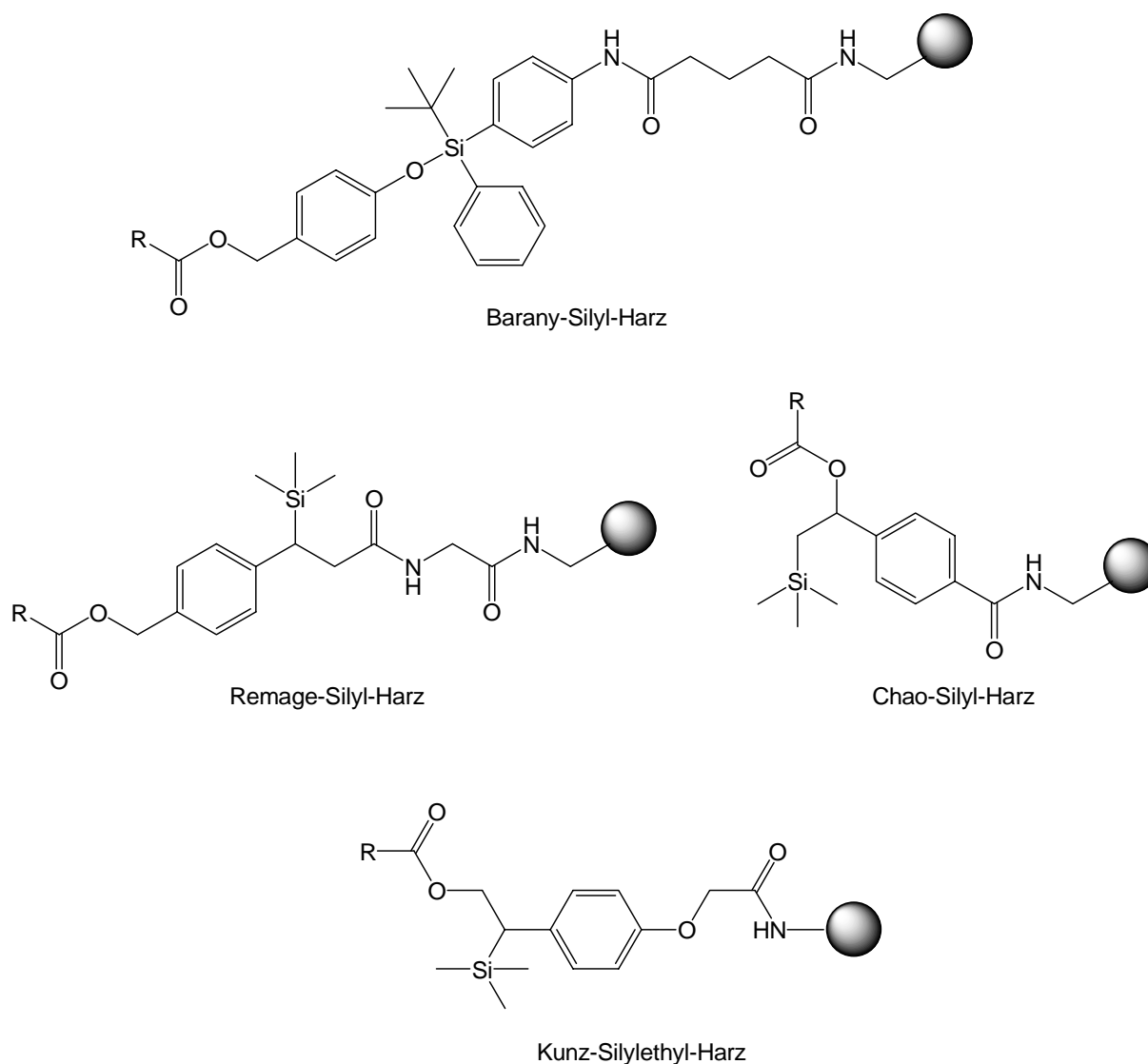


Abb. 3.3.2.4: Silyl-Ankersysteme

Zur in situ-Aktivierung der Aminosäurebausteine für die Kupplungsreaktionen gibt es viele Kupplungsreagenzien^{208,209}. Am häufigsten verwendet werden heute die Uroniumsalze *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU),²¹⁰ *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)^{211,212} und *O*-(Azobenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU),^{213,214}

²⁰⁸ S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447.

²⁰⁹ F. Albericio, R. Chinchilla, D. J. Dodsworth, C. Najera, *Org. Prep. Proced. Int.* **2001**, *33*, 203.

²¹⁰ R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.

²¹¹ V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269.

²¹² V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, 572.

²¹³ L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201.

²¹⁴ L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279.

sowie die Carbodiimide Dicyclohexylcarbodiimid (DCC),²¹⁵ Diisopropylcarbodiimid (DIC) und *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC)²¹⁶ (Abb. 3.3.2.5).

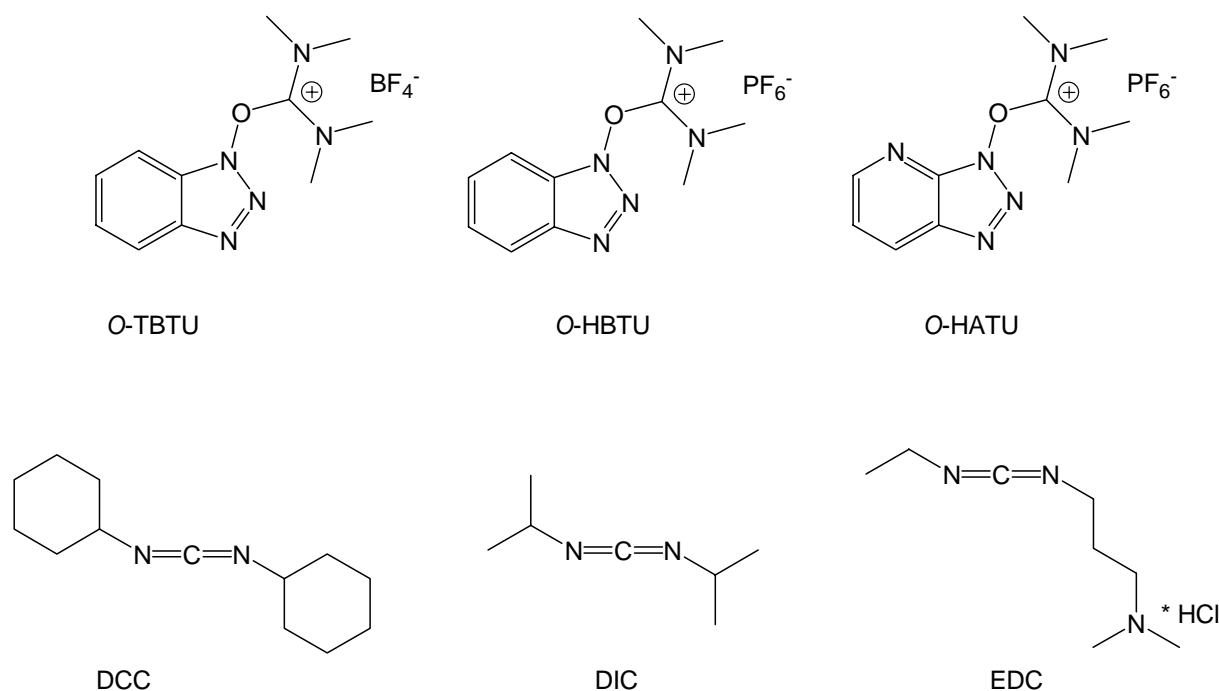


Abb. 3.3.2.5: Kupplungsreagenzien

Die Uroniumsalze haben sich als überlegene Kupplungsreagenzien erwiesen, da sie wesentlich reaktiver sind und mit ihnen in Gegenwart von Additiven die Racemisierung der Peptide besser unterdrückt werden kann. Zur Beschleunigung der Aktivierung mit Uroniumsalzen werden die Additive 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)²¹⁷ bzw. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt)²¹⁸ zugefügt, wodurch neben der Racemisierungsgefahr auch Nebenreaktionen gemindert werden.

Die Festphasenpeptidsynthese von Glycopeptiden erfordert *Fmoc*-geschützte glycosylierte Aminosäurebausteine,²¹⁹ die im Kohlenhydrateil Acetyl- oder Benzyl-Schutzgruppen tragen. Sie können in Kombination mit säurelabilen Ankern oder dem neutral spaltbaren PTMSE-Ankersystem (*Kunz*-Anker) eingesetzt werden. Im Anschluss an die Festphasensynthese müssen die Acetylgruppen basisch verseift und die Benzylgruppen hydrogenolytisch entfernt werden.

²¹⁵ J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067.

²¹⁶ J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2525.

²¹⁷ W. Koenig, R. Geiger, *Chem Ber.* **1970**, 103, 788.

²¹⁸ L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397.

²¹⁹ G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 2839.

3.3.3 Allgemeines Protokoll der Festphasenpeptid- und Glycopeptidsynthese

Unter Verwendung eines *Perkin-Elmer Applied Biosystems ABI 433 A*-Peptidsynthesizers werden automatisiert Peptide und Glycopeptide nach *Fmoc*-Strategie hergestellt. Hierbei kommen mit *Fmoc*-Aminosäuren vorbeladene Tentagel-Harze zur Anwendung. Die Beladungskonzentrationen werden stets relativ niedrig, im Bereich von 0.2-0.25 mmol/g, gewählt, um eventuelle störende gegenseitige Beeinflussungen der wachsenden Peptidstränge zu vermeiden. Bei der Synthese oligofunktionaler Peptide oder Glycopeptide kommt der orthogonalen Schutzgruppenstrategie besondere Bedeutung zu. Zum Schützen der Hydroxyfunktionen von Threonin und Serin wird meist die säurelabile *tert*-Butyl-Schutzgruppe oder die hydrogenolytisch spaltbare Benzylschutzgruppe verwendet. Die Säuregruppierungen der Asparaginsäure und der Glutaminsäure werden ebenfalls mit säurelabilen *tert*-Butyl-Gruppen geschützt. Die Guanidino-Funktion der Arginin-Bausteine werden mit der säurelabilen 2,2,5,7,8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonyl-Gruppe (PMC) geschützt (Abb. 3.3.3.1). Die Hydroxy-Gruppen der Glycopeptidbausteine sind stets mit Acetylgruppen, welche basenkatalytisch entfernt werden können, geschützt.

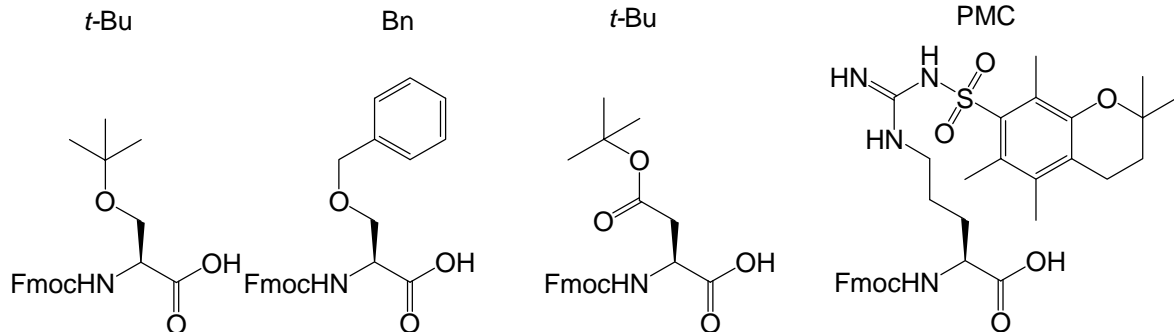


Abb. 3.3.3.1: Sekundäre Schutzgruppen von Serin, Asparaginsäure und Arginin

Wichtiges Werkzeug der Festphasensynthese ist die temporäre *N*-terminale-*Fmoc*-Schutzgruppe, welche basenkatalysiert mit Piperidin in NMP entfernt wird. Das entstehende Dibenzofulven-Piperidin-Addukt wird photometrisch bestimmt, um den Verlauf und die Vollständigkeit des Abspaltungsvorgangs zu kontrollieren (Abb. 3.3.3.2).

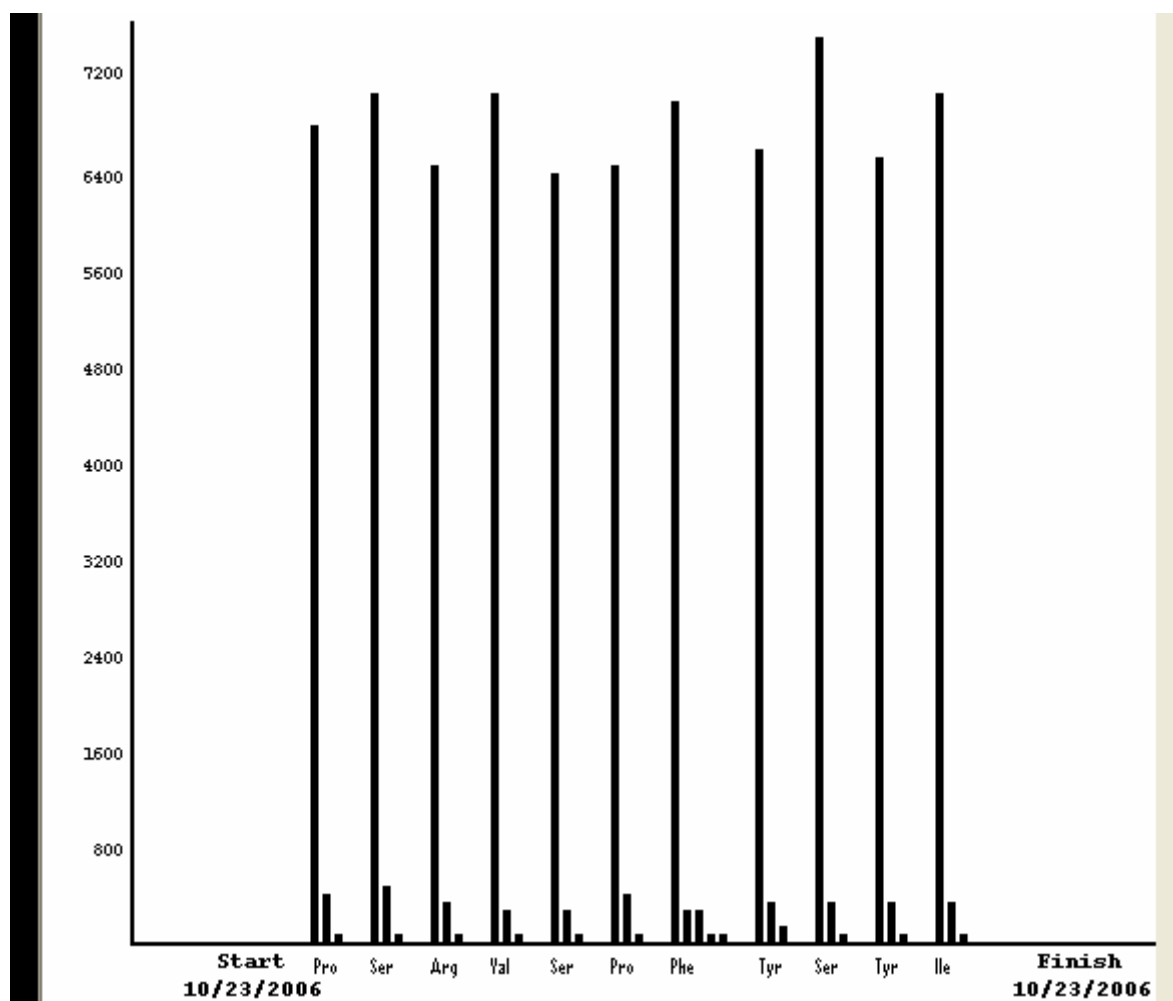


Abb. 3.3.3.2: Abspaltungsprotokoll einer Peptidsynthese

Die einzelnen *Fmoc*-Aminosäurebausteine werden im Peptidsynthesizer vollautomatisiert in iterativen Synthesezyklen miteinander verknüpft. Jeder Zyklus besteht aus drei Teilschritten: Zunächst wird die Aminofunktion durch Abspaltung der temporären *Fmoc*-Schutzgruppe freigelegt. Anschließend wird die Kupplungsreaktion mit 1 mmol (10 Äquiv.) der *Fmoc*-Aminosäuren, den Kupplungsreagenzien HBTU und HOBt sowie 2 mmol *Hünigs* Base über einen Zeitraum von 20-30 min durchgeführt. Im Anschluss an jeden einzelnen Kupplungsschritt werden nicht umgesetzte Aminofunktionen mit dem Capping-Reagenz (Acetanhydrid, *Hünigs* Base und HOBt) acetyliert, um Fehlsequenzen zu vermeiden. Die Kupplungsreaktion der *Fmoc*-Glycopeptid-Bausteine erfolgt halbautomatisch. Dazu wird der Glyco-Baustein mit HOAt^{218,220} und HATU sowie NMM aktiviert, bevor er in den Festphasenreaktor des Synthesizers eingebracht und dort in vier bis fünf Stunden gekuppelt wird.

²²⁰ L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2460.

Sind die Aminosäuresequenzen am polymeren Träger aufgebaut, wird das Harz in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt und manuell vom Harz gespalten.

3.3.4 Synthese von Amino-funktionalisierten MUC1-Glycopeptid-Antigenen

Zur Entwicklung von synthetischen Antitumorvakzinen auf MUC1-Basis ist neben der erfolgreichen Synthese der Glycopeptide, auch deren Funktionalisierung für spätere Konjugationen mit Trägerproteinen oder anderen immunstimulierenden Substanzen notwendig. Die Festphasensynthese von mucinartigen Glycopeptiden ist aufgrund der gestreckten Konformation der Mucine meist erfolgreich. So können Peptidstränge von über 20 Aminosäuren in sehr guten Ausbeuten erhalten werden. Um allerdings Glycopeptide im weiteren Syntheseverlauf chemoselektiv an andere Epitope zu binden, müssen geeignete Funktionalisierungen vorgenommen werden. Diese funktionellen Gruppen sollen über eine nicht immunogene Oligoethylenglycol-Einheit mit dem Glycopeptid-Hapten verbunden sein. Oligoethylenglycol-Spacer haben sich als Abstandhalter bei der Vakzinsynthese durchgesetzt.^{109,110} Sie sind nicht immunogen und beeinflussen die Konformation von Peptiden oder Glycopeptiden nicht. Des Weiteren schaffen Sie den nötigen Abstand zwischen zwei Immunepitopen, so dass diese unabhängig voneinander ihre zugewiesene Aufgabe bei Immunisierungen wahrnehmen können.

Die naheliegendste Funktionalisierung solcher Oligoethylenglycol-Spacer repräsentiert die des freienamins am Ende. Das freie Amin ermöglicht das Knüpfen einer Amid-Bindung, die unter anderem auch zur Weiterführung einer Peptidsynthese führen könnte. Ein solches Spacermolekül kann auch als Fmoc-Carbamat eingesetzt werden, dies ermöglicht die Verfolgung des Syntheseverlaufs von Spacerkupplungen am Peptidsynthesizer durch photometrische Bestimmung des Benzofulven-Piperidin-Addukts.

3.3.4.1 Synthese eines Fmoc-funktionalisierten Triethylenglycol-Abstandhalters

Spacermoleküle werden in der Synthese biologisch relevanter Glycopeptidkonjugate als Abstandhalter verwendet, um die charakteristische Konformation des jeweiligen Epitops zu erhalten. In späteren Synthesen sollen diese Spacer zwischen einem MUC1-Glycopeptid und Immunostimulanzien für die nötige Distanz sorgen. In Anlehnung an die bekannte Synthese

soll der Triethylglycolspacer^{221,222,112,114} als Aminosäureanalogon in der Festphasenpeptidsynthese zum Einsatz kommen.

Die Synthese des als *Fmoc*-Carbamat funktionalisierten Spacermoleküls zum direkten Einsatz in der Festphasensynthese nach *Fmoc*-Strategie beginnt mit einer Hetero-Michael-Addition, in welcher Triethylglycol (46) mit Acrylsäure-*tert*-butylester (47) in Tetrahydrofuran zum 12-Hydroxy-4,7,9-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (48) reagiert. Im weiteren Syntheseverlauf wird die Hydroxyfunktion von 48 mit Mesylchlorid und Triethylamin in Dichlormethan zunächst mesyliert, bevor mit Natriumazid nucleophil substituiert und so der 12-Azido-4,7,9-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (50) erhalten wird. Um aus 50 einen für die Festphasenpeptidsynthese nach der *Fmoc*-Strategie geeigneten Spacer zu erhalten, muss die Azidfunktion zum Amin reduziert und mit der *Fmoc*-Schutzgruppe versehen werden. Die Reduktion von 50 zum 12-Amino-4,7,9-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (51) wird mit Wasserstoff über Raney-Nickel durchgeführt. Im Anschluss erfolgt die Umsetzung mit *Fmoc*-OSu in Aceton/Wasser (1:1) zum geschützten Spacerbaustein 52. Im letzten Syntheseschritt wird der *tert*-Butylester acidolytisch in Trifluoressigsäure und Anisol (10:1) gespalten. Die so erhaltene *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,9-dioxa-nonansäure (53) kann direkt in der Festphasensynthese eingesetzt werden und ermöglicht den linearen Aufbau von mehreren immunologisch separierten Peptidepitopen (Abb. 3.3.4.1).

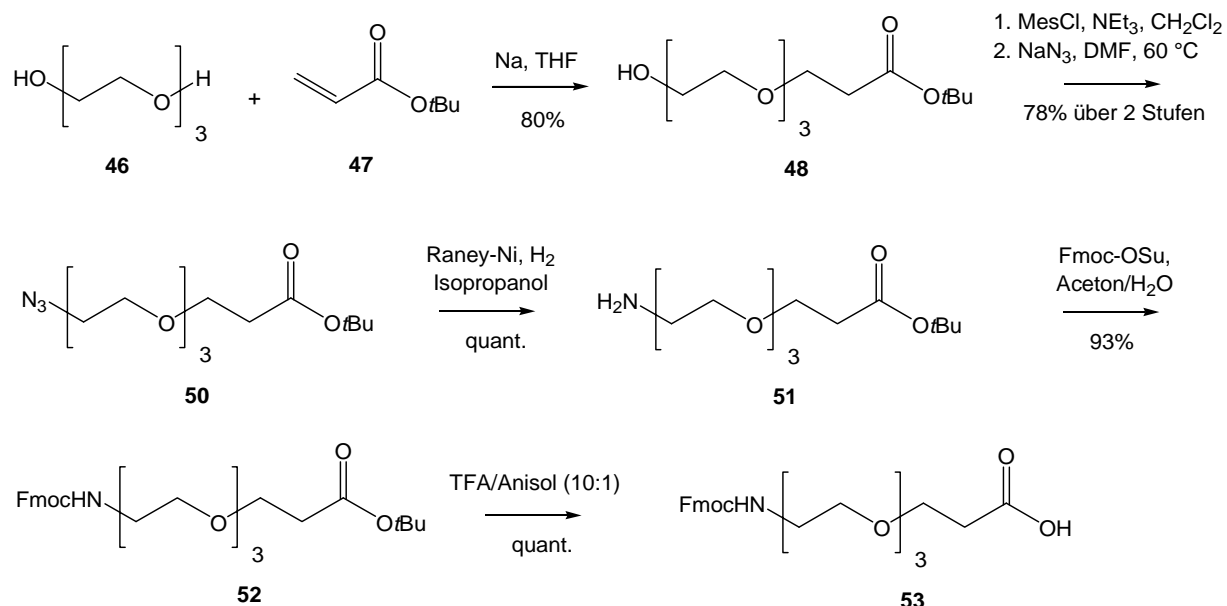


Abb. 3.3.4.1: Synthese des Triethylglycolspacers 53

²²¹ O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 813.

²²² O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 901.

3.3.4.2 Synthese von Amino-funktionalisierten MUC1-Eicosaglycopeptiden

Als Ausgangssubstanzen zur Vakzinsynthese und als Vergleichssubstanzen für spätere immunologische Studien werden Glycopeptide aus der *Tandem-Repeat*-Sequenz des epithelialen Mucins MUC1 mit den verschiedenen tumorassoziierten Saccharideinheiten synthetisiert. Um einen internen Standard zu schaffen, wird ausschließlich an Stelle des Threonins⁶ der vollständigen *Tandem-Repeat*-Domäne des MUC1 die glycosylierte Aminosäure eingebaut. Dieser Standard soll in immunologischen Studien ermöglichen, Aussagen über die Rolle des Saccharidteils zu treffen.

Zur Synthese wird ein mit *Fmoc*-Prolin vorbeladenes Trityl-Tentagel-Harz (**54**) als polymerer Träger eingesetzt. Die Verwendung des acidolytisch spaltbaren Trityl-Ankers ermöglicht die simultane Abspaltung aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen sowie das Ablösen des Glycopeptids vom Harz.⁶⁰ Aufgrund des hohen sterischen Anspruchs des Trityl-Linkers wird die Diketopiperazinbildung vollständig unterbunden. Die Synthese der ersten 13 Aminosäuren erfolgt nach dem Standardprotokoll durch schrittweise Kupplung der Aminosäuren. Zunächst wird die *Fmoc*-Gruppe durch 20%iges Piperidin in DMF abgespalten. Der Amino-Terminus wird einer Kupplung unter Verwendung der Reagenzienkombination HBTU/HOBt/DIPEA in DMF unterzogen. Nach erfolgter Kondensation wird eventuell verbliebenes freies Amin mit Capping-Reagenz (kat. HOBt/Ac₂O/DIPEA in NMP) acetyliert, um dann den nächsten Synthesecyclus anzuschließen. Nach Entfernung der *Fmoc*-Gruppe an Serin¹⁴ werden die glycosylierten Aminosäurebausteine **11a**, **22a**, **25**, **34** und **37** mit den reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt/NMM in NMP binnen fünf Stunden Vortex-Schütteln semiautomatisch gekuppelt. Die anschließenden Kupplungen der verbliebenen fünf Aminosäuren und des Spacermoleküls **53** werden vollautomatisch durchgeführt. Simultane Abspaltung vom Harz und der Seitenkettenschutzgruppen liefert nach präparativer HPLC-Reinigung die amino-funktionalisierten Glycopeptide **55**, **57**, **60**, **62**, **65** in 16-28%-iger Gesamtausbeute bezogen auf **54** (Abb. 3.3.4.2.1).

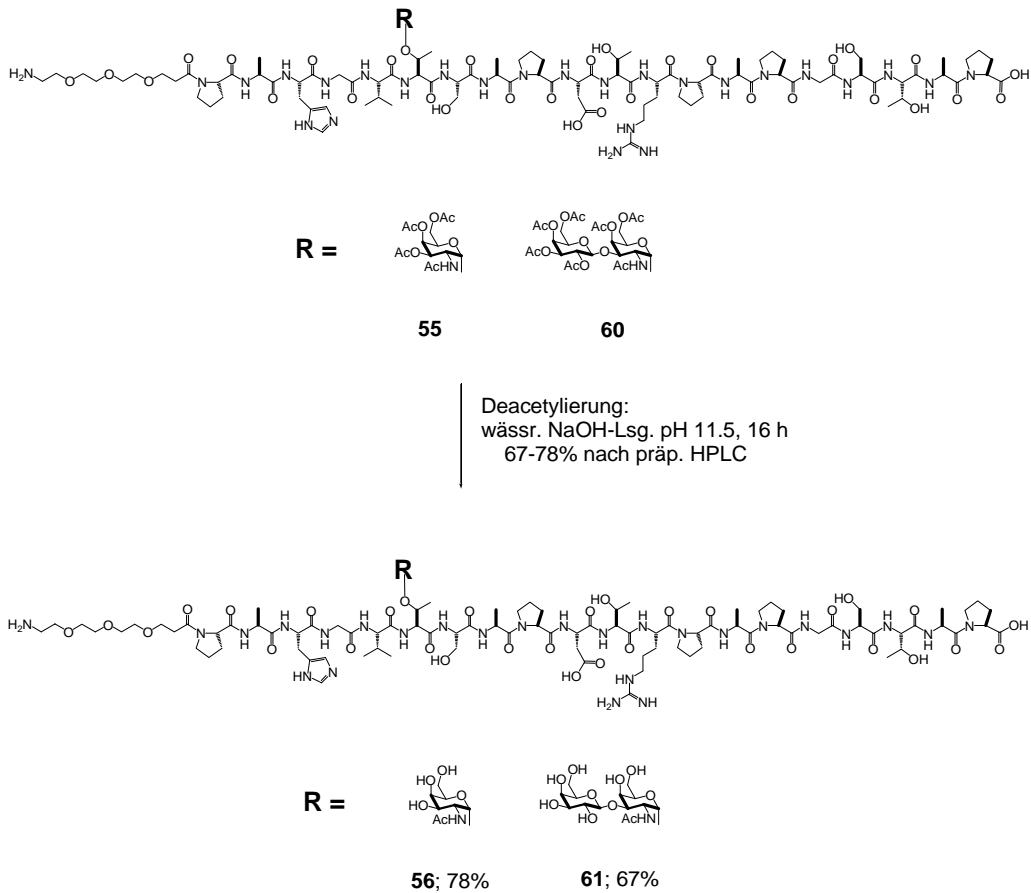


Abb. 3.3.4.2.2: Deacetylierung von 55 und 60 zu 56 und 61

Bei den Glycopeptiden, die sialylierte Antigene **57**, **62**, **65** tragen, müssen zunächst die Benzyl-Ester und -Ether hydrogenolytisch entfernt werden, bevor deacetyliert wird. Eine umgekehrte Reihenfolge würde zu Lösungsproblemen im Medium Methanol führen in welchem die Benzyl-Hydrogenolyse gewöhnlich durchgeführt wird. Bei der Deacetylierung mit Methanol/NaOMe an dieser Stelle, würde der Benzylester der Neuraminsäure in den Methylester überführt werden. Die Glycopeptide **57**, **62**, **65** werden in Methanol gelöst und anschließend mit Palladium auf Aktivkohle in Wasserstoffatmosphäre hydriert. Alternativ kann man auch nach Lösen in Methanol mit Palladiumacetat versetzen und hydrieren.²²³ Das frisch gefällte Palladium ist äußerst aktiv und ermöglicht die vollständige (HPLC-Reaktionskontrolle) Hydrogenolyse in nur drei Stunden. Nach erfolgter Hydrierung kann nach der oben beschriebenen Methode mit wässriger NaOH deacetyliert werden. Im Falle des 2,3-Sialyl-T-Antigens nimmt die Deacetylierung drei Tage in Anspruch, da die Acetylfunktion der 4-Position der Galactose sterisch stark gehindert ist.¹¹² Bei dieser ausgedehnten Reaktionszeit kommt es zur teilweisen Deglycosylierung durch β -Eliminierung.

²²³ T. Gutjahr, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2008**.

Allerdings lassen sich die dadurch gebildeten Peptide leicht von der Zielsubstanz trennen. So können die deblockierten sialylierten Glycopeptide **59**, **64**, **67** in Ausbeuten von 40-73% nach präparativer RP-HPLC erhalten werden (Abb. 3.3.4.2.3).

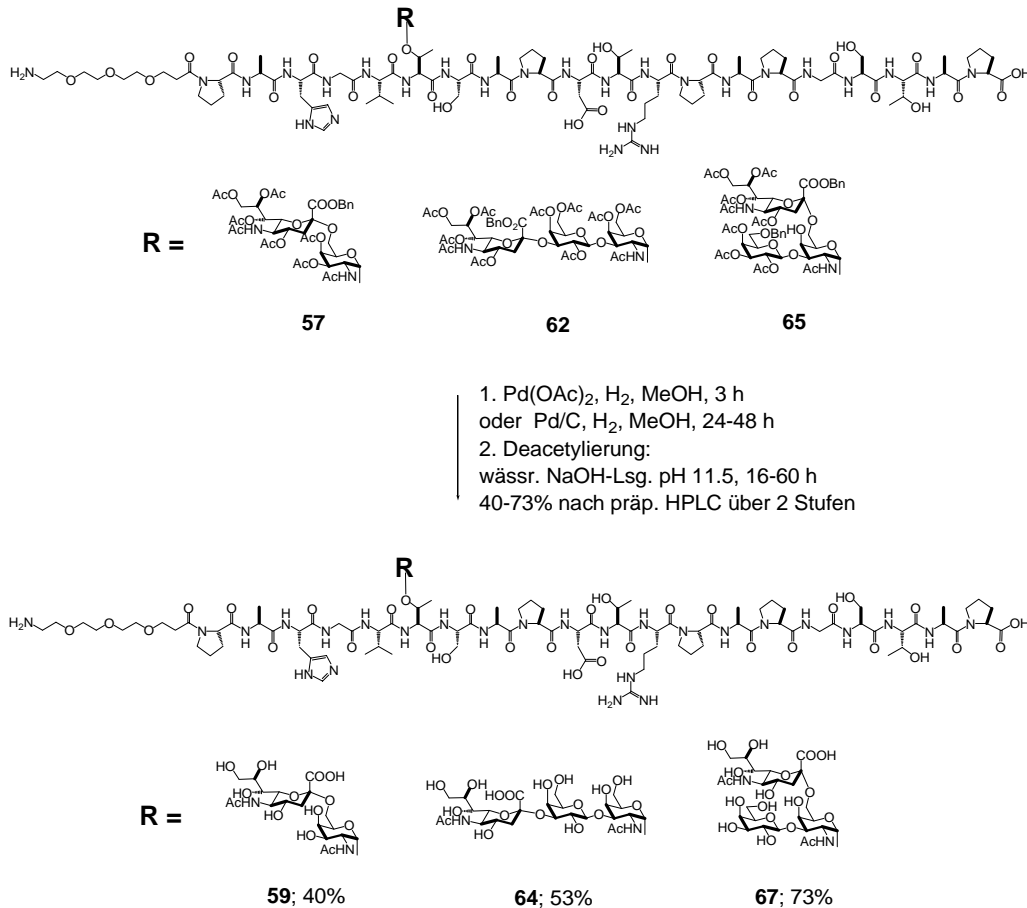


Abb. 3.3.4.2.3: Deblockierung von 57, 62 und 65 zu 59, 64 und 67

Die exakten Strukturen der amino-funktionalisierten Glycopeptide konnten mittels ESI-MS, MALDI-TOF Massenspektrometrie und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie eindeutig belegt werden. Die synthetisierten Glycopeptide können als Testsubstanzen in immunologischen Studien und für die Gewinnung von Vakzinen eingesetzt werden.

3.3.5 Geplante Synthese von Thiol-funktionalisierten MUC1-Glycopeptid-Antigenen

Für synthetische Antitumorvakzine ist die immunkompatible Thioether-Funktionalisierung für spätere Konjugationen an Trägerproteine oder andere immunstimulierende Komponenten eine attraktive Variante. Freie Thiol-Gruppen können chemoselektiv in Wasser an Doppelbindungen gekuppelt werden. Diese Radikalreaktion kann durch Licht geeigneter

Wellenlänge gestartet werden. Sie wurde bei der Anbindung von Glycopeptiden an BSA schon erfolgreich demonstriert (Abb. 3.3.4.2.3).^{224,114,115}

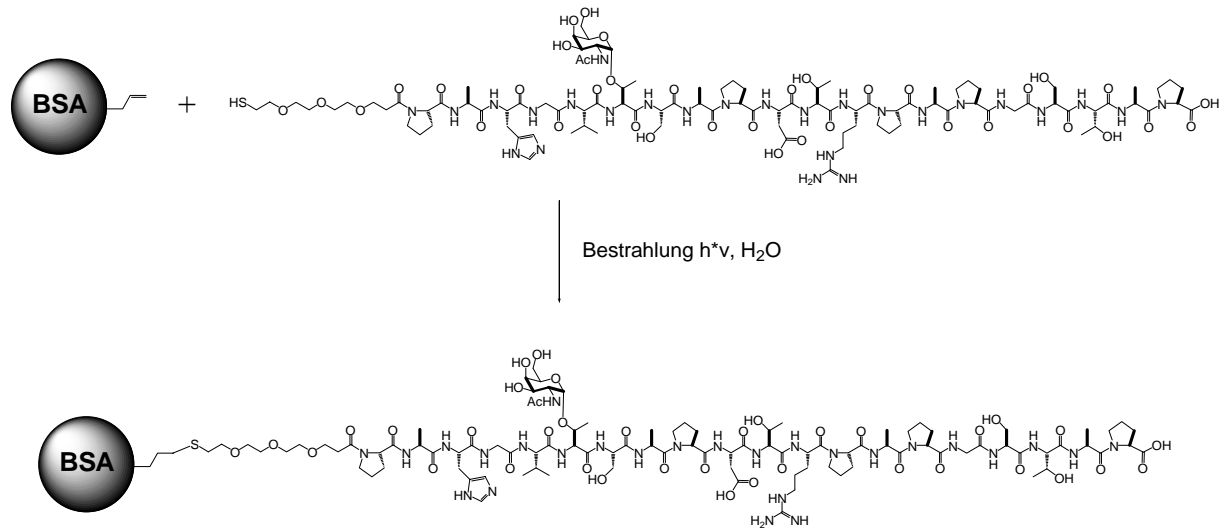


Abb. 3.3.4.2.3: Thiol-En-Anbindung von Glycopeptiden an Proteine

Um diese immunkompatible Verlinkung durchzuführen, sollen als Thiol funktionalisierte Glycopeptide synthetisiert werden. Die geschützte Thiol-Gruppe soll analog zur Amino-Gruppe über einen Oligoethylenglycol-Spacer an das Glycopeptid gebunden sein. Da freie Thiole äußerst oxidationsempfindlich sind, müssen sie orthogonal zu den Schutzgruppen in der Glycopeptidsynthese geschützt werden. Hierbei hat sich die Verwendung einer Acetylgruppe bewährt, da sie bei der abschließenden Deacetylierung der Zucker-OH Gruppen simultan mit abgespalten wird.¹¹⁴

3.3.5.1 Synthese eines Thioacetyl-funktionalisierten Triethylglycol-Abstandhalters

Um Mercapto-Glycopeptide darzustellen, muss zunächst ein flexibler, hydrophiler Ethylenglycol-Spacer synthetisiert werden, der am C-Terminus eine freie Carboxyl-Gruppe trägt.

Der bereits beschriebene Hydroxy-4,7,9-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester **48** wird mit Mesylchlorid mesyliert. Mit Cäsiumthioacetat wird die Thioacetyl-Gruppe zu 12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**68**) eingeführt. Die Acetylschutzgruppe an der Thiol-Position ist orthogonal stabil zur Schutzgruppenstrategie der Glycopeptidfestphasensynthese nach dem Trityl-Anker-Protokoll. Die acidolytische Spaltung

²²⁴ S. Wittrock, T. Becker, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5319.

des *tert*-Butylesters liefert 12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure (**69**) nach drei Stufen in einer Gesamtausbeute von 71% (Abb. 3.3.5.1).

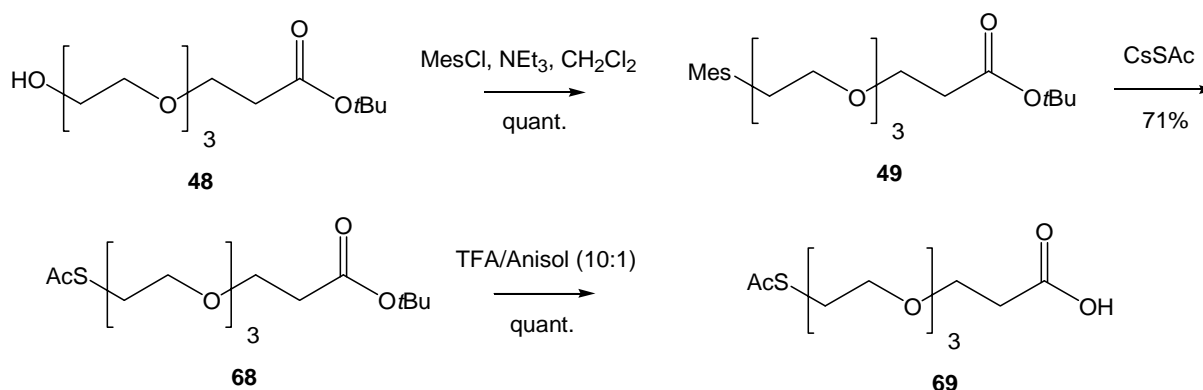


Abb. 3.3.5.1: Synthese des Thioacetyl-triethylglycolspacers **69**

3.3.5.2 Versuch der Synthese von Thiol-funktionalisierten sialylierten MUC1-Glycopeptiden

Es sollen durch automatisierte Festphasenpeptidsynthese Thiol-funktionalisierte Glycopeptide synthetisiert werden, die nach Freilegung der Thiol-Gruppe chemoselektiv an mit Doppelbindungen versehene immunstimulierende Substanzen gebunden werden können. Die Glycopeptide sollen aus der vollständigen *Tandem-Repeat*-Sequenz des epithelialen Mucin MUC1 bestehen und die sialylierten tumorassoziierten 2,3-, 2,6-Sialyl-T- und Sialyl-T_N-Antigene tragen.

Die Synthese beginnt mit einem mit *Fmoc*-Prolin vorbeladenen Tentagel-Harz **54** nach dem Trityl-Protokoll. Die Kupplung der ersten 13 Aminosäuren erfolgt nach Standardprotokoll der Festphasensynthese. Nach Entfernung der *Fmoc*-Gruppe an Serin¹⁴ werden die glycosylierten Aminosäurebausteine **34**, **37** und **22a** mit den Kupplungsreagenzien HATU/HOAt halbautomatisch angebunden. Die anschließenden Kupplungen der restlichen fünf Aminosäuren und des Spacermoleküls **69** werden vollautomatisch durchgeführt. Abspaltung vom Harz bei gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen führt zu den Thioacetyl-funktionalisierten Glycopeptiden **70**, **73** und **76** in 36-60%-iger Ausbeute nach präparativer HPLC-Reinigung (Abb. 3.3.5.2.1).

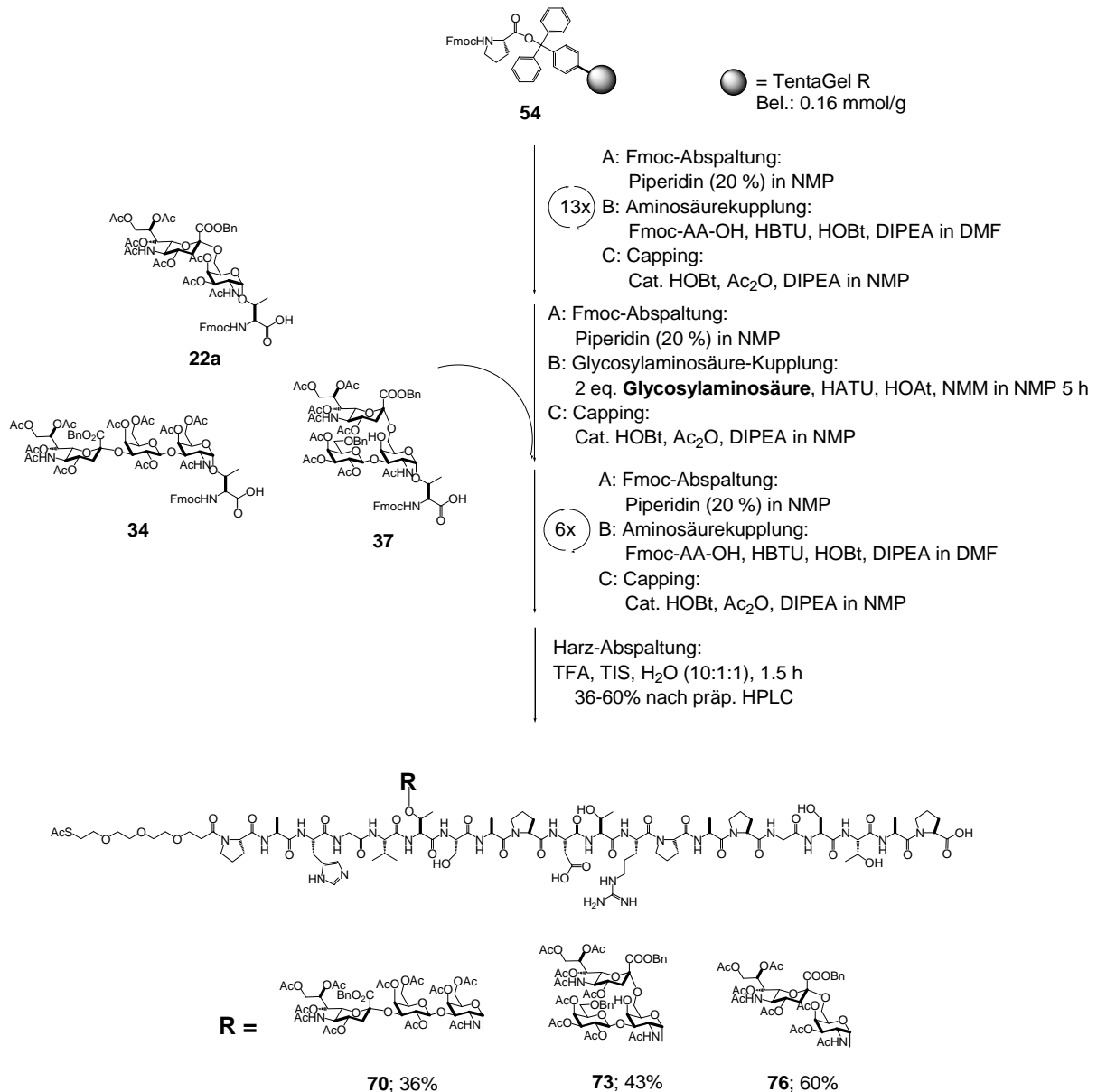


Abb. 3.3.5.2.1: Festphasenglycopeptidsynthese von 70, 73 und 76

Zum Deblockieren der Kohlenhydrat-Funktionen müssen zunächst hydrogenolytisch die Benzyl-Ester und -Ether entfernt werden. Die blockierten Glycopeptide **70**, **73** und **76** werden in Methanol gelöst und mit Palladium auf Aktivkohle in Wasserstoffatmosphäre hydriert. Nach 4-stündiger Hydrogenolyse zeichnet sich die Bildung einer Hauptkomponente im HPLC-Chromatogramm ab. Nach 24 Stunden zeigt das Chromatogramm ein Produkt an, welches isoliert und charakterisiert wurde. Jedoch entstanden unter diesen hydrogenolytischen Reaktionsbedingungen nicht die gewünschten Thioacetyl-funktionalisierten Glycopeptid Antigene, sondern in Methylgruppen endende Glycopeptide **71**, **74** (Abb. 3.3.5.2.2).

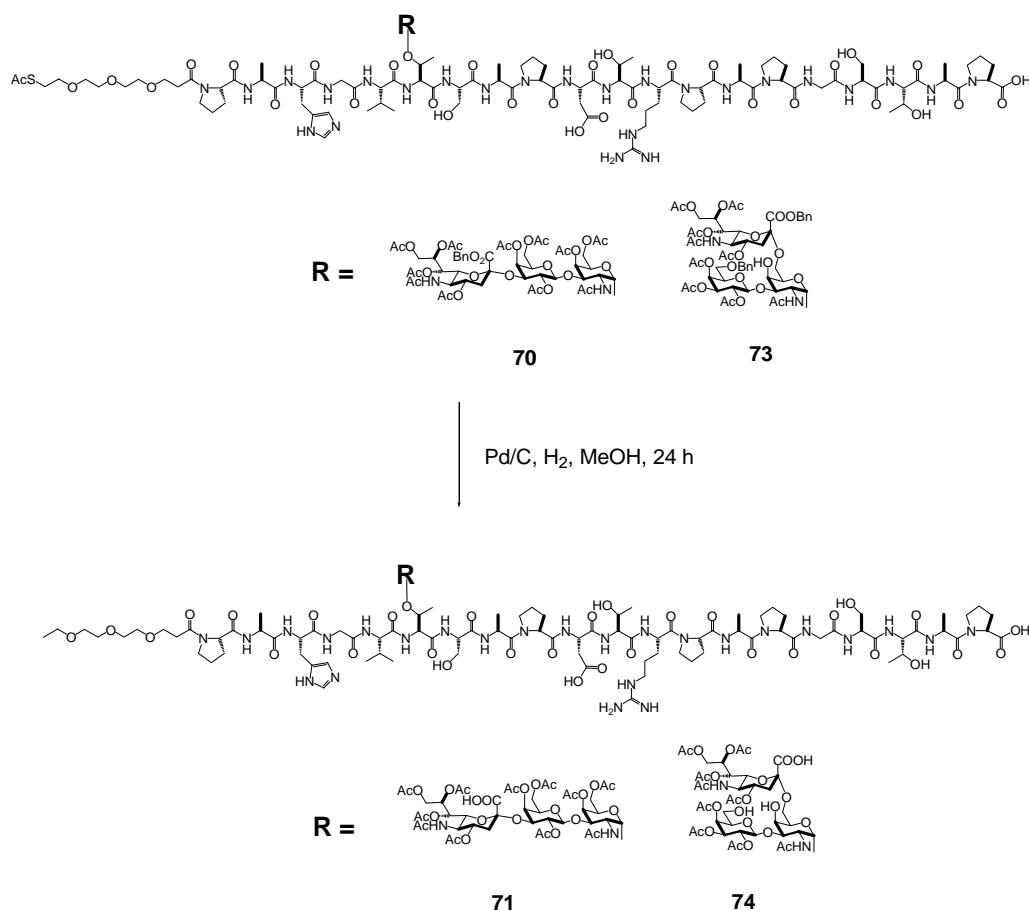


Abb. 3.3.5.2.2: Hydrogenolyse von 70 und 73

Dieser Befund zeigt an, dass die Thioacetylgruppierung bei der von Palladium katalysierten Hydrierung ebenfalls reaktiv entfernt wird. Mehrere Versuche, die Thioacetylgruppe durch Variation des Palladium-Katalysators oder der Reaktionszeiten zu erhalten, blieben ohne Erfolg. Die ständige HPLC-MS-Kontrolle in 30 minütigen Kontrollschritten nach Fluten des Reaktionsgefäßes mit Wasserstoff, ergab, dass die Thioacetylgruppe als erste funktionelle Einheit noch vor den Benzyl-Estern und -Ethern hydriert wird. Nach drei stündigem Rühren ist die Thioacetyl-Funktion vollständig entfernt. Zu diesem Zeitpunkt sind die Benzylether noch nahezu unberührt (Abb. 3.3.5.2.3).

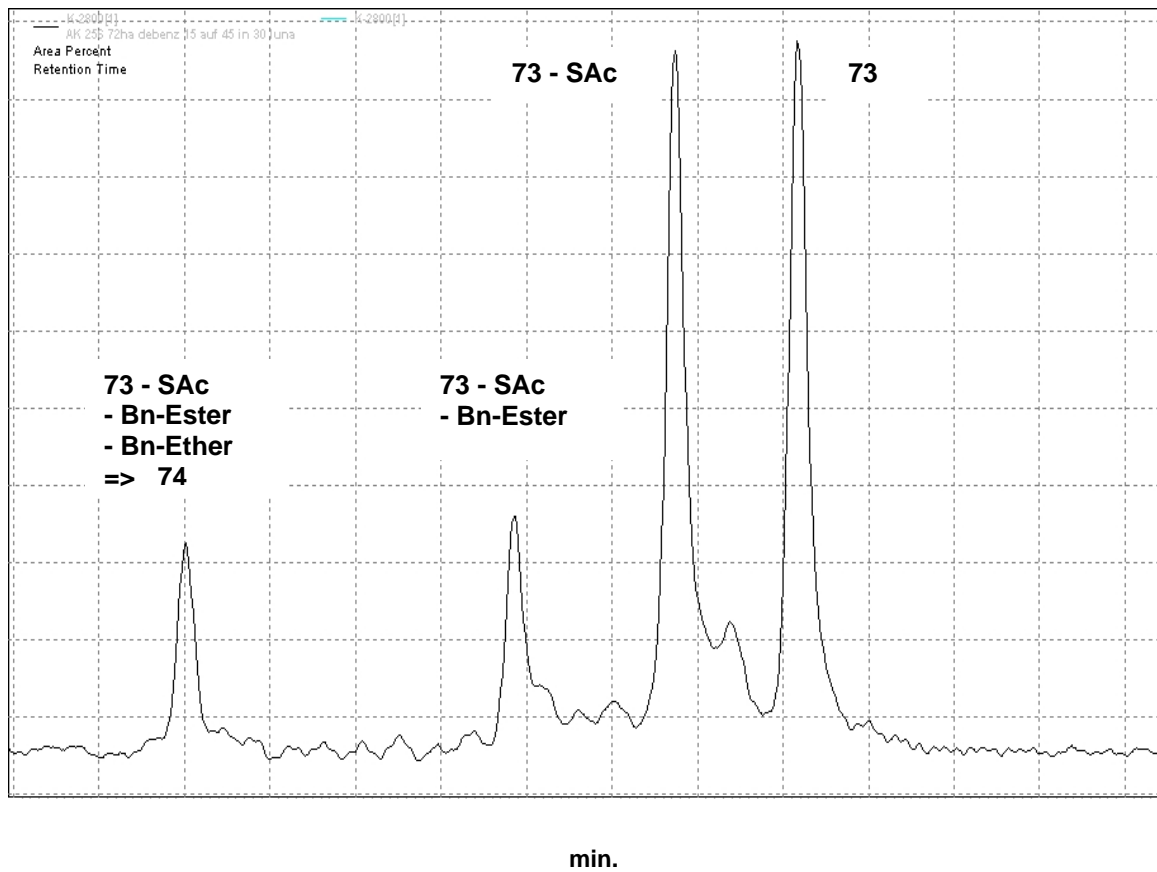


Abb. 3.3.5.2.3: RP-HPLC-Chromatogramm der Debenzylierung von Glycopeptid 73 nach dreistündiger Reaktionszeit

Die debenzylierten und entschwefelten Glycopeptide **71** und **74** werden mit wässriger NaOH von den verbleibenden Acetylschutzgruppen befreit und in 30-81%-iger Ausbeute über zwei Stufen erhalten (Abb. 3.3.5.2.4).

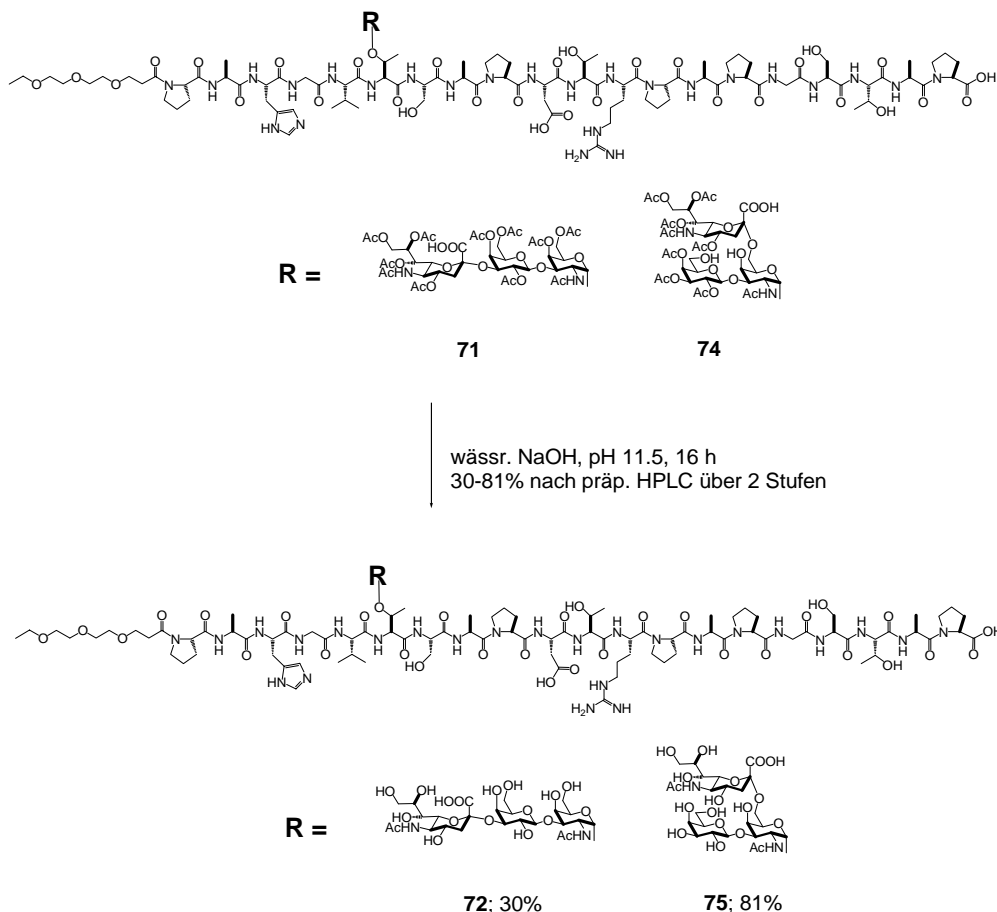


Abb. 3.3.5.2.4: Deacetylierung von 71 und 74

Die exakten Strukturen der methylierten Glycopeptide **72** und **75** konnten durch ESI-MS- und MALDI-TOF-Massenspektrometrie und durch NMR-Spektroskopie eindeutig bestätigt werden. Die dargestellten entschwefelten Verbindungen können als Testsubstanzen in immunologischen Studien eingesetzt werden.

3.3.6 Synthese eines dimeren Sialyl-T_N-MUC1-Glycopeptids

Da die Hydrogenolyse von Thioacetyl-funktionalisierten Glycopeptiden fehlschlug, musste nach geeigneten Alternativen gesucht werden, diese Strukturen zugänglich zu machen. Zum Einen könnte man bei der Synthese der sialylierten Saccharidbausteine für die Festphasenglycopeptidsynthese die Verwendung von benzylischen Schutzgruppen vermeiden. Eine Möglichkeit wäre die Anwendung von Allyl-Estern und -Ethern, welche durch Palladium(0)-Katalyse ohne Wasserstoff gespalten werden können. Da dies allerdings erheblichen synthetischen Aufwand bedeuten würde, wurde dies in dieser Arbeit nicht verfolgt. Zum andern könnte man nach Varianten der Benzyl-Entfernung ohne Hydrogenolyse

suchen. Diese Suche blieb bezüglich der Benzylether erfolglos. Benzylester lassen sich dagegen durchaus verseifen.

Das blockierte Merkaptoacetylglycopeptid **76** wird direkt mit wässriger NaOH-Lösung bei pH 11.5 umgesetzt (Abb. 3.3.6.1).

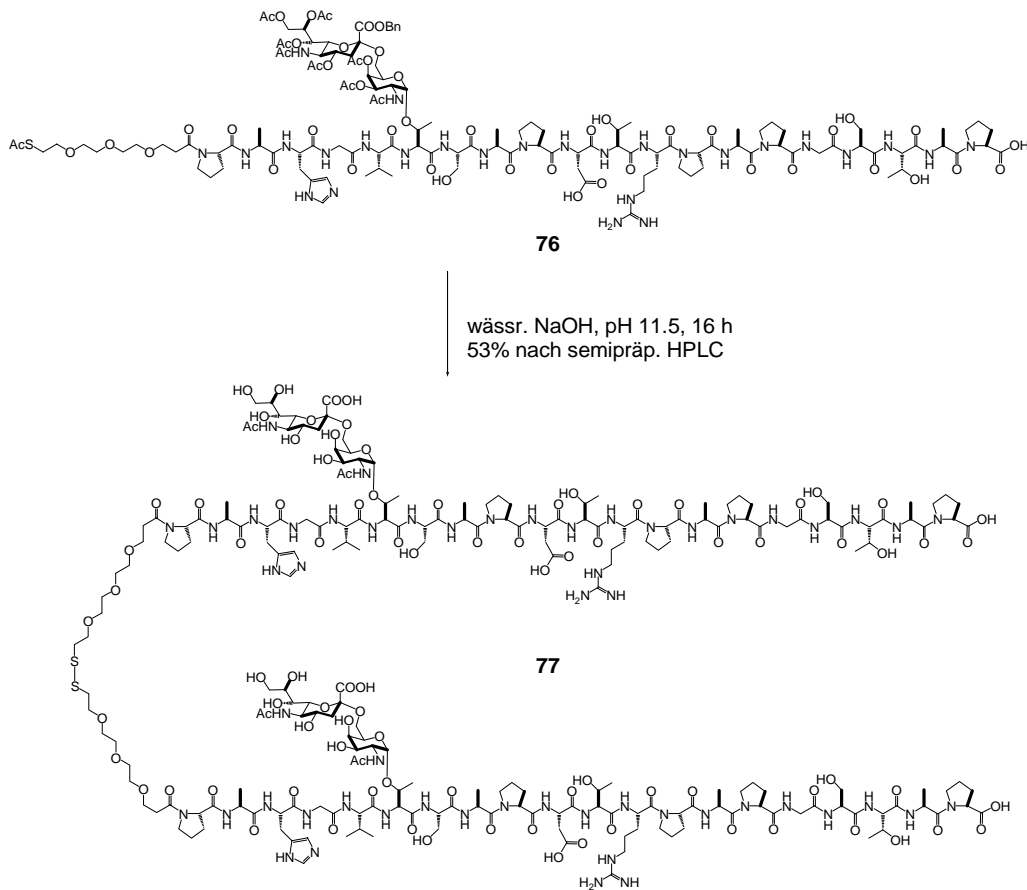


Abb. 3.3.6.1: Deblockierung von 76 in wässr. NaOH-Lösung

So sollten alle Acetyl-Schutzgruppen, der Benzylester und die Thioacetylgruppe zum freien Thioglycopeptid hydrolysiert werden. Nach 3 h Rühren in wässriger NaOH zeigt das HPLC-Chromatogramm ein homogenes Profil an. Das entstehende Produkt ist vollständig deacetyliert, debenzyliert und trägt auch noch die Thiol-Komponente. Allerdings ließ sich durch HR-ESI-TOF- und MALDI-TOF-Massenspektrometrie eindeutig eine Dimerisierung des Produktes unter Ausbildung einer Disulfidbrücke nachweisen (Abb. 3.3.6.2).

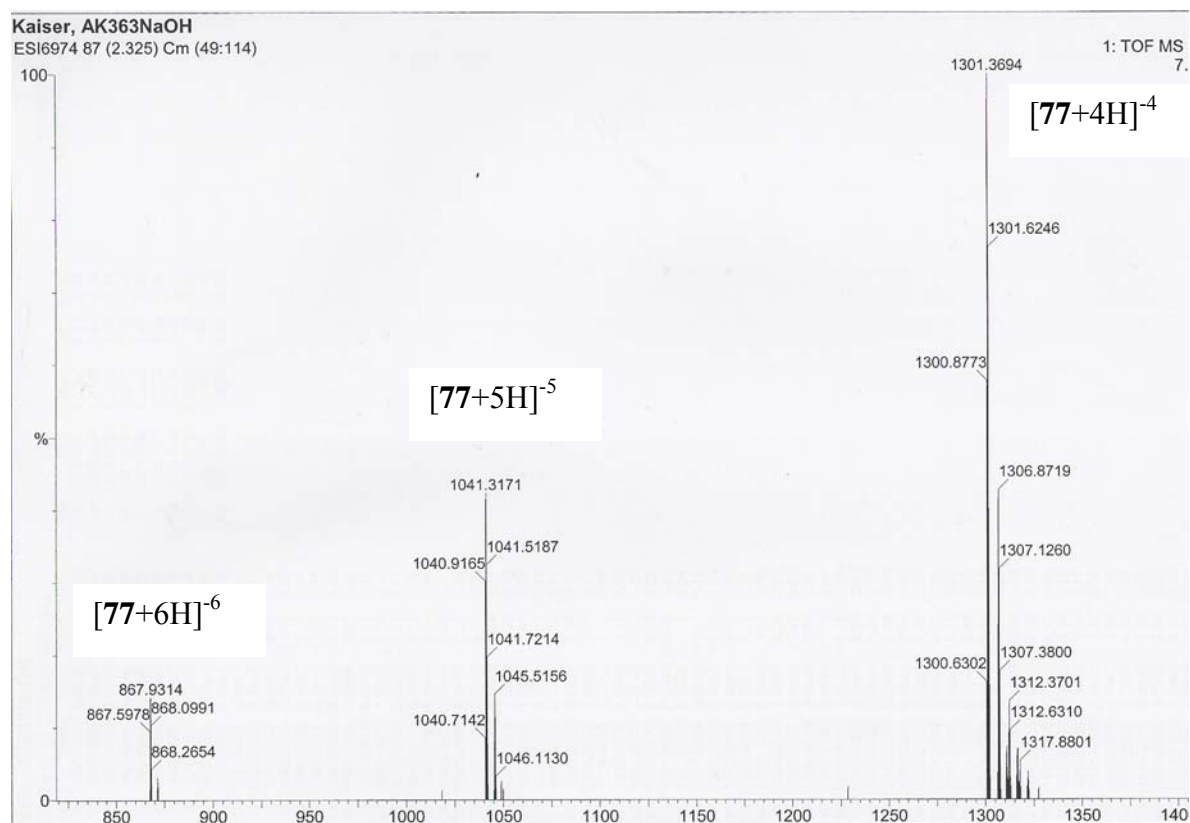


Abb. 3.3.6.2: HR-ESI-TOF-MS von Verbindung 77

Somit lässt sich der Benzylester des Thioacetyl-funktionalisierten Glycopetids erfolgreich in NaOH-Lösung verseifen, allerdings kommt es zu einer oxidativen Dimerisierung des Produktes. Will man auf diese Weise die freie Thiol-Komponente isolieren, müsste die Disulfidbrücke beispielsweise mit Tris(2-cyanoethyl)-phosphin (TCEP)²²⁵ reaktiv gespalten werden. Dies wurde hier nicht durchgeführt, vielmehr wurde das synthetisierte Dimer **77** in immunologischen Studien als Vergleichssubstanz eingesetzt.

²²⁵ J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Withesides, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2648.

3.4 Synthese und immunologische Evaluierung von MUC1-Glycopeptid-Protein-Konjugaten

3.4.1 Protein-Antigen-Konjugate

Zur Auslösung von Immunreaktionen gegen ein bestimmtes Hapten-Molekül dienen in der Regel Hapten-Protein-Konjugate.^{226,227} So erreicht man schnell und zuverlässig Immunantworten, deren Intensität und Spezifität untersucht werden kann. Zur Induktion einer MHC-II-restringierten Immunreaktion müssen B-Zellen effektiv aktiviert werden. Dazu muss nicht nur das Antigen an die B-Zellrezeptoren binden, sondern auch die B-Zelle durch T_H2 -Helferzellen erkannt und stimuliert werden. Diese sogenannte „gekoppelte Erkennung“ (linked recognition) gewährleistet die Überwindung der Selbst-Toleranz des Immunsystems. Da Proteine aus langen, meist linearen Polypeptiden aufgebaut sind, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass ein T_H2 -Zell-Epitop Teil des Trägerproteins, an das das Hapten gebunden ist, ist. Ist dies der Fall, verfügt der immunisierte Organismus über $CD4^+$ -T-Zellen, die mit einem Rezeptor ausgestattet sind, der spezifisch die auf MHC-II präsentierten Peptidfragmente des Trägerproteins erkennt.

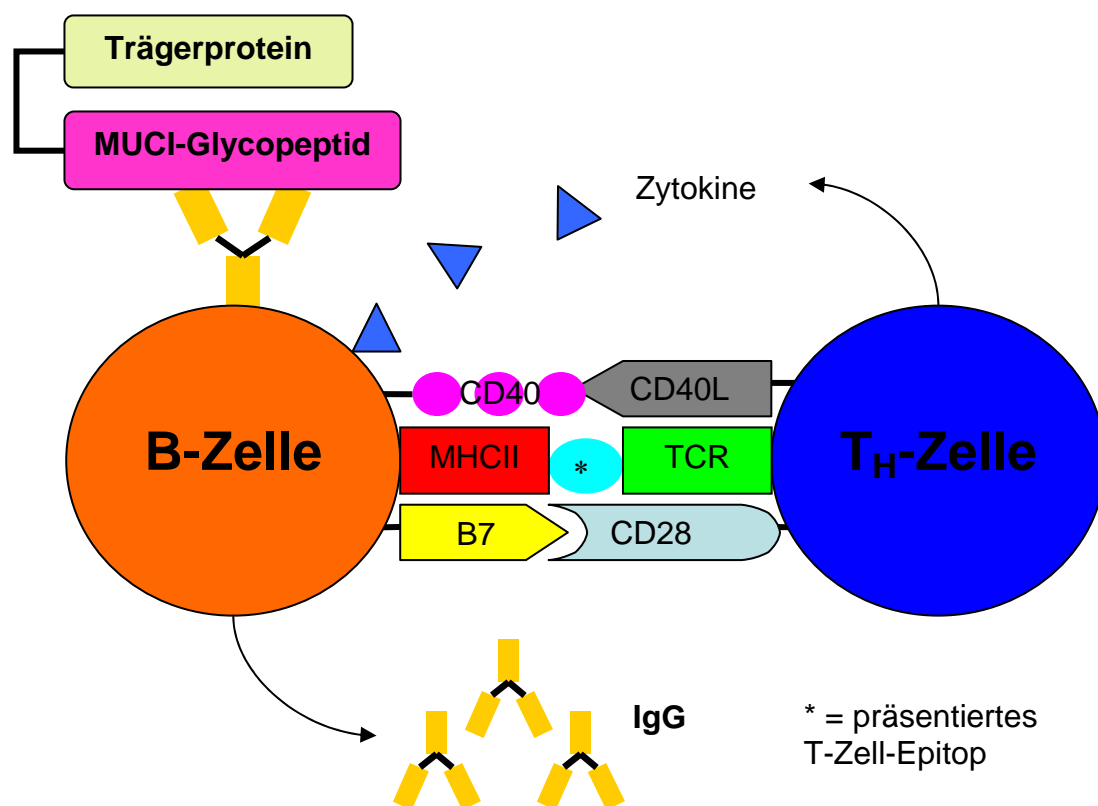


Abb. 3.4.1 Vereinfachtes Schema der MHC-II-restringierten Immunantwort

²²⁶ V. P. Butler Jr., S. M. Beiser, *Adv. Immun.* **1973**, *17*, 255.

²²⁷ B. F. Erlanger, *Methods Enzymol.* **1980**, *70*, 85.

Nach der Immunisierung mit einem solchen Konjugat aus Protein und Hapten wird dieses von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und prozessiert. Bei dieser Proteolyse entstehende Fragmente des Trägerproteins werden auf der B-Zelloberfläche auf dem MHC-II-Komplex präsentiert (Abb. 3.4.1).¹³ Diese T-Zell-Epitop-MHC-II-Komplexe werden von Rezeptoren auf den T_H2-Zellen erkannt, woraufhin diese antigenspezifischen T_H2-Zellen kostimulatorische Signale aussenden, die eine selektive B-Zellaktivierung bewirken. Kostimulatorische Signale sind z. B. gegeben durch die Sekretion von Zytokinen wie IL-2 (Proliferations-Induktion), IL-4 (initiale Aktivierung der B-Zell-Proliferation) oder IL-6 (B-Zell-Differenzierung). Weitere wichtige Signal-Wechselwirkungen, die eine Auslösung der adaptiven MHC-II-restringierten Immunantwort unterstützen, finden zwischen bestimmten Rezeptoren und Liganden statt. So bindet der B7-Ligand einer B-Zelle an den CD28-Rezeptor der T-Helferzelle und der CD40L an CD40 sowie LFA3 an CD2 (Abb. 3.4.1).

3.4.2 MUC1-Glycopeptid-Protein-Konjugate

Zur Entwicklung einer therapeutisch und prophylaktisch wirksamen Antitumor-Vakzine muss eine effiziente humorale Immunantwort gegen tumorassoziierte Oberflächenglycopeptide des epithelialen MUC1 ausgelöst werden.^{42,51,61} Entsprechend dem oben beschriebenen Mechanismus soll das MUC1-Glycopeptid-Antigen, welches das B-Zell-Epitop repräsentiert, an ein T-Zell-Epitope tragendes Trägerprotein gebunden werden und dadurch eine toleranzüberschreitende humorale Immunantwort ausgelöst werden. Wie besprochen soll die Präsentation der T_H2-Zell-Epitope des Carriers über MHC-II-Komplexe zur Stimulierung einer adaptiven Immunantwort dienen.²²⁸

Als Carrier-Proteine für diese Zwecke verwendet man am häufigsten Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin),²²⁹ Hämocyanin der Schlüssellocknapfschnecke (KLH, keyhole limpet hemocyanin)²³⁰ und Tetanus-Toxoid.^{231,232,233,234,235,236} Diese Proteine besitzen die

²²⁸ A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* 121 **2009**, 121, 7688.

²²⁹ T. Peters Jr., *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 161.

²³⁰ K. E. van Holde, K. I. Miller, *Adv. Protein Chem.* **1995**, 47, 1.

²³¹ A. Barra, C. Cordonnier, M. P. Preziosi, L. Intrator, L. Hessel, B. Fritzell, J. L. Preud'homme, *J. Infect. Dis.* **1992**, 166, 1021.

²³² H. J. Jennings, R. K. Snood, *Neoglycoconjugates, Preparation and Application*, Academic, San Diego, **1994**.

²³³ D. W. Scheifele, W. Meekison, R. Guasparini, A. Roberts, L. Barreto, J. Thipphawong, S. Wiltsey, *Vaccine* **1995**, 13, 104.

²³⁴ S. Kuritska, H. Kaeyhty, L. Saarinen, P.-R. Rounberg, J. Eskola, H. P. Makela, *J. Pediatr.* **1996**, 128, 525.

²³⁵ R. E. Huebner, M. Nicol, R. Mothupi, H. Kaeyhty, N. Mbelle, E. Khomo, K.-P. Klugman, *Vaccine* **2005**, 23, 802.

²³⁶ T. Nolan, S. Lambert, D. Robertson, H. Marshall, P. Richmond, C. Streeton, J. Poolman, D. Boutriau, *Vaccine* **2007**, 25, 8487.

notwendigen T_H2-Helferzell-Epitope. Ein entscheidender Schritt bei der Synthese des Hapten-Protein-Konjugats ist die Anbindung des MUC1-Glycopeptid-Antigens an das Trägerprotein. Die Verknüpfungsreaktion muss unter möglichst milden Reaktionsbedingungen durchführbar sein, um weder das Protein noch das Glycopeptid zu verändern. Des Weiteren sollte sie chemoselektiv verlaufen, damit die T_H2-Zell-Epitope des Carriers nicht beeinträchtigt werden. In der Literatur findet man eine Reihe von Konjugationsmöglichkeiten, die allerdings alle Vor- und Nachteile haben.^{237,238,239,240,241,242,243,244} Eine unerwünschte Folge erwächst durch die Konjugation oft aus der hohen Immunogenität mancher Spacermoleküle. Der Maleinimid-Spacer beispielsweise ermöglicht zwar eine chemoselektive Verknüpfung des Haptens an Thiole,²⁴⁵ ist aber selbst so immunogen, dass es in der Immunreaktion zur vollständigen Unterdrückung der Immunantwort gegen das Antigen kommen kann (Spacer induced suppression).²⁴⁶ Ein in jüngerer Zeit häufig angewendetes Verfahren zur Konjugation ist die 1,3-dipolare *Huisgen*-Cycloaddition, die eine chemoselektive Verknüpfung von Alkin- an Azid-funktionalisierten Komponenten ermöglicht.^{247,248} Allerdings gibt es keine genaueren immunologischen Daten bezüglich der Immunogenität des entstehenden Triazol-Gerüsts. Eine immunologisch unbedenkliche Anbindung an Trägerproteine erlaubt die radikalische Reaktion zwischen einer freien Thiol-Komponente und einer Doppelbindung.^{114,115,224} Diese immunkompatible Verlinkung kann allerdings aufgrund der in Kapitel 3.3 beschriebenen Erfahrungen in der vorliegenden Arbeit nicht angewendet werden. Vielmehr soll eine von Tietze et al. entwickelte Konjugationsstrategie zum Einsatz kommen, die sich die hohe Selektivität bei Reaktionen von Nucleophilen mit Quadratsäureestern zu Nutze macht.^{249,250,251,252,61}

²³⁷ H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, 98, 354.

²³⁸ H. Kunz, S. Birnbach, P. Wernig, *Carbohydr. Res.* **1990**, 202, 207.

²³⁹ K. v. d. Bruch, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 101.

²⁴⁰ J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2525.

²⁴¹ S. Bauminger, M. Wilchek, *Methods Enzymol.* **1980**, 70, 151.

²⁴² T. H. Ji, *Methods Enzymol.* **1983**, 91, 580.

²⁴³ A. J. Habeeb, R. Hiramoto, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, 126, 16.

²⁴⁴ R. B. Mikkelsen, D. F. Wallach, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 7413.

²⁴⁵ J. Carlsson, H. Drevin, R. Axen, *Biochem. J.* **1978**, 173, 723.

²⁴⁶ T. Buskas, Y. Li, G.-J. Boons, *Chemistry Eur. J.* **2004**, 10, 3517.

²⁴⁷ H. D. Agnew, R. D. Rohde, S. W. Millward, A. Nag, W.-S. Yeo, J. E. Hein, S. M. Pitram, A. A. Tariq, V. M. Burns, R. J. Krom, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, J. R. Heath, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 5044.

²⁴⁸ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, J. R. Heath, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708.

²⁴⁹ L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, 124, 1215.

²⁵⁰ L. F. Tietze, C. Schröter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H.-J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, 2, 148.

²⁵¹ S. Spjut, M. Pudelko, M. Hartmann, M. Elofsson, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 349.

²⁵² S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7798.

3.4.3 Mit Quadratsäureestern funktionalisierte MUC1-Glycopeptide

An den Trägerproteinen sind die Amino-Funktionen der Lysin-Seitenketten und des *N*-Terminus die am leichtesten angreifbaren nucleophilen Gruppen. Um die Quadratsäureester-Strategie anzuwenden zu können, muss das Glycopeptid-Antigen in ein Quadratsäuremonoamid-Derivat überführt werden. Selbst diese Anbindung muss chemoselektiv an eine freie Amino-Gruppe, z. B. an der eines Oligoethylenglycol-Abstandhalters erfolgen. Die zahlreichen anderen funktionellen Gruppen von tumorassoziierten sialylierten MUC1-Glycopeptid-Antigenen dürfen dabei nicht in Mitleidenschaft gezogen werden (Abb. 3.4.3.1).

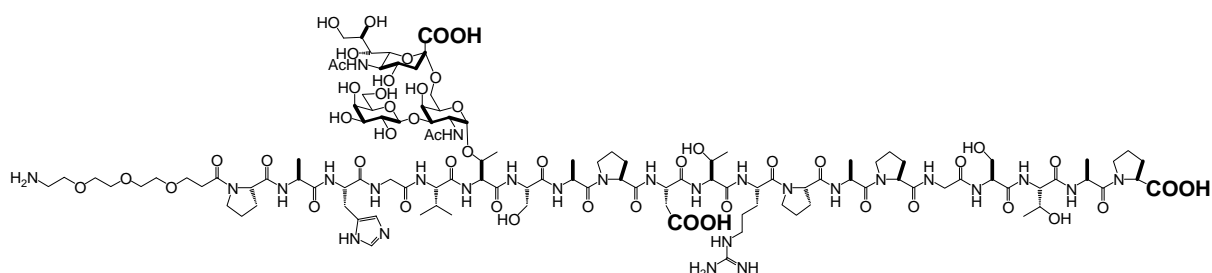


Abb. 3.4.3.1 Funktionalität von MUC1-Glycopeptid-Antigenen

Das freie Amin am Spacer der vollständig deblockierten Glycopeptide kann in einer Lösung aus Ethanol/Wasser (1:1) bei einem pH von 8 selektiv mit Quadratsäurediethylester **78** zu den Monosquaraten **79**, **84**, **87** und **90** in 64-95%-iger Ausbeute umgesetzt werden (Abb.3.4.3.2). Diese als Quadratsäuremonoester funktionalisierten Glycopeptide können dann bei Erhöhung des pH-Werts chemoselektiv an die Lysin-Seitenketten des Carriers gebunden werden.

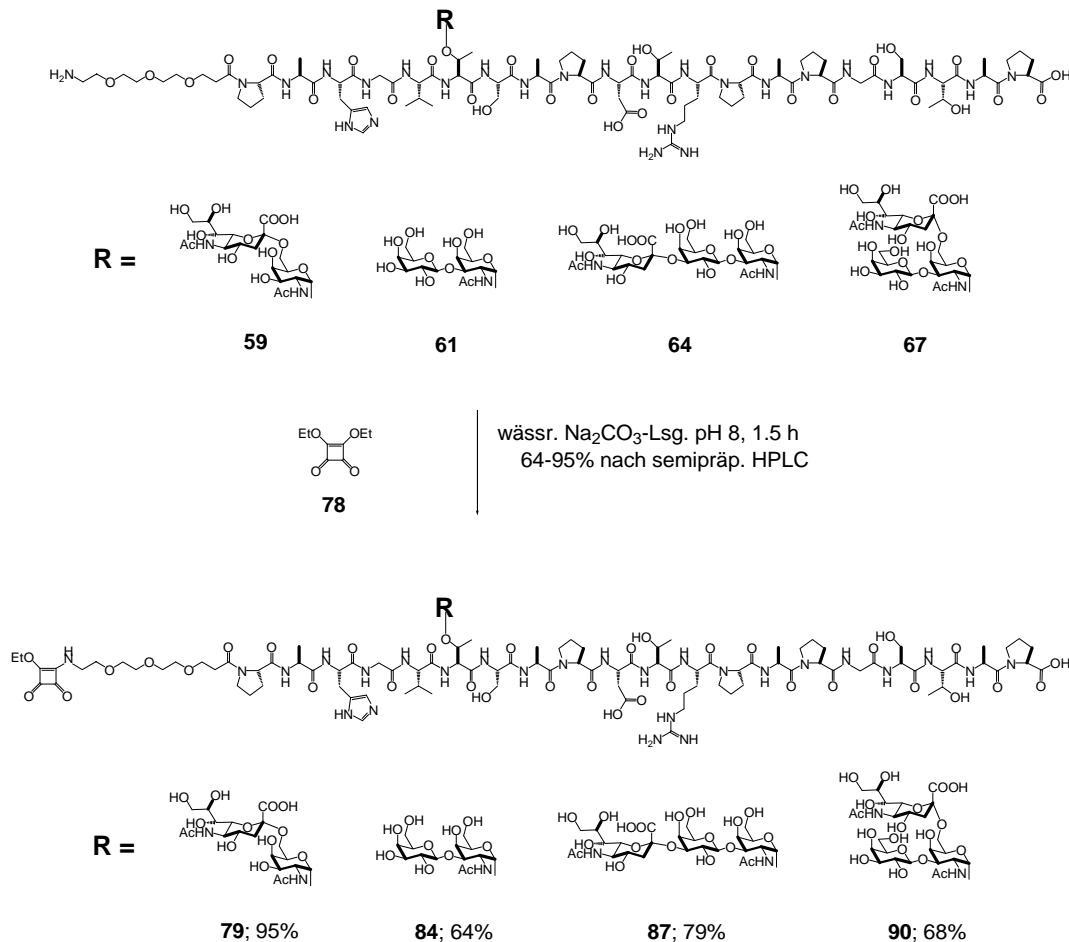


Abb. 3.4.3.2 Synthese der Quadransäure-funktionalisierten MUC1-Glycopeptid-Antigene 79, 84, 87, 90

3.4.4 BSA-Glycopeptid-Konjugate

Rinderserumalbumin ist mit insgesamt 582 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 66.500 g/mol ein vergleichsweise „kleines“ Protein. Es ist zur Induktion einer selektiven Immunantwort in der Lage, allerdings gibt es für diesen Zweck weitaus besser geeignete Proteine, wie die stärker immunogen wirkenden KLH und Tetanus-Toxoid. Dennoch liegt im überschaubaren Molekulargewicht des BSA ein entscheidender Vorteil. BSA-Konstrukte können durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert werden. Dies ermöglicht eine konkrete Aussage über den Beladungsgrad des Proteins mit Antigenen. Daher eignet sich Rinderserumalbumin zur Reaktionsoptimierung für die Konjugation über Quadransäureester. Die so synthetisierten Neoglycoproteine sind keine besonders stark wirkenden Vakzine. Sie eignen sich allerdings für die Beschichtung von ELISA-Mikrotiterplatten (enzyme linked immunosorbent assay).

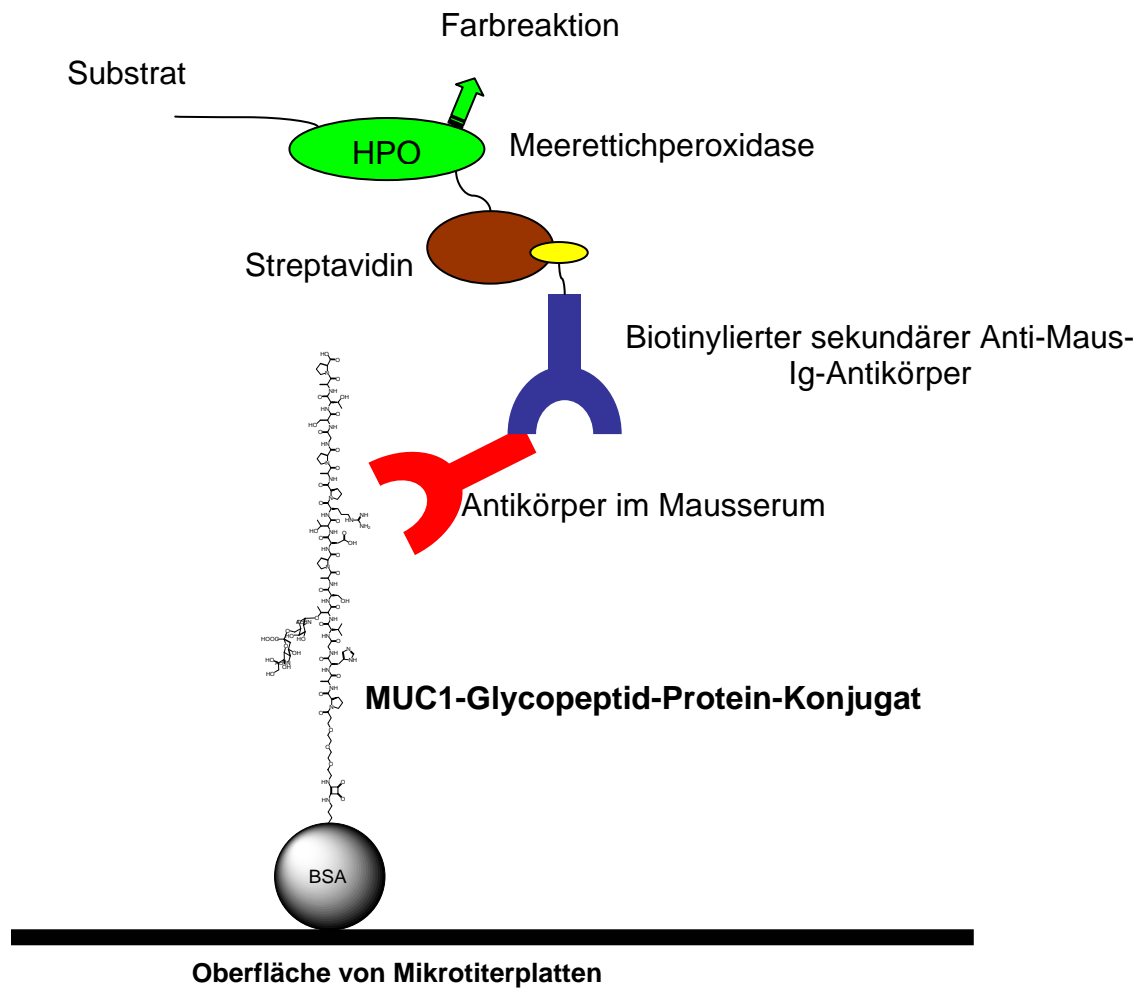


Abb. 3.4.4.1 ELISA-Test mit BSA-MUC1-Glycopeptid-Konjugaten

Dazu werden die BSA-Konjugate in wässriger Lösung auf Mikrotiterplatten aufgebracht. Nach Inkubation bleibt ein bestimmter Anteil des Neoglycoproteins auf der ELISA-Platte haften und kann so zum selektiven Antikörpernachweis genutzt werden. Aus Immunisierungen gewonnene Antikörper binden an das immobilisierte MUC1-Glycopeptid-Antigen und werden im Folgenden durch Farbreaktion visualisiert. Im Falle von Immunisierungsexperimenten an der Maus erkennt ein biotinylierter Anti-Maus-Ig-Antikörper nach Seruminkubation den gegen das Glycopeptid-Antigen spezifischen und daher gebundenen Antikörper. Dieser biotinylierte Anti-Maus-Antikörper wird mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat nachgewiesen, indem durch die Peroxidase der farblose Stoff ABTS (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)) zum freien grünfarbigen Radikal oxidiert wird (Abb. 3.4.4.2).

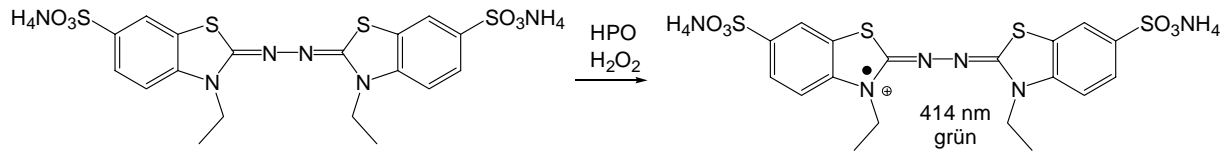


Abb. 3.4.4.2 Reduktion des ABTS-Farbstoffs

Dieses freie Radikal hat eine charakteristische Absorptionsbande bei $\lambda = 414 \text{ nm}$, welche detektiert wird. Das Auftragen der Absorptionsmesswerte gegen die Verdünnung des Serums liefert Erkenntnisse über die Konzentration der Antikörper gegen die tumorassoziierten MUCI-Eicosaglycopeptide.

Zur Anbindung der als Quardratsäuremonoester funktionalisierten Glycopeptide aus der repetitiven Wiederholungseinheit des MUCI **79**, **84**, **87** und **90** werden diese in Natriumphosphatpuffer bei pH 9.5 gelöst und mit Rinderserumalbumin **80** drei Tage bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird durch eine Membran, die alle Moleküle mit Molekulargewichten unter 30.000 g/mol passieren lässt, in 500 ml entionisiertem Wasser ultrafiltriert (Abb. 3.4.4.3).

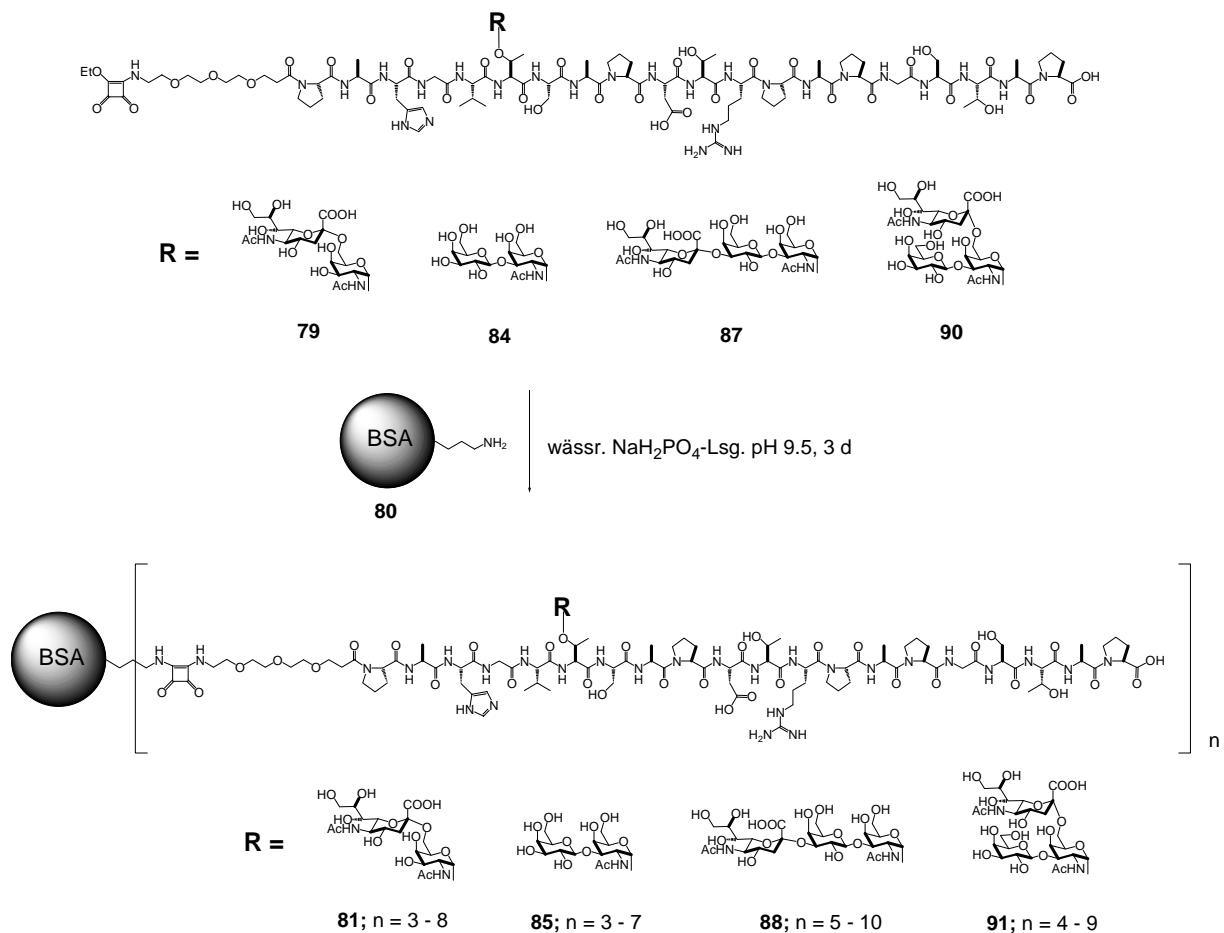


Abb. 3.4.4.3 MUC1-Glycopeptid-Beladung von BSA

Nach Gefriertrocknung des Filtrerrückstands erhält man die Neoglycoproteine, welche von sämtlichen Resten des niedermolekularen Antigens befreit sind. Durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie kann eine durchschnittliche Beladung von ca. 7 Molekülen des MUC1-Glycopeptid-Antigens pro BSA-Molekül ermittelt werden (Abb. 3.4.4.4). Es fällt auf, dass die Auflösungen der Massenspektren der sialylierten Neoglycoproteine **81**, **88** und **91** wesentlich schlechter ist, als das des mit dem *Thomson-Friedenreich*-Antigen glycosylierten Neoglycoprotein **85**.

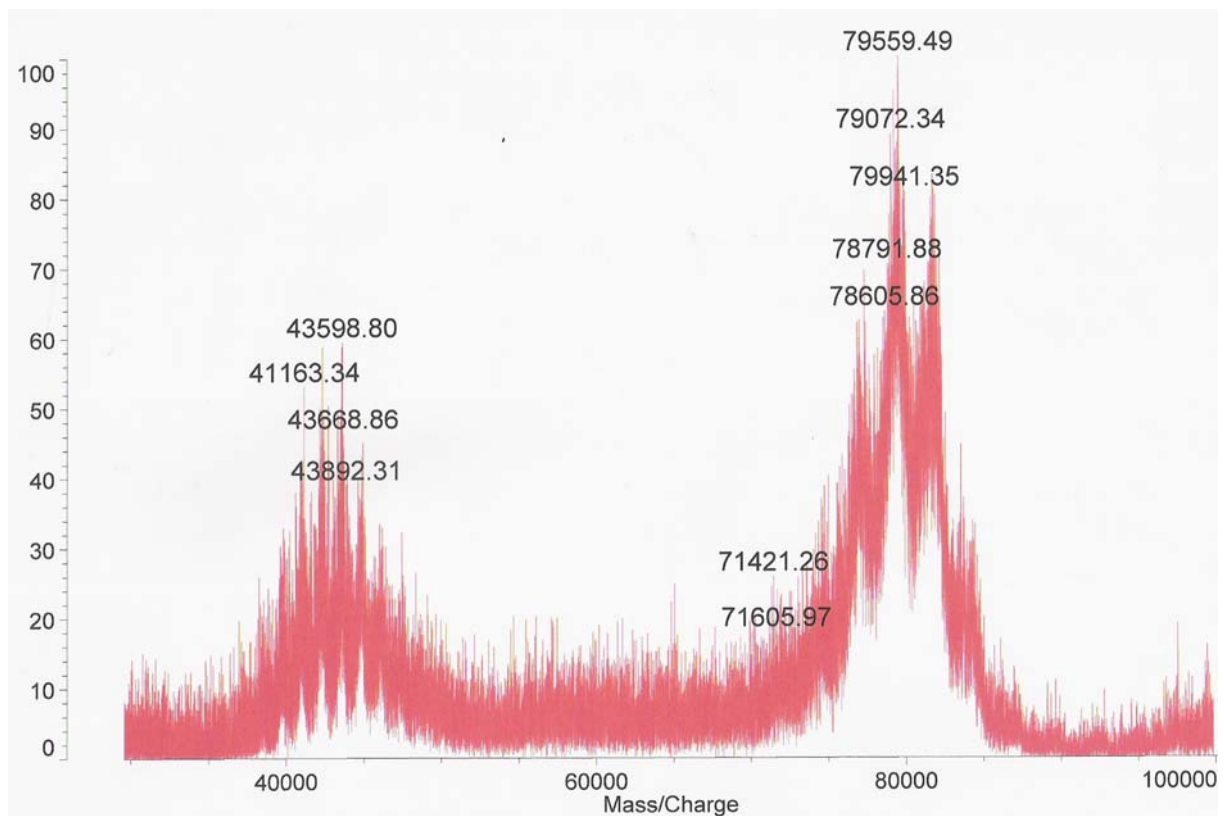


Abb. 3.4.4.4 MALDI-TOF-Analyse von MUC1-Glycopeptid-BSA-Konjugat **85**

3.4.5 Vakzine aus Tetanus-Toxoid und MUC1-Glycopeptid-Antigenen

Wie in Kapitel 3.4.1 angesprochen, müssen zur Induktion einer toleranzbrechenden Immunantwort gegen Antigen-Strukturen möglichst immunogene Trägerproteine verwendet werden. Zur Gewinnung eines Antitumor-Impfstoffs soll deshalb das stark immunogene Tetanus-Toxoid (150.000 g/mol) als Trägerprotein zum Einsatz kommen. Impfstoffkonjugate mit Tetanus-Toxoid haben den großen Vorteil, dass sie sowohl in Tieren als auch im Menschen starke Immunantworten hervorrufen können. Des Weiteren erleichtert die Anwendung von Tetanus-Toxoid die Weiterentwicklung zu einem Impfstoff der auch beim

Menschen angewendet werden kann, da mit diesem Protein gegen Wundstarrkrampf geimpft wird. Ein Konjugat aus Tetanus-Toxoid und einem *Tandem-Repeat*-MUC1-Glycopeptid sollte eine hohe Konzentration an spezifischen Antikörpern liefern.

Um Tetanus-Toxoid-Glycopeptid-Konjugate zu gewinnen, wird analog der Synthese von BSA-Neoglycoproteinen vorgegangen. Die mit dem Monoquadratsäureamid belegten MUC1-Glycopeptid Antigene **79**, **84**, **87** und **90** werden mit Tetanus-Toxoid in einer Natriumphosphatpuffer-Lösung bei pH 9.5 drei Tage gerührt. Nach Ultrafiltration und Gefriertrocknung werden die Konjugate als farblose Lyophilisate erhalten (Abb. 3.4.5.1).

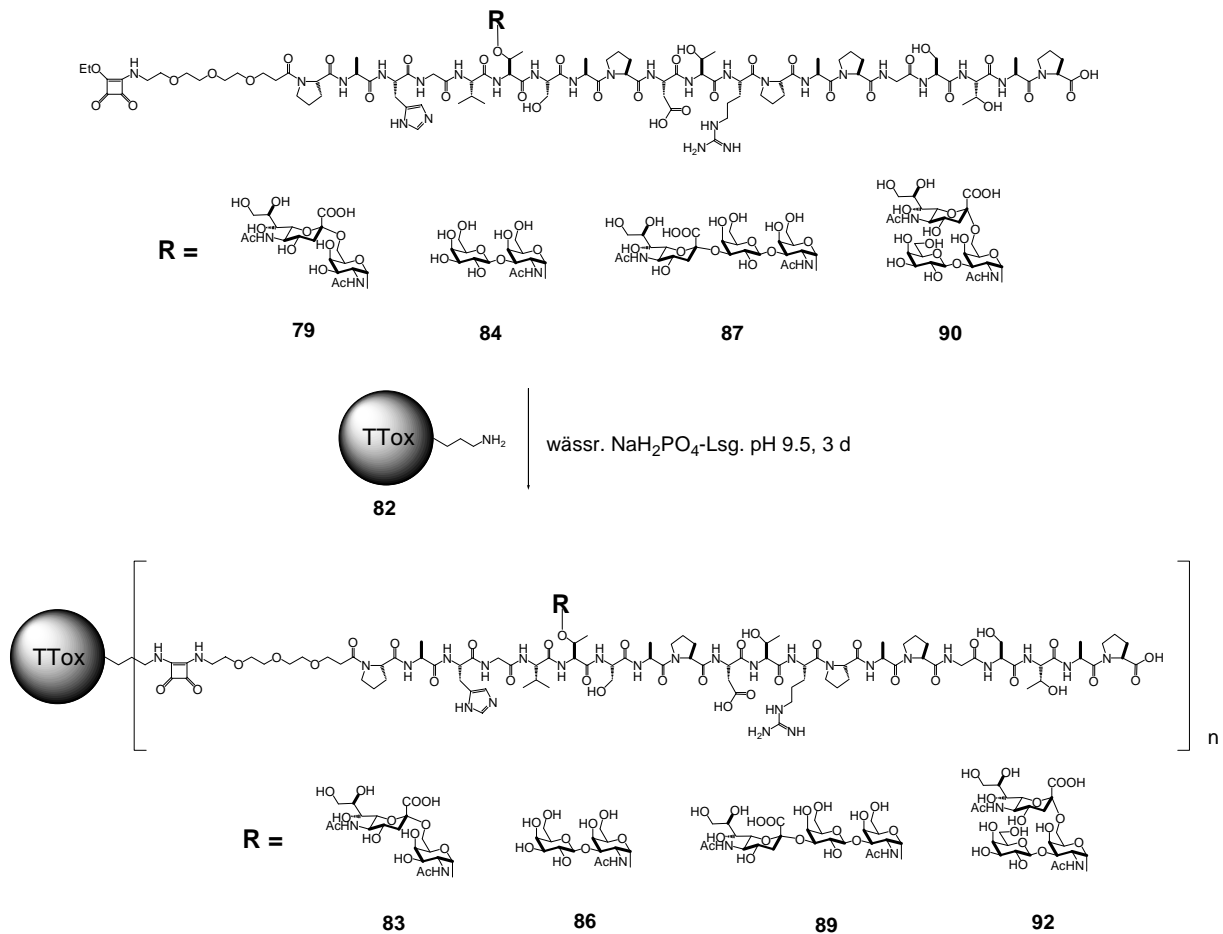


Abb. 3.4.5.1 Beladung des Tetanus-Toxoids mit MUC1-Glycopeptiden

Die Beladungsdichten der synthetischen Vakzinkonstrukte **83**, **86**, **89** und **92** konnten leider nicht durch MALDI-TOF-Spektroskopie ermittelt werden, da die hohen Molekulargewichte die Auflösungsgrenze des Gerätes überschreiten. So musste auf andere Analysetechniken zurückgegriffen werden, um die Beladung zu bestimmen. Da man nach der Reinigung des Konjugats durch Ultrafiltration davon ausgehen kann, dass sich keine Glycopeptid-Antigene mehr in der Lösung befinden und dass der Natriumphosphatpuffer die Membran mit der

Durchlässigkeit von 30 kDa vollständig passiert hat, kann eine gravimetrische Abschätzung der Beladung durchgeführt werden. Diese gravimetrische Analyse liefert Werte für die Beladungen von 30-40 Antigenmolekülen pro Tetanus-Toxoid Molekül. Um diese Dotierungsgrade auf andere Art sicherzustellen wird das Tetanus-Toxoid-MUC1-Sialyl-T_N-Eicosapeptid-Konjugat **83** auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit dem BSA-MUC1-Sialyl-T_N-Eicosapeptid-Konjugat **81** als Beschichtung verglichen. Die Quantifizierung wurde mit einem monoklonalen Sialyl-T_N-MUC1-Eicosapeptid-Antikörper nach dem ELISA-Prinzip vorgenommen. Dieser monoklonale Antikörper 2B3 resultierte aus Immunisierungsexperimenten mit den MUC1-Glycopeptid-Antigenen, die mit einer Peptidsequenz aus dem Hühnerserum-Albumin (OVA) verknüpft als synthetische Vakzine eingesetzt wurden. Der monoklonale Antikörper 2B3 erkennt hochselektiv das MUC1-Sialyl-T_N-Eicosapeptid-B-Zell-Epitop des TTox-Konjugats **83**. Zur Negativkontrolle wird mit dem unbehandelten Tetanus-Toxoid-Protein **82** beschichtet.

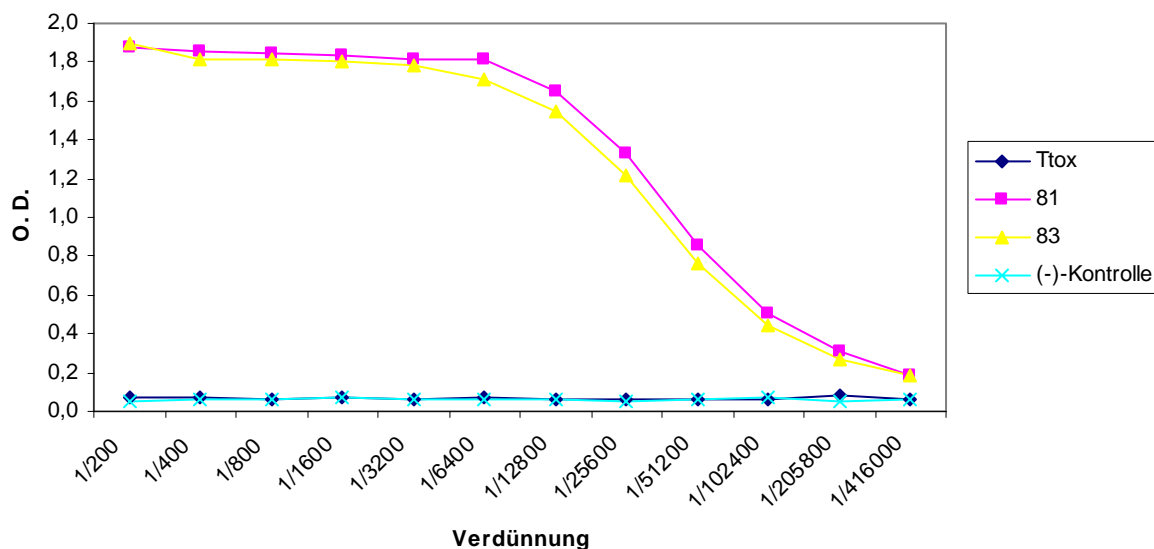


Abb. 3.4.5.2 Beladung des Tetanus-Toxoids mit MUC1-Glycopeptiden

Abb. 3.4.5.2 zeigt, dass die TTox-Vakzine **83** als Beschichtung eine ähnlich hohe Antikörperkonzentration bindet, wie das mit sieben Antigenmolekülen belegte BSA-Konstrukt **81**. Somit kann man auf eine nahezu gleiche Antigenichte und damit auf gleiche Beladung schließen. Für das wesentlich größere Tetanus-Toxoid bedeutet das, dass mindestens 20 Moleküle MUC1-Glycopeptid-Antigen auf einem Molekül TTox gebunden sind. Dieser Wert kann allerdings nur als Abschätzung betrachtet werden, da die unterschiedlichen Löslichkeiten und Polaritäten der Trägerproteine das Resultat beeinflussen.

Des Weiteren wird die Zugänglichkeit der Antikörper zu den MUC1-Antigenen auf dem voluminöseren Tetanus-Toxoid im Vergleich zum kleineren BSA eingeschränkt sein.

3.4.6 Immunologische Evaluierung des Tetanus-Toxoid-MUC1- Sialyl-T_N-Glycopeptid-Konjugats **83**

Um den in Kap. 3.4.1 postulierten Wirkmechanismus für die synthetischen Vakzine zu überprüfen, wird das synthetisierte Tetanus-Toxoid-Neoglycoprotein **83** als Impfstoff zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt. Dazu werden 10 weibliche balb/c-J-Mäuse mit der MUC1-Sialyl-T_N-Eicosaglycopeptid-Tetanus-Toxoid-Vakzine **83** immunisiert. Nach der Primärimmunisierung mit vollständigem Freund'schen Adjuvans (CFA) und Vakzine **83** und einer Restimulationen mit unvollständigem Freund Adjuvans (IFA) und Vakzine **83** nach 21 Tagen, wurde den Mäusen Blut entnommen und in den Seren die Antikörperkonzentrationen gegen das MUC1-Sialyl-T_N-Glycopeptid-Hapten durch ELISA bestimmt (Abb. 3.4.6.1). Hierzu wurden Mikrotiterplatten verwendet, die mit dem MUC1-Glycopeptid-Antigen tragenden BSA-Konjugat **81** beschichtet waren.

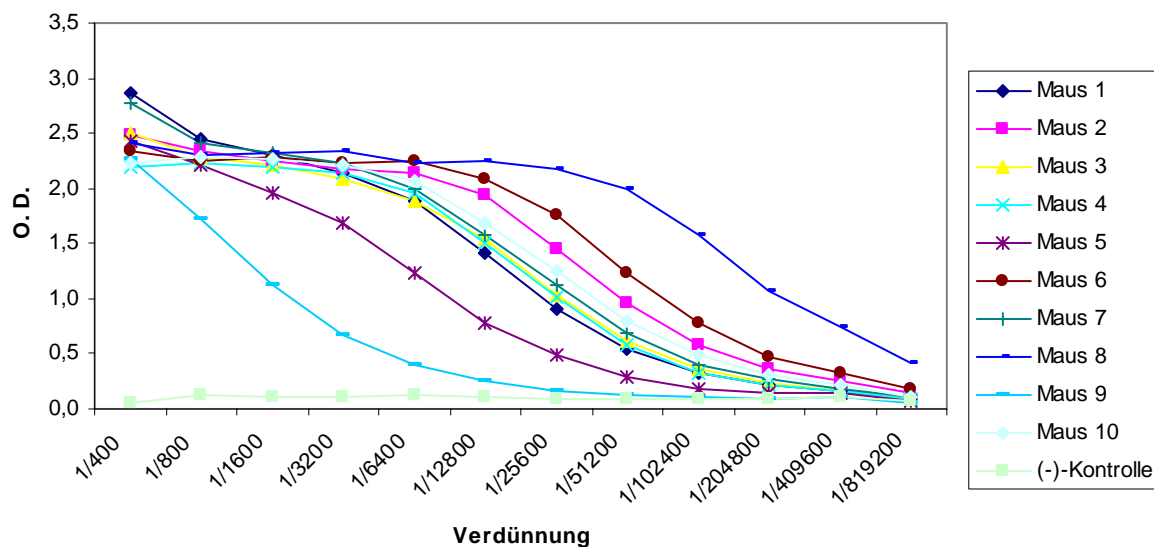


Abb. 3.4.6.1: ELISA der Seren der mit **83** immunisierten Mäuse (nach der 2. Immunisierung, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-Konjugat **81**)

Die Ergebnisse der ELISA-Tests bestätigen, dass Konjugate aus MUC1-Glycopeptid und Tetanus-Toxoid stark immunogene Impfstoffe sind. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass in allen 10 Mäusen starke Antikörpertiter erzeugt wurden. Das Resultat belegt nicht nur die starke Immunogenität der MUC1-TTox-Vakzine, sondern auch die

Reproduzierbarkeit des oben beschriebenen immunologischen Mechanismus nachdem man über den MHCII-T-Zellepitop-Komplex zu starken humoralen Immunantworten gelangt. In Anbetracht der Tatsache, dass Tetanus-Toxoid **82** als Impfstoff beim Menschen eingesetzt wird, ist diese Immunisierungsstrategie direkt auf den Menschen übertragbar. Um die Wirksamkeit des synthetisch veränderten Tetanus-Toxoid-Impfstoffs **83** gegen Wundstarrkrampf zu überprüfen, werden die Seren der 10 Mäuse in einem ELISA-Experiment auf Tetanus-Toxoid-Antikörper untersucht. Dazu wird die Mikrotiterplatte mit Tetanus-Toxoid **82** beschichtet und anschließend ein ELISA-Test mit den Seren der 10 Mäuse durchgeführt (Abb. 3.4.6.2).

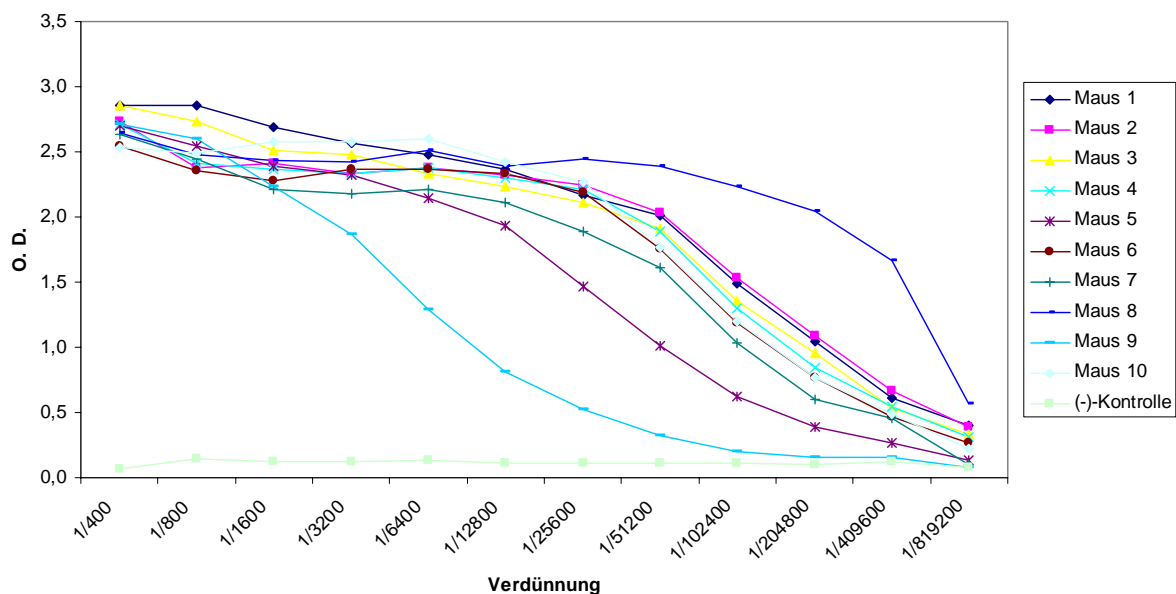


Abb. 3.4.6.2: ELISA der Seren der mit **83 immunisierten Mäuse (nach der 2. Immunisierung, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Tetanus-Toxoid **82**)**

Abb. 3.4.6.2 zeigt deutlich dass jede der 10 Mäuse Antikörper gegen Tetanus-Toxoid produziert. Im Vergleich zu den ELISA-Titern gegen das MUC1-Sialyl-T_N-Glycopeptid-Hapten sind die Titer gegen das Trägerprotein **82** in der Regel höher bis gleich. Dies bedeutet, dass die synthetische Vakzine **83** auch als Wundstarrkrampf-Vakzine eingesetzt werden könnte.

Um die Selektivität des Antikörpers gegenüber den verschiedenen Glycoformen der MUC1-Glycopeptide zu überprüfen, wird das Serum von Maus 8 (V:080430) mit einer Auswahl von synthetisierten mucinartigen Glycopeptiden (Abb. 3.4.6.3) inkubiert und dessen jeweilige Neutralisation durch ELISA analysiert. Bindet der Antikörper an eine synthetisierte Substanz, dann wird Bindung an die Beschichtung der Platte schwächer. Durch diese Technik kann man die Antikörperselektivitäten studieren und Aufschluss über die strukturelle

Erkennungsbreite von durch Glycopeptid-Vakzinen induzierten Seren gewinnen. So soll gezeigt werden, dass die induzierten Antikörper selektiv nur tumorassoziierte Strukturen auf Tumorgewebe erkennen und gesundes Gewebe unangetastet lassen. Zum Neutralisationstest wird zunächst eine Mikrotiterplatte mit dem BSA-MUC1-Sialyl-T_N-Konjugat **81** beschichtet. Parallel dazu wird in einer separaten Mikrotiterplatte das bis in die Nähe des Titerpunktes verdünnte Serum von Maus 8 (Verdünnungen: 1/30000; 1/90000; 1/270000; 1/810000), welche mit dem Tetanus-Toxoid-MUC1-Sialyl-T_N-Konjugat **83** immunisiert wurde, mit den in Abb. 3.4.6.4 gezeigten mucinartigen Glycopeptiden eine Stunde inkubiert. Anschließend werden die inkubierten Seren auf die mit dem BSA-Konjugat **81** beschichtete 96-Lochplatte übertragen und ein ELISA-Test durchgeführt (Abb. 3.4.6.2).

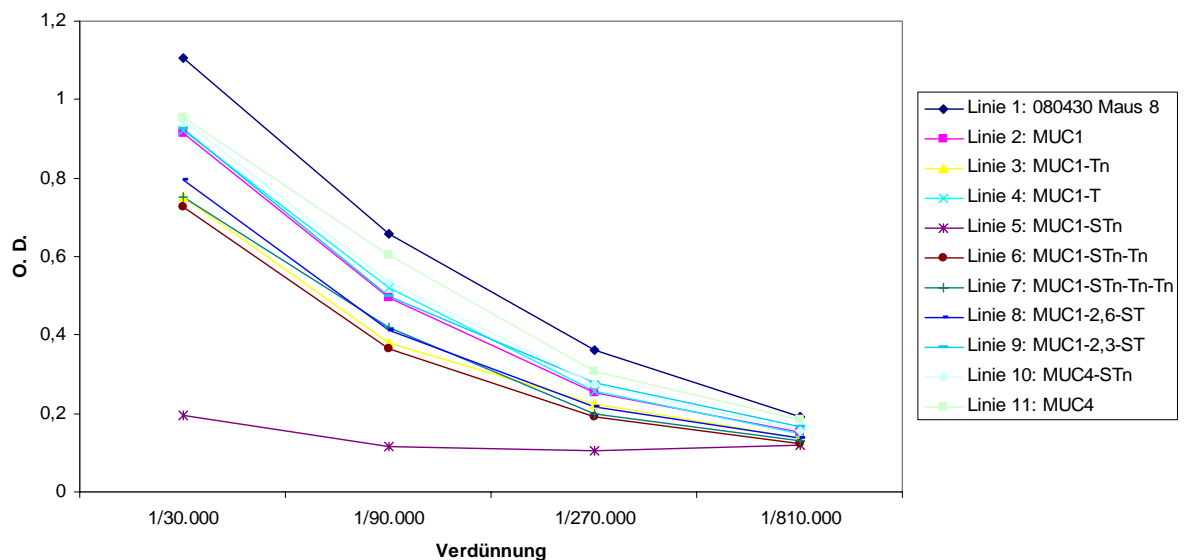


Abb. 3.4.6.3: Neutralisations-ELISA des Serums von Maus 8 (080430) (Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-Konjugat 81)

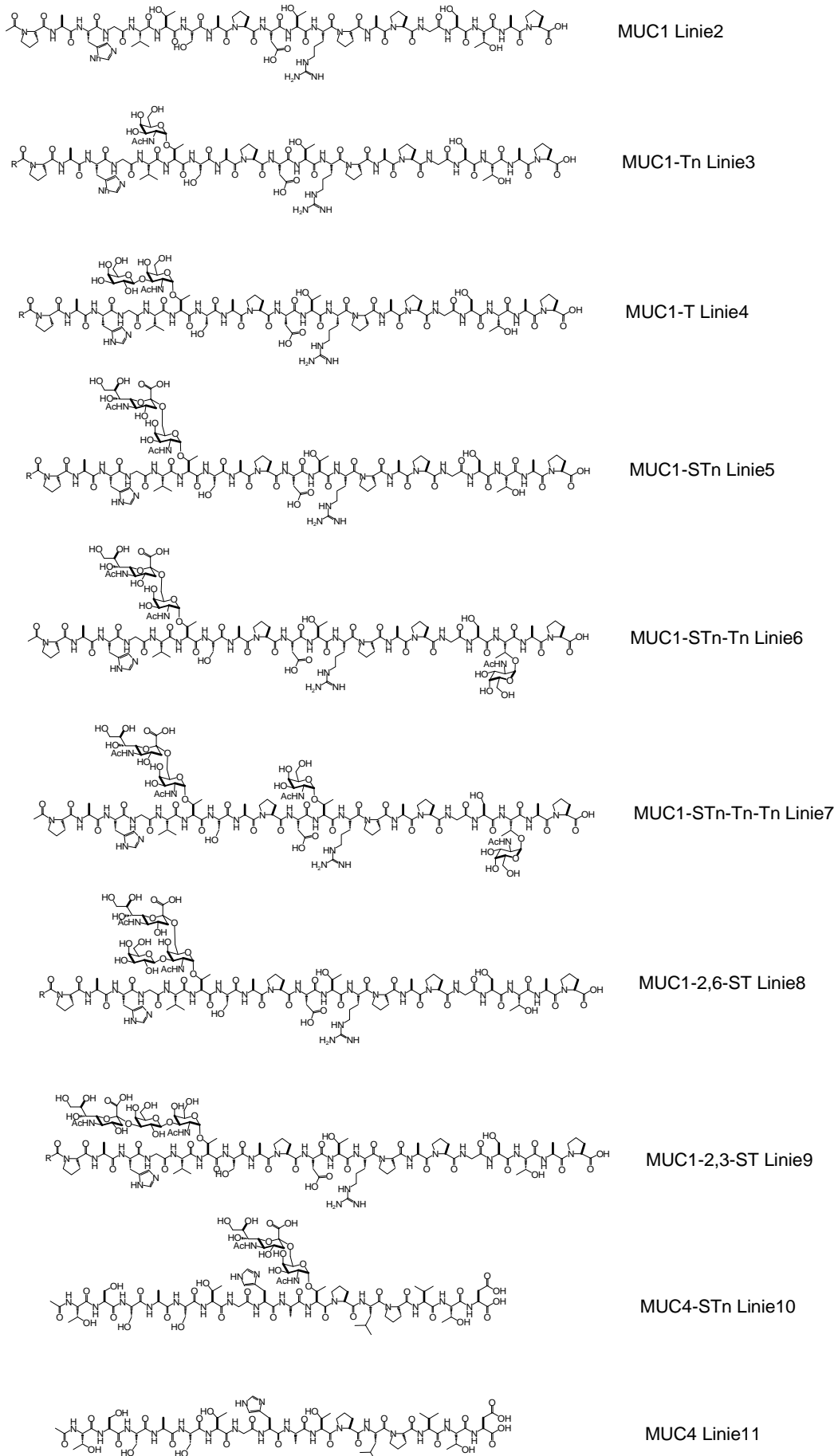


Abb. 3.4.6.4: Mucinartige Antigenstrukturen für Selektivitätsstudien

Die Ergebnisse des Neutralisationstest lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- Linie 1 steht für die Antikörperantwort von Maus 8. Da hier das Serum von Maus 8 nicht mit einer neutralisierenden Substanz inkubiert wurde, spiegelt diese Linie 1 das Maximum des ELISA-Test und damit den Referenzwert wieder.
- Linie 5 repräsentiert das Minimum des Tests. Hier wurde der Antikörper mit exakt dem gleichen MUC1-Glycopeptid-Antigen inkubiert, welches in der Vakzine **83** selbst vorliegt. Der Antikörper erkennt folglich hoch selektiv diese MUC1-Sialyl-T_N-Struktur. Des Weiteren zeigt dieses Resultat, dass keine Antikörper gegen das Quadratsäurespacermolekül vorliegen können. Diese müssten nämlich, wenn sie existieren würden, eine Restbindung an das BSA-Konjugat zeigen, da sie struktureller Bestandteil der Vakzine **83** und des Beschichtungsmaterials **81** sind.
- Die Linien 3, 6, 7 und 8 repräsentieren Bindungswerte des Serums von Maus 8, nach denen es mit MUC1-Glycopeptid-Antigenen inkubiert wurde, welche noch in erheblichem Maße die durch **83** induzierten Antikörper neutralisieren. All diesen Antigenstrukturen ist gemeinsam, dass sie die identische MUC1-Eicosapeptidsequenz und wesentliche Teile des Sialyl-T_N-Disaccharids beinhalten. Da diese erkannten Strukturen allesamt tumorassoziiert sind, hat diese Erkennung keine Nachteile im Bezug auf die Entwicklung einer selektiven Antitumorkvakzine.
- Linie 2 repräsentiert die Inkubation mit der unglycosylierten MUC1-Peptidstruktur. Diese Struktureinheit liegt auf Tumorzellen wohl kaum vor. Dieses Resultat zeigt, dass die Kooperation von Peptid-Epitop und Kohlenhydrat-Epitop eine entscheidende Rolle im Erkennungsprozess spielt.
- Linie 4 und 9 repräsentieren die Neutralisation von MUC1-Eicosaglycopeptid-Antigenen, die als zentralen Kohlenhydratbaustein das *Thomson-Friedenreich*-Antigen tragen (T-, 2,3-ST-Antigen), welches in der Vakzine **83**, nicht vertreten ist. Sie neutralisieren nur schwach. Die Art des Saccharids hat demnach Bedeutung für die Selektivität der Antikörper.
- Die Linien 10 und 11 zeigen die Inkubation mit einem MUC4-Antigen. Linie 11 zeigt, dass die unglycosylierte MUC4-Spezies das Mausserum nicht neutralisieren kann. Der Antikörper ist also selektiv auf die MUC1-*Tandem-Repeat*-Sequenz eingestellt. Linie 10 zeigt, dass die Antikörper auch nicht vom Kohlenhydrat allein neutralisiert werden, was erneut das Zusammenspiel von Peptid und Saccharid in der Vakzine belegt.

All diese Ergebnisse unterstreichen die immens hohe Selektivität der durch die MUC1-Glycopeptid-TTox-Vakzine induzierten Antikörper. Es wird gezeigt, dass Variationen

bezüglich der Peptidsequenz zum Verlust der Erkennung führen. Dagegen toleriert der Antikörper Abweichungen im Kohlenhydratteil durchaus. Allerdings führt nur die Inkubation mit der Glycopeptid-Partialstruktur zur vollständigen Neutralisation des Serums, welche in der Vakzine präsentiert war.

