

# **Synthese mehrfach fluorierter MUC1- Glycopeptide für die Entwicklung tumorselektiver Vakzine und Untersuchung Mikroreaktor- unterstützter Bausteinsynthesen**

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

Thomas Oberbillig  
geboren in Trier

Mainz, September 2012



Tag der Prüfung: 12.10.2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit  
von November 2008 bis September 2012  
am Institut für Organische Chemie  
an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Nicht weil es schwer ist, wagen wir es nicht,  
sondern weil wir es nicht wagen, ist es schwer.

(Lucius Annaeus Seneca)

„Schönen guten Tach,  
ich bin der, der Action macht!“  
(Jim Toronto, Das Actionteam)

FÜR LENI





# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Wissenswertes über Krebs .....	1
1.2	Das Mucin MUC1.....	4
1.3	Tumorassoziierte Antigene in der aktiven Immuntherapie.....	8
1.4	Fluorierte Antigenanaloga für die Immuntherapie .....	12
1.5	Mikroreaktoren in der organischen Synthese .....	16
2	Zielsetzung.....	20
3	Allgemeiner Teil .....	24
3.1	Synthese der Galactosyldonoren.....	25
3.1.1	Synthese des acetylierten 6-Fluor-Galactosyldonors .....	25
3.1.2	Synthese des benzylierten 2-Fluor-Galactosyldonors.....	27
3.1.2.1	Konventionelle Synthese .....	27
3.1.2.2	Optimierungsversuche im Mikroreaktor.....	29
3.1.3	Synthese des benzylierten 2,6-Bisfluor-Galactosyldonors .....	32
3.2	Synthesen der <i>N</i> -Acetyl-galactosamin-Threonin-Konjugate.....	34
3.2.1	Synthese des benzyliertenblockierten T <sub>N</sub> -Bausteins .....	34
3.2.2	Synthese des 6-Fluor-T <sub>N</sub> -Bausteins .....	38
3.2.3	Synthese des 6-Bisfluor-T <sub>N</sub> -Bausteins .....	41
3.3	Synthesen der fluorierten T-Antigenanaloga.....	43
3.3.1	Glycosylierungen der fluorierten T <sub>N</sub> -Antigenanaloga .....	44
3.3.2	Glycosylierungen des benzyliertenblockierten T <sub>N</sub> -Bausteins .....	52
3.3.2.1	Glycosylierungen im Batch-Verfahren.....	52
3.3.2.2	Glycosylierungen im Continuous-Flow-Verfahren .....	54
3.3.3	Acetalöffnung und versuchte Fluorierung am T-Antigen.....	62
3.4	Synthesen der fluorierten Glycopeptide und die Konjugation an Carrierproteine ....	65
3.4.1	Synthese des Ethylenglykol-Spacers .....	66
3.4.2	Synthesen der Glycopeptide und der Glycopeptidkonjugate .....	67
3.5	Immunologische Evaluierung .....	84
4	Zusammenfassung .....	93
5	Experimentalteil.....	101
5.1	Allgemeines und Messgeräte .....	101
5.2	Synthesen der Galactosyldonoren.....	105
5.3	Synthesen der <i>N</i> -Acetylgalactosamin-Threonin-Konjugate .....	122
5.4	Synthesen der fluorierten T-Antigene.....	139
5.5	Synthesen der Glycopeptide und Proteinkonjugate .....	159
	Literaturverzeichnis.....	177
	Spektroskopischer Anhang.....	X



## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	spezifischer Drehwinkel
A	Absorption
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
absol.	absolutiert
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
Ac	Acetyl
Ac <sub>2</sub> O	Acetanhydrid
AcOH	Essigsäure
Ala, A	Alanin
APC	<i>antigen-presenting cell</i> /antigen-präsentierende Zelle
Arg, R	Arginin
AS	Aminosäure
Asp, D	Asparaginsäure
ATR	<i>attenuated total reflection</i>
B	Base
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bs	breites Singulett
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> /Rinderserumalbumin
Bu, <i>t</i> Bu	Butyl, <i>tert</i> -Butyl
Bzn	Benzyliden
c	Konzentration
ca.	circa
(-)-CSA	(-)-Campher-10-sulfonsäure
<sup>°</sup> Hex	Cyclohexan
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
$\delta$	chemische Verschiebung
d, dd, ddd	Dublett, Dublett von Dublett, Dublett von Dublett von Dublett
DAST <sup>®</sup>	<i>N,N</i> -Diethylaminoschwefeltrifluorid
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
Deoxo-Fluor <sup>®</sup>	[Bis(2-methoxyethyl)amino]-schwefeltrifluorid
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure

DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dt	Dublett von Triplett
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI-MS	<i>electron spray ionization mass spectrometry</i>
Et	Ethyl
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
EtOAc	Essigäureethylester
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
Fmoc	<i>N</i> -9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat
FSPE	fluorous solid-phase extraction
g	Gramm
Gal	Galactose
ges.	gesättigt
Glc	Glucose
Gly, G	Glycin
h	Stunde
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	<i>O</i> -2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
His, H	Histidin
HMBA	4-Hydroxymethylbenzoesäure
HMQC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPLC-MS	<i>high performance liquid chromatography-mass spectrometry</i>
HR-ESI-MS	high resolution ESI-MS
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> / Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
<i>i</i> PrOH	<i>iso</i> -Propanol
IR	Infrarot
Kap.	Kapitel

kat./Kat.	katalytisch/Katalysator
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i> /Hämocyanin der Schlüssellochnapfschnecke
konz.	konzentriert
L	Liter
LA	Lewis-Säure
m	Masse, Meter, Multiplett
M	molar
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i>
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
MS	Molsieb
MsCl	Mesylchlorid
MW	Mikrowelle
NaOMe	Natriummethanolat
NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidinon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
OVA	Ovalbumin
p	Druck
<i>p</i>	<i>para</i>
P	Leistung
PDC	Pyridiniumdichromat
Ph	Phenyl
Pmc	2,2,5,7-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
ppm	<i>parts per million</i>
PPTs	Pyridinium- <i>para</i> -toluolsulfonat
Pro, P	Prolin
pt	Pseudotriplett
PTFE	Polytetrafluorethylen
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
quant.	quantitativ
R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
Raumtemp.	Raumtemperatur
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor

RP-HPLC	<i>reversed phase-high performance liquid chromatography</i>
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
s	Singulett
SASRIN <sup>®</sup>	<i>super acid sensitive resin</i>
Selectfluor <sup>®</sup>	1-Chlormethyl-4-fluor-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octan- bis(tetrafluoroborat)
Ser, S	Serin
SG	Schutzgruppe
Sia	Sialinsäure
t	Triplett
T	Temperatur
TAA	tumorassoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TBTU	<i>O</i> -2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium- tetrafluoroborat
TCI	Trichloracetimidat
TCR	T-Zellrezeptor
td	Triplett von Dublett
<i>tert, t</i>	<i>tertiär</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thr, T	Threonin
TMSOTf	Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TTox	Tetanus Toxoid
UV	Ultraviolett
Val, V	Valin
verd.	verdünnt
VTNR	<i>varial number of tandem repeats</i>
W	Watt
z	Ladung

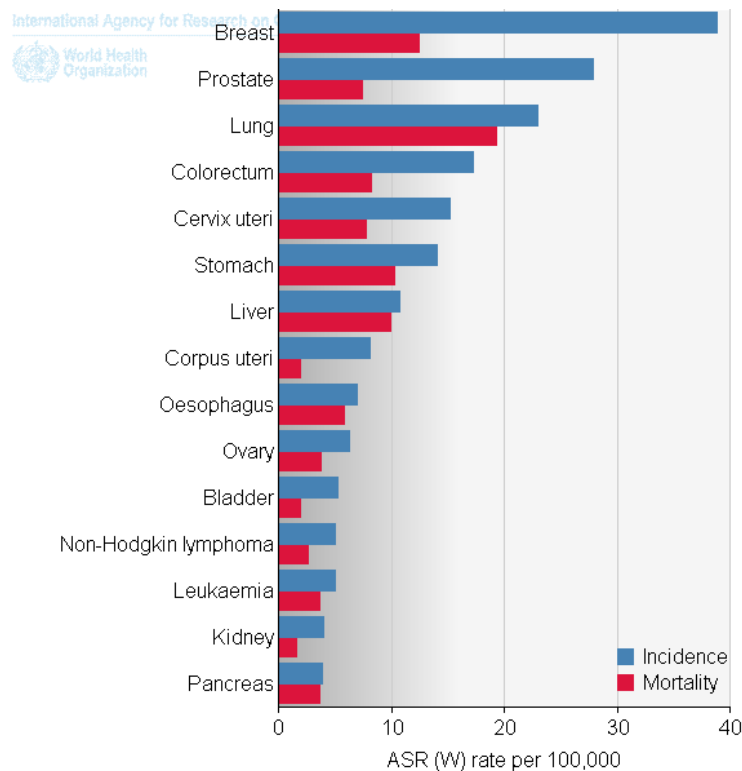




# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Wissenswertes über Krebs

Die Erkrankung Krebs wurde Berichten der *International Agency for Research on Cancer* der *World Health Organization* zufolge im Jahr 2008 weltweit 12.7 Millionen Mal diagnostiziert und führte in 7.6 Millionen Fällen zum Tod. Obwohl der Brustdrüsen- und der Prostatakrebs die am häufigsten auftretenden Arten des Krebses darstellen, weist die Erkrankung der Lunge aufgrund der eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten die größte Anzahl an Todesfällen auf.



**Abb. 1.1 Häufigkeit der weltweit auftretenden Krebserkrankungen (incidence) und der damit verbundenen Todesfälle (mortality) in 2008.<sup>[1]</sup>**

Allein in Deutschland starben über 215.000 Patienten an den Folgen von Krebs, darunter 115.000 Männer und 100.000 Frauen, und somit bedeutet die maligne Tumorerkrankung nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache hierzulande.<sup>[2]</sup> Zudem wurde bei weiteren 470.000 Menschen (247.000 Männern und 223.000 Frauen) in Deutschland die Erkrankung neu festgestellt, was eine Steigerung um 35% für Frauen und um über 80% für Männer seit 1980 bedeutet. Die Häufigkeit der Tumorlokalisation hängt

sehr stark vom Geschlecht ab. So ist bei Männern in den meisten Fällen die Prostata betroffen, wohingegen Frauen vornehmlich an Brustdrüsenkrebs erkranken. Die zweithäufigste Krebsart stellt geschlechtsunabhängig der Darmkrebs dar. Die meisten Todesfälle treten bei der männlichen Bevölkerung jedoch durch den Befall der Lunge auf, während bei Frauen auch hier der Brustdrüsenkrebs als Ursache überwiegt.

Allgemein versteht man unter dem Krankheitsbild Krebs das Auftreten maligner Tumore beziehungsweise bösartiger Neoplasien (Gewebeneubildung) sowie Erkrankungen des blutbildenden Systems (Hämoblastosen), wobei stets ein unkontrolliertes Wachstum von Zellen zugrunde liegt. Dies resultiert aus einer Störung des Gleichgewichtes von Proliferation und Apoptose (Absterben) der Zellen im betroffenen Organismus, welche zu Gunsten des Zellwachstums ausfällt und nach *Hanahan* und *Weinberg* auf folgende Mutationen der Krebszellen zurückzuführen ist:<sup>[3,4]</sup>

- Selbstversorgung mit Wachstumssignalen: Im Gegensatz zu gesunden Zellen sind die entarteten Tumorzellen nicht auf externe Wachstumssignale angewiesen und entziehen sich somit der Kontrolle durch den Organismus.
- Unfähigkeit zur Apoptose: Während normale Zellen im Fall von Defekten befähigt sind, ihren eigenen Zelltod einzuleiten, so ist dieses Attribut bei Krebszellen nicht mehr vorhanden.
- Unempfindlichkeit gegenüber Apoptose verursachende Stimulation: Zusätzlich reagieren die malignen Zellen auch nicht mehr auf zellteilungshemmende Signale des Organismus.
- Unbegrenztetes Wachstumspotential: In gesunden Zellen wird die Zellteilung durch die Verkürzung von Telomeren bei jeder Teilung kontrolliert. Werden diese Ketten zu kurz, wird entweder das Wachstum gestoppt oder der Zelltod eingeleitet. Durch Überexpression des Enzyms Telomerase in malignen Zellen, welches die Telomere verlängert, ist ein grenzenloses Wachstum der mutierten Zellen möglich.
- Induzierte Angiogenese: Alle Zellen sind im Wachstum von der Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff abhängig. Während im gesunden menschlichen Organismus die Anzahl an Blutgefäßen in erster Näherung konstant ist, sind maligne Zellen in der Lage Gefäßneubildungen anzuregen und können daher überdurchschnittlich schnell wachsen.
- Invasion und Metastasierung: Im Gegensatz zu gesunden Zellen, die bis auf wenige Ausnahmen fest lokalisiert sind, können Tumorzellen in benachbartes Gewebe eindringen und sich bei Invasion der Blut- und Lymphgefäße im Körper bewegen und andernorts erneut ansiedeln (Metastasen).

Als Auslöser für die Entartung der Zellen kommen unterschiedliche erbgutverändernde Faktoren in Frage. Häufig sind physikalische Einflüsse, wie z. B. elektromagnetische, radioaktive oder ultraviolette Strahlung, Chemikalien, die nicht selten über Konsumgüter oder die Nahrung aufgenommen werden, oder auch virale beziehungsweise bakterielle Kontakte für die Schädigung des genetischen Materials verantwortlich. Um eine genauere Einordnung der vielseitigen Krebsarten zu ermöglichen, klassifiziert man die Tumore in der Medizin nach der Herkunft des entarteten Gewebes. Den häufigsten Ursprung haben die malignen Veränderungen im Epithelgewebe, wobei sie im Falle des Deckgewebes der Haut und der Schleimhäute als Karzinome, in Drüsengewebe hingegen als Adenokarzinome bezeichnet werden. Beginnt das unkontrollierte Wachstum demgegenüber im Binde- oder Stützgewebe (z. B. Fettgewebe, Muskeln, Sehnen, Knochen) spricht man von Sarkomen, während das Auftreten von Mutationen in der Entwicklungsphase von Organen und Geweben, den embryonalen Tumoren, zu sogenannten Blastomen führt. Zusätzlich zu den hier aufgeführten „soliden“ Tumoren, die aus einem anfangs festen und lokal begrenzten Gewebe entspringen, kann es auch zu hämatologischen Krebsformen, den sogenannten systemischen Erkrankungen des Blutes oder der blutbildenden Organe, den Leukämien und Lymphome, kommen.

Die hier aufgeführten unterschiedlichen Ausprägungen der Krankheit, die von lokal definierten Tumoren bis zu metastasierenden oder systemischen Auswüchsen reichen, führen zu diversen Therapiestrategien und variieren stark in den Erfolgsaussichten. Während definiert auftretende Tumore oft durch chirurgische Eingriffe komplett oder zumindest zu großen Teilen entfernt werden können, was bei früh diagnostizierten Krebserkrankungen recht wahrscheinlich ist, wird bei einer metastasierenden Erkrankung die Behandlung in der Regel mit Chemo- und/oder Strahlentherapie ergänzt. In der Chemotherapie werden dem Patienten starke Zytostatika zur Hemmung der Zellteilung verabreicht. Derselbe Prozess kann auch durch Bestrahlung induziert werden. Hierbei wird der Körper energiereicher Strahlung, sei es in Form von Röntgen-, Elektronen-, Protonen- oder Ionenstrahlung, ausgesetzt, die vor allem sich schnell teilende Zellen beeinflusst. Zudem kann bei bestimmten Tumorerkrankungen auf einen nuklearmedizinischen Ansatz durch Applikation von Radiopharmaka, die direkt an der Tumorzelle wirken, zurückgegriffen werden. Bis auf die selten ausreichende chirurgische Entfernung handelt es sich bei den aufgeführten Methoden um unspezifische Behandlungen, die mit erheblichen Schädigungen des umliegenden Gewebes oder nicht-entarteten teilungsaktiven Zellen einhergeht. Das Resultat sind unter anderem Haarausfall, Übelkeit, ernsthafte Organschäden und eine Anfälligkeit für Infektionen durch eine signifikante Schwächung des Immunsystems. Aufgrund der genannten Unzulänglichkeiten der gegenwärtigen Behandlungsmöglichkeiten, die hauptsächlich aus der mangelnden Selektivität der Therapeutika resultieren, ist das Interesse an der

Entwicklung einer spezifischen Methode gegen das Krankheitsbild Krebs sehr hoch. So gelang es beispielsweise *H. zur Hausen* einen antiviralen Impfstoff gegen den durch humane Papillomviren bedingten Gebärmutterhalskrebs zu entwickeln, wofür er 2008 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde.<sup>[5]</sup> Neben der rein prophylaktischen Wirkweise dieses Vakzins ist man in der Erforschung der Krebsimmuntherapie zudem bestrebt, Antitumorwirkstoffe zu entwickeln, deren Einsatz auch in einer akuten Behandlung möglich ist. Das Ziel eines solchen Antitumorimpfstoffes ist die spezifische Aktivierung des angeborenen sowie des adaptiven Teils des Immunsystems gegen die malignen Strukturen. Dabei soll eine eindeutige Identifikation der entarteten Zellen durch das Immunsystem erfolgen, um das gesunde Gewebe entsprechend zu schonen. Durch eine körpereigene aktive Immunreaktion wäre der Organismus somit im Stande, einen Tumor inklusive eventueller Metastasen zielgerichtet zu bekämpfen und bei gleichzeitiger Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses im adaptiven Teil einen erneuten Ausbruch der Krankheit zu verhindern. Um jedoch die Spezifität der Immunantwort zu garantieren, muss ein charakteristisches und zuverlässiges Unterscheidungsmerkmal zwischen gesunder und entarteter Zelle zur Differenzierung zugrunde liegen. Das Oberflächenprotein MUC1 aus der Klasse der Mucine stellt eine vielversprechende Struktur dar, die es ermöglichen kann, Tumorzellen selektiv anzusteuern. Es wurde daher im Rahmen dieser Arbeit als Target für eine spezifische Immuntherapie auf Basis tumorselektiver Vakzine ausgewählt.

## 1.2 Das Mucin MUC1

Bei Mucinen, deren Namen sich von „mucus“, dem lateinischen Wort für Schleim, ableitet, handelt es sich um hochmolekulare, polymorphe Glycoproteine, die hauptsächlich vom epithelialen Gewebe des Gastrointestinal- und des Bronchialtraktes auf der apicalen Zelloberfläche exprimiert werden.<sup>[6]</sup> Sie dienen in erster Linie dem Schutz der Zelloberfläche vor Einwirkungen durch Mikroorganismen, proteolytische Enzyme, Säure oder überhöhte Ionenkonzentrationen.<sup>[7]</sup> Man unterteilt die humanen Mucine in die Klassen der sekretorischen Proteine, welche mittels intermolekularer Disulfidbrücken hochviskose, oligomere Skelette ausbilden, und der membrangebundenen Proteine, zu denen beispielsweise das MUC1 gehört.<sup>[8]</sup> Dieses Mucin ist fest über einen hydrophoben Transmembranteil in der Membran verankert und verfügt über einen cytoplasmatischen Teil, der aufgrund zahlreicher potentieller Phosphorylierungsstellen einen wichtigen Bestandteil der Signaltransduktion darstellt.<sup>[9]</sup> Diese ausgedehnte extrazelluläre Domäne ragt 200 nm bis 800 nm in das Lumen

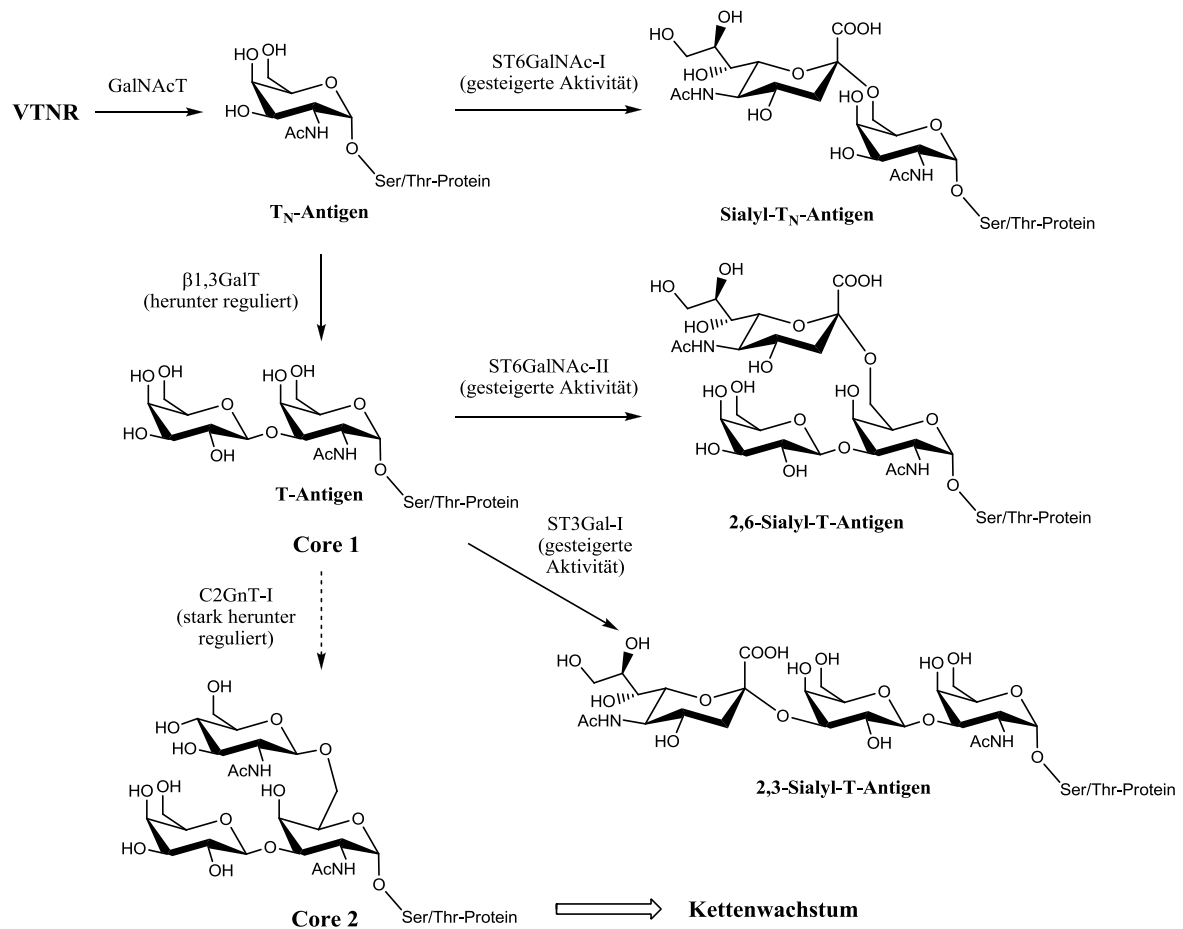
hinein<sup>[10]</sup> und ist neben der einleitend erwähnten Schutzfunktion auch durch Wechselwirkungen mit dem Cytoskelett für Zell-Zell-Adhäsionsprozesse mitverantwortlich.<sup>[11]</sup> Die nicht-kovalent mit der Transmembranregion verbundene extrazelluläre Domäne<sup>[12]</sup> verfügt über ein Mucine-typisches Peptidrückgrat, welches zahlreiche oligomere Kohlenhydratseitenketten trägt, die zwischen 50 und 90 Gewichtsprozent des Proteins ausmachen.<sup>[13]</sup> Betrachtet man den allgemeinen peptidischen Aufbau der Mucine, so bestehen diese aus repetitiven Aminosäuresequenzen, den sogenannten *tandem repeats*, die für jedes Mucin charakteristisch sind und sich 20- bis 125-mal wiederholen können (*varial number of tandem repeats*, VTNR).<sup>[14,15]</sup> Eine Gemeinsamkeit aller *tandem repeats* ist der große Anteil der Aminosäuren Prolin, Serin und Threonin, wobei die beiden Letztgenannten durch ihre  $\beta$ -Hydroxylfunktionen potentielle *O*-Glycosylierungsstellen für den Aufbau der saccharidischen Seitenketten bereitstellen. Im Falle des MUC1 besteht die *tandem repeat*-Einheit aus 20 Aminosäuren (H-G-V-T-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P-P-A), wobei die Sequenz dreimal Threonin und zweimal Serin beinhaltet, wodurch fünf mögliche Anknüpfungspunkte für Zuckerbausteine zur Verfügung stehen. An welchen Positionen letzten Endes glycosyliert wird und wie sich der genaue Aufbau der Kohlenhydratseitenketten gestaltet, hängt vom Typ des Gewebes und dem Entwicklungsstand der Zelle ab. Die Glycosylierungsmuster lassen sich jedoch für alle Mucine auf acht Kernstrukturen (Core 1-8) zurückführen (Abb. 1.2), wobei für das MUC1 lediglich das Core 1- und das Core 2-Gerüst relevant sind.<sup>[15]</sup>

Core 1:	$\beta$ Gal-(1,3)- $\alpha$ GalNAc- <i>O</i> -Thr/Ser
Core 2:	$\beta$ Gal-(1,3)-[ $\beta$ GlcNAc-(1,6)-] $\alpha$ GalNAc- <i>O</i> -Thr/Ser
Core 3:	$\beta$ GlcNAc-(1,3)- $\alpha$ GalNAc- <i>O</i> -Thr/Ser
Core 4:	$\beta$ GlcNAc-(1,3)-[ $\beta$ GlcNAc-(1,6)-] $\alpha$ GalNAc- <i>O</i> -Thr/Ser
Core 5:	$\alpha$ GalNAc-(1,3)- $\alpha$ GalNAc- <i>O</i> -Thr/Ser
Core 6:	$\beta$ GlcNAc-(1,6)- $\alpha$ GalNAc- <i>O</i> -Thr/Ser
Core 7:	$\alpha$ GalNAc-(1,3)- $\alpha$ GalNAc- <i>O</i> -Thr/Ser
Core 8:	$\alpha$ Gal-(1,3)- $\alpha$ GalNAc- <i>O</i> -Thr/Ser

**Abb. 1.2 Kernstrukturen der *O*-Glycane bei Mucinen**  
(Gal: Galactose; GalNAc: N-Acetylgalactosamin; GlcNAc: N-Acetylglucosamin).

Nach erfolgter Proteinbiosynthese im Ribosom werden die komplexen Oligosaccharidketten im *Golgi*-Apparat am Peptidrückgrat aufgebaut. Im Falle des MUC1 erfolgt initial mittels enzymatischer Glycosylierung an den bereits erwähnten  $\beta$ -Hydroxylgruppen des Serins und/oder des Threonins die  $\alpha$ -selektive Anbindung von *N*-Acetylgalactosamin durch eine entsprechende Transferase.<sup>[16]</sup> Durch schrittweise Verlängerung der Kette wird

die entstandene T<sub>N</sub>-Antigenstruktur im weiteren Verlauf durch  $\beta$ -selektive Galactosylierung in die Core 1-Struktur, das sogenannte *Thomsen-Friedenreich*-Antigen (T-Antigen), überführt. Daraus kann durch enzymatische  $\beta$ -Verknüpfung von *N*-Acetylglucosamin an Position 6 der Galactosamineinheit direkt die Core 2-Struktur gebildet werden. Aufbauend auf diesen beiden elementaren Bausteinen wachsen die hochmolekularen Seitenketten durch diverse enzymatische Glycosylierungsprozesse an. Während die hier beschriebenen Transformationen alle im *cis-Golgi* ablaufen, findet die Terminierung der Oligosaccharide mittels enzymatischer Sialylierung, Fucosylierung oder Sulfatierung im zur Plasmamembran ausgerichteten *trans-Golgi* statt. Durch den hier beschriebenen Aufbau zahlreicher und voluminöser Kohlenhydratseitenketten sowie den erheblichen Anteil der helixbrechenden Aminosäure Prolin in der *tandem repeat*-Sequenz nimmt das gesunde MUC1-Protein eine langgestreckte, starre, weit in das Lumen hineinragende Konformation ein, wobei das Peptidrückgrat komplett von den komplexen oligomeren Sacchariden abgeschirmt wird. Betrachtet man hingegen Tumorzellen, bei denen eine starke Überexpression des MUC1 auftritt, stößt man auf fehlerhafte Enzymaktivitäten im *Golgi*-Apparat. So wurden beispielsweise in der Brustkrebszelllinie T47D eine starke Verkürzung der Kohlenhydratseitenketten festgestellt,<sup>[17,18]</sup> die von einer deutlich verminderten Aktivität der für das Kettenwachstum verantwortlichen Glucosaminyl- und der Galactosyltransferasen bei einer gleichzeitig stark erhöhten Expression der terminierenden Sialyltransferasen<sup>[19,20]</sup> ausgelöst werden. Als Resultat wird das Wachstum bereits auf der Core 1-Struktur beendet und anstelle der langen Oligosaccharidketten trägt das Peptidrückgrat der entarteten Zelle hauptsächlich T<sub>N</sub>-, T- und die dazugehörigen sialylierten Strukturen, die als tumorassoziierte Antigene (TAA) bezeichnet werden (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3 Enzymatische O-Glycosylierungen der Mucine.**  
(VNTR: „varial number of tandem repeats“; GalNAcT: Galactosaminyltransferasen;  
ST6GalNAc: α-2,6-Sialyltransferase; ST3Gal: α-2,3-Sialyltransferase; β1,3GalT: β-1,3-Galactosyltransferase; C2GnT: β-1,6-Glucosaminyltransferase)

Die malignen Tumorzellen weisen also deutliche strukturelle Unterschiede zu gesunden Zellen auf, anhand deren eine Differenzierung der Zellen möglich ist. So löst die Überexpression des Mucins eine Ausweitung des Vorkommens auf der gesamten Zelloberfläche (bei gesunden Zellen ist das MUC1 stets auf die apicale Seite beschränkt) aus, was wiederum zum Verlust der Polarisierung der Zelle und einer Veränderung der Oberflächenstruktur führt. Da zudem die Kohlenhydratseitenketten wegen modifizierter Enzymaktivitäten stark verkürzt vorliegen, nehmen die Glycoproteine nicht mehr zwangsläufig eine starre, gestreckte Konformation ein, wodurch vorher abgeschirmte Peptidepitope, wie die immundominanten Domänen GSTA und PDTRP der MUC1-tandem repeat,<sup>[21]</sup> exponiert werden und dem Immunsystem zugänglich sind. Beispielsweise liegt die PDTRP-Sequenz in einer turn-Konformation vor, die knaufartig hervorsticht.<sup>[22]</sup>

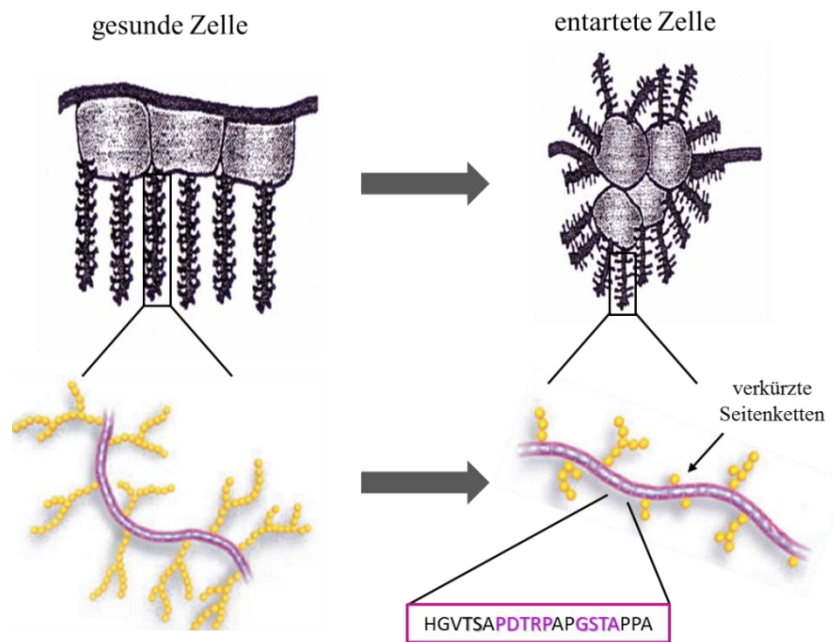


Abb. 1.4 Strukturveränderung des MUC1 in entarteten Zellen.

Aufbauend auf den hier erläuterten Unterschieden des Oberflächenglycoproteins MUC1 bei gesunden und tumorösen Zellen existiert also eine Möglichkeit zur zuverlässigen Differenzierung zwischen natürlichem und entartetem Gewebe, die eine selektive Aktivierung des Immunsystems erlaubt. So wurde das MUC1 bei einer Priorisierung von Antigenen (unter Berücksichtigung der Antigenhäufigkeit, der Antitumoraktivität, der Auslösung von Immunantworten sowie deren Spezifität) für die Entwicklung von Antitumorvakzinen als eine der lohnendsten Zielstrukturen eingestuft.<sup>[23]</sup>

### 1.3 Tumorassoziierte Antigene in der aktiven Immuntherapie

Im Bereich der immuntherapeutischen Behandlung unterscheidet man generell zwei verschiedene Modelle: die aktive und die passive Immuntherapie. Während Letztere auf der Verabreichung von Antikörpern basiert, die das maligne Gewebe vernichten sollen, ist das Ziel der aktiven Immuntherapie die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen die Tumorzellen. In erster Linie wäre solch eine medikamentöse Maßnahme in Ergänzung zu operativen Entfernungen von Tumoren einsetzbar, um Metastasen durch das Immunsystem zu bekämpfen. Idealerweise resultiert aus einer derartigen Behandlung



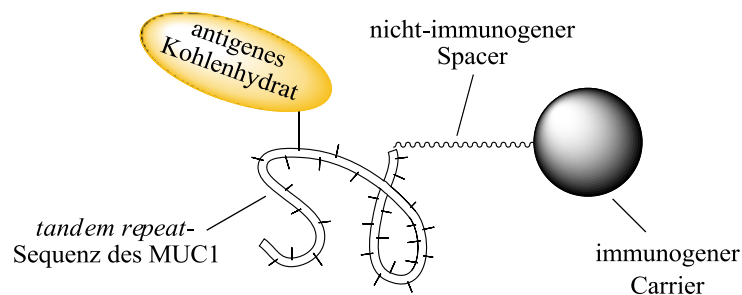
die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gegen die bereits bekannten Tumorzellen, wodurch eine Wiedererkrankung verhindert würde.<sup>[24]</sup>

Ein vielversprechendes Modell für ein solches Vakzin stellt das in Kapitel 1.2 vorgestellte tumorassoziierte Antigen MUC1 dar. Aufgrund der Freilegung der immundominanten Domänen auf der *tandem repeat*-Einheit des Peptids und der Verkürzung der Kohlenhydratseitenketten ist eine angemessene Differenzierung der entarteten Zellen möglich. Dennoch existiert eine Aktivierungsschwelle des Immunsystems, die für eine ausreichend starke und selektive Immunreaktion überschritten werden muss. Sie lässt sich physiologisch darauf zurückführen, dass es sich um körpereigenes Gewebe handelt und eine gewisse Toleranz zur Vermeidung von Autoimmunerkrankungen unumgänglich ist. Zudem verfügen Tumorzellen über diverse immunsuppressive Mechanismen, die einen Angriff durch Immunzellen ebenfalls hemmen.<sup>[25]</sup> So führen zum Beispiel die vermehrte Sekretion von Cytokinen, wie dem TNF- $\beta$ , die durch geringere HLA-Expression verminderte Antigenpräsentation, ein häufiger Mangel an kostimulierenden Faktoren oder schlichtweg ein schlechter lokaler Zugang zum Tumorgewebe zu einer Steigerung der Toleranz gegenüber erkrankten Zellen. Die Grundlage einer effektiven Therapie liegt daher in der Generierung einer durchdringenden humoralen und zellulären Immunantwort, welche sich in einer cytotoxischen T-Zellantwort und einer T-Zell-vermittelten Antikörperproduktion äußert.

Für die Antikörperproduktion sind zuvor aktivierte B-Zellen, die zu Gedächtnis- und Plasmazellen differenzieren, verantwortlich. Die dazu benötigte Aktivierung basiert auf der Erkennung des Antigens durch den B-Zellrezeptor und die gekoppelte Stimulierung durch T-Helferzellen. Um solch eine T-Zell-vermittelte Antwort zu erreichen müssen nach Bindung des Antigens an den B-Zellrezeptor und dessen anschließender Endocytose T-Zellepitope über den MHC-II (*major histocompatibility complex*) an der B-Zelloberfläche präsentiert werden, die dann von der T-Zelle erkannt werden. Durch weitere Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen und die Sekretion von kostimulatorischen Faktoren durch die T-Helferzelle wird schließlich die Proliferation und die Differenzierung der B-Zelle eingeleitet und es kommt zur Ausschüttung von Antikörpern (siehe auch: Kap. 3.4.2). Diese sind in der Lage die antigenen Strukturen auf den Tumorzellen für Makrophagen zu markieren und eine Lyse der malignen Zellen auszulösen. Die zusätzliche Ansteuerung des humoralen Arms des Immunsystems bedeutet die Aktivierung einer weiteren Klasse von T-Zellen, den cytotoxischen T-Zellen. Im Gegensatz zu den T-Helferzellen reagieren diese auf antigen-präsentierende Zellen (APC), wie z. B. dendritische Zellen, Monozyten oder auch Makrophagen. Diese präsentieren die entsprechenden Epitope über den MHC-I auf ihrer Oberfläche, wobei zusätzliche kostimulierende Cytokine und weitere Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen

für eine effektive Aktivierung notwendig sind. Bei erfolgreicher Erkennung und Aktivierung schütten die cytotoxischen T-Zellen schließlich Perforine, deren Aufgabe die Durchdringung der Membran und die Formung einer Pore ist, sowie Granzyme aus, die durch die gebildete Pore eindringen und den programmierten Zelltod (Apoptose) der MHC-I-tragenden Zelle induzieren.

Wie bereits angedeutet wurde, muss bei der Entwicklung eines potenten Antitumorvakzins für die aktive Immuntherapie die zugrunde liegende Antigenstruktur einigen Ansprüchen genügen. In erster Linie ist die spezifische Identifizierung unumgänglich, um autoimmune Reaktionen gegen körpereigenes Gewebe zu verhindern. Zudem muss der Impfstoff zugängliche B-Zellepitope enthalten, die vom B-Zellrezeptor detektiert werden können. Damit ferner eine ausreichend starke T-Zell-vermittelte Antikörperproduktion und eine direkte Bekämpfung der Tumorzellen durch T-Killerzellen erfolgen kann, müssen auch entsprechende T-Zellepitope vom Vakzin bereitgestellt werden. Daher wird im Rahmen dieser Dissertation die Entwicklung eines Vakzins auf der Basis von MUC1-artigen Strukturen untersucht, das folgenden schematischen Aufbau besitzt:<sup>[26]</sup>



**Abb. 1.5** Konzipierung eines MUC1-basierten Vakzins.

Während die glycosylierte *tandem repeat*-Sequenz des MUC1 für die Erkennung durch den B-Zellrezeptor und somit die Spezifität des Vakzins zuständig ist, wird durch die Anbindung über einen indifferenten Linker an ein geeignetes immunogenes Carrierprotein auch die Präsentation der erforderlichen T-Zellepitope gewährleistet. So wurde in der Vergangenheit über zahlreiche Beispiele von tumorassoziierten Antigenen, die an unterschiedliche immunogene Carrier angebinden wurden, berichtet. Insbesondere die Arbeitsgruppen von *H. Kunz*<sup>[27,28,29]</sup> und *G.-J. Boons*<sup>[30,31]</sup> haben sich in diesem Zusammenhang erfolgreich mit der Synthese der MUC1-basierten Strukturen sowie deren Konjugation an geeignete Immunstimulanzien beschäftigt.

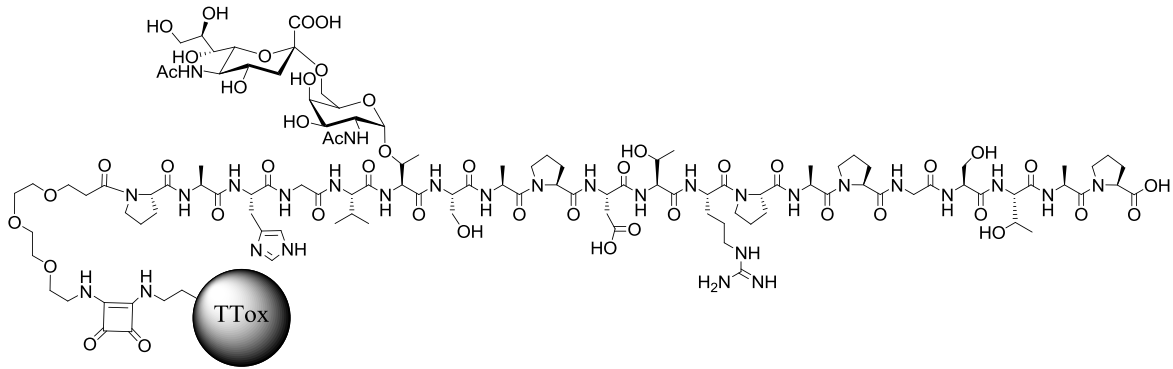


Abb. 1.6 Vakzin aus der Arbeitsgruppe Kunz.<sup>[32]</sup>

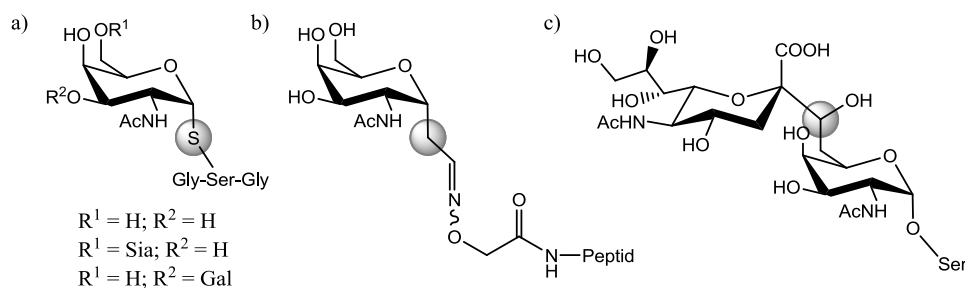
In jüngster Vergangenheit konnte durch *Kunz et al.* gezeigt werden, dass vor allem die Verwendung des Tetanus Toxoids (TTox), welches ohnehin beim Menschen zur Impfung gegen Wundstarrkrampf eingesetzt wird, robuste und selektive Immunantworten erlaubt (Abb. 1.6)<sup>[33,34]</sup>, wobei die aus Immunisierungsstudien an transgenen Mäusen erhaltenen Antikörper an humane Zellen der Brustkrebszelllinien MCF7 und T-47D banden.<sup>[32]</sup>

Neben dem Trägerprotein TTox konnten *Danishesky et al.* auch von der erfolgreichen Konjugation des Hämocyanins der Schlüssellocknapfschnecke (keyhole limpet hemocyanin, KLH) als immunogenen Träger an ein T<sub>N</sub>-Antigen-Trimer als B-Zellepitop berichten.<sup>[35]</sup> Ein verwandter Ansatz zur hier diskutierten Strategie der Anbindung an T-Zellepitope stellt die Adressierung des Toll-like (TL)-2-Rezeptors dar. Dieser kann durch Wechselwirkungen mit adäquaten Liganden zur Ausschüttung von Cytokinen stimuliert werden, die zur Aktivierung von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen führt.<sup>[36,37]</sup> Einen solchen Liganden stellt das Lipopeptid Pam<sub>3</sub>Cys dar, dessen Struktur vereinfacht auf dreifach mit Palmitinsäure acyliertem Cystein beruht. Während in der Arbeitsgruppe von *Kunz* das Pam<sub>3</sub>Cys mit der kompletten, einfach glycosylierten MUC1-*tandem repeat*-Domäne kombiniert wurde,<sup>[38]</sup> setzten *Boons und Mitarbeiter* lediglich eine einfach glycosylierte, kurze Teilsequenz der Wiederholungseinheit ein, verknüpften diese jedoch über ein T-Zellepitop mit dem TL-2-Liganden zu einem „3-Komponenten-Vakzin“.<sup>[30]</sup> Die Kombination beider Herangehensweisen findet sich schließlich in einer aktuellen Veröffentlichung von *R. J. Payne*,<sup>[39]</sup> in der das Pam<sub>3</sub>Cys über einen Oligoethylenglykol-Spacer und ein kurzes T-Zellepitop mit einer kompletten und vollständig glycosylierten MUC1-*tandem repeat*-Sequenz verknüpft wird. In allen Fällen konnten toleranzbrechende Immunantworten beobachtet werden, wobei *Boons*<sup>[40]</sup> und *Payne*<sup>[39]</sup> ebenfalls die Erkennung menschlicher Brustkrebszellen durch die gebildeten Antikörper nachweisen konnten.

Einhergehend mit dem gesteigerten Interesse an der Entwicklung potenter Anti-Krebs-Vakzine für die Immuntherapie ist auch der Einsatz von entsprechenden Strukturanaloga in den Fokus aktueller Forschungsarbeiten geraten.<sup>[41,42,43]</sup> Dabei versucht man durch geringfügige atomare oder auch molekulare Veränderung der natürlichen Leitmotive eine Optimierung der Eigenschaften, in der Regel der immunologischen Wirkung oder der metabolischen Stabilität, zu erreichen. Bestandteil dieser Arbeit ist zu diesem Zweck die Untersuchung der Auswirkungen des Austausches von Hydroxylgruppen durch bioisosteres Fluor in Vakzinkandidaten. Insbesondere sollen die strukturell modifizierten Impfstoffkandidaten im direkten Vergleich zu den natürlichen Strukturen auf ihre immunologischen Eigenschaften geprüft werden.

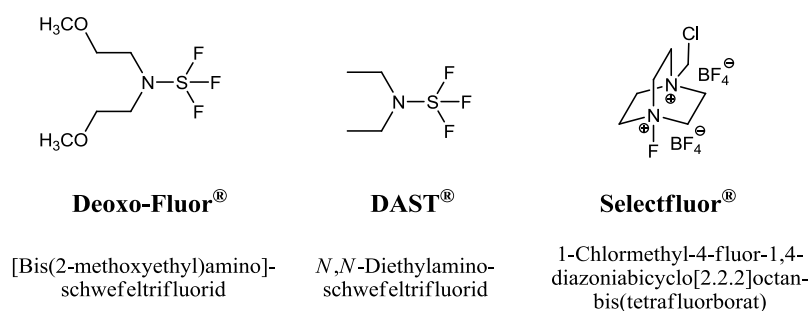
## 1.4 Fluorierte Antigenanaloga für die Immuntherapie

Bei der Entwicklung und Optimierung von Vakzinen aus tumorassoziierten Antigenen wird der Modifizierung natürlicher Kohlenhydratgruppen zunehmend Bedeutung beigemessen. Häufig mangelt es den glycosidisch verknüpften Strukturen an chemischer und metabolischer Stabilität. Die acetalischen Bindungen zwischen den einzelnen Zuckerbausteinen bzw. mit dem Peptidrückgrat sind stets ein Angriffspunkt für den enzymatischen Abbau durch Glycosidasen, so dass kaum zufriedenstellende Zirkulationszeiten im Organismus zu erreichen sind. Um den damit einhergehenden Verlust der für die Spezifität benötigten Erkennungsstrukturen zu vermeiden, wird versucht, die Labilität der Saccharidgruppen durch möglichst geringfügige Eingriffe in das Kohlenhydratgerüst zu vermindern. Eine naheliegende Methode zur Stabilisierung ist der Austausch des Sauerstoffatoms am anomeren Zentrum und die Aufhebung der säurelabilen Acetalstruktur ohne die elementaren Charakteristika der Zucker zu verändern. In der Literatur findet man daher zahlreiche Beispiele komplexer tumorassoziierter Kohlenhydratanaloga, deren Verknüpfungen S-<sup>[44,45,46]</sup> oder C-glycosidisch<sup>[47,48,49,50]</sup> gestaltet sind (Abb. 1.7) und deren gesteigerte Stabilität teilweise bereits nachgewiesen werden konnte.<sup>[47]</sup>



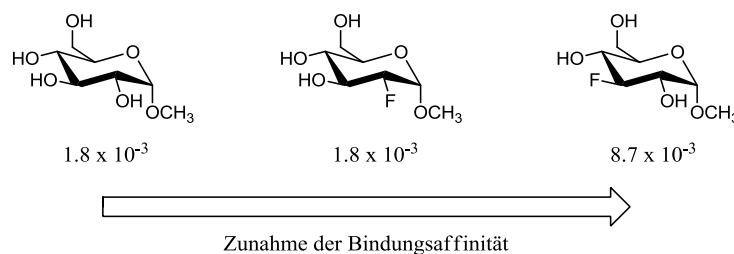
**Abb. 1.7 Beispiele modifizierter Antigenanaloga:**  
 a) Gin et al.<sup>[45]</sup> (Sia: Sialinsäure Gal: Galactosyl); b), c) Nicotra et al.<sup>[47,48]</sup>

Als weitere Option zur metabolischen Stabilisierung bietet sich der Austausch von Hydroxylgruppen gegen das oft ein bioisosteres Verhalten zeigende Fluoratom an. Aufgrund der geringen Unterschiede der Van der Waals-Radien eines Fluorsubstituenten und einer OH-Gruppe (OH: 1.40 Å; F: 1.47 Å) führt eine Substitution in erster Näherung zu keiner sterischen Beeinflussung der zugrundeliegenden Struktur beziehungsweise deren Konformation. Demgegenüber können die Auswirkungen durch den Einbau des elektronegativen und schwer polarisierbaren Fluorsubstituenten auf das elektronische System deutlicher sein und ein verändertes chemisches und physikalisches Verhalten der Verbindung nach sich ziehen. Insbesondere der Einfluss auf intermolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, die häufig eine elementare Rolle spielen, machen die fluorierten Verbindungen zu vielversprechenden Analoga. Die gezielte Untersuchung der Derivatisierung von Kohlenhydraten mit Fluor wird daher schon seit längerer Zeit betrieben, hat jedoch in jüngerer Vergangenheit durch die Entwicklung selektiver und leicht handhabbarer Fluorierungsreagenzien wie Deoxo-Fluor<sup>®</sup>,<sup>[51]</sup> DAST<sup>®</sup><sup>[52,53]</sup> oder Selectfluor<sup>®</sup><sup>[54,55]</sup> verstärkt an Interesse gewonnen.



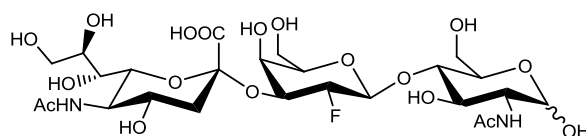
**Abb. 1.8 Moderne Fluorierungsreagenzien.**

Schon früh fanden fluoridierte Kohlenhydrate Anwendung in der Untersuchung spezifischer Adhäsionsprozesse und der Aufklärung enzymatischer Mechanismen. Im Arbeitsumfeld von *Stephen Withers* wurde bereits 1988 mit dem Einsatz entsprechender 2-Desoxy-2-fluor-D-glycosylfluoriden die kompetitive Hemmung verschiedener Galactosidasen, Glucosidasen und Mannosidasen gezeigt.<sup>[56]</sup> Nach immer detaillierteren Forschungen bezüglich des Einflusses von Fluorsubstituenten auf Wechselwirkungen mit Enzymen unter Zuhilfenahme von <sup>19</sup>F-NMR-Spektroskopie<sup>[57,58,59]</sup> konnte bereits 1994 von ersten Inhibierungen von  $\beta$ -Glucosidase sowie  $\beta$ -Mannosidase *in vivo* in Ratten berichtet werden.<sup>[60]</sup> Auch in aktuellen Forschungsarbeiten wird zur kovalenten Blockierung aktiver Zentren von Enzymen und der Aufklärung von Mechanismen durch <sup>19</sup>F-NMR auf fluoridierte Desoxy-Kohlenhydrate<sup>[61,62,63]</sup> sowie fluoridierte Pyrimidin- oder  $\alpha$ -Fluorketone zurückgegriffen.<sup>[64]</sup> Neben den Analysen zu Bindungen an Enzymen berichteten *Glaudemans et al.* 1989 von systematischen Untersuchungen zur Affinität monofluorierter Methylglucoside zum monoklonalen Immunglobulin IgA W3129. Dabei konnten die Autoren für das 2-Desoxy-2-fluor-Glycosid im Vergleich zur unfluorierten Glucose identische Bindungskonstanten nachweisen. Das in Position 3 fluoridierte Derivat zeigte darüber hinaus sogar dreimal so hohe Bindungskonstanten,<sup>[65]</sup> wofür die Acidifizierung der benachbarten Hydroxylfunktionen verantwortlich gemacht wurde, die zu stärkeren Wechselwirkungen mit dem Protein führen sollte.



**Abb. 1.9** Bindungskonstanten für das Immunglobulin IgA W3129.

Auch in komplexeren Oligosacchariden konnte durch *Davis und Mitarbeiter* gezeigt werden, dass trotz Einbaus eines Fluoratoms in die Position 2' eines Sialyllactosamins die Bindungseigenschaften zur TgMIC1-MAR-Rezeptor des Parasiten *Toxoplasma gondii*, einem dem Malaria-Erreger ähnlichen pathogenen Protein, nicht herabgesetzt wurden.<sup>[66]</sup>



**Abb. 1.10** 2'-F-Sialyllactosamin für Bindungsstudien.

Neben den hier angeführten Bindungsstudien, die weitestgehend in Labormodellen eruiert wurden, studierten *Matta et al.* durch Zugabe von peracetyliertem 4F-Galactosamin zu promyeloblastischen *human leukaemia* (HL)-60-Zellkulturen das tatsächliche Verhalten des Fluorzuckers *in vivo*.<sup>[67,68]</sup> Der fluorierte Zuckerbaustein wurde dazu *in vitro* durch Glycosyltransferasen *O*-glycosidisch in den P-Selektin-Glycoproteinliganden PSGL-1 eingebaut. Hierbei wurde eine Reduzierung des Glycananteils des Proteins von ungefähr 20% beobachtet, wobei allein der *N*-Acetyl-lactosamin-Anteil um 75% abnahm. Ebenso wurde die Expression des kutanen Lymphocyten-assoziierten Antigens HECA-452 nach nur zwei Zellteilungszyklen um über 80% reduziert. Zur Verifizierung der *in vitro*-Ergebnisse wurde eine Maus mit induzierter Peritonitis (Bauchfellentzündung) intravenös mit 4F-GalNAc behandelt, woraufhin eine deutlich reduzierte Leukozytenmigration und somit eine entzündungshemmende Wirkung festgestellt werden konnte.