Mit der oben beschriebenen Methode lässt sich die Selektivität der gegen das MUC1-Sialyl-T_N-Eicosapeptid gerichteten Antikörper bestimmen. Um herauszufinden, ob im Serum von Maus 8 auch Antikörper gegen andere tumorassoziierten Strukturelemente wie die unglycosylierte MUC1-Sequenz enthalten sind, bedarf es einer anderen ELISA-Technik.

Daher wird eine Mikrotiterplatte mit einem BSA-Konjugat beschichtet, welches mit dem unglycosylierten MUC1-Eicosapeptid beladen ist. Anschließend wird zum einen das unbehandelte Serum von Maus 8 und zum andern das mit dem MUC1-Eicosapeptid inkubierte Serum von Maus 8 in die Nuten der Mikrotiterplatte gegeben und die Bindung gemessen (Abb. 3.4.6.5).

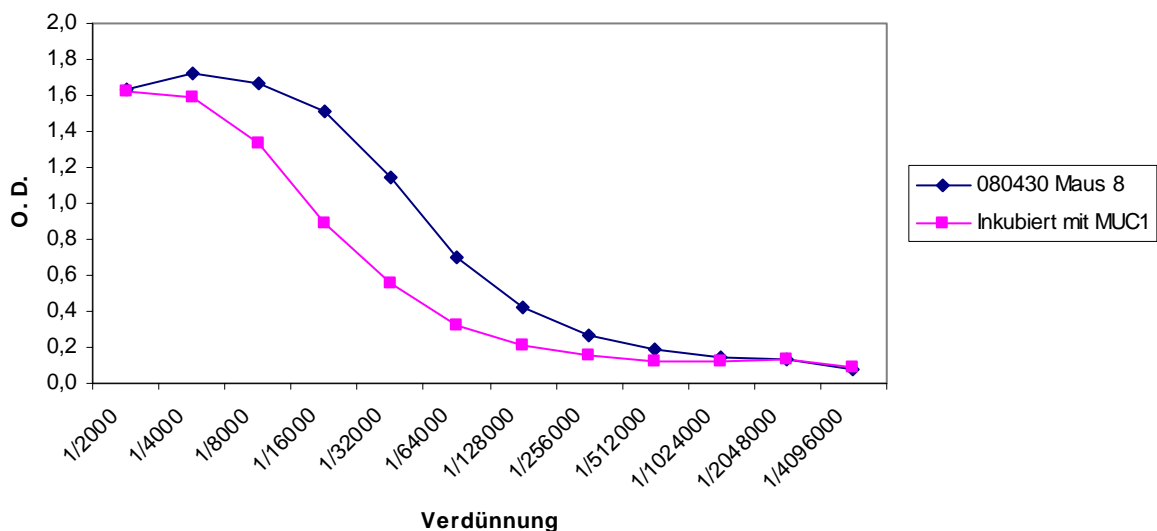


Abb. 3.4.6.5: ELISA des Serums von Maus 8 (080430) ohne und mit Zusatz der unglycosylierten MUC1-Sequenz (Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-MUC1-Konjugat)

Abb. 3.4.6.5 zeigt, dass das unglycosylierte MUC1-Peptid vom induzierten Antikörper erkannt wird und diese Erkennung teilweise durch das MUC1-Peptid neutralisieren lässt. Dies zeigt, dass im Serum von Maus 8 auch Antikörper vorhanden sind, die selektiv die nicht glycosylierte MUC1-Peptidsequenz erkennen.

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob das Serum der Maus 8 sich auch nach dieser Neutralisationstechnik vollständig neutralisieren lässt. Hierzu wird die ELISA-Platte mit BSA-Konjugat **81** beschichtet und sowohl das Serum von Maus 8, als auch das mit der

identischen MUC1-STn-Antigenstruktur inkubierte Serum von Maus 8 untersucht (Abb. 3.4.6.6).

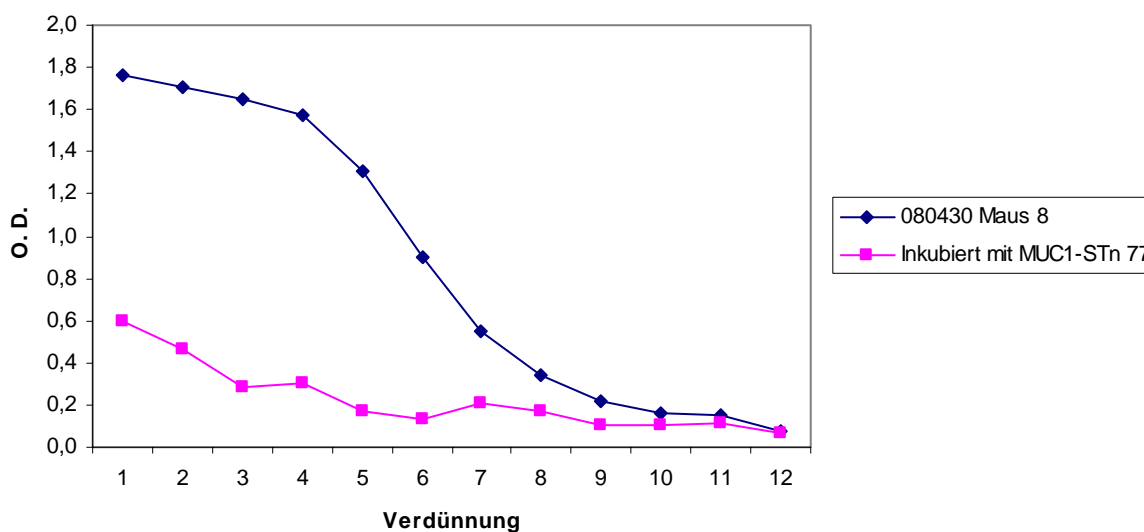


Abb. 3.4.6.6: ELISA des Serums von Maus 8 (080430) ohne und mit Zusatz von MUC1-STn-Konstrukt 77 (Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-MUC1-STn-Konjugat 81)

Die Ergebnisse der in Abb. 3.4.5.6 wiedergegebenen Neutralisationsexperimente illustrieren die hohe Selektivität der durch Immunisierung mit der Tetanus-Toxoid-MUC1-Sialyl-T_N-Vakzine **83** induzierten Antikörper.

Das entscheidende Kriterium dafür, dass man Tumorzellen immunologisch angreifen kann, ohne dabei gesundes Gewebe zu zerstören, sollte in der aberanten Glycosylierung des tumorassoziierten Mucin MUC1 liegen. Der Antikörper sollte also zuverlässig nicht an mit langen Glycanen versehene MUC1-Strukturen binden. Bei kurzen tumorassoziierten Glycanen ist jedoch eine Erkennung zu erwarten. Um zu überprüfen, ob der durch die TTox-MUC1-STn-Vakzine **83** induzierte Antikörper an solche Glycopeptide mit kurzen tumorassoziierten Sacchariden bindet, werden zwei weitere Neutralisationsexperimente durchgeführt. Dafür wird zunächst eine Mikrotiterplatte mit einem BSA-MUC1-Neoglycoprotein beschichtet, welches jeweils an den drei Threonin-Einheiten der MUC1-*Tandem-Repeat*-Sequenz mit STn, Tn und Tn glycosyliert ist. Anschließend wird das Serum von Maus 8 ohne Inkubat in die Nuten und in andere Nuten das Serum (Maus 8) nach Inkubation mit der MUC1-STn-Tn-Tn-Struktur eingebracht, und die Bindung analysiert (Abb. 3.4.6.7).

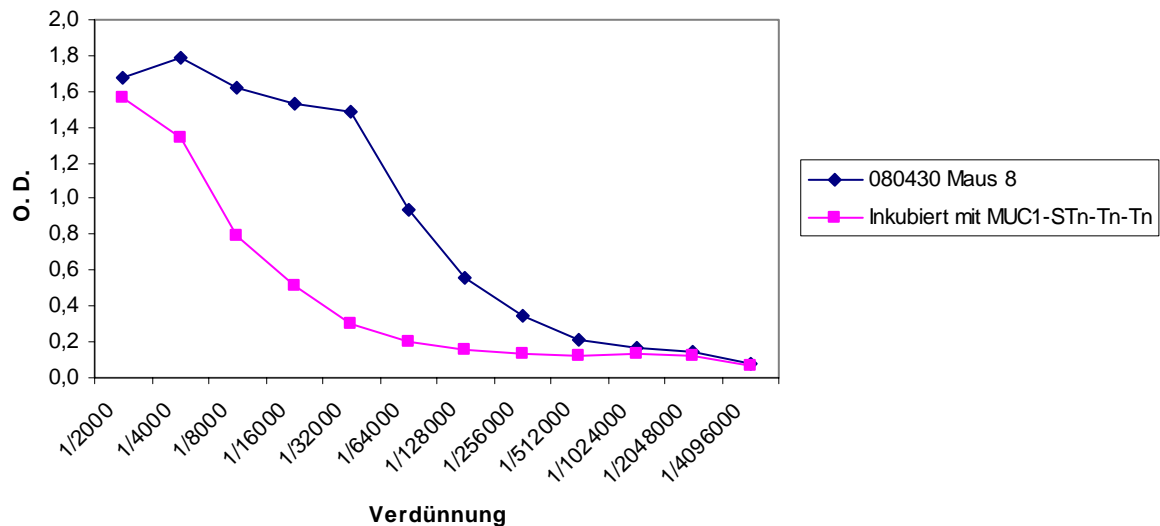


Abb. 3.4.6.7: ELISA des Serums von Maus 8 (080430) ohne und mit Zusatz von MUC1-STn-Tn-Tn (Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-MUC1-STn-Tn-Tn-Konjugat)

Die in Abb. 3.4.6.7 gezeigten Daten zeigen, dass die dreifach glycosylierte MUC1-Sequenz vom Antikörper erkannt wird (siehe auch Linie 7 Abb. 3.4.6.3). Allerdings ist die Erkennung deutlich schwächer als jene der exakten Sialyl-T_N-Antigen-Struktur (Abb. 3.4.5.6).

Zur weiteren Ermittlung der Selektivität der durch Vakzine **83** induzierten Immunreaktion wird eine ELISA-Platte mit BSA-MUC1-2,6-ST-Konjugat **91** beschichtet. Anschließend wird das Serum von Maus 8 einerseits ohne Inkubat und andererseits nach Inkubation mit dem MUC1-2,6-ST-Glycopeptid **67** eingebracht und analysiert (Abb. 3.4.6.8).

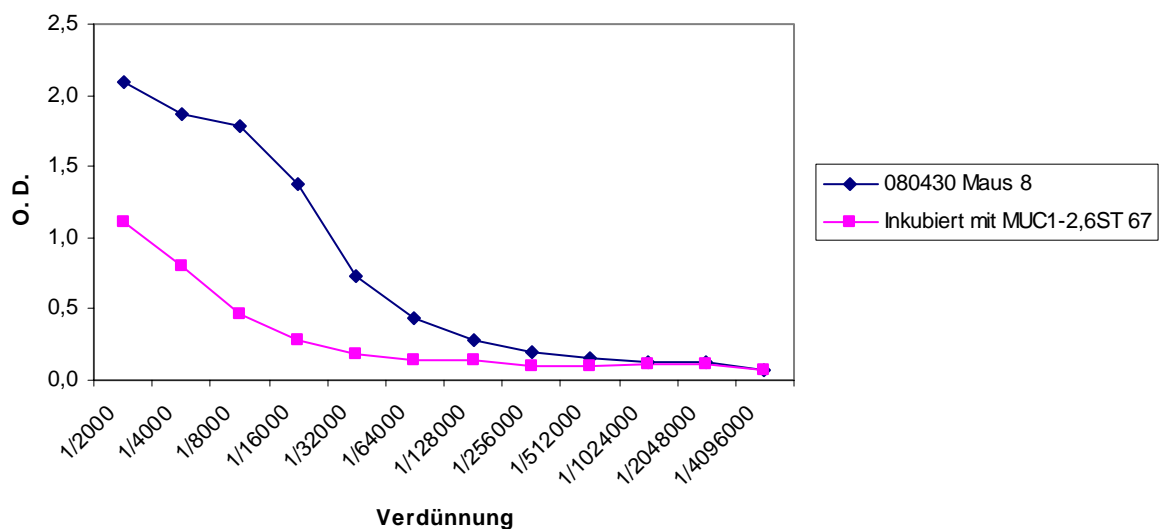


Abb. 3.4.6.8: ELISA des Serums von Maus 8 (080430) ohne und mit Zusatz von MUC1-2,6-ST (Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-MUC1-2,6-ST-Konjugat 91)

Die in Abb. 3.4.6.8 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, dass auch diese glycosylierte MUC1-Antigenstruktur vom Antikörper erkannt wird. Allerdings ist die Erkennung auch in diesem Fall deutlich schwächer im Vergleich zur Inkubation mit dem exakten MUC1-Sialyl-T_N-Glycopeptid-Antigen-Struktur (Abb. 3.4.6.6).

Die oben gezeigten Neutralisationsexperimente belegen einerseits die hohe Spezifität durch die Tetanus-Toxoid-MUC1-ST_N-Vakzine **83** induzierten Antikörper gegen das exakte Glycopeptid-Antigen. Sie zeigen aber auch, dass geringfügige Veränderungen im Saccharidteil akzeptiert werden. Da alle verwendeten Inkubate (Abb. 3.4.6.4) tumorassoziierte Antigenstrukturen verkörpern, sollte durch diese Immunisierungsstrategie eine humorale, gegen Tumorzellen gerichtete Immunantwort induzierbar sein, die selektiv und von praktisch nutzbarer Breite ist.

In einigen klinischen Studien mit Kohlenhydrat-Vakzinen wurden ermutigende Ergebnisse beschrieben, nach denen zirkulierende Tumorzellen lysiert werden konnten.^{253,254,255,256} Das hier beschriebene Impfverfahren könnte ein weiteres Werkzeug sein, mit dem das adaptive Immunsystem gegen tumorassoziierte Glycopeptid-Haptene gerichtet werden kann, um durch die ausgelöste humorale Immunantwort die Lyse von Epitheltumoren zu erreichen.

3.4.7 Immunologische Evaluierung des Tetanus-Toxoid-MUC1-TF-Glycopeptid-Konjugats **86**

Zur Auswertung des synthetisierten Tetanus-Toxoid-Neoglycoproteins **86** als Vakzine werden drei weibliche balb/c-J-Mäuse immunisiert. Nach Primärimmunisierung mit dem vollständigen Freund'schen Adjuvans (CFA) und der Vakzine **86** und zwei Restimulationen mit unvollständigem Freund Adjuvans (IFA) und Vakzine **86** nach jeweils 20 Tagen wurde Blut entnommen und das Serum durch ELISA-Test auf die gegen das MUC1-T-Glycopeptid-Hapten spezifischen Antikörper geprüft (Abb. 3.4.7.1). Hierbei werden die Mikrotiterplatten mit dem MUC1-Glycopeptid-T-Antigen tragenden BSA-Konjugat **85** beschichtet.

²⁵³ G. F. Springer, *J. Mol. Med.* **1997**, 75, 594.

²⁵⁴ D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 477.

²⁵⁵ O. Ouerfelli, J. D. Warren, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Expert Rev. Vaccines* **2005**, 4, 677.

²⁵⁶ S. F. Solvin, S. J. Keding, G. Ragupathi, *Immunol. Cell Biol.* **2005**, 83, 418.

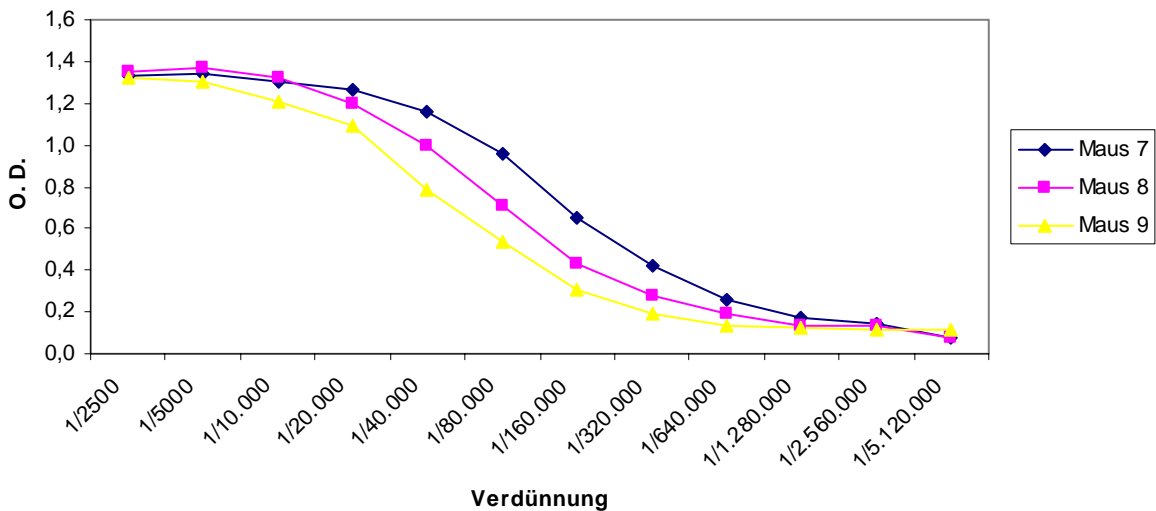


Abb. 3.4.7.1: ELISA der Seren der mit TTox-Vakzine 86 immunisierten Mäuse (nach der 3. Immunisierung, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-Konjugat 85)

Abb. 3.4.7.1 zeigt, dass jede der drei Mäuse eine starke gegen das MUC1-T-Antigen gerichtete Immunantwort induziert. Die Seren der drei Mäuse werden im Folgenden auf ihre gegen das Tetanus-Toxoid gerichteten Antikörper untersucht. Dazu wird eine Mikrotiterplatte mit Tetanus-Toxoid **82** beschichtet. Anschließend werden durch ELISA, die Seren der drei Mäuse analysiert (Abb. 3.4.7.2).

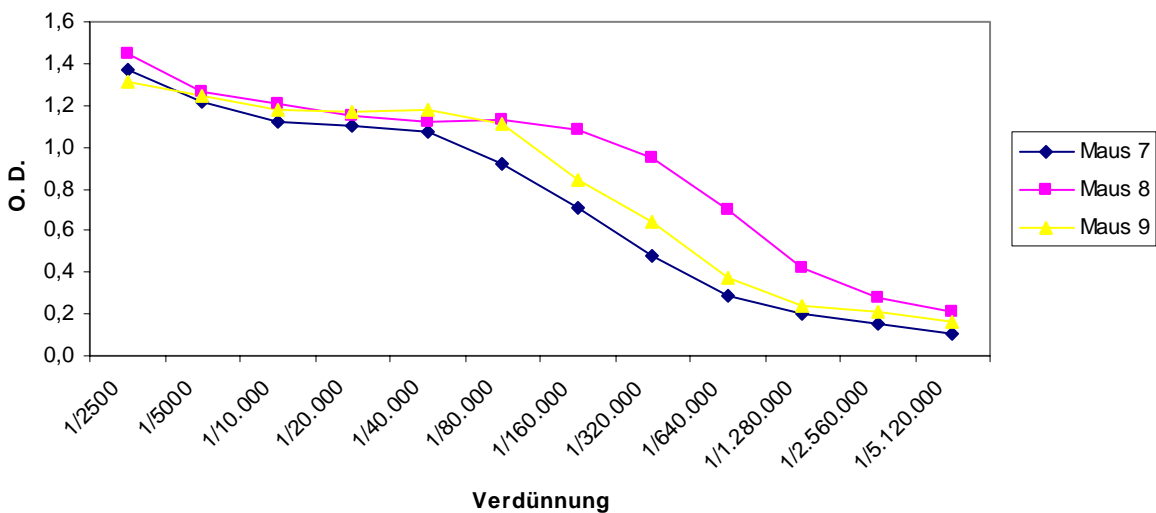


Abb. 3.4.7.2: ELISA der Seren der mit TTox-Vakzine 86 immunisierten Mäuse (nach 3. Immunisierung, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Tetanus-Toxoid 82)

Diese Analyse ergab (Abb. 3.4.7.2), dass die Tetanus-Toxoid-MUC1-T-Vakzine **86** auch Antikörper gegen das Trägerprotein induziert.

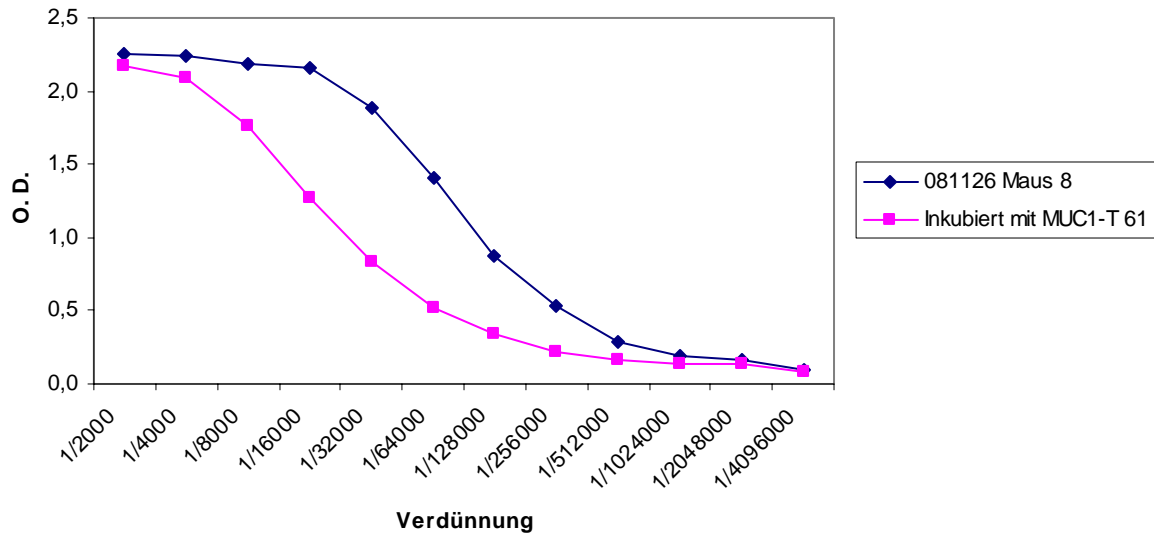


Abb. 3.4.7.2: ELISA des Serums von Maus 8 (081126) ohne und mit Zusatz von MUC1-T 61 (Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-MUC1-T-Konjugat 85)

Um die Selektivität der Antikörper in den Seren gegenüber MUC1-Glycopeptiden zu überprüfen, wird das Serum von Maus 8 (081126) mit der in Kapitel 3.4.5 beschriebenen Auswahl von synthetischen Mucin-Glycopeptiden in Neutralisationsexperimenten (Abb. 3.4.6.3) analysiert. So soll sichergestellt werden, dass die erzeugten Antikörper selektiv nur gegen tumorassoziierte Strukturen gerichtet sind. Da die Neutralisationsergebnisse im Wesentlichen den in Kapitel 3.4.6 zusammengefassten Erkenntnissen entsprechen, wird exemplarisch nur ein Experiment abgebildet (Abb. 3.4.7.2). Zum Neutralisationstest wird zunächst eine Mikrotiterplatte mit dem BSA-MUC1-T-Konjugat **85** beschichtet. Dann wird zum einen das unbehandelte Serum und zum anderen das mit der identischen MUC1-T-Glycopeptid-Struktur inkubierte Serum von Maus 8 (081126) eingefüllt. Durch ELISA-Tests zeigte sich, dass die tumorassoziierte MUC1-T-Glycopeptid-Struktur **61** selektiv erkannt wird. Die Antikörper von Maus 8 (081126) zeigen auch Affinitäten zu den MUC1-Glycopeptid-Antigenen MUC1-STn **77**, MUC1-STn-Tn, MUC1-STn-Tn-Tn und MUC1-2,6-ST jedoch in einem verminderten Maße im Vergleich zur exakten MUC1-T-Glycopeptid-Sequenz **61** aus Abb. 3.4.7.2 (Werte des Neutralisationstest mit den hier beschriebenen Substanzen befinden sich unter 5. Experimenteller Teil).

Die oben aufgeführten Neutralisationsexperimente der durch die Tetanus-Toxoid-MUC1-T-Vakzine **86** induzierte Antikörper bestätigen die in Kapitel 3.4.6 gezogenen Schlussfolgerungen, dass die Antikörper zwar hochspezifisch an die exakte Antigenstruktur binden, aber auch Veränderungen im Saccharidteil akzeptieren.

3.5 Synthese und immunologische Evaluierung von octameren MUC1-Glycopeptid-Antigenen

3.5.1 Dendrimere Glycopeptide

Der Einsatz von Konjugaten aus Antigenen und Proteinen als Vakzin-Kandidaten führt im Allgemeinen zuverlässig zu starken Immunantworten (siehe Kap. 3.4). Jedoch haben diese Konjugate einige Nachteile. Aus synthetischer Sicht ist ein chemoselektiver Konjugationsschritt von Hapten zum Carrier-Protein von entscheidender Bedeutung. Es erfordert der Verwendung eines geeigneten Spacermoleküls. Einige dieser Abstandhalter haben sich als stark immunogen erwiesen, was zu fehlgeleiteten Immunantworten führte.²⁵⁷ Des Weiteren verursachen auf Carrier-Proteinen gegründete Immunisierungen meist zu Immunantworten gegen das Trägerprotein selbst, was zur Folge haben kann, dass die Hauptmenge der produzierten Antikörper gegen Carrier-Epitope gerichtet ist und Immunantworten gegen das Hapten vollständig unterdrückt wird („Carrier-Immundominanz“, „Carrier induced suppression“). Ein anderer Nachteil ergibt sich aus der Komplexität und Größe dieser Verbindungen, die eine vollständige Charakterisierung der Konstrukte praktisch unmöglich macht.

Der Aufbau von dendrimeren Glycopeptiden, z. B. an einem Oligolysin-Kern mittels Festphasensynthese nach MAP-Strategie (MAP: multiple antigen peptides),^{258,259} eröffnet den Zugang zu vollsynthetischen Vakzinen. Dies bietet eine Alternative zu Hapten-Protein-Konjugaten (Abb. 3.5.1).^{260,261,262,263,264,114} Auf diese Weise sind definierte hochmolekulare Moleküle in genügenden Mengen (mg-Maßstab) zugänglich, die in der Hauptmasse aus Hapten bestehen und den Molgewichten von Proteinen nahe kommen.^{265,266,267,268,269,270}

²⁵⁷ T. Buskas, Y. Li, G. J. Boons, *Chemistry Eur. J.* **2004**, *10*, 3517.

²⁵⁸ J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5409.

²⁵⁹ J. P. Tam, Y. A. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 9084.

²⁶⁰ T. Becker, A. Kaiser, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, *7*, 1113.

²⁶¹ S. Keil, A. Kaiser, F. Syed, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, *7*, 1355.

²⁶² C. Ozawa, H. Katayama, H. Hojo, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3531.

²⁶³ J. P. Defoort, B. Nardelli, W. Huang, D. D. Ho, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9084.

²⁶⁴ C. Ozawa, H. Hojo, H. Katayama, K. Nabeshima, T. Akahane, Y. Nakahara, *Pept. Sci.* **2007**, *44*, 45.

²⁶⁵ P. Veprek, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 5.

²⁶⁶ P. Veprek, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 203.

²⁶⁷ P. Niederhafner, M. Reinis, J. Sebestik, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 556.

²⁶⁸ P. Niederhafner, J. Sebestik, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 44.

²⁶⁹ P. Niederhafner, M. Reinis, J. Sebestik, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 2.

²⁷⁰ R. Roy, *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, *1*, 327.

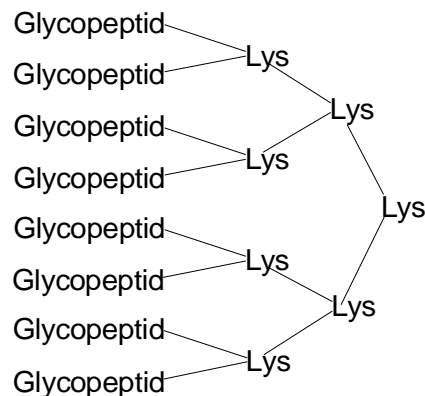


Abb. 3.4.1: Octamere Glycopeptide

Die starke Immunogenität solcher Konstrukte wird u. a. auf ihre Multivalenz (Cluster Effekt) zurückgeführt, die eine stärkere Rezeptorbindung ermöglicht.^{271,272,273} Die Möglichkeit der Quervernetzung von Oberflächenrezeptoren der Immunzelle (Cross linking)²⁷⁴ erhöht dabei zusätzlich die Intensität der Immunantwort. Aufgrund dieser Tatsachen wird vermutet, dass multiple Peptid-Dendrimere, zum einen über MHC-II (Haupt Histokompatibilitätskomplex II) eine humorale Immunantwort induzieren, und zum anderen wie endogene Proteine prozessiert werden, was folgerichtig zur Präsentation auf dem MHC-I-Komplex (Haupt-Histokompatibilitätskomplex I) und so zur verstärkten Bildung von cytotoxischen T-Zellen führt. Auf diese Weise konnten schon erfolgreich Vakzin-Kandidaten gegen HIV^{275,276} und Hepatitis²⁵⁹ hergestellt werden.

²⁷¹ K. L. Rock, *Immunol. Today* **1996** 17, 131.

²⁷² W. R. Heath, F. R. Carbone, *Am. Rev. Immunol.* **2001**, 19, 47.

²⁷³ S. Ota, T. Ono, A. Morita, A. Uenaka, M. Harada, E. Nakayama, *Cancer Res.* **2002**, 62, 1471.

²⁷⁴ W. R. Heath, F. R. Carbone, *Nat. Rev. Immunol.* **2001**, 1, 126.

²⁷⁵ B. Nardelli, Y. A. Lu, D. R. Shiu, C. Delpierre-Defoort, A. T. Profy, J. P. Tam, *J. Immunol.* **1992**, 148, 914.

²⁷⁶ J. P. Defoort, B. Nardelli, W. Huang, D. D. Ho, J. P. Tam, **1992**, 89, 3879.

3.5.2 Synthese von octameren MUC1-Glycopeptiden

Im Folgenden wird die Synthese von octameren Glycopeptiden aus der vollständigen *Tandem Repeat*-Domäne des tumorassoziierten epithelialen Mucins MUC1 geschildert. Aufgrund der multivalenten Präsentation des Haptens, ist das Dendrimer immunogen genug, um eine hochspezifische, humorale Immunantwort gegen Glycopeptid-Partialstrukturen, wie sie nur auf Tumorzellen überexprimiert vorkommen, zu induzieren.^{258,259}

Die dendrimeren Glycopeptide **94**, **96** und **98** werden an einem kommerziell erhältlichen Oligolysin-Harz²⁷⁷ **93** durch Glycopeptidfestphasensynthese^{111,219} aufgebaut. Als Zielstruktur wird die vollständige MUC1-*Tandem Repeat*-Sequenz gewählt, welche einerseits an Thr⁶ mit T_N-Antigen **11a** bzw. mit dem *Thomson-Friedenreich*-Antigen (T-Antigen) **25** und andererseits an Ser⁷ mit Sialyl-T_N-Antigen **22b** glycosyliert sind.

Zunächst werden die Fmoc-Schutzgruppen der *N*-Termini des Harzes **93** mit Piperidin/NMP (1:4) entfernt, bevor alle acht freien Aminofunktionen simultan mit den entsprechenden Fmoc-Aminosäuren im Syntheseautomaten kondensiert wurden. Dies geschieht mit der Reagenzienkombination *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) bei gleichzeitiger Erhöhung der eingesetzten Aminosäureäquivalente von 10 (Standard *FastMoc*-Protokoll) auf 20. Jeweils vier Äquivalente der Fmoc-geschützten T_N-Thr- **11a**, TF-Thr- **25** und Sialyl-T_N-Ser-Bausteine **22b** werden mit den reaktiveren Aza-Analoga der Oben beschriebenen Kupplungsreagenzien (HATU, HOAt)^{260,261} kondensiert, wobei die Vortex-Schüttelzeit auf 5 Stunden ausgedehnt wird. Nach beendeter Festphasensynthese werden die octameren Glycopeptide **94**, **96** und **98** mit Trifluoressigsäure/Wasser/Triisopropylsilan (10:1:1), bei gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten, vom Harz abgespalten (Abb. 3.5.2.1).

²⁷⁷ Novabiochem, Katalog 2002-2003, S. 204, Produkt-Nr. 05-24-0150; *Calbiochem-Novabiochem (Merck Biosciences)*, Schwalbach a. T., Germany.

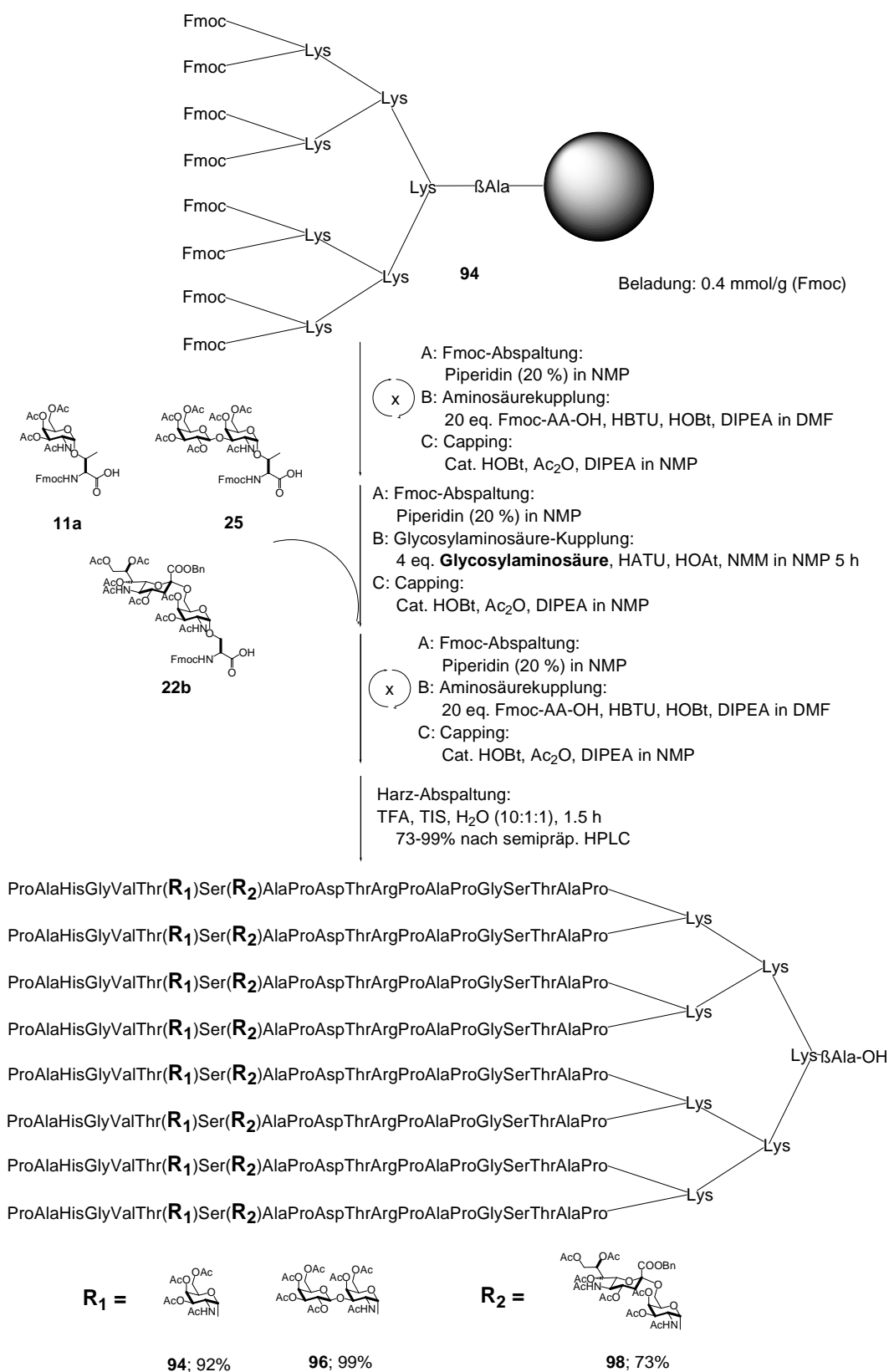


Abb. 3.5.2.1: Festphasensynthese der dendrimeren Glycopeptide 94, 96, 98

Im Anschluss werden die im Kohlenhydratteil befindlichen Acetyl- sowie Benzylesterschutzgruppen mit wässriger NaOH-Lösung bei einem pH-Wert von 11.5 entfernt. Nach semipräparativer HPLC-Reinigung erhält man **95** in 75%-, **97** in 66%- und **99** in 67%-iger Gesamtausbeute über jeweils 42 Stufen in reiner Form als farblose Lyophilisate (Abb. 3.5.2.2; Abb. 3.5.2.3; Abb. 3.5.2.4).

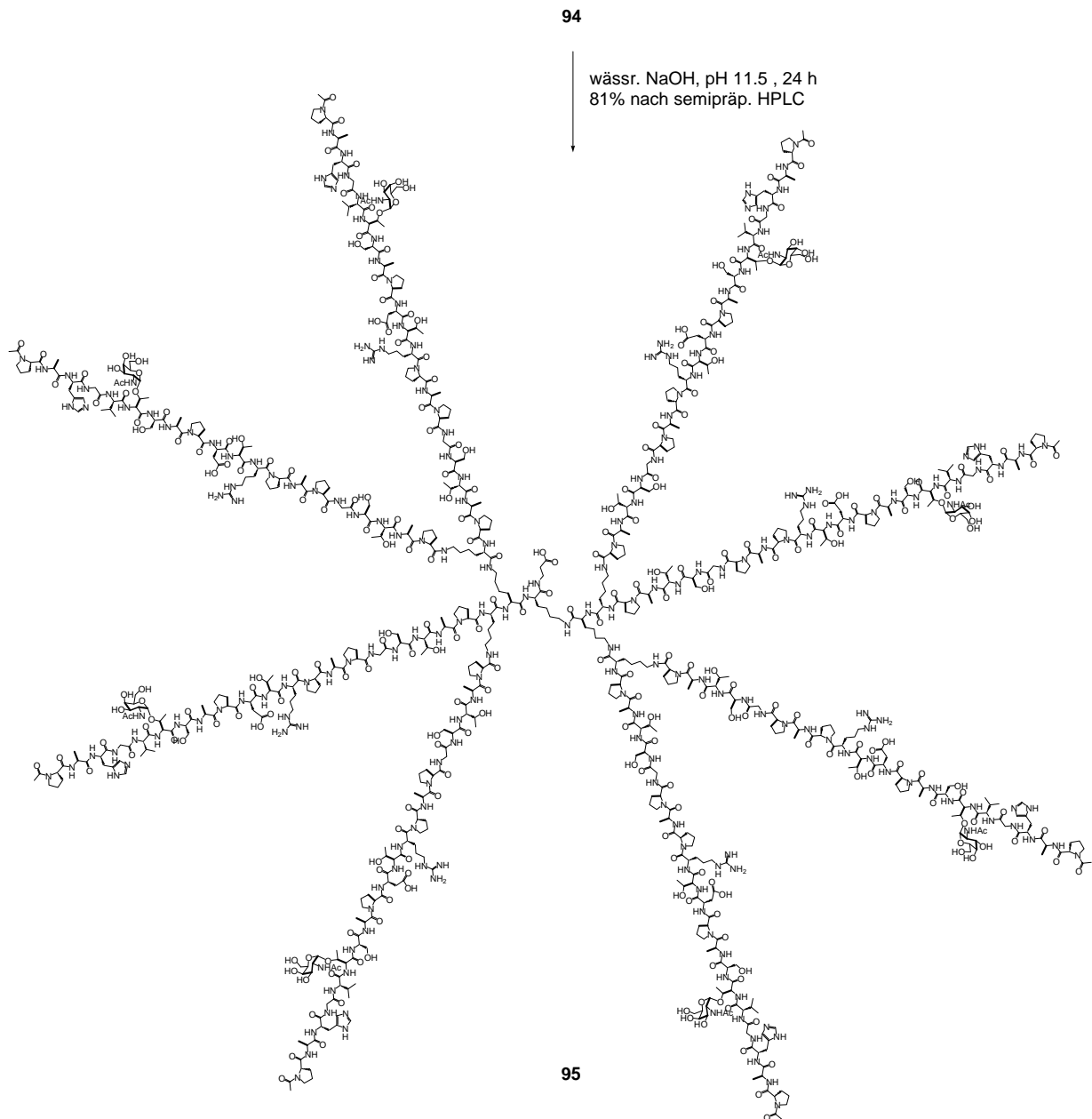


Abb. 3.5.2.2: Abspaltung der Saccharidschutzgruppen von **94**

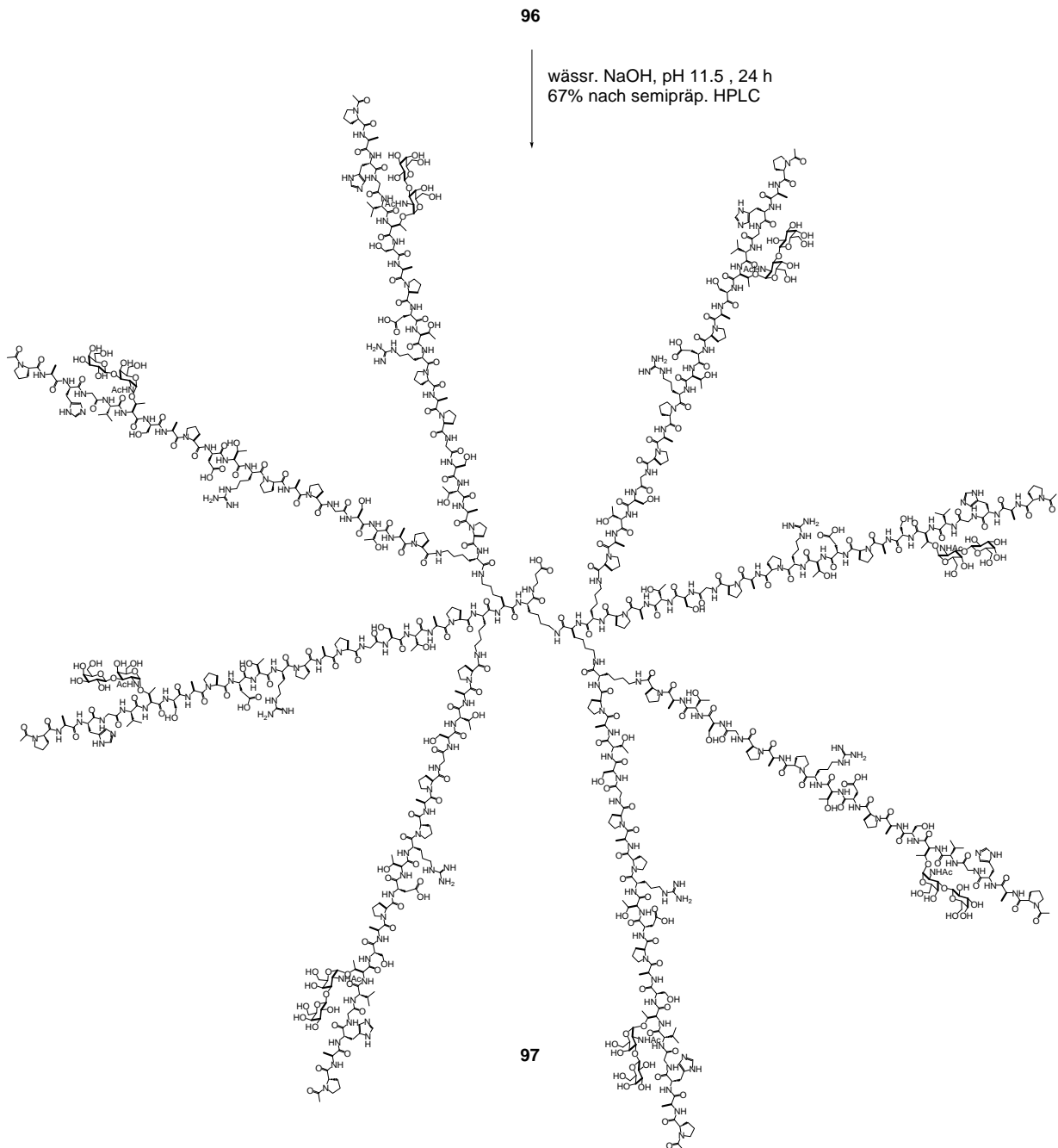


Abb. 3.5.2.3: Abspaltung der Saccharidschutzgruppen von 96

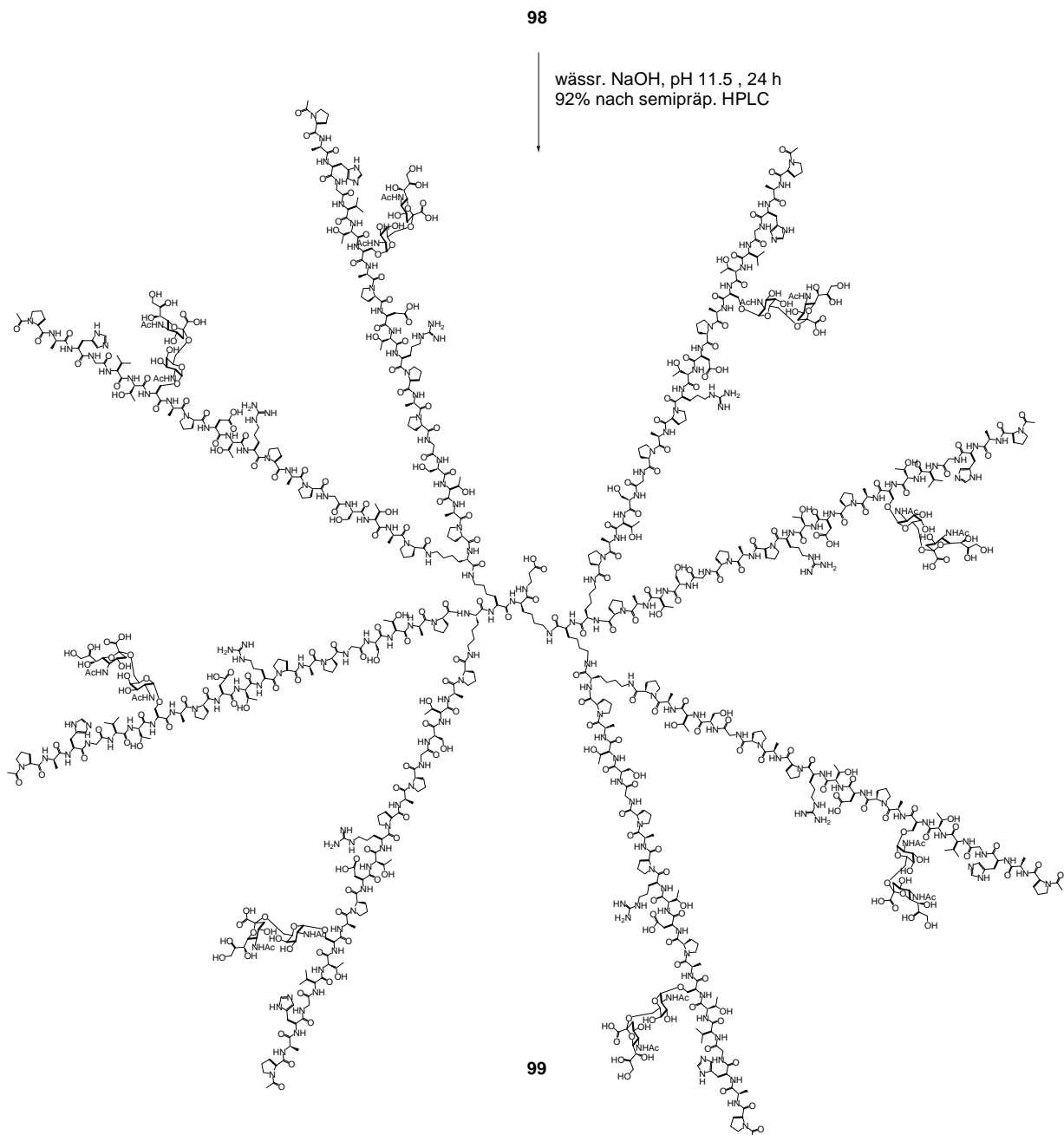


Abb. 3.5.2.4: Abspaltung der Saccharidschutzgruppen von 98

Die Reinigung der dendrimeren Glycopeptide mit Hilfe der RP-HPLC-Chromatographie erwies sich als schwierig. Da die octameren Glycopeptide in mehreren Protonierungsgraden vorliegen, entstehen keine einheitlichen Chromatogramme. Um die Ausbildung dieser unterschiedlichen Protonierungsformen zu vermeiden, werden die Dendrimere eine Stunde mit einer 0.1%-igen

wässrigen TFA-Lösung behandelt, um ein homogenes Protonierungsmuster zu erreichen. Des Weiteren ist die Verwendung von großporigen HPLC-Säulenmaterialien von Vorteil, um ein möglichst schmales Elutionsprofil zu erhalten. Bei Beachtung dieser Kriterien ist es möglich, die Produkte nach der Schutzgruppenmanipulationen in reiner Form zu isolieren. Abb. 3.5.2.5 zeigt das Chromatogramm von Verbindung **97** nach beendeter Deacetylierung.

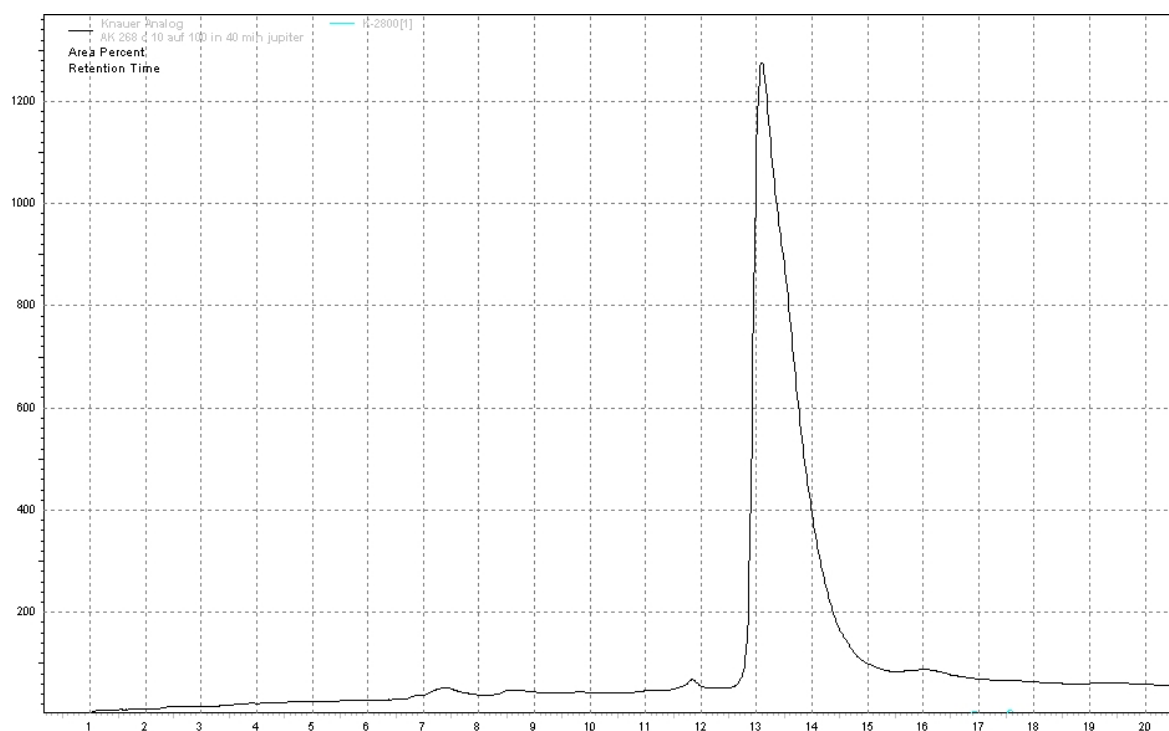


Abb. 3.5.2.5: RP-HPLC-Chromatogramm der semipräparativen Isolierung von **97**

Im 400-MHz- ^1H -NMR-Spektrum des mit Sialyl-Tn glycosylierten MUC1-Dendrimers **99** erkennt man bei $\delta = 2.54$ ppm deutlich das Signal des äquatoriale Protons H_{eq} der Desoxy-Funktion der Neuraminsäure als Dublett vom Dublett (Abb. 3.5.2.6). Die hohe Homogenität dieses Signalsatzes lässt darauf schließen, dass alle acht Glycopeptidketten unabhängig voneinander die gleiche konformative Umgebung besitzen, was ein Indiz dafür ist, dass es zu keiner Interaktion der einzelnen Peptidstränge kommt. Diese strukturelle Identität der Hapten-Epitope ist insbesondere für biologische Anwendungen wichtig. Das Multiplett bei $\delta = 2.44$ ppm zeigt die beiden CH_2 -Gruppen des β -Alanins an, die hier zusammenfallen und relativ schlecht aufgelöst sind, da sie im Zentrum des Oligolysin-Kerns von den Glycopeptid-Antigenen abgeschirmt

werden. Durch Integration beider isolierter Signale lässt sich ein Verhältnis von 8:4 Protonen ableiten, was ein Beleg dafür ist, dass die Verbindung tatsächlich ein Octamer repräsentiert.

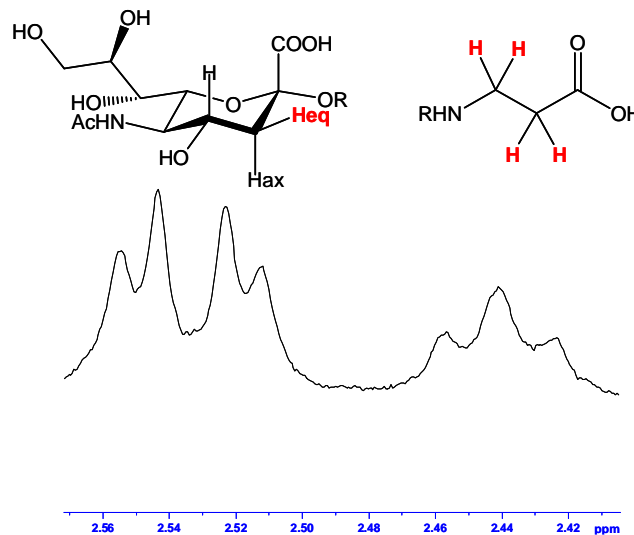


Abb. 3.5.2.6: Ausschnitt des 400 MHz ^1H -NMR-Spektrums von **99**

3.5.3 Immunologische Evaluierung von octameren MUC1-Glycopeptiden

Um die Immunogenität der synthetisierten Konstrukte zu prüfen werden drei weibliche balb/c-J-Mäuse mit dem Glycopeptid-Dendrimer **97** immunisiert. Dazu werden zuerst 10 μg der octameren Vakzine **97** in Kombination mit CFA (vollständigem Freund'-schem Adjuvans) in die Fußsohle injiziert. Drei Auffrischungsimpfungen erfolgen jeweils im Abstand von 21 Tagen. Dazu werden 10 μg Vakzin **97** je Maus zusammen mit IFA (unvollständigem Freund'-schem Adjuvans) intraperitoneal injiziert. Fünf Tage nach jeder Sekundärimmunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Mäuse entnommen, um das daraus gewonnene Serum auf gegen das MUC1-Eicosaglycopeptid **61** spezifische Antikörper mittels ELISA-Test zu untersuchen. Hierzu wird Octamer **97** in einem Phosphatpuffer (PBS) gelöst und in die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte eingefüllt. Dabei bindet es unspezifisch an die Plattenoberfläche. Anschließend werden die Maus-Seren in der ELISA-Platte mit zunehmender Verdünnung titriert, um die Stärke der spezifischen Immunantwort mithilfe eines sekundären, biotinylierten Anti-Maus-Antikörpers über Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase photometrisch zu bestimmen. Alle drei immunisierten Mäuse zeigen schon nach der zweiten Immunisierung eine starke humorale

Immunantwort, die durch die zwei darauffolgenden Restimulationen noch gesteigert werden kann (Abb. 3.5.3.1).

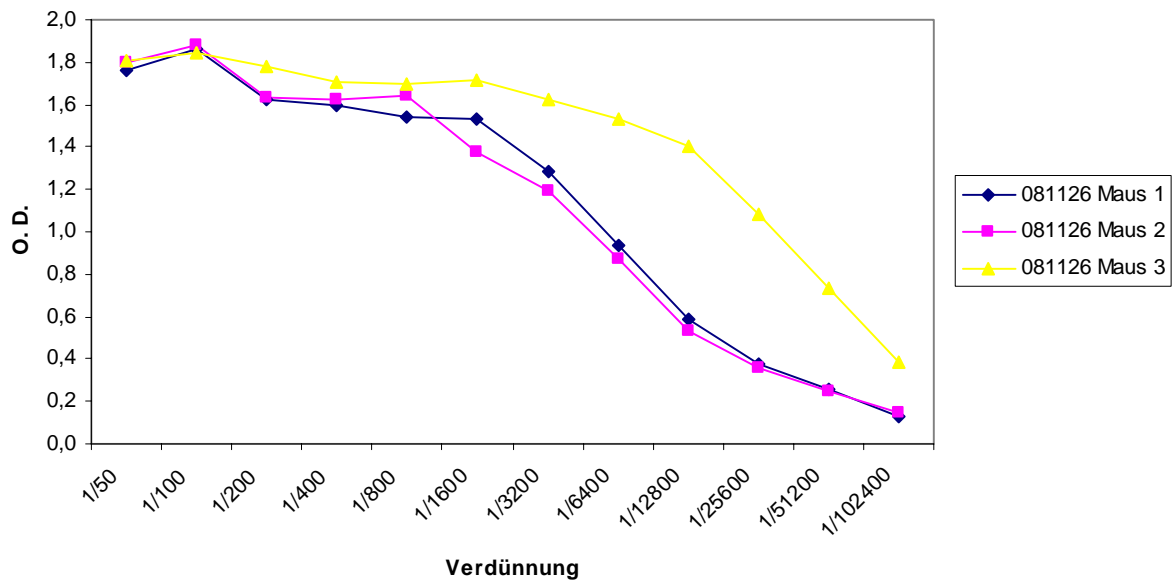


Abb. 3.5.3.1: ELISA der Seren der mit 97 immunisierten Mäuse (nach 3. Immunisierung, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Dendrimer 97

Abbildung 3.5.3.1 zeigt nicht nur, dass durch Immunisieren mit vollsynthetischen Glycopeptid-Dendrimeren robuste toleranzbrechende Immunantworten ausgelöst werden, sondern beweist auch, dass die synthetischen Dendrimeren als Beschichtungen von ELISA-Platten dienen können. So kann man auf die synthetisch aufwendigeren BSA-Konjugate für diese Zwecke verzichten. Sie sind stets nur in geringeren Mengen zugänglich. Die beschriebene Synthesestrategie begünstigt daher ein schnelles Screening von ausgedehnten Substanzbibliotheken, die mit Hilfe der Festphasensynthese gewonnen werden können.

Die erhaltenen IgG-spezifischen Antikörper von Maus 1-3 werden im Folgenden auf ihre Anbindung zu ein mit der identischen MUC1-Glycopeptidstruktur tragendes Neoglycoprotein-Konjugat **85** getestet. Dazu wird das BSA-Konjugat **85** unspezifisch auf die Mikrotiterplatte aufgebracht. Die Auswertung des ELISA-Tests ergab, dass der durch das Dendrimer **97** induzierte Antikörper mit verminderter Affinität auch an dieses Konstrukt spezifisch bindet (Abb. 3.5.3.2). Das eingeschränkte Bindungsvermögen des Antikörpers an das BSA-Konjugat **85** ergibt sich, weil die Dendrimere am C-Terminus des MUC1-Glycopeptid-Epitops nicht über

einen immunkompatiblen Abstandhalter, sondern direkt an die *N*-Termini der Lysine kondensiert sind. Obwohl der Oligolysin-Kern als immunologisch unbedenklich beschrieben wird, hat die direkte Anbindung strukturelle Differenzen im Vergleich zu Spacer-gebundenen Glycopeptiden zur Folge. Um äquivalente Antikörperreaktionen auszulösen, müsste nach Deblockierung der *Fmoc*-Schutzgruppen des Harzes **93** zunächst der Oligoethylenglycol-Spacer **53** in die Synthese integriert werden bevor das MUC1-Glycopeptid aufgebaut wird. Diese Vakzine sollte dann identische Ergebnisse liefern, unabhängig von der Beschichtung.

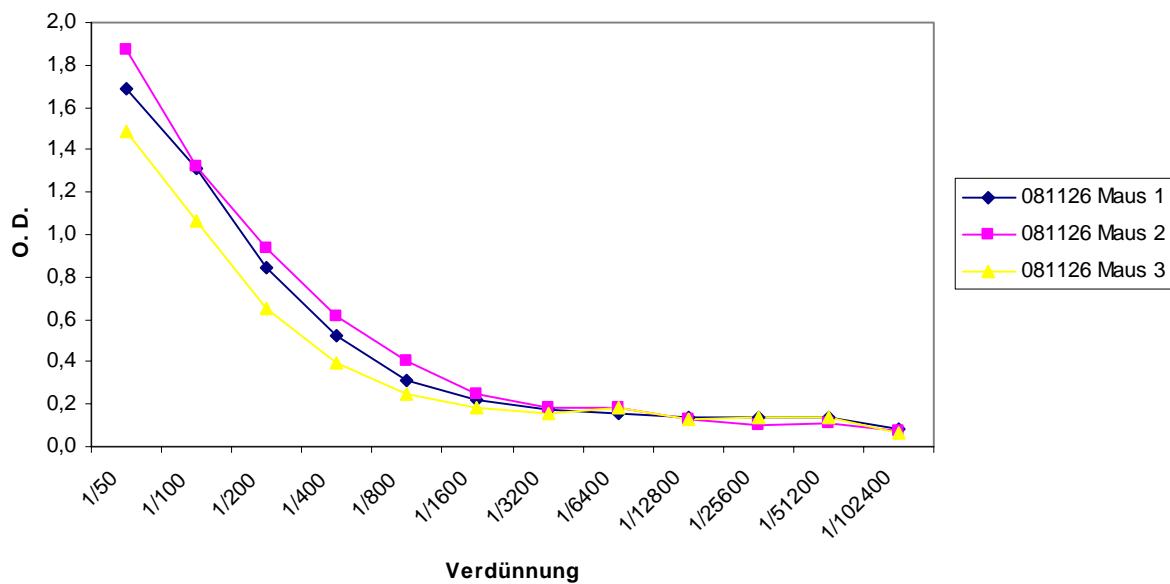


Abb. 3.5.3.2: ELISA der Seren der mit 97 immunisierten Mäuse (nach 3. Immunisierung, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit MUC1-TF-Glycopeptid-BSA-Konjugat 85).

Die hier gezeigte Synthese von dendrimeren Glycopeptiden aus einer Partialstruktur des tumorassoziierten Mucin MUC1 stellt ein robustes Verfahren zum Aufbau octamerer Antigene in hochreiner Form dar. Diese Verbindungen sind im Stande eine starke hochspezifische humorale Immunantwort zu induzieren. Ihre mögliche Prozessierung entsprechend den endogenen Proteinen sollte über MHC-I zu einer cytotoxischen T-Zellantwort führen, welche das Immunsystem zusätzlich im Kampf gegen Epitheltumore unterstützen sollte. Das gezeigte Verfahren repräsentiert ein erfolgsversprechendes Konzept für die Entwicklung einer selektiven Antitumor-Vakzine, die das Potenzial besitzt die Antikörperproduktion gegen Karzinoma entscheidend zu verstärken und dabei benigne Zellen unangetastet zu lassen.

3.5.4 Synthese eines immunkompatiblen octameren MUC1-Glycopeptids

Aufgrund der Erkennungsdifferenzen, der in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Seren im Bezug auf die Beschichtungen mit octamerem-MUC1-Glycopeptid **97** und BSA-MUC1-TF-Konjugat **85**, wurde die These aufgestellt, dass die Verwendung eines immunkompatiblen Abstandhalters von Nöten ist. Eine dendrimere Vakzine, welche am Lysin-Kern zunächst mit einem Oligoethylenglycol-Spacer versehen wurde, bevor das tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid-Antigen aufgebaut wird, sollte eine Immunantwort induzieren, die auf beiden Beschichtungen die äquivalente Antikörperkonzentration liefert. Um mehr Strukturvielfalt zu erzeugen, wird bei der folgenden Synthese die am C-Terminus um zwei Aminosäuren verlängerte *Tandem-Repeat*-Sequenz des tumorassoziierten epithelialen Mucins MUC1 verwendet. Somit beinhaltet die MUC1-Sequenz die STAPPA-Aminosäurereihenfolge, welche einerseits ein CD8-T-Zellepitop andererseits in der glycosylierten Form ein immundominantes Epitop repräsentiert. Gleichzeitig soll diesmal das Threonin¹⁸ durch den Sialyl-T_N-Threonin Baustein ersetzt werden.

Das octamerne MUC1-Doeicosaglycopeptid **100** wird am kommerziell erhältlichen Oligolysin-Harz **93** durch Glycopeptidfestphasensynthese nach oben beschriebener Methodik synthetisiert. Zunächst werden die *Fmoc*-Schutzgruppen der *N*-Termini des Harzes **93** mit Piperidin/NMP (1:4) entfernt, bevor alle acht freien Aminofunktionen simultan mit der Spaceraminosäure **53** im Syntheseautomaten kondensiert werden. Anschließend werden die nächsten vier Aminosäuren im Syntheseautomaten gekuppelt, bevor der glycosylierte *Fmoc*-Aminosäurebaustein **22a** mit den reaktiveren Aza-Analogen Kupplungsreagenzien (HATU, HOAt) kondensiert wird, wobei die Vortex-Schüttelzeit auf 5 Stunden ausgedehnt wird. Nach Kupplung der darauffolgenden 17 Aminosäuren wird das octamere Glycopeptide **100** mit Trifluoressigsäure/Wasser/Triisopropylsilan (10:1:1) vom Harz abgespalten, bei gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten in 94%-iger Ausbeute nach semipräparativer RP-HPLC (Abb. 3.5.4.1).

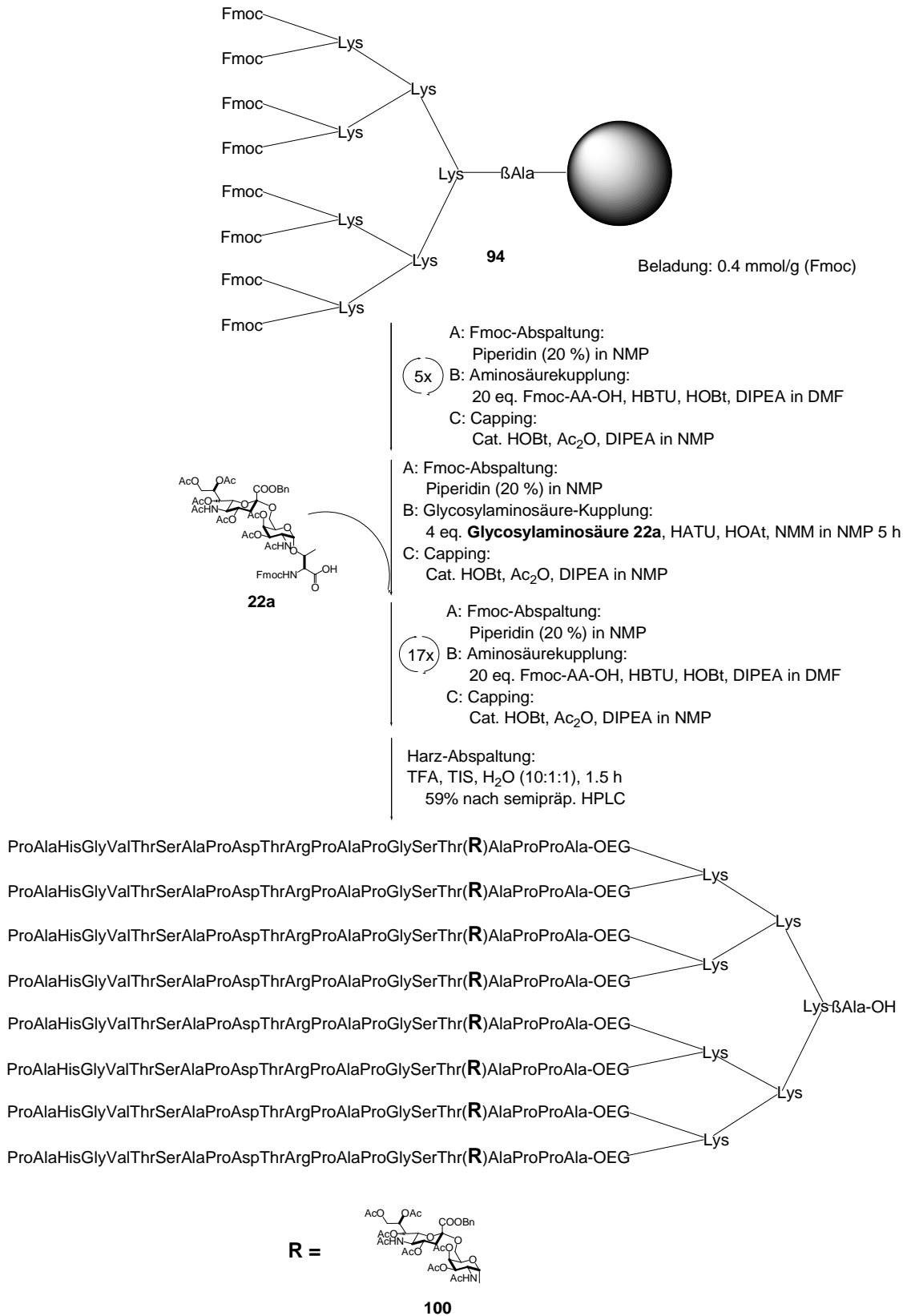


Abb. 3.5.4.1: Festphasensynthese des dendrimeren Glycopeptids 100

Im Anschluss werden die im Kohlenhydratteil befindlichen Acetyl- und Benzylesterschutzgruppen in wässriger NaOH-Lösung bei pH 11.5 entfernt. Nach semipräparativer HPLC-Reinigung erhält man das octamere MUC1-Doeicosaglycopeptid **101** als farbloses Lyophilisat (Abb. 3.5.4.2). Auch hier wird das äquatoriale Proton der Neuraminsäure-Desoxy-Position als isoliertes Dublett vom Dublett im NMR-Spektrum sichtbar.

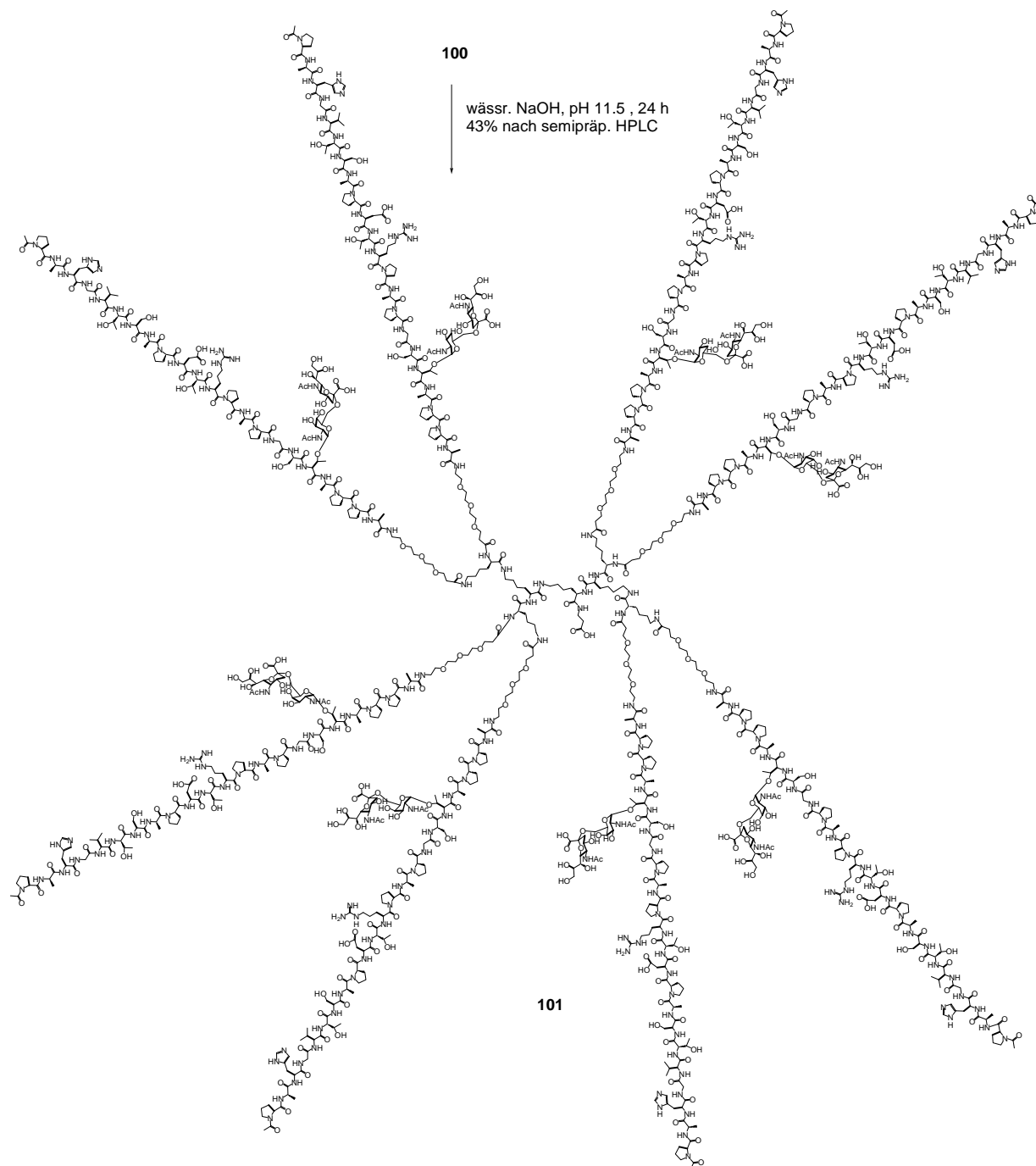


Abb. 3.5.4.2: Synthese des deblockierten MUC1-Octamer **101**

3.6 Synthese und immunologische Evaluierung von MUC1-Glycopeptid-Mitogen-Konjugaten

3.6.1 Glycopeptid-Mitogen-Konjugate

Mitogene sind Verbindungen, die in der Lage sind, B- sowie T-Zellen auf eine nicht vom Antigen abhängige Art und Weise zu stimulieren. Das Mitogen *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3-bispalmitoyloxy-(2*R*)-propyl)-(R)-cystein (*Pam*₃Cys) kommt bei einigen Immunisierungsverfahren zum Einsatz.^{278,279} *Pam*₃Cys ist ein synthetisches Pendant zum *N*-Terminus eines Lipoproteins aus der äußeren Membran des *Escherichia-coli*-Bakteriums. Wie das Lipoprotein kann *Pam*₃Cys B-Zellen, Monocyten und Neutrophile aktivieren.^{280,281} In Optimierungsstudien wurde herausgefunden, dass sich die biologische Aktivität des *Pam*₃Cys durch Anbindung der Aminosäuren Serin und viermal Lysin am C-Terminus des Cysteins um ein Vielfaches erhöhen lässt.²⁸² Das so erhaltene *Pam*₃CysSerLysLysLysLys (Abb. 3.6.1.1) ist zusätzlich ein TLR2-Agonist (toll-like-receptor 2).²⁸³

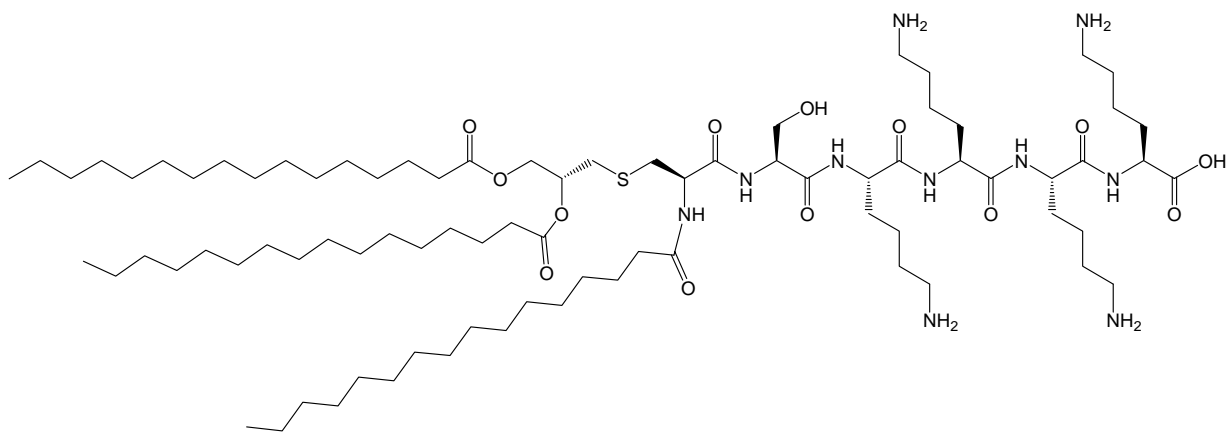


Abb. 3.6.1.1: *Pam*₃CysSerLysLysLysLys

²⁷⁸ G. Jung, C. Carrera, H. Brückner, W. G. Bessler, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1608.

²⁷⁹ G. Jung, K.-H. Wiesmüller, W. Scheuer, W. G. Bessler, *Pept.: Struct. Funct., Proc. Am. Pept. Symp.*, 8th **1983**, 179.

²⁸⁰ K.-H. Wiesmüller, S. Freund, G. Jung, M. Krug, G. Folkers, G. Hess, *Peptides* **1988**, 695.

²⁸¹ J. W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 38, 545.

²⁸² J. Metzger, G. Jung, W. G. Bessler, P. Hoffmann, M. Strecker, A. Lieberknecht, U. Schmidt, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1969.

²⁸³ R. Spohn, U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, K.-H. Wiesmüller, *Vaccine* **2004**, 22, 2494.

Toll-like-Rezeptoren gehören zu den Komponenten der angeborenen Immunität und erkennen eine definierte Auswahl von Mikroorganismen anhand charakteristischer Strukturmerkmale (PAMPs, pathogen-associated molecular pattern).²⁸⁴ Durch die Anbindung von Pam₃CSK₄ an den Toll-like-Rezeptor-2 kommt es zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, die die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort unterstützen und über den MHC-II Komplex die Antikörperproduktion induzieren.^{285,286} Mit der kovalenten Konjugation des Mitogens Pam₃CSK₄ an ein MUC1-Glycopeptid B-Zell-Epitop sollte es möglich sein, selektive Immunantworten zu erzielen.^{287,288,289,71,290} Des Weiteren können solche Lipoglycopeptid-Konjugate auch als Adjuvantien in Immunisierungen eingesetzt werden.^{291,292,293} Lipid-Strukturen, die kovalent an polare Proteine oder Peptide gebunden sind, induzieren häufig Überstrukturen wie Micellen oder Liposome,²⁹⁴ die bei Immunisierungen den Depot-Effekt zur Folge haben.^{295,296,297} Dieser Effekt ermöglicht die partielle, verzögerte Verteilung eines Impfstoffes in der Blutbahn aufgrund seiner mäßigen Löslichkeit in Wasser. Bei Immunisierungen mit polaren Vakzinen wird dieser Effekt unter Verwendung des beim Menschen nicht zugelassenen kompletten Freund'schen Adjuvans (CFA) induziert. Somit sind Glycopeptid-Mitogen-Konjugate im Hinblick auf die Entwicklung von humanen Vakzinen auch als Adjuvantien einsetzbar.^{298,299,300}

Auf dieser Basis sollen nun Konjugate bestehend aus MUC1-Glycopeptid und dem Mitogen Pam₃CSK₄ über einen nicht immunogenen Abstandhalter kovalent verknüpft werden, um sie in Immunisierungsexperimenten einsetzen zu können.

²⁸⁴ B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, J. A. Hoffmann, *Cell* **1996**, 86 973.

²⁸⁵ K. Dabbagh, D. B. Lewis, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2003**, 16, 199.

²⁸⁶ M. M. Pütz, W. Ammerlaan, F. Schneider, G. Jung, C. P. Muller, *Vaccine* **2004**, 22, 4173.

²⁸⁷ G. F. Springer, *J. Mol. Med.* **1997**, 75, 594.

²⁸⁸ D. Galonic, D. Y. Gin, *Nature* **2007**, 446, 1000.

²⁸⁹ S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 663.

²⁹⁰ S. Ingale, M. A. Wolfert, T. Buskas, G.-J. Boons, *ChemBioChem* **2009**, 10, 455.

²⁹¹ B. Frisch, A. Roth, F. Schuber, *Methods Enzymol.* **2003**, 373, 51.

²⁹² G. R. Matyas, J. M. Muderhwa, *Methods Enzymol.* **2003**, 373, 34.

²⁹³ E. Ribi, J. Cantrell, K. Takayama, N. Qureshi, J. Peterson, *Rev. Infect. Dis.* **1984**, 6, 567.

²⁹⁴ S. Ingale, T. Buskas, G.-J. Boons, *Org. Lett.* **2006**, 8, 5785.

²⁹⁵ M. J. Copland, M. A. Baird, T. Rades, J. L. McKenzie, B. Becker, F. Reck, P. C. Tyler, N. M. Davies, *Vaccine* **2003**, 21, 883.

²⁹⁶ I. Fernandes, B. Frisch, S. Muller, F. Schuber, *Mol. Immunology* **1997**, 34, 569.

²⁹⁷ C. L. van Broekhoven, C. R. Parish, C. Demangel, W. J. Britton, J. G. Altin, *Cancer Res.* **2004**, 64, 4357.

²⁹⁸ C. R. Kensil, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1996**, 13, 1.

²⁹⁹ D. Krikorian, E. Panou-Pomonis, C. Voitharou, C. Sakarellos, M. A. Sakarellos-Daitsiotis, *Bioconjug. Chem.* **2005**, 16, 812.

³⁰⁰ S. D. C. Müller, M. R. Müller, M. Huber, U. v.d. Esche, C. J. Kirschning, H. Wagner, W. G. Bessler, K. Mittenbühler, *Int. Immunopharm.* **2004**, 4, 1287.

Die synthetische Anbindung soll über eine Amid-Bindung erfolgen. Ein linearer Aufbau unter Verwendung der Festphasenpeptidsynthese und anschließende Verküpfung des *N*-Terminus des Glycopeptids mit dem freien *C*-Terminus des Pam₃Cys schlug leider fehl.¹¹⁴ Nach Abspaltung der Sequenz vom Harz konnte das vollständig blockierte Lipoglycopeptid zwar erhalten werden, allerdings zog die Deblockierung der Acetyl-geschützten Hydroxygruppen unter basischen Bedingungen auch einen Verlust der Palmitinsäureester nach sich.¹¹⁴ Aus diesem Grund wurde beschlossen, eine chemoselektive Fragmentkondensation⁶⁸ zwischen einem vollständig deblockierten MUC1-Glycopeptid, welches über einen Oligoethylenglycol-Spacer mit einer freien Amino-Gruppe versehen ist, und einem vollständig blockierten TLR-2-Agonisten-Pam₃CSK₄ mit freiem *C*-Terminus durchzuführen (Abb. 3.6.1.2).

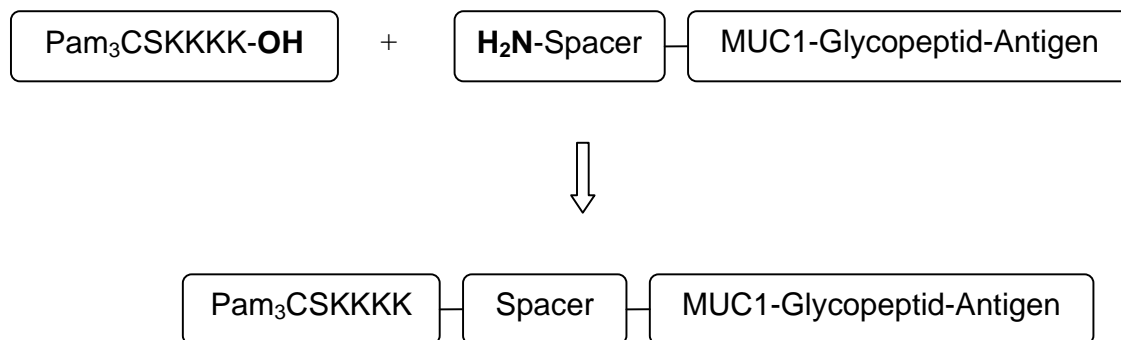


Abb. 3.6.1.2: geplante Fragmentkondensation

3.6.2 Synthese von Pam₃Cys-OH

Die Synthese des Mitogens *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3-bispalmitoyloxy-(2*R*)-propyl)-(R)-cystein (**111**), welches später als Festphasenbaustein zum Einsatz kommen soll, wird nach einer literaturbekannten Vorschrift in sechs Stufen durchgeführt.³⁰¹ Ausgehend von L-Cystin (**102**) wird zunächst der *C*-Terminus mit *tert*-Butylacetat (**103**) in den *tert*-Butylester **104** überführt.³⁰² In die freie Amino-Funktion wird mit *Fmoc*-OSu in THF die *Fmoc*-Schutzgruppe eingeführt, bevor reduktiv mit Zink unter sauren Bedingungen die Disulfid-Brücke von **105** gespalten wird. Die freie Thiol-Gruppe wird mit (R)+Glycidol (**106**) in den entsprechenden Thioether **107**

³⁰¹ F. Reichel, A. M. Roelofsen, H. P. M. Geurts, T. I. Hamalainen, M. C. Feiters, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7989.

³⁰² M. J. Amaral, M. A. Macedo, M. I. Oliveira, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1977**, *2*, 205.

überführt, der mit der für das Pam₃Cys charakteristischen Glycerin-Seitenkette verknüpft ist. In Aktivitätsstudien hat sich gezeigt, dass das R-Derivat bis zu 3x aktiver als das S-Diastereomer ist. Durch *Steglich*-Veresterung (DIC, kat. DMAP) werden die beiden freien Hydroxy-Einheiten in Palmitinsäureester überführt. Anschließende Umsetzung mit Piperidin/DMF spaltet die *Fmoc*-Schutzgruppe ab und ermöglicht die Acylierung mit Palmitinsäure (**108**) unter Verwendung von TBTU/HOBt in DMF zum Ester von Pam₃Cys **110**. Die acidolytische Spaltung des *tert*-Butylesters mit TFA liefert den Pam₃Cys-Festphasenbaustein **111** in 50%-iger Gesamtausbeute ausgehend von L-Cystin (**102**) über sechs Stufen ohne die Verwendung chromatographischer Trennverfahren, was diese Synthese besonders attraktiv macht (Abb. 3.6.2).

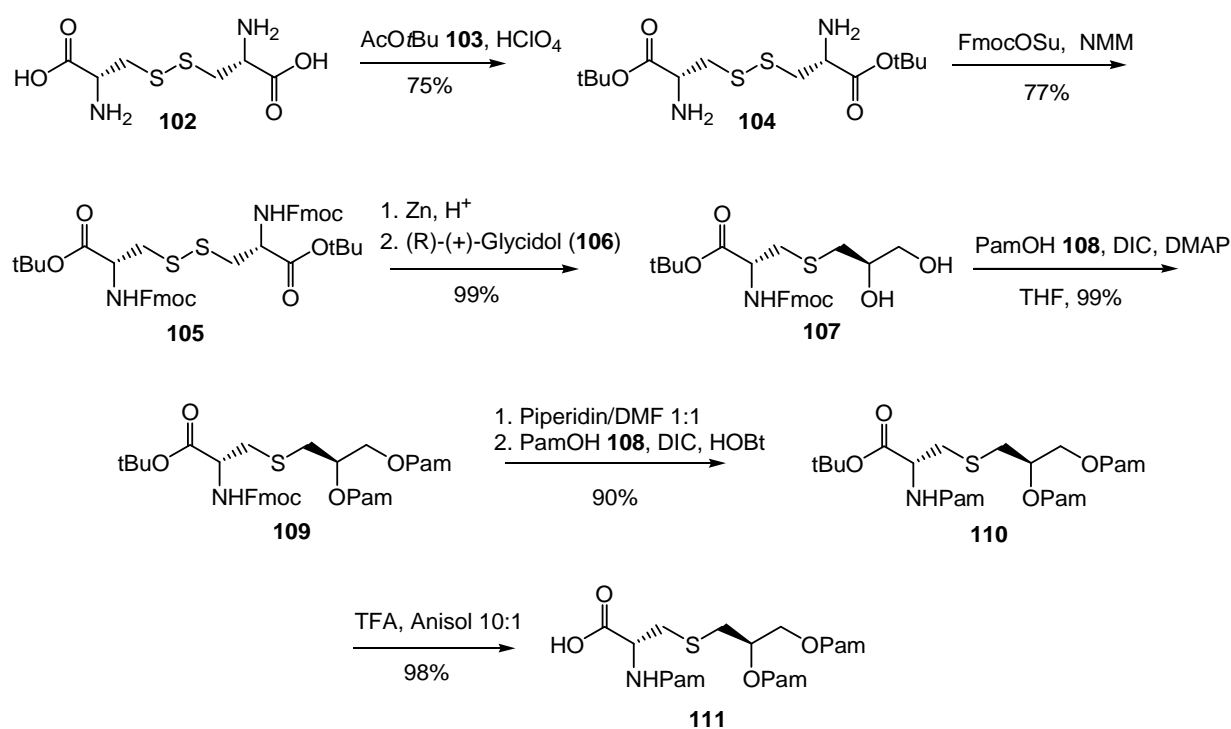


Abb. 3.6.2: Synthese von Pam₃Cys-OH **111**

Leitstrukturoptimierung an Pam₃Cys z. B. durch Ersatz der Palmitinester durch Ether oder Ersatz des Schwefels durch andere Heteroatome führte ausnahmslos zu Aktivitätsverlusten.²⁸²

3.6.3 Synthese des TLR2-Agonisten Pam₃CysSerLysLysLysLys

Die Synthese von Pam₃CSK₆ soll an der festen Phase durchgeführt werden. Um eine spätere Konjugation mit einem deblockierten Glycopeptid chemoselektiv über eine Amid-Bindung zu gewährleisten, muss der TLR2-Agonist vollständig geschützt vorliegen. Hierzu sollen die Aminosäuren Serin und Lysin jeweils mit der *tert*-Butyl bzw. *tert*-Butyloxycarbonyl Schutzgruppe versehen werden. Des Weiteren muss die Festphasen-Lipopeptidsynthese an einem geeigneten Ankermolekül stattfinden, welches es ermöglicht, das voll geschützte Konstrukt von der festen Phase quantitativ zu lösen. Da das Zielmolekül sowohl säurelabile (*t*-Bu, BOC) als auch basenlabile (Palmitinester) Bereiche enthält, muss die verwendete Ankergruppe unter möglichst neutralen Bedingungen spaltbar sein. Bei solchen Problemen hat sich der Phenyltrimethylsilyethyl (PTMSE)-Linker als besonders geeignet erwiesen. Dieser Anker kann unter Verwendung von Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in Dichlormethan gespalten werden. Diese weitestgehend neutrale Reagenzienkombination löst eine *Peterson*-Olefinierung unter Bildung eines Styrol-Derivats und der freien Carboxylgruppe am C-Terminus des wachsenden Peptids aus (Abb. 3.6.3).

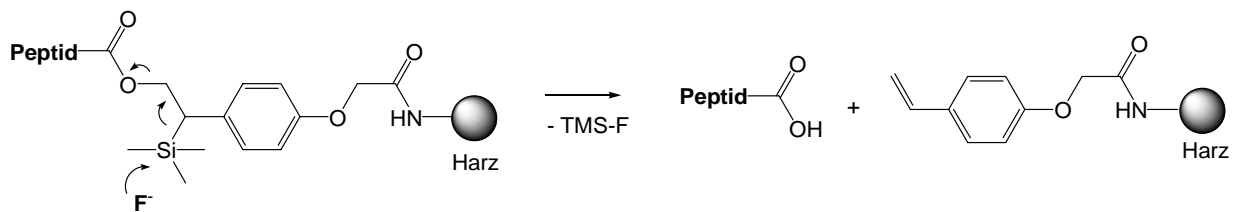


Abb. 3.6.3: Abstaltung des PTMSE-Ankersystems

Um die Lipopeptid-Festphasensynthese des TLR-2-Agonisten Pam₃CSK₆ nach dem PTMSE-Protokoll durchzuführen, bedarf es zunächst der Synthese des mit Lysin vorbeladenen PTMSE-Ankers.

3.6.4 Synthese des Lysin-PTMSE-Systems

Die Darstellung des PTMSE-Linkers³⁰³ erfolgt ausgehend von *p*-Bromphenol (**112**), welches quantitativ mit Ethylvinylether und katalytischen Mengen an Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTS) in Dichlormethan zu 1-(4-Bromphenoxy)-1-ethoxyethan (**113**) umgesetzt wird. Für die Cuprat-Addition zum 2-(*p*-Ethoxyethoxyphenyl)-2-trimethylsilyl-ethanol (**114**) wird 2-Trimethylsilyloxiran (**115**) synthetisiert. Dies wird aus Trimethylvinylsilan (**114**) mit *m*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) erhalten. Für die *Gilman*-Cuprat-Addition zum Linkersystem wird **113** bei -65 °C mit *n*-Butyllithium lithiiert und anschließend mit Kupfer(Diodid) einer Transmetallierung^{304,305,306} unterzogen, bevor mit Oxiran (**115**) in *para*-Position des Phenylrings zum 2-Aryl-2-silyl-ethanol **116** umgesetzt wird (Abb. 3.6.4.1).

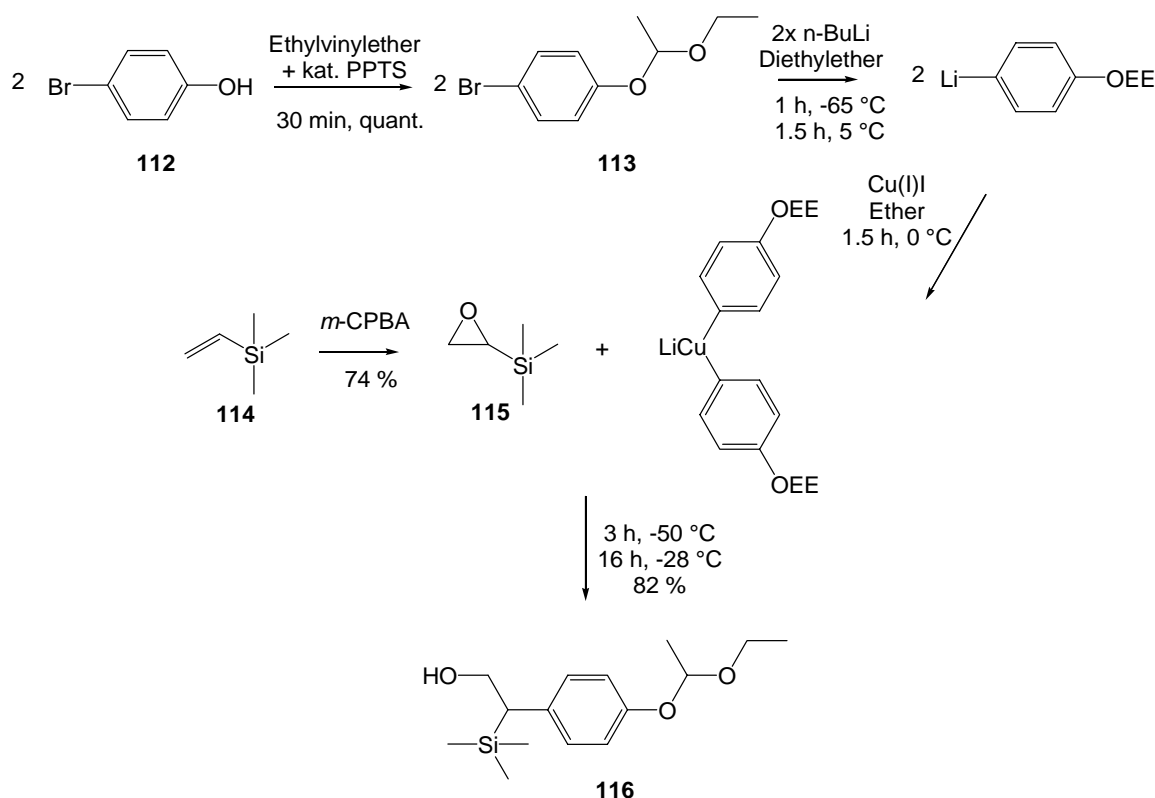


Abb. 3.6.4.1: Synthese des PTMSE-Linkers **116**

³⁰³ M. Wagner, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2001.

³⁰⁴ J. J. Eisch, J. E. Galle, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2615.

³⁰⁵ J. J. Eisch, J. E. Galle, *J. Organomet. Chem.* **1988**, *341*, 293.

³⁰⁶ N. E. Schore, M. C. Croudace, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5356.

Zur Anknüpfung des Silyl-Linkers **116** an einen polymeren Träger muss **116** geeignet funktionalisiert werden. Die Verküpfung soll über eine Amidbindung erfolgen, deshalb wird der Anker mit einer Säurefunktion versehen. Dazu wird die Ethoxyethyl-Schutzgruppe mit katalytischen Mengen an PPTS in Methanol quantitativ entfernt. Im Folgeschritt wird die phenolische Hydroxygruppe selektiv mit Chloressigsäureallylester (**118**), Kaliumcarbonat und Kaliumjodid in Aceton zum 4-(2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)-ethyl)-phenoxy-essigsäureallylester (**119**) umgesetzt (Abb. 3.6.4.2). Aufgrund des niedrigeren pK_S -Wertes der phenolischen OH-Gruppe wird durch gezielte Wahl der Reaktionsbedingungen die aliphatische OH-Gruppierung nicht angegriffen.

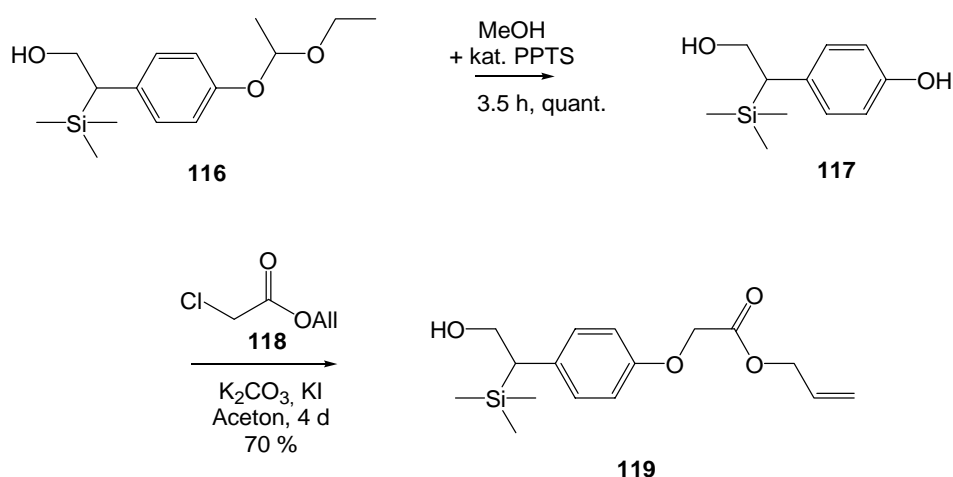


Abb. 3.6.4.2: Funktionalisierung des PTMSE-Linkers

Nachdem die geschützte Säurefunktion in das Linkersystem eingebracht wurde, kann die Beladung des Ankers erfolgen. Dies geschieht, indem die gewünschte Fmoc-Aminosäure unter *Steglich*-Bedingungen (DCC, kat. DMAP) mit der Hydroxyfunktion von **119** verestert wird. Im Hinblick auf die Festphasensynthese des TLR-2-Agonisten Pam₃CSK₄ wird der Linker mit Fmoc-Lysin(BOC) **120** beladen. Nach erfolgreicher Beladung des PTMSE-Linkersystems kann die Anknüpfung an den polymeren Träger durchgeführt werden. Zum Deblockieren der Säurefunktion wird der Allylester **119** mit $Pd(PPh_3)_4$ und NMA (*N*-Methylanilin) in THF gespalten,^{307,308} bevor man die Säure durch

³⁰⁷ O. Knöll, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2004.

³⁰⁸ M. Ciommer, H. Kunz, *Synlett*. 1991, 8, 593.

Aktivierung mit HOBt/TBTU/DIPEA in DMF/CH₂Cl₂, an ein aminofunktionalisiertes Polymerharz bindet (Abb. 3.6.4.3).

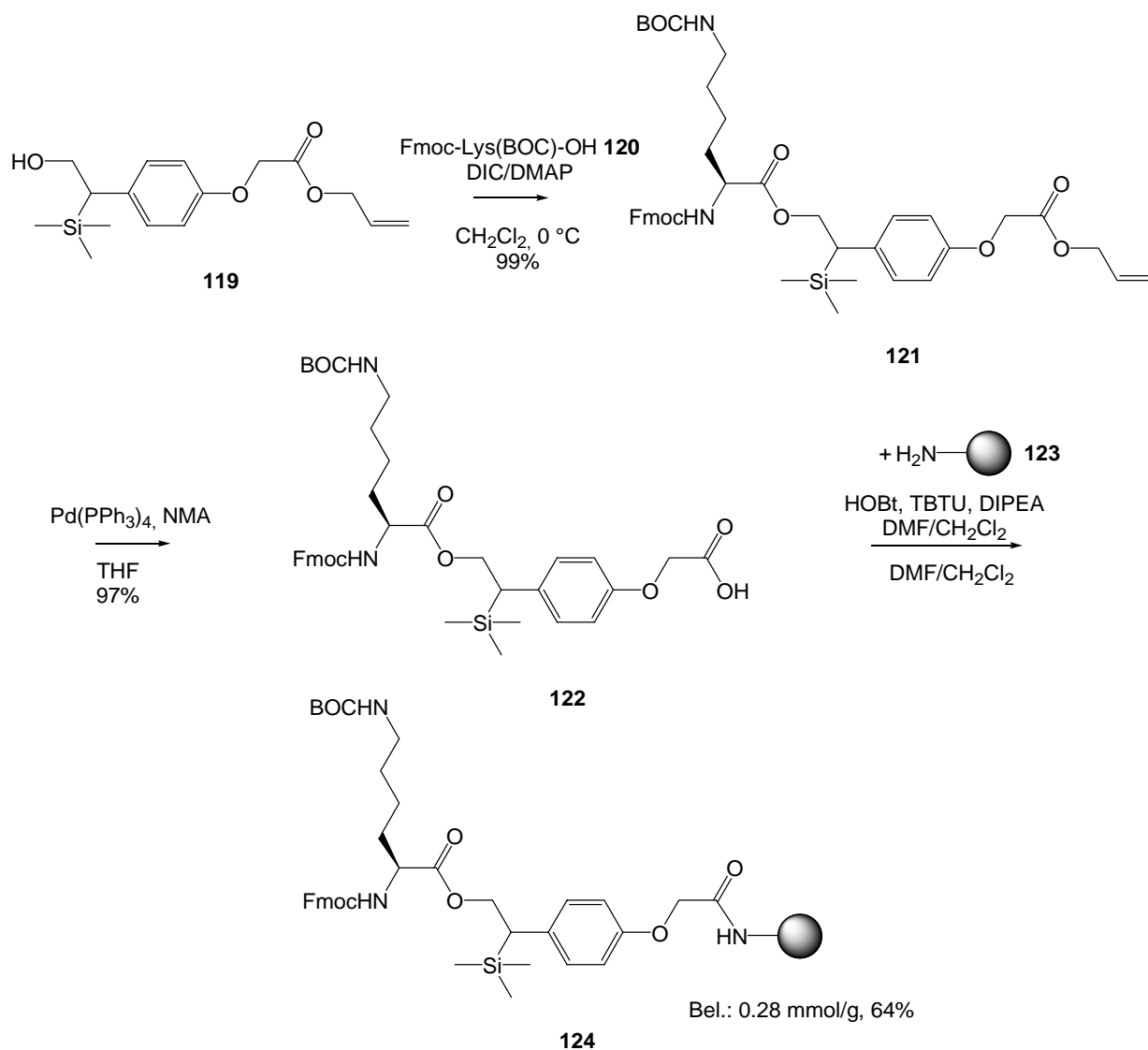


Abb. 3.6.4.3: *Fmoc*-Lys(BOC) beladenes PTMSE-Ankersystem 124

Damit ist ein über den PTMSE-Linker vorbeladenes Harz für die Festphasenpeptidsynthese gewonnen, das in der Festphasenlipopetidsynthese des geschützten TLR-2-Agonisten zum Einsatz kommt.

3.6.5 Festphasen-Lipopeptidsynthese des geschützten TLR2-Agonisten

Die Synthese des blockierten TLR2-Agonisten Pam₃CSK₄ erfolgt mit dem mit *Fmoc*-Lysin(BOC) vorbeladenen PTMSE-Harz **124** (Abb. 3.6.5).

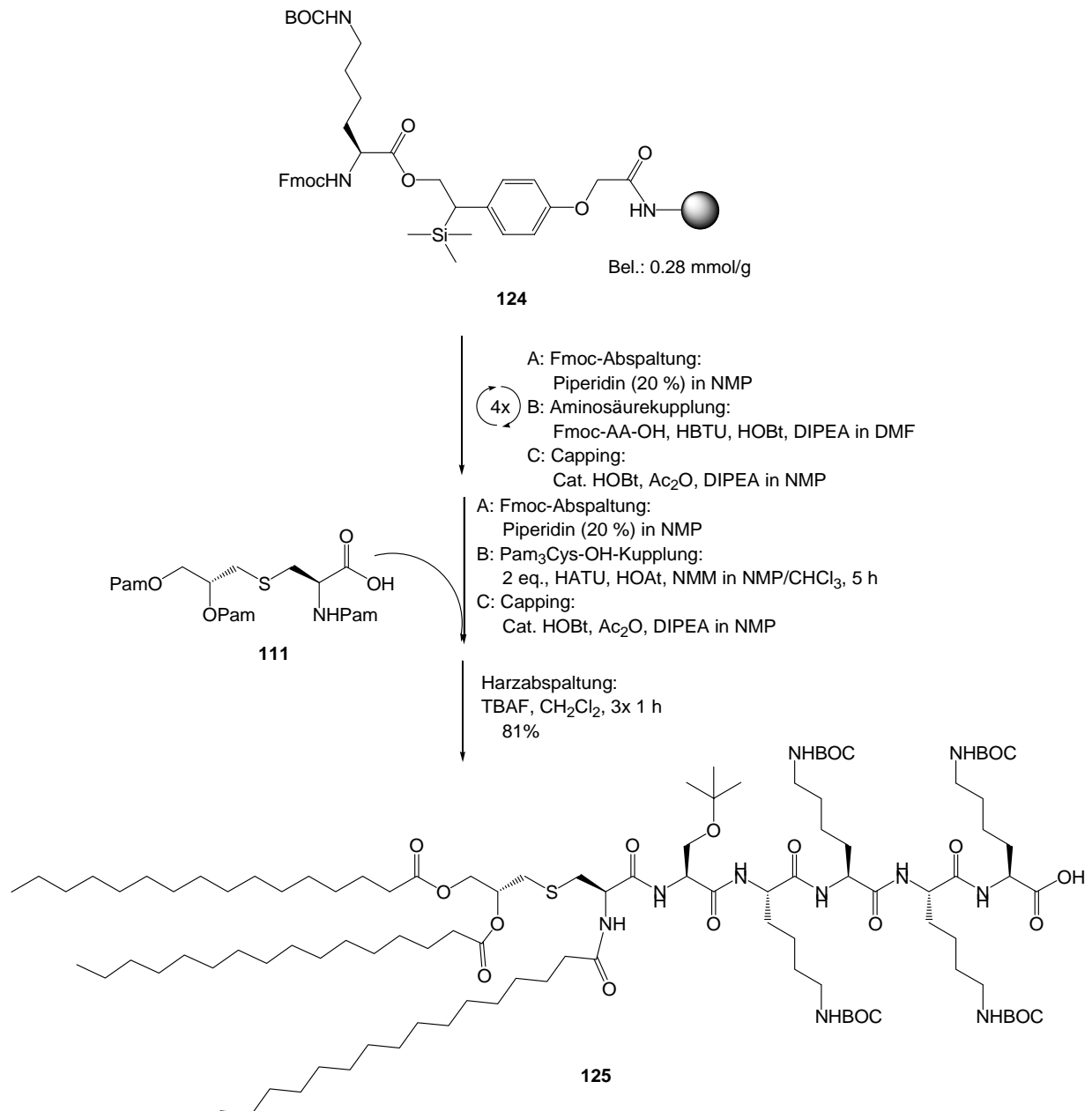


Abb. 3.6.5: Festphasen-Lipopeptidsynthese nach PTMSE-Protokoll

Die ersten vier Peptidkupplungen werden nach dem Standardprotokoll im Syntheseautomaten durchgeführt (siehe Kap. 3.3). Nach Abspaltung der *Fmoc*-Funktion am Serin-*N*-Terminus wird eine halbautomatisierte Kupplung des Mitogens Pam₃Cys-OH **111** unter Verwendung der Reagenzienkombination HATU/HOAt in Dichlormethan/DMF (3:1) durchgeführt. Nach 5 Stunden Vortex-Schütteln ist die Synthese beendet und Konjugat **125** kann vom Harz abgespalten werden. Mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in Dichlormethan wird die Abspaltung durch *Peterson*-Olefinierung ausgelöst, wobei sich das noch geschützte Lipopeptid in 81%-iger Gesamtausbeute vom polymeren Träger löst. Aufgrund der hohen Selektivität des Abspaltungsschritts kann auf eine Reinigung verzichtet werden.

3.6.6 Synthese von MUC1-Glycopeptid-TLR2-Agonist-Konjugaten

Zur Gewinnung vollsynthetischer Vakzin-Konjugate aus MUC1-Glycopeptid-Hapten und TLR2-Agonist Pam₃CSK⁶⁸ müssen Fragmentkondensationen⁶⁸ durchgeführt werden. Nach erfolgter Kondensation müssen die säurelabilen Schutzgruppen des Lipoglycopeptids entfernt werden.

Zur Fragmentkondensation wird das blockierte Pam₃CSK⁶⁸-OH **125** zunächst mit HATU/HOAt in DMF 15 Minuten gerührt um am *C*-Terminus in situ den Aktivester zu erhalten. Anschließend wird eines der vollständig deblockierten Glycopeptid-Antigene **56**, **61** und **67** gelöst in DMF zum Reaktionsgemisch getropft und 24h bei Raumtemp. gerührt. Nach abschließender acidolytischer Schutzgruppenabspaltung und chromatographischer Trennung an einer semipräparativen C4-Protein-RP-HPLC-Säule werden die MUC1-Glycopeptid-TLR2-Agonist-Vakzin-Konjugate **126**, **127** und **128** in 20-25%-iger Ausbeute erhalten (Abb. 3.6.6.1).

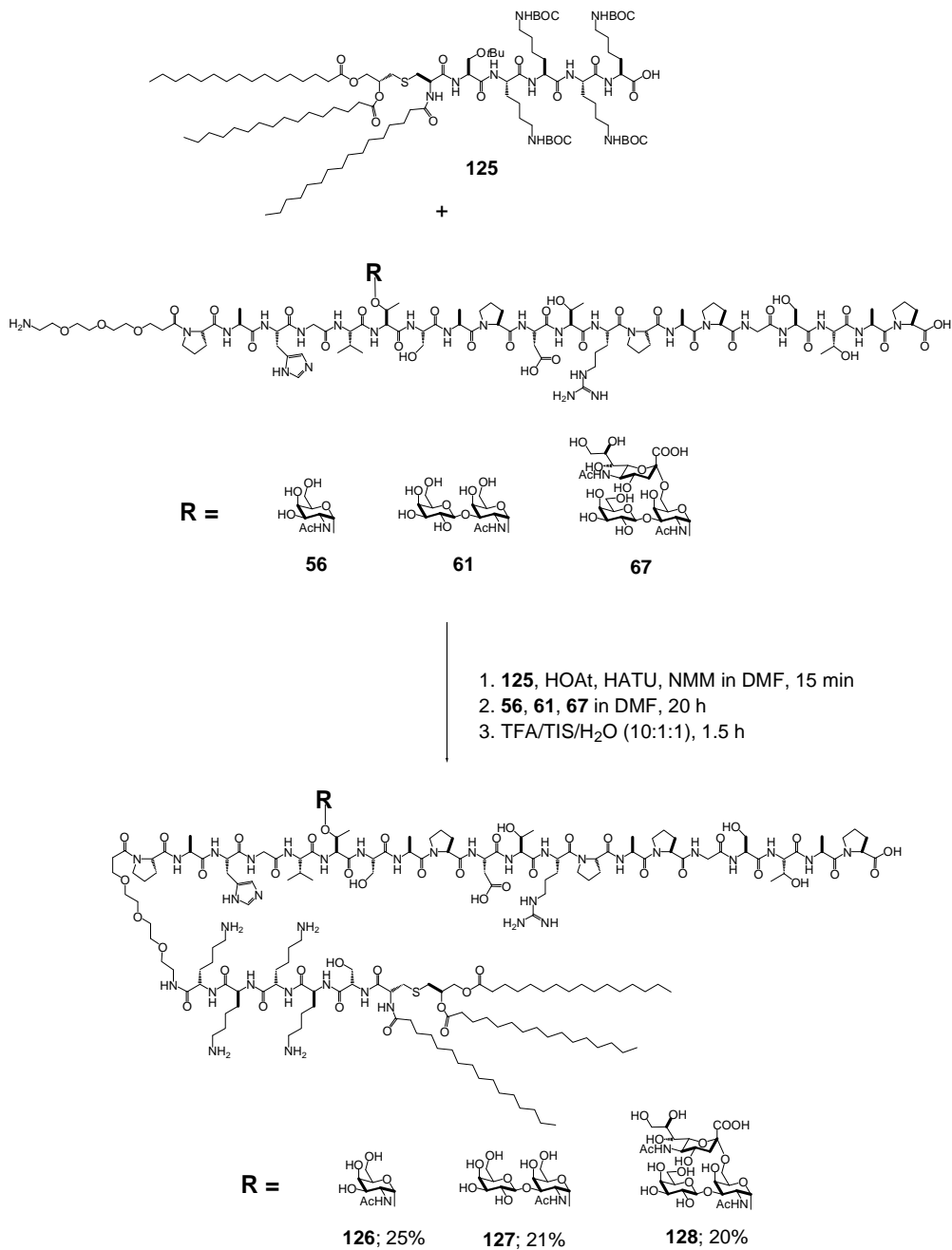


Abb. 3.6.6.1: Lipoglycopeptid-Konjugate 126, 127, 128

Der praktizierte Syntheseweg ermöglichte die Synthese der MUC1-Glycolipopeptide **126**, **127** und **128** in moderaten Ausbeuten. Es gelang aber stets, bis zu 8 mg der Vakzin-Konjugate in hoher Reinheit zu isolieren. Leider war eine ausführliche und exakte NMR-Auswertung aufgrund

der für die NMR-Spektroskopie zu geringen Substanzmengen in Anbetracht der hohen Komplexität der Konjugate nicht möglich. Die ^1H -NMR-Spektren konnten noch aufgelöst werden, allerdings waren die Versuche, aussagekräftige ^{13}C -NMR-Spektren zu messen, erfolglos. Trotzdem konnten die exakt definierten Strukturen mit Hilfe von HR-ESI-TOF-MS und besonders MALDI-TOF-Massenspektrometrie eindeutig belegt werden. In Abbildung 3.6.6.2 ist das MALDI-TOF-Spektrum von Vakzine **126** repräsentativ abgebildet.

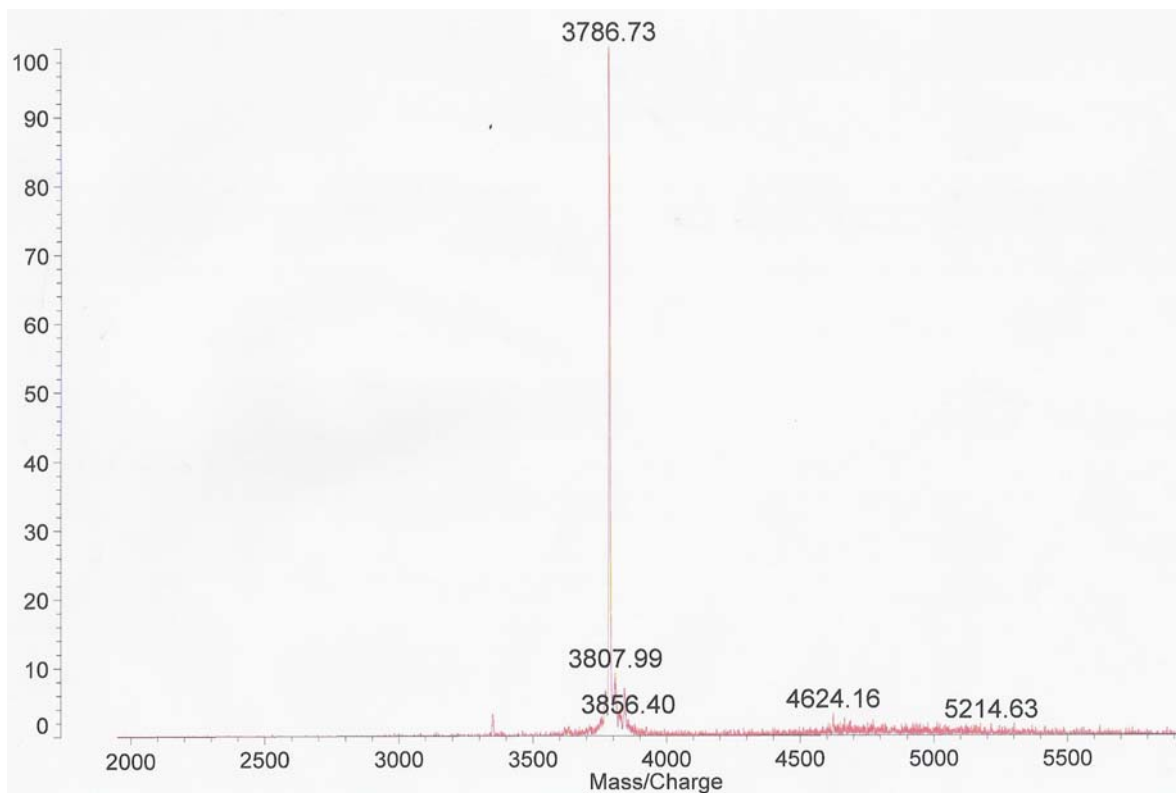


Abb. 3.6.6.2: MALDI-TOF-MS des Lipoglycopeptid-Konjugats 126

3.6.7 Immunologische Evaluierung der MUC1-Glycopeptid-TLR2-Agonist-Konjugate

Um die Tauglichkeit der synthetisierten Lipoglycopeptid-Konjugate **126**, **127** und **128** als potenzielle Vakzine zu überprüfen werden drei balb/c-J-Mäuse mit dem MUC1-Eicosaglycopeptid-TLR2-Agonist-Konjugat **127**, welches das T-Antigen im Saccharidteil trägt, immunisiert. Nach Primärimmunisierung mit vollständigem Freund'schen Adjuvans (CFA) plus Vakzine **127** und zwei Sekundärimmunisierungen mit unvollständigem Freund-Adjuvans (IFA) plus Vakzine **127** wurde Blut entnommen und mittels ELISA-Test die MUC1-Glycopeptid-Hapten spezifischen Antikörperkonzentrationen bestimmt (Abb. 3.5.5.1 und Abb. 3.5.5.2). Hierbei wurden die Mikrotiterplatten zum einen mit dem MUC1-Glycopeptid-Antigen tragenden BSA Konjugat **85** (Abb. 3.6.7.1) und zum andern mit dem äquivalenten Dendrimer **97** (Abb. 3.6.7.2) beschichtet.

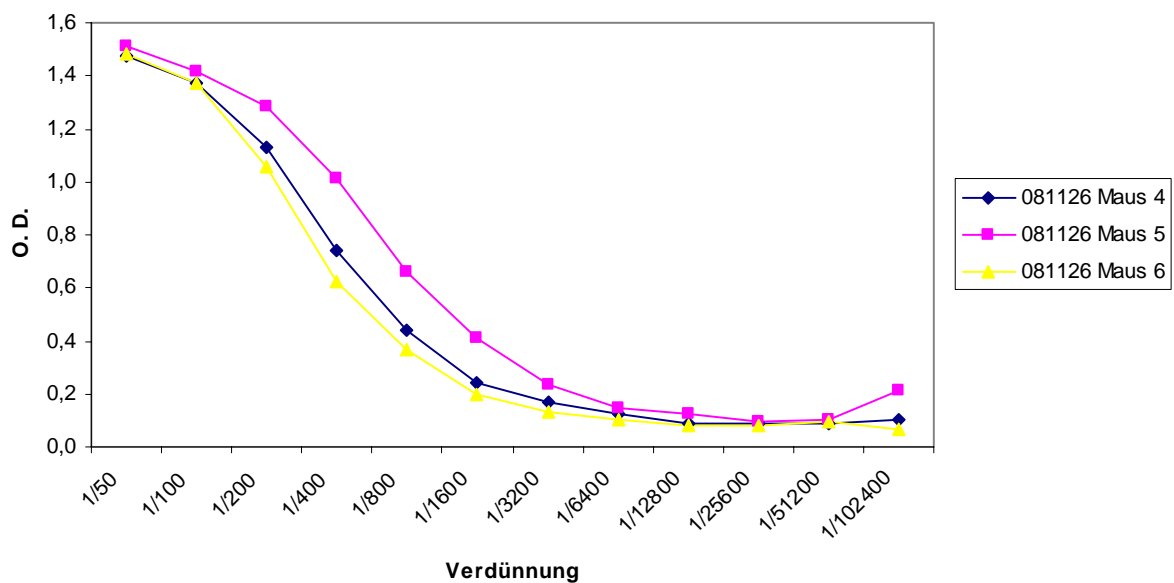


Abb. 3.6.7.1: ELISA der Seren der mit 127 immunisierten Mäuse (nach 3. Immunisierung, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit BSA-Konjugat 85)

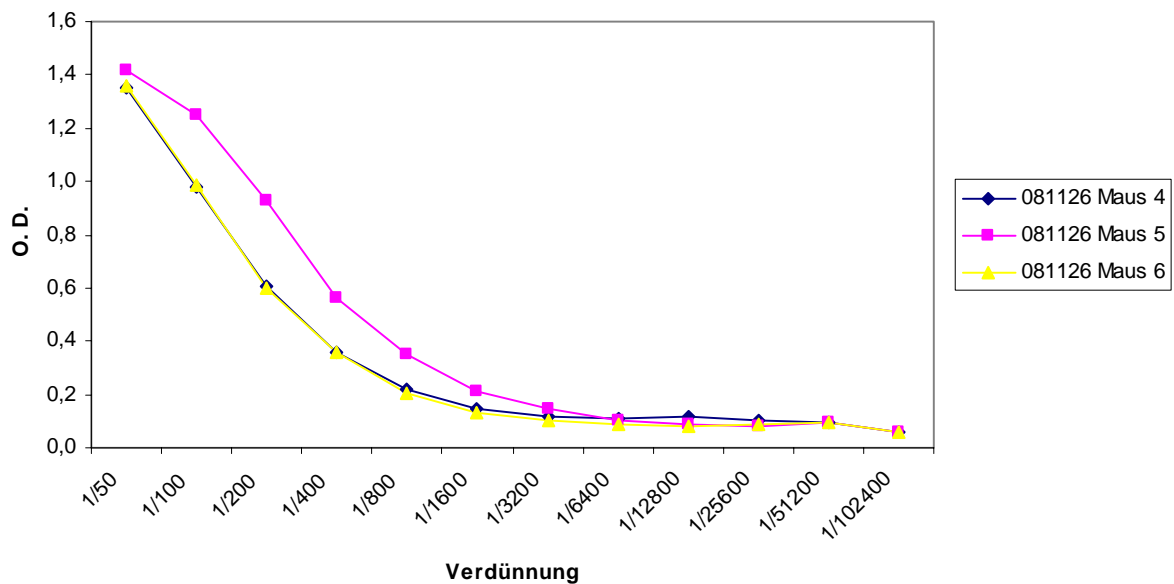


Abb. 3.6.7.2: ELISA der Seren der mit 127 immunisierten Mäuse (nach 3. Immunisierung, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Dendrimer 97)

Die Ergebnisse der ELISA Tests bestätigen, dass Konjugate bestehend aus MUC1-Glycopeptid und dem TLR2-Agonisten Pam₃CSK₄ als vollsynthetische Vakzin-Konstrukte wirken. Zwar sind die gemessenen Antikörpertiter nicht so hoch wie die der Tetanus-Toxoid-Protein-Konjugate (Kap. 3.4) oder der Dendrimere (Kap. 3.5), dennoch ist die Immunreaktion beachtlich. Besonders interessant erscheinen die sehr ähnlichen Antikörperkonzentrationen aller drei Mäuse. Dieser Befund unterstreicht die Reproduzierbarkeit des oben beschriebenen (Kap. 3.6.1) immunologischen Mechanismus der durch den TLR2-Agonisten ausgelösten Aktivierung. Bei unterschiedlichen Versuchstieren wird ein ähnlicher Effekt erzielt. Somit wird dieses Impfverfahren zu einem zuverlässigen Werkzeug, das adaptive Immunsystem gegen tumorassoziierte Glycopeptid-Haptene zu fokussieren. In Abbildung 3.6.7.2 zeigt sich nochmals die Verwendbarkeit octamerer MUC1-Glycopeptide für die Beschichtung der Mikrotiterplatten. Hierbei ähneln sich die Titer-Werte der beiden Beschichtungen (**85, 97**) im Vergleich sehr stark. Des Weiteren empfiehlt sich die Anwendung solcher Lipoglycopeptide als Adjuvantien, um in Kombination mit dem passenden MUC1-Glycopeptid-Tetanus-Toxoid-Konjugat oder dem Dendrimer-Pendant eine aktive Antitumor-Immunisierung beim Menschen durchzuführen. Dabei könnte auf das beim Menschen nicht zulässige CFA verzichtet werden.

3.7 Synthese von oligotopen MUC1-Glycopeptid-Vakzin-Konjugaten

3.7.1 Heterotop-Konjugate

Die zur Zeit am häufigsten verwendete Methode zur Induzierung robuster Immunantworten mit vollsynthetischen Antitumor-Vakzinen ist die kovalente Verknüpfung von tumorassoziierten B-Zell-Epitopen mit einem potentiellen T_H2-Zell-Epitop.^{309,71,68,63,60,310,311} Solche Konjugate bezeichnet man im allgemeinen als Heterotop-Konjugate (Abb. 3.7.1).

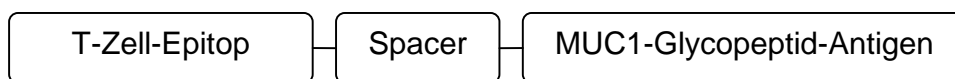


Abb. 3.7.1: Heterotop Konjugate

Genau wie die Trägerprotein-Hapten-Konstrukte bewirken die Heterotope aus B- und T-Zell-Epitop das spezifisch B-Zellen erkennt, in die Vakzine internalisiert und in denen sie prozessiert werden, was dann zur Antikörperproduktion führt. Im Falle der MUC1-Glycopeptid-B-Zell-Epitope ist es möglich, selektive Antikörper gegen tumorassoziierte Strukturen zu gewinnen.^{68,71,60,228}

Bei der auf die Stimulierung durch T-Helferzell-Epitop gegründeten Immunisierung werden neben einzelnen Fragmenten des B-Zell-Epitops auch solche des T_H2-Zell-Epitops auf der B-Zell-Oberfläche über den MHC-II-Komplex präsentiert. Die T-Zellen erkennen spezifisch die präsentierten T_H2-Zell-Epitope, was dann zur Stimulierung der B-Zellen führt. Die B-Zellen differenzieren dann zu Plasmazellen und letztere proliferieren (siehe Kap. 3.4).

Die Aktivierung über den MHC-II-Komplex verläuft äquivalent zur Carrier-Konjugat-Methode mit dem wesentlichen Unterschied, dass das T-Zell-Epitop aus einer definierten Peptidsequenz besteht und nicht verschiedene Teilsequenzen eines ganzen Proteins repräsentiert. Diese Tatsache bewirkt, dass die Immunisierung wesentlich selektivere Immunantworten gegen das tumorassoziierte Antigen liefert, da nicht auch B-Zell-Epitope eines Carrier-Proteins präsentiert werden.^{68,71,60} Des Weiteren ermöglicht die Vollsynthese von Vakzinen an der festen Phase,

³⁰⁹ S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379.

³¹⁰ I. Bettahi, G. Dasgupta, O. Renaudet, A. A. Chentoufi, X. Zhang, D. Carpenter, S. Yoon, P. Dumy, L. BenMohamed, *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2009**, *58*, 187.

³¹¹ C. Leclerc, G. Przewlocki, M. P. Schultze, L. Chedid, *Eur. J. Immunol.* **1987**, *17*, 269.

definierte Strukturen zugänglich zu machen, die mit chemischen Analysemethoden eindeutig bestimmt werden können.

3.7.2 Synthese eines MUC1-Glycopeptid-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugats

Eine Möglichkeit mit Heterotop-Konjugaten humorale Immunantworten zu induzieren besteht darin, ein MUC1-Glycopeptid-Antigen kovalent über einen Spacer mit einem Peptidfragment aus dem Hühnerserum-Albumin (Ovalbumin, OVA) zu verknüpfen. Das gesamte Konstrukt mit dem Heptadecapeptid der OVA₃₂₃₋₃₃₉-Sequenz als spezifischem T_H2-Zellepitop bewirkt, dass über den Oberflächen-Immunglobulin-Rezeptor einer B-Zelle an das B-Zell-Epitop (MUC1-Glycopeptid) durch rezeptorvermittelte Endocytose in die B-Zelle internalisiert wird. Nach der Prozessierung des Konjugats wird das OVA₃₂₃₋₃₃₉-Epitop über MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche der B-Zelle präsentiert. Die T_H2-Zellen von Ovalbumin transgenen Mäusen erkennen den MHC-II-OVA-Peptid-Komplex und regen daraufhin die B-Zelle zur Differenzierung zur Plasma-Zelle an die dann proliferiert. Die Plasmazellen sezernieren dann MUC1-spezifische Antikörper.^{60,68}

Zur Vakzinsynthese soll an einem *Wang*-Tentagel-Harz, das mit *Fmoc*-Arginin, welches an der Seitenkette die *Pmc*-Schutzgruppe trägt, vorbeladenen ist (**129**) zunächst die aus 17 Aminosäuren bestehende OVA₃₂₃₋₃₃₉-Sequenz nach Standardprotokoll synthetisiert werden. Anschließend erfolgt der vollautomatische Einbau des Spacer-Moleküls **53**, bevor das MUC1-B-Zell-Epitop aufgebaut wird. Als B-Zell-Epitop dient hier ein Dodecapeptid aus der *Tandem-Repeat*-Einheit des MUC1. Die folgenden 9 Aminosäuren werden erneut nach dem Standard-Synthese-Protokoll bis zur Aminosäure Serin aufgebaut. Nach Entfernung der *Fmoc*-Gruppe an Serin²⁷ wird der in vielen Tumorzelllinien nachgewiesene, mit 2,3-Sialyl-T-Antigen glycosylierte, Aminosäurebausteine **34** mit dem reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt/NMM in NMP binnen sechs Stunden unter Vortex-Schütteln halbautomatisch gekuppelt. Die anschließenden Kupplungen der verbleibenden zwei Aminosäuren werden vollautomatisch durchgeführt und der *N*-Terminus von Glycin wird mit dem Capping-Reagenz acetyliert. Simultane Abspaltung vom Harz und Seitenkettenschutzgruppeneblockierung liefern das Heterotop-Glycopeptid **130** in 45%-iger Ausbeute nach präparativer RP-HPLC (Abb. 3.7.2.1).

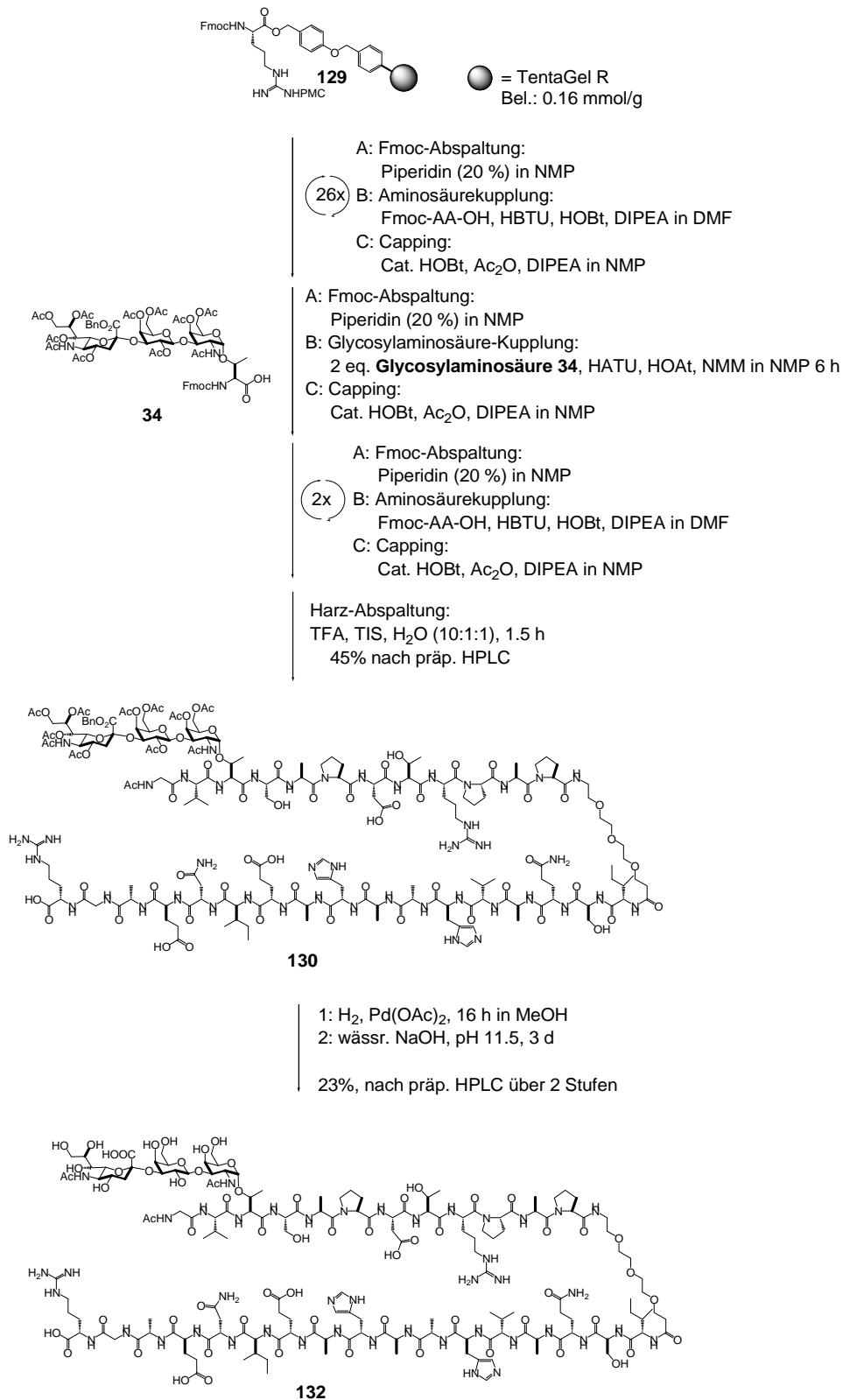


Abb. 3.7.2: Festphasenglycopeptidsynthese des OVA₃₂₃₋₃₃₉-MUC1-Glycopeptid-Konjugats 132

Im Anschluss an die Festphasenglycopeptidsynthese werden die saccharidischen Schutzgruppen entfernt. Zunächst wird Heterotop-Konjugat **130** in Methanol gelöst, mit zwei Spatelspitzen Palladiumacetat versetzt und mit Wasserstoff hydriert. Anschließend wird 3 Tage mit einer wässrigen NaOH-Lösung pH 11.5 deacetyliert. Nach Neutralisation mit 1N Essigsäure wird das deblockierte MUC1-Glycopeptid-OVA-Heterotop-Konjugat **132** in 23%-iger Ausbeute über zwei Stufen und nach präparativer RP-HPLC-Reinigung erhalten. Das Konjugat ist sehr schlecht in Wasser und Acetonitril löslich, weshalb nur ein geringer Teil gereinigt wurde. Das gereinigte Produkt **132** löste sich auch nur zu geringen Teilen in den verwendeten NMR-Lösungsmitteln (DMSO-d₆, D₂O), was eine NMR-Auswertung nicht möglich machte. Allerdings konnte die Bildung des Produktes eindeutig über ESI-Massenspektrometrie bestätigt werden.

Die geringe Löslichkeit der synthetisierten OVA₃₂₃₋₃₃₉-MUC1-Glycopeptid-Vakzine **132** sollte sich auf die immunologische Evaluierung eher positiv auswirken, da so der Depot-Effekt unterstützt wird. Das Konjugat **132** sollte also in der Lage sein, in transgenen Mäusen vom Stamm DO11.10, deren CD4⁺-T-Zellen mit einem Rezeptor ausgestattet sind, der eine Spezifität für das über MHC-II-Moleküle präsentierte OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid-Epitop aufweist, eine humorale Immunantwort auszulösen.

3.7.3 Synthese eines Lipo-MUC1-Glycopeptid-OVA₃₂₃₋₃₃₉-Konjugats

Die Immunität von Peptiden kann durch Ausbildung von Überstrukturen in Form von Aggregaten wie Micellen oder Liposomen verstärkt werden (Kap. 3.6). Um die Bildung solcher Überstrukturen zu fördern, kann man Phospholipid-Vesikel kovalent an ein Vakzin binden. Diese lipoide Komponente ist auch gleichzeitig ein „internes“ Adjuvanz wie z. B. Phosphoryl-Lipid-A³¹² oder Pam₃Cys (Kap. 3.6).^{313,314}

Zur Synthese eines Lipoglycopeptid-Konjugats soll eine säurefunktionalisierte Lipid-Komponente in die Festphasensynthese nach *Fmoc*-Strategie eingebaut werden. Durch Dioctadecylamin **133** wird das zyklische Anhydrid der Diglycolsäure **134** in Toluol unter Rückfluss aminolysiert. Unter Ringöffnung entsteht in 85%-iger Ausbeute der Lipid-Festphasenbaustein

³¹² E. Ribi, J. Cantrell, K. Takayama, N. Qureshi, J. Peterson, *Rev. Infect. Dis.* **1984**, *6*, 567.

³¹³ B. Frisch, A. Roth, F. Schuber, *Methods Enzymol.* **2003**, *373*, 51.

³¹⁴ G. R. Matyas, J. M. Muderhwa, *Methods Enzymol.* **2003**, *373*, 34.

Diocetylcarbamoylethoxyessigsäure **135** die analog zur Kupplung von Pam₃Cys-Konjugaten in die Festphasenglycopeptidsynthese eingeführt werden kann (Abb. 3.7.3.1).

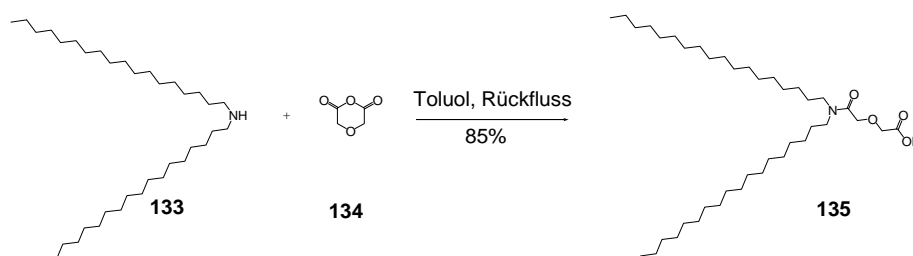
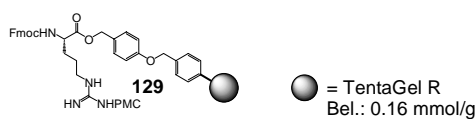


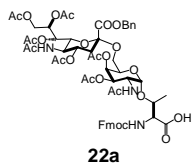
Abb. 3.7.3.1: Synthese von Diocetylcarbamoylethoxyessigsäure **135**

Zur Herstellung einer Oligotop-Vakzine aus Lipid-, CD4⁺-T-Zell-Epitop und MUC1-Glycopeptid-B-Zell-Epitop wird das oben beschriebene OVA₃₂₃₋₃₃₉-T_H2-Zellepitop und ein Glycopeptid-Antigen, welches die vollständige *Tandem-Repeat*-Sequenz des MUC1 trägt und an Threonin⁶ mit dem Sialyl-T_N-Antigen glycosyliert ist, an der festen Phase aufgebaut.

Ausgehend von einem mit *Fmoc*-Arginin(Pmc) vorbeladenem Wang-Tentagel-Harz (**129**) wird zunächst die aus 17 Aminosäuren bestehende OVA₃₂₃₋₃₃₉-Sequenz nach Standardprotokoll synthetisiert. Anschließend erfolgt der Einbau des Spacers **53**, bevor das MUC1-B-Zell-Epitop aufgebaut wird. Die folgenden 14 Aminosäuren werden nach Standard-Peptid-Protokoll bis zur Aminosäure Serin aufgebaut. Nach Entfernung der *Fmoc*-Gruppe an Serin³³ wird der Sialyl-T_N-Aminosäurebausteine **22a** mit den Kupplungsreagenzien HATU/HOAt/NMM in NMP binnen sechs Stunden unter Vortex-Schütteln halbautomatisch gekuppelt. Die anschließenden Kupplungen der verbleibenden fünf Aminosäuren und des Spacers **53** werden vollautomatisch durchgeführt. Nach *Fmoc*-Abspaltung wird mit vier Äquivalenten Diocetylcarbamoylethoxyessigsäure **135** in einer Lösung aus NMP/Dichlormethan (1:5) mit der Reagenzienkombination HATU/HOAt/NMM die Lipid-Komponente kondensiert. Anschließende simultane Abspaltung vom Harz und Seitenkettenschutzgruppenentfernung liefern das Oligotop-Lipoglycopeptid **136** in 7%-iger Ausbeute nach Reinigung durch semipräparative RP-HPLC (Abb. 3.7.2.1).

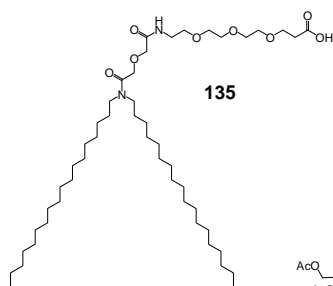


- (31x)
- A: Fmoc-Abspaltung:
Piperidin (20 %) in NMP
- B: Aminosäurekupplung:
Fmoc-AA-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF
- C: Capping:
Cat. HOBT, Ac₂O, DIPEA in NMP



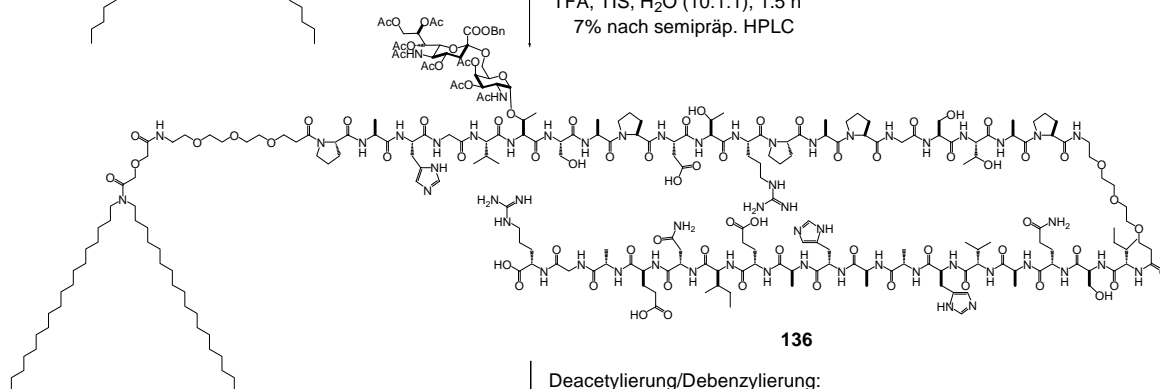
- A: Fmoc-Abspaltung:
Piperidin (20 %) in NMP
- B: Glycosylaminosäure-Kupplung:
2 eq. **Glycosylaminosäure 22a**, HATU, HOAt, NMM in NMP 6 h
- C: Capping:
Cat. HOBT, Ac₂O, DIPEA in NMP

- (6x)
- A: Fmoc-Abspaltung:
Piperidin (20 %) in NMP
- B: Aminosäurekupplung:
Fmoc-AA-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF
- C: Capping:
Cat. HOBT, Ac₂O, DIPEA in NMP



- A: Fmoc-Abspaltung:
Piperidin (20 %) in NMP
- B: Lipidaminosäure-Kupplung:
4 eq. **Lipid 133**, HATU, HOAt, NMM in NMP/DCM (1:5) 6 h
- C: Capping:
Cat. HOBT, Ac₂O, DIPEA in NMP

Harz-Abspaltung:
TFA, TIS, H₂O (10:1:1), 1.5 h
7% nach semipräp. HPLC



Deacetylierung/Debenzylierung:
wässr. NaOH-Lsg. pH 11.5, 16 h
quant.

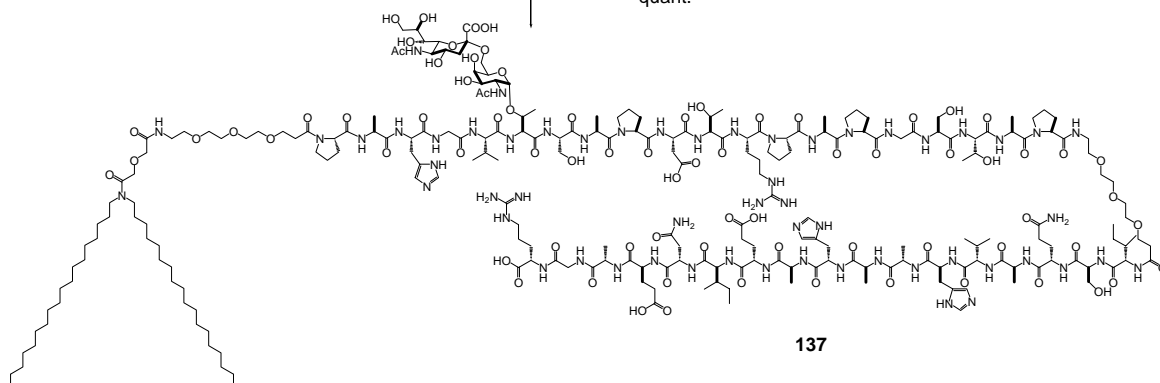


Abb. 3.7.3.1: Synthese des Lipoglycopeptid-Vakzins 137

Im Anschluss an die Festphasen-Lipoglycopeptidsynthese wird in wässriger NaOH-Lösung bei pH 11.5 deacetyliert und debenzyliert. Nach Neutralisation mit 1N Essigsäure wird das deblockierte Oligotop-Lipoglycopeptid **137** in quantitativer Rohausbeute erhalten. Eine Lösung des Produkts gelang in den Lösungsmitteln Wasser und Acetonitril nicht. Aus diesem Grund und weil ein analytisches Chromatogramm der Verbindung **137** nach Deblockierung einheitlich aussah, wurde auf eine HPLC-Trennung verzichtet (Abb. 3.7.3.2).

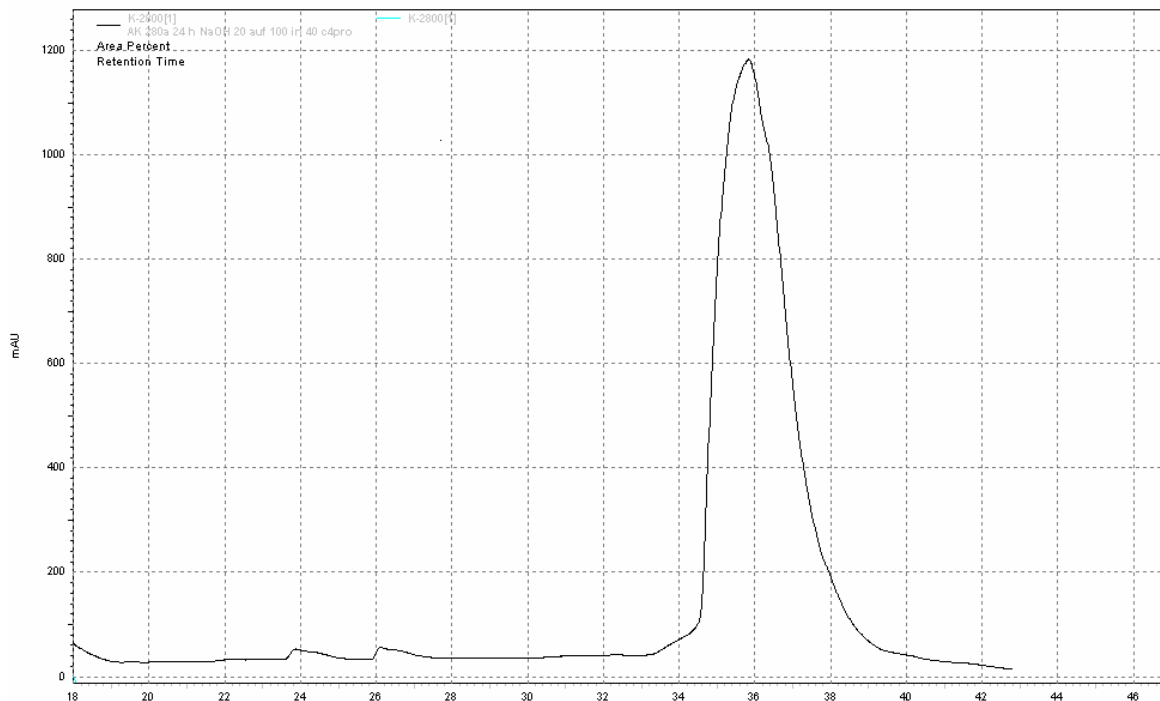


Abb. 3.7.3.1: RP-HPLC-Chromatogramm von Lipoglycopeptid **137** nach Schutzgruppenabspaltung

Aufgrund der geringen Löslichkeit war auch eine NMR-Analyse des Oligotop-Vakzins **137** nicht möglich. Die Struktur des Produkts konnte nur durch ESI- und MALDI-TOF massenspektrometrisch bestätigt werden.

Trotz geringer Löslichkeit des Lipo-OVA₃₂₃₋₃₃₉-MUC1-Glycopeptid-Heterotops **137** sollte eine immunologische Evaluierung an OVA-transgenen Mäusen durchführbar sein.

3.7.4 Synthese eines TLR2-Agonist-MUC1-Glycopeptid-Tetanus-Toxoid-Konjugats

Die in Kap. 3.7.2 und 3.7.3 besprochene Immunisierungsstrategie führte in ähnlichen Projekten zur Ausbildung einer ausgeprägten Immunantwort in transgenen Mäusen.^{60,61} Leider reagierte in den bisherigen Immunisierungsstudien nur ein Drittel der Mäuse durch Antikörperproduktion. Des Weiteren ist die Übertragbarkeit der Immunisierungsstrategie auf den Menschen nicht möglich. Eine Möglichkeit, die T_H2-vermittelte Immunreaktion auf den Menschen zu übertragen, besteht darin, ein im Menschen präsenten T_H2-Peptid-Epitop zu identifizieren und dieses in eine synthetische Vakzine zu integrieren. Als universelles T-Zellepitop kommt die Partialsequenz TTox₅₈₀₋₅₉₉ aus dem Tetanus-Toxoid in betracht (Abb. 3.7.4.1).^{315,316,261}

Asn-Ser-Val-Asp-Asp-Ala-Leu-Ile-Asn-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val

Abb. 3.7.4.1: Tetanus-Toxoid-T-Zell-Epitop

Das vollständige Protein Tetanus-Toxoid ist ein Impfstoff gegen Wundstarrkrampf, mit dem nahezu jeder Mensch immunisiert wird. Eine synthetische Vakzine, aus einem universellen T_H2-Peptid-Epitop des Tetanus-Toxoids und einem tumorassoziierten MUC1-B-Zell-Epitop sollte im Menschen zu humoralen Immunantworten führen. Dekoriert man diesen Impfstoff zusätzlich mit dem TLR2-Agonisten Pam₃CSK₄ wie in Kapitel 3.6 beschrieben, sollte die Immunreaktion noch ausgeprägter sein.

Zur Synthese dieses Oligotop-Konjugats soll die in Kap. 3.6 beschriebene Synthesestrategie angewendet werden. Dafür muss zunächst die Festphasenglycopeptidsynthese eines Heterotop-Konjugats bestehend aus der vollständigen *Tandem-Repeat*-Domäne des MUC1-Glycopeptid und dem T-Zell-Epitop TTox₅₉₂₋₅₉₉ durchgeführt werden. Hierbei kann nicht das vollständige Tetanus-Toxin₅₈₀₋₅₉₉-Epitop zum Einsatz kommen, da Lysin⁵⁹¹ die Chemoselektivität der Fragmentkondensation zum TLR2-Agonisten gefährden würde. Aber das verwendete Octapeptid beinhaltet zumindest die vollständige immundominante Domäne des T-Zell-Epitops-TTox₅₈₀₋₅₉₉ (Abb. 3.7.4.1 fett gedruckt).

³¹⁵ P. C. Ho, D. A. Mutch, K. D. Winkel, A. J. Saul, G. L. Jones, T. J. Doran, C. M. Rzepczyk, *Eur. J. Immunol.* **1990**, 20, 477.

³¹⁶ J. C. Reece, H. M. Geysen, S. J. Rodda, *J. Immunol.* **1993**, 151, 6175.

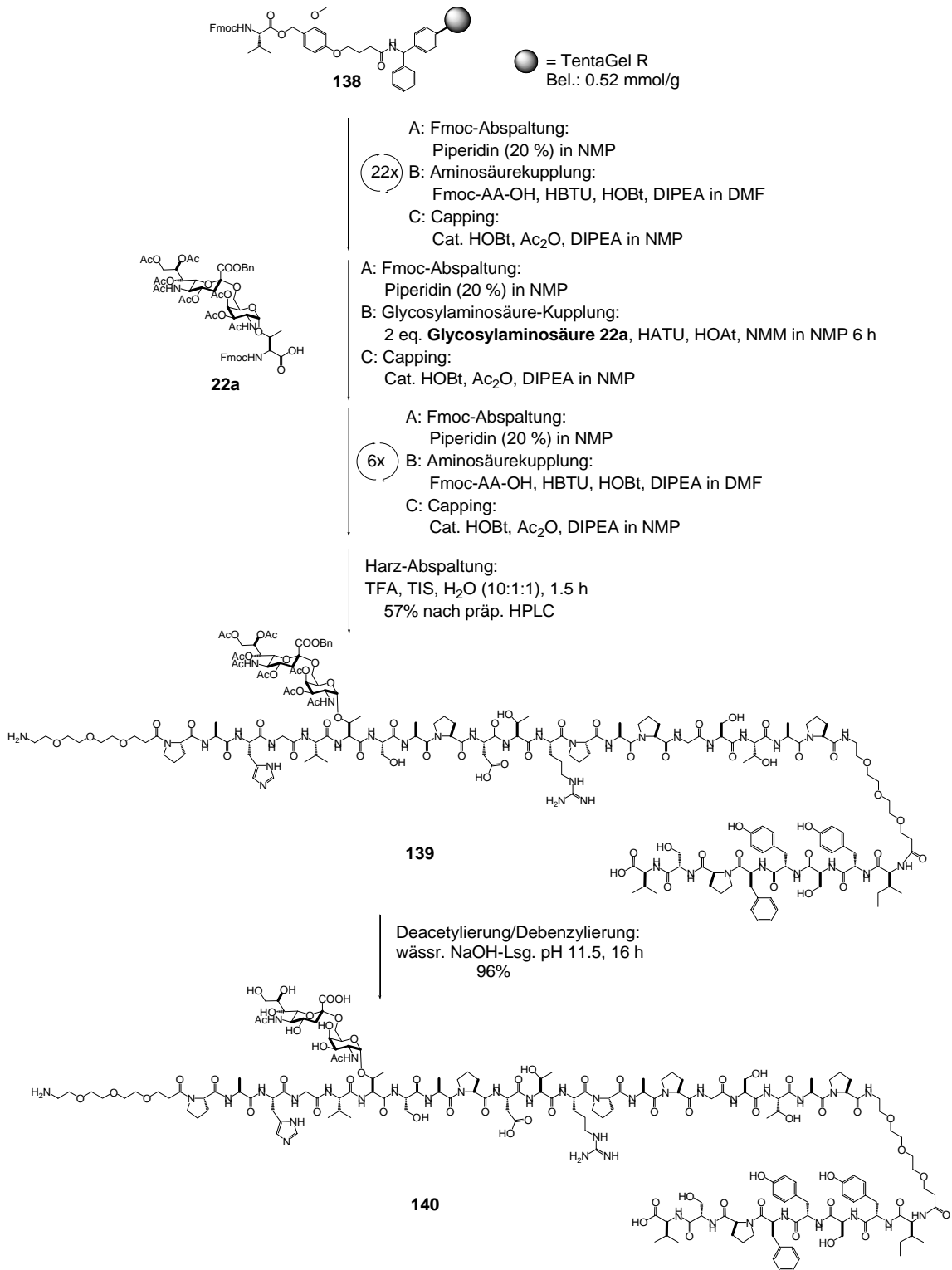


Abb. 3.7.4.2: Festphasensynthese des Heterotop-Konjugats aus MUC1-Glycopeptid und TTox₅₉₁₋₅₉₉ **140**

Die Synthese des Heterotop-Konjugats **140** wird ausgehend von einem *Fmoc*-Val-HMPB-BHA-Tentagel-Harz (**138**) durchgeführt. Zunächst wird die aus acht Aminosäuren bestehende TTox₅₉₂₋₅₉₉-Sequenz unter Standardbedingungen aufgebaut. Anschließend erfolgt die Kupplung der Spaceraminosäure **53**, bevor das MUC1-B-Zell-Epitop aufgebaut wird. Die folgenden 14 Aminosäuren werden nach Standard-Peptid-Protokoll bis zur Aminosäure Serin aufgebaut. Nach Entfernung der *Fmoc*-Gruppe an Serin²³ wird der Sialyl-T_N-Aminosäurebausteine **22a** mit den Kupplungsreagenzien HATU/HOAt/NMM in NMP binnen sechs Stunden unter Vortex-Schütteln gekuppelt. Die anschließenden Kupplungen der verbleibenden fünf Aminosäuren und der Spaceraminosäure **53** werden vollautomatisch durchgeführt und die terminale *Fmoc*-Schutzgruppe abgespalten. Anschließend wird das Glycopeptid-Heterotop **139** bei gleichzeitiger Entfernung aller säurelabilen Schutzgruppen auf den Aminosäureseitenketten vom Harz abgespalten. Das Oligotop-Glycopeptid **139** wird nach semipräparativer RP-HPLC-Reinigung in 57%-iger Ausbeute erhalten. (Abb. 3.7.4.2). Im Anschluss an die Festphasensynthese wird in wässriger NaOH-Lösung bei pH 11.5 deacetyliert und debenzyliert. Nach Neutralisation mit 1N Essigsäure wird das deblockierte MUC1-Tetanus-Toxin-Glycopeptid **140** in 96%-iger Ausbeute nach präparativer RP-HPLC erhalten (Abb. 3.7.4.2). Das Produkt konnte eindeutig über NMR- und Massenspektroskopie nachgewiesen werden und repräsentiert schon an dieser Stelle ein potentiell vollsynthetisches Vakzin, welches zu Immunisierungsexperimenten eingesetzt werden könnte.

Zur Synthese des Lipoglycopeptid-Oligotop-Konjugats **141** muss das Heterotop-Konjugat **140** einer Fragmentkondensation mit dem blockierten Pam₃CSK₄KKK-OH **125** unterworfen werden. Dazu wird, wie in Kap. 3.6 beschrieben, der geschützte TLR2-Agonist **125** zunächst mit der Reagenzienkombination HATU/HOAt in DMF 15 Minuten gerührt, um am C-terminus in situ den Aktivester zu erhalten. Im Anschluss wird das vollständig deblockierte Heterotop-Glycopeptid-Konjugat **140** in DMF zum Reaktionsgemisch getropft und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Nach abschließender acidolytischer Schutzgruppenabspaltung und chromatographischer Trennung an einer semipräparativen C₄-Protein-RP-HPLC-Säule wird das TLR2-Agonist-MUC1-Glycopeptid-TTox₅₉₂₋₅₉₉-Vakzin-Konjugat **141** in 11%-iger Ausbeute erhalten (Abb. 3.7.4.3).

Das synthetisierte Vakzin-Konjugat aus TLR2-Agonist Pam₃CSK₄KKK, T-Helferzell-Epitop-Tetanus-Toxin₅₉₂₋₅₉₉ und MUC1-Glycopeptid kann eindeutig über Massen- und ¹H-NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden und steht für Immunisierungsstudien zur Verfügung.

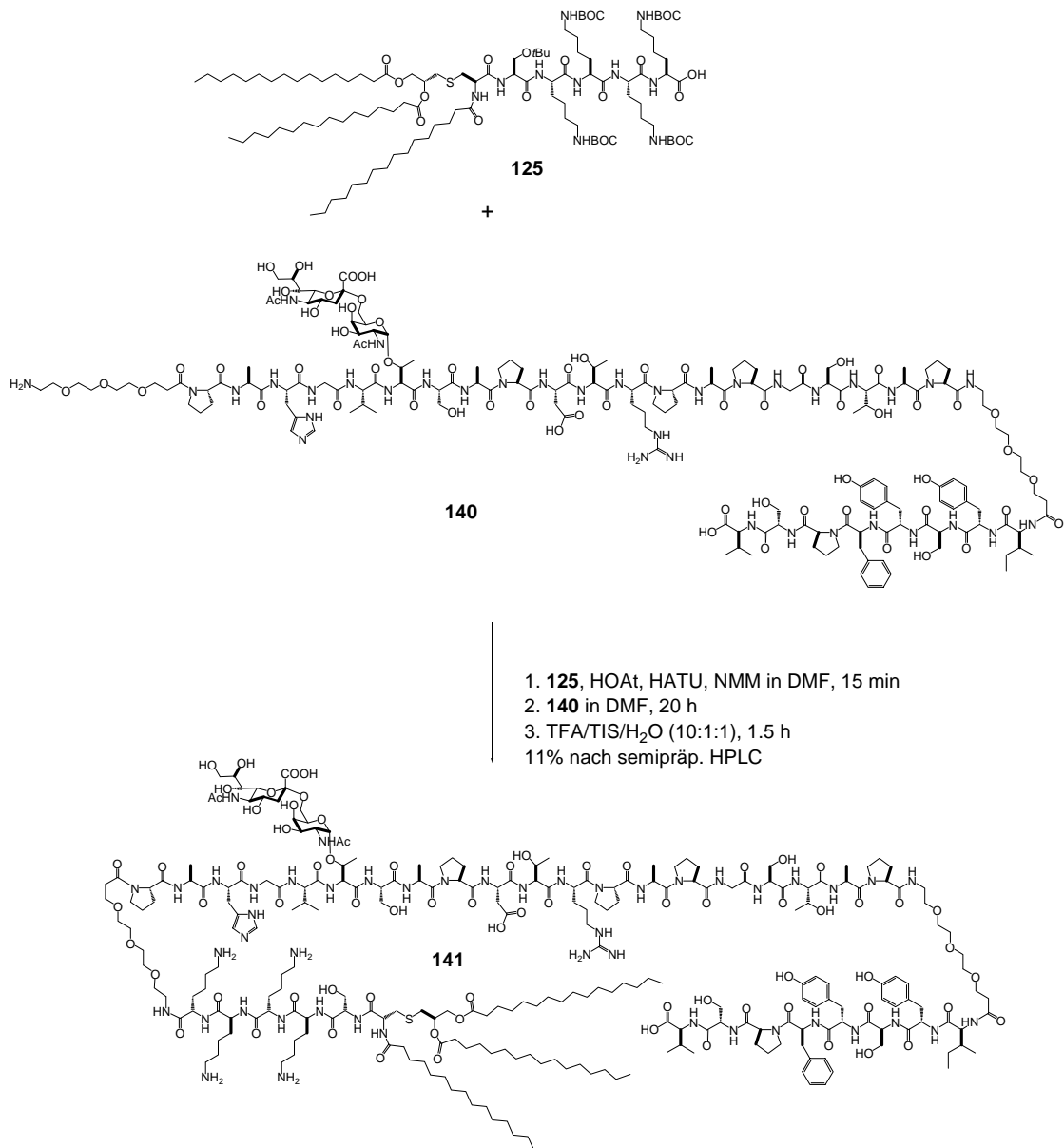


Abb. 3.7.3.2: Synthese des Heterotop-Konjugats aus MUC1-Glycopeptid, TLR2-Agonist und TTox₅₉₁₋₅₉₉ **141**

4. Zusammenfassung

Eine Immuntherapie von Tumorerkrankungen, die mit Hilfe von Antitumorimpfstoffen prophylaktisch und therapeutisch erfolgen könnte, wäre eine attraktive Alternative zu den bisher angewendeten Krebsbehandlungen. Aufgrund charakteristisch veränderter Aktivitäten von Glycosyltransferasen in der Glycoprotein-Biosynthese werden auf malignen Zellen stark verkürzte, frühzeitig sialylierte mucinartige Glycoproteine exprimiert. Diese verkürzten Kohlenhydrate repräsentieren tumorassoziierte Antigene. Sie haben zur Folge, dass Peptidpitope der Mucin-Glycoproteine, die auf gesundem Gewebe durch den hohen Glycosylierungsgrad maskiert sind, für das Immunsystem freiliegen. Diese Strukturunterschiede sollten einen selektiven Angriff auf das Tumorgewebe erlauben, ohne dass gesundes Gewebe beeinträchtigt wird, wenn es gelänge, das Immunsystem auf diese veränderten Strukturelemente zu fokussieren. Dabei ist es wichtig, dass die Immunantwort mit synthetisch definierten Glycopeptidpitopen ausgelöst wird, um Autoimmunreaktionen zu vermeiden. Somit ist die Synthese von exakt definierten tumorassoziierten Glycopeptiden von zentraler Bedeutung für die Entwicklung eines Antitumor-Impfstoffes.

Da die tumorassoziierten Kohlenhydratstrukturen Antigene darstellen, die vom Immunsystem weitestgehend toleriert werden, ist es notwendig, ihre Immunogenität mit Hilfe immunstimulierender Epitope so zu erhöhen, dass eine effiziente Immunreaktion erfolgt. Nach diesem Konzept wurden in der vorliegenden Arbeit Methoden und Strategien entwickelt, synthetische Impfstoff-Konjugate zu synthetisieren und immunologisch in Mausexperimenten zu evaluieren (Abb. 4.1).

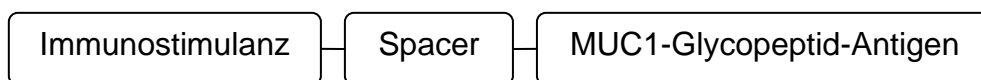


Abb. 4.1: Synthetische Glycopeptidkonjugate als Impfstoffe

Die Synthesen der Glycopeptid-B-Zell-Epitope erfolgte durch Festphasenglycopeptidsynthese nach der *Fmoc*-Strategie. Dafür war es notwendig, zunächst in einer linearen, biomimetischen Synthesestrategie die tumorassoziierten Kohlenhydratantigene T_N, Sialyl-T_N, TF, 2,6-Sialyl-T und 2,3-Sialyl-T (siehe Kap. 3.2) in Form von glycosylierten Aminosäurebausteinen des *Fmoc*-Threonin bzw. *Fmoc*-Serin herzustellen (Abb. 4.2).

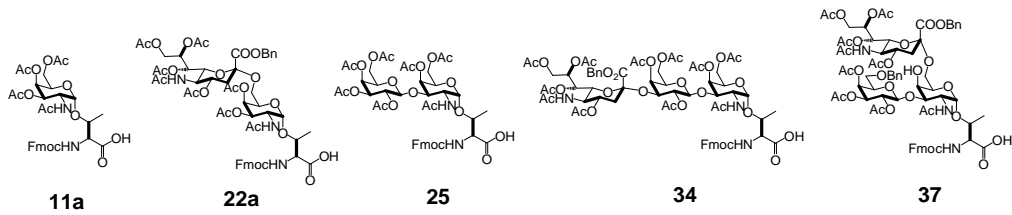


Abb. 4.2: Glycosylierte *Fmoc*-Aminosäurebausteine

Für eine Weiterentwicklung von Glycopeptid-Wirkstoffen ist die begrenzte metabolische Stabilität von glycosidischen Bindungen ein beschränkender Faktor. Eine Stabilisierung dieser Glycokonjugate gegen Glycosidasen könnte durch Ersatz der Sauerstoff-Brücke durch eine Methylen-Einheit erreicht werden. Deshalb wurde als Beispiel ein Konjugat mit einer *C*-glycosidischen Bindung zwischen der um einen Kohlenstoff verlängerten *D*-Galactose und Neuraminsäure hergestellt. Die hier entwickelte Samarium(II)-induzierte *Barbier-C*-Glycosylierung eröffnet einen Zugang zu einem *C*-glycosidisch verknüpften Sialyl-T_N-Antigen-Baustein (Abb. 4.3).

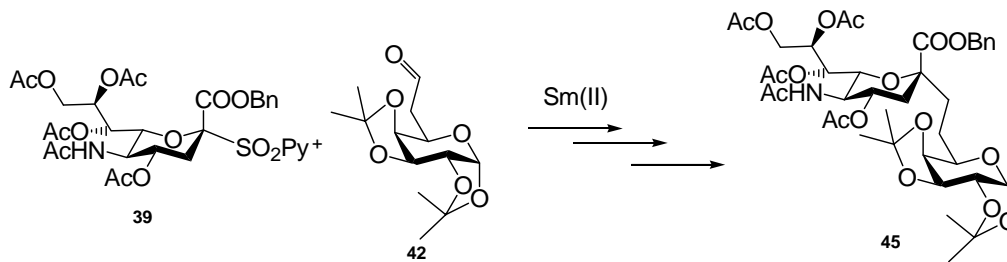


Abb. 4.3: Synthese eines *C*-glycosidischen ST_N-Antigens

Zur chemoselektiven Konjugation von MUC1-Glycopeptid-Epitopen mit immunstimulierenden Faktoren, müssen die Glycopeptide geeignet funktionalisiert werden. Für dieses Ziel wurden mit nucleophilen Gruppen, wie Aminen und Thiolen terminierte, immunologisch nicht störende Oligoethylenglycol-Spacer an die B-Zell-Epitop-Glycopeptide kovalent angebunden. Nach dem Einbau der immunkompatiblen Abstandhalter in die automatisierte Festphasensynthese über deren Carboxylfunktion wurden die synthetischen Glycopeptid-Epitope durch RP-HPLC in reiner Form isoliert (Kap. 3.3). Leider gelang eine selektive Thiol-Funktionalisierung nicht, da bei Hydrogenolyse der Benzyl-Schutzgruppen auch die Thiol-Einheit abgespalten wurde. Allerdings gelang die Synthese eines Dimers von MUC1-Glycopeptid, bei welchem die hydrogenolytische Schutzgruppenentfernung ausgespart werden konnte (Abb. 4.4). Auf diese Weise konnten Glycopeptid-Strukturbibliotheken der vollständigen *Tandem-Repeat*-Sequenz des Mucins MUC1 synthetisiert werden, die nicht nur zur Vakzin-Synthese, sondern auch zur Überprüfung der Selektivität der induzierten Immunantworten eingesetzt wurden (Abb. 4.4).

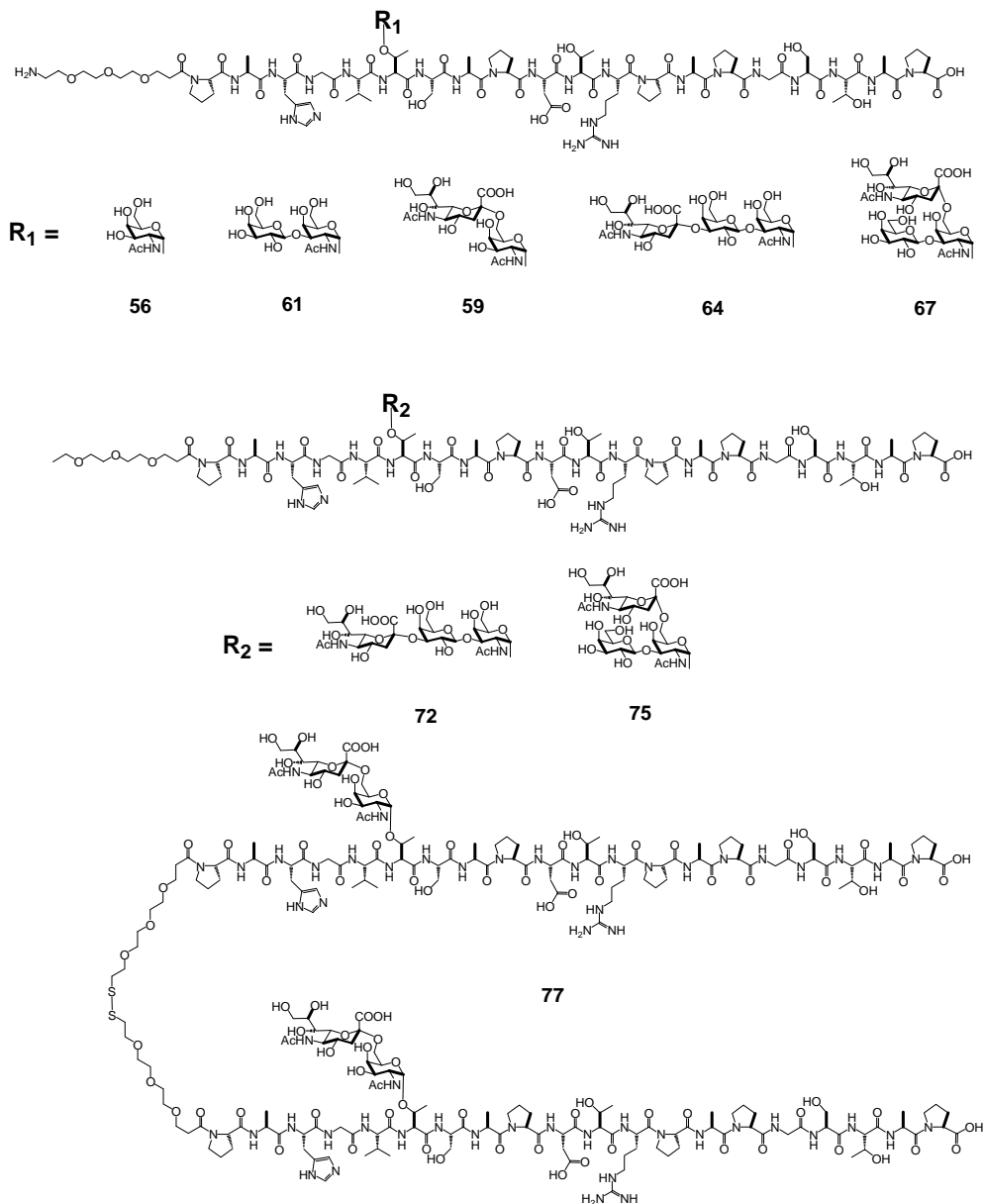


Abb. 4.4: Immunkompatibel verlinkte Glycopeptide

Tetanus-Toxoid ist ein stark immunogenes Trägerprotein, das bei geeigneter Konjugation mit Antigenen starke Immunreaktionen auslöst. Zur Entwicklung einer Antitumor-Vakzine bestehend aus Tetanus-Toxoid und einem tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid wurden die aminofunktionalisierten Glycopeptide **59**, **61**, **64** und **67** über Quadratsäure an das Trägerprotein gekuppelt (Abb. 4.5, Kap. 3.4). Die Quadratsäure wirkt als heterobifunktionaler Linker, der bei einem pH-Wert von 8 die terminale Aminofunktion des Glycopeptids in das Monoamid des Quadratsäureesters überführt. Bei einer Erhöhung des pH-Werts auf 9.5 in Gegenwart des Proteins bildet sich mit den Lysin-Seitenketten des Trägerproteins ein Quadratsäure-diamid (Abb. 4.5).

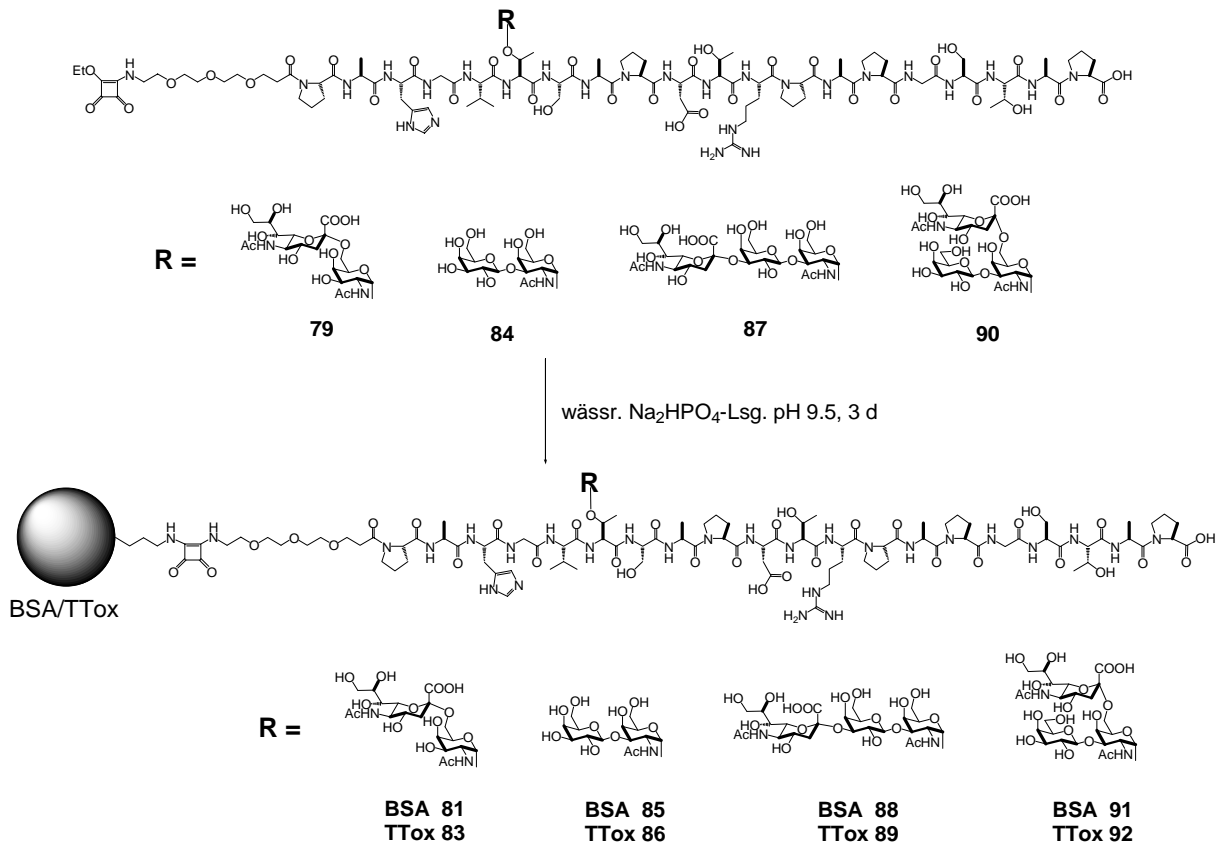


Abb. 4.5: MUC1-Neoglycoproteine aus BSA und Tetanus-Toxoid

Auf analoge Weise wurden auch aus Rinderserumalbumin (BSA) und MUC1-Glycopeptiden Neoglycoproteine erzeugt, die zur Beschichtung von Mikrotiterplatten in den immunologischen Bindungsstudien eingesetzt wurden. Im Falle der BSA-Konjugate konnte die Beladung des Proteins mit den MUC1-Glycopeptiden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt werden. Im Durchschnitt wurden nach diesem Konjugationsverfahren 3-8 Moleküle MUC1-Glycopeptid pro BSA angebunden. Ein Vergleich des MUC1-Glycopeptid-TTox-Konjugats **83** mit dem analogen BSA-Konjugat **81** zeigte in einem Bindungsassay bei der Verwendung eines gegen das MUC1-Glycopeptid spezifischen monoklonalen Antikörpers eine nahezu identische Antigendichte. Hieraus wurde abgeleitet, dass die Beladungsdichte von BSA- und TTox-Konjugat etwa gleich ist (Abb. 4.6 (links)). Zur Prüfung der synthetisierten Vakzine **83** aus Tetanus-Toxoid und MUC1-Glycopeptid, wurden 10 balb/c-J-Mäuse mit Vakzine **83** immunisiert. Nach der 2. Immunisierung konnten in den Seren aller Mäuse hohe Antikörperkonzentrationen durch ELISA gegen das MUC1-Glycopeptid festgestellt werden (Abb. 4.6 (rechts)).

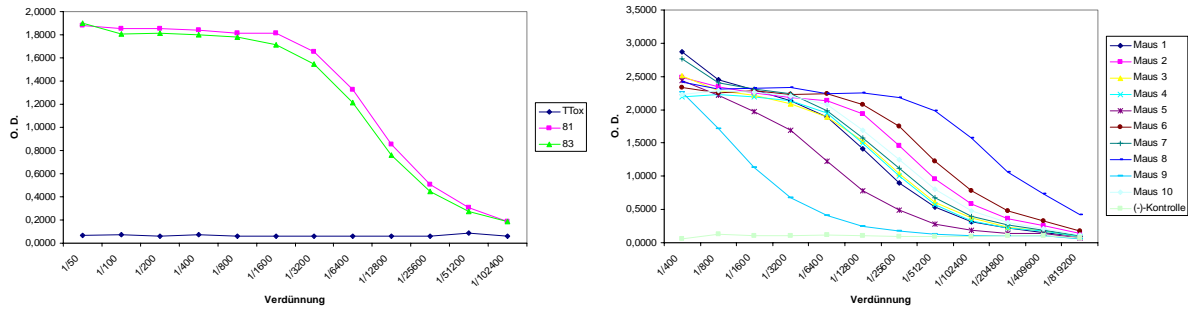


Abb. 4.6: Immunologisch ermittelter Vergleich der Beladung von BSA-Konjugat 81 und Tetanus-Toxoid-Vakzine 83 (links); MUC1-Glycopeptid-spezifische Immunreaktionen (Antikörper-Titer) nach 2. Immunisierung mit Vakzine 83 (rechts)

Tetanus-Toxoid wird als Impfstoff gegen Wundstarrkrampf eingesetzt. Es erstaunt daher nicht, dass durch Vakzine **83** Tetanus-Toxoid-spezifische Antikörper induziert werden. Deren Titer wurden ermittelt, indem das Tetanus-Toxoid als Beschichtung im ELISA verwendet wurde (Abb. 4.7 (links)). Um herauszufinden wie selektiv die induzierten MUC1-spezifischen Antikörper reagieren, wurde das Serum von Maus 8 mit dem synthetischen MUC1-Glycopeptid-Dimer **77** (Abb. 4.4) inkubiert und die Restbindungsfähigkeit an das BSA-MUC1-Konjugat **81** mit der Bindung des unbehandelten Serums von Maus 8 verglichen (Abb. 4.7 (rechts)). Dabei wurde nahezu vollständige Neutralisierung der Antikörper und damit die hohe Selektivität der induzierten humoralen Immunantwort nachgewiesen. In weiteren Neutralisationsexperimenten konnte die hohe Selektivität der Antikörper auch gegenüber anderen tumorassoziierten MUC1-Glycopeptiden ermittelt werden (Kap. 3.4). Nach der gleichen Immunisierungsstrategie wurden auch Mäuse mit der Tetanus-Toxoid-MUC1-T-Vakzine **86** behandelt, welche als prägendes Saccharid das T-Antigen trägt.

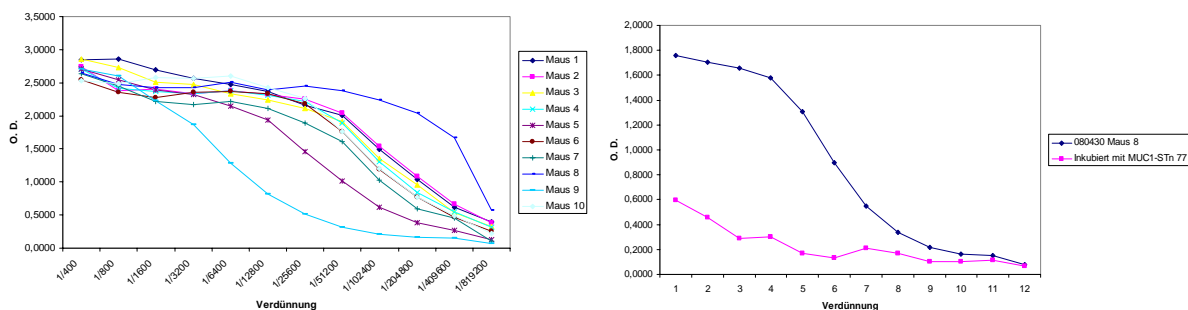
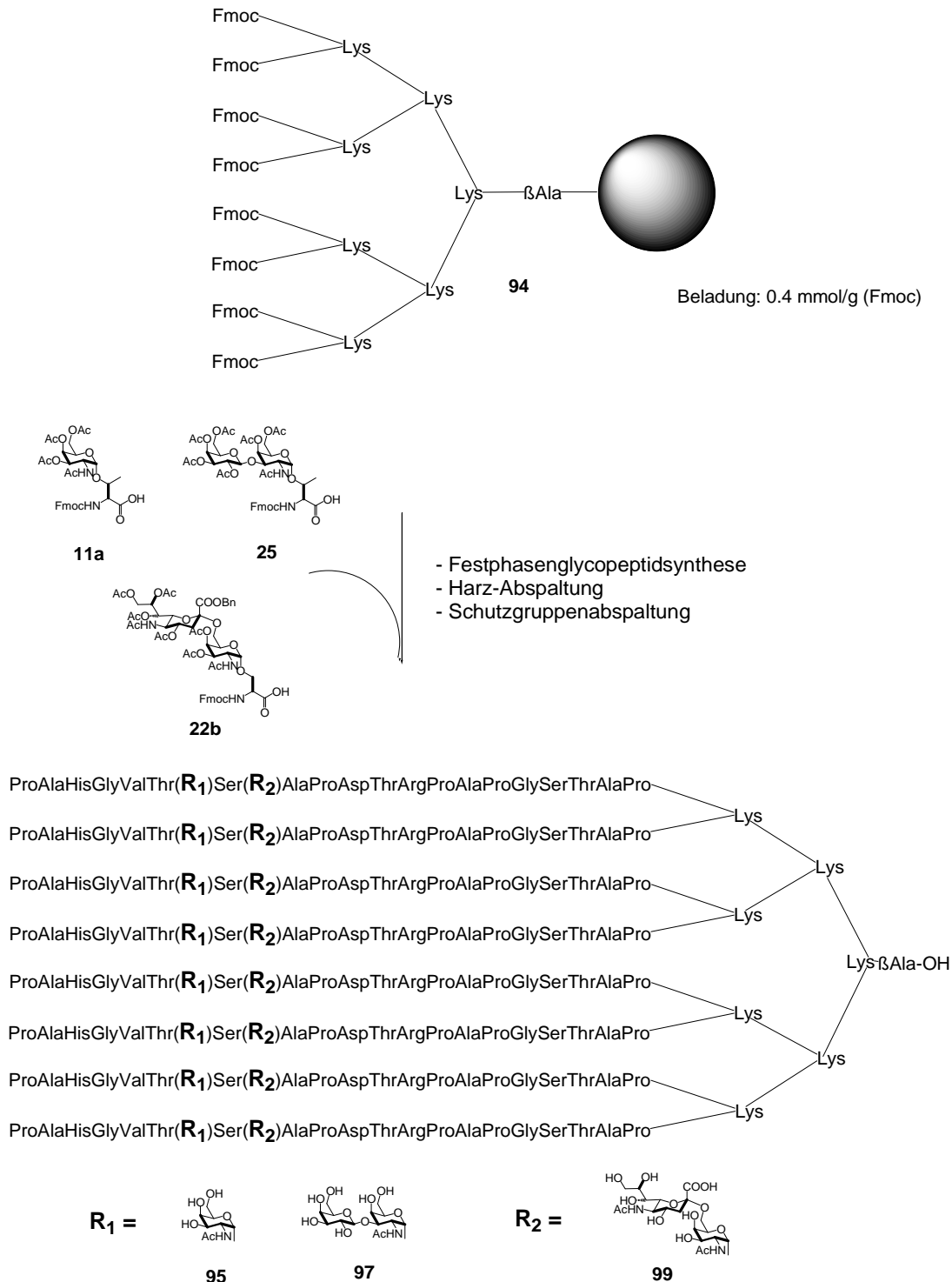


Abb. 4.7: Titer der gegen Tetanus-Toxoid-spezifischen Antikörper der mit Vakzine 83 ausgelösten Immunantwort (links); Neutralisierung der MUC1-Glycopeptid(79)-spezifischen Antikörper nach Inkubation mit Glycopeptid-Dimer 77 (rechts)

Es zeigte sich auch hier, dass Immunisierungen mit Tetanus-Toxoid-Glycopeptid-Konjugaten robuste hochselektive IgG-spezifische humorale Immunantworten gegen die Glycopeptid-Haptene liefern. Solche Vakzin-Konstrukte dürften für die Entwicklung eines beim Menschen applizierbaren Antitumor-Impfstoffs entscheidende Bedeutung haben.

Die wesentlichen Nachteile von Protein-Konjugaten ist, dass sie sich nicht eindeutig charakterisieren lassen. Auch ist ihre Synthese in größeren Mengen umständlich und teuer. Eine Lösung dieses Problems könnte die Entwicklung von vollsynthetischen Antitumor-Impfstoffen bieten. Eine Möglichkeit, definierte vollsynthetisch zugängliche MUC1-Glycopeptid-Vakzin-Kandidaten zu erhalten ist in der Synthese von dendrimeren Glycopeptiden gegeben. Hierzu wurde die Festphasensynthese von dendrimeren MUC1-Glycopeptiden an einem Oligolysinkern durchgeführt. Bis zu acht Peptidstränge wurden so gleichzeitig aufgebaut (Kap. 3.5). Nach Schutzgruppenentfernung erhielt man die vollsynthetischen Vakzine, welche durch RP-HPLC gereinigt und durch NMR-Spektroskopie charakterisiert wurden (Abb. 4.8). Wegen der Multivalenz und des Molekulargewichts (ca. 20000 g/mol) der octameren MUC1-Glycopeptide dürften sie im Körper wie endogene Proteine prozessiert werden, was zu einer Immunreaktion führen würde, ohne dass die Konstrukte mit immunstimulierenden Substanzen aktiviert werden müssen. Um zu überprüfen, ob die synthetisierten octameren MUC1-Glycopeptide in der Lage sind, eine humorale IgG-spezifische Immunantwort zu induzieren, wurden mit Vakzine **97** drei balb/c-J-Mäuse immunisiert. Nach der zweiten Immunisierung war die gegen das MUC1-Glycopeptid(**84**)-spezifische Immunantwort deutlich zu erkennen. Sie konnte durch zwei weitere Auffrischungsimpfungen weiter verstärkt werden, was ein deutliches Indiz für eine MHCII-restringierte IgG-Immunantwort ist. In ELISA-Tests der Seren der drei Mäuse konnte gezeigt werden, dass dendrimere Glycopeptide auch als Beschichtungen für Mikrotiterplatten bei der Auswertung von Immunreaktionen geeignet sind.



Vergleichende ELISA-Tests ergaben, dass die spezifischen IgG-Antikörper der drei Mäuse unterschiedlich auf die Beschichtung mit Dendrimer **97** bzw. mit BSA-Konjugat **85** reagieren (Abb. 4.9). Beide Konstrukte enthalten die identische MUC1-Glycopeptidsequenz. Allerdings liegt das octamere Glycopeptid ohne immunkompatiblen Spacer an den Lysinkern gebunden vor. Das bedeutet, dass der Lysinkern einen immunologischen Effekt hat, der zu Differenzen in der Bindung des Antikörpers führt.

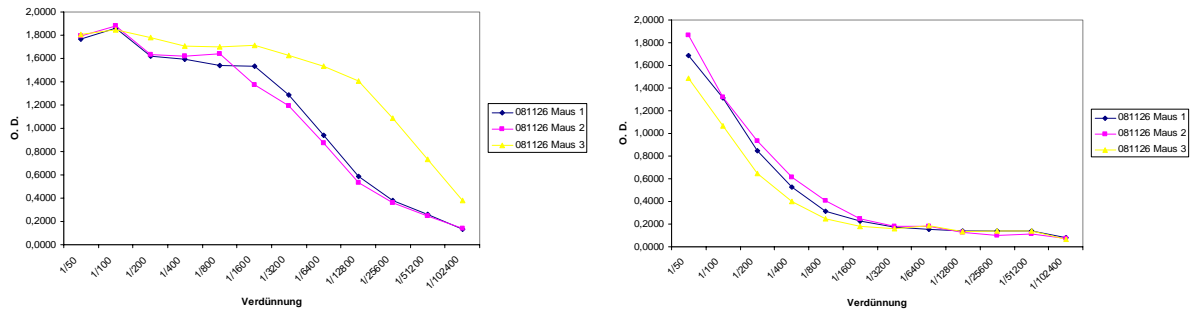


Abb. 4.9: Antikörperkonzentrationen in den Seren der mit Vakzine 97 immunisierten Mäusen (Mikrotiterplatten beschichtet mit octamerem Glycopeptid 97 (links) und mit BSA-Neoglycoprotein 85 (rechts))

Um solche Differenzen zu vermeiden, wurde ein Glycopeptid-Dendrimer synthetisiert, welches über die Spaceraminosäure **53** am Lysinkern verankert ist. Des Weiteren wurde bei diesem Dendrimer **101** eine um zwei Aminosäuren verlängerte MUC1-Sequenz, die im Peptidepitop STAPPA mit dem Sialyl-T_N-Antigen glycosyliert vorliegt, synthetisiert (Abb. 4.10). Diese dendrimere Vakzine sollte Immunreaktionen auslösen, die auf BSA- und Dendrimer-Beschichtungen identische Antikörpererkenntnisse ergeben.

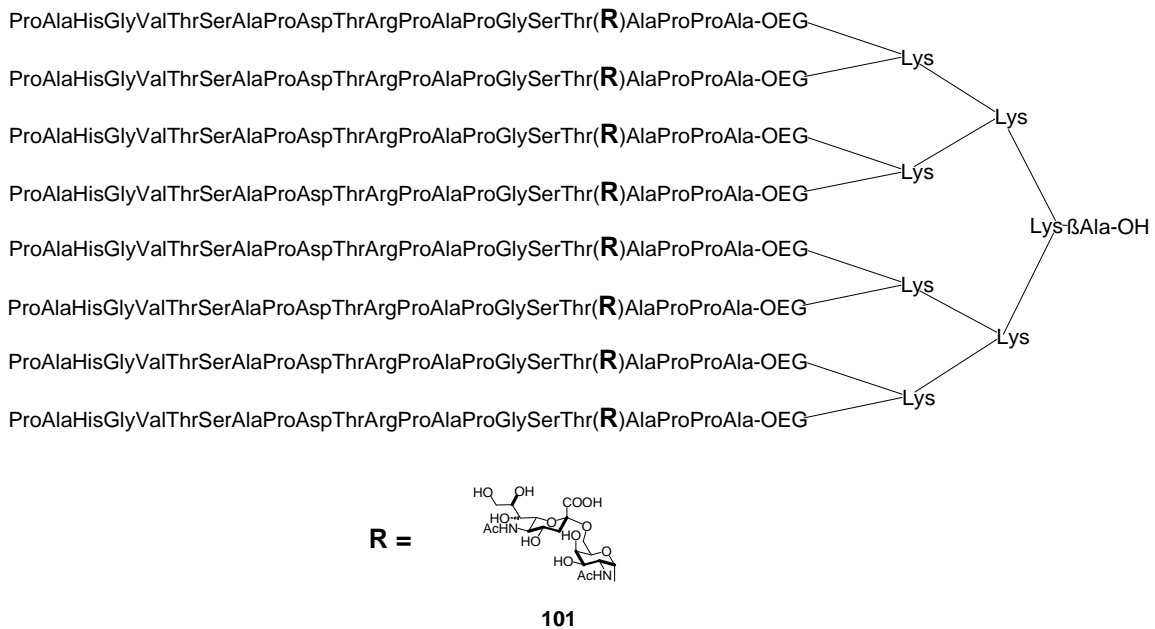


Abb. 4.10: Synthese des octameren spacergebundenen Glycopeptids 101

Die Synthese dendrimere Glycopeptide verkörpert ein Verfahren, vollsynthetische Vakzin-Kandidaten in präparativen Mengen zugänglich zu machen. Diese Konstrukte lösen in Immunisierungen bei Mäusen starke, reproduzierbare humorale Immunantworten aus.

Im Hinblick auf eine beim Menschen durchführbare aktiv-Immunsierung wurde nach weiteren Alternativen zu den TTox-Konjugaten gesucht. Interessant sind Verfahren, die die Verwendung des kompletten Freund'schen Adjuvans überflüssig machen. Der TLR2-Agonist Pam₃CSK₆ kann bei Immunsierungen als Adjuvans fungieren, indem er über eine polyklonale Aktivierung von B-Zellen eine Immunantwort induziert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid-B-Zell-Epitop mit dem TLR2-Agonist über einen immunologisch neutralen Abstandhalter konjugiert. Nach der Synthese des Pam₃Cys-Bausteins ausgehend von L-Cystin, wurde der basen- und säure-labile geschützte TLR2-Agonist durch Lipopeptidsynthese an der Festphase nach dem PTMSE-Protokoll durchgeführt (Kap. 3.6). Das PTMSE-Ankermolekül ermöglicht eine Abspaltung vom polymeren Träger unter neutralen Bedingungen. Der nur am C-Terminus deblockierte TLR2-Agonist wurde anschließend in einer Fragmentkondensation mit vollständig deblockierten MUC1-Glycopeptiden verknüpft. Nach abschließender Schutzgruppenabspaltung konnten die MUC1-Lipoglycopeptide nach RP-HPLC in reiner Form erhalten werden (Abb. 4.11).

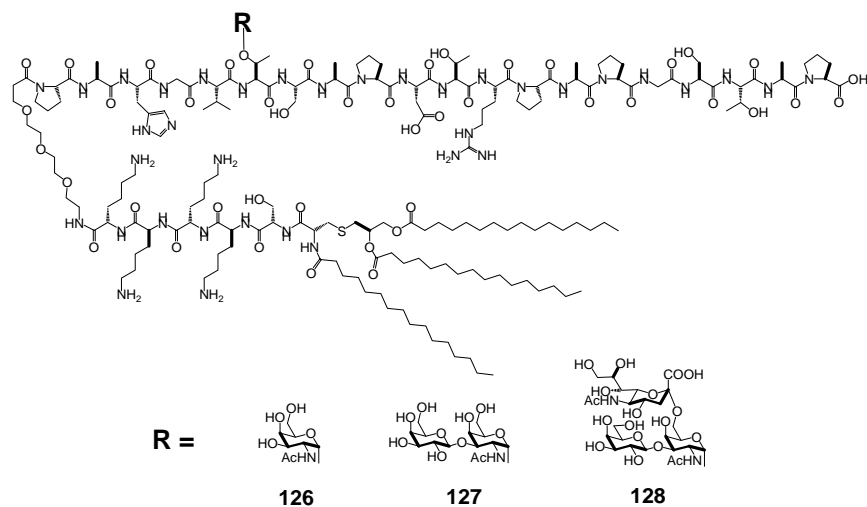


Abb. 4.11: MUC1-Glycopeptid-TLR2-Agonist-Konjugate

Um herauszufinden, ob die Konjugation des TLR2-Agonisten an die MUC1-Glycopeptide unter polyklonaler B-Zellaktivierung zu humoralen Immunantworten führt, wurde das Vakzin-Konstrukt **127** drei Mäusen des Stamms balb/c-J appliziert. Nach drei Immunsierungen konnte eine deutliche spezifische humorale IgG-Antikörperproduktion festgestellt werden (Abb. 4.12). Die ELISA-Resultate lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Aktivierung des Immunsystems mit TLR2-Agonist-MUC1-Glycopeptid-Konjugaten zu MHC(II)-restringierten Immunantworten führt.

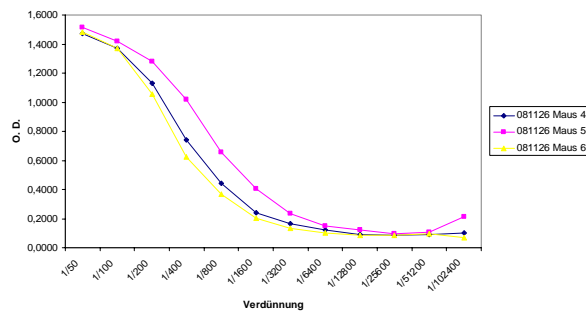


Abb. 4.12: Antikörperkonzentrationen (nach 3. Immunisierung) in den Seren der mit Vakzine 127 immunisierten Mäuse (Mikrotiterplatten beschichtet mit BSA-Konjugat 85)

Eine weitere Möglichkeit, die Immunogenität von Glycopeptid-Epitopen zu steigern, besteht in der Anbindung der Antigene an ein universelles T_H-Zell-Epitop. Diese Variante ermöglicht den Zugang zu relativ niedermolekularen, vollsynthetischen Vakzin-Konstrukten. Es wurden daher Heterotop-Konjugate aus tumorassoziierten MUC1-Glycopeptiden und den universellen T-Zell-Epitopen OVA₃₂₃₋₃₃₉ und TTox₅₉₀₋₅₉₉ hergestellt. Das OVA₃₂₃₋₃₃₉-T-Zell-Epitop kann nur in OVA-transgenen Mäusen zum Einsatz kommen, wohingegen die TTox₅₉₀₋₅₉₉-Sequenz ein Ausschnitt aus dem Tetanus-Toxoid-Protein ist und somit auch als potentielle Vakzine für den Menschen in Frage kommt (Abb. 4.13).

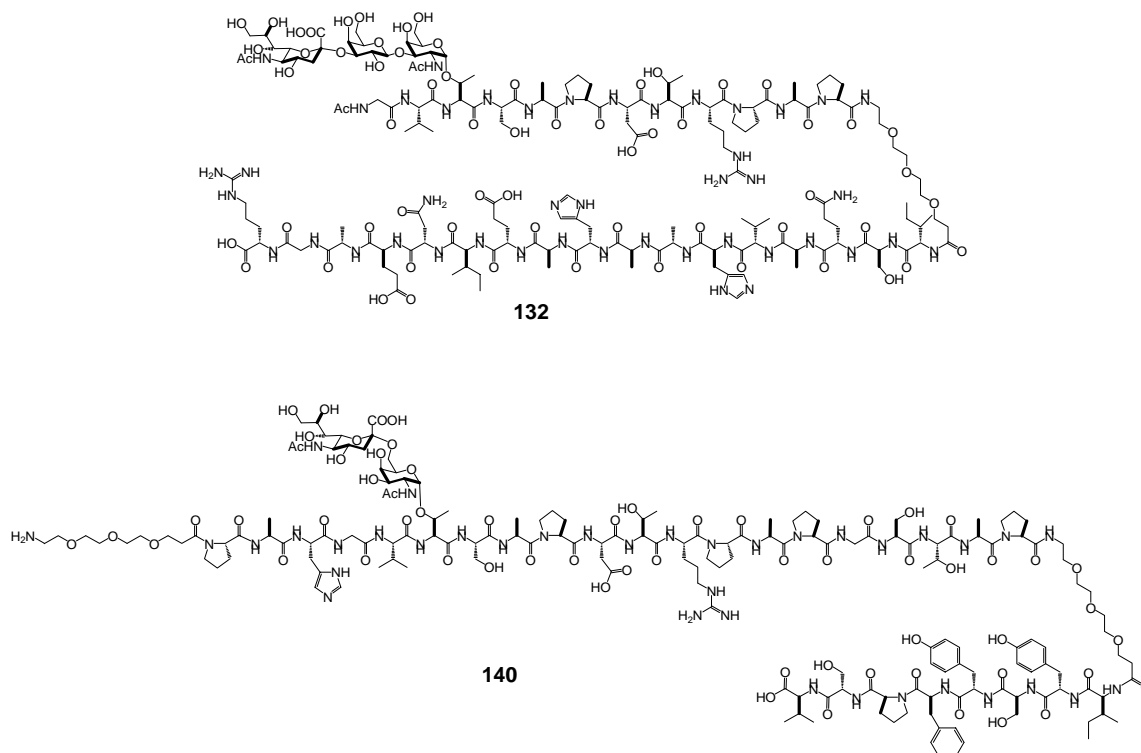


Abb. 4.13: OVA₃₂₃₋₃₃₉-MUC1-Glycopeptid- 132 und TTox₅₉₀₋₅₉₉-MUC1-Glycopeptid-Heterotop-Konjugat 140

Um die Immunität solcher Heterotop-Konjugate zu steigern, kann man sie noch zusätzlich mit Lipid-Strukturen versehen. Solche Oligotop-Konjugate wurden aufgebaut, indem die Festphasensynthese mit einem Alkylamid abgeschlossen wurde, das lange Alkylketten trägt. In diesem Sinne wurde ein Heterotop-Konjugat aus OVA₃₂₃₋₃₃₉-T-Zell-Epitop und MUC1-Glycopeptid mit zwei Octadecyl-Ketten hergestellt. Außerdem wurde eine aus drei Komponenten bestehende Vakzine aufgebaut, indem der lipophile TLR2-Agonist an eine TTox₅₉₀₋₅₉₉-MUC1-Glycopeptid-Vakzine kovalent über die Oligoethylenglycop-Spacereinheit angebunden wurde (Abb. 4.14).

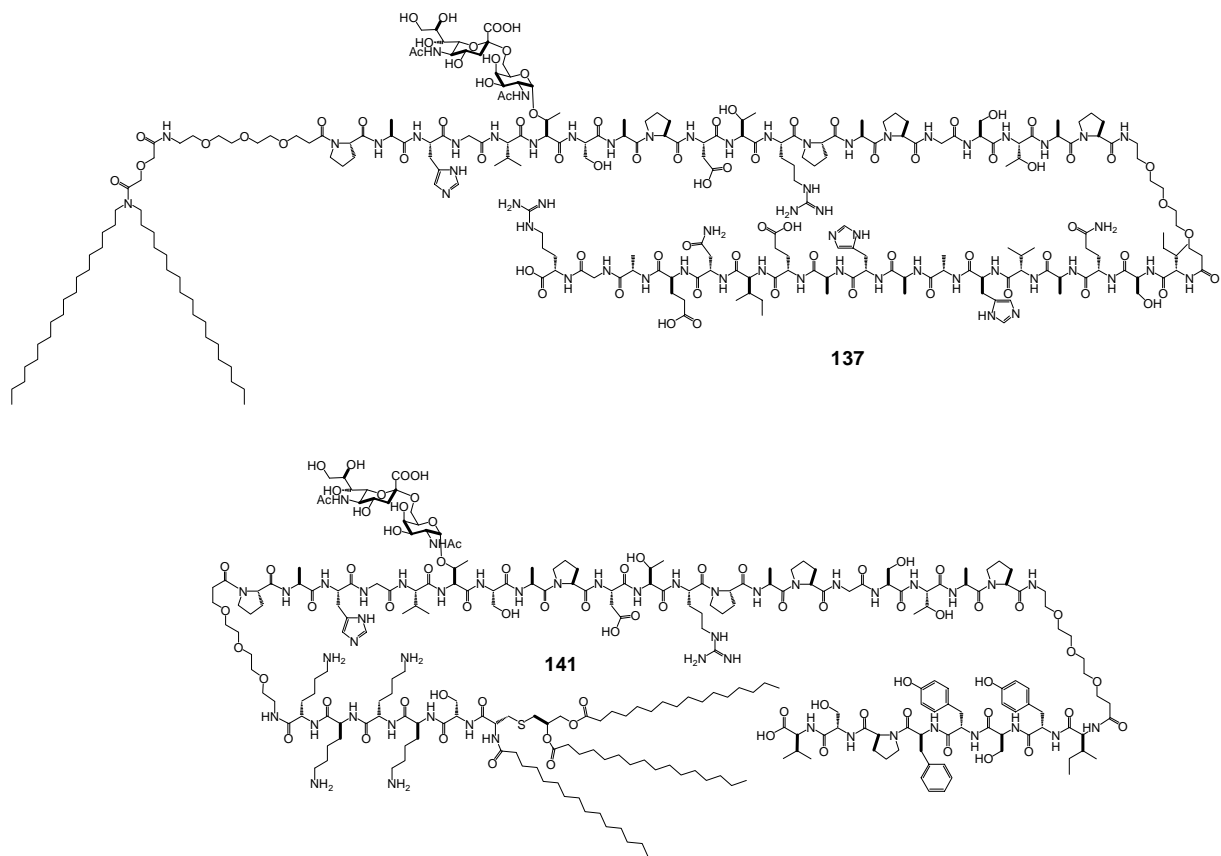


Abb. 4.13: Lipoglycopeptide aus Dioctadecyl-OVA₃₂₃₋₃₃₉-MUC1-Glycopeptid 137 und TLR2-Agonist-TTox₅₉₀₋₅₉₉-MUC1-Glycopeptid-Heterotop-Konjugat 141

Die in dieser Arbeit diskutierten und durchgeführten synthetischen und immunologischen Studien zur Entwicklung von Glycopeptid-Antitumor-Vakzinen zeigen, dass robuste, reproduzierbare und selektive Immunantworten gegen synthetische Mucin MUC1-Glycopeptid-Antigene induziert werden können. Mit der Synthese von Konjugaten aus Tetanus-Toxoid und MUC1-Glycopeptid-Antigen ist außerdem der Weg von Tierexperimenten hin zu einer beim Menschen anwendbaren Vakzine frei. Auch dürften die dendrimere Glycopeptid-Konstrukte im humanen System erfolgreich angewendet werden

können. Mit der Entwicklung von TLR2-Agonist-Glycopeptid-Konjugaten kann darüber hinaus der Einsatz des beim Menschen nicht zugelassenen kompletten Freund'schen Adjuvans (CFA) vermieden werden. Das TLR2-Adjuvans fördert zusätzlich die Ausbildung einer humoralen Immunantwort. Mit einem Heterotop-Konjugat bestehend aus MUC1-Glycopeptid und einer Tetanus-Toxoid-Partialsequenz, könnte die Anwendung des kompletten hoch immunogenen Tetanus-Toxoid-Trägerproteins umgangen werden. Allerdings muss der Ersatz des Freund'schen Adjuvans durch die TLR2-Agonist-Konjugate in immunologischen Studien noch geprüft werden, etwa durch eine Immunisierungsstrategie, bei der die Tetanus-Toxoid-Vakzine **92** stets mit dem TLR2-Agonist-MUC1-Konjugat **128** zusammen und ohne Verwendung von CFA appliziert wird.

Erste Resultate zur Gewinnung monoklonaler Antikörper, die unbegrenzt verfügbar sind und als therapeutische Werkzeuge bei der Bekämpfung und Eindämmung von Tumorerkrankungen dienen könnten, liegen bereits vor.

Die nächsten Schritte zur Prüfung einer Antitumor-Vakzine müssen in pathologischen Untersuchungen bestehen, in denen gezeigt wird, dass die Antikörper nur Tumorzellen, nicht aber normale Zellen erkennen.

5. Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

Lösungsmittel: Alle Lösungsmittel wurden in der Qualität *pro analysi* (p.a.) bezogen und vor Gebrauch destilliert. Absolute Lösungsmittel wurden durch Trocknen nach literaturbekannten Verfahren³¹⁷ und anschließende Destillation gewonnen.

Dünnschichtchromatographie: Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel60 F254 beschichtete Aluminiumfertigplatten der Firma *Merck*, Darmstadt verwendet. Zur Detektion bediente man sich folgender Methoden:

- UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm.
- Seebach-Reagenz (1.0 g Cer(IV)-sulfat-tetrahydrat und 2.5 g Molybdätosphorsäure in einer Mischung aus 94 ml entionisiertem Wasser und 6 ml konz. Schwefelsäure). Die Entwicklung erfolgte durch Wärmeeinwirkung.
- Methoxyphenol-Reagenz (1:1-Mischung aus 0.2%-iger ethanolischer *m*-Methoxyphenol-Lösung und 2N ethanolischer Schwefelsäure). Die Entwicklung erfolgte durch Wärmeeinwirkung.
- Kaliumpermanganat-Reagenz (0.5%-ige wässrige Kaliumpermanganat-Lösung). Die Entwicklung erfolgte durch Wärmeeinwirkung.
- Ninhydrin-Reagenz (1.5 g Ninhydrin in 15 ml Essigsäure und 500 ml Methanol). Die Entwicklung erfolgte durch Wärmeeinwirkung.

Flashchromatographie:³¹⁸ Für die Flashchromatographie der in Lösung erzeugten Verbindungen unter erhöhtem Druck (0.5 - 1 mbar), wurde Kieselgel mit einer Partikelgröße von 0.032-0.063 nm der Firma *Acros Organics* eingesetzt. Das Laufmittel wurde in der Regel durch Redestillation der Eluate anderer Chromatographien gewonnen. Durch Zusatz der polaren oder unpolaren Komponente wurde das Lösungsmittelgemisch so eingestellt, dass die zu isolierende Substanz einen R_f -Wert von 0.05-0.20 aufwies.

³¹⁷ D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3 ed., Pergamon Press, Oxford, 1988.

³¹⁸ W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923.

Massenspektrometrie:

- MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Tofspec E-Gerät der Firma *Micromass*, Eschborn, bzw. einem *Bruker* Time-of-flight REFLEX-Spektrometer gemessen. Als Matrices dienten 2,5-Dihydroxybenzoesäure (dhb, 17 mg/ml in H₂O/Acetonitril 1:1, + 0.1% TFA), bzw. Sinapinsäure (10 mg/ml in H₂O/Acetonitril 1:1, + 0.1% TFA).
- ESI-Massenspektren wurden mit einem *Micromass* LCT-Spektrometer gemessen.
- Hochaufgelöste HR-ESI-TOF-Spektren wurden mit einem *Micromass* Q-TOF Ultima Spektrometer aufgenommen.
- FD-Massenspektren wurden mit einem *Finnigan* MAT-95-Spektrometer der Firma *ThermoElectron*, Boston, gemessen.

Schmelzpunkte wurden an einer *Büchi*-Schmelzpunktapparatur nach Dr. Totolli bestimmt und sind unkorrigiert.

Drehwerte: Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem *Perkin-Elmer* Polarimeter 241 bestimmt und auf die Natrium-D-Linie (589.5 nm) extrapoliert. Lösungsmittel, Temperatur und Konzentration, die in g/100 ml angegeben ist, sind für die einzelnen Verbindungen vermerkt.

NMR-Spektroskopie: Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten aufgenommen:

- *Bruker* WT-300: 300 MHz-¹H-NMR und 75.5 MHz-¹³C-NMR
- *Bruker* AM-400: 400 MHz-¹H-NMR und 100.6 MHz-¹³C-NMR

Die angegebenen Werte für die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das Signal des deuterierten Lösungsmittels bei relativer Kalibrierung zu Tetramethylsilan als Standard. Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffsignale erfolgte unter Verwendung von COSY-, TOCSY-, NOESY-, HSQC- und HMBC-Experimenten, soweit angegeben. In der schriftlichen Interpretation der ¹H- und ¹³C-Signale wurden die Atome des D-Galactosamins ohne (), der D-Galactose mit einfacher (') und die der *N*-Acetylneuraminsäure durch zweifache Apostrophierung (") gekennzeichnet. In den Verbindungen des (2→3)- und (2→6)-verbundenen Sialinsäurerestes wurden die Atome durch zweifache Apostrophierung (") kenntlich gemacht. Die Atome der Aminosäuren wurden durch indizierte griechische Buchstaben markiert.

RP-HPLC:³¹⁹ Analytische HPLC wurde mit einer *Knauer* Maxi Star K 1000-Gradienten-Pumpe, einem *Knauer* 4-Kanal-Entgaser sowie einem *Knauer* Diodenarraydetektor DAD K2800 unter Verwendung der Software *ChromGate* der Firma *Knauer*, Berlin, durchgeführt. Die Detektion der Produkte erfolgte bei $\lambda = 214$ nm bzw. 254 nm. Es wurden folgende RP-Säulen benutzt:

- *Phenomenex Luna 5 μ C18 (2), 250 x 4.6 mm*
- *Phenomenex Jupiter 5 μ C18 (2), 300 Å, 250 x 4.6 mm*
- *Vydac Protein 5 μ C4 (2), 300 Å, 250 x 4.6 mm*

Als Eluentien dienten Wasser/Acetonitril-Gemische, gegebenenfalls unter Zusatz von 0.1% Trifluoressigsäure, bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die verwendeten Gradienten sind in der jeweiligen Synthesvorschrift der entsprechenden Verbindungen aufgeführt. Für die präparative HPLC wurden zwei *Knauer* Ministar K500-Pumpen in Hochdruckgradientenschaltung in Kombination mit einem variablen Wellenlängenmonitor eingesetzt. Die Detektion der Produkte erfolgte bei $\lambda = 214$ nm bzw. 254 nm. Man bediente sich folgender Säulen :

- *Phenomenex Luna 10 μ C18 (2), 260 x 50.0 mm, Flussrate: 20 mL/min*
- *Phenomenex Luna 5 μ C18 (2), 250 x 21.2 mm, Flussrate: 10 mL/min*
- *Phenomenex Jupiter 5 μ C18 (2), 250 x 21.2 mm, Flussrate: 10 mL/min*
- *Vydac Protein 5 μ C4 (2), 250 x 21.2 mm, Flussrate: 10 mL/min*

Festphasenpeptidsynthese: Die Peptid- und Glycopeptidsynthesen an der Festphase wurden an einem *Perkin-Elmer* ABI 433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt, der zur Kontrolle des Syntheseverlaufs mit einem externen *Perkin-Elmer* Series 200 UV/Vis-Detektor der Firma *Applied Biosystems* ausgestattet ist. Die polymeren Träger für die Festphasensynthese wurden von der Firma *Calbiochem-Novabiochem AG*, Läuflingen, Schweiz, und der Firma *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, erworben. Die verwendeten Aminosäurebausteine wurden von den Firmen *Orpegen Pharma*, Heidelberg, bzw. *Calbiochem-Novabiochem AG*, Läuflingen, Schweiz, bezogen.

In den sich wiederholenden Syntheseabschnitten wird zunächst die *Fmoc*-Schutzgruppe durch Behandlung (3 x 2.5 min) des Harzes mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon (NMP) abgespalten. Zur Überprüfung des Abspaltungsvorgangs wird über UV-Absorption das gebildete Dibenzofulven-Piperidin-Addukt in NMP bei einer Wellenlänge von $\lambda = 301$ nm detektiert.

³¹⁹ G. Szepesi, *Reverse-Phase HPLC*, VCH, Weinheim, 1992.

Die darauf folgenden sequentiellen Aminosäure-Kupplungen erfolgen jeweils mit einer Reaktionslösung von 1 mmol des *Fmoc*-geschützten Aminosäurebausteins, 1 mmol HBTU, 1 mmol 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 2 mmol *N*-Ethyldiisopropylamin (DIPEA) in DMF unter starkem Schütteln (Vortex, 20-30 min). Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz zur Acetylierung verbleibender freier Amino-Funktionen 5 min mit einer Lösung aus 0.5 M Acetanhydrid, 0.125 M DIPEA und 0.015 M HOBt in NMP (Capping-Reagenz) behandelt. Das Harz wird nach jedem Syntheseschritt 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 und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

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

Beladungsbestimmungen³²⁰ erfolgten photometrisch durch Abspalten der *N*-terminalen Fmoc- Schutzgruppe und anschließende Messung der Extinktion *E* des in der Abspaltung gebildeten Dibenzofulven-Basen-Addukts. Zur Ermittlung der Beladungen wurden 20 mg des Harzes in 18.07 g Piperidin/DMF (1:1) suspendiert und 45 min geschüttelt. Anschließend wurde ein Aliquot von 1 g entnommen, mit DMF/Piperidin auf 10 mL aufgefüllt und photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 278$ nm in einem *Perkin-Elmer* Lambda 17 UV/Vis-Spektrometer vermessen. Die Beladung wurde mit der Kalibrationsgeraden c [mol/l] = $(E * 104) / 10417$ ermittelt.

Ultrafiltration erfolgte in einer *Stirred Ultrafiltration Cell* der Firma *Millipore Corporation*, Bedford, USA. Ultrafiltrationen wurden mit Membranen aus Polyethersulfonen der Durchlässigkeit 10 kDa und 30 kDa durchgeführt.

Molekulare Massen in runden Klammern beziehen sich auf die natürliche Isotopenverteilung, Molmassen in eckigen Klammern hingegen auf die exakten Massen der Isotope ¹H, ¹³C, ¹⁴N, ¹⁶O und ³²S.

³²⁰ *Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Organic Chemistry*, 1998, 330.

Allgemeine Vakzin-Formulierung:*Materialien:*

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

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

Synthetische MUC1-Vakzine in PBS1x, $c = 0.5$ mg/ml bzw. 0.4 mg/ml.

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** verfahren unter Verwendung von 1 ml CFA und 1 ml einer Lösung der synthetischen MUC1-Vakzine in PBS1x-Lösung ($c = 0.5$ mg/ml) \rightarrow ($c(\text{MUC1-Vakzine}) = 0.25$ mg/ml).

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

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

Blutprobenentnahme und Serumgewinnung

Blutproben der Mäuse werden jeweils 5 Tage nach jeder Immunisierung unter sterilen Bedingungen aus der Schwanzvene entnommen und sofort für die Serumgewinnung eingesetzt. Zur Serumgewinnung werden ca. $4-5$ Tropfen Blut in einem 1.5 ml Eppendorf-Gefäß bis zur vollständigen Gerinnung 2 h bei Raumtemperatur, anschließend 2 h bei 4 °C belassen und dann 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Das klare Serum wird abgenommen und erneut 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Das Serum wird in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung in ELISA-Tests bei -20 °C gelagert.

ELISA-Materialien

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

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

Wasch-Puffer: PBS + Tween© 20 ($1/100$); Tween© 20: Polyethylenglycolsorbitan-Monolaurat (nicht ionisches Detergenz)

Citrat-Puffer: 40 mM Citronensäure, 60 mM Na₂HPO₄·2H₂O-Lösung, pH = 4.4-4.5
ABTS/H₂O₂-Lsg. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzylthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz (Sigma), c(ABTS) = 1 mg/ml Citrat-Puffer; Zugabe von 25 µl einer 0.3%-igen H₂O₂-Lösung in Citrat-Puffer / ml 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 $\lambda = 410$ nm in einem ImmunoReader MJ2000 (InterMed) gemessen.

5.2 Synthesen zu Kapitel 3.2

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin (2a)**

(Fmoc-Thr-OH)¹¹²

Eine Lösung von 17.7 g (148.5 mmol) L-Threonin (**1a**) und 12.5 g (148.6 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)-methoxycarbonyl-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) versetzt. Es wird 15 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit konz. HCl auf pH = 2 angesäuert und das Aceton i. Vak. abdestilliert. Das Produkt wird dreimal mit jeweils 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird zweimal mit je 100 ml 1N HCl und 200 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird dreimal mit Toluol und anschließend zweimal mit Dichlormethan kodestilliert.

Ausbeute: 49.4 g (144.6 mmol, 97%), farbloser amorpher Feststoff, $R_f = 0.57$ (EE/HOAc, 10:1).

$C_{19}H_{19}NO_5$ (M = 341.36 g/mol) [341.13].

ESI-MS (*positiv*), m/z : 364.3 ($[M+Na]^+$, ber.: 364.1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.70 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.56 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.0$ Hz), 7.42-7.20 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 4.44-4.31 (m, 4H, CH₂-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 4.13 (t, 1H, H9-Fmoc, $J_{H9,CH2} = 6.9$ Hz), 1.31 (d, 3H, T ^{γ} , $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-serin (2b)**

(Fmoc-Ser-OH)¹¹³

Eine Lösung von 5.20 g (50 mmol) L-Serin (**1b**) in 100 ml Acetonitril und 6.96 ml (50 mmol) Triethylamin wird mit 16.9 g (50 mmol) Fmoc-OSu versetzt. Zur farblosen Suspension werden innerhalb von 15 min. weitere 6.96 ml (50 mmol) Triethylamin zugetropft. Die farblose Lösung wird 30 min. bei Raumtemp. gerührt und dann i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird auf 200 ml einer 1N HCl-Lösung gegossen. Nach 14 h bei 0 °C wird der Niederschlag abfiltriert. der Niederschlag wird wieder in 500 mL CH₂Cl₂ gelöst und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösung wird teilweise eingengt und das Produkt mit Petrolether ausgefällt.

Ausbeute: 11.10 g (33.9 mmol, 98%); farbloser amorpher Feststoff; R_f : 0.55 (EE/AcOH 1:1).
Schmp.: 90-93 °C; weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹³
 $C_{18}H_{17}NO_5$ (M = 327.34 g/mol) [327.11].

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-threonin-*tert*-butylester (3a)**

(Fmoc-Thr-*Ot*Bu)^{112,119,120}

Eine Mischung aus 100 g (483 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, 22 g (679 mmol) *tert*-Butanol und 1.2 g (12 mmol) wasserfreiem Kupfer(I)-chlorid wird 4 d unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt. Die dunkelgrüne Reaktionsmischung wird mit 40 ml absol. Dichlormethan verdünnt. Anschließend wird unter Eiskühlung eine Lösung von 49.3 g (144 mmol) Fmoc-Thr-OH (**2a**) in 100 ml absol. Dichlormethan innerhalb von 1 h zugetropft und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Während der Reaktion ausgefallener Dicyclohexylharnstoff wird über einem Büchner-Trichter abfiltriert und mehrmals mit eiskaltem Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt, wobei weiterer Harnstoff auskristallisiert und abgetrennt werden kann. Danach wird die Lösung dreimal mit jeweils 100 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird in wenig Ethylacetat aufgenommen und über Nacht bei -28 °C aufbewahrt. Hierbei kristallisiert weiterer Harnstoff aus, der abfiltriert wird. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 2:1) und anschließende Umkristallisation aus Diethylether/Petrolether.

Ausbeute: 37.2 g (93.6 mmol, 65%), farbloser kristalliner Feststoff, R_f = 0.45 (Toluol/Aceton, 4:1), $[\alpha]_D^{23} = -11.4$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:⁵⁵ $[\alpha]_D^{28} = -9.5$ (c = 1.05, CHCl₃),
Schmp.: 72-73 °C, Lit.:¹¹² 72-74 °C.

$C_{23}H_{27}NO_5$ (M = 397.46 g/mol) [397.28].

ESI-MS (positiv), m/z: 420.27 ([M+Na]⁺, ber.:420.27).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.35$ Hz), 7.59 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.0$ Hz), 7.38-7.22 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.53 (d, 1H, NH-Urethan, $J_{NH-T\alpha} = 8.4$ Hz), 4.40 (d, 2H, CH₂-Fmoc, $J_{CH2,H9} = 7.35$ Hz), 4.30-4.17 (m, 3H, H9-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 1.97 (s_b, 1H, OH), 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.23 (d, 3H, T ^{γ} , $J_{T\gamma,T\beta} = 7.0$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.30 (C=O-*Ot*Bu), 156.81 (C=O-Urethan), 143.92, 143.81 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.32 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.74 (C3-, C6-Fmoc), 127.10 (C2-,

C7-Fmoc), 125.16 (C1-, C8-Fmoc), 120.00 (C4-, C5-Fmoc), 82.62 (C(CH₃)₃), 67.22 (CH₂-Fmoc), 59.67 (T^α) 47.24 (C9-Fmoc), 28.07 (C(CH₃)₃), 19.97 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-serin-*tert*-butylester (3b)
(Fmoc-Ser-*Ot*Bu)^{113,119,120}**

Unter Argon und Lichtausschluß wird ein Gemisch aus 25.18 g (0.12 mol) DCC, 13.02 g (0.18 mol) *tert*-Butanol und 0.80 g (0.01 mol) Kupfer(I)-chlorid drei Tage bei Raumtemp. gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch mit 50 ml absol. CH₂Cl₂ verdünnt und die grüne Suspension mit 11.10 g (33.91 mmol) Fmoc-Ser-OH (**2b**), gelöst in 70 ml absol. CH₂Cl₂, versetzt. Der Fortgang der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach ca. 3 h Rühren bei Raumtemp. wird die blaugrüne Suspension i. Vak. bis zur Trockene eingengt. Der grüne Feststoff wird in 200 ml CH₂Cl₂ aufgenommen, einmal mit 100 ml einer 0.1N HCl-Lösung sowie dreimal mit je 100 ml einer ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die Lösung wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. 12.98 g Rohprodukt werden durch Flashchromatographie an Kieselgel mit PE/EE 2:1 gereinigt, und aus Diethylether/PE umkristallisiert.

Ausbeute: 8.08 g (21.1 mmol, 75%); farbloser amorpher Feststoff; R_f: 0.46 (Tol/EtOH 10:1); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹³

C₂₂H₂₅NO₅ (M = 383.44 g/mol) [383.17].

3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (6)¹²³

Zu 300 ml Acetanhydrid werden unter Eiskühlung 1.7 ml Perchlorsäure (60%) gegeben. Innerhalb von 30 min wird die gelbe Lösung mit 63.5 g (352.5 mmol) D-Galactose (**4**) versetzt und 3 h bei Raumtemp. nachgerührt. Nach vollständiger Acetylierung (DC-Kontrolle: R_f = 0.46 (Toluol/EE, 6:4)) werden unter Eiskühlung 60 ml Phosphortribromid gefolgt von 20 ml Wasser so zugetropft, dass die Lösung bei einer Temperatur von 20 °C gehalten wird. Im Anschluss wird bis zur vollständigen Umsetzung zum 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-galactopyranosylbromid (**5**) 3 h bei Raumtemp. gerührt (DC-Kontrolle: R_f = 0.56 (Toluol/EE, 6:4)). Die Lösung wird zur Hydrolyse in einen 2 l-Erlenmeyerkolben, befüllt mit 500 ml Eiswasser und 250 ml Dichlormethan gegeben, bevor man die organische Phase abtrennt und einmal mit 200 ml Eiswasser, fünfmal mit 250 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 250 ml einer ges. Natriumchlorid-

Lösung wäscht. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird die Lösung i. Vak. auf 150 ml eingengt und zu einer stark gerührten, auf $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Suspension aus 350 ml Wasser, 250 ml Essigsäure, 100 g Zink-Staub und 10 g Kupfersulfat getropft. Es wird 2 h bei dieser Temperatur nachgerührt. Nach Erwärmen auf Raumtemp. wird über *Hyflo Super Cel* filtriert und mit 200 ml Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird mit 250 ml Eiswasser und zweimal mit 250 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Produkt i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Es ist für die weitere Umsetzung rein genug.

Ausbeute: 81 g (297.7 mmol, 84%), farbloses viskoses Öl, $R_f = 0.52$ (Toluol/EE, 6:4); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹²³

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

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat (7)

($\alpha/\beta\text{Ac}_3\text{GalN}_3\text{-ONO}_2$)¹²¹

Eine auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlte Lösung von 35 g (128.6 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**6**) in 400 ml absol. Acetonitril wird unter Argon mit 211 g (384.9 mmol) trockenem Cerammoniumnitrat und 12.5 g (192.3 mmol) trockenem Natriumazid versetzt. Die Suspension wird 7 h bei einer Temperatur von $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die intensiv gelbe Reaktionsmischung wird durch Zugabe von 500 ml eisgekühltem Diethylether verdünnt, bevor 500 ml Eiswasser hinzugefügt werden. Nach 15 min. wird die organische Phase dreimal mit 300 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt.

Ausbeute: 21.4 g (56.8 mmol, 44%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.55$ (Toluol/EE, 6:4); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹²¹

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

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (8)

($\alpha\text{Ac}_3\text{GalN}_3\text{-Br}$)¹³²

Zu einer gut gerührten Suspension von 28.4 g (327 mmol) trockenem Lithiumbromid in 250 ml absol. Acetonitril werden 17.5 g (46.5 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat (**7**), gelöst in 80 ml absol. Acetonitril gegeben. Das Reaktionsgemisch

wird 15 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt und anschließend mit 500 ml Dichlormethan verdünnt. Es wird zweimal mit jeweils 250 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert und das gelbe Öl ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 17.4 g (44.2 mmol, 95%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.62$ (Toluol/EE, 6:4); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹³²

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

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (9a)**

(Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu)¹¹²

Eine Lösung von 17.0 g (42.7 mmol) Fmoc-Thr-OtBu (**3a**) in 140 ml absol. Dichlormethan und 120 ml absol. Toluol wird mit 40 g gepulvertem Molekularsieb (4 Å) eine Stunde unter Argon gerührt. Durch Eiskühlung wird die Temperatur der Suspension auf 0 °C abgesenkt, bevor unter Lichtausschluss 15.0 g (54.5 mmol) Silbercarbonat hinzugefügt werden. Die Reaktionsmischung wird anschließend mit einer Lösung von 1.86 g (9.0 mmol) wasserfreiem Silberperchlorat in 60 ml absol. Toluol versetzt. Es wird 30 min bei 0 °C gerührt, bevor innerhalb von 30 min eine Lösung aus 16.5 g (41.9 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosylbromid (**8**) in 300 ml absol. Dichlormethan und absol. Toluol (1:1) zugetropft wird. Nach Erwärmen auf Raumtemp. wird 3 d gerührt. Die gelbe Lösung wird mit 300 ml Dichlormethan verdünnt, über *Hyflo Super Cel* filtriert und das Filtrat zweimal mit jeweils 300 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 300 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 10:1).

Ausbeute: 22.2 g (31.2 mmol, 74%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.57$ (Toluol/Ethylacetat, 6:4), $[\alpha]_D^{23} = 62.9$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$), Lit.:⁵⁹ $[\alpha]_D^{23} = 65.8$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹²

$C_{35}H_{42}N_4O_{12}$ ($M = 710.73$ g/mol) [710.28].

ESI-MS (positiv), m/z : 733.21 ($[M+Na]^+$, ber.:733.27).

¹*H-NMR* (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz), 7.59 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz), 7.42-7.27 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.64 (d, 1H, NH-Urethan, $J_{NH-T\alpha} = 9.3$ Hz), 5.45 (d, 1H, H4, $J_{CH2,H9} = 2.4$ Hz), 5.32 (dd, 1H,

H₃, $J_{H_3,H_4} = 2.9$ Hz, $J_{H_3,H_2} = 11.3$ Hz), 5.09 (d, 1H, H₁, $J_{H_1,H_2} = 3.8$ Hz) 4.48-4.17 (m, 6H, H₅, H_{6a}, H_{6b}, H₉-Fmoc, T^α, T^β), 4.17-4.04 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 3.62 (dd, 1H, H₂, $J_{H_2,H_1} = 3.89$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 10.6$ Hz), 2.13, 2.06, 2.03 (3x s, 9H, CH₃CO), 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.33 (d, 3H, T^γ, $J_{T_γ,T_β} = 6.4$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (9b)
(Fmoc-Ser(Ac₃GalN₃)-OtBu)¹¹³**

Zu 25 g pulverisiertem, ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å wird eine Lösung von 8.08 g (21.1 mmol) Fmoc-Ser-OtBu (**3b**) in 70 ml absol. Toluol und 80 ml absol. CH₂Cl₂ gegeben. Die farblose Suspension wird auf -10 °C gekühlt und im Argon-Gegenstrom mit 8.12 g (29.5 mmol) Silbercarbonat versetzt. Das Reaktionsgemisch wird unter Argon und Lichtausschluß 30 min. bei -10 °C gerührt. Nach Zugabe von 1.05 g (5.06 mmol) Silberperchlorat in 20 ml absol. Toluol wird das Reaktionsgemisch weitere 20 min. bei -10 °C gerührt. Dann wird zum Reaktionsgemisch über eine Kanüle eine Lösung von 14.51 g (36.81 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-D-galactopyranosylbromid (**8**) in 100 ml absol. Toluol/Dichlormethan (1:1) zugeführt und das Reaktionsgemisch 14 h bei Raumtemp. unter Argon und Lichtausschluß gerührt. Nach Verdünnen mit 100 ml Dichlormethan wird die gelbe Suspension über Celite filtriert, und das Filtrat zweimal mit je 150 ml einer 5%igen NaHCO₃-Lösung und einmal mit 100 ml Wasser ausgeschüttelt. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel mit CH/EE 3:1 gereinigt.

Ausbeute: 12.37 g (17.76 mmol, 84%); farbloser amorpher Feststoff. R_f: 0.61 (CH/EE 1:1); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹³

FD-MS, $m/z = 698.0$ ([M+H]⁺, ber.: 697.3).

C₃₄H₄₀N₄O₁₂ (M = 696.71 g/mol) [696.26].

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (10a)
(Fmoc-Thr(αAc₃GalNAc)-OtBu)¹¹²**

In 1000 ml einer Mischung aus THF, Acetanhydrid und Essigsäure (3:2:1) werden 18 g (25.3 mmol) (Fmoc-Thr(αAc₃GalN₃)-OtBu) (**9a**) gelöst. Dazu werden 17.5 g (267.3 mmol)

Zink-Staub gegeben, der zuvor durch AufschlÄmmen in 400 ml einer 2%igen CuSO₄-Lösung aktiviert, mit Wasser gewaschen und mit Ethylacetat getrocknet wurde. Es wird 16 h bei Raumtemp. gerührt. Nachfolgend wird über *Hyflo Super Cel* filtriert und mit 200 ml THF gewaschen. Das Lösungsmittel wird destillativ i. Vak. entfernt, worauf der Rückstand dreimal mit Toluol und zweimal mit Dichlormethan kodestilliert wird. Das Rohprodukt wird in 100 ml Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit jeweils 150 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 100 ml ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 1:1)

Ausbeute: 14.3 g (13.0 mmol, 78%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.28$ (CH/EE, 1:3), $[\alpha]_D^{23} = 59.5$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:¹¹² $[\alpha]_D^{23} = 62.4$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₃₇H₄₆N₂O₁₃ (M = 726.77 g/mol) [726.30].

ESI-MS (positiv), m/z: 749.54 ([M+Na]⁺, ber.:749.32).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.0$ Hz), 7.61 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz), 7.39-7.31 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.98 (d, 1H, NH-Urethan, $J_{NH-T\alpha} = 9.9$ Hz), 5.53 (d, 1H, NH-GalNAc, $J_{NH,H2} = 9.2$ Hz), 5.37 (d, 1H, H4, $J_{CH2,H9} = 2.7$ Hz), 5.07 (dd, 1H, H3, $J_{H3,H4} = 2.55$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.4$ Hz), 4.86 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz), 4.66-4.52 (m, 1H, H2), 4.48-4.41 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.31-4.04 (m, 6H, H5, H6_a, H6_b, H9-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 2.14 (s, 3H, CH₃CO), 2.02 (s, 3H, CH₃-AcNH), 1.98 (s, 6H, 2xCH₃CO), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.30 (d, 3H, T ^{γ} , $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.92, 170.35, 170.31, 169.99 (C=O-Ac), 156.47 (C=O-Urethan), 143.71 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.31 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.77 (C3-, C6-Fmoc), 127.11 (C2-, C7-Fmoc), 125.11 (C1-, C8-Fmoc), 120.01 (C4-, C5-Fmoc), 99.96 (C1), 83.23 (C(CH₃)₃), 68.69, 67.40, 67.34, 67.28 (C3, C4, C5, CH₂-Fmoc), 62.10 (C6), 58.89 (T ^{α}), 47.32, 47.17 (C2, C9-Fmoc), 28.07 (C(CH₃)₃), 23.23, 20.73, 20.63 (CH₃CO), 18.56 (T ^{γ}).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (10b)
(Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OtBu)¹¹³**

In 180 mL eines THF/Acetanhydrid/AcOH-Gemisches 3:2:1 werden 6.28 g (7.73 mmol) Fmoc-Ser(Ac₃GalN₃)-OtBu **9b** gelöst und mit 7.50 g (0.12 mol) aktiviertem Zinkstaub versetzt. Die Suspension wird 14 h bei Raumtemp. gerührt, über Celite filtriert und der

Niederschlag mit 250 mL CH₂Cl₂ nachgewaschen. Das Filtrat wird eingeeengt, zweimal mit je 50 ml Toluol kodestilliert, und der gelbe Rückstand in 200 ml EE aufgenommen. Die hellgelbe Lösung wird mit 150 ml Wasser, 150 ml einer ges. NaHCO₃-Lösung und wieder 150 ml Wasser ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel mit CH/EE 1:2 gereinigt.

Ausbeute: 4.78 g (6.71 mmol, 87% (3:1 α/β)); farbloser amorpher Feststoff; R_f: α: 0.43 (EE), β: 0.35 (EE); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹³

FD-MS (positiv), m/z = 713.2 ([M+H]⁺, ber.: 713.3).

C₃₆H₄₄N₂O₁₃ (M = 712.75 g/mol) [712.28].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.0 Hz), 7.60 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3 Hz), 7.35 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.72 (d, 1H, NH-Urethan, J_{NH-Tα} = 7.9 Hz), 5.65 (d, 1H, NH-GalNAc, J_{NH,H2} = 9.7 Hz), 5.36 (d, 1H, H4, J_{CH2,H9} = 3.4 Hz), 5.10 (dd, 1H, H3, J_{H3,H4} = 3.4 Hz, J_{H3,H2} = 11.2 Hz), 4.82 (d, 1H, H1, J_{H1,H2} = 3.0 Hz), 4.65-4.45 (m, 2H, H2, S_α), 4.40 (d, 2H, CH₂-Fmoc, J_{CH2,H9} = 7.8 Hz), 4.25-3.90 (m, 6H, H9-Fmoc, H5, H6_a, H6_b, S_β), 2.15 (s, 3H, CH₃ OAc), 1.98 (s, 6H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc), 1.92 (s, 3H, CH₃ OAc), 1.45 (s, 9H, CH₃ tBu).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-*α*-D-galactopyranosyl)-L-threonin (11a)**

(Fmoc-Thr(α-Ac₃GalNAc)-OH)¹¹¹

Es werden 1.1 g (1.51 mmol) Fmoc-Thr(α-Ac₃GalNAc)-OtBu (**10a**) in 15 ml CH₂Cl₂ mit 15 ml TFA sowie 2.5 ml Anisol versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 6 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt, und dann mit 40 ml Toluol verdünnt. Das Lösungsmittel wird destillativ entfernt und der Rückstand dreimal mit je 40 ml Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 94:5:0.5 gereinigt.

Ausbeute: 983 mg (1.47 mmol, 97%); farbloser amorpher Feststoff; R_f: 0.11 (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 94:5:0.5); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹¹

C₃₃H₃₈N₂O₁₃ (M = 670.66 g/mol) [670.24].

ESI-MS (positiv), m/z: 693.50 ([M+Na]⁺, ber.:693.24).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 6.8 Hz), 7.60 (d, 2H, H1-, H8-, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.2 Hz), 7.37-7.28 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.00 (d, 1H, NH-Urethan, J_{NH-Tα} = 8.7 Hz), 5.51 (d, 1H, NH-GalNAc, J_{NH,H2} = 9.0 Hz), 5.35 (m, 1H, H4), 5.10 (m, 1H, H3), 4.85 (d, 1H, H1, J_{H1,H2} = 3.1 Hz) 4.68-4.53 (m, 1H, H2), 4.49-

4.39 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.33-4.02 (m, 6H, H5, H6_a, H6_b, H9-Fmoc, T^α, T^β), 2.09 (s, 3H, CH_3CO), 2.05-1.92 (s, 9H, 2x CH_3CO , $\text{CH}_3\text{-AcNH}$), 1.24 (d, 3H, T^γ, $J_{T^\gamma, T^\beta} = 6.1$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.95, 170.42, 170.37, 170.13 (C=O-Ac), 156.43 (C=O-Urethan), 142.54 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.78 (C4a-, C5a-Fmoc), 128.12 (C3-, C6-Fmoc), 127.91 (C2-, C7-Fmoc), 125.18 (C1-, C8-Fmoc), 120.15 (C4-, C5-Fmoc), 99.97 (C1), 68.61, 67.48, 67.36, 67.23 (C3, C4, C5, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 62.17 (C6), 58.92 (T^α), 47.38, 47.23 (C2, C9-Fmoc), 23.27, 20.78, 20.62 (CH_3CO), 17.91 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serin (**11b**)**

(Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OH)¹¹¹

Es werden 3.46 g (4.85 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OtBu (**10b**) in 15 ml CH₂Cl₂ mit 15 ml TFA sowie 2.5 ml Anisol versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 6 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt, und dann mit 40 ml Toluol verdünnt. Das Lösungsmittel wird destillativ entfernt und der Rückstand dreimal mit je 40 ml Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 94:5:0.5 gereinigt.

Ausbeute: 2.34 g (3.56 mmol, 73%); farbloser amorpher Feststoff; R_f: 0.10 (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 94:5:0.5); [α]_D²² = 76.0 (c = 1.00, CHCl₃); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹¹

C₃₂H₃₆N₂O₁₃ (M = 656.63 g/mol) [656.22].

ESI-MS (positiv), m/z: 679.48 ([M+Na]⁺, ber.:679.22).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.73 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4, H3} = J_{H5, H6} = 7.3$ Hz), 7.59 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{H1, H2} = J_{H8, H7} = 6.9$ Hz), 7.38-7.11 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.24 (d, 1H, *NH*-Urethan, $J_{NH-T\alpha} = 7.7$ Hz), 6.11 (d, 1H, *NH*-GalNAc, $J_{NH, H2} = 8.8$ Hz), 5.35 (d, 1H, H4, $J_{CH2, H9} = 3.5$ Hz), 5.13 (dd, 1H, H3, $J_{H3, H4} = 3.2$ Hz, $J_{H3, H2} = 11.3$ Hz), 4.80 (d, 1H, H1, $J_{H1, H2} = 3.1$ Hz), 4.66-4.43 (m, 2H, H2, S_α), 4.41 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, $J_{CH2, H9} = 7.6$ Hz), 4.28-3.89 (m, 6H, H9-Fmoc, H5, H6_a, H6_b, S_β), 2.13 (s, 3H, CH_3 OAc), 1.97 (s, 6H, CH_3 OAc, CH_3 NHAc), 1.90 (s, 3H, CH_3 OAc).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (12a)**

(Fmoc-Thr(α GalNAc)-OtBu)¹¹²

Eine Lösung von 8.6 g (11.8 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OtBu (**10a**) in 120 ml absol. Methanol wird unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes tropfenweise mit frisch hergestellter 1%iger methanolischer Natriummethanolat-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5-9 erreicht ist. Es wird 7 h gerührt, wobei der pH-Wert in Abständen von 30 min kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert wird. Nach vollständiger Deacetylierung (DC-Kontrolle) wird mit 1N Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend in 200 ml Acetonitril/Dichlormethan 1:1 aufgenommen und mit 2.8 g (8.5 mmol) Fmoc-OSu und 1.5 ml DIPEA versetzt. Nach 16 Stunden Rühren wird durch Zugabe des Kationenaustauschers Amberlyst 15 neutralisiert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird mit 300 ml Ethylacetat aufgenommen und nacheinander mit 100 ml Wasser, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der org. Phase über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE/MeOH, 20:1).

Ausbeute: 6.49 g (10.9 mmol, 92%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.17$ (EE/MeOH, 20:1), $[\alpha]_D^{22} = 39.6$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:¹¹² $[\alpha]_D^{23} = 44.7$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₃₁H₄₀N₂O₁₀ (M = 600.66 g/mol) [600.27].

ESI-MS (positiv), m/z : 601.49 ([M+H]⁺, ber.: 600.48), 623.42 ([M+Na]⁺, ber.:623.32), 639.40 ([M+K]⁺, ber.:639.30).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.58 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz), 7.37-7.26 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.84 (d, 1H, NH-Urethan, $J_{NH-T\alpha} = 7.8$ Hz), 5.72 (d, 1H, NH-GalNAc, $J_{NH,H2} = 9.5$ Hz), 5.07 (dd, 1H, H3, $J_{H3,H4} = 2.7$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.1$ Hz), 4.85 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz), 4.66-4.52 (m, 1H, H2), 4.48-4.41 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.31-4.09 (m, 6H, H5, H6_a, H6_b, H9-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 2.08 (s, 3H, CH₃-AcNH), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.24 (d, 3H, T ^{γ} , $J_{T\gamma,T\beta} = 7.3$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.92 (C=O-OtBu), 171.16 (C=O-Ac), 156.51 (C=O-Urethan), 143.66 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.30 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.76 (C3-, C6-Fmoc), 127.07 (C2-, C7-Fmoc), 125.00 (C1-, C8-Fmoc), 119.98 (C4-, C5-Fmoc), 99.59 (C1), 83.26 (C(CH₃)₃), 70.81, 70.05, 69.47, 67.16 (C3, C4, C5, CH₂-Fmoc), 62.52 (C6), 60.39 (T ^{α}), 50.81, 47.17 (C2, C9-Fmoc), 28.03 (C(CH₃)₃), 22.90, (CH₃CO), 18.86 (T ^{γ}).

N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (12b)*(Fmoc-Ser(α GalNAc)-*O**t*Bu)¹¹³**

Eine Lösung von 4.9 g (7.6 mmol) Fmoc-Ser(α Ac₃GalNAc)-*O**t*Bu (**10b**) in 120 ml absol. Methanol wird unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes tropfenweise mit frisch hergestellter 1%iger methanolischer Natriummethanolat-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5-9 erreicht ist. Es wird 6 h gerührt, wobei der pH-Wert in Abständen von 30 min kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert wird. Nach vollständiger Deacetylierung (DC-Kontrolle) wird mit 1N Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend in 200 ml Acetonitril/Dichlormethan 1:1 aufgenommen und mit 1.65 g (5.0 mmol) Fmoc-OSu und 0.9 ml DIPEA versetzt. Nach 14 Stunden Rühren wird durch Zugabe des Kationenaustauschers, Amberlyst 15, neutralisiert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird mit 200 ml Ethylacetat aufgenommen und nacheinander mit 100 ml Wasser, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der org. Phase über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Ethylacetat/Methanol, 20:1).

Ausbeute: 3.93 g (6.7 mmol, 88%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.15$ (EE/MeOH, 20:1); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹³

C₃₀H₃₈N₂O₁₀ (M = 586.63 g/mol) [586.25].

ESI-MS (positiv), m/z: 587.54 ([M+H]⁺, ber.: 587.25).

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α , β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (14)**(α , β Ac₅NeuNAcCOOH)¹³⁴**

Zu einer Lösung aus 16.2 g (42.4 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure (**13**) in 250 ml Pyridin werden unter Eiskühlung 120 ml Acetanhydrid getropft. Man rührt 16 h bei Raumtemp. und entfernt das Lösungsmittel i. Vak.. Der Rückstand wird dreimal mit 100 ml Toluol und anschließend zweimal mit 100 ml Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt kann ohne Reinigung weiter umgesetzt werden.

Ausbeute: 22.0 g (42.4 mmol, quant.), gelbliches Öl, $R_f = 0.23$ (EE); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹³⁴

C₂₁H₂₉NO₁₄ (M = 519.45 g/mol) [519.16].

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (15)**(α,β Ac₅NeuNAcCOOBn)¹³⁴**

Eine Lösung von 22.0 g (42.4 mmol) α,β Ac₅NeuNAcCOOH **14** in 80 ml Ethanol wird mit 8.74 g (26.2 mmol) Cäsiumcarbonat, gelöst in 15 ml Wasser, versetzt. Nach Abklingen der Gasentwicklung wird weitere 30 min bei Raumtemp. gerührt. Das Ethanol wird i. Vak. entfernt und der Rückstand fünfmal mit jeweils 100 ml Toluol kodestilliert, bis ein trockener farbloser amorpher Feststoff zurückbleibt. Der Rückstand wird in 150 ml DMF aufgenommen und langsam mit 56 ml (471 mmol) Benzylbromid versetzt und 18 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Hochvak. abdestilliert und der Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen. Hierdurch lässt sich ausgefallenes Cäsiumbromid abfiltrieren. Die org. Phase wird erneut i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: EE/CH, 7:1). Für die folgende Umsetzung können beide Anomere eingesetzt werden.

Ausbeute: 25.8 g (42.4 mmol, quant.), farbloser, amorpher Feststoff, R_f = 0.32 (EE); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹³⁴

C₂₈H₃₅NO₁₄ (M = 609.58 g/mol) [609.21].