Darüber hinaus konnte im Hinblick auf die in dieser Arbeit angestrebten vollsynthetischen modifizierten Glycoproteine als Impfstoffe von *Kihlberg und Mitarbeitern* 2003 der erfolgreiche Einbau eines an Hydroxylysin gebundenen 4-F-Galactose-Derivates in eine aus 15 Aminosäuren bestehende Partialsequenz des Kollagens Typ II berichtet werden.<sup>[69]</sup> In anschließenden Bindungsstudien blieb die Affinität zu Antikörpern, die gegen die natürlichen Strukturen gebildet wurden, vollständig erhalten. Darüber hinaus wurden in jüngster Vergangenheit in der Arbeitsgruppe von *A. Hoffmann-Röder* erste Vertreter von Glycopeptiden auf der Basis des tumorassoziierten MUC1 mit unterschiedlich fluorierten T-Antigen-Glycanseitenketten hergestellt sowie deren Konjugation an immunogene Carrier erfolgreich durchgeführt (Abb. 1.11).<sup>[42,70]</sup>

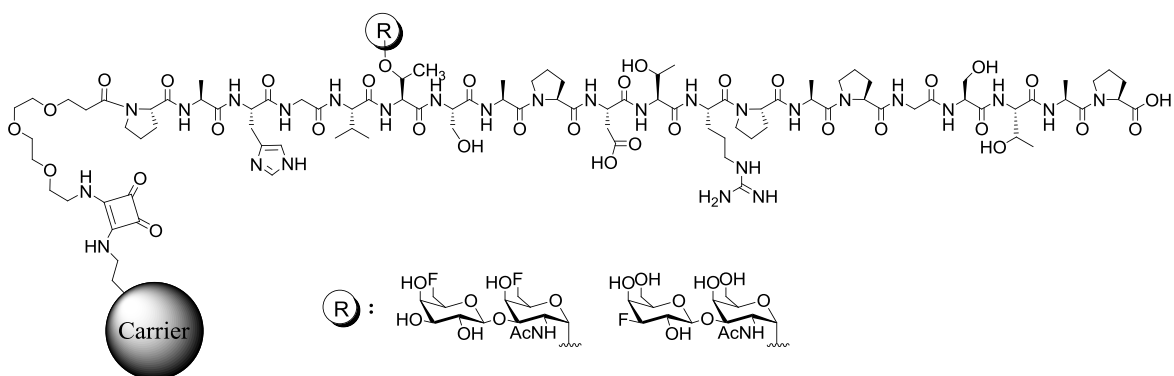


Abb. 1.11 Beispiele für fluorierte Vakzinkandidaten von Hoffmann-Röder et al..

Die z. B. von *S. Wagner* und *M. Johannes* hergestellten fluorierten Glycopeptidantigene (Abb. 1.11) wurden an TTox als Carrierprotein gebunden und im Mausmodell hinsichtlich ihrer immunologischen Eigenschaften evaluiert.<sup>[70]</sup> Dabei zeigte sich vor allem für das 6,6'-Desoxy-6,6'-difluor-T-Antigen-tragende Konjugat eine Immunantwort, die der entsprechenden nichtfluorierten Verbindung vergleichbar ist und die gewünschte MUC1-Spezifität der Antikörper liefert. Einen ersten Beleg für die erwünschte Steigerung der metabolischen Stabilität konnte zudem von *M. Johannes* erbracht werden,<sup>[71]</sup> der in Abbaustudien mit einer  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderhoden eine deutliche Verlangsamung der Hydrolyse bzw. deren Inhibierung für unterschiedlich fluoriierte T-Antigene nachweisen konnte.

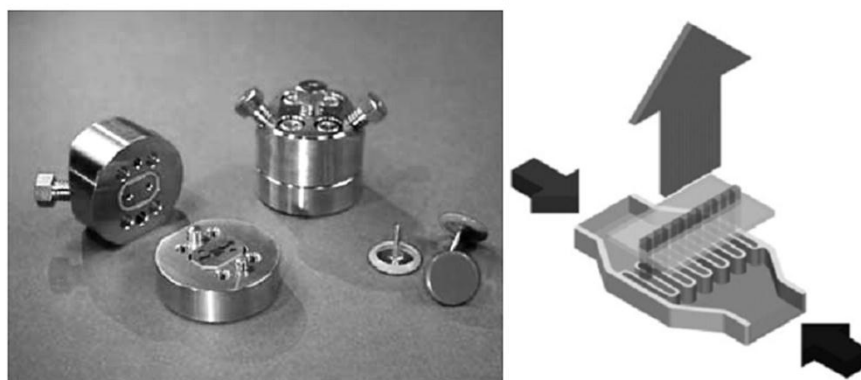
## 1.5 Mikroreaktoren in der organischen Synthese

In den letzten zehn Jahren findet man immer häufiger Beispiele für die Verwendung mikrostrukturierter Reaktorsysteme in der organischen Synthese. Diese Systeme ermöglichen eine effiziente Entwicklung von Feinchemikaliensynthesen und erleichtern deren Umsetzung in den Produktionsmaßstab. Daher konnte sich die Mikroreaktionstechnik in den letzten Jahren zunehmend in der chemischen Industrie etablieren.<sup>[72]</sup>

Unter mikrostrukturierten Reaktoren versteht man dreidimensionale Durchflusssysteme, die typischerweise über Innendurchmesser zwischen zehn Mikrometern und einem Millimeter verfügen, wobei die äußeren Dimensionen der Anlagen kein Kriterium darstellen.<sup>[73]</sup> Als direktes Resultat der kleinen Kanalquerschnitte der Kapillaren ergibt sich ein sehr großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, das sich im Fall einer zylindrischen Geometrie antiproportional zum Radius verhält, und damit problemlos Werte von 10 bis 50  $\text{mm}^{-1}$  annehmen kann.<sup>[74]</sup> Nähert man hingegen exemplarisch einen 1-L-Rundkolben als geschlossene Kugel mit einem Radius von 6 cm an, ergibt sich für das Oberfläche/Volumen-Verhältnis lediglich ein Wert von 0.05  $\text{mm}^{-1}$ . Dieser gravierende Unterschied von Mantelfläche zu Reaktionsvolumen spielt bei der Kontrolle und Einhaltung von Reaktionsbedingungen häufig eine entscheidende Rolle. Bei der Betrachtung von Reaktionstemperaturen muss stets berücksichtigt werden, dass Kühl- oder Heizelemente in der Regel nur durch den Kontakt mit der Oberfläche der Reaktoren die Temperatur regulieren. Kleine Verhältnisse von Oberfläche zu Volumen verursachen daher häufig einen Temperaturgradienten zwischen dem Zentrum und den Randgebieten der Reaktionsgefäße. Im Gegensatz dazu ermöglichen mikrostrukturierte Bauteile durch



ihre extrem hohe Wärmetauschleistung, sei es beim Aufheizen der Reaktionsmischung oder durch die rasche Abführung der entstehenden Reaktionswärme, eine annähernd isotherme Reaktionsführung. Sie erlauben auf diesem Wege die Handhabung stark exothermer Reaktionen sowie die exakte Einhaltung von Reaktionsparametern bei temperatursensiblen Reaktionen durch Vermeidung lokaler Überhitzungen. Weitere Vorteile ergeben sich aus der Durchführung von Reaktionen im Durchfluss. Der kontinuierliche Fluss der Reaktionslösung erlaubt das genaue Einstellen der Reaktionszeit und verhindert darüber hinaus durch Entfernung von bereits reagiertem Material aus der Reaktionszone die Bildung von Zersetzungsprodukten und das Auftreten von Folgereaktionen des angestrebten Produktes. Ein hierfür notwendiger Bestandteil der Reaktionsführung ist das sorgfältige Mischen der Edukte um eventuelle Konzentrationsgradienten der Reaktionslösung zu vermeiden. Zu diesem Zweck werden sogenannte Mikromischer eingesetzt, die den Mischprozess in möglichst kleinen Weglängen realisieren, so dass eine Homogenisierung des Reaktionsgemisches im Millisekundenbereich erfolgt.



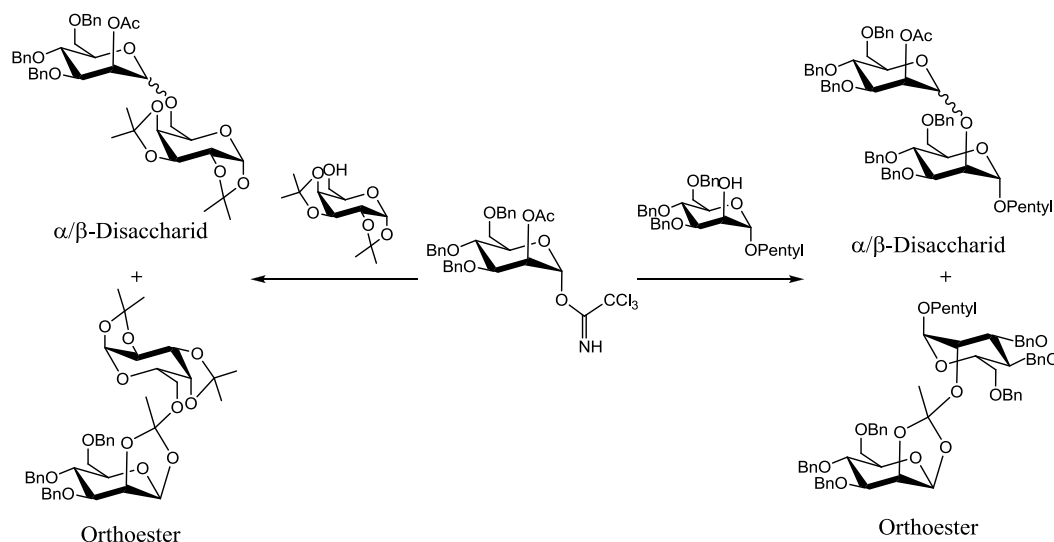
*Abb. 1.12 Laminarmischer SIMM-V2 (IMM).*

In Abb. 1.12 ist der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Schlitz-Interdigital-Mikromischer (SIMM-V2) des Instituts für Mikrotechnik Mainz (IMM) mit dem zugrunde liegende Mischprinzip dargestellt. Die beiden Komponenten werden durch mikrostrukturierte, lamellenartige Kanäle alternierend zusammengeführt und anschließend durch einen Ausgangsschlitz fokussiert.<sup>[75]</sup>

Die hier aufgeführten Spezifikationen der Durchflusstechnik in mikrostrukturierten Reaktorsystemen erlauben daher eine präzise Einhaltung der entscheidenden Reaktionsparameter. Von besonderem Interesse ist die Mikroreaktionstechnik daher im Hinblick auf die Ausweitung von Synthesen vom Labormaßstab hin zur Produktion. Während konventionell eine im Labor entwickelte Synthese im zeit- und kostenintensiven

*scale up*-Verfahren auf die Verwendung großer Rührkessel angepasst werden muss, wobei stets die eingehend erläuterte Problematik der Parameterkontrolle zu beachten ist, kann bei der Verwendung von Mikroreaktoren durch einfaches Parallelschalten von Reaktionskapillaren, dem sogenannten *numbering up*, schnell und effektiv ein laufendes Produktionsverfahren großtechnisch erschlossen werden.

Ausgelöst von den zahlreichen Vorteilen, die sich aus der Syntheseführung in Mikroreaktoren ergibt, hat sich deren Verwendung annähernd im gesamten Bereich der organischen Synthese als lohnende Alternative zur traditionellen Glaskolben-Synthese etabliert.<sup>[76,77,78]</sup> Im Hinblick auf diese Dissertation ist dabei die Verwendung der mikrostrukturierten Systeme beim Aufbau glycosidischer Bindungen von besonderem Interesse. Erste Optimierungsstudien wurden 2005 von *Seeberger et al.* anhand verschiedener Glycosylierungen im Mikroreaktor unter Berücksichtigung des stereochemischen Verlaufs und der Bildung von Orthoestern als Nebenprodukte beschrieben.<sup>[79,80]</sup>



**Abb. 1.13** Mikroreaktorgestützte Screenings von Glycosylierungen.

Bereits 2007 gelang es *Seeberger et al.* ein Oligosaccharid auf der Basis von Mannosylbausteinen im Mikroreaktor zu synthetisieren.<sup>[81]</sup> Durch die Verwendung eines über einen Heptenol-Linker angeordneten Perfluoralkyl-Anker am ursprünglichen Glycosylakzeptor konnten die Oligosaccharide nach beendeter Synthese leicht durch fluorogene Festphasen-Extraktion (*fluorous solid-phase extraction*, FSPE) gereinigt werden. Die Wahl des Linkers lässt zudem eine Reihe von späteren Funktionalisierungsschritten am Oligosaccharid-Baustein zu (Abb. 1.14).

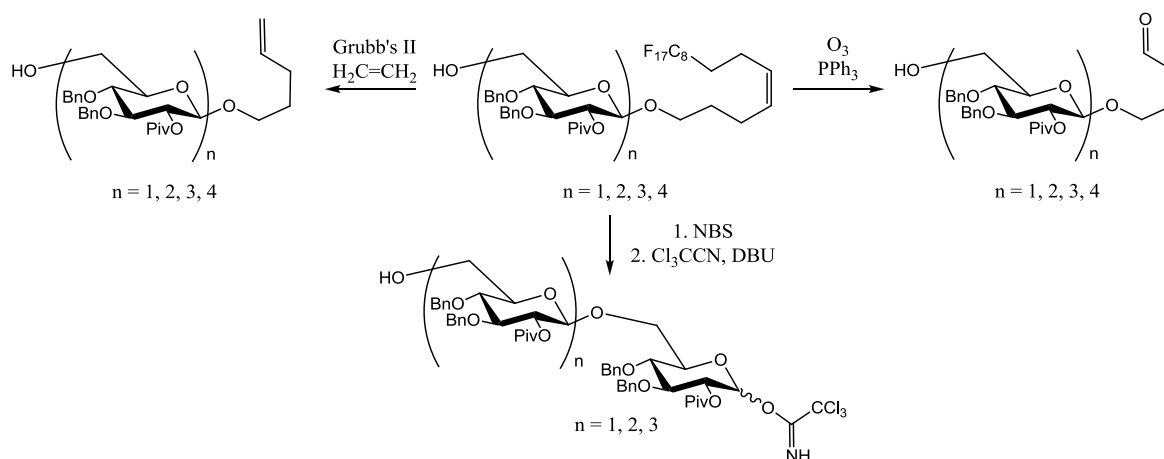


Abb. 1.14 Oligosaccharid aus Mikroreaktorsynthese.

Neben dem Aufbau beziehungsweise der Transformation von Zuckerbausteinen in mikrostrukturierten Systemen konnte in den letzten Jahren ebenfalls die Verwendung der in Kapitel 1.4 vorgestellten Fluorierungsreagenzien in *Continuous Flow*-Prozessen vorgestellt werden. Nachdem Anfang 2008 von *Negi et al.* die erfolgreiche Prozessentwicklung einer Deoxo-Fluor<sup>®</sup>-vermittelten Fluorierung eines Steroid-Gerüsts berichtet wurde,<sup>[82]</sup> folgten kurz darauf Veröffentlichungen der Arbeitsgruppen von *Seeberger* sowie *Ley* über den Einsatz weiterer Fluorierungsmittel in Mikroreaktoren.<sup>[83,84,85]</sup> Diese beinhalten zahlreiche Beispiele für Desoxyfluorierungen von einfachen und komplexen Alkoholen bzw. Carbonylverbindungen sowie Synthesen von Säurefluoriden und Glycosylfluoriden. Während *Seeberger*<sup>[83]</sup> sich auf die Verwendung von DAST<sup>®</sup> als Fluorierungsreagenz beschränkt beschreibt *Ley*<sup>[85]</sup> auch verschiedene Einsatzmöglichkeiten von Selectfluor<sup>®</sup>.

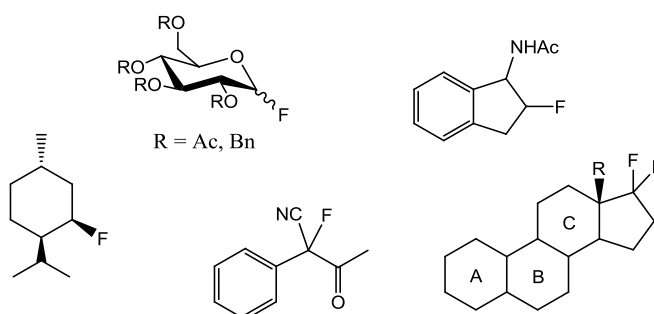


Abb. 1.15 Beispiele für Fluorierungen im Mikroreaktor.

Insbesondere bei diesen Prozessen bietet die Mikroreaktionstechnik große Vorteile im Umgang mit den teilweise giftigen und im Batch-Verfahren schwer zu kontrollierenden Fluorierungsmitteln.

## 2 ZIELSETZUNG

Das auf Tumorgewebe durch veränderte Enzymaktivitäten strukturell abweichende und stark überexprimierte Mucin MUC1 befähigt das menschliche Immunsystem prinzipiell zur Differenzierung von malignen und gesunden Zellen. Mit diesem Oberflächen-glycoprotein steht daher eine hochinteressante Leitstruktur für die Entwicklung einer spezifischen Tumorimmuntherapie zur Verfügung. Die gleichzeitige Präsentation der Peptid epitope und der Kohlenhydratseitenketten sollten dabei eine präzise und zuverlässige Erkennung der entarteten Zellen erlauben. Da die tumorassoziierten Antigene selbst jedoch nur schwach immunogen sind und deren direkte Anwendung keine ausreichende Immunantwort im zellulären und humoralen Arm des Immunsystems induziert, soll durch eine Konjugation an ein stark immunogenes, T-Zellepitope tragendes Trägerprotein (z. B. TTox) die gewünschte spezifische Immunreaktion gegen den Tumor hervorgerufen werden. Des Weiteren handelt es sich bei den Glycoproteinen um körpereigene Stoffe und da Tumorzellisolate nur mikroheterogen gewonnen werden können, bestünde bei Immunisierungen mit diesem Material stets die Gefahr einer Autoimmunreaktion gegen gesundes Gewebe. Es ist daher unumgänglich, bei den Impfungen auf exakt definierte Vakzine, die derzeit nur vollsynthetisch zugänglich sind, zurückzugreifen. Darüber hinaus soll durch strategisch eingebrachte Fluorsubstituenten in den Kohlenhydratseitenketten eine Steigerung der Bioverfügbarkeit durch die erhöhte Beständigkeit im Metabolismus erreicht werden, wobei nach Möglichkeit eine gleichbleibende immunologische Aktivität respektive der Spezifität der Vakzinkandidaten gewährleistet sein sollte. Um dies überprüfen zu können, soll daher die immunologische Evaluierung der fluorhaltigen Glycopeptid-Analoga stets im Vergleich zu Vakzinen auf Basis der natürlichen Strukturen erfolgen.

Anknüpfend an bereits in der Arbeitsgruppe von A. Hoffmann-Röder durchgeführte Untersuchungen bezüglich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen von fluorierten tumorassoziierten Antigenen,<sup>[41,42,70]</sup> ist das Ziel der vorliegenden Arbeit die Synthese mehrfach fluorierter MUC1-Analoga und deren Erprobung in Immunisierungsstudien.

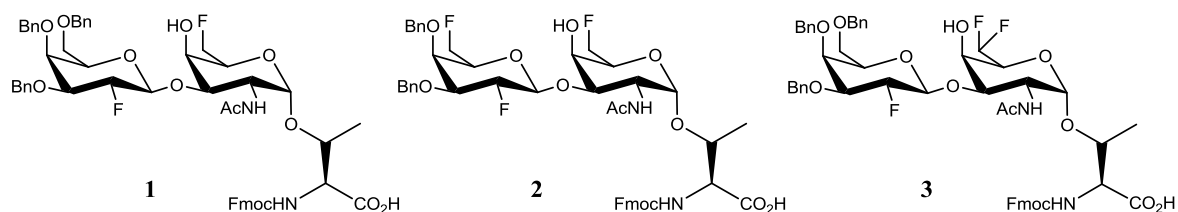


Abb. 2.1 Angestrebte mehrfach fluorierte Bausteine für die Festphasenpeptidsynthese.

Hierfür muss zunächst ein Zugang zu den unterschiedlich fluorierten T-Antigenanaloga **1**, **2** und **3** als Bausteine für die Festphasenpeptidsynthese entwickelt werden (Abb. 2.1). Der Aufbau der komplexen Disaccharide soll dabei durch  $\beta$ -selektive Glycosylierungsreaktionen an den entsprechend fluorierten Glycosylakzeptoren erfolgen.

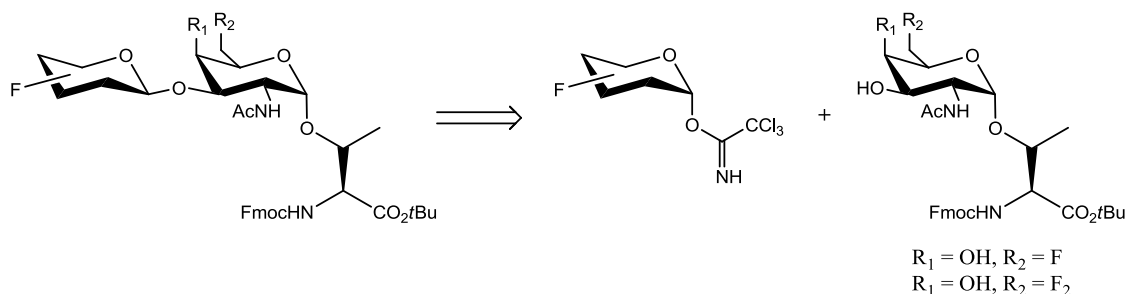


Abb. 2.2 Syntheseplan der fluorierten Disaccharide.

Die Synthese der fluorierten Glycosylaminosäuren mit einem frühen Einbau des Fluorsubstituenten hat sich in vorangegangenen Arbeiten als kostenintensiv und ineffizient erwiesen. Folglich sollte ein Verfahren zur späten Einführung des Fluorsubstituenten, d. h. nach dem Aufbau des als Glycosylakzeptor fungierenden  $T_N$ -Antigens entwickelt werden. Neben dem selektiven Einbau des Fluorsubstituenten muss hierfür zusätzlich eine geeignete Schutzgruppenstrategie erarbeitet werden (Abb. 2.3).

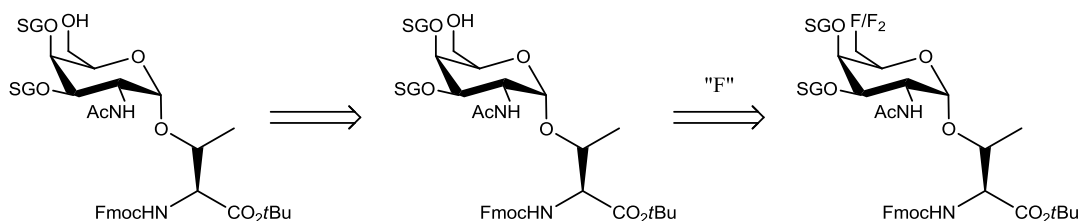


Abb. 2.3 Syntheschema der fluorierten  $T_N$ -Antigenanaloga.

Durch Kombination der erhaltenen fluorierten Glycosylakzeptoren mit den ebenfalls unterschiedlich fluorierten Galactosyldonoren wird schließlich ein modularer Aufbau verschiedener neuartiger T-Antigenanaloga ermöglicht.

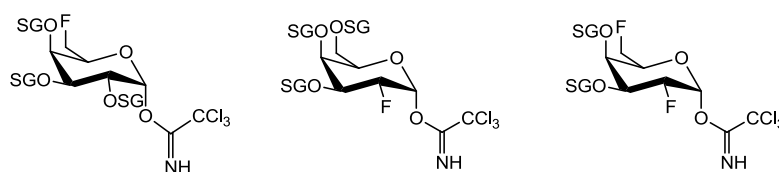


Abb. 2.4 Geplante Donoren für Glycosylierungsreaktionen.

Zu diesem Zweck werden die entsprechenden einfach sowie zweifach fluorierten Donorbausteine synthetisiert werden und in den jeweiligen Glycosylierungsreaktionen erprobt (Abb. 2.4). Hierbei muss im Hinblick auf die anschließend geplanten, automatisierten Festphasenpeptidsynthesen ein kompatibles Schutzgruppenmuster für die Donoren erarbeitet werden, um überflüssige Schutzgruppenmanipulationen zu vermeiden. Zusätzlich sollen, aufbauend auf Versuchsreihen der Diplomarbeit, weitere Untersuchungen zur Durchführung der Selectfluor<sup>®</sup>-vermittelten elektrophilen Fluorierung der Galactosylbausteine in *Continuous Flow*-Reaktionen zeigen, ob durch eine solche Prozessführung ein verbesserter Zugang zu den 2-Desoxy-2-fluor-Derivaten möglich ist.

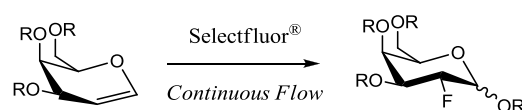


Abb. 2.5 Fluorierung in Position 2 der Galactose.

Eine besondere Herausforderung in dieser Arbeit stellen die erforderlichen  $\beta$ -selektiven Glycosylierungen der 2-Desoxy-2-fluor-Galactosyldonoren dar. Durch das Fehlen einer dirigierenden Nachbargruppe müssen an dieser Stelle geeignete Reaktionsbedingungen identifiziert werden, die vorzugsweise das *trans*-Glycosid liefern. Darüber hinaus ist die Untersuchung des Einsatzes von Mikroreaktoren in komplexen Glycosylierungsreaktionen, anknüpfend an erste vielversprechende Ergebnisse aus der Diplomarbeit, vorgesehen. Hierzu soll zunächst der Prozess für zwei bekannte, einfach fluorierte T-Antigenanaloga optimiert werden, da diese sich bereits in ersten immunologischen Studien als potente Kandidaten für die Entwicklung von Krebsvakzinen erwiesen haben.

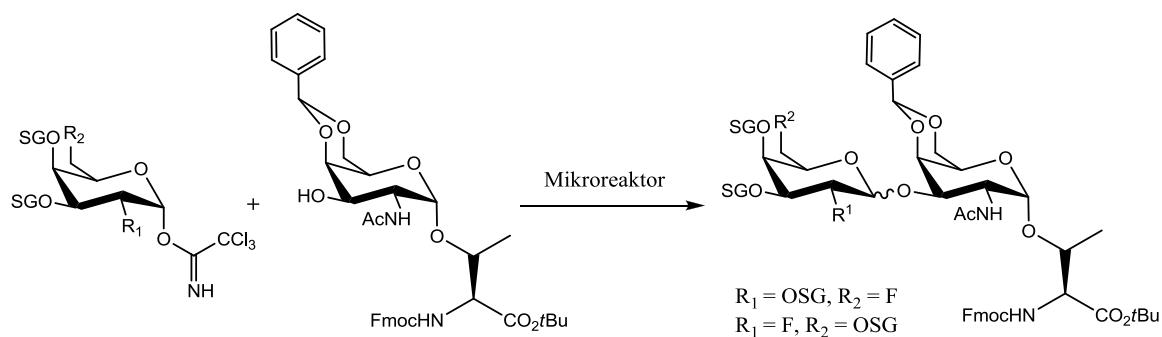


Abb. 2.6 Mikroreaktorunterstützte Glycosylierungen.

Anschließend sollen die in Abb. 2.1 gezeigten mehrfach fluoriierten T-Antigenanaloga mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese in die *tandem repeat*-Sequenz des MUC1 eingebaut werden und zum Aufbau der gewünschten Vakzinkandidaten über ein Linkersystem kovalent an entsprechend immunogene Carrierproteine, wie z. B. das TTox, angebunden werden. Damit wird gleichzeitig eine hohe Spezifität und eine robuste T-Helferzell-vermittelte Immunantwort sichergestellt. Für die immunologische Evaluierung in Form von ELISA-Studien ist zudem eine Anbindung an das Trägerprotein BSA erforderlichlich.

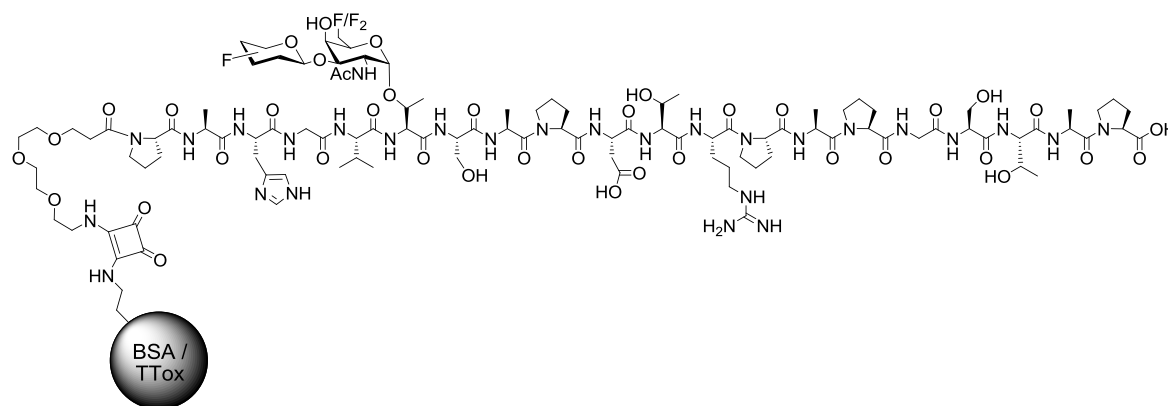


Abb. 2.7 Angestrebte Vakzinkandidaten.

Die definierten, vollsynthetisch hergestellten TTox-Konjugate sollen abschließend, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *E. Schmitt* am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, in Immunisierungsstudien an Mäusen auf ihre Eignung als Vakzine getestet werden. Besonderes Augenmerk soll bei diesen Studien auf die Spezifität der resultierenden Antikörper sowie auf eine T-Zell-abhängige Immunantwort, die zu einer Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses befähigt, gelegt werden.

### 3 ALLGEMEINER TEIL

Basierend auf den einleitend erörterten Gründen eignen sich fluoridierte, tumorassoziierte Kohlenhydratantigene zur Entwicklung selektiver Vakzine. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck einige Beispiele mehrfach fluorierter T-Antigene sowie die entsprechenden Glycopeptide synthetisiert. Der Zugang zu den Disacchariden erfolgte durch Glycosylierungsreaktionen, in denen unterschiedlich fluoridierte Donoren und Akzeptoren eingesetzt wurden.

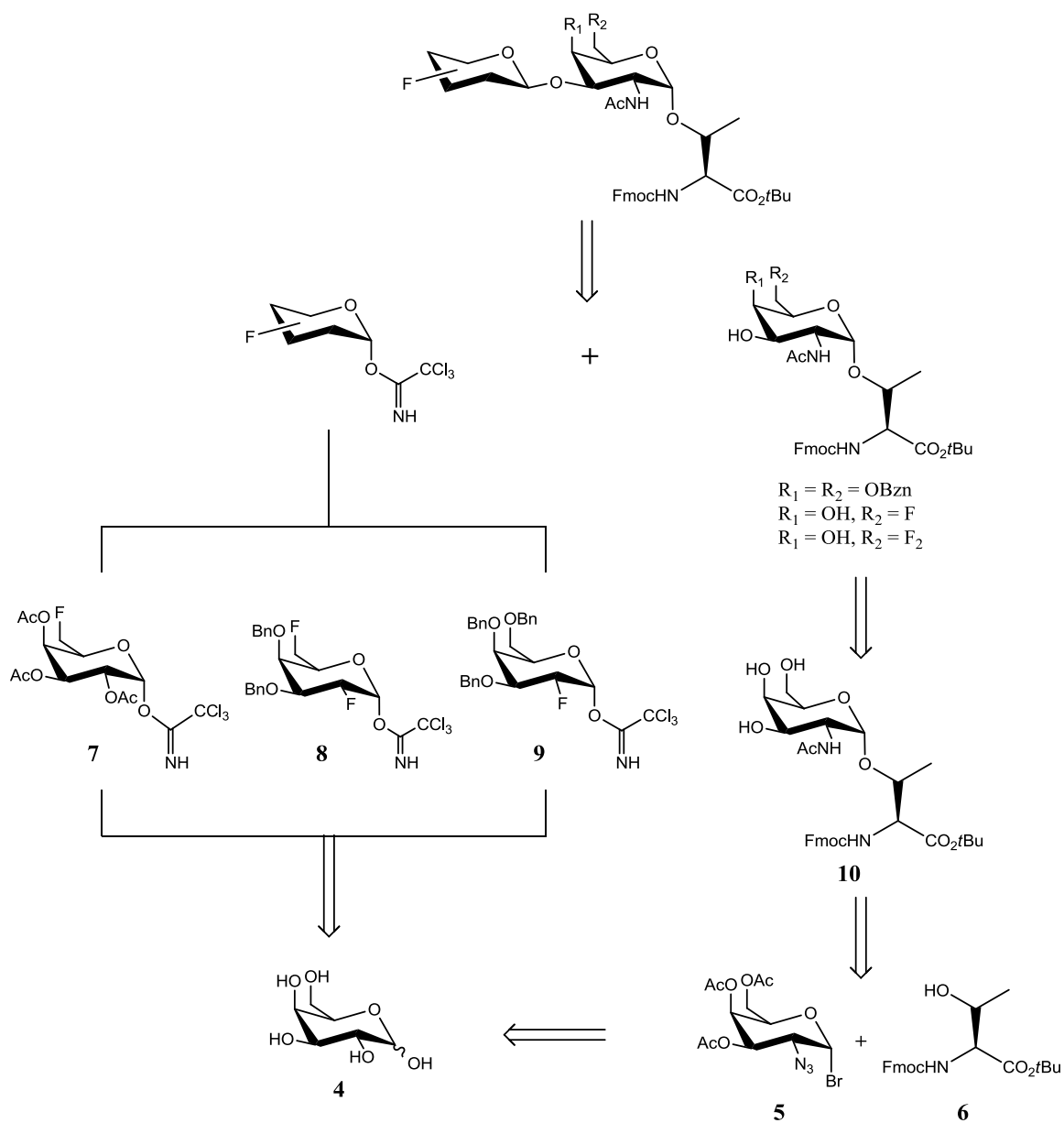


Abb. 3.1 Retrosynthese der synthetisierten Disaccharide.



## 3.1 Synthese der Galactosyldonoren

Der synthetische Zugang zu den fluorierten T-Antigenen wurde durch Glycosylierungen nach einer von *R. R. Schmidt* eingeführten Methode<sup>[86,87]</sup> unter Verwendung hochreaktiver Trichloracetimidatdonoren erreicht. Insbesondere für eine Anwendung in Durchfluss-Verfahren in mikrostrukturierten Reaktoren konnten *P. Seeberger et al.* bereits zeigen, dass diese Klasse von Glycosyldonoren hierfür geeignete Bausteine darstellen.<sup>[79,80]</sup> Ausgehend von D-Galactose wurden daher für die Synthese der Glycosylaminosäuren und die Anwendung mikroreaktorunterstützter Verfahren drei unterschiedlich fluorierte Donoren synthetisiert (Abb. 3.2).

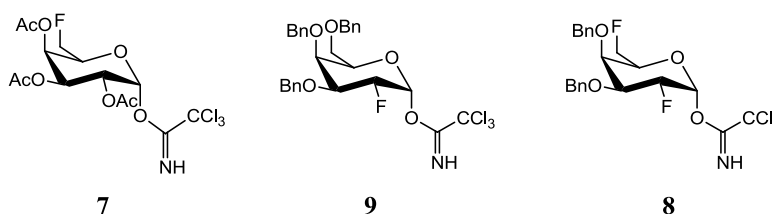


Abb. 3.2 Synthetisierte Glycosyldonoren

Mit Blick auf die geplanten Glycosylierungen wurde hierbei auf unterschiedliche Schutzgruppenmuster zurückgegriffen. Bei der Synthese des 6-Fluor-Donors **7** fiel die Wahl auf Acetatschutzgruppen, da bei der folgenden Glycosylierung so der  $\beta$ -dirigierende Nachbargruppeneffekt der Acetatschutzgruppe in Position 2 ausgenutzt werden kann (Kap. 3.3.2). Durch den 2-Fluor-Substituent der beiden Donoren **8** und **9** fehlt dieser dirigierende Einfluss jedoch, weshalb zur Reaktivitätssteigerung bzw. aus elektronischen Gründen Benzylether zur Blockierung der Hydroxyfunktionen eingesetzt wurden (Kap. 3.3.1).

### 3.1.1 Synthese des acetylierten 6-Fluor-Galactosyldonors

Für die Fluorierung in Position 6 der Galactose wurde in Anlehnung an eine von *S. Wagner* in der Arbeitsgruppe von *A. Hoffmann-Röder* entwickelte Route verfahren.<sup>[88]</sup> Die Blockierung der sekundären Hydroxyfunktionen durch Isopropylidenacetale ermöglicht eine regioselektive Desoxyfluorierung unter Verwendung von Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST<sup>®</sup>).<sup>[52]</sup> Hierbei hat sich eine mikrowellenunterstützte Synthese (P = 100 W, T = 80 °C, 60 min) unter Zusatz von 2,4,6-Collidin als sehr effektive Methode für die Fluorierung erwiesen (Abb. 3.3).

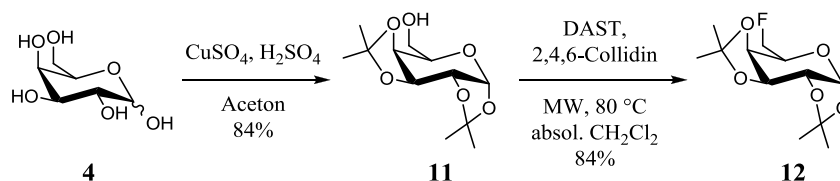


Abb. 3.3 DAST-vermittelte Fluorierung der Galactose.

Letztere wird durch einen nucleophilen Angriff des freien Sauerstoffs des Galactosebausteins **11** am Schwefelatom des DAST<sup>®</sup>-Reagenzes initiiert. Durch die Substitution wird gleichzeitig ein Fluoridion abgespalten, das den zweiten nucleophilen Substitutionsschritt unter Austausch der neu installierten Abgangsgruppe in Position 6 gegen den Fluorsubstituenten einleitet (Abb. 3.4).

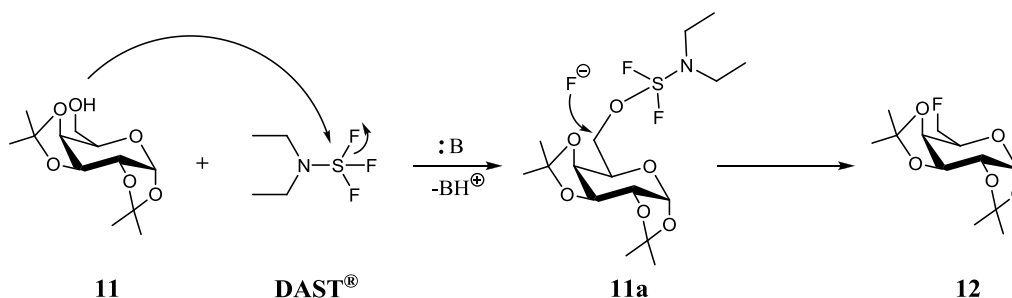


Abb. 3.4 Mechanismus der nucleophilen Fluorierung mit DAST<sup>®</sup>.

Nach Acidolyse der Acetalgruppen mit 80%iger Essigsäure konnte das Rohprodukt direkt in einer Pyridin/Acetanhydrid-Mischung (2:1) peracetyliert werden. Für die darauffolgende Freisetzung des anomeren Zentrums wurde aus Ethylendiamin und Essigsäure *in situ* das Ethylendiaminacetat generiert, welches als milde Base selektiv das Acetat in Position 1 spaltet.<sup>[89]</sup> Der entstandene, am anomeren Zentrum einfach deacetylierte Zucker **14** wurde abschließend mit Trichloracetonitril und katalytischen Mengen an 1,8-Diaza-bicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) als Base zum angestrebten Galactosyldonor **7** umgesetzt.

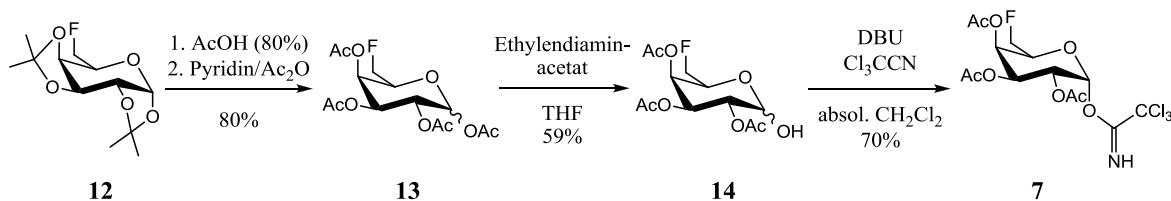


Abb. 3.5 Synthese des 2,3,4-Tri-O-acetyl-6-desoxy-6-fluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyltrichloracetimidats **7**.

Die Selektivität dieses letzten Schritts ist im  $\alpha$ -stabilisierenden anomeren Effekt begründet, der bei stark elektronenziehenden Gruppen X am anomeren Zentrum dominiert. Der Effekt kann sowohl auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen als auch auf Orbitalwechselwirkungen zurückgeführt werden (Abb. 3.6).<sup>[90]</sup>

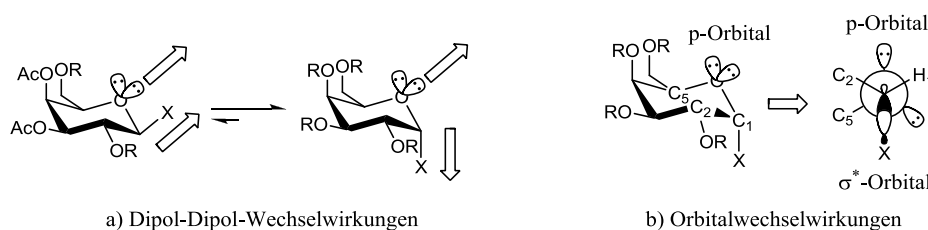


Abb. 3.6 Veranschaulichung des anomeren Effektes

Betrachtet man die beteiligten Dipole, welche durch die freien Elektronenpaare des Ringsauerstoffes und durch die polarisierte C-X-Bindung verursacht werden, so ist die Anordnung bei der die maximale Kompensation der Dipolmomente auftritt energetisch begünstigt ( $\alpha$ -Anomer). Dementsprechend führt die sich verstärkende parallele Ausrichtung der Dipole im  $\beta$ -Anomer zu dessen Destabilisierung (Abb. 3.6a)).

Im Orbitalmodell ist die Wechselwirkung zwischen einem nichtbindenden Orbital des Ringsauerstoffes und dem  $\sigma^*$ -Orbital der C-X-Bindung ausschlaggebend. Im Falle des  $\alpha$ -konfigurierten Saccharids kommt es zur anti-periplanaren Ausrichtung der Orbitale, die eine Delokalisation der nichtbindenden Elektronen des Sauerstoffes in das  $\sigma^*$ -Orbital zulässt (negative Hyperkonjugation). Die daraus resultierende Stabilisierung führt zur Bevorzugung des  $\alpha$ -Anomers (Abb. 3.6b)).

## 3.1.2 Synthese des benzylierten 2-Fluor-Galactosyldonors

### 3.1.2.1 Konventionelle Synthese

Ausgehend von D-Galactose erfolgte die Darstellung des 2-Fluordonors **9** in sieben Stufen. Nach Peracetylierung der Galactose in Acetanhydrid und in Gegenwart katalytischer Mengen Perchlorsäure wurde durch Zugabe von Bromwasserstoff in Eisessig (33%ig) direkt das  $\alpha$ -konfigurierte Bromid **15** erzeugt.<sup>[91]</sup> Das Rohprodukt wurde durch anschließende Eliminierung mit aktiviertem Zink in einem Essigsäure-Wasser-Gemisch in das Galactal **16** überführt, welches nach chromatographischer Reinigung in guten Ausbeuten erhalten wurde (Abb. 3.7).<sup>[92]</sup>

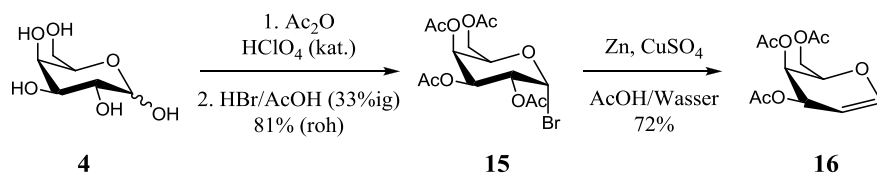


Abb. 3.7 Synthese des 3,4,6-Tri-O-acetylgalactals 16.

Die anschließende Entfernung der Acetylgruppen erfolgte in einem Methanol/Natrium-methanolat-Gemisch (2%ig) bei einem pH-Wert von 10.5. Das rohe Galactal wurde in *N,N*-Dimethylformamid mit einer 60%igen Natriumhydrid-Dispersion deprotoniert und durch Zugabe von Benzylbromid in sehr guten Ausbeuten in das benzylierte Galactal **17** überführt.<sup>[93,94]</sup>

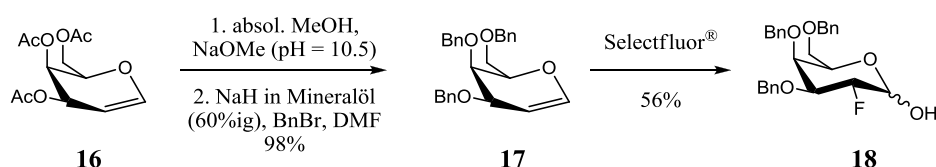


Abb. 3.8 Darstellung des 2-Desoxy-2-fluor-Zuckers 18.

Mit dem elektrophilen Fluorierungsreagenz 1-Chlormethyl-4-fluordiazoniabicyclo[2.2.2]-octan-bis-(tetrafluoroborat),<sup>[54,95]</sup> welches unter dem Handelsnamen Selectfluor<sup>®</sup> kommerziell erhältlich ist, wurde der Fluorsubstituent in die Position 2 eingeführt.<sup>[96,97]</sup> Mechanistisch betrachtet verläuft die Reaktion über eine *syn*-Addition des Reagenzes an die Doppelbindung des Glycals. Das  $\alpha$ -konfigurierte *N*-Glycosid **19a** steht im Gleichgewicht mit dem thermodynamisch begünstigten  $\beta$ -Anomeren **19b**.<sup>[98]</sup> In Gegenwart eines geeigneten Nucleophils (z. B. Wasser) kommt es zur Substitution am C-1 unter Bildung eines Anomerengemisches der 3,4,6-Tri-O-benzyl-2-desoxy-2-fluor-D-galactopyranose **20** (Abb.3.9).

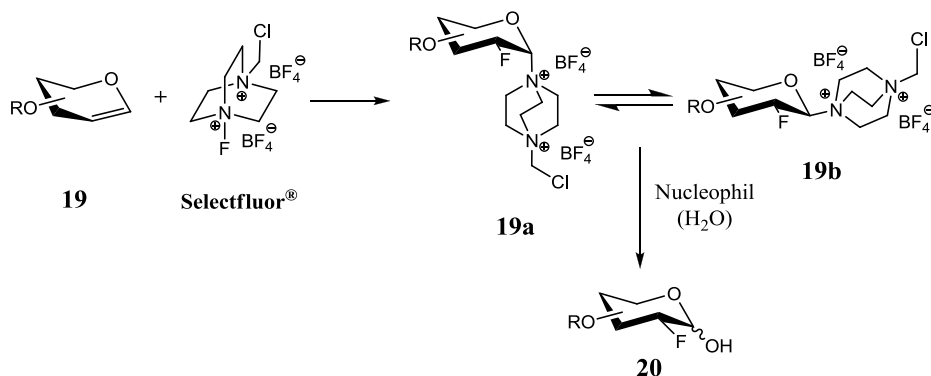


Abb.3.9 Mechanismus der elektrophilen Fluorierung mit Selectfluor<sup>®</sup>.

Abschließend wurde die benzylierte 2-Fluorgalactose **18** durch basenkatalysierte Reaktion mit Trichloracetonitril und DBU zum 2,3,4-Tri-*O*-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyltrichloracetimidat **9** umgesetzt. Aufgrund des anomeren Effektes (Abb. 3.6, Kap. 3.1.1) erhält man in dieser Reaktion ebenso selektiv das thermodynamisch bevorzugte  $\alpha$ -Anomer.

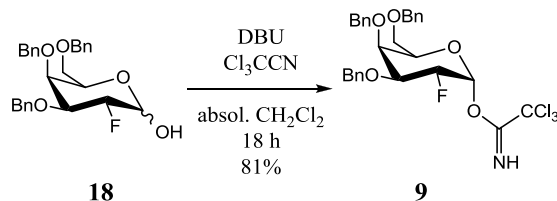
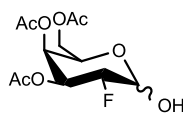
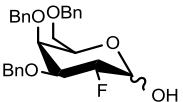


Abb. 3.10 Reaktion zum 2,3,4-Tri-*O*-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyltrichloracetimidat **9**.

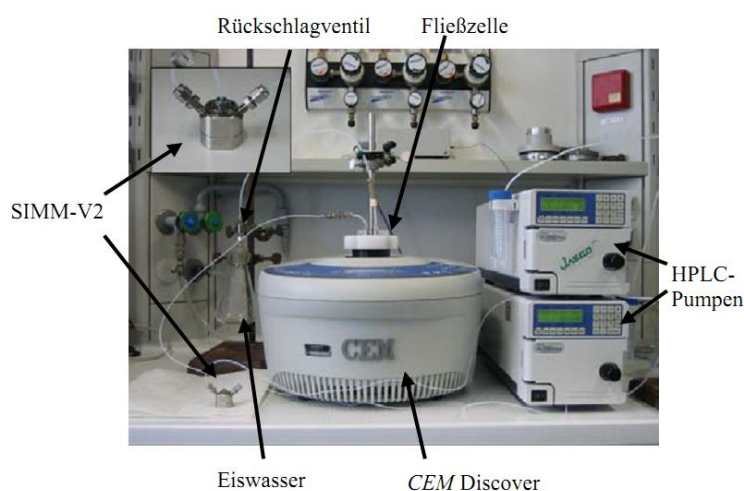
### 3.1.2.2 Optimierungsversuche im Mikroreaktor

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden bereits zahlreiche Versuche zur Optimierung der Selectfluor<sup>®</sup>-vermittelten Fluorierungen in Mikroreaktorsystemen durchgeführt.<sup>[99]</sup> Dabei wurden mikrowellenunterstützte Fluorierungen mit Selectfluor<sup>®</sup> am acetylierten sowie am benzylierten Galactal vorgenommen. Nach einem intensiven Parameter-Screening (Temperatur, Äquivalente, Reaktionszeit, Mikrowellenleistung) im statischen Versuchsaufbau wurden diese auf ein kontinuierliches Verfahren übertragen und optimiert. Die chemischen Ausbeuten der mikroreaktorunterstützten Synthesen fielen jedoch durchweg geringer aus als unter statischer Reaktionsführung. Aus diesem Grunde wurden im Rahmen der Dissertation weitere Versuche zur Optimierung der kontinuierlichen Reaktionsführung durchgeführt.

Produkt	Lösungsmittel	Leistung in W	Temperatur in °C	Reaktionszeit in min	Ausbeute in %
	MeNO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O	150	90	2:40	37
	MeCN/H <sub>2</sub> O	150	80	4	35

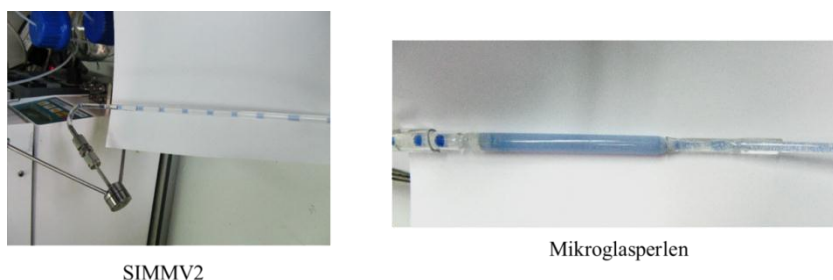
Tab. 3.1 Ergebnisse der Optimierungsversuche im Mikroreaktor aus der Diplomarbeit.

Der Aufbau des Durchflussreaktors bestand aus einer *Braun* Perfusor V-Spritzenpumpe oder zwei *Jasco* PU2080-HPLC-Pumpen sowie einer *CEM* Discover-Mikrowelle mit Durchflusszelle. Die Reagenzien wurden in einem *SIMM-V2* Mikromischer vom *IMM* gemischt und über eine 1/8 Zoll-PTFE-Kapillare durch die Reaktionszone der Mikrowelle gepumpt. Nach Verlassen der Zelle wurde ein Rückschlagventil passiert und die Reaktionslösung wurde zum Abbruch der Reaktion in Eiswasser eingeleitet (Abb. 3.11). Die Temperaturkontrolle im Innern der Mikrowelle-Reaktionskammer erfolgte über den integrierten Infrarotsensor.



**Abb. 3.11** Aufbau zu Fluorierungen im Mikroreaktor.

Die Problematik der Reaktionsführung beruht auf der Zweiphasigkeit der Reaktionsmischung. Man benötigt sowohl Wasser als polare Lösungsmittelkomponente, da Selectfluor in organischen Medien nur sehr gering löslich ist, als auch eine organische Komponente zum Lösen der Zuckerbausteine. Mit Hilfe von Tintenwasser in Kombination mit organischen Medien konnte die schnelle Entmischung der Phasen im Durchfluss illustriert werden. Zur Demonstration wurden als Mischelemente ein *SIMM-V2*-Mischer und eine Redispergierschleife, bestehend aus einer mit Mikroglassperlen (Durchmesser: 250-420  $\mu\text{m}$ ) gefüllten Kapillare, untersucht (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12** Mischung zweiphasiger Systeme in unterschiedlichen Mischelementen.