ESI-MS (positiv), m/z: 632.42 ([M+Na]⁺, ber.:632.20), 648.44 ([M+K]⁺, ber.:648.21).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.33 (s, 5H, H_{ar}-Bn), 5.43-5.03 (m, 6H, H₄, H₆, H₇, H₈, OCH₂-Bn), 4.42 (dd, 1H, H_{9a}, J_{H_{9a},H₈} = 2.6 Hz, J_{H₃,H₂} = 12.5 Hz), 4.20-4.00 (m, 2H, H₅, H_{9b}), 2.52 (dd, 1H, H_{3eq}, J_{H_{3eq},H_{3ax}} = 13.6 Hz, J_{H_{3eq},H₄} = 5.1 Hz), 2.10, 2.08, 1.99, 1.86 (m, 19H, 6xCH₃-Ac, H_{3ax}).

Benzyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2-chloro-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (16)**(β Ac₄NeuNAcCOOBnCl)¹³⁴**

Zu 23.9 g (39.2 mmol) α,β Ac₅NeuNAcCOOBn **15** werden 60.6 ml (66.6 g, 843 mmol) auf 0°C abgekühltes und mit 0.6 ml Wasser versetztes Acetylchlorid gegeben. Die Reaktionsmischung wird 3 d bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird überschüssiges Acetylchlorid i. Vak. entfernt, der Rückstand fünfmal mit je 100 ml Toluol und dann dreimal mit je 100 ml Dichlormethan kodestilliert. Das so erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.

Ausbeute: 24.0 g (39.2 mmol, quant.), gelbbraunes Öl, $R_f = 0.42$ (EE); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹³⁴

$C_{26}H_{32}ClNO_{12}$ (M = 585.98 g/mol) [585.16].

***O*-Ethyl-*S*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)dithiocarbonat (17)**

(α Ac₄NeuNAcCOOBnXan)¹¹²

Eine Lösung von 24.0 g (39.2 mmol) β Ac₄NeuNAcCOOBnCl (**16**) in 400 ml Ethanol wird unter Argon mit 12.2 g (76.2 mmol) Kalium-ethylxanthogenat versetzt. Es wird 2 d unter Lichtausschluss bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird durch Zugabe von 400 ml Dichlormethan verdünnt und dreimal mit je 200 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Die Reinigung des Rückstands erfolgt mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat/Cyclohexan, 7:1).

Ausbeute: 20.4 g (30.6 mmol, 78%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.36$ (EE), $[\alpha]_D^{22} = 33.1$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:¹³⁴ $[\alpha]_D^{23} = 34.1$ (c = 1.00, CHCl₃).

$C_{29}H_{37}NO_{13}S_2$ (M = 671.74 g/mol) [671.31].

ESI-MS (positiv), m/z: 694.30 ([M+Na]⁺, ber.:694.30), 710.24 ([M+K]⁺, ber.:710.31).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.32 (m, 5H, H_{ar}-Bn), 5.40-5.13 (m, 5H, H7, H8, OCH₂-Bn, NH), 4.82 (td, 1H, H4, $J_{H4,H5} = 4.4$ Hz, $J_{H4,H3} = 11.0$ Hz), 4.55 (d, 1H, H6, $J_{H6,H5} = 12.5$ Hz, $J_{H6,H7} = 1.8$ Hz), 4.48-3.87 (m, 4H, H5, H9, OCH₂CH₃), 2.62 (dd, 1H, H3_{eq}, $J_{H3eq,H3ax} = 12.9$ Hz, $J_{H3eq,H4} = 4.4$ Hz), 2.11, 2.09, 1.99, 1.86 (m, 19H, 6xCH₃-Ac, H3_{ax}), 1.21 (t, 3H, OCH₂CH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 207.09 (C=S), 170.73, 170.49, 170.33, 170.11, 170.04 (C=O), 167.85 (C1), 134.88 (C_{quart}-Bn), 128.75, 128.61, 128.45, 128.00 (C-Bn), 86.58 (C2), 75.18, 70.64, 70.34, 68.73, 67.97, 67.74 (C4, C6, C7, C8, OCH₂-Bn, OCH₂CH₃), 61.91 (C9), 49.22 (C5), 37.14 (C3), 23.16 (NHAc), 21.05, 20.78, 20.56 (CO-Ac), 13.02 (OCH₂CH₃).

***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-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)- α -D-galacto-pyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (20a)
(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α GalNAc)-OtBu)¹¹²**

Herstellung einer 1.6 N Lösung von Methylsulfenylbromid in 1,2-Dichlorethan:

410 μ l (7.99 mmol) Brom werden zu einer Lösung von 709 μ l (7.99 mmol) Dimethyldisulfid in 10 ml absol. 1,2-Dichlorethan getropft. Es wird 16 h unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt.

Glycosylierung: Eine Lösung von 2.2 g (3.66 mmol) Fmoc-Thr(α GalNAc)-OtBu (**12a**) und 6.2 g (9.3 mmol) α Ac₄NeuNAcCOOBnCXan (**17**) in einer Mischung aus 45 ml Acetonitril (HPLC-Grade) und 22.5 ml absol. Dichlormethan wird zusammen mit 5 g ausgeheiztem, pulverisiertem Molekularsieb (4 Å) unter Argon und Lichtausschluss 1 h gerührt. Anschließend werden 2.4 g (9.32 mmol) trockenes Silbertriflat (6x mit 20 ml absol. Toluol kodestilliert) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird auf -65 °C abgekühlt. Über einen Zeitraum von 30 min werden 5.8 ml (9.28 mmol) einer 1.6 N Lösung von Methylsulfenylbromid in 1,2 Dichlorethan zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 3.5 h bei -65 °C gerührt, unter ständiger Kontrolle des Rührvorgangs. Anschließend wird mit 1.6 ml (1.15 g, 11.38 mmol) DIPEA neutralisiert. Man rührt weitere 15 min bei dieser Temperatur und lässt auf 10 °C erwärmen. Es wird mit 300 ml Dichlormethan verdünnt und über *Hyflo Super Cel* filtriert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE/EtOH, 20:1).

Ausbeute: 2.4 g (2.08 mmol, 57 %), farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.21$ (EE/EtOH, 20:1), $[\alpha]_D^{24} = 4.7$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:¹³⁴ $[\alpha]_D^{23} = 6.27$ ($c = 1.00$, CHCl₃); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹²

C₅₇H₇₁N₃O₂₂ (M = 1150.18 g/mol) [1149.45].

HR-ESI-TOF-MS (positiv), m/z: 1172.45 ([M+Na]⁺, ber.:1172.44).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.3$ Hz), 7.61 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz), 7.43-7.26 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x H_{ar}Bn), 6.68 (d, 1H, NH-GalNAc, $J_{NH,H2} = 7.4$ Hz), 5.50 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{NH-T\alpha} = 9.4$ Hz), 5.38-5.27 (m, 2H, H7'', H8''), 5.23 (d, 1H, CH₂-Bn_a, $J_{a,b} = 12.0$ Hz), 5.17 (d, 1H, CH₂-Bn_b, $J_{a,b} = 12.0$ Hz), 4.92-4.86 (m, 1H, H4''), 4.78 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 2.9$ Hz), 4.45 (d, 2H, CH₂-Fmoc, $J_{CH2,H9} = 6.6$ Hz), 4.35 (dd, 1H, H9_a'', $J_{H9a'',H8''} = 2.2$ Hz, $J_{H9a'',H9b''} = 12.4$ Hz), 4.27-4.01 (m, 7H, H5'', H6'', H9-Fmoc, H9_b'', H2, T ^{α} , T ^{β}), 3.89 (dd, 1H, H6_a, $J_{H6a,H5} = 7.1$ Hz, $J_{H6a,H6b} = 10.1$ Hz), 3.72-3.60 (m, 3H, H3, H4, H5), 3.51 (dd, 1H, H6_b, $J_{H6b,H5} = 3.9$ Hz,

$J_{H6b,H6a} = 10.1$ Hz), 2.60 (dd, 1H, H_{3eq} , $J_{H3eq,H3ax} = 12.9$ Hz, $J_{H3eq,H4} = 4.4$ Hz), 2.10, 2.09, 2.08, 2.10, 1.98, 1.84 (s, 18H, NHAc, OAc, H_{3ax}), 1.44 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.24 (d, 3H, T^y , $J_{Ty,T\beta} = 7.0$ Hz).

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-deoxy-6-*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-serin-*tert*-butylester (20b)**

(Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5AcCOOBn-(2 \rightarrow 6))- α -GalNAc)-*Or*Bu)¹¹³

Zu 10 g gepulverten, über 5 h mit einem Quarzstrahler i. Vak. ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å werden 3.05 g (5.20 mmol) Fmoc-Ser(α -GalNAc)-*Or*Bu (**12b**), gelöst in 120 ml absol. Acetonitril, über eine Kanüle zugegeben. Dann werden 4.31 g (6.42 mmol) α -NeuAc₄NAcCOOBnXan **17**, gelöst in 60 ml absol. Dichlormethan, ebenfalls zur Suspension über eine Kanüle zugegeben. Nach Rühren über 1.5 h bei Raumtemp. unter Argon werden im Argon-Gegenstrom 1.64 g Silbertriflat zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Suspension wird auf -65 °C gekühlt und langsam über einen Tropftrichter mit 4.01 ml (6.42 mmol) einer auf 0 °C gekühlten 1.6 N Methylsulfenylbromid-Lösung versetzt. Es wird drei Stunden bei -65 °C nachgerührt und die Reaktion mit 4.5 ml Diisopropylamin abgebrochen. Man läßt das Reaktionsgemisch auf Raumtemp. kommen und verdünnt dann mit 300 ml Dichlormethan. Es wird über Celite filtriert, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt wird zweimal mit 20 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel mit EE/MeOH 10:1 gereinigt.

Ausbeute: 2.40 g (2.29 mmol, 44%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.27$ (EE/MeOH 9:1); $[\alpha]_D^{22} = 4.8$ ($c = 1.00$, CH_2Cl_2); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹³

$C_{56}H_{69}N_3O_{22}$ ($M = 1136.37$ g/mol) [1135.44].

ESI-MS (positiv) $m/z = 1159.0$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1158.4), 1175.1 ($[M+K]^+$, ber.: 1174.5).

¹*H-NMR* (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 7.88 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.75-7.63 (m, 4H, NH-AcSialyl, NH-Fmoc, H1-, H8-Fmoc), 7.43-7.28 (m, 10H, NH-GalNAc, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x $H_{ar}Bn$), 5.32-5.14 (m, 4H, OCH_2 -Bn, H8'', H7''), 4.78-4.68 (m, 1H, H4''), 4.61 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 2.9$ Hz), 4.36-4.16 (m, 5H, CH_2 -Fmoc, H9-Fmoc, H9''_a, S ^{α}), 4.08-4.02 (m, 3H, H6'', H9''_b, H2), 4.00-3.81 (m, 1H, H5''), 3.73-3.54 (m, 6H, H6_a, S ^{β} , H5, H3, H4), 3.40 (dd, 1H, H6_b, $J_{H6b,H5} = 5.0$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 9.9$ Hz), 2.61 (dd, 1H, H_{3eq} , $J_{H3eq,H3ax} = 12.5$ Hz, $J_{H3eq,H4} = 3.5$ Hz), 2.06, 2.00, 1.97, 1.92 (s, 12H, NHAc, OAc), 1.83-1.66 (m, 7H, NHAc'', H3''_a, Gal-NHAc), 1.36 (s, 9H, $C(CH_3)_3$).

***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-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-
nonulopyranosyl)onat)- α -D-galacto-pyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (21a)
(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-OtBu)¹¹²**

Eine Lösung von 1.2 g (1.04 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-OtBu (**20a**) in 10 ml Pyridin wird unter Eiskühlung mit 5 ml Acetanhydrid und 12 mg DMAP versetzt, 1 h bei 0 °C und anschließend 16 h bei Raumtemp. gerührt. Die schwach gelbe Reaktionsmischung wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und überschüssiges Acetanhydrid durch Zugabe von 20 ml Eiswasser hydrolysiert. Die organische Phase wird dreimal mit jeweils 150 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 150 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit je 50 ml Toluol und zweimal mit jeweils 50 ml Dichlormethan kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE).

Ausbeute: 1.17 g (0.95 mmol, 91%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.49$ (EE), $[\alpha]_D^{22} = 28.0$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:¹³⁴ $[\alpha]_D^{23} = 28.0$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₆₁H₇₅N₃O₂₄ (M = 1234.25 g/mol) [1233.45].

HR-ESI-TOF-MS (positiv), m/z : 1234.50 ([M+H]⁺, ber.:1234.45), 1256.44 ([M+Na]⁺, ber.:1256.44), 2490.93 ([2M+Na+H]⁺, ber.:2490.90).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.61 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.0$ Hz), 7.43-7.26 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x H_{ar}Bn), 5.95 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{NH-T\alpha} = 9.6$ Hz), 5.62 (d, 1H, NH-GalNAc, $J_{NH,H2} = 9.2$ Hz), 5.32-5.21 (m, 3H, H7'', H8'', CH₂-Bn_a), 5.16-5.07 (m, 2H, H4, CH₂-Bn_b), 5.00-4.89 (dd, 1H, H3, $J_{H3,H2} = 11.4$ Hz, $J_{H3,H4} = 2.9$ Hz), 4.82 (d+m, 2H, H1, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz, H4''), 4.59-4.46 (m, 4H, CH₂-Fmoc, H2, T ^{β}), 4.27-4.14 (m, 4H, H6'', H9_a'', H9-Fmoc, T ^{α}), 4.11-3.97 (m, 3H, H5, H5'', H9_b''), 3.83 (m, 1H, H6_a), 3.10 (dd, 1H, H6_b, $J_{H6b,H5} = 4.1$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 10.3$ Hz), 2.54 (dd, 1H, H3_{eq}'', $J_{H3eq'',H3ax''} = 12.9$ Hz, $J_{H3eq'',H4''} = 4.4$ Hz), 2.10, 2.06, 2.00, 1.98, 1.83 (5x s, 25H, NHAc, OAc, H3_{ax}''), 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.23 (d, 3H, T ^{γ} , $J_{T\gamma,T\beta} = 7.0$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.55, 170.38, 170.17, 170.11, 170.02, 169.65, 169.31 (C=O-OtBu, C=O-Ac), 167.33 (C1'), 156.56 (C=O-Urethan), 143.84, 143.71 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.31 (C4a-, C5a-Fmoc), 134.68 (C_{quart.}-Bn), 129.03, 128.85, 128.67 (C-Bn), 127.76 (C3-, C6-Fmoc), 127.10 (C2-, C7-Fmoc), 125.06 (C1-, C8-Fmoc), 120.03 (C4-, C5-Fmoc), 100.06 (C1), 98.57 (C2''), 83.02 (C(CH₃)₃), 77.02 (T ^{β}), 72.60, 68.88, 68.04, 67.85,

67.59, 67.21, 67.09 (C3, C4, C5, CH₂-Fmoc, CH₂-Bn, C4'', C6'', C7'', C8''), 63.88, 62.35 (C6, C9''), 59.13 (T^α), 49.13 (C5''), 47.38, 47.21 (C2, C9-Fmoc), 37.60 (C3''), 28.07 (C(CH₃)₃), 23.16, 21.00, 20.81, 20.70, 20.63 (CH₃CO), 18.61 (T^γ).

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-deoxy-6-*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-serin-*tert*-butylester (21b)
(Fmoc-Ser([α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)]- α -GalAc₂NAc)-OtBu)¹¹³**

Eine Lösung von 2.70 g (2.38 mmol) Fmoc-Ser([α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)]- α -GalNAc)-OtBu (**20b**) in 50 ml Pyridin wird auf 0 °C gekühlt, mit 25 ml Acetanhydrid und 25 mg DMAP versetzt. Es wird 14 h bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird i. Vak. eingengt und mit Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel mit EE gereinigt.

Ausbeute: 1.73 g (2.38 mmol, quant.); farbloser amorpher Feststoff; R_f: 0.20 (EE); [α]_D²² = 25.7 (c = 1.00, CHCl₃); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹³

C₆₀H₇₃N₃O₂₄ (M = 1220.24 g/mol) [1219.46].

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃), δ (ppm): 7.73 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz), 7.61 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.39-7.28 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x H_{ar}Bn), 5.34-5.07 (m, 5H, OCH₂-Bn, H8'', H7'', H4), 4.82-4.70 (m, 1H, H1), 4.52 (dt, 1H, H4'', $J_{H4'',H5''} = 11.0$ Hz), 4.36-4.21 (m, 3H, CH₂-Fmoc, H2), 4.20-3.75 (m, 10H, H6'', H9''_b, H9-Fmoc, H9''_a, S^α, S^β, H5'', H6_a, H5), 3.12 (dd, 1H, H6_b, $J_{H6b,H5} = 4.9$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 10.1$ Hz), 2.56 (dd, 1H, H3_{eq}'', $J_{H3eq'',H3ax''} = 12.8$ Hz, $J_{H3eq'',H4''} = 4.5$ Hz), 2.08, 2.06, 2.00, 1.97, 1.92, 1.82, 1.76 (s, 25H, NHAc, OAc, H3''_a), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃).

***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- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)- α -D-galacto-pyranosyl)-L-threonin (22a)
(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-OH)¹¹²**

Eine Lösung von 900 mg (0.73 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-OtBu (**21a**) in 20 ml Dichlormethan wird mit 1.5 ml Anisol und 20 ml Trifluoressigsäure versetzt. Es wird 3 h bei Raumtemp. geschüttelt. Danach wird die Reaktionlösung fünfmal mit je 50 ml Toluol kodestilliert. Das so erhaltene Rohprodukt wird

mittels Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE/MeOH, 25:1).

Ausbeute: 812 mg (0.68 mmol, 95%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.49$ (EE/MeOH, 3:1), $[\alpha]_D^{22} = 31.9$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:¹³⁴ $[\alpha]_D^{23} = 29.1$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{57}\text{H}_{65}\text{N}_3\text{O}_{24}$ ($M = 1178.15$ g/mol) [1177.41].

HR-ESI-TOF-MS (positiv), m/z : 1178.43 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1178.24), 1200.40 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1200.24), 2378.81 ($[\text{2M}+\text{Na}+\text{H}]^+$, ber.: 2378.52).

¹*H-NMR* (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.4$ Hz), 7.61 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.0$ Hz), 7.43-7.26 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x H_{ar}-Bn), 5.95 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{\text{NH-T}\alpha} = 9.6$ Hz), 5.62 (d, 1H, NH-GalNAc, $J_{\text{NH,H2}} = 9.2$ Hz), 5.32-5.21 (m, 3H, H7'', H8'', CH₂-Bn_a), 5.16-5.07 (m, 2H, H4, CH₂-Bn_b), 5.00-4.89 (dd, 1H, H3, $J_{\text{H3,H2}} = 11.4$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 2.9$ Hz), 4.82 (m, 2H, H1, H4''), 4.59-4.46 (m, 4H, CH₂-Fmoc, H2, T^β), 4.27-4.14 (m, 4H, H6'', H9_a'', H9-Fmoc, T^α), 4.11-3.97 (m, 3H, H5, H5'', H9_b''), 3.83 (m, 1H, H6_a), 3.10 (dd, 1H, H6_b, $J_{\text{H6b,H5}} = 4.1$ Hz, $J_{\text{H6b,H6a}} = 10.3$ Hz), 2.54 (dd, 1H, H3_{eq}'', $J_{\text{H3eq}'',\text{H3ax}''} = 12.9$ Hz, $J_{\text{H3eq}'',\text{H4}''} = 4.4$ Hz), 2.10, 2.06, 2.00, 1.98, 1.83 (5x s, 25H, NHAc, OAc, H3_{ax}''), 1.23 (d, 3H, T^γ, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 7.0$ Hz).

¹³*C-NMR* (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.55, 170.38, 170.17, 170.11, 170.02, 169.65, 169.31 (C=O-Ac), 167.33 (C1'), 156.56 (C=O-Urethan), 143.84, 143.71 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.31 (C4a-, C5a-Fmoc), 134.68 (C_{quart}-Bn), 129.03, 128.85, 128.67 (C-Bn), 127.76 (C3-, C6-Fmoc), 127.10 (C2-, C7-Fmoc), 125.06 (C1-, C8-Fmoc), 120.03 (C4-, C5-Fmoc), 100.06 (C1), 98.57 (C2S), 77.02 (T^β), 72.60, 68.88, 68.04, 67.85, 67.59, 67.21, 67.09 (C3, C4, C5, CH₂-Fmoc, CH₂-Bn, C4'', C6'', C7'', C8''), 63.88, 62.35 (C6, C9''), 59.13 (T^α), 49.13 (C5''), 47.38, 47.21 (C2, C9-Fmoc), 37.60 (C3''), 23.16, 21.00, 20.81, 20.70, 20.63 (CH₃CO), 18.61 (T^γ).

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-deoxy-6-*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-serin (22b)**

(Fmoc-Ser($[\alpha$ NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)]- α GalAc₂NAc)-OH)¹¹³

Es werden 1.61 g (1.32 mmol) Fmoc-Ser($[\alpha$ -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)]- α -GalAc₂NAc)-*O*tBu (21b) nacheinander mit 10 ml Dichlormethan, 10 ml TFA und 2 ml Anisol versetzt und 6 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 30 ml Toluol verdünnt, die überschüssigen Reagenzien werden destillativ entfernt und der Rückstand

dreimal mit je 40 ml Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel mit EE/MeOH 2:1 gereinigt.

Ausbeute: 1.54 g (1.32 mmol, quant.); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.11$ (EE); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹³

$C_{56}H_{65}N_3O_{24}$ (M = 1164.14 g/mol) [1163.40].

ESI-MS (positiv), m/z: 1202.81 ($[M+K]^+$, ber.: 1202.40), 1186.85 ($[M+Na]^+$, 1186.40).

¹H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$), δ (ppm): 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz), 7.63 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.40-7.25 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x $H_{ar}Bn$), 5.34-5.12 (m, 5H, OCH_2 -Bn, H8'', H7'', H4), 4.95-4.68 (m, 3H, H1, H3, H4''), 4.39-4.25 (m, 3H, CH_2 -Fmoc, H2), 4.21-3.76 (m, 10H, H6'', H9''_b, H9-Fmoc, H9''_a, S ^{α} , S ^{β} , H5'', H6_a, H5), 3.09 (dd, 1H, H6_b, $J_{H6b,H5} = 5.0$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 9.0$ Hz), 2.54 (dd, 1H, H3_{eq}'', $J_{H3eq'',H3ax''} = 12.2$ Hz, $J_{H3eq'',H4''} = 3.8$ Hz), 2.03, 2.01, 1.98, 1.91, 1.87, 1.80, 1.69 (s, 25H, NHAc, OAc, H3''_a).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*butylester (23)**

(Fmoc-Thr(α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu)¹¹²**

Eine Lösung von 4.50 g (7.49 mmol) Fmoc-Thr(GalNAc)-*O**t*Bu **12a** und 2.26 ml (2.30 g, 15.1 mmol) Benzaldehyddimethylacetal (α,α -Dimethoxytoluol) in 125 ml Acetonitril (HPLC grade) wird mit drei Spatelspitzen *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Der Reaktionskolben wird 3.5 h bei 40 °C am Rotationsverdampfer bei einem Vakuum von 200 mbar rotiert. Nach Zugabe von 0.3 ml Triethylamin wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: CH/EE, 3:1).

Ausbeute: 4.55 g (6.60 mmol, 88%), farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = 61.3$ (c = 1.00, $CHCl_3$), $R_f = 0.41$ (CH/EE, 1:4).

$C_{38}H_{44}N_2O_{10}$ (M = 688.76 g/mol) [688.30].

ESI-MS (positiv), m/z: 689.4 ($[M+H]^+$, ber. 689.3), 711.4 ($[M+Na]^+$, ber.: 711.3).

¹H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.60 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.0$ Hz), 7.52-7.45 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.44-7.28 (m, 7H, H2-, H7-Fmoc, $H_{ar}Bn$), 6.49 (d, 1H, NH-GalNAc, $J_{NH,H2} = 8.5$ Hz), 5.54 (s, 1H, CH-Bn), 5.49 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{NH,T\alpha} = 9.4$ Hz), 4.93 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 2.9$ Hz), 4.53-4.34 (m, 3H, H2, CH_2 -Fmoc), 4.30-3.95 (m, 6H, H5, H6_a, H6_b, H9-Fmoc, T _{α} , T _{β}), 3.90- 3.75 (m, 1H, H3), 3.68 (s, 1H, H4), 2.07 (s, 3 H, OAc), 1.45 (s, 9H, *t*Bu), 1.27 (d, 3 H, T _{γ} , $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 172.43, 170.76 (C=O), 156.43 (C=O-Urethan), 143.73 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.34 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.49 (C_q-Bn), 129.10, 128.21, 126.32 (C_{ar}-Bn), 127.80 (C3-, C6-Fmoc), 127.07 (C2-, C7-Fmoc), 125.00 (C1-, C8-Fmoc), 120.04 (C4-, C5-Fmoc), 101.17 (CH-Bn), 100.47 (C1), 83.38 (C_q-*t*Bu), 76.67 (T _{β}), 75.52 (C3), 69.69 (C4), 69.17 (CH₂-Fmoc), 67.18 (C6), 63.66 (C5), 58.91 (T _{α}), 50.40 (C2), 47.20 (C9-Fmoc), 28.07 (*t*Bu), 23.06 (CH₃-Ac), 19.01 (T _{γ}).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (24)**

(Fmoc-Thr([β Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*Ot*Bu)¹¹³

In einer Suspension aus 30 ml Dichlormethan/Nitromethan 3:1 und 1.5 g Molsieb 4 Å werden 1.50 g (2.24 mmol) Fmoc-Thr(α GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*Ot*Bu (**23**) und 2.77 g (6.72 mmol, 3 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid (**5**) eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Nach der Zugabe von 1.13 g (4.48 mmol, 2 Äquiv.) Hg(CN)₂ wird das Reaktionsgemisch weitere 2.5 h bei Raumtemp. gerührt, und dann erneut mit 1.13 g Hg(CN)₂ versetzt. Die Suspension wird 16 h bei Raumtemp. gerührt, mit 50 ml Dichlormethan verdünnt und über Celite in 50 ml eine ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung filtriert. Die org. Phase wird abgetrennt, zweimal mit 50 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, einmal mit 50 ml einer ges. Natriumiodid-Lösung und ein letztes Mal mit 50 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Die Lösung wird nun über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt und durch Flashchromatographie an Kieselgel mit CH/EE 1:1 gereinigt.

Ausbeute: 1.62 g (1.61 mmol, 72%); farbloser amorpher Feststoff; R_f = 0.42 (EE); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹³

C₅₂H₆₂N₂O₁₉ (M = 1019.05 g/mol) [1018.39].

ESI-MS (positiv), m/z = 1041.87 ([M+Na]⁺, ber.: 1041.39).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (25)
(Fmoc-Thr(β Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalAc₂NAc)-OH)¹¹⁵**

1.62 g (1.61 mmol) Fmoc-Thr($[\beta$ -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*O**t*Bu (24) werden in 15 ml TFA und 1 ml Anisol 2.5 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. dreimal mit 50 ml Toluol kodestilliert. Das resultierende Öl wird mit 50 ml einer Acetanhydrid/Pyridin-Mischung (1:2) und 20 mg DMAP bei 0 °C versetzt und 16 h bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Danach entfernt man das Lösungsmittel i. Hochvak. und kodestilliert dreimal mit je 50 ml Toluol. Den Rückstand nimmt man in 80 ml Dichlormethan auf und wäscht zweimal mit je 50 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung. Man trocknet über Magnesiumsulfat, entfernt das Dichlormethan i. Vak. und chromatographiert den Rückstand an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/HOAc (100:1:1)).

Ausbeute: 1.11 g (1.16 mmol, 72% über 3 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = 59.9$ ($c = 1.00$, CH₂Cl₂), $[\alpha]_D^{23} = 63.1$ ($c = 1.00$, CH₂Cl₂); $R_f = 0.28$ (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 100:4:1).

C₄₅H₅₄N₂O₂₁ (M = 958.91 g/mol) [958.32].

ESI-MS (positiv), m/z : 959.57 ($[M+H]^+$, ber.: 959.32).

¹*H-NMR* (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.78 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.63 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.0$ Hz), 7.42 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.32 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc), 6.07 (d, 1H, NH-GalNAc, $J_{NH,H2} = 8.5$ Hz), 5.55 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{NH,T\alpha} = 7.8$ Hz), 5.38 (d, 1H, H4', $J = 2.64$ Hz), 5.36 (d, 1H, H4, $J = 2.49$ Hz), 5.08 (m, 1H, H2'), 5.01 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz), 5.04 (dd, 1H, H3', $J_{H3',H2'} = 10.4$ Hz, $J_{H3',H4'} = 3.2$ Hz), 4.58 (d, 1H, H1', $J_{H1',H2'} = 7.6$ Hz), 4.53-4.51 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.45-4.39 (m, 3H, H3, H2, T _{α}), 4.23 (m, 1H, H9-Fmoc), 4.19-4.08 (m, 3H, H6_a, T _{β} , H6_a'), 4.04-3.98 (m, 2H, H6b', H6_b), 3.89-3.80 (m, 2H, H5, H5'), 2.36 (s, 3H, CH₃ NHAc), 2.16, 2.13, 2.07, 2.03, 2.01, 2.00 (s, 18H, 6x CH₃ OAc), 1.30 (d, 3H, T _{γ} , $J_{T\gamma,T\beta} = 6.0$ Hz).

¹³*C-NMR* (100.6 MHz, CDCl₃, HSQC), δ (ppm): 173.19 (COOH), 170.61, 170.50, 170.33, 170.10, 169.99, 169.69 (C=O OAc, C=O NHAc), 156.63 (C=O Urethan), 143.78, 143.61 (C8_a-, C9_a-Fmoc), 141.35 (C4_a-, C4_b-Fmoc), 127.84 (C3-, C6-Fmoc), 127.20, 127.12 (C2-, C7-Fmoc), 125.30, 124.94 (C1-, C8-Fmoc), 120.21, 120.08 (C4-, C5-Fmoc), 100.38 (C1'), 99.63 (C1), 77.23 (C3), 72.63, 70.87 (C5, C5'), 70.67 (C3'), 68.86, 68.63, 67.78 (T _{β} , C4, C2'), 66.95 (CH₂-Fmoc), 66.76 (C4'), 62.86, 61.10 (C6', C6), 58.48 (T _{α}), 49.12 (C2), 47.25 (C9-Fmoc), 22.79 (CH₃ NHAc), 20.71, 20.67, 20.62, 20.57, 20.52, 20.11 (6x CH₃ OAc), 18.29 (T _{γ}).

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (26)¹⁵¹

Zu einer Suspension von 30.0 g (0.17 mol) D-Galactose **4** und 67.0 g (0.42 mol) wasserfreiem Kupfersulfat in 500 mL Aceton werden 4 ml konz. Schwefelsäure gegeben, und man rührt 24 h bei Raumtemperatur. Kupfersulfat wird durch Filtration entfernt und das Filtrat mit Calciumhydroxid neutralisiert. Man filtriert über *Hyflo* und entfernt Aceton im Vakuum. Das Produkt wird ohne zusätzliche Reinigung weiter umgesetzt.

Rohausbeute: 44.5 g (0.17 mol, quant.); gelbes Öl; $R_f = 0.39$ (CH/EE, 1:1); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹⁵¹

$C_{12}H_{20}O_6$ (M = 260.28 g/mol) [260.13].

6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (27)**(α -6-Bn-diisopropyl-Gal)**¹¹²

Eine auf 0 °C abgekühlte Lösung von 44.5 g (max. 0.17 mol) roher 1,2,3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**26**) in 300 ml DMF wird unter Argon portionsweise mit 11.0 g (0.28 mol) einer 60%-igen Dispersion von Natriumhydrid in Mineralöl versetzt. Die Kühlung wird entfernt und die Reaktionsmischung 1 h bei Raumtemp. gerührt. Nach erneutem Abkühlen auf 0 °C tropft man 32.6 ml (47.0 g, 0.28 mol) Benzylbromid in 50 ml DMF zu. Anschließend wird 24 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 10 ml Methanol wird DMF destillativ i. Hochvak. entfernt und der Rückstand in 300 ml Dichlormethan aufgenommen. Die resultierende gelbe Lösung wird dreimal mit je 100 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und destillativ i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird viermal mit je 20 ml Toluol kodestilliert und anschließend durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 8:1) gereinigt.

Ausbeute: 41.3 g (0.12 mmol, 87% über 2 Stufen), gelbes Öl, $[\alpha]_D^{24} = -60.8$ (c = 1.00, CHCl₃), $R_f = 0.32$ (CH/EE, 5:1); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹²

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

ESI-MS (positiv), m/z: 373.18 ($[M+Na]^+$, ber.: 373.17).

6-*O*-Benzyl- α,β -D-galactopyranose (28)**(α,β -6-Bn-Gal)**¹¹²

Eine Lösung von 41.2 g (118 mmol) 6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose **27** in 800 ml 60%-iger Essigsäure wird 4 h bei 85 °C gerührt. Das

Essigsäure-Wasser-Gemisch wird i. Hochvak. abdestilliert und der Rückstand viermal mit je 50 ml Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Rohausbeute: 31.9 g (quant.), gelbes Öl, $R_f = 0.22$ (EE/EtOH, 10:1); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹²

$C_{13}H_{18}O_6$ (M = 270.28 g/mol) [270.11].

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α,β -D-galactopyranose (29)

(α,β -Ac₄-6-Bn-Gal)¹¹²

Eine Lösung von 31.9 g (max. 118 mmol) roher 6-*O*-Benzyl- α,β -D-galactopyranose (**28**) in 300 ml Pyridin wird auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe einer Spatelspitze *N,N*-Dimethylaminopyridin werden unter Rühren 150 ml Acetanhydrid zugetropft. Die Kühlung wird entfernt, und man rührt 4 h bei Raumtemp.. Die Reaktionslösung wird von Pyridin und überschüssigem Acetanhydrid i. Hochvak. befreit. Das Rohprodukt wird sechsmal mit jeweils 50 ml Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 2:1) gereinigt. Für die nachfolgende Umsetzung zum Bromid **31** können beide Anomere verwendet werden.

Ausbeute: 45.98 g (104.9 mmol, 89% über 2 Stufen), gelbes Öl; weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹²

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

ESI-MS (positiv), *m/z*: 461.98 ($[M+Na]^+$, ber.: 461.15), 476.97 ($[M+K]^+$, ber.: 477.15).

¹*H-NMR* (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.43-7.26 (m, 5H, H_{ar}-Bn), 5.66 (d, 1H, H1', $J_{H1',H2'} = 8.1$ Hz), 5.48 (d, 1H, H3', $J_{H3',H4'} = 2.9$ Hz), 5.34-5.22 (m, 1H, H4'), 5.08-4.97 (m, 1H, H2'), 4.52, 4.36 (2 x d, 2H, CH₂-Bn), 3.96 (t, 1H, H5', $J_{H5',H6'} = 6.2$ Hz), 3.58-3.49 (m, 1H, H6a'), 3.48-3.37 (m, 1H, H6b'), 2.07, 2.03, 2.00, 1.96 (4 x s, 12H, CH₃-Ac).

¹³*C-NMR* (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.99, 169.87, 169.41, 168.96 (C=O), 137.31 (C_{Ar}_{ipso}), 128.38, 127.88, 127.72, 127.53, 127.46 (C_{ar}-Bn), 92.26 (C1), 73.48 (CH₂-Bn), 72.81, 71.00, 68.07, 67.15, 66.76 (C2, C3, C4, C5, C6), 20.89, 20.78, 20.63, 20.57 (CH₃CO).

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactosylbromid (30)

(α Ac₄-6-Bn-GalBr)¹¹²

Zu einer auf 0 °C abgekühlten Lösung von 3.0 g (6.84 mmol) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α,β -D-galactopyranose (**29**) in 40 ml absol. Dichlormethan werden unter Argon 20 ml

HBr in Eisessig (33%) innerhalb von 20 min getropft. Es wird 10 min bei dieser Temperatur gerührt, bevor die Reaktionsmischung zur Hydrolyse langsam auf 125 ml Eiswasser gegossen wird. Nach Verdünnen mit 150 ml Dichlormethan wird die organische Phase zweimal mit jeweils 150 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 150 ml einer 10%-igen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der rotbraune Rückstand wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE) gereinigt.

Ausbeute: 1.7 g (3.72 mmol, 55%); gelbes Öl; $R_f = 0.52$ (CH/EE, 3:1); weitere analytische Daten siehe Literatur.¹¹²

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{BrO}_8$ (M = 459.29 g/mol) [458.08].

***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]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*butylester (31)**

(Fmoc-Thr(β Ac₃-6-Bn-Gal(1 \rightarrow 3)- α 4,6-*O*-BznGalNAc)-*O*tBu)¹¹²

Eine Lösung von 4.50 g (6.54 mmol) Fmoc-Thr(α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O*tBu **23** in 100 ml Nitromethan/Dichlormethan (3:2) wird unter Argon 1 h mit 5.0 g frisch ausgeheiztem Molekularsieb (3 Å, Kugeln) gerührt. Anschließend werden 3.70 g (14.78 mmol) $\text{Hg}(\text{CN})_2$ zugegeben und 7.50 g (16.33 mmol) α Ac₄-6-Bn-GalBr **30**, gelöst in 25 ml einer Mischung aus Nitromethan/Dichlormethan (3:2), zugetropft. Es wird bei Raumtemp. gerührt, wobei nach 1 h und 4 h jeweils zwei weitere Spatelspitzen $\text{Hg}(\text{CN})_2$ hinzugefügt werden. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 18 h wird die Mischung über *Hyflo* filtriert und mit Dichlormethan nachgespült. Die organische Phase wird zweimal mit jeweils 150 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 100 ml einer ges. NaI-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. eingeengt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 1:1).

Ausbeute: 6.47 g (6.06 mmol, 93%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 62.9$ (c = 1.00, CHCl_3), $R_f = 0.59$ (CH/EE, 1:3).

$\text{C}_{57}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{O}_{18}$ (M = 1067.14 g/mol) [1066.43].

ESI-MS (positiv), m/z: 1089.48 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1089.43).

¹*H-NMR* (400 MHz, CDCl_3 , COSY, HMQC), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, H4-, H5- Fmoc, $J_{3,4} = J_{5,6} = 7.4$ Hz), 7.60 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H7,H8}} = 7.0$ Hz), 7.52 (d, 2H, H_{ar}-Bn, $J_{\text{H}_a,\text{H}_b} = 6.7$ Hz), 7.45-7.16 (m, 12H, H2-, H3-, H6-, H7- Fmoc, H_{ar}-Bn (3H), H_{ar}-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-Bn {s, 5.50}, H4' {d, 5.41, $J_{\text{H}3',\text{H}4'} = 2.7$ Hz}, 5.21-5.11 (m, 1H, H2'), 5.00-4.86 (m, 2H, H3' {4.96}, H1 {4.91}), 4.73-4.57 (m, 2H, H1' {4.67}, H2 {4.66}), 4.55-4.36 (m, 4H, CH₂-Fmoc {4.48}, CH₂-Bn {4.38}), 4.32-3.99 (m, 5H, T_α {4.29}, H4 {4.27}, H9-Fmoc {4.24}, T_β {4.18}, H6a {4.14}), 3.95-3.79 (m, 3H, H6b {3.89}, H5' {3.86}, H3 {3.82}), 3.63-3.43 (m, 3H, H5 {3.59}, H6a' {3.54}, H6b' {3.48}), 2.06, 2.05, 1.98, 1.95 (4x s, 12H, CH₃-Ac), 1.43 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.23 (sb, 3H, T_γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT), δ (ppm): 170.29, 170.17, 170.07, 169.72, 169.44 (C=O), 156.32 (C=O-Urethan), 143.66 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.34 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.63, 137.46 (C_q-Bn), 128.73, 128.51, 128.46, 128.07, 127.92, 126.19 (C_{ar}-Bn), 127.84, 127.81 (C3-, C6-Fmoc), 127.08 (C2-, C7-Fmoc), 124.91 (C1-, C8-Fmoc), 120.09 (C4-, C5-Fmoc), 101.65 (C1'), 100.56 (CH-Bzn), 100.31 (C1), 83.16 (C_q-*t*Bu), 76.12 (T_β), 75.46 (C4), 74.78 (C3), 73.50 (CH₂-Bn), 72.22 (C5'), 71.20 (C3'), 69.03 (C6), 68.91 (C2'), 68.01 (C6'), 67.59 (C4'), 66.92 (CH₂-Fmoc), 63.69 (C5), 59.06 (T_α), 47.92 (C2), 47.24 (C9-Fmoc), 28.00 (CH₃-*t*Bu), 23.47 (CH₃-NHAc), 21.06, 20.71, 20.61 (3x CH₃-OAc), 18.94 (T_γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[6-*O*-benzyl-β-D-galacto-pyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butyl-ester (32)**

(Fmoc-Thr(β6-Bn-Gal(1→3)-α4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu)¹¹²

Eine Lösung von 5.15 g (4.83 mmol) Fmoc-Thr(βAc₃-6-Bn-Gal(1→3)-α4,6-*O*Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu (31) in 80 ml absol. Methanol wird unter ständiger Kontrolle des pH Wertes langsam mit einer 1%-igen NaOMe/Methanol-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5-9.5 erreicht ist. Es wird 8 h gerührt, wobei in regelmäßigen Abständen der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert wird. Nach erfolgter Deacetylierung wird mit 1N Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wird in 40 ml einer Mischung aus Dioxan/Wasser (1:1) gelöst, mit 844 mg (2.50 mmol) Fmoc-OSu und 275 μl (253 mg, 2.50 mmol) *N*-Methylmorpholin (NMM) versetzt und 15 h gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit 2N HCl auf pH = 6 angesäuert und das Dioxan i. Vak. abdestilliert. Das Produkt wird dreimal mit jeweils 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird zweimal mit je 200 ml 1N HCl und 200 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE→EE/EtOH, 40:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.82 g (4.05 mmol, 84%), farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = 67.1$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.33$ (Toluol/Ethanol, 4:1).

$\text{C}_{51}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_{15}$ ($M = 941.03$ g/mol) [940.40].

ESI-MS (positiv), m/z : 963.5 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 963.4).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.4$ Hz), 7.61 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.4$ Hz), 7.49 (d, 2H, Har-Bzn, $J_{\text{Ha,Hb}} = 6.6$ Hz), 7.42-7.25 (m, 12H, H3-, H6-, H2-, H7-Fmoc, Har-Bzn (3H), Har-Bn (5H)), 6.42 (d, 1H, NHGalNAc, $J_{\text{NH,H2}} = 9.2$ Hz), 5.82 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.2$ Hz), 5.42 (s, 1H, CH-Bzn), 4.91 (d, 1H, H1, $J_{\text{H1,H2}} = 2.9$ Hz), 4.68-4.43 (m, 5H, H2, CH_2 -Fmoc, CH_2 -Bn), 4.31-4.02 (m, 6H, H4, H1', H9-Fmoc, T_α , T_β , H6a), 3.93-3.45 (m, 8H, H3, H6b, H3', H4', H5', H5, H6'a, H6b'), 3.42-3.29 (m, 1H, H2'), 2.61 (sb, 1H, OH), 2.01 (s, 3H, CH_3 -Ac), 1.42 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu), 1.24 (d, 3 H, T_γ , $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 4.8$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , DEPT), δ (ppm): 173.11 (COOH), 172.32 (C=O), 156.59 (C=O-Urethan), 143.73 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.31 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.13, 137.62 (Cq-Bn, Cq-Bzn), 128.92, 128.10, 126.69 (Car-Bzn), 128.42, 127.77 (Car-Bn), 127.68 (C3-, C6-Fmoc), 127.10 (C2-, C7-Fmoc), 125.03 (C1-, C8-Fmoc), 120.04 (C4-, C5-Fmoc), 105.36 (CH-Bzn), 101.14 (C1'), 100.56 (C1), 83.23 (Cq-*t*Bu), 77.37 (T_β), 76.72 (C4), 75.78 (C3), 73.73 (C5'), 73.52 (CH_2 -Bn), 73.39 (C3'), 70.81 (C2'), 70.01 (C6), 68.97 (C6'), 68.89 (C4'), 67.07 (CH_2 -Fmoc), 63.62 (C5), 59.14 (T_α), 48.18 (C2), 47.23 (C9-Fmoc), 28.09 (CH_3 -*t*Bu), 23.43 (CH_3 -Ac), 19.07 (T_γ).

***N*-(9*H*-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-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}]- α -D-galacto-pyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (33)**

(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuAcCOOBn-(2→3)- β 6-Bn-Gal(1→3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu)¹¹²

Eine Lösung von 3.30 g (3.51 mmol) Fmoc-Thr(β 6-Bn-Gal(1→3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu **32** und 5.90 g (8.77 mmol, 2.5 eq.) α Ac₄NeuNAcCOOBnXan **17** in einer Mischung aus 80 ml absol. Acetonitril und 40 ml absol. Dichlormethan wird mit 6 g ausgeheiztem Molekularsieb 3 Å in einem Schlenck-Kolben (Braunglas) 1 h unter Argon gerührt, auf -65 °C abgekühlt und mit 2.25 g (8.77 mmol) wasserfreiem Silbertriflat versetzt. Anschließend werden über einen Zeitraum von 30 min. 5.50 ml (8.8 mmol) einer 1.6 M Methylsulfonylbromid-Lösung in absol. 1,2-Dichlorethan unter Lichtausschluss zugetropft.

Die Mischung wird 3.5 h bei $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und anschließend durch Zugabe von 0.8 ml DIPEA neutralisiert. Man lässt auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ kommen, verdünnt mit 40 ml Dichlormethan und filtriert über *Hyflo Super Cel*. Das Filtrat wird i. Vak. vom Lösungsmittel befreit, und der Rückstand wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE→EE/EtOH, 40:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.65 g (1.78 mmol, 51%, $\alpha/\beta = 98:2$), farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = 32.0$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.26$ (EE/EtOH, 10:1), $R_f = 30.1$ min (Phenomenex Luna-C18, Grad.: MeCN/H₂O (60:40) → (90:10) in 40 min).

$\text{C}_{77}\text{H}_{91}\text{N}_3\text{O}_{27}$ ($M = 1490.55$ g/mol) [1489.58].

ESI-MS (positiv), m/z : 1512.7 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 1512.6).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY, HMQC), δ (ppm): 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H4},\text{H3}} = J_{\text{H5},\text{H6}} = 7.8$ Hz), 7.58 (dd, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H1},\text{H2}} = J_{\text{H8},\text{H7}} = 7.80$ Hz), 7.49 (d, 2H, Har-Bzn, $J_{\text{Ha},\text{Hb}} = 5.8$ Hz), 7.42-7.35 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.35-7.24 (m, 15H, H2-, H7-Fmoc, Har-Bzn (3H), Har-Bn (10H)), 6.59 (d, 1H, NH-GalNAc, $J_{\text{NH},\text{H2}} = 9.4$ Hz), 6.12 (d, 1H, T_{NH}, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.8$ Hz), 5.45 (s, 1H, CH-Bzn), 5.40 (t, 1H, H8'', $J_{\text{H8}'',\text{H9}''} = 6.6$ Hz), 5.28-5.13 (m, 2H, H7'', NH-NeuNAc), 5.16 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.98 (d, 1H, H1, $J_{\text{H1},\text{H2}} = 3.5$ Hz), 4.92-4.81 (m, 1H, H4''), 4.74-4.63 (m, 1H, H2), 4.55 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.52-4.03 (m, 10H, H9a'' {4.46}, CH₂-Fmoc {4.39, 4.34}, T _{β} {4.33}, H4 {4.26}, T _{α} {4.25}, H9-Fmoc {4.19}, H1' {4.15}, H6a {4.13}, H5'' {4.06}), 3.99-3.84 (m, 4H, H6'' {3.93}, H9b'' {3.92}, H3' {3.90}, H6b {3.87}), 3.72-3.55 (m, 4H, H3 {3.67}, H2' {3.61}, H6a' {3.59}, H5 {3.57}), 3.54-3.39 (m, 2H, H6b' {3.87}, H5' {3.41}), 3.24 (s, 1H, H4'), 2.78 (sb, 1H, OH), 2.71 (dd, 1H, H3eq'', $J_{\text{H3eq}'',\text{H3ax}''} = 12.7$ Hz, $J_{\text{H3eq}'',\text{H2}''} = 4.3$ Hz), 2.36 (s, 1H, OH), 2.03-2.00 (m, 1H, H3ax''), 2.09, 2.07, 2.02, 2.00, 1.92, 1.82 (6x s, 18H, 6x CH₃-Ac), 1.42 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.26 (d, 3H, T _{γ} , $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 5.9$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , BB, HMQC), δ (ppm): 171.53, 170.91, 170.82, 170.24, 170.09, 169.76, 167.77 (C=O), 156.83 (C=O-Urethan), 143.71 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.29, 141.15 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.07, 137.51 (C_q-Bn), 134.21 (C_q-Bn), 128.97, 128.84, 128.78, 128.43, 127.51 (C_{ar}-Bn), 128.78, 128.04, 126.44 (C_{ar}-Bzn), 127.79 (C3-, C6-Fmoc), 127.09, 126.97 (C2-, C7-Fmoc), 125.17, 124.94 (C1-, C8-Fmoc), 120.03 (C4-, C5-Fmoc), 106.55 (C1'), 100.96 (CH-Bzn), 100.45 (C1), 97.47 (C2''), 83.13 (C_q-*t*Bu), 78.15 (C3), 75.94, 75.15 (T _{β} , C4, C3'), 73.60 (CH₂-Bn), 73.43, 72.92 (C6'', C5'), 69.72 (C8'', C6'), 69.07 (C6), 68.61 (C4''), 68.22, 68.11 (CH₂-Bn, C2', C4', C7''), 67.25 (CH₂-Fmoc), 63.64 (C9''), 63.52 (C5), 59.24 (T _{α}), 49.08 (C5''), 47.79 (C2), 47.09 (C9-Fmoc), 37.42 (C3''), 28.06 (CH₃-*t*Bu), 23.16, 23.07 (CH₃-NHAc), 21.33, 21.21, 21.01, 20.78, 20.64 (CH₃-OAc), 19.47 (T _{γ}).

***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-didesoxy- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (34)**

(Fmoc-Thr(α Ac₄Neu5AcCOOBn-(2→3)- β 6-*O*-Bn-Ac₂Gal(1→3)- α Ac₂GalNAc)-OH)¹¹²

2.3 g mg (1.46 mmol) (Fmoc-Thr(α Ac₄Neu5AcCOOBn-(2→3)- β 6-*O*-Bn-Ac₂Gal(1→3)- α Ac₂GalNAc)-*O**t*Bu) **33** werden in einer Mischung aus 25 ml Trifluoressigsäure und 2 ml Anisol gelöst, zwei Stunden bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit 50 ml absol. Toluol verdünnt. Überschüssiges Anisol, Trifluoressigsäure und Toluol 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 Raumtemp. unter Argon gerührt. Danach entfernt man das Lösungsmittel i. Hochvak. und kodestilliert dreimal mit je 50 ml Toluol. Den Rückstand nimmt man in 100 ml Dichlormethan auf und wäscht zweimal mit je 50 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung. Man trocknet über Magnesiumsulfat, entfernt das Dichlormethan i. Vak. und chromatographiert den Rückstand an Kieselgel (Laufmittel: EE/MeOH, 2:1).

Ausbeute: 1.68 g (1.11 mmol, 76%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.27$ (EE/MeOH, 1:1), $[\alpha]_D^{23} = 24.8$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₇₄H₈₇N₃O₃₁ (M = 1514.48 g/mol) [1513.53].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 1537.1 ([M+Na]⁺, ber.: 1536.5), 1553.0 ([M+K]⁺, ber.: 1552.6), 1559.0 ([M+2Na-H]⁺, ber.: 1558.5).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, COSY, HMQC): δ (ppm): 7.82 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc), $J_{H_3,H_4} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz), 7.72-7.68 (m, 2H, H₁-, H₈-Fmoc), 7.52-7.27 (m, 14H, H₂-, H₃-, H₆-, H₇-Fmoc, H_{ar} (2x Bn, 10H)), 5.60-5.54 (m, 1H, H₈"'), 5.48-5.38 (m, 3H, H₄ {5.45}, H₇" {5.42}, CH_{2a}-Bn {d, $J_{H_a,H_b} = 12.2$ Hz}), 5.21 (d, 1H, H₄', $J_{H_3',H_4'} = 3.1$ Hz), 5.16 (d, 1H, CH_{2b}-Bn, $J_{H_a,H_b} = 12.1$ Hz), 5.04-4.96 (m, 2H, H₁ {4.99}, H₄" {4.96}), 4.87 (d, 2H, H₂', $J_{H_2',H_3'} = 10.1$ Hz), 4.77 (d, 1H, H₁', $J_{H_1',H_2'} = 7.6$ Hz), 4.68-4.42 (m, 6H, H₃' {4.65}, CH₂-Bn {4.62, 4.52}, CH₂-Fmoc {4.61, 4.48}, T _{β} {4.44}), 4.38-4.29 (m, 2H, H₂ {4.33}, H_{9a}" {4.31}), 4.28-4.21 (m, 2H, H₉-Fmoc {4.26}, H₅ {4.23}), 4.16-4.11 (m, 2H, T _{α} {4.14}, H_{6a} {4.12}), 4.08-3.94 (m, 4H, H₃ {4.05}, H_{9b}" {4.02}, H_{6b} {4.01}, H₅" {3.97}), 3.92-3.86 (m, 1H, H₅'), 3.82-3.77 (m, 1H, H₆"'), 3.64 (dd, 1H, H_{6a}', $J_{H_5',H_6'a} = 6.3$ Hz, $J_{H_6'a,H_6'b} = 9.4$ Hz), 3.49 (dd, 1H, H_{6b}', $J_{H_5',H_6'b} = 6.3$ Hz, $J_{H_6'a,H_6'b} = 9.4$ Hz), 2.64 (dd, 1H, H_{3eq}"', $J_{H_{3ax"},H_{3eq}"} = 12.6$ Hz, $J_{H_{3eq"},H_4"} = 4.6$ Hz), 2.29 (s, 3H, CH₃-Ac), 2.19 (s, 3H, CH₃-Ac), 2.13 (s, 3H, CH₃-Ac), 2.10 (s, 3H, CH₃-Ac), 2.08 (s, 3H, CH₃-Ac), 2.06 (s, 6H, CH₃ (2x Ac)), 2.04 (s, 3H, CH₃-Ac), 2.00 (s, 3H, CH₃-Ac),

1.85 (s, 3H, CH₃-Ac), 1.56 (dd, 1H, H_{3ax}"', $J_{\text{H3ax}'',\text{H3eq}''} = 12.5$ Hz, $J_{\text{H3ax}'',\text{H4}''} = 12.1$ Hz), 1.26 (d, 3H, T_γ, $J_{\text{Tβ},\text{Tγ}} = 5.8$ Hz).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, HMQC), δ (ppm): 172.05, 171.77, 171.51, 170.99, 168.72 (C=O), 159.00 (C=O-Urethan), 145.36 (C1a-, C8a-Fmoc), 142.66 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.83, 134.68 (C_q (2x Bn)), 129.82, 129.65, 129.56, 129.45, 128.94, 128.82, 128.16 (C_{ar} (2x Bn)), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 126.12, 125.99 (C1-, C8-Fmoc), 121.00 (C4-, C5-Fmoc), 102.65 (C1'), 100.27 (C1), 98.14 (C2''), 77.50 (T_β), 74.87 (C3), 74.51 (CH₂-Bn), 73.22 (C5'), 72.99 (C6''), 72.81 (C3'), 71.43 (C4, C2'), 70.87 (C4''), 69.76 (CH₂-Bn), 69.35 (C4'), 69.26 (C6'), 68.98 (C8''), 68.84 (C5), 68.49 (C7''), 67.52 (CH₂-Fmoc), 64.29 (C6), 63.48 (C9''), 61.24 (T_α), 50.44 (C2), 49.22 (C5''), 48.81 (C9-Fmoc), 38.73 (C3''), 23.58, 22.68 (CH₃-NHAc), 21.73, 21.03, 20.97, 20.79, 20.69, 20.54 (8x CH₃-OAc), 19.45 (T_γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (35)
(Fmoc-Thr(β6-*O*-Bn-Ac₃Gal(1→3)-αGalNAc)-OtBu)¹¹²**

Eine Lösung von 3.34 g (3.14 mmol) Fmoc-Thr(βAc₃-6-Bn-Gal(1→3)-α4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu **31** in 75 ml Essigsäure (80%-ig) wird 1 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf ca. 40 °C wird die Mischung durch Zugabe von 100 ml Toluol verdünnt und i. Vak. konzentriert. Der Rückstand wird fünfmal mit jeweils 50 ml Toluol i. Vak. kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 2.73 g (2.79 mmol, 89%), farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = 34.9$ (c = 1.00, CHCl₃), R_f = 0.10 (CH/EE, 1:4).

C₅₀H₆₂N₂O₁₈ (M = 979.03 g/mol) [978.40 g/mol].

ESI-MS (positiv), m/z: 1001.9 ([M+Na]⁺, ber.: 1001.4).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H4-, H5- Fmoc, $J_{3,4} = J_{5,6} = 7.4$ Hz), 7.59 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{\text{H1},\text{H2}} = J_{\text{H8},\text{H7}} = 7.4$ Hz), 7.46-7.15 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7- Fmoc, Har-Bn (5 H)), 5.95 (d, 1 H, NH-GalNAc, $J_{\text{NH},\text{H2}} = 8.5$ Hz), 5.51 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{\text{NH},\text{Tα}} = 9.2$ Hz), 5.39 (d, 1H, H4', $J_{\text{H3}',\text{H4}'} = 2.9$ Hz), 5.23-5.08 (m, 1H, H2'), 5.00-4.90 (m, 1H, H3'), 4.80 (sb, 1H, H1), 4.64-4.33 (m, 6H, H1', H2, CH₂-Fmoc, CH₂-Bn), 4.29-3.98 (m, 5H, H9-Fmoc, T_α, T_β, H4), 3.94-3.56 (m, 5H, H6_b, H6_a, H5', H3, H5), 3.55-3.35 (m, 2H, H6'_a, H6'_b), 2.05, 2.04, 1.98, 1.95 (4x s, 12 H, CH₃-Ac), 1.43 (s, 9 H, CH₃-*t*Bu), 1.24 (sb, 3 H, T_γ).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ (ppm): 170.19, 170.10, 169.54 (C=O), 156.37 (C=OUrethan), 143.65 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.32 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.31 (C_q-Bn), 128.51,

128.0 (Car-Bn), 127.78 (C3-, C6-Fmoc), 127.10 (C2-, C7-Fmoc), 125.18, 124.91 (C1-, C8-Fmoc), 120.07 (C4-, C5-Fmoc), 101.57 (C1'), 100.03 (C1), 83.15 (Cq-*t*Bu), 76.23 (T β), 76.01 (C3), 73.58 (CH₂-Bn), 72.34 (C5'), 70.85 (C3'), 69.82, 69.54 (C4, C6), 68.72 (C2'), 67.84 (C6'), 67.44 (C4'), 66.83 (CH₂-Fmoc), 62.86 (C5), 59.02 (T α), 47.59 (C2), 47.24 (C9-Fmoc), 27.95 (CH₃-*t*Bu), 23.23 (CH₃-NHAc), 20.71, 20.61, 20.55 (3x CH₃-OAc), 18.74 (T γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*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 (36)**

(Fmoc-Thr(β Ac₃-6-Bn-Gal(1 \rightarrow 3)-[α Ac₄NeuNAcCOOBn(2 \rightarrow 6)]- α GalNAc)-*Ot*Bu)¹¹²

Eine Lösung von 1.40 g (1.32 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃-6-Bn-Gal(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-*Ot*Bu **35** und 2.20 g (3.28 mmol, 2.5 eq.) α Ac₄NeuNAcCOOBnXan **17** in 100 ml absol. Acetonitril/absol. Dichlormethan (2:1) wird mit 5 g ausgeheiztem Molekularsieb 3 Å in einem Schlenck-Kolben (Braunglas) 1 h unter Argon gerührt, auf -65 °C abgekühlt und mit 850 mg wasserfreiem Silbertriflat (3.30 mmol) versetzt. Anschließend werden über einen Zeitraum von 25 min 2.1 ml (3.30 mmol) einer auf -10 °C vorgekühlten 1.6 M Methylsulfenylbromid-Lösung in absol. 1,2-Dichlorethan unter Lichtausschluss zugetropft. Die Mischung wird 4 h bei -65 °C gerührt und anschließend durch Zugabe von 0.7 ml DIPEA neutralisiert. Man lässt auf Raumtemp. kommen, verdünnt mit 50 ml Dichlormethan und filtriert über *Hyflo Super Cel*. Das Filtrat wird i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE) gereinigt. Die Trennung der beiden Anomere erfolgt durch präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, MeCN/Wasser, Grad. (55:45) \rightarrow (80:20), 60 min, (100:0), 30 min, λ = 254 nm, R_t (α -Anomer) = 63.4 min, R_t (β -Anomer) = 79.0 min).

Ausbeute: 1.2 g (0.79 mmol, 60%); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ = 12.0 (c = 1.00, CHCl₃), R_f = 0.21 (EE), R_t = 31.8 min (Phenomenex Luna, MeCN/Wasser, Grad. (55:45) \rightarrow (75:25), 40 min, (100:0), 20 min, λ = 254 nm).

C₇₆H₉₃N₃O₃₀ (M = 1528.55 g/mol) [1527.58 g/mol].

ESI-MS (positiv), m/z: 1551.1 ([M+Na]⁺, ber.: 1550.6), 1567.0 ([M+K]⁺, ber.: 1566.7).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HMQC, HMBC), δ (ppm): 7.79-7.72 (m, 2H, H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.8$ Hz), 7.44-7.17 (m, 14H, H3-, H6-, H2-, H7-Fmoc, H_{ar}-Bn (10H)), 5.87 (d, 1H, NH-GalNAc, $J_{\text{NH,H2}} = 8.6$ Hz), 5.50-5.39 (m, 2H,

T_{NH} {5.45}, $H4'$ {5.42}), 5.38-5.24 (m, 2H, $H8''$ {5.32}, $H7''$ {5.28}), 5.23-5.06 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-COOBn}$ {5.18, 5.15}, $H2'$ {5.13}, NH-NeuNAc {5.09}), 4.95 (dd, 1H, $H3'$, $J_{H3',H2'} = 10.3$ Hz, $J_{H3',H4'} = 3.0$ Hz), 4.86-4.77 (m, 1H, $H4''$), 4.71 (d, 1H, $H1$, $J_{H1,H2} = 3.0$ Hz), 4.66-4.44 (m, 5H, $H1'$ {4.59, d, $J_{H1',H2'} = 8.1$ Hz}, $H2$ {4.49}, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ {4.51, 4.47}, $\text{CH}_{2a}\text{-Bn}$ {4.47}), 4.43-4.31 (m, 1H, $\text{CH}_{2b}\text{-Bn}$), 4.30-4.19 (m, 2H, $H9a''$ {4.27, dd, $J_{H9a'',H9b''} = 12.3$ Hz, $J_{H9a'',H8''} = 2.3$ Hz}, $H9\text{-Fmoc}$ {4.24}), 4.18-4.00 (m, 5H, T_α {4.14}, T_β {4.11}, $H9b''$ {4.05}, $H5''$ {4.04}, $H6''$ {4.03}), 3.94-3.73 (m, 4H, $H4$ {3.90}, $H6a$ {3.89}, $H5'$ {3.84}, $H5$ {3.79}), 3.66-3.57 (m, 1H, $H3$ {3.61}), 3.55-3.46 (m, 2H, $H6b$ {3.52}, $H6a'$ {3.48}), 3.45-3.38 (m, 1H, $H6b'$ {3.42}), 2.58 (dd, 1H, $H3_{\text{eq}}''$, $J_{H3_{\text{eq}}'',H3_{\text{ax}}''} = 12.6$ Hz, $J_{H3_{\text{eq}}'',H4''} = 4.3$ 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, $H3_{\text{ax}}''$), 1.84 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$), 1.42 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$), 1.26 (d, 3H, T_γ , $J_{T_\gamma,T_\beta} = 6.1$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , HSQC), δ (ppm): 170.2, 169.5, 169.4, 169.2, 166.7 (C=O), 166.4 ($\text{C1}''$), 155.6 (C=O-Urethan), 143.0 (C1a- , C8a-Fmoc), 140.5 (C4a- , C5a-Fmoc), 136.7 ($\text{C}_q\text{-Bn}$ ($\text{C6}'$)), 134.1 ($\text{C}_q\text{-Bn}$ ($\text{C1}''$)), 127.8, 127.4 ($\text{C}_{ar}\text{-Bn}$), 127.2 (C2- , C7-Fmoc), 127.1 ($\text{C}_{ar}\text{-Bn}$), 126.3 (C3- , C6-Fmoc), 124.1 (C1- , C8-Fmoc), 119.2 (C4- , C5-Fmoc), 100.8 ($\text{C1}'$), 99.5 (C1), 98.1 ($\text{C2}''$), 82.4 ($\text{C}_q\text{-}t\text{Bu}$), 76.7 (C3), 75.8 (T_β), 72.7 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$ ($\text{C6}'$)), 71.9 ($\text{C6}''$), 71.4 ($\text{C5}'$), 70.0 ($\text{C3}'$), 68.4 ($\text{C8}''$), 68.2 (C5), 68.1 ($\text{C4}''$), 68.0 ($\text{C2}'$), 67.5 (C4), 66.9 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$ ($\text{C1}''$)), 66.6 ($\text{C4}'$), 66.6 ($\text{C7}''$), 66.5 ($\text{C6}'$), 66.3 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 63.1 (C6), 61.6 ($\text{C9}''$), 58.1 (T_α), 48.6 ($\text{C5}''$), 46.9 (C2), 46.6 (C9-Fmoc), 36.8 ($\text{C3}''$), 27.4 ($\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$), 22.5, 22.3 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 20.2, 20.0, 19.9, 19.8 ($\text{CH}_3\text{-OAc}$), 17.9 (T_γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (37)**

(Fmoc-Thr(β 6-BnAc₃-Gal(1→3)-[α Ac₄NeuNAcCOOBn(2→6)]- α GalNAc)-OH)¹¹²

1.2 g (0.815 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃-6-Bn-Gal(1→3)-[α Ac₄NeuNAcCOOBn(2→6)]- α GalNAc)-*O**t*Bu **36** werden in 15 ml Trifluoressigsäure und 2 ml Anisol gelöst. Die Reaktionsmischung wird 2.5 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit 50 ml Toluol verdünnt und i. Vak. konzentriert. Der Rückstand wird dreimal mit jeweils 50 ml Toluol kodestilliert und zunächst durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE/EtOH, 4:1) und anschließend durch präparative RP-HPLC (Phenomenex LUNA, MeCN/Wasser, Grad. (60:40)→(70:30), 70 min, $\lambda = 254$ nm, $R_t = 46.5$ min) gereinigt.

Ausbeute: 1.04 g (0.709 mmol, 87%), farbloser Feststoff, $[\alpha]_D^{22} = 25.3$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.51$ (EE:EtOH, 2:1), $R_t = 17.1$ min (Phenomenex LUNA, MeCN/Wasser + 0.1% TFA, Grad. (55:45) → (75:25), 30 min, $\lambda = 254$ nm).

$\text{C}_{72}\text{H}_{85}\text{N}_3\text{O}_{30}$ ($M = 1472.45$ g/mol) [1471.52].

ESI-MS (positiv), m/z : 1495.13 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1494.52), 1517.11 ($[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$, ber.: 1516.52).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY, HMQC), δ (ppm): 7.78-7.70 (m, 2H, H4-, H5-Fmoc), 7.63-7.52 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.42-7.13 (m, 14H, H3-, H6-, H2-, H7-Fmoc, Har-Bn (10H)), 6.22 (d, 1H, NH-GalNAc, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 8.2$ Hz), 5.73 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 7.4$ Hz), 5.44-5.23 (m, 3H, H4' {5.40}, H8'' {5.33}, H7'' {5.26}), 5.23-5.05 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-COOBn}$ {5.17, 5.10}, H2' {5.11}), 5.01-4.72 (m, 3H, H3' {4.94}, H1 {4.81}, H4'' {4.80}), 4.71 (d, 1H, H1, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.0$ Hz), 4.62-4.52 (m, 1H, H1'), 4.51-4.42 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ {4.46}, $\text{CH}_{2a}\text{-Bn}$ {4.47}), 4.39-4.25 (m, 5H, $\text{CH}_{2b}\text{-Bn}$ {4.36}, H2 {4.35}, H9a'' {4.30}, T α {4.31}, T β {4.28}), 4.24-4.17 (m, 1H, H9-Fmoc), 4.10-3.72 (m, 7H, H9b'' {4.04}, H6'' {4.04}, H5'' {4.02}, H4 {3.89}, H6a {3.88}, H5' {3.82}, H5 {3.79}), 3.71-3.60 (m, 1H, H3), 3.56-3.46 (m, 2H, H6b {3.50}, H6a' {3.48}), 3.45-3.32 (m, 1H, H6b'), 2.57 (dd, 1H, H3 $_{\text{eq}}''$, $J_{\text{H}_{3\text{eq}}'',\text{H}_{3\text{ax}}''} = 8.8$ Hz, $J_{\text{H}_{3\text{eq}}'',\text{H}_4''} = 3.9$ Hz), 2.15, 2.05, 2.04, 2.02, 1.98, 1.96, 1.94, 1.93 (8x s, 24H, 8x $\text{CH}_3\text{-Ac}$), 1.88 (m, 1H, H3 $_{\text{ax}}''$), 1.85 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$), 1.21 (d, 3H, T γ , $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.3$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , BB, HMQC), δ (ppm): 172.70 (COOH), 170.80, 170.27, 170.15, 169.87, 169.64 (C=O), 167.30 (C1''), 155.82 (C=O-Urethan), 143.78 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.25 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.25 (C $_q$ -Bn an C6'), 134.83 (C $_q$ -Bn an C1''), 128.73, 128.67, 128.50, 128.43, 128.32, 127.78, 127.67 (C $_{ar}$ -Bn), 127.12 (C2-, C7-Fmoc), 125.03 (C3-, C6-Fmoc), 124.92 (C1-, C8-Fmoc), 119.99 (C4-, C5-Fmoc), 102.11 (C1'), 101.30 (C1), 98.68 (C2''), 78.74 (T β), 77.14 (C3), 73.48 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$ (C6')), 73.30 (C6''), 72.81 (C5'), 70.82 (C3'), 69.25 (C8''), 68.92 (C5), 68.49 (C4''), 68.17 (C2'), 67.79 (C4), 67.73 (C7''), 67.45 (C6'), 67.02 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 67.35 (C4'), 66.70 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$ (C1'')), 63.99 (C6), 62.42 (C9''), 58.66 (T α), 49.25 (C5''), 48.40 (C2), 47.20 (C9-Fmoc), 37.46 (C3''), 23.01, 22.77 (3x $\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 21.02, 20.70, 20.58, 20.53, 20.47 (7x $\text{CH}_3\text{-OAc}$), 18.31 (T γ).

S-(Benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)-2-mercaptopyridin (38)**(α Ac₄NeuNAcCOOBnSPy)**

Einer Lösung von 29.8 g (50.9 mmol) β Ac₄NeuNAcCOOBnCl **16** und 17.32 g (51 mmol) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat in 300 ml Ethylacetat werden 25.6 g (220 mmol) 2-Mercaptopyridin gelöst in 300 ml 1N Natriumcarbonat-Lösung zugesetzt. Es wird 5 h bei Raumtemp. gerührt, mit 300 ml Ethylacetat verdünnt und dreimal mit je 200 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, zweimal mit je 200 ml Wasser und einmal mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Die Reinigung des Rückstands erfolgt mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat/Cyclohexan, 7:1).¹⁸³

Ausbeute: 31.0 g (47.0 mmol, 92%), gelblicher, amorpher Feststoff, $R_f = 0.42$ (Ethylacetat), $[\alpha]_D^{24} = 5.66$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₃₁H₃₆N₂O₁₂S (M = 660.69 g/mol) [660.20].

ESI-MS (positiv), m/z : 683.16 ($[M+Na]^+$, ber.:683.20).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.39 (m, 1H, H6-Py), 7.63 (ddd, 1H, H4-Py, $J_{H4-Py,H3-Py} = 7.7$ Hz, $J_{H4-Py,H5-Py} = 1.83$ Hz), 7.46 (d, 1H, H3-Py, $J_{H3-Py,H4-Py} = 7.7$ Hz), 7.36-7.22 (m, 5H, H_{ar}-Bn), 7.15 (m, 1H, H5-Py), 5.32-5.06 (m, 5H, H7, H8, OCH₂-Bn, NH), 4.85 (m, 1H, H4), 4.30-3.95 (m, 4H, H6, H5, H9_{eq,ex}), 2.98-2.83 (m, 2H, H3_{eq,ex}), 2.25-1.78 (m, 15H, 5xCH₃-Ac).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.48, 172.21, 171.54, 171.09, 171.00 (C=O), 168.95 (C1), 148.41 (C_{quart.} Py), 141.59 (C-Py), 137.24, 136.48 (C-Py, C_{quart.}-Bn), 130.71, 129.54, 129.29, 124.02 (C-Bn, C-Py), 86.37 (C2), 75.23, 70.99, 70.18, 69.08, 68.54 (C4, C6, C7, C8, OCH₂-Bn), 63.02 (C9), 49.14 (C5), 39.48 (C3), 22.56 (NHAc), 21.06, 20.85, 20.61 (CO-Ac).

S-(Benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)-2-pyridylsulfon (39)**(α Ac₄NeuNAcCOOBnSO₂Py)**

Eine Lösung von 3.9 g (5.9 mmol) α Ac₄NeuNAcCOOBnSPy **38** in 100 ml Dichlormethan wird auf 0 °C abgekühlt und mit 3.5 g (41.3 mmol) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Dann werden 7.35 g (ca. 20 mmol) 70-75%ige *m*-CPBA zugesetzt. Es wird 2.5 h bei 0 °C gerührt, mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und dreimal mit je 300 ml einer 50%igen

Natriumdithiosulfat-Lösung, einmal mit 300 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 150 ml ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Die Reinigung des Rückstands erfolgt mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat).¹⁸³

Ausbeute: 1.3 g (1.9 mmol, 32%), amorpher Feststoff, $R_f = 0.31$ (Ethylacetat), $[\alpha]_D^{24} = -3.32$ ($c = 0.98$, MeOH).

$C_{31}H_{36}N_2O_{14}S$ ($M = 692.69$ g/mol) [692.19].

FD-MS (positiv), m/z : 693.2 ($[M+H]^+$, ber.: 693.20).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.65 (m, 1H, H6-Py), 7.92-8.18 (m, 2H, H4-Py, H3-Py), 7.58 (m, 1H, H5-Py), 7.48-7.29 (m, 5H, H_{ar} -Bn), 5.50-5.09 (m, 5H, H7, H8, OCH_2 -Bn, **NH**), 4.76 (m, 1H, H4), 4.38-3.99 (m, 4H, H6, H5, $H_{9eq,ex}$), 3.06 (dd, 2H, H_{3eq} , $J_{H_{3eq},H_{3ax}} = 12.9$ Hz, $J_{H_{3eq},H_4} = 4.4$ Hz), 2.19-1.78 (m, 15H, $5 \times CH_3$ -Ac).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 173.50, 172.41, 171.68, 171.63, 171.45 (**C=O**), 168.78 (C1), 154.14 ($C_{quart.}$ Py), 150.65 (C-Py), 139.24 (C-Py), 136.48 ($C_{quart.}$ -Bn), 130.75, 129.65, 129.48, 124.56 (C-Bn, C-Py), 87.33 (C2), 75.47, 70.94, 70.29, 69.17, 68.62 (C4, C6, C7, C8, OCH_2 -Bn), 62.96 (C9), 49.29 (C5), 39.58 (C3), 22.67 (NHAc), 21.08, 20.79, 20.70 (**CO**-Ac).

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden-6-iod- α -D-galactopyranose (40)

(α -6-Iod-diisopropyl-Gal)¹⁸⁵

Eine Lösung von 8.0 g (max. 30.8 mmol) roher 1,2,3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**26**) in 200 ml Benzol wird mit 5.2 g (76.3 mmol) Imidazol versetzt und 5 min gerührt. Anschließend werden 15.5 g (60.1 mmol) Iod und 20 g (76.7 mmol) Triphenylphosphin zugesetzt und 2 h unter Rückfluss erhitzt. Zum Abbruch der Reaktion wird auf 100 ml ges. Natriumsulfat-Lösung gegossen und dreimal mit 100 ml Ether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden mit 100 ml ges. NaCl gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. destilliert und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 10.8 g (29.3 mmol, 95%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{24} = -42.0$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$), $R_f = 0.44$ (CH/EE, 3:1).

$C_{12}H_{19}IO_5$ ($M = 370.18$ g/mol) [370.03].

FD-MS (positiv), m/z : 370.1 ($[M]^+$, ber.: 370.0).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.52 (d, 1H, H1', $J_{\text{H1}',\text{H2}'} = 4.8$ Hz), 4.59 (dd, 1H, H3', $J_{\text{H3}',\text{H4}'} = 7.0$ Hz, $J_{\text{H3}',\text{H2}'} = 2.6$ Hz), 4.38 (dd, 1H, H4', $J_{\text{H4}',\text{H3}'} = 8.0$ Hz, $J_{\text{H4}',\text{H5}'} = 1.8$ Hz), 4.27 (dd, 1H, H2', $J_{\text{H2}',\text{H1}'} = 5.2$ Hz, $J_{\text{H2}',\text{H3}'} = 2.6$ Hz), 3.90 (td, 1H, H5', $J_{\text{H5}',\text{H4}'} = 1.5$ Hz, $J_{\text{H5}',\text{H6}'} = 7.0$ Hz), 3.24 (dq, 2H, H6a', H6b'), 1.61-1.18 (m, 12H, 4x CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , DEPT), δ (ppm): 96.69 (C1), 71.56, 71.10, 70.54, 68.94, (C2, C3, C4, C5), 26.90 (C6), 26.02, 25.94, 24.88, 24.43 (CH_3).

6-Cyano-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (41)

(α -6-CN-diisopropyl-Gal)¹⁸⁴

Eine Lösung von 11.5 g (31.0 mmol) 1,2,3,4-Di-*O*-isopropyliden-6-iod- α -D-galactopyranose (40) in 400 ml DMSO wird mit 3.0 g (61.6 mmol) Natriumcyanid versetzt und 3 h bei 80 °C erhitzt. Nach Kühlen auf Raumtemp. werden 200 ml Wasser zugesetzt. Es wird fünfmal mit je 100 ml Ether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden zweimal mit 100 ml Wasser und einmal mit 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 6.83 g (25.4 mmol, 82%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -61.0$ (c = 1.00, CHCl_3), $R_f = 0.19$ (CH/EE, 5:1).

$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ (M = 269.29 g/mol) [269.13].

Gef.: C: 58,11; H: 7,07; N: 5,07.

Ber.: C: 57,98; H: 7,11; N: 5,20.

FD-MS (positiv), m/z: 270 .3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 270.1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.48 (d, 1H, H1', $J_{\text{H1}',\text{H2}'} = 4.8$ Hz), 4.63 (dd, 1H, H3', $J_{\text{H3}',\text{H4}'} = 2.6$ Hz, $J_{\text{H3}',\text{H2}'} = 7.7$ Hz), 4.31 (dd, 1H, H2', $J_{\text{H2}',\text{H1}'} = 5.1$ Hz, $J_{\text{H2}',\text{H3}'} = 2.6$ Hz), 4.22 (dd, 1H, H4', $J_{\text{H4}',\text{H3}'} = 7.7$ Hz, $J_{\text{H4}',\text{H5}'} = 1.9$ Hz), 4.03 (td, 1H, H5', $J_{\text{H5}',\text{H4}'} = 1.8$ Hz, $J_{\text{H5}',\text{H6}'} = 7.3$ Hz), 2.74-2.58 (m, 2H, H6a', H6b'), 1.62-1.18 (m, 12H, 4x CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , DEPT), δ (ppm): 96.37 (C1), 71.10, 70.71, 70.15, 64.30 (C2, C3, C4, C5), 26.90, 26.03, 25.87, 24.79 (CH_3), 19.31 (C6).

6-Deoxy-1,2:3,4-di-O-isopropyliden- α -D-galacto-heptodialdo-1,5-pyranose (42)**(α -6-CO-diisopropyl-Gal)¹⁸⁴**

Zu einer Lösung von 1.4 g (5.2 mmol) 6-Cyano-1,2,3,4-di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**41**) in 50 ml absol. Dichlormethan werden unter Argon 5.76 ml (5.76 mmol) einer 1N DIBAL-H-Lösung in Hexan bei -78 °C zugetropft. Über einen Zeitraum von 4 h wird die Lösung auf -20 °C erwärmt und mit 5 ml (5.00 mmol) 1N DIBAL-H-Lösung in Hexan versetzt. Nach 16 h Rühren bei -20 °C wird mit 50 ml 1N Essigsäure versetzt und dreimal mit 50 ml Ether/Hexan 1:1 extrahiert. Anschließend werden die vereinigten org. Phasen mit je 50 ml Wasser, ges. Natriumhydrogencarbonat und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. destilliert. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.03 g (3.8 mmol, 73%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -48.0$ (c = 1.00, CHCl₃), $R_f = 0.21$ (CH/EE, 3:1).

C₁₃H₁₉NO₅ (M = 272.29 g/mol) [272.13].

Gef.: C: 57,41; H: 7,37.

Ber.: C: 57,34; H: 7,40.

FD-MS (positiv), m/z: 272 .2 ([M]⁺, ber.: 272.1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.77 (m, 1H, H7'), 5.48 (d, 1H, H1', $J_{H1',H2'} = 4.8$ Hz), 4.61 (dd, 1H, H3', $J_{H3',H4'} = 2.6$ Hz, $J_{H3',H2'} = 8.1$ Hz), 4.34-4.23 (m, 2H, H2', H5'), 4.19 (dd, 1H, H4', $J_{H4',H3'} = 7.7$ Hz, $J_{H4',H5'} = 1.8$ Hz), 2.81-2.61 (m, 2H, H6a', H6b'), 1.54 (s, 3H, CH₃), 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.31 (s, 3H, CH₃), 1.23 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, DEPT), δ (ppm): 200.42 (C7), 96.34 (C1), 72.31, 70.75, 70.25, 63.31 (C2, C3, C4, C5), 44.29 (C6), 26.00, 25.93, 24.91, 24.40 (CH₃).

7-Hydroxy-6-deoxy-1,2:3,4-di-O-isopropyliden-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galacto-hepto-1,5-pyranose (43)**(α Ac₄NeuNAcCOOBn- α -6-C(OH)-diisopropyl-Gal)**

1.21 g (1.75 mmol) α Ac₄NeuNAcCOOBnSO₂Py **39** und 1.0 g (3.68 mmol) α -6-CO-diisopropyl-Gal **42** werden in 15 ml absol. THF gelöst und unter Argon so lange mit einer 0.1N Samarium(II)iodid-Lösung in THF (ca. 64.6 ml, 6.46 mmol, 3.5 Äquiv.) versetzt, bis sich die Lösung tief blau färbt und die Färbung mindestens 1 min. bestehen bleibt. Nach 10 min. Rühren bei Raumtemp. wird mit 50 ml ges. Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und

dreimal mit 50 ml Dichlormethan extrahiert. Anschließend werden die vereinigten org. Phasen zweimal mit 50 ml Wasser und einmal mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. destilliert. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE) gereinigt.¹⁸⁷

Ausbeute: 880 mg (1.07 mmol, 61%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -23.0$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_f = 0.24$ (EE).

$\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{NO}_{18}$ ($M = 823.83$ g/mol) [823.33].

Gef.: C: 56,80; H: 6,58; N: 1,74.

Ber.: C: 56,86; H: 6,48; N: 1,70.

HR-ESI-MS-TOF (positiv), m/z : 846.33 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 846.33), 1669.65 ($[2\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1669.65).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY, HSQC), δ (ppm): 7.38-7.25 (m, 5H, $\text{H}_{\text{ar-Bn}}$), 5.48-5.02 (m, 6H, $\text{H1}'$ {5.41}, $\text{H7}''$ {5.23}, $\text{H8}''$ {5.31}, $\text{OCH}_2\text{-Bn}$ {5.30}, **NH**), 4.75 (m, 1H, $\text{H4}''$), 4.61 (m, 1H, $\text{H3}'$), 4.39-3.96 (m, 10H, $\text{H2}'$ {4.35}, $\text{H5}'$ {4.31}, $\text{H6}''$ {4.04}, $\text{H5}''$ {4.02}, $\text{H9}''_{\text{eq,ax}}$ {4.30, 4.04}, $\text{H6}_{\text{a,b}'}$ {4.21}, $\text{H7}'$ {4.11}), 3.93 (dd, 1H, $\text{H4}'$, $J_{\text{H4}',\text{H3}'} = 10.7$ Hz, $J_{\text{H4}',\text{H5}'} = 2.7$ Hz) 3.24 (bs, 1H, OH(S-Diastereomer)), 2.45 (2xddd, 1H, $\text{H3}_{\text{eq}}''$ (S/R-Diastereomer), $J(\text{S})_{\text{H3}_{\text{eq}}'',\text{H3}_{\text{ax}}''} = 12.7$ Hz, $J_{\text{H3}_{\text{eq}}'',\text{H4}''} = 4.6$ Hz, $J(\text{R})_{\text{H3}_{\text{eq}}'',\text{H3}_{\text{ax}}''} = 12.7$ Hz, $J_{\text{H3}_{\text{eq}}'',\text{H4}''} = 4.6$ Hz), 2.22-1.68 (m, 15H, $\text{H3}_{\text{ax}}''$ {1.88}, 5x $\text{CH}_3\text{-Ac}$ {2.04, 2.02, 2.00, 1.86, 1.85}), 1.51 (s, 3H, CH_3), 1.46 (s, 3H, CH_3), 1.29 (s, 3H, CH_3), 1.23 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , DEPT, HSQC), δ (ppm): 171.31, 171.09, 170.73, 170.39, 170.13 ($\text{C}=\text{O}$), 169.29 ($\text{C1}''$), 135.32 ($\text{C}_{\text{quart.-Bn}}$), 128.31, 128.25, 127.72, 127.09, 126.28 (C-Bn), 96.41 ($\text{C1}'$), 83.69, 83.57 ($\text{C2}''$, $\text{C7}''$), 74.27 ($\text{OCH}_2\text{-Bn}$), 73.70 ($\text{C6}''$), 71.74 ($\text{C5}''$), 70.73 ($\text{C3}'$), 70.16 ($\text{C8}''$), 68.81 ($\text{C4}''$), 67.69 ($\text{C2}'$), 67.41 ($\text{C4}'$), 65.70 ($\text{C7}''$), 62.88 ($\text{C9}''$), 62.76 ($\text{C6}'$), 49.41 ($\text{C5}''$), 33.53 ($\text{C3}''$), 26.07, 24.99, 24.62, 23.20, 21.42, 20.88 (CH_3); (Das Diastereomerengemisch verursacht teilweise Signalverdopplung).

7,6-Dideoxy-1,2:3,4-di-O-isopropyliden-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galacto-hepto-1,5-pyranose (45)

($\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn-}\alpha\text{-6-CH}_2\text{-diisopropyl-Gal}$)

60 mg (72.8 μmol) $\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn-}\alpha\text{-6-C(OH)-diisopropyl-Gal}$ **43** und 200 mg (1.11 mmol) Thiocarbonyldiimidazol werden in 3 ml absol. Acetonitril gelöst und 30 min bei

90 °C in der Mikrowelle erhitzt, bis die Umsetzung vollständig ist (bis zu 3 Wiederholungen, $R_f = 0.19$ (EE)). Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. destilliert.

$C_{43}H_{56}N_3O_{18}S$ ($M = 934.98$ g/mol) [934.33].

ESI-MS (positiv), m/z : 934.36 ($[M]^+$, ber.: 934.33), 1868.78 ($[2M]^+$, ber.: 1868.66).

Der Rückstand wird in 1 ml absol. Toluol aufgenommen und mit 20 mg (80.6 μ mol) TTMS (Tris(trimethylsilyl)silan) und 3 mg AIBN versetzt. Dann wird für 45 min bei 90 °C in der Mikrowelle erhitzt und das Lösungsmittel i. Vak. destilliert. Der Rückstand wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex LUNA, MeCN/Wasser, Grad. (30:70) \rightarrow (100:0), 70 min, $\lambda = 254$ nm, $R_t = 40.5$ min.) gereinigt.

Ausbeute: 40.5 mg (50.2 μ mol, 69%), farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{23} = -17.9$ ($c = 0.30$, $CHCl_3$), $R_f = 0.23$ (EE), $R_t = 19.2$ min (Phenomenex LUNA, MeCN/Wasser, Grad. (50:50) \rightarrow (80:20), 40 min, $\lambda = 254$ nm).

$C_{39}H_{53}NO_{17}$ ($M = 807.83$ g/mol) [807.33].

ESI-MS (positiv), m/z : 830.28 ($[M+Na]^+$, ber.: 830.33), 1637.62 ($[2M+Na]^+$, ber.: 1637.65).

HR-ESI-MS-TOF (positiv), m/z : 808.34 ($[M+H]^+$, ber.: 808.33).

$[M+H]^+$, Ber.: $C_{39}H_{54}NO_{17}$; Gef.: $C_{39}H_{54}NO_{17}$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.39-7.35 (m, 5H, H_{ar-Bn}), 6.07 (d, 1H, **NH**, $J_{NH^{\prime},H5^{\prime\prime}} = 10.0$ Hz), 5.50 (d, 1H, $H1^{\prime}$ $J_{H1^{\prime},H2^{\prime}} = 5.1$ Hz), 5.38-5.21 (m, 4H, $H8^{\prime\prime}$ {5.31}, OCH_2-Bn {5.30}, $H7^{\prime}_a$ {d, 5.25, $J_{H7^{\prime}_a,H7^{\prime}_b} = 12.2$ Hz,}) 5.18-5.00 (m, 4H, $H7^{\prime}_b$ {d, 5.13, $J_{H7^{\prime}_b,H7^{\prime}_a} = 12.2$ Hz,}) $H7^{\prime\prime}$ {5.06}), 4.81 (m, 1H, $H4^{\prime\prime}$), 4.57 (m, 1H, $H3^{\prime}$), 4.41 (m, 1H, $H6^{\prime}_a$), 4.33-4.22 (m, 2H, $H2^{\prime}$ {4.28}, $H5^{\prime}$ {4.26}), 4.13 (m, 1H, $H6^{\prime}_b$), 4.09-3.94 (m, 4H, $H6^{\prime\prime}$ {4.06}, $H5^{\prime\prime}$ {4.00}, $H9^{\prime\prime}$ {4.01}), 3.91 (dd, 1H, $H4^{\prime}$, $J_{H4^{\prime},H3^{\prime}} = 10.7$ Hz, $J_{H4^{\prime},H5^{\prime}} = 1.9$ Hz), 2.53 (dd, 1H, $H3^{\prime}_{eq}$, $J_{H3^{\prime}_{eq},H3^{\prime}_{ax}} = 13.0$ Hz, $J_{H3^{\prime}_{eq},H4^{\prime\prime}} = 4.7$ Hz), 2.16-1.83 (m, 15H, $H3^{\prime}_{eq}$ {1.86}, 5x**CH₃-Ac** {2.12, 2.11, 2.03, 2.02, 1.86}), 1.51 (s, 3H, **CH₃**), 1.45 (s, 3H, **CH₃**), 1.34 (s, 3H, **CH₃**), 1.33 (s, 3H, **CH₃**).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, DEPT, HSQC), δ (ppm): 171.63, 170.94, 170.61, 170.23 (**C=O**), 170.15 ($C1^{\prime\prime}$), 135.10 ($C_{quart.-Bn}$), 128.82, 128.69, 128.48, 128.36 (**C-Bn**), 96.57 ($C1^{\prime}$), 80.16 ($C2^{\prime\prime}$), 73.62 (OCH_2-Bn), 72.62 ($C6^{\prime\prime}$), 70.89 ($C5^{\prime}$), 70.45 ($C3^{\prime}$), 70.26 ($C8^{\prime\prime}$), 68.09 ($C4^{\prime\prime}$), 67.51 ($C2^{\prime}$), 67.35 ($C4^{\prime}$), 67.18 ($C7^{\prime}$), 65.65 ($C7^{\prime\prime}$), 62.32 ($C9^{\prime\prime}$), 62.05 ($C6^{\prime}$), 49.61 ($C5^{\prime\prime}$), 36.68 ($C3^{\prime\prime}$), 26.11, 26.03, 24.93, 24.45, 23.86, 23.24, 21.12, 20.91, 20.81 (**CH₃**).

5.3 Synthesen zu Kapitel 3.3

12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (48)

(HO-{OEG}-COO*t*Bu)¹¹²

Zu einer Lösung von 32 ml (239 mmol) wasserfreiem Triethylenglycol (46) in 150 ml absol. THF werden unter Argon 65 mg (2.8 mmol) Natrium gegeben. Nachdem das Natrium vollständig gelöst ist, werden 12 ml (83.3 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester (47) zugesetzt, und es wird 15 h bei Raumtemp. gerührt. Durch Zugabe von 2 ml 1N HCl wird die Reaktionsmischung neutralisiert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird mit 100 ml einer ges. NaCl-Lösung versetzt und dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 30 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das Produkt in einer für die weitere Umsetzung ausreichend reinen Form erhalten.

Ausbeute: 18.6 g (67 mmol, 80%), farbloses Öl, Lit.: 86 %, $R_f = 0.28$ (EE)

$C_{13}H_{26}O_6$ (278.34 g/mol) [278.17].

ESI-MS (positiv), m/z : 279.19 ($[M+H]^+$, ber.:279.17).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 3.85-3.42 (m, 14H, 7x OCH_2), 2.86-2.38 (sb, 1H, OH, t, 2H, 2- CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 6.5$ Hz), 1.41 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 170.92 ($C=O$ -O*t*Bu), 80.65 ($C(CH_3)_3$), 76.58 (8- CH_2), 72.48 (5- CH_2), 70.32 (6- CH_2), 66.81 (3- CH_2), 61.74 (9- CH_2), 36.14 (2- CH_2), 28.04 ($C(CH_3)_3$).

12-Methansulfonyloxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (49)

(MsO-{OEG}-COO*t*Bu)¹¹⁴

Eine Lösung von 2.3 g (8.3 mmol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (48) und 2.0 ml (14.2 mmol) Triethylamin in 20 ml absol. Dichlormethan wird auf 0 °C abgekühlt. Man tropft langsam 1.0 ml (13.0 mmol) Methansulfonsäurechlorid zu und rührt die Reaktionsmischung unter langsamem Aufwärmen auf Raumtemp. in 5.5 Stunden. Ausgefallenes Aminhydrochlorid wird abfiltriert und die Lösung nacheinander mit je 15 ml Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wird ohne Reinigung direkt weiter umgesetzt.

Ausbeute: 3.0 g (quant); gelbliches Öl.

$C_{14}H_{28}O_8S$ ($M = 356.43$ g/mol) [356.15].

12-Azido-4,7,9-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (50)

$(N_3\text{-}\{\text{OEG}\}\text{-COO}t\text{Bu})^{114}$

12 g (33.8 mmol) 12-Methansulfonyloxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**49**) wird in 50 ml DMF aufgenommen und mit 13.5 g (207 mmol) Natriumazid versetzt. Es wird 15 h bei 60 °C gerührt. Das DMF wird destillativ i. Vak. entfernt und der Rückstand in 50 ml Wasser gelöst. Die wässrige Phase wird viermal mit jeweils 50 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat, 3:1).

Ausbeute: 8 g (26.4 mmol, 78%), farbloses Öl, $R_f = 0.33$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 2:1).

$C_{13}H_{25}N_3O_5$ (303.36 g/mol) [303.18].

ESI-MS (positiv), m/z : 326.21 ($[M+Na]^+$, ber.: 326.09).

$^1H\text{-NMR}$ (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 3.76-3.47 (m, 12H, 6x OCH_2), 3.36 (t, 2H, N_3CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 5.0$ Hz), 2.49 (t, 2H, 2- CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 6.6$ Hz), 1.42 (s, 9H, $CH_3\text{-}t\text{Bu}$).

$^{13}C\text{-NMR}$ (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 170.86 ($C=O\text{-O}t\text{Bu}$), 80.49 ($C(CH_3)_3$), 76.58, 75.49 (CH_2), 70.57, 70.00 (5- CH_2 , 6- CH_2), 66.94 (3- CH_2), 50,66 (N_3CH_2), 36.23 (2- CH_2), 28.06 ($C(CH_3)_3$).

12-Amino-4,7,9-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (51)

$(NH_2\text{-}\{\text{OEG}\}\text{-COO}t\text{Bu})^{112}$

Eine Suspension von 5.1 g einer Ni-Al-Legierung in 150 ml Wasser wird solange mit festem NaOH versetzt bis bei weiterer Zugabe keine Gasentwicklung mehr auftritt. Nach 10 min Stehen bei Raumtemp. wird die Mischung 30 min auf 70 °C erwärmt. Anschließend wird die überstehende Lösung vom gebildeten Raney-Nickel abdekantiert und mit Wasser neutral gewaschen. Im Anschluss wird mehrmals mit Isopropanol gespült. Zum Katalysator werden 8 g (26.4 mmol) 12-Azido-4,7,9-trioxa-nonansäure-*tert*-butylester (**50**), gelöst in 50 ml Isopropanol, gegeben. Durch wiederholtes Anlegen eines Vakuums und Belüften mit Argon wird die Reaktionsmischung von Sauerstoff befreit und anschließend mit Wasserstoff überschichtet. Die Lösung wird 18 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Das Raney-Nickel

wird über *Hyflo Super Cel* abfiltriert und das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand ist für die weitere Umsetzung rein genug.

Ausbeute: 7.3 g (26.4 mmol, quant), farbloses Öl, $R_f = 0.13$ (Ether/Methanol, 1:1).

$C_{13}H_{27}NO_5$ (277.36 g/mol) [277.19].

ESI-MS (positiv), m/z : 278.21 ($[M+H]^+$, ber.: 278.19).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 3.75-3.40 (m, 12H, 6x OCH_2), 2.83 (t, 2H, 12- CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 4.9$ Hz), 2.48 (t, 2H, 2- CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 6.6$ Hz), 1.94 (s, 3H, NH_3^+), 1.41 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 170.89 ($C=O$ -*Ot*Bu), 80.53 ($C(CH_3)_3$), 73.15 (CH_2), 70.31, 70.19 (5- CH_2 , 6- CH_2), 66.86 (3- CH_2), 41.64 (NH_2CH_2), 36.20 (2- CH_2), 28.06 ($C(CH_3)_3$).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,9-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (52)**

(FmocNH-{OEG}-COO*t*Bu)¹¹²

Zu einer Lösung von 7.3 g (26.4 mmol) 12-Amino-4,7,9-trioxa-nonansäure-*tert*-butylester (**51**) in 100 ml einer Mischung aus Aceton und Wasser (1:1) werden 2.37 g (28.1 mmol) Natriumhydrogencarbonat gegeben. Unter Rühren wird die Reaktionsmischung mit 10.1 g (30 mmol) *Fmoc*-OSu versetzt und 18 h gerührt. Anschließend wird die Lösung mit halbkonz. HCl auf pH = 5 angesäuert, wobei sich das Produkt als Öl abscheidet. Aceton wird i. Vak. abdestilliert und das Produkt viermal mit jeweils 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit 150 ml 1N HCl und 150 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und destillativ i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das zurückbleibende Öl wird durch Flashchromatographie an Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat, 2:1).

Ausbeute: 12.3 g (24.6 mmol, 93 %), farbloses Öl, $R_f = 0.20$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 2:1).

$C_{28}H_{37}NO_7$ (499.60 g mol⁻¹) [499.26].

ESI-MS (positiv), m/z : 500.39 ($[M+H]^+$, ber.:500.26), 522.40 ($[M+Na]^+$, ber.:522.26).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz), 7.58 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.0$ Hz), 7.46-7.15 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.39 (s_b, 1H, *NH*-Urethan), 4.38 (d, 2H, CH_2 -Fmoc, $J_{CH_2,CH} = 7.0$ Hz), 4.20 (t, 1H, H9-Fmoc, $J_{H_9,CH_2} = 7.0$ Hz), 3.79-3.50 (m, 12H, 6x OCH_2), 3.40 (t, 2H, 12- CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 5.2$ Hz), 2.51 (t, 2H, 2- CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 6.3$ Hz), 1.42 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.90 (C=O-OtBu), 156.51 (C=O-Urethan), 143.99 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.28 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.62 (C3-, C6-Fmoc), 127.01 (C2-, C7-Fmoc), 125.09 (C1-, C8-Fmoc), 119.92 (C4-, C5-Fmoc), 80.59 (C(CH₃)₃), 76.58 (11-CH₂), 70.51, 70.30, 70.15, 70.00 (9-CH₂, 8-CH₂, 5-CH₂, 6-CH₂), 66.88 (3-CH₂), 66.85 (CH₂-Fmoc), 47.24 (C9-Fmoc), 40.92 (FmocHNCH₂), 36.19 (2-CH₂), 28.07 (C(CH₃)₃).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,9-trioxa-dodecansäure (53)
(FmocNH-{OEG}-COOH)¹¹²**

12.3 g (24.6 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,9-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**52**) werden in einer Mischung aus 100 ml Trifluoressigsäure und 10 ml Wasser 2.5 h gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit 50 ml Toluol verdünnt, i. Vak. eingengt und der erhaltene Rückstand dreimal mit je 50 ml Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol/Essigsäure, 40:1:0.5). Zum Entfernen der Essigsäure aus dem Elutionmittel wird das Produkt viermal mit jeweils 50 ml Toluol und dreimal mit jeweils 50 ml Dichlormethan kodestilliert.

Ausbeute: 10.66 g (24.6 mmol, quant.), farbloser amorpher Feststoff, $R_f = 0.23$ (Dichlormethan/Methanol/Essigsäure, 40:1:0.5).

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_7$ (443.49 g/mol) [443.19].

ESI-MS (positiv), m/z : 466.32 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.:466.19).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.50 (s_b, 1H, COOH), 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.4$ Hz), 7.58 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.0$ Hz), 7.46-7.15 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.41 (s_b, 1H, NH-Urethan), 4.38 (d, 2H, CH₂-Fmoc, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 7.0$ Hz), 4.21 (t, 1H, H9-Fmoc, $J_{\text{H9,CH}_2} = 7.0$ Hz), 3.84-3.47 (m, 12H, 6x OCH₂), 3.47-3.20 (t, 2H, 12-CH₂, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 5.7$ Hz), 2.59 (t, 2H, 2-CH₂, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.3$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , DEPT), δ (ppm): 127.67 (C3-, C6-Fmoc), 127.05 (C2-, C7-Fmoc), 125.11 (C1-, C8-Fmoc), 119.95 (C4-, C5-Fmoc), 77.17 (11-CH₂), 70.54, 70.38, 70.35, 70.09 (9-CH₂, 8-CH₂, 5-CH₂, 6-CH₂), 66.71 (3-CH₂), 66.34 (CH₂-Fmoc), 47.21 (C9-Fmoc), 40.88 (FmocHNCH₂), 34.72 (2-CH₂).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (55)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -Ac₃GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-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 (**54**) (Rapp Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) erfolgt die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der Aminosäure *Fmoc*-Ser(*O*tBu)-OH wird die glycosylierten Aminosäure **11a** manuell verknüpft. 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 135.0 mg (0.2 mmol, 2 eq.) des Tn-Threonin-Konjugats **11a**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55 μ l (0.5 mmol, 5 eq.) *N*-Methylmorpholin (NMM) in 2 ml *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und es wird 3 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. Es werden 443.5 mg (1 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl amido-4,7,10-trioxadecansäure **53**, 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 und im Stickstoffstrom getrocknet. Noch verbliebene Lösungsmittelreste werden i. Hochvak. entfernt. In einem *Merrifield*-Glasreaktor wird das Harz 1.5 h mit einer Mischung aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Triisopropylsilan und 1 ml H₂O geschüttelt. Es wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 2 ml Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 ml Toluol versetzt und i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 15 ml Toluol kodestilliert und die Lösung schließlich i. Vak. auf ca. 0.5 ml eingeeengt. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von 20 ml eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Rohpeptid wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (5:95)→(70:30), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 23.6 min) gereinigt.

Ausbeute: 44.0 mg (0.0182 mmol, 18 %, farbloses Lyophilisat, $R_t = 14.0$ min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(70:30), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

C₁₀₃H₁₆₃N₂₇O₄₀ (M = 2419.55 g/mol) [2418.16 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1210.04 ([M+2H]²⁺, ber.: 1210.08), 1221.05 ([M+H+Na]²⁺, ber.: 1221.08), 1229.03 ([M+H+K]²⁺, ber.: 1229.08), 807.35 ([M+3H]³⁺, ber.: 807.05), 814.69 ([M+2H+Na]³⁺, ber.: 814.39), 820.01 ([M+2H+K]³⁺, ber.: 819.72).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (56)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

43 mg (0.018 mmol) des Glycopeptids (55), werden in 10 ml Methanol gelöst. Es wird so lange mit frisch hergestellter 1%iger Natriummethylatlösung in Methanol versetzt bis ein pH-Wert von 10.5 erreicht ist. Nach 16 h Rühren bei Raumtemp. wird mit 100 μ l 1N Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (5:95) → (70:30), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 14.3$ min) gereinigt.

Ausbeute: 31.0 mg (0.014 mmol, 78 %), farbloses Lyophilisat, $R_t = 11.4$ min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (5:95)→(70:30), 40 min, $\lambda = 214$ nm), $[\alpha]_{24}^D = -114.0$ (c = 1.00 g/100 ml, H₂O).

C₉₇H₁₅₇N₂₇O₃₇ (M = 2293.44 g/mol) [2292.12 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1147.10 ([M+2H]²⁺, ber.: 1147.06), 765.06 ([M+3H]³⁺, ber.: 765.04).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.51 (d, 1H, H _{ϵ} , $J_{H_{\epsilon}, H $\delta$$ } = 1.43 Hz), 7.21 (d, 1H, H _{δ} , $J_{H δ , H_{\epsilon}$ } = 1.40 Hz), 4.83 (d, 1H, H₁, J_{H_1, H_2} = 3.78 Hz), 4.64-4.05 (m, 21H, D _{α} {4.63}, H _{α} {4.60}, R _{α} {4.53}, A_{3 α} {4.49}, A_{2 α} {4.43}, S_{2 α} {4.39}, A_{4 α} {4.37}, S_{1 α} {4.35}, P_{1-5 α} {4.29, 4.28, 4.27, 4.19, 4.17}, V _{α} {4.19}, T_{Tn α} {4.17}, T_{Tn β} {4.14}, A_{1 α} {4.13}, T_{1 α} {4.10}, T_{2 α} {4.06}, T_{2 β} {4.08}, T_{1 β} {4.07}), 3.97 (dd, 1H, H₂, J_{H_2, H_1} = 3.74 Hz, J_{H_2, H_3} = 10.90 Hz), 3.94-3.32 (m, 33H, G_{1 $\alpha\alpha$} {3.86}, G_{1 $\alpha\beta$} {3.85}, H₅ {3.76}, 4x CH₂O-Spacer {3.76}, S_{2 β} {3.76}, G_{2 α} {3.70}, H₃ {3.74}, S_{1 β} {3.67}, 3-CH₂-Spacer {3.66}, H_{6 α, β} {3.64}, H₄ {3.56}, P_{1-5 δ} {3.55, 3.51, 3.46, 3.42}), 3.20 (dd, 1H, H _{$\beta\alpha$} , $J_{H $\beta, H $\alpha$$ } = 5.68 Hz, $J_{H $\beta\alpha, H $\beta\beta$$ } = 15.68 Hz), 3.14-3.02 (m, 7H, CH₂-Spacer {3.09}, H _{$\beta\beta$} {3.08}, D _{$\beta\alpha$} {3.07}, R _{δ}$$

{3.06}), 2.81 (m, 1H, D_{βb}), 2.70-2.50 (m, 4H, 12-CH₂-Spacer {2.63}, $J_{\text{CH}_2.\text{CH}_2} = 6.72$ Hz, CH₂-Spacer {2.57}, $J_{\text{CH}_2.\text{CH}_2} = 5.80$ Hz), 2.30-2.07 (m, 4H, P_{1,2βa} {2.21, 2.19}, CH₂-Spacer {2.15}), 2.05-1.68 (m, 23H, P_{3-5βa} {1.96, 1.89, 1.85}, V_β {1.98}, P_{1-5γ} {1.94-1.82}, P_{1-5βb} {2.02, 1.97, 1.92, 1.86, 1.84}, AcNH (s, 1.91}, R_{βa} {1.72}), 1.67-1.47 (m, 3H, R_{βb} {1.59}, R_γ {1.57}), 1.30-1.19 (m, 12H, A_{2β} {1.25}, {1.27, d, A_{3β} $J_{\text{Aβ,Aα}} = 6.80$ Hz}, {1.25 d, A_{4β}, $J_{\text{Aβ,Aα}} = 7.00$ Hz}, {1.22, d, A_{1β}, $J_{\text{Aβ,Aα}} = 7.32$ Hz}), 1.15 (d, 3H, T_{Tnγ}, $J_{\text{Tγ,Tβ}} = 6.40$ Hz), 1.09 (d, 3H, T_{2γ}, $J_{\text{Tγ,Tβ}} = 6.56$ Hz), 1.07 (d, 3H, T_{1γ}, $J_{\text{Tγ,Tβ}} = 6.56$ Hz), 0.85 (t, 6H, V_γ, $J_{\text{Vγ,Vβ}} = 6.40$ Hz).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC): δ (ppm):

176.10, 174.93, 174.91, 174.41, 174.15, 173.96, 173.75, 173.72, 173.48, 173.11, 172.60, 172.54, 172.38, 171.98, 171.95, 171.55, 171.36, 171.23, 171.16, 171.12, 170.93, 170.68 (C=O, C=O-Acetyl), 156.70 (C=NH), 133.46 (H_{C2}), 128.43 (H_{C5}), 117.30 (H_{C4}), 99.00 (C1), 76.86 (T_{Tn*β}), 69.58 (CH₂-Spacer), 68.50 (C3), 68.21 (C4), 67.01 (T_{1β}), 66.31 (C5), 66.23 (C6), 66.07 (T_{2β}), 61.44 (S_{1β}, S_{2β}), 61.16, 60.78, 60.51, 60.06, 60.00 (P_{1-5α}), 59.58 (T_{2α}), 59.36 (T_{1α}), 58.90 (V_α), 58.77 (T_{Tn*α}), 57.01 (S_{2α}), 55.57 (S_{1α}), 52.30 (H_α), 51.12 (R_α), 50.15 (D_α), 49.63 (C2), 49.49 (A_{3α}), 48.06 (A_{4α}), 47.87 (A_{1α}), 47.76, 47.66, 47.61, 47.41 (P_{1-5δ}), 42.39 (G_{2α}), 42.31 (G_{1α}), 40.52 (CH₂-Spacer), 39.06 (R_δ), 34.04 (D_β), 30.16 (V_β), 29.65, 29.34, 29.29, 29.20, 28.81 (P_{1-5β}), 27.48 (R_β), 26.22 (H_β), 24.73, 24.63, 24.54, 24.34 (P_{1-5γ}), 23.96 (R_γ), 22.22 (CH₃-AcNH), 18.83 (T_{1γ}), 18.75 (T_{2γ}), 18.45 (V_{γa}), 18.28 (T_{Tn*γ}), 17.75 (V_{γb}), 16.28, 15.21, 15.10 (A_{1-4β}).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-{2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-α-glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (57)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→6)-αAc₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-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 (**54**) (Rapp Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) erfolgt die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der Aminosäure *Fmoc*-Ser(*Ot*Bu)-OH wird die glycosylierten Aminosäure **22a** manuell verknüpft. 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 235

mg (0.2 mmol, 2 eq.) des Sialyl-T_N-Threonin-Konjugats **22a**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55 μ L (0.5 mmol, 5 eq.) *N*-Methylmorpholin (NMM) in 2 ml *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und es wird 4 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 des Synthesizers gekuppelt. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe an Glycin wird mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Es werden 443.5 mg (1 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl amido-4,7,10-trioxadecansäure **53**, 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 und im Stickstoffstrom getrocknet. Noch verbliebene Lösungsmittelreste werden i. Hochvak. entfernt. In einem *Merrifield*-Glasreaktor wird das Harz 1.5 h mit einer Mischung aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Triisopropylsilan und 1 ml H₂O geschüttelt. Es wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 2 ml Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 ml Toluol versetzt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 15 ml Toluol kodestilliert und die Lösung schließlich i. Vak. auf ca. 0.5 ml eingengt. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von 20 ml eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Rohpeptid wird durch präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80)→(100:0), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 28.3 min) gereinigt.

Ausbeute: 81.0 mg (0.028 mmol, 28 %, farbloses Lyophilisat, R_t = 11.4 min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₂₇H₁₉₂N₂₈O₅₁ (M = 2927.04 g/mol) [2925.33 g/mol]

ESI-MS (positiv) m/z: 1463.71 ([M+2H]²⁺, ber.: 1463.67), 976.12 ([M+3H]³⁺, ber.: 976.11), 732.62 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 732.33).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (59)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -NeuNAcCOOH-(2→6)- α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Hydrierung: 81 mg (0.028 mmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-P-A-H-G-V-T(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P-OH **57**

werden in 6 ml Methanol gelöst. Unter Argon werden 2 Spatelspitzen Palladium auf Aktivkohle (10%) zugegeben. Der Kolben wird anschließend dreimal mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und jeweils mit Wasserstoff gespült. Man rührt 48 h unter Wasserstoffatmosphäre. Die Aktivkohle wird durch Filtration über *Hyflo Super Cell* entfernt und der Filtrerrückstand wird mit insgesamt 50 ml Methanol nachgespült. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert, wobei 62.7 mg (0.022 mmol) eines farblosen Feststoffs entstehen. $R_t = 5.0$ min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

C₁₂₀H₁₈₆N₂₈O₅₁ (M = 2836.92 g/mol) [2835.28 g/mol]

ESI-MS (positiv) m/z: 1418.66 ([M+2H]²⁺, ber.: 1418.64), 946.10 ([M+3H]³⁺, ber.: 946.09), 710.10 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 709.82).

Deacetylierung:

62.7 mg (max. 0.022 mmol) des rohen Glycopeptids **58**, werden in 5 ml wässriger NaOH-Lösung (80 mg NaOH in 500 ml entionisiertem Wasser (c = 0.004 mol/l), pH = 11.5) gelöst und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 100 μ l 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90) → (40:60), 50 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 13.6$ min) gereinigt.

Ausbeute: 29.2 mg (0.011 mmol, 40 % über 2 Stufen), farbloses Lyophilisat, $R_t = 7.0$ min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(40:60), 40 min, $\lambda = 214$ nm), $[\alpha]_{24}^D = -65.4$ (c = 1.00 g/100 ml, H₂O).

C₁₀₈H₁₇₄N₂₈O₄₅ (M = 2584.70 g/mol) [2583.22 g/mol]

ESI-MS (positiv) m/z: 1293.14 ([M+2H]²⁺, ber.: 1292.61), 875.07 ([M+K+2H]³⁺, ber.: 874.74), 869.75 ([M+Na+2H]³⁺, ber.: 869.41), 862.08 ([M+3H]³⁺, ber.: 862.07).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.49 (d, 1H, H_ε, $J_{H_ε, H_δ} = 1.39$ Hz), 7.20 (d, 1H, H_δ, $J_{H_δ, H_ε} = 1.21$ Hz), 4.80 (d, 1H, H₁, $J_{H_1, H_2} = 3.80$ Hz), 4.61-4.03 (m, 21H, D_α {4.60}, H_α {4.56}, R_α {4.51}, A_{3α} {4.47}, A_{2α} {4.45}, S_{2α} {4.37}, A_{4α} {4.33}, S_{1α} {4.32}, P_{1-5α} {4.29, 4.28, 4.27, 4.19, 4.17}, V_α {4.18}, T_{STnα} {4.17}, T_{STnβ} {4.13}, A_{1α} {4.12}, T_{1α} {4.11}, T_{2α} {4.09}, T_{2β} {4.06}, T_{1β} {4.05}), 3.98-3.61 (m, 23H, H₂ {3.92}, G_{1αa} {3.86}, G_{1αb} {3.85}, H₅ {3.76}, 4x CH₂O-Spacer {3.76}, S_{2β} {3.74}, G_{2α} {3.70}, H₃ {3.68}, S_{1β} {3.66}, 3-CH₂-Spacer {3.66}, H_{6a,b} {3.64}), 3.60-3.32 (m, 18H, H₄ {3.60}, H₆" {3.59}, H_{9a}" {3.58}, H₇" {3.57}, P_{1-5δ} {3.56, 3.53, 3.49, 3.45}, H_{9b}" {3.56}, H₄" {3.55}, H₈" {3.52}, H₅" {3.49}), 3.17 (d, 1H, H_{βa}, $J_{H_ε, H_α} = 5.52$ Hz), 3.12–3.01 (m, 7H, CH₂-Spacer {3.09}, H_{βb} {3.08}, D_{βa} {3.05}, R_δ {3.03}), 2.82 (m, 1H, D_{βb}), 2.60 (t, 2H, 12-CH₂-Spacer, $J_{CH_2, CH_2} = 6.20$ Hz), 2.58-2.49 (m, 3H, H_{3eq}" {2.54}, CH₂-Spacer, $J_{CH_2, CH_2} = 6.04$ Hz {2.53}), 2.25-2.06 (m, 4H, P_{1,2βa} {2.21, 2.19}, CH₂-Spacer {2.15}), 2.03-1.66 (m, 26H, P_{3-5βa} {1.96, 1.89, 1.85}, V_β {1.95}, P_{1-5γ} {1.94-1.82}, P_{1-5βb} {2.02, 1.97, 1.92, 1.86, 1.84}, AcNH (2x s, 1.82, 1.80), R_{βa} {1.74}), 1.64-1.48 (m, 4H, R_{βb} {1.58}, H_{3ax}" {1.56}, R_γ {1.54}), 1.28-1.18 (m, 12H, A_{2β}, {1.25, d, A_{3β} $J_{A_β, A_α} = 6.6$ Hz}, {1.23 d, A_{4β}, $J_{A_β, A_α} = 7.00$ Hz}, {1.20, d, A_{1β}, $J_{A_β, A_α} = 7.36$ Hz}), 1.16 (d, 3H, T_{STnγ}, $J_{T_γ, T_β} = 6.42$ Hz), 1.07 (d, 3H, T_{2γ}, $J_{T_γ, T_β} = 6.48$ Hz), 1.05 (d, 3H, T_{1γ}, $J_{T_γ, T_β} = 6.48$ Hz), 0.84 (d, 3H, V_γ, $J_{V_{γa}, V_β} = 6.78$ Hz), 0.82 (d, 3H, V_γ, $J_{V_{γb}, V_β} = 6.67$ Hz).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC): δ (ppm):

174.91, 174.89, 174.37, 173.99, 173.70, 173.59, 173.47, 173.17, 173.09, 172.92, 172.60, 172.54, 172.33, 171.98, 171.93, 171.53, 171.35, 171.20, 171.10, 170.89, 170.68 (C=O, C=O-Acetyl, C1"), 133.45 (H_{C2}), 128.27 (H_{C5}), 117.34 (H_{C4}), 99.25 (C2"), 99.18 (C1), 77.51 (T_{STn*β}), 72.61 (C6"), 71.59 (C7"), 69.41 (C9"), 69.35 (CH₂-Spacer), 68.23 (C3), 68.20 (C4), 68.16 (C8"), 66.98 (T_{1β}), 66.97 (C5), 66.56 (C4"), 66.23 (C6), 66.05 (T_{2β}), 61.47, 61.43 (S_{1β}, S_{2β}), 61.14, 60.53, 60.45, 60.03, 59.96 (P_{1-5α}), 59.48 (T_{2α}), 59.39 (T_{1α}), 59.35 (V_α), 58.92 (T_{STn*α}), 56.97 (S_{2α}), 55.51 (S_{1α}), 52.27 (C5"), 51.78 (H_α), 51.09 (R_α), 50.14 (D_α), 49.60 (C2), 49.49 (A_{3α}), 48.02 (A_{4α}), 47.85 (A_{1α}), 47.74, 47.64, 47.58, 47.38 (P_{1-5δ}), 42.35 (G_{2α}), 42.21 (G_{1α}), 42.15 (CH₂-Spacer), 40.47 (R_δ), 40.42 (C3"), 40.35 (CH₂-Spacer), 39.00 (D_β), 31.00 (V_β), 30.10, 30.07, 29.63, 29.30, 29.26 (P_{1-5β}), 29.15 (R_β), 27.41 (H_β), 24.69, 24.66, 24.65, 24.52, 24.31 (P_{1-5γ}), 23.95 (R_γ), 22.20, 21.96, 20.61 (CH₃-AcNH), 18.27 (T_{1γ}), 18.71 (T_{2γ}), 18.41 (V_{γa}), 18.31 (T_{STn*γ}), 17.73 (V_{γb}), 16.27, 15.15, 15.07, 15.03 (A_{1-4β}).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]-4,6-di-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (60)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Ac₄Gal-(1-3)- α -Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-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 (**54**) (Rapp Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) erfolgt die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der Aminosäure *Fmoc*-Ser(*Ot*Bu)-OH wird die glycosylierte Aminosäure **25** manuell verknüpft. 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 191.8 mg (0.2 mmol, 2 eq.) des TF-Threonin-Konjugats **25**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55 μ l (0.5 mmol, 5 eq.) *N*-Methylmorpholin (NMM) in 2 ml *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und es wird 4 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 des Synthesizers gekuppelt. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe an Glycin wird mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Es werden 443.5 mg (1 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl amido-4,7,10-trioxadecansäure **53**, 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 und im Stickstoffstrom getrocknet. Noch verbliebene Lösungsmittelreste werden i. Hochvak. entfernt. In einem *Merrifield*-Glasreaktor wird das Harz 1.5 h mit einer Mischung aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Triisopropylsilan und 1 ml H₂O geschüttelt. Es wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 2 ml Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 ml Toluol versetzt und i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 15 ml Toluol kodestilliert und die Lösung schließlich i. Vak. auf ca. 0.5 ml eingeeengt. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von 20 ml eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Rohpeptid

wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (15:85)→(70:30), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 21.3 min) gereinigt.

Ausbeute: 61.0 mg (0.0225 mmol, 23 %, farbloses Lyophilisat, R_t = 11.0 min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₁₅H₁₇₉N₂₇O₄₈ (M = 2707.80 g/mol) [2706.24 g/mol]

ESI-MS (positiv) m/z: 1354.11 ([M+2H]²⁺, ber.: 1354.12), 903.06 ([M+3H]³⁺, ber.: 903.08).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (61)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

61 mg (0.0225 mmol) des Glycopeptids (60), werden in 5 ml wässriger NaOH-Lösung (80 mg NaOH in 500 ml entionisiertem Wasser (c = 0.004 mol/l), pH = 11.5) gelöst und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 100 µl 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (5:95) → (70:30), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 21.3 min) gereinigt.

Ausbeute: 37.0 mg (0.015 mmol, 67 %), farbloses Lyophilisat, R_t = 14.0 min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (5:95)→(70:30), 40 min, λ = 214 nm), [α]₂₄^D = -110.0 (c = 1.00 g/100 ml, H₂O).

C₁₀₃H₁₆₇N₂₇O₄₂ (M = 2455.58 g/mol) [2454.18 g/mol]

ESI-MS (positiv) m/z: 1228.09 ([M+2H]²⁺, ber.: 1228.09), 819.05 ([M+3H]³⁺, ber.: 819.06).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.52 (d, 1H, H_ε, J_{H_ε, H_δ} = 1.34 Hz), 7.21 (d, 1H, H_δ, J_{H_δ, H_ε} = 1.42 Hz), 4.84 (d, 1H, H₁, J_{H₁, H₂} = 3.86 Hz), 4.65-4.00 (m, 21H, D_α {4.62}, H_α {4.61}, R_α {4.54}, T_{T*α} {4.54}, A_{3α} {4.52}, A_{2α} {4.49}, S_{2α} {4.42}, A_{4α} {4.37}, S_{1α} {4.32}, H_{1'} {4.28}, P_{1-5α} {4.33, 4.30, 4.29, 4.23, 4.22}, V_α {4.16}, T_{T*β} {4.14}, A_{1α} {4.12}, T_{1α} {4.11}, T_{2α} {4.09}, T_{2β} {4.07}, T_{1β} {4.06}), 3.98-3.45 (m, 39H, H_{5'} {3.94}, H₂ {3.92}, H₃ {3.91}, G_{1αa} {3.89}, G_{1αb} {3.85}, H₅, H_{4'} {3.78}, S_{2β} {3.72}, H_{6'}_{a,b} {3.70}, G_{2α} {3.69}, S_{1β} {3.66}, H₆_{a,b} {3.63}, 4x CH₂O-Spacer {3.59}, 3-CH₂-Spacer {3.56}, H₄ {3.54}, P_{1-5δ} {3.58, 3.54, 3.53, 3.50}, H_{3'} {3.48}), 3.39 (m, 1H, H_{2'}), 3.21 (m, 1H, H_{βa}), 3.15-3.04 (m, 7H, CH₂-Spacer {3.11}, H_{βb} {3.10}, D_{βa} {3.10}, R_δ {3.08}), 2.91-2.74 (m, 3H, D_{βb}, 12-CH₂-Spacer), 2.61 (m, 2H, CH₂-Spacer), 2.30-2.08 (m, 4H, P_{1,2βa} {2.22,

2.19}, CH₂-Spacer {2.17}), 2.06-1.69 (m, 26H, P_{3-5βa} {1.98, 1.88, 1.85}, V_β {1.93}, P_{1-5γ} {1.96-1.82}, P_{1-5βb} {2.01, 1.97, 1.94, 1.86, 1.84}, AcNH (s, 1.89}, R_{βa} {1.77}), 1.68-1.49 (m, 3H, R_{βb} {1.62}, R_γ {1.58}), 1.30-1.20 (m, 12H, A_{2β}, {1.27}, A_{3β} {1.26}, A_{4β} {1.26}, {1.22, d, A_{1β}, J_{Aβ,Aα} = 7.44 Hz}), 1.16 (d, 3H, T_{T*γ}, J_{Tγ,Tβ} = 6.48 Hz), 1.10 (d, 3H, T_{2γ}, J_{Tγ,Tβ} = 6.48 Hz), 1.07 (d, 3H, T_{1γ}, J_{Tγ,Tβ} = 6.48 Hz), 0.86 (t, 6H, V_γ, J_{Vγ,Vβ} = 7.16 Hz).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC): δ (ppm):

176.02, 174.90, 174.47, 174.11, 173.96, 173.76, 173.65, 173.53, 173.14, 172.62, 172.54, 172.39, 172.02, 171.94, 171.57, 171.37, 171.29, 171.19, 171.11, 170.91, 170.68 (C=O, C=O-Acetyl), 156.70 (C=NH), 133.50 (H_{C2}), 128.41 (H_{C5}), 117.94 (H_{C4}), 104.65 (C1'), 99.17 (C1), 77.11 (T_{T*β}), 76.96 (C3), 75.01 (C4'), 72.51 (C3'), 70.95 (C5'), 70.58 (C2'), 69.56 (CH₂-Spacer), 68.91 (C2), 68.57 (C4), 67.01 (T_{1β}), 66.35 (C5), 66.10 (T_{2β}), 61.42, 61.29 (S_{1β}, S_{2β}), 61.18, 61.04, 60.81, 60.54 (P_{1-5α}), 60.08 (C6'), 60.02 (C6), 59.91 (V_α), 59.58 (T_{2α}), 59.31 (T_{1α}), 58.79 (T_{T*α}), 57.01 (S_{2α}), 55.56 (S_{1α}), 52.31 (H_α), 51.12 (R_α), 50.14 (D_α), 49.65 (C2), 48.28 (A_{3α}), 48.05 (A_{4α}), 47.85 (A_{1α}), 47.83, 47.76, 47.66, 47.43 (P_{1-5δ}), 42.44 (G_{2α}), 42.36 (G_{1α}), 42.31 (CH₂-Spacer), 40.54 (R_δ), 35.05 (D_β), 34.11 (CH₂-Spacer), 31.71 (V_β), 30.26, 29.68, 29.35, 29.21, 28.81 (P_{1-5β}), 27.51 (R_β), 26.23 (H_β), 24.74, 24.65, 24.61, 24.53, 24.32 (P_{1-5γ}), 23.99 (R_γ), 22.29 (CH₃-AcNH), 18.84 (T_{1γ}), 18.77 (T_{2γ}), 18.51 (V_{γα}), 18.36 (T_{T*γ}), 17.83 (V_{γb}), 16.29, 15.23, 15.11 (A_{1-4β}).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-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-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}-β-D-galactopyranosyl)]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (62)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→3)-βAc₂GalBn-(1→3)-αAc₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-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 (**54**) (Rapp Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) erfolgt die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der Aminosäure Fmoc-Ser(OtBu)-OH wird die glycosylierte Aminosäure **34** manuell verknüpft. 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 302 mg (0.2 mmol, 2 eq.) des 2,3-Sialyl-T-Threonin-Konjugats **34**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55 μ L (0.5 mmol, 5 eq.) *N*-Methylmorpholin (NMM) in 2 ml *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und es wird 5 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 des Synthesizers gekuppelt. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe an Glycin wird mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Es werden 443.5 mg (1 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl amido-4,7,10-trioxadecansäure **53**, 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 und im Stickstoffstrom getrocknet. Noch verbliebene Lösungsmittelreste werden i. Hochvak. entfernt. In einem *Merrifield*-Glasreaktor wird das Harz 1.5 h mit einer Mischung aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Triisopropylsilan und 1 ml H₂O geschüttelt. Es wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 2 ml Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 mL Toluol versetzt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 15 ml Toluol kodestilliert und die Lösung schließlich i. Vak. auf ca. 0.5 ml eingengt. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von 20 ml eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Rohpeptid wird durch präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80)→(100:0), 80 min, λ = 214 nm, R_t = 27.5 min) gereinigt.

Ausbeute: 53.0 mg (0.016 mmol, 16 %, farbloses Lyophilisat, R_t = 16.6 min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₄₄H₂₁₂N₂₈O₅₈ (M = 3263.38 g/mol) [3261.45 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1631.75 ([M+2H]²⁺, ber.: 1631.73), 1088.16 ([M+3H]³⁺, ber.: 1088.15).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3-*O*-{(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl)]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (64)
(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 3)- β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Hydrierung: 53 mg (0.016 mmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-P-A-H-G-V-T(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)- β Ac₂GalBn-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P-OH **62** werden in 5 ml Methanol gelöst und mit 2 Spatelspitzen Pd(OAc)₂ versetzt. Der Kolben wird anschließend dreimal mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und jeweils mit Wasserstoff gespült. Man rührt 3 h unter Wasserstoffatmosphäre und filtriert im Anschluss über *Hyflo Super Cell*. Der Filtrerrückstand wird mit insgesamt 50 ml Methanol nachgespült. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert, wobei 45 mg (0.014 mmol) eines farblosen Feststoffs entstehen. $R_t = 10.8$ min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (10:90) \rightarrow (100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

C₁₃₀H₂₀₀N₂₈O₅₈ (M = 3083.13 g/mol) [3081.36 g/mol].

MALDI-TOF-MS (*dhb*, *positiv*) *m/z*: 3084.62 ([M+H]⁺, ber.: 3082.36).

Deacetylierung:

45 mg (max. 0.014 mmol) des rohen Glycopeptids **63**, werden in 5 ml wässriger NaOH-Lösung (80 mg NaOH in 500 ml entionisiertem Wasser (c = 0.004 mol/l), pH = 11.5) gelöst und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 100 μ L 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (5:95) \rightarrow (50:50), 40 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 13.8$ min) gereinigt.

Ausbeute: 23 mg (0.0084 mmol, 53 % über 2 Stufen), farbloses Lyophilisat, $R_t = 9.8$ min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (5:95) \rightarrow (100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm), $[\alpha]_{24}^D = -88.4$ (c = 1.00 g/100 ml, H₂O).

C₁₁₄H₁₈₄N₂₈O₅₀ (M = 2746.84 g/mol) [2745.27 g/mol].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 1373.69 ([M+2H]²⁺, ber.: 1373.64), 916.46 ([M+3H]³⁺, ber.: 916.09), 923.46 ([M+Na+2H]³⁺, ber.: 923.42).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , COSY, HSQC): δ (ppm):

8.51 (d, 1H, H_ϵ , $J_{\text{H}_\epsilon, \text{H}_\delta} = 1.34$ Hz), 7.20 (m, 1H, H_δ), 4.84 (d, 1H, H_1 , $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.48$ Hz), 4.65-4.01 (m, 23H, D_α {4.62}, H_α {4.58}, R_α {4.53}, $\text{A}_{3\alpha}$ {4.50}, $\text{A}_{2\alpha}$ {4.42}, $\text{S}_{2\alpha}$ {4.40}, H_1' {4.36}, $\text{A}_{4\alpha}$ {4.35}, $\text{S}_{1\alpha}$ {4.33}, $\text{P}_{1-5\alpha}$ {4.28, 4.27, 4.25, 4.22, 4.20}, V_α {4.21}, $\text{T}_{2,3-\text{ST}\beta}$ {4.20}, $\text{T}_{2,3-\text{ST}\alpha}$ {4.18}, H_2 {4.07}, $\text{T}_{2\beta}$ {4.12}, $\text{A}_{1\alpha}$ {4.11}, $\text{T}_{1\beta}$ {4.07}, H_5' {4.01}), 3.99-3.42 (m, 48H, $\text{T}_{1\alpha}$ {3.93}, $\text{T}_{2\alpha}$ {3.91}, $\text{G}_{1\alpha\alpha}$ {3.86}, H_3 {3.85}, $\text{G}_{1\alpha\beta}$ {3.82}, $\text{H}_6'_{\text{a,b}}$ {3.79}, 4x $\text{CH}_2\text{O-Spacer}$ {3.76}, $\text{S}_{2\beta}$ {3.73}, H_5 {3.70}, $\text{G}_{2\alpha}$ {3.69}, $\text{S}_{1\beta}$ {3.67}, 3- $\text{CH}_2\text{-Spacer}$ {3.64}, H_4'' {3.62}, $\text{H}_{6\text{a,b}}$ {3.61}, H_4' {3.59}, H_6'' {3.56}, $\text{H}_{9\text{a}}''$ {3.54}, H_7'' {3.52}, $\text{P}_{1-5\delta}$ {3.56, 3.53, 3.51, 3.50}, $\text{H}_{9\text{b}}''$ {3.54}, H_8'' {3.50}, H_4 {3.48}, H_5'' {3.46}, H_3' {3.45}), 3.39 (dd, 1H, H_2' , $J_{\text{H}_2', \text{H}_1'} = 7.61$ Hz, $J_{\text{H}_2', \text{H}_3'} = 9.76$ Hz), 3.19 (dd, 1H, $\text{H}_{\beta\text{a}}$, $J_{\text{H}_{\beta\text{a}}, \text{H}_\alpha} = 5.64$ Hz, $J_{\text{H}_{\beta\text{a}}, \text{H}_{\beta\text{b}}} = 15.60$ Hz), 3.13–3.01 (m, 7H, R_δ {3.09}, $\text{CH}_2\text{-Spacer}$ {3.08}, $\text{H}_{\beta\text{b}}$ {3.06}, $\text{D}_{\beta\text{a}}$ {3.04}), 2.82 (m, 1H, $\text{D}_{\beta\text{b}}$), 2.70-2.48 (m, 5H, 12- $\text{CH}_2\text{-Spacer}$ {2.63}, $\text{H}_{3\text{eq}}''$ {2.62}, $\text{CH}_2\text{-Spacer}$ {2.57}), 2.30-2.06 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-Spacer}$ {2.18}, $\text{P}_{1,2\beta\text{a}}$ {2.14, 2.10}), 2.05-1.46 (m, 30H, $\text{P}_{3-5\beta\text{a}}$ {2.01, 1.98, 1.95}, V_β {1.95}, $\text{P}_{1-5\gamma}$ {1.93, 1.88, 1.83}, $\text{P}_{1-5\beta\text{b}}$ {1.91, 1.84, 1.79, 1.75, 1.71}, AcNH (2x s, 1.90, 1.88}, $\text{R}_{\beta\text{a}}$ {1.75}, $\text{H}_{3\text{ax}}''$ {1.69}, $\text{R}_{\beta\text{b}}$ {1.58}, R_γ {1.56}), 1.30-1.18 (m, 12H, {1.26 d, $\text{A}_{2\beta}$, $J_{\text{A}_{\beta}, \text{A}_\alpha} = 6.08$ Hz}, $\text{A}_{3\beta}$ {1.24}, {1.24 d, $\text{A}_{4\beta}$, $J_{\text{A}_{\beta}, \text{A}_\alpha} = 6.88$ Hz}, {1.21, d, $\text{A}_{1\beta}$, $J_{\text{A}_{\beta}, \text{A}_\alpha} = 7.28$ Hz}), 1.14 (d, 3H, $\text{T}_{2,3-\text{ST}\gamma}$, $J_{\text{T}_\gamma, \text{T}\beta} = 6.24$ Hz), 1.08 (d, 3H, $\text{T}_{2\gamma}$, $J_{\text{T}_\gamma, \text{T}\beta} = 6.64$ Hz), 1.06 (d, 3H, $\text{T}_{1\gamma}$, $J_{\text{T}_\gamma, \text{T}\beta} = 6.48$ Hz), 0.89-0.81 (m, 6H, V_γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, D_2O , ^{13}C , HSQC): δ (ppm):

175.81, 174.95, 174.89, 174.79, 174.38, 173.94, 173.74, 173.48, 173.15, 173.10, 172.91, 172.64, 172.49, 172.36, 171.93, 171.53, 171.43, 171.21, 171.12, 170.90, 170.87, 170.69 (C=O, C=O-Acetyl, C_1''), 156.66 (C=NH), 133.43 (H_{C_2}), 128.38 (H_{C_5}), 117.30 (H_{C_4}), 104.44 (C_1'), 99.19 (C_2''), 99.08 (C_1), 77.47 ($\text{T}_{2,3-\text{ST}*\beta}$), 74.99 (C_4'), 72.88 (C_6''), 72.48 (C_3'), 71.48 (C_7''), 70.93 (C_5'), 70.43 (C_2'), 70.10 (C_9''), 69.57, 69.50, 69.45, 69.42 ($\text{CH}_2\text{-Spacer}$), 68.17 (C_3), 68.06 (C_4), 67.96 (C_8''), 67.35 ($\text{T}_{1\beta}$), 66.99 (C_5), 66.67 (C_4''), 66.30 (C_6), 66.06 ($\text{T}_{2\beta}$), 63.11 (C_6'), 61.40, 61.26 ($\text{S}_{1\beta}$, $\text{S}_{2\beta}$), 61.15, 61.02, 60.94, 60.76, 60.50 ($\text{P}_{1-5\alpha}$), 60.05 ($\text{T}_{2\alpha}$), 59.97 ($\text{T}_{1\alpha}$), 59.36 (V_α), 58.88 ($\text{T}_{2,3-\text{ST}*\alpha}$), 57.00 ($\text{S}_{2\alpha}$), 55.54 ($\text{S}_{1\alpha}$), 52.27, 52.00, 51.61 (C_5'' , H_α , R_α), 50.09 (D_α), 49.61 (C_2), 48.20 ($\text{A}_{3\alpha}$), 48.04 ($\text{A}_{4\alpha}$), 47.86 ($\text{A}_{1\alpha}$), 47.75, 47.66, 47.61, 47.39 ($\text{P}_{1-5\delta}$), 42.39, 42.31 ($\text{G}_{2\alpha}$, $\text{G}_{1\alpha}$), 40.51 (R_δ), 39.04 ($\text{CH}_2\text{-Spacer}$), 38.80 (C_3''), 30.24 (V_β), 29.65, 29.32, 29.27, 29.19 ($\text{P}_{1-5\beta}$), 28.75 (R_β), 27.46 (H_β), 24.72, 24.61, 24.53, 24.33 ($\text{P}_{1-5\gamma}$), 23.96 (R_γ), 22.35, 22.02 ($\text{CH}_3\text{-AcNH}$), 18.82 ($\text{T}_{1\gamma}$), 18.73 ($\text{T}_{2\gamma}$), 18.48 ($\text{V}_{\gamma\text{a}}$), 18.35 ($\text{T}_{2,3-\text{ST}*\gamma}$), 17.85 ($\text{V}_{\gamma\text{b}}$), 16.28, 15.18, 15.07 ($\text{A}_{1-4\beta}$).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*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-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (65)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Ac₃BnGal-(1 \rightarrow 3)-[α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-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 (**54**) (Rapp Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) erfolgt die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der Aminosäure *Fmoc*-Ser(*O*tBu)-OH wird die glycosylierten Aminosäure **37** manuell verknüpft. 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 294 mg (0.2 mmol, 2 eq.) des 2,6-Sialyl-T-Threonin-Konjugats **37**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55 μ L (0.5 mmol, 5 eq.) *N*-Methylmorpholin (NMM) in 2 ml *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und es wird 5 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 des Synthesizers gekuppelt. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe an Glycin wird mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Es werden 443.5 mg (1 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl amido-4,7,10-trioxadecansäure **53**, 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 und im Stickstoffstrom getrocknet. Noch verbliebene Lösungsmittelreste werden i. Hochvak. entfernt. In einem *Merrifield*-Glasreaktor wird das Harz 1.5 h mit einer Mischung aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Triisopropylsilan und 1 ml H₂O geschüttelt. Es wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 2 ml Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 mL Toluol versetzt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 15 ml Toluol kodestilliert und die Lösung schließlich i. Vak. auf ca. 0.5 mL eingengt. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von

20 ml eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Rohpeptid wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 34.5 min) gereinigt.

Ausbeute: 84.0 mg (0.026 mmol, 26 %, farbloses Lyophilisat, R_t = 29.9 min (Phenomenex Jupiter, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(50:50), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₄₂H₂₁₀N₂₈O₅₇ (M = 3221.34 g/mol) [3219.44 g/mol]

ESI-MS (positiv) m/z: 1611.25 ([M+2H]²⁺, ber.: 1610.72), 1074.52 ([M+3H]³⁺, ber.: 1074.15).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[β-D-galactopyranosyl]-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (67)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-(1→3)-[αNeuNAcCOOH-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Hydrierung: 84 mg (0.026 mmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-P-A-H-G-V-T(βAc₃BnGal-(1→3)-[αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→6)]-αGalNAc)-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P-OH **65** werden in 5 ml Methanol gelöst. Unter Argon werden 2 Spatelspitzen Pd(OAc)₂ zugegeben. Der Kolben wird anschließend dreimal mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und jeweils mit Wasserstoff gespült. Man rührt 3 h unter Wasserstoffatmosphäre. Das entstandene Palladiumschwarz wird mit einem Spritzenfilter (PTFE) entfernt und 2x mit 2 ml Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert. R_t = 15.5 min (Phenomenex Jupiter, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(50:50), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₂₈H₁₉₈N₂₈O₅₇ (M = 3041.10 g/mol) [3039.35 g/mol].

Deacetylierung:

Das rohe Glycopeptid **66** wird in 5 ml wässriger NaOH-Lösung (80 mg NaOH in 500 ml entionisiertem Wasser (c = 0.004 mol/l), pH = 11.5) gelöst und 11 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 100 µl 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90) → (25:75), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 21.1 min) gereinigt.

Ausbeute: 52.2 mg (0.019 mmol, 73 % über 2 Stufen), farbloses Lyophilisat, $R_t = 7.5$ min (Phenomenex Jupiter, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90)→(25:75), 30 min, $\lambda = 214$ nm), $[\alpha]_{22}^D = -83.6$ (c = 1.00 g/100 ml, H₂O).

C₁₁₄H₁₈₄N₂₈O₅₀ (M = 2746.84 g/mol) [2745.27 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1373.84 ([M+2H]²⁺, ber. 1373.64), 916.58 ([M+3H]³⁺, ber.: 916.09).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.49 (d, 1H, H_e, $J_{H_e, H\delta} = 1.46$ Hz), 7.19 (m, 1H, H _{δ}), 4.82 (d, 1H, H₁, $J_{H_1, H_2} = 3.88$ Hz), 4.62-4.00 (m, 21H, D _{α} {4.58}, H _{α} {4.56}, R _{α} {4.54}, A_{3 α} {4.49}, A_{2 α} {4.44}, S_{2 α} {4.39}, A_{4 α} {4.32}, S_{1 α} {4.32}, H_{1'} {4.29}, P_{1-5 α} {4.30, 4.28, 4.25, 4.20, 4.19}, V _{α} {4.19}, T_{2,6-ST β} {4.15}, A_{1 α} {4.11}, T_{2,6-ST α} {4.08}, T_{2 β} {4.07}, T_{1 β} {4.06}, H₂ {4.06}), 3.97 (m, 1H, H_{5'} {3.97}), 3.94-3.38 (m, 46H, T_{1 α} {3.88}, T_{2 α} {3.85}, G_{1 α} {3.86}, H₃ {3.86}, G_{1 α} {3.85}, H_{6'ab} {3.76}, 4x CH₂O-Spacer {3.75}, H_{4'} {3.74}, S_{2 β} {3.74}, H₅ {3.70}, G_{2 α} {3.70}, S_{1 β} {3.67}, 3-CH₂-Spacer {3.65}, H_{6ab} {3.63}, H_{6''} {3.58}, H_{9a''} {3.56}, H_{7''} {3.54}, P_{1-5 δ} {3.56, 3.53, 3.49, 3.45}, H_{9b''} {3.56}, H_{4''} {3.55}, H_{8''} {3.52}, H₄ {3.50}, H_{5''} {3.49}, H_{3'} {3.45}), 3.35 (m, 1H, H_{2'}), 3.18 (dd, 1H, H _{β a}, $J_{H\beta a, H\alpha} = 5.68$ Hz, $J_{H\beta a, H\beta b} = 15.30$ Hz), 3.11–3.01 (m, 7H, CH₂-Spacer {3.09}, R _{δ} {3.07}, H _{β b} {3.06}, D _{β a} {3.05}), 2.80 (m, 1H, D _{β b}), 2.61 (t, 2H, 12-CH₂-Spacer, $J_{CH_2, CH_2} = 6.36$ Hz), 2.57-2.46 (m, 3H, CH₂-Spacer, $J_{CH_2, CH_2} = 5.88$ Hz {2.55}, H_{3 $_{eq}$ '}} {2.50}), 2.27-2.05 (m, 5H, P_{1,2 β a} {2.18, 2.15}, CH₂-Spacer {2.15}), 2.03-1.66 (m, 26H, P_{3-5 β a} {1.96, 1.90, 1.86}, V _{β} {1.95}, P_{1-5 γ} {1.94, 1.91, 1.86}, P_{1-5 β b} {1.92, 1.89, 1.82, 1.78, 1.74}, AcNH (2x s, 1.88, 1.86), R _{β a} {1.74}), 1.65-1.47 (m, 4H, H_{3 $_{ax}$ '}} {1.58}, R _{β b} {1.57}, R _{γ} {1.54}), 1.26-1.18 (m, 12H, A_{2 β} , A_{3 β} {1.24}, {1.23 d, A_{4 β} , $J_{A\beta, A\alpha} = 6.96$ Hz}, {1.20, d, A_{1 β} , $J_{A\beta, A\alpha} = 7.24$ Hz}), 1.15 (d, 3H, T_{2,6-ST γ} , $J_{T\gamma, T\beta} = 6.56$ Hz), 1.07 (d, 3H, T_{2 γ} , $J_{T\gamma, T\beta} = 6.54$ Hz), 1.05 (d, 3H, T_{1 γ} , $J_{T\gamma, T\beta} = 6.50$ Hz), 0.83 (t, 6H, V _{γ} , $J_{V\gamma, V\beta} = 6.92$ Hz).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC): δ (ppm):

175.80, 174.89, 174.37, 173.97, 173.90, 173.71, 173.53, 173.47, 173.19, 173.08, 172.65, 172.49, 172.33, 172.27, 171.99, 171.93, 171.56, 171.50, 171.34, 171.22, 171.18, 171.11, 170.91, 170.68 (C=O, C=O-Acetyl, C1'), 156.63 (C=NH), 133.43 (H_{C2}), 128.33 (H_{C5}), 117.68 (H_{C4}), 104.57 (C1'), 99.30 (C2''), 99.01 (C1), 76.91 (T_{2,6-ST* β}), 74.97 (C4'), 72.74 (C6''), 72.69 (C3'), 70.99 (C7''), 70.97 (C5'), 70.53 (C2'), 69.56 (C9''), 69.49, 60.44, 69.39 (CH₂-Spacer), 68.53 (C3), 68.51 (C4), 68.24 (C8''), 66.97 (T_{1 β}), 66.97 (C5), 66.51 (C4''), 66.29 (C6), 66.03 (T_{2 β}), 62.82 (C6'), 61.40, 61.38 (S_{1 β} , S_{2 β}), 61.15, 61.02, 60.75, 60.03, 59.96 (P_{1-5 α}), 59.32 (T_{2 α} , T_{1 α}), 59.29 (V _{α}), 58.87 (T_{2,6-ST* α}), 56.94 (S_{2 α}), 55.51 (S_{1 α}), 52.29 (C5''), 51.69 (H _{α}), 51.07 (R _{α}), 50.09 (D _{α}), 49.58 (C2), 48.14 (A_{3 α}), 48.02 (A_{4 α}), 47.83 (A_{1 α}), 47.73, 47.68, 47.63, 47.38 (P_{1-5 δ}), 42.40 (G_{2 α}), 42.36 (G_{1 α}), 42.28 (CH₂-Spacer), 40.48 (R _{δ}), 40.48

(C3"), 40.26 (CH₂-Spacer), 39.01 (D_β), 30.21 (V_β), 29.96, 29.62, 29.30, 29.25 (P_{1-5β}), 28.70 (R_β), 27.42 (H_β), 24.69, 24.60, 24.51, 24.30 (P_{1-5γ}), 23.94 (R_γ), 22.26, 21.99 (CH₃-AcNH), 18.79 (T_{1γ}), 18.71 (T_{2γ}), 18.46 (V_{γa}), 18.29 (T_{2,6ST*γ}), 17.79 (V_{γb}), 16.27, 15.14, 15.07, 15.04 (A_{1-4β}).

12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (68)

(AcS-{OEG}-COOtBu)¹¹⁴

Eine Lösung von 3.7 g (48.5 mmol) frisch destillierter Thioessigsäure in 80 ml Methanol wird portionsweise unter Rühren mit 13.32 g (40.7 mmol) Cäsiumcarbonat versetzt. Nach Abklingen der Gasentwicklung wird weitere 15 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Das Methanol wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das auf diese Weise erhaltene, leicht gelbliche Cäsiumthioacetat wird in 100 ml DMF aufgenommen und mit 12.86 g (36.1 mmol) 12-Methansulfonyloxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**49**) versetzt. Die Lösung wird 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt und dann i.Vak. auf das halbe Volumen eingengt. Die Lösung wird in 300 ml Ethylacetat aufgenommen und mit je zweimal 50 ml Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (Cyclohexan/EE 3:1) gereinigt.

Ausbeute.: 8.62 g (25.63 mmol, 71%); farbloses Öl; R_f = 0.17 (Cyclohexan/EE 3:1).

C₁₅H₂₈O₆S (M = 336.44 g/mol) [336.16].

FD-MS, m/z: 337.7 ([M+H]⁺, ber.: 337.2).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.68 (t, 2H, OCH₂, J_{CH₂,CH₂} = 6.6 Hz), 3.61-3.52 (m, 10H, 5x OCH₂), 3.06 (t, 2H, -SCH₂-, J_{CH₂,CH₂} = 6.2 Hz), 2.47 (t, 2H, COCH₂, J_{CH₂,CH₂} = 6.6 Hz), 2.30 (s, 3H, CH₃ (SAc)), 1.42 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 195.49 (C=O), 170.87 (C=O-O*t*Bu), 80.47 (C(CH₃)₃), 70.53, 70.50, 70.35, 70.30, 69.74 (CH₂), 66.89 (3-CH₂), 36.25 (2-CH₂), 30.53 (SCH₂), 28.81 (CH₃-Ac).

12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure (69)

(AcS-{OEG}-COOH)¹¹⁴

Eine Lösung von 6.4 g (19.0 mmol) 12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**68**) in 20 ml Dichlormethan wird mit 50 ml Trifluoressigsäure versetzt und

90 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Die Trifluoressigsäure wird i. Vak. abdestilliert und das zurückbleibende Öl zweimal mit Toluol kodestilliert. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (EE/MeOH 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 5.32 g (19.0 mmol, quant.); leicht gelbliches Öl; $R_f = 0.50$ (EE/MeOH 2:1).

$C_{11}H_{20}O_6S$ ($M = 280.34$ g/mol) [280.10].

ESI-MS (negativ), m/z : 279.04 ($[M-H]^-$, ber.:279.10).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.47 (bs, 1H, COOH), 3.75 (t, 2H, OCH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 6.2$ Hz), 3.58-3.51 (m, 10H, 5x OCH_2), 3.06 (t, 2H, $-SCH_2-$, $J_{CH_2,CH_2} = 6.6$ Hz), 2.63 (t, 2H, $COCH_2$, $J_{CH_2,CH_2} = 6.2$ Hz), 2.31 (s, 3H, CH_3 -SAc).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 195.93 (COS), 70.40, 70.31, 70.25, 70.12, 69.77 (CH_2), 66.34 (3- CH_2), 34.68 (2- CH_2), 30.51 (SCH₂), 28.64 (CH_3 -Ac).

12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-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- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl)]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (70)

(AcS-(CH_2CH_2O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)- β Ac₂GalBn-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-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 (**54**) (Rapp Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) erfolgt die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der Aminosäure *Fmoc*-Ser(OtBu)-OH wird die glycosylierten Aminosäure **34** manuell verknüpft. 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 302 mg (0.2 mmol, 2 eq.) des 2,3-Sialyl-T-Threonin-Konjugats **34**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55 μ L (0.5 mmol, 5 eq.) *N*-Methylmorpholin (NMM) in 2 ml *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und es wird 5 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 des Synthesizers gekuppelt. Die

N-terminale Fmoc-Schutzgruppe an Glycin wird mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten.

Es werden 281 mg (1 mmol) 12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure **69**, 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 und im Stickstoffstrom getrocknet. Noch verbliebene Lösungsmittelreste werden i. Hochvak. entfernt. In einem *Merrifield*-Glasreaktor wird das Harz 1.5 h mit einer Mischung aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Triisopropylsilan und 1 ml H₂O geschüttelt. Es wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 2 ml Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 mL Toluol versetzt und i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 15 ml Toluol kodestilliert und die Lösung schließlich i. Vak. auf ca. 0.5 ml eingeeengt. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von 20 ml eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Rohpeptid wird durch präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm, *R*_t = 32.5 min) gereinigt.

Ausbeute: 118.8 mg (0.036 mmol, 36 %, farbloses Lyophilisat, *R*_t = 18.1 min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₄₆H₂₁₃N₂₇O₅₉S (M = 3322.46 g/mol) [3320.42 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1661.60 ([M+2H]²⁺, ber.: 1661.21), 1108.06 ([M+3H]³⁺, ber.: 1107.81).

4,7,10-Trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3-*O*-{(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl)]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (72)

(CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→3)- β Gal-(1→3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Hydrierung: 88 mg (0.028 mmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-P-A-H-G-V-T(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→3)- β Ac₂GalBn-(1→3)- α Ac₂GalNAc)-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-

T-A-P-OH **70** werden in 5 ml Methanol gelöst. Unter Argon werden 2 Spatelspitzen Pd auf Aktivkohle zugegeben. Der Kolben wird anschließend dreimal mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und jeweils mit Wasserstoff gespült. Man rührt 24 h unter Wasserstoffatmosphäre, bevor man mit einem Spritzenfilter (PTFE) die Pd/C Reste entfernt und 2x mit 5 ml Methanol wäscht. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert. $R_t = 20.7$ min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

C₁₃₀H₁₉₉N₂₇O₅₈ (M = 3068.12 g/mol) [3066.35 g/mol].

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv) m/z : 3067.64 ([M+H]⁺, ber.: 3067.35).

Deacetylierung:

77 mg (max. 0.025 mmol) des rohen Glycopeptids **71**, werden in 5 ml wässriger NaOH-Lösung (80 mg NaOH in 500 ml entionisiertem Wasser (c = 0.004 mol/l), pH = 11.5) gelöst und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 100 μ L 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (5:95) → (50:50), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 33.0$ min) gereinigt.

Ausbeute: 23 mg (0.0084 mmol, 30 % über 2 Stufen), farbloses Lyophilisat, $R_t = 11.1$ min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (5:95)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm), $[\alpha]_{24}^D = -95.4$ (c = 0.35 g/100 ml, H₂O).

C₁₁₄H₁₈₃N₂₇O₅₀ (M = 2731.82 g/mol) [2730.26 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z : 1366.16 ([M+2H]²⁺, ber. 1366.13).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.50 (d, 1H, H_e, $J_{H_e, H_\delta} = 1.34$ Hz), 7.21 (m, 1H, H _{δ}), 4.86 (d, 1H, H₁, $J_{H_1, H_2} = 3.48$ Hz), 4.68-4.03 (m, 23H, D _{α} {4.63}, H _{α} {4.58}, R _{α} {4.54}, A_{3 α} {4.51}, A_{2 α} {4.423}, S_{2 α} {4.42}, H_{1'} {4.35}, A_{4 α} {4.34}, S_{1 α} {4.33}, P_{1-5 α} {4.28, 4.27, 4.25, 4.23, 4.21}, V _{α} {4.20}, T_{2,3-ST β} {4.19}, T_{2,3-ST α} {4.18}, H₂ {4.09}, T_{2 β} {4.13}, A_{1 α} {4.12}, T_{1 β} {4.06}, H_{5'} {4.05}), 4.00-3.43 (m, 48H, T_{1 α} {3.95}, T_{2 α} {3.91}, G_{1 $\alpha\alpha$} {3.88}, H₃ {3.86}, G_{1 $\alpha\beta$} {3.83}, H_{6'}_{a,b} {3.79}, 4x CH₂O-Spacer {3.77}, S_{2 β} {3.73}, H₅ {3.70}, G_{2 α} {3.69}, S_{1 β} {3.66}, 3-CH₂-Spacer {3.64}, H_{4''} {3.61}, H_{6 $\alpha\beta$} {3.60}, H_{4'} {3.58}, H_{6''} {3.56}, H_{9 α ''} {3.54}, H_{7''} {3.52}, P_{1-5 δ} {3.58, 3.55, 3.52, 3.50}, H_{9 β ''} {3.55}, H_{8''} {3.49}, H₄ {3.47}, H_{5''} {3.45}, H_{3'} {3.44}), 3.39 (dd, 1H, H_{2'}, $J_{H_2', H_1'} = 7.61$ Hz, $J_{H_2', H_3'} = 9.76$ Hz), 3.19 (dd, 1H, H _{$\beta\alpha$} , $J_{H_{\beta\alpha}, H_\alpha} = 5.64$ Hz, $J_{H_{\beta\alpha}, H_{\beta\beta}} = 15.60$ Hz), 3.13–3.01 (m, 7H, R _{δ} {3.09}, CH₂-Spacer {3.08}, H _{$\beta\beta$} {3.06}, D _{$\beta\alpha$} {3.04}), 2.82 (m, 1H, D _{$\beta\beta$}), 2.70-2.48 (m, 5H, 12-CH₂-Spacer {2.63}, H_{3 eq ''} {2.62}, CH₂-Spacer {2.57}), 2.30-2.06 (m, 4H, CH₂-Spacer {2.18}, P_{1,2 $\beta\alpha$} {2.14, 2.10}), 2.05-1.46 (m, 30H, P_{3-5 $\beta\alpha$} {2.01, 1.98, 1.95}, V _{β} {1.95}, P_{1-5 γ} {1.93, 1.88, 1.83}, P_{1-5 $\beta\beta$} {1.91, 1.84, 1.79, 1.75, 1.71}, AcNH (2x s, 1.90,

1.88}, R_{βa} {1.75}, H_{3ax}" {1.69}, R_{βb} {1.58}, R_γ {1.56}), 1.30-1.18 (m, 12H, {1.26 d, A_{2β}, J_{Aβ,Aα} = 6.08 Hz}, A_{3β} {1.24}, {1.24 d, A_{4β}, J_{Aβ,Aα} = 6.88 Hz}, {1.21, d, A_{1β}, J_{Aβ,Aα} = 7.28 Hz}), 1.14 (d, 3H, T_{2,3-STγ}, J_{Tγ,Tβ} = 6.24 Hz), 1.08 (d, 3H, T_{2γ}, J_{Tγ,Tβ} = 6.64 Hz), 1.05 (d, 3H, T_{1γ}, J_{Tγ,Tβ} = 6.48 Hz), 0.91 (m, 3H, CH₃-Spacer), 0.89-0.81 (m, 6H, V_γ).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC): δ (ppm):

175.81, 174.95, 174.89, 174.79, 174.38, 173.94, 173.74, 173.48, 173.15, 173.10, 172.91, 172.64, 172.49, 172.36, 171.93, 171.53, 171.43, 171.21, 171.12, 170.90, 170.87, 170.69 (C=O, C=O-Acetyl, C1"), 156.66 (C=NH), 133.43 (H_{C2}), 128.38 (H_{C5}), 117.30 (H_{C4}), 104.44 (C1'), 99.19 (C2"), 99.08 (C1), 77.47 (T_{2,3-ST*β}), 74.99 (C4'), 72.88 (C6"), 72.48 (C3'), 71.48 (C7"), 70.93 (C5'), 70.43 (C2'), 70.10 (C9"), 69.57, 69.50, 69.45, 69.42 (CH₂-Spacer), 68.17 (C3), 68.06 (C4), 67.96 (C8"), 67.35 (T_{1β}), 66.99 (C5), 66.67 (C4"), 66.30 (C6), 66.06 (T_{2β}), 63.11 (C6'), 61.40, 61.26 (S_{1β}, S_{2β}), 61.15, 61.02, 60.94, 60.76, 60.50 (P_{1-5α}), 60.05 (T_{2α}), 59.97 (T_{1α}), 59.36 (V_α), 58.88 (T_{2,3-ST*α}), 57.00 (S_{2α}), 55.54 (S_{1α}), 52.27, 52.00, 51.61 (C5", H_α, R_α), 50.09 (D_α), 49.61 (C2), 48.20 (A_{3α}), 48.04 (A_{4α}), 47.86 (A_{1α}), 47.75, 47.66, 47.61, 47.39 (P_{1-5δ}), 42.39, 42.31 (G_{2α}, G_{1α}), 40.51 (R_δ), 39.04 (CH₂-Spacer), 38.80 (C3"), 30.24 (V_β), 29.65, 29.32, 29.27, 29.19 (P_{1-5β}), 28.75 (R_β), 27.46 (H_β), 24.72, 24.61, 24.53, 24.33 (P_{1-5γ}), 23.96 (R_γ), 22.35, 22.02 (CH₃-AcNH), 18.82 (T_{1γ}), 18.73 (T_{2γ}), 18.48 (V_{γa}), 18.35 (T_{2,3-ST*γ}), 18.1 (CH₃-Spacer), 17.85 (V_{γb}), 16.28, 15.18, 15.07 (A_{1-4β}).

12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-benzyl-β-D-galactopyranosyl]-6-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-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (73)

(AcS(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βAc₃BnGal-(1→3)-[αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-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 (**54**) (Rapp Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) erfolgt die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der Aminosäure Fmoc-Ser(OtBu)-OH wird die glycosylierten Aminosäure **37** manuell verknüpft. 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 294 mg (0.2 mmol, 2 eq.) des 2,6-Sialyl-T-Threonin-Konjugats **37**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55 μ L (0.5 mmol, 5 eq.) *N*-Methylmorpholin (NMM) in 2 ml *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und es wird 5 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 des Synthesizers gekuppelt. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe an Glycin wird mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Es werden 281 mg (1 mmol) 12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxadodecansäure **69**, 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 und im Stickstoffstrom getrocknet. Noch verbliebene Lösungsmittelreste werden i. Hochvak. entfernt. In einem *Merrifield*-Glasreaktor wird das Harz 1.5 h mit einer Mischung aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Triisopropylsilan und 1 ml H₂O geschüttelt. Es wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 2 ml Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 mL Toluol versetzt und i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 15 ml Toluol kodestilliert und die Lösung schließlich i. Vak. auf ca. 0.5 mL eingeeengt. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von 20 ml eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Rohpeptid wird durch präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 34.8 min) gereinigt.

Ausbeute: 139.7 mg (0.043 mmol, 43 %, farbloses Lyophilisat, R_t = 17.4 min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₄₄H₂₁₁N₂₇O₅₈S (M = 3280.43 g/mol) [3278.41 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1640.68 ([M+2H]²⁺, ber.: 1640.21), 1094.24 ([M+3H]³⁺, ber.: 1093.80), 820.97 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 820.60).

4,7,10-Trioxa-dodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (75)

(CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal-(1 \rightarrow 3)-[α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)]- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Hydrierung: 53 mg (0.016 mmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-P-A-H-G-V-T(β Ac₃BnGal-(1 \rightarrow 3)-[α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α GalNAc)-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P-OH **73** werden in 5 ml Methanol gelöst. Unter Argon werden 2 Spatelspitzen Pd auf Aktivkohle zugegeben. Der Kolben wird anschließend dreimal mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und jeweils mit Wasserstoff gespült. Man rührt 24 h unter Wasserstoffatmosphäre, bevor man mit einem Spritzenfilter (PTFE) die Pd/C Reste entfernt und 2x mit 5 ml Methanol wäscht. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert. $R_t = 16.7$ min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (5:95) \rightarrow (100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

C₁₂₈H₁₉₇N₂₇O₅₇ (M = 3026.08 g/mol) [3024.33 g/mol].

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1009.12 ([M+2H]²⁺, ber.: 1009.11).

Deacetylierung:

Das rohe Glycopeptid **74** wird in 5 ml wässriger NaOH-Lösung (80 mg NaOH in 500 ml entionisiertem Wasser (c = 0.004 mol/l), pH = 11.5) gelöst und 11 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 100 μ l 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (5:95) \rightarrow (100:0), 80 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 21.1$ min) gereinigt.

Ausbeute: 34 mg (0.013 mmol, 81 % über 2 Stufen), farbloses Lyophilisat, $R_t = 11.2$ min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (5:95) \rightarrow (100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm), $[\alpha]_{24}^D = -64.9$ (c = 0.80 g/100 ml, H₂O).

C₁₁₄H₁₈₃N₂₇O₅₀ (M = 2731.82 g/mol) [2730.26 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1366.20 ([M+2H]²⁺, ber. 1366.13).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv) m/z: 2733.33 ([M+H]⁺, ber.: 2731.26).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.50 (d, 1H, H_e, $J_{H_e, H_8} = 1.48$ Hz), 7.21 (m, 1H, H₈), 4.82 (d, 1H, H₁, $J_{H_1, H_2} = 3.92$ Hz), 4.62-4.00 (m, 21H, D _{α} {4.58}, H _{α} {4.56}, R _{α} {4.54}, A_{3 α} {4.49}, A_{2 α} {4.44}, S_{2 α} {4.39}, A_{4 α} {4.32}, S_{1 α} {4.32}, H_{1'} {4.29}, P_{1-5 α} {4.30, 4.28, 4.25, 4.20, 4.19}, V _{α} {4.19}, T_{2,6-ST β} {4.15},

$A_{1\alpha}$ {4.11}, $T_{2,6-ST\alpha}$ {4.08}, $T_{2\beta}$ {4.07}, $T_{1\beta}$ {4.06}, H_2 {4.06}), 3.97 (m, 1H, H_5' {3.97}), 3.94-3.38 (m, 46H, $T_{1\alpha}$ {3.88}, $T_{2\alpha}$ {3.85}, $G_{1\alpha\alpha}$ {3.86}, H_3 {3.86}, $G_{1\alpha\beta}$ {3.85}, $H_6'_{a,b}$ {3.76}, 4x CH_2O -Spacer {3.75}, H_4' {3.74}, $S_{2\beta}$ {3.74}, H_5 {3.70}, $G_{2\alpha}$ {3.70}, $S_{1\beta}$ {3.67}, 3- CH_2 -Spacer {3.65}, $H_{6,a,b}$ {3.63}, H_6'' {3.58}, H_{9a}'' {3.56}, H_7'' {3.54}, $P_{1-5\delta}$ {3.56, 3.53, 3.49, 3.45}, H_{9b}'' {3.56}, H_4'' {3.55}, H_8'' {3.52}, H_4 {3.50}, H_5'' {3.49}, H_3' {3.45}), 3.35 (m, 1H, H_2'), 3.18 (dd, 1H, $H_{\beta a}$, $J_{H_{\beta a}, H_{\alpha}} = 5.68$ Hz, $J_{H_{\beta a}, H_{\beta b}} = 15.30$ Hz), 3.11–3.01 (m, 7H, CH_2 -Spacer {3.09}, R_{δ} {3.07}, $H_{\beta b}$ {3.06}, $D_{\beta a}$ {3.05}), 2.80 (m, 1H, $D_{\beta b}$), 2.61 (t, 2H, 12- CH_2 -Spacer, $J_{CH_2, CH_2} = 6.36$ Hz), 2.57-2.46 (m, 3H, CH_2 -Spacer, $J_{CH_2, CH_2} = 5.88$ Hz {2.55}, H_{3eq}'' {2.50}), 2.27-2.05 (m, 5H, $P_{1,2\beta a}$ {2.18, 2.15}, CH_2 -Spacer {2.15}), 2.03-1.66 (m, 26H, $P_{3-5\beta a}$ {1.96, 1.90, 1.86}, V_{β} {1.95}, $P_{1-5\gamma}$ {1.94, 1.91, 1.86}, $P_{1-5\beta b}$ {1.92, 1.89, 1.82, 1.78, 1.74}, $AcNH$ (2x s, 1.88, 1.86}, $R_{\beta a}$ {1.74}), 1.65-1.47 (m, 4H, H_{3ax}'' {1.58}, $R_{\beta b}$ {1.57}, R_{γ} {1.54}), 1.28-1.19 (m, 12H, $A_{2\beta}$ {1.25}, $A_{3\beta}$ {1.24}, {1.24, d, $A_{4\beta}$, $J_{A_{\beta}, A_{\alpha}} = 7.12$ Hz}, {1.21, d, $A_{1\beta}$, $J_{A_{\beta}, A_{\alpha}} = 7.24$ Hz}), 1.17 (d, 3H, $T_{2,6-ST\gamma}$, $J_{T_{\gamma}, T_{\beta}} = 6.04$ Hz), 1.07 (d, 3H, $T_{2\gamma}$, $J_{T_{\gamma}, T_{\beta}} = 6.48$ Hz), 1.07-1.02 (m, 3H, $T_{1\gamma}$ {1.04}), 0.85 (m, 3H, CH_3 -Spacer), 0.84 (t, 6H, V_{γ} , $J_{V_{\gamma}, V_{\beta}} = 6.68$ Hz).

^{13}C -NMR (400 MHz, D_2O , ^{13}C , HSQC): δ (ppm):

175.80, 174.89, 174.37, 173.97, 173.90, 173.71, 173.53, 173.47, 173.19, 173.08, 172.65, 172.49, 172.33, 172.27, 171.99, 171.93, 171.56, 171.50, 171.34, 171.22, 171.18, 171.11, 170.91, 170.68 (C=O, C=O-Acetyl, C_1''), 156.63 (C=NH), 133.43 (H_{C2}), 128.33 (H_{C5}), 117.68 (H_{C4}), 104.57 (C_1'), 99.30 (C_2''), 99.01 (C_1), 76.91 ($T_{2,6-ST*\beta}$), 74.97 (C_4'), 72.74 (C_6''), 72.69 (C_3'), 70.99 (C_7''), 70.97 (C_5'), 70.53 (C_2'), 69.56 (C_9''), 69.49, 60.44, 69.39 (CH_2 -Spacer), 68.53 (C_3), 68.51 (C_4), 68.24 (C_8''), 66.97 ($T_{1\beta}$), 66.97 (C_5), 66.51 (C_4''), 66.29 (C_6), 66.03 ($T_{2\beta}$), 62.82 (C_6'), 61.40, 61.38 ($S_{1\beta}$, $S_{2\beta}$), 61.15, 61.02, 60.75, 60.03, 59.96 ($P_{1-5\alpha}$), 59.32 ($T_{2\alpha}$, $T_{1\alpha}$), 59.29 (V_{α}), 58.87 ($T_{2,6-ST*\alpha}$), 56.94 ($S_{2\alpha}$), 55.51 ($S_{1\alpha}$), 52.29 (C_5''), 51.69 (H_{α}), 51.07 (R_{α}), 50.09 (D_{α}), 49.58 (C_2), 48.14 ($A_{3\alpha}$), 48.02 ($A_{4\alpha}$), 47.83 ($A_{1\alpha}$), 47.73, 47.68, 47.63, 47.38 ($P_{1-5\delta}$), 42.40 ($G_{2\alpha}$), 42.36 ($G_{1\alpha}$), 42.28 (CH_2 -Spacer), 40.48 (R_{δ}), 40.48 (C_3''), 40.26 (CH_2 -Spacer), 39.01 (D_{β}), 30.21 (V_{β}), 29.96, 29.62, 29.30, 29.25 ($P_{1-5\beta}$), 28.70 (R_{β}), 27.42 (H_{β}), 24.69, 24.60, 24.51, 24.30 ($P_{1-5\gamma}$), 23.94 (R_{γ}), 22.26, 21.99 (CH_3 -AcNH), 18.79 ($T_{1\gamma}$), 18.71 ($T_{2\gamma}$), 18.46 ($V_{\gamma a}$), 18.29 ($T_{2,6ST*\gamma}$), 18.12 (CH_3 -Spacer), 17.79 ($V_{\gamma b}$), 16.27, 15.14, 15.07, 15.04 ($A_{1-4\beta}$).

12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (76)

(AcS(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-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 (**54**) (Rapp Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) erfolgt die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der Aminosäure *Fmoc*-Ser(*Ot*Bu)-OH wird die glycosylierten Aminosäure **22a** manuell verknüpft. 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 235 mg (0.2 mmol, 2 eq.) des Sialyl-T_N-Threonin-Konjugats **22a**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55 μ L (0.5 mmol, 5 eq.) *N*-Methylmorpholin (NMM) in 2 ml *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und es wird 4 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 des Synthesizers gekuppelt. Die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe an Glycin wird mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Es werden 281 mg (1 mmol) 12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure **69**, 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 und im Stickstoffstrom getrocknet. Noch verbliebene Lösungsmittelreste werden i. Hochvak. entfernt. In einem *Merrifield*-Glasreaktor wird das Harz 1.5 h mit einer Mischung aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Triisopropylsilan und 1 ml H₂O geschüttelt. Es wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 2 ml Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 ml Toluol versetzt und i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 15 ml Toluol kodestilliert und die Lösung schließlich i. Vak. auf ca. 0.5 ml eingeeengt. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von 20 ml eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Rohpeptid wird durch

präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80)→(100:0), 60 min, λ = 214 nm, R_t = 39.5 min) gereinigt.

Ausbeute: 178 mg (0.060 mmol, 60 %, farbloses Lyophilisat, R_t = 15.0 min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₂₉H₁₉₃N₂₇O₅₂S (M = 2986.13 g/mol) [2984.30 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1493.71 ([M+2H]²⁺, ber.: 1493.15), 996.14 ([M+3H]³⁺, ber.: 995.77).

Di-(sulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-α-glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin) (77)

(S(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α-NeuNAcCOOH-(2→6)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)₂

Entfernung der Kohlenhydratschutzgruppen:

65 mg (0.022 mmol) des Glycopeptids **76**, werden in 5 ml wässriger NaOH-Lösung (80 mg NaOH in 500 ml entionisiertem Wasser (c = 0.004 mol/l), pH = 11.5) gelöst und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 100 µl 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90) → (100:0), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 13.6 min) gereinigt.

Ausbeute: 30.5 mg (0.0059 mmol, 53 %), farbloses Lyophilisat, R_t = 9.3 min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm), [α]₂₄^D = -83.5 (c = 1.00 g/100 ml, H₂O).

C₂₁₆H₃₄₄N₅₄O₉₀S₂ (M = 5201.48 g/mol) [5198.34 g/mol].

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1300.88 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1300.59), 1040.92 ([M+5H]⁵⁺, ber.: 1040.67), 867.60 ([M+6H]⁶⁺, ber.: 867.39).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv) m/z: 2602.67 ([M+2H]²⁺, ber.: 2601.74).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC, TOCSY): δ (ppm):

8.52 (d, 2H, H_ε, J_{H_ε, H_δ} = 1.32 Hz), 7.22 (m, 2H, H_δ), 4.83 (d, 2H, H₁, J_{H₁, H₂} = 3.81 Hz), 4.65-4.05 (m, 42H, D_α {4.61}, H_α {4.57}, R_α {4.51}, A_{3α} {4.49}, A_{2α} {4.43}, S_{2α} {4.40}, S_{1α} {4.35}, A_{4α} {4.34}, P_{1-5α} {4.35, 4.32, 4.30, 4.25, 4.19}, V_α {4.23}, T_{STnα} {4.20}, T_{STnβ} {4.17}, A_{1α} {4.16}, T_{1α} {4.15}, T_{2α} {4.13}, T_{2β} {4.12}, T_{1β} {4.09}), 4.00-3.41 (m, 82H, H₂ {3.94}, G_{1αα} {3.87}, G_{1αβ} {3.83}, H₅ {3.78}, 4x CH₂O-Spacer {3.76}, S_{2β} {3.77}, G_{2α} {3.74}, H₃ {3.71},

S_{1β} {3.69}, 3-CH₂-Spacer {3.67}, H_{6_{a,b}} {3.63}, H₄ {3.62}, H₆" {3.62}, H_{9_a"} {3.61}, H₇" {3.59}, P_{1-5δ} {3.59, 3.55, 3.51, 3.49}, H_{9_b"} {3.58}, H₄" {3.57}, H₈" {3.53}, H₅" {3.51}), 3.21 (dd, 2H, H_{β_a}, $J_{Hβ_a, Hα} = 5.92$ Hz, $J_{Hβ_a, Hβ_b} = 15.60$ Hz), 3.14–3.03 (m, 14H, CH₂-Spacer {3.09}, H_{β_b} {3.11}, D_{β_a} {3.07}, R_δ {3.06}), 2.90-2.74 (m, 6H, D_{β_b} {2.82}, t, S-CH₂-Spacer, $J_{S-CH_2.CH_2} = 6.03$ Hz {2.82}), 2.70-2.49 (m, 6H, CH₂-Spacer {2.58}, H_{3_{eq}"} {2.54}), 2.29-2.08 (m, 8H, P_{1,2β_a} {2.21, 2.19}, CH₂-Spacer {2.17}), 2.04-1.68 (m, 52H, P_{3-5β_a} {1.97, 1.90, 1.84}, V_β {1.98}, P_{1-5γ} {1.93-1.85}, P_{1-5β_b} {2.01, 1.95, 1.91, 1.88, 1.87}, AcNH (2x s, 1.91}, R_{β_a} {1.74}), 1.67-1.47 (m, 8H, R_{β_b} {1.59}, H_{3_{ax}"} {1.56}, R_γ {1.53}), 1.30-1.20 (m, 24H, A_{2β} {1.25}, {1.27, d, A_{3β} $J_{Aβ,Aα} = 5.92$ Hz}, {1.25 d, A_{4β}, $J_{Aβ,Aα} = 7.04$ Hz}, {1.23, d, A_{1β}, $J_{Aβ,Aα} = 7.48$ Hz}), 1.18 (d, 6H, T_{STnγ}, $J_{Tγ,Tβ} = 6.52$ Hz), 1.09 (d, 6H, T_{2γ}, $J_{Tγ,Tβ} = 6.44$ Hz), 1.07 (d, 6H, T_{1γ}, $J_{Tγ,Tβ} = 5.84$ Hz), 0.86 (d, 6H, V_γ, $J_{Vγ_a,Vβ} = 6.40$ Hz), 0.84 (d, 6H, V_γ, $J_{Vγ_b,Vβ} = 6.48$ Hz).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, HSQC, HMBC): δ (ppm):

174.91, 174.89, 174.37, 173.99, 173.70, 173.59, 173.47, 173.17, 173.09, 172.92, 172.60, 172.54, 172.33, 171.98, 171.93, 171.53, 171.35, 171.20, 171.10, 170.89, 170.68 (C=O, C=O-Acetyl, C1"), 133.45 (H_{C2}), 128.27 (H_{C5}), 117.34 (H_{C4}), 99.25 (C2"), 99.18 (C1), 77.51 (T_{STn*β}), 72.61 (C6"), 71.59 (C7"), 69.41 (C9"), 69.35 (CH₂-Spacer), 68.23 (C3), 68.20 (C4), 68.16 (C8"), 66.98 (T_{1β}), 66.97 (C5), 66.56 (C4"), 66.23 (C6), 66.05 (T_{2β}), 61.47, 61.43 (S_{1β}, S_{2β}), 61.14, 60.53, 60.45, 60.03, 59.96 (P_{1-5α}), 59.48 (T_{2α}), 59.39 (T_{1α}), 59.35 (V_α), 58.92 (T_{STn*α}), 56.97 (S_{2α}), 55.51 (S_{1α}), 52.27 (C5"), 51.78 (H_α), 51.09 (R_α), 50.14 (D_α), 49.60 (C2), 49.49 (A_{3α}), 48.02 (A_{4α}), 47.85 (A_{1α}), 47.74, 47.64, 47.58, 47.38 (P_{1-5δ}), 42.35 (G_{2α}), 42.21 (G_{1α}), 42.15 (CH₂-Spacer), 40.47 (R_δ), 40.42 (C3"), 39.00 (D_β), 37.18 (S-CH₂-Spacer), 31.00 (V_β), 30.10, 30.07, 29.63, 29.30, 29.26 (P_{1-5β}), 29.15 (R_β), 27.41 (H_β), 24.69, 24.66, 24.65, 24.52, 24.31 (P_{1-5γ}), 23.95 (R_γ), 22.20, 21.96, 20.61 (CH₃-AcNH), 18.27 (T_{1γ}), 18.71 (T_{2γ}), 18.41 (V_{γ_a}), 18.31 (T_{STn*γ}), 17.73 (V_{γ_b}), 16.27, 15.15, 15.07, 15.03 (A_{1-4β}).

5.4 Synthesen zu Kapitel 3.4

1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (79)

(EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette werden 1.21 μ l (1.41 mg, 0.0082 mmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (78) zu einer Lösung von 21.1 mg (0.0078 mmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH 59 in 5 ml einer Mischung aus Ethanol/H₂O (1:1) pipettiert. In Abständen von jeweils 2 min werden 5 μ l einer ges. Na₂CO₃-Lösung zugegeben, bis ein pH von 8 erreicht ist (Zugabe von insgesamt von 25 μ l). Nach 1.5 h Rühren bei Raumtemp. (Reaktionskontrolle durch analyt. RP-HPLC) wird die Reaktionsmischung durch Zugabe von 100 μ l 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das als Quadratsäuremonoester funktionalisierte Glycopeptid wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter C18, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90) \rightarrow (25:75), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 27.2 min) gereinigt.¹¹²

Ausbeute: 21.0 mg (7.75 μ mol, 95%), farbloses Lyophilisat, R_t = 17.0 min (Phenomenex Jupiter, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (10:90) \rightarrow (25:75), 30 min, λ = 214 nm), $[\alpha]_{23}^D = -47.2$ (c = 1.00 g/100 ml, H₂O)

C₁₁₄H₁₇₈N₂₈O₄₈ (M = 2708.79 g/mol) [2707.23 g/mol]

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv) m/z: 2710.29 ([M+H]⁺, ber.: 2708.23).

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1354.62 ([M+2H]²⁺, ber.: 1354.62).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.50 (d, 1H, H_e, $J_{H_e, H_\delta} = 1.44$ Hz), 7.21 (d, 1H, H _{δ} , $J_{H_\delta, H_e} = 1.11$ Hz), 4.81 (d, 1H, H₁, $J_{H_1, H_2} = 3.60$ Hz), 4.62-4.04 (m, 23H, D _{α} {4.60}, CH₂O-Squarat {4.59}, H _{α} {4.57}, R _{α} {4.52}, A_{3 α} {4.47}, A_{2 α} {4.44}, S_{2 α} {4.38}, A_{4 α} {4.34}, S_{1 α} {4.31}, P_{1-5 α} {4.28, 4.26, 4.23, 4.19, 4.17}, V _{α} {4.19}, T_{STn α} {4.17}, T_{STn β} {4.14}, A_{1 α} {4.12}, T_{1 α} {4.10}, T_{2 α} {4.08}, T_{2 β} {4.06}, T_{1 β} {4.05}), 3.97-3.59 (m, 23H, H₂ {3.94}, G_{1 α} {3.88}, G_{1 α} β {3.86}, H₅ {3.77}, 4x CH₂O-Spacer {3.76}, S_{2 β} {3.74}, G_{2 α} {3.71}, H₃ {3.69}, S_{1 β} {3.67}, 3-CH₂-Spacer {3.66}, H_{6 α, β} {3.64}), 3.58-

3.29 (m, 18H, H4 {3.57}, H6" {3.56}, H9_a" {3.56}, H7" {3.55}, P_{1-5δ} {3.56, 3.53, 3.48, 3.44}, H9_b" {3.54}, H4" {3.53}, H8" {3.52}, H5" {3.48}), 3.18 (d, 1H, H_{βa}, $J_{Hε, Hα} = 5.88$ Hz), 3.12–3.02 (m, 7H, CH₂-Spacer {3.08}, H_{βb} {3.08}, D_{βa} {3.07}, R_δ {3.04}), 2.81 (m, 1H, D_{βb}), 2.60 (t, 2H, 12-CH₂-Spacer, $J_{CH_2, CH_2} = 6.32$ Hz), 2.57–2.48 (m, 3H, H3_{eq}" {2.54}, CH₂-Spacer {2.53}), 2.26–2.07 (m, 4H, P_{1,2βa} {2.22, 2.19}, CH₂-Spacer {2.14}), 2.01–1.67 (m, 26H, P_{3-5βa} {1.97, 1.89, 1.84}, V_β {1.96}, P_{1-5γ} {1.95–1.81}, P_{1-5βb} {2.00, 1.96, 1.91, 1.87, 1.83}, AcNH (2x s, 1.89, 1.89}, R_{βa} {1.76}), 1.65–1.47 (m, 7H, R_{βb} {1.60}, H3_{ax}" {1.55}, R_γ {1.53}, CH₃CH₂-Squarat {1.49}), 1.33–1.19, (m, 12H, A_{2β}, {1.25, d, A_{3β} $J_{Aβ, Aα} = 7.0$ Hz}, {1.23 d, A_{4β}, $J_{Aβ, Aα} = 7.28$ Hz}, {1.20, d, A_{1β}, $J_{Aβ, Aα} = 7.28$ Hz}), 1.16 (d, 3H, T_{STnγ}, $J_{Tγ, Tβ} = 6.16$ Hz), 1.08 (d, 3H, T_{2γ}, $J_{Tγ, Tβ} = 6.50$ Hz), 1.05 (d, 3H, T_{1γ}, $J_{Tγ, Tβ} = 6.44$ Hz), 0.84 (d, 3H, V_γ, $J_{Vγa, Vβ} = 6.52$ Hz), 0.82 (d, 3H, V_γ, $J_{Vγb, Vβ} = 6.44$ Hz).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC): δ (ppm):

189.01 (C=O-Squarat), 174.90, 174.81, 174.33, 173.90, 173.69, 173.59, 173.48, 173.16, 173.10, 172.91, 172.63, 172.55, 172.29, 171.95, 171.90, 171.56, 171.38, 171.25, 171.17, 170.84, 170.66 (C=O, C=O-Acetyl, C1"), 156.21 (O-C=C-Squarat), 136.39 (C=C-N-Squarat), 133.43 (H_{C2}), 129.02 (H_{C5}), 117.31 (H_{C4}), 99.20 (C2"), 99.03 (C1), 77.55 (T_{STn*β}), 72.56 (C6"), 71.71 (C7"), 69.23 (C9"), 69.09 (CH₂-Spacer), 68.23 (C3), 68.18 (C4), 68.11 (C8"), 66.96 (T_{1β}), 66.93 (C5), 66.58 (C4"), 66.29 (C6), 66.07 (T_{2β}), 61.46, 61.42 (S_{1β}, S_{2β}), 61.28 (CH₂-Squarat), 61.09, 60.76, 60.51, 60.15, 59.99 (P_{1-5α}), 59.47 (T_{2α}), 59.34 (T_{1α}), 59.21 (V_α), 58.90 (T_{STn*α}), 56.94 (S_{2α}), 55.49 (S_{1α}), 52.19 (C5"), 51.85 (H_α), 51.11 (R_α), 50.16 (D_α), 49.61 (C2), 49.50 (A_{3α}), 48.01 (A_{4α}), 47.82 (A_{1α}), 47.74, 47.65, 47.59, 47.37 (P_{1-5δ}), 42.33 (G_{2α}), 42.19 (G_{1α}), 42.13 (CH₂-Spacer), 40.48 (R_δ), 40.42 (C3"), 40.36 (CH₂-Spacer), 39.05 (D_β), 31.01 (V_β), 30.14, 30.06, 29.70, 29.29, 29.21 (P_{1-5β}), 29.12 (R_β), 27.38 (H_β), 24.70, 24.63, 24.60, 24.50, 24.29 (P_{1-5γ}), 23.97 (R_γ), 22.21, 21.93, 20.68 (CH₃-AcNH), 18.29 (T_{1γ}), 18.69 (T_{2γ}), 18.42 (V_{γa}), 18.31 (T_{STn*γ}), 17.75 (V_{γb}), 16.28, 15.16, 15.10, 15.05 (A_{1-4β}) 13.78 (CH₃-Squarat).

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH mit Rinderserumalbumin (BSA) (81)

3.0 mg (0.045 μmol) Rinderserumalbumin (BSA) **80** werden in 2 ml einer Lösung aus 65 mg NaH₂PO₄ pro 1 ml H₂O gelöst (pH = 9.5) und mit 3 mg (1.11 μmol, 25 eq.) EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αNeuNAcCOOH-(2→6)-

α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **79** versetzt. Es wird 3d bei Raumtemp. gerührt. Zum Entfernen von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30000 Da) überführt und 10x mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Neoglycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 4 mg, farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z: 74222.4 – 89236.8.

Durch MALDI-TOF Massenspektrometrie wird eine Belegung von 3 - 8 Molekülen **79** pro Molekül BSA ermittelt.

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH mit Tetanus Toxoid (TTox) (83**)**

4.0 mg (0.026 μ mol) Tetanus Toxoid (TTox) **82** werden in 2 ml einer Lösung aus 65 mg NaH₂PO₄ pro 1 ml H₂O gelöst (pH = 9.5) und mit 4 mg (1.48 μ mol, 57 eq.) EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **79** versetzt. Es wird 3d bei Raumtemp. gerührt. Zum Entfernen von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30000 Da) überführt und 10x mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Neoglycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 7.5 mg, farbloses Lyophilisat.

1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl) -2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (84**)**

(EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Gal-(1-3)- α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette werden 1.4 μ l (1.63 mg, 0.0095 mmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (**78**) zu einer Lösung von 20.9 mg (0.0085 mmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Gal-(1-3)- α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **61** in 5 ml einer Mischung aus

Ethanol/H₂O (1:1) pipettiert. In Abständen von jeweils 2 min werden 5 µl einer ges. Na₂CO₃-Lösung zugegeben, bis ein pH von 8 erreicht ist (Zugabe von insgesamt von 25 µl). Nach 1 h Rühren bei Raumtemp. (Reaktionskontrolle durch analyt. RP-HPLC) wird die Reaktionsmischung durch Zugabe von 100 µl 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Quadratsäuremonoester funktionalisierte Glycopeptid wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter C18, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90) → (25:75), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 32.2 min) gereinigt.

Ausbeute: 15.6 mg (6.05 µmol, 64%), farbloses Lyophilisat, R_t = 17.8 min (Phenomenex Jupiter, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(25:75), 30 min, λ = 218 nm), [α]^D₂₂ = -82.3 (c = 1.00 g/100 ml, H₂O)

C₁₀₉H₁₇₁N₂₇O₄₅ (M = 2579.68 g/mol) [2578.19 g/mol]

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv) m/z: 2580.88 ([M+H]⁺, ber.: 2579.19).

ESI-MS (positiv) m/z: 1290.17 ([M+2H]²⁺, ber.: 1290.10), 860.77 ([M+3H]³⁺, ber.: 860.40).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.50 (d, 1H, H_ε, J_{H_ε, H_δ} = 1.34 Hz), 7.20 (d, 1H, H_δ, J_{H_δ, H_ε} = 1.08 Hz), 4.83 (d, 1H, H₁, J_{H₁, H₂} = 3.84 Hz), 4.63-4.03 (m, 24H, D_α {4.59}, CH₂O-Squarat {4.59}, H_α {4.58}, R_α {4.53}, T_{T*α} {4.53}, A_{3α} {4.47}, A_{2α} {4.47}, S_{2α} {4.40}, A_{4α} {4.35}, S_{1α} {4.32}, H_{1'} {4.29}, P_{1-5α} {4.30, 4.29, 4.27, 4.25, 4.23}, V_α {4.19}, T_{T*β} {4.14}, A_{1α} {4.12}, T_{1α} {4.09}, T_{2α} {4.09}, T_{2β} {4.07}, T_{1β} {4.06}), 3.95-3.31 (m, 40H, H_{5'} {3.92}, H₂ {3.89}, H₃ {3.87}, G_{1αab} {3.85}, H₅, H_{4'}, H_{5'} {3.77}, S_{2β} {3.72}, H_{6' a,b} {3.69}, G_{2α} {3.67}, S_{1β} {3.66}, H_{6 a,b} {3.63}, 4x CH₂O-Spacer {3.61}, 3-CH₂-Spacer {3.56}, H₄ {3.53}, P_{1-5δ} {3.57, 3.55, 3.51, 3.49}, H_{3'} {3.46}, H_{2'} {3.38}, 3.20 (m, 1H, H_{βa}), 3.14-3.01 (m, 7H, CH₂-Spacer {3.09}, H_{βb} {3.09}, D_{βa} {3.08}, R_δ {3.05}), 2.80 (m, 3H, D_{βb}, 12-CH₂-Spacer), 2.58 (m, 2H, CH₂-Spacer), 2.28-2.07 (m, 4H, P_{1,2βa} {2.19, 2.16}, CH₂-Spacer {2.17}), 2.06-1.48 (m, 27H, P_{3-5βa} {1.92, 1.91, 1.89}, V_β {1.91}, P_{1-5γ} {1.97-1.78}, P_{1-5βb} {1.90-1.77}, AcNH (s, 1.88), R_{βa} {1.74}), 1.67-1.47 (m, 6H, R_{βb} {1.60}, R_γ {1.56}, CH₃CH₂-Squarat {1.56}), 1.34-1.17 (m, 12H, {1.31, d, A_{2β}, J_{A_β, A_α} = 7.16 Hz}, A_{3β} {1.25}, A_{4β} {1.25}, {1.22, d, A_{1β}, J_{A_β, A_α} = 7.28 Hz}), 1.14 (d, 3H, T_{T*γ}, J_{T_γ, T_β} = 6.28 Hz), 1.08 (d, 3H, T_{2γ}, J_{T_γ, T_β} = 6.56 Hz), 1.06 (d, 3H, T_{1γ}, J_{T_γ, T_β} = 7.16 Hz), 0.84 (t, 6H, V_γ, J_{V_γ, V_β} = 8.31 Hz).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC): δ (ppm):

188.83 (C=O-Squarat), 176.19, 174.94, 174.89, 174.84, 174.44, 174.20, 173.99, 173.77, 173.67, 173.53, 173.51, 173.11, 172.58, 172.42, 172.02, 171.96, 171.51, 171.35, 171.22, 171.14, 170.93, 170.74 (C=O, C=O-Acetyl), 156.70 (C=NH, O-C=C-Squarat), 133.41 (H_{C2}), 128.47 (H_{C5}), 117.29 (H_{C4}), 104.63 (C_{1'}), 99.13 (C₁), 77.07 (T_{T*β}), 76.99 (C₃), 74.93 (C_{4'}),

72.46 (C3'), 70.92 (C5'), 70.57 (C2'), 69.56 (CH₂-Spacer), 68.86 (C2), 68.52 (C4), 66.99 (T_{1β}), 66.11 (C5), 65.96 (T_{2β}), 61.40, 61.26 (S_{1β}, S_{2β}), 61.20 (CH₂-Squarat), 61.13, 61.01, 60.76, 60.49 (P_{1-5α}), 60.05 (C6'), 60.05 (C6), 59.61 (V_α), 59.28 (T_{2α}), 58.87 (T_{1α}), 58.76 (T_{T*α}), 55.52 (S_{2α}), 54.95 (S_{1α}), 52.30 (H_α), 51.08 (R_α), 50.16 (D_α), 49.62 (C2), 48.29 (A_{3α}), 48.05 (A_{4α}), 47.87 (A_{1α}), 47.82, 47.75, 47.67, 47.61, 47.41 (P_{1-5δ}), 43.91 (G_{2α}), 43.81 (G_{1α}), 42.38 (CH₂-Spacer), 40.50 (R_δ), 35.11 (D_β), 34.04 (CH₂-Spacer), 30.21 (V_β), 29.62, 29.32, 29.27, 29.16, 28.78 (P_{1-5β}), 27.42 (R_β), 26.15 (H_β), 24.74, 24.70, 24.62, 24.51, 24.33 (P_{1-5γ}), 23.95 (R_γ), 22.25 (CH₃-AcNH), 18.80 (T_{1γ}), 18.72 (T_{2γ}), 18.47 (V_{γa}), 18.35 (T_{T*γ}), 17.83 (V_{γb}), 16.20, 15.18, 15.06, 15.02 (A_{1-4β}), 14.03 (CH₃-Squarat).

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH mit Rinderserumalbumin (BSA) (85)

5.4 mg (0.071 μmol) Rinderserumalbumin (BSA) 80 werden in 2 ml einer Lösung aus 65 mg NaH₂PO₄ pro 1 ml H₂O gelöst (pH = 9.5) und mit 5 mg (1.94 μmol, 27 eq.) EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **84** versetzt. Es wird 3d bei Raumtemp. gerührt. Zum Entfernen von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30000 Da) überführt und 10x mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Neoglycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 7.1 mg, farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z: 74147.6 – 84176.1.

Durch MALDI-TOF Massenspektrometrie wird eine Belegung von 3 - 7 Molekülen **84** pro Molekül BSA ermittelt.

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH mit Tetanus Toxoid (TTox) (86)

3.5 mg (0.023 μmol) Tetanus Toxoid (TTox) **82** werden in 2 ml einer Lösung aus 65 mg NaH₂PO₄ pro 1 ml H₂O gelöst (pH = 9.5) und mit 5 mg (1.85 μmol, 80 eq.) EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **84** versetzt. Es wird 3d bei

Raumtemp. gerührt. Zum Entfernen von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30000 Da) überführt und 10x mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Neoglycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 7.0 mg, farbloses Lyophilisat.

1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[3-O-{(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl)]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (87)
(EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 3)- β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette werden 1.21 μ l (1.41 mg, 0.0082 mmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (**78**) zu einer Lösung von 19.0 mg (0.0066 mmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 3)- β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **64** in 5 ml einer Mischung aus Ethanol/H₂O (1:1) pipettiert. In Abständen von jeweils 2 min werden 5 μ l einer ges. Na₂CO₃-Lösung zugegeben, bis ein pH von 8 erreicht ist (Zugabe von insgesamt von 25 μ l). Nach 3.5 h Rühren bei Raumtemp. (Reaktionskontrolle durch analyt. RP-HPLC) wird die Reaktionsmischung durch Zugabe von 100 μ l 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Quadratsäuremonoester funktionalisierte Glycopeptid wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter C18, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90) \rightarrow (30:70), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 26.7 min) gereinigt.

Ausbeute: 15.0 mg (5.23 μ mol, 79%), farbloses Lyophilisat, R_t = 16.6 min (Phenomenex Jupiter, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90) \rightarrow (25:75), 30 min, λ = 214 nm), $[\alpha]_{24}^D = -45.2$ (c = 1.00 g/100 ml, H₂O).

C₁₂₀H₁₈₈N₂₈O₅₃ (M = 2870.93 g/mol) [2869.29 g/mol].

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1435.65 ([M+2H]²⁺, ber.: 1435.65).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.51 (d, 1H, H_e, $J_{H_e, H_\delta} = 1.31$ Hz), 7.20 (m, 1H, H _{δ}), 4.83 (d, 1H, H₁, $J_{H_1, H_2} = 3.58$ Hz), 4.65-3.99 (m, 21H, D _{α} {4.60}, CH₂O-Squarat {4.60}, H _{α} {4.56}, R _{α} {4.53}, A_{3 α} {4.49}, A_{2 α}

{4.42}, S_{2α} {4.40}, H1' {4.36}, A_{4α} {4.35}, S_{1α} {4.33}, P_{1-5α} {4.28, 4.27, 4.25, 4.22, 4.20}, V_α {4.19}, T_{2,3-STβ} {4.21}, T_{2,3-STα} {4.18}, H2 {4.12}, T_{2β} {4.12}, A_{1α} {4.11}, T_{1β} {4.07}, H5' {4.01}, 3.96-3.44 (m, 45H, T_{1α} {3.90}, T_{2α} {3.89}, G_{1αα} {3.87}, H3 {3.85}, G_{1αb} {3.84}, H6_{a,b} {3.78}, 4x CH₂O-Spacer {3.77}, S_{2β} {3.75}, H5 {3.70}, G_{2α} {3.70}, S_{1β} {3.68}, 3-CH₂-Spacer {3.65}, H4" {3.63}, H6_{a,b} {3.63}, H4' {3.60}, H6" {3.58}, H9_a" {3.56}, H7" {3.54}, P_{1-5δ} {3.56, 3.53, 3.51, 3.50}, H9_b" {3.56}, H8" {3.52}, H4 {3.50}, H5" {3.46}), 3.39 (dd, 1H, H2', J_{H2', H1'} = 8.04 Hz, J_{H2', H3'} = 9.40 Hz), 3.30 (dd, 1H, H3', J_{H3', H4'} = 1.90 Hz, J_{H3', H2'} = 9.80 Hz), 3.20 (dd, 1H, H_{βa}, J_{Hβa, Hα} = 5.52 Hz, J_{Hβa, Hβb} = 15.52 Hz), 3.14–3.01 (m, 7H, H_{βb} {3.10}, R_δ {3.09}, CH₂-Spacer {3.08}, D_{βa} {3.07}), 2.79 (m, 1H, D_{βb}), 2.68-2.44 (m, 5H, 12-CH₂-Spacer {2.61}, CH₂-Spacer {2.58}, H_{3eq}" {2.56}), 2.27-2.07 (m, 4H, CH₂-Spacer {2.16}, P_{1,2βa} {2.15, 2.14}), 2.02-1.67 (m, 26H, P_{3-5βa} {1.99, 1.96, 1.93}, V_β {1.96}, P_{1-5γ} {1.93, 1.89, 1.85}, P_{1-5βb} {1.91, 1.86, 1.80, 1.77, 1.73}, AcNH (2x s, 1.92, 1.91}, R_{βa} {1.75}), 1.67-1.48 (m, 3H, R_{βb} {1.58}, R_γ {1.56}), 1.43 (t, 1H, H_{3ax}" , J_{Hax, Heq} = 11.72 Hz), 1.31 (t, 3H, CH₃CH₂-Squarat, J_{CH₃, CH₂} = 7.04 Hz), 1.29-1.18 (m, 12H, {1.27 d, A_{2β}, J_{Aβ, Aα} = 5.65 Hz}, A_{3β} {1.24}, {1.24 d, A_{4β}, J_{Aβ, Aα} = 6.96 Hz}, {1.21, d, A_{1β}, J_{Aβ, Aα} = 7.24 Hz}), 1.14 (d, 3H, T_{2,3-STγ}, J_{Tγ, Tβ} = 6.20 Hz), 1.08 (d, 3H, T_{2γ}, J_{Tγ, Tβ} = 6.56 Hz), 1.06 (d, 3H, T_{1γ}, J_{Tγ, Tβ} = 6.52 Hz), 0.90-0.82 (m, 6H, V_γ).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC): δ (ppm):

188.83 (C=O-Squarat), 174.93, 174.02, 173.99, 173.86, 173.75, 173.49, 173.17, 173.10, 172.74, 172.65, 172.62, 172.54, 172.42, 171.99, 171.94, 171.53, 171.20, 171.10, 170.90, 170.77, 170.66, 169.62, 169.37, 169.05, 168.97 (C=O, C=O-Acetyl, C1", O-C=C-Squarat), 161.12 (C=NH), 133.53 (H_{C2}), 128.30 (H_{C5}), 117.34 (H_{C4}), 102.90 (C1'), 101.07 (C2"), 99.10 (C1), 78.15 (T_{2,3-ST*β}), 74.21 (C4'), 72.61 (C6"), 72.49 (C3'), 71.28 (C7"), 70.56 (C5'), 70.51 (C2'), 70.36 (CH₂-Squarat), 70.33 (C9"), 69.57, 69.35 (CH₂-Spacer), 68.22 (C3), 67.87 (C4), 67.83 (C8"), 66.98 (T_{1β}), 66.98 (C5), 66.58 (C4"), 66.14 (C6), 65.53 (T_{2β}), 63.67 (C6'), 61.41, 61.38 (S_{1β}, S_{2β}), 61.15, 60.75, 60.50, 60.05 (P_{1-5α}), 59.71 (T_{2α}), 59.31 (T_{1α}), 59.32 (V_α), 58.75 (T_{2,3-ST*α}), 55.21 (S_{2α}), 54.90 (S_{1α}), 52.26 (C5", H_α, R_α), 50.20 (D_α), 49.63 (C2), 49.21 (A_{3α}), 48.03 (A_{4α}), 47.76 (A_{1α}), 47.75, 47.59, 47.39 (P_{1-5δ}), 42.09 (G_{2α}, G_{1α}), 42.20 (CH₂-Spacer), 40.71 (R_δ), 40.49 (C3"), 40.45 (CH₂-Spacer), 30.20 (V_β), 29.62, 29.51, 29.30, 29.17 (P_{1-5β}), 28.81 (R_β), 27.43 (H_β), 24.62, 24.50, 24.22, 24.11 (P_{1-5γ}), 23.96 (R_γ), 22.43, 22.37 (CH₃-AcNH), 18.82 (T_{1γ}), 18.73 (T_{2γ}), 18.49 (V_{γa}), 18.40 (T_{2,3-ST*γ}), 17.92 (V_{γb}), 15.30, 15.21, 15.03, 14.97 (A_{1-4β}), 14.28 (CH₃-Squarat).

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 3)- β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH mit Rinderserumalbumin (BSA) (88)

3.0 mg (0.045 μ mol) Rinderserumalbumin (BSA) **80** werden in 2 ml einer Lösung aus 65 mg NaH₂PO₄ pro 1 ml H₂O gelöst (pH = 9.5) und mit 3 mg (1.05 μ mol, 23 eq.) EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 3)- β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **87** versetzt. Es wird 3d bei Raumtemp. gerührt. Zum Entfernen von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30000 Da) überführt und 10x mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Neoglycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 3.5 mg, farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z: 86518.7.

Durch MALDI-TOF Massenspektrometrie wird eine Belegung von durchschnittlich 7 Molekülen **1** pro Molekül BSA ermittelt.

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 3)- β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH mit Tetanus Toxoid (TTox) (89)

3.5 mg (0.023 μ mol) Tetanus Toxoid (TTox) **82** werden in 2 ml einer Lösung aus 65 mg NaH₂PO₄ pro 1 ml H₂O gelöst (pH = 9.5) und mit 3.8 mg (1.32 μ mol, 57 eq.) EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 3)- β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **87** versetzt. Es wird 3d bei Raumtemp. gerührt. Zum Entfernen von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30000 Da) überführt und 10x mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Neoglycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 5.8 mg, farbloses Lyophilisat.

1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[β-D-galactopyranosyl]-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl) -2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (90)
(EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-(1→3)-[αNeuNAcCOOH-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette werden 1.58 μl (1.84 mg, 0.0082 mmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (**78**) zu einer Lösung von 20.9 mg (0.0076 mmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-(1→3)-[αNeuNAcCOOH-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **67** in 5 ml einer Mischung aus Ethanol/H₂O (1:1) pipettiert. In Abständen von jeweils 2 min werden 5 μl einer ges. Na₂CO₃-Lösung zugegeben, bis ein pH von 8 erreicht ist (Zugabe von insgesamt von 25 μl). Nach 1 h Rühren bei Raumtemp. (Reaktionskontrolle durch analyt. RP-HPLC) wird die Reaktionsmischung durch Zugabe von 100 μl 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Quadratsäuremonoester funktionalisierte Glycopeptid wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter C18, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90) → (30:70), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 26.4 min) gereinigt.

Ausbeute: 15.9 mg (5.54 μmol, 68%), farbloses Lyophilisat, R_t = 18.3 min (Phenomenex Jupiter, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90)→(25:75), 30 min, λ = 214 nm), [α]₂₃^D = -88.6 (c = 1.00 g/100 ml, H₂O)

C₁₂₀H₁₈₈N₂₈O₅₃ (M = 2870.93 g/mol) [2869.29 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1436.26 ([M+2H]²⁺, ber.: 1435.65), 964.85 ([M+2H+Na]³⁺, ber.: 964.76) 957.86 ([M+3H]³⁺, ber.: 957.43).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.51 (d, 1H, H_e, J_{H_e, H_δ} = 1.37 Hz), 7.21 (m, 1H, H_δ), 4.83 (d, 1H, H₁, J_{H₁, H₂} = 3.80 Hz), 4.65-4.02 (m, 21H, D_α {4.60}, CH₂O-Squarat {4.59}, H_α {4.55}, R_α {4.51}, A_{3α} {4.48}, A_{2α} {4.43}, S_{2α} {4.40}, A_{4α} {4.32}, S_{1α} {4.33}, H_{1'} {4.29}, P_{1-5α} {4.31, 4.26, 4.25, 4.21, 4.19}, V_α {4.20}, T_{2,6-STβ} {4.18}, A_{1α} {4.13}, T_{2,6-STα} {4.09}, T_{2β} {4.08}, T_{1β} {4.06}, H₂ {4.06}), 3.99 (m, 1H, H_{5'}), 3.95-3.40 (m, 46H, T_{1α} {3.92}, T_{2α} {3.89}, G_{1αa} {3.87}, H₃ {3.86}, G_{1αb} {3.85}, H_{6'}_{a,b} {3.78}, 4x CH₂O-Spacer {3.76}, H_{4'} {3.74}, S_{2β} {3.75}, H₅ {3.70}, G_{2α} {3.70}, S_{1β} {3.65}, 3-CH₂-Spacer {3.65}, H_{6_{a,b}} {3.63}, H_{6''} {3.58}, H_{9_a''} {3.56}, H_{7''} {3.54}, P_{1-5δ} {3.56, 3.53, 3.49, 3.45}, H_{9_b''} {3.56}, H_{4''} {3.55}, H_{8''} {3.52}, H₄ {3.50}, H_{5''} {3.46}, H_{3'}

{3.43}), 3.38 (m, 1H, H_{2'}), 3.20 (dd, 1H, H_{βa}, $J_{Hβa, Hα} = 6.00$ Hz, $J_{Hβa, Hβb} = 15.72$ Hz), 3.13–3.02 (m, 7H, H_{βb} {3.09}, CH₂-Spacer {3.08}, R_δ {3.06}, D_{βa} {3.05}), 2.82 (m, 1H, D_{βb}), 2.67–2.47 (m, 5H, (t) 12-CH₂-Spacer, $J_{CH_2, CH_2} = 6.56$ Hz {2.60}, CH₂-Spacer {2.55}, H_{3_{eq}'} {2.52}), 2.28–2.06 (m, 4H, P_{1,2βa} {2.17, 2.11}, CH₂-Spacer {2.17}), 2.03–1.66 (m, 26H, P_{3–5βa} {1.96, 1.94, 1.90}, V_β {1.95}, P_{1–5γ} {1.93, 1.90, 1.85}, P_{1–5βb} {1.91, 1.87, 1.81, 1.76, 1.74}, AcNH (2x s, 1.90, 1.88}, R_{βa} {1.74}), 1.67–1.48 (m, 4H, H_{3_{ax}'} {1.57}, R_{βb} {1.56}, R_γ {1.55}), 1.30 (t, 3H, CH₃CH₂-Squarat, $J_{CH_3, CH_2} = 7.04$ Hz), 1.28–1.19 (m, 12H, {1.27 d, A_{2β}, $J_{Aβ, Aα} = 5.60$ Hz}, A_{3β} {1.24}, {1.24 d, A_{4β}, $J_{Aβ, Aα} = 7.04$ Hz}, {1.21, d, A_{1β}, $J_{Aβ, Aα} = 7.28$ Hz}), 1.17 (d, 3H, T_{2,6-STγ}, $J_{Tγ, Tβ} = 6.12$ Hz), 1.08 (d, 3H, T_{2γ}, $J_{Tγ, Tβ} = 6.55$ Hz), 1.06 (d, 3H, T_{1γ}, $J_{Tγ, Tβ} = 6.47$ Hz), 0.84 (t, 6H, V_γ, $J_{Vγ, Vβ} = 6.88$ Hz).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC): δ (ppm):

188.78 (C=O-Squarat), 175.86, 174.88, 174.43, 174.40, 174.22, 173.95, 173.87, 173.76, 173.48, 173.21, 173.09, 172.65, 172.38, 171.99, 171.92, 171.53, 171.45, 171.19, 171.12, 170.88, 170.69 (C=O, C=O-Acetyl, C1"), 166.88 (O-C=C-Squarat), 159.75 (C=NH), 133.46 (H_{C2}), 128.36 (H_{C5}), 117.43 (H_{C4}), 104.60 (C1'), 99.58 (C2"), 99.27 (C1), 77.61 (T_{2,6-ST*β}), 74.91 (C4'), 72.61 (C6"), 72.49 (C3'), 71.28 (C7"), 70.56 (C5'), 70.51 (C2'), 70.36 (CH₂-Squarat), 70.33 (C9"), 69.57, 69.35 (CH₂-Spacer), 68.22 (C3), 67.87 (C4), 67.83 (C8"), 66.98 (T_{1β}), 66.98 (C5), 66.58 (C4"), 66.14 (C6), 66.10 (T_{2β}), 62.67 (C6'), 61.41, 61.38 (S_{1β}, S_{2β}), 61.13, 61.00, 60.74, 60.52, 60.03 (P_{1–5α}), 59.37 (T_{2α}, T_{1α}), 59.27 (V_α), 58.74 (T_{2,6-ST*α}), 56.95 (S_{2α}), 55.52 (S_{1α}), 52.29 (C5"), 51.75 (H_α), 51.08 (R_α), 50.13 (D_α), 49.61 (C2), 48.14 (A_{3α}), 48.04 (A_{4α}), 47.82 (A_{1α}), 47.76, 47.74, 47.64, 47.38 (P_{1–5δ}), 42.36 (G_{2α}), 42.36 (G_{1α}), 42.31 (CH₂-Spacer), 40.50 (R_δ), 40.50 (C3"), 40.50 (CH₂-Spacer), 39.71 (D_β), 30.20 (V_β), 29.91, 29.60, 29.29, 29.16 (P_{1–5β}), 28.73 (R_β), 27.43 (H_β), 24.70, 24.61, 24.52, 24.27 (P_{1–5γ}), 23.97 (R_γ), 22.30, 21.99 (CH₃-AcNH), 18.81 (T_{1γ}), 18.72 (T_{2γ}), 18.48 (V_{γa}), 18.35 (T_{2,6-ST*γ}), 17.80 (V_{γb}), 16.22, 15.15, 15.05, 15.01 (A_{1–4β}), 14.96 (CH₃-Squarat).

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-(1→3)-[αNeuNAcCOOH-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH mit Rinderserumalbumin (BSA) (91)

4.9 mg (0.074 μmol) Rinderserumalbumin (BSA) **80** werden in 2 ml einer Lösung aus 65 mg NaH₂PO₄ pro 1 ml H₂O gelöst (pH = 9.5) und mit 4.7 mg (1.64 μmol, 22 eq.) EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-(1→3)-[αNeuNAcCOOH-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **90**

versetzt. Es wird 3d bei Raumtemp. gerührt. Zum Entfernen von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30000 Da) überführt und 10x mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Neoglycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 7 mg, farbloses Lyophilisat.

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z: 85121.8.

Durch MALDI-TOF Massenspektrometrie wird eine Belegung von durchschnittlich 6.5 Molekülen **90** pro Molekül BSA ermittelt.

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-(1→3)-[αNeuNAcCOOH-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH mit Tetanus Toxoid (TTox) (92)

3.4 mg (0.022 μmol) Tetanus Toxoid (TTox) **82** werden in 2 ml einer Lösung aus 65 mg NaH₂PO₄ pro 1 ml H₂O gelöst (pH = 9.5) und mit 4.8 mg (1.68 μmol, 76 eq.) EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-(1→3)-[αNeuNAcCOOH-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **90** versetzt. Es wird 3d bei Raumtemp. gerührt. Zum Entfernen von nicht gekuppelten Glycopeptidmolekülen wird die Reaktionsmischung in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30000 Da) überführt und 10x mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert. Das Neoglycoprotein wird nach Gefriertrocknung als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 8.2 mg, farbloses Lyophilisat.

Beladungsbestimmung der TTox-MUC1-Vakzine 83:

Durchführung des 1. ELISA Tests (Abb. 3.4.5.2):

1. **Beschichtung** der Platten mit **Tetanus-Toxoid 82**, **BSA-MUC1-ST_N 81** und **Tetanus-Toxoid-MUC1-ST_N 83** in Coating-Puffer (c = 5 μg/ml), 50 μl/Nute, 1 h, 37 °C.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. **Blocken** noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x, 0.5 h, 37 °C.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

3. **Titration** des monoklonalen Serum 2B3 ab einer Verdünnung von 1:50, 50 μl/well, 1 h, 37 °C.

Durchführung: Es werden 50 µl einer 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x in jeder Nute vorgelegt. Anschließend pipettiert man 50 µl des entsprechenden Serums (Verdünnung: 1:25 in 1%-iger Lösung von BSA (in PBS1x)) in die erste Nute einer Reihe der ELISA-Platte (→ Endverdünnung = 1:50). Nach gründlichem Mischen werden 50 µl der Lösung entnommen und zur folgenden Nute gegeben. Diese Prozedur wird bis zum Ende einer Reihe wiederholt. Aus der letzten Vertiefung werden abschließend 50 µl der Lösung entnommen und verworfen. Es wird 1 h bei 37 °C inkubiert.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

4. **Zugabe des biotinylierten**, gegen Maus-Gesamtimmunglobulin gerichteten **Antikörpers** aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in 1%-iger Gelatine Lösung in PBS1x) einer Stammlösung mit $c = 1.2 \mu\text{g/ml}$), 1 h, 37 °C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. **Zugabe von 50 µl/well SA-HPO** (1:10000) in 1%-iger Gelatine-Lösung PBS1x. Inkubation: 0.5 h, 37 °C.

6. Zugabe von 50 µl/Nute der **ABTS/H₂O₂**-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Daten der Beladungsbestimmung über ELISA:

Verdünnung	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
TTox	0,0679	0,0716	0,0602	0,0744	0,0628	0,0626
81	1,8808	1,8538	1,8502	1,8379	1,8116	1,8111
83	1,8986	1,8095	1,8130	1,8016	1,7786	1,7105

Verdünnung	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400
TTox	0,0633	0,0617	0,0601	0,0602	0,0839	0,0589
81	1,6519	1,3275	0,8533	0,5068	0,3044	0,1840
83	1,5491	1,2123	0,7621	0,4440	0,2716	0,1884

Immunisierung 080430 (Maus 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10) mit Tetanus-Toxoid-HN-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH 83:

Ca. acht Wochen alte balb/c-J-Mäuse wurden nach folgendem Schema immunisiert:

Erstimmunisierung: A (40 µl) B (40 µl → 20 µg **83** je Maus) (in eine Fußsohle der drei Mäuse) (CFA + **83**).

1 Sekundärimmunisierung: C (50 µl) D (50 µl → 10 µg **83** je Maus) (intraperitoneal) (IFA + **PBS**) (IFA + **83**) Tag: 21.

Durchführung des 2. ELISA Tests (Abb. 3.4.5.1):

1. **Beschichtung** der Platten mit **BSA-Konjugat 81** in Coating-Puffer ($c = 10 \mu\text{g/ml}$), $50 \mu\text{l/Nute}$, 1 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. **Blocken** noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x, 0.5 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

3. **Titration** der Seren ab einer Verdünnung von 1:400, $50 \mu\text{l/well}$, 1 h, 37°C .

Durchführung: Es werden $50 \mu\text{l}$ einer 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x in jeder Nute vorgelegt. Anschließend pipettiert man $50 \mu\text{l}$ des entsprechenden Serums (Verdünnung: 1:200 in 1%-iger Lösung von BSA (in PBS1x)) in die erste Nute einer Reihe der ELISA-Platte (\rightarrow Endverdünnung = 1:400). Nach gründlichem Mischen werden $50 \mu\text{l}$ der Lösung entnommen und zur folgenden Nute gegeben. Diese Prozedur wird bis zum Ende einer Reihe wiederholt. Aus der letzten Vertiefung werden abschließend $50 \mu\text{l}$ der Lösung entnommen und verworfen. Es wird 1 h bei 37°C inkubiert.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

4. **Zugabe des biotinylierten**, gegen Maus-Gesamtimmunglobulin gerichteten **Antikörpers** aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in 1%-iger Gelatine Lösung in PBS1x) einer Stammlösung mit $c = 1.2 \mu\text{g/ml}$), 1 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. **Zugabe von** $50 \mu\text{l/well}$ **SA-HPO** (1:10000) in 1%-iger Gelatine-Lösung PBS1x. Inkubation: 0.5 h, 37°C .

6. Zugabe von $50 \mu\text{l/Nute}$ der **ABTS/H₂O₂**-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Daten des ELISA-Tests 2:

Verdünnung		1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
80430	Maus 1	2,8675	2,4544	2,2969	2,1399	1,8853	1,4100
	Maus 2	2,4889	2,3434	2,2540	2,1785	2,1317	1,9418
	Maus 3	2,5103	2,2814	2,2203	2,0870	1,8857	1,5326
	Maus 4	2,1926	2,2279	2,1961	2,1312	1,9505	1,4965
	Maus 5	2,4389	2,2193	1,9666	1,6910	1,2262	0,7860
	Maus 6	2,3324	2,2490	2,2906	2,2322	2,2431	2,0804
	Maus 7	2,7682	2,4039	2,3122	2,2396	1,9858	1,5774
	Maus 8	2,4140	2,3046	2,3174	2,3344	2,2379	2,2573
	Maus 9	2,2654	1,7202	1,1300	0,6789	0,4028	0,2466
	Maus 10	2,2275	2,2887	2,2684	2,2086	2,0711	1,6925
	(-)-Kontrolle	0,0543	0,1331	0,1100	0,1094	0,1193	0,1028

Verdünnung		1/25600	1/51200	1/102400	1/204800	1/409600	1/819200
80430	Maus 1	0,8977	0,5400	0,3198	0,2170	0,1562	0,0886
	Maus 2	1,4540	0,9521	0,5828	0,3582	0,2609	0,1375
	Maus 3	1,0365	0,6077	0,3696	0,2323	0,1699	0,0899
	Maus 4	1,0074	0,5724	0,3263	0,2169	0,1715	0,0971
	Maus 5	0,4950	0,2856	0,1859	0,1406	0,1413	0,0697
	Maus 6	1,7549	1,2263	0,7792	0,4733	0,3296	0,1723
	Maus 7	1,1174	0,6813	0,3994	0,2644	0,1858	0,1045
	Maus 8	2,1852	1,9862	1,5766	1,0663	0,7367	0,4249
	Maus 9	0,1694	0,1254	0,1036	0,0994	0,1056	0,0615
	Maus 10	1,2482	0,8031	0,4815	0,3027	0,2120	0,1158
	(-)-Kontrolle	0,0918	0,0983	0,0912	0,0995	0,1057	0,0676

Durchführung des 3. ELISA Tests (Abb. 3.4.5.2):

1. **Beschichtung** der Platten mit **Tetanus-Toxoid 82** in Coating-Puffer ($c = 5 \mu\text{g/ml}$), $50 \mu\text{l/Nute}$, 1 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. **Blocken** noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x, 0.5 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

3. **Titration** der Seren ab einer Verdünnung von 1:400, $50 \mu\text{l/well}$, 1 h, 37°C .

Durchführung: Es werden $50 \mu\text{l}$ einer 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x in jeder Nute vorgelegt. Anschließend pipettiert man $50 \mu\text{l}$ des entsprechenden Serums (Verdünnung: 1:200 in 1%-iger Lösung von BSA (in PBS1x)) in die erste Nute einer Reihe der ELISA-Platte (\rightarrow Endverdünnung = 1:400). Nach gründlichem Mischen werden $50 \mu\text{l}$ der Lösung entnommen und zur folgenden Nute gegeben. Diese Prozedur wird bis zum Ende einer Reihe wiederholt. Aus der letzten Vertiefung werden abschließend $50 \mu\text{l}$ der Lösung entnommen und verworfen. Es wird 1 h bei 37°C inkubiert.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

4. **Zugabe des biotinylierten**, gegen Maus-Gesamtimmunglobulin gerichteten **Antikörpers** aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in 1%-iger Gelatine Lösung in PBS1x) einer Stammlösung mit $c = 1.2 \mu\text{g/ml}$), 1 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. **Zugabe von** $50 \mu\text{l/well}$ **SA-HPO** (1:10000) in 1%-iger Gelatine-Lösung PBS1x. Inkubation: 0.5 h, 37°C .

6. Zugabe von $50 \mu\text{l/Nute}$ der **ABTS/H₂O₂**-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Daten des ELISA-Tests 3:

Verdünnung		1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
80430	Maus 1	2,8521	2,8538	2,6897	2,5687	2,4729	2,3636
	Maus 2	2,7385	2,3815	2,4073	2,3286	2,3821	2,3230
	Maus 3	2,8594	2,7343	2,5108	2,4778	2,3322	2,2346
	Maus 4	2,7076	2,4119	2,3650	2,3374	2,3827	2,3046
	Maus 5	2,7023	2,5408	2,3906	2,3204	2,1460	1,9350
	Maus 6	2,5394	2,3520	2,2727	2,3612	2,3709	2,3296
	Maus 7	2,6368	2,4445	2,2120	2,1752	2,2109	2,1069
	Maus 8	2,6441	2,4724	2,4315	2,4275	2,5082	2,3889
	Maus 9	2,7068	2,5967	2,2323	1,8645	1,2887	0,8145
	Maus 10	2,5325	2,4859	2,5780	2,5724	2,6024	2,4237

Verdünnung		1/25600	1/51200	1/102400	1/204800	1/409600	1/819200
80430	Maus 1	2,1617	2,0066	1,4940	1,0424	0,6158	0,3977
	Maus 2	2,2498	2,0365	1,5382	1,0844	0,6639	0,3862
	Maus 3	2,1156	1,9165	1,3515	0,9541	0,5351	0,3296
	Maus 4	2,2158	1,8917	1,3050	0,8435	0,5454	0,3101
	Maus 5	1,4622	1,0125	0,6240	0,3861	0,2646	0,1306
	Maus 6	2,1857	1,7575	1,1856	0,7667	0,4700	0,2615
	Maus 7	1,8881	1,6147	1,0281	0,5976	0,4600	0,1020
	Maus 8	2,4487	2,3836	2,2364	2,0471	1,6636	0,5676
	Maus 9	0,5170	0,3198	0,2043	0,1593	0,1507	0,0751
	Maus 10	2,2649	1,7647	1,1966	0,7645	0,4937	0,2200

Durchführung des 1. Neutralisationstests (Abb. 3.4.5.3):

1. **Beschichtung** der Platten mit **BSA-Konjugat 81** in Coating-Puffer ($c = 10 \mu\text{g/ml}$), $50 \mu\text{l/Nute}$, 1 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. **Blocken** noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x, 0,5 h, 37°C .

3. Inkubation des Serums von Maus 8:

Durchführung: Hierzu werden jeweils $40 \mu\text{l}$ des Serums in den Verdünnungen 1/15000; 1/45000; 1/135000 und 1/405000 in jeweils drei Nuten einer Grainer-96-Loch-Mikrotiterplatte eingebracht und mit $40 \mu\text{l}$ PBS(1x) auf $80 \mu\text{l}$ aufgefüllt und titriert (Endverdünnung: 1/30000; 1/90000; 1/270000; 1/810000). Anschließend werden $10 \mu\text{l}$ der Inkubationssubstanz in einer Konzentration von $c = 500 \mu\text{g/ml}$ zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert.

4. 3x **Waschen** der mit BSA-Konjugat **81** beschichteten Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. **Übertrag** der Seren von der Grainer-Platte (Punkt 3.) in die mit BSA-Konstrukt **81** beschichteten Platten.

Es wird 1 h bei 37 °C inkubiert.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

6. **Zugabe des biotinylierten**, gegen Maus-Gesamtimmungglobulin gerichteten **Antikörpers** aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in 1%-iger Gelatine Lösung in PBS1x) einer Stammlösung mit $c = 1.2 \mu\text{g/ml}$), 1 h, 37 °C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

7. **Zugabe von** 50 μl /well **SA-HPO** (1:10000) in 1%-iger Gelatine-Lösung PBS1x. Inkubation: 0.5 h, 37 °C.

8. Zugabe von 50 μl /Nute der **ABTS/H₂O₂**-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Daten des Neutralisationstests 1:

Verdünnung	1/30.000	1/90.000	1/270.000	1/810.000
080430 Maus 8 Linie1	1,1047	0,6564	0,362	0,1902
MUC1 Linie2	0,9136	0,4936	0,2526	0,1504
MUC1-Tn Linie3	0,7524	0,3802	0,2228	0,1387
MUC1-T Linie4	0,9225	0,5213	0,255	0,1482
MUC1-STn Linie5	0,1935	0,115	0,1036	0,1196
MUC1-STn-Tn Linie6	0,7272	0,3652	0,1911	0,1214
MUC1-STn-Tn-Tn Linie7	0,7512	0,4198	0,1979	0,1307
MUC1-2,6-ST Linie8	0,7939	0,4115	0,2158	0,1359
MUC1-2,3-ST Linie9	0,9252	0,498	0,2797	0,1674
MUC4-STn Linie10	0,946	0,5362	0,274	0,155
MUC4 Linie11	0,9545	0,6021	0,3074	0,1839

Allgemeine Durchführung des Neutralisationstests in Abb. 3.4.5.5 und Abb. 3.4.5.6:

1. **Beschichtung** der Platten mit **BSA-Konjugat**: **MUC1-BSA**, **MUC1-STn-BSA 81**, **MUC1-STn-Tn-BSA**, **MUC1-STn-Tn-Tn-BSA**, **MUC1-T-BSA 85**, **MUC1-2,6ST-BSA 91** und **MUC1(12 Aminosäuren)-STn-BSA** in Coating-Puffer ($c = 10 \mu\text{g/ml}$), 50 μl /Nute, 1 h, 37 °C.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. **Blocken** noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x, 0.5 h, 37 °C.

3. **Inkubation des Serums von Maus 8:**

Durchführung: Hierzu werden jeweils 40 µl des Serums in den Verdünnungen 1/1000 in die erste Nute einer Grainer-96-Loch-Mikrotiterplatte eingebracht und mit 40 µl PBS(1x) auf 80 µl aufgefüllt und titriert (Endverdünnung: 1/2000). Anschließend werden 10 µl der Inkubationssubstanz (siehe Abb. 3.4.5.4) in einer Konzentration von $c = 500 \mu\text{g/ml}$ zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert.

4. 3x **Waschen** der mit BSA-Konjugaten beschichteten Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. **Übertrag** der Seren von der Grainer-Platte (Punkt 3.) in die mit BSA-Konstrukten beschichteten Platte.

Es wird 1 h bei 37 °C inkubiert.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

6. **Zugabe des biotinylierten**, gegen Maus-Gesamtimmunglobulin gerichteten **Antikörpers** aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in 1%-iger Gelatine Lösung in PBS1x) einer Stammlösung mit $c = 1.2 \mu\text{g/ml}$), 1 h, 37 °C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

7. **Zugabe von** 50 µl/well **SA-HPO** (1:10000) in 1%-iger Gelatine-Lösung PBS1x. Inkubation: 0.5 h, 37 °C.

8. Zugabe von 50 µl/Nute der **ABTS/H₂O₂**-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Daten der Neutralisationsexperimente:

Verdünnung	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	Beschichtung	Inkubat
080430 Maus 8	1,6350	1,7220	1,6720	1,5126	MUC1-BSA	
080430 Maus 8	1,6173	1,5875	1,3301	0,8927	MUC1-BSA	MUC1
080430 Maus 8	1,7619	1,7026	1,6539	1,5764	MUC1-STn-BSA	
080430 Maus 8	0,5968	0,4600	0,2887	0,3003	MUC1-STn-BSA	MUC1-STn
080430 Maus 8	1,6951	1,6858	1,6136	1,5428	MUC1-STn-Tn-BSA	
080430 Maus 8	1,5405	1,5568	1,2677	0,9442	MUC1-STn-Tn-BSA	MUC1-STn-Tn
080430 Maus 8	1,6757	1,7840	1,6203	1,5314	MUC1-STn-Tn-Tn-BSA	
080430 Maus 8	1,5694	1,3438	0,7977	0,5135	MUC1-STn-Tn-Tn-BSA	MUC1-STn-Tn-Tn
080430 Maus 8	1,8921	2,0561	1,6477	1,1265	MUC1-T-BSA	
080430 Maus 8	1,5151	0,8863	0,5392	0,3193	MUC1-T-BSA	MUC1-T
080430 Maus 8	2,0880	1,8742	1,7865	1,3723	MUC1-2,6T-BSA	
080430 Maus 8	1,1074	0,8005	0,4614	0,2857	MUC1-2,6T-BSA	MUC1-2,6ST
080430 Maus 8	1,1100	0,6830	0,3714	0,2690	MUC1(12)-STn-BSA	
080430 Maus 8	0,3133	0,2312	0,1459	0,0937	MUC1(12)-STn-BSA	MUC1(12)-STn
(-) -Kontrolle	0,0671	0,1496	0,1294	0,1275	negativ	

Verdünnung	1/32000	1/64000	1/128000	1/256000	Beschichtung	Inkubat
080430 Maus 8	1,1433	0,7046	0,4206	0,2679	MUC1-BSA	
080430 Maus 8	0,5597	0,3247	0,2060	0,1576	MUC1-BSA	MUC1
080430 Maus 8	1,3074	0,8958	0,5466	0,3373	MUC1-STn-BSA	
080430 Maus 8	0,1705	0,1317	0,2096	0,1666	MUC1-STn-BSA	MUC1-STn
080430 Maus 8	1,2606	0,8875	0,5409	0,3235	MUC1-STn-Tn-BSA	
080430 Maus 8	0,6020	0,4356	0,3399	0,1915	MUC1-STn-Tn-BSA	MUC1-STn-Tn
080430 Maus 8	1,4895	0,9438	0,5592	0,3451	MUC1-STn-Tn-Tn-BSA	
080430 Maus 8	0,2975	0,1974	0,1609	0,1381	MUC1-STn-Tn-Tn-BSA	MUC1-STn-Tn-Tn
080430 Maus 8	0,6800	0,3754	0,2293	0,1730	MUC1-T-BSA	
080430 Maus 8	0,2421	0,1488	0,1081	0,2080	MUC1-T-BSA	MUC1-T
080430 Maus 8	0,7283	0,4368	0,2756	0,1924	MUC1-2,6T-BSA	
080430 Maus 8	0,1876	0,1416	0,1413	0,0984	MUC1-2,6T-BSA	MUC1-2,6ST
080430 Maus 8	0,1890	0,1425	0,1174	0,1230	MUC1(12)-STn-BSA	
080430 Maus 8	0,0938	0,0934	0,0894	0,0883	MUC1(12)-STn-BSA	MUC1(12)-STn
(-)-Kontrolle	0,1449	0,1245	0,1200	0,1206	negativ	

Verdünnung	1/512000	1/1024000	1/2048000	1/4096000	Beschichtung	Inkubat
080430 Maus 8	0,1853	0,1481	0,1284	0,0759	MUC1-BSA	
080430 Maus 8	0,1260	0,1214	0,1356	0,0902	MUC1-BSA	MUC1
080430 Maus 8	0,2177	0,1601	0,1512	0,0765	MUC1-STn-BSA	
080430 Maus 8	0,1042	0,1042	0,1145	0,0680	MUC1-STn-BSA	MUC1-STn
080430 Maus 8	0,2160	0,1577	0,1421	0,0775	MUC1-STn-Tn-BSA	
080430 Maus 8	0,1610	0,1982	0,1227	0,0852	MUC1-STn-Tn-BSA	MUC1-STn-Tn
080430 Maus 8	0,2150	0,1621	0,1401	0,0792	MUC1-STn-Tn-Tn-BSA	
080430 Maus 8	0,1235	0,1341	0,1251	0,0719	MUC1-STn-Tn-Tn-BSA	MUC1-STn-Tn-Tn
080430 Maus 8	0,1430	0,1327	0,1369	0,0683	MUC1-T-BSA	
080430 Maus 8	0,0957	0,1661	0,1024	0,0686	MUC1-T-BSA	MUC1-T
080430 Maus 8	0,1600	0,1316	0,1254	0,0761	MUC1-2,6T-BSA	
080430 Maus 8	0,0934	0,1111	0,1135	0,0706	MUC1-2,6T-BSA	MUC1-2,6ST
080430 Maus 8	0,1117	0,1147	0,1253	0,0660	MUC1(12)-STn-BSA	
080430 Maus 8	0,0875	0,0961	0,1080	0,0558	MUC1(12)-STn-BSA	MUC1(12)-STn
(-)-Kontrolle	0,1120	0,1054	0,1238	0,0620	negativ	

**Immunisierung 081126 (Maus 7,8,9) mit Tetanus-Toxoid-HN-Squarath-
HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-Ser-
Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH 86:**

Ca. acht Wochen alte balb/c-J-Mäuse wurden nach folgendem Schema immunisiert:

Erstimmunisierung: **A** (40 µl) **B** (40 µl → 20 µg **86** je Maus) (in eine Fußsohle der drei Mäuse) (**CFA + 86**).

2 Sekundärimmunisierung: **C** (50 µl) **D** (50 µl → 10 µg **86** je Maus) (intraperitoneal) (**IFA + PBS**) (**IFA + 86**) Tag: **21, 43**.

Durchführung des 1. ELISA Tests (Abb. 3.4.6.1):

1. **Beschichtung** der Platten mit **BSA-Konjugat 85** in Coating-Puffer ($c = 5 \mu\text{g/ml}$), $50 \mu\text{l/Nute}$, 1 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. **Blocken** noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x, 0.5 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

3. **Titration** der Seren ab einer Verdünnung von 1:2500, $50 \mu\text{l/well}$, 1 h, 37°C .

Durchführung: Es werden $50 \mu\text{l}$ einer 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x in jeder Nute vorgelegt. Anschließend pipettiert man $50 \mu\text{l}$ des entsprechenden Serums (Verdünnung: 1:200 in 1%-iger Lösung von BSA (in PBS1x)) in die erste Nute einer Reihe der ELISA-Platte (\rightarrow Endverdünnung = 1:2500). Nach gründlichem Mischen werden $50 \mu\text{l}$ der Lösung entnommen und zur folgenden Nute gegeben. Diese Prozedur wird bis zum Ende einer Reihe wiederholt. Aus der letzten Vertiefung werden abschließend $50 \mu\text{l}$ der Lösung entnommen und verworfen. Es wird 1 h bei 37°C inkubiert.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

4. **Zugabe des biotinylierten**, gegen Maus-Gesamtimmungglobulin gerichteten **Antikörpers** aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in 1%-iger Gelatine Lösung in PBS1x) einer Stammlösung mit $c = 1.2 \mu\text{g/ml}$), 1 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. **Zugabe von** $50 \mu\text{l/well}$ **SA-HPO** (1:10000) in 1%-iger Gelatine-Lösung PBS1x. Inkubation: 0.5 h, 37°C .

6. Zugabe von $50 \mu\text{l/Nute}$ der **ABTS/H₂O₂**-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Daten des ELISA-Tests 1:

Verdünnung		1/2500	1/5000	1/10.000	1/20.000	1/40.000	1/80.000
1. Bluten	Maus 7	1,3327	1,3405	1,2984	1,2602	1,1606	0,9547
	Maus 8	1,3535	1,3700	1,3216	1,2021	0,9956	0,7070
	Maus 9	1,3208	1,2996	1,2112	1,0936	0,7871	0,5325
2. Bluten	Maus 7	1,3531	1,3524	1,2564	1,0948	0,8682	0,5889
	Maus 8	1,3542	1,3521	1,2562	1,1463	0,9047	0,6356
	Maus 9	1,3270	1,3541	1,2828	1,1687	1,0119	0,6692
(-)-Kontrolle		0,0544	0,0717	0,0649	0,0659	0,0689	0,0751

Verdünnung		1/160.000	1/320.000	1/640.000	1/1.280.000	1/2.560.000	1/5.120.000
1. Blüten	Maus 7	0,6473	0,4201	0,2601	0,1730	0,1470	0,0787
	Maus 8	0,4285	0,2741	0,1898	0,1314	0,1337	0,0785
	Maus 9	0,3042	0,1934	0,1375	0,1261	0,1132	0,1121
2. Blüten	Maus 7	0,3643	0,2248	0,1525	0,1159	0,1095	0,0719
	Maus 8	0,4013	0,2494	0,1657	0,1312	0,1403	0,0833
	Maus 9	0,4359	0,2836	0,1788	0,1288	0,1541	0,1447
(-)-Kontrolle		0,0747	0,0729	0,0743	0,0990	0,1257	0,1560

Durchführung des 2. ELISA Tests (Abb. 3.4.6.2):

1. **Beschichtung** der Platten mit **Tetanus-Toxoid 82** in Coating-Puffer ($c = 5 \mu\text{g/ml}$), $50 \mu\text{l/Nute}$, 1 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. **Blocken** noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x, 0.5 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

3. **Titration** der Seren ab einer Verdünnung von 1:2500, $50 \mu\text{l/well}$, 1 h, 37°C .

Durchführung: Es werden $50 \mu\text{l}$ einer 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x in jeder Nute vorgelegt. Anschließend pipettiert man $50 \mu\text{l}$ des entsprechenden Serums (Verdünnung: 1:200 in 1%-iger Lösung von BSA (in PBS1x)) in die erste Nute einer Reihe der ELISA-Platte (\rightarrow Endverdünnung = 1:2500). Nach gründlichem Mischen werden $50 \mu\text{l}$ der Lösung entnommen und zur folgenden Nute gegeben. Diese Prozedur wird bis zum Ende einer Reihe wiederholt. Aus der letzten Vertiefung werden abschließend $50 \mu\text{l}$ der Lösung entnommen und verworfen. Es wird 1 h bei 37°C inkubiert.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

4. **Zugabe des biotinylierten**, gegen Maus-Gesamtimmungglobulin gerichteten **Antikörpers** aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in 1%-iger Gelatine Lösung in PBS1x) einer Stammlösung mit $c = 1.2 \mu\text{g/ml}$), 1 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. **Zugabe von** $50 \mu\text{l/well}$ **SA-HPO** (1:10000) in 1%-iger Gelatine-Lösung PBS1x. Inkubation: 0.5 h, 37°C .

6. Zugabe von $50 \mu\text{l/Nute}$ der **ABTS/H₂O₂**-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Daten des ELISA-Tests 2:

Verdünnung		1/2500	1/5000	1/10.000	1/20.000	1/40.000	1/80.000
1. Blüten	Maus 7	1,3017	1,2279	1,1075	0,9182	0,5638	0,3616
	Maus 8	1,3663	1,3300	1,3362	1,1961	1,2223	1,2024
	Maus 9	1,4080	1,2639	1,1739	1,1678	1,1623	1,1260
2. Blüten	Maus 7	1,3701	1,2142	1,1228	1,0975	1,0704	0,9218
	Maus 8	1,4450	1,2630	1,2098	1,1540	1,1214	1,1277
	Maus 9	1,3128	1,2501	1,1764	1,3307	1,1739	1,1135

Verdünnung		1/160.000	1/320.000	1/640.000	1/1.280.000	1/2.560.000	1/5.120.000
1. Blüten	Maus 7	0,2357	0,1689	0,1214	0,1161	0,1074	0,0641
	Maus 8	1,2243	1,0835	0,8262	0,5585	0,3553	0,2167
	Maus 9	0,9659	0,6959	0,4358	0,2724	0,1896	0,1104
2. Blüten	Maus 7	0,7105	0,4747	0,2870	0,2011	0,1536	0,1015
	Maus 8	1,0807	0,9506	0,6962	0,4212	0,2786	0,2140
	Maus 9	0,8403	0,6383	0,3773	0,2417	0,2099	0,1654

Allgemeine Durchführung des Neutralisationstests in Abb. 3.4.5.5 und Abb. 3.4.5.6:

1. **Beschichtung** der Platten mit **BSA-Konjugat: MUC1-BSA, MUC1-STn-BSA 81, MUC1-STn-Tn-BSA, MUC1-STn-Tn-Tn-BSA, MUC1-T-BSA 85, MUC1-2,6ST-BSA 91 und MUC1(12 Aminosäuren)-STn-BSA** in Coating-Puffer ($c = 10 \mu\text{g/ml}$), $50 \mu\text{l/Nute}$, 1 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. **Blocken** noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x, 0.5 h, 37°C .

3. Inkubation des Serums von Maus 8:

Durchführung: Hierzu werden jeweils $40 \mu\text{l}$ des Serums in den Verdünnungen 1/1000 in die erste Nute einer Grainer-96-Loch-Mikrotiterplatte eingebracht und mit $40 \mu\text{l}$ PBS(1x) auf $80 \mu\text{l}$ aufgefüllt und titriert (Endverdünnung: 1/2000). Anschließend werden $10 \mu\text{l}$ der Inkubationssubstanz (siehe Abb. 3.4.5.4) in einer Konzentration von $c = 500 \mu\text{g/ml}$ zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert.

4. 3x **Waschen** der mit BSA-Konjugaten beschichteten Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. **Übertrag** der Seren von der Grainer-Platte (Punkt 3.) in die mit BSA-Konstrukten beschichteten Platte.

Es wird 1 h bei 37°C inkubiert.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

6. **Zugabe des biotinylierten**, gegen Maus-Gesamtimmungglobulin gerichteten **Antikörpers** aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in 1%-iger Gelatine Lösung in PBS1x) einer Stammlösung mit $c = 1.2 \mu\text{g/ml}$), 1 h, 37°C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

7. **Zugabe von 50 µl/well SA-HPO (1:10000)** in 1%-iger Gelatine-Lösung PBS1x.
Inkubation: 0.5 h, 37 °C.

8. Zugabe von 50 µl/Nute der **ABTS/H₂O₂**-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Daten der Neutralisationsexperimente:

Verdünnung	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	Beschichtung	Inkubat
081126 Maus 8	2,2701	2,4591	2,3730	2,2627	MUC1-BSA	
081126 Maus 8	2,1849	2,1439	1,8295	1,3837	MUC1-BSA	MUC1
081126 Maus 8	2,2477	2,2385	2,1911	2,1600	MUC1-STn-BSA	
081126 Maus 8	2,1773	2,0895	1,7684	1,2640	MUC1-STn-BSA	MUC1-STn
081126 Maus 8	2,1909	2,2499	2,1216	1,9970	MUC1-STn-Tn-BSA	
081126 Maus 8	2,2039	2,2446	2,0131	1,6464	MUC1-STn-Tn-BSA	MUC1-STn-Tn
081126 Maus 8	2,2479	2,3632	2,2498	2,0412	MUC1-STn-Tn-Tn-BSA	
081126 Maus 8	2,7623	2,8484	2,7778	2,4277	MUC1-STn-Tn-Tn-BSA	MUC1-STn-Tn-Tn
081126 Maus 8	2,6149	2,9264	2,8500	2,6523	MUC1-T-BSA	
081126 Maus 8	2,5963	2,6994	2,5139	2,1066	MUC1-T-BSA	MUC1-T
081126 Maus 8	2,5729	2,6000	2,7565	2,5723	MUC1-2,6T-BSA	
081126 Maus 8	2,6000	2,5924	2,3371	1,8977	MUC1-2,6T-BSA	MUC1-2,6ST
081126 Maus 8	2,4657	2,3846	1,7820	1,0598	MUC1(12)-STn-BSA	
081126 Maus 8	2,4348	2,3045	1,9358	1,2043	MUC1(12)-STn-BSA	MUC1(12)-STn
(-)-Kontrolle	0,0700	0,1407	0,1282	0,1226	negativ	

Verdünnung	1/32000	1/64000	1/128000	1/256000	Beschichtung	Inkubat
081126 Maus 8	1,8644	1,1881	0,6529	0,3520	MUC1-BSA	
081126 Maus 8	0,8007	0,4493	0,2835	0,2975	MUC1-BSA	MUC1
081126 Maus 8	1,8845	1,4135	0,8806	0,5304	MUC1-STn-BSA	
081126 Maus 8	0,8311	0,5165	0,3348	0,2239	MUC1-STn-BSA	MUC1-STn
081126 Maus 8	1,5476	1,0359	0,5651	0,3245	MUC1-STn-Tn-BSA	
081126 Maus 8	1,1373	0,7312	0,4469	0,2814	MUC1-STn-Tn-BSA	MUC1-STn-Tn
081126 Maus 8	1,6079	1,0651	0,5432	0,3023	MUC1-STn-Tn-Tn-BSA	
081126 Maus 8	1,8884	1,2498	0,7683	0,4732	MUC1-STn-Tn-Tn-BSA	MUC1-STn-Tn-Tn
081126 Maus 8	2,2449	1,7185	0,9547	0,4613	MUC1-T-BSA	
081126 Maus 8	1,5203	0,9718	0,6828	0,3809	MUC1-T-BSA	MUC1-T
081126 Maus 8	2,6348	1,6090	1,0409	0,5893	MUC1-2,6T-BSA	
081126 Maus 8	1,2263	0,7820	0,4681	0,3281	MUC1-2,6T-BSA	MUC1-2,6ST
081126 Maus 8	0,5748	0,4468	0,3185	0,1415	MUC1(12)-STn-BSA	
081126 Maus 8	0,5626	0,3563	0,2397	0,1508	MUC1(12)-STn-BSA	MUC1(12)-STn
(-)-Kontrolle	0,1364	0,1359	0,1066	0,1094	negativ	

<i>Verdünnung</i>	<i>1/512000</i>	<i>1/1024000</i>	<i>1/2048000</i>	<i>1/4096000</i>	Beschichtung	Inkubat
081126 Maus 8	0,2190	0,1670	0,1420	0,0862	MUC1-BSA	
081126 Maus 8	0,1441	0,1208	0,1202	0,0765	MUC1-BSA	MUC1
081126 Maus 8	0,2895	0,1950	0,1605	0,1013	MUC1-STn-BSA	
081126 Maus 8	0,1581	0,1341	0,1354	0,0770	MUC1-STn-BSA	MUC1-STn
081126 Maus 8	0,1973	0,1511	0,1128	0,0759	MUC1-STn-Tn-BSA	
081126 Maus 8	0,1902	0,1540	0,1458	0,0776	MUC1-STn-Tn-BSA	MUC1-STn-Tn
081126 Maus 8	0,1901	0,1459	0,1305	0,0733	MUC1-STn-Tn-Tn-BSA	
081126 Maus 8	0,2735	0,2062	0,1708	0,0993	MUC1-STn-Tn-Tn-BSA	MUC1-STn-Tn-Tn
081126 Maus 8	0,2816	0,1777	0,1740	0,0991	MUC1-T-BSA	
081126 Maus 8	0,2243	0,1717	0,1562	0,0859	MUC1-T-BSA	MUC1-T
081126 Maus 8	0,3030	0,1905	0,1783	0,0915	MUC1-2,6T-BSA	
081126 Maus 8	0,1915	0,1766	0,1936	0,0793	MUC1-2,6T-BSA	MUC1-2,6ST
081126 Maus 8	0,1334	0,1221	0,1356	0,0808	MUC1(12)-STn-BSA	
081126 Maus 8	0,1141	0,1251	0,1225	0,0672	MUC1(12)-STn-BSA	MUC1(12)-STn
(-)-Kontrolle	0,1065	0,1156	0,1171	0,0650	negativ	

5.5 Synthesen zu Kapitel 3.5

N^α,*N*^ε-Tetrakis-(*N*^α,*N*^ε-bis{*N*^α,*N*^ε-bis-[*N*-acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl]-L-lysyl}-L-lysyl)-L-lysyl-β-alanin (**95**)

{[Ac-PAHGV-T(αGalNAc)-SAPDTRPAPGSTAP]₂K₂K₂K-βA-OH

Die automatisierte Peptidsynthese des octameren, mit Tn-Antigen glycosylierten MUC1-Eicosapeptid **94** erfolgt im Synthesizer ausgehend von 125 mg {[Fmoc-Lys(Fmoc)]₂-Lys}₂-Lys-β-alanyl-PHB-aminomethyl-polystyrol **93** (125 mg, Beladung: 0.04 mmol Fmoc = 0.05 mmol Peptid). Die Kupplung der ersten 14 Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll. Die Kupplung des Tn-Bausteins **11a** geschieht halbautomatisch. Hierzu wird zunächst die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom harzgebundenen Peptid abgespalten. Der Glycosylaminosäurebaustein **11a** (135 mg, 0.20 mmol, 4 eq.) wird mit 97.5 mg (0.25 mmol, 5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 5 eq.) HOAt und 65 μl (0.5 mmol, 10 eq.) NMM in 2 ml NMP aktiviert und in den Reaktor überführt. Das Harz wird 6 h in dieser Lösung stark geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Die Kupplung der restlichen fünf Aminosäuren erfolgt wieder vollautomatisch nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wird die *N*-terminale *Fmoc*-Gruppe abgespalten und der *N*-Terminus mit Capping-Reagenz acetyliert. Zur Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt und zwei Stunden in einer Lösung aus 10 ml TFA, 1 ml TIS und 1 ml dest. Wasser geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit je 2 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. dreimal mit Toluol kodestilliert und dann mit 20 ml Diethylether versetzt. Das ausgefallene Peptid wird abdekantiert, in 5 ml Wasser aufgenommen und in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 10000 Da) überführt und 10x mit 50 ml entionisiertem Wasser filtriert.