Während sich nach dem Verlassen des SIMM-V2 die Phasentrennung unmittelbar unter Ausbildung von Pfropfen, sogenannten Plugs, einstellt, beobachtet man bei der Verwendung einer Redispergierschleife ein System feiner Tröpfchen. Letztere haben den Vorteil, dass eine größere Grenzfläche zwischen den Phasen geschaffen wird und somit ein größerer Kontakt zwischen den Reaktanden besteht. Um eine möglichst effiziente Homogenisierung des Reaktionsgemisches zu erreichen, wurde daher die Kapillare in der Durchflusszelle der Mikrowelle durch eine Redispergierschleife ersetzt. Erst durch diese Modifizierung des Aufbaus konnten isolierbare Mengen der Fluorzucker erhalten werden. Die Verwendung einer Redispergierschleife führte jedoch zu einem sehr starken Druckaufbau im Durchflusssystem, infolgedessen nur geringe Flussraten möglich waren. Daher wurde als Versuch zur weiteren Optimierung das ungeschützte, wasserlösliche D-Galactal **21** synthetisiert, so dass auf die Verwendung einer organischen Lösungsmittelkomponente verzichtet werden konnte und die Inhomogenität des Reaktionsgemisches vermieden würde.

Zu diesem Zweck wurde das 2,3,4-Tri-*O*-acetylgalactal **16** unter *Zemplén*-Bedingungen<sup>[100]</sup> mit Natriummethanolat in absolutem Methanol deblockiert und nach Umkristallisieren aus Essigester wurde in guten Ausbeuten das 1,5-Anhydro-D-arabino-hex-1-enitol **21** erhalten.<sup>[101]</sup>

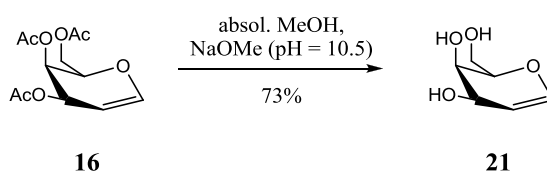


Abb. 3.13 *Synthese des 1,5-Anhydro-D-arabino-hex-1-enitol 21.*

In ersten Vorversuchen wurde das Galactal **21** sowohl rein thermisch (Variante A) als auch mikrowellenunterstützt (Variante B) in Wasser mit Selectfluor<sup>®</sup> umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend einer Peracetylierung in einem Pyridin/Acetanhydrid-Gemisch (2:1) unterzogen, bevor das vollständig acetylierte Produkt mittels Säulenchromatographie isoliert wurde. Hierbei konnten in beiden Varianten gute Ausbeuten von 66% bei der thermischen Variante A sowie 57% bei der mikrowellenunterstützten Variante B der peracetylierten 2-Desoxy-2-fluorgalactose **23** erzielt werden.

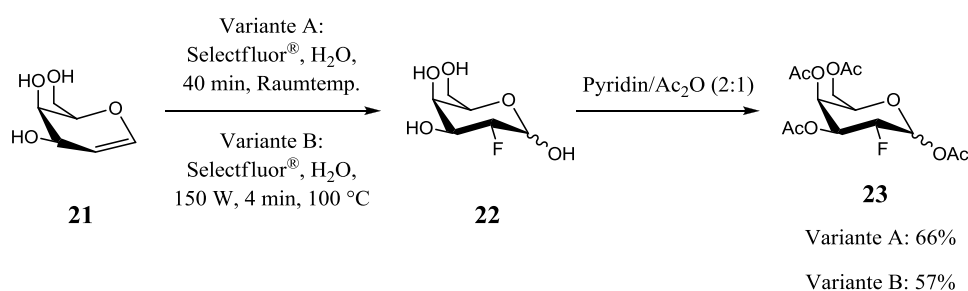


Abb. 3.14 *Selectfluor<sup>®</sup>-vermittelte Fluorierung des ungeschützten Galactals 21.*

Zur Reaktionsführung im Mikroreaktor wurde der Aufbau zur Versuchsdurchführung im kontinuierlichen Fluss übernommen (Abb. 3.11), wobei auf den Einbau der Redispergierschleife verzichtet wurde. Mit einer Flussrate von 0.5 mL/min wurde die Reaktionslösung durch die Zelle (Volumen: 2 mL) gepumpt und durch Mikrowelleneinstrahlung mit 150 W während vier Minuten auf 100 °C erhitzt. Der Abbruch der Reaktion nach Verlassen der Reaktionszone erfolgte erneut durch Einleiten in Eiswasser. Nach Entfernen des Wassers unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt analog zu den Vorversuchen einer Acetylierung unterzogen, bevor die 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose **23** flashchromatographisch gereinigt wurde. Unter diesen Reaktionsbedingungen konnten jedoch nur 39% der acetylierten 2-Desoxy-2-fluorgalactose **23** isoliert werden. Eine Verdoppelung der Reaktionszeit führte allerdings zu keiner Steigerung der Ausbeute. Gleiches galt für die Isolierung der dünnen Kapillare im Innern der Durchflusszelle mit Glaswolle, die dazu dienen sollte Temperaturschwankungen zu vermeiden, letztendlich jedoch dazu führte, dass die Reaktionstemperatur nicht mehr über den Infrarotsensor kontrolliert werden konnte.

Trotz der aufgeführten Bemühungen, die Fluorierung des Galactals im kontinuierlichen Fluss verfahrenstechnisch zu optimieren, konnten schließlich keine verbesserten Ausbeuten gegenüber der Batch-Synthese erzielt werden.

### 3.1.3 Synthese des benzylierten 2,6-Bisfluor-Galactosyldonors

Für die Darstellung des zweifach fluorierten Galactosyldonors **8** wurde analog der Herstellung der beiden oben gezeigten Donoren **7** und **9** verfahren.<sup>[43]</sup> So wurde zunächst das 3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluorgalactal **25** als Zwischenstufe dargestellt.<sup>[88]</sup> Anstelle der Deblockierung des anomeren Zentrums wurde die peracetylierte Fluorgalactose **13** jedoch mit 33%iger Bromwasserstofflösung in Eisessig in das  $\alpha$ -Bromid **24** überführt. Die Eliminierung zum entsprechenden Galactal **25** erfolgte mit frisch aktiviertem Zink in Gegenwart der Base *N*-Methylimidazol und verlief in sehr guten Ausbeuten (Abb. 3.15).

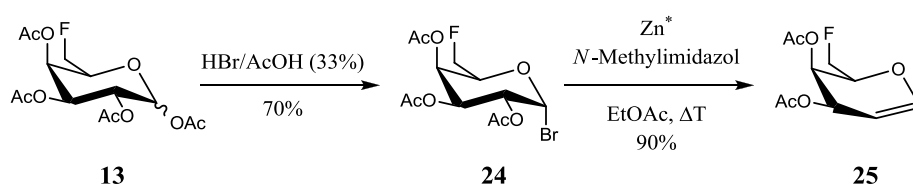


Abb. 3.15 Synthese des 3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluorgalactals **25**.



Die Schutzgruppenmanipulation und die Einführung des zweiten Fluorsubstituenten wurden in Anlehnung an die Synthese des benzylierten 2-Fluor donors **9** durchgeführt. Nach Abspaltung der Acetatgruppen gemäß *Zemplén*<sup>[100]</sup> wurde das Rohprodukt mit Natriumhydrid und Benzylbromid in *N,N*-Dimethylformamid zum zweifachen Benzylether **26** umgesetzt. Die elektrophile Fluorierung in Position 2 erfolgte erneut in einem Nitromethan/Wasser-Gemisch (4:1) mit Selectfluor<sup>®</sup>, wobei zunächst durch 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde, bevor zur Vervollständigung der Reaktion drei Stunden unter Rückfluss erhitzt wurde. Das gewünschte doppelt fluorierte Produkt **27** ließ sich so in annähernd quantitativer Ausbeute erhalten.

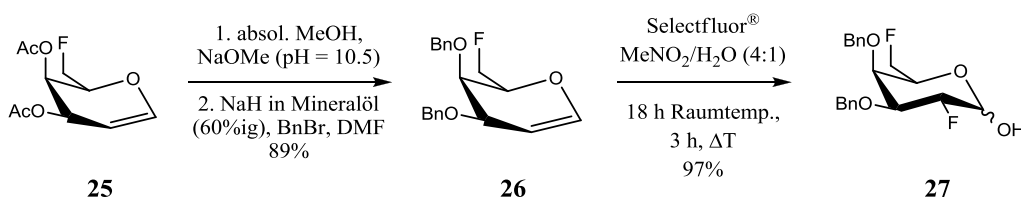


Abb. 3.16 Darstellung der 2,6-Bisfluorgalactose **27**.

Der zweifach fluorierte Donor **8** konnte schließlich durch basenkatalysierte Reaktion mit Trichloracetonitril selektiv als  $\alpha$ -Anomer erhalten werden.

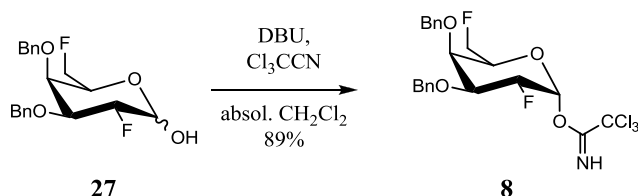


Abb. 3.17 Synthese des 3,4-Di-O-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-bisfluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyltrichloracetimidates **8**.

## 3.2 Synthesen der *N*-Acetyl-galactosamin-Threonin-Konjugate

Für die Synthese unterschiedlich fluorierter T-Antigenanaloge wurden drei verschiedene Glycosylakzeptoren dargestellt, welche alle ausgehend vom zentralen T<sub>N</sub>-Antigen-Baustein zugänglich sind.

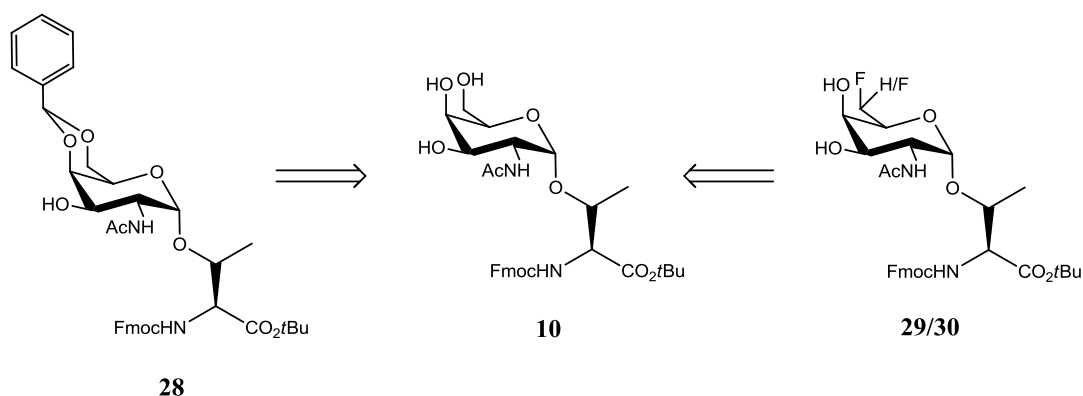


Abb. 3.18 Synthetisierte Glycosylakzeptoren.

### 3.2.1 Synthese des benzyldenblockierten T<sub>N</sub>-Bausteins

Die Darstellung des unfluorierten Akzeptors erfolgte nach einem etablierten Verfahren<sup>[102,103]</sup>, bei dem die Glycosylaminosäure durch die Anbindung eines Galactosylbromid-Donors **5** an ein orthogonal blockiertes L-Threonin-Derivat **6** aufgebaut wird.

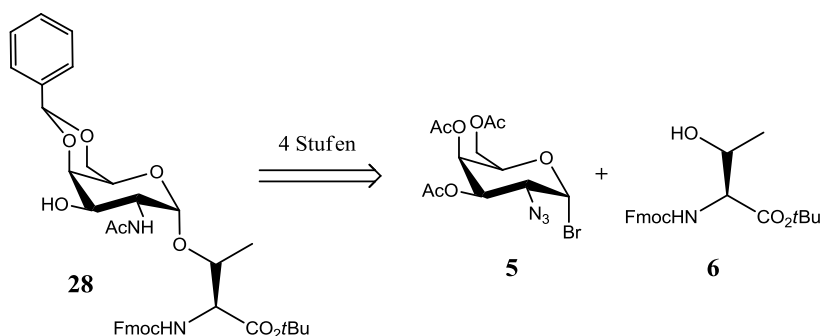


Abb. 3.19 Synthese des unfluorierten T<sub>N</sub>-Bausteins 28.

Im ersten Schritt wurde die Aminofunktion in annähernd quantitativer Ausbeute mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) zum basenlabilen Carba-

mat **31** umgesetzt.<sup>[104,105]</sup> Bei der darauffolgenden Kupfer(I)-katalysierten Veresterung mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *tert*-Butanol ist eine aufmerksame Reaktionskontrolle von Nöten, da als Folgereaktion leicht die Veretherung der  $\beta$ -Hydroxyfunktion der Aminosäure auftreten kann (Abb. 3.20).<sup>[106]</sup>

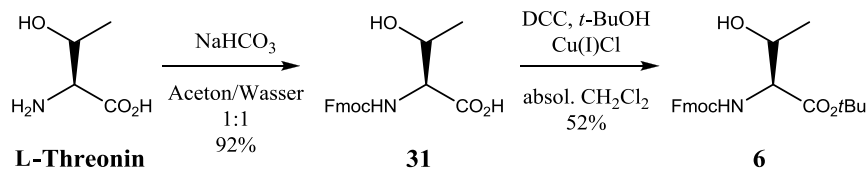


Abb. 3.20 Darstellung des orthogonal blockierten *L*-Threonins 30.

Der Galactosyldonor **5** wurde ausgehend vom peracetylierten Galactal **16** in zwei Stufen hergestellt. Zunächst wurde das Galactal in Gegenwart von Natriumazid und zwei Äquivalenten Cer(IV)-ammoniumnitrat einer Azidonitratisierung nach *R. U. Lemieux* unterzogen.<sup>[107]</sup>

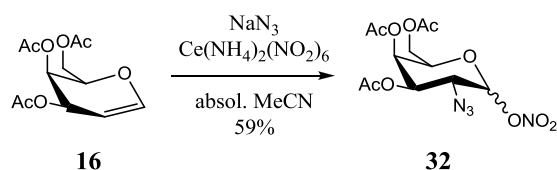


Abb. 3.21 Bildung des 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -*D*-galactopyranosylnitrates 32.

Dabei erfolgt die Einführung der 2-Azido-Funktion als Vorläufer für die angestrebte *N*-Acetylaminogruppe der Glycosylaminosäure **28**, deren  $\beta$ -dirigierender Effekt in der Glycosylierung unerwünscht ist. Ebenso entsteht am anomeren Zentrum in Form des Nitrats eine Austrittsgruppe, welche die weitere Umsetzung zum Bromid ermöglicht. Der von *Lemieux* postulierte Mechanismus nimmt einen radikalischen Verlauf.<sup>[107,108]</sup>

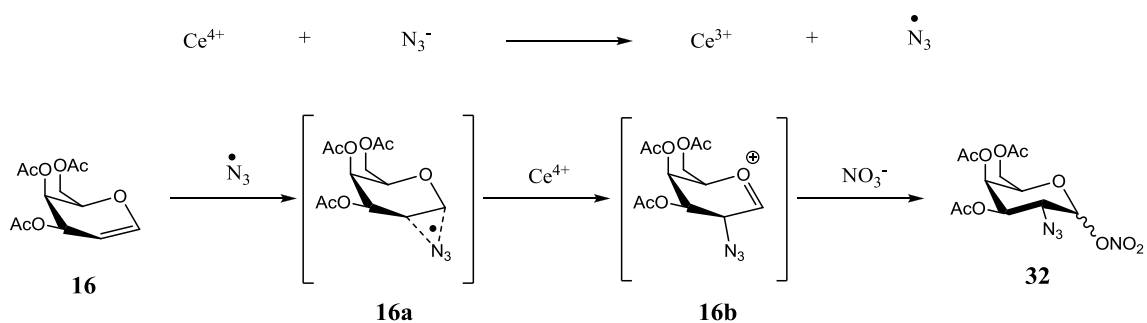


Abb. 3.22 Radikalischer Mechanismus der Azidonitratisierung nach Lemieux.

Ein Äquivalent des Cer(IV)-ammoniumnitrats bewirkt die Oxidation des Azids zum Radikal, welches über den energetisch begünstigten axialen Angriff an die Doppelbindung des Galactals **16** die radikalische Zwischenstufe **16a** ausbildet. Das zweite Äquivalent Cer(IV) oxidiert diese zum Oxoniumion **16b** und in Anwesenheit von Nitrationen erhält man das Anomerengemisch des Azidonitrates **32** (Abb. 3.22). Letzteres wurde mit wasserfreiem Lithiumbromid zum  $\alpha$ -konfigurierten Galactosyldonor **5** umgesetzt. Die Stereoselektivität ist auf den bei Halogeniden stark ausgeprägten anomeren Effekt zurückzuführen (Abb. 3.6, Kap. 3.1.1).

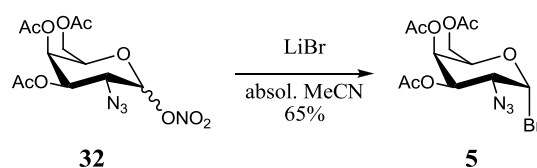


Abb. 3.23 Umsetzung zum Azidobromid-Donor **5**.

Bei der Glycosylierung des orthogonal blockierten Threonins **6** wurde nach einer von *Paulsen* und *Hölck* entwickelten Variante der *Koenigs-Knorr*-Glycosylierung verfahren.<sup>[109]</sup> Zur Aktivierung des Bromid-Donors wird in dieser Methode ein Gemisch aus Silber(I)-carbonat und Silber(I)-perchlorat verwendet und die Glycosylierung wird in einem Lösungsmittelgemisch aus absolutem Toluol und absolutem Dichlormethan (1:1) durchgeführt.<sup>[110]</sup> Durch den fehlenden dirigierenden Effekt der Azidgruppe des Glycosyldonors **5** und aufgrund des anomeren Effektes (Abb. 3.6, Kap. 3.1.1) ist die Bildung des  $\alpha$ -konfigurierten Produktes wiederum stark bevorzugt.

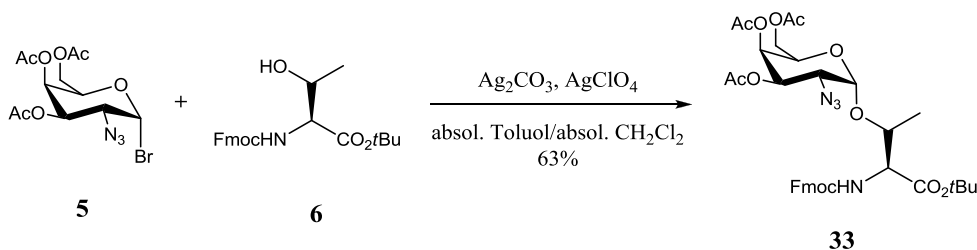


Abb. 3.24 Glycosylierung zum Aminosäure-Konjugat nach *Paulsen* und *Hölck*.

Anschließend wurde das Azid **33** in einem Gemisch aus Tetrahydrofuran/Acetanhydrid/Essigsäure (3:2:1) mit Zinkstaub reaktiv in das gewünschte Acetamid **34** überführt.

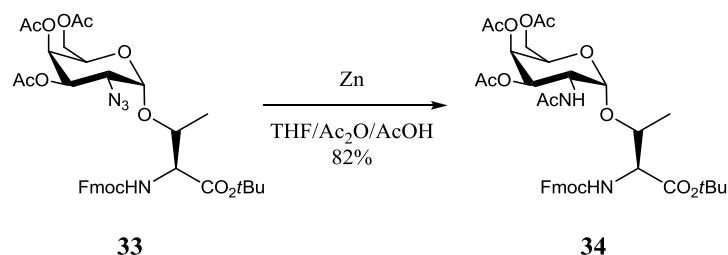


Abb. 3.25 Reduktion zum Acetamid 34.

Zur Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde wieder das *Zemplén*-Protokoll<sup>[100]</sup>, das heißt der Einsatz von Natriummethanolat in absolutem Methanol, verwendet. Allerdings muss die Deblockierung bei milderen Bedingungen, also einem maximalen pH-Wert von 8.5-9.0, ablaufen, da unter alkalischeren Bedingungen die basenlabile Fmoc-Gruppe ebenfalls entfernt würde.<sup>[102]</sup> Trotz aufmerksamer pH-Kontrolle kam es tatsächlich in geringem Maße zur Freisetzung des Amins **10a**, welches durch das Spülen der Chromatographiesäule mit Methanol isoliert werden konnte. Nach erneuter Blockierung des Amins **10a** unter Verwendung von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in absolutem Dichlormethan<sup>[111]</sup> sowie Säulenchromatographie konnte schließlich eine Gesamtausbeute von 92% an **10** erzielt werden.

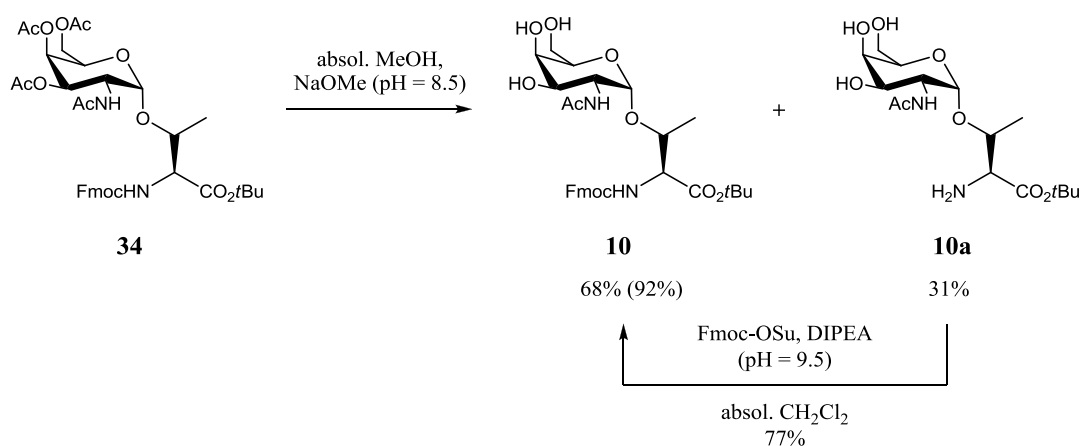


Abb. 3.26 Umsetzung zum  $T_N$ -Antigen 10.

Um eine regioselektive Glycosylierung in Position 3 des  $T_N$ -Antigens zu gewährleisten, wurden die Hydroxylgruppen in Position 4 und 6 als Benzylidenacetal blockiert. Dazu wurde das  $T_N$ -Antigen **10** in absolutem Acetonitril bei 40 °C in Gegenwart katalytischer Mengen an *p*-Toluolsulfonsäure (pH = 4) mit dem Dimethylacetal des Benzaldehyds zur Reaktion gebracht.<sup>[111,112]</sup> Der gewünschte Glycosylakzeptor **28** wurde nach flash-chromatographischer Reinigung in sehr guten Ausbeuten erhalten (Abb. 3.27).

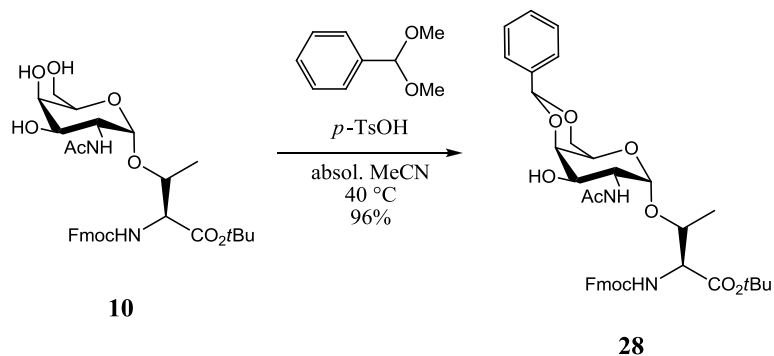


Abb. 3.27 Darstellung des unfluorierten Glycosylakzeptors 28.

### 3.2.2 Synthese des 6-Fluor- $T_N$ -Bausteins

Für die Synthese mehrfach fluoriertes T-Antigenderivate wurde auch ein monofluoriertes Analogon des  $T_N$ -Antigens als Glycosylakzeptor synthetisiert. Hierbei sollte der Fluorsubstituent nicht wie in der bereits publizierten Synthese von *S. Wagner* direkt zu Beginn eingebaut werden,<sup>[88]</sup> sondern die Fluorierung sollte an der vorgeformten Glycosylaminosäure durchgeführt werden.<sup>[113]</sup>

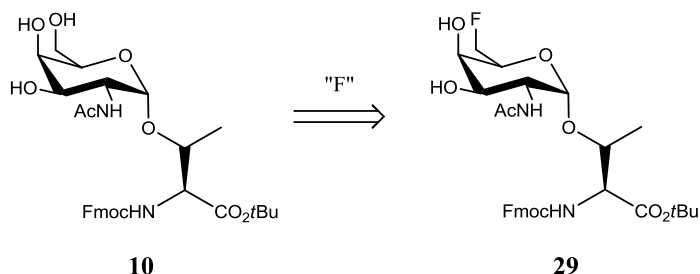


Abb. 3.28 Fluorierung des  $T_N$ -Antigens 10.

Um eine regioselektive Fluorierung in Position 6 des  $T_N$ -Antigens **10** zu ermöglichen, wurden die Hydroxylgruppen in Position 3 und 4 mit einem Isopropylidenacetal blockiert. Bereits bei der Einführung des Acetals muss auf die Regioselektivität der Umsetzung geachtet werden, da sowohl das thermodynamisch stabilere 3:4- als auch das kinetisch begünstigte 4:6-*O*-Isopropylidenacetal gebildet werden. Während ein erster Versuch, die Acetalbildung mit Aceton in Gegenwart von Kupfer(II)-sulfat und unter Zusatz katalytischer Mengen an Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTs) durchzuführen, zu keiner Reaktion führte, konnte unter Verwendung von *p*-Toluolsulfonsäure (*p*-TsOH) als Katalysator nach vier Tagen ein fast quantitativer Umsatz beobachtet werden. Hierbei entstanden allerdings beide Acetale in annähernd gleichen Mengen. Der Versuch, durch

Kühlen der Reaktionsmischung auf 0 °C, gefolgt von langsamem Erwärmen auf Raumtemperatur die Reaktion in Richtung des kinetisch favorisierten Produktes zu drängen, führte jedoch nur zu einer Verringerung der Ausbeute. Selbst die Verwendung von 2,2-Dimethoxypropan und katalytischen Mengen an (-)-Campher-10-sulfonsäure ((-)-CSA) analog einer Vorschrift von *Jacquinet et al.*<sup>[114]</sup> führte nur zu einem Gemisch beider Acetale. Daher wurde nach Abbruch der Reaktion mit Triethylamin und Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum der Rückstand in einem 10:1-Gemisch aus Methanol und Wasser so lange auf 65 °C erhitzt, bis dünnschichtchromatographisch nur noch das thermodynamisch stabilere Produkt zu erkennen war. Durch erneutes Abtrennen des Lösungsmittels und flashchromatographischer Reinigung konnte so das gewünschte 3:4-Isopropylidenacetal **35** in 85%iger Ausbeute erhalten werden (Abb. 3.29).

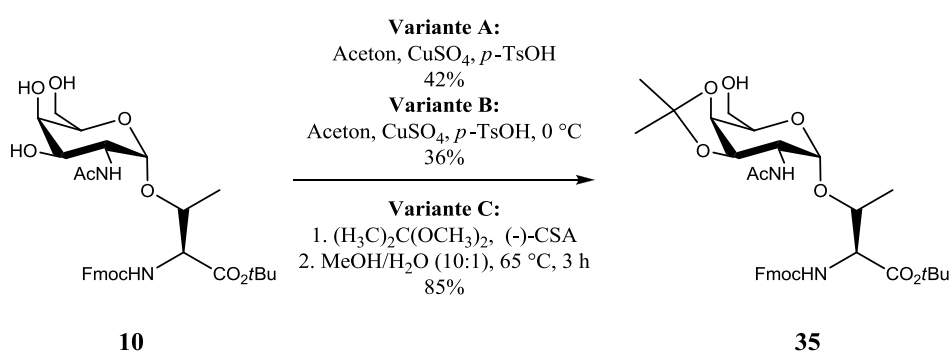


Abb. 3.29 Bildung des 1,2-Acetals **35**.

Bei früheren Versuchen der Desoxyfluorierung der Glycosylaminosäure **36** von *S. Wagner* unter Verwendung von Deoxofluor<sup>®</sup> bzw. DAST<sup>®</sup> in Gegenwart von Pyridin trat stets die ungewünschte Eliminierung als Hauptreaktion auf (Abb. 3.30).<sup>[115]</sup>

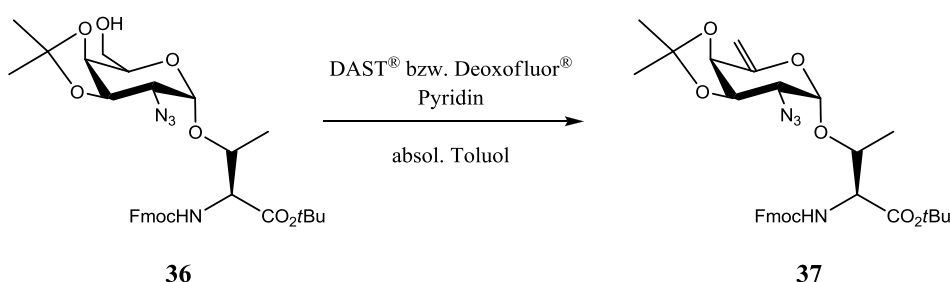


Abb. 3.30 Fluorierungsversuche von *S. Wagner*.

Daher wurde die DAST<sup>®</sup>-vermittelte Einführung des Fluorsubstituenten in Analogie zur 6-Desoxy-6-fluor-1:2,3:4-Di-*O*-isopropylidengalactose **12** mikrowellenunterstützt (100 W, 80 °C, 60 min) in absolutem Dichlormethan und in Gegenwart der milderen Base 2,4,6-

Collidin durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte keine Eliminierung beobachtet werden und das fluoridierte T<sub>N</sub>-Analogon **38** wurde nach Flashchromatographie mit einer Ausbeute von 80% erhalten. Die finale Deblockierung der Hydroxylfunktionen erfolgte durch Acidolyse mit dem stark sauren Ionentauscher Amberlyst 15<sup>®</sup> in Methanol. Nach Abfiltrieren des Ionentauschers und Entfernen des Lösungsmittels lieferte den fluoridierten Galactosylakzeptor **29** in ausreichender Reinheit.

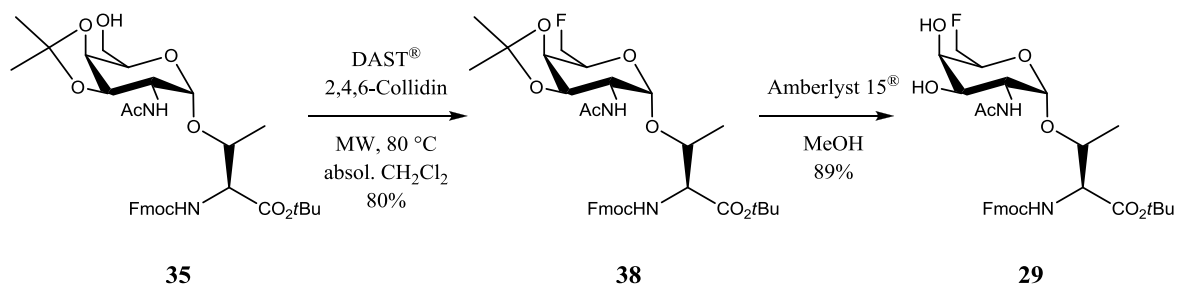


Abb. 3.31 Darstellung des 6-Fluor-T<sub>N</sub>-Analogons **29**.

Der angestrebte *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester **29** konnte ausgehend von D-Galactose in einer Gesamtausbeute von 6.5% über elf lineare Stufen synthetisiert werden. Im Vergleich zur bisher bekannten Synthese mit 5.7% Gesamtausbeute<sup>[88]</sup> resultiert aus dieser Darstellungsart Verbesserung um 0.8%. Der wesentliche Vorteil dieser Strategie liegt jedoch in der Variabilität. Ausgehend vom ungeschützten T<sub>N</sub>-Antigen **10** als gemeinsamen Vorläufer, für dessen synthetischen Zugang ausgearbeitete Methoden zur Verfügung stehen (Kap. 3.2.1), konnten sowohl der benzylidenblockierte Baustein **28** sowie der monofluorierte Glycosylakzeptor **29** für weitere Antigensynthesen dargestellt werden. Des Weiteren dient die isopropylidenblockierte Zwischenstufe **35** als Ausgangspunkt für die in Kapitel 3.2.3 beschriebene Synthese des in Position 6 zweifach fluoridierten T<sub>N</sub>-Derivates **30**. Statt mehrerer separater Synthesewege bietet diese Route daher die Möglichkeit, erst in den letzten Stufen die gewünschte Funktionalisierung vorzunehmen, wodurch sich z. B. die benötigte Menge des kostenintensiven Fluorierungsreagenzes DAST<sup>®</sup> auf ein Minimum beschränkt.



### 3.2.3 Synthese des 6-Bisfluor-T<sub>N</sub>-Bausteins

Der Versuch von *M. Johannes*, die Darstellung eines 6-Bisfluor-T<sub>N</sub>-Antigens in Anlehnung an die Synthesestrategie des natürlichen Antigens **10** zu realisieren, wurde aufgrund der geringen Reaktivität der Zwischenstufen bereits vor der Kupplung zur entsprechenden bisfluorierten Glycosylaminosäure verworfen.<sup>[113]</sup> Bei dieser Strategie wurden die Fluor-Substituenten zu einem frühen Zeitpunkt der Synthese eingeführt (Abb. 3.32). So konnte gezeigt werden, dass nach der *Swern*-Oxidation der 1:2,3:4-Di-*O*-isopropylidengalactose **11** zum Aldehyd **39** die zweifache Desoxyfluorierung mit *DAST*<sup>®</sup> erfolgreich durchgeführt werden kann. Der anschließende Wechsel der Schutzgruppen, die Generierung des anomeren Bromids **43** und die Eliminierung zum Glycal **44** verliefen noch in moderaten bis guten Ausbeuten. Bei der Azidonitratisierung nach *Lemieux* und bei der Überführung ins Azidobromid **47** setzten jedoch die elektronenziehenden Fluorsubstituenten die Reaktivität so stark herab, dass keine brauchbaren Ausbeuten mehr erhalten werden konnten.

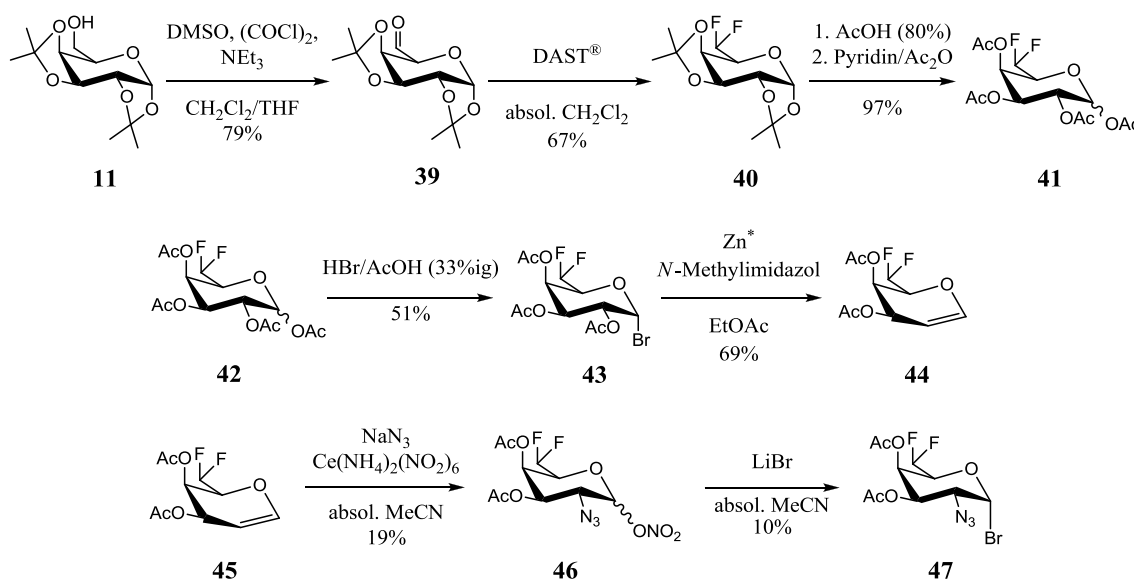


Abb. 3.32 Versuch einer T<sub>N</sub>-analogen Synthese von *M. Johannes*.

Ausgehend von dem zuvor beschriebenen 3:4-*O*-Isopropylidenacetal des T<sub>N</sub>-Antigens **35** gelang es *M. Johannes* jedoch einen synthetischen Zugang zum 6-Bisfluor-T<sub>N</sub>-Antigenanalogon **30** zu entwickeln,<sup>[113]</sup> der auch im Rahmen dieser Arbeit Anwendung fand (Abb. 3.33). Dabei wurde zunächst die freie Hydroxylgruppe in Position 6 mit Hilfe von Pyridiniumdichromat (PDC) in Abwesenheit von Wasser selektiv zum Aldehyd oxidiert.<sup>[116]</sup> Eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Ausbeute dieser Reaktion spielt die Abtrennung der Chromsalze. Bei direkter Säulenchromatographie des Rohproduktes,

welches durch Abbrechen der Reaktion mit Triethylamin und Entfernen des Lösungsmittels erhalten wurde, konnte der Aldehyd **48** nur in Ausbeuten von unter 50% erhalten werden. Durch Ausfällen der Salze mit Essigester und Abtrennung mit Hilfe einer kurzen Kieselgelsäule unter Verwendung reinen Essigesters als Eluenten vor der eigentlichen flashchromatographischen Reinigung des Produktes konnte jedoch eine Steigerung der Ausbeute auf 67% erreicht werden. Die darauffolgende Fluorierung mit 2.2 Äquivalenten DAST<sup>®</sup> war schon nach drei Stunden bei Raumtemperatur beendet und der zweifach fluoridierte Baustein **49** konnte in guten Ausbeuten isoliert werden (Abb. 3.33).

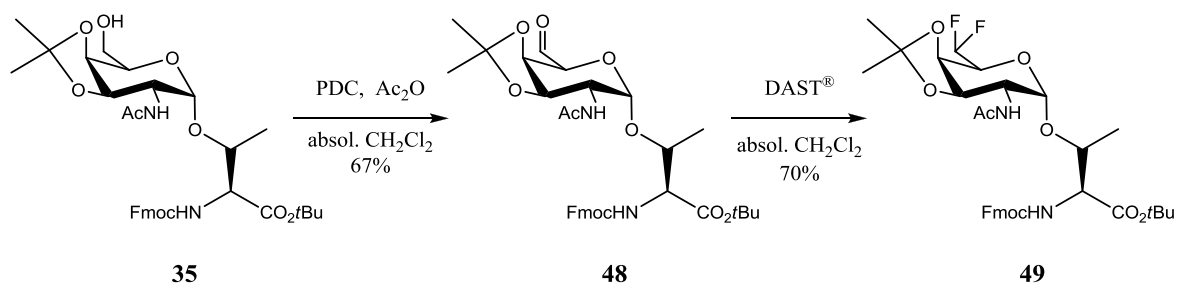


Abb. 3.33 Oxidation und Fluorierung des isopropylidenblockierten  $T_N$  35.

Die Abspaltung der Acetalschutzgruppe führte schließlich zu dem gewünschten Galactosylakzeptor **30**, wobei die saure Hydrolyse der Acetalgruppe mit Amberlyst 15<sup>®</sup> in Methanol durchgeführt wurde. Nach Abfiltrieren des Ionentauschers und Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt in ausreichender Reinheit für die weiteren Umsetzungen erhalten.

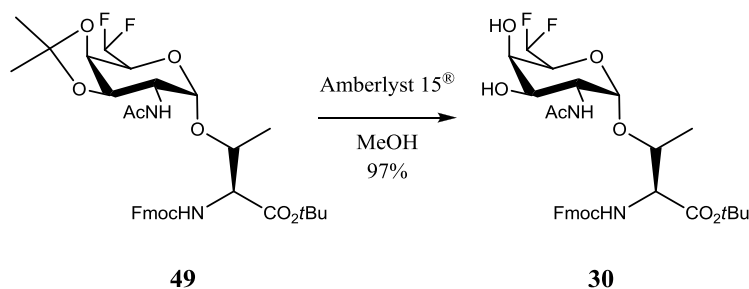


Abb. 3.34 Deblockierung zum 6-Bisfluor-Galactosylakzeptor 30.

### 3.3 Synthesen der fluorierten T-Antigenanaloga

Ausgehend von den zuvor beschriebenen Trichloracetimidat-Donoren **8** und **9** sowie den Glycosylaminosäuren **29** und **30** sollten neuartige fluorierte Derivate des *Thomsen-Friedenreich*-Antigens dargestellt werden. Der Einsatz sowohl fluorierter Donoren als auch Akzeptoren liefert hierbei mehrfach fluorierte Bausteine für die Festphasen-peptidsynthese (Abb. 3.35). Die Anbindung der Donoren erfolgte wie bereits erwähnt nach der Glycosylierungsmethode von *R. R. Schmidt*.<sup>[86]</sup>

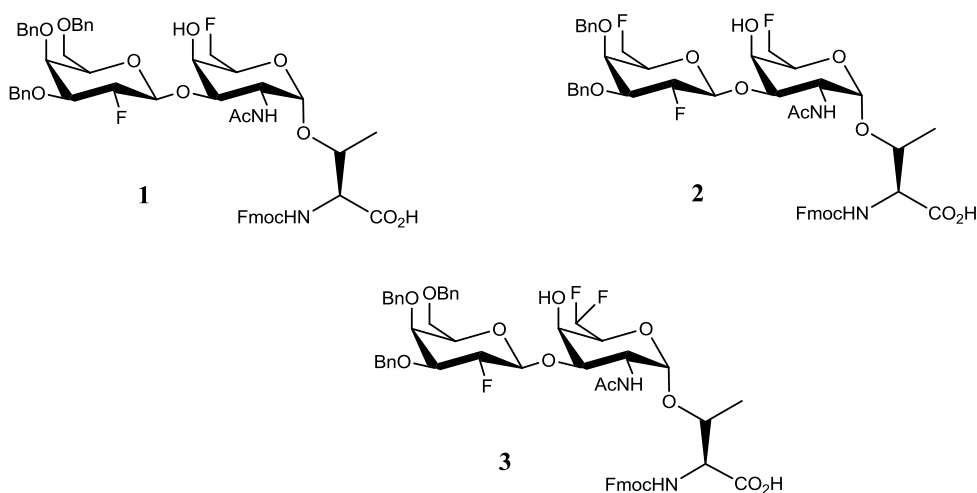


Abb. 3.35 Dargestellte, mehrfach fluorierte T-Antigenderivate.

Des Weiteren wurde an Glycosylierungen von fluorierten Donoren mit dem benzylden-blockierten T<sub>N</sub>-Baustein als Glycosylakzeptor die Reaktion in einem Continuous-Flow-Verfahren untersucht. Insbesondere der Einfluss der Reaktionsparameter auf die Ausbeute, die Bildung von Nebenprodukten sowie den stereochemischen Ausgang der Reaktion standen im Fokus der mikroreaktorunterstützten Experimente.

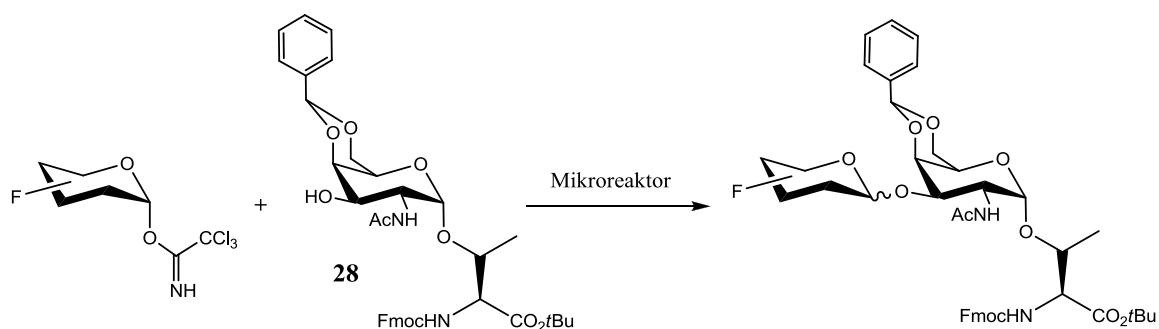


Abb. 3.36 Mikroreaktorscreening.

### 3.3.1 Glycosylierungen der fluorierten T<sub>N</sub>-Antigenanaloga

In vorangegangenen Arbeiten zu Glycosylierungen mit 2-Desoxy-2-fluorgalactosyl-Donoren konnte von *C. Mersch* bereits gezeigt werden, dass die Schutzgruppenstrategie einen erheblichen Einfluss auf die Konfiguration am anomeren Zentrum des Produktes ausübt. So zeigt das acetylierte, in Position 2 fluorierte Trichloracetimidat der Galactose bei der Anbindung an ein T<sub>N</sub>-Derivat nur eine geringe Bevorzugung des  $\alpha$ -konfigurierten Disaccharides (70%,  $\alpha/\beta$  2:1).<sup>[88]</sup> Setzt man unter gleichen Bedingungen einen Trichloracetimidatdonor ein, bei dem Benzylether die Blockierung der Hydroxylfunktionen übernehmen, entsteht in deutlichen Überschüssen das gewünschte  $\beta$ -Anomer des T-Antigenanalogs (86%,  $\alpha/\beta$  1:10).<sup>[41]</sup> Neben sterischen Effekten und Reaktivitätsunterschieden der verschiedenen Donorbausteine sind nach *Woerpel et al.* elektronische Einflüsse der Schutzgruppen für die Stereoselektivität der Glycosylierung ausschlaggebend.<sup>[117]</sup> So kommen nach Aktivierung und Abspaltung der Trichloracetimidat-Gruppierung zwei diastereomere Halbsessel, die <sup>3</sup>H<sub>4</sub>- und die <sup>4</sup>H<sub>3</sub>-Konfiguration, für das intermediär entstehende Oxocarbeniumion in Frage. Bei Betrachtung monosubstituierter Oxocarbeniumionen nehmen Heterosubstituenten am C3 bzw. C4 bevorzugt die pseudo-axiale Ausrichtung ein, da die resultierende räumliche Nähe der partiell negativen Heteroatome zum kationischen Kohlenstoff eine Stabilisierung durch elektrostatische Wechselwirkungen ermöglicht.<sup>[118]</sup> Für Substituenten am C5 konnten *Codée und van der Marel und Mitarbeiter* die gleiche Bevorzugung der pseudo-axialen Ausrichtung belegen (Abb. 3.37).<sup>[119]</sup>

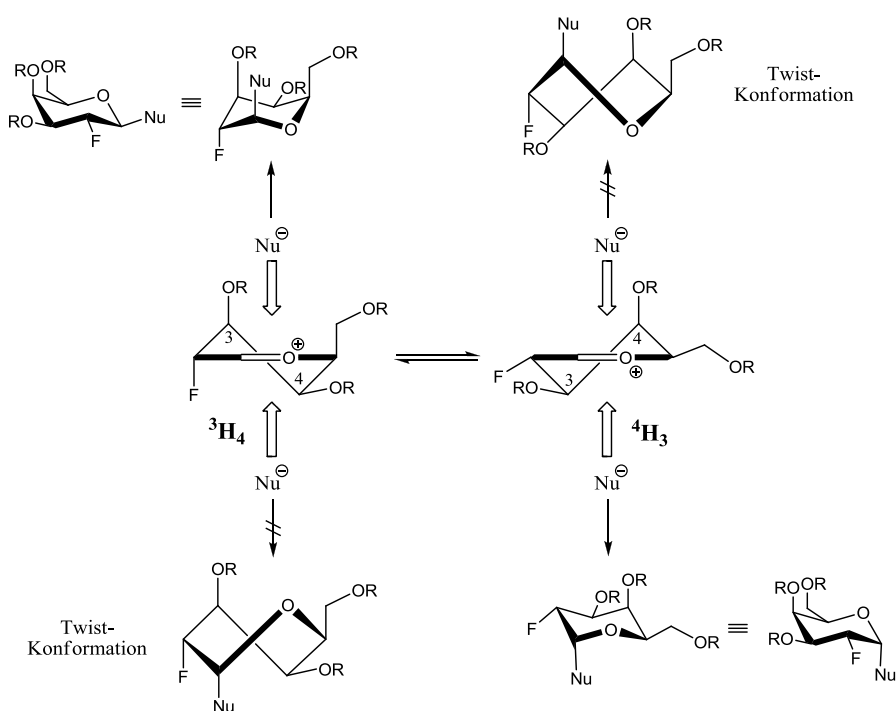


Abb. 3.37 Einfluss der diastereomeren Oxocarbeniumionen in Glycosylierungsreaktionen fluorierter Glycosyldonoren.

Im Falle des  $^3\text{H}_4$ -Diastereomers führt der Angriff eines Nucleophils (hier: Glycosylakzeptoren) von oben selektiv zum  $\beta$ -Glycosid, wohingegen der umseitige Angriff zur thermodynamisch ungünstigen Twist-Konformation führen würde. Analog zu dieser Betrachtung gilt für das diastereomere  $^4\text{H}_3$ -Konformer der spiegelbildliche Fall. Die Annäherung des Nucleophils von der Oberseite würde zur instabilen Twist-Form reagieren und der Unterseitenangriff liefert das  $\alpha$ -Glycosid. Bei Betrachtung der Position 2 bietet sich für elektronenziehende Substituenten eine pseudo-äquatoriale Anordnung an, da diese eine Stabilisierung durch Hyperkonjugation zwischen der C2-H-Bindung und dem 2p-Orbital des kationischen Kohlenstoffs zulässt. Die produktive nucleophile Addition von der Unterseite, welche im Falle der  $^4\text{H}_3$ -Anordnung zu erwarten wäre, kann je nach Größe des Substituenten sterisch gehindert sein und der Angriff erfolgt somit über das energetisch höher liegende  $^3\text{H}_4$ -Intermediat (Abb. 3.38).<sup>[117]</sup>

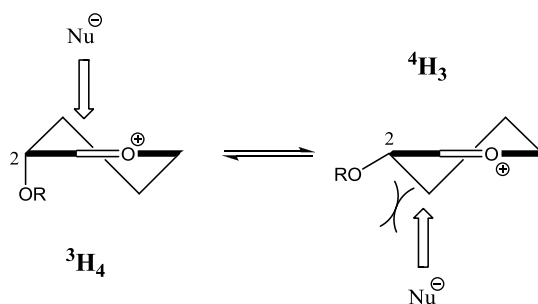


Abb. 3.38 Einfluss des C2-Substituenten auf die Selektivität in Glycosylierungen.

Für die tatsächlich bevorzugte Konformation mehrfach substituierter Oxocarbeniumionen muss stets die Summe der Effekte betrachtet werden und insbesondere bei einander entgegen gerichteten Einflüssen ist die Vorhersage über die bevorzugte Stereochemie nicht trivial und kann anhand der gewonnen Erkenntnisse nicht zuverlässig getroffen werden.

Für die Glycosylierungen mit 2-Desoxy-2-Fluor-Donoren wurden aus den aufgeführten Gründen und Ergebnissen aus vorherigen Glycosylierungen<sup>[41]</sup> Benzylether zur Blockierung der Hydroxylfunktionen eingesetzt. Die Differenzierung der beiden freien Hydroxylgruppen am Akzeptor **29** erfolgte einzig aufgrund der höheren Reaktivität der Position 3. So wurde das 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-galatopyranosyltrichloracetimidat **9** in einer Glycosylierungsreaktion mit dem 6-Fluor-T<sub>N</sub>-Antigenderivat **29** umgesetzt (Abb. 3.39). Die Reaktion wurde in absolutem Dichlormethan bei 0 °C durch Zugabe des Promotors TMSOTf gestartet und das Gemisch wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Auf diese Weise konnte das gewünschte Disaccharid **50** in 61% Ausbeute mit einem  $\alpha/\beta$ -Verhältnis von 1:2.5 (44%  $\beta$ -Anomer) erhalten werden. Bei dem Versuch, die  $\beta$ -Selektivität durch Abkühlen der Reaktionsmischung auf -15 °C und langsames Erwärmen auf maximal 15 °C zu verbessern, gelang jedoch nicht (Abb. 3.39).

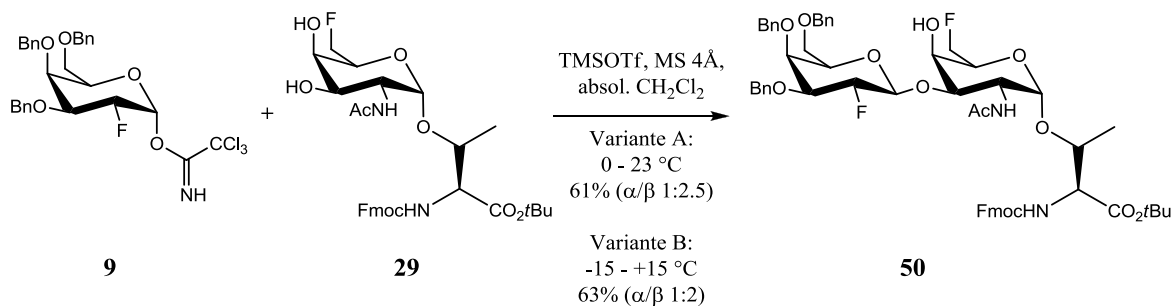


Abb. 3.39 Glycosylierung zum 2',6-Dideoxy-2',6-difluoro-T-Antigen 50.

Eine weitere Herabsenkung der Reaktionstemperatur auf  $-20\text{ °C}$  oder kälter führte auch bei längeren Reaktionszeiten zu keiner nennenswerten Produktbildung. Im Gegensatz dazu lieferten die von *C. Mersch* durchgeführten Glycosylierungen des gleichen Donors **9** mit dem 4-6-*O*-benzylidenblockierten  $T_N$ -Antigen **28**<sup>[41]</sup> als Akzeptor trotz erhöhten sterischen Anspruchs deutliche Überschüsse des *trans*-Glycosids. Bei Betrachtung der Oxocarbeniumionen und der potentiellen Möglichkeiten (gelb und blau gekennzeichnet) für ein Nucleophil, sich dem reaktiven Zentrum zu nähern, sollte ein voluminöser Reaktionspartner den Angriff an der  $^4\text{H}_3$ -Form des Intermediates bevorzugen. Die Oberseite des elektronisch bevorzugten  $^3\text{H}_4$ -Konformers ist hingegen durch die pseudo-axialen Ausrichtungen der Benzylether nur schwer zugänglich für Nucleophile (Abb. 3.40).

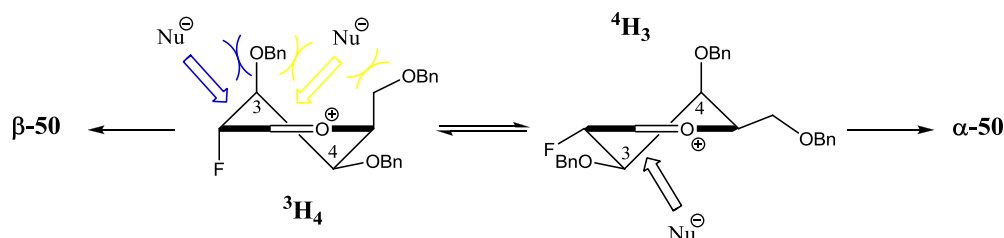


Abb. 3.40 Sterische Einflüsse auf die Selektivität der Glycosylierung.

Die stabilere  $^3\text{H}_4$ -Form des Oxocarbeniumions würde in diesem Fall tatsächlich zum gewünschten  $\beta$ -konfigurierten Disaccharid **50** führen. So konnten *Woerpel und Mitarbeiter* bei Versuchen mit mehrfach substituierten Kationen des Mannosyl-Typs ebenfalls beobachten, dass sterische Effekte der Substituenten den Verlust der Stereoselektivität bewirken können.<sup>[120,121]</sup> Darüber hinaus berichteten jüngst *Gilmour und Mitarbeiter* von  $\beta$ -selektiven Glycosylierung unter Verwendung des Donors **9**.<sup>[122]</sup> Setzten sie in den Glycosylierungen einfache Akzeptoren wie Ethanol ein, konnten Selektivitäten von  $\alpha:\beta = 1:300$  erzielt werden. Es zeigte sich jedoch auch hier, dass der stereochemische Verlauf der Reaktion stark von den elektronischen und sterischen Eigenschaften des Akzeptors abhängt. So führte bereits die Verwendung von Phenol als Nucleophil zu einer

starken Verminderung des  $\beta$ -Überschusses ( $\alpha:\beta = 1:6$ ). Bei 1 $\rightarrow$ 3-Glycosylierung an 4,6-*O*-benzylidenblockierten Derivaten der Galactose konnte ebenfalls nur eine geringe  $\beta$ -Selektivität von  $\alpha:\beta = 1:5$  beobachtet werden. Demnach haben bei Glycosylierungen von 2-Desoxy-2-fluor-galactosyldonoren nicht nur die Konformationen der intermediär entstehenden Oxocarbeniumionen, sondern auch die elektronische und sterische Beschaffenheit des Akzeptors, eine ausschlaggebende Wirkung auf die bevorzugte Konfiguration des gebildeten Glycosids.

Um in der Glycopeptidsynthese an der festen Phase eingesetzt werden zu können, wurde der C-Terminus der Aminosäure durch saure Verseifung freigesetzt. Der *tert*-Butylester wurde demnach unter Einwirkung von einer Trifluoressigsäure/Wasser-Lösung (10:1) gespalten und die freie Säure konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in sehr guten Ausbeuten erhalten werden.

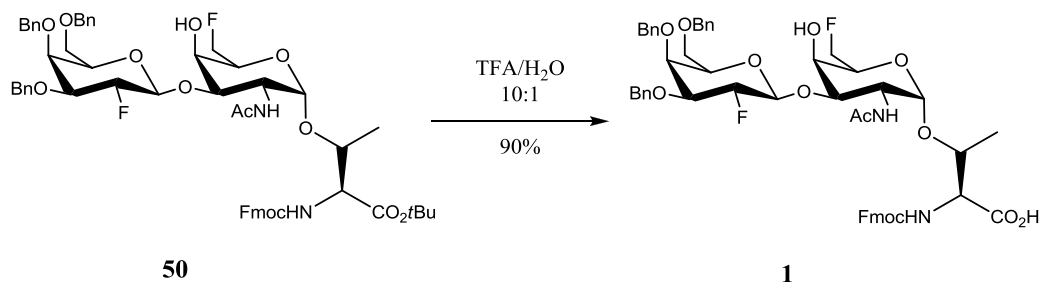


Abb. 3.41 Freisetzung des C-Terminus.

Als weiteres Beispiel eines mehrfach fluorierten T-Antigenanalogons wurde das 6-Desoxy-6-fluor-T<sub>N</sub>-Antigen **29** mit dem zweifach fluorierten, benzylblockierten Donor **8** umgesetzt. Führt man die Glycosylierung unter vergleichbaren Bedingungen wie zuvor durch, das heißt die Reaktion wurde in absolutem Dichlormethan bei -10 °C mit TMSOTf gestartet und langsam auf Raumtemperatur erwärmt, erhält man in 57% Ausbeute und mit mäßiger  $\beta$ -Selektivität ( $\alpha/\beta$  1:2) das gewünschte dreifach fluorierte Saccharid **51** (Abb. 3.42).

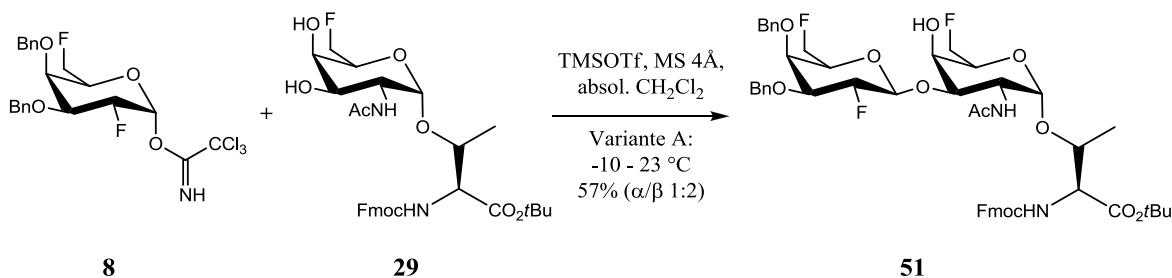


Abb. 3.42 Glycosylierung zum dreifach fluorierten T-Antigen 51.

Um die Selektivität trotz fehlenden Nachbareffektes des 2-Fluordonors **8** zugunsten des  $\beta$ -Produktes zu optimieren, wurde versuchsweise auf die Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel zurückgegriffen (Abb. 3.43).<sup>[107,123]</sup>

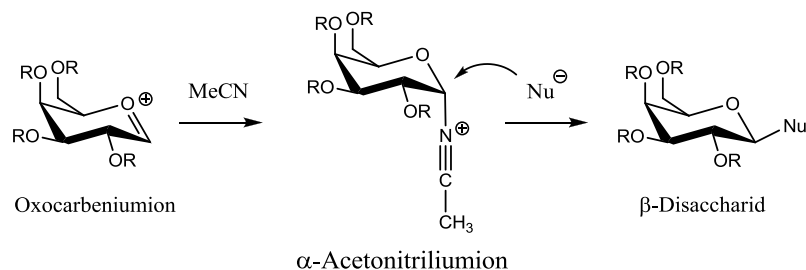


Abb. 3.43 Veranschaulichung des Nitrileffektes.

In Anwesenheit von Acetonitril bildet sich mit dem Oxocarbeniumion ein  $\alpha$ -konfiguriertes Acetonitriliumion<sup>[124]</sup> aus, welches gemäß einer S<sub>N</sub>2-Reaktion von einem Nucleophil unter Umkehr der Stereochemie substituiert werden kann. Folglich führt der Nitrileffekt zur verstärkten Bildung von  $\beta$ -Disacchariden. Der Nachteil der Bildung eines Acetonitriliumions liegt häufig in der einhergehenden Herabsetzung der Reaktivität der Oxocarbeniumionen-Zwischenstufen.<sup>[66]</sup> So konnten *B. G. Davis et al.* zeigen, dass bei ähnlichen Glycosylierungen mit 2-Fluor-2-desoxy-galactosyltrichloracetimidaten in Dichlormethan zwar die besten Ausbeuten, in Acetonitril jedoch die höchsten  $\beta$ -Selektivitäten erreicht werden können. Durch Kombination der beiden Lösungsmittel im Verhältnis 1:1 konnten so bei niedrigen Temperaturen gute Ausbeuten bei akzeptabler stereochemischer Kontrolle erzielt werden.<sup>[66]</sup> Die Übertragung dieser Methode auf die Glycosylierung zum dreifach fluorierten T-Antigen **51** führte tatsächlich zu einer leichten Steigerung des  $\beta$ -Produktes ( $\alpha/\beta$  1:3) bei annähernd gleichbleibender Gesamtausbeute (Abb. 3.44).

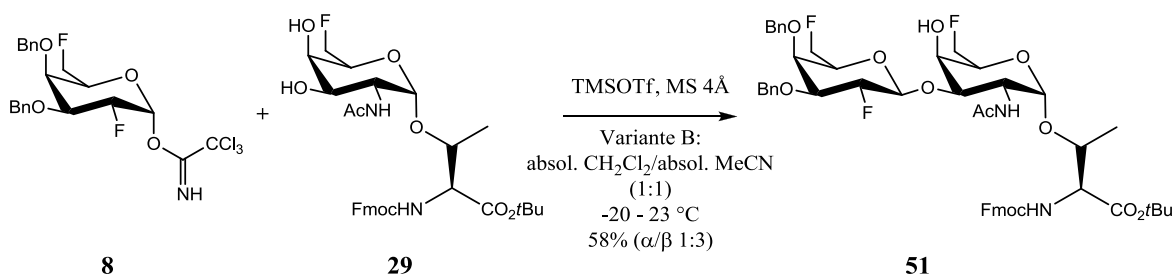


Abb. 3.44 Optimierung der Glycosylierung zum dreifach fluorierten T-Antigen **51**.

Zusätzlich konnte bei Anwendung dieser Methode in sehr geringen Mengen die Bildung eines Nebenproduktes beobachtet werden. So traten nach Abtrennung des  $\alpha$ -Anomers im HPLC-Chromatogramm zwei zusätzliche Peaks auf, deren massenspektrometrische



Analyse mittels HPLC-MS in beiden Fällen das gleiche Masse/Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) ergab. Die per ESI-Massenspektrometrie bestimmten Werte von  $1317.5 m/z$  entsprechen der Masse der Summe des zweifach glycosylierten Produktes **52** ( $1294.5 g/mol$ ) und eines Natriumions. Des Weiteren weist der verdoppelte Peak mit der gleichen Molekülmasse auf ein vorliegendes Anomerengemisch hin.

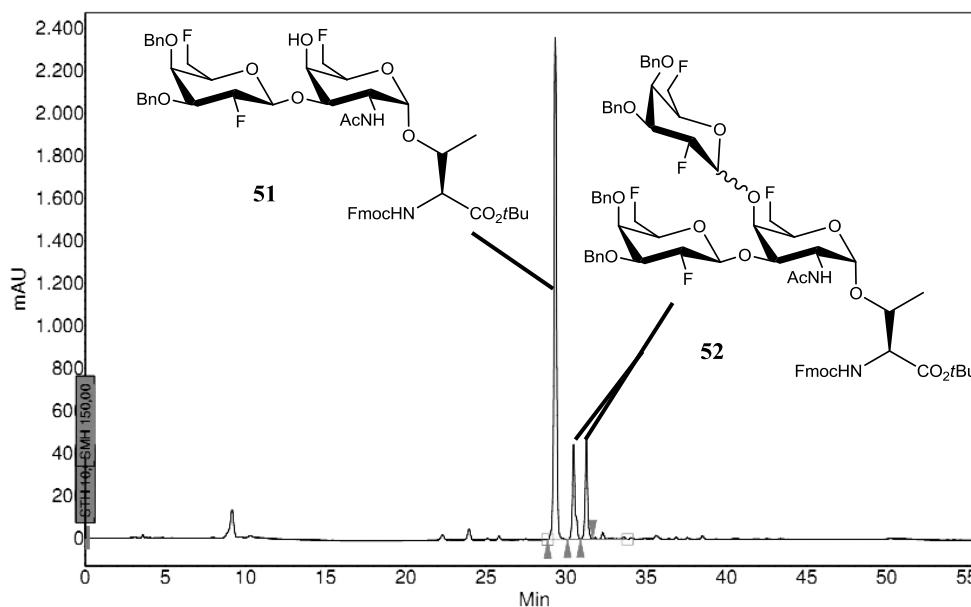


Abb. 3.45 HPLC-Chromatogramm der Glycosylierung nach Säulenchromatographie.

Trotz hoher Regioselektivität der Glycosylierung kommt es unter den oben angegebenen Bedingungen in minimalen Mengen ( $< 10\%$ ) zur Bildung des Trisaccharides **52**. Zur Vermeidung dieser Folgereaktion könnte die Anbringung einer geeigneten Schutzgruppe an Position 4 beziehungsweise eine Reduzierung der eingesetzten Äquivalente des Glycosyldonors führen.

Damit der dreifach fluorierte Baustein **51** ebenfalls in der Festphasensynthese der Glycopeptide verwendet werden konnte, wurde die Säurefunktion analog zur Deblockierung des zweifach fluorierten T-Antigenanalogons **50** freigesetzt.

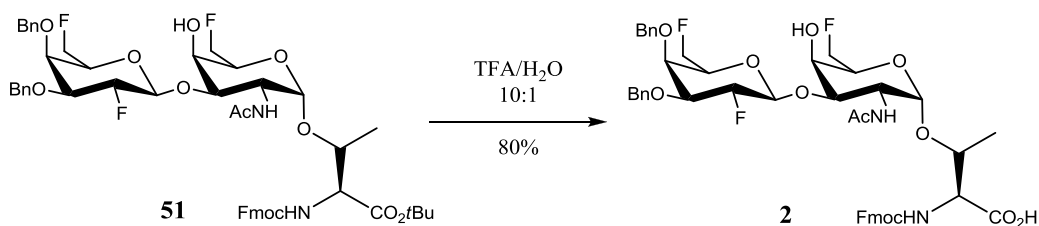


Abb. 3.46 Deblockierung der Säurefunktion.

Nach dreistündiger Behandlung mit einem Trifluoressigsäure/Wasser-Gemisch im Verhältnis 10:1 bei Raumtemperatur und nach flashchromatographischer Isolierung wurde die freie Säure **2** in sehr guter Ausbeute erhalten.

Ein drittes mehrfach fluoriertes T-Antigenderivat wurde schließlich über eine Glycosylierungsreaktion des 6-Desoxy-6-difluor-T<sub>N</sub>-Antigens **30** mit dem 2-Fluor-Galactosyldonor **9** dargestellt. Die Durchführung der Synthese in reinem Dichlormethan bei einem Temperaturverlauf von -20 bis 10 °C führte zu 58% eines Anomerengemisches ( $\alpha/\beta$  1:1). Unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus Acetonitril und Dichlormethan im Verhältnis 1:1 und einem vergleichbaren Temperaturprofil konnte bei annähernd konstanten Gesamtausbeuten eine leichte Selektivitätssteigerung ( $\alpha/\beta$  1:4) aufgrund des Nitrileffektes erzielt werden, wodurch die Menge an gewonnenem  $\beta$ -Anomer von 29% auf 40% gesteigert wurde (Abb. 3.47).

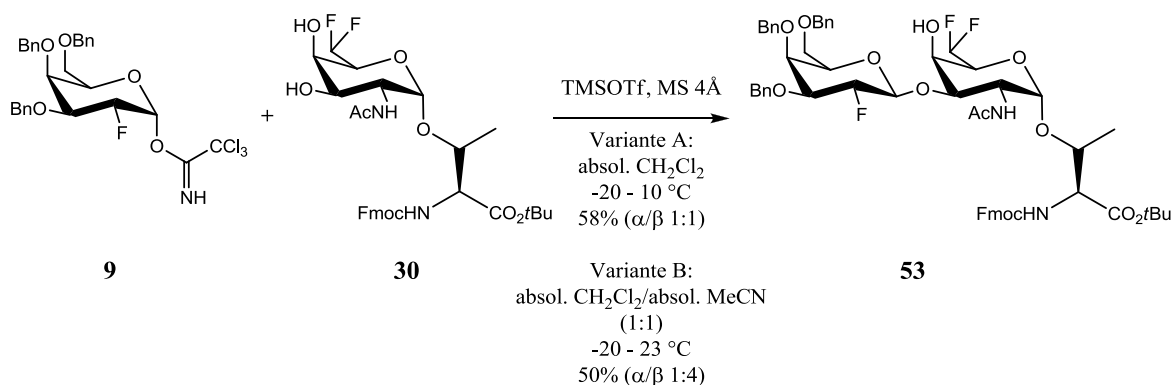


Abb. 3.47 Glycosylierungen zum mehrfach fluorierten T-Antigenanalogon **53**.

Per Dünnschichtchromatographie konnte bei Variante B beobachtet werden, dass die Umsetzung zum Disaccharid **53** bei niedrigen Temperaturen nur sehr langsam voranschreitet. Daher wurde als weiterer Optimierungsversuch die Reaktion im Lösungsmittelgemisch Dichlormethan/Acetonitril bereits bei 0 °C durch Zugabe des Promotors TMSOTf gestartet und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die chemische Gesamtausbeute lag bei diesem Protokoll nur bei 36% bei gleichzeitiger Verminderung der erwünschten  $\beta$ -Selektivität ( $\alpha/\beta$  1:2.5).

Die Freisetzung der Säure **3** konnte erneut durch die Anwendung des Standardprotokolls unter Verwendung von Trifluoressigsäure/Wasser 10:1 erreicht werden. Im Gegensatz zu den vorherigen fluorierten T-Antigenanaloga **50** und **51**, die sich in sehr guten Ausbeuten von 90% (**50**) und 80% (**51**) deblockieren ließen, scheint das in Position 6 des Galactosaminbausteins zweifach fluorierte Analogon **53** deutlich säurelabiler zu sein. So

konnten nach analoger Verseifung in einem Gemisch aus Trifluoressigsäure/Wasser (10:1) trotz vollständigen Umsatzes nur 55% der freien Säure **3** erhalten werden.

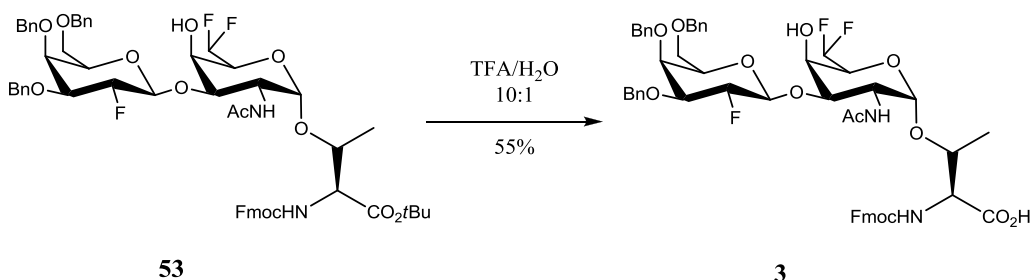


Abb. 3.48 Verseifung des tert-Butylesters **53**.

Es konnten ausgehend von den fluorierten T<sub>N</sub>-Antigenen **29** und **30** durch Kombination mit den ebenfalls fluorierten Donoren **8** und **9** insgesamt drei neue Glycosylaminosäure-Bausteine hergestellt werden. Diese stehen im Folgenden für den Einbau in die *tandem repeat*-Sequenz des Mucins MUC1 bereit (Kap. 3.4.2).

### 3.3.2 Glycosylierungen des benzylidenblockierten T<sub>N</sub>-Bausteins

Einen weiteren Bestandteil dieser Forschungsarbeit stellte der mikroreaktorunterstützte Zugang zu fluorierten Analoga des T-Antigens dar. Die zentrale Glycosylierung sollte in einem kontinuierlichen Verfahren durchgeführt und optimiert werden. Wie bereits einleitend erwähnt wurde, sollte dabei auf die von *R. R. Schmidt* etablierte Methode der hochreaktiven Trichloracetimidatdonoren zurückgegriffen werden.<sup>[86,87]</sup> Dazu wurden die Glycosylierungen des benzylidenblockierten T<sub>N</sub>-Antigens **28** mit dem benzylierten 2-F-Galactosyldonor **9**<sup>[41,125]</sup> sowie dem acetylierten 6-F-Trichloracetimidatdonor **7** untersucht (Abb. 3.49).

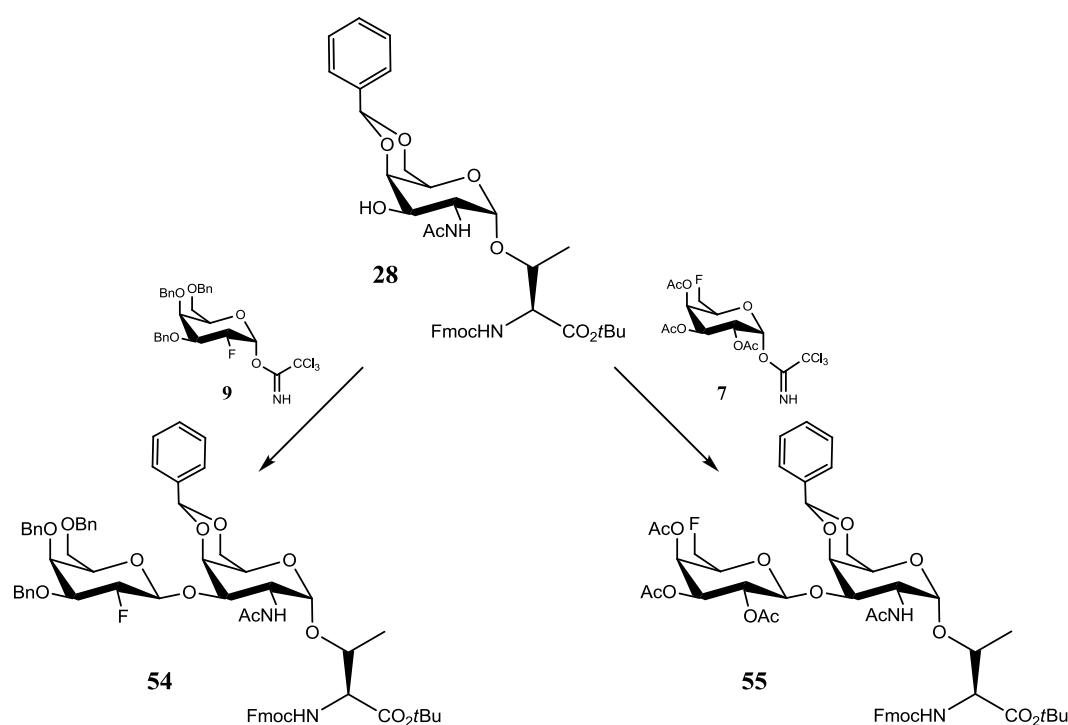


Abb. 3.49 Überblick über die Glycosylierungen am benzylidengeschützten T<sub>N</sub>-Baustein **28**.

#### 3.3.2.1 Glycosylierungen im Batch-Verfahren

Als Referenz für die Continuous-Flow-Versuchsreihen in den mikrostrukturierten Systemen wurden die zu untersuchenden Glycosylierungen zunächst im konventionellen Batch-Verfahren durchgeführt.

Bei der Glycosylierung zum Bn<sub>3</sub>2FGal-Bzn-T-Antigen **54** wurde analog zur publizierten Vorschrift verfahren.<sup>[41]</sup> Die beiden Edukte wurden in absolutem Dichlormethan mit frisch

aktiviertem Molsieb vorgerührt und nach Abkühlen der Lösung auf 0 °C wurde die Reaktion durch Zugabe der Lewis-Säure TMSOTf gestartet. Das Gemisch wurde daraufhin binnen 18 Stunden auf Raumtemperatur erwärmt und die Reaktion wurde mit festem Natriumhydrogencarbonat abgebrochen. Die Isolierung des Produktes erfolgte nach säulenchromatographischer Reinigung. Auf diesem Wege konnte eine Gesamtausbeute von 76% bzw. eine auf das  $\beta$ -Anomer bezogene Ausbeute von 65% ( $\alpha/\beta$  1:6) erzielt werden.

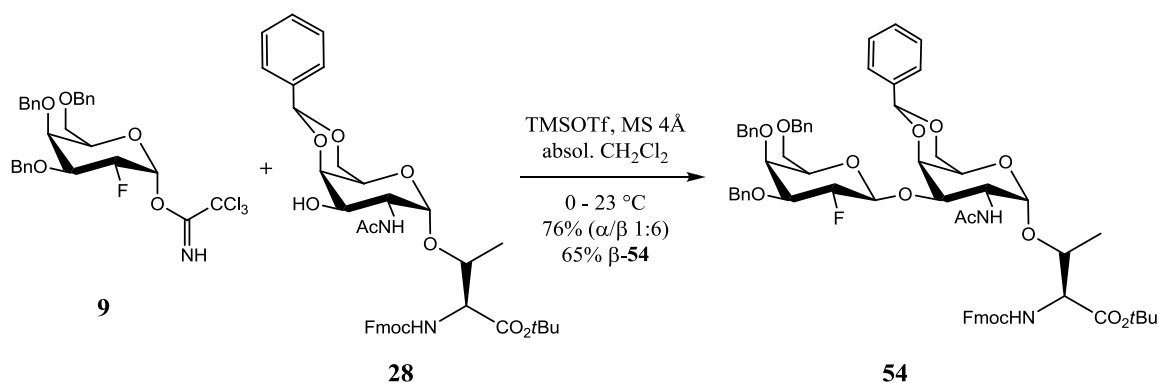


Abb. 3.50 Batch-Glycosylierung zum 2'-Desoxy-2'-fluor-T-Analogon 54.

Die Glycosylierung zum acetylierten 6'-F-Disaccharid 55 wurde in Anlehnung an das oben beschriebene Verfahren durchgeführt. Die Anwesenheit der partizipierenden Acetylgruppe in Position 2 des Galactosyldonors 7 lässt jedoch höhere Reaktionstemperaturen zu, da durch den Nachbargruppeneffekt die selektive  $\beta$ -Glycosylierung begünstigt ist.

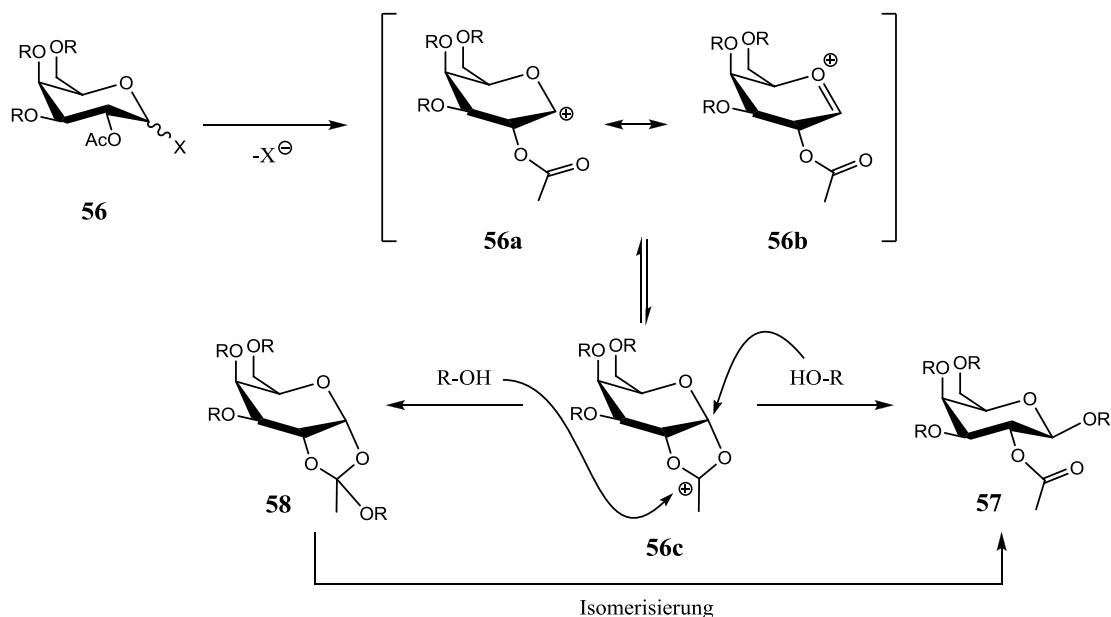


Abb. 3.51 Nachbargruppeneffekt der Acetylgruppe in Position 2.

Das intermediär gebildete Oxocarbeniumion **56a,b** erliegt einem intramolekularen nucleophilen Angriff der Acetatgruppe in Position 2 des Zuckers zum Carbeniumion **56c**. Im Folgenden kann die freie Hydroxyfunktion des Akzeptors entweder mit dem anomeren Zentrum unter Ausbildung des  $\beta$ -konfigurierten Disaccharids **57** reagieren, oder alternativ den Orthoester **58** bilden. Dieser kann unter saurer Katalyse ebenfalls zum 1,2-*trans*-Glycosid isomerisieren (Abb. 3.51). Daher wurde die Reaktion zum Ac<sub>3</sub>6FGal-Bzn-T-Antigen **55** bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei bereits nach drei Stunden Reaktionszeit in 89% Ausbeute ausschließlich das *trans*-Produkt erhalten werden konnte.

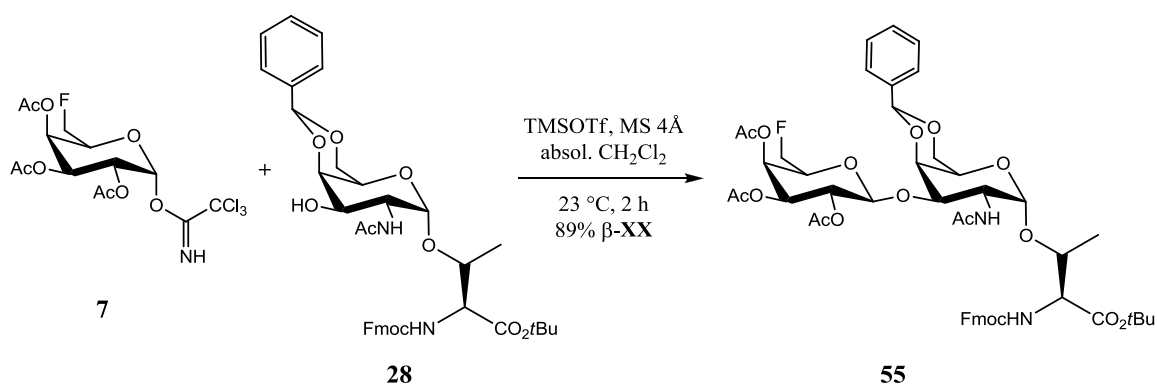


Abb. 3.52 Batch-Glycosylierung zum 6'-Desoxy-6'-fluor-T-Analogon **55**.

### 3.3.2.2 Glycosylierungen im Continuous-Flow-Verfahren

Zur Übertragung der beiden oben gezeigten Glycosylierungen auf eine Reaktionsführung im Durchfluss-Mikroreaktor wurde nur mit kleinen Ansätzen von ca. 20 mg des jeweiligen Glycosylakzeptors gearbeitet, um den Substanzverbrauch zu minimieren. Die Bestimmung der Ausbeute, des Anomerenverhältnis und des Umsatzes erfolgte daher mittels HPLC. Zu diesem Zweck wurde eine quantitative Kalibrierung der UV-Absorption des Glycosylakzeptors und der jeweiligen Produkte bei der Wellenlänge  $\lambda = 214$  nm in Abhängigkeit von der Konzentration mithilfe einer Verdünnungsreihe erstellt (Abb. 3.53, Abb. 3.54, Abb. 3.55).

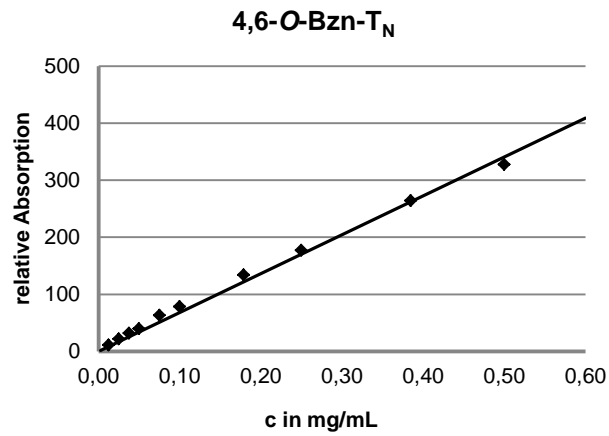


Abb. 3.53 Kalibrierung des benzylidengeschützten T<sub>N</sub>-Antigens 28.

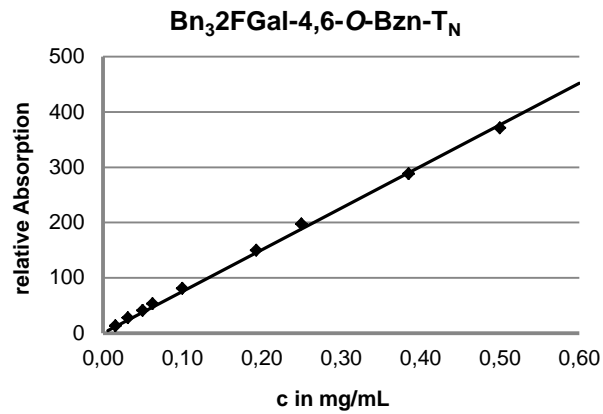


Abb. 3.54 Kalibrierung des 2'-Desoxy-2'-fluor-T-Antigens 54.

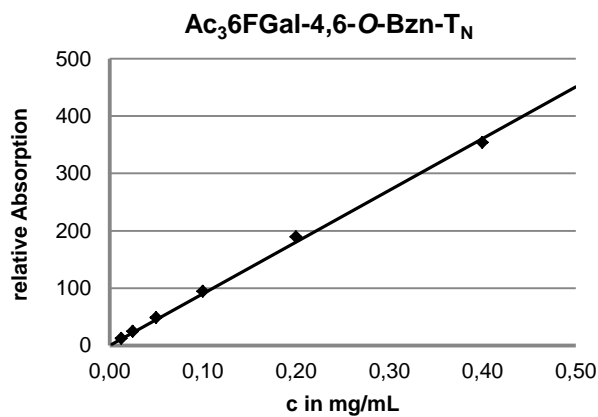


Abb. 3.55 Kalibrierung des 6'-Desoxy-6'-fluor-T-Antigens 55.

Der proportionale Zusammenhang des Integrals der relativen Absorption  $A$  zur Konzentration  $c$  der Substanzen konnte durch eine lineare Regressionsgerade beschrieben werden, deren Güte durch den Korrelationskoeffizienten  $R^2$  abgeschätzt wurde.

Verbindung	Konzentration	$R^2$
Benzylidengeschütztes T <sub>N</sub> -Antigen <b>28</b>	$c = A/681.4$	0.993
2'-Desoxy-2'-fluor-T-Antigen <b>54</b>	$c = A/753.5$	0.998
6'-Desoxy-6'-fluor-T-Antigens <b>55</b>	$c = A/901.2$	0.998

*Tab. 3.2 Zusammenhang der Konzentration  $c$  und der Absorption  $A$ .*

Durch die experimentell bestimmte Abhängigkeit der Konzentration von der Absorption lässt sich somit die enthaltene Stoffmenge der in Tab. 3.2 aufgelisteten Verbindungen in einer Probe quantitativ bestimmen.

Für die Durchführung der Optimierungsversuche wurden typischerweise 20 mg (0.03 mmol) des Glycosylakzeptors und 2.5 Äquivalente des entsprechenden Donors separat in absol. Dichlormethan gelöst. Im Sinne einer inversen Glycosylierung<sup>[126]</sup> wurde dann der Promotor (1.5  $\mu$ L TMSOTf) zur Lösung des Akzeptors gegeben. Diese Reaktionsführung bietet sich vor allem bei längeren Reaktionszeiten bzw. bei Verwendung von unreaktiven Donoren an, da so eine frühzeitige Zersetzung des durch den Promotor aktivierten Donors verhindert wird. Die beiden Lösungen wurden mit Hilfe einer Spritzenpumpe durch ein SIMM-V2-Mischelement in die PTFE-Verweilschleife (Durchmesser 1/16 Zoll) mit einem Gesamtvolumen von 3 mL gepumpt und die Reaktionszeiten wurden durch Anpassen der Förderrate der Pumpe eingestellt (Tab. 3.3). Um die Reaktionstemperatur zu variieren, wurden Mikromischer und Verweilschleife wahlweise mittels Kryostat gekühlt oder im Thermostaten erwärmt. Durch Eintropfen der Reaktionslösung in eine ges. Natriumchlorid-Lösung erfolgte der Abbruch der Reaktion unmittelbar nach Durchlaufen der Verweilschleife (Abb. 3.56).

Reaktionszeit in min	Flussrate in mL/min
22.5	0.133
45	0.067
90	0.033

*Tab. 3.3 Flussraten der jeweiligen Reaktionszeiten.*



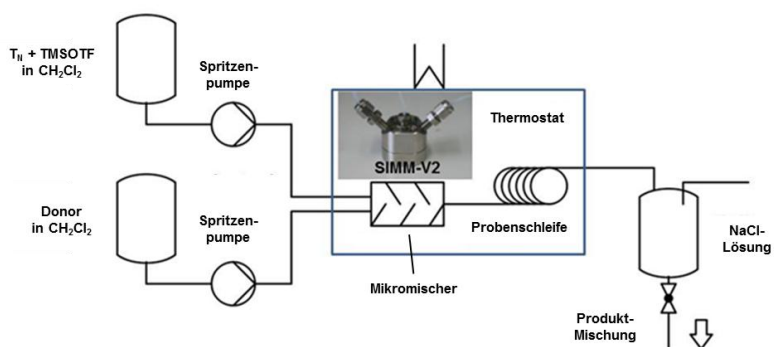


Abb. 3.56 Schematischer Aufbau der Glycosylierungen im Durchfluss.

### Screening der Glycosylierung zum 2'-Desoxy-2'-fluor-T-Antigen 54:

Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurde dann die Glycosylierung von **9** mit **28** durchgeführt.

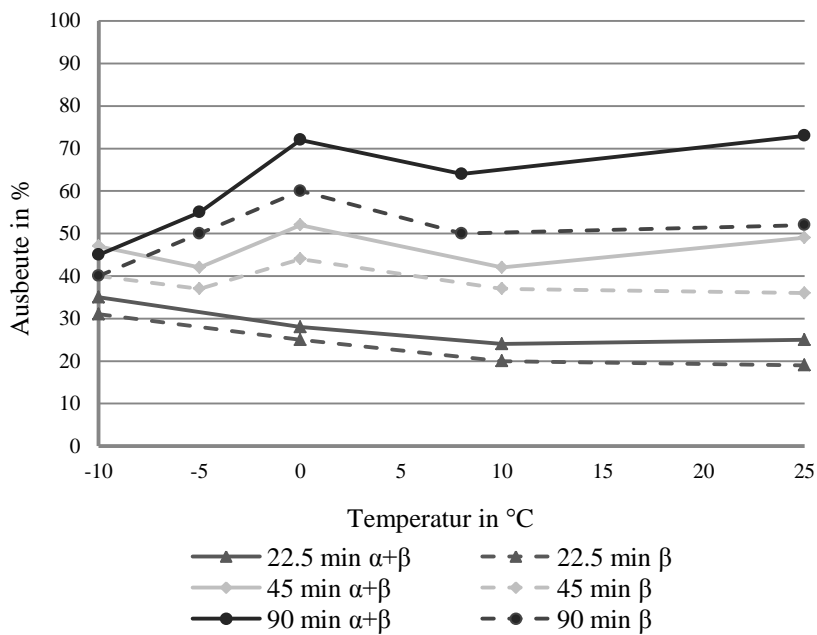


Abb. 3.57 Screening der Glycosylierung zum 2'-Desoxy-2'-fluor-T-Antigen 54.

Die Versuchsreihe dieser Glycosylierung spiegelt das grundlegende Dilemma bezüglich Ausbeute und Selektivität der Reaktion wider. Während die Selektivität bezüglich des kinetisch bevorzugten *trans*-Produktes mit abnehmenden Reaktionstemperaturen (25 °C,  $\alpha/\beta$  1:3  $\rightarrow$  -10 °C,  $\alpha/\beta$  1:8) ansteigt, sinkt gleichzeitig die Gesamtausbeute des gebildeten Disaccharids. Bei einer Temperatur von 0 °C findet sich ein kleines Maximum hinsichtlich Umsatz und Stereokontrolle. Förderte man die Reaktionslösung innerhalb von 90 Minuten durch die Verweilschleife, konnte bei einer Gesamtausbeute von 71% und einem  $\alpha/\beta$ -Verhältnis von 1:6 das gewünschte Produkt  $\beta$ -**54** in 60%iger Ausbeute generiert werden. Niedrigere Reaktionstemperaturen führten zwar zu höheren Anteilen des  $\beta$ -Anomers, die Reaktionsgeschwindigkeit und die damit einhergehende Gesamtausbeute wurde jedoch signifikant herabgesetzt. Bei höheren Temperaturen im Bereich von 23 °C konnte hingegen eine Steigerung der Gesamtausbeute erzielt werden, die jedoch durch einen Verlust an  $\beta$ -Stereoselektivität überkompensiert wurde und letztlich die Ausbeute des  $\beta$ -Anomers deutlich verringerte. Ebenso lässt sich aus dem Screening die Tendenz erkennen, dass gewisse Reaktionszeiten nötig sind um einen ausreichenden Umsatz zu gewährleisten. Die Reaktionszeit von 90 Minuten lieferte deutlich höhere Ausbeuten als es bei 45 Minuten der Fall war. Eine Verweilzeit von 22.5 Minuten führte sogar zu derart geringen Umsätzen, dass selbst bei Änderung der Reaktionstemperatur keine Erhöhung der Gesamtausbeute zu beobachten war. Durch den Versuch einer Verlängerung der Verweilzeit auf 200 Minuten konnte ebenfalls keine Steigerung der Gesamtausbeute erzielt werden. Daher wurde versucht, die  $\beta$ -Selektivität der Glycosylierung auch bei 0 °C und 90 Minuten Verweilzeit durch die Wahl des Lösungsmittels zu beeinflussen (Tab. 3.4).

Solvens	Ausbeute in %	$\alpha/\beta$	$\beta$ in %
Acetonitril	6	0:1	6
Tetrahydrofuran	15	5:1	3
1,2-Dichlorethan	33	1:6	28

Tab. 3.4 Variation des Lösungsmittels.

Die Verwendung von 1,2-Dichlorethan lieferte bei ähnlichen Selektivitäten signifikant schlechtere Ausbeuten wie die Durchführung in Dichlormethan. Bei Einsatz von Tetrahydrofuran wurde bei niedrigen Umsätzen zudem das  $\alpha$ -Anomer bevorzugt gebildet, wohingegen die Verwendung von Acetonitril durch den Nitrileffekt zu einem drastischen Einbruch der Ausbeute, unter ausschließlicher Bildung des gewünschten *trans*-Glycosids **54** führte.

Zudem wurde der ebenfalls häufig in *Schmidt*-Glycosylierungen verwendete Promotor Bortrifluorid-Etherat ( $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$ ) als Alternative zum getestet. Würde eine zu harsche

Aktivierung durch das TMSOTf die frühzeitige Zersetzung des Trichloracetimidat-Donors **9** bewirken, sollte die mildere Lewis-Säure  $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$  folglich zu einer Erhöhung des Umsatzes führen. Es zeigte sich, dass bei näherungsweise gleichen Anomerenverhältnissen der Wechsel des Promotors erneut mit Einbußen in der Gesamtausbeute verbunden war (Tab. 3.5). Eine frühzeitige Zersetzung des Donors durch die stärkere Lewis-Säure TMSOTf scheint demnach keine wesentliche Rolle zu spielen. Vielmehr ist das höhere Aktivierungspotential des Sulfonats nötig, um eine ausreichende Reaktionsgeschwindigkeit zu ermöglichen. Die Reaktion wurde dabei erneut bei einer Verweilzeit von 90 Minuten im Reaktor durchgeführt.

T in °C	Ausbeute in %	$\alpha/\beta$	$\beta$ in %
0	39	1:5	32
25	38	1:2	25

Tab. 3.5 Verwendung des Promotors  $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$ .

Um die Praktikabilität der entwickelten Methode zu demonstrieren, wurde die Reaktion im präparativen Maßstab durchgeführt. Für die Glycosylierung wurden 100 mg (0.15 mmol) des benzyldenblockierten Akzeptors **28** und 10  $\mu\text{L}$  TMSOTf sowie 240 mg (0.40 mmol) des 2F-Galactosyldonors **9**, die jeweils in 8 mL absolutem Dichlormethan gelöst und nach dem oben beschriebenen Protokoll zur Reaktion gebracht wurden. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte bei einer Gesamtausbeute von 71% und einem Anomerenverhältnis von  $\alpha/\beta = 1:7$  das  $\beta$ -konfigurierte Produkt in 61% Ausbeute erhalten werden.

Demnach zeigen die Ergebnisse der Glycosylierung im kontinuierlichen Prozess einen effizienten Zugang auch zu komplexen Disaccharidstrukturen. So konnten durch Optimierung der Prozessparameter die Ausbeuten unter konventionellen Reaktionsbedingungen im Kolben (Reaktionszeit von ca. 18 Stunden) bereits bei einer Verweilzeit von nur 90 Minuten im Continuous-Flow-Modus erreicht werden. Ebenfalls in Bezug auf die Selektivitäten der Reaktion produzierten beide Methoden ähnliche 1,2-*trans*-Überschüsse, wobei in den Versuchen im Durchfluss sogar eine höhere Selektivität zugunsten des  $\beta$ -Anomers erreicht wurde. Die Reaktionsführung im Mikroreaktor erwies sich somit als potentes Hilfsmittel für das Screening bzw. die Optimierung von Reaktionsbedingungen und konnte ohne weitere Entwicklungsarbeit direkt für Synthesen präparativen Maßstab angewendet werden.

### Screening der Glycosylierung zum 6'-Desoxy-6'-fluor-T-Antigen 55:

Analog zur erfolgreichen Optimierung der zuvor beschriebenen Glycosylierung wurde auch die Bildung des 6'-Desoxy-6'-fluor-T-Antigen **55** untersucht. Beim Screening der unterschiedlichen Reaktionstemperaturen wurde anhand der HPLC-Diagramme die Bildung eines unpolaren Nebenproduktes nachgewiesen, dessen Menge von der Reaktionstemperatur abhängig ist. Mittels ESI-Massenspektrometrie konnte dem zugehörigen Produktpeak ein Masse/Ladungs-Verhältnis von 1001.53 g/mol zugeordnet werden, was Summe der Masse des Disaccharids **55** und einem Natriumion (ber.: 1001.37 g/mol) entspricht. In Anbetracht des großen Unterschiedes in der Retentionszeit (ca. 6 min) ist das Vorliegen eines weiteren Konformers beziehungsweise Anomers auszuschließen, so dass allem Anschein nach die temperaturabhängige Bildung des Orthoesters auftrat, wie sie in Arbeiten von *K. Baumann* für ähnliche Substrate bereits beschrieben wurde.<sup>[127]</sup>

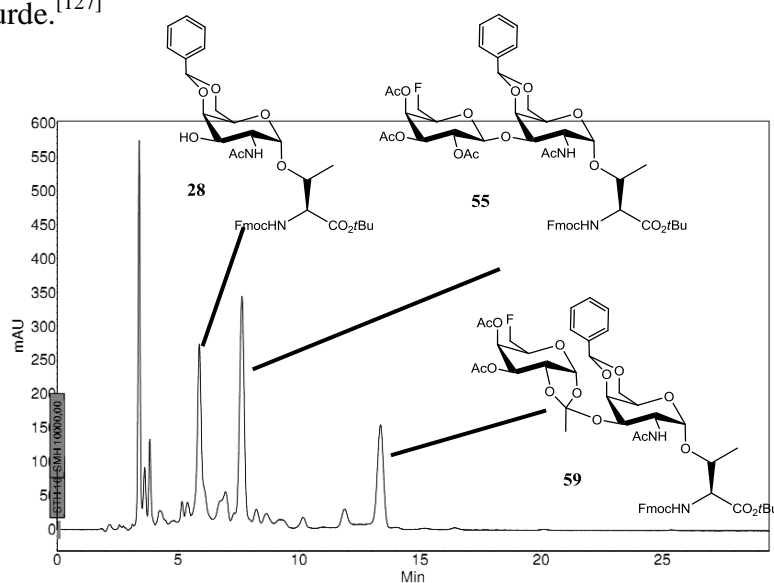


Abb. 3.58 HPLC-Diagramm zur Orthoesterbildung.

Im Folgenden sind die Ergebnisse des Temperatur-Screenings inklusive der Bildung des Orthoesters graphisch dargestellt.

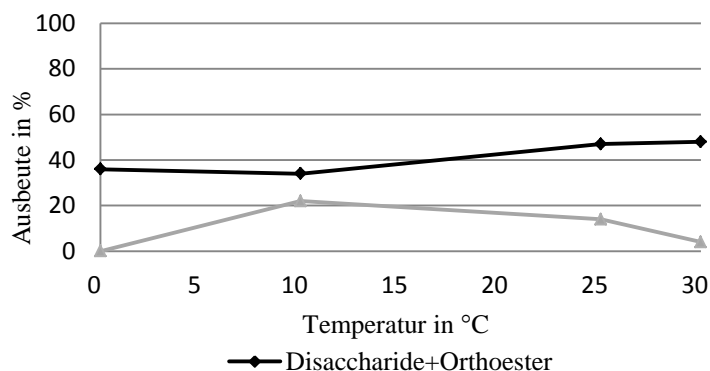


Abb. 3.59 Screening der Glycosylierung zum 6'-Desoxy-6'-fluor-T-Antigen 55 bei 90 min.

Im Diagramm ist nur eine schwache Abhängigkeit des Umsatzes (schwarze Kurve) von der Reaktionstemperatur zu erkennen. So führte die Erhöhung der Temperatur von 0 °C auf 30 °C lediglich zu einer moderaten Steigerung des Umsatzes um ca. 10%. Interessant ist hierbei die Entwicklung der Orthoesterbildung. Bei niedrigen Temperaturen (0 °C) scheint sich ausschließlich das angestrebte  $\beta$ -konfigurierte Produkt zu bilden, wohingegen bei 10 °C der Orthoester zum Hauptprodukt wird. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur auf 25 °C nimmt der Anteil des Orthoesters im Reaktionsgemisch ab, während gleichzeitig der Umsatz leicht ansteigt. Bei 30 °C kann schließlich kaum noch Orthoesterbildung beobachtet werden und der Umsatz entspricht näherungsweise der Reaktion zum gewünschten *trans*-Produkt. Dies steht im Einklang mit dem zuvor beschriebenen Mechanismus der Glycosylierung in Anwesenheit einer partizipierenden Nachbargruppe (Abb. 3.51). Dabei ist augenscheinlich sowohl die Bildung des Orthoesters als auch dessen Isomerisierung zum 1,2-*trans*-Glycosid temperaturabhängig. Während bei niedrigen Temperaturen der Orthoester noch nicht gebildet wird, liegt er im Bereich von 10 °C als Hauptprodukt vor und wird bei weiterer Steigerung der Reaktionstemperatur durch die verstärkt einsetzende, sauer katalysierte Isomerisierung in das gewünschte Produkt umgewandelt.

Um eine Steigerung der bisher nur mäßigen Ausbeute an **55** zu erreichen, wurde 1,2-Dichlorethan als Lösungsmittel eingesetzt, da dies höhere Reaktionstemperaturen erlaubt. Bei einer Verweilzeit von 90 Minuten in der auf 45 °C temperierten PTFE-Kapillare konnten jedoch nur 19% Umsatz erreicht werden, wobei erneut kein Orthoester auftrat. Daneben wurde die Glycosylierung auch mit einer Verweilzeit von 120 Minuten bei 30 °C durchgeführt, wodurch sich der Umsatz jedoch gerade einmal um 2% im Vergleich zur 90-minütigen Umsetzung steigern ließ.

### 3.3.3 Acetalöffnung und versuchte Fluorierung am T-Antigen

Die unmittelbar zuvor gezeigten Glycosylierungen im kontinuierlichen Verfahren erlauben zwar einen Zugang zu größeren Mengen der fluorierten Disaccharide **54** und **55**, jedoch sollte auch versucht werden, die späte Fluorierung auf ein entsprechendes T-Antigen zu übertragen. Zu diesem Zweck sollte die nucleophile, DAST<sup>®</sup>-vermittelte Fluorierung an der selektiv deblockierten Glycosylaminosäure durchgeführt werden. Hierzu sollten die erhaltenen 2'-F- beziehungsweise 6'-F-T-Antigenanaloga **54** und **55** als Startmaterialien genutzt werden, was eine regioselektive Freisetzung der Hydroxylfunktion in Position 6 des T-Bausteins voraussetzte (Abb. 3.60).