Ausbeute: 87 mg (0.046 mmol, 92%); farbloses Lyophilisat; analyt. HPLC (Phenomenex Jupiter C18, H₂O/MeCN + 0.1% TFA 90:10 → 0:100 in 40 min., λ = 214 nm): R_t = 12.9 min. C₈₁₁H₁₂₅₅N₂₂₃O₂₉₇ (M = 18880.96 g/mol) [18870.00].

Entfernung der Kohlenhydratschutzgruppen: 87 mg (0.046 mmol) {[Ac-PAHGV-T(α-Ac₃GalNAc)-SAPDTRPAPGSTAP]₂K₄K₂K-OH **94** werden in 25 ml wässriger NaOH-Lösung pH 11.5 gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisation mit

1N Essigsäure wird gefriergetrocknet und im Anschluss mittels semipräparativer HPLC gereinigt (Phenomenex Jupiter C18, H₂O/MeCN + 0.1% TFA (90:10) → (0:100) in 40 min., Rt = 13.3 min., λ = 214 nm).

Ausbeute: 67 mg (0.037 mmol, 81%); farbloses Lyophilisat; $[\alpha]_D^{23} = -107.6$ (c = 1.0 g/100 ml, H₂O); Rt = 10.0 min (Jupiter C18, H₂O/MeCN + 0.1% TFA (90:10) → (0:100) in 40 min., λ = 214 nm).

C₇₆₃H₁₂₀₇N₂₂₃O₂₇₃ (M = 17872.08 g/mol) [17861.74].

HR-ESI-MS (positive), m/z: 1793.0 ([M+7H+3Na]¹⁰⁺, ber.: 1791.6), 1797.1 ([M+6H+4Na]¹⁰⁺, calcd.: 1796.0), 1638.3 ([M+5H+6Na]¹¹⁺, calcd.: 1636.8), 1640.2 ([M+4H+7Na]¹¹⁺, calcd.: 1638.8), 1506.7 ([M+3H+9Na]¹¹⁺, calcd.: 1506.0).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY), δ [ppm]: 8.96 (s, 8H, 8xH_{Im-H2}), 8.26-8.19 (m, 20H, 4xK_{NHα} {8.24}, 8xD_{NH} {8.23}, 8xG_{NH} {8.22}), 8.18-7.88 (m, 76H, 8xG_{NH} {8.14}, 3xK_{NH} {8.13}, 8xA_{NH} {8.12}, 8xS_{NH} {8.05}, 8xA_{NH} {8.04}, 8xV_{NH} {7.96}, 8xS_{NH} {7.94}, 8xR_{NH} {7.92}, 1xβ_{A_{NH}} {7.92}, 16xA_{NH} {7.93}, 7.81 (8H, 8xT_{NH}), 7.75 (16H, 16xT_{NH}), 7.51-7.48 (m, 8H, 8xR_{NH-Gua}), 7.38 (s, 8H, 8xH_{Im-H4}), 7.38-7.22 (m, 7H, 7xK_{NHε}), 7.11 (d, 8H, 8xNH-GalNAc, J_{NH,H2} = 8.4 Hz), 4.71 (sb, 8H, 8xH1), 4.62-3.85 (m, 171H, 8xH_α {4.56}, 8xD_α {4.52}, 8xR_α {4.49}, 8xA_α {4.48}, 8xV_α {4.47}, 8xA_α {4.45}, 8xT_{Nα} {4.39}, 8xS_α {4.38}, 8xA_α {4.36}, 40xP_α {4.33, 4.28, 4.21, 4.18, 4.16}, 8xS_α {4.29}, 7xK_α {4.24, 4.16}, 16xT_α {4.18}, {4.15}, 8xA_α {4.14}, 8xT_{Tβ} {4.14}, 8xT_{2β} {4.05}, 8xH₂ {3.93}, 8xT_β {3.93}, 8xG_{αα} {3.88}), 3.80-3.69 (m, 32H, 8xH₅ {3.76}, 8xG_{ab} {3.74}, 8xH_{6a} {3.72}, 8xG_α {3.72}), 3.68-3.41 (m, 138H, 8xH₄ {3.64}, 40xP_{1-5δ} {3.64, 3.57, 3.48, 3.43}, 1xβ_{Aβ} {3.59}, 8xS_{βα} {3.61}, 8xH₃ {3.60}, 8xS_{βb} {3.52}, 16S_β {3.51}, 8xH_{6b} {3.46}), 3.18-2.70 (m, 38H, 7xK_ε {3.16}, 8xR_δ {3.08}), 8xD_{βa}), 2.55-2.45 (m, 8H (unter DMSO), 8xD_{βb} {2.51}), 2.22-2.08 (m, 34H, 16xP_{βa} {2.13, 2.12}, 1xβ_{Aα} {2.10}), 2.06-1.94 (m, 56H, 24xP_{βa} {2.01, 1.99, 1.98}, 8xV_β {1.98}), 1.93-1.62 (m, 148H, 40xP_γ {1.88-1.81}, 7xK_β {1.71-1.65}, 8xAcNH {1.86}, 40xP_{βb} {1.82, 1.77, 1.76, 1.75, 1.68}, 8xR_{βa} {1.67}), 1.57-1.41 (m, 38H, 8xR_{βb} {1.52}, 8xR_γ {1.51}, 7xK_δ {1.47}), 1.30-1.05 (m, 134H, 32xA_β {1.21, 1.17, 1.15, 1.13}, 7xK_γ {1.10}, 8xT_{Tγ} {1.10, d, J_{Tγ,Tβ} = 5.7 Hz}), 1.05-0.96 (m, 48H, 16xT_γ), 0.93 (d, 24H, V_{γa}, J_{Vγa,Vβ} = 6.7 Hz), 0.83 (d, 24H, V_{γb}, J_{Vγb,Vβ} = 6.7 Hz).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, BB, HMQC), δ [ppm]: 173.3, 172.3, 172.1, 171.8, 171.8, 171.1, 170.4, 170.3, 170.1, 169.9, 169.6, 169.5, 169.2 (C=O), 172.0, 170.7, 169.6 (C=O-Acetyl), 133.7 (H_{Im-C2}), 117.2 (H_{Im-C4}), 98.9 (C1), 75.4 (T_{Tn*β}), 68.8 (C3), 68.7 (C4), 66.8 (T_β), 66.7 (C5), 66.3 (T_β), 63.7 (C6), 61.8, 61.8 (S_β), 59.3, 59.1, 58.5, 58.1, 57.9 (P_α), 58.1 (T_α), 58.0 (T_α), 57.3 (V_α), 56.1 (T_{Tnα}), 54.9, 54.8 (S_α), 53.5, 52.2 (K_α), 51.5 (H_α), 50.0 (R_α),

49.7 (D α), 49.5 (C2), 48.2, 46.5, 46.3 (A α), 46.8, 46.6, 46.4, 46.6 (P δ), 42.2, 42.1 (G α), 41.4 (β A α), 40.6 (R δ), 39.1, 38.2 (K ϵ), 35.6 (D β), 31.0 (V β), 30.6, 30.2 (K β), 29.1, 29.0, 28.8, 28.5, 27.9 (P β), 28.4 (R β), 28.0 (β A β), 27.8 (K δ), 27.0 (H β), 24.5 (R γ), 24.6-24.4 (P γ), 24.6, 24.6, 24.4 (CH₃-AcNH), 22.3 (K γ), 20.0, 19.9 (T γ), 19.4 (V γ _a), 18.4 (T_{T γ}), 18.2 (V γ _b), 17.7-16.5 (A β).

***N* ^{α} ,*N* ^{ϵ} -Tetrakis-(*N* ^{α} ,*N* ^{ϵ} -bis{*N* ^{α} ,*N* ^{ϵ} -bis-[*N*-acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl]-L-lysyl}-L-lysyl)-L-lysin- β -alanin (97)**

{[Ac-PAHGV-T(β -Gal-(1-3)- α -GalNAc)-SAPDTRPAPGSTAP]₂K}₂K β -OH

Die automatisierte Peptidsynthese des octameren, mit TF-Antigen glycosylierten MUC1-Eicosapeptid **96** erfolgt im Synthesizer ausgehend von 125 mg {[Fmoc-Lys(Fmoc)]₂-Lys}₂-Lys- β -alanyl-PHB-aminomethyl-polystyrol **93** (125 mg, Beladung: 0.04 mmol Fmoc = 0.05 mmol Peptid). Die Kupplung der ersten 14 Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll. Die Kupplung des TF-Bausteins **25** geschieht halbautomatisch. Hierzu wird zunächst die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe vom Harz abgespalten. Der Glycosylaminosäurebaustein **25** (192 mg, 0.20 mmol, 4 eq.) wird mit 97.5 mg (0.25 mmol, 5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 5 eq.) HOAt und 55 μ l (0.5 mmol, 5 eq.) NMM in 2 ml NMP aktiviert und in den Reaktor überführt. Das Harz wird 5 h in dieser Lösung stark geschüttelt (30 sec. Vortex, 30 sec. Stillstand). Die Kupplung der restlichen fünf Aminosäuren erfolgt wieder vollautomatisch nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wird die *N*-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten und der *N*-Terminus mit Capping-Reagenz acetyliert. Zur Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt und zwei Stunden in einer Lösung aus 10 ml TFA, 1 ml TIS und 1 ml dest. Wasser geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz noch dreimal mit je 2 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. dreimal mit Toluol kodestilliert und dann mit 20 ml Diethylether versetzt. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert, in dest. Wasser aufgenommen, lyophilisiert und mittels semipräparativer HPLC gereinigt (Jupiter C18, H₂O/MeCN + 0.1% TFA (90:10) \rightarrow (0:100) in 40 min., Rt = 18.8 min., λ = 214 nm)..

Ausbeute: 106 mg (0.05 mmol, 99%); farbloses Lyophilisat.

$C_{909}H_{1387}N_{223}O_{361}$ (M = 21215.02 g/mol) [21202.70].

Entfernung der Kohlenhydratschutzgruppen: 106 mg (0.05 mmol) {[Ac-PAHGV-T(β -Ac₄Gal-(1-3)- α -Ac₂GalNAc)-SAPDTRPAPGSTAP]₂K)₄K}₂K-OH **96** werden in 25 ml wässriger NaOH-Lösung pH 11.5 gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisation mit 1N Essigsäure wird gefriergetrocknet und im Anschluss mittels semipräparativer HPLC gereinigt (Jupiter C18, H₂O/MeCN (90:10) → (0:100) in 40 min., R_t = 13.0 min., λ = 214 nm).

Ausbeute: 82 mg (0.034 mmol, 67%); farbloses Lyophilisat; $[\alpha]_D^{23} = -104.1$ (c = 1.0, H₂O); R_t = 7.8 min. (Jupiter C18, H₂O/MeCN + 0.1% TFA (90:10) → (0:100) in 40 min., λ = 214 nm).

$C_{811}H_{1287}N_{223}O_{131}$ (M = 19169.20 g/mol) [19158.16].

ESI-MS (positiv), m/z: 1917.6 ([M+10H]¹⁰⁺, calcd.: 1916.8), 1745.9 ([M+11H]¹¹⁺, calcd.: 1743.7), 1598.2 ([M+12H]¹²⁺, calcd.: 1597.5).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY), δ [ppm]: 8.48 (d, 8H, H _{ϵ} , J_{H ϵ , H δ} = 1.27 Hz), 7.17 (m, 8H, H δ), 4.80 (d, 8H, H₁, J_{H₁, H₂} = 3.78 Hz), 4.62-3.95 (m, 183H, D _{α} {4.59}, H _{α} {4.58}, R _{α} {4.55}, T_{T* α} {4.50}, A_{3 α} {4.47}, A_{2 α} {4.41}, S_{2 α} {4.38}, A_{4 α} {4.34}, S_{1 α} {4.30}, H_{1'} {4.28}, P_{1-5 α} {4.25, 4.23, 4.22, 4.19, 4.18}, 7x K _{α} {4.26, 4.22, 4.18}, V _{α} {4.19}, T_{T* β} {4.18}, A_{1 α} {4.09}, T_{1 α} {4.09}, T_{2 α} {4.07}, T_{2 β} {4.06}, T_{1 β} {4.03}), 3.94-3.40 (m, 216H, H_{5'} {3.89}, H₂ {3.86}, H₃ {3.85}, G_{1 α} {3.83}, G_{1 α} b {3.80}, H₅, H_{4'}, H_{5'} {3.75}, S_{2 β} {3.71}, H_{6'a,b} {3.69}, G_{2 α} {3.68}, S_{1 β} {3.68}, H_{6'a,b} {3.63}, H₄ {3.59}, P_{1-5 δ} {3.59, 3.54, 3.50, 3.48}, H_{3'} {3.45}), 3.34 (m, 8H, H_{2'}), 3.16 (m, 8H, H _{β a}), 3.11-2.93 (m, 46H, 7x K _{ϵ} {3.09-3.00}, H _{β b} {3.07}, D _{β a} {3.04}, R _{δ} {2.97}), 2.88-2.68 (m, 8H, D _{β b}), 2.44 (m, 4H, β -A), 2.25-2.04 (m, 16H, P_{1,2 β a} {2.15, 2.09}), 2.02-1.43 (m, 260H, P_{3-5 β a} {1.98, 1.88, 1.85}, V _{β} {1.93}, P_{1-5 γ} {1.96-1.78}, AcNH {s, 1.95}, P_{1-5 β b} {1.82-1.72}, AcNH_{T*} {s, 1.86}, 7x K _{β} {1.85-1.66}, R _{β a} {1.68}, R _{β b} {1.55}, R _{γ} {1.52}, 7x K _{δ} {1.64-1.46}), 1.42-1.29 (m, 14H, 7x K _{γ}), 1.25-1.14 (m, 96H, A_{2 β} , {1.23}, A_{3 β} {1.22}, A_{4 β} {1.21}, {1.18, d, A_{1 β} , J_{A β , A α} = 7.40 Hz}), 1.12 (d, 24H, T_{T* γ} , J_{T γ , T β} = 6.28 Hz), 1.04 (t, 48H, T_{2 γ} , T_{1 γ} , J_{T γ , T β} = 5.59 Hz), 0.82 (t, 48H, V _{γ} , J_{V γ , V β} = 6.92 Hz).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC): δ (ppm):

174.89, 174.81, 174.41, 173.92, 173.88, 173.77, 173.71, 173.57, 173.43, 173.10, 173.05, 172.63, 172.54, 172.45, 171.98, 171.88, 171.43, 171.32, 171.19, 171.14, 171.05, 170.88, 170.65, 163.06, 162.70 (C=O, C=O-Acetyl), 156.60 (C=NH), 133.42 (H_{C2}), 128.32 (H_{C5}), 117.22 (H_{C4}), 104.57 (C_{1'}), 99.09 (C₁), 76.97 (T_{T* β} , C₃), 74.92 (C_{4'}), 72.42 (C_{3'}), 70.90 (C_{5'}), 70.50 (C_{2'}), 68.83 (C₂), 68.50 (C₄), 67.03 (T_{1 β}), 67.00 (C₅), 66.96 (T_{2 β}), 61.35, 61.25

Diethylether versetzt. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert, in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgt durch semipräparative HPLC (Jupiter C18, H₂O/MeCN + 0.1% TFA (90:10) → (0:100) in 40 Min., R_t = 27.0 Min., λ = 214 nm).

Ausbeute: 84 mg (0.037 mmol, 73%); farbloses Lyophilisat.

C₁₀₀₅H₁₄₉₁N₂₃₁O₃₈₅ (M = 22968.91 g/mol) [22955.42].

Entfernung der Kohlenhydratschutzgruppen: 84 mg (0.037 mmol) {[Ac-PAHGV-T-S(αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→6)-αAc₂GalNAc)APDTRPAPGSTAP]₂K)₄K}₂K-OH **98** werden in 25 ml wässriger NaOH-Lösung pH 11.5 gelöst und 24 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Nach Neutralisation mit 1N Essigsäure wird gefriergetrocknet und im Anschluss mittels semipräparativer HPLC gereinigt (Jupiter C18, H₂O/MeCN + 0.1% TFA (90:10) → (0:100) in 40 min., R_t = 12.3 min., λ = 214 nm).

Ausbeute: 67 mg (0.034 mmol, 92%); farbloses Lyophilisat; [α]_D²³ = -92.8 (c = 1.0, H₂O); R_t = 9.1 min. (Jupiter C18, H₂O/MeCN + 0.1% TFA (90:10) → (0:100) in 40 min., λ = 214 nm).

C₈₅₁H₁₃₄₃N₂₃₁O₃₃₇ (M = 20202.11 g/mol) [20190.51].

ESI-MS (positive), m/z: 2244.5 ([M+9H]⁹⁺, ber.: 2244.4), 2021.2 ([M+10H]¹⁰⁺, calcd.: 2020.1), 1837.4 ([M+11H]¹¹⁺, calcd.: 1836.5), 1684.3 ([M+12H]¹²⁺, calcd.: 1683.5).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY), δ [ppm]: 8.47 (d, 8H, H_ε, J_{H_ε, H_δ} = 1.20 Hz), 7.18-7.16 (m, 8H, H_δ), 4.73 (d, 8H, H₁, unter D₂O-Signal), 4.63-3.95 (m, 175H, D_α {4.60}, H_α {4.56}, R_α {4.53}, A_{3α} {4.45}, A_{2α} {4.44}, S_{STnα} {4.40}, S_{1α} {4.31}, A_{4α} {4.26}, P_{1-5α} {4.28, 4.24, 4.21, 4.17, 4.13}, 7x K_α {4.26, 4.22, 4.18}, V_α {4.19}, T_{1α} {4.17}, T_{1β} {4.17}, A_{1α} {4.11}, T_{2α} {4.07}, T_{3α} {4.07}, T_{3β} {4.04}, T_{2β} {4.02}), 3.94-3.27 (m, 248H, H₂ {3.92}, G_{1αα} {3.88}, G_{1αb} {3.82}, H₅ {3.74}, S_{STnβ} {3.71}, H₃ {3.67}, G_{2α} {3.66}, S_{1β} {3.65}, H_{6a,b} {3.63}, H₄ {3.60}, H₆" {3.58}, H_{9a}" {3.56}, H₇" {3.54}, P_{1-5δ} {3.56, 3.52, 3.50, 3.45}, H_{9b}" {3.53}, H₄" {3.53}, H₈" {3.51}, H₅" {3.49}), 3.20-2.91 (m, 54H, H_{βa} {3.16}, H_{βb} {3.06}, D_{βa} {3.05}, R_δ {3.05}, 7x K_ε {3.11-2.94}), 2.90-2.66 (m, 8H, D_{βb}), 2.53 (dd, 8H, H_{3eq}" , J_{H_{3eq}, H_{3ax}} = 12.60 Hz, J_{H_{3eq}, H₄} = 4.76 Hz), 2.44 (m, 4H, β-A), 2.25-2.05 (m, 16H, P_{1,2βa} {2.20, 2.14}), 2.00-1.45 (m, 292H, P_{3-5βa} {1.92, 1.88, 1.84}, V_β {1.94}, P_{1-5βb} {2.01, 1.97, 1.95, 1.91, 1.88}, P_{1-5γ} {1.93-1.72}, AcNH {s, 1.95}, AcNH_{STn*} {2x s, 1.88, 1.87}, 7x K_β {1.83-1.64}, R_{βa} {1.65}, R_{βb} {1.61}, H_{3ax}" {1.63}, R_γ {1.52}, 7x K_δ {1.65-1.46}), 1.42-1.30 (m, 14H, 7x K_γ), 1.27-1.14 (m, 96H, {1.22 d, A_{2β}, J_{A_β, A_α} = 6.60 Hz}, A_{3β} {1.21}, A_{4β} {1.21}, {1.18, d, A_{1β}, J_{A_β, A_α} = 7.20 Hz}), 1.10-0.98 (m, 72H, T_{1γ}, T_{2γ}, T_{3γ}), 0.79 (d, 24H, V_γ, J_{V_{γa}, V_β} = 6.72 Hz), 0.78 (d, 24H, V_γ, J_{V_{γb}, V_β} = 6.68 Hz).

Standardprotokoll. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wird die *N*-terminale *Fmoc*-Gruppe abgespalten und der *N*-Terminus mit Capping-Reagenz acetyliert. Zur Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt und zwei Stunden in einer Lösung aus 10 ml TFA, 1 ml TIS und 1 ml dest. Wasser geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz noch dreimal mit je 2 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. dreimal mit Toluol kodestilliert und dann mit 20 ml Diethylether versetzt. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert, in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgt durch semipräparative HPLC (Jupiter C18, H₂O/MeCN + 0.1% TFA (90:10) → (0:100) in 40 Min., *R*_t = 33.4 Min., λ = 214 nm).

Ausbeute: 75 mg (0.030 mmol, 59%); farbloses Lyophilisat.

C₁₁₄₁H₁₇₂₅N₂₅₅O₄₃₂ (M = 25922.94 g/mol) [25640.07].

Entfernung der Kohlenhydratschutzgruppen: 75 mg (0.030 mmol) des dendrimeren Glycopeptids **100** werden in 25 ml wässriger NaOH-Lösung pH 11.5 gelöst und 24 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Nach Neutralisation mit 1N Essigsäure wird gefriergetrocknet und im Anschluss mittels semipräparativer HPLC gereinigt (Jupiter C18, H₂O/MeCN + 0.1% TFA (90:10) → (0:100) in 40 min., *R*_t = 17.4 min., λ = 214 nm).

Ausbeute: 30 mg (0.013 mmol, 43%); farbloses Lyophilisat; [α]_D²³ = -127.6 (c = 1.0, H₂O); *R*_t = 16.2 min. (Jupiter C18, H₂O/MeCN + 0.1% TFA (90:10) → (0:100) in 40 min., λ = 214 nm).

C₉₈₉H₁₅₈₁N₂₅₅O₃₈₄ (M = 23186.94 g/mol) [22904.07].

ESI-MS (positive), *m/z*: 1909.9 ([M+12H]¹²⁺, calcd.: 1909.7).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY), δ [ppm]: 8.49 (m, 8H), 7.18 (m, 8H, H_δ), 4.80 (d, 8H, H₁, *J*_{H1, H2} = 3.48 Hz), 4.64-4.00 (m, 177H, D_α {4.61}, H_α {4.57}, R_α {4.55}, A_{3,5α} {4.46}, A_{2α} {4.45}, S_{2α} {4.41}, S_{1α} {4.30}, A_{4α} {4.27}, T_{STnα} {4.18}, P_{1-6α} {4.29, 4.26, 4.23, 4.21, 4.17, 4.14}, 7x K_α {4.25, 4.20, 4.17}, V_α {4.19}, T_{STnβ} {4.14}, T_{1α} {4.16}, T_{1β} {4.14}, A_{1α} {4.12}, T_{2α} {4.08}, T_{2β} {4.05}), 3.96 (m, 1H, H₂), 3.91-2.93 (m, 311H, G_{1αa} {3.89}, G_{1αb} {3.84}, 3x CH₂O-Spacer {3.78}, H₅ {3.73}, S_{2β} {3.70}, H₃ {3.68}, G_{2α} {3.65}, 3-CH₂-Spacer {3.65}, S_{1β} {3.64}, H_{6,a,b} {3.61}, H₄ {3.60}, H_{6''} {3.58}, H_{9a''} {3.55}, H_{7''} {3.55}, P_{1-6δ} {3.58, 3.55, 3.52, 3.48, 3.45}, H_{9b''} {3.52}, H_{4''} {3.51}, H_{8''} {3.50}, H_{5''} {3.47}, H_{βa} {3.23}, CH₂-Spacer {3.11}, H_{βb} {3.09}, D_{βa} {3.07}, R_δ {3.05}, 7x K_ε {3.11-2.94}), 2.92-2.67 (m, 8H, D_{βb}), 2.56 (dd, 8H, H_{3eq}'', *J*_{H3eq,H3ax} = 12.48 Hz, *J*_{H3eq,H4} = 4.63 Hz), 2.50-2.40 (m, 20H, CH₂-Spacer, β-A), 2.37 (t, 16H, 12-CH₂-Spacer, *J*_{CH₂.CH₂} = 5.68 Hz), 2.30-2.06 (m, 40H, P_{1,2,3βa} {2.20, 2.18,

2.14}, CH₂-Spacer {2.10}), 2.04-1.46 (m, 316H, P_{4-6βa} {1.93, 1.90, 1.87}, V_β {1.94}, P_{1-6βb} {2.00, 1.95, 1.92, 1.89, 1.86}, P_{1-6γ} {1.94-1.70}, AcNH {s, 1.89}, AcNH_{STn*} {2x s, 1.88, 1.86}, 7x K_β {1.82-1.60}, R_{βa} {1.66}, R_{βb} {1.62}, H_{3ax}" {1.61}, R_γ {1.54}, 7x K_δ {1.66-1.45}), 1.44-1.30 (m, 14H, 7x K_γ), 1.31-1.14 (m, 120H, A_{2β}, A_{3β} {1.21}, A_{4β} {1.19}, A_{4β} {1.18}, A_{1β}), 1.16 (d, T_{STnγ}, J_{TSTnγa,TSTnβ} = 6.80 Hz), 1.10-1.01 (m, 48H, T_{1γ}, T_{2γ}), 0.85-0.78 (m, 48H, V_γ).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC): δ (ppm):

174.97, 174.90, 174.86, 174.15, 173.99, 173.86, 173.75, 173.63, 173.45, 173.15, 172.84, 172.50, 172.39, 172.01, 171.91, 171.53, 171.36, 171.23, 170.78, 170.55, 163.12, 162.76 (C=O, C=O-Acetyl, C1"), 156.66 (C=NH), 133.45 (H_{C2}), 128.51 (H_{C5}), 117.23 (H_{C4}), 99.82 (C2"), 98.90 (C1), 77.55 (T_{STn*β}), 72.77 (C6"), 70.83 (C7"), 69.67 (C9"), 69.09 (CH₂-Spacer), 68.43 (C8"), 68.34 (C2), 68.26 (C3), 67.57 (C4), 67.39 (C5), 67.00, 66.93 (T_{2β}, T_{3β}, C4", C6), 63.66 (T_{1β}), 61.46, 61.42 (S_{1β}, S_{2β}), 61.11 (m), 60.70 (m) (P_{1-6α}), 60.21 (V_α), 60.02 (T_{3α}), 59.85 (T_{2α}), 58.90 (T_{STn*α}), 55.55 (m) (S_{2α}, S_{1α}, K_α, T_{1α}), 53.05 (H_α), 52.25 (C5"), 51.67 (R_α), 51.06 (D_α), 49.61 (m) (A_{3α}, A_{2α}), 49.47 (m) (A_{4α}, A_{1α}), 48.01 (A_{5α}), 48.67 (C2), 47.73 (m), 47.58 (m) (P_{1-5δ}), 42.37 (G_{2α}), 42.13 (CH₂-Spacer), 42.30 (G_{1α}), 40.48 (C3", R_δ), 40.36 (CH₂-Spacer), 39.14 (m) (K_ε), 34.98 (D_β), 31.62 (V_β), 30.11 (K_β), 29.87, 29.50, 29.32, 29.21 (P_{1-5β}), 27.85 (R_β), 27.43 (K_δ), 26.21 (H_β), 24.67, 24.59, 24.25 (P_{1-5γ}), 23.93 (R_γ), 22.36 (K_γ), 21.99, 21.34, 21.10 (CH₃-AcNH), 18.79 (T_{1γ}, T_{2γ}), 18.61 (V_{γa}), 18.31 (T_{STn*γ}), 17.58 (V_{γb}), 16.14, 15.54, 15.38, 15.06 (A_{1-5β}).

Immunisierung 081126 von Mäusen (Maus 1,2,3) mit dem Dendrimer ([Ac-PAHGV-T(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-SAPDTRPAPGSTAP]₂K)₄K]₂K-βA-OH 97:

Etwa acht Wochen alte balb/c-J-Mäuse wurden nach folgendem Schema immunisiert:

Erstimmunisierung: A (40 µl) B (40 µl → 10 µg **97** je Maus) (in eine Fußsohle der drei Mäuse) (CFA + **97**).

3 Sekundärimmunisierungen: C (50 µl) D (50 µl → 10 µg **97** je Maus) (intraperitoneal) (IFA + PBS) (IFA + **97**) Tag: **21, 43, 65**.

Durchführung des 1. ELISA Tests (Abb. 3.5.3.1):

1. **Beschichtung** der Platten mit **Dendrimer ([Ac-PAHGV-T(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-SAPDTRPAPGSTAP]₂K)₄K]₂K-βA-OH 97** in Coating-Puffer (c = 10 µg/ml), 50 µl/Nute, 1 h, 37 °C.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. **Blocken** noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x, 0.5 h, 37 °C.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

3. **Titration** der Seren ab einer Verdünnung von 1:50, 50 µl/well, 1 h, 37 °C.

Durchführung: Es werden 50 µl einer 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x in jeder Nute vorgelegt. Anschließend pipettiert man 50 µl des entsprechenden Serums (Verdünnung: 1:25 in 1%-iger Lösung von BSA (in PBS1x)) in die erste Nute einer Reihe der ELISA-Platte (→ Endverdünnung = 1:50). Nach gründlichem Mischen werden 50 µl der Lösung entnommen und zur folgenden Nute gegeben. Diese Prozedur wird bis zum Ende einer Reihe wiederholt. Aus der letzten Vertiefung werden abschließend 50 µl der Lösung entnommen und verworfen. Es wird 1 h bei 37 °C inkubiert.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

4. **Zugabe des biotinylierten**, gegen Maus-Gesamtimmungglobulin gerichteten **Antikörpers** aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in 1%-iger Gelatine Lösung in PBS1x) einer Stammlösung mit $c = 1.2 \mu\text{g/ml}$), 1 h, 37 °C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. **Zugabe von 50 µl/well SA-HPO** (1:10000) in 1%-iger Gelatine-Lösung PBS1x. Inkubation: 0.5 h, 37 °C.

6. Zugabe von 50 µl/Nute der **ABTS/H₂O₂**-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Daten von Immunisierung 081126 (nach 2. Sekundärimmunisierung):

Verdünnung		1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
081126	Maus 1	1,5531	1,5282	1,4928	1,4489	1,3652	1,1594
	Maus 2	1,5037	1,4349	1,3850	1,3079	1,1958	0,9058
	Maus 3	1,4564	1,4466	1,3583	1,3338	1,2915	1,2868
	(-)-Kontrolle	0,0743	0,1974	0,0946	0,0864	0,0938	0,0915

Verdünnung		1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400
081126	Maus 1	0,7982	0,5220	0,3207	0,2132	0,1559	0,0880
	Maus 2	0,5983	0,4263	0,2330	0,1548	0,1270	0,0743
	Maus 3	1,2342	1,0376	0,7318	0,4688	0,2943	0,1609
	(-)-Kontrolle	0,0853	0,0858	0,0896	0,0844	0,0941	0,0613

Daten von Immunisierung 081126 (nach 3. Sekundärimmunisierung):

Verdünnung		1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
081126	Maus 1	1,7658	1,8618	1,6202	1,5953	1,5430	1,5323
	Maus 2	1,7962	1,8784	1,6318	1,6227	1,6397	1,3718
	Maus 3	1,8099	1,8435	1,7825	1,7064	1,6993	1,7156
	(-)-Kontrolle	0,0743	0,1974	0,0946	0,0864	0,0938	0,0915

Verdünnung		1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400
081126	Maus 1	1,2866	0,9402	0,5859	0,3785	0,2595	0,1305
	Maus 2	1,1934	0,8730	0,5354	0,3574	0,2465	0,1424
	Maus 3	1,6279	1,5325	1,4078	1,0868	0,7305	0,3820
	(-)-Kontrolle	0,0853	0,0858	0,0896	0,0844	0,0941	0,0613

Durchführung des 2. ELISA Tests (Abb. 3.5.3.2):

1. **Beschichtung** der Platten mit **BSA-NH-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH 85** in Coating-Puffer (c = 5 µg/ml), 50 µl/Nute, 1 h, 37 °C.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. **Blocken** noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x, 0.5 h, 37 °C.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

3. **Titration** der Seren ab einer Verdünnung von 1:50, 50 µl/well, 1 h, 37 °C.

Durchführung: Es werden 50 µl einer 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x in jeder Nute vorgelegt. Anschließend pipettiert man 50 µl des entsprechenden Serums (Verdünnung:

1:25 in 1%-iger Lösung von BSA (in PBS1x)) in die erste Nute einer Reihe der ELISA-Platte (→ Endverdünnung = 1:50). Nach gründlichem Mischen werden 50 µl der Lösung entnommen und zur folgenden Nute gegeben. Diese Prozedur wird bis zum Ende einer Reihe wiederholt. Aus der letzten Vertiefung werden abschließend 50 µl der Lösung entnommen und verworfen. Es wird 1 h bei 37 °C inkubiert.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

4. **Zugabe des biotinylierten**, gegen Maus-Gesamtimmungglobulin gerichteten **Antikörpers** aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in 1%-iger Gelatine Lösung in PBS1x) einer Stammlösung mit c = 1.2 µg/ml), 1 h, 37 °C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. **Zugabe von** 50 µl/well **SA-HPO** (1:10000) in 1%-iger Gelatine-Lösung PBS1x. Inkubation: 0.5 h, 37 °C.

6. Zugabe von 50 µl/Nute der **ABTS/H₂O₂**-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Daten von Immunisierung 081126 (nach 2. Sekundärimmunisierung):

Verdünnung		1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
081126	Maus 1	1,3497	0,9776	0,6039	0,3576	0,2192	0,1495
	Maus 2	1,4159	1,2497	0,9278	0,5645	0,3539	0,2144
	Maus 3	1,3586	0,9876	0,6015	0,3611	0,2041	0,1345
(-)-Kontrolle		0,0580	0,1145	0,1017	0,1004	0,1021	0,1094

Verdünnung		1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400
081126	Maus 1	0,1171	0,1079	0,1146	0,1004	0,0941	0,0593
	Maus 2	0,1451	0,1046	0,0885	0,0833	0,0932	0,0562
	Maus 3	0,1032	0,0895	0,0826	0,0870	0,0952	0,0548
(-)-Kontrolle		0,0833	0,0859	0,0774	0,0860	0,0888	0,0654

Daten von Immunisierung 081126 (nach 2. Sekundärimmunisierung):

Verdünnung		1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
081126	Maus 1	1,6867	1,3140	0,8459	0,5240	0,3115	0,2241
	Maus 2	1,8698	1,3183	0,9338	0,6126	0,4065	0,2464
	Maus 3	1,4858	1,0656	0,6488	0,3989	0,2444	0,1832
(-)-Kontrolle		0,0580	0,1145	0,1017	0,1004	0,1021	0,1094

Verdünnung		1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400
081126	Maus 1	0,1709	0,1525	0,1405	0,1416	0,1402	0,0790
	Maus 2	0,1822	0,1791	0,1288	0,1033	0,1109	0,0705
	Maus 3	0,1594	0,1873	0,1317	0,1373	0,1368	0,0688
(-)-Kontrolle		0,0833	0,0859	0,0774	0,0860	0,0888	0,0654

5.6 Synthesen zu Kapitel 3.6

L-Cystin-di-*tert*-butylester (104)¹¹⁴

21.4 g (89.15 mmol) L-Cystin (**102**) werden in 65.0 g 70 %iger Perchlorsäure unter Eiskühlung gelöst. Man gibt 500 ml Essigsäure-*tert*-butylester (**103**) hinzu und rührt bei Raumtemperatur. Nach ca. einer Stunde hat sich eine homogene Lösung gebildet, welche weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wird. Die Lösung wird 24 Stunden bei -4°C aufbewahrt, der Niederschlag danach abfiltriert und mit eiskaltem Diethylether gewaschen. Das so erhaltene Perchlorat wird in wenig Wasser aufgeschlämmt und mit ges. NaHCO₃-Lösung auf pH = 7-8 eingestellt. Die wässrige Phase wird viermal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 150 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 23.6 g (67.03 mmol, 75%), leicht gelbliches Öl, $R_f = 0.29$ (Ethylacetat), $[\alpha]_D^{24} = -23.19$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₆H₁₂N₂O₄S₂ (M = 352.51 g/mol) [352.15 g/mol].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.51 (t, 2H, 2xCH_α, $J_{H\alpha,CH_2} = 6.4$ Hz), 2.96-2.90 (m, 4H, 2xCH₂), 2.65 (bs, 4H, 2xNH₂), 1.42 (s, 18H, 2xC(CH₃)₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 172.85 (C=O), 80.69 (O-C(CH₃)₃), 54.45 (CHNH₂), 43.93 (CH₂S), 27.79 (C(CH₃)₃).

N,N'-Di-(9H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-cystin-di-*tert*-butylester (105)¹¹⁴

In 115 ml absol. THF werden 11.0 g (31.17 mmol) L-Cystin-di-*tert*-butylester (**104**) und 31.4 g (84.14 mmol) *Fmoc*-OSu gelöst. Man gibt langsam, in 7.5 ml absol. THF gelöste, 7.9 ml (7.3 g; 71.60 mmol) *N*-Methylmorpholin hinzu, und rührt über Nacht unter Argon. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand in 200 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird zweimal mit je 75 ml 5%iger Zitronensäure-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert, der Rückstand aus 350 ml Dichlormethan/Methanol 1:4 umkristallisiert. Das Produkt wird abfiltriert, mit einer kalten Mischung aus *tert*-Butanol/Isopropanol 1:1 gewaschen und i. Vak. getrocknet.

Ausbeute: 19.1 g (23.97 mmol, 77%, Lit.: 86%), farbloser Feststoff, $R_f = 0.65$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1), $[\alpha]^{24}_D = -3.57$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

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

ESI-MS (positiv), m/z : 819.31 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 819.29).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_2Cl_2), δ (ppm): 7.76 (d, 4H, $2\times\text{H4-}$, $2\times\text{H5-Fmoc}$, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.4$ Hz), 7.59 (d, 4H, $2\times\text{H1-}$, $2\times\text{H8-Fmoc}$, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.4$ Hz), 7.39 (t, 4H, $2\times\text{H3-}$, $2\times\text{H6-Fmoc}$, $J_{\text{H3,H2/H4}} = J_{\text{H6,H5/H7}} = 7.4$ Hz), 7.29 (t, 4H, $2\times\text{H2-}$, $2\times\text{H7-Fmoc}$, $J_{\text{H2,H1/H3}} = J_{\text{H7,H6/H8}} = 7.4$ Hz), 5.72 (d, 2H, $2\times\text{NH-Fmoc}$, $J_{\text{NH,H}\alpha} = 6.9$ Hz), 4.51 (q, 2H, $2\times\text{H}\alpha$, $J_{\text{H}\alpha,\text{CH}_2\text{S/NH-Fmoc}} = 7.4$ Hz), 4.35 (d, 4H, $2\times\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, $J_{\text{CH}_2\text{-Fmoc,CH-Fmoc}} = 7.4$ Hz), 4.2 (t, 2H, $2\times\text{CH-Fmoc}$, $J_{\text{CH-Fmoc,CH}_2\text{-Fmoc}} = 6.6$ Hz), 3.26-3.11 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2\text{S}$, $J_{\text{CH}_2\text{S,H}\alpha} = 7.7$ Hz), 1.46 (s, 18H, $2\times\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_2Cl_2), δ (ppm): 169.66 (C=O), 156.02 (C=O-Fmoc), 144.31 (C1_a -, C8_a -Fmoc), 141.61 (C4_a -, C5_a -Fmoc), 128.03 (C2-, C7-Fmoc), 127.41 (C3-, C6-Fmoc), 125.48 (C1-, C8-Fmoc), 120.27 (C4-, C5-Fmoc), 83.27 (O-C(CH₃)₃), 67.39 (CH₂-Fmoc), 47.51 (CHNH₂), 42.21 (CH₂S), 28.07 (C(CH₃)₃).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-dihydroxy-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (107)**¹¹⁴

In 95 ml entgastem Dichlormethan werden 7.20 g (9.04 mmol) *N,N'*-Di-(9*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*L*-cystin-di-*tert*-butylester (**105**) gelöst und mit 4.20 g (64.20 mmol) Zinkstaub versetzt. Nun werden unter kräftigem Rühren 30 ml einer Mischung aus Methanol, konz. HCl und konz. H₂SO₄ (100:7:1) zugegeben. Man lässt 20 Minuten rühren und gibt dann 3.40 g (3.05 ml; 45.90 mmol) (*R*)-(+)-Glycidol (**106**) hinzu. Es wird über Nacht bei 40 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wird i. Vak. auf das halbe Volumen eingengt und anschließend mit 10 ml 5%iger KHSO₄-Lösung versetzt. Nach 20 Stunden Stehen bei + 4 °C wird die Mischung über *Hyflo* filtriert. Nach Abtrennen der organischen Phase wird die wässrige Phase dreimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und dreimal mit je 20 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt, ein Öl, wird mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Ethylacetat/Cyclohexan 1:1).

Ausbeute: 4.25 g (8.97 mmol, 99%), hochviskoses, gelbliches Öl, $R_f = 0.44$ (Ethylacetat/Cyclohexan 3:1), $[\alpha]^{24}_D = -9.05$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $R_t = 25.4$ min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O (20:80)→(100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm).

$C_{25}H_{31}NO_6S$ ($M = 473.58$ g/mol) [473.19 g/mol].

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, **H4**-, **H5**-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.7$ Hz), 7.58 (d, 2H, **H1**-, **H8**-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.7$ Hz), 7.39 (t, 2H, **H2**-, **H7**-Fmoc, $J_{H2,H3/H1} = J_{H7,H8/H6} = 7.4$ Hz), 7.31 (t, 2H, **H3**-, **H6**-Fmoc, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4$ Hz), 5.77 (d, 1H, **NH**-Fmoc, $J_{NH,H\alpha} = 7.7$ Hz), 4.51 (q, 1H, **H α** , $J_{H\alpha,NH-Fmoc,CH_2S} = 6.9$ Hz), 4.38 (d, 2H, **CH $_2$** -Fmoc, $J_{CH_2-Fmoc, CH-Fmoc} = 6.6$ Hz), 4.21 (t, 1H, **CH**-Fmoc, $J_{CH-Fmoc, CH_2-Fmoc} = 6.9$ Hz), 3.76 (m, 1H, **CHOH**), 3.67 (dd, 1H, **HOCH $_2$** , $^3J_{HOCH_2,CHOH} = 4.0$ Hz, $^2J_{HOCH_2,HOCH_2} = 11.4$ Hz), 3.05-2.88 (dt, 2H, **CH $_2$ S**, $J_{CH_2S,H\alpha} = 4.4$ Hz, $J_{CH_2S,CH_2S} = 13.9$ Hz), 3.49 (dd, 1H, **HOCH $_2$** , $^3J_{HOCH_2,CHOH} = 5.9$ Hz, $^2J_{HOCH_2,HOCH_2} = 11.0$ Hz), 2.79 (dd, 1H, **CH $_2$** , $^3J_{CH_2,CH-Glyc} = 3.3$ Hz, $^2J_{CH_2,CH_2} = 13.6$ Hz), 2.61 (m, 1H, **CH $_2$** , $^3J_{CH_2,CH-Gly} = 5.2$ Hz, $^2J_{CH_2,CH_2} = 13.6$ Hz), 1.48 (s, 9H, **C(CH $_3$) $_3$**).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 143.69 (**C=O**), 141.29 (**C=O**-Fmoc), 129.01 (**C1 $_a$** -, **C8 $_a$** -Fmoc), 128.21 (**C4 $_a$** -, **C5 $_a$** -Fmoc), 127.74 (**C2**-, **C7**-Fmoc), 127.07 (**C3**-, **C6**-Fmoc), 125.28 (**C1**-, **C8**-Fmoc), 119.99 (**C4**-, **C5**-Fmoc), 83.20 (**C(CH $_3$) $_3$**), 70.49 (**CHOH**), 67.19 (**CH $_2$** -Fmoc), 65.23 (**CH $_2$ OH**), 54.46 (**CH $_2$**), 47.08 (**CH**-Fmoc), 36.83 (**CH α**), 35.77 (**CH $_2$ S**), 27.98 (**C(CH $_3$) $_3$**).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (109)¹¹⁴**

Es werden 4.0 g (8.44 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-dihydroxy-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (**107**) in 100 ml absol. THF gelöst. Nach Zugabe von 7.2 g (27.56 mmol) Palmitinsäure (**108**), 5.3 ml (34.44 mmol) DIC und 0.4 g (3.47 mmol) DMAP wird die Reaktionsmischung fünf Stunden unter Argon gerührt. Nach ca. einer halben Stunde tritt eine Trübung der vorher klaren Lösung auf. Nach Zugabe von 4 ml Essigsäure am nächsten Tag (DC-Kontrolle) wird die Lösung i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt aus Dichlormethan/Methanol 1:20 umkristallisiert.

Ausbeute: 7.97 g (8.33 mmol, 99%), farbloser Feststoff, $R_f = 0.29$ (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1), Schmp.: 43-42 °C, Lit.: Schmp.: 42-38 °C, $[\alpha]^{24}_D = 0.12$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$).

$C_{57}H_{91}NO_8S$ ($M = 950.40$ g/mol) [949.65 g/mol].

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.36 (d, 2H, **H4**-, **H5**-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.30 (d, 2H, **H1**-, **H8**-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz), 7.27 (t, 2H, **H2**-, **H7**-Fmoc), 7.24 (t, 2H, **H3**-, **H6**-Fmoc), 5.67 (d, 1H, **NH**-Fmoc, $J_{NH,H\alpha} = 7.4$ Hz), 5.12 (m, 1H, **H α**), 4.48 (m, 1H,

CH-Glyceryl), 4.38-4.10 (m, 5H, 2x*CH*₂-Glyceryl, 2x*CH*₂-Fmoc, *CH*-Fmoc), 3.02 (dt, 2H, *CH*₂S, ³*J*_{CH₂S,H_α} = 4.4 Hz, ²*J*_{CH₂S,CH₂S} = 9.6 Hz), 2.74 (d, 2H, *CH*₂, ³*J*_{CH₂,CH-Gly} = 6.2 Hz), 2.26 (m, 4H, 4x*H*_α-Pam), 1.57 (m, 4H, 4x*H*_β-Pam), 1.47 (s, 9H, C(*CH*₃)₃), 1.23 (s, 52H, *CH*₂-Pam), 0.86 (t, 9H, *CH*₃-Pam, *J*_{CH₃-Pam,CH₂-Pam} = 3.5 Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.32 (2C, 2xCOOPam), 173.02 (2C, 1xCOOtBu, 1xCOOFmoc), 143.79 (C1_a-,C8_a-Fmoc), 141.27 (C4_a-,C5_a-Fmoc), 127.69 (C2-,C7-Fmoc), 127.05 (C3-,C6-Fmoc), 125.17 (C1-,C8-Fmoc), 119.95 (C4-,C5-Fmoc), 82.99 (C(CH₃)₃), 70.20 (*CH*-Glyceryl), 67.21 (*CH*₂-Fmoc), 63.43 (*CH*₂-Glyceryl), 54.33 (*CH*₂), 47.09 (*CH*-Fmoc), 36.41 (*CH*_α), 34.26, 34.06 (2x*C*_α-Pam), 31.91 (*CH*₂S), 42.49-22.68 (26C, *CH*₂-Pam), 21.00 (C(CH₃)₃), 14.11 (3x*CH*₃-Pam).

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (110)¹¹⁴**

In 75 ml DMF/Piperidin (1:1) werden 6.5 g (6.84 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (**109**) gelöst und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wird i. Vak. eingeeengt und der Rückstand dreimal mit Toluol kodestilliert. Das freie Amin wird in 110 ml Dichlormethan/DMF 5:2 aufgenommen. Die Lösung wird mit 3.09 g (12.06 mmol) Palmitinsäure (**108**), 1.63 g (12.06 mmol) HOBt-Hydrat und 1.53 g (12.06 mmol) DIC versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird die Mischung mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und je dreimal mit 100 ml Wasser, ges. NaHCO₃-Lösung und wieder mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wird aus 50 ml Chloroform/Methanol (1:5) umkristallisiert und bei -20 °C wieder ausgefällt.

Ausbeute: 5.9 g (6.13 mmol, 90%), farbloser Feststoff, *R*_f = 0.46 (Cyclohexan), [α]²³_D = 4.18 (c = 1.00, CHCl₃), Smp.: 59 °C.

C₅₈H₁₁₁NO₇S (M = 966.57 g/mol) [965.81 g/mol].

FD-MS, *m/z*: 966.9 ([M+H]⁺, ber.: 966.8).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.31 (d, 1H, *NH*, *J*_{NH,H_α} = 7.4 Hz), 5.12 (m, 1H, *H*_α), 4.70 (m, 1H, *CH*-Glyceryl), 4.31 (dd, 1H, *CH*₂-Glyceryl, ³*J*_{CH₂-Gly,CH-Gly} = 3.7 Hz, ²*J*_{CH₂-Gly,CH₂-Gly} = 12.1 Hz), 4.11 (q, 1H, *CH*₂-Glyceryl, ³*J*_{CH₂-Gly,CH-Gly} = 5.9 Hz, ²*J*_{CH₂-Gly,CH₂-Gly} = 12.1 Hz), 3.08-2.94 (dt, 2H, *CH*₂S, ³*J*_{CH₂S,H_α} = 4.4 Hz, ²*J*_{CH₂S,CH₂S} = 13.6 Hz), 2.71 (d, 2H, *CH*₂, *J*_{CH₂,H_α} = 6.6 Hz), 2.31-2.19 (dt, 6H, 6x*H*_α-Pam, ³*J*_{H_α-Pam,H_β-Pam} = 2.6 Hz, *J*_{H_α-Pam,H_α-Pam} =

7.4 Hz), 1.59 (m, 6H, H_{β} -Pam), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.22 (s, 78H, CH₂-Pam), 0.86 (t, 9H, CH₃-Pam, $J_{\text{CH}_3\text{-Pam,CH}_2\text{-Pam}} = 3.5$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.32 (COOtBu), 173.03, 172.91 (2x C=O-Ester), 169.71 (C=O-Amid), 82.84 (C(CH₃)₃), 70.31 (CH-Glyceryl), 63.48 (CH₂OPam) 52.47 (CH₂S-Glyceryl), 36.50 (CHNHPam), 34.26, 34.06 (2x C $_{\alpha}$ -Pam), 31.90 (CH₂S), 29.69, 29.64, 29.49, 29.34, 29.29, 27.95, 25.54, 24.94, 24.88, (39C, CH₂-Pam), 29.10 (C(CH₃)₃), 22.66 (C $_{\alpha}$ -Amid), 14.09 (3xCH₃-Pam).

N-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein (**111**)¹¹⁴

4.8 g (4.97 mmol) *N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*R*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (**110**) werden in 11 ml Dichlormethan gelöst, mit 2.3 ml Anisol und 56 ml Trifluoressigsäure versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wird mit 70 ml Toluol verdünnt und i. Vak. eingengt, der Rückstand dreimal i. Vak. mit Toluol kodestilliert. Das Produkt wird durch Umkristallisation aus 200 ml Petrolether/Chloroform 16:1 bei -20 °C gereinigt.

Ausbeute: 4.45 g (4.89 mmol, 98%, Lit.: 91%), farbloser Feststoff, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 10.51$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₅₄H₁₀₃NO₇S (M = 910.46 g/mol) [909.75 g/mol].

ESI-MS (positiv), m/z: 932.87 ([M+Na]⁺, ber.: 932.75).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.58 (d, 1H, NH, $J_{\text{NH,H}\alpha} = 6.9$ Hz), 5.13 (m, 1H, H $_{\alpha}$), 4.72 (m, 1H, CH-Glyceryl), 4.33 (dd, 1H, CH₂-Glyceryl, $^3J_{\text{CH}_2\text{-Gly,CH-Gly}} = 3.3$ Hz, $^2J_{\text{CH}_2\text{-Gly,CH}_2\text{-Gly}} = 11.8$ Hz), 4.11 (q, 1H, CH₂-Glyceryl, $^3J_{\text{CH}_2\text{-Gly,CH-Gly}} = 6.3$ Hz, $^2J_{\text{CH}_2\text{-Gly,CH}_2\text{-Gly}} = 11.8$ Hz), 3.17-2.98 (dq, 2H, CH₂S, $^3J_{\text{CH}_2\text{S,CH-Gly}} = 4.8$ Hz, $^2J_{\text{CH}_2\text{S,CH}_2\text{S}} = 13.9$ Hz), 2.71 (d, 2H, CH₂, $J_{\text{CH}_2,\text{H}\alpha} = 6.6$ Hz), 2.33-2.24 (m, 6H, 6xH $_{\alpha}$ -Pam), 1.59 (m, 6H, H $_{\beta}$ -Pam), 1.23 (m, 78H, CH₂-Pam), 0.86 (t, 9H, CH₃-Pam, $J_{\text{CH}_3\text{-Pam,CH}_2\text{-Pam}} = 6.2$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 174.71 (COOH), 173.69, 173.57 (2x C=O-Ester), 172.31 (C=O-Amid), 70.13 (CH-Glyceryl), 63.66 (CH₂OPam) 52.09 (CH₂S-Glyceryl), 36.22 (CHNHPam) 34.33, 34.07 (2x C $_{\alpha}$ -Pam), 33.78, 32.92, 29.70, 29.64, 29.51, 29.34, 29.28, 29.24, 29.12, 25.49, 24.91, 24.85 (3x(CH₂)₁₄-Pam), 31.90 (CH₂S), 22.68 (C $_{\alpha}$ -Amid), 14.09 (3xCH₃-Pam).

Darstellung des PTMSE-Ankersystems**1-(4-Bromphenoxy)-1-ethoxyethan (113)¹¹²**

50 g (290 mmol) *p*-Bromphenol (**112**) werden in 800 ml Dichlormethan gelöst und mit 90 ml (900 mmol, 62.3 g) Ethylvinylether, sowie 9.0 g (37.7 mmol) PPTS versetzt. Man rührt 30 min unter Argonatmosphäre. Im Anschluß wird zweimal mit 200 ml einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 200 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Ethylacetat/Cyclohexan, 1:1).

Ausbeute: 71.05 g (290 mmol, quant.), gelbliche Flüssigkeit, $R_f = 0.76$ (Ethylacetat/Cyclohexan, 1:1).

$C_{10}H_{13}BrO_2$ (245.11 g mol⁻¹) [244.01].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.35 (d, 2H, H_{3ar}, H_{5ar}, $J_{H_{3ar},H_{2ar}} = J_{H_{5ar},H_{6ar}} = 8.8$ Hz), 6.87 (d, 2H, H_{2ar}, H_{6ar}, $J_{H_{2ar},H_{3ar}} = J_{H_{6ar},H_{5ar}} = 9.2$ Hz), 5.41-5.21 (m, 1H, O-CH-O), 3.85-3.42 (md, 2H, CH₃-CH₂-O), 1.45-1.40 (m, 3H, CH-CH₃), 1.31-1.09 (m, 3H, CH₂-CH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 155.01 (C_{1ar}), 132.37 (C_{3ar}, C_{5ar}), 117.21 (C_{2ar}, C_{6ar}), 112.47 (C_{4ar}), 99.67 (O-CH-O), 60.90 (CH₃-CH₂-O), 20.04 (CH-CH₃), 15.24 (CH₂-CH₃).

2-Trimethylsilyloxiran (115)¹¹²

In einem Dreihalskolben werden 24.51 g (101 mmol) *m*-Chlorperbenzoesäure in 250 ml Dichlormethan gelöst und auf 0°C abgekühlt. Dannach werden 15.5 ml (101 mmol) Trimethylvinylsilan (**114**) in 50 ml Dichlormethan zugetropft. Es wird 3 d bei Raumtemp. gerührt. Der entstehende farblose Niederschlag wird über *Hyflo Super Cel* abfiltriert. Das Filtrat wird zweimal mit 200 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und das Rohprodukt in einer Mikro-Destillationapparatur unter vermindertem Druck (370 mbar) destilliert.

Ausbeute: 8.69 g (74.7 mmol, 74%), farblose Flüssigkeit, $Sdp_{.370\text{ mbar}}: 75-79$ °C, $n_D^{25}=1.414$, (Lit.: $Sdp.: 109-110$ °C, $n_D^{25}=1.414$).

$C_5H_{12}OSi$ (116.23 g mol⁻¹) [116.07].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 2.88 (t, 1H, CH-SiMe_3 , $J_{\text{CH-SiMe}_3, \text{CH}_a\text{-O}} = J_{\text{CH-SiMe}_3, \text{CH}_b\text{-O}} = 5.9$ Hz), 2.53 (dd, 1H, $\text{CH}_a\text{-O}$, $J_{\text{CH}_a\text{-O}, \text{CH-SiMe}_3} = 5.9$ Hz, $J_{\text{CH}_a\text{-O}, \text{CH}_b\text{-O}} = 4.4$ Hz), 2.17 (dd, 1H, $\text{CH}_b\text{-O}$, $J_{\text{CH}_b\text{-O}, \text{CH-SiMe}_3} = 5.7$ Hz, $J_{\text{CH}_b\text{-O}, \text{CH}_a\text{-O}} = 4.1$ Hz), 0.04 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

(2-(*p*-Ethoxyethoxyphenyl)-2-trimethylsilyl)-ethanol (**116**)¹¹²

1. Lithiierung:

35 g (142 mmol) 1-(4-Bromphenoxy)-1-ethoxyethan (**113**) werden in 140 ml absol. Diethylether gelöst und unter Argon auf -65 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur werden 56.8 ml (142 mmol) einer *n*-Butyllithium-Lösung (2.5 M) in Hexan im Verlauf von 30 min zugetropft. Im Anschluß wird 30 min bei -65 °C gerührt, man lässt die Lösung sich innerhalb von 1 h auf 5 °C erwärmen und rührt weitere 1.5 h bei dieser Temperatur rührt.

2. Cupratbildung und Cuprataddition:

Eine unter Argon auf 0 °C gekühlte und gerührte Suspension aus 13.0 g (69.2 mmol) Cu(I)I in 50 ml absol. Diethylether wird mittels Edelstahldoppelkanüle mit der lithiierten Lösung (s.o.) innerhalb von 1 h versetzt. Man rührt 30 min nach, bevor man die nun dunkelbraune Reaktionsmischung auf -50 °C abkühlt. Bei -50 °C werden 2.7 g (23.2 mmol) 2-Trimethylsilyloxiran (**115**) mit einer Spritze zugetropft. Man lässt 3 h bei -50 °C und 16 h bei -28 °C rühren. Man lässt sich die Reaktionsmischung auf 0 °C erwärmen und versetzt mit 200 ml einer ges. Ammoniumchlorid-Lösung und rührt 10 min bei 10 °C. Die Lösung wird nun mit 300 ml Ethylacetat verdünnt und dreimal mit 200 ml einer ges. Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die gesammelten wässrigen Phasen werden einmal mit 150 ml Ethylacetat extrahiert. Anschließend werden die organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat, 7:1, + 0.1% Triethylamin).

Ausbeute: 5.3 g (18.8 mmol, 82%), gelblicher, kristalliner Feststoff, $R_f = 0.17$ (Ethylacetat/Cyclohexan, 1:6).

$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Si}$ (282.45 g mol⁻¹) [282.17].

ESI-MS (positiv), m/z : 321.20 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.:321.18).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.98 (d, 2H, H_a , $J_{\text{H}_a, \text{H}_b} = 8.5$ Hz), 6.90 (d, 2H, H_a , $J_{\text{H}_b, \text{H}_a} = 8.5$ Hz), 5.31 (m, 1H, O- CH-O), 4.12-3.85 (m, 2H, O- CH_2), 3.85-3.45 (md, 2H, TMS- $\text{CH-CH}_2\text{-O}$), 2.37 (dd, 1H, TMS- $\text{CH-CH}_2\text{-O}$, $J_{\text{TMS-CH, CH}_a\text{-O}} = 11.4$ Hz, $J_{\text{TMS-CH, CH}_b\text{-O}} =$

4.4 Hz), 1.46 (d, 3H, CH-CH₃, $J_{\text{CH}_3, \text{CH}} = 5.5$ Hz), 1.19 (t, 3H, CH₂-CH₃, $J_{\text{CH}_3, \text{CH}_2} = 7.0$ Hz), -0.06 (s, 9H, Si(CH₃)₃).

(2-(*p*-Hydroxyphenyl)-2-trimethylsilyl)-ethanol (117)¹¹⁴

Eine Lösung von 5.3 g (18.8 mmol) (2-(*p*-Ethoxyethoxyphenyl)-2-trimethylsilyl)-ethanol (**116**) in 80 ml Methanol wird unter Argon-Atmosphäre gerührt und bei Raumtemp. mit 142.2 mg (0.564 mmol) PPTS versetzt. Nach 3.5 h wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Produkt zweimal mit 20 ml Toluol kodestilliert.

Ausbeute: 3.95 g (18.8 mmol, quant.), gelblicher, kristalliner Feststoff, $R_f = 0.18$ (Ethylacetat/Cyclohexan, 1:3).

C₁₁H₁₈ O₂Si (210.34 g mol⁻¹) [210.11].

¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆), δ (ppm): 7.99 (bs, 1H, OH_{Phenol}) 6.95 (d, 2H, Har, $J_{\text{Ha}, \text{Hb}} = 8.5$ Hz), 6.71 (d, 2H, Har, $J_{\text{Hb}, \text{Ha}} = 8.8$ Hz), 4.08-3.90 (m, 2H, TMS-CH-CH₂-O), 3.25 (bs, 1H, OH), 2.28 (dd, 1H, TMS-CH-CH₂-O, $J_{\text{TMS-CH}, \text{CH}_a\text{-O}} = 9.2$ Hz, $J_{\text{TMS-CH}, \text{CH}_b\text{-O}} = 4.1$ Hz), -0.05 (s, 9H, Si(CH₃)₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, Aceton-d₆), δ (ppm): 155.39 (C_{ipso, Ar-O}), 133.56 (C_{ipso, Ar-CH}), 129.46 (C_{ar}), 115.65 (C_{ar}), 63.78 (CH₂-O), 40.73 (TMS-CH), -2.25 (Si(CH₃)₃).

4-(2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)-ethyl)-phenoxy-essigsäureallylester (119)¹¹⁴

Eine Lösung von 3.90 g (18.6 mmol) (2-(*p*-Hydroxyphenyl)-2-trimethylsilyl)-ethanol (**117**) in 100 ml Aceton wird unter Argon mit 3.35 g (24.3 mmol) Kaliumcarbonat, 0.41 g (2.5 mmol) Kaliumjodid und 2.6 ml (22.0 mmol) Chloressigsäureallylester (**118**) versetzt. Nach 1 d Rühren werden weitere 2.0 g (14.5 mmol) Kaliumcarbonat, 0.24 g (1.4 mmol) Kaliumjodid und 1.5 ml (12.8 mmol) Chloressigsäureallylester zugegeben. Nach weiteren 3 d Rühren wird über *Hyflo Super Cel* abfiltriert, mit 100 ml Aceton nachgewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat, 6:1).

Ausbeute: 4.0 g (13.0 mmol, 70%), farbloser, kristalliner Feststoff, $R_f = 0.25$ (Ethylacetat/Cyclohexan, 1:6).

C₁₆H₂₄ O₄Si (308.44 g mol⁻¹) [308.14].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.99 (d, 2H, Har, $J_{\text{Ha}, \text{Hb}} = 8.8$ Hz), 6.82 (d, 2H, Har, $J_{\text{Hb}, \text{Ha}} = 8.8$ Hz), 6.00-5.78 (m, 1H, CH-Allyl), 5.32 (dd, 1H, HC=CH_aH_b, $J_{\text{CH}, \text{CH}_a} = 17.2$ Hz,

$J_{\text{CH}_a, \text{CH}_b} = 1.5 \text{ Hz}$), 5.23 (dd, 1H, $\text{HC}=\text{CH}_a\mathbf{H}_b$, $J_{\text{CH}, \text{CH}_a} = 10.3 \text{ Hz}$, $J_{\text{CH}_a, \text{CH}_b} = 0.7 \text{ Hz}$), 4.68 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}} = 5.5 \text{ Hz}$), 4.61 (s, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CO}$), 4.10-3.88 (m, 2H, $\text{TMS-CH-CH}_2\text{-O}$), 2.36 (dd, 1H, $\text{TMS-CH-CH}_2\text{-O}$, $J_{\text{TMS-CH}, \text{CH}_a\text{-O}} = 11.4 \text{ Hz}$, $J_{\text{TMS-CH}, \text{CH}_b\text{-O}} = 4.4 \text{ Hz}$), 1.40 (s, 1H, OH), -0.07 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 168.79 (CO Ester), 155.67 ($\text{C}_{\text{ipso}, \text{Ar-O}}$), 133.58 ($\text{C}_{\text{ipso}, \text{Ar-CH}}$), 131.41 ($\text{CH}=\text{CH}_2$) 128.79 (C_{ar}), 119.00 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 114.97 (C_{ar}), 65.75, 65.53 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2, \text{OC-CH}_2\text{-O}$), 63.15 ($\text{TMS-CH-CH}_2\text{-O}$), 40.76 (TMS-CH), -2.69 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

4-(2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-lysyl)-1-(trimethylsilyl)-ethyl)-phenoxyessigsäureallylester (121)

(Fmoc-Lys(Boc)-PTMSE-OAll)

Zu 1.38 g (2.95 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-OH (**120**) in 20 ml absol. Dichlormethan werden 0.83 g (2.69 mmol) 4-(2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)-ethyl)-phenoxyessigsäureallylester (**119**) gegeben. Man rührt unter Argon und kühlt auf 0 °C ab. Nacheinander werden 20 mg (0.16 mmol) DMAP und 0.51 ml (3.25 mmol) DIC zugegeben, und man rührt 4 h bei 0 °C (DC-Kontrolle). Die Mischung wird über *Hyflo Super Cel* abfiltriert und mit 80 ml Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird zweimal mit je 100 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, einmal mit 100 ml Wasser und letztlich mit 100 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Man trocknet über Magnesiumsulfat und entfernt das Lösungsmittel i. Vak.. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat, 7:1).

Ausbeute: 2.22 g (2.93 mmol, 99%), farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.27$ (Ethylacetat/Cyclohexan, 1:4), $[\alpha]_D^{23} = -10.06$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_9\text{Si}$ ($M = 758.97 \text{ g/mol}$) [758.36 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z : 781.41 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 781.36).

Ber.: C, 66.46; H, 7.17; N, 3.69

Gef.: C, 64.12; H, 6.96; N, 3.59

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = J_{\text{H}_5, \text{H}_6} = 7.4 \text{ Hz}$), 7.55 (d, 2H, H1-, H8-, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = J_{\text{H}_8, \text{H}_7} = 7.0 \text{ Hz}$), 7.41-7.18 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.93 (d, 2H, Har, $J_{\text{H}_a, \text{H}_b} = 6.6 \text{ Hz}$), 6.78 (d, 2H, Har, $J_{\text{H}_b, \text{H}_a} = 8.4 \text{ Hz}$), 5.96-5.79 (m, 1H, CH-Allyl), 5.39-5.09 (m, 3H, $\text{HC}=\text{CH}_a\mathbf{H}_b$, NH), 4.68 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}} = 5.5 \text{ Hz}$), 4.58 (m, 3H, $\text{O-CH}_2\text{-CO}$, $\alpha\text{-CH Lys}$), 4.36-4.30 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.20-4.14 (m, 3H, H9-

Fmoc, TMS-CH-CH₂-O), 3.00-2.91 (m, 2H, ε-CH₂ Lys), 2.55-2.47 (m, 1H, TMS-CH-CH₂-O), 1.82-0.85 (m, 6H, β,δ,γ-CH₂ Lys), 1.41 (s, 9H, Boc), -0.02 (s, 9H, Si(CH₃)₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 172.76 (CO Ester Lys), 168.79 (CO Allylester), 155.81, 155.57 (CO Urethan, C_{ipso,Ar-O}), 143.92, 143.77 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.27 (C4a-, C5a-Fmoc), 133.30 (C_{ipso,Ar-CH}), 131.41 (CH=CH₂), 128.36 (C_{ar}), 127.68 (C3-, C6-Fmoc), 127.05 (C2-, C7-Fmoc), 125.09 (C1-, C8-Fmoc), 119.94, 119.06 (C4-, C5-Fmoc), 119.03 (CH=CH₂), 114.62 (C_{ar}), 66.95, 66.34, 66.25, 65.78, 65.39 (CH₂-Fmoc, O-CH₂-CH=CH₂, C(CH₃)₃ Boc, OC-CH₂-O, TMS-CH-CH₂-O), 53.71 (α-CH Lys), 47.12 (C9-Fmoc), 40.22 (ε-CH₂ Lys), 36.49 (TMS-CH), 32.11 (β-CH₂ Lys), 28.43 (C(CH₃)₃ Boc), 26.89 (δ-CH₂ Lys), 22.09 (γ-CH₂ Lys), -2.74 (Si(CH₃)₃).

4-(2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-lysyl)-1-(trimethylsilyl)-ethyl)-phenoxyessigsäure (122)

(Fmoc-Lys(Boc)-PTMSE-OH)

Zu 1.52 g (2.0 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-PTMSE-OAll (**121**) in 20 ml absol. THF werden unter Argon 177 mg (0.15 mmol) Pd(PPh₃)₄ und 0.342 mg (3.2 mmol) *N*-Methylanilin gegeben. Man rührt 1.5 h bei Raumtemp., entfernt das Lösungsmittel i. Vak. und reinigt das Rohprodukt durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol/Essigsäure, 40:1:0.05). Um die Essigsäurereste aus dem Eluat zu entfernen, wird dreimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert.

Ausbeute: 1.40 g (1.95 mmol, 97%), farbloser, amorpher Feststoff, R_f = 0.23 (Dichlormethan/Methanol/Essigsäure, 40:1:0.05), [α]²²_D = -21.75 (c = 1.00, CHCl₃).

C₃₉H₅₀N₂O₉Si (M = 718.91 g/mol) [718.33 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 741.34 ([M+Na]⁺, ber.: 741.33).

Ber.: C, 65.16; H, 7.01; N, 3.90

Gef.: C, 65.25; H, 7.10; N, 3.83

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.3 Hz), 7.68-7.15 (m, 6H, H1-, H8-, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.94-6.88 (m, 2H, Har), 6.78 (d, 2H, Har, J_{Hb,Ha} = 8.3 Hz), 5.27 (m, 1H, NH), 4.85-4.45 (m, 3H, O-CH₂-CO, α-CH Lys), 4.43-4.28 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.25-4.10 (m, 3H, H9-Fmoc, TMS-CH-CH₂-O), 3.97-2.89 (m, 2H, ε-CH₂ Lys), 2.58-2.49 (m, 1H, TMS-CH-CH₂-O), 1.62-0.83 (m, 6H, β,δ,γ-CH₂ Lys), 1.41 (s, 9H, Boc), -0.02 (s, 9H, Si(CH₃)₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 172.49 (CO Ester Lys), 155.94, 155.45 (CO Urethan, $\text{C}_{\text{ipso,Ar-O}}$), 143.90, 143.74 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.30 (C4a-, C5a-Fmoc), 129.03 ($\text{C}_{\text{ipso,Ar-CH}}$), 128.36 (C_{ar}), 128.22, 127.69 (C3-, C6-Fmoc), 127.05 (C2-, C7-Fmoc), 125.29, 125.09 (C1-, C8-Fmoc), 119.97 (C4-, C5-Fmoc), 114.43 (C_{ar}), 66.95, 66.88, 66.14, 64.97 (CH_2 -Fmoc, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc, OC- CH_2 -O, TMS-CH- CH_2 -O), 53.56 (α -CH Lys), 47.15 (C9-Fmoc), 40.55 (ϵ - CH_2 Lys), 36.50 (TMS-CH), 32.23 (β - CH_2 Lys), 28.38 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc), 21.85 (δ - CH_2 Lys), 21.45 (γ - CH_2 Lys), -2.77 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

Beladung von Novasyn-Tg-Amino-resin HL mit 4-(2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-*N*-tert-butyloxycarbonyl-lysyl)-1-(trimethylsilyl)-ethyl)-phenoxyessigsäure

(Fmoc-Lys(Boc)-PTMSE-Novasyn-Tg-Amino-resin HL) (124)

Zu einer Lösung von 800 mg (1.12 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-PTMSE-OH (**122**) in einer Mischung aus 30 ml Dichlormethan und 3 ml DMF werden nacheinander 176.0 mg (1.14 mmol) HOBt, 366.7 mg (1.14 mmol) TBTU und 303 μl (2.28 mmol) *N*-Methylmorpholin gegeben. Nach 15-minütigem Vorrühren wird die Reaktionslösung in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt, in dem 2.50 g Novasyn-Tg-Amino-resin HL (**123**) (Novabiochem, 110 μm beads, Bel.: 0.44 mmol/g, 1.1 mmol) in 15 ml Dichlormethan 30 min vorgequollen wurden. Man schüttelt 16 h bei Raumtemp. und filtriert ab. Das Harz wird dreimal mit jeweils 20 ml DMF und anschließend dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Zum Capping von nicht umgesetzten Aminofunktionen wird das Harz mit 20 ml einer Lösung aus Pyridin/Acetanhydrid (3:1) versetzt und 30 min geschüttelt. Der polymere Träger wird viermal mit je 20 ml DMF und insgesamt sechsmal wechselweise mit je 20 ml Methanol gefolgt von jeweils 20 ml Dichlormethan gewaschen. Nach Trocknung i. Hochvak. werden 1.29 g beladenes Harz erhalten. Durch die photometrische Beladungsbestimmung anhand von UV-Absorbtion des Fmoc-Abspaltproduktes, das durch Behandeln von 20 mg des mit der Fmoc-Aminosäure beladenen Harzes mit 18.07 g Piperidin/DMF (20ml:20ml) erzeugt wird, konnte eine Beladung von $c = 0.28$ mmol/g ermittelt werden. Dies entspricht einer Kupplungsausbeute von 64%.

Pam), 1.79-1.53 (m, 6H, H_{β} -Pam), 1.50-1.33 (m, 45H, $C(CH_3)_3$ *t*-Bu, $C(CH_3)_3$ Boc), 1.23-1.10 (m, 102H, CH_2 -Pam, $4 \times K_{\beta,\delta,\gamma}$), 0.85 (t, 9H, CH_3 -Pam, $J_{CH_3-Pam,CH_2-Pam} = 6.68$ Hz).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 175.44, 175.28, 175.05, 175.00, 174.95, 174.84, 174.80, 173.43, 172.69, 172.34, 171.44, 170.71, 170.66 (C=O-Ester, COOH, C=O-Amid), 156.15 (C=O Urethan), 70.51 (CH-Glyceryl), 63.87, 63.81, 63.71, 63.67 ($C(CH_3)_3$ Boc), 61.44 (S_{β}), 63.03 ($C(CH_3)_3$ *t*-Bu), 58.72 (CH_2OPam), 55.57 (S_{α}), 54.68 (CH_2S -Glyceryl), 53.78, 53.73 (K_{α}), 40.66, 40.40, 40.17 (K_{ϵ}), 36.19 (CHNHPam), 34.37, 34.32, 34.09 (C_{α} -Pam), 32.71, 32.36 (K_{β}), 31.90 (CH_2 -Pam), 31.11 (CH_2S), 29.68 (breit), 29.45, 29.34, 28.46 (CH_2 -Pam, $C(CH_3)_3$ *t*-Bu, $C(CH_3)_3$ Boc), 27.41 (K_{δ}), 22.68 (C_{α} -Amid), 22.09 (K_{γ}), 14.11 ($3 \times CH_3$ -Pam).

***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*-histidyl-*L*-glycyl-*L*-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonyl-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolin (126)**

(Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

30 mg (15 μ mol) Pam₃Cys-Ser(OtBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH **125**, 5.8 mg (15 μ mol) HATU, 2.1 mg (15 μ mol) HOAt werden in 2 ml absol. DMF gelöst und mit 3.3 μ l (30 μ mol) *N*-Methylmorpholin (NMM) versetzt. Nach 15minütigem Rühren werden 20 mg (8.7 μ mol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **56** gelöst in 2 ml absol. DMF zugegeben und die Mischung 20 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend werden 15 ml Wasser zugegeben und gefriergetrocknet, bevor zur Entfernung aller säurelabilen Schutzgruppen 1.5 h in 10 ml einer Lösung aus TFA/H₂O/TIS (10/1/1) gerührt wird. Nach destillativer Entfernung wird 4x mit 20 ml absol. Toluol kodestilliert, mit 5 ml Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC (Vydac C4 Protein, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80) \rightarrow (100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 37.4$ min) gereinigt.

Ausbeute: 8.3 mg (2.2 μ mol, 25%), farbloses Lyophilisat, $R_t = 38.5$ min (Vydac C4 Protein, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80) \rightarrow (100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm), $[\alpha]_{23}^D = -66.5$ ($c = 0.37$ g/100 ml, H₂O).

$C_{179}H_{314}N_{36}O_{49}S$ ($M = 3786.69$ g/mol) [3784.29 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1262.94 ($[M+3H]^{-3+}$, ber.: 1262.43), 947.46 ($[M+4H]^{-4+}$, ber.: 947.07), 758.18 ($[M+5H]^{-5+}$, ber.: 757.86).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv) m/z: 3786.36 ($[M+H]^+$, ber.: 3785.29).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY, HSQC): δ (ppm):

8.51 (s, 1H, H_ϵ), 7.21 (s, 1H, H_δ), 5.11 (bs, 1H, **CH**-Glyceryl), 4.83 (bs, 1H, H_1), 4.64-4.04 (m, 29H, D_α , C_α , H_α , R_α , $A_{3\alpha}$, $A_{2\alpha}$, $S_{2\alpha}$, $A_{4\alpha}$, $S_{1\alpha}$, $P_{1-5\alpha}$, V_α , $T_{Tn\alpha}$, $T_{Tn\beta}$, $A_{1\alpha}$, $T_{1\alpha}$, $T_{2\alpha}$, $T_{2\beta}$, $T_{1\beta}$, **CH**₂-Glyceryl, $S_{3\alpha}$, 4x K_α), 4.01-3.33 (m, 34H, H_2 , $G_{1\alpha\alpha}$, $G_{1\alpha\beta}$, H_5 , 4x CH_2O -Spacer, $S_{2\beta}$, $G_{2\alpha}$, H_3 , $S_{1\beta}$, $S_{3\beta}$, 3- CH_2 -Spacer, $H_{6a,b}$, H_4 , $P_{1-5\delta}$), 3.27–2.39 (m, 24H, $H_{\beta\alpha}$, CH_2 -Spacer, 4x K_ϵ , $H_{\beta\beta}$, $D_{\beta\alpha}$, **CH**₂S, R_δ , C_β , $D_{\beta\beta}$, 12- CH_2 -Spacer, CH_2 -Spacer), 2.37-2.03 (m, 10H, $P_{1,2\beta\alpha}$, 6x H_α -Pam, CH_2 -Spacer), 2.03-0.91 (m, 149H, $P_{3-5\beta\alpha}$, V_β , $P_{1-5\gamma}$, $P_{1-5\beta\beta}$, AcNH {1.91}, $R_{\beta\alpha}$, **H** _{β} -Pam, $R_{\beta\beta}$, R_γ , $A_{2\beta}$, $A_{3\beta}$, $A_{4\beta}$, $A_{1\beta}$, **CH**₂-Pam, 4x $K_{\beta,\delta,\gamma}$, $T_{Tn\gamma}$, $T_{2\gamma}$, $T_{1\gamma}$), 0.90-0.67 (m, 15H, V_γ , $J_{V\gamma,V\beta} = 6.3$ Hz, **CH**₃-Pam).

***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*-histidyl-*L*-glycyl-*L*-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -*D*-galactopyranosyl]- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonyl-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolin (127)**
(Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Gal-(1-3)- α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

30 mg (15 μ mol) Pam₃Cys-Ser(OtBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH **125**, 5.8 mg (15 μ mol) HATU, 2.1 mg (15 μ mol) HOAt werden in 2 ml absol. DMF gelöst und mit 3.3 μ l (30 μ mol) *N*-Methylmorpholin (NMM) versetzt. Nach 15minütigem Rühren werden 20 mg (8.1 μ mol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Gal-(1-3)- α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **61** gelöst in 2 ml absol. DMF zugegeben und die Lösung 20 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend werden 15 ml Wasser zugegeben und gefriergetrocknet, bevor zur Entfernung aller säurelabilen Schutzgruppen 1.5 h in 10 ml einer Lösung aus TFA/H₂O/TIS (10/1/1) gerührt wird. Nach destillativer Entfernung wird 4x mit 20 ml absol. Toluol kodestilliert, mit 5 ml Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC (Vydac C4 Protein, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80) \rightarrow (100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 38.1$ min) gereinigt.

Ausbeute: 6.7 mg (1.7 μmol , 21%), farbloses Lyophilisat, $R_t = 39.1$ min (Vydac C4 Protein, Grad.: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA, (20:80) \rightarrow (100:0), 40 min, $\lambda = 214$ nm), $[\alpha]_{22}^D = -48.4$ ($c = 0.3$ g/100 ml, H_2O).

$\text{C}_{184}\text{H}_{321}\text{N}_{37}\text{O}_{54}\text{S}$ ($M = 3947.80$ g/mol) [3945.32 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1316.83 ($[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, ber.: 1316.11), 987.63 ($[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, ber.: 987.33), 790.52 ($[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, ber.: 790.06).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv) m/z: 3947.64 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 3946.32).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , COSY, HSQC): δ (ppm):

8.51 (s, 1H, H_ϵ), 7.20 (s, 1H, H_δ), 5.12 (bs, 1H, **CH**-Glyceryl), 4.83 (bs, 1H, H_1), 4.62-3.97 (m, 30H, D_α , C_α , H_α , R_α , $\text{A}_{3\alpha}$, $\text{A}_{2\alpha}$, $\text{S}_{2\alpha}$, H_1' , $\text{A}_{4\alpha}$, $\text{S}_{1\alpha}$, $\text{P}_{1-5\alpha}$, V_α , $\text{T}_{\text{T}\alpha}$, $\text{T}_{\text{T}\beta}$, $\text{A}_{1\alpha}$, $\text{T}_{1\alpha}$, $\text{T}_{2\alpha}$, $\text{T}_{2\beta}$, $\text{T}_{1\beta}$, **CH**₂-Glyceryl, $\text{S}_{3\alpha}$, $4\times\text{K}_\alpha$), 3.97-3.26 (m, 40H, H_2 , H_5' , $\text{G}_{1\text{aa}}$, $\text{G}_{1\text{ab}}$, H_5 , $4\times\text{CH}_2\text{O}$ -Spacer, $\text{S}_{2\beta}$, $\text{G}_{2\alpha}$, H_3 , H_4' , $\text{S}_{1\beta}$, $\text{S}_{3\beta}$, 3- CH_2 -Spacer, $\text{H}_{6\text{a,b}}$, $\text{H}_{6' \text{a,b}}$, H_4 , H_3' , $\text{P}_{1-5\delta}$, H_2'), 3.26–2.41 (m, 24H, $\text{H}_{\beta\text{a}}$, CH_2 -Spacer, $4\times\text{K}_\epsilon$, $\text{H}_{\beta\text{b}}$, $\text{D}_{\beta\text{a}}$, **CH**₂S, R_δ , C_β , $\text{D}_{\beta\text{b}}$, 12- CH_2 -Spacer, CH_2 -Spacer), 2.36-2.05 (m, 10H, $\text{P}_{1,2\beta\text{a}}$, $6\times\text{H}_\alpha$ -Pam, CH_2 -Spacer), 2.02-0.93 (m, 149H, $\text{P}_{3-5\beta\text{a}}$, V_β , $\text{P}_{1-5\gamma}$, $\text{P}_{1-5\beta\text{b}}$, AcNH {1.88}, $\text{R}_{\beta\text{a}}$, **H** β -Pam, $\text{R}_{\beta\text{b}}$, R_γ , $\text{A}_{2\beta}$, $\text{A}_{3\beta}$, $\text{A}_{4\beta}$, $\text{A}_{1\beta}$, **CH**₂-Pam, $4\times\text{K}_{\beta,\delta,\gamma}$, $\text{T}_{\text{T}\gamma}$, $\text{T}_{2\gamma}$, $\text{T}_{1\gamma}$), 0.93-0.63 (m, 15H, V_γ , **CH**₃-Pam).

***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*-histidyl-*L*-glycyl-*L*-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -*D*-galactopyranosyl]-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonyl-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolin (128)**

(Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal-(1 \rightarrow 3)-[α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)]- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

30 mg (15 μmol) Pam₃Cys-Ser(OtBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH **125**, 5.8 mg (15 μmol) HATU, 2.1 mg (15 μmol) HOAt werden in 2 ml absol. DMF gelöst und mit 3.3 μl (30 μmol) *N*-Methylmorpholin (NMM) versetzt. Nach 15minütigem Rühren werden 20 mg (7.3 μmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal-(1 \rightarrow 3)-[α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)]- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **67** gelöst in 2 ml absol. DMF zugegeben und 20 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend werden 15 ml Wasser zugegeben und gefriergetrocknet, bevor zur Entfernung aller säurelabilen Schutzgruppen 1.5 h in 10 ml einer Lösung aus TFA/H₂O/TIS (10/1/1)

gerührt wird. Nach destillativer Entfernung wird 4x mit 20 ml absol. Toluol kodestilliert, mit 5 ml Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semipräparative RP-HPLC (Vydac C4 Protein, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80) → (100:0), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 40.0 min) gereinigt.

Ausbeute: 6.1 mg (1.44 μmol, 20%), farbloses Lyophilisat, R_t = 42.1 min (Vydac C4 Protein, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm), [α]^D₂₂ = -37.4 (c = 0.5 g/100 ml, H₂O).

C₁₉₅H₃₃₈N₃₈O₆₂S (M = 4239.05 g/mol) [4236.42 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 2120.23 ([M+2H]²⁺, ber.: 2119.21), 1413.53 ([M+3H]³⁺, ber.: 1413.14), 1060.66 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1060.11), 1316.85 ([M+3H-Neu]³⁺, ber.: 1316.11).

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1413.14 ([M+3H]³⁺, ber.: 1413.14).

MALDI-TOF-MS (dhh, negativ) m/z: 4236.00 ([M-H]⁻, ber.: 4235.42), 3944.15 ([M-H-Neu]⁻, ber.: 3944.32).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.51 (s, 1H, H_ε), 7.22 (s, 1H, H_δ), 5.11 (bs, 1H, CH-Glyceryl), 4.83 (bs, 1H, H₁), 4.62-4.00 (m, 30H, D_α, C_α, H_α, R_α, A_{3α}, A_{2α}, S_{2α}, H₁['], A_{4α}, S_{1α}, P_{1-5α}, V_α, T_{2,6-STβ}, T_{2,6-STα}, A_{1α}, T_{1α}, T_{2α}, T_{2β}, T_{1β}, CH₂-Glyceryl, S_{3α}, 4xK_α), 3.99-3.26 (m, 47H, H₂, H₅['], G_{1αα}, G_{1αb}, H₅, 4x CH₂O-Spacer, S_{2β}, G_{2α}, H₃, H₄['], S_{1β}, S_{3β}, 3-CH₂-Spacer, H_{6a,b}, H₆[']_{a,b}, H₄, H₃['], P_{1-5δ}, H₂['], H₆["], H_{9a}["], H₇["], H_{9b}["], H₄["], H₈["], H₅["]), 3.26–2.36 (m, 25H, H_{βa}, CH₂-Spacer, 4xK_ε, H_{βb}, D_{βa}, CH₂S, R_δ, C_β, D_{βb}, 12-CH₂-Spacer, CH₂-Spacer, H_{3eq}["]), 2.35-2.02 (m, 10H, P_{1,2βa}, 6xH_α-Pam, CH₂-Spacer), 2.02-0.94 (m, 150H, P_{3-5βa}, V_β, P_{1-5γ}, P_{1-5βb}, AcNH {1.88}, R_{βa}, H_β-Pam, R_{βb}, R_γ, A_{2β}, A_{3β}, A_{4β}, A_{1β}, CH₂-Pam, 4xK_{β,δ,γ}, T_{2,6-STγ}, H_{3ax}["], T_{2γ}, T_{1γ}), 0.92-0.66 (m, 15H, V_γ, CH₃-Pam).

Immunisierung 081126 von Mäusen (Maus 4,5,6) mit Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH 127:

Etwa acht Wochen alte balb/c J Mäuse wurden nach folgendem Schema immunisiert:

Erstimmunisierung: A (40 μl) B (40 μl → 10 μg 127 je Maus) (in eine Fußsohle der drei Mäuse) (CFA + 127).

3 Sekundärimmunisierungen: C (50 μl) D (50 μl → 10 μg 127 je Maus) (intraperitoneal) (IFA + PBS) (IFA + 127) Tag: 21, 43, 65.

Durchführung des 1. ELISA Tests (Abb. 3.6.7.1):

1. **Beschichtung** der Platten mit **BSA-NH-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH 85** in Coating-Puffer (c = 5 µg/ml), 50 µl/Nute, 1 h, 37 °C.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. **Blocken** noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x, 0.5 h, 37 °C.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

3. **Titration** der Seren ab einer Verdünnung von 1:50, 50 µl/well, 1 h, 37 °C.

Durchführung: Es werden 50 µl einer 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x in jeder Nute vorgelegt. Anschließend pipettiert man 50 µl des entsprechenden Serums (Verdünnung: 1:25 in 1%-iger Lösung von BSA (in PBS1x)) in die erste Nute einer Reihe der ELISA-Platte (→ Endverdünnung = 1:50). Nach gründlichem Mischen werden 50 µl der Lösung entnommen und zur folgenden Nute gegeben. Diese Prozedur wird bis zum Ende einer Reihe wiederholt. Aus der letzten Vertiefung werden abschließend 50 µl der Lösung entnommen und verworfen. Es wird 1 h bei 37 °C inkubiert.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

4. **Zugabe des biotinylierten**, gegen Maus-Gesamtimmungglobulin gerichteten **Antikörpers** aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in 1%-iger Gelatine Lösung in PBS1x) einer Stammlösung mit c = 1.2 µg/ml), 1 h, 37 °C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. **Zugabe von** 50 µl/well **SA-HPO** (1:10000) in 1%-iger Gelatine-Lösung PBS1x. Inkubation: 0.5 h, 37 °C.

6. Zugabe von 50 µl/Nute der **ABTS/H₂O₂**-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Daten der Immunisierung 081126 (nach 3. Sekundärimmunisierung):

Verdünnung		1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
081126	Maus 4	1,4723	1,3709	1,1327	0,7416	0,4403	0,2421
	Maus 5	1,5148	1,4174	1,2815	1,0165	0,6574	0,4075
	Maus 6	1,4837	1,3694	1,0553	0,6221	0,3696	0,2013
(-)-Kontrolle		0,0580	0,1145	0,1017	0,1004	0,1021	0,1094

Verdünnung		1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400
081126	Maus 4	0,1661	0,1240	0,0887	0,0853	0,0903	0,1020
	Maus 5	0,2360	0,1493	0,1245	0,0979	0,1047	0,2111
	Maus 6	0,1307	0,1026	0,0836	0,0842	0,0937	0,0668
(-)-Kontrolle		0,0833	0,0859	0,0774	0,0860	0,0888	0,0654

Durchführung des 2. ELISA Tests (Abb. 3.6.7.2):

1. **Beschichtung** der Platten mit ($\{[Ac-PAHGV-T(\beta-Gal-(1-3)-\alpha-GalNAc)-SAPDTRPAPGSTAP]_2K\}_4K\}_2K-\beta A-OH$ 97 in Coating-Puffer (c = 10 µg/ml), 50 µl/Nute, 1 h, 37 °C.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. **Blocken** noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x, 0.5 h, 37 °C.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

3. **Titration** der Seren ab einer Verdünnung von 1:50, 50 µl/well, 1 h, 37 °C.

Durchführung: Es werden 50 µl einer 1%-iger Lösung von BSA in PBS1x in jeder Nute vorgelegt. Anschließend pipettiert man 50 µl des entsprechenden Serums (Verdünnung: 1:25 in 1%-iger Lösung von BSA (in PBS1x)) in die erste Nute einer Reihe der ELISA-Platte (→ Endverdünnung = 1:50). Nach gründlichem Mischen werden 50 µl der Lösung entnommen und zur folgenden Nute gegeben. Diese Prozedur wird bis zum Ende einer Reihe wiederholt. Aus der letzten Vertiefung werden abschließend 50 µl der Lösung entnommen und verworfen. Es wird 1 h bei 37 °C inkubiert.

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

4. **Zugabe des biotinylierten**, gegen Maus-Gesamtimmunglobulin gerichteten **Antikörpers** aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in 1%-iger Gelatine Lösung in PBS1x) einer Stammlösung mit c = 1.2 µg/ml), 1 h, 37 °C .

3x **Waschen** der Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. **Zugabe von** 50 µl/well **SA-HPO** (1:10000) in 1%-iger Gelatine-Lösung PBS1x. Inkubation: 0.5 h, 37 °C.

6. Zugabe von 50 µl/Nute der **ABTS/H₂O₂**-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Daten von Immunisierung 081126 (nach 3. Sekundärimmunisierung):

<i>Verdünnung</i>		<i>1/50</i>	<i>1/100</i>	<i>1/200</i>	<i>1/400</i>	<i>1/800</i>	<i>1/1600</i>
081126	Maus 4	1,3497	0,9776	0,6039	0,3576	0,2192	0,1495
	Maus 5	1,4159	1,2497	0,9278	0,5645	0,3539	0,2144
	Maus 6	1,3586	0,9876	0,6015	0,3611	0,2041	0,1345
(-)-Kontrolle		0,0743	0,1974	0,0946	0,0864	0,0938	0,0915

<i>Verdünnung</i>		<i>1/3200</i>	<i>1/6400</i>	<i>1/12800</i>	<i>1/25600</i>	<i>1/51200</i>	<i>1/102400</i>
081126	Maus 4	0,1171	0,1079	0,1146	0,1004	0,0941	0,0593
	Maus 5	0,1451	0,1046	0,0885	0,0833	0,0932	0,0562
	Maus 6	0,1032	0,0895	0,0826	0,0870	0,0952	0,0548
(-)-Kontrolle		0,0853	0,0858	0,0896	0,0844	0,0941	0,0613

5.7 Synthesen zu Kapitel 3.7

N-Acetyl-glycyl-L-valyl-*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- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl)]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*-(2,2,5,7,8-pentamethyl-chroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*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 (130)

(Ac-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→3)- β Ac₂GalBn-(1→3)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH)

Ausgehend von 527 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Arg(Pmc)-Wang vorbeladenen Tentagel-Harzes (**129**) (Rapp Polymere, Beladung: 0.19 mmol/g) erfolgt die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach Standardprotokoll. Nach Kupplung der Aminosäure Isoleucin wird die Spaceramino-säure **53** unter Standardbedingungen in die Synthese eingebaut. Es werden 443.5 mg (1 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl amido-4,7,10-trioxadecansäure **53** in die Kartusche des Synthesizers eingewogen. Nach Kupplung von *Fmoc*-Ser(*O**t*Bu)-OH wird die glycosylierte Aminosäure **34** manuell verknüpft. 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 302 mg (0.2 mmol, 2 eq.) des 2,3-Sialyl-T-Threonin-Konjugats **34**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55 μ L (0.5 mmol, 5 eq.) *N*-Methylmorpholin (NMM) in 2 ml *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und es wird 6 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 des Synthesizers gekuppelt. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe an Glycin wird mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten und acetyliert. Das Harz wird gründlich mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Noch verbliebene Lösungsmittelreste werden i. Hochvak. entfernt. In einem *Merrifield*-Glasreaktor wird das Harz 1.5 h mit einer Mischung aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Triisopropylsilan und 1 ml H₂O geschüttelt. Es wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 2 ml

Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 mL Toluol versetzt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 15 ml Toluol kodestilliert und die Lösung schließlich i. Vak. auf ca. 0.5 ml eingengt. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von 20 ml eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Rohpeptid wird durch präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80)→(50:50), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 33.6 min) gereinigt.

Ausbeute: 194 mg (0.045 mmol, 45%, farbloses Lyophilisat, R_t = 26.7 min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (20:80)→(50:50), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₈₉H₂₈₆N₄₄O₇₃ (M = 4342.54 g/mol) [4340.00 g/mol].

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1448.01 ([M+3H]³⁺, ber.: 1447.67), 1086.26 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1086.00).

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv) m/z: 4340.19 ([M+H]¹⁺, ber.: 4341.00).

***N*-Acetyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3-*O*-{(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl)]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-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 (132)**

Ac-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→3)- β Gal-(1→3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

Hydrierung: 80 mg (0.018 mmol) Ac-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→3)- β Ac₂GalBn-(1→3)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH **130** werden in 40 ml Methanol gelöst und mit 2 Spatelspitzen Pd(OAc)₂ versetzt. Der Kolben wird anschließend dreimal mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und jeweils mit Wasserstoff gespült. Man rührt 16 h unter Wasserstoffatmosphäre und filtriert im Anschluss über *Hyflo Super Cell*. Der Filtrerrückstand wird mit insgesamt 50 ml Methanol nachgespült. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert. R_t = 10.9 min (Phenomenex Luna, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (20:80)→(50:50), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₇₅H₂₇₄N₄₄O₇₃ (M = 4162.30 g/mol) [4159.61 g/mol].

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv) m/z: 4162.5 ([M+H]⁺, ber.: 4160.6).

Deacetylierung:

52 mg (max. 0.013 mmol) des rohen Glycopeptids **131**, werden in 30 ml wässriger NaOH-Lösung (80 mg NaOH in 500 ml entionisiertem Wasser ($c = 0.004 \text{ mol/l}$), $\text{pH} = 11.5$) gelöst und 3 d bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 200 μl 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{ TFA}$, (10:90) \rightarrow (40:60), 40 min, $\lambda = 214 \text{ nm}$, $R_t = 31.7 \text{ min}$) gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (0.0013 mmol, 23% über 2 Stufen bezogen auf die gereinigte Menge), farbloses Lyophilisat, $R_t = 21.4 \text{ min}$ (Phenomenex Luna, Grad.: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{ TFA}$, (10:90) \rightarrow (40:60), 40 min, $\lambda = 214 \text{ nm}$); $[\alpha]_D^{22} = -48.1$ ($c = 1.00$, H_2O).

$\text{C}_{159}\text{H}_{258}\text{N}_{44}\text{O}_{65}$ ($M = 3826.01 \text{ g/mol}$) [3823.82 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1314.01 ($[\text{M}+3\text{K}]^{3+}$, ber.: 1313.61).

Diocetylcarbamoylmethoxyessigsäure (135)¹¹²

In 40 mL Toluol werden 4.5 g (8.62 mmol) Dioctadecylamin (**133**) und 1.0 g (8.62 mmol) Diglycolsäureanhydrid (**134**) suspendiert und unter Erhitzen gelöst. Die Lösung wird 48 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend lässt man die Reaktionsmischung auf Raumtemp. abkühlen, wobei Teile des Produkts ausfallen. Das Lösungsmittel wird destillativ i. Vak. entfernt und der bräunliche Rückstand aus Chloroform umkristallisiert.

Ausbeute: 4.65 g (7.29 mmol, 85%), farbloser, kristalliner Feststoff, Smp.: 82 °C.

$\text{C}_{40}\text{H}_{79}\text{NO}_4$ ($M = 638.06 \text{ g mol}^{-1}$) [637.60 g/mol].

Gef.: C: 75.32; H: 12,43; N: 2,20.

Ber.: C: 75,30; H: 12,48; N: 2,20.

MALDI-TOF-MS (positiv), m/z: 639.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 639.1), 661.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 661.1), 677.1 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 677.2).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4.35 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 4.18 (s, 2H, $\text{NC(O)-CH}_2\text{-O}$), 3.32 (t, 3H, $\text{CH}_{2a}\text{-N}$, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.7 \text{ Hz}$), 3.05 (t, 3H, $\text{CH}_{2b}\text{-N}$, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.7 \text{ Hz}$), 1.58-1.42 (m, 4H, 2x $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 1.38-1.07 (m, 60H, 30x CH_2), 0.85 (t, 6H, 2x CH_3 , $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 8.4 \text{ Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 171.75 (COOH), 170.56 (CONH), 73.03 ($\text{CH}_2\text{-COOH}$), 71.18 (NC(O)-CH_2), 46.85 (2x $\text{CH}_2\text{-N}$), 31.89 (2x $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 29.55, 29.50, 29.43, 29.33, 29.28, 29.21, 28.59, 27.38 (26x CH_2), 26.92, 26.78 (2x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-N}$), 22.65 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 14.07 (2x CH_3).

Diocetylcarbamoylethoxyacetyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*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 (137)

([H₃C(CH₂)₁₇]₂NHCOCH₂OCH₂CONH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

Ausgehend von 527 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Arg(Pmc)-Wang vorbeladenen Tentagel-Harzes (**129**) (Rapp Polymere, Beladung: 0.19 mmol/g) erfolgt die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach Standardprotokoll. Nach Kupplung der Aminosäure Isoleucin wird die Spaceraminosäure **53** unter Standardbedingungen in die Synthese eingebaut. Es werden 443.5 mg (1 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxadecansäure **53** in die Kartusche des Synthesizers eingewogen. Nach Kupplung der Aminosäure Fmoc-Ser(*O**t*Bu)-OH wird die glycosylierte Aminosäure **22a** manuell verknüpft. 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 235 mg (0.2 mmol, 2 eq.) des Sialyl-T_N-Threonin-Konjugats **22a**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55 μ L (0.5 mmol, 5 eq.) *N*-Methylmorpholin (NMM) in 2 ml *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und es wird 6 h stark geschüttelt (je 30 s Vortex, 30 s Pause). Eventuell noch verbliebene Aminogruppen werden acetyliert, das Harz wird mit NMP gewaschen. Nach Kupplung der Aminosäure Prolin wird erneut die Spaceraminosäure eingeführt. Es werden 443.5 mg (1 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxadecansäure **53** in die Kartusche des Synthesizers eingewogen und gekuppelt. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe am Spacer wird mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten und die Lipid-Aminosäure Diocetylcarbamoylethoxyessigsäure (**135**) in die Synthese integriert. Eine Lösung von 256 mg (0.4 mmol, 4 eq.) Diocetylcarbamoylethoxyessigsäure (**135**), 195 mg (0.5 mmol, 5 eq.) HATU, 66 mg (0.5 mmol, 5 eq.) HOAt und 110 μ L (1 mmol, 10 eq.)

N-Methylmorpholin (NMM) in 2 ml NMP/CH₂Cl₂ (1:5) wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und 6 h stark geschüttelt (je 30 s Vortex, 30 s Pause). Eventuell noch verbliebene Aminogruppen werden acetyliert, das Harz wird gründlich mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Noch verbliebene Lösungsmittelreste werden i. Hochvak. entfernt. In einem *Merrifield*-Glasreaktor wird das Harz 1.5 h mit einer Mischung aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Triisopropylsilan und 1 ml H₂O geschüttelt. Es wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 2 ml Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 mL Toluol versetzt und i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 15 ml Toluol kodestilliert und die Lösung schließlich i. Vak. auf ca. 0.5 ml eingeeengt. Das Glycopeptid wird durch Zugabe von 20 ml eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Rohpeptid wird durch semipräparative RP-HPLC (Vydac C4 Protein, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80) → (100:0), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 38.1 min) gereinigt.

Ausbeute: 37.3 mg (6.8 μmol, 7%), farbloses Lyophilisat, R_t = 37.4 min (Vydac C4 Protein, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₂₅₀H₄₀₄N₅₆O₈₂ (M = 5506.21 g/mol) [5502.92 g/mol].

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1377.01 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1376.73), 1102.22 ([M+5H]⁵⁺, ber.: 1101.58). 918.70 ([M+6H]⁶⁺, ber.: 918.15).

MALDI-TOF-MS (positiv, dhb), m/z: 5505.29 ([M+H]⁺, ber.: 5503.92).

Deacetylierung und Debenzylierung:

20 mg (3.6 μmol) des Glycopeptids **136** werden in 30 ml wässriger NaOH-Lösung (80 mg NaOH in 500 ml entionisiertem Wasser (c = 0.004 mol/l), pH = 11.5) gelöst und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 200 μl 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet.

Rohausbeute: 19 mg (3.6 μmol, quant.), farbloses Lyophilisat, R_t = 34.6 min (Vydac C4 Protein, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₂₃₁H₃₈₆N₅₆O₇₆ (M = 5163.87 g/mol) [5160.81 g/mol].

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1721.59 ([M+3H]³⁺, ber.: 1721.27), 1291.20 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1291.20), 1033.17 ([M+5H]⁵⁺, ber.: 1033.16). 861.15 ([M+6H]⁶⁺, ber.: 861.14).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv) m/z: 5160.75 ([M]⁺, ber.: 5160.81).

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-isoleucyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valin (140)

NH₂(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Tyr-Ser-Phe-Pro-Ser-Val-OH

Ausgehend von 192 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Val-HMPB-BHA vorbeladenen Tentagel-Harzes (**138**) (Novabiochem, Beladung: 0.52 mmol/g) erfolgt die Glycopeptidsynthese im Peptidsynthesizer nach Standardprotokoll. Nach Kupplung der Aminosäure Isoleucin wird die Spaceramino-säure **53** unter Standardbedingungen in die Synthese eingebaut. Es werden 443.5 mg (1 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxadecansäure (**53**) in die Kartusche des Synthesizers eingewogen. Nach Kupplung der Aminosäure Fmoc-Ser(*O*tBu)-OH wird die glycosylierte Aminosäure **22a** manuell verknüpft. 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 235 mg (0.2 mmol, 2 eq.) des Sialyl-T_N-Threonin-Konjugats **22a**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 eq.) HOAt und 55 μ L (0.5 mmol, 5 eq.) *N*-Methylmorpholin (NMM) in 2 ml *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wird in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt, und es wird 6 h stark geschüttelt (je 30 s Vortex, 30 s Pause). Eventuell noch verbliebene Aminogruppen werden acetyliert, das Harz wird mit NMP gewaschen. Nach Kupplung der Aminosäure Prolin wird erneut die Spaceramino-säure **53** eingeführt. Es werden 443.5 mg (1 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxadecansäure (**53**) in die Kartusche des Synthesizers eingewogen und gekuppelt. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe am Spacer wird mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten, das Harz gründlich mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. In einem *Merrifield*-Glasreaktor wird das Harz 1.5 h mit einer Mischung aus 10 ml Trifluoressigsäure, 1 ml Triisopropylsilan und 1 ml H₂O geschüttelt. Es wird filtriert und das Harz dreimal mit jeweils 2 ml Trifluoressigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 15 mL Toluol versetzt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird dreimal mit je 15 ml Toluol kodestilliert und die Lösung schließlich i. Vak. auf ca. 0.5 ml eingengt. Das Glycopeptid wird durch

Zugabe von 20 ml eisgekühltem Diethylether ausgefällt und der Niederschlag abdekantiert. Das Rohpeptid wird durch präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 32.6 min) gereinigt.

Ausbeute: 231 mg (56.5 μmol, 57%), farbloses Lyophilisat, R_t = 11.8 min (Phenomenex Luna, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm).

C₁₈₅H₂₇₃N₃₇O₆₇ (M = 4087.35 g/mol) [4084.91 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1362.73 ([M+3H]³⁺, ber.: 1362.64), 1022.30 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1022.23), 818.25 ([M+5H]⁵⁺, ber.: 817.98).

Deacetylierung und Debenzylierung:

231 mg (56.5 μmol) des Heterotops **139** werden in 100 ml wässriger NaOH-Lösung (80 mg NaOH in 500 ml entionisiertem Wasser (c = 0.004 mol/l), pH = 11.5) gelöst und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 1 ml 1N Essigsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Jupiter, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90) → (100:0), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 18.6 min) gereinigt.

Ausbeute: 202.4 mg (54.0 μmol, 96%), farbloses Lyophilisat, R_t = 15.6 min (Phenomenex Jupiter, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm); [α]²⁴_D = -84.5 (c = 1.00, H₂O).

C₁₆₆H₂₅₅N₃₇O₆₁ (M = 3745.01 g/mol) [3742.80 g/mol].

ESI-MS (positiv) m/z: 1249.29 ([M+3H]³⁺, ber.: 1248.60), 936.98 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 936.70), 749.58 ([M+5H]⁵⁺, ber.: 749.56).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.49 (d, 1H, H_ε, J_{H_ε, H_δ} = 1.4 Hz), 7.20 (d, 1H, H_δ, J_{H_δ, H_ε} = 1.2 Hz), 7.28-7.09 (m, 5H, F_{ar}), 6.95 (d, 2H, 2x Y_{δ1}, J_{Y_δ, Y_ε} = 7.80 Hz), 6.90 (d, 2H, 2x Y_{δ2}, J_{Y_δ, Y_ε} = 8.1 Hz), 6.65 (d, 4H, Y_ε, J_{Y_ε, Y_δ} = 8.0 Hz), 4.81 (d, 1H, H₁, J_{H₁, H₂} = 3.80 Hz), 4.61-4.03 (m, 27H, D_α {4.60}, H_α {4.56}, R_α {4.51}, A_{3α} {4.47}, A_{2α} {4.45}, S_{2,4α} {4.37}, F_α {4.35}, Y_{α1,2} {4.35}, A_{4α} {4.33}, S_{1,3α} {4.32}, P_{1-6α} {4.29, 4.28, 4.27, 4.19, 4.17, 4.15}, V_{α1} {4.18}, T_{STnα} {4.17}, T_{STnβ} {4.13}, A_{1α} {4.12}, T_{1α} {4.11}, T_{2α} {4.09}, T_{2β} {4.06}, T_{1β} {4.05}), 4.01-3.61 (m, 39H, I_α {3.99}, V_{α2} {3.95}, H₂ {3.92}, G_{1αa} {3.86}, G_{1αb} {3.85}, H₅ {3.76}, 8x CH₂O-Spacer {3.76}, S_{2,4β} {3.79}, G_{2α} {3.70}, S_{3β} {3.74}, H₃ {3.68}, S_{1β} {3.66}, 2x3-CH₂-Spacer {3.66}, H_{6a,b} {3.64}), 3.60-3.32 (m, 20H, H₄ {3.60}, H₆" {3.59}, H_{9a}" {3.58}, H₇" {3.57}, P_{1-6δ} {3.56, 3.53, 3.49, 3.48, 3.45}, H_{9b}" {3.56}, H₄" {3.55}, H₈" {3.52}, H₅" {3.49}), 3.17 (d, 1H, H_{βa}, J_{H_ε, H_α} = 5.5 Hz), 3.12–3.01 (m, 11H, 2xCH₂-Spacer {3.09}, H_{βb} {3.08}, D_{βa} {3.05}, R_δ {3.03}, F_{βa} {2.97}, Y_{βa1,2} {2.97}), 2.90-2.49 (m, 13H D_{βb} {2.80}, F_{βb} {2.82}, Y_{βb1,2} {2.82}, 2x12-CH₂-Spacer {2.61}, H_{3eq}" {2.54}, 2xCH₂-Spacer, J_{CH₂.CH₂} = 6.04 Hz {2.53}), 2.25-2.06

(m, 7H, $P_{1,2,6\beta a}$ {2.21, 2.19, 2.17}, 2xCH₂-Spacer {2.15}), 2.03-1.66 (m, 30H, $P_{3-5\beta a}$ {1.96, 1.89, 1.85}, 2xV_β {1.95}, $P_{1-6\gamma}$ {1.94-1.82}, $P_{1-6\beta b}$ {2.02, 1.97, 1.92, 1.86, 1.84}, AcNH (2x s, 1.82, 1.80}, $R_{\beta a}$ {1.74}), 1.64-1.48 (m, 5H, I_{β} {1.64}, $R_{\beta b}$ {1.58}, H_{3ax}" {1.56}, R_{γ} {1.54}), 1.28-1.18 (m, 15H, $A_{2\beta}$, {1.25, d, $A_{3\beta}$ $J_{A\beta, A\alpha} = 6.6$ Hz}, I_{γ} {1.64}, {1.23 d, $A_{4\beta}$, $J_{A\beta, A\alpha} = 7.00$ Hz}, {1.20, d, $A_{1\beta}$, $J_{A\beta, A\alpha} = 7.36$ Hz}), 1.16 (d, 3H, $T_{STn\gamma}$, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.42$ Hz), 1.07 (d, 3H, $T_{2\gamma}$, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.48$ Hz), 1.05 (d, 3H, $T_{1\gamma}$, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.48$ Hz), 0.84 (d, 6H, 2xV_{γa}, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.78$ Hz), 0.82 (d, 6H, 2xV_{γb}, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.67$ Hz), 0.71-0.63 (m, 6H, I_{δ} {0.69}, I_{γ} {1.64}).

¹³C-NMR (400 MHz, D₂O, ¹³C, HSQC): δ (ppm):

174.91, 174.89, 174.37, 173.99, 173.70, 173.59, 173.47, 173.17, 173.09, 172.92, 172.60, 172.54, 172.33, 171.98, 171.93, 171.53, 171.35, 171.20, 171.10, 170.89, 170.68 (C=O, C=O-Acetyl, C1"), 133.45 (H_{C2}), 130.42 (Y_δ), 129.21, 128.53, 126.8 (F_{ar}), 128.27 (H_{C5}), 117.34 (H_{C4}), 115.11 (2x Y_ε), 99.25 (C2"), 99.18 (C1), 77.51 (T_{STn*β}), 72.61 (C6"), 71.59 (C7"), 69.41 (C9"), 69.35 (CH₂-Spacer), 68.23 (C3), 68.20 (C4), 68.16 (C8"), 66.98 (T_{1β}), 66.97 (C5), 66.56 (C4"), 66.23 (C6), 66.05 (T_{2β}), 61.47, 61.43, 61.40, 61.38 (S_{1β}, S_{2β}, S_{3β}, S_{4β}), 61.14, 60.53, 60.45, 60.03, 59.96 (P_{1-6α}), 59.48 (T_{2α}), 59.39 (T_{1α}), 59.35 (V_{1α}, V_{2α}), 58.92 (T_{STn*α}), 57.81 (I_α), 56.97, 56.88, 56.02, 55.51 (S_{1α}, S_{2α}, S_{3α}, S_{4α}), 55.51, 55.13 (Y_δ, F_{ar}), 52.27 (C5"), 51.78 (H_α), 51.09 (R_α), 50.14 (D_α), 49.60 (C2), 49.49 (A_{3α}), 48.02 (A_{4α}), 47.85 (A_{1α}), 47.74, 47.64, 47.58, 47.38 (P_{1-6δ}), 42.35 (G_{2α}), 42.21 (G_{1α}), 42.15 (CH₂-Spacer), 40.47 (R_δ), 40.42 (C3"), 40.35 (CH₂-Spacer), 39.00 (D_β), 36.58, 35.98 (Y_δ, F_{ar}), 35.88 (I_β), 31.00, 29.98 (V_{β1}, V_{β2}), 30.10, 30.07, 29.63, 29.30, 29.26, 29.18 (P_{1-6β}), 29.15 (R_β), 27.41 (H_β), 24.69, 24.66, 24.65, 24.52, 24.31, 24.17 (P_{1-6γ}), 23.95 (R_γ), 35.88 (I_γ), 22.20, 21.96, 20.61 (CH₃-AcNH), 18.27 (T_{1γ}), 18.71 (T_{2γ}), 18.41 (V_{γ1a}, V_{γ2a}), 18.31 (T_{STn*γ}), 17.73 (V_{γ1b}, V_{γ2b}), 16.27, 15.15, 15.07, 15.03 (A_{1-4β}), 14.41 (I_γ), 9.68 (I_δ).

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*-histidyl-*L*-glycyl-*L*-valyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -glycero-*D*-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -*D*-galactopyranosyl}-*L*-threonyl-*L*-seryl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-aspartyl-*L*-threonyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-*L*-glycyl-*L*-seryl-*L*-threonyl-*L*-alanyl-*L*-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-*L*-isoleucyl-*L*-tyrosyl-*L*-seryl-*L*-phenylalanyl-*L*-prolyl-*L*-seryl-*L*-valin (141)

(Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Tyr-Ser-Phe-Pro-Ser-Val-OH)

60 mg (30 μ mol) Pam₃Cys-Ser(OtBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH **125**, 11.6 mg (30 μ mol) HATU, 4.2 mg (30 μ mol) HOAt werden in 4 ml absol. DMF gelöst und mit 6.6 μ l (60 μ mol) *N*-Methylmorpholin (NMM) versetzt. Nach 15minütigem Rühren werden 60 mg (16 μ mol) NH₂(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Tyr-Ser-Phe-Pro-Ser-Val-OH **140** gelöst in 4 ml absol. DMF zugegeben und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend werden 50 ml Wasser zugegeben und gefriergetrocknet, bevor zur Entfernung der restlichen säurelabilen Schutzgruppen 1.5 h in 10 ml einer Lösung aus TFA/H₂O/TIS (10/1/1) gerührt wird. Nach destillativer Entfernung wird viermal mit 20 ml absol. Toluol kodestilliert, mit 5 ml Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird durch semi-präparative RP-HPLC (Vydac C4 Protein, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80) \rightarrow (100:0), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 41.2 min) gereinigt.

Ausbeute: 9.5 mg (1.8 μ mol, 11%), farbloses Lyophilisat, R_t = 39.3 min (Vydac C4 Protein, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA, (20:80) \rightarrow (100:0), 40 min, λ = 214 nm), [α]_D²² = -57.8 (c = 0.5 g/100 ml, H₂O).

C₂₄₇H₄₀₉N₄₇O₇₃S (M = 5237.23 g/mol) [5233.95 g/mol].

ESI-MS (positiv) *m/z*: 1746.02 ([M+3H]³⁺, ber.: 1745.65), 1309.77 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1309.49), 1048.43 ([M+5H]⁵⁺, ber.: 1047.79), 873.52 ([M+6H]⁶⁺, ber.: 873.32).

MALDI-TOF-MS (dhb, negativ) *m/z*: 5232.29 ([M-H]⁻, ber.: 5232.95), 4941.49 ([M-H-Neu]⁻, ber.: 4942.85).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC): δ (ppm):

8.51 (s, 1H, H_e), 7.22 (s, 1H, H₈), 7.28-7.09 (m, 5H, F_{ar}), 6.95 (d, 2H, 2x Y _{δ 1}, J_{Y δ , Y_e} = 7.80 Hz), 6.90 (d, 2H, 2x Y _{δ 2}, J_{Y δ , Y_e} = 8.1 Hz), 6.65 (d, 4H, Y_e, J_{Y_e, Y δ} = 8.0 Hz), 5.11 (bs, 1H, **CH**-

Glyceryl), 4.82 (bs, 1H, H1), 4.62-4.00 (m, 35H, D_α, C_α, H_α, R_α, A_{3α}, A_{2α}, S_{2α}, A_{4α}, S_{3,4α}, S_{1α}, P_{1-6α}, V_{α1,2}, T_{STnβ}, T_{STnα}, A_{1α}, T_{1α}, F_α, T_{2α}, T_{2β}, Y_{α1,2}, T_{1β}, CH₂-Glyceryl, S_{5α}, 4xK_α), 3.99-3.26 (m, 55H, I_α, H₂, G_{1αa}, G_{1αb}, H₅, 8x CH₂O-Spacer, S_{2β}, G_{2α}, H₃, S_{4,5β}, S_{1β}, S_{3β}, 2x3-CH₂-Spacer, H_{6a,b}, H₄, P_{1-6δ}, H₆"", H_{9a}"", H₇"", H_{9b}"", H₄"", H₈"", H₅""), 3.26-2.36 (m, 37H, H_{βa}, 2xCH₂-Spacer, 4xK_ε, H_{βb}, D_{βa}, CH₂S, R_δ, F_{βa}, Y_{βa1,2}, C_β, D_{βb}, F_{βb}, Y_{βb1,2}, 2x12-CH₂-Spacer, 2xCH₂-Spacer, H_{3eq}""), 2.35-2.02 (m, 11H, P_{1,2,6βa}, 6xH_α-Pam, 2xCH₂-Spacer), 2.02-0.94 (m, 158H, P_{3-5βa}, 2xV_β, P_{1-6γ}, P_{1-6βb}, AcNH {1.88}, R_{βa}, H_β-Pam, R_{βb}, R_γ, I_β, A_{2β}, A_{3β}, A_{4β}, A_{1β}, I_γ, CH₂-Pam, 4xK_{β,δ,γ}, T_{STnγ}, H_{3ax}"", T_{2γ}, T_{1γ}), 0.92-0.60 (m, 27H, 2xV_γ, CH₃-Pam, I_δ, I_γ).

6. Literaturverzeichnis

- [1] B. Nosse, *Chem. Unserer Zeit* **2006**, *40*, 164.
- [2] G. T. Diamandopoulos, *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 1595.
- [3] H. zur Hausen, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5910.
- [4] J. N. Blattman, P. D. Greenberg, *Science* **2004**, *305*, 200.
- [5] Z. Yu, N. P. Restifo, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 289.
- [6] J. A. Berzofsky, M. Terabe, S. Oh, I. M. Belayakov, J. D. Ahlers, J. E. Janik, J. C. Morris, *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1515.
- [7] I. Espinoza-Delgado, *The Oncologist* **2002**, *7*, 20.
- [8] S. J. Danishefsky, J. A. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882.
- [9] M. S. Mitchell, *Int. Immunopharmacol.* **2003**, *3*, 1051.
- [10] P. Moingeon, *Vaccine* **2001**, *19*, 1305.
- [11] Z. Yu, N. P. Restifo, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 289.
- [12] E. Jäger, D. Jäger, A. Knuth, *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 817.
- [13] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *Immunologie*, 5. Auflage **2001**, Spektrum Akademischer Verlag.
- [14] S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. M. Burchell, L. Pemberton, E. Lalani, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15286.
- [15] J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 301.
- [16] F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439.
- [17] S. J. Gendler, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, *6*, 339.
- [18] J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, T. Plunkett, R. Graham, I. Correra, D. Miles, M. Smith, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2002**, *7*, 209.
- [19] F.-G. Hanisch, *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 705.
- [20] S. Yonezawa, M. Goto, N. Yamada, M. Higashi, M. Nomoto, *Proteomics* **2008**, *8*, 3329.
- [21] A. M. Vlad, J. C. Kettel, N. M. Alajez, C. A. Carlos, O. J. Finn, *Adv. Immunol.* **2004**, *82*, 249.
- [22] R. Sangha, C. Butts, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4652.
- [23] J. Hilkins, M. J. L. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 359.
- [24] J. R. Gum Jr., *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 795.
- [25] I. Carlstedt, J. R. Davies, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 214.
- [26] T. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cummings, *J. Cell Biol.* **2008**, *182*, 531.
- [27] F.-G. Hanisch, *Biol. Chem.* **2001**, 382, 143.
- [28] J. Burchell, S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, A. Girling, A. Lewis, R. Mills, D. Lamport, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5476.
- [29] D. M. Swallow, S. J. Gendler, B. Griffiths, G. Corney, J. Taylor-Papadimitriou, *Nature* **1987**, 328, 82.
- [30] K. Engelmann, S. E. Baldus, F.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 27764.
- [31] T. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cummings, *J. Cell Biol.* **2008**, *182*, 531.
- [32] M. A. Trap, H. Clausen, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1780*, 546.
- [33] J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, *6*, 355.
- [34] I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 67.
- [35] F.-G. Hanisch, G. Uhlenbruck, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 872.

- [36] F.-G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbruck, *Glycoconjugate J.* **1990**, 7, 524.
- [37] I. Brockhausen, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, 31, 63
- [38] S. Zotter, P. C. Hageman, A. Lossnitzer, W. J. Mooi, J. H. M. Hilgers, *Cancer Rev.* **1988**, 11-12, 55.
- [39] S. Wilkie, G. Picco, J. Foster, D. M. Davies, S. Julien, L. Cooper, S. Arif, S. J. Mather, J. Taylor Papadimitriou, J. M. Burchell, J. Maher, *J. Immunol.* **2008**, 180, 4902.
- [40] S. Müller, F.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 26103.
- [41] I. Brockhausen, J. M. Yang, J. M. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 607.
- [42] P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 1336.
- [43] Y. Ikehara, N. Kojima, N. Kurosawa, T. Kudo, M. Kono, S. Nishihara, S. Issiki, K. Morozumi, S. H. Itzkowitz, T. Tsuda, S. I. Nishimura, S. Tsuji, H. Narimatsu, *Glycobiology* **1999**, 9, 1213.
- [44] S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, 49, 197.
- [45] H. Inoue, *Obstet. Gynecol.* **1990**, 75, 1031.
- [46] I. Takahashi, I. Maehara, T. Kusumoto, M. Yoshida, Y. Kakej, H. Kusumoto, M. Furusawa, K. Sugimachi, *Cancer* **1993**, 72, 1836.
- [47] R. Soares, A. Marinho, F. Schmitt, *Pathol. Res. Pract.* **1996**, 192, 1182.
- [48] S. Julien, G. Picco, R. Sewell, A.-S. Vercoutter-Edouart, M. Tarp, D. Miles, H. Clausen, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, *British J. Cancer* **2009**, 100, 1746.
- [49] V. Friedenreich, *The Thomsen Hemagglutination Phenomenon*, Levin and Munksgaard, Copenhagen, **1930**.
- [50] F. J. Irazoqui, G. A. Nores, *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, 3, 433.
- [51] G. F. Springer, W. A. Fry, R. R. Desai, R. A. Semerdjan, H. Tegtmeier, C. G. Neybert, E. F. Scanlon, *Cancer Detect. Preven.* **1985**, 8, 95.
- [52] M. Fukuda, S. R. Carlsson, J. C. Klock, A. Dell, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 12796.
- [53] M. Fukuda, S. Tsuboi, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 205.
- [54] N. Marcos, T. A. Cruz, F. Silva, R. Almeida, L. David, U. Mandel, H. Clausen, S. v. Mensdorff-Pouilly, C. Reis, *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, 51, 761.
- [55] D. Baeckström, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 11503.
- [56] J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, 44, 691.
- [57] J. D. Fontenot, S. V. Mariappan, P. Catasti, N. Domenech, O. J. Finn, G. Gupta, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, 13, 245.
- [58] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montenegro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, 53, 5386.
- [59] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheidt, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 4981.
- [60] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 7662.
- [61] M. A. Trap, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, 17, 197.
- [62] U. Westerlind, H. Schröder, A. Hobel, N. Gaidzik, A. Kaiser, C. M. Niemeyer, E. Schmitt, H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, 121, DOI: 10.1002/ange.200902963.
- [63] S. Dziadek, H. Kunz, *Chem. Rec.* **2004**, 3, 308.
- [64] T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz, *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, 6, 491.
- [65] A. Liakatos, H. Kunz, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2007**, 9, 35.