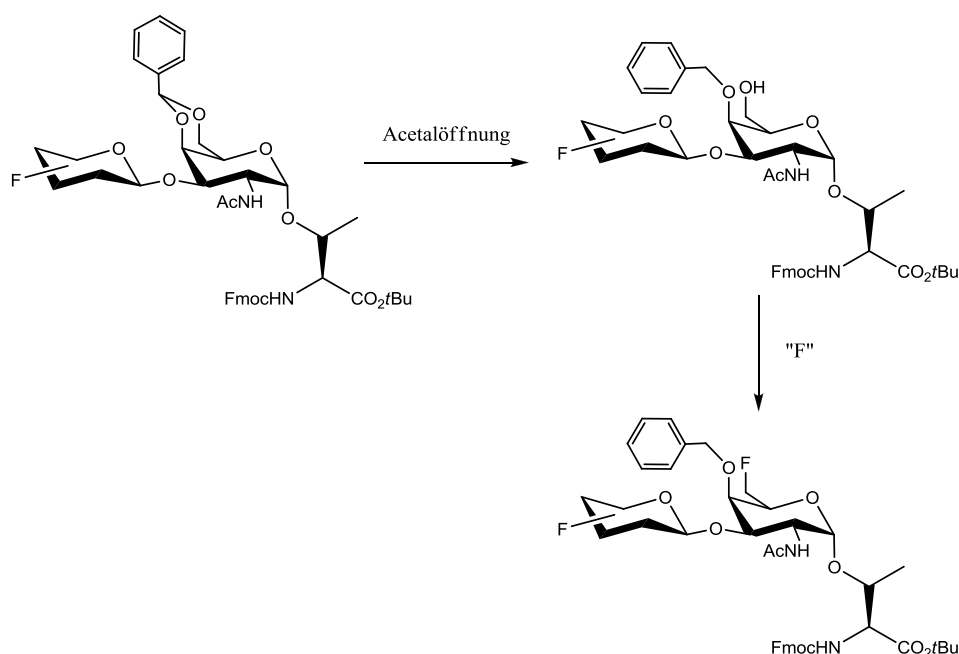


Abb. 3.60 Synthesestrategie zur Fluorierung am T-Antigen.

Die regioselektive Ringöffnung von Benzylidenacetalen spielt sowohl in der Kohlenhydratchemie als auch in der Naturstoffsynthese eine große Rolle und es existiert eine Fülle an Varianten um die gewünschte Öffnung zu erreichen.<sup>[128,129]</sup> Die gängige Umwandlung des Acetals in eine Benzylgruppe verläuft unter reduktiven Bedingungen in Gegenwart einer Lewis-Säure (LA), deren Anbindung an den Sauerstoff in Position 4 oder 6 über den regioselektiven Ausgang der Reaktion entscheidet (Abb. 3.61). So konnten *Nánási et al.* am Beispiel unterschiedlicher Glucosederivate nachweisen, dass neben elektronischen Effekten vor allem der sterische Anspruch des Substituenten R<sup>3</sup> eine entscheidende Rolle bei der Regiokontrolle der initialen Komplexierung spielt.<sup>[130]</sup>

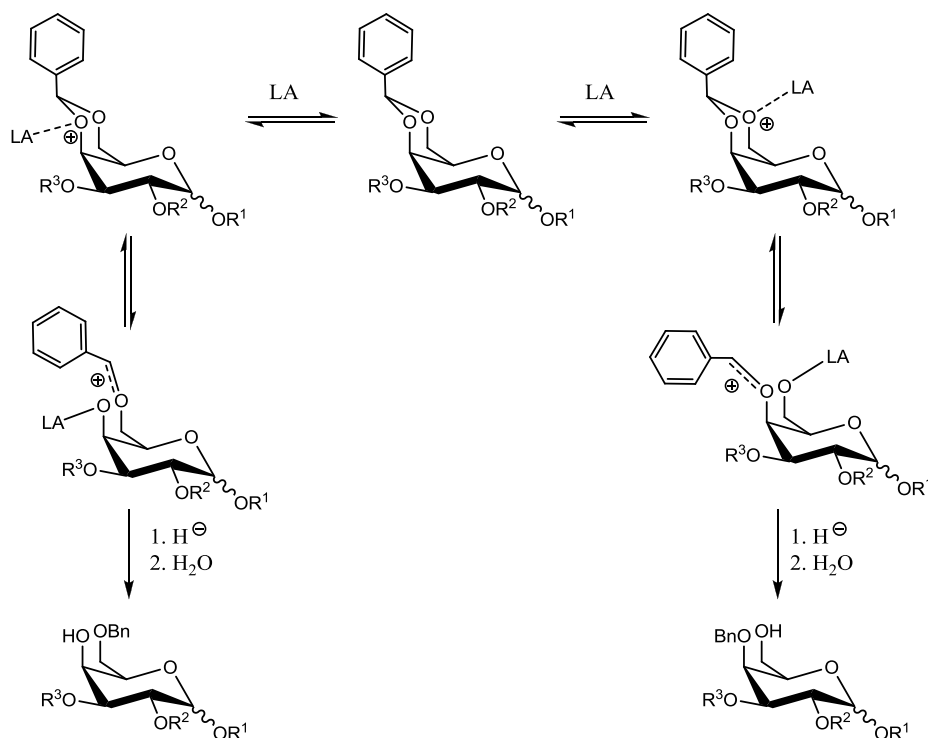


Abb. 3.61 Mechanismus der reduktiven, Lewis-Säure-katalysierten Acetalöffnung.

Betrachtet man hingegen Galactosederivate bezüglich des Einflusses des Substituenten in Position 3, so relativieren sich diese Effekte teilweise, da die räumliche Distanz des Substituenten zur Position 4 merklich größer ist.<sup>[131,132]</sup> Um dennoch eine hinreichende Differenzierung der beiden Positionen gewährleisten zu können, müssen im Fall von galactokonfigurierten Substraten sterisch anspruchsvolle Lewis-Säuren eingesetzt werden. So konnte analog einer Vorschrift von *Hamana und Mitarbeitern* bei Verwendung der Lewis-Säure Dichlorphenylboran und Triethylsilan als Hydridquelle in absolutem Dichlormethan und bei einer Reaktionstemperatur von  $-78\text{ °C}$ <sup>[133]</sup> das 2'-Desoxy-2'-fluor-T-Antigenanalogon **54** in 83%iger Ausbeute in das 4-O-Benzyl-6-hydroxy-Produkt **60** überführt werden.

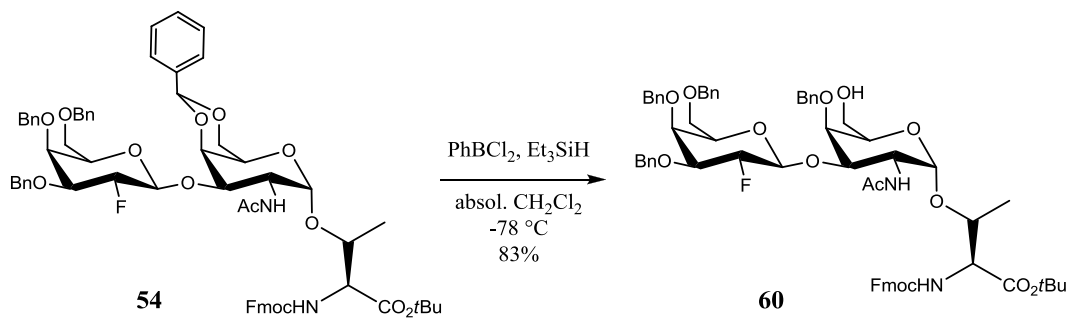


Abb. 3.62 Benzylidenacetalöffnung am 2'-Desoxy-2'-fluor-T-Antigenanalogon 54.

Die anschließende Einführung des Fluorsubstituenten in Position 6 wurde erneut mit Hilfe von DAST<sup>®</sup> versucht. In Anlehnung an die Fluorierung des isopropyliden-geschützten T<sub>N</sub>-Antigens **35** wurde die Umsetzung mit einem leichten Überschuss an DAST<sup>®</sup> (1.3 Äquivalente) in absolutem Dichlormethan und in Gegenwart der Base 2,4,6-Collidin durchgeführt. Bei Raumtemperatur konnte jedoch kein Umsatz beobachtet werden, weshalb die Reaktion auch unter Mikrowelleneinstrahlung erprobt wurde. Bei 100 W maximaler Mikrowellenleistung und einer Reaktionstemperatur von 80 °C konnte jedoch nur ein komplexes Produktgemisch erhalten werden, in dem mittels HPLC-MS-Untersuchung das gewünschte Produkt **61** in Spuren nachgewiesen werden konnte. Aus zeitlichen Gründen konnte eine Optimierung der Reaktion bzw. eine Anpassung des Schutzgruppenmusters hin zu den stabilisierenden Acetatgruppen nicht mehr durchgeführt werden.

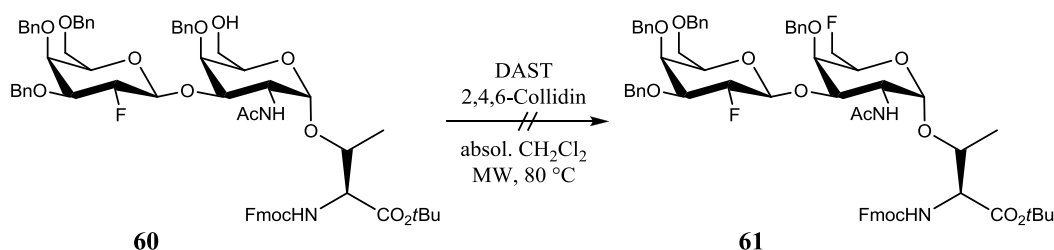


Abb. 3.63 Fluorierungsversuch des T-Antigenanalogons **60**.

Die selektive Öffnung des Benzylidenacetals wurde ebenso am Beispiel des im Mikroreaktor zugänglichen 6'-Desoxy-6'-fluor-T-Antigens **55** untersucht. Unter den milden Bedingungen, die sich beim benzylierten 2'-Derivat **54** bewährt haben (Abb. 3.62), entstand bereits bei -78 °C ein nicht genauer zu analysierendes Produktgemisch. Die Öffnung des Acetals konnte in HPLC-MS-Untersuchungen zwar in Spuren nachgewiesen werden, es fanden sich allerdings auch zahlreiche Nebenprodukte deren genaue Identifikation nicht möglich war. Unter anderem konnte die komplette Abspaltung des Acetals beobachtet werden. Die Route wurde daher aus Zeitgründen verworfen.

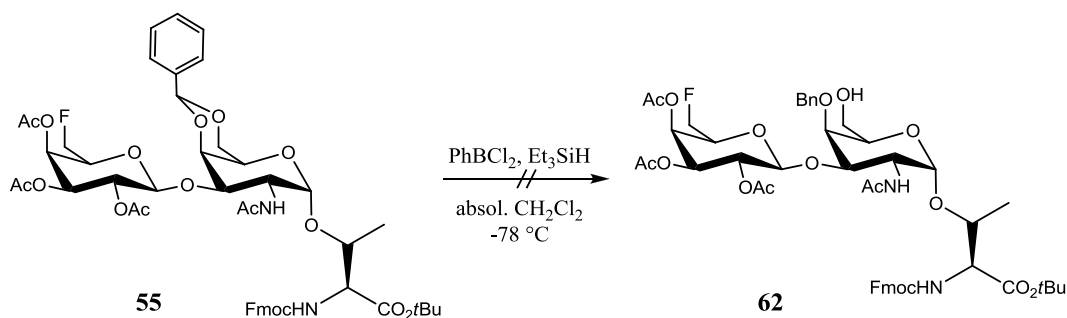


Abb. 3.64 Versuch der Acetalöffnung am 6'-Desoxy-6'-fluor-T-Antigen **55**.



### 3.4 Synthesen der fluorierten Glycopeptide und die Konjugation an Carrierproteine

Die immuntherapeutische Evaluierung der mehrfach fluorierten MUC1-Glycopeptid-konjugate setzt zunächst den Einbau der synthetisierten, mehrfach fluorierten Glycosyl-aminosäuren in die Peptidsequenz des MUC1 sowie dessen Anbindung an ein geeignetes Carrierprotein über einen nicht-immunogenen Spacer voraus.

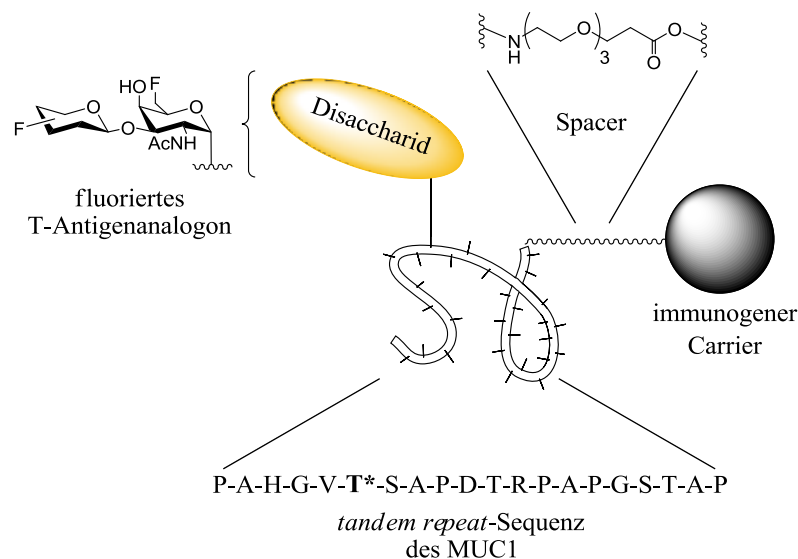


Abb. 3.65 Konzept der potentiellen Krebsvakzine.

Wie bereits einleitend erörtert (Kap. 1.3) und in Arbeiten von *Westerlind*<sup>[29]</sup> und *Kaiser*<sup>[38,134]</sup> demonstriert, eignet sich die *tandem repeat*-Sequenz des Mucins MUC1 als Peptidepitop für den Aufbau der Krebsvakzinkandidaten. Die jeweiligen Glycosyl-aminosäuren wurden dazu am C-Terminus deblockiert und halbautomatisch per Festphasensynthese eingebaut. Um eine ausreichende Immunantwort zu gewährleisten, erfolgte anschließend eine Anbindung an die beiden immunstimulierenden Trägerproteine Rinderserumalbumin (BSA) und Tetanus Toxoid (TTox) unter Einsatz eines immunologisch indifferenten Triethylenglykol-Linkers.

### 3.4.1 Synthese des Ethylenglykol-Spacers

Um die Konjugation der fluorierten Glycopeptide an die Carrierproteine zu bewerkstelligen, die durch die Bereitstellung von T-Zell-Epitopen für die entsprechende Stimulierung des zellulären Teils des Immunsystems verantwortlich sind, wurde ein nicht-immunogener Spacer am Ende der Peptidsequenz installiert. Durch den Spacer wird die erforderliche räumliche Distanz zwischen MUC1-Sequenz und dem Trägerprotein hergestellt, so dass eine Interaktion der Epitope verhindert wird.<sup>[28]</sup> Ein solcher Spacer sollte daher nicht in Wechselwirkung mit den Teilstrukturen treten und über keine biologische Aktivität verfügen. Der im Rahmen dieser Forschungsarbeit verwendete Triethylenglykol-Spacer erfüllt diese Voraussetzungen und trägt zudem zur Löslichkeit des Konjugates in Wasser bei.

Die Synthese des Triethylenglykol-Spacers **63** wurde ausgehend von Triethylenglykol und Acrylsäure-*tert*-butylester nach einem literaturbekanntem Verfahren hergestellt.<sup>[28,135,136]</sup> In Gegenwart katalytischer Mengen an Natrium wurden die beiden Ausgangschemikalien gemäß einer Hetero-Michael-Reaktion zum 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester **64** umgesetzt. Anschließend wurde die Hydroxylfunktion mit Mesylchlorid und Triethylamin in die entsprechende Mesylat-Abgangsgruppe überführt und in *N,N*-Dimethylformamid durch Zugabe von Natriumazid zum Azid **65** substituiert (Abb. 3.66).

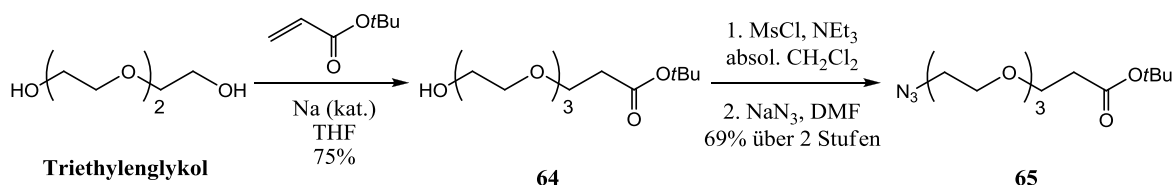


Abb. 3.66 Synthese des 12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylesters **65**.

Durch eine Raney-Nickel-vermittelte Hydrierung konnte das Azid **65** in Isopropanol quantitativ in das entsprechende Amin **66** überführt werden, bevor die Aminofunktion für die geplanten automatisierten Peptidsynthesen mit Fmoc-OSu als Carbamat blockiert wurde. Im letzten Schritt konnte der C-Terminus des Linkers durch Verseifung des *tert*-Butylesters in einem TFA/Wasser-Gemisch (10:1) freigesetzt werden, wobei die Spacer-Aminosäure nach Säulenchromatographie in 93% Ausbeute erhalten wurde (Abb. 3.67).

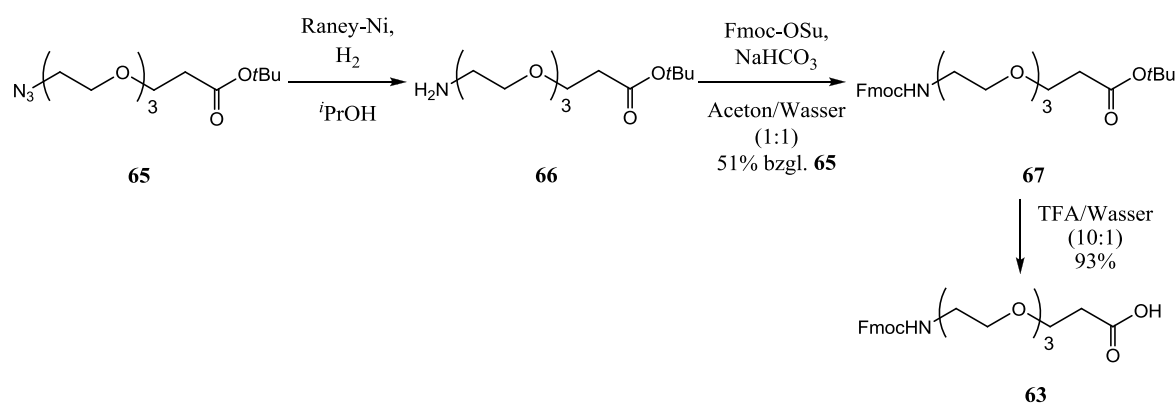


Abb. 3.67 Synthese des Triethylglykol-Spacers 63.

### 3.4.2 Synthesen der Glycopeptide und der Glycopeptidkonjugate

Die Synthese von Peptiden kann nach zwei generellen Prinzipien, entweder in Lösung oder an der festen Phase, durchgeführt werden. Bei den hier dargestellten Vakzinkandidaten wurden die Oligopeptide durch die effektive, von *R. R. Merrifield* eingeführte Festphasensynthese<sup>[137,138]</sup> aufgebaut. Dabei wird die Startaminosäure mit Hilfe ihres C-Terminus über ein entsprechendes Ankersystem an ein polymeres, chemisch inertes und unlösliches Harz angebunden. Nach Entfernen der Schutzgruppe am N-Terminus steht dieser für die nächste Kupplung bereit und das wachsende Peptidfragment verbleibt stets an der festen Phase. Dies bietet den Vorteil, dass überschüssige Materialien, wie z. B. Reagenzien oder nicht-reagierte Edukte direkt durch Waschen und Filtrieren des Harzes entfernt werden können. Die Regioselektivität der Kupplungen wird durch den Einsatz N-terminal blockierter Aminosäuren mit freien Säurefunktionen gewährleistet, wobei als Amin-Schutzgruppen vor allem die säurelabile *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-<sup>[139,140]</sup> und das basisch spaltbare Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Carbamat<sup>[141,142]</sup> eingesetzt werden. Für die Synthese von Glycopeptiden eignet sich in der Regel die Fmoc-Strategie besser, da die Spaltung des Fmoc-Carbamates mit Piperidin oder *N*-Methylmorpholin (NMM) unter sehr milden Bedingungen von statten geht und keine Reaktionen an Seitenschutzgruppen bzw. an den Glycanstrukturen auftreten.<sup>[143]</sup> Die Freisetzung der Boc-blockierten Amine hingegen erfordert den Einsatz von 20 - 50%iger Trifluoressigsäure statt und birgt daher ein hohes Risiko an ungewollten Nebenreaktionen.<sup>[144]</sup> Ferner ist es nach jeder Kupplung erforderlich nicht reagierte Amino-Termini der polymergebundenen, wachsenden Peptidketten zu blockieren, um komplexe Produktgemische zu verhindern. Zu diesem Zweck wird nach jeder Aminosäurekupplung das Harz inklusive des entstehenden Peptides mit dem sogenannten *Capping*-Reagenz, einem Gemisch aus Acetanhydrid, Diisopropylethyl-

amin (DIPEA) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) in *N*-Methylpyrrolidin-2-on (NMP), behandelt, wodurch alle verbliebenen freien Amingruppen acetyliert werden. Durch Iteration des hier beschriebenen Verfahrens können schließlich effizient und in kurzer Zeit oligopeptidische Strukturen aufgebaut werden (Abb. 3.68).

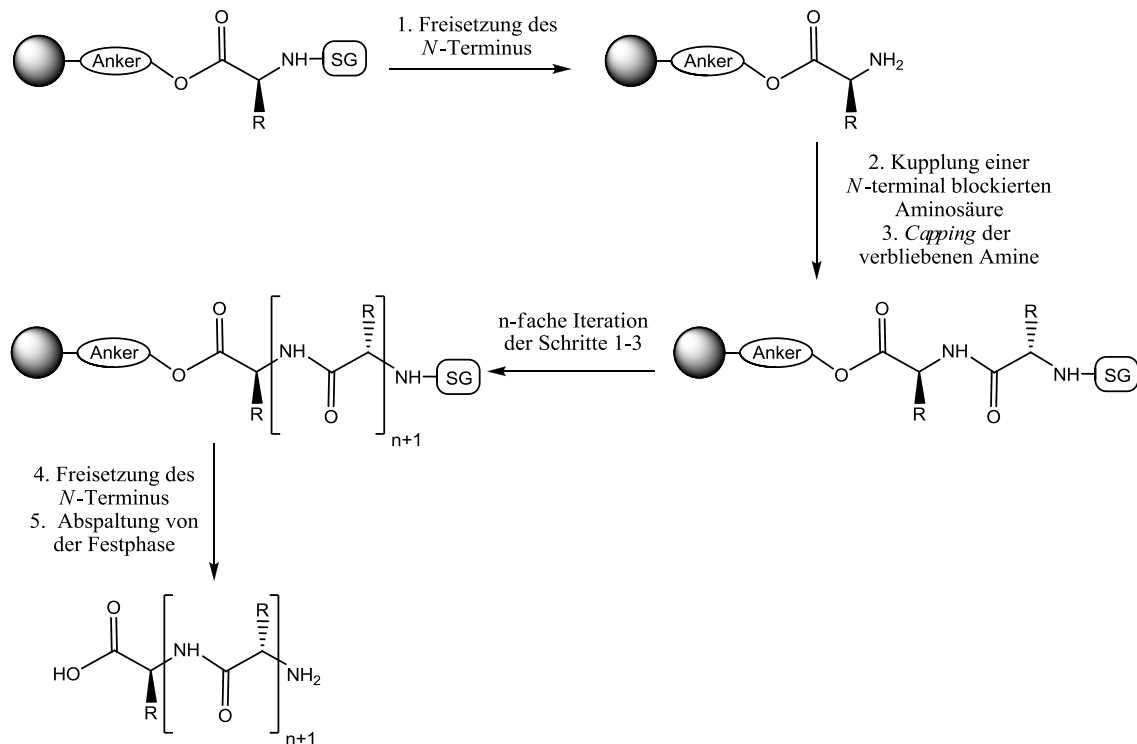
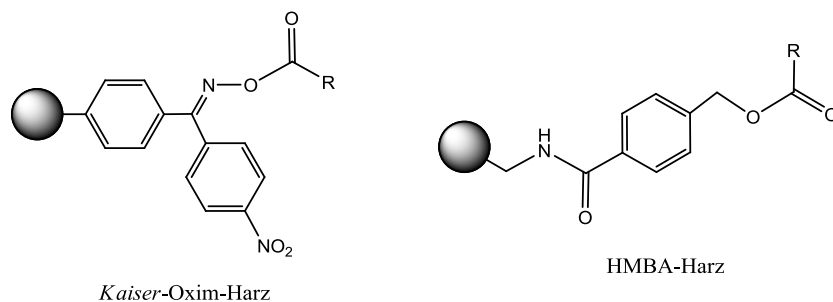


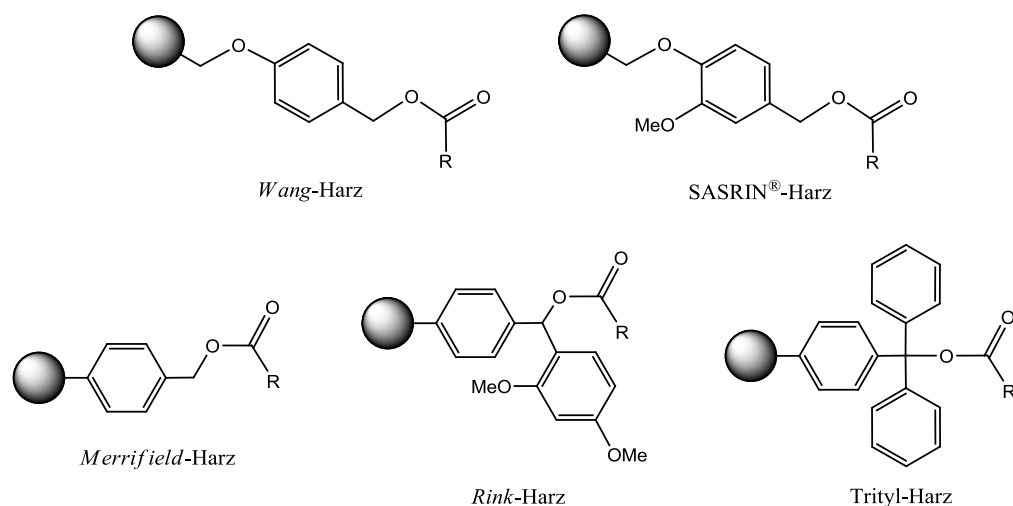
Abb. 3.68 Prinzip der Festphasenpeptidsynthese.

Eine entscheidende Rolle bei der Peptidsynthese spielt die Wahl des Harzes beziehungsweise des Ankersystems, über das das Peptid mit der festen Phase verknüpft ist. Nach finaler Deblockierung des *N*-Terminus der letzten Aminosäure in der Peptidsequenz muss das Produkt vom polymeren Trägermaterial gelöst werden. Unter welchen Bedingungen diese Abspaltung vollzogen werden kann, hängt von der Wahl des Ankers ab und muss daher sorgfältig in Abhängigkeit der Sequenz und der Seitengruppen gewählt werden. Ein umfassender Überblick über mögliche Ankersysteme für die Festphasenpeptidsynthese findet sich in einem Übersichtsartikel von *I. W. James*.<sup>[145]</sup> Im Folgenden werden lediglich einige gängige Beispiele exemplarisch vorgestellt. Im Fall von basenlabilen Linkern, wie z. B. dem *Kaiser-Oxim*-<sup>[146]</sup> und dem HMBA (4-Hydroxymethylbenzoesäure)-Anker,<sup>[147]</sup> kann es unter den relativ harschen Abspaltungsbedingungen zu Racemisierungen und Nebenreaktionen kommen, wie z. B. der  $\beta$ -Eliminierung der Kohlenhydratseitenkette oder der baseninduzierten Aspartatimidbildung bei Asparaginsäuren.



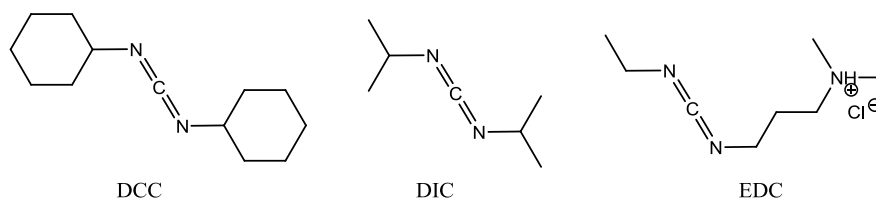
**Abb. 3.69** Beispiele für basenlabile Ankersysteme.

Von größerem Vorteil sind dabei häufig säurelabile Systeme, von denen das *Wang*-Harz<sup>[148]</sup>, dessen Spaltung mit 50 - 90%iger Trifluoressigsäure gelingt, und das bereits mit 1%iger Trifluoressigsäure lysierbare SASRIN<sup>®</sup> (Super Acid Sensitive ResIN)-Harz,<sup>[149]</sup> wohl zu den populärsten Vertretern gehören. Weitere wichtige Vertreter stellen das mit Fluorwasserstoff spaltbare *Merrifield*-Harz,<sup>[137]</sup> das *Rink*-Harz,<sup>[150]</sup> welches sich unter Einwirkung von Essigsäure in Dichlormethan ablösen lässt, und das *Tryl*-Harz<sup>[151]</sup> dar (Abb. 3.1). Letzteres wurde in den hier durchgeführten Glycopeptidsynthesen verwendet und kann bereits mit Trifluoressigsäure gespalten werden. Durch die Verwendung gängiger säurelabiler Schutzgruppen an für die Seitenkettenfunktionalitäten der eingebauten Aminosäuren kann zudem mit der Abspaltung vom Polymer gleichzeitig deren globale Entfernung durchgeführt werden.



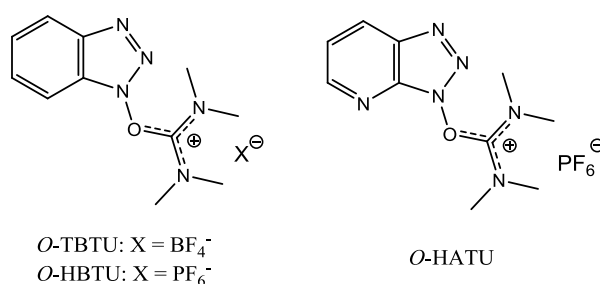
**Abb. 3.70** Säurelabile Ankersysteme

Für den Aufbau von Peptidsequenzen existiert eine Fülle von Kupplungsmethoden, die eine möglichst effektive Anbindung der Aminosäurebausteine ermöglichen sollen. Daher seien hier nur einige gängige Kupplungsreagenzien erläutert, und für einen umfassenderen Überblick wird an dieser Stelle auf den Übersichtsartikel von *El-Faham* und *Albericio* verwiesen.<sup>[152]</sup> In der Peptidsynthese erfolgt die Bildung der Amidbindung in der Regel durch eine Aktivierung der Carbonsäure für einen nucleophilen Angriff durch die Aminkomponente, wobei die Stabilität und die Racemisierungsgefahr der Substrate bei der Wahl der Kupplungsreagenzien berücksichtigt werden muss. Die Säurekomponente kann beispielsweise durch Überführung in das entsprechende Säurehalogenid,<sup>[153]</sup> in ein Säureazid,<sup>[154]</sup> in ein Anhydrid<sup>[154]</sup> oder durch die Generierung eines Reaktivesters<sup>[154]</sup> für die Kupplung aktiviert werden. In der Festphasenpeptidsynthese wird für gewöhnlich auf eine *in situ*-Aktivierung der Säurefunktion, wie sie bei der Verwendung von Carbodiimiden (z. B. *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC)<sup>[155]</sup>, *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC))<sup>[155]</sup> erfolgt, zurückgegriffen.<sup>[156]</sup>



**Abb. 3.71 Carbodiimide zur Säureaktivierung.**

Noch reaktivere Säurederivate sind durch Umsetzung zu Aktivestern mit Uroniumsalzen auf Basis des Benzotriazols herstellbar, die sich daher in der Peptidsynthese sehr bewährt haben. Zu den etabliertesten Vertretern dieser Kupplungsreagenzien gehören *O*-2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU),<sup>[157]</sup> *O*-2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU)<sup>[158,159]</sup> und *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU),<sup>[160,161]</sup> die alle hier in der *O*-Form dargestellt sind.



**Abb. 3.72 Uroniumsalze zur Säureaktivierung.**

Um die bereits angesprochene Racemisierung der *in situ* gebildeten Aktivester zu vermeiden, werden häufig Gemische aus den in Abb. 3.71 und in Abb. 3.72 gezeigten Kupplungsreagenzien und Additiven wie 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)<sup>[162]</sup> bzw. 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol (HOAt)<sup>[163]</sup> eingesetzt (Abb. 3.73).

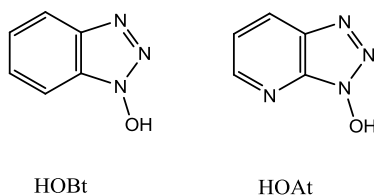


Abb. 3.73 Additive für die Peptidkupplung.

Nach Ausbildung der *O*-Isoacylestere **68** durch Reaktion mit dem Kupplungsreagenz in Gegenwart einer Base, wobei typischerweise *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) verwendet wird, kommt es zum nucleophilen Angriff des deprotonierten Additivs an dessen aktivierter Säurefunktion. Der so entstandene Aktivester **69** ist durch seine hohe Reaktivität in der Lage, auch mit sterisch anspruchsvollen bzw. weniger reaktiven Aminen zügig abzureagieren, so dass unerwünschte Nebenreaktionen, wie die Racemisierung, unterdrückt werden (Abb. 3.74).

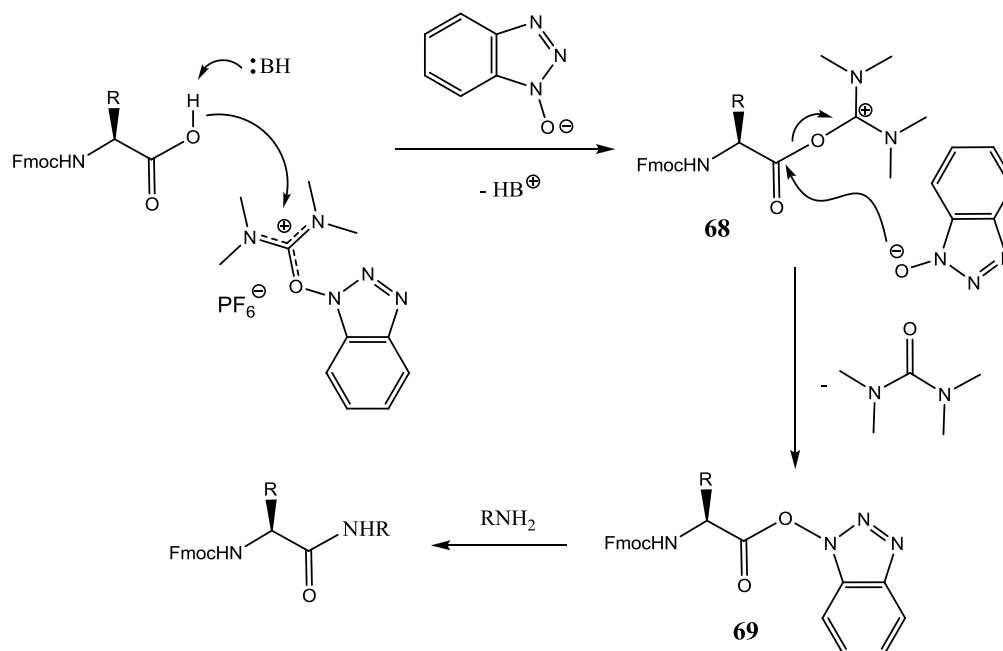


Abb. 3.74 Kupplungsmechanismus am Beispiel des Systems HBTU/HOBt.

Bei besonders anspruchsvollen Kupplungen hat sich die Verwendung des hochreaktiven Systems HATU/HOAt mit *N*-Methylmorpholin als Base bewährt. Die vom Pyridin abgeleiteten Benzotriazolgrundgerüste verfügen durch den elektronenziehenden Einfluss des Ringstickstoffs über eine gesteigerte Reaktivität und insbesondere der mit HOAt gebildete Aktivester stellt eine hervorragende Austrittsgruppe bereit. Des Weiteren wird die Kupplungsgeschwindigkeit durch die Koordination des Pyridylrestes an die zu kuppelnde Aminkomponente über eine Wasserstoffbrücke signifikant erhöht (Abb. 3.75). Aus den genannten Gründen wurde dieses Kupplungssystem beim Einbau der unreaktiven und sterisch anspruchsvollen Glycosylaminosäuren angewendet.

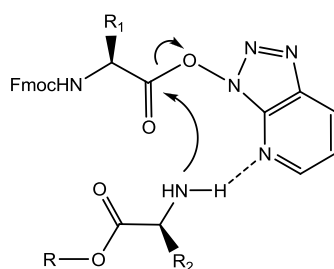


Abb. 3.75 Vorteile des Kupplungssystems HATU/HOAt.

Trotz der zahlreichen Innovationen im Bereich der Festphasenpeptidsynthese lassen sich durch die Wahl der Kupplungsbedingungen nicht alle Nebenreaktionen vollständig vermeiden. Insbesondere ungewollte Transformation, die primär von der Aminosäuresequenz abhängen, bereiten bei der Peptidsynthese oftmals Probleme. Bekannt ist beispielsweise von Synthesen, die mit den Aminosäuren Prolin, Glycin oder Alanin starten, dass es nach der ersten Kupplung und der darauffolgenden Abspaltung der *N*-Schutzgruppe zu einem intramolekularen nucleophilen Angriff auf die Esterfunktion der Startaminosäure kommen kann. Die daraus resultierende Bildung eines 2,5-Diketopiperazins geht mit der Ablösung vom polymeren Träger einher, so dass der begonnene Strang nicht mehr für das Kettenwachstum zur Verfügung steht (Abb. 3.76).<sup>[164]</sup>

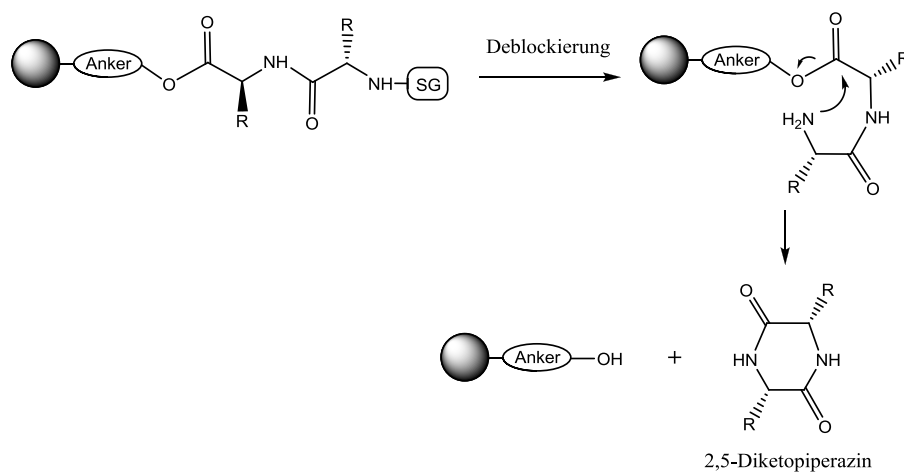


Abb. 3.76 Nebenreaktion zum 2,5-Diketopiperazin.



Läuft diese Reaktion intermolekular ab, also zwischen zwei unterschiedlichen Peptidketten ab, kommt es anstelle der Trennung vom Harz zur Ausbildung von Fehlsequenzen.<sup>[165]</sup>

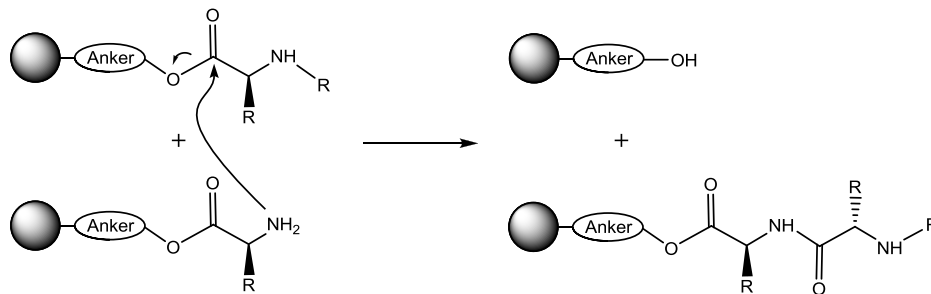


Abb. 3.77 Bildung von Fehlketten.

Da bei den hier beschriebenen MUC1-Glycopeptidsynthesen die Sequenz mit Prolin beginnt, wurde auf ein prolinbeladenes Tentagel S-Triptyl-Harz zurückgegriffen. Die sperrige Triptyl-Ankergruppe minimiert durch die sterische Abschirmung der Esterfunktion den nucleophilen Angriff auf den Carboxyl-Kohlenstoff und drängt die oben beschriebenen Nebenreaktionen in den Hintergrund.

Zu Problemen während des Aufbaus von Peptidsequenzen kann auch die Aminosäure Asparaginsäure führen. Wird sie, wie es bei der MUC1-*tandem repeat* Sequenz der Fall ist, in Nachbarschaft zu Serin, Glycin, Alanin oder Glutamin eingebaut, besteht die Möglichkeit einer basenkatalysierten Aspartatimidbildung. Bei anschließender Ringöffnung unter Hydrolysebedingungen können aus dem Imid sowohl das gewünschte  $\alpha$ - als auch das  $\beta$ -Aspartyl-Peptid als Nebenprodukte entstehen.<sup>[166]</sup> Um diese Reaktion zu unterdrücken, verwendet man daher voluminöse Schutzgruppen, wie z. B. *tert*-Butylester, die die Säurefunktion gegen den nucleophilen Angriff durch den benachbarten Amidstickstoff abschirmen.

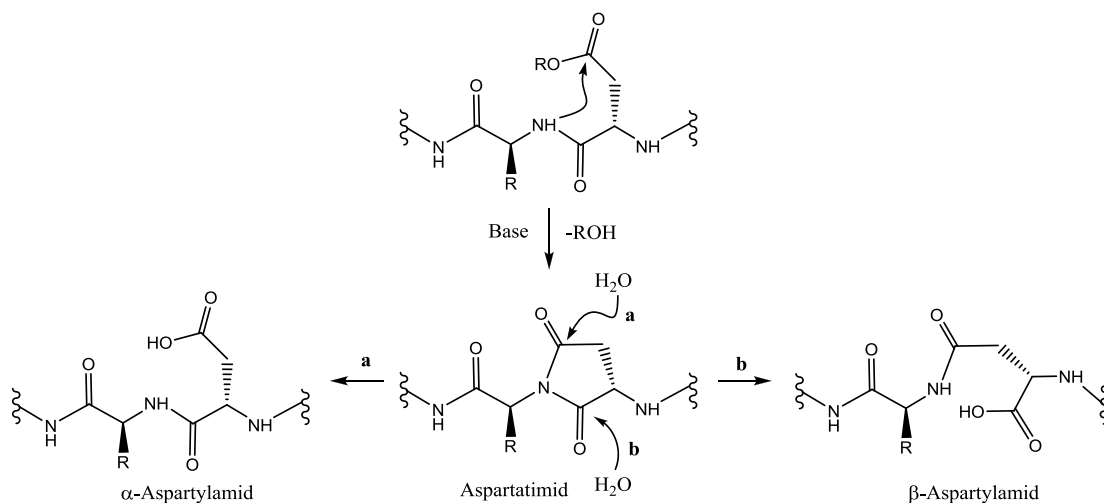


Abb. 3.78 Bildung des Aspartatimids und anschließende Hydrolyse.

Probleme kann auch die nucleophile Guanidinseitengruppe der Aminosäure Arginin bereiten. Bereits bei der Aktivierung des C-Terminus für die Kupplung an das wachsende Peptid kann es durch einen intramolekularen Ringschluss zur Bildung eines  $\delta$ -Lactams (Abb. 3.79),<sup>[167]</sup> und damit zu Ausbeuteeinbußen kommen.

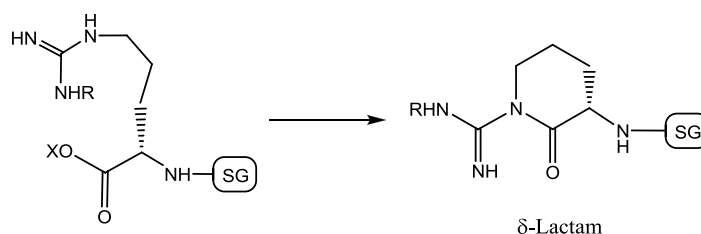


Abb. 3.79  $\delta$ -Lactambildung des aktivierten Arginins.

Darüber hinaus kann das Arginin auch nach dem Einbau in das Peptid in den nachfolgenden Kupplungsschritten Nebenreaktionen bewirken. In Gegenwart eines Aktivesters einer Aminosäure kann anstelle der Amidbildung auch eine Acylierung des Guanidin-Imin-Stickstoffs auftreten. Durch die nachfolgende Abspaltung eines 2-Iminoimidazolins wird das eingebaute Arginin zum Ornithin umgewandelt, wodurch wiederum Fehlsequenzen auftreten (Abb. 3.80).

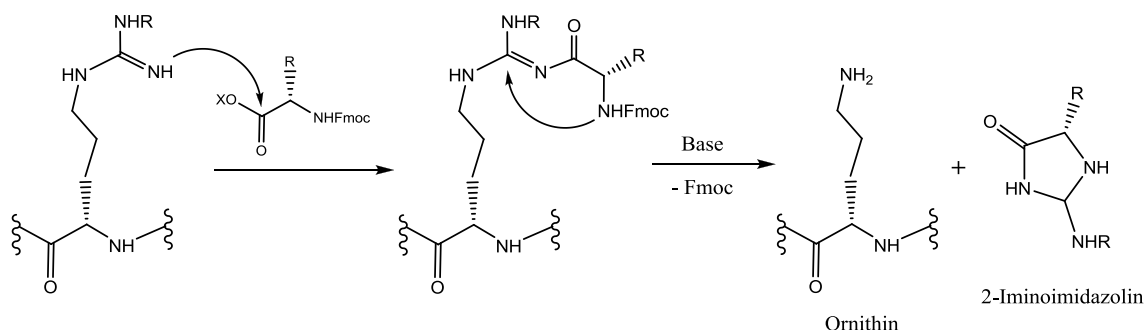


Abb. 3.80 Umwandlung des Arginins ins Ornithin.

Doch auch diese Nebenreaktion kann durch die Wahl einer entsprechenden Schutzgruppe für die Seitenkette effektiv unterdrückt werden. Blockiert man die Guanidineinheit nämlich mit der säurelabilen 2,2,5,7-Pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc)-Gruppe,<sup>[168,169]</sup> so sinkt die Tendenz zur Acetylierung des Imins nachhaltig und die Ornithinbildung bleibt aus.

Die hier diskutierten Nebenreaktionen können zusammenfassend durch ein umsichtiges Schutzgruppenmuster für die Aminosäureseitenketten auf ein Minimum reduziert werden. Generell handelt es sich bei den vorgestellten Schutzgruppen ausschließlich um säurelabile Derivate, deren Abspaltung sich unter den gleichen sauren Bedingungen, die für die

Abtrennung der Peptidkette vom Trityl-Anker erforderlich sind, durchführen lässt. Verwendet man in den Synthesen der *tandem repeat*-Domäne des MUC1 darüber hinaus die sauer spaltbare Trityl-Gruppe um den sekundären Stickstoff des Imidazolylrestes der Aminosäure Histidin zu blockieren, so erfolgt beim Ablösen der Peptidsequenz vom polymeren Träger ein globale Deblockierung sämtlicher Seitenketten der Aminosäuresequenz (Abb. 3.81).

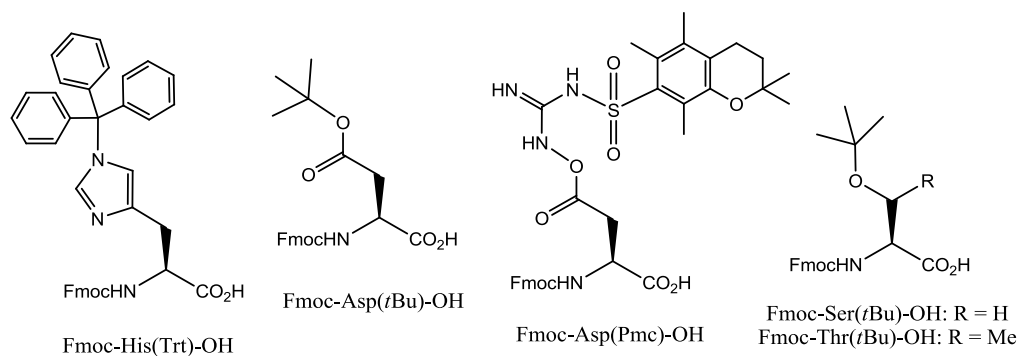


Abb. 3.81 Übersicht über die verwendeten Schutzgruppenmuster.

### Protokoll der (automatisierten) Festphasenpeptidsynthese:

Die Synthese der fluorierten MUC1-Glycopeptide wurden automatisiert in einem ABI 433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems* nach dem Standardprogramm *Fastmoc* auf Basis der Fmoc-Strategie durchgeführt. Wegen der guten Quelleigenschaften und der oben erläuterten Vorteile des Trityl-Ankersystems wurden die Peptidsequenzen an Tentagel S-Trityl-Harzen aufgebaut, die mit der Startaminosäure Fmoc-Prolin vorbeladenen waren. Um Interaktionen zwischen den wachsenden Peptidsträngen zu minimieren, wurden Harze mit relativ niedriger Beladung von 0.22 mmol/mg oder 0.24 mmol/mg verwendet. Im Hinblick auf simultane Abspaltung und Deblockierung der Glycopeptide nach beendeter Synthese, sowie den bereits erwähnten Gründen bezüglich der Unterdrückung von Nebenreaktionen, wurden die in Abb. 3.81 gezeigten Aminosäurebausteine eingesetzt. Der Einbau der fluorierten Glycosylaminosäuren erfolgte ohne weitere Schutzgruppenmanipulation mit den in Kap. 3.3.1 gezeigten Bausteinen. Die Entfernung der Benzylether-Schutzgruppen des Glycans wurde daher in einer separaten Hydrogenolyse nach Abspaltung vom Harz vollzogen.

Der Aufbau der Glycopeptide erfolgte mit Hilfe des in Abb. 3.68 gezeigten Schemas der automatisierten Festphasensynthese. Dabei wurden für jede Aminosäurekupplung drei Iterationsschritte durchlaufen. Im ersten Schritt wurde unter Einwirkung einer 20%igen Piperidinlösung die *N*-terminale Fmoc-Gruppe der zuletzt angebotenen Aminosäure entfernt. Um eine quantitative Freisetzung des Amins zu gewährleisten wurde dieser Schritt dreimal wiederholt, wobei das dabei entstandene Dibenzofulven-Piperidin-Addukt **70** jeweils mittels UV-Spektroskopie detektiert wurde (Abb. 3.82).

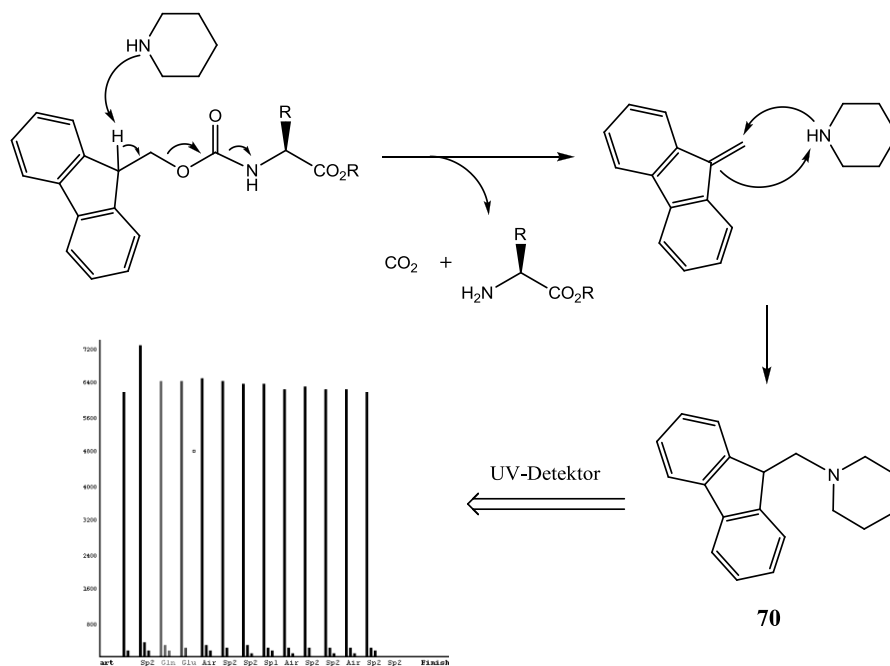


Abb. 3.82 Fmoc-Abspaltung unter Bildung des Dibenzofulvens **70**.

Nach erfolgreicher Deblockierung des *N*-Terminus, wurde im zweiten Schritt die Kupplung der folgenden Aminosäure, welche in einem zehnfachen Überschuss zur Harzbeladung eingesetzt wurde, durchgeführt. Bei der Anbindung der nicht-glycosylierten Aminosäuren kam hierfür ein Gemisch aus HTBU/HOBt (je 1 Äquivalent) sowie *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) als Base (2 Äquivalente) in einer ca. 30-minütigen Reaktionszeit zum Einsatz. Im Fall der teuren fluorinierten Glycosylaminosäuren wurden hingegen nur 1.12 - 1.80 Äquivalente eingesetzt und die Kupplung erfolgte unter Verwendung des reaktiveren Kupplungspaares HATU/HOAt in Gegenwart von *N*-Methylmorpholin (NMM) als Base und einer verlängerten Reaktionszeit von acht Stunden. Nach Beendigung jedes Kupplungsschrittes wurde das Harz mit dem sogenannten *Capping*-Reagenz, einer Mischung aus  $\text{Ac}_2\text{O}$ /DIPEA/HOBt 1:0.25:0.03, behandelt, um nicht-umgesetzte Aminfunktionen durch Acetylierung zu blockieren. Dadurch lässt sich die Bildung von schwer abtrennbaren Fehlsequenzen vermeiden. Abschließend wurde der zuvor beschriebene Triethylenglykol-Spacer **63** nach dem Standardprotokoll an das Peptid gekuppelt.

Für die globale Deblockierung der Aminosäureseitenketten und die Abspaltung der Glycopeptide vom polymeren Träger wurde dieser nach Abschluss der Peptidsynthese in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt und ca. drei Stunden mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure/Wasser/Triisopropylsilan (10:1:1) behandelt. Die Bedingungen der Hydrogenolyse der Benzylether der Galactosyleinheiten werden bei den einzelnen Synthesen angegeben.

### Synthese der fluorierten Glycopeptide:

Nach dem oben beschriebenen Protokoll wurden im Rahmen dieser Arbeit drei neue, mehrfach fluoriierte Analoga von tumorassoziierten MUC1-Glycopeptiden als potentielle Krebsvakzinbausteine dargestellt.

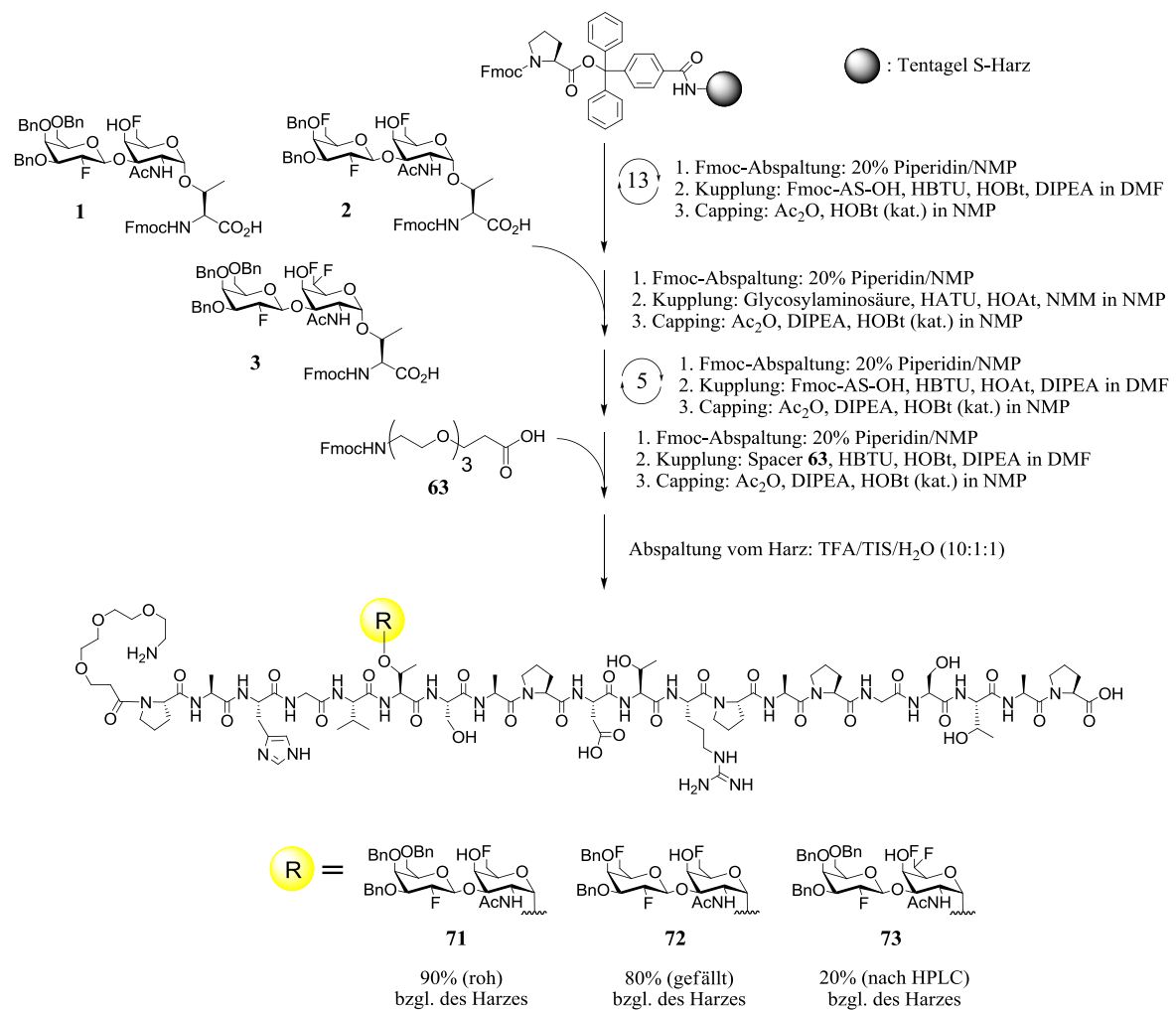


Abb. 3.83 Festphasensynthese der mehrfach fluorierten Glycopeptide vom MUC1-Typ.

Nach der Abspaltung vom Harz wurden die rohen Glycopeptide als farblose Lyophilisate erhalten. Im Falle des Peptids **71** wurde das Rohprodukt ohne weitere Reinigung der Hydrogenolyse unterzogen, wohingegen die beiden dreifach fluorierten Glycopeptide **72** und **73** zuvor in wenig Methanol gelöst und durch Eintropfen in eisgekühlten Diethylether ausgefällt wurden. Die von der Deblockierung der Aminosäuren resultierenden organischen Reste blieben bei dieser Prozedur in Lösung und konnten nach Zentrifugieren bei 4 °C abgetrennt werden. Durch diesen ersten Reinigungsschritt verbesserten sich das Lösungsverhalten der rohen Glycopeptide und damit die Handhabung in den folgenden Arbeitsschritten signifikant. Des Weiteren wurde das Glycopeptid **73** aufgrund von Schwierigkeiten bei der Hydrogenolyse, die im Folgenden beschrieben werden, nach der Fällung zusätzlich mittels semipräparativer HPLC gereinigt.

Die hydrogenolytische Spaltung der Benzylether der Glycanseitenketten in **71** und **72** gelang mit Wasserstoff unter Palladium(II)-acetat-Katalyse in Methanol. Dabei musste für einen vollständigen Umsatz die Reaktionszeit für die Debenzylierung des Glycopeptids **72** mit drei Fluorsubstituenten im Glycan auf sechs Tage verlängert werden, während im Fall des zweifach fluorierten Peptides **71** bereits zwei Tage zur Hydrogenolyse genühten. Nach Reinigung der Rohprodukte mit Hilfe der semipräparativen HPLC konnten die beiden Peptide sauber erhalten werden (Abb. 3.84).

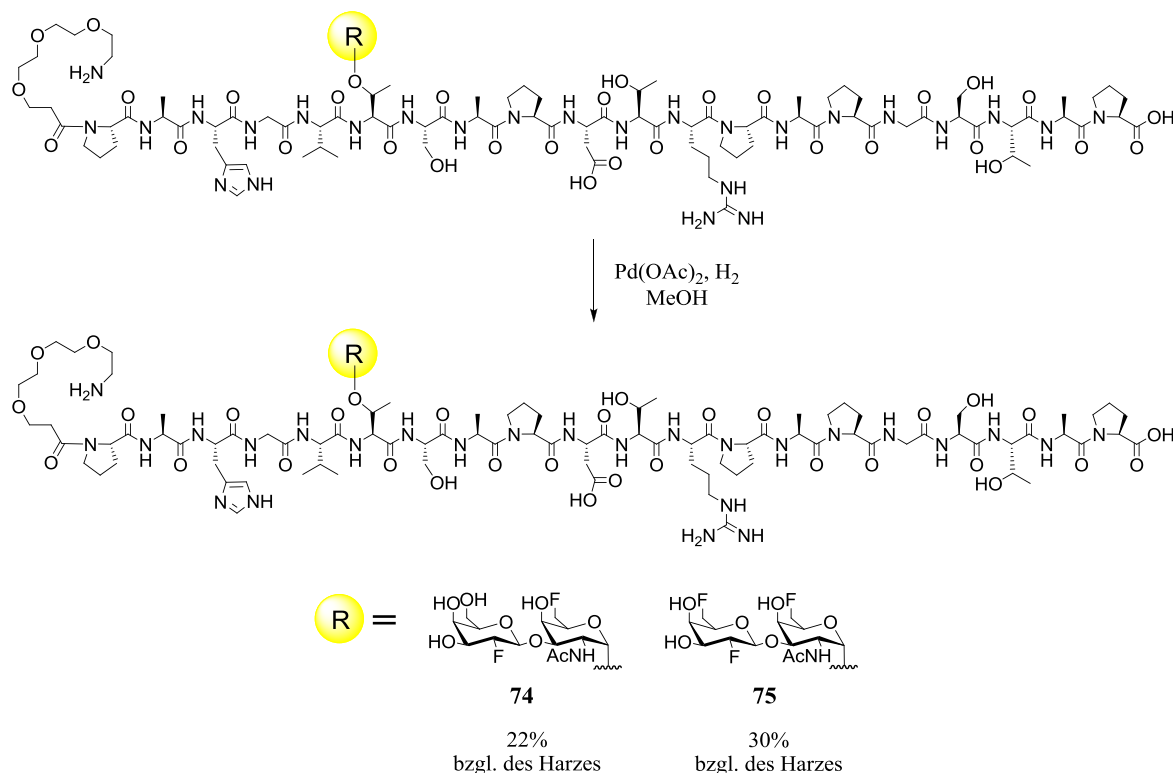
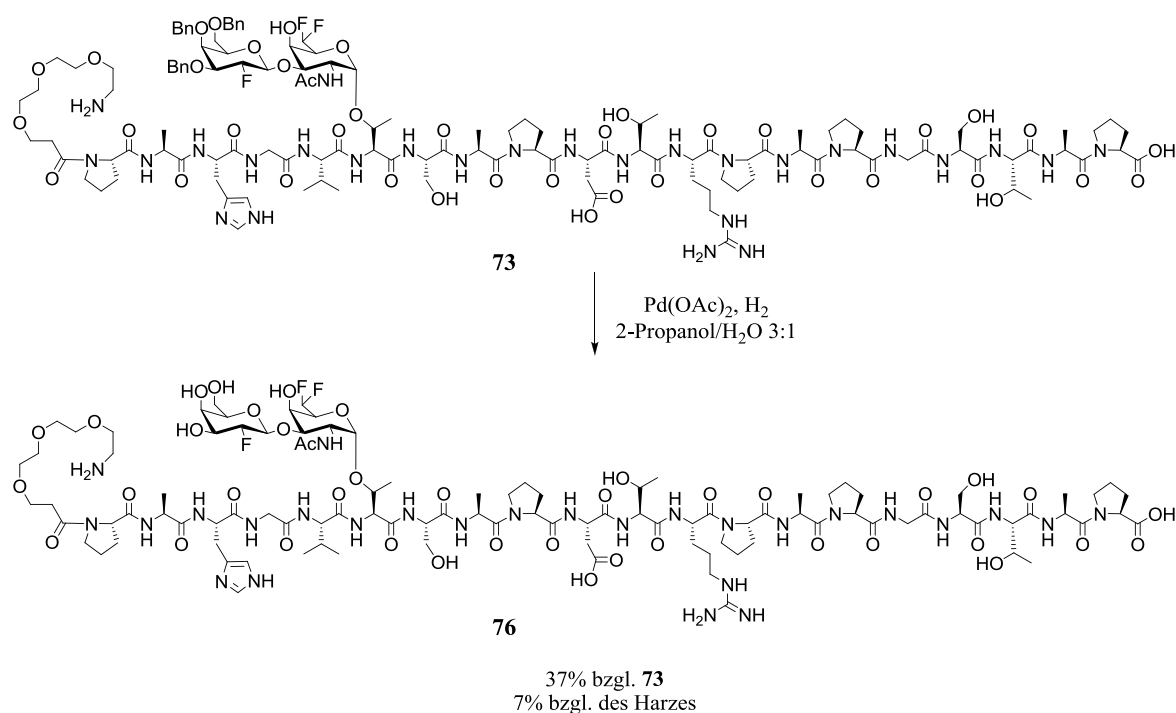


Abb. 3.84 Hydrogenolyse der fluorierten Glycopeptide **71** und **72**.

Unter vergleichbaren Bedingungen konnte bei der Deblockierung der fluorierten T-Antigen-Struktur des rohen Glycopeptids **73** trotz zweiwöchiger Reaktionszeit und wiederholter Erhöhung der Katalysatormenge nahezu kein Umsatz beobachtet werden. Auch die Erhöhung des Wasserstoffdrucks auf 15 bar im Autoklaven führte zu keiner Verbesserung. Die Umsetzung bei einem Wasserstoffdruck von 20 bar in Gegenwart von Palladium auf Kohle (10%) als Hydrierkatalysator führte schließlich nach vier Tagen zur Zersetzung des Eduktes. Daher wurde nach die Festphasensynthese Peptids **73** wiederholt und das erhaltene Rohprodukt wurde zunächst durch semipräparative HPLC gereinigt, um potentiell störende Verunreinigungen abzutrennen. Anschließend wurde das in 20%iger Ausbeute erhaltene, gereinigte Peptid **73** in einem 3:1-Gemisch aus Isopropanol und Wasser in Gegenwart von Palladium(II)-hydroxid hydriert, wobei nach elf Tagen kein Startmaterial mehr per HPLC detektiert werden konnte. Nach Aufarbeitung und Reinigung mittels semipräparativer HPLC konnte das gewünschte Glycopeptid **76** schließlich in 37% Ausbeute erhalten werden (Abb. 3.85).



**Abb. 3.85** Hydrogenolyse des dreifach fluorierten Glycopeptids **73**.

### Synthesen der Glycopeptidkonjugate:

Das erklärte Ziel der Entwicklung eines selektiven Tumorstimmungs erfordert die gleichzeitige Stimulation einer zellulären und einer humoralen Immunantwort. Dazu ist es nötig, die MHC-II-restringierte, gekoppelte Erkennung von B-Zelle und T-Helferzelle auszulösen, um die immunsuppressiven Mechanismen des Tumors zu überwinden.

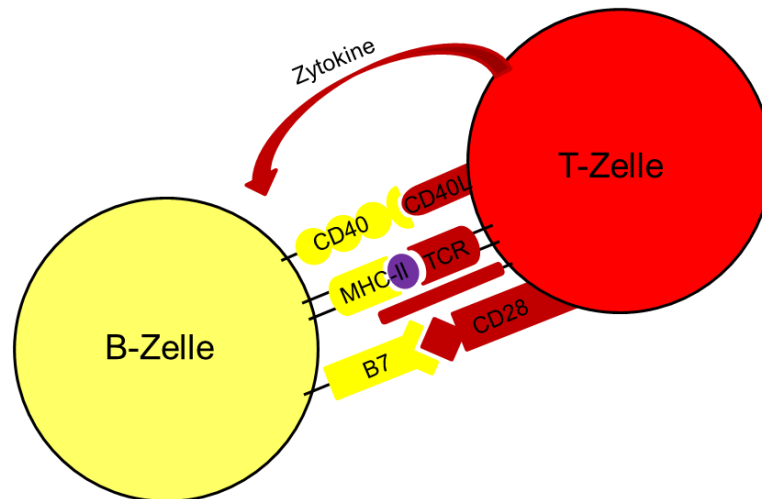


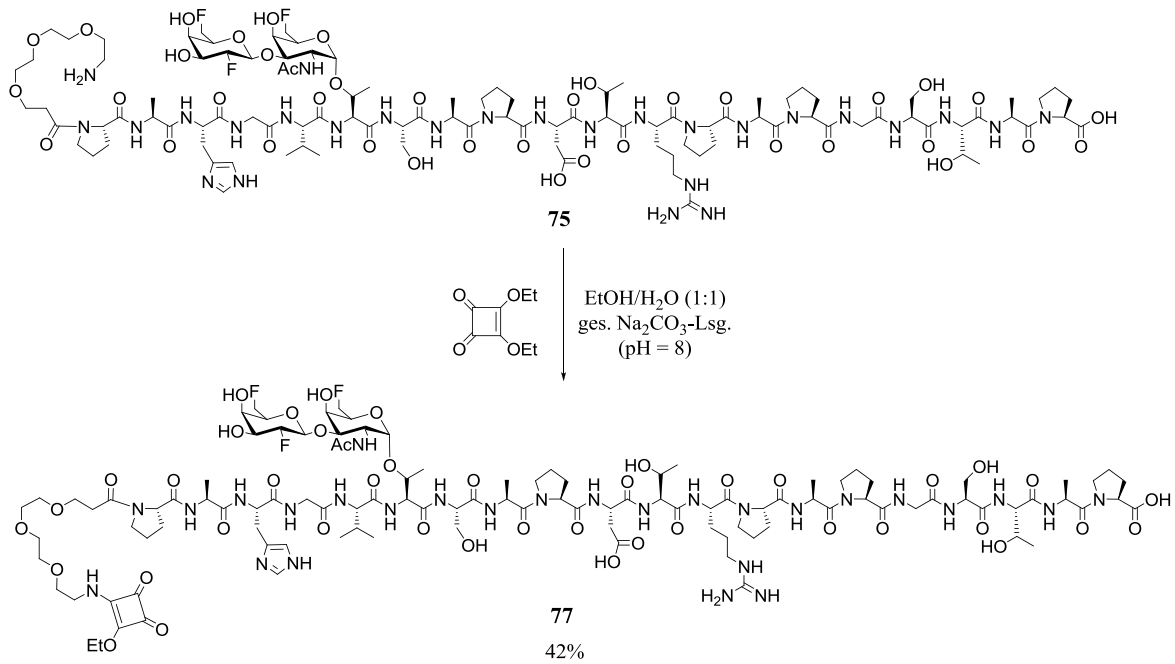
Abb. 3.86 Gekoppelte Erkennung zur T-Zell-vermittelten Aktivierung der B-Lymphozyten.

Bei den hier synthetisierten MUC1-Carrierprotein-Konjugaten liefert die glycosylierte *tandem repeat*-Sequenz des Mucins das für die spezifische Identifikation erforderliche B-Zell-Epitop. Nach Erkennung dieses Haptens und Prozessierung in der Zelle werden T<sub>H</sub>2-Zellepitope des Carrierproteins mit Hilfe des MHC-II präsentiert und können durch den T-Zellrezeptor (TCR) auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup>-Zellen erkannt werden. Durch weitere Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, wie z. B. zwischen dem CD40-Ligand und dem CD40-Rezeptor, beziehungsweise dem B7-Ligand und dem CD28-Rezeptor, sowie durch Ausschüttung kostimulierender Zytokine, den Interleukinen IL-2, IL-4, und IL-6, kommt es schließlich zu einer T-Zell-vermittelten Aktivierung des B-Lymphozyten (Abb. 3.86). Als solche Trägerproteine haben sich in der Vergangenheit das Rinderserumalbumin (BSA),<sup>[170]</sup> das Ovalbumin (OVA),<sup>[171]</sup> das Hämocyanin der Schlüssellochnapfschnecke (KLH)<sup>[172]</sup> und vor allem das Tetanus Toxoid (TTox)<sup>[173,174,175,176]</sup> erwiesen. Bei erfolgreicher Wechselwirkung, auch der oben genannten, zusätzlichen Ligand-Rezeptor-Interaktionen und der Ausschüttung kostimulatorischer Zytokine, kommt es zur T-Zell-vermittelten Anregung der Proliferation sowie der Differenzierung der B-Zelle und folglich zur Antikörperproduktion.



Im Rahmen dieser Dissertation wurden erstmals Glycopeptid-Protein-Konjugate hergestellt, die die MUC1-*tandem repeat*-Sequenz mit einem dreifach fluorierten T-Antigenanalogon beinhalten und durch die Kopplung des Glycopeptids **75** an die Trägerproteine BSA bzw. TTox erhalten wurden. Das verhältnismäßig kleine Protein BSA ( $M \approx 66.500 \text{ g/mol}$ ) löst jedoch nur vergleichsweise geringe Immunantworten aus und diente daher weniger als Vakzin, sondern wurde in den ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)-Tests für die Beschichtung der Mikrotiterplatten eingesetzt (Kap. 3.5). Diese ermöglichen es, bereits während der Immunisierung die Bildung von spezifischen anti-MUC1-Antikörpern nachzuweisen. Bei der Vakzinierung der Mäuse kamen Glycopeptidkonjugate des deutlich größeren TTox-Proteins ( $M \approx 150.000 \text{ g/mol}$ ) zum Einsatz, da diese wesentlich stärkere Immunantworten verursachen, die die natürliche Toleranzschwelle gegen die MUC1-Strukturen durchbrechen.<sup>[34,134]</sup> Ferner werden Wundstarrkrampfpimpfungen beim Menschen mit eben diesem Protein durchgeführt und somit sollte eine Übertragung vom Mausmodell auf den menschlichen Organismus prinzipiell möglich sein.

Für die Anbindung des Glycopeptids an die Trägerproteine wird ein nicht-immunogener, bifunktionaler Linker benötigt. Darüber hinaus muss dieser eine selektive Kupplung an das Trägerprotein eingehen, ohne dass unter den Reaktionsbedingungen die T<sub>H</sub>2-Zell-Epitope des Proteins beziehungsweise das B-Zell-Epitop der MUC1-Sequenz in Mitleidenschaft gezogen werden. Unter der Vielzahl der erprobten Systeme<sup>[177]</sup> wurde auf den von *Tietze und Mitarbeitern* entwickelten Quadratsäurediethylester als Linker<sup>[178,179]</sup> zurückgegriffen, da sich dieser in der Vergangenheit bei der Darstellung von MUC1-Glycopeptidkonjugaten bewährt hat.<sup>[29,38,180]</sup> Im ersten Schritt wurde der Quadratsäurediethylester an das fluoridierte MUC1-Glycopeptid angebunden, bevor die Konjugation an die Trägerproteine erfolgte. Führt man diesen in einem Wasser/Ethanol-Gemisch (1:1) bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 8 durch, so reagiert der Quadratsäurediethylester selektiv mit der Aminfunktion des Triethylenglykol-Spacers eines Glycopeptidmoleküls zum Monoamid. Die relativ milden Reaktionsbedingungen verhindern sowohl potentielle Nebenreaktionen an den Seitenketten der Peptidsequenz als auch die Folgereaktion mit einem weiteren Glycopeptidmolekül zum Diamid. Nach Isolierung mittels semipräparativer HPLC konnte das Monosquarat **77** in 42% Ausbeute erhalten werden (Abb. 3.87).



**Abb. 3.87** *Synthese des Squarates 77.*

Nach Installation des Quadratsäure-Linkers wurde das Glycopeptid **77** an die Trägerproteine Rinderserumalbumin (BSA) und dem Tetanus Toxoid (TTox) gebunden. Diese Verknüpfung mit den Lysinseitenketten der immunogenen Carrierproteine erfolgte durch sechstägiges Rühren bei Raumtemperatur in einem Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer bei einem pH-Wert von 9.5.<sup>[180]</sup> Unter diesen Bedingungen reagierte nun auch die zweite Esterfunktion der Quadratsäure mit der Aminfunktion der Proteinlysinseitenketten zu den gewünschten Diamiden. Zur Reinigung des Konjugates wurden Ultrafiltrationen durchgeführt, wodurch nichtumgesetzte Glycopeptidmoleküle und die Salze der Pufferlösung durch eine Membran, deren Durchlässigkeit nur für Moleküle unter 35.000 g/mol gegeben ist, entfernt wurden. Nach Lyophilisation wurden so die fluorinierten MUC1-Glycopeptid-Konjugate erhalten (Abb. 3.88, Abb. 3.89), die im Folgenden in Immunisierungsstudien eingesetzt wurden.

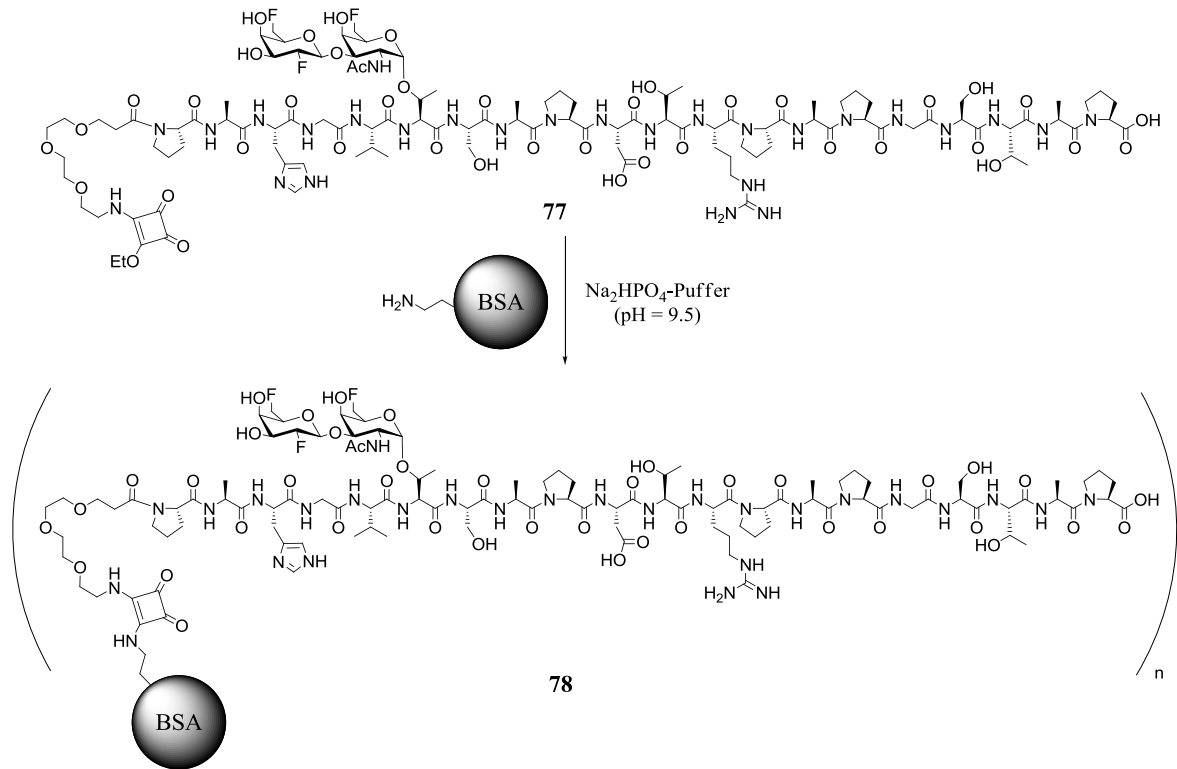


Abb. 3.88 Kupplung an das BSA-Trägerprotein.

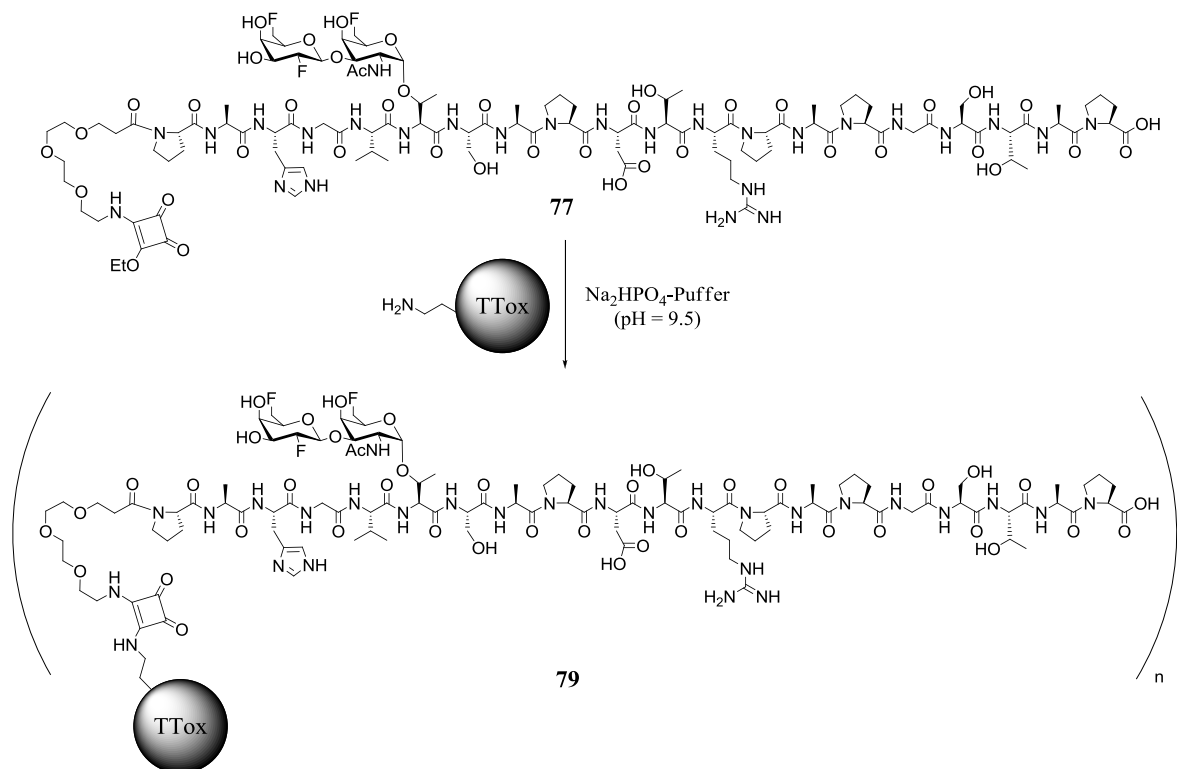


Abb. 3.89 Kupplung an das TTox-Trägerprotein.

### 3.5 Immunologische Evaluierung

#### ELISA-Neutralisationstests:

Bevor die im Rahmen der Dissertation hergestellten MUC1-artigen Glycopeptide in Immunisierungsstudien eingesetzt wurden, sollte zunächst deren Erkennung durch spezifische Antikörper mittels ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)-Neutralisationstests nachgewiesen werden. Die dazu eingesetzten Antisera stammen aus Vakzinierungen von BALB/c-Mäusen mit TTox-Konjugaten eines natürlichen,<sup>[42]</sup> und zweier fluorierter MUC1-Glycopeptide,<sup>[42,88]</sup> die freundlicherweise von A. Kaiser, C. Mersch und S. Wagner zur Verfügung gestellt wurden (Abb. 3.90).

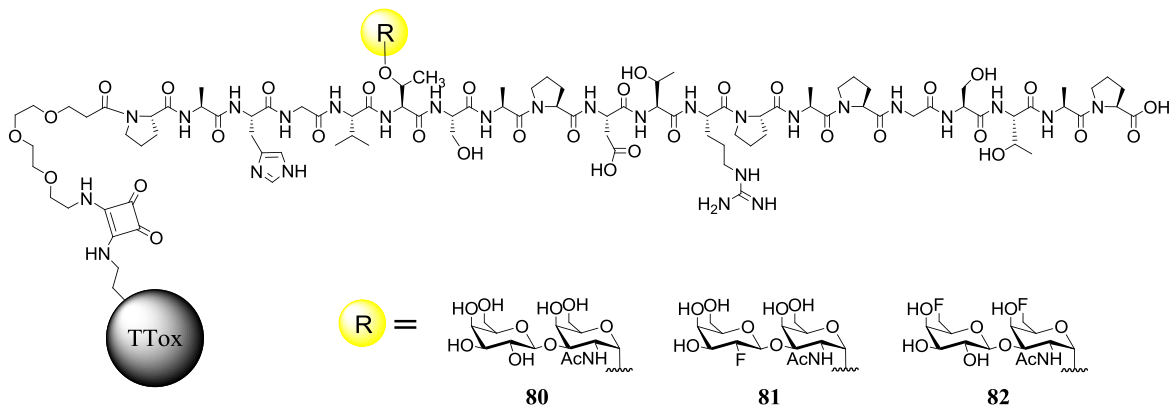


Abb. 3.90 MUC1-artige, tumorspezifische Krebs-Vakzine.

Bei der Durchführung der ELISA-Tests, welche durch S. Wagner und N. Gaidzik in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von E. Schmitt am Institut für Immunologie Mainz stattfanden, wurden BSA-Konjugate der jeweiligen Glycopeptide in wässriger Lösung auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert, bevor diese mit dem Primärantikörper-enthaltenden Serum versetzt wurde. Nach Spülen der Platte, wodurch nicht-gebundene Antikörper entfernt wurden, konnten nach Zugabe eines biotinylierten, spezifischen Anti-Maus-Antikörper die durch das immobilisierte Konjugat gebundenen Antikörper identifiziert werden. Hierzu wurde eine durch Streptavidin funktionalisierte Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) herangezogen, die in einer Farbreaktion die Visualisierung der gebundenen Antikörper (Abb. 3.91) erlaubte.

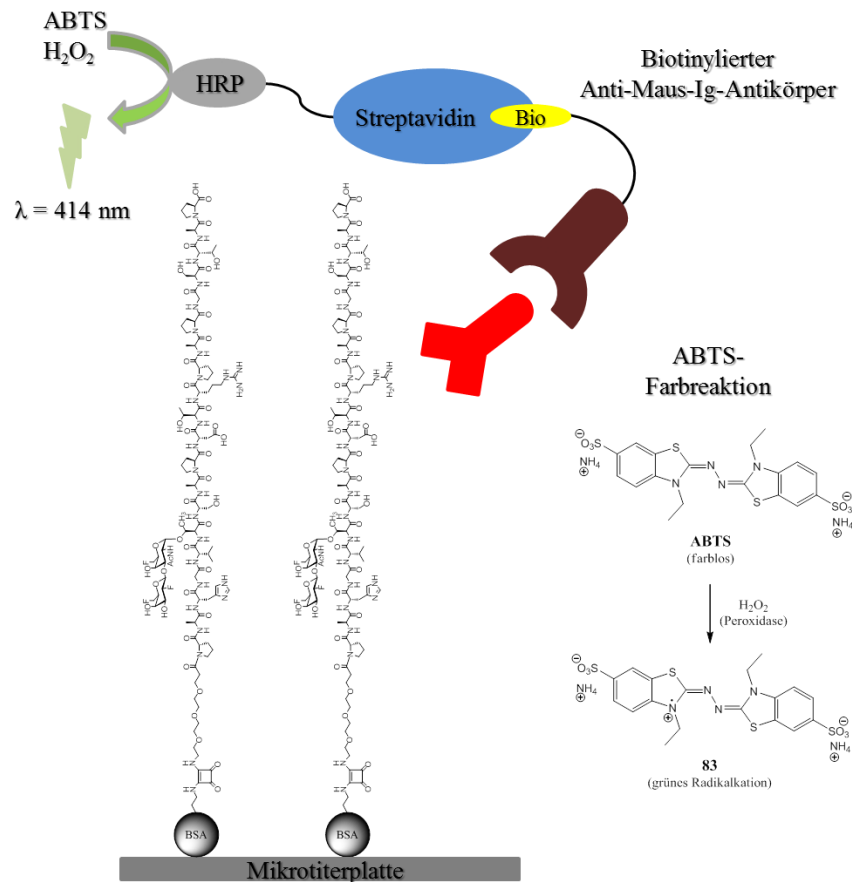
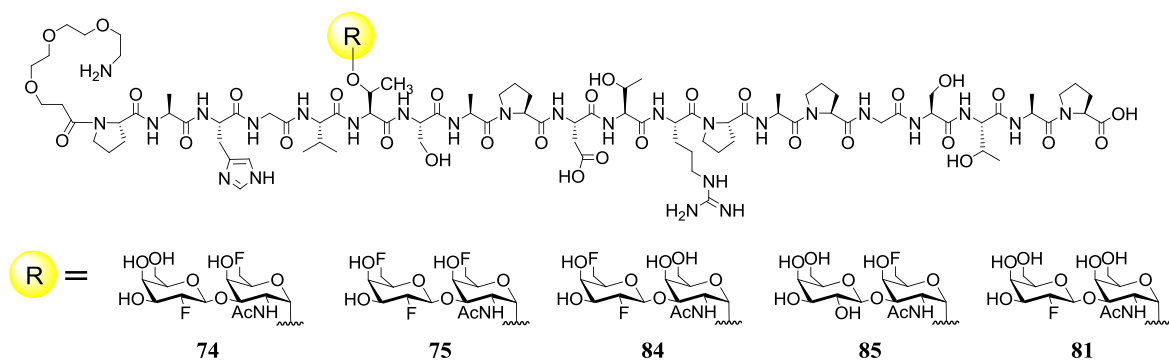


Abb. 3.91 Prinzip der ELISA-Studien.

Die Peroxidase kann in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die farblose 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) zum grünfarbigen Radikal **83** oxidieren, dessen charakteristische Absorption bei 414 nm photometrisch detektiert wird. Die Farbreaktion lässt damit quantitative Rückschlüsse auf die Bindung der Primärantikörper an das immobilisierte Antigen-Konjugat zu.

Auf diesem Wege können die Bindungsspezifität der Antikörper sowie die zugehörigen Titerwerte bestimmt werden. Um jedoch einen Vergleich der Affinität der modifizierten Glycopeptidstrukturen zu den in den jeweiligen Vakzinierungen eingesetzten Antigenen herstellen zu können, wurden zusätzlich ELISA-Neutralisationstests durchgeführt. Hierbei werden die entsprechenden BSA-Konjugate der in den Immunisierungen eingesetzten MUC1-Antigen-TTox-Konjugate auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Parallel hierzu werden die zu untersuchenden, löslichen MUC1-Glycopeptide (Abb. 3.92) auf einer zweiten Mikrotiterplatte mit bis annähernd zum Titerpunkt verdünnten Serum ebenfalls eine Stunde inkubiert. Nach anschließender Übertragung dieser Lösung auf die mit den BSA-Konjugaten beschichtete Mikrotiterplatte und einer weiteren Stunde Inkubationszeit

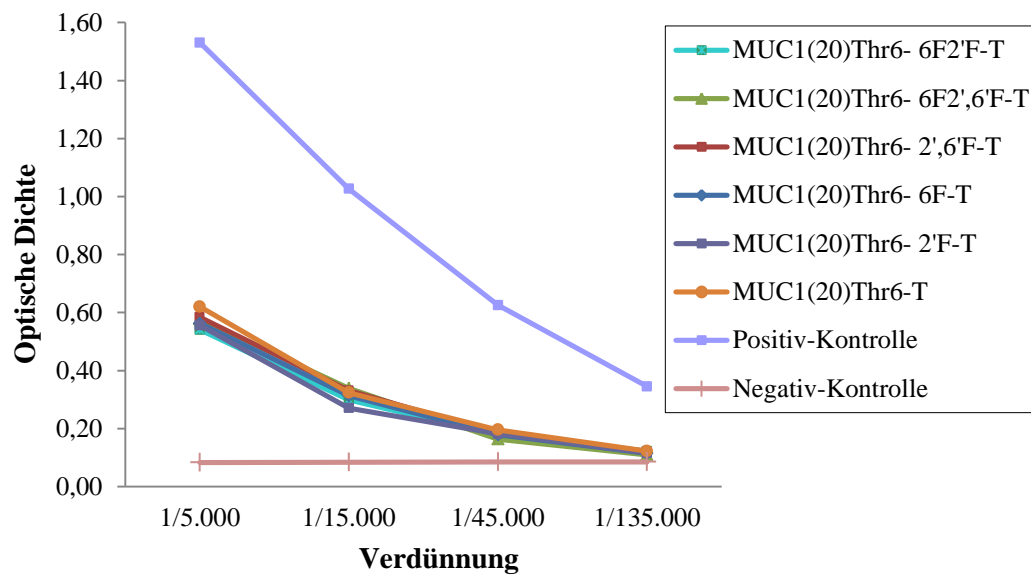
kann die Verteilung der Antikörper zwischen den beiden antigenen Strukturen (löslich und immobilisiert) bestimmt werden. Dazu werden die an die löslichen Antigene gebundenen Antikörper vor der Quantifizierung gewaschen, wodurch die gemessene Absorption die Restbindefähigkeit der Antikörper an die immobilisierten Antigene beschreibt. Das Neutralisationsexperiment erlaubt also eine Aussage über die Bindungsaffinität der löslichen MUC1-Glycopeptide im direkten Vergleich zu den immobilisierten Antigenen. Zur Verifizierung jedes Experimentes wurde in einer Positiv-Kontrolle das Experiment ohne Zusatz von löslichen Antigenen sowie in einer Negativ-Kontrolle ohne Zugabe von Antikörpern durchgeführt.



**Abb. 3.92 Lösliche MUC1-Glycopeptide für die ELISA-Neutralisationstests.**

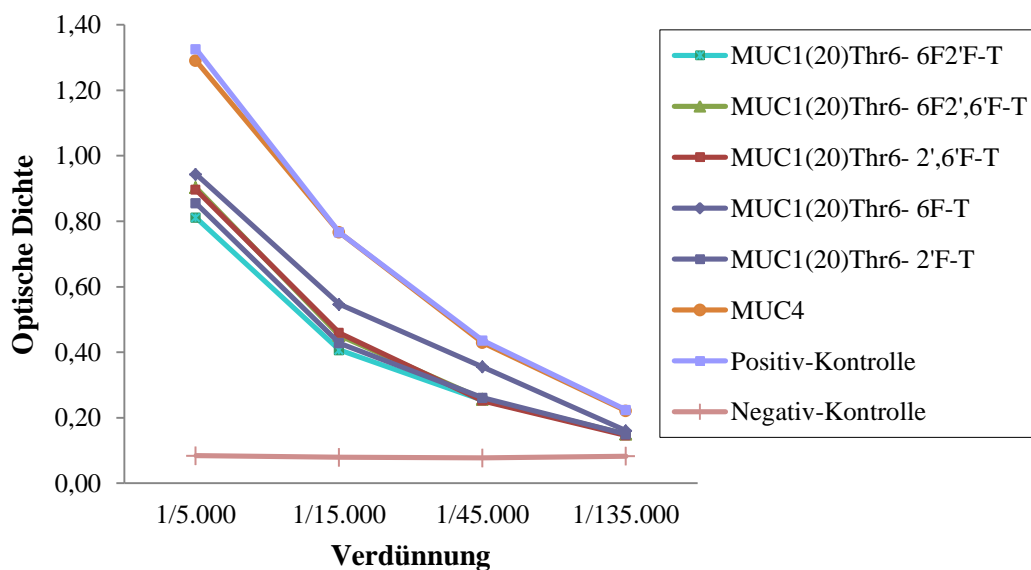
Die in Abb. 3.92 gezeigten MUC1-Glycopeptide (**81** und **84** wurden von *C. Mersch* und **85** wurde von *S. Wagner* zu Verfügung gestellt) wurden als lösliche Antigene in Konkurrenz zu den BSA-Konjugaten der in

Abb. 3.90 gezeigten Vakzine unter Verwendung der entsprechenden Seren getestet. Die Ergebnisse der ELISA-Neutralisationstests sind im Folgenden durch den Zusammenhang der optischen Dichte der photometrischen Analyse und der Verdünnung des Serums graphisch dargestellt.



**Abb. 3.93** Neutralisations-ELISA des Serums einer Maus, die mit dem natürlichen T-Antigen tragenden TTox-Konjugat 80 immunisiert wurde.

Die Neutralisationsexperimente mit dem Serum einer Maus, der eine dem natürlichen MUC1 entsprechende Partialstruktur als Bestandteil des Vakzins (MUC1(20)Thr6-T-TTox) verabreicht wurde, zeigen sehr ähnliche Affinitäten der fluorierten löslichen Antigene zu den Antikörpern. Die beobachteten Bindungsaffinitäten entsprechen zudem derjenigen des nicht-fluorierten MUC1-Glycopeptids.



**Abb. 3.94** Neutralisations-ELISA des Serums einer Maus, die mit dem 2'-Desoxy-2-fluor-T-Antigen tragenden TTox-Konjugat 81 immunisiert wurde.

Die in Abb. 3.94 gezeigten Neutralisationsversuche mit dem Serum einer mit dem MUC1-2'F-T-Antigen-TTox-Konjugat<sup>[181]</sup> vakzinieren Maus zeigen erneut eine Bindung der Antigene an die Antikörper. Dabei zeigt das in der 6-Position monofluorierte Glycopeptid von allen fluorierten Vertretern die schwächste Bindung. Zwar ist dieser Effekt nicht sehr ausgeprägt, doch deutet er dennoch eine gewisse „Feinspezifität“ der Antikörperbindung an. Dass die Erkennung der Antikörper insgesamt strukturselektiv ist, zeigt das entsprechende Neutralisationsexperiment, bei dem ein Glycopeptid aus der verwandten MUC4-*tandem repeat*-Sequenz (von C. Brocke zur Verfügung gestellt)<sup>[112]</sup> als lösliches Antigen eingesetzt wird. Im Gegensatz zu den fluorierten MUC1-Glycopeptiden bleibt hier die Bindung an den Antikörper völlig aus und es wird ein Kurvenverlauf analog zur Positivkontrolle beobachtet.

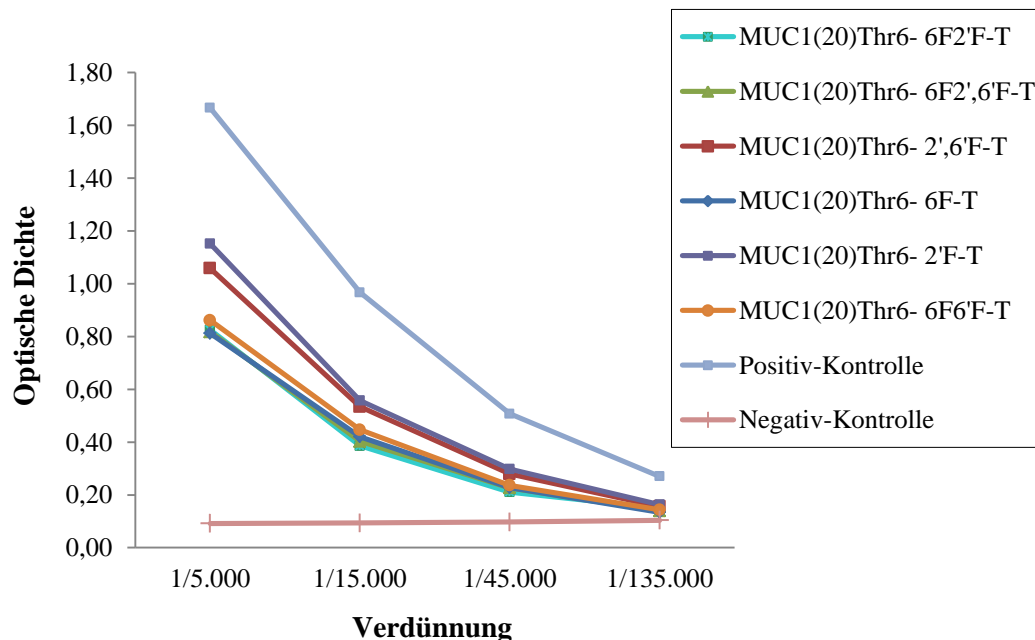


Abb. 3.95 Neutralisations-ELISA des Serums einer Maus, die mit dem 6,6'-Dideoxy-6,6'-difluor-T-Antigen tragenden TTox-Konjugat 82 immunisiert wurde.

In einem dritten Neutralisationsexperiment wurde schließlich das Serum einer Maus verwendet, deren Immunisierung mit dem TTox-Konjugat des MUC1-Glycopeptides **82**, das ein in den Positionen 6 und 6' fluoriertes T-Antigen als Saccharidseitenkette trägt.<sup>[42]</sup> Im Gegensatz zu den vorherigen ELISA-Versuchen zeichnet sich hier ein Trend ab, nach dem sämtliche in Position 6 des T-Antigens fluorierte Glycopeptide eine etwas höhere Affinität zu den Antikörpern zeigen. Etwas schwächer binden hingegen die Glycopeptide, bei denen ein 2'-Fluorsubstituent bzw. zwei Fluoratome in der 2'- und 6'-Position eingebaut wurden.



Zusammenfassend stellen die hier präsentierten Ergebnisse der Neutralisationsversuche eine aussichtsreiche Perspektive für weitere Vakzinierungen mit den neuen fluorierten MUC1-Glycopeptid-Konjugaten dar. So wurden alle untersuchten fluorierten Glycopeptid-Antigene von den eingesetzten Antikörpern erkannt, wobei Letztere sowohl von Vakzinen mit modifizierter bzw. fluorierter MUC1-Struktur als auch durch solche mit natürlicher MUC1-Struktur induziert wurden. Der Einbau der Fluorsubstituenten beeinträchtigt damit keine der für die Antigen-Antikörper-Erkennung ausschlaggebenden Bindungskontakte. Obwohl die universelle Erkennung der unterschiedlichen Antigene darauf hindeutet, dass das Peptidrückgrat eine entscheidende Rolle bei der Bindung der Antikörper spielt, konnte dennoch eine gesteigerte Affinität bei entsprechend fluorierten Disaccharidseitenketten nachgewiesen werden. Insbesondere das Peptid **75**, dessen T-Antigen-Einheit insgesamt drei Fluorsubstituenten trägt und das in allen Untersuchungen stets zu den Strukturen mit den stärksten Affinitäten gehörte, empfiehlt sich für Immunisierungsstudien im Mausmodell.

### Immunisierungsstudien mit dem 2',6'-Di-F-6-F-T-Thr<sup>6</sup>-MUC1(20)-TTox-Konjugat:

Um das aus den Neutralisations-ELISA-Experimenten als vielversprechend hervorgegangene, dreifach fluoridierte Glycopeptid **75** hinsichtlich seiner Eignung, spezifische anti-MUC1-Antikörper zu induzieren, zu testen, wurden drei weibliche BALB/c-Mäuse mit dem entsprechenden TTox-Konjugat **79** immunisiert (Abb. 3.96). Die Immunisierungen erfolgten dabei ebenfalls in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *E. Schmitt* am Institut für Immunologie in Mainz, und wurden von *S. Wagner*, *N. Gaidzik* und *B. Gerlitzki* durchgeführt.

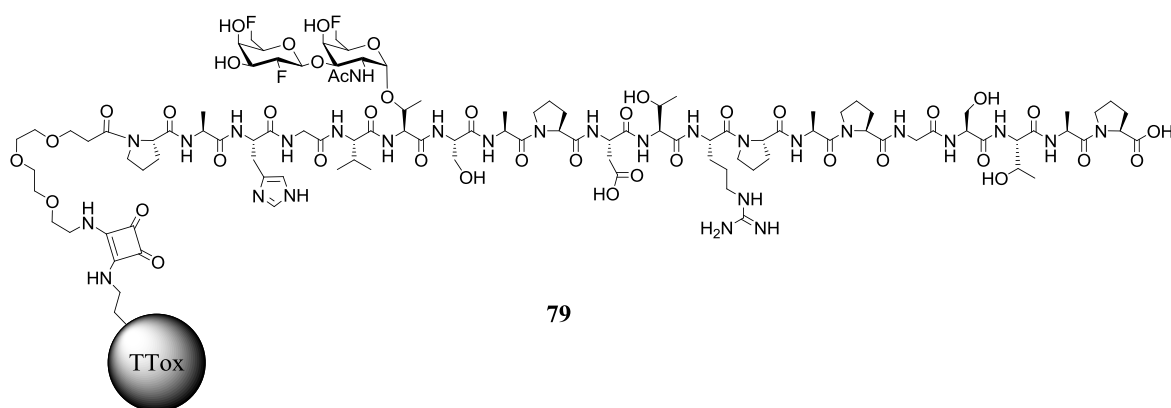
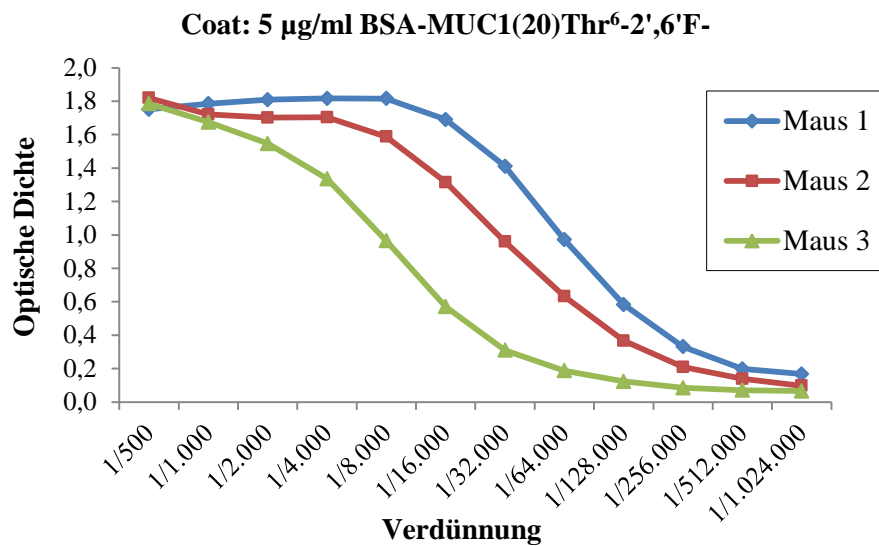


Abb. 3.96 Vakzin für die Immunisierungsstudien im Mausmodell.

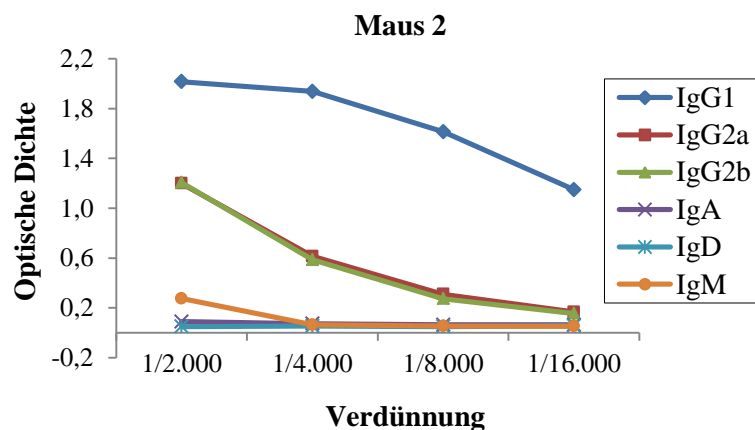
Nach der initialen Immunisierung unter Verwendung des kompletten Freund'schen Adjuvans wurden in einem Abstand von je 21 Tagen drei Auffrischungsimpfungen mit dem inkompletten Freund'schen Adjuvans intraperitoneal appliziert. Fünf Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen aus der Schwanzvene Blut entnommen und das daraus gewonnene Serum wurde mittels ELISA-Mikrotiterplatten, die mit den vakzinanalogen BSA-Konjugaten beschichtet waren, auf die Bildung von Antikörpern geprüft. Zu diesem Zweck wurden die, um eine Überreaktion durch TTox-spezifische Antikörper zu vermeiden, und nach der Standard-ELISA-Methode untersucht (Abb. 3.97).