- [66] A. L. Sørensen, C. A. Reis, M. A. Trap, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, *16*, 96.
- [67] S. Wittrock, H. Kunz, *BioTec Zeitschrift für Biotechnologie* **2006**, 34.
- [68] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803.
- [69] S. Muller in *synthetic peptides as antigens*; (Ed.: S. Pillai, P. C. van der Vliet), Elsevier: Amsterdam, **1999**, *28*, 79.
- [70] V. P. Butler Jr., S. M. Beiser, *Adv. Immun.* **1973**, *17*, 255.
- [71] T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5985.
- [72] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5409.
- [73] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683.
- [74] P. M. Rudd, T. Elliott, P. Creswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek, *Science* **2001**, *291*, 2370.
- [75] H. Kunz, M. Schultz, *Carbohydrates in Chemistry and Biology, 1*, (Eds.: B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, 267.
- [76] H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495.
- [77] O. Seitz, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 214.
- [78] G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2839.
- [79] H. Kunz, M. Schultz, *Glycopeptides and Related Compounds* (Eds.: D. G. Large, C. D. Warren), M. Dekker, Inc., New York, **1997**.
- [80] T. Kjeldsen, H. Clausen, S. Hirohashi, T. Ogawa, H. Iijama, S.-I. Hakomori, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 2214.
- [81] H. Kunz, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 563.
- [82] T. F. Ørntoft, H. N. Harving, N. C. Langkilde, *Int. J. Cancer* **1990**, *45*, 666.
- [83] B. Kuberan, R. J. Linhardt, *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 653.
- [84] C. Leclerc, G. Przewlocki, M.-P. Schultz, L. Chedid, *Eur. J. Immunol.* **1987**, *17*, 269.
- [85] B. Agrawal, M. J. Krautz, M. J. Raddish, B. M. Longenecker, *Nat. Med.* **1988**, *4*, 43.
- [86] A. K. Chan, D. C. Lockhart, W. Von Bernstorff, R. A. Spanjaard, H.-G. Joo, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure, *Int. J. Cancer* **1999**, *82*, 721.
- [87] Z.-H. Jiang, R. R. Kogenty, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1423.
- [88] H. Kunz, B. Dombo, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 732.
- [89] H. Kunz, *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 1223-1232.
- [90] H. Kunz, W. Kosch, J. März, M. Ciommer, W. Günther, C. Unverzagt, *Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis and Related Technologies* (Ed. R. Epton) Intercept Ltd., Andover, U. K., **1992**, 171.
- [91] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [92] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748.
- [93] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Macofske, C. D. Chang, *Int J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35.
- [94] C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246.
- [95] B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1939.
- [96] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091.
- [97] T. M. Fyles, C. C. Leznoff, *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 1328.
- [98] J. M. Frechet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 3055.
- [99] K. Baumann, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3494.
- [100] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328.
- [101] G. W. Anderson, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3359.
- [102] R. M. Valerio, P. F. Alewood, R. B. Johns, *Synthesis* **1988**, 786.
- [103] R. Y. Tsien, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5721.
- [104] C. Brocke, H. Kunz, *Boorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3085.
- [105] S. Dziadek, C. G. Espinola, H. Kunz, *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 519.

- [106] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1763.
- [107] S. Czernecki, C. Georggoulis, C. Provelenghiou, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 3535.
- [108] K. Kanai, I. Sakamoto, S. Ogawa, T. Suami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 1529.
- [109] O. Seitz, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1995**.
- [110] G. Fuchs, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1995**.
- [111] C. Brocke, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2003**.
- [112] S. Dziadek, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- [113] A. Kuhn, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- [114] T. Becker, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2006**.
- [115] S. Wittrock, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2006**.
- [116] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 629.
- [117] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89.
- [118] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976.
- [119] G. Braum, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1991**.
- [120] H. Kunz, *Preperative Carbohydrate Chemistry* (Ed.: S. Hanessian), M. Dekker, New York, **1997**, 265.
- [121] R.U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244.
- [122] J. Habermann, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1998**.
- [123] R. Pfau, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2001**.
- [124] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129.
- [125] R.U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Deutsche Patentanmeldung* **1978**, AZ: P 2816340.8.
- [126] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473.
- [127] B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8777.
- [128] W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *1901*, 957.
- [129] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 985.
- [130] D. B. Bryan, R. F. Hall, K. G. Holden, W. F. Huffman, J. G. Gleason, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2353.
- [131] A. Mehta, R. Jaouhari, T. J. Benson, K. T. Douglas, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5441.
- [132] B. Liebe, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1997**.
- [133] G. Zemplén, A. Kunz, *Chem. Ber.* **1923**, *56*, 1705.
- [134] S. Keil, *Dissertation*, Universität Mainz, **2000**.
- [135] J. C. Lee, Y. S. Oh, S. H. Cho, J. I. Lee, *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 480.
- [136] A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35.
- [137] P. J. Garegg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1997**, *52*, 177.
- [138] F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, c13.
- [139] H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115.
- [140] O. Kanie, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 501.
- [141] R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett.* **1990**, 694.
- [142] H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115.
- [143] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556.
- [144] M. Leuck and H. Kunz, *J. prakt. Chem.* **1997**, *339*, 322.
- [145] S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 880.
- [146] B. Helferich, F. Wedemeyer, *Liebigs Ann. Chem.* **1949**, *563*, 139.
- [147] T. Reipen, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2002**.
- [148] T. Reipen, H. Kunz, *Synthesis* **2003**, 2487.
- [149] N. Bézay, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.
- [150] H. Herzner, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2001**.
- [151] C. Filser, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- [152] X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6569.

- [153] S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Chemistry Eur. J.* **2004**, *10*, 4150.
- [154] S. Dziadek, H. Kunz, *Synlett* **2003**, 1623.
- [155] N. Mathieux, H. Paulsen, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 2359.
- [156] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, *4*, 525.
- [157] A. Kuhn, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 458.
- [158] S. I. Hakamori, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 257.
- [159] B. Kuberan, R. J. Linhardt, *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 653.
- [160] N. Sharon, H. Lis, *Science* **1987**, *246*, 227.
- [161] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683.
- [162] M. Postema, *C-Glycoside synthesis*, CRC, Boc Ratom. **1995**.
- [163] R. V. Weatherman, K. H. Mortell, M. Cheruenak, L. L. Kiessling, E. J. Toone, *Biochem.* **1996**, *35*, 3619.
- [164] R. Ravishankar, A. Surolia, M. Vijayan, S. Lim, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11297.
- [165] C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kaijimoto, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 521.
- [166] S. Howard, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10326.
- [167] X. Yuan, R. J. Linhardt, *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1393.
- [168] Q. Wang, M. Wolff, T. Polat, Y. Du, R. J. Linhardt, *Bioorg. Med. Lett.* **2000**, *10*, 941.
- [169] K. C. Nicolaou, S. P. Ellery, J. S. Chen, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2.
- [170] J. Namy, J. Collin, C. Bied, H. Kagan, *Synlett.* **1992**, 733.
- [171] D. Curran, T. Fevig, C. Jasperse, M. Totleben, *Synlett.* **1992**, 943.
- [172] G. Molander, J. McKie, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4112.
- [173] P. de Pouilly, A. Chenede, J.-M. Mallet, P. Sinaÿ, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1993**, *130*, 256.
- [174] D. Mazeas, T. Skrydstrup, J.-M. Beau, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 909.
- [175] H. Paulsen, P. Matschulat, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 487.
- [176] K. Wallimann, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta.* **1991**, *74*, 1520.
- [177] J. Nagy, M. Bednarski, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3953.
- [178] C. Blomberg, *Concepts in Organic Chemistry*, Ed. K. Hafner, *31*, Springer-Verlag, Berlin **1993**.
- [179] A. Malapelle, Z. Abdallah, G. Doisneau, J.-M. Beau, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 6016.
- [180] I. R. Vlahov, P. I. Vlahov, R. J. Linhardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1480.
- [181] S. Cao, S. Meuneir, F. Andersson, M. Letellier, R. Roy, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 2303.
- [182] B. Kuberan, S. A. Sikkander, H. Tomiyama, R. J. Linhardt, *Angew. Chem.* **2003**, *117*, 7803.
- [183] P. J. Garegg, B. Samuelsson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1980**, *1*, 2866.
- [184] S. Hosokawa, M. Isobe, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 37.
- [185] J. F. Espinosa, M. Bruix, O. Jarreton, T. Skrydstrup, J. M. Beau, J. J. Barbero, *Chemistry Eur. J.* **1999**, *5*, 442.
- [186] D. H. P. Barton, G. Bringmann, W. B. Motherwell, *Synthesis* **1980**, 68.
- [187] M. Ballestri, C. Chatgililoglu, K. B. Clark, D. Griller, B. Giese, B. Kopping, *J. Org. Chem.* **2001**, *56*, 678.
- [188] H. Kunz, *Pure & Appl. Chem.*, **1993**, *65*, 1223.
- [189] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798.
- [190] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161.
- [191] F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686.
- [192] G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180.
- [193] A. J. Mort, D. T. Lampion, *Anal. Biochem.* **1977**, *82*, 289.

- [194] C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246.
- [195] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. D. Chang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *13*, 35.
- [196] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404.
- [197] L. A. Carpino, *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 401.
- [198] P. Schufheiss-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 64.
- [199] T. W. Greene, P. G. Wuts, *Protective groups in organic synthesis*; 3rd ed.; Wiley: New York, **1999**.
- [200] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005.
- [201] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1145.
- [202] R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, *20*, 451.
- [203] W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295.
- [204] D. G. Mullen, G. Barany, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 491.
- [205] R. Ramage, C. A. Barron, S. Bielecki, D. W. Thomas, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4105.
- [206] H.-G. Chao, M. S. Bernatowicz, P. D. Reiss, C. E. Klimas, G. R. Matsudea, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1746.
- [207] M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 315.
- [208] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447.
- [209] F. Albericio, R. Chinchilla, D. J. Dodsworth, C. Najera, *Org. Prep. Proced. Int.* **2001**, *33*, 203.
- [210] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
- [211] V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269.
- [212] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, 572.
- [213] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201.
- [214] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279.
- [215] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067.
- [216] J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2525.
- [217] W. Koenig, R. Geiger, *Chem Ber.* **1970**, *103*, 788.
- [218] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- [219] G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2839.
- [220] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2460.
- [221] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813.
- [222] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 901.
- [223] T. Gutjahr, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2008**.
- [224] S. Wittrock, T. Becker, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5319.
- [225] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Withesides, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2648.
- [226] V. P. Butler Jr., S. M. Beiser, *Adv. Immun.* **1973**, *17*, 255.
- [227] B. F. Erlanger, *Methods Enzymol.* **1980**, *70*, 85.
- [228] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688.
- [229] T. Peters Jr., *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 161.
- [230] K. E. van Holde, K. I. Miller, *Adv. Protein Chem.* **1995**, *47*, 1.
- [231] A. Barra, C. Cordonnier, M. P. Preziosi, L. Intrator, L. Hessel, B. Fritzell, J. L. Preud'homme, *J. Infect. Dis.* **1992**, *166*, 1021.
- [232] H. J. Jennings, R. K. Snood, *Neoglycoconjugates, Preparation and Application*, Academic, San Diego, **1994**.
- [233] D. W. Scheifele, W. Meekison, R. Guasparini, A. Roberts, L. Barreto, J. Thippawong, S. Wiltsey, *Vaccine* **1995**, *13*, 104.

- [234] S. Kuritska, H. Kaeyhty, L. Saarinen, P.-R. Rounberg, J. Eskola, H. P. Makela, *J. Pediatr.* **1996**, 128, 525.
- [235] R. E. Huebner, M. Nicol, R. Mothupi, H. Kaeyhty, N. Mbelle, E. Khomo, K.-P. Klugman, *Vaccine* **2005**, 23, 802.
- [236] T. Nolan, S. Lambert, D. Robertson, H. Marshall, P. Richmond, C. Streeton, J. Poolman, D. Boutriau, *Vaccine* **2007**, 25, 8487.
- [237] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, 98, 354.
- [238] H. Kunz, S. Birnbach, P. Wernig, *Carbohydr. Res.* **1990**, 202, 207.
- [239] K. v. d. Bruch, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 101.
- [240] J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2525.
- [241] S. Bauminger, M. Wilchek, *Methods Enzymol.* **1980**, 70, 151.
- [242] T. H. Ji, *Methods Enzymol.* **1983**, 91, 580.
- [243] A. J. Habeeb, R. Hiramoto, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, 126, 16.
- [244] R. B. Mikkelsen, D. F. Wallach, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 7413.
- [245] J. Carlsson, H. Drevin, R. Axen, *Biochem. J.* **1978**, 173, 723.
- [246] T. Buskas, Y. Li, G.-J. Boons, *Chemistry Eur. J.* **2004**, 10, 3517.
- [247] H. D. Agnew, R. D. Rohde, S. W. Millward, A. Nag, W.-S. Yeo, J. E. Hein, S. M. Pitram, A. A. Tariq, V. M. Burns, R. J. Krom, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, J. R. Heath, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 5044.
- [248] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, J. R. Heath, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708.
- [249] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, 124, 1215.
- [250] L. F. Tietze, C. Schröter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H.-J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, 2, 148.
- [251] S. Spjut, M. Pudelko, M. Hartmann, M. Elofsson, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 349.
- [252] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7798.
- [253] G. F. Springer, *J. Mol. Med.* **1997**, 75, 594.
- [254] D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 477.
- [255] O. Ouerfelli, J. D. Warren, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Expert Rev. Vaccines* **2005**, 4, 677.
- [256] S. F. Solvin, S. J. Keding, G. Ragupathi, *Immunol. Cell Biol.* **2005**, 83, 418.
- [257] T. Buskas, Y. Li, G. J. Boons, *Chemistry Eur. J.* **2004**, 10, 3517.
- [258] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 5409.
- [259] J. P. Tam, Y. A. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 9084.
- [260] T. Becker, A. Kaiser, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, 7, 1113.
- [261] S. Keil, A. Kaiser, F. Syed, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, 7, 1355.
- [262] C. Ozawa, H. Katayama, H. Hojo, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Org. Lett.* **2008**, 10, 3531.
- [263] J. P. Defoort, B. Nardelli, W. Huang, D. D. Ho, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 9084.
- [264] C. Ozawa, H. Hojo, H. Katayama, K. Nabeshima, T. Akahane, Y. Nakahara, *Pept. Sci.* **2007**, 44, 45.
- [265] P. Veprek, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **1999**, 5, 5.
- [266] P. Veprek, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **1999**, 5, 203.
- [267] P. Niederhafner, M. Reinis, J. Sebestik, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2008**, 14, 556.
- [268] P. Niederhafner, J. Sebestik, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2008**, 14, 44.
- [269] P. Niederhafner, M. Reinis, J. Sebestik, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2008**, 14, 2.
- [270] R. Roy, *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, 1, 327.
- [271] K. L. Rock, *Immunol. Today* **1996**, 17, 131.
- [272] W. R. Heath, F. R. Carbone, *Am. Rev. Immunol.* **2001**, 19, 47.

- [273] S. Ota, T. Ono, A. Morita, A. Uenaka, M. Harada, E. Nakayama, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 1471.
- [274] W. R. Heath, F. R. Carbone, *Nat. Rev. Immunol.* **2001**, *1*, 126.
- [275] B. Nardelli, Y. A. Lu, D. R. Shiu, C. Delpierre-Defoort, A. T. Profy, J. P. Tam, *J. Immunol.* **1992**, *148*, 914.
- [276] J. P. Defoort, B. Nardelli, W. Huang, D. D. Ho, J. P. Tam, **1992**, *89*, 3879.
- [277] Novabiochem, Katalog 2002-2003, S. 204, Produkt-Nr. 05-24-0150; Calbiochem-Novabiochem (Merck Biosciences), Schwalbach a. T., Germany.
- [278] G. Jung, C. Carrera, H. Brückner, W. G. Bessler, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1608.
- [279] G. Jung, K.-H. Wiesmüller, W. Scheuer, W. G. Bessler, *Pept.: Struct. Funct., Proc. Am. Pept. Symp., 8th* **1983**, 179.
- [280] K.-H. Wiesmüller, S. Freund, G. Jung, M. Krug, G. Folkers, G. Hess, *Peptides* **1988**, 695.
- [281] J. W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *38*, 545.
- [282] J. Metzger, G. Jung, W. G. Bessler, P. Hoffmann, M. Strecker, A. Lieberknecht, U. Schmidt, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1969.
- [283] R. Spohn, U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, K.-H. Wiesmüller, *Vaccine* **2004**, *22*, 2494.
- [284] B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, J. A. Hoffmann, *Cell* **1996**, *86* 973.
- [285] K. Dabbagh, D. B. Lewis, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2003**, *16*, 199.
- [286] M. M. Pütz, W. Ammerlaan, F. Schneider, G. Jung, C. P. Muller, *Vaccine* **2004**, *22*, 4173.
- [287] G. F. Springer, *J. Mol. Med.* **1997**, *75*, 594.
- [288] D. Galonic, D. Y. Gin, *Nature* **2007**, *446*, 1000.
- [289] S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 663.
- [290] S. Ingale, M. A. Wolfert, T. Buskas, G.-J. Boons, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 455.
- [291] B. Frisch, A. Roth, F. Schuber, *Methods Enzymol.* **2003**, *373*, 51.
- [292] G. R. Matyas, J. M. Muderhwa, *Methods Enzymol.* **2003**, *373*, 34.
- [293] E. Ribí, J. Cantrell, K. Takayama, N. Qureshi, J. Peterson, *Rev. Infect. Dis.* **1984**, *6*, 567.
- [294] S. Ingale, T. Buskas, G.-J. Boons, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5785.
- [295] M. J. Copland, M. A. Baird, T. Rades, J. L. McKenzie, B. Becker, F. Reck, P. C. Tyler, N. M. Davies, *Vaccine* **2003**, *21*, 883.
- [296] I. Fernandes, B. Frisch, S. Muller, F. Schuber, *Mol. Immunology* **1997**, *34*, 569.
- [297] C. L. van Broekhoven, C. R. Parish, C. Demangel, W. J. Britton, J. G. Altin, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4357.
- [298] C. R. Kensil, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1996**, *13*, 1.
- [299] D. Krikorian, E. Panou-Pomonis, C. Voitharou, C. Sakarellos, M. A. Sakarellos-Daitsiotis, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 812.
- [300] S. D. C. Müller, M. R. Müller, M. Huber, U. v.d. Esche, C. J. Kirschning, H. Wagner, W. G. Bessler, K. Mittenbühler, *Int. Immunopharm.* **2004**, *4*, 1287.
- [301] F. Reichel, A. M. Roelofsen, H. P. M. Geurts, T. I. Hamalainen, M. C. Feiters, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7989.
- [302] M. J. Amaral, M. A. Macedo, M. I. Oliveira, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1977**, *2*, 205.
- [303] M. Wagner, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2001**.
- [304] J. J. Eisch, J. E. Galle, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2615.
- [305] J. J. Eisch, J. E. Galle, *J. Organomet. Chem.* **1988**, *341*, 293.
- [306] N. E. Schore, M. C. Croudace, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5356.
- [307] O. Knöll, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2004**.

-
- [308] M. Ciommer, H. Kunz, *Synlett*. **1991**, 8, 593.
- [309] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 379.
- [310] I. Bettahi, G. Dasgupta, O. Renaudet, A. A. Chentoufi, X. Zhang, D. Carpenter, S. Yoon, P. Dumy, L. BenMohamed, *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2009**, 58, 187.
- [311] C. Leclerc, G. Przewlocki, M. P. Schultze, L. Chedid, *Eur. J. Immunol.* **1987**, 17, 269.
- [312] E. Ribí, J. Cantrell, K. Takayama, N. Qureshi, J. Peterson, *Rev. Infect. Dis.* **1984**, 6, 567.
- [313] B. Frisch, A. Roth, F. Schuber, *Methods Enzymol.* **2003**, 373, 51.
- [314] G. R. Matyas, J. M. Muderhwa, *Methods Enzymol.* **2003**, 373, 34.
- [315] P. C. Ho, D. A. Mutch, K. D. Winkel, A. J. Saul, G. L. Jones, T. J. Doran, C. M. Rzepczyk, *Eur. J. Immunol.* **1990**, 20, 477.
- [316] J. C. Reece, H. M. Geysen, S. J. Rodda, *J. Immunol.* **1993**, 151, 6175.
- [317] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3 ed., Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- [318] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923.
- [319] G. Szepesi, *Reverse-Phase HPLC*, VCH, Weinheim, **1992**.
- [320] *Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Organic Chemistry*, **1998**, 330.

7. Anhang

7-Hydroxy-6-deoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galacto-hepto-1,5-pyranose

(43) ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 290

7,6-Dideoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galacto-hepto-1,5-pyranose

(45) ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 292

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

(56) ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 294

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

(59) ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 296

$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr}(\beta\text{-Gal-(1-3)-}\alpha\text{-GalNAc})\text{-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH}$

(61) ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 298

$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr}(\alpha\text{NeuNAcCOOH-(2}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{Gal-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{GalNAc})\text{-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH}$

(64) ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 300

$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr}(\beta\text{Gal-(1}\rightarrow\text{3)-}[\alpha\text{NeuNAcCOOH-(2}\rightarrow\text{6)]-}\alpha\text{GalNAc})\text{-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH}$

(67) ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 302

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr}(\alpha\text{NeuNAcCOOH-(2}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{Gal-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{GalNAc})\text{-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH}$

(72) ^1H , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 304

- CH₃CH₂O(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-(1→3)-
[αNeuNAcCOOH-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-
Ala-Pro-OH
(75) ¹H 306
- (S(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α-NeuNAcCOOH-(2→6)-α-
GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)₂
(77) ¹H, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹H-TOCSY, ¹H-¹³C-HSQC, ESI-MS 307
- EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α-NeuNAcCOOH-
(2→6)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH
(79) ¹H, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹H-TOCSY, ¹H-¹³C-HSQC 310
- BSA-NH-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-
Thr(αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-
Thr-Ala-Pro-OH
(81) MALDI-TOF 312
- EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1-3)-α-
GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH
(84) ¹H, ¹³C, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C-HSQC 313
- BSA-NH-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1-3)-α-
GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH
(85) MALDI-TOF 315
- EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αNeuNAcCOOH-
(2→3)-βGal-(1→3)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-
OH
(87) ¹H, ¹³C, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C-HSQC 316

- BSA-NH-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αNeuNAcCOOH-(2→3)-βGal-(1→3)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH
(88) MALDI-TOF 318
- EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-(1→3)-[αNeuNAcCOOH-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH
(90) ¹H, ¹³C, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C-HSQC 319
- BSA-NH-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-(1→3)-[αNeuNAcCOOH-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH
(91) MALDI-TOF 321
- ({[Ac-PAHGV-T(αGalNAc)-SAPDTRPAPGSTAP]₂K }₂K }₂K-βA-OH
(95) ¹H, ¹³C, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C-HSQC 322
- ({[Ac-PAHGV-T(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-SAPDTRPAPGSTAP]₂K }₂K }₂K-βA-OH
(97) ¹H, ¹³C, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C-HSQC 324
- ({[Ac-PAHGVTS(α-NeuNAcCOOH-(2-6)-α-GalNAc)APDTRPAPGSTAP]₂K }₂K }₂K-βA-OH
(99) ¹H, ¹³C, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C-HSQC 326
- ({[Ac-PAHGVTSAPDTRPAPGST(α-NeuNAcCOOH-(2-6)-α-GalNAc)APPA
HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH]₂K }₂K }₂K-βA-OH
(101) ¹H, ¹³C, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C-HSQC 328
- Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH
(126) ¹H, MALDI-TOF, ESI-MS 330

Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1-3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH

(127) ¹H, MALDI-TOF, ESI-MS 332

Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-(1→3)-[αNeuNAcCOOH-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH

(128) ¹H, MALDI-TOF, ESI-MS 334

([H₃C(CH₂)₁₇]₂NHCOCH₂OCH₂CONH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αNeuNAcCOOBn-(2→6)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH

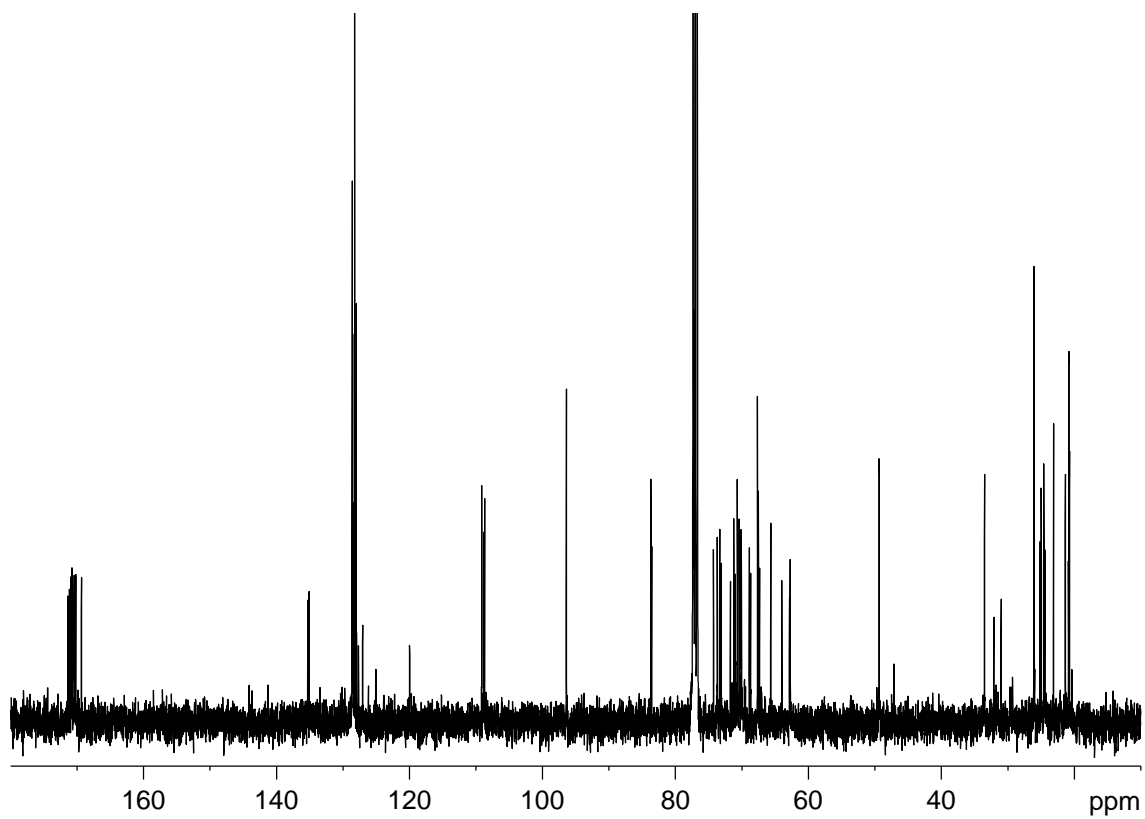
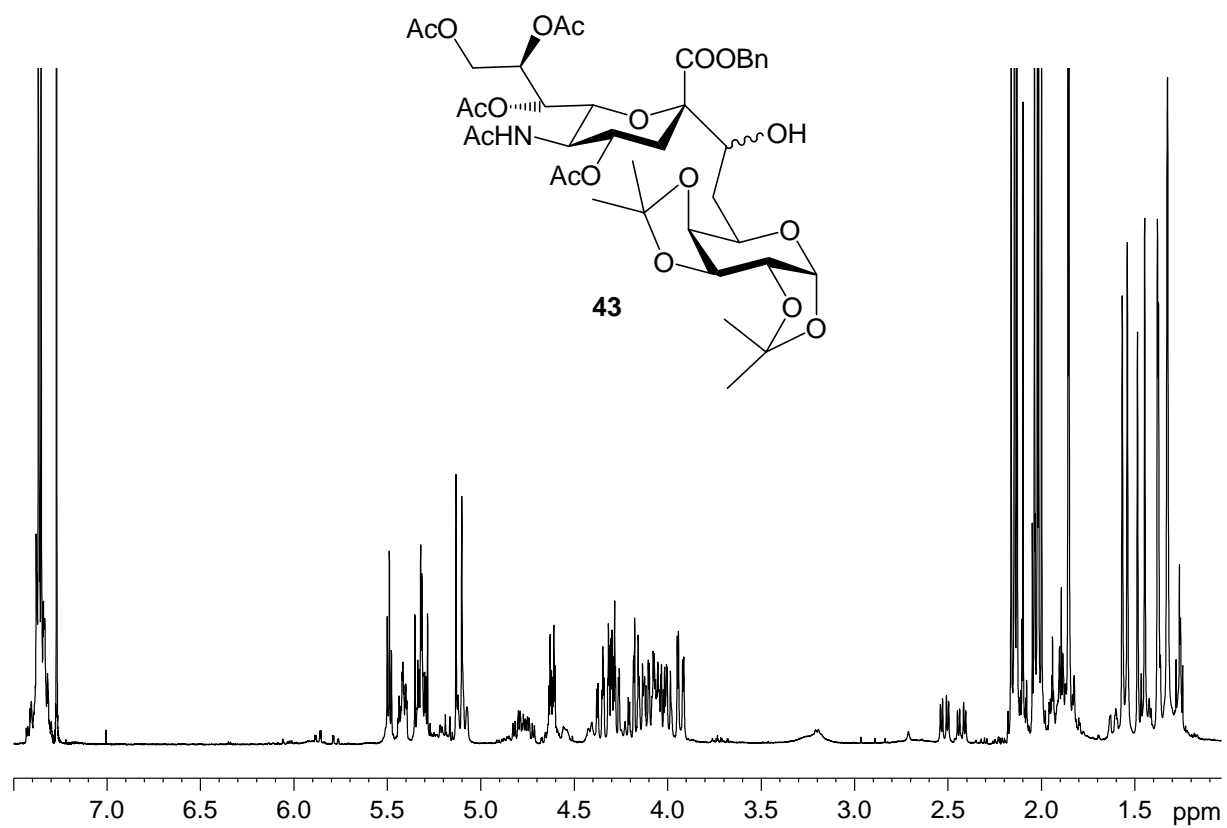
(137) MALDI-TOF, ESI-MS 336

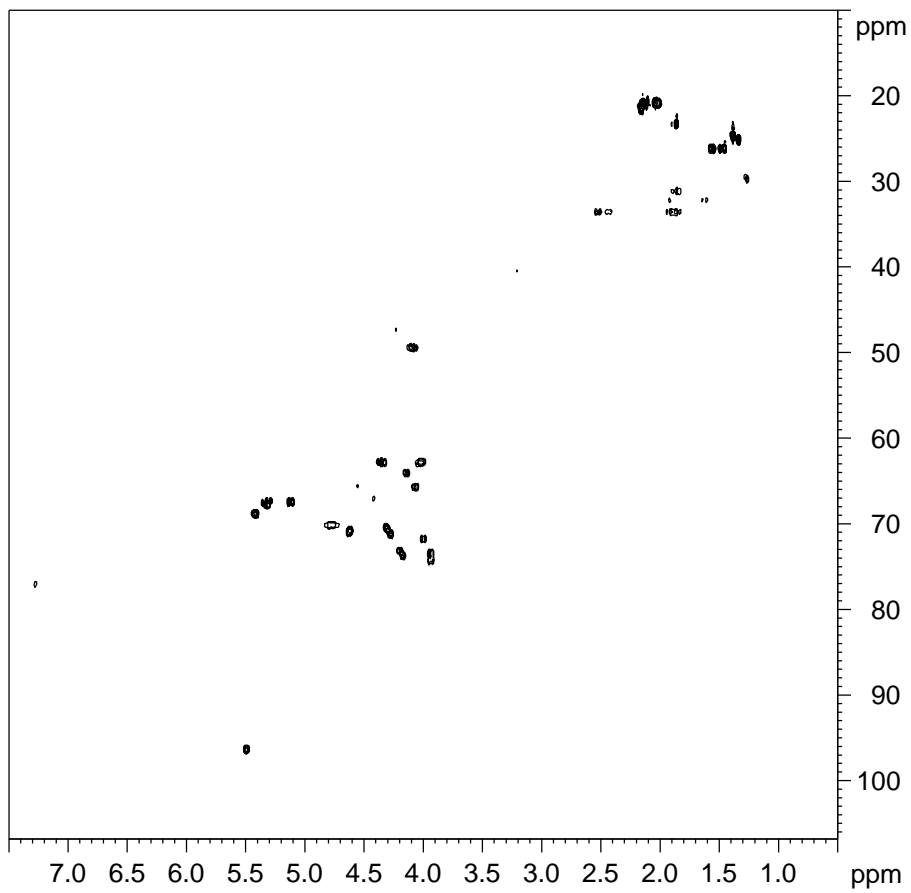
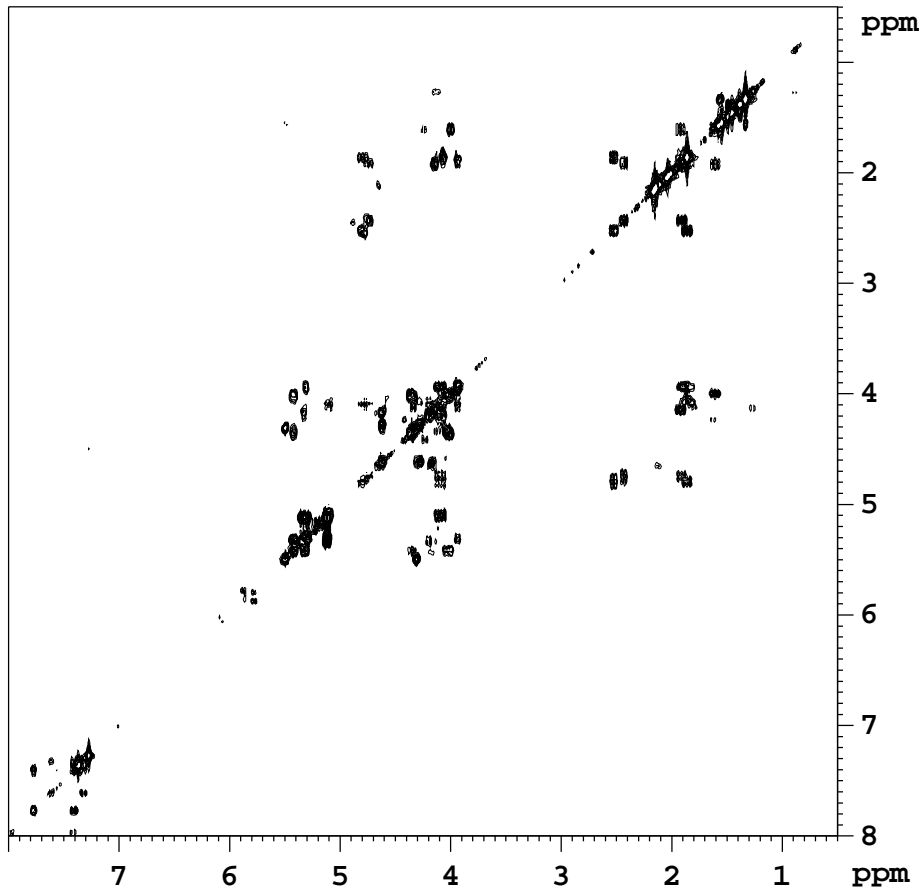
NH₂(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Tyr-Ser-Phe-Pro-Ser-Val-OH

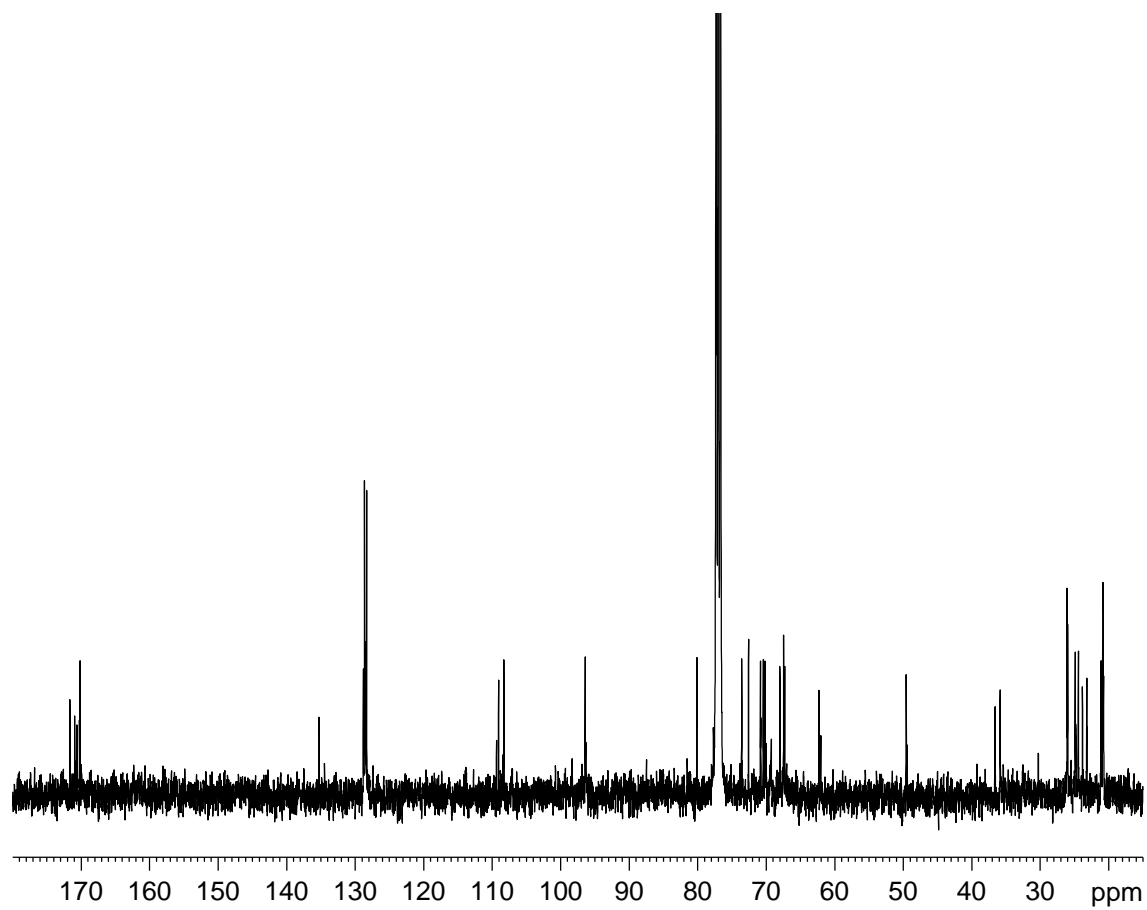
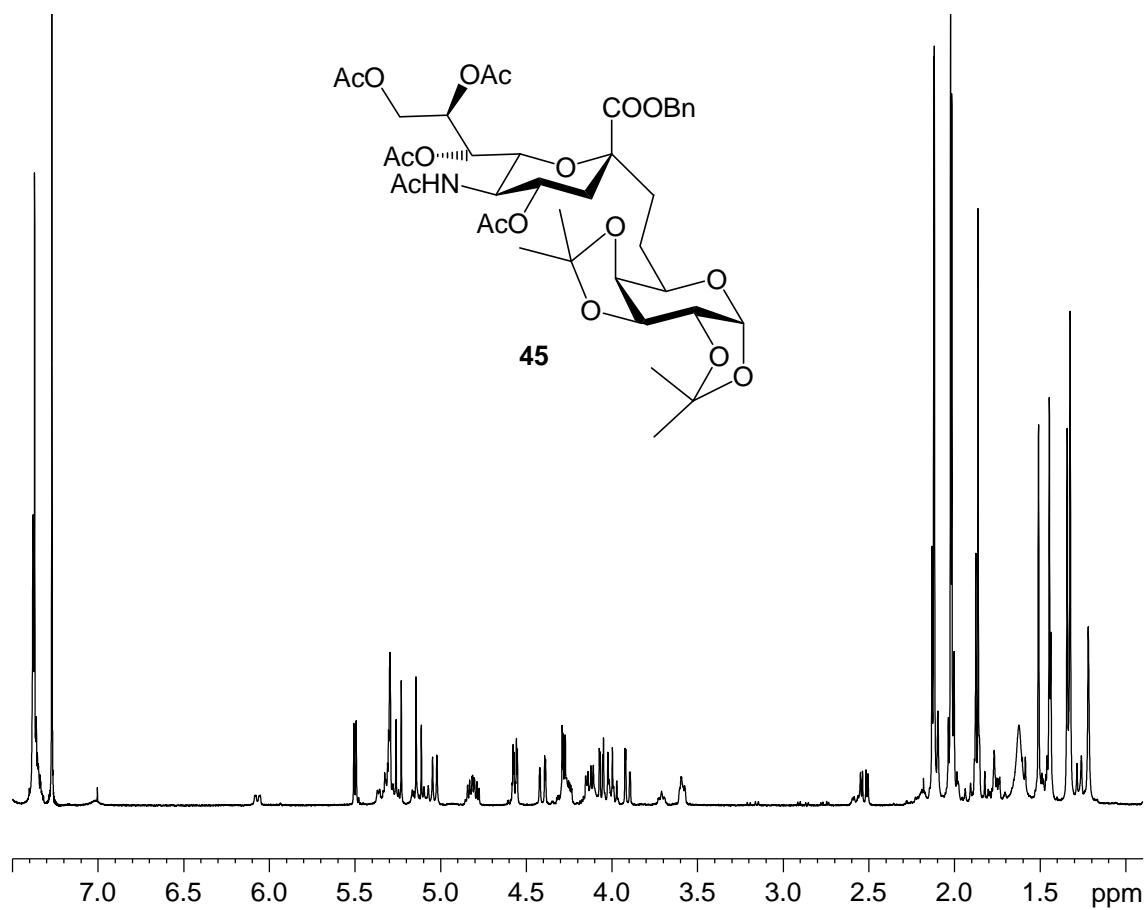
(140) ¹H, ¹³C, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C-HSQC 337

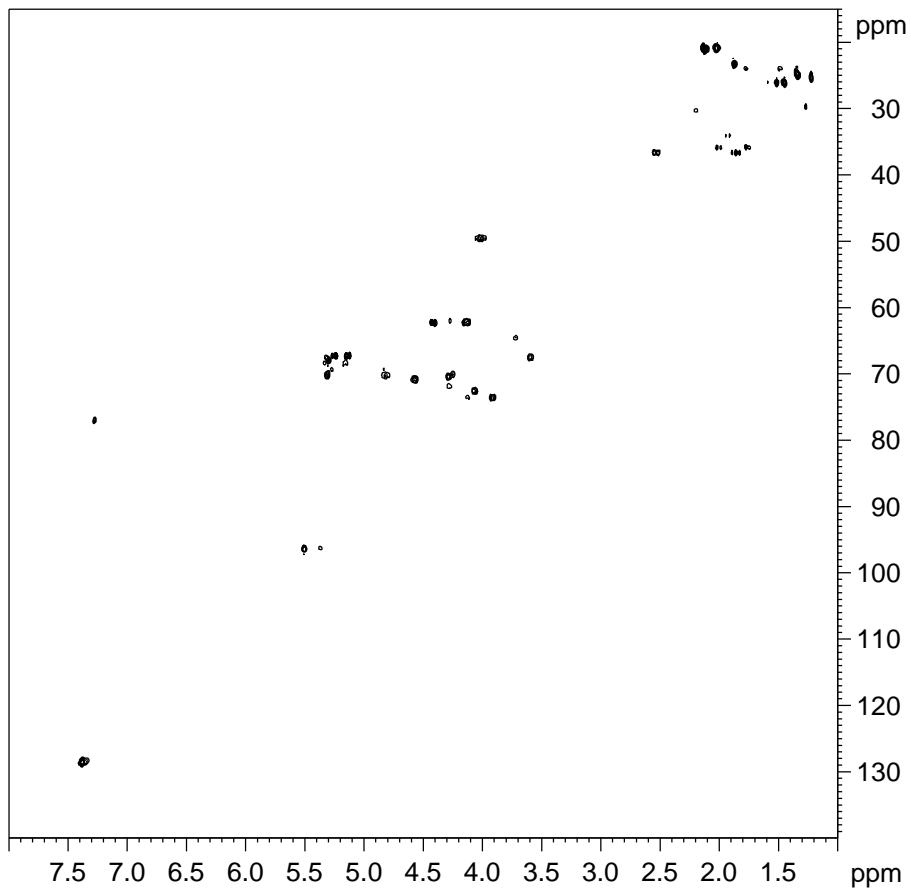
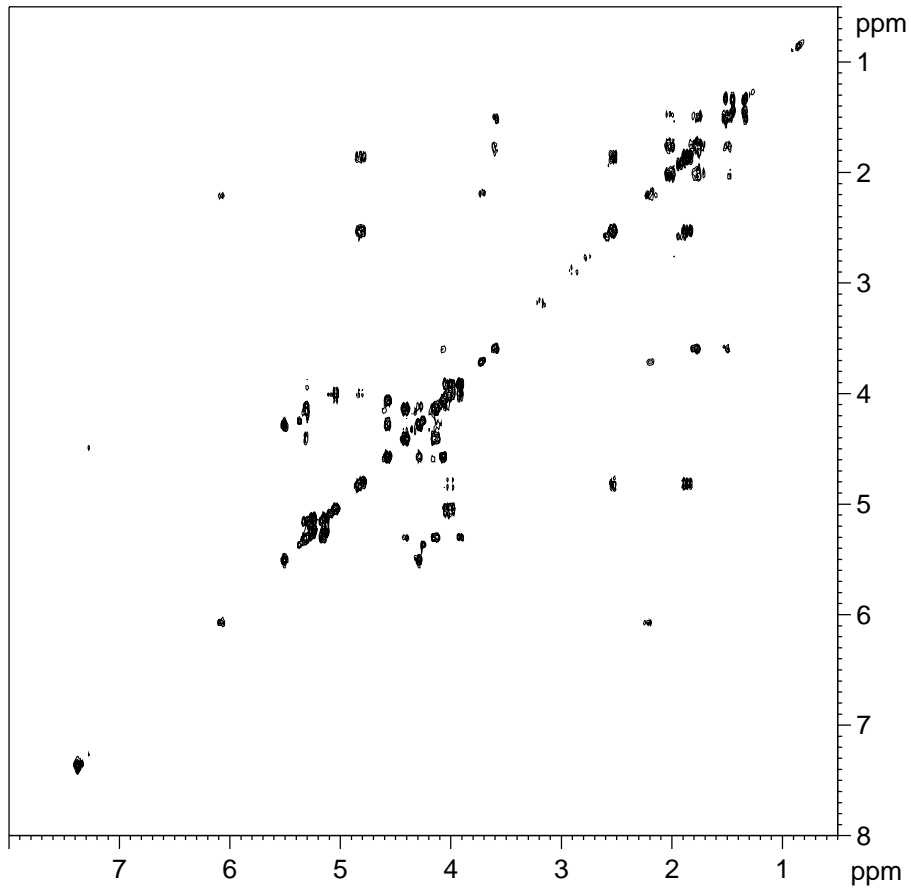
Pam₃Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr((αNeuNAcCOOH-(2→6)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Ile-Tyr-Ser-Phe-Pro-Ser-Val-OH

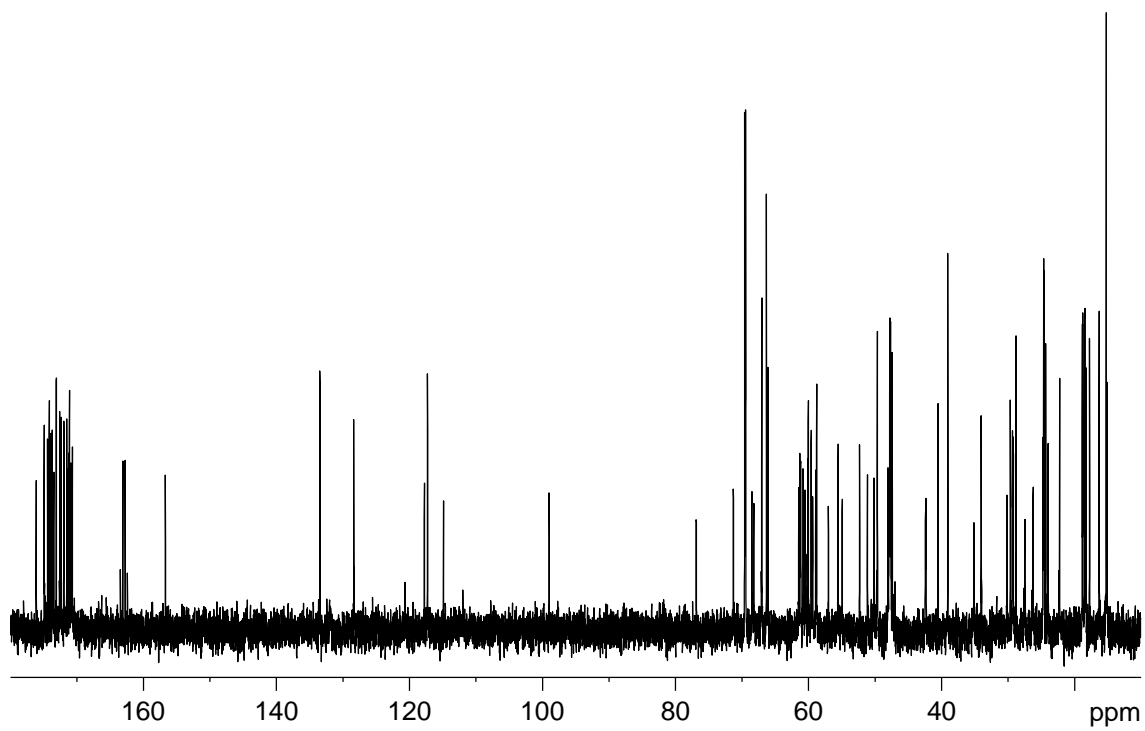
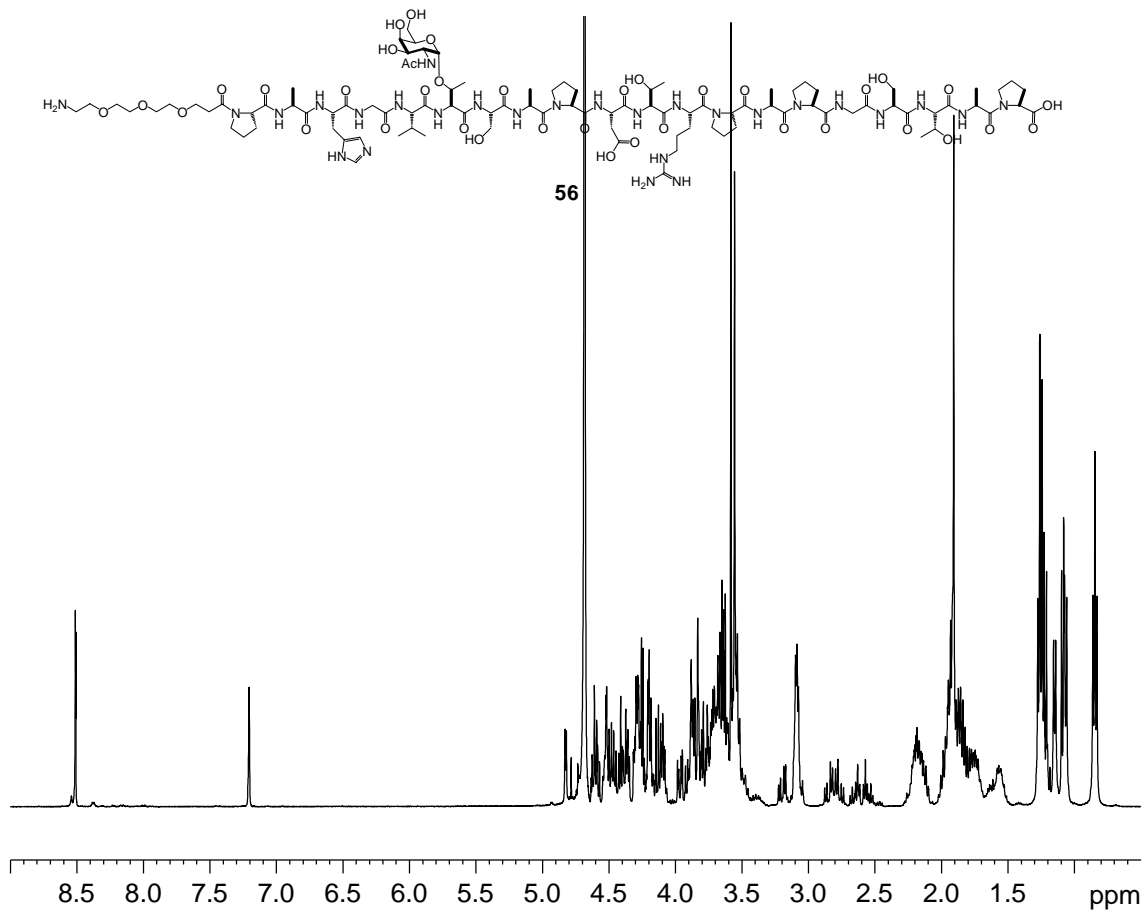
(141) ¹H, MALDI-TOF, ESI-MS 339

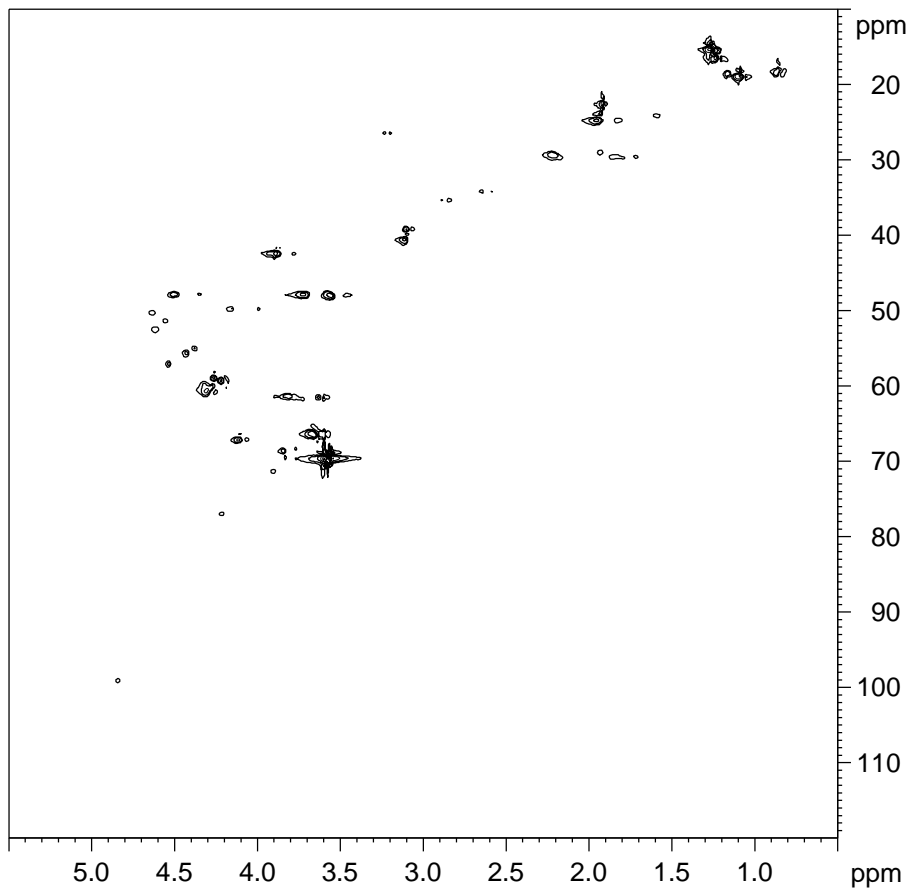
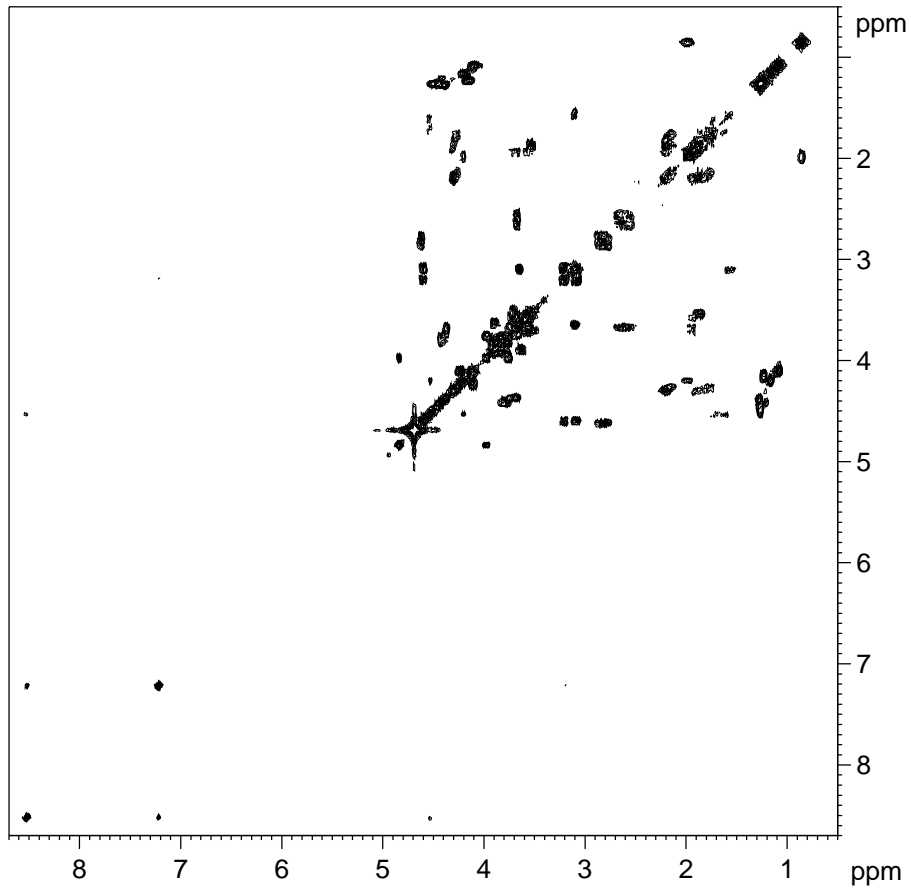


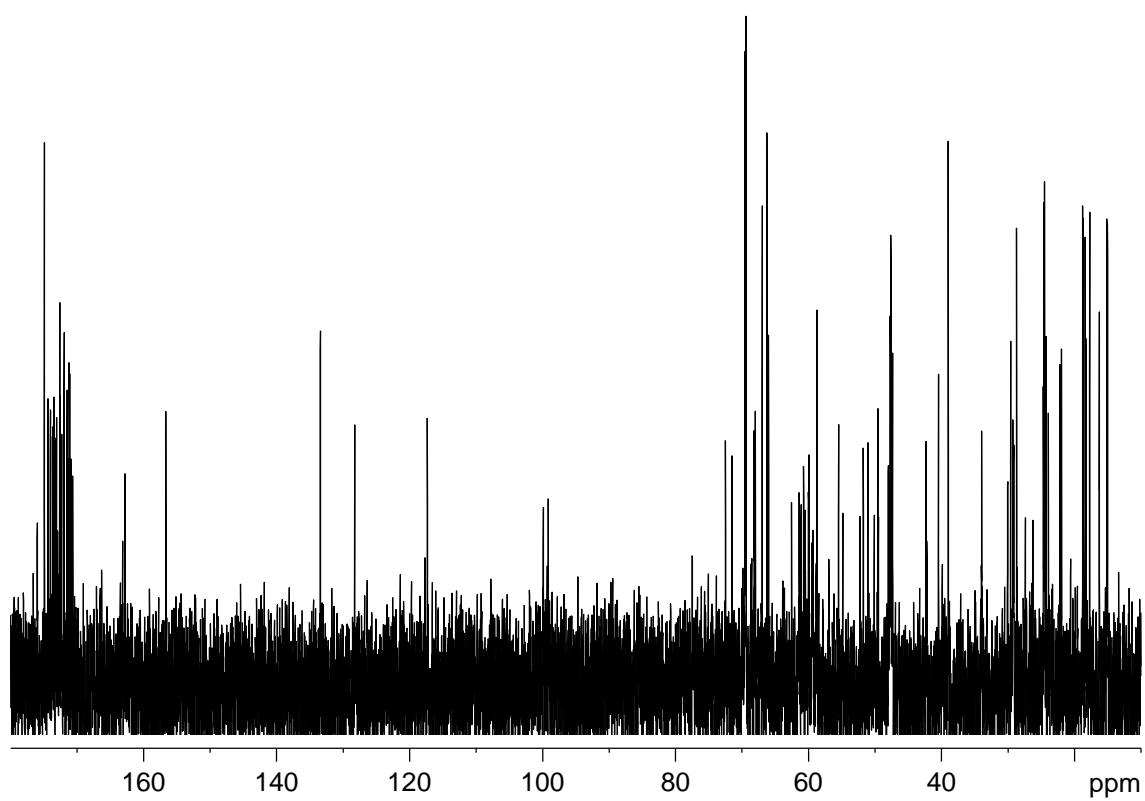
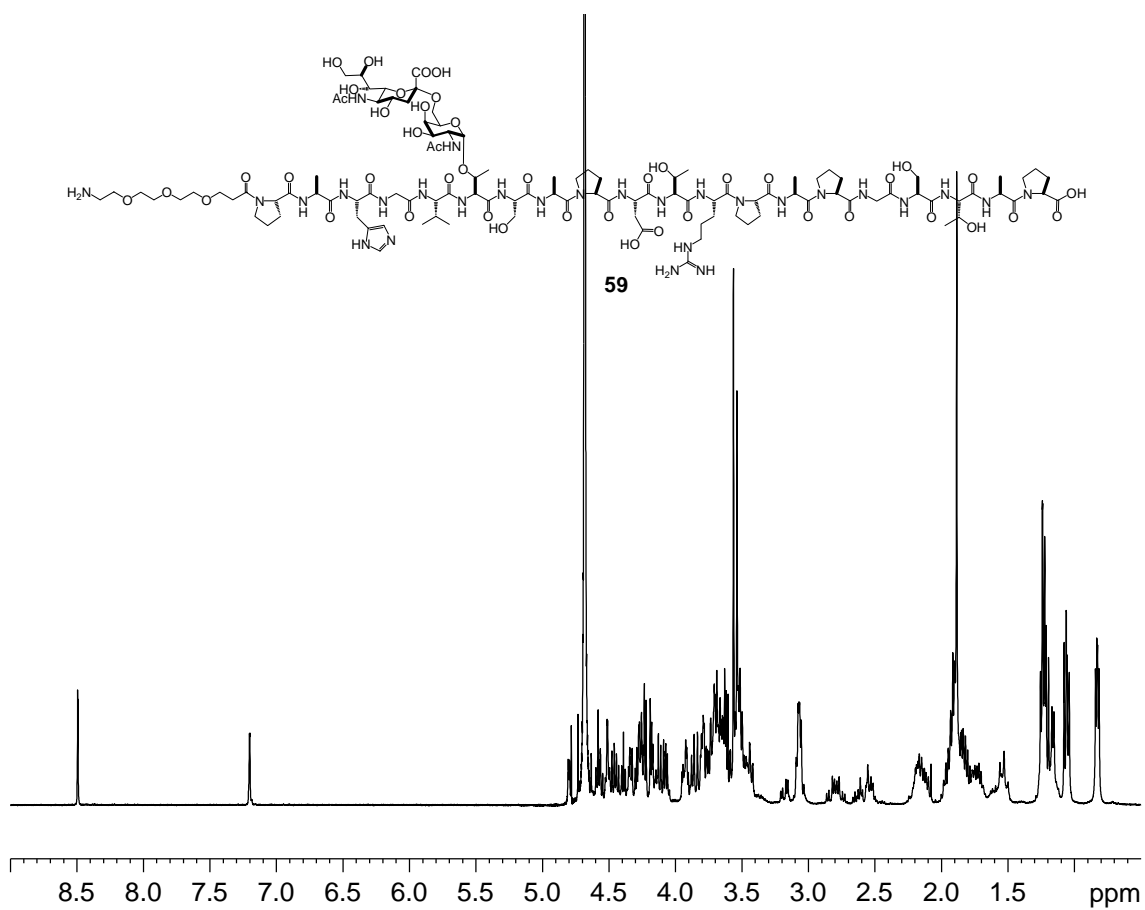


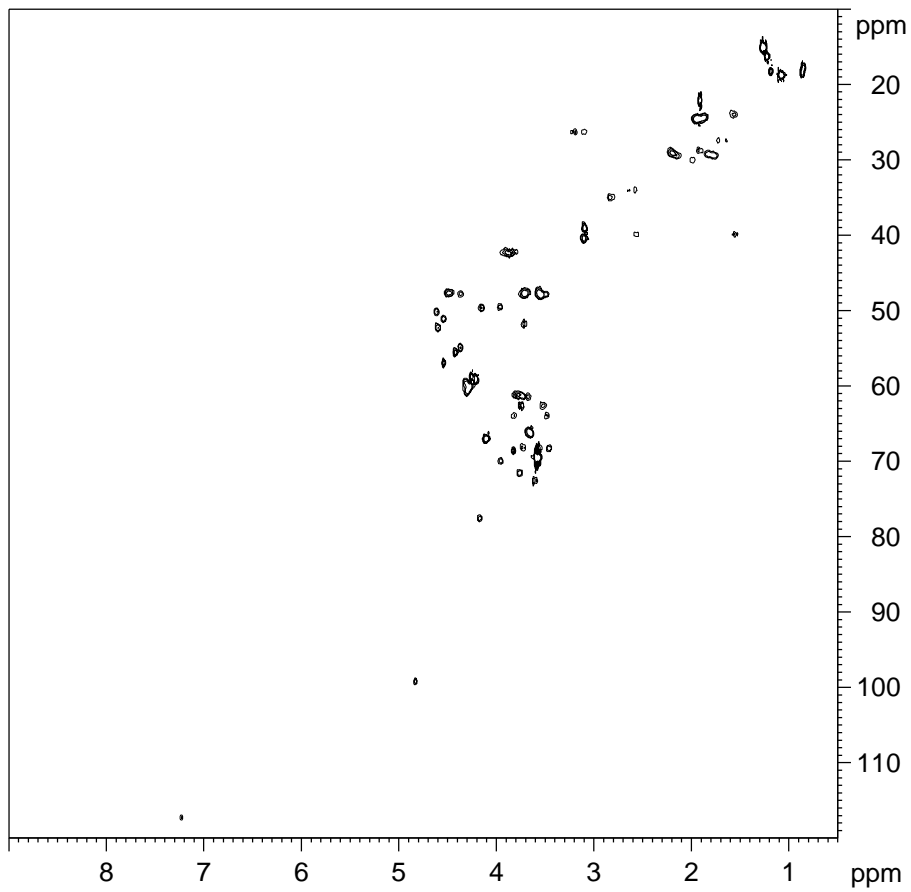
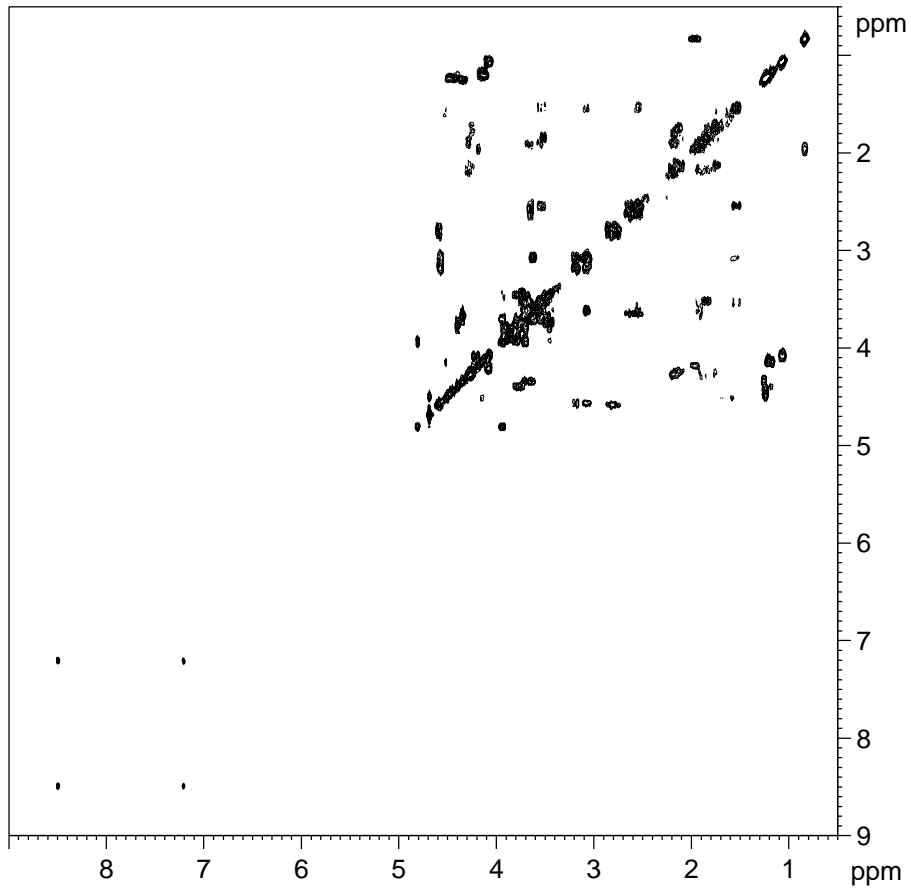


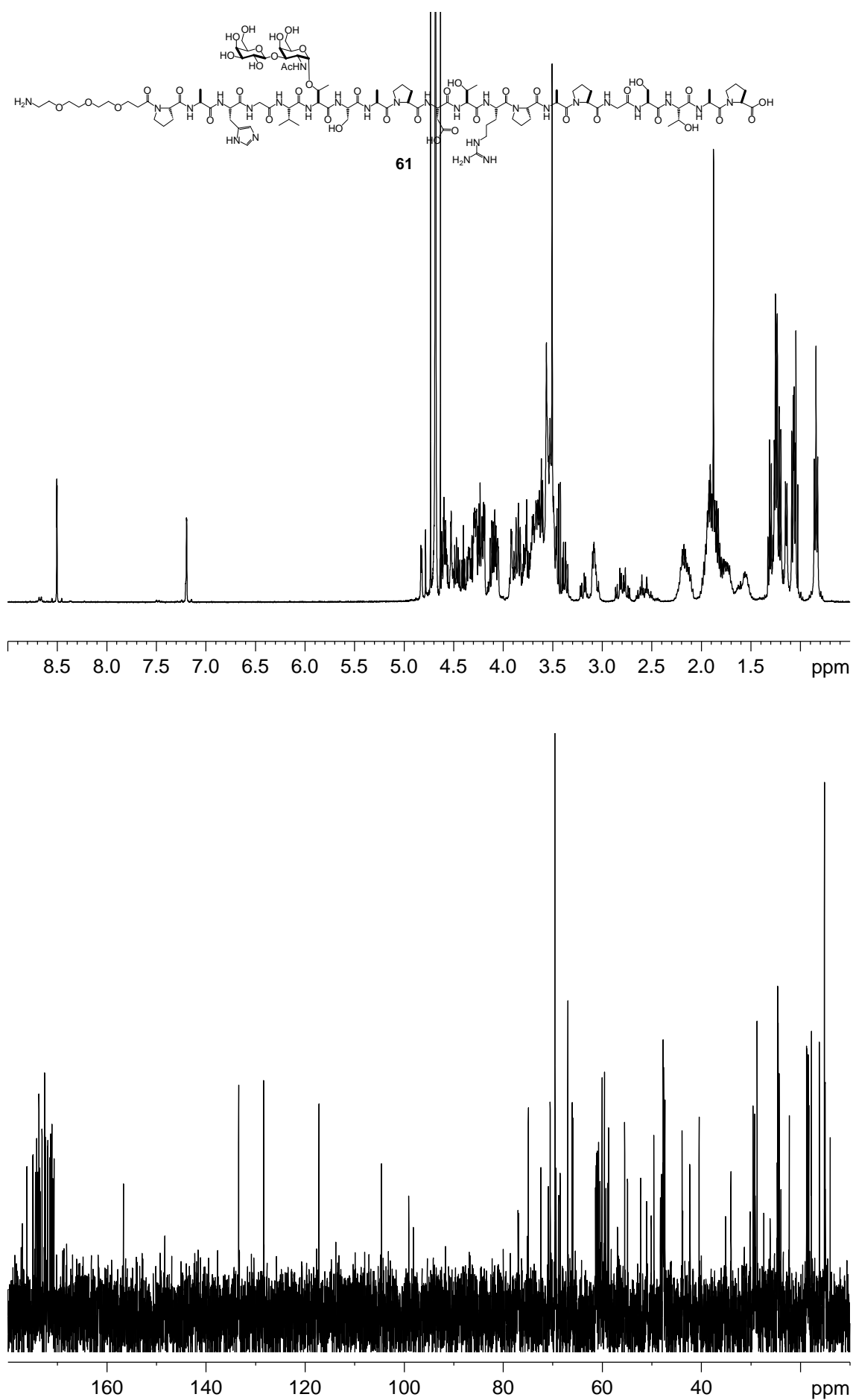


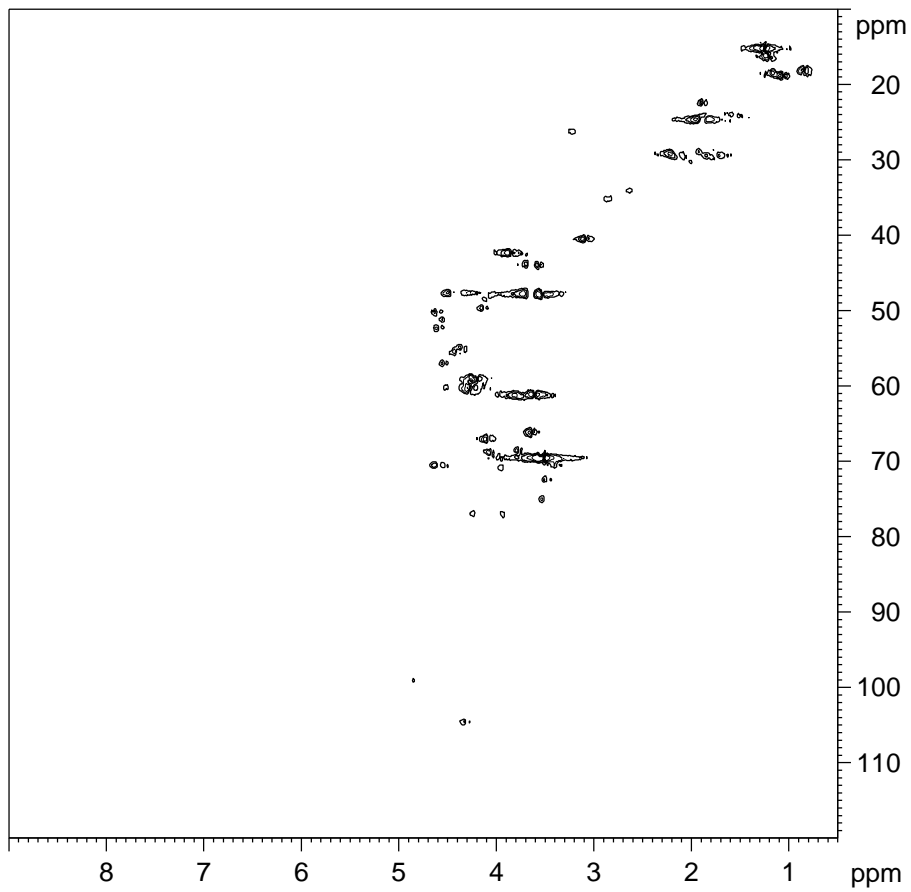
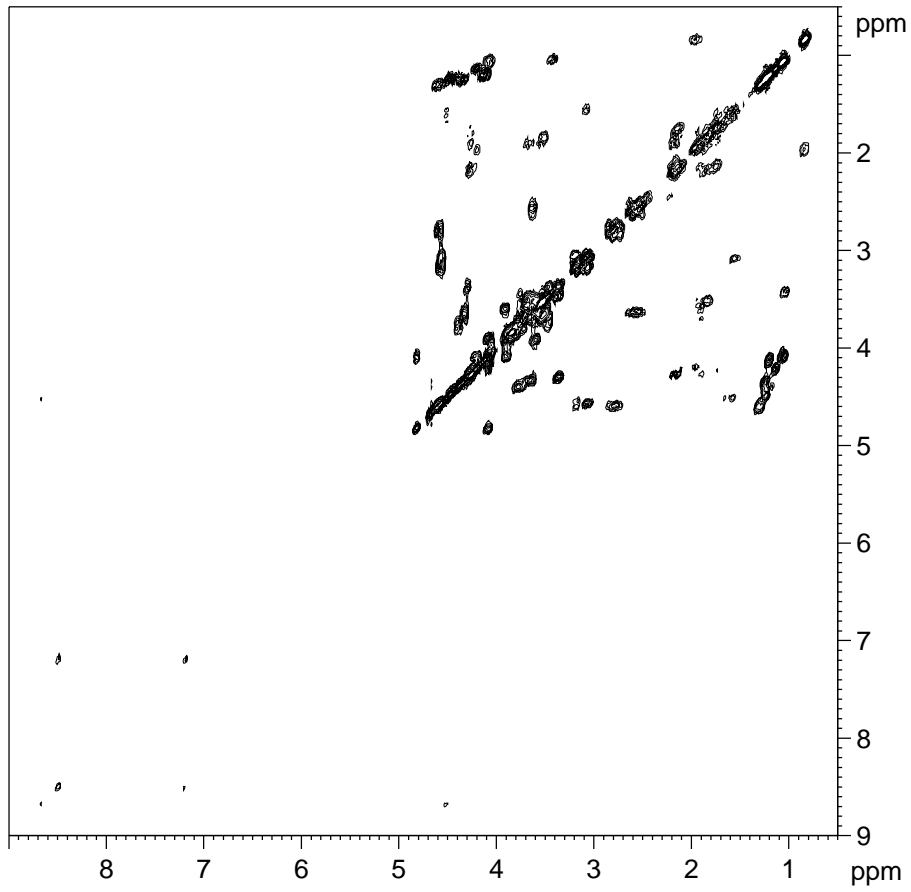


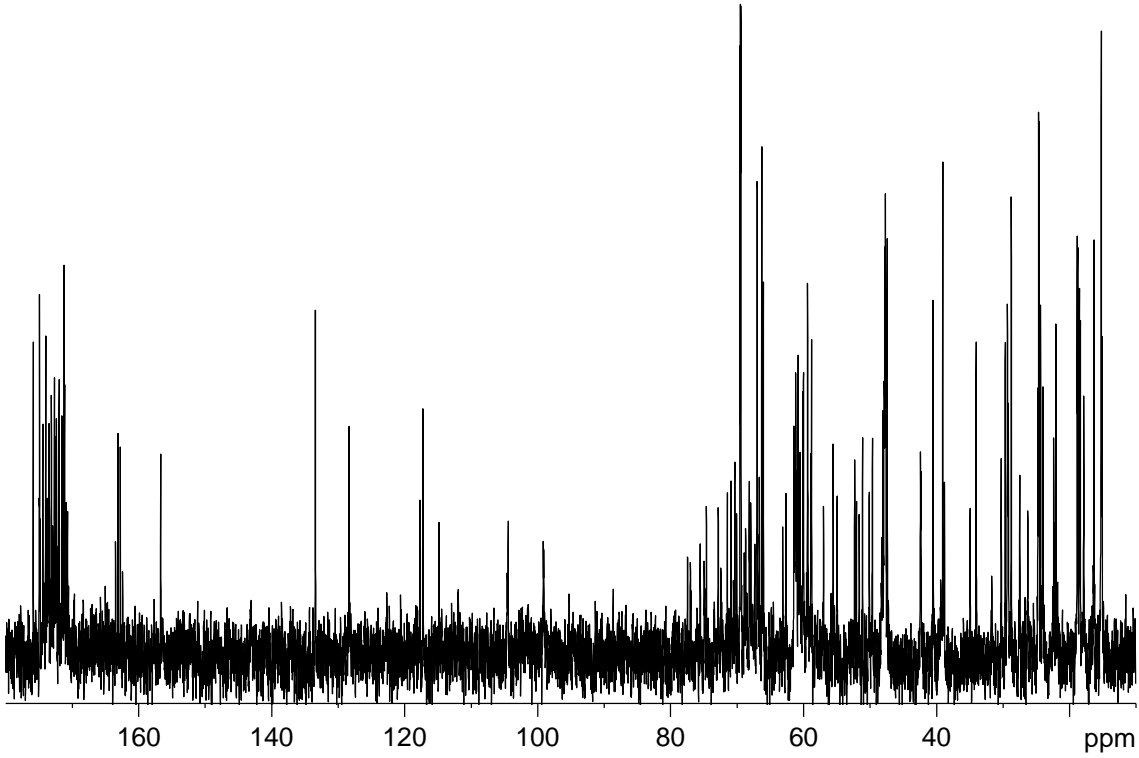
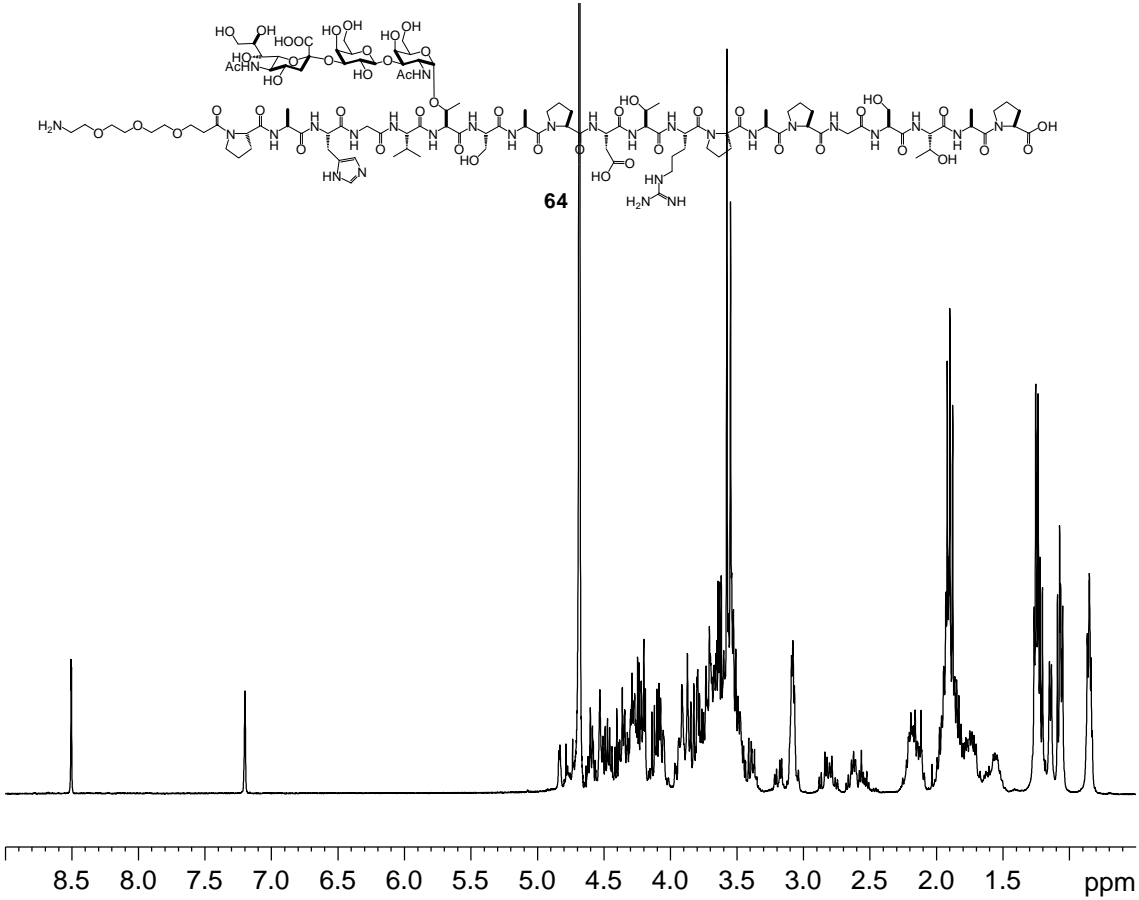


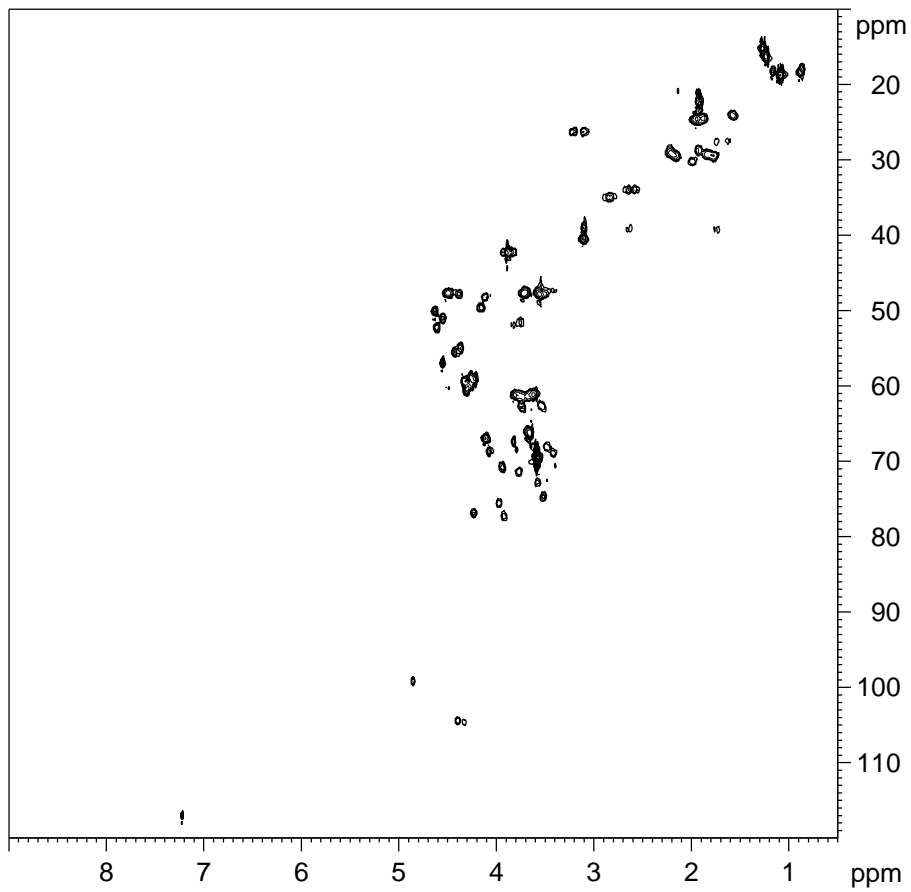
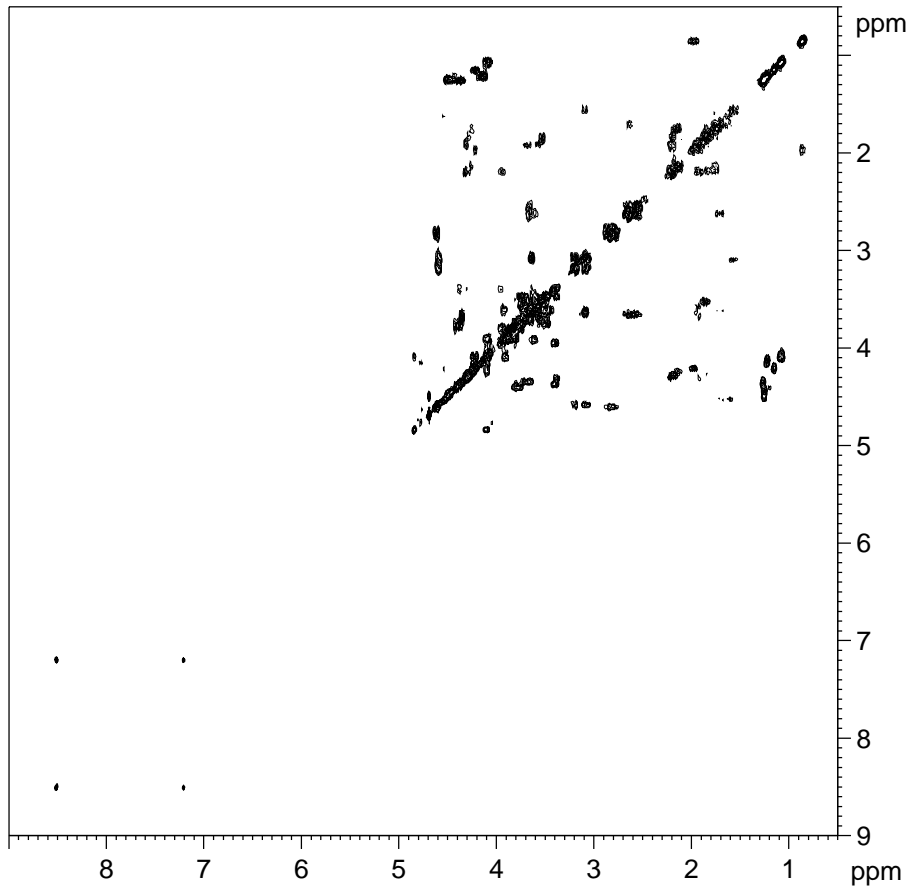


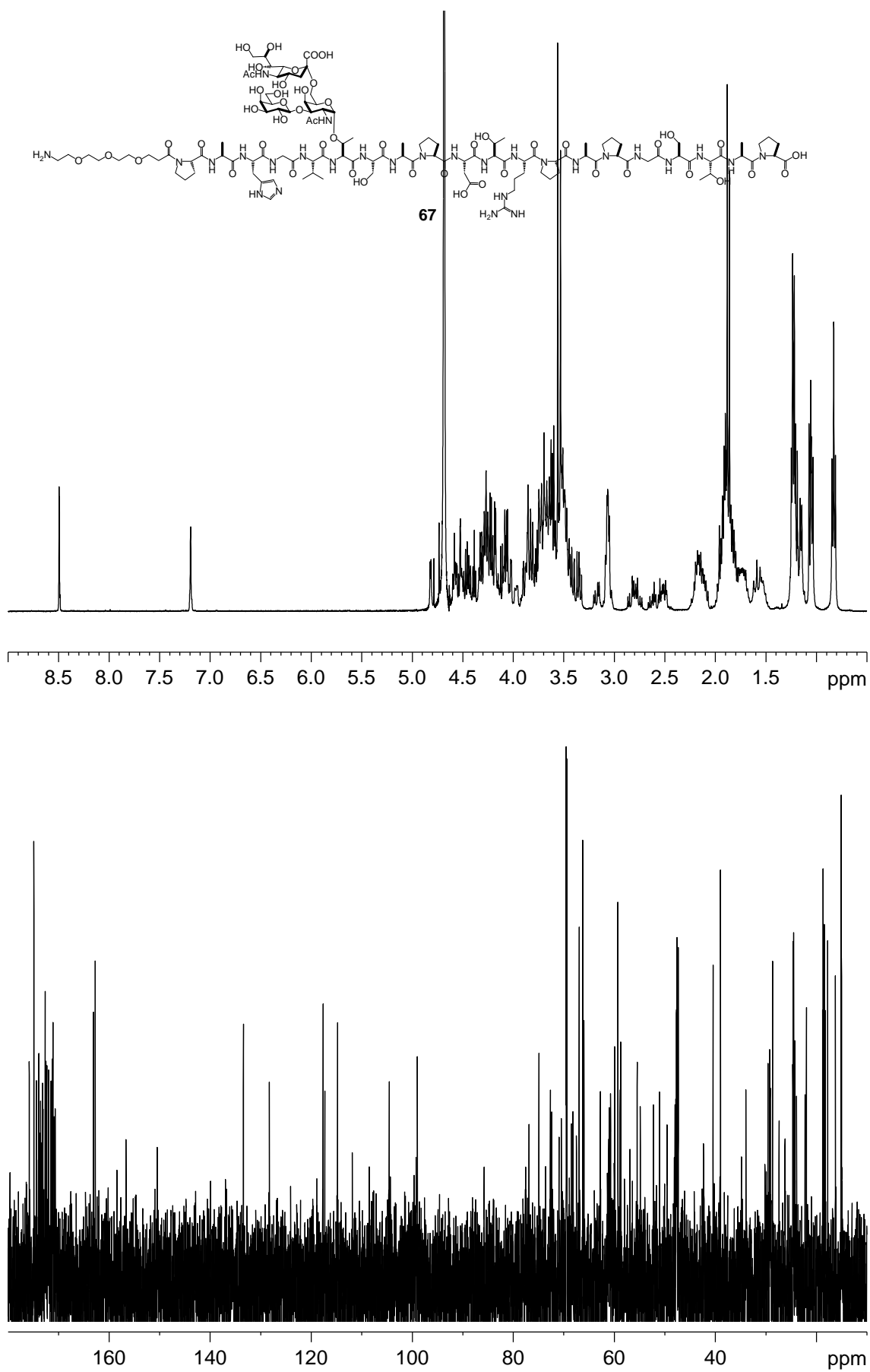


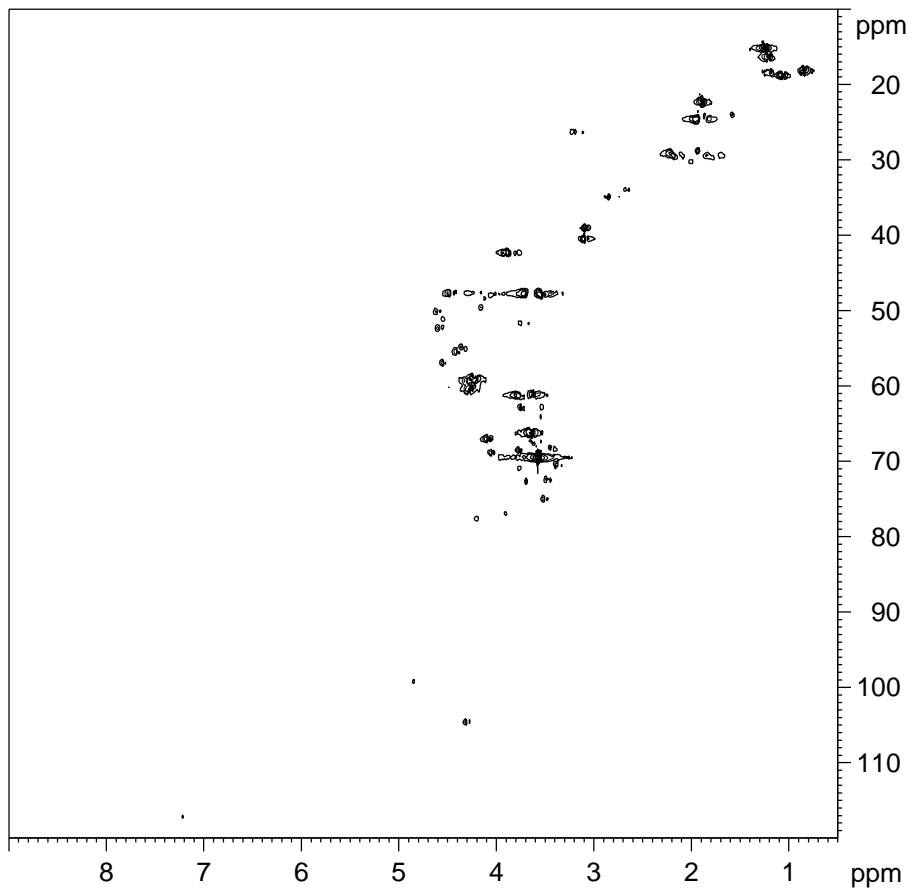
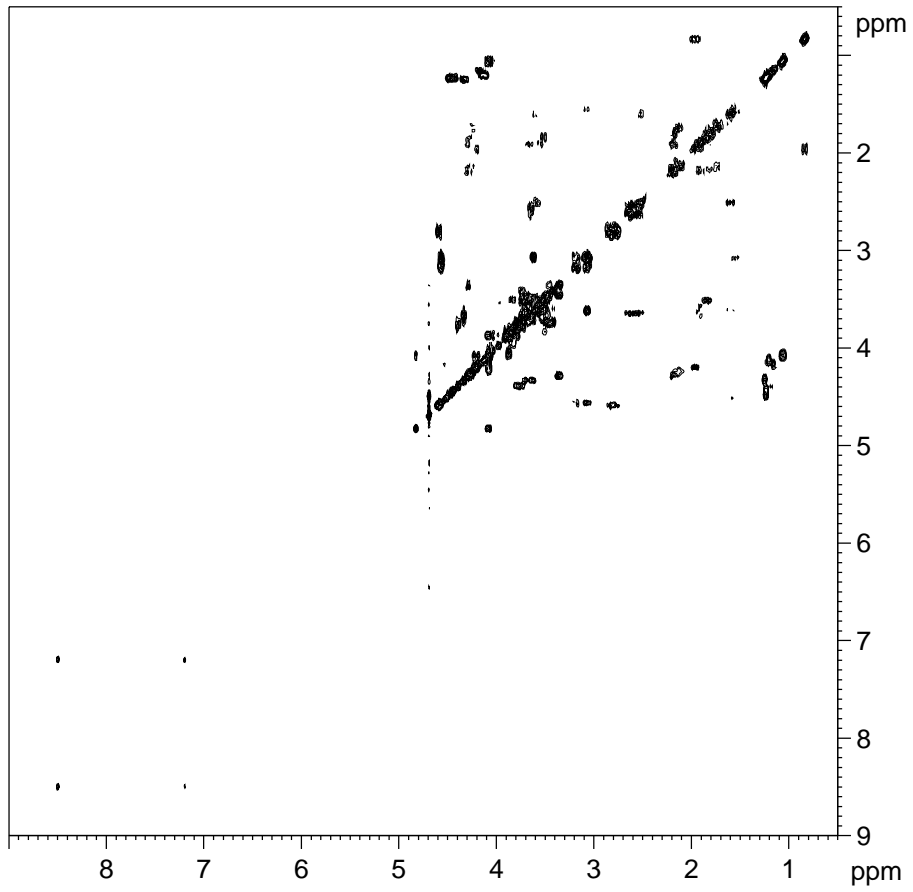


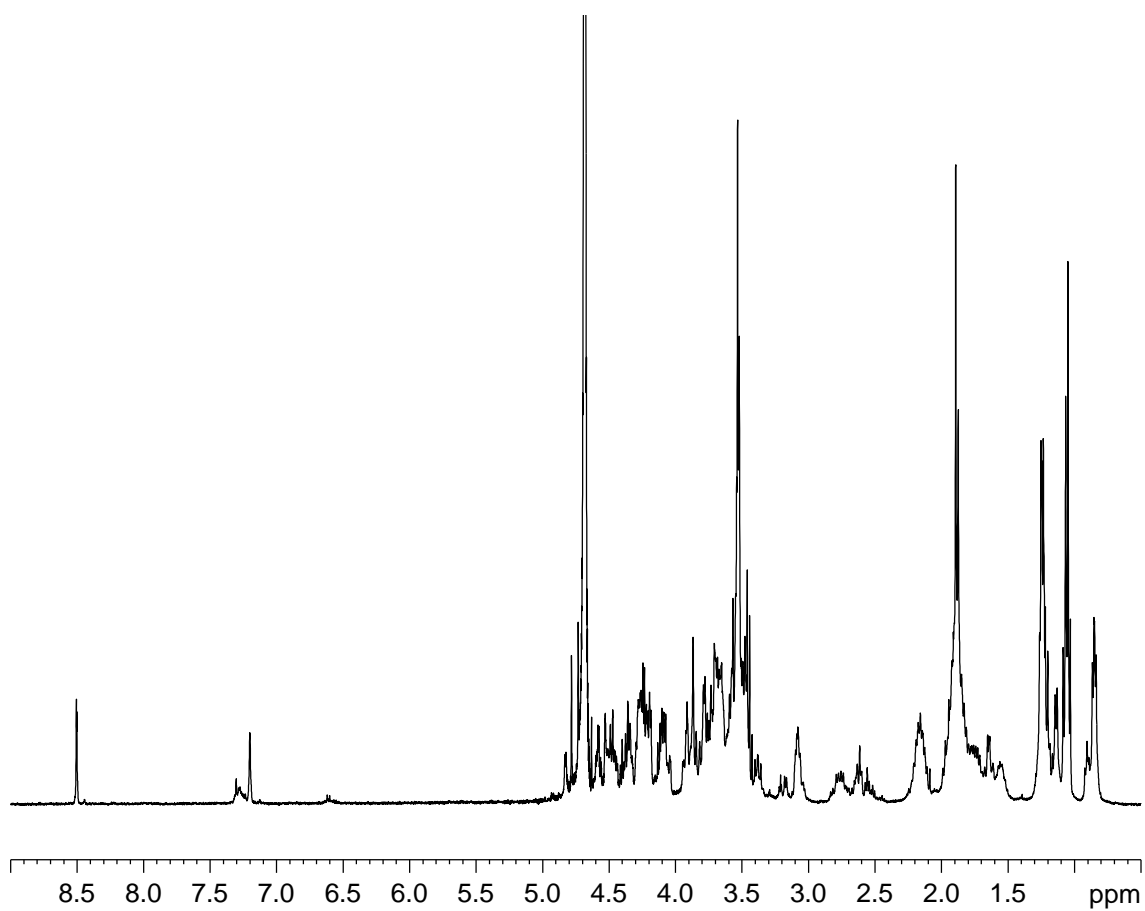
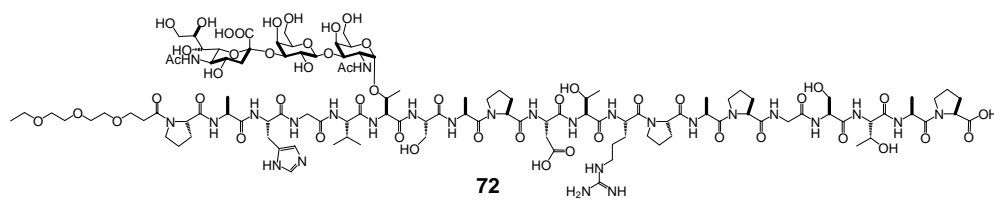


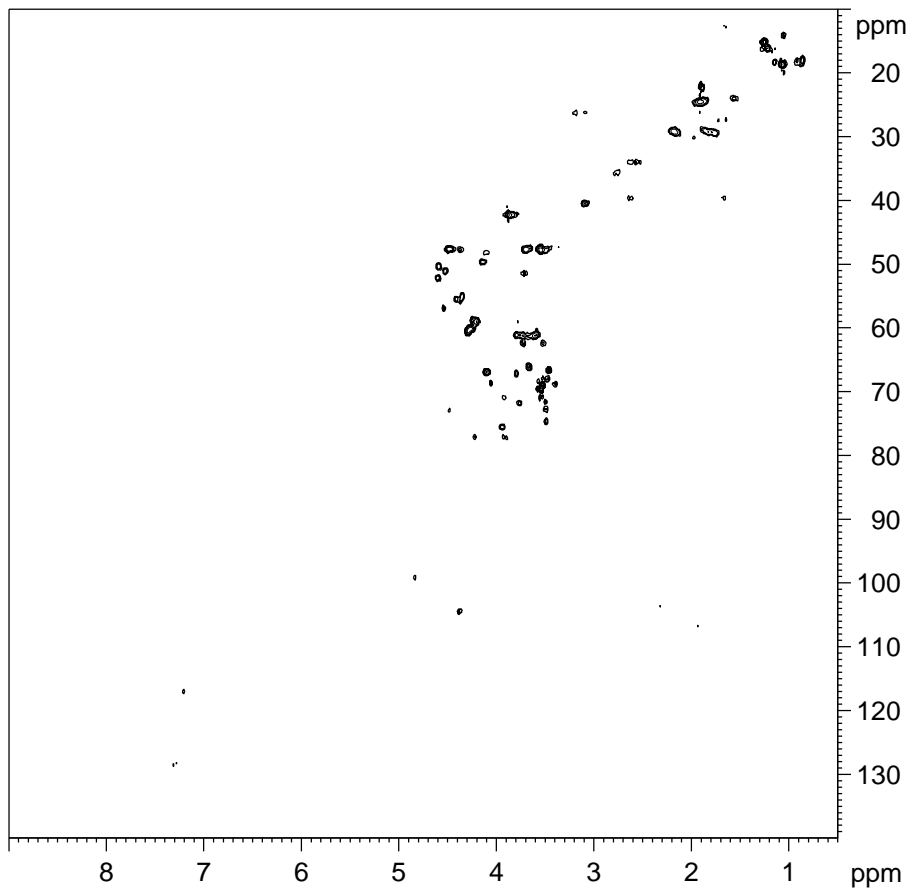
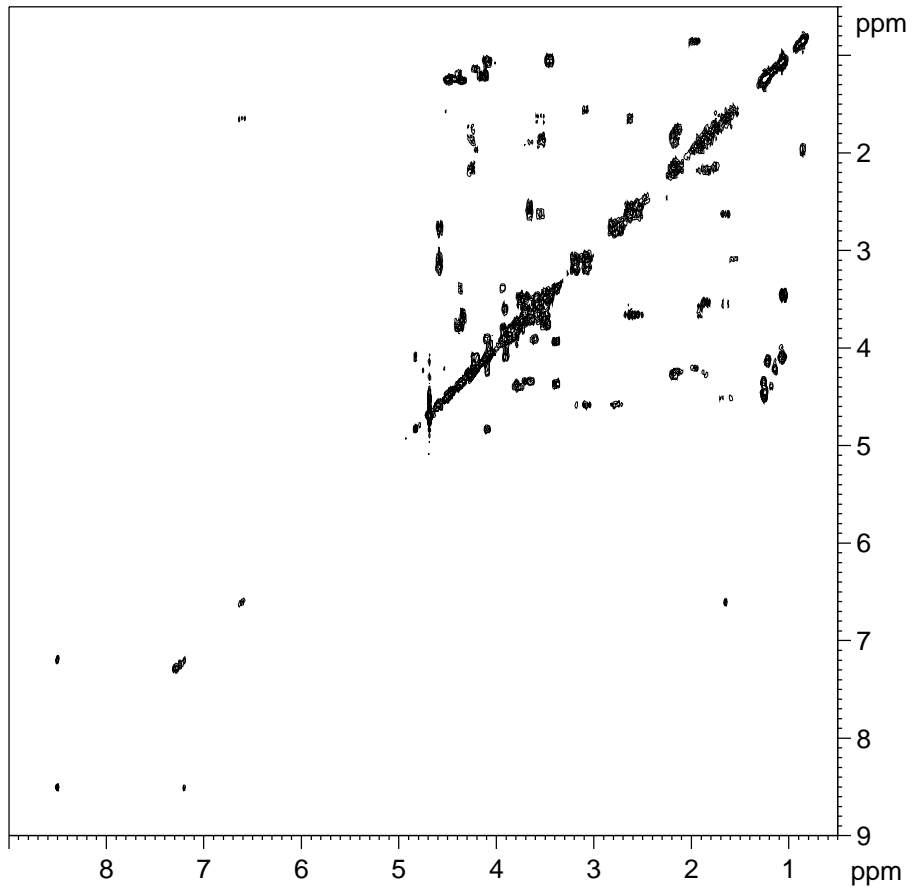


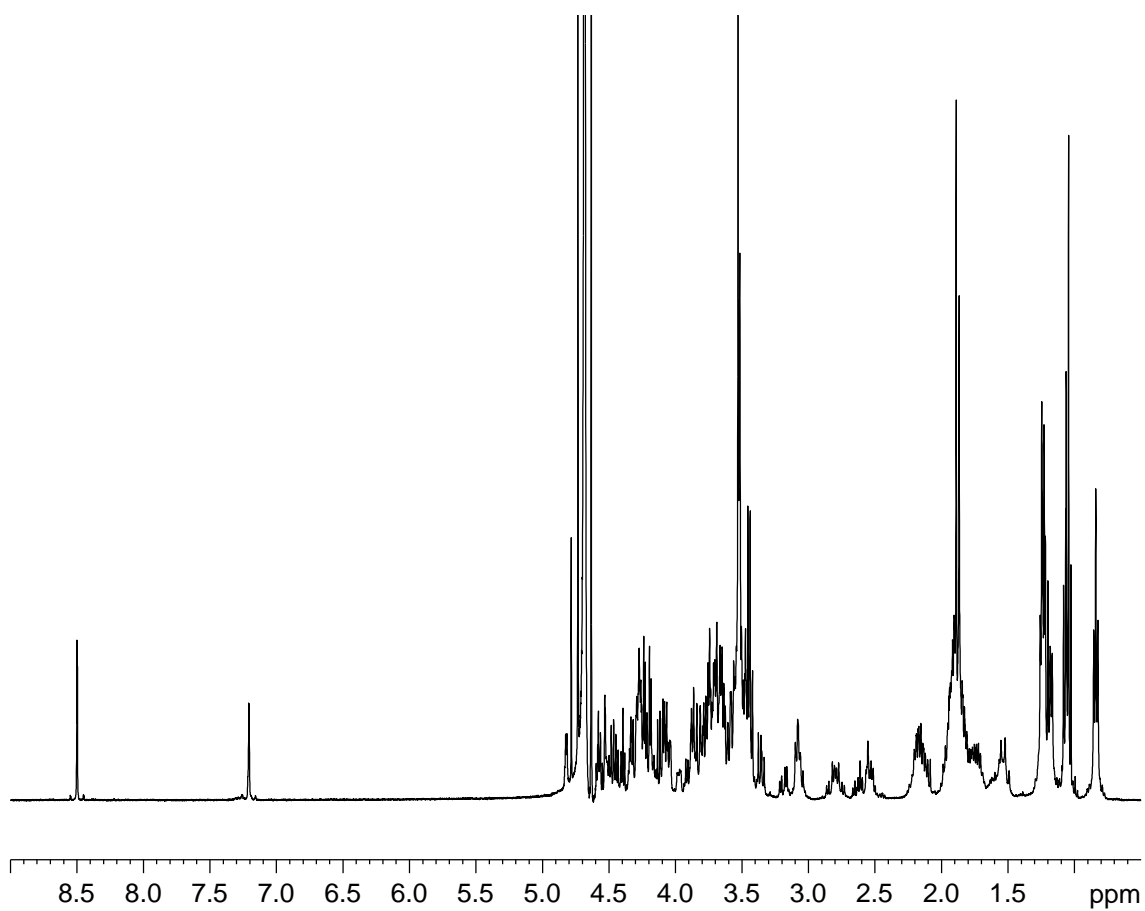
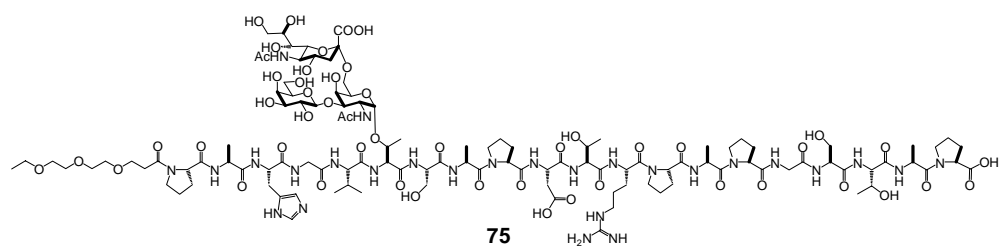


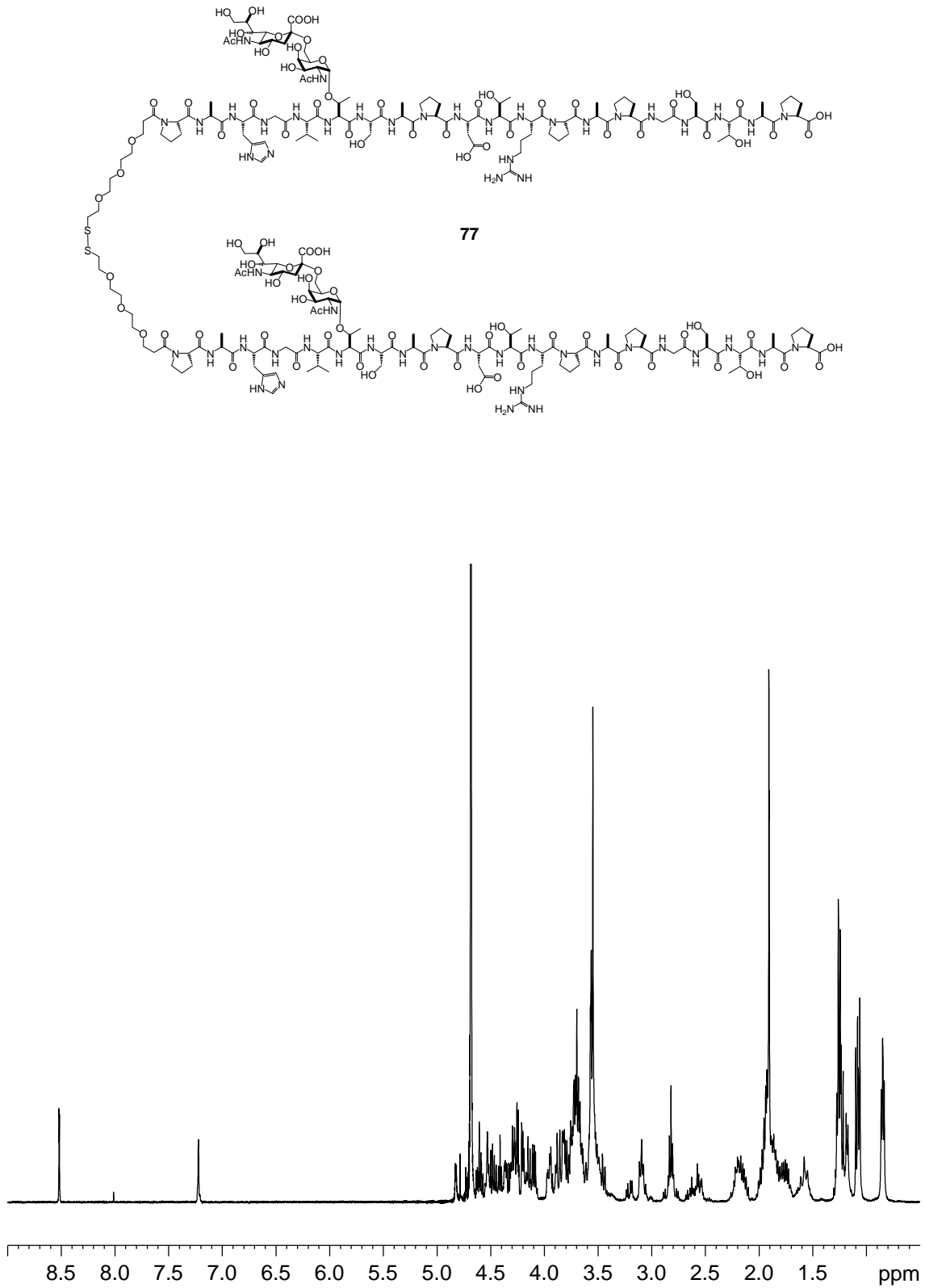


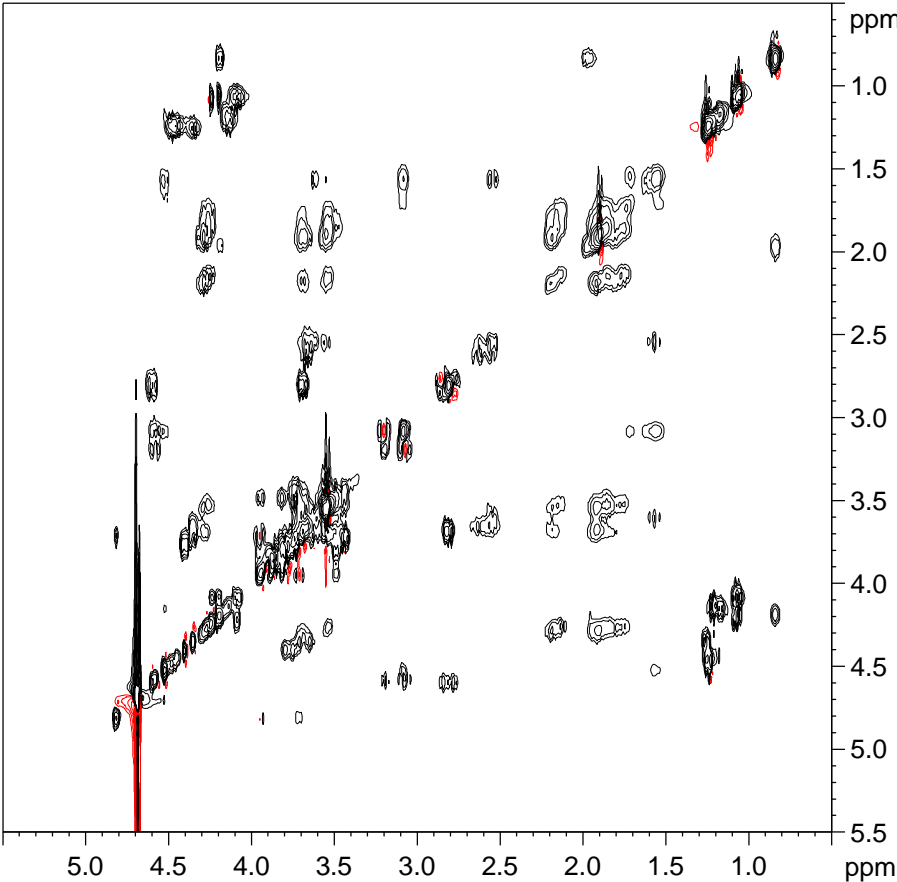
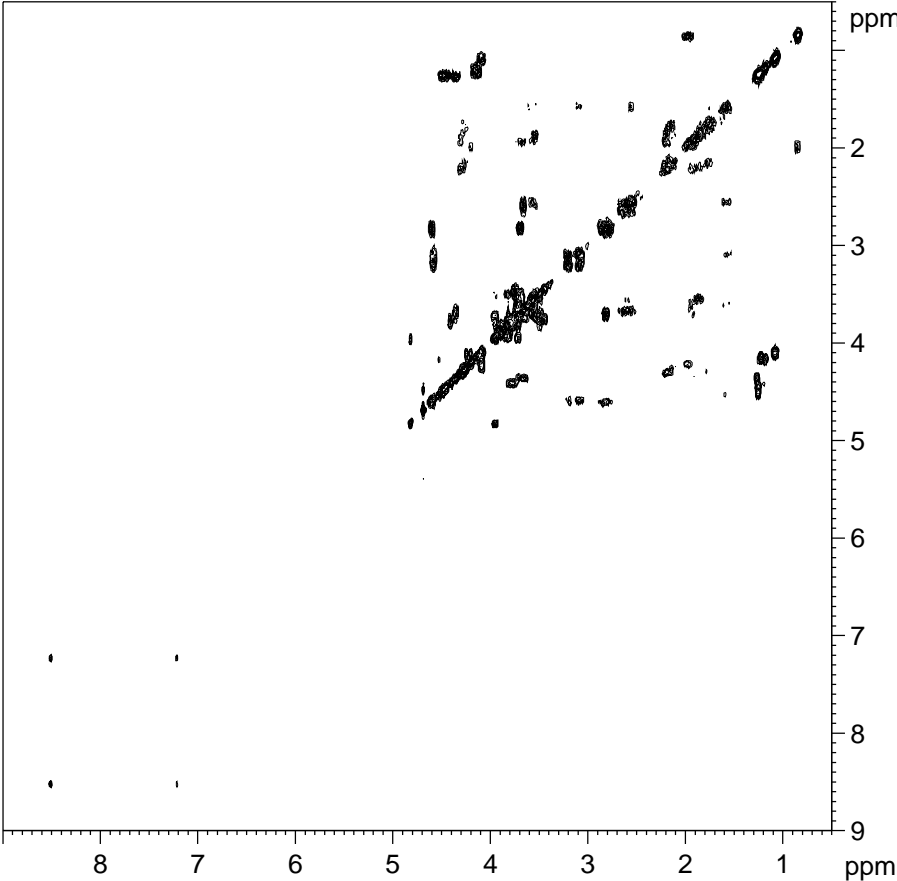


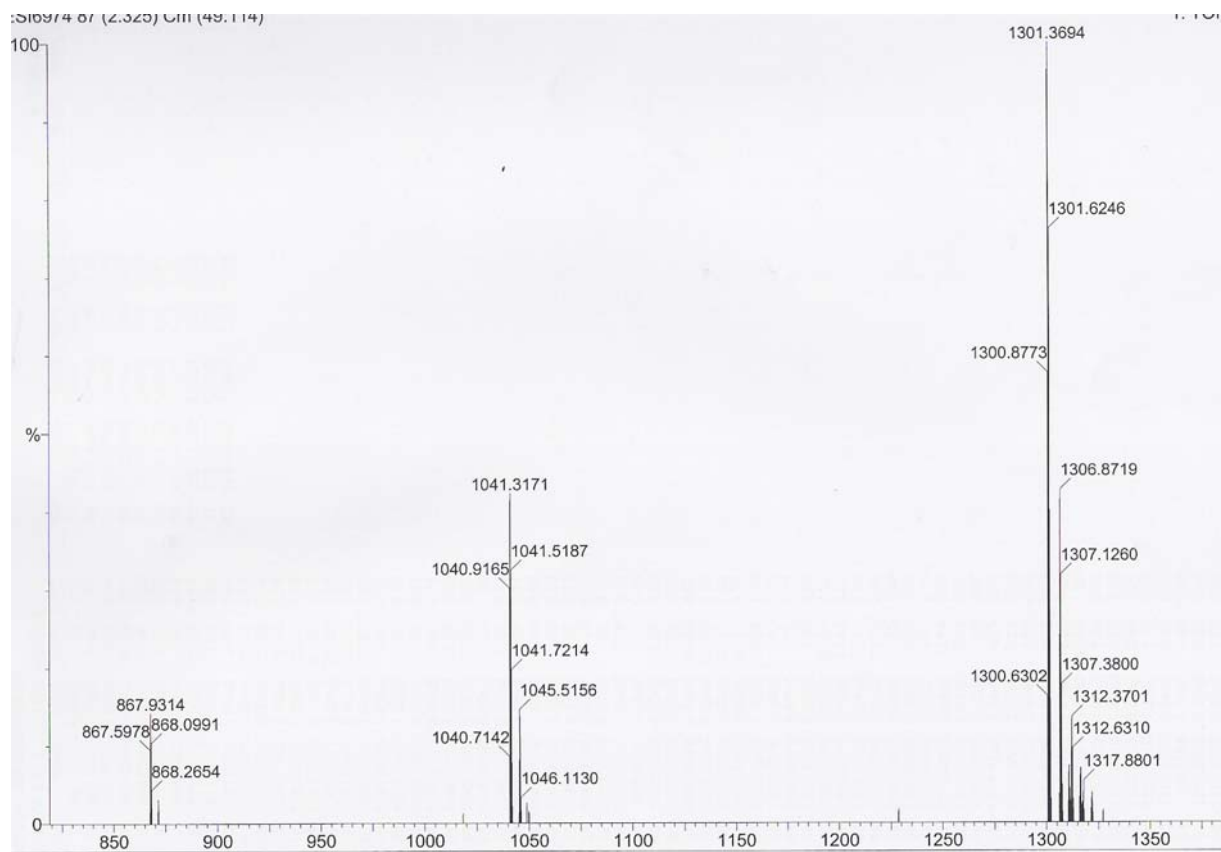
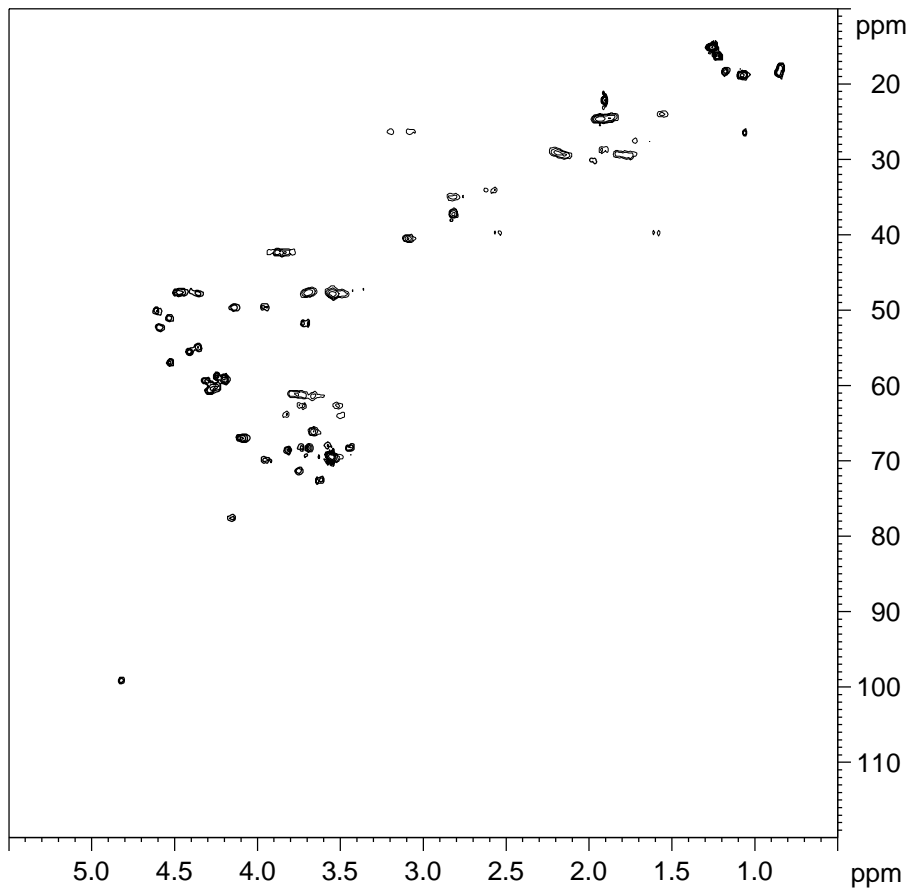