**Abb. 3.97** ELISA zur Bestimmung der vakzin-spezifischen Antikörper.

Aus dem Diagramm geht hervor, dass alle drei Mäuse eine starke Immunantwort nach der Behandlung mit dem dreifach fluoridierten Vakzin zeigen. Obwohl Maus 3 mit einem etwas höheren Titer von ca. 1/20.000 eine etwas schwächere Immunreaktion als Maus 1 und 2 mit Titern von ca. 1/40.000 bzw. 1/64.000 zeigt sind diese dennoch in allen Fällen ausreichend stark, um die Immuntoleranz zu überwinden.

Um eine genauere Aussage über die im Serum enthaltenen Antikörper treffen zu können wurde ein weiteres ELISA-Experiment, diesmal unter Verwendung Isotyp-spezifischer Sekundärantikörper, durchgeführt. Aufgrund gleichbleibender Tendenzen bei den Untersuchungen der Seren der einzelnen Mäuse wurde exemplarisch nur die Isotyp-Bestimmung im Serum von Maus 2 dargestellt, da dessen Immunantwort im Vergleich zu den Mäusen 1 und 3 die mittlere Immunreaktion der Immunisierungsreihe darstellt.



**Abb. 3.98** Isotyp-selektive ELISA-Versuche.

Da erfreulicherweise ein hoher Anteil an IgG-Antikörpern und gleichzeitig nur verschwindend geringe Mengen an IgM im Serum nachgewiesen werden konnten, kann von einer selektiven Immunreaktion ausgegangen werden. Insbesondere der Typ IgG<sub>1</sub> ist ein guter Indikator für eine MHC-II-restringierte Immunantwort und liefert darüber hinaus die Basis für die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses.

Als weiterer Schritt zur Evaluierung des Glycopeptid-Konjugates als Anti-Tumor-Vakzine sollten die durch die Immunisierung erhaltenen Antikörper bezüglich ihrer Affinität zu Tumorzellen der humanen Brustkrebszelllinie MFC-7 untersucht werden. Dies sollte unter Zuhilfenahme der *fluorescence activated cell sorter* (FACS)-Analysemethode, deren Prinzip auf der Detektion laserinduzierter Fluoreszenz von Sekundärantikörpern im Durchfluss basiert, erfolgen. Allerdings ergaben sich wiederholt Probleme mit den MFC-7-Tumorzellen, die zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen führten. Aus zeitlichen Gründen konnte jedoch nicht bis zur Klärung der Ursache beziehungsweise zur Anschaffung neuer Zellen gewartet werden.

Abschließend lässt sich feststellen, dass sich die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten und getesteten Verbindungen als potentielle Kandidaten für Immunisierungsversuche erwiesen haben. Auch die exemplarisch durchgeführten Vakzinierungen von drei Mäusen mit dem 2',6'-Di-F-6-F-T-Thr<sup>6</sup>-MUC1(20)-TTox-Konjugat und die damit verbundenen ersten Evaluierungen der Immunantworten deuten auf eine gute Eignung des Glycopeptid-Konjugates als Entwicklungskandidaten für die Herstellung eines selektiven Antitumor-vakzins.

## 4 ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung selektiver Antitumorimpfstoffe ist ein aussichtsreicher Ansatz, um durch eine aktive immuntherapeutische Bekämpfung der Krankheit Krebs die Schädigung von gesundem Gewebe zu minimieren. Zudem würde eine solche Immuntherapie einen potentiellen Angriffspunkt für die bisher schwer behandelbare, metastasierende Form der Erkrankung bedeuten. Um die benötigte Differenzierung der natürlichen und der malignen Zellen zu erreichen, können Oberflächenglycoproteine der Mucine als Erkennungsstrukturen herangezogen werden. Diese unterscheiden sich bei krankhaftem Gewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe aufgrund enzymatischer Fehlregulierungen durch stark verkürzte Glycanseitenketten und der daraus resultierenden Exposition von Peptidomänen. Unter Zuhilfenahme hoch-immunogener Proteine als Carrier (z. B. TTox) in strukturell definierten Glycopeptidkonjugaten können mit geeigneten Glycopeptid-Partialstrukturen spezifische Immunreaktionen gegen die tödlichen Zellen initiiert werden. Da die Glycopeptidkonjugate unter metabolischen Bedingungen jedoch zügig durch diverse Enzyme abgebaut werden, ist ein weiterer Bestandteil dieser Therapiestrategie die Sicherstellung einer ausreichenden Zirkulationszeit im Organismus.

Im Fokus dieser Arbeit stand daher der strategische Einbau von Fluorsubstituenten anstelle der Hydroxylgruppen im Glycanrest von MUC1-Glycopeptiden, um eine Steigerung der metabolischen Stabilität zu erreichen. Der Aufbau der Peptidsequenzen mit den entsprechenden fluorierten Glycosylaminosäuren sollte hierbei an der festen Phase erfolgen. Die so erhaltenen Strukturanaloga sollten im Anschluss auf ihre immunologischen Eigenschaften geprüft werden, da als elementare Voraussetzung für eine sinnvolle Modifizierung die Tumorselektivität und die Immunogenität dieser Glycopeptide erhalten werden muss.

Für den Einbau in die MUC1-Peptidsequenz wurde daher zunächst ein synthetischer Zugang zu den mehrfach fluorierten Thomsen-Friedenreich-Antigenanaloga (Abb. 4.1).

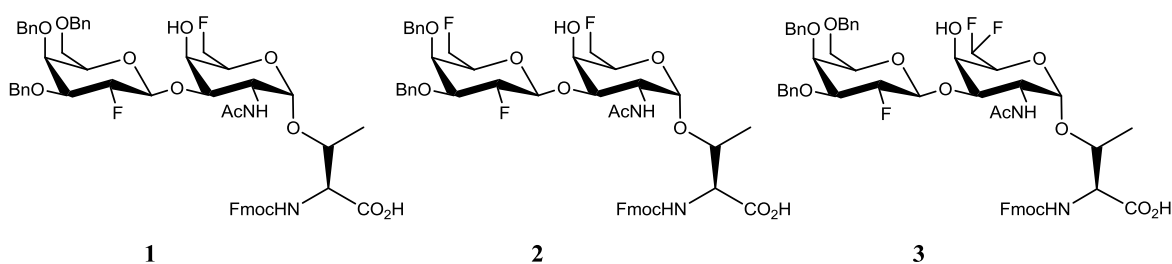


Abb. 4.1 Synthetisierte T-Antigenanaloga.

Einer konvergenten Strategie folgend wurden die Disaccharide über Glycosylierungsreaktionen unter Einsatz der unterschiedlich fluorierten Galactosyldonoren und der T<sub>N</sub>-Antigenanaloge als Akzeptoren dargestellt. Die Synthese des einfach fluorierten Galactosyldonors **9** erfolgte ausgehend von D-Galactose in sieben Stufen, wobei die Selectfluor<sup>®</sup>-vermittelte Einführung des Fluorsubstituenten am benzylierten Galactal durchgeführt wurde.

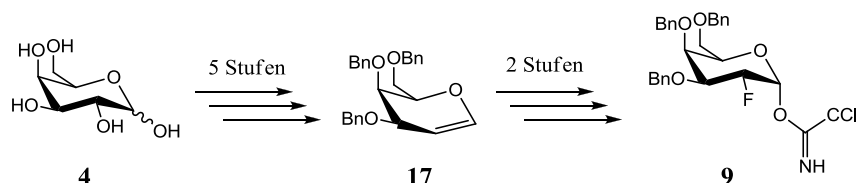


Abb. 4.2 Synthese des 2-Desoxy-2-fluor-Donors **9**.

In Analogie zum in Abb. 4.2 gezeigten Trichloracetimidat **9** wurde der zweifach fluorierte Galactosyldonor **8** erst durch eine Desoxyfluorierung mit DAST<sup>®</sup> in Position 6 modifiziert, bevor der Fluorsubstituent in Position 2 eingebracht wurde.

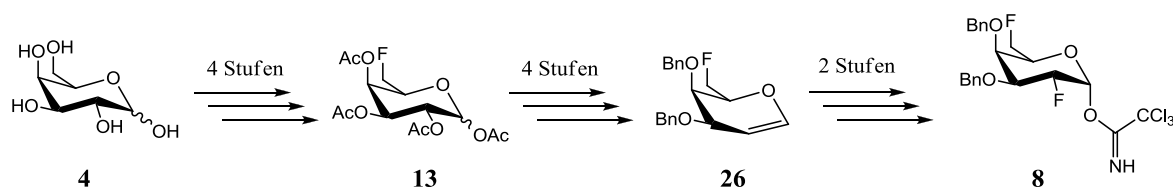


Abb. 4.3 Synthese des 2,6-Difluor-Donors **8**.

Bei der Herstellung der fluorierten Galactosylakzeptoren gelang eine späte Einführung der Fluorsubstituenten, wodurch eine modulare Syntheseroute, basierend auf dem literaturbekannten, schrittweisen Aufbau des T<sub>N</sub>-Antigen-Threoninkonjugates, entwickelt werden konnte (Kap. 3.2.1).

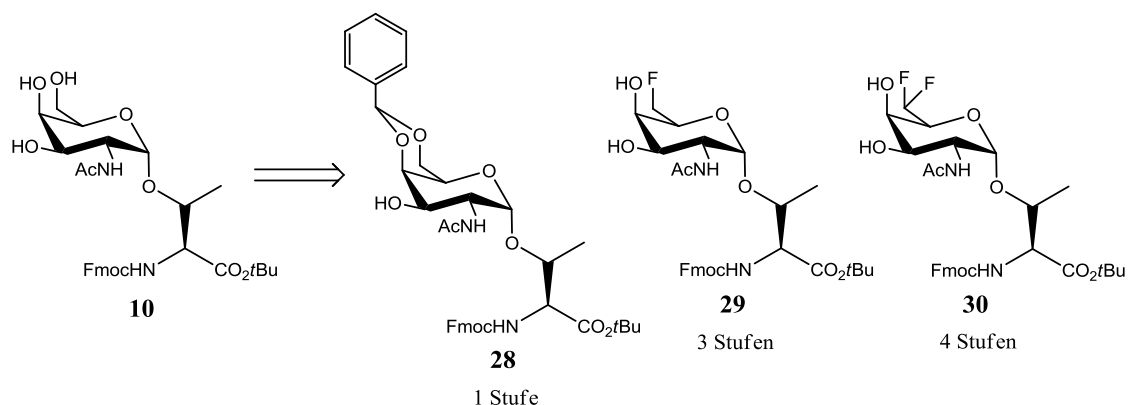
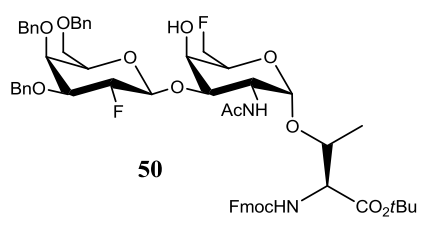
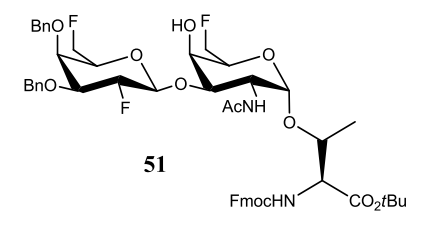
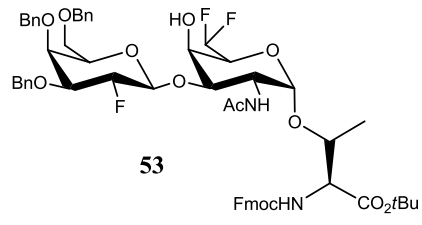


Abb. 4.4 Synthesestrategie der Glycosylakzeptoren.

Das *N*-Acetyl-galactosamin-Threonin-Konjugat **10** konnte als gemeinsamer Vorläufer für alle in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Glycosylakzeptoren eingesetzt werden und ermöglichte daher eine effiziente und kostengünstige Darstellung der Bausteine. Hierbei konnte im Vergleich zu der vorab publizierten Synthese des 6F-T<sub>N</sub>-Antigens **29**, bei der das Fluor zu Beginn der Synthesesequenz eingebaut wird,<sup>[88]</sup> eine Steigerung der Gesamtausbeute von 5.7% auf 6.5% erzielt werden. Im Falle der Difluor-Glycosylaminosäure **30** konnte *M. Johannes* zeigen, dass der Akzeptor **30** sogar ausschließlich durch die hier entwickelte Route eines späten Fluorierungsschrittes zugänglich ist.<sup>[113]</sup> Nach erfolgreicher Herstellung der einzelnen Bausteine gelang in Glycosylierungsreaktionen der Aufbau der mehrfach fluorierten T-Antigenanaloga **50**, **51** und **53**. Aufgrund des fehlenden Nachbargruppeneffektes der 2-Desoxy-2-fluor-galactosyldonoren wurden durch Variation der Reaktionsparameter die Glycosylierungen zugunsten der Bildung der *trans*-Glycoside optimiert (Tab. 4.1).

T-Antigenanalogon	Lösungsmittel	Temperatur in °C	Ausbeute in %	α/β	β-Anomer in %
 <b>50</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0 - 23 °C	61	1:2.5	44
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-15 - 15 °C	63	1:2	42
 <b>51</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-10 - 23 °C	57	1:2	38
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN	-20 - 23 °C	58	1:3	44
 <b>53</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-20 - 10 °C	58	1:1	29
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN	0 - 23 °C	50	1:4	40
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN	-20 - 23 °C	36	1:2.5	26

Tab. 4.1 Ergebnisse der Glycosylierung zu den neuen T-Antigenanaloga.

Nach Acidolyse der *tert*-Butylester wurden die fluorierten Disaccharide im Austausch für das Threonin 6 erfolgreich in die 20 Aminosäuren umfassende *tandem repeat*-Sequenz des MUC1 eingebaut, welche für die nachfolgende Konjugation an immunogene Carrier mit einem Triethylglykol-Linker versehen wurden.

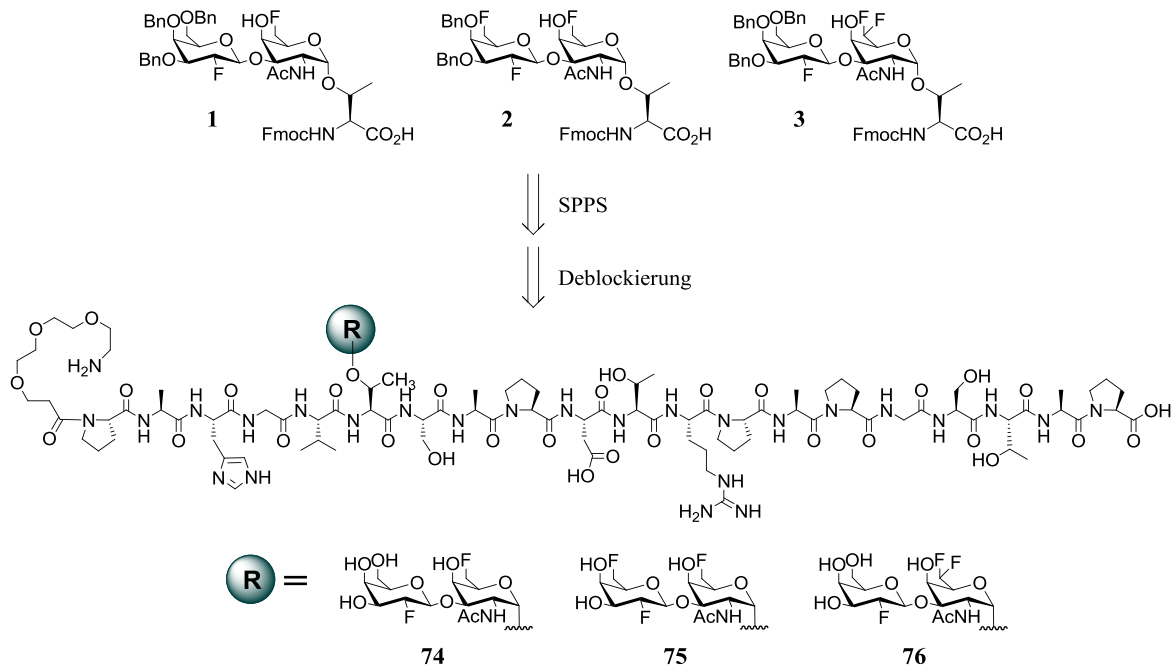


Abb. 4.5 Synthetisierte Glycopeptide des MUC1-Typs.

Die Konjugation an die Trägerproteine BSA und TTox erfolgte exemplarisch am dreifach fluorierten Glycopeptid **72**, wobei die Quadratsäure für die Verbindung des Linkers mit den Proteinen eingesetzt wurde.

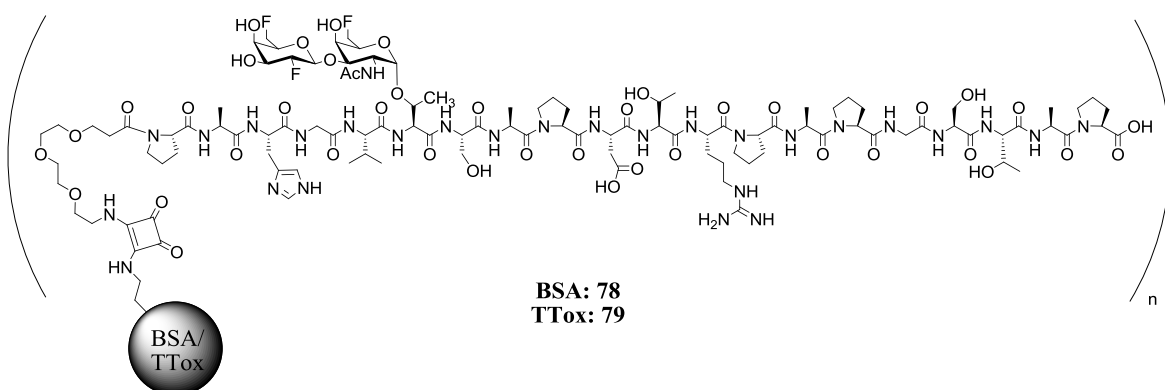


Abb. 4.6 Dreifach fluoriertes Vakzin für Immunsierungsstudie.



Darüber hinaus wurden wichtige Schlüsselschritte in der Synthese fluorierter T-Antigene in mikrostrukturierten Reaktoren untersucht, um durch die kontinuierliche Reaktionsführung einen optimierten und raschen Zugang zu den komplexen Verbindungen zu ermöglichen. Zu diesen Reaktionsschritten zählen die Selectfluor<sup>®</sup>-vermittelte elektrophile Fluorierung des Galactals sowie die komplexen Glycosylierungsreaktionen zu den fluorierten T-Antigenanaloga. Zur Optimierung der Fluorierung sollten aufbauend auf den Ergebnissen der Diplomarbeit abschließende Untersuchungen am ungeschützten Galactal zeigen, ob bei homogener Reaktionslösung die Ausbeuten der Fluorierung gesteigert werden können. Leider konnte keine signifikante Erhöhung der Ausbeute der Fluorierung erzielt werden und das fluorierte Galactosederivat **23** wurde in 39%iger Ausbeute über zwei Stufen erhalten.

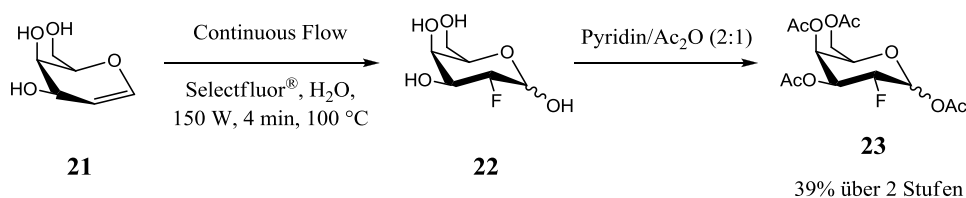


Abb. 4.7 Fluorierung des Galactals im Continuous Flow-Prozess.

Die Versuche der mikroreaktorunterstützten Glycosylierungen wurden an zwei T-Antigenanaloga untersucht, deren Potential in Vakzinierungsstudien bereits gezeigt werden konnte. Hierbei wurde neben der bekannten Glycosylierungsreaktion des benzylierten 2-Fluor-galactosyltrichloracetimidats **9** mit dem 4,6-benzylidenblockierten T<sub>N</sub>-Antigen **28** auch die analoge Darstellung des 6-F-T-Antigenderivates **55** untersucht. Letztere Verbindung wurde bisher stets aufwendig mittels der toxischen, Quecksilber(II)-cyanid-vermittelter Helferich-Glycosylierung synthetisiert.

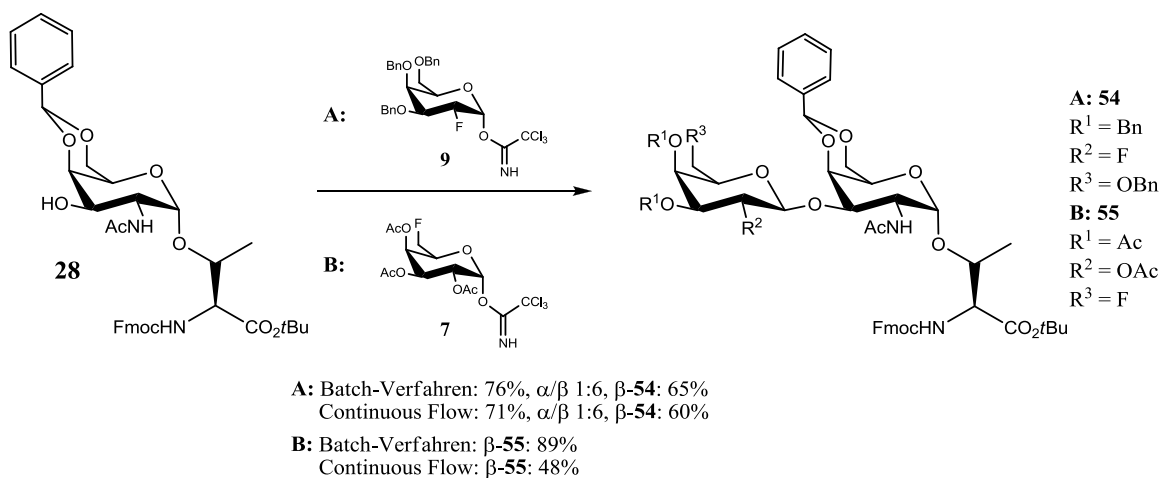
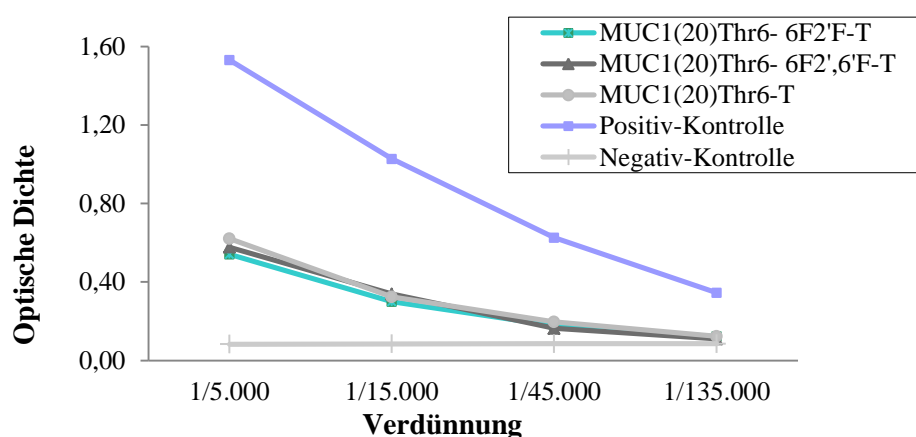


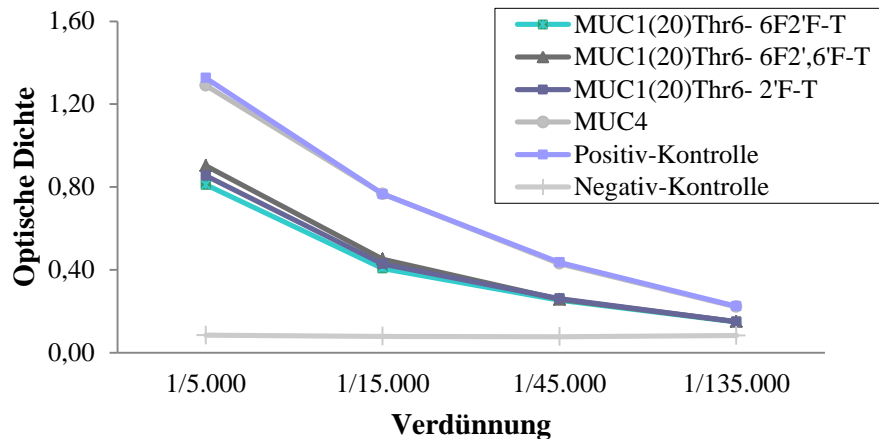
Abb. 4.8 Glycosylierung in Continuous Flow-Prozessen in mikrostrukturierten Reaktoren.

Die Glycosylierungen wurden nach *Schmidt* unter Verwendung der reaktiven Trichloracetimidatdonoren und TMSOTf als Promotor durchgeführt. Bei der Glycosylierung zum T-Antigenanalogon **54** konnten bei einer Verkürzung der Reaktionszeit von 16 Stunden auf 90 Minuten annähernd identische Ausbeuten und  $\beta$ -Selektivitäten wie im Batch-Verfahren erzielt werden. Im Falle des 6-F-Analogons blieben die Ausbeuten der Versuche im Durchfluss-Reaktor zwar deutlich unter denen des Batch-Verfahrens, es konnte jedoch beim Screening der Reaktionsparameter die temperaturabhängige Nebenreaktion zum Orthoester festgestellt und detailliert beschrieben werden. Während bei niedrigen Temperaturen keine Orthoester-Bildung beobachtet werden konnte, tritt die Reaktion bei moderaten Temperaturen in den Vordergrund. Erneute Erhöhung der Reaktionstemperatur führt wiederum zur vermehrten Isomerisierung des Nebenproduktes zum gewünschten *trans*-Glycosid **55**. Für beide Reaktionen konnte also die erfolgreiche Umsetzung in mikrostrukturierten Reaktoren erzielt werden. Obwohl bei Verwendung des unreaktiveren 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluorgalactosyldonors **7** die hohen Ausbeuten des Batch-Verfahrens zwar nicht erreicht wurden, konnte dennoch ein detaillierter Einblick in das Reaktionsgeschehen erlangt werden.

Die zuvor in Abb. 4.5 gezeigten mehrfach fluoriierten Glycopeptide wurden darüber hinaus in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *E. Schmitt* auf ihre Eignung als spezifische Vakzine getestet. In Neutralisationsstudien mit Antikörpern aus früheren Immunisierungen von Mäusen mit dem natürlichen Hapten und zwei fluoriierten Analoga hat sich eine selektive Bindung, die teilweise sogar leicht höher als zuvor war, herausgestellt.

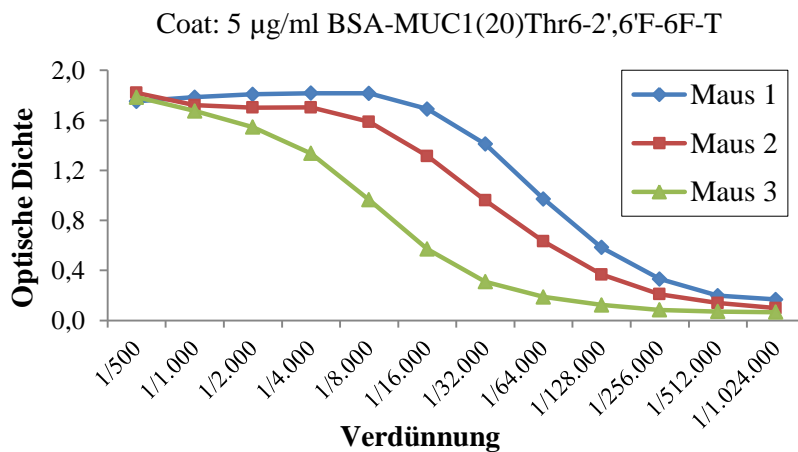


**Abb. 4.9** Neutralisations-ELISA des Serums einer Maus, die mit dem natürlichen T-Antigen tragenden TTox-Konjugat immunisiert wurde.



**Abb. 4.10** Neutralisations-ELISA des Serums einer Maus, die mit dem 2'-Desoxy-2'-fluor-T-Antigen tragenden TTox-Konjugat immunisiert wurde.

Zudem wurde das dreifach fluorierte MUC1-Glycopeptid **75** als potentieller Antitumorimpfstoff getestet. Hierzu wurde das TTox-Konjugat in einer Immunisierungsreihe an drei Mäusen eingesetzt und die Titer der Antikörperantworten in ELISA-Tests bestimmt. Das BSA-Konjugat des entsprechenden Glycopeptides diente dabei als Coating-Material auf den Testplatten.



**Abb. 4.11** ELISA mit den Seren der drei immunisierten Mäuse.

An den erhaltenen Titerwerten zwischen 1/20.000 und 1/64.000 lassen sich trotz der geringen Unterschiede der Seren durchweg toleranzdurchdringende Immunantworten erkennen. Zudem zeugt das Auslösen der Immunreaktion bei allen drei Versuchstieren von der Reproduzierbarkeit der Immunisierungsergebnisse.

In einem abschließenden Assay wurde mit Hilfe von spezifischen Sekundärantikörper die Isotypenzusammensetzung der gebildeten Antikörper in den Seren aufgeschlüsselt (Abb. 4.12).

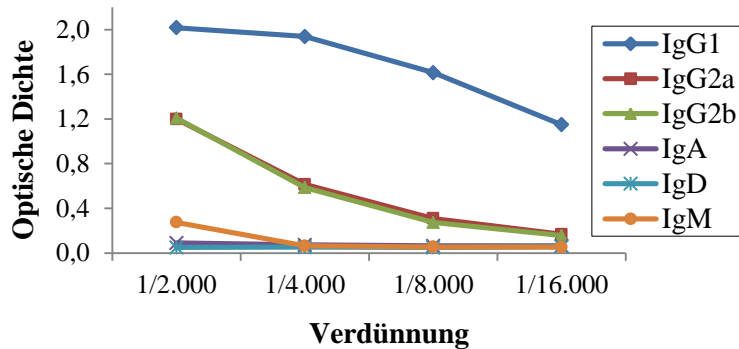


Abb. 4.12 Isotypspezifischer ELISA des Serums von Maus 2.

Anhand des hohen Anteils an IgG-Antikörpern (vor allem an IgG<sub>1</sub>), die sich aus den IgM-Antikörpern der akuten Infektionsphase bilden, kann von einer erfolgreichen MHC-II-restringierten Immunreaktion ausgegangen werden, die mit der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses einhergeht.

Abschließend kann im Rahmen der vorliegenden Dissertation von der erfolgreichen Synthese verschiedener mehrfach fluorierter T-Antigenanaloga, deren Einbau in die MUC1-*tandem repeat*-Sequenz sowie deren immunologischer Evaluierung berichtet werden. Auf dem Weg dahin konnte ebenfalls demonstriert werden, dass in synthetischen Schlüsselsequenzen wie den Glycosylierungen die Mikroreaktionstechnik beziehungsweise die kontinuierliche Prozessführung ein probates Mittel zur Optimierung komplexer organischer Stufen darstellt. Des Weiteren konnte beispielhaft an einem der fluorierten Glycopeptide nach Konjugation an einen immunogenen Carrier in Immunisierungsversuchen gezeigt werden, dass das entsprechende Vakzin in der Lage ist robuste und selektive Immunantworten auszulösen, einhergehend mit der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses.

## 5 EXPERIMENTALTEIL

### 5.1 Allgemeines und Messgeräte

**Lösungsmittel:** Alle Lösungsmittel wurden in der Qualität *pro analysi* bezogen und frisch destilliert eingesetzt. Bei Gebrauch von absoluten Lösungsmitteln wurden diese nach literaturbekannten Verfahren<sup>[182]</sup> erhalten.

**Optische Drehwerte:** Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem Polarimeter 241 der Firma *Perkin-Elmer*, Massachusetts (USA), bei den Wellenlängen  $\lambda = 546$  nm und  $\lambda = 578$  nm gemessen und auf die Natrium-D-Linie ( $\lambda = 589$  nm) extrapoliert.<sup>[183]</sup> Die verwendeten Lösungsmittel, die entsprechenden Konzentrationen (in g/100 mL) sowie die Messtemperatur sind bei den jeweiligen Werten vermerkt.

**Massenspektrometrie:** Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte an folgenden Spektrometern:

- Die Aufnahme der FD-Massenspektren erfolgte an einem Finnigan MAT-95-Spektrometer der Firma *ThermoElectron*, Boston (USA).
- ESI-Massenspektren wurden mit einem LCT-Spektrometer der Firma *Micromass*, Manchester (England), sowie einem Series 1200 LC/MSD Trap XCT der Firma *Agilent*, Santa Clara (USA), gemessen.
- Hochaufgelöste ESI-Massenspektren (HR-ESI-MS) wurden mit einem Q-TOF Ultima 3 Spektrometer der Firma *Micromass*, Manchester (England), gemessen.
- MALDI-TOF-Experimente wurden an einem Axima-CFR Spektrometer des Herstellers *Shimadzu*, Kyoto (Japan), durchgeführt. Proben mit Massen unter 10.000 g/mol wurden in einer DHB-Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure, 17 mg/mL in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1) mit 0.1% Trifluoressigsäure) gemessen. Bei Molmassen darüber wurde eine Sinapinsäure-Matrix (10 mg/mL in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1) mit 0.1% Trifluoressigsäure) verwendet.

Die in runden Klammern angegebenen molaren Massen beziehen sich auf die natürliche Häufigkeit der Isotope, wohingegen in eckigen Klammern die exakten Massen der reinen Isotope vermerkt sind.

**Flashchromatographie:** Die flashchromatographische Reinigung erfolgte unter erhöhtem Druck (0.3-0.8 bar) an Kieselgel der Korngröße 32-64  $\mu\text{m}$  der Firma *Acros Organics*, Geel (Belgien). Die jeweiligen Zusammensetzungen der Laufmittel sind angegeben und beziehen sich auf die Volumina der Eluenten.

**Dünnschichtchromatographie:** Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) beschichtete Aluminiumplatten der Firma *Merck*, Darmstadt, verwendet. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 254$  nm sowie durch die Verwendung folgender Färbereagenzien:

- *Seebach-Reagenz*: 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1.0 g Cer(IV)-sulfat-tetrahydrat, 4 mL konz. Schwefelsäure, 96 mL Wasser
- „Zucker-Reagenz“: 1:1-Mischung aus 0.2%iger *p*-Methoxyphenol-Lösung und 2 M ethanolischer Schwefelsäure.

Die Chromatogramme wurden durch Wärmeeinstrahlung mit einem Heißluftfön entwickelt.

**Reversed Phase HPLC (RP-HPLC):** Bei der analytischen RP-HPLC wurde mit einer Anlage der Firma *Jasco*, Easton (USA), bestehend aus einer Pumpe (PU-2080 Plus), einer ternären Gradienteneinheit (LG-2080-02), einem 3-Wege-Entgaser (DG-2080-53) und einem Diodenarraydetektor (MD-2010 Plus) mit variabler Wellenlänge. Folgende analytische Säulen wurden verwendet:

- *PerfectSil*, 5  $\mu\text{m}$ , C18, 300Å, 250  $\times$  4.6 mm
- *Phenomenex Luna*, 5  $\mu\text{m}$ , C18(2), 100Å, 250  $\times$  4.6 mm
- *Phenomenex Jupiter*, 5  $\mu\text{m}$ , C18(2), 300Å, 250  $\times$  4.6 mm

Die Anlage wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min betrieben.

Die Durchführung der semipräparativen HPLC erfolgte mit zwei Gradientenpumpen (PU-2087 Plus) und einem UV-Detektor mit variabler Wellenlänge (UV-2075 Plus), die ebenfalls von der Firma *Jasco*, Easton (USA), bezogen wurden. Die Eluenten wurden vor der Verwendung 30 Minuten mittels Ultraschall entgast. Folgende semipräparative Säulen mit den jeweiligen Flussraten wurden verwendet:

- *PerfectSil*, 5  $\mu\text{m}$ , C18, 300Å, 250  $\times$  20 mm; Flussrate: 10 mL/min
- *Phenomenex Luna*, 10  $\mu\text{m}$ , C18(2), 100Å, 250  $\times$  30 mm; Flussrate: 20 mL/min
- *Phenomenex Jupiter*, 5  $\mu\text{m}$ , C18, 300Å, 250  $\times$  30 mm; Flussrate: 20 mL/min

Als Eluenten dienten Gemische aus Methanol oder Acetonitril und Wasser, wenn erforderlich mit einem Zusatz von 0.1% Trifluoressigsäure. Das Methanol und das Acetonitril wurden bei den Firmen *Fisher Scientific*, Schwerte, *VWR*, West Chester (USA), oder bei *Sigma Aldrich*, St. Louis (USA), in der Reinheit „HPLC-grade“ erworben; das Wasser wurde mit einer Simplicity 185-Wasseraufbereitungsanlage der Firma *Millipore*, Billerica (USA), entionisiert. Die jeweiligen Gradienten sowie die Wellenlängen zur Detektion sind bei den entsprechenden Verbindungen angegeben.

**HPLC-MS:** Die gekoppelten Messungen der HPLC-MS erfolgten an einem Komplettsystem der Serie 1200 LC/MSD Trap XCT der Firma *Agilent*, Santa Clara (USA). Als Säule wurde eine Ascentis Express (C8, 90Å, 30 × 2.7 mm) der Firma *Supelco Analytical/Sigma-Aldrich*, St. Louis (USA), bei einer Flussrate von 0.5 mL/min verwendet.

**Kernresonanzspektroskopie (NMR):** Die Aufnahme der Spektren erfolgte an folgenden Geräten der Firma *Bruker*, Bremen:

- AC-300: 300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR; 75.5 MHz-<sup>13</sup>C-NMR
- Avance-II 400: 400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR; 100.6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR
- AM-400: 376.6 MHz-<sup>19</sup>F-NMR
- Avance-III 600: 600 MHz-<sup>1</sup>H-NMR; 150.9 MHz-<sup>13</sup>C-NMR

Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  (ppm) beziehen sich auf das deuterierte Lösungsmittel, welches relativ zu Tetramethylsilan ( $\delta = 0$ ) kalibriert wurde. Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffsignale erfolgte mit Hilfe von COSY-, HSQC- und HMBC-Experimenten. Die durchgeführten Experimente sowie das Lösungsmittel sind bei den einzelnen Verbindungen angegeben.

Bei der Kennzeichnung der Signale der Disaccharide werden die Protonen des *N*-Acetylgalactosamin-Bausteins ohne Apostroph, die Protonen des Galactose-Bausteins mit Apostroph aufgeführt. Die Aminosäuren werden mittels Einbuchstabencode abgekürzt und mit griechischen Indices zugeordnet. Im Peptid wird die Glycosylaminosäure mit „\*“ markiert. Die Multiplizitäten der Signale werden folgendermaßen abgekürzt:

s	Singulett
bs	breites Singulett
d	Dublett
dd	Dublett von Dublett
dt	Dublett von Triplet
ddd	Dublett von Dublett von Dublett
m	Multiplet
pt	Pseudotriplet
t	Triplet
td	Triplet von Dublett

**Festphasenpeptidsynthesen:** Alle Synthesen wurden in einem Peptidsynthesizer des Typs ABI 433A der Firma *Applied Biosystems*, Carlsbad (USA), nach dem Standardprogramm *Fastmoc* (0.1 mmol) am Prolin-beladenen Fmoc-Pro-O-Trt-Tentagel S-Harz der Firma

*Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, durchgeführt. Die verwendeten Aminosäuren (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Asp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Val-OH) wurden von der Firma *Orpegen*, Heidelberg, bezogen und die Visualisierung der Fmoc-Abspaltungen erfolgte über einen UV/VIS-Detektor der Firma *Perkin-Elmer* (Series 200), Waltham (USA). Dichlormethan und *N*-Methylpyrrolidin-2-on (beide in der Reinheit „peptide grade“) sowie die Kupplungsreagenzien 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorophosphat (HBTU) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) wurden von der Firma *Iris Biotech*, Marktredwitz, bezogen. Die verbleibenden Kupplungsreagenzien, 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorophosphat (HATU) und 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt), wurden von der Firma *AK Scientific*, Mountain View (USA), erworben.

**Ultrafiltration:** Es wurde eine Stirred Cell 8050 Ultrafiltrationsanlage mit 50 mL Volumen der Firma *Millipore*, Billerica (USA), verwendet. Als Filtermaterial wurden Polyethersulfon-Membranen mit einer Durchlässigkeit von 30 kDa eingesetzt.

**BSA:** Das Bovine Serumalbumin (Fettsäure- und Globulinfrei, A 0281) wurde von der Firma *Sigma-Aldrich Biochemicals*, Taufkirchen, bezogen und direkt für die Konjugatbildung verwendet.

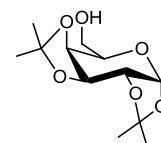
**Tetanus-Toxoid:** Von der Firma *CLS Behring*, Marburg, wurde eine Lösung von 17 mg/mL des Tetanus-Toxoids in einem Natriumchlorid-Puffer bezogen. Die Lösung wurde ohne weitere Reinigung verwendet.



## 5.2 Synthesen der Galactosyldonoren

### Synthese des acetylierten 6-Fluor-Galactosyldonors

#### 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranose (11)<sup>[184]</sup>



Eine Suspension von 67.0 g (0.42 mol) wasserfreiem Kupfer(II)-sulfat in 520 mL Aceton wurde portionsweise mit 30.0 g (0.17 mol) D-Galactose versetzt und anschließend 21 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Gemisch durch *Hyflo*<sup>®</sup> filtriert, das Filtrat wurde mit festem Calciumhydroxid neutralisiert und die entstandene Suspension wurde erneut durch *Hyflo*<sup>®</sup> filtriert. Die Lösung wurde i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 36.3 g (84%, 0.14 mol) leicht gelbes, viskoses Öl

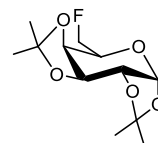
$R_f = 0.44$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:1)

$C_{12}H_{20}O_6$  (M = 260.28 g/mol) [260.13]

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 5.56 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 5.0$  Hz, 1-H), 4.60 (dd, 1H,  $J_{H3,H2} = 2.3$  Hz,  $J_{H3,H4} = 7.9$  Hz, 3-H), 4.32 (ddd, 1H,  $J_{H2,H4} = 0.5$  Hz,  $J_{H2,H3} = 2.4$  Hz,  $J_{H2,H1} = 5.1$  Hz, 2-H), 4.26 (dd, 1H,  $J_{H4,H5} = 1.1$  Hz,  $J_{H4,H3} = 8.0$  Hz, 4-H), 3.89-3.80 (m, 2H,  $\delta_{a/b}$ -H, 5-H), 3.77-3.70 (m, 1H,  $\delta_{a/b}$ -H), 2.25 (bs, 1H, OH), 1.52, 1.44, 1.32 (4  $\times$  s, 12H, 4  $\times$  CH<sub>3</sub>).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[185]</sup>

### 6-Desoxy-6-fluor-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranose (**12**)<sup>[41]</sup>



Es wurden 15.0 g (57.6 mmol) 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactose (**11**) in 35 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 18.3 mL (0.14 mol) 2,4,6-Collidin sowie 9.20 mL (69.6 mmol) DAST versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in der Mikrowelle ( $P_{\max} = 100$  W,  $T = 80$  °C,  $p_{\max} = 5.0$  bar) eine Stunde lang zur Reaktion gebracht, bevor die Reaktion durch Zugabe von 15 mL Methanol abgebrochen wurde. Das Gemisch wurde i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  5:1) gereinigt.

Ausbeute: 12.6 g (84%, 48.2 mmol) leicht gelbes, viskoses Öl

$R_f = 0.73$  ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

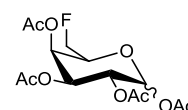
$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{FO}_5$  (M = 262.27 g/mol) [262.12]

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 5.54 (d, 1H,  $J_{\text{H1,H2}} = 5.0$  Hz, 1-H), 4.68-4.56 (m, 2H, 3-H,  $6_{\text{a/b-H}}$ ), 4.53-4.40 (m, 1H,  $6_{\text{a/b-H}}$ ), 4.34 (dd, 1H,  $J_{\text{H2,H3}} = 2.5$  Hz,  $J_{\text{H2,H1}} = 5.0$  Hz, 2-H), 4.26 (dd, 1H,  $J_{\text{H4,H5}} = 2.0$  Hz,  $J_{\text{H4,H3}} = 7.9$  Hz, 4-H), 4.12-4.01 (m, 1H, 5-H), 1.53, 1.44, 1.33 ( $4 \times \text{s}$ , 12H,  $4 \times \text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 109.6, 108.6 ( $2 \times \text{C}_{\text{quartär}}$  (Acetal)), 96.1 (C1), 82.0 (d,  $J_{\text{C6,F6}} = 168.0$  Hz, C6), 70.5, 70.4, 70.4 (C2, C3, C4), 66.6 (d,  $J_{\text{C5,F6}} = 22.5$  Hz, C5), 26.0, 25.9, 24.9, 24.4 ( $4 \times \text{CH}_3$ ).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[41]</sup>

### 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (**13**)<sup>[41]</sup>



Es wurden 12.6 g (48.0 mmol) 6-Desoxy-6-fluor-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranose (**12**) in 130 mL 80%iger Essigsäure gelöst und 36 Stunden unter

Rückfluss erhitzt. Die Essigsäure wurde mittels Kodestillation mit viermal 80 mL Toluol und zweimal 50 mL Dichlormethan unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde in 500 mL Pyridin und 220 mL Acetanhydrid gelöst und weitere 48 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Das Gemisch wurde i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:1) gereinigt.

Ausbeute: 13.4 g (80%, 38.3 mmol) leicht gelbes Öl (Anomerengemisch)

$R_f = 0.66$  ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 1:1)

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{FO}_9$  (M = 350.29 g/mol) [350.10]

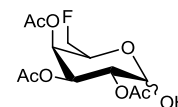
**ESI-MS** (positiv), m/z: 373.08 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ , ber.: 373.09.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), charakteristische Signale  $\delta$  [ppm] = 5.73 (dd, 1H,  $J_{\text{H}\beta 1, \text{H}3} = 0.4$  Hz,  $J_{\text{H}\beta 1, \text{H}2} = 8.3$  Hz, 1-H $\beta$ ), 5.49 (d, 1H,  $J_{\text{H}\alpha 1, \text{H}2} = 3.3$  Hz, 1-H $\alpha$ ).

Eine detaillierte Zuordnung der Signale wurde aufgrund des vorliegenden Anomerengemisches nicht durchgeführt.

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[41]</sup>

### 2,3,4-Tri-O-acetyl-6-desoxy-6-fluor- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (14)



Unter Eiskühlung wurde 1.00 mL (17.5 mmol) Essigsäure langsam zu einer Lösung von 1.00 mL (15.0 mmol) Ethylendiamin in 15 mL THF getropft. Nach Entfernung der Kühlung und Zugabe von 3.07 g (8.76 mmol)  $\text{Ac}_4\text{6FGal}$  (**13**), gelöst in 10 mL THF, wurde das Gemisch 42 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde mit 10 mL Wasser verdünnt, fünfmal mit 20 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden sukzessive mit je 30 mL verd. Salzsäure (1 M), ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  2:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.59 g (59%, 5.16 mmol) farbloses Öl (Anomerengemisch)

$R_{f\alpha} = 0.50$ ;  $R_{f\beta} = 0.40$  ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 1:1)

$C_{12}H_{17}FO_8$  (M = 308.26 g/mol) [308.09]

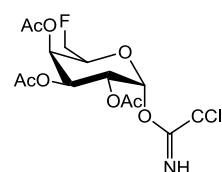
$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ , COSY),  $\delta$  [ppm] = 5.54 (pt, 1H,  $J_{H1\alpha, H\alpha 2} = 3.5$  Hz, 1-H $\alpha$ ), 5.51 (dd, 1H,  $J_{H\alpha 4, H\alpha 5} = 1.0$  Hz,  $J_{H\alpha 4, H\alpha 3} = 3.3$  Hz, 4-H $\alpha$ ), 5.45 (d, 1H,  $J_{H\beta 4, H\beta 3} = 2.7$  Hz, 4-H $\beta$ ), 5.42 (dd, 1H,  $J_{H\alpha 3, H\alpha 4} = 3.3$  Hz,  $J_{H\alpha 3, H\alpha 2} = 10.8$  Hz, 3-H $\alpha$ ), 5.17 (dd, 1H,  $J_{H\alpha 2, H\alpha 1} = 3.2$  Hz,  $J_{H\alpha 2, H\alpha 3} = 10.6$  Hz, 2-H $\alpha$ ), 5.10-5.07 (m, 2H, 2-H $\beta$ , 3-H $\beta$ ), 4.73 (pt, 1H,  $J_{H1\beta, H\beta 2} = 8.1$  Hz, 1-H $\beta$ ), 4.58-4.32 (m, 5H, 5-H $\alpha$  {4.55}, 6<sub>a,b</sub>-H $\beta$ , 6<sub>a</sub>-H $\alpha$  {4.48}, 6<sub>b</sub>-H $\alpha$  {4.37}), 4.04-3.96 (m, 1H, 5-H $\beta$ ), 2.16, 2.10, 2.00 (3  $\times$  s, 9H, 3  $\times$  CH<sub>3</sub> ( $\beta$ -Anomer)), 2.14, 2.10, 1.99 (3  $\times$  s, 9H, 3  $\times$  CH<sub>3</sub> ( $\alpha$ -Anomer)).

Aus dem Protonenspektrum wurde ein  $\alpha/\beta$ -Verhältnis von 5:1 bestimmt.

$^{13}C$ -NMR (100.6 MHz,  $CDCl_3$ , HMQC),  $\delta$  [ppm] = 171.1, 170.4, 170.2, 170.1, 170.1 (6  $\times$  C=O (Ac)), 96.0 (C1 $\beta$ ), 90.6 (C1 $\alpha$ ), 81.5 (d,  $J_{C6\alpha, F6} = 171.4$  Hz, C6 $\alpha$ ), 80.7 (d,  $J_{C6\beta, F6} = 172.0$  Hz, C6 $\beta$ ), 71.7 (d,  $J_{C5\beta, F6} = 23.3$  Hz, C5 $\beta$ ), 70.9 (C2 $\beta$ ), 70.3 (C3 $\beta$ ), 68.2, 68.2 (C2 $\alpha$ , C4 $\alpha$ ), 67.1 (C3 $\alpha$ ), 67.1 (d,  $J_{C5\alpha, F6} = 22.4$  Hz, C5 $\alpha$ ), 21.0, 20.6, 20.5 (3  $\times$  CH<sub>3</sub> (Ac,  $\beta$ -Anomer)), 20.8, 20.6, 20.6 (3  $\times$  CH<sub>3</sub> (Ac,  $\alpha$ -Anomer)).

$^{19}F$ -NMR (376.6 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\alpha$ -Anomer:  $\delta$  [ppm] = -231.5 (td,  $J_{F6, H5} = 14.8$  Hz,  $J_{F6, H6a,b} = 46.5$  Hz, F6);  $\beta$ -Anomer:  $\delta$  [ppm] = -231.4 (td,  $J_{F6, H5} = 12.0$  Hz,  $J_{F6, H6a/b} = 46.4$  Hz, F6).

### 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-trichloracetimidat (7)<sup>[186]</sup>



Eine Lösung von 1.58 g (5.14 mmol) der 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (**14**) in 100 mL absol. Dichlormethan wurde mit 2.30 mL (23.1 mmol) Trichloracetonitril und fünf Tropfen 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en versetzt und anschließend 18 Stunden bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel ( $^c$ Hex/EtOAc 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.64 g (70%, 3.62 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +97.4$  (c = 1.00,  $CHCl_3$ )

$R_f = 0.79$  ( $^c$ Hex/EtOAc, 1:1)

$C_{14}H_{17}Cl_3FNO_8$  (M = 452.64 g/mol) [451.00]

**ESI-MS** (positiv),  $m/z$ : 474.02  $[M+Na]^+$ , ber.: 473.99.

**HR-ESI-MS** (positiv),  $m/z$ : 473.9905  $[M+Na]^+$ , ber.: 473.9901.

**$^1H$ -NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ , COSY),  $\delta$  [ppm] = 8.68 (s, 1H, =NH), 6.62 (d, 1H,  $J_{H1,H2}$  = 3.4 Hz, 1-H), 5.62 (d, 1H,  $J_{H4,H3}$  = 3.1 Hz, 4-H), 5.43 (dd, 1H,  $J_{H3,H4}$  = 3.1 Hz,  $J_{H3,H2}$  = 10.9 Hz, 3-H), 5.37 (dd, 1H,  $J_{H2,H1}$  = 3.4 Hz,  $J_{H2,H3}$  = 10.9 Hz, 2-H), 4.55-4.32 (m, 3H, 5-H {4.49}, 6<sub>a,b</sub>-H), 2.17, 2.03, 2.02 (3  $\times$  s, 9H, 3  $\times$   $CH_3$  (Ac)).

**$^{13}C$ -NMR** (100.6 MHz,  $CDCl_3$ , HMQC),  $\delta$  [ppm] = 170.1, 170.0, 169.9 (3  $\times$  C=O (Ac)), 160.8 (TCI), 93.4 (C1), 90.7 ( $CCl_3$ ), 80.6 (d,  $J_{C6,F6}$  = 172.3 Hz, C6), 69.6 (d,  $J_{C5,F6}$  = 23.6 Hz, C5), 67.4 (C3), 67.4 (d,  $J_{C4,F6}$  = 5.6 Hz, C4), 66.8 (C2), 20.7, 20.6, 20.5 (3  $\times$   $CH_3$  (Ac)).