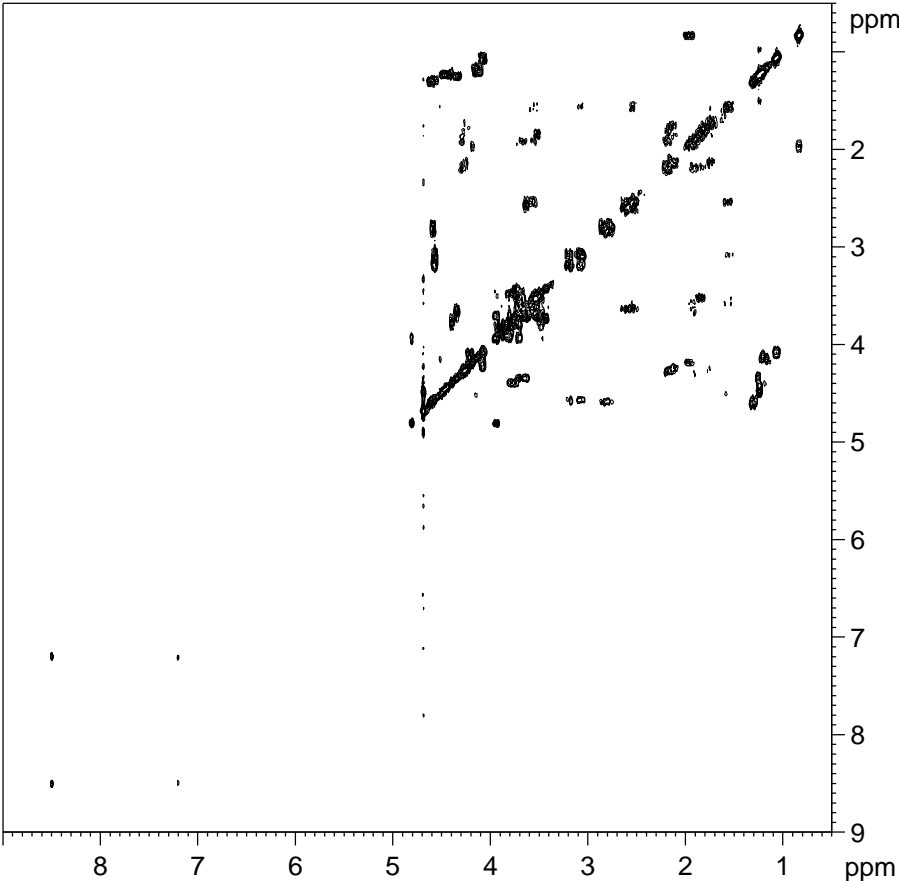
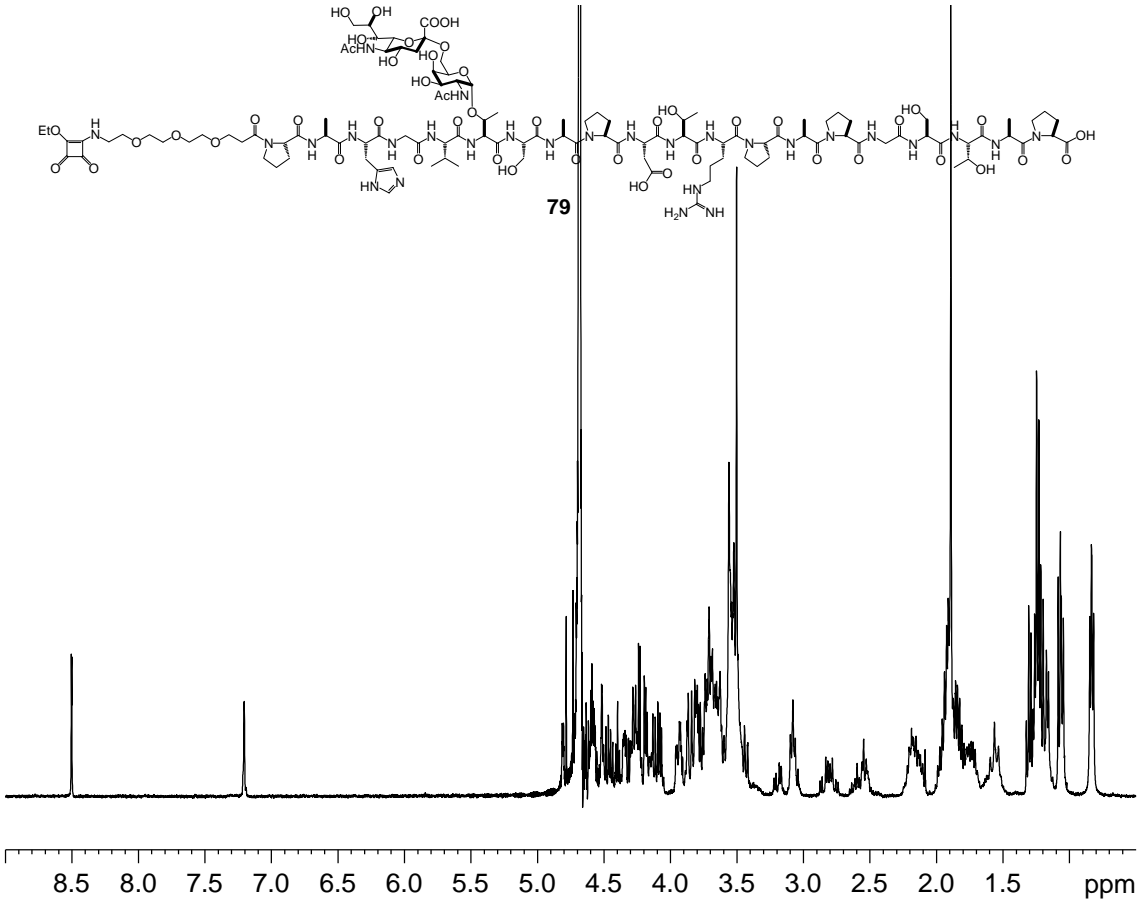


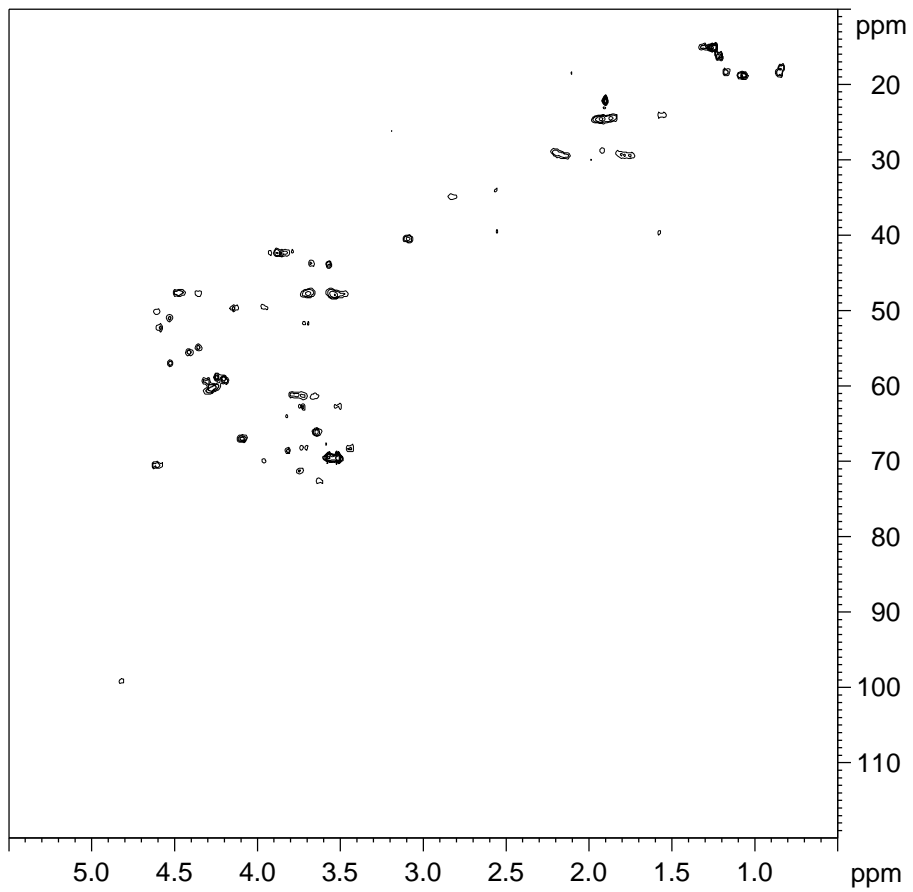
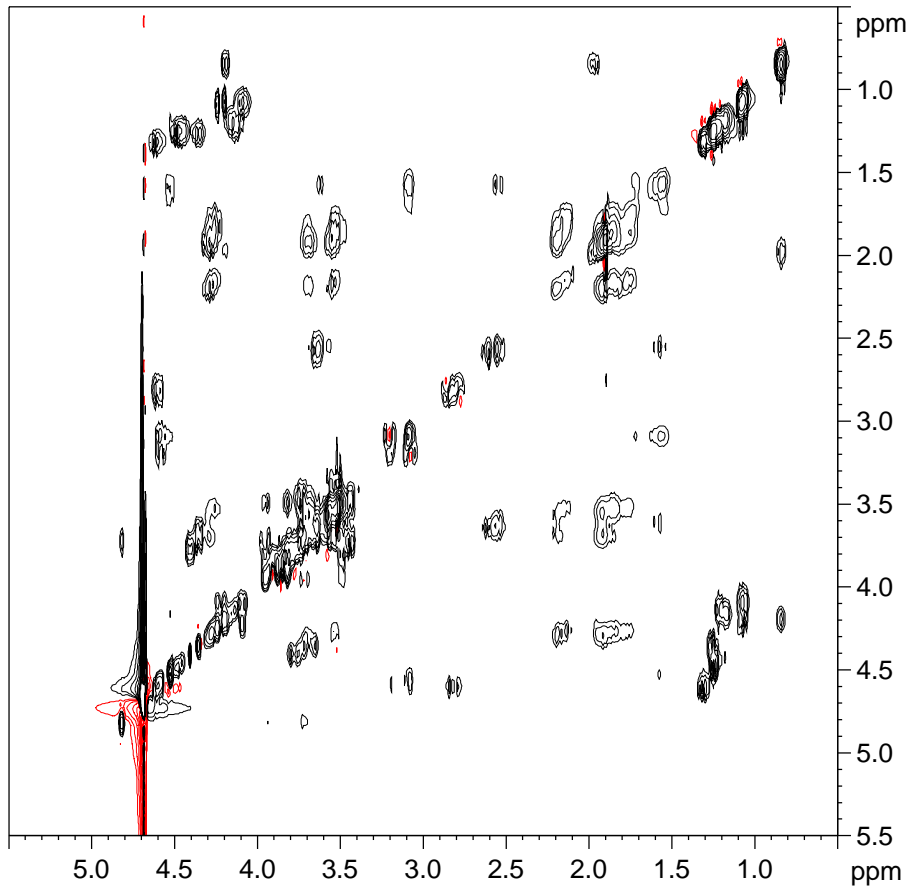


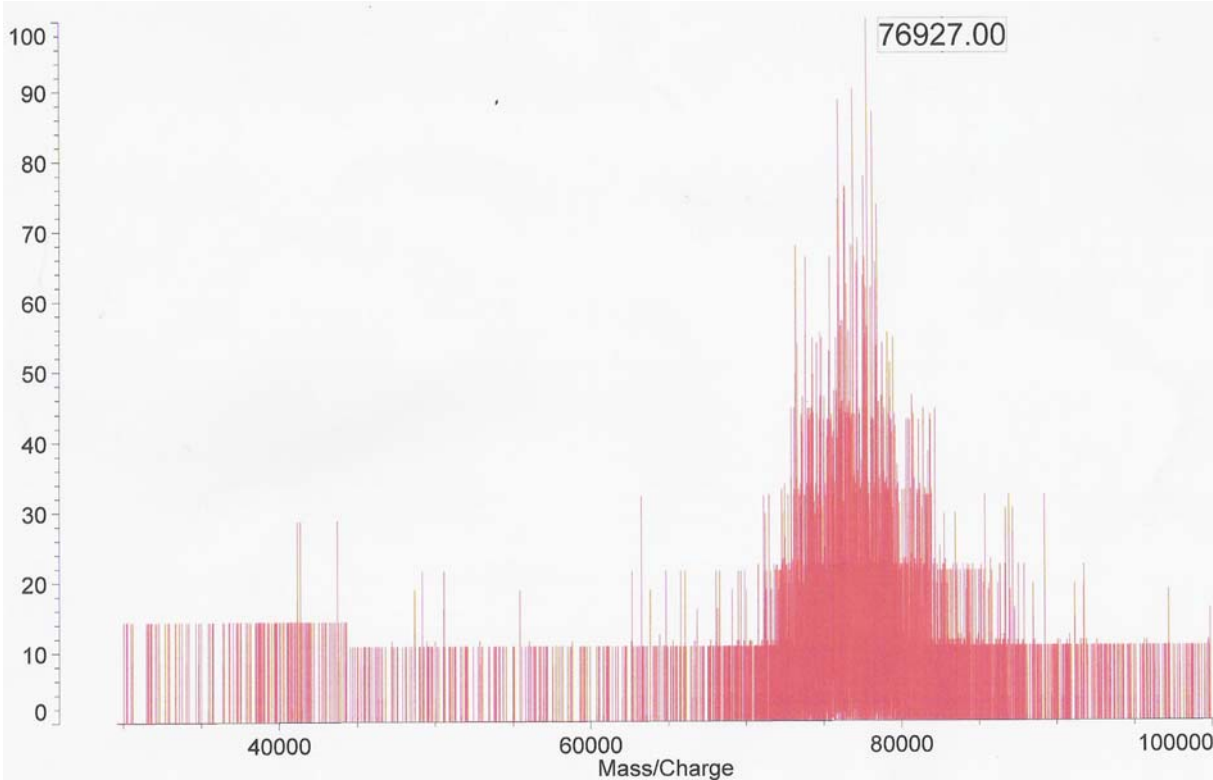
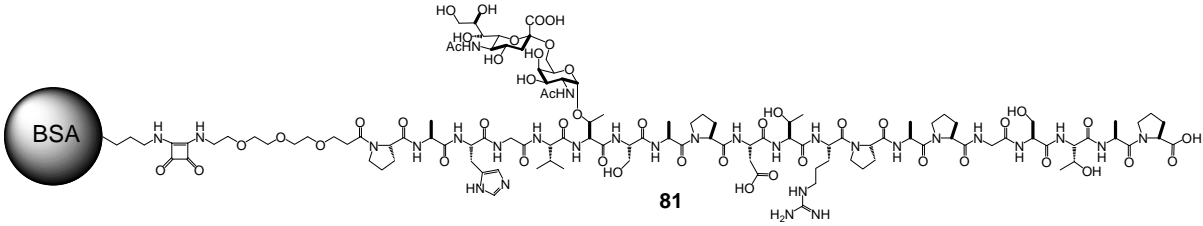


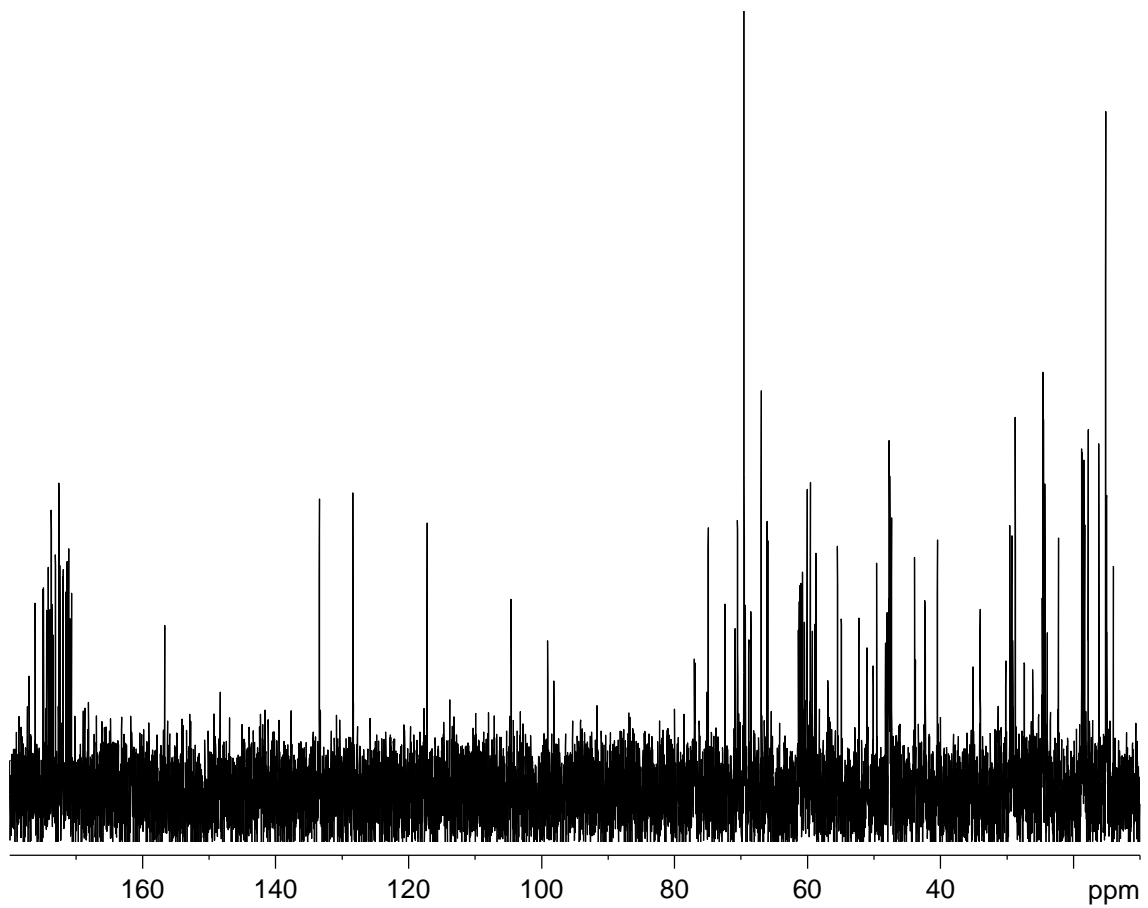
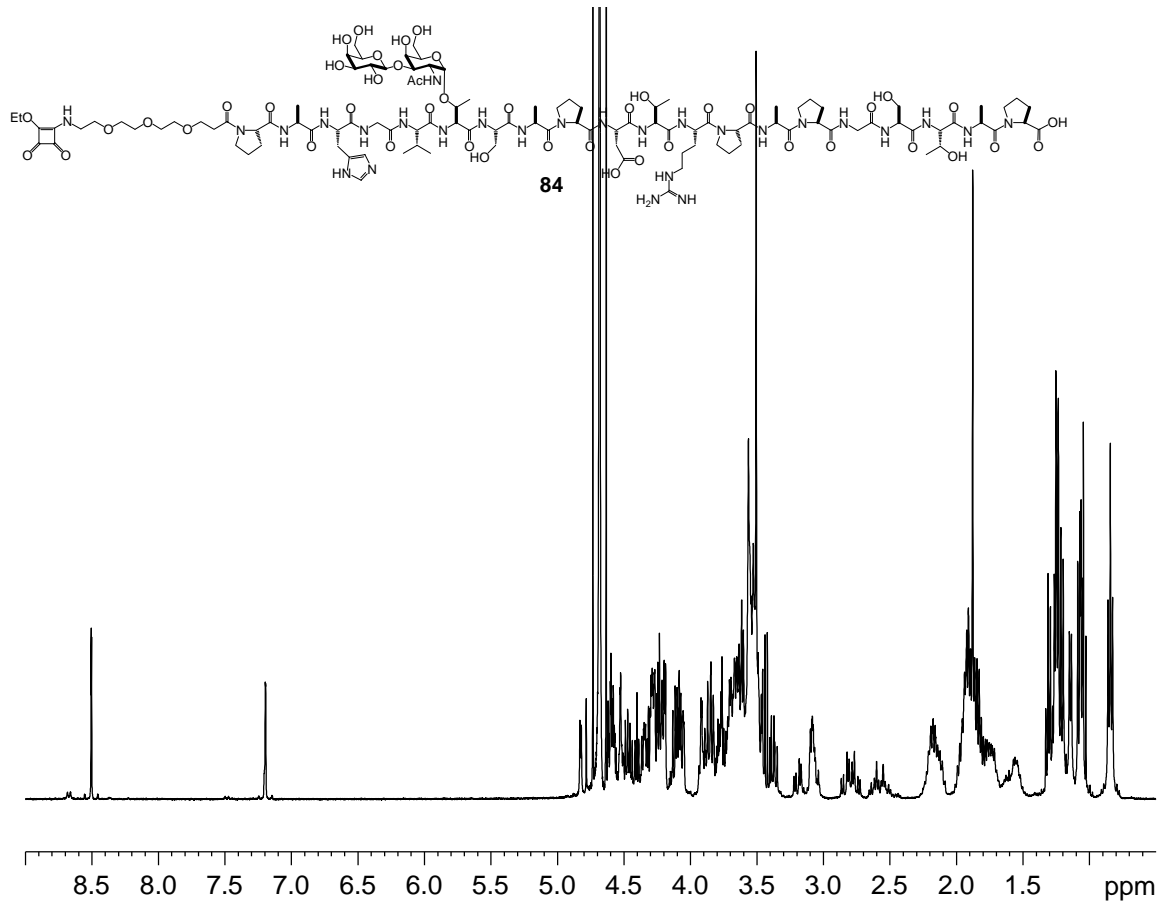


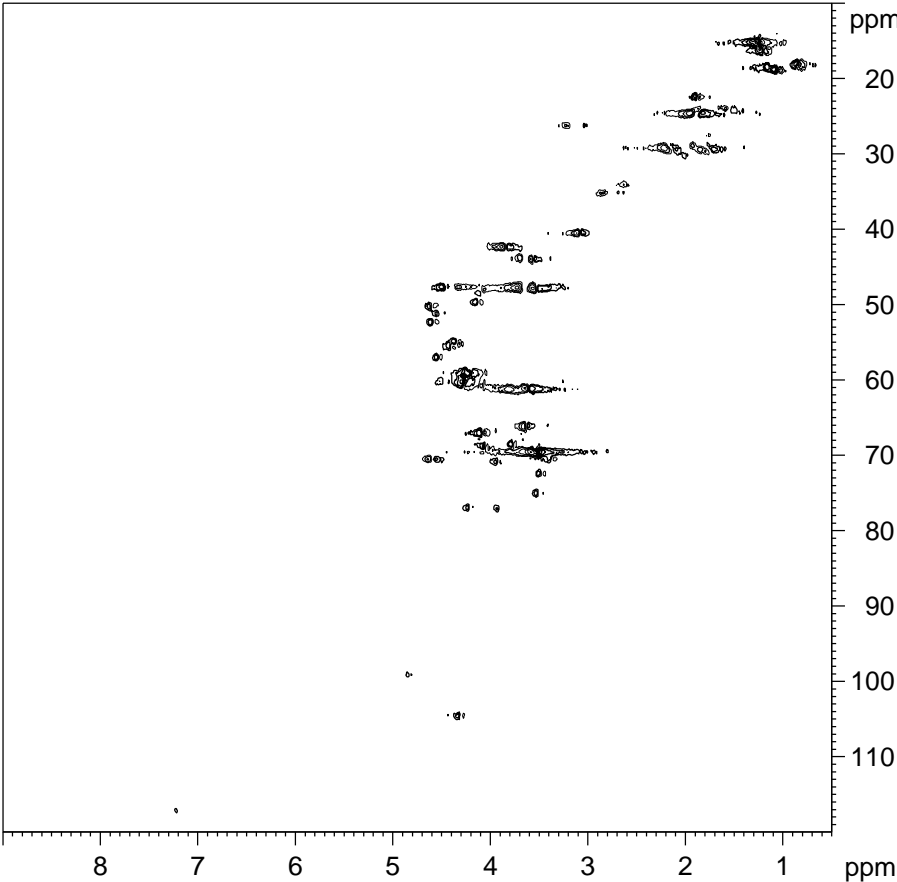
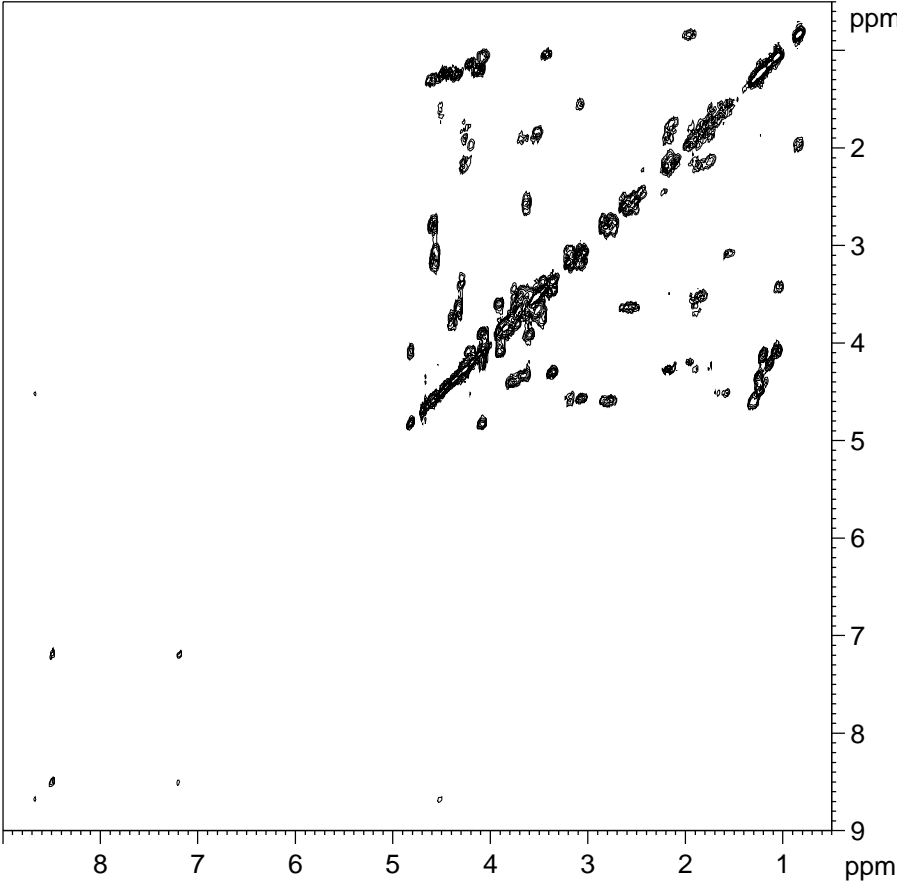


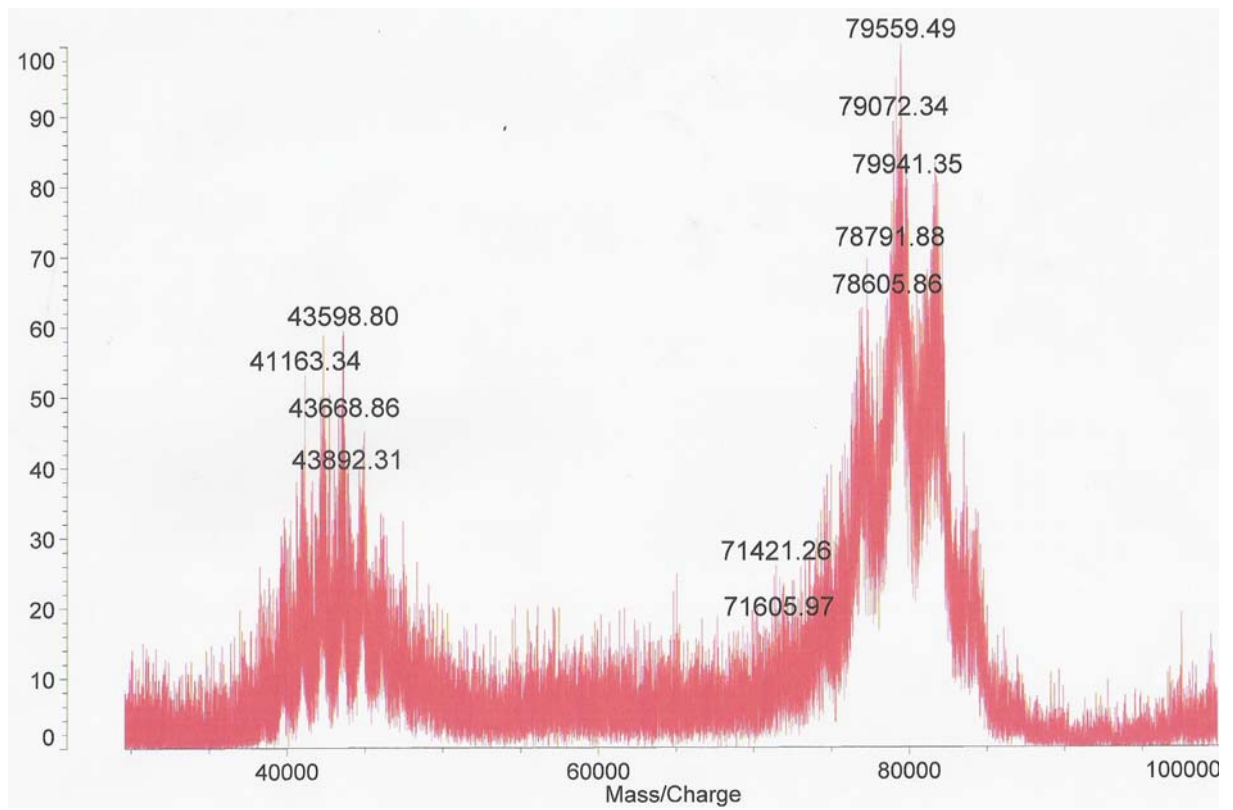
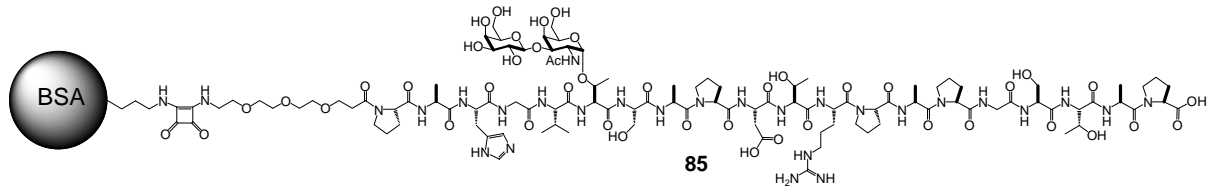


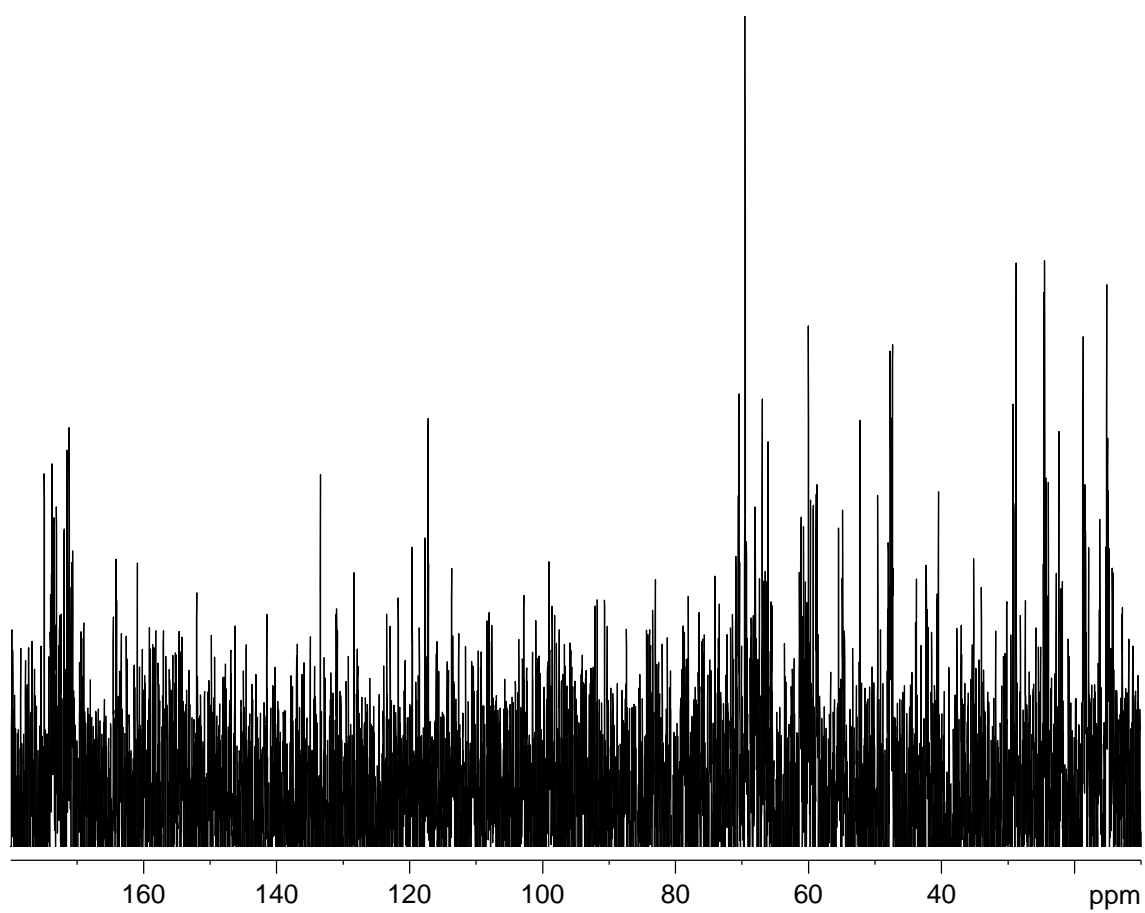
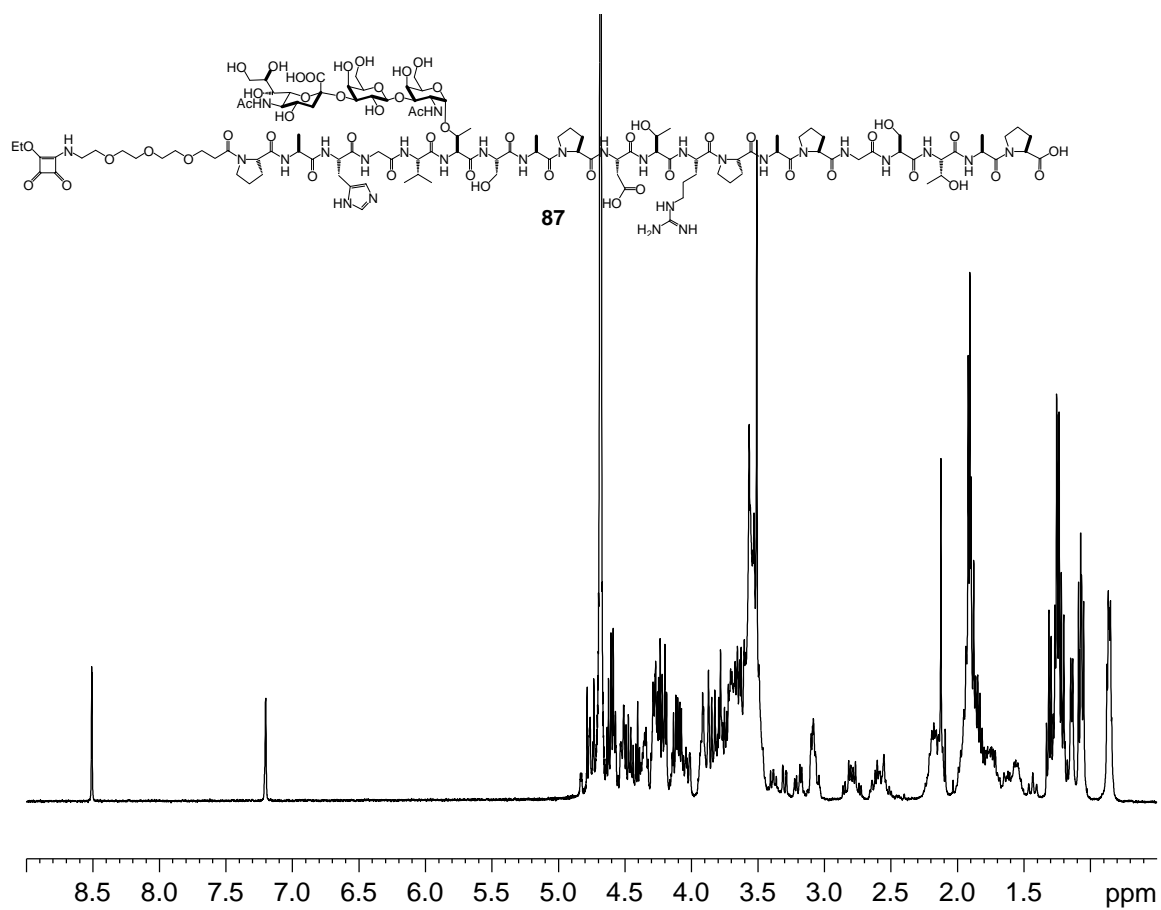


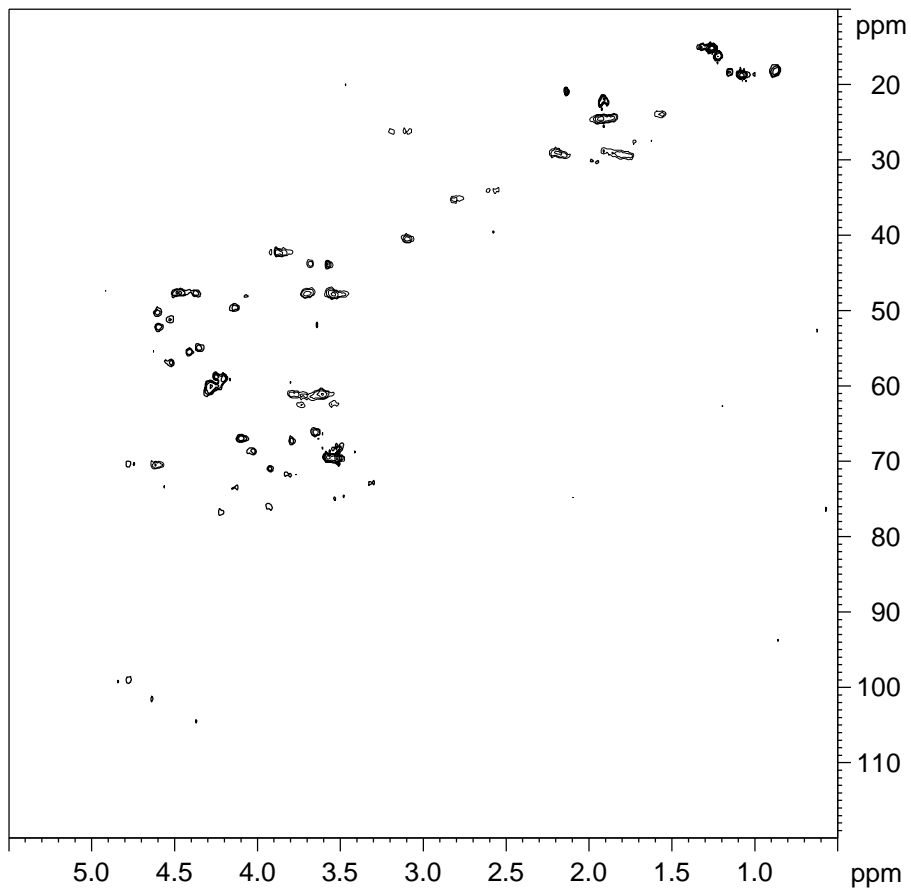
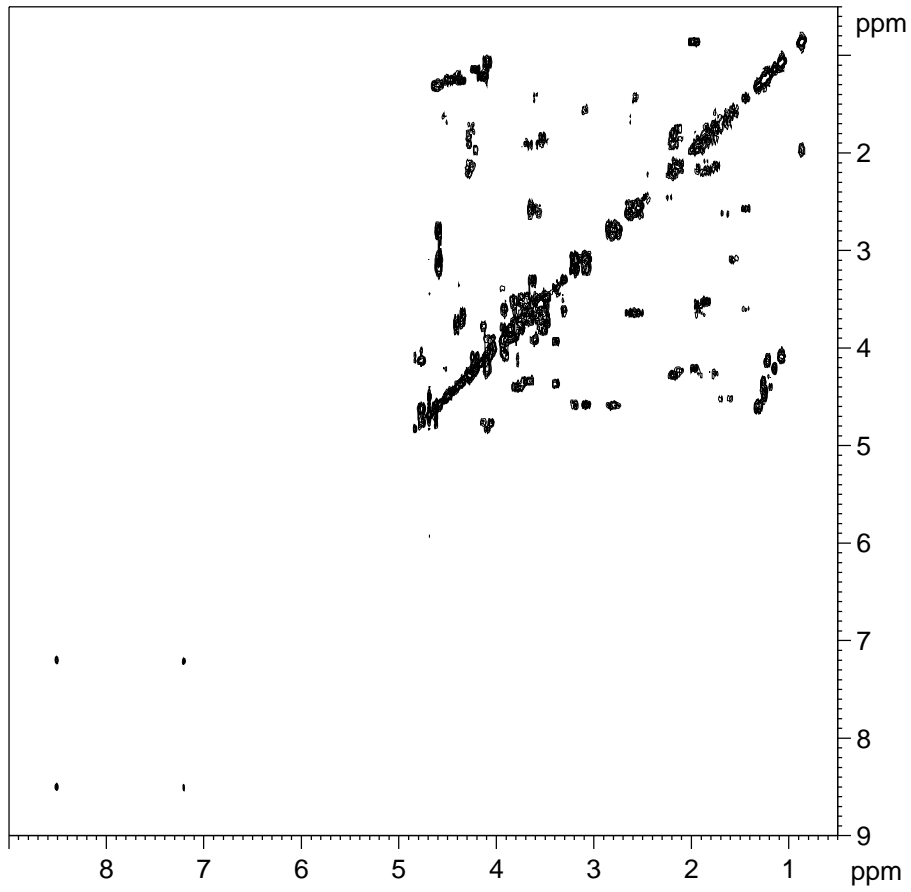


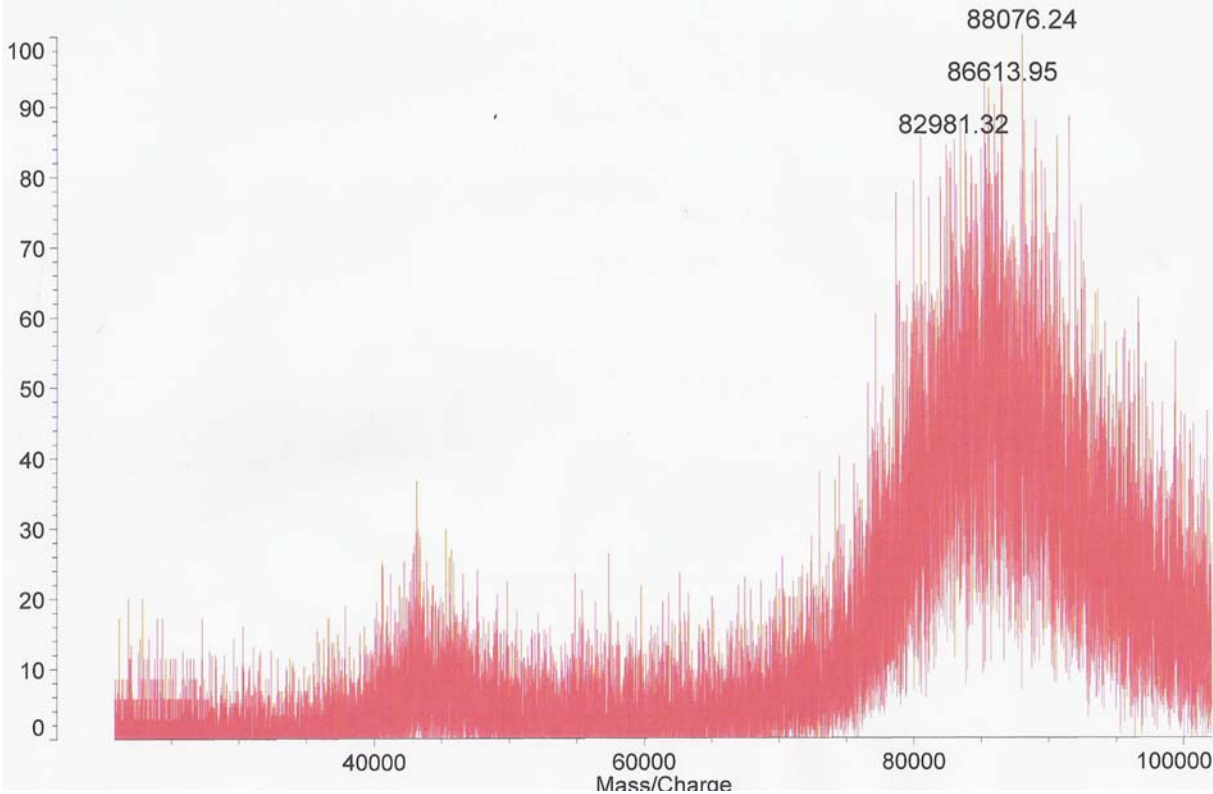
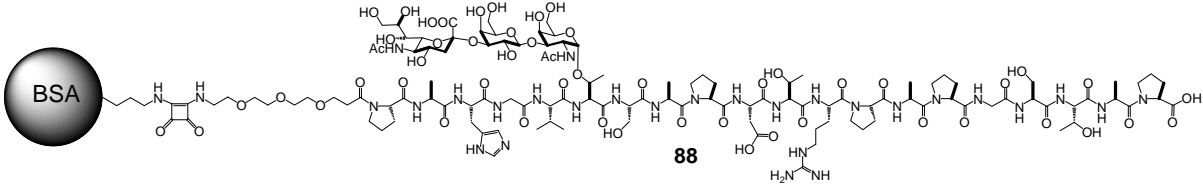


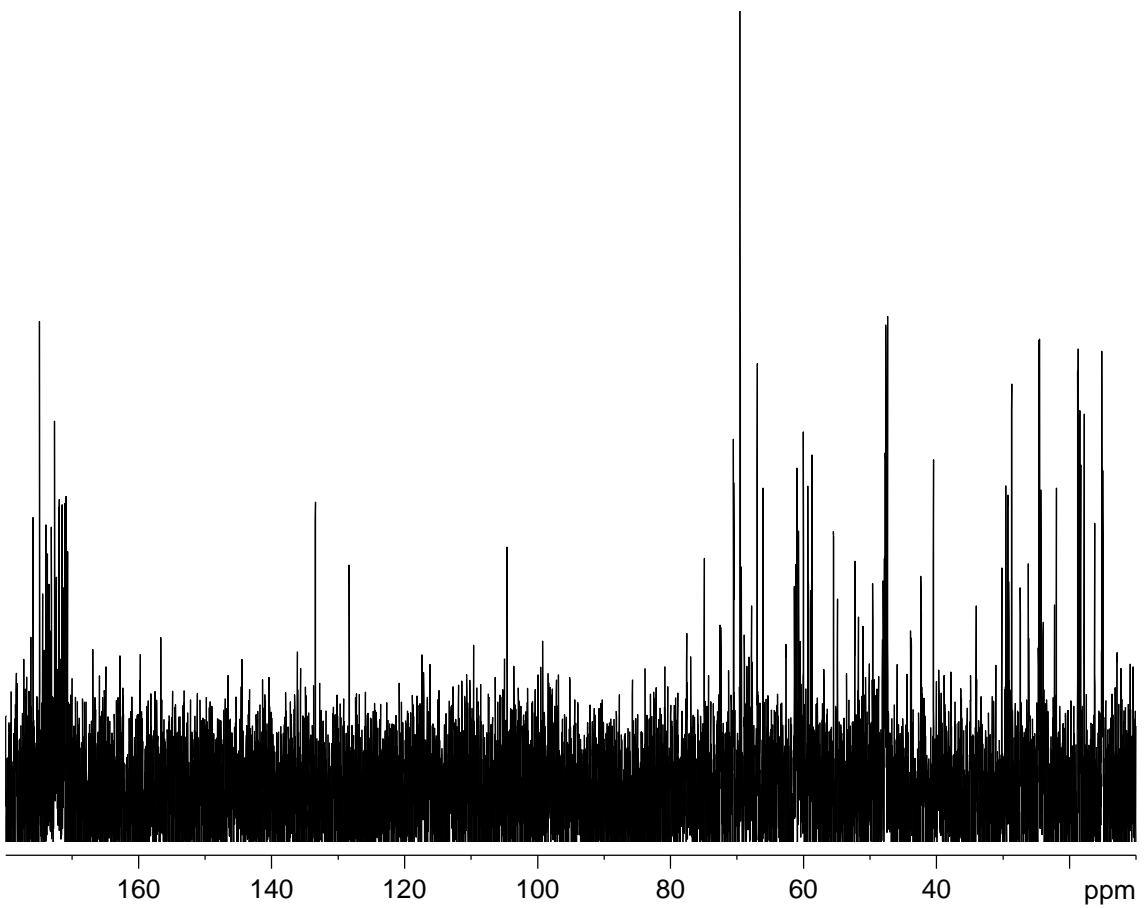
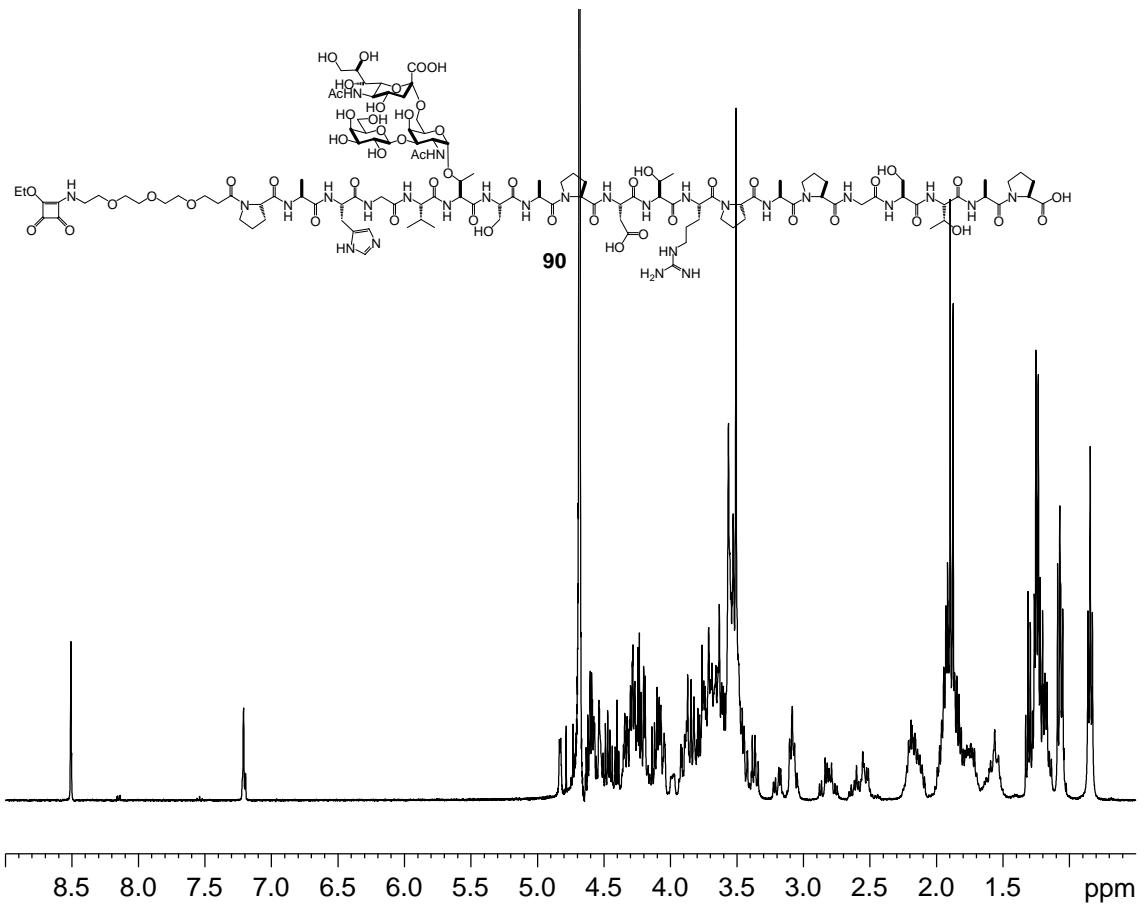


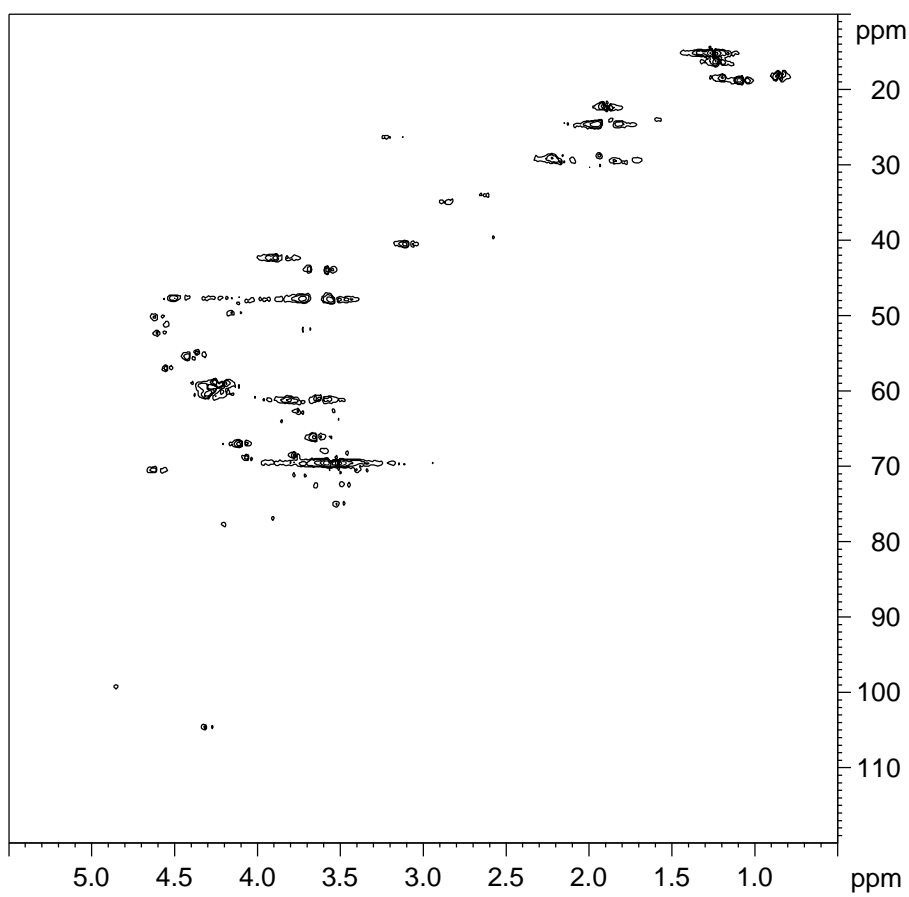
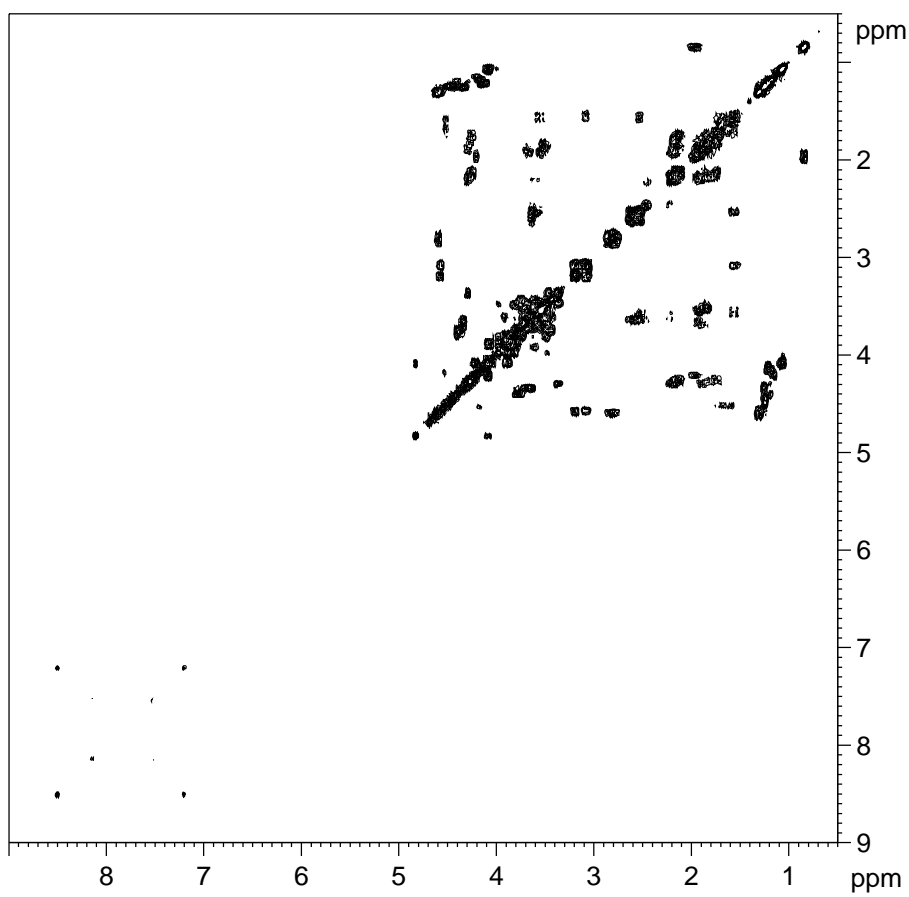


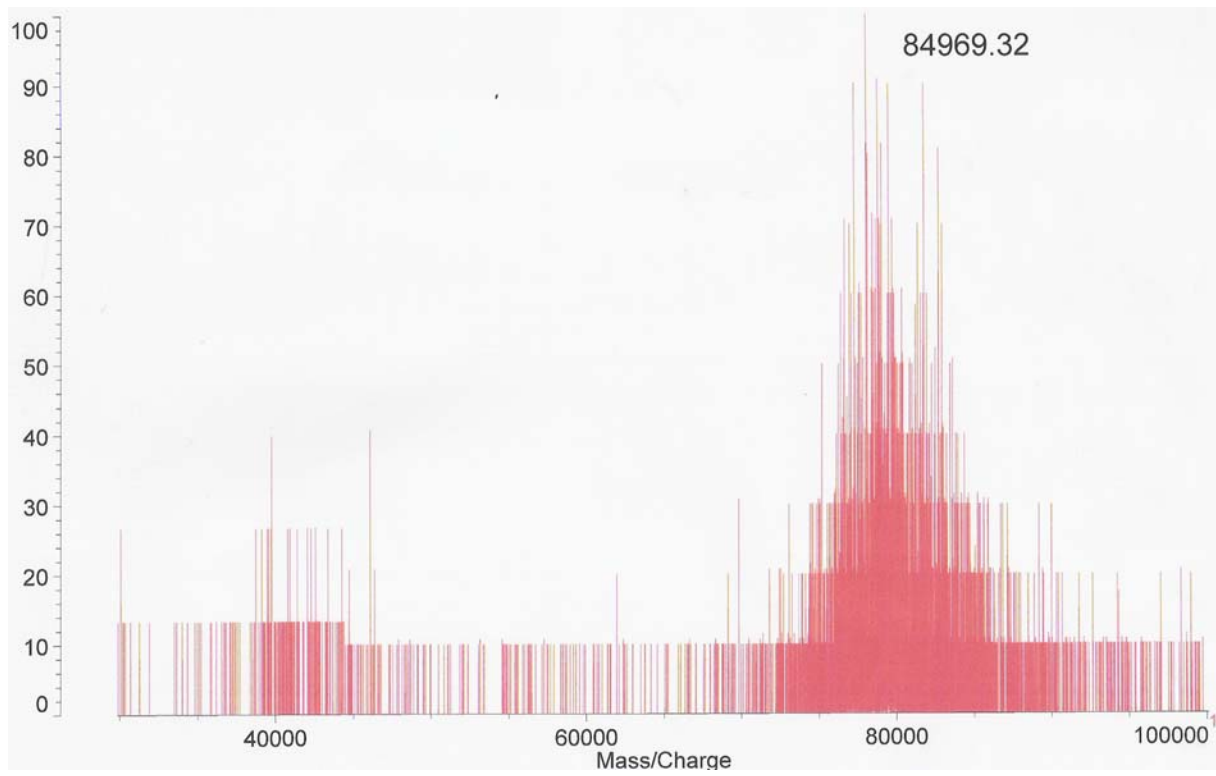
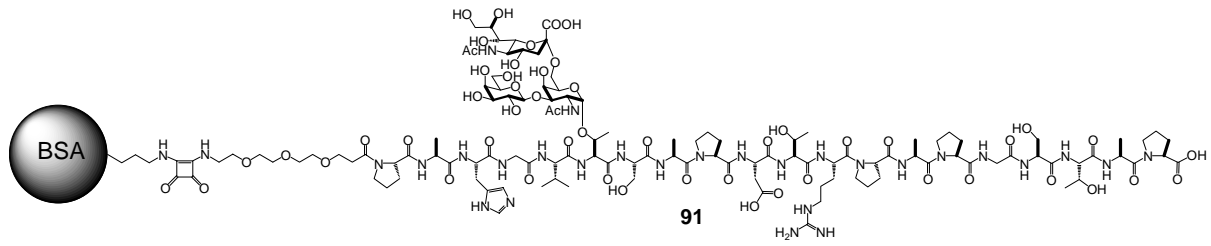


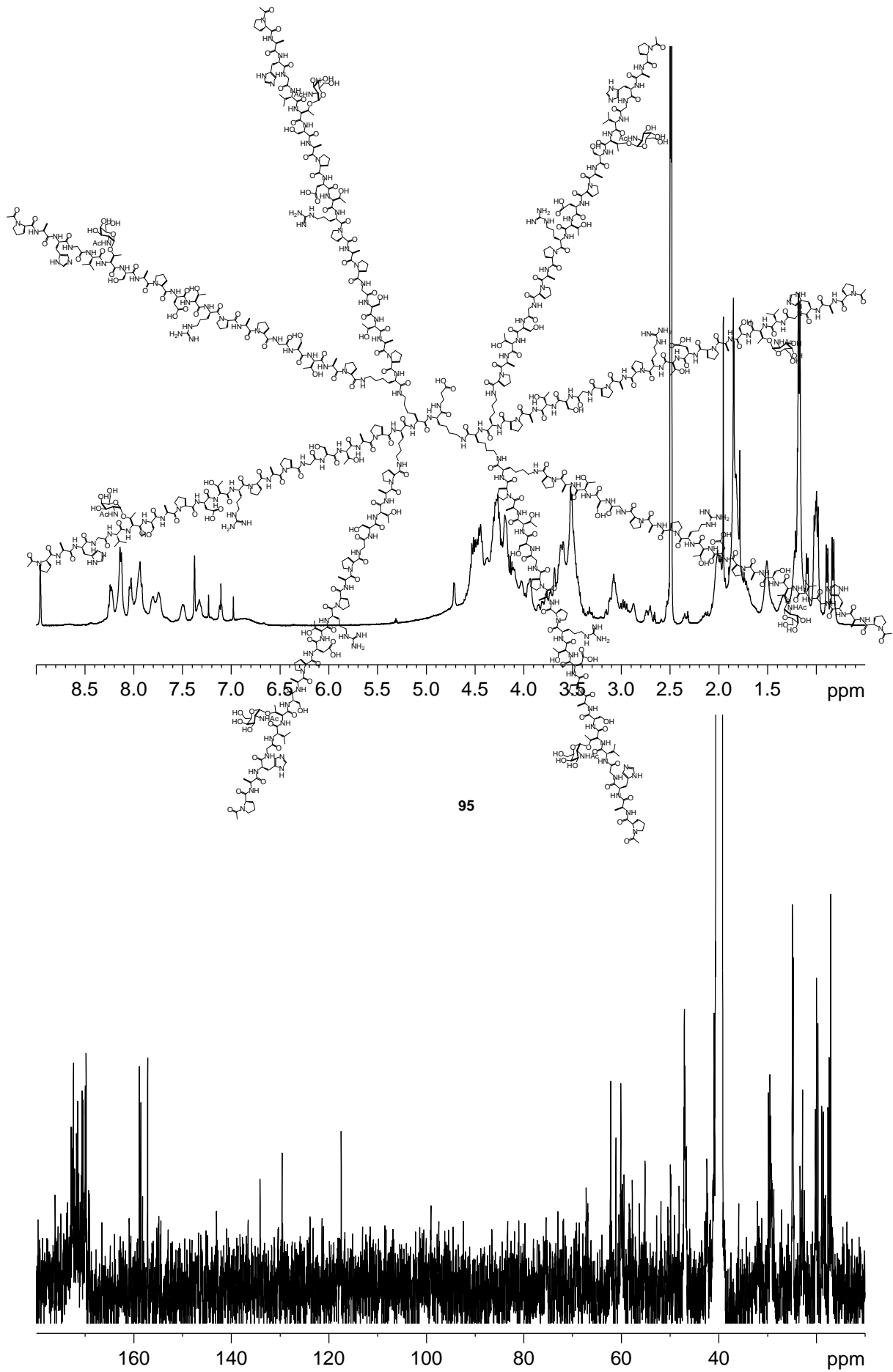


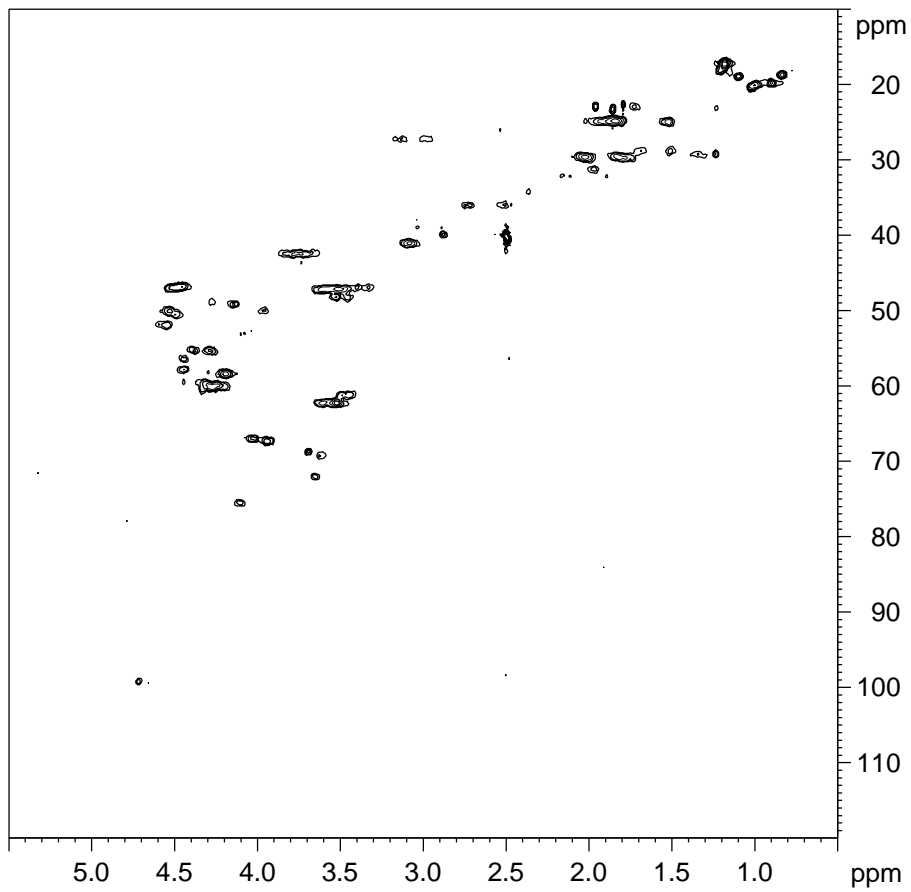
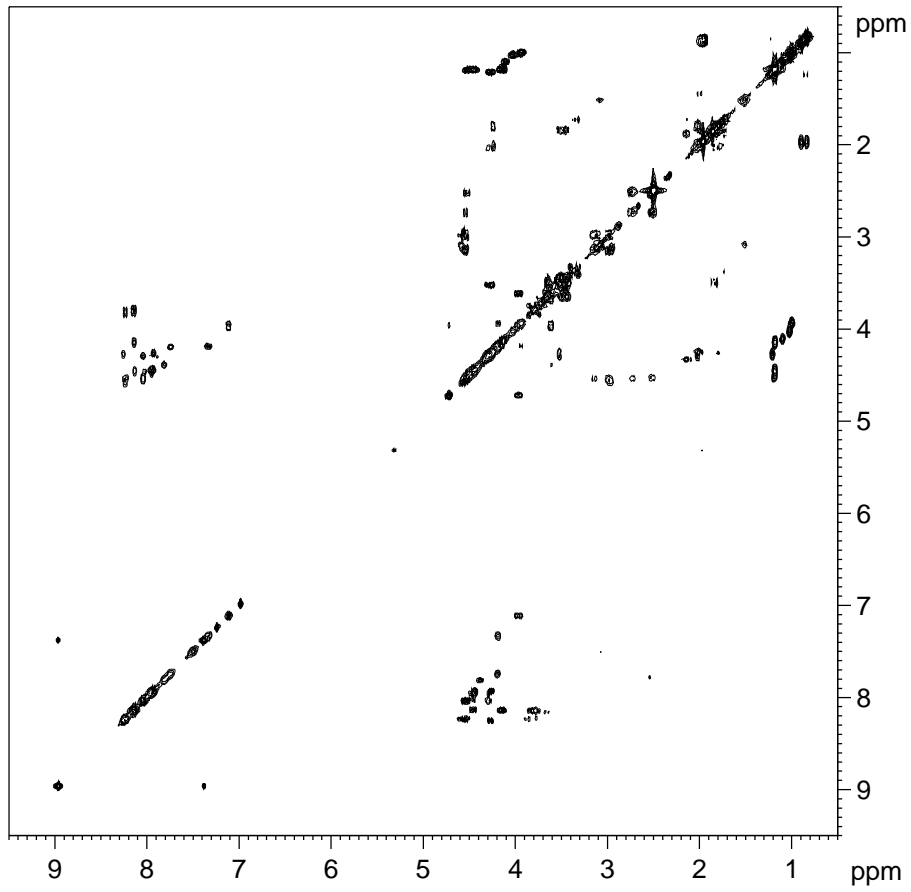


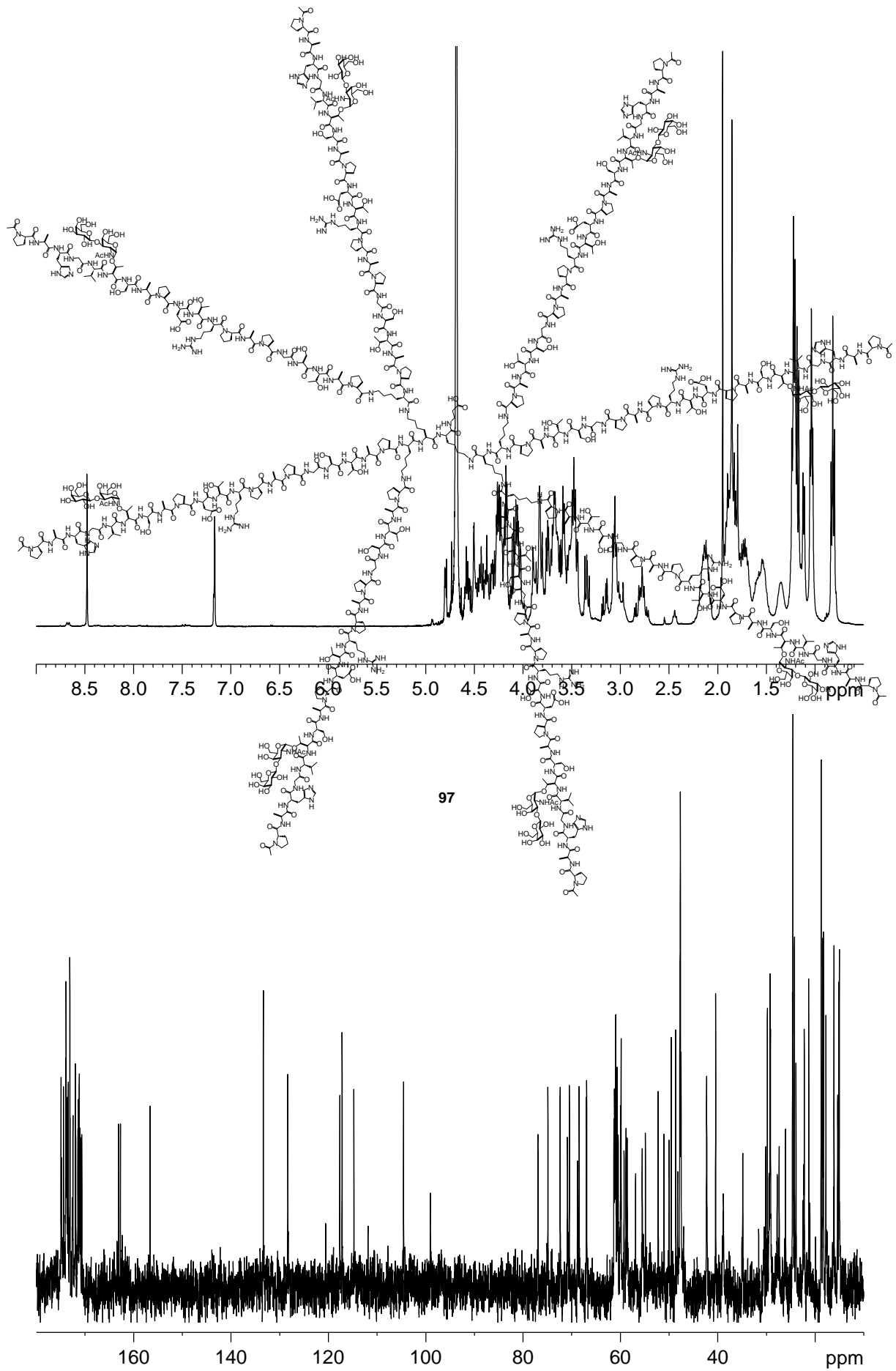


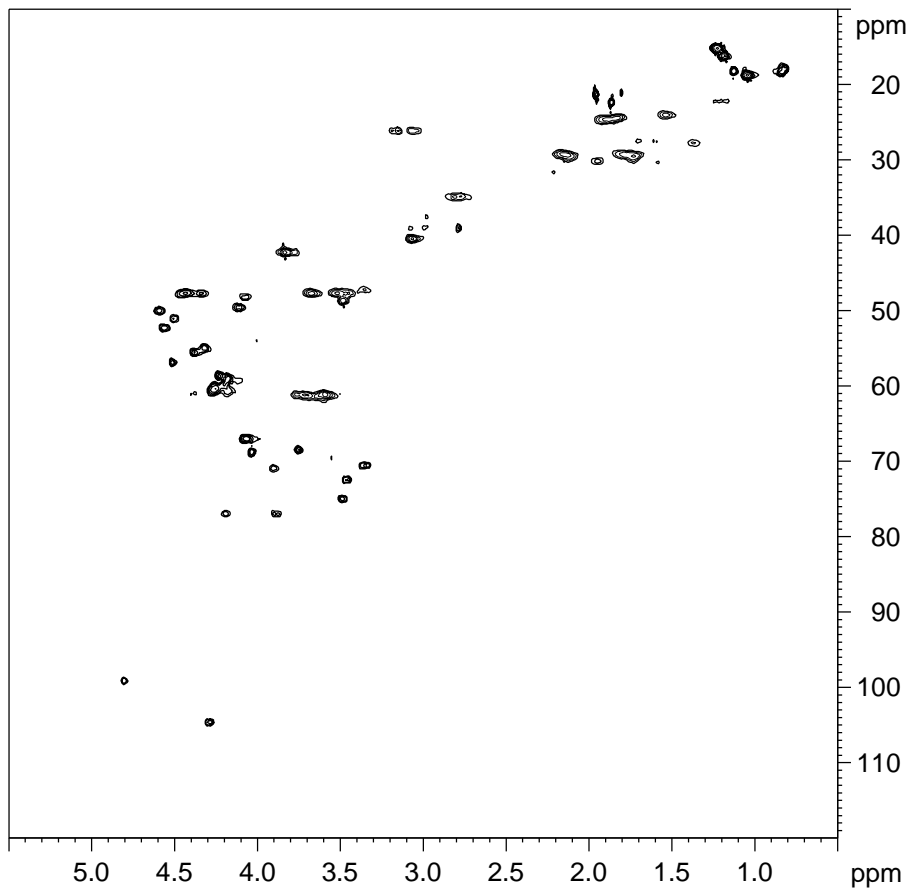
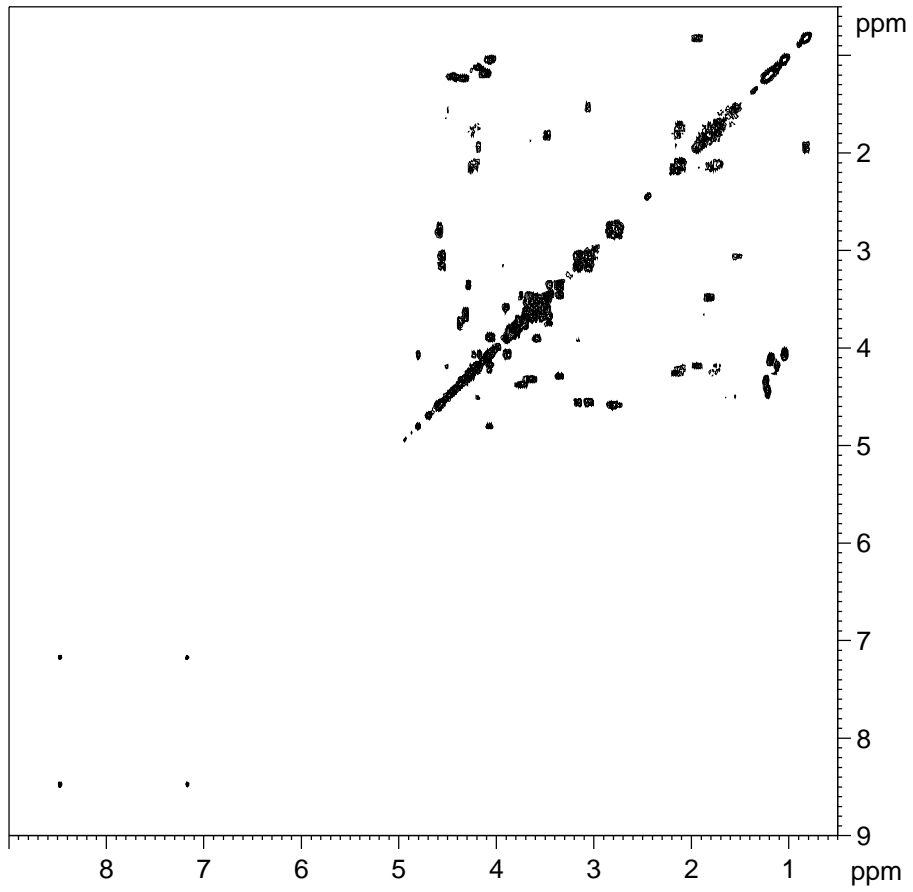


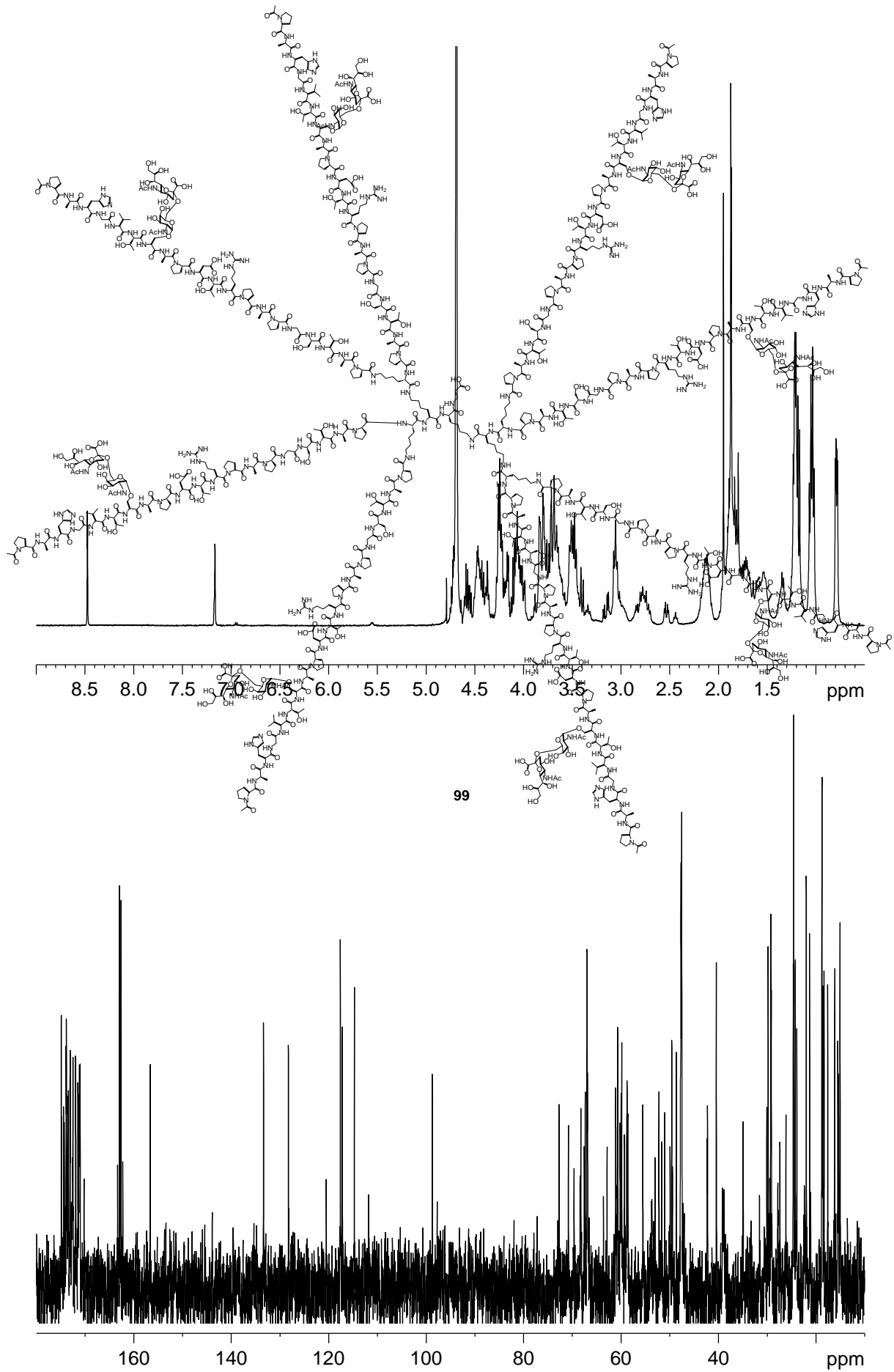


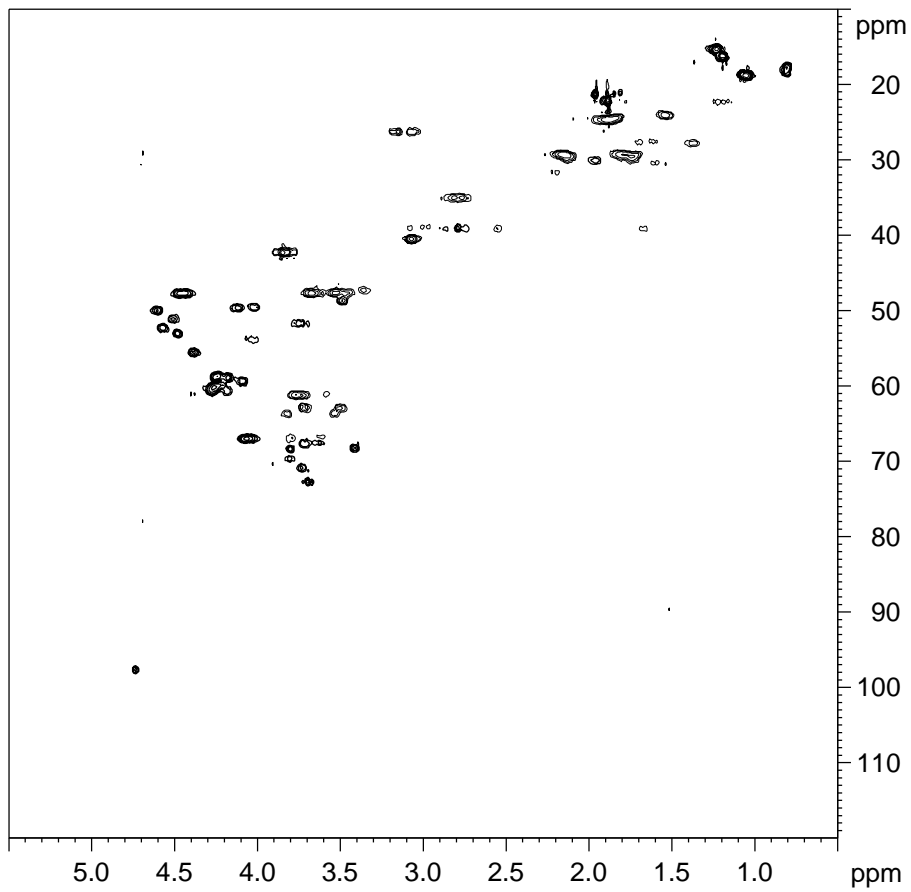
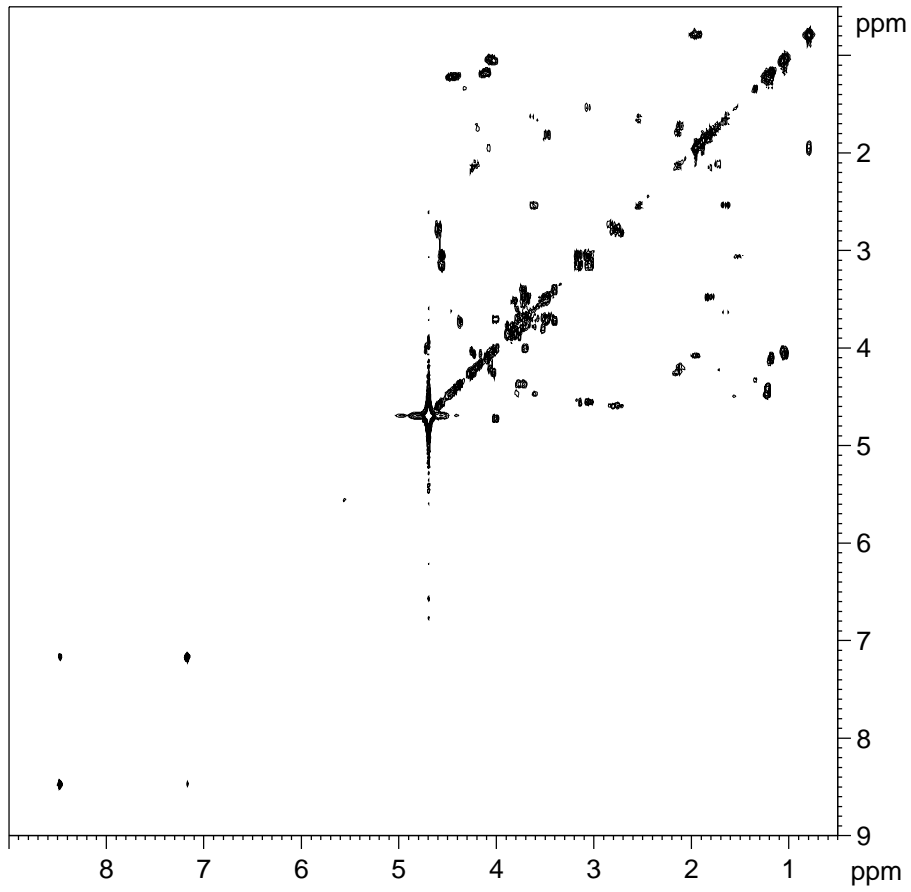


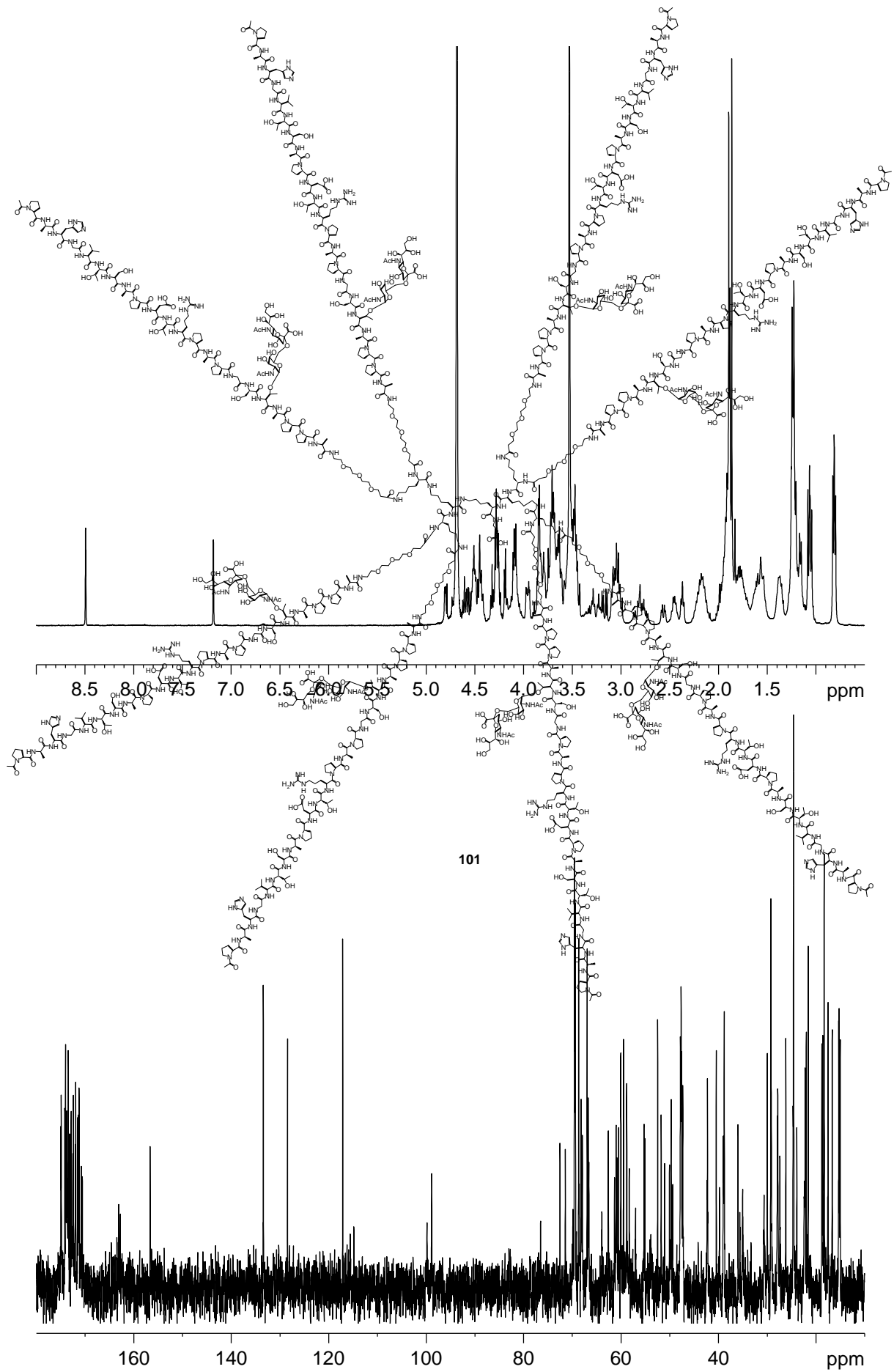


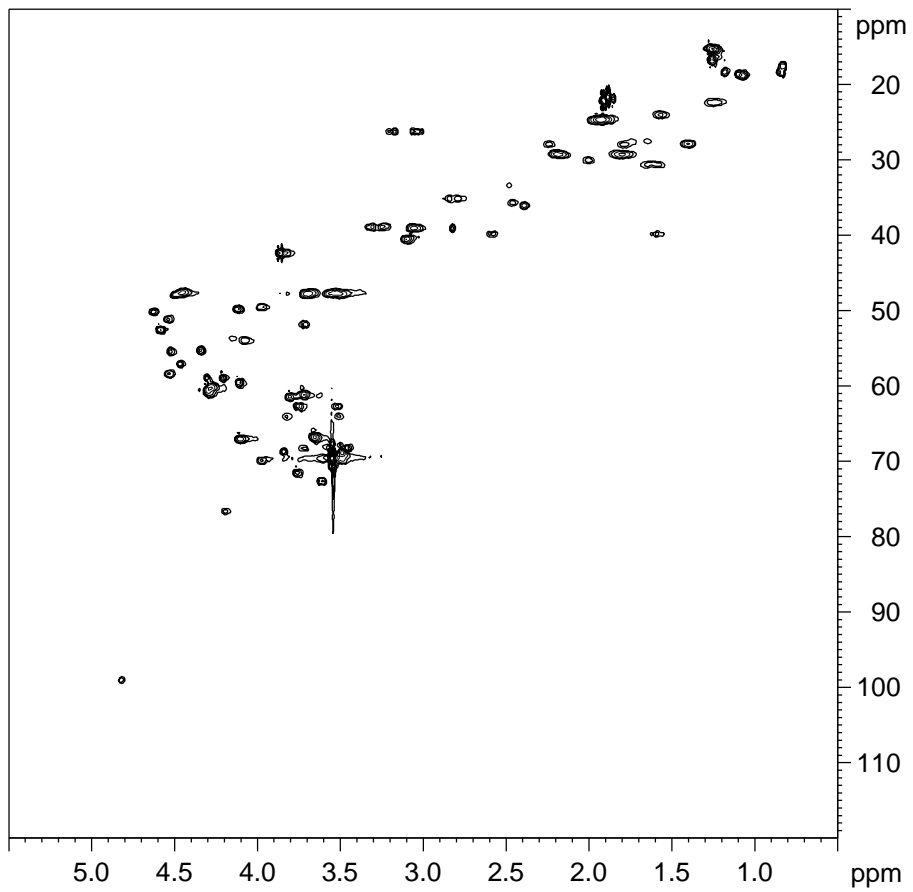
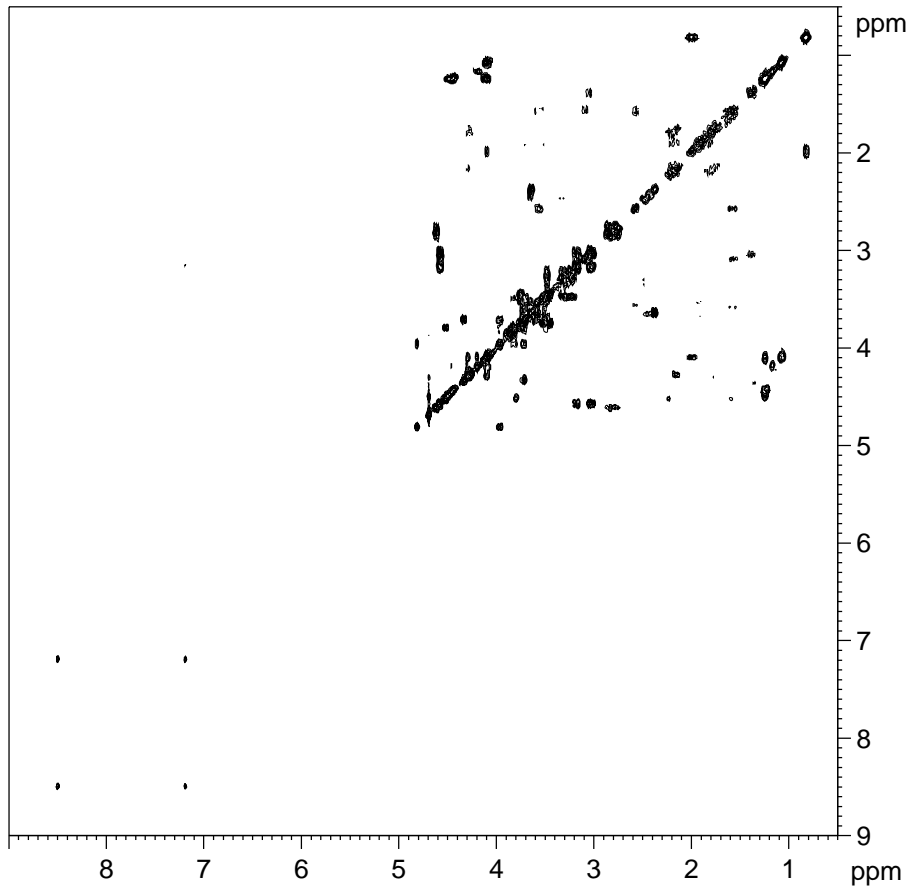


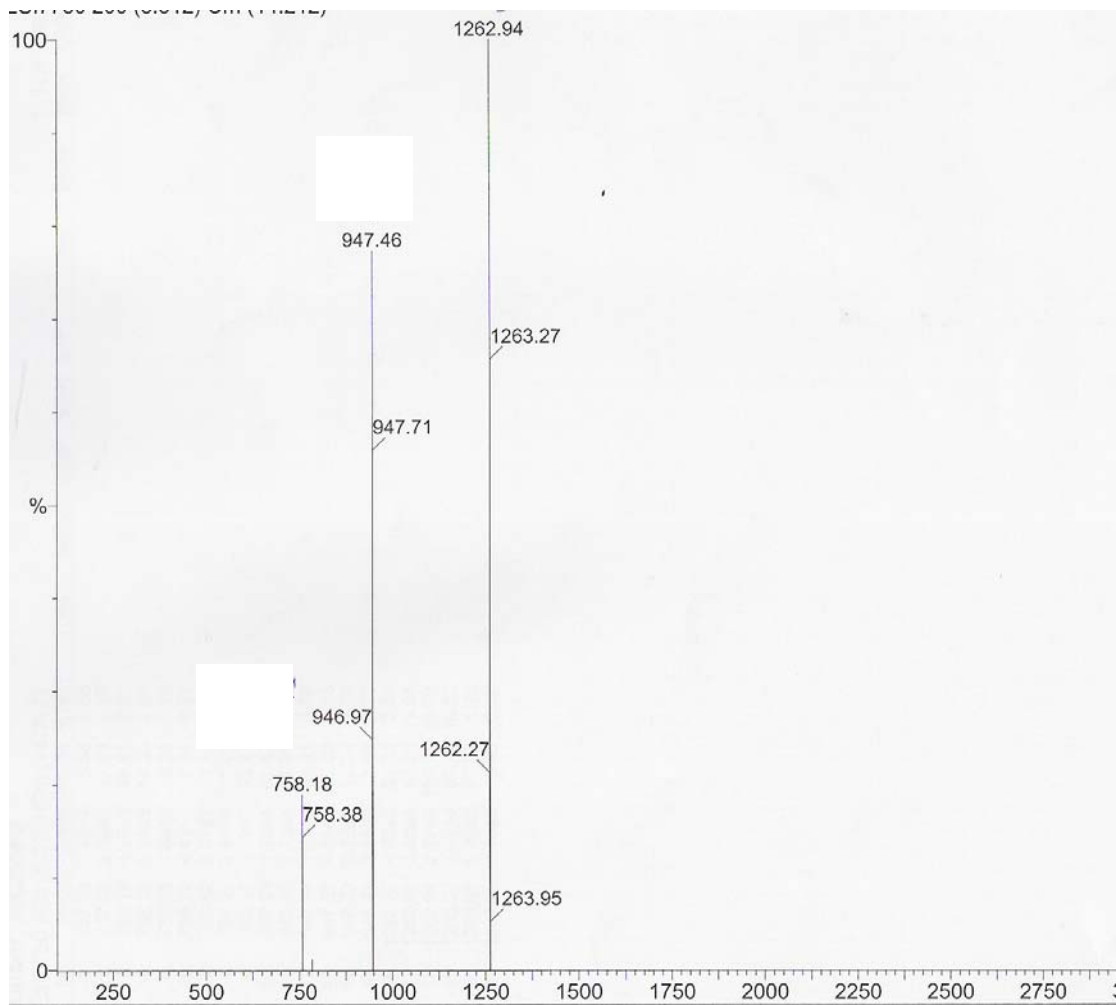
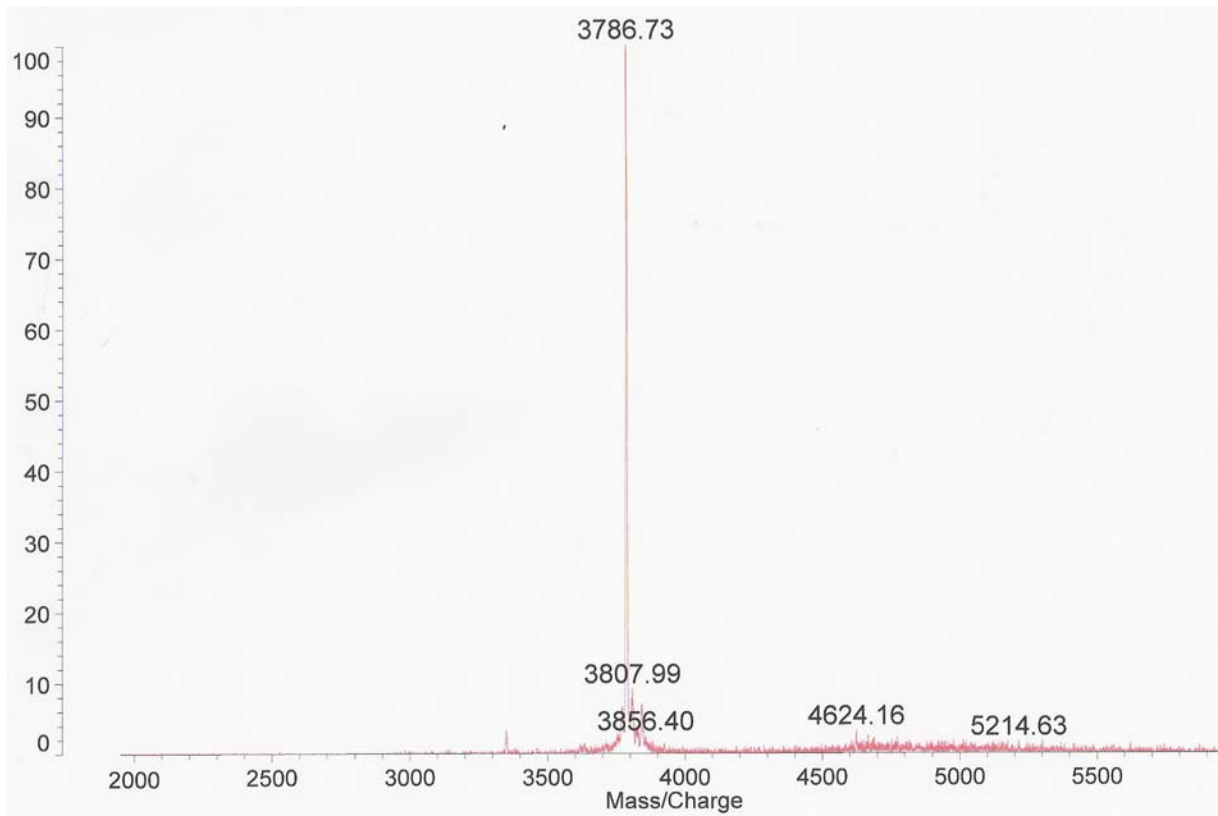


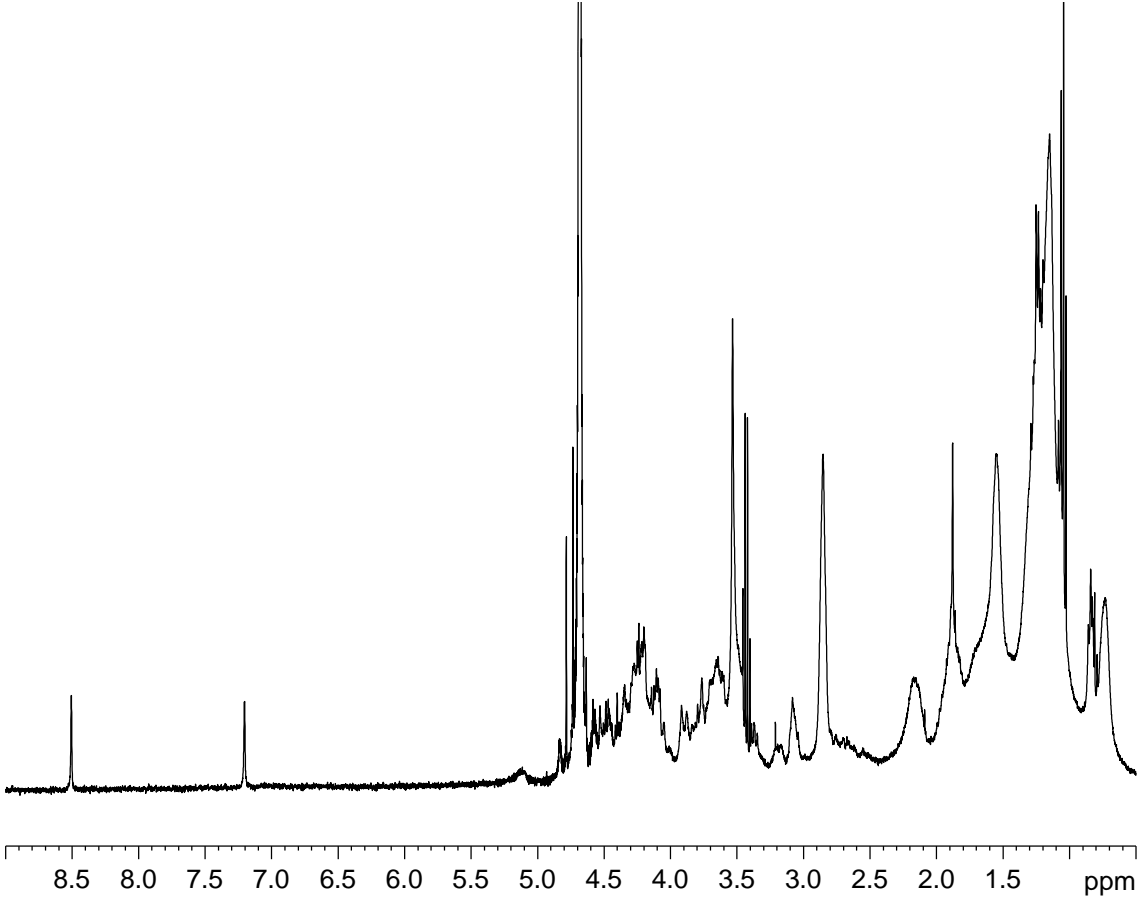
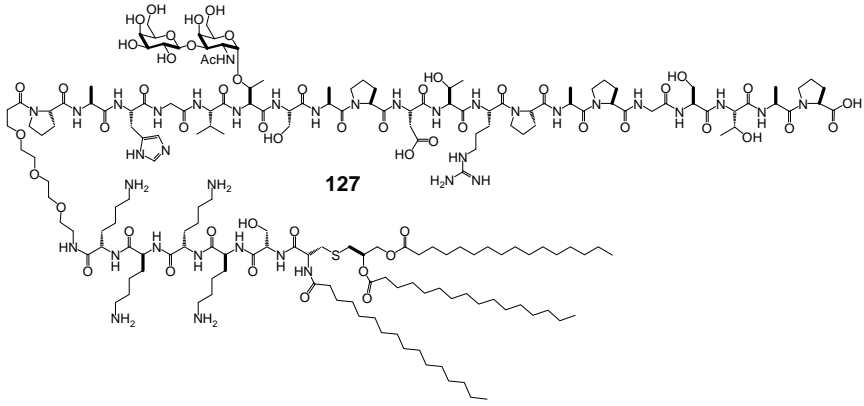


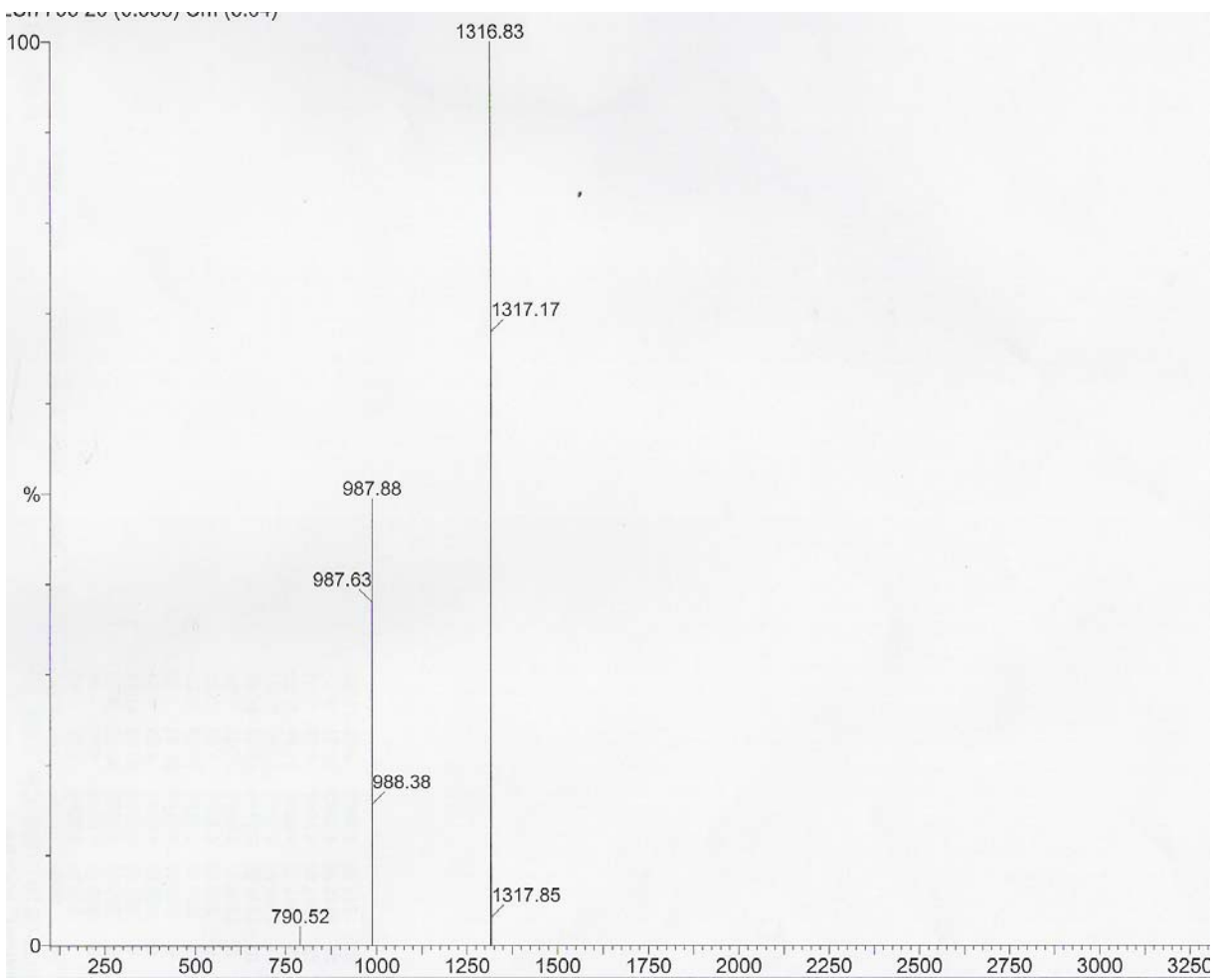
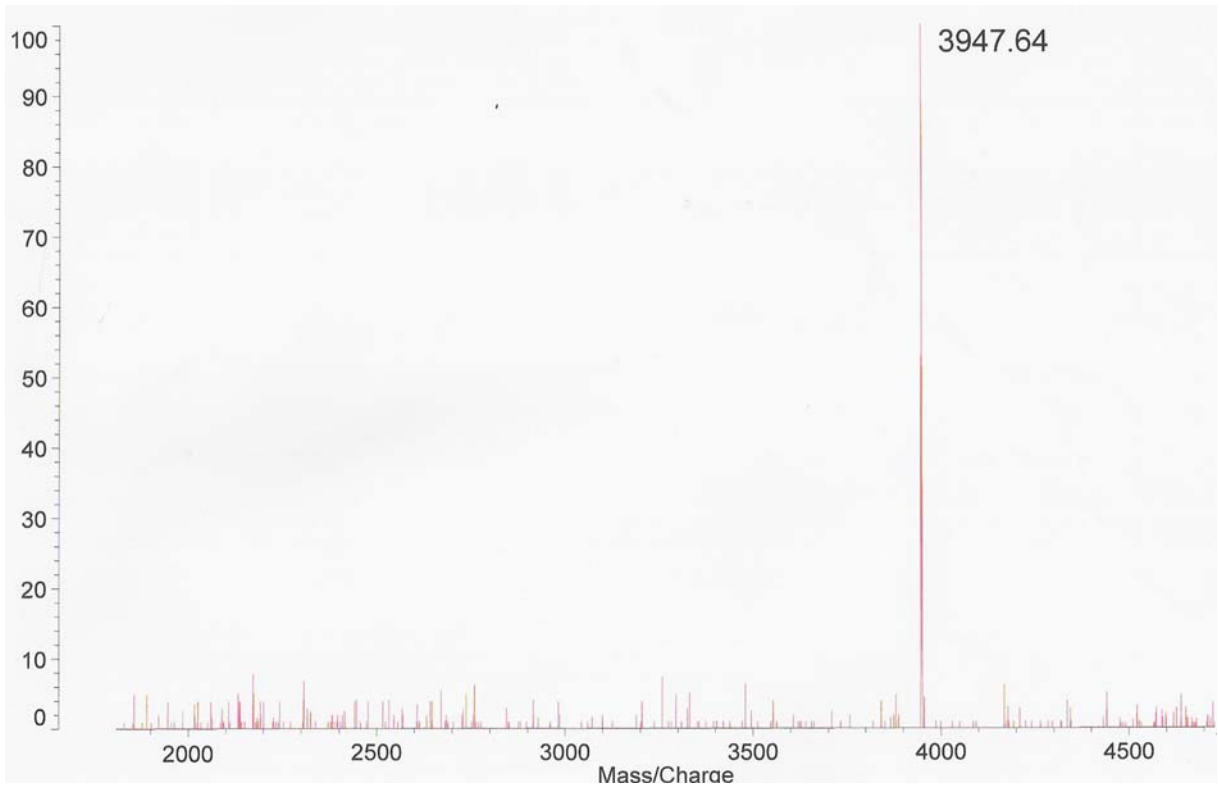


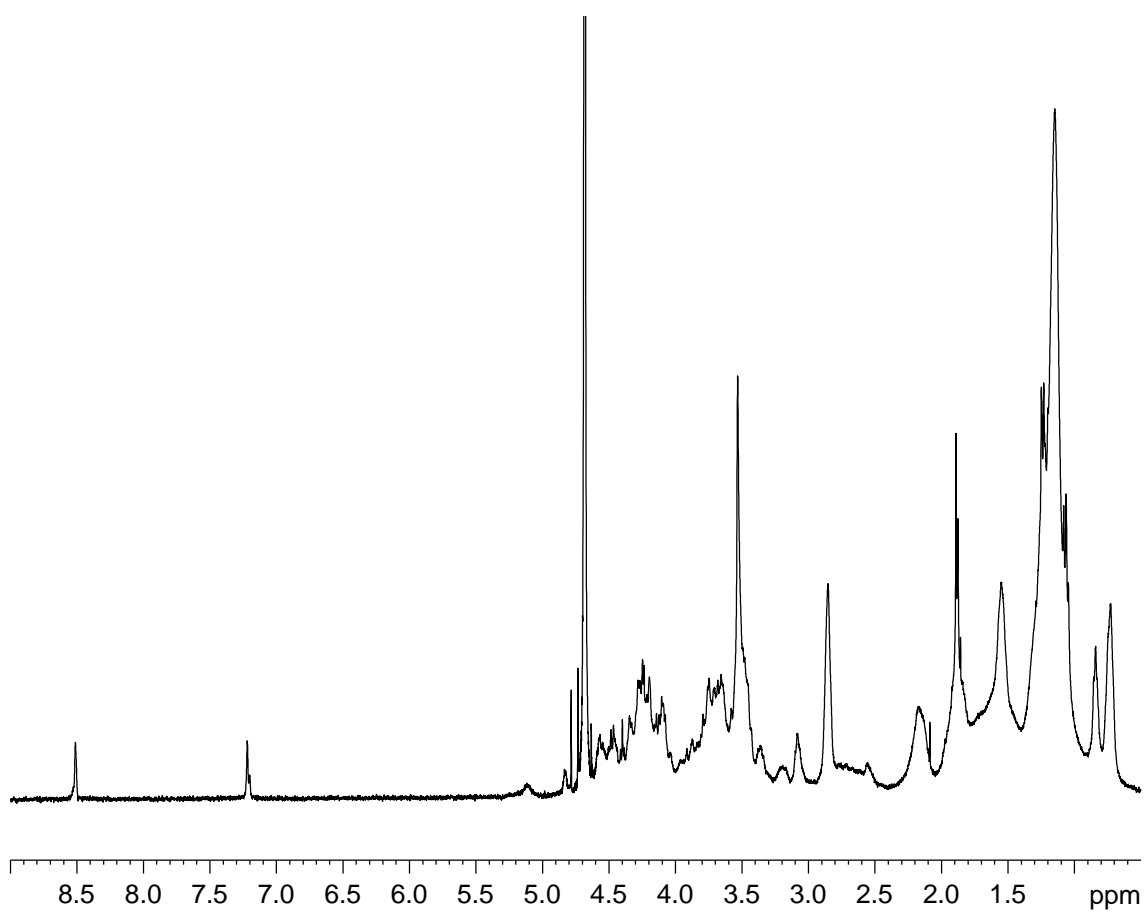
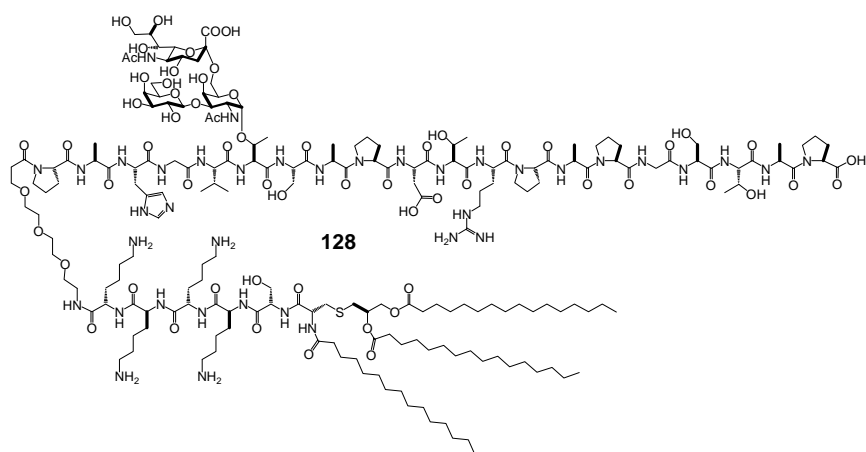


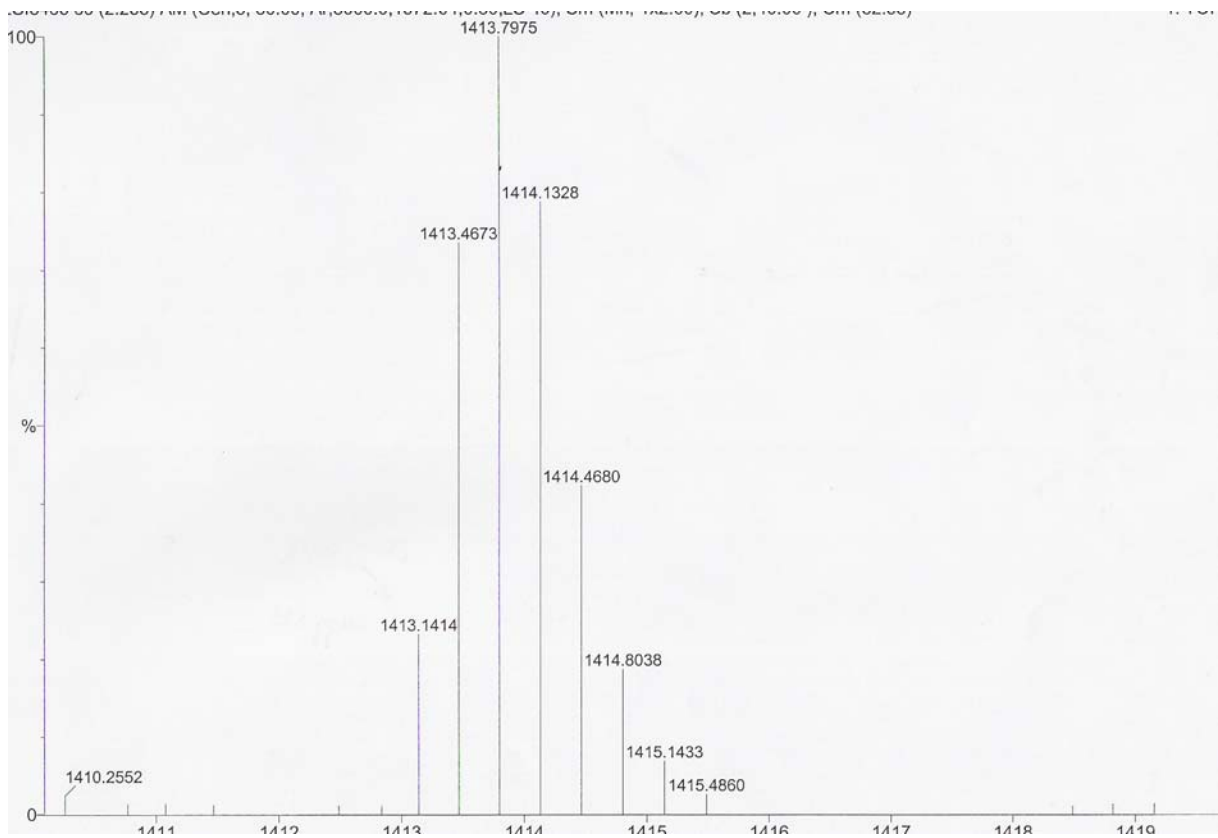
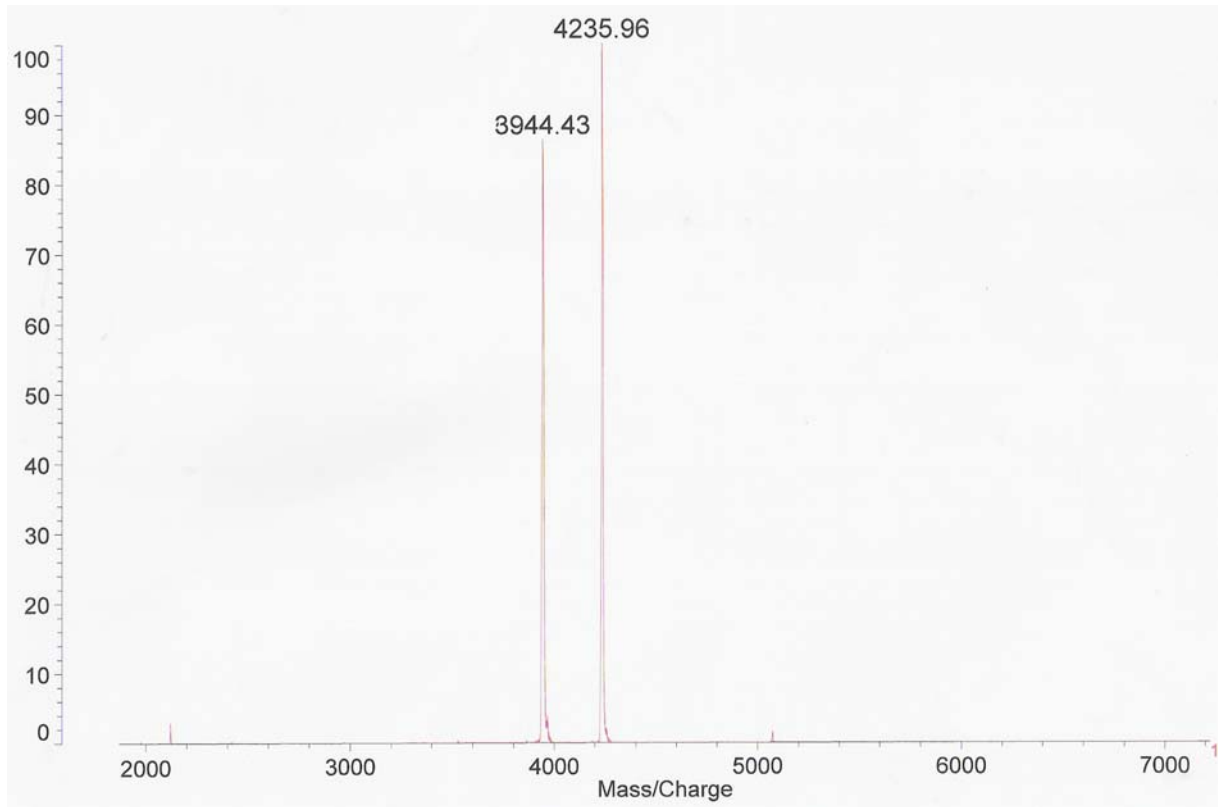


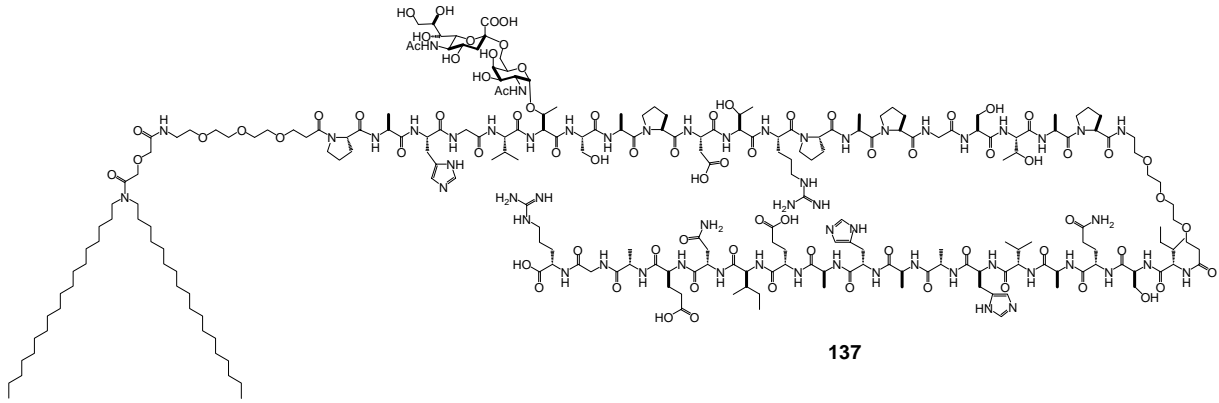












137