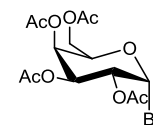
**$^{19}F$ -NMR** (376.6 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  [ppm] = -232.0 – -232.3 (m, F6).

**RP-HPLC** (PerfectSil C18(2),  $\lambda$  = 214 nm,  $H_2O$ -MeCN, 30:70  $\rightarrow$  15:85, 30 min  $\rightarrow$  0:100, 10 min):  $R_t$  = 3.5 min.

## Synthese des benzylierten 2-Fluor-Galactosyldonors

### Synthese des benzylierten 2-Fluor-Galactosyldonors im Batch

#### 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosylbromid (15)<sup>[91]</sup>



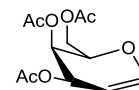
Eine Lösung von 0.5 g D-Galactose in 210 mL Acetanhydrid wurde mit 1.25 mL Perchlorsäure versetzt. Anschließend wurden weitere 49.5 g D-Galactose (insgesamt 50.0 g, 0.28 mol) so zugegeben, dass die Temperatur der Lösung zwischen 30 und 40 °C gehalten wurde. Nach beendeter Zugabe wurde 60 Minuten bei Raumtemp. gerührt, mit 230 mL einer 33%igen Bromwasserstofflösung in Eisessig versetzt und weitere 120 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wurde daraufhin mit 300 mL Dichlormethan verdünnt, zur Hydrolyse auf Eiswasser gegossen und vorsichtig mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Die organische Phase wurde noch dreimal mit je 150 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt, mit Magnesiumsulfat

getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Umsetzung verwendet.

Rohausbeute: 93.0 g (81%, 0.23 mol) braunes Öl

Analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[187]</sup>

### 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**16**)<sup>[92]</sup>



Eine auf -18 °C gekühlte Mischung aus 550 mL Wasser und 400 mL Essigsäure wurde mit 150 g Zink und einer Kupfersulfat-Lösung (15.0 g in 75 mL Wasser) versetzt. Nach begonnener Wasserstoffentwicklung wurden 93.0 g (0.23 mol) rohes 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosylbromid (**15**), gelöst in 150 mL Dichlormethan, innerhalb von 30 Minuten zugegeben und die Suspension wurde binnen 100 Minuten auf 5 °C erwärmt. Es wurde durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt, mit 200 mL eines Essigsäure/Wasser-Gemisches (1:1) nachgewaschen und das Filtrat wurde dreimal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 200 mL Eiswasser sowie zweimal mit je 200 mL einer kalten, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Produkt wurde mit Hilfe von Flashchromatographie an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 2:1) isoliert.

Ausbeute: 44.1 g (72%, 0.16 mol) leicht gelbes, viskoses Öl

$$[\alpha]_D^{23} = -18.6 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}$$

$$R_f = 0.68 \text{ (}^c\text{Hex/EtOAc, 1:1)}$$

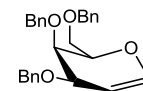
$$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7 \quad (\text{M} = 272.25 \text{ g/mol}) \quad [272.09]$$

**ESI-MS** (positiv), m/z: 295.11 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 295.08.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 6.46 (dd, 1H,  $J_{\text{H1,H3}} = 1.8 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{H1,H2}} = 6.3 \text{ Hz}$ , 1-H), 5.56-5.53 (m, 1H, 3-H), 5.43-5.41 (m, 1H, 4-H), 4.74-4.71 (m, 1H, 2-H), 4.34-4.30 (m, 1H, 5-H), 4.26-4.18 (m, 2H, 6<sub>a,b</sub>-H), 2.12, 2.08, 2.02 (3  $\times$  s, 9H, 3  $\times$  CH<sub>3</sub> (Ac)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 170.5, 170.3, 170.1 (3  $\times$  C=O (Ac)), 145.4 (C1), 98.8 (C2), 72.7 (C5), 63.8, 63.7 (C3, C4), 61.9 (C6), 20.8, 20.7, 20.6 (3  $\times$  CH<sub>3</sub> (Ac)).

Weitere analytischen Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[91]</sup>

**3,4,6-Tri-*O*-benzylgalactal (17)**<sup>[188]</sup>

Zur Deacetylierung wurde eine Lösung aus 6.02 g (22.1 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**16**) in 50 mL absolutem Methanol mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (1% in Methanol) auf einen pH-Wert von 10-10.5 eingestellt und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Methanol i. Vak. abdestilliert und zur darauffolgenden Benzylierung wurde das Rohprodukt in 70 mL absolutem DMF gelöst. Unter Eiskühlung wurden vorsichtig portionsweise 4.15 g (0.10 mol) Natriumhydrid-Dispersion (60%ig in Mineralöl) zugegeben und 15 Minuten gerührt. Im Anschluss wurden bei andauernder Kühlung langsam 13.0 mL (0.11 mol) Benzylbromid zugetropft und das Gemisch wurde nach beendeter Zugabe noch 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde mit 200 mL Toluol und 100 mL Wasser verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase wurde noch zweimal mit je 50 mL Toluol extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurde das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 9.02 g (98%, 21.7 mmol) amorpher, farbloser Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = -34.0$  ( $c = 1.00$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), Lit.:<sup>[188]</sup>  $[\alpha]_D^{23} = -45.0$  ( $c = 1.00$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

$R_f = 0.59$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:1)

$\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_4$  (M = 416.51 g/mol) [416.20]

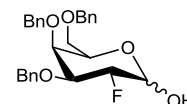
**ESI-MS** (positiv), m/z: 439.21  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 439.19.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 7.38-7.29 (m, 15H,  $\text{H}_{\text{aromatisch}}$  (Bn)), 6.38 (d, 1H,  $J_{\text{H1,H2}} = 6.4$  Hz, 1-H), 4.89 (d, 1H,  $J_{\text{Ha,Hb}} = 11.7$  Hz,  $\text{CH}_{2a}$  (Bn1)), 4.88-4.85 (m, 1H, 2-H), 4.69-4.57 (m, 3H,  $\text{CH}_{2b}$  (Bn1),  $\text{CH}_{2a,b}$  (Bn2)), 4.51 (d, 1H,  $J_{\text{Ha,Hb}} = 11.9$  Hz,  $\text{CH}_{2a}$  (Bn3)), 4.43 (d, 1H,  $J_{\text{Ha,Hb}} = 11.9$  Hz,  $\text{CH}_{2b}$  (Bn3)), 4.21-4.18 (m, 2H, 3-H, 5-H), 3.96-3.94 (m, 2H, 4-H), 3.79 (dd, 1H,  $J_{\text{H6a,H6b}} = 9.7$  Hz,  $J_{\text{H6a,H5}} = 7.5$  Hz, 6<sub>a</sub>-H), 3.65 (dd, 1H,  $J_{\text{H6b,H5}} = 5.1$  Hz,  $J_{\text{H6b,H6a}} = 10.1$  Hz, 6<sub>b</sub>-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 144.2 (C1), 138.4, 138.3, 137.9 ( $3 \times \text{C}_{\text{quartär}}$  (Bn)), 128.3, 128.3, 128.1, 127.9, 127.7, 127.5, 127.4 ( $\text{C}_{\text{aromatisch}}$  (Bn)), 100.0 (C2), 75.6, 73.4, 73.3, 71.2, 70.8, 70.7 ( $3 \times \text{CH}_2$  (Bn), C3, C4, C5), 68.4 (C6).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[188]</sup>

### 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (**18**)



#### Variante A:<sup>[189]</sup>

Eine Lösung von 1.80 g (4.32 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-benzylgalactal (**17**) und 2.30 g (6.48 mmol) Selectfluor<sup>®</sup> in 80 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Acetonitril und Wasser (1:1) wurde zwei Tage bei Raumtemp. gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 50 mL Wasser verdünnt und es wurde fünfmal mit je 100 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.09 g (56%, 2.41 mmol) blassgelbes Öl

#### Variante B (Mikrowellenreaktor):<sup>[41]</sup>

300 mg (0.72 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-benzylgalactal (**17**) und 385 mg (1.08 mmol) Selectfluor<sup>®</sup> wurden in 8 mL eines Acetonitril/Wasser-Gemisches (1:1) gelöst, bevor das Gemisch in einer Mikrowelle (Discover der Firma CEM, Matthews (USA)) 6 Minuten bei einer maximalen Leistung von 100 W und einer Reaktionstemperatur von 70 °C zur Reaktion gebracht wurde. Im Anschluss wurde mit 50 mL Wasser verdünnt und die Lösung wurde fünfmal mit je 50 mL Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und das Produkt wurde per Flashchromatographie an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 4:1) isoliert.

Ausbeute: 166 mg (51%, 0.37 mmol) blassgelbes Öl

$R_{f\alpha} = 0.66$ ;  $R_{f\beta} = 0.60$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

$C_{27}H_{29}FO_5$  (M = 452.51 g/mol) [452.20]

*ESI-MS* (positiv), m/z: 475.22 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 475.19.



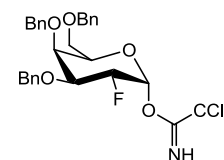
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 7.38-7.29 (m, 24H,  $\text{H}_{\text{aromatisch}}$  (Bn)), 5.44 (d, 1H,  $J_{\text{H1,H2}} = 3.8$  Hz,  $1_{\alpha}\text{-H}$ ), 4.95 (ddd, 1H,  $J_{\text{H2,H1}} = 3.8$  Hz,  $J_{\text{H2,H3}} = 9.8$  Hz,  $J_{\text{H2,F2}} = 50.3$  Hz,  $2_{\alpha}\text{-H}$ ).

Aufgrund des vorliegenden Anomerengemisches wurde eine genauere Zuordnung der Signale nicht durchgeführt.

$^{19}\text{F-NMR}$  (376.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\alpha\text{-Anomer}$ :  $\delta$  [ppm] = -207.3 (ddd,  $J_{\text{F2,H1}} = 4.2$  Hz,  $J_{\text{F2,H3}} = 10.0$  Hz,  $J_{\text{F2,H2}} = 50.3$  Hz, F2);  $\beta\text{-Anomer}$ :  $\delta$  [ppm] = -204.9 (m, F2).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[41]</sup>

### 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-trichloracetimidat (9)<sup>[41]</sup>



Eine Lösung von 1.10 g (2.43 mmol)  $\text{Bn}_3\text{2FGal-OH}$  (**18**) in 80 mL absol. Dichlormethan wurde mit fünf Tropfen 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en versetzt und 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  3:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.18 g (81%, 1.97 mmol) gelbliches, viskoses Öl

$R_f = 0.66$  ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

$\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{Cl}_3\text{FNO}_5$  (M = 596.90 g/mol) [595.11]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 618.43 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ , ber.: 618.10.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 8.64 (s, 1H, NH), 7.44-7.20 (m, 15H,  $\text{H}_{\text{aromatisch}}$  (Bn)), 6.56 (d, 1H,  $J_{\text{H1,H2}} = 3.6$  Hz, 1-H), 5.17 (ddd, 1H,  $J_{\text{H2,H1}} = 3.8$  Hz,  $J_{\text{H2,H3}} = 9.5$  Hz,  $J_{\text{H2,F2}} = 49.3$  Hz, 2-H), 4.97 (d, 1H,  $J_{\text{CH2,CH2}} = 11.2$  Hz,  $\text{CH}_{2a}$  (Bn1)), 4.81 (d, 1H,  $J_{\text{CH2,CH2}} = 11.9$  Hz,  $\text{CH}_{2a}$  (Bn2)), 4.73 (d, 1H,  $J_{\text{CH2,CH2}} = 11.9$  Hz,  $\text{CH}_{2b}$  (Bn2)), 4.60 (d, 1H,  $J_{\text{CH2,CH2}} = 11.2$  Hz,  $\text{CH}_{2b}$  (Bn1)), 4.48 (d, 1H,  $J_{\text{CH2,CH2}} = 11.6$  Hz,  $\text{CH}_{2a}$  (Bn3)), 4.41 (d, 1H,  $J_{\text{CH2,CH2}} = 11.6$  Hz,  $\text{CH}_{2b}$  (Bn3)), 4.51 (ddd, 1H,  $J_{\text{H6a,H5}} = 6.2$  Hz,  $J_{\text{H6a,H6b}} = 9.3$  Hz,  $J_{\text{H6a,F6}} = 35.0$  Hz,  $6_a\text{-H}$ ), 4.19-4.06 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 3.69-3.53 (m, 1H,  $6_b\text{-H}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 160.9 (TCI), 128.4, 128.3, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7 ( $\text{C}_{\text{aromatisch}}$ ), 94.1 (d,  $J_{\text{C1,F2}} = 23.3$  Hz, C1), 90.9 ( $\text{CCl}_3$ ), 88.6 (d,  $J_{\text{C2,F2}} =$

188.9 Hz, C2), 76.4 (d,  $J_{C3,F2} = 16.3$  Hz, C3), 75.2 (CH<sub>2</sub> (Bn)), 74.6 (d,  $J_{C4,F2} = 8.1$  Hz, C4), 73.4 (CH<sub>2</sub> (Bn)), 72.2 (C5), 67.6 (C6).

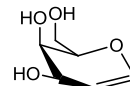
<sup>19</sup>F-NMR (376.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = -209.0 (ddd,  $J_{F2,H1} = 4.7$  Hz,  $J_{F2,H3} = 9.6$  Hz,  $J_{F2,H2} = 49.6$  Hz, F2).

**RP-HPLC** (PerfectSil C18(2), λ = 214 nm, H<sub>2</sub>O-MeCN, 25:75 → 10:90, 30 min → 0:100, 10 min): R<sub>t</sub> = 12.1 min.

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[41]</sup>

## Optimierungsversuche im Mikroreaktor

### D-Galactal (21)<sup>[101]</sup>



Der pH-Wert einer Lösung von 4.62 g (17.0 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**16**) in 40 mL Methanol (HPLC-grade) wurde mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (2% in Methanol) auf 10.5 eingestellt. Die Lösung wurde 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt, bevor unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisieren aus Essigester gereinigt.

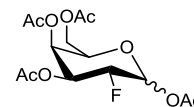
Ausbeute: 1.81 g (73%, 12.4 mmol) amorpher, farbloser Feststoff

C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (M = 146.14 g/mol) [146.06]

**FD-MS**, m/z: 146.46.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = 6.27 (dd, 1H,  $J_{H1,H3} = 1.9$  Hz,  $J_{H1,H2} = 6.4$  Hz, 1-H), 4.54 (ddd, 1H,  $J_{H2,H3} = 2.0$  Hz,  $J_{H2,H4} = 2.0$  Hz,  $J_{H2,H3} = 6.3$  Hz, 2-H), 4.27-4.23 (m, 1H, 3-H), 3.86-3.78 (m, 2H, 4-H, 5-H), 3.77-3.63 (m, 2H, 6<sub>a,b</sub>-H).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[101]</sup>

**1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (23)**Variante A:

Eine Lösung von 102 mg (0.70 mmol) des Galactals **21** und 380 mg (1.07 mmol) Selectfluor<sup>®</sup> in 10 mL Wasser wurde 40 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt, der Rückstand wurde in 10 mL Methanol aufgenommen und ausgefallener Feststoff wurde abgesaugt. Das Filtrat wurde erneut i. Vak. vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand wurde in 1.40 mL (17.3 mmol) Pyridin und 0.7 mL (7.41 mmol) Acetanhydrid gelöst und das Gemisch wurde 3 Tage bei Raumtemp. gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung auf 30 mL Eiswasser gegossen und dreimal mit je 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 160 mg (66%, 12.4 mmol) amorpher, farbloser Feststoff

Variante B (Mikrowellenreaktor):

Eine Lösung von 100 mg (0.70 mmol) des Galactals **21** und 375 mg (1.06 mmol) Selectfluor<sup>®</sup> in 8 mL Wasser wurde in einer Mikrowelle (Discover der Firma CEM, Matthews (USA)) 4 Minuten bei einer maximalen Leistung von 150 W und einer Reaktionstemperatur von 100 °C zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde das Gemisch i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand wurde fünfmal mit je 10 mL Toluol kodestilliert. Der Rückstand wurde mit 1.50 mL (18.6 mmol) Pyridin und 0.80 mL (8.46 mmol) Acetanhydrid versetzt und die Lösung wurde drei Tage bei Raumtemp. gerührt. Das Gemisch wurde auf 30 mL Eiswasser gegossen und dreimal mit je 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 130 mg (53%, 0.37 mmol) amorpher, farbloser Feststoff

Variante C (Flowreaktor mit Mikrowelleneinstrahlung):

Es wurden 100 mg (0.70 mmol) des Galactals **21** sowie 375 mg (1.06 mmol) Selectfluor<sup>®</sup> in je 5 mL Wasser gelöst und getrennt in Spritzen aufgezogen. Die Spritzen wurden in

einen Perfusor V der Firma *Braun*, Melsungen, eingespannt und mit einer Flussrate von 0.5 mL/min zu einem SIMM-V2 Mikromischer (*IMM*, Mainz) gefördert. Nach dem Mischvorgang wurde die Reaktionslösung durch eine Teflon-Kapillare (Durchmesser: 1/8 Zoll) durch die Durchflusszelle der Mikrowelle (*CEM Discover*) gepumpt (Kapillarvolumen: 2 mL). Bei einer Verweilzeit von vier Minuten im Mikrowellenbereich wurde das Gemisch mit einer Strahlungsleistung von 150 W bei einer Temperatur von 100 °C zur Reaktion gebracht. Nach Verlassen der Zelle passiert die Reaktionslösung ein Rückschlagventil bevor die Reaktion durch Einleiten in Eiswasser abgebrochen wurde. Nach beendeter Reaktion wurde das Wasser i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde noch dreimal mit je 20 mL Toluol kodestilliert. Der Rückstand wurde zur Acetylierung mit 1.50 mL (18.6 mmol) Pyridin und 0.8 mL (8.46 mmol) Acetanhydrid versetzt und das Gemisch wurde drei Tage bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde erneut auf 30 mL Eiswasser gegossen und dreimal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde per Flashchromatographie an Kieselgel (cHex/EtOAc 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 96.0 mg (39%, 0.27 mmol) amorpher, farbloser Feststoff

$R_f = 0.67$  (cHex/EtOAc, 1:1)

$C_{14}H_{19}FO_9$  (M = 350.29 g/mol) [350.10]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 373.10 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 373.09.

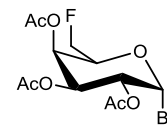
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = 6.45 (d, 1H,  $J_{H1\alpha, H2\alpha} = 4.0$  Hz, 1 $\alpha$ -H), 5.78 (dd, 1H,  $J_{H1\beta, H3\beta} = 4.1$  Hz,  $J_{H1\beta, H2\beta} = 8.0$  Hz, 1 $\beta$ -H), 5.51 (dt, 1H,  $J_{H4\alpha, H5\alpha} = 1.4$  Hz,  $J_{H4\alpha, H3\alpha} = 3.3$  Hz, 4 $\alpha$ -H), 5.46-5.35 (m, 2H, 4 $\beta$ -H, 3 $\alpha$ -H), 5.17 (ddd, 1H,  $J_{H3\beta, H4\beta} = 3.6$  Hz,  $J_{H3\beta, H2\beta} = 9.8$  Hz,  $J_{H3\beta, F2\beta} = 13.1$  Hz, 3 $\beta$ -H), 4.89 (ddd, 1H,  $J_{H2\alpha, H3\alpha} = 3.9$  Hz,  $J_{H2\alpha, H1\alpha} = 10.2$  Hz,  $J_{H2\alpha, F2\alpha} = 49.2$  Hz, 2 $\alpha$ -H), 4.64 (ddd, 1H,  $J_{H2\beta, H3\beta} = 8.1$  Hz,  $J_{H2\beta, H1\beta} = 9.8$  Hz,  $J_{H2\beta, F2\beta} = 51.5$  Hz, 2 $\beta$ -H), 4.34-4.26 (m, 1H, 5 $\alpha$ -H), 4.15-4.03 (m, 5H, 5 $\beta$ -H, 6 $_{a,b}\alpha$ -H, 6 $_{a,b}\beta$ -H), 2.18, 2.06, 2.03 (3 × s, 9H, 3 × CH<sub>3</sub> (Ac- $\beta$ )), 2.14 (s, 4.5H, CH<sub>3</sub> (Ac- $\beta$ ), CH<sub>3</sub> (Ac- $\alpha$ )), 2.18, 2.05, 2.03 (3 × s, 4.5H, 3 × CH<sub>3</sub> (Ac- $\alpha$ )).

Anhand der Integrale des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums konnte das Anomerenverhältnis auf  $\alpha/\beta$  1:2 abgeschätzt werden.

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[190]</sup>

## Synthese des benzylierten 2,6-Difluor-Galactosyldonors

### 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- $\alpha$ -D-galactosylbromid (**24**)<sup>[41,191]</sup>



Es wurden 10.40 g (29.7 mmol) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (**13**) in 130 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zur dieser Lösung wurde ein Gemisch aus 25 mL Bromwasserstoff in Eisessig (33%ig) und 45 mL Dichlormethan binnen 45 Minuten zugetropft. Die Kühlung wurde entfernt und die Reaktionslösung wurde 2.5 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Es wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt, bevor zur Hydrolyse auf Eiswasser gegossen und mit festem Natriumhydrogencarbonat vorsichtig neutralisiert wurde. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 50 mL Dichlormethan ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, sowie einmal mit 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung neutral gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.80 g (42%, 12.4 mmol) amorpher, farbloser Feststoff

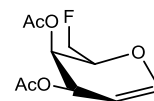
$[\alpha]_D^{23} = +208.2$  (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>), Lit.:<sup>[41]</sup>  $[\alpha]_D^{23} = +214.0$  (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>)

$R_f = 0.78$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:1)

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>BrFO<sub>7</sub> (M = 371.15 g/mol) [370.01]

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 6.71 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 4.0$  Hz, 1-H), 5.57 (d, 1H,  $J_{H4,H3} = 3.3$  Hz, 4-H), 5.41 (dd, 1H,  $J_{H3,H4} = 3.3$  Hz,  $J_{H3,H2} = 10.6$  Hz, 3-H), 5.07 (dd, 1H,  $J_{H2,H1} = 4.0$  Hz,  $J_{H2,H3} = 10.6$  Hz, 2-H), 4.59-4.47 (m, 2H, 5-H {4.54, t,  $J_{H5,H6} = 2.6$  Hz}, 6<sub>a/b</sub>-H), 4.45-4.33 (m, 1H, 6<sub>a/b</sub>-H), 2.15, 2.11, 2.01 (3 × s, 9H, 3 × CH<sub>3</sub> (Ac)).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[41]</sup>

**3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (25)**<sup>[41]</sup>

Es wurden 8.10 g (0.13 mol) Zinkpulver mit verd. Salzsäure (1 M) aktiviert und sukzessive je dreimal mit Wasser, Ethanol und Essigester gewaschen. Das aktivierte Zinkpulver wurde in 35 mL Essigester suspendiert, mit 1.05 mL (13.1 mmol) *N*-Methylimidazol versetzt und das Gemisch wurde zum Sieden erhitzt. Das Bromid (**24**), gelöst in 40 mL Essigester, wurde zur Zink-Suspension getropft. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch eine weitere Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde durch *Hyflo*<sup>®</sup> filtriert. Das Filtrat wurde zweimal mit 40 mL verd. Salzsäure (1 M) sowie zweimal mit 40 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.60 g (90%, 11.2 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

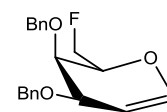
$R_f = 0.48$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

$C_{10}H_{13}FO_5$  (M = 232.21 g/mol) [232.07]

<sup>1</sup>**H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 6.48 (dd, 1H,  $J_{H1,H3} = 1.6$  Hz,  $J_{H1,H2} = 6.3$  Hz, 1-H), 5.56-5.51 (m, 1H, 3-H), 5.47-5.43 (m, 1H, 4-H), 4.75 (ddd, 1H,  $J_{H2,H4} = 1.3$  Hz,  $J_{H2,H3} = 3.0$  Hz,  $J_{H2,H1} = 6.2$  Hz, 2-H), 4.62 (ddd, 1H,  $J_{H6a,H5} = 7.3$  Hz,  $J_{H6a,H6b} = 10.0$  Hz,  $J_{H6a,F6} = 47.7$  Hz, 6<sub>a</sub>-H), 4.51 (ddd, 1H,  $J_{H6b,H5} = 4.1$  Hz,  $J_{H6b,H6a} = 10.0$  Hz,  $J_{H6a,F6} = 46.1$  Hz, 6<sub>a</sub>-H), 4.44-4.33 (m, 1H, 5-H), 2.11, 2.02 (2 × s, 6H, 2 × CH<sub>3</sub> (Ac)).

<sup>13</sup>**C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 170.2, 170.0 (2 × C=O (Ac)), 145.5 (C1), 98.8 (C2), 81.0 (d,  $J_{C6,F6} = 170.7$  Hz, C6), 73.5 (d,  $J_{C5,F6} = 22.1$  Hz, C5), 63.8 (d,  $J_{C4,F6} = 6.8$  Hz, C4), 63.7 (C3), 20.7, 20.6 (2 × CH<sub>3</sub> (Ac)).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[41]</sup>

**3,4-Di-*O*-benzyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (26)**<sup>[43]</sup>

Zur Deacetylierung wurde eine Lösung aus 2.54 g (10.9 mmol) 3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (**25**) in 50 mL Methanol mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (1% in Methanol) auf einen pH-Wert von 10-10.5 eingestellt und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Methanol i. Vak. abdestilliert und es wurde mit 40 mL Toluol kodestilliert, bevor zur darauffolgenden Benzylierung das Rohprodukt in 40 mL DMF gelöst wurde. Unter Eiskühlung wurden portionsweise 1.31 g (32.8 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60%ig in Mineralöl) zugegeben und das Gemisch wurde 15 Minuten gerührt. Im Anschluss wurden bei andauernder Kühlung langsam 2.86 mL (24.1 mmol) Benzylbromid zugetropft und das Gemisch wurde nach beendeter Zugabe noch 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde mit 60 mL Toluol und 30 mL Wasser verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase wurde noch zweimal mit je 30 mL Toluol extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurde das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel (Toluol) gereinigt.

Ausbeute: 3.26 g (89%, 9.74 mmol) leicht gelber, amorpher Feststoff

$R_f = 0.25$  (Toluol)

$C_{20}H_{21}FO_3$  (M = 328.38 g/mol) [328.15]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 351.1 [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>, ber.: 351.14.

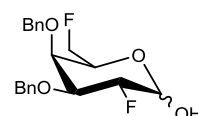
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 7.39-7.28 (m, 10H,  $H_{\text{aromatisch}}$  (Bn)), 6.36 (dd, 1H,  $J_{H1,H3} = 0.8$  Hz,  $J_{H1,H2} = 6.2$  Hz, 1-H), 4.95-4.76 (m, 3H, 2-H {4.93, dd,  $J_{H2,H3} = 4.2$  Hz,  $J_{H2,H1} = 6.2$  Hz}), 6<sub>a</sub>-H {ddd,  $J_{H6a,H5} = 8.0$  Hz,  $J_{H6a,H6b} = 10.5$  Hz,  $J_{H6a,F6} = 49.8$  Hz}, CH<sub>2a</sub> (Bn1) {4.81, d,  $J_{CH2,CH2} = 11.9$  Hz}), 4.72-4.56 (m, 4H, CH<sub>2a</sub> (Bn2) {4.70, d,  $J_{CH2,CH2} = 12.0$  Hz}), 6<sub>b</sub>-H {4.64, ddd,  $J_{H6b,H5} = 3.0$  Hz,  $J_{H6b,H6a} = 10.5$  Hz,  $J_{H6b,F6} = 46.2$  Hz}, CH<sub>2b</sub> (Bn1) {4.64, d,  $J_{CH2,CH2} = 11.9$  Hz}, CH<sub>2b</sub> (Bn2) {4.64, d,  $J_{CH2,CH2} = 12.0$  Hz}), 4.46-4.37 (m, 1H, 5-H), 4.12-4.08 (m, 1H, 3-H), 3.96 (td, 1H,  $J_{H4,H5} = 2.0$  Hz,  $J_{H4,H3} = 3.9$  Hz, 4-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75.5 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 143.9 (C1), 138.3, 137.8 ( $2 \times C_{\text{quartär}}$  (Bn)), 128.5, 128.4, 127.9, 127.9, 127.6, 127.5 ( $8 \times C_{\text{aromatisch}}$  (Bn)), 99.5 (C2), 81.5 (d,  $J_{C6,F6} =$

165.5 Hz, C6), 74.9 (d,  $J_{C5,F6} = 20.8$  Hz, C5), 72.4 (d,  $J_{C4,F6} = 7.6$  Hz, C4), 72.3 (CH<sub>2</sub> (Bn1)), 71.1 (CH<sub>2</sub> (Bn2)), 68.1 (C3).

<sup>19</sup>F-NMR (376.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = -225.7 (bs, F6).

### 3,4-Di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-bisfluor- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (**27**)<sup>[43]</sup>



Eine Lösung von 1.00 g (3.05 mmol) 3,4-Di-*O*-benzyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (**26**) in 75 mL eines Nitromethan/Wasser-Gemisches (4:1) wurde mit 1.85 g (5.22 mmol) Selectfluor<sup>®</sup> versetzt und 18 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde drei Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend mit 100 mL Wasser verdünnt. Die Reaktionslösung wurde mit verd. Salzsäure (1 M) angesäuert, dreimal mit je 250 mL Essigester ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen wurden mit 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutral gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.08 g (97%, 2.96 mmol) leicht gelbes Öl

$R_{f\alpha} = 0.55$ ;  $R_{f\beta} = 0.43$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 2:1)

C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>F<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = 364.38 g/mol) [364.15]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 387.09 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 387.14; 403.10 [M+K]<sup>+</sup>, ber.: 403.11.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 387.1400 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 387.1384.

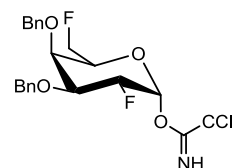
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Aufgrund des vorliegenden Anomerengemisches wurde keine genaue Zuordnung der Signale durchgeführt.

<sup>19</sup>F-NMR (376.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  **$\alpha$ -Anomer**:  $\delta$  [ppm] = -204.9 – -205.1 (m, F2), -230.0 (td,  $J_{F6,H5} = 10.7$  Hz,  $J_{F6,H6a/b} = 46.6$  Hz, F6);  **$\beta$ -Anomer**:  $\delta$  [ppm] = -207.4 (ddd,  $J_{F2,H3} = 4.0$  Hz,  $J_{F2,H1} = 10.5$  Hz,  $J_{F2,H2} = 50.1$  Hz, F2), -230.0 (td,  $J_{F6,H5} = 12.5$  Hz,  $J_{F6,H6a/b} = 47.1$  Hz, F6).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[43]</sup>



**3,4-Di-*O*-benzyl-2,6-didesoxy-2,6-bisfluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyltrichloracetimidat**  
(8)<sup>[43]</sup>



Eine Lösung von 340 mg (0.93 mmol) 3,4-Di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-bisfluor- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (**27**) in 20 mL absol. Dichlormethan wurde auf 0 °C gekühlt und mit 0.4 mL (3.99 mmol) Trichloracetonitril, sowie mit fünf Tropfen 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemp. erwärmt und 18 Stunden gerührt, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert wurde. Das Produkt wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 4:1) isoliert.

Ausbeute: 420 mg (89%, 0.83 mmol) blassgelbes Öl

$$[\alpha]_D^{23} = +73.3 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}$$

$$R_{fa} = 0.90 \text{ (}^c\text{Hex/EtOAc 2:1)}$$

$$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{Cl}_3\text{F}_2\text{NO}_4 \quad (\text{M} = 508.77 \text{ g/mol}) \quad [507.06]$$

**ESI-MS** (positiv), m/z: 530.0 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 530.1.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 530.0490 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 530.0480.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 8.68 (s, 1H, NH), 7.47-7.26 (m, 10H, H<sub>aromatisch</sub> (Bn)), 6.59 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 3.6$  Hz, 1-H), 5.18 (ddd, 1H,  $J_{H2,H1} = 3.8$  Hz,  $J_{H2,H3} = 9.9$  Hz,  $J_{H2,F2} = 49.2$  Hz, 2-H), 5.00 (d, 1H,  $J_{CH2,CH2} = 11.3$  Hz, CH<sub>2a</sub> (Bn1)), 4.87 (d, 1H,  $J_{CH2,CH2} = 11.9$  Hz, CH<sub>2a</sub> (Bn2)), 4.75 (d, 1H,  $J_{CH2,CH2} = 11.9$  Hz, CH<sub>2b</sub> (Bn2)), 4.64 (d, 1H,  $J_{CH2,CH2} = 11.3$  Hz, CH<sub>2b</sub> (Bn1)), 4.51 (ddd, 1H,  $J_{H6a,H5} = 6.2$  Hz,  $J_{H6a,H6b} = 9.3$  Hz,  $J_{H6a,F6} = 35.0$  Hz, 6<sub>a</sub>-H), 4.36 (ddd, 1H,  $J_{H6a,H5} = 6.2$  Hz,  $J_{H6a,H6b} = 9.3$  Hz,  $J_{H6a,F6} = 33.0$  Hz, 6<sub>b</sub>-H), 4.25-4.18 (m, 1H, 3-H), 4.13 (dt, 1H,  $J_{H5,H4} = 2.9$  Hz,  $J_{H5,H6a,b} = 9.9$  Hz, 5-H), 4.05-4.00 (m, 1H, 4-H).

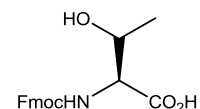
**<sup>13</sup>C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 160.7 (TCI), 137.7, 137.7 (2  $\times$  C<sub>quartär</sub> (Bn)), 128.5, 128.4, 128.3, 128.3, 128.0, 128.0, 127.9, 127.7 (8  $\times$  C<sub>aromatisch</sub> (Bn)), 93.9 (d,  $J_{C1,F2} = 23.9$  Hz, C1), 90.9 (CCl<sub>3</sub>), 88.2 (d,  $J_{C2,F2} = 189.6$  Hz, C2), 81.1 (d,  $J_{C6,F6} = 168.3$  Hz, C6), 75.9 (d,  $J_{C5,F6} = 16.3$  Hz, C5), 75.1 (CH<sub>2</sub> (Bn)), 74.4 (dd,  $J_{C4,F6} = 4.5$  Hz,  $J_{C4,F2} = 8.6$  Hz, C4), 73.2 (CH<sub>2</sub> (Bn)), 71.6 (dd,  $J_{C3,F6} = 1.0$  Hz,  $J_{C3,F2} = 24.9$  Hz, C3).

**<sup>19</sup>F-NMR** (376.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = -209.3 (ddd,  $J_{F2,H3} = 4.2$  Hz,  $J_{F2,H1} = 9.9$  Hz,  $J_{F2,H2} = 49.2$  Hz, F2), -230.8 (td,  $J_{F6,H5} = 10.8$  Hz,  $J_{F6,H6a/b} = 46.5$  Hz, F6).

### 5.3 Synthesen der *N*-Acetylgalactosamin-Threonin-Konjugate

#### Synthese des Benzyliden-blockierten T<sub>N</sub>-Bausteins

##### *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-threonin (31)<sup>[104,106]</sup>



Es wurden 15.0 g (0.13 mol) L-Threonin und 10.7 g (0.13 mol) Natriumhydrogencarbonat in 680 mL eines Aceton/Wasser-Gemisches (1:1) gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Rühren portionsweise 42.6 g (0.13 mol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 23 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit konz. Salzsäure ein pH-Wert von 2 eingestellt, das Aceton wurde i. Vak. abdestilliert und die wässrige Phase wurde dreimal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 200 mL verd. Salzsäure (1 M) sowie zweimal mit je 250 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit Toluol und abschließend dreimal mit Dichlormethan kodestilliert.

Ausbeute: 39.7 g (92%, 0.12 mol) farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = -5.0 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}$$

$$R_f = 0.74 \text{ (}^c\text{Hex/EtOAc, 1:1)}$$

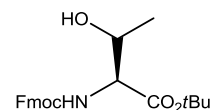
$$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_5 \quad (\text{M} = 341.36 \text{ g/mol}) \quad [341.13]$$

**ESI-MS** (positiv), m/z: 364.14 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 364.12; 705.30 [2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 705.25.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = 7.72 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = J_{\text{H}_5, \text{H}_6} = 7.2$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60-7.54 (m, 2H, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.35 (t, 2H,  $J_{\text{H}_3, \text{H}_2/\text{H}_4} = J_{\text{H}_6, \text{H}_5/\text{H}_7} = 7.5$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.28-7.23 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.10 (d, 1H,  $J_{\text{NH}, \text{T}\alpha} = 9.0$  Hz, NH), 4.47-4.30 (m, 4H, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.16 (t, 1H,  $J_{\text{CH}, \text{CH}_2} = 6.9$  Hz, CH-Fmoc), 1.23 (d, 3H,  $J_{\text{T}\gamma, \text{T}\beta} = 6.3$  Hz, T<sup>γ</sup>), 1.06 (bs, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 174.5 (COOH), 157.2 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.5 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 67.9 ( $\text{CH}_2$ -Fmoc), 67.4 ( $\text{T}^\beta$ ), 59.0 ( $\text{T}^\alpha$ ), 47.0 (CH-Fmoc), 19.3 ( $\text{T}^\gamma$ ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (6)**<sup>[104,106]</sup>



Es wurden 45.0 g (0.22 mol) *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid, 21.6 g (0.29 mol) *tert*-Butanol und 0.80 g (7.01 mmol) wasserfreies Kupfer(I)-chlorid sechs Tage lang unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt. Das Gemisch wurde daraufhin mit 90 mL absol. Dichlormethan verdünnt und auf 0 °C gekühlt, bevor 25.0 g (73.2 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*L*-threonin (**31**), gelöst in 60 mL absol. Dichlormethan, innerhalb von 40 Minuten zugetropft wurden. Das Gemisch wurde weitere 30 Minuten im Wasserbad gerührt, bevor durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt wurde. Anschließend wurde mit kaltem Dichlormethan nachgewaschen und das Filtrat zügig dreimal mit je 200 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie zweimal mit je 200 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 150 mL Dichlormethan extrahiert, bevor die vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat getrocknet, i. Vak. deutlich eingengt und abgekühlt wurden. Ausgefallener *N,N*-Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt und das Filtrat wurde i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in wenig Essigester gelöst, wieder gekühlt und erneut ausgefallener Harnstoff abgesaugt. Der restliche Essigester wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 4:1 → 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 15.1 g (52%, 38.0 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = -8.2 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{), Lit.:}^{[109]} [\alpha]_D^{23} = -9.0 \text{ (c = 1.15, CHCl}_3\text{)}$$

$$R_f = 0.70 \text{ (}^c\text{Hex/EtOAc, 2:1)}$$

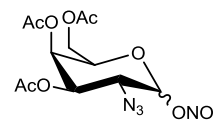
$$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_5 \quad (\text{M} = 397.46 \text{ g/mol}) \quad [397.19]$$

**ESI-MS** (positiv), m/z: 420.32 [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>, ber.: 420.18.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 7.77 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63-7.57 (m, 2H, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_2/\text{H}_4} = J_{\text{H}_6,\text{H}_5/\text{H}_7} = 6.6$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.34-7.29 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.64 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 8.4$  Hz, NH), 4.41 (d, 2H,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 4.37-4.34 (m, 2H,  $\text{T}^\alpha$ ,  $\text{T}^\beta$ ), 4.24 (t, 1H,  $J_{\text{CH},\text{CH}_2} = 7.5$  Hz, CH-Fmoc), 1.94 (bs, 1H, OH), 1.49 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  (*t*Bu)), 1.25 (d, 3H,  $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 5.7$  Hz,  $\text{T}^\gamma$ ).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[192]</sup>

### 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranosylnitrat (32)<sup>[107]</sup>



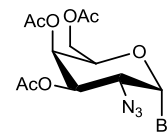
Es wurden 400 mL absol. Acetonitril auf  $-30$  °C gekühlt und mit 184.3 g (0.34 mol) Cerammoniumnitrat sowie mit 12.1 g (0.19 mol) Natriumazid versetzt (beide Salze wurden vorher mehrere Stunden im Hochvakuum getrocknet). Zu der gekühlten Suspension wurden binnen 45 Minuten 31.1 g (0.11 mol) 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**16**) getropft und nach beendeter Zugabe wurde 15 h bei  $-18$  °C in der Tiefkühltruhe gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 400 mL kaltem Diethylether verdünnt und auf 400 mL Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 300 mL Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Rohausbeute: 24.3 g (59%, 64.6 mol) blassgelber, amorpher Feststoff

$R_f = 0.33$  ( $^c$ Hex/EtOAc, 4:1)

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

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[107]</sup>

**3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactosylbromid (5)**<sup>[193,194]</sup>

Es wurden unter kräftigem Rühren 18.7 g (0.22 mol) Lithiumbromid (zuvor mehrere Stunden i. Vak. getrocknet) in 220 mL absol. Acetonitril suspendiert und 15.7 g (41.7 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranosylnitrat (**32**), gelöst in 120 mL absol. Acetonitril, wurden langsam zu dieser Suspension getropft. Das Gemisch wurde 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde mit 400 mL Dichlormethan verdünnt, zweimal mit je 300 mL ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt und die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und das Produkt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 3:1) isoliert.

Ausbeute: 10.7 g (65%, 27.1 mmol) farbloser, kristalliner Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = 162.9 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}, \text{ Lit.:}^{[107]} [\alpha]_D^{23} = 188.6 \text{ (c = 1.95, CHCl}_3\text{)}$$

$$R_f = 0.77 \text{ (}^c\text{Hex/EtOAc, 1:1)}$$

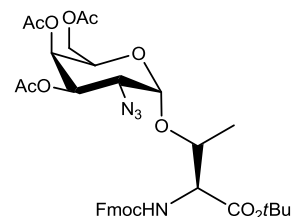
$$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{O}_7 \quad (\text{M} = 394.18 \text{ g/mol}) \quad [393.02]$$

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 6.47 (d, 1H,  $J_{\text{H1,H2}} = 3.9$  Hz, 1-H), 5.50-5.49 (m, 1H, 4-H), 5.33 (dd, 1H,  $J_{\text{H3,H4}} = 3.6$  Hz,  $J_{\text{H3,H2}} = 10.8$  Hz, 3-H), 4.50-4.45 (m, 1H, 5-H), 4.20-4.06 (m, 2H, 6<sub>a,b</sub>-H), 3.98 (dd, 1H,  $J_{\text{H2,H1}} = 3.8$  Hz,  $J_{\text{H2,H3}} = 10.7$  Hz, 2-H), 2.15, 2.06, 2.05 (3  $\times$  s, 9H, 3  $\times$  CH<sub>3</sub> (Ac)).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 170.3, 169.7, 169.4 (3  $\times$  C=O (Ac)), 88.8 (C1), 71.4 (C5), 69.8 (C3), 66.5 (C4), 60.7 (C6), 58.6 (C2), 20.6, 20.5, 20.5 (3  $\times$  CH<sub>3</sub> (Ac)).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[193]</sup>

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (33)<sup>[109,110]</sup>**



Eine Lösung aus 6.93 g (17.4 mmol) Fmoc-Thr-*O*tBu (**6**) in 60 mL eines 1:1-Gemisches aus absol. Dichlormethan und absol. Toluol wurde eine Stunde lang mit 20.0 g gepulvertem, frisch aktiviertem Molsieb (4Å) bei Raumtemperatur und unter Argonatmosphäre gerührt. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und unter Lichtausschluss wurden 5.00 g (18.1 mmol) festes Silbercarbonat, sowie 0.79 g (3.51 mmol) Silberperchlorat, gelöst in 5 mL absol. Toluol, zugegeben. Es wurde weitere 30 Minuten bei 0 °C gerührt, bevor in die gekühlte Reaktionsmischung innerhalb von 90 Minuten eine Lösung aus 6.46 g (16.4 mmol)  $\alpha$ -Ac<sub>3</sub>N<sub>3</sub>Gal-Br (**5**) in einem Gemisch aus 25 mL absol. Dichlormethan und 25 mL absol. Toluol getropft wurde. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 24 Stunden gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt. Das Filtrat wurde zweimal mit je 150 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie zweimal mit je 150 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc, 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 7.33 g (63%, 10.3 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = 66.2 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{), Lit.:}^{[109]} [\alpha]_D^{23} = 69.3 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}$$

$$R_f = 0.69 \text{ (CH}_2\text{Cl}_2\text{/EtOAc, 10:1)}$$

$$\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{12} \quad (\text{M} = 710.73 \text{ g/mol}) \quad [710.28]$$

**ESI-MS** (positiv), m/z: 733.25 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 733.27; 1443.55 [2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1443.55.

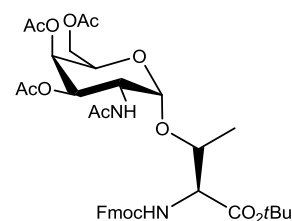
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 7.77 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.64 (d, 2H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_7,\text{H}_8} = 7.4$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_2/\text{H}_4} = J_{\text{H}_6,\text{H}_5/\text{H}_7} = 7.44$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.35-7.28 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.66 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.3$  Hz, NH-Fmoc), 5.47 (d, 1H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 2.7$  Hz, 4-H), 5.35 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.0$  Hz,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 11.2$  Hz, 3-H), 5.11 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.7$  Hz, 1-H), 4.46-4.44 (m, 1H, T <sup>$\beta$</sup> ),

4.40-4.36 (m, 2H,  $6_{a,b}$ -H), 4.32-4.25 (m, 3H,  $T^{\alpha}$ , 5-H, CH-Fmoc), 4.10 (d, 1H,  $J_{CH_2,CH} = 6.3$  Hz,  $CH_2$ -Fmoc), 3.64 (dd, 1H,  $J_{H_2,H_1} = 3.4$  Hz,  $J_{H_2,H_3} = 11.0$  Hz, 2-H), 2.15, 2.08, 2.05 ( $3 \times s$ , 9H,  $3 \times CH_3$  (Ac)), 1.51 (s, 9H,  $CH_3$  (*t*Bu)), 1.36 (d, 3H,  $J_{T^{\gamma},T^{\beta}} = 6.5$  Hz,  $T^{\gamma}$ ).

$^{13}C$ -NMR (75.5 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 170.3, 170.0, 169.8, 169.2 ( $4 \times C=O$  ( $3 \times$  Ac, *t*Bu-Ester)), 156.8 (C=O (Urethan)), 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.3, 125.2 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 99.2 (C1), 82.9 ( $C_{\text{quartär}}$  (*t*Bu)), 76.3 ( $T^{\beta}$ ), 68.0 (C3), 67.5 (C4,  $CH_2$ -Fmoc), 67.0 (C5), 61.7 (C6), 59.2 ( $T^{\alpha}$ ), 57.7 (C2), 47.1 (CH-Fmoc), 27.9 ( $CH_3$  (*t*Bu)), 20.6, 20.6, 20.6 ( $3 \times CH_3$  (Ac)), 18.9 ( $T^{\gamma}$ ).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[195,196]</sup>

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (34)<sup>[196]</sup>**



Es wurden 18.3 g (0.28 mol) Zinkpulver durch mehrfaches AufschlÄmmen mit einer verdünnten Kupfer(II)-sulfat-Lösung (9.00 g (36.0 mmol) Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat in 300 mL Wasser) aktiviert, mit Wasser gewaschen und anschließend mit Diethylether getrocknet. Das aktivierte Zink wurde zu einer Lösung von 7.88 g (11.1 mmol) des Azids **33** in 630 mL eines Tetrahydrofuran/Acetanhydrid/Essigsäure-Gemisches (3:2:1) gegeben und es wurde vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Suspension durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt, das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand wurde viermal mit je 50 mL Toluol kdestilliert. Die Reinigung des erhaltenen Rohproduktes wurde per Flashchromatographie an Kieselgel ( $^{\circ}Hex/EtOAc$  1:2) durchgeführt.

Ausbeute: 6.59 g (82%, 9.07 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = 64.7$  ( $c = 1.00$ ,  $CHCl_3$ ), Lit.:<sup>[109]</sup>  $[\alpha]_D^{23} = 61.3$  ( $c = 1.00$ ,  $CHCl_3$ )

$R_f = 0.47$  ( $^{\circ}Hex/EtOAc$ , 1:2)

$C_{37}H_{46}N_2O_{13}$  (M = 726.77 g/mol) [726.30]

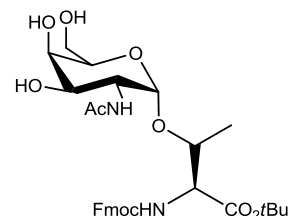
**ESI-MS** (positiv), m/z: 749.31 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 749.29; 1475.65 [2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1475.59.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = 7.75 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.3$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.62 (d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.1$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.39 (t, 2H,  $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.33-7.31 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.99 (d, 1H,  $J_{NH,T\alpha} = 9.9$  Hz, NH-Fmoc), 5.55 (d, 1H,  $J_{NH,H2} = 8.9$  Hz, NH (NHAc)), 5.38 (d, 1H,  $J_{H4,H3} = 2.4$  Hz, 4-H), 5.07 (dd, 1H,  $J_{H3,H4} = 2.4$  Hz,  $J_{H3,H2} = 10.8$  Hz, 3-H), 4.86 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 2.7$  Hz, 1-H), 4.62-4.57 (m, 1H, 2-H), 4.46-4.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.27-4.04 (m, 6H, CH-Fmoc, 5-H, 6<sub>a,b</sub>-H, T<sup>α</sup>, T<sup>β</sup>), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Ac)), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (AcNH)), 1.98 (2 × s, 6H, 2 × CH<sub>3</sub> (Ac)), 1.44 (s, 9H, CH<sub>3</sub> (tBu)), 1.30 (d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.0$  Hz, T<sup>γ</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = 170.9 (C=O (AcNH)), 170.4, 170.3, 170.3 (3 × C=O (Ac)), 169.9 (C=O (tBu-Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7, 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 99.9 (C1), 83.2 (C<sub>quartär</sub> (tBu)), 77.2 (T<sup>β</sup>), 68.6 (C3), 67.4 (C4, C5), 67.3 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 62.0 (C6), 58.9 (T<sup>α</sup>), 47.2, 47.1 (C2, CH-Fmoc), 28.0 (CH<sub>3</sub> (tBu)), 23.2 (AcNH), 20.7, 20.6 (3 × CH<sub>3</sub> (Ac)), 18.5 (T<sup>γ</sup>).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[196]</sup>

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (10)<sup>[197]</sup>**



Der pH-Wert einer Lösung von 4.99 g (6.86 mmol) acetyliertem T<sub>N</sub> **34** in 100 mL absol. Methanol wurde mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (1% in Methanol) vorsichtig auf 8.5 eingestellt. Die Reaktion wurde 14 Stunden bei Raumtemp. gerührt, wobei der pH-Wert regelmäßig kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert wurde. Anschließend wurde das Gemisch mit dem sauren Ionentauscher *Amberlite*<sup>®</sup> *IR 120* neutralisiert. Der Ionentauscher wurde abfiltriert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH



10:1 → 5:1) gereinigt und es wurden 2.80 g (4.66 mmol) des Produktes isoliert. Durch Spülen der Chromatographiesäule mit Methanol und anschließendem Entfernen des Lösungsmittels konnten weitere 800 mg (2.11 mmol) des freien Amins isoliert werden. Dieses wurde in 50 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 930 mg (2.74 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit DIPEA auf 9.5 eingestellt und das Gemisch wurde 18 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Es wurde erneut mit *Amberlite*<sup>®</sup> *IR 120* neutralisiert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Mittels flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10:1) konnten weitere 977 mg (1.63 mmol) des Produktes erhalten werden.

Gesamtausbeute: 3.78 g (92%, 6.29 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = 32.1 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{), Lit.:}^{[192]} [\alpha]_D^{22} = 40.2 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}$$

$$R_f = 0.49 \text{ (CH}_2\text{Cl}_2\text{/EtOH, 5:0.4)}$$

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

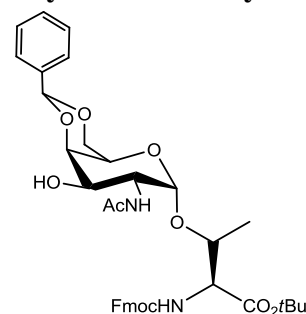
**ESI-MS** (positiv), m/z: 623.26 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 623.26; 1223.54 [2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1223.53.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = 7.75 (d, 2H, *J*<sub>H4,H3</sub> = *J*<sub>H5,H6</sub> = 7.1 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60 (d, 2H, *J*<sub>H1,H2</sub> = *J*<sub>H7,H8</sub> = 6.9 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.39 (t, 2H, *J*<sub>H3,H2/H4</sub> = *J*<sub>H6,H5/H7</sub> = 7.0 Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.34-7.27 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.92 (d, 1H, *J*<sub>NH,H2</sub> = 8.1 Hz, NH (NHAc)), 5.91 (d, 1H, *J*<sub>NH,Tα</sub> = 9.3 Hz, NH-Fmoc), 4.86 (d, 1H, *J*<sub>H1,H2</sub> = 2.6 Hz, 1-H), 4.51-4.29 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH-Fmoc, 2-H), 4.28-4.20 (m, 1H, T<sup>α</sup>), 4.19-4.03 (m, 2H, 4-H, T<sup>β</sup>), 3.96-3.77 (m, 4H, 3-H, 5-H, 6<sub>a,b</sub>-H), 3.45 (bs, 3H, 3 × OH), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (AcNH)), 1.43 (s, 9H, CH<sub>3</sub> (*t*Bu)), 1.28 (d, 3H, *J*<sub>Tγ,Tβ</sub> = 5.9 Hz, T<sup>γ</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = 173.6, 170.8 (2 × C=O (AcNH, *t*Bu-Ester), 156.6 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 99.6 (C1), 83.1 (C<sub>quartär</sub> (*t*Bu)), 76.4 (T<sup>β</sup>), 70.5, 70.1 (C3, C5), 69.4 (C4), 67.1 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 62.2 (C6), 59.0 (T<sup>α</sup>), 50.6 (C2), 47.1 (CH-Fmoc), 28.0 (CH<sub>3</sub> (*t*Bu)), 22.9 (CH<sub>3</sub> (Ac)), 18.9 (T<sup>γ</sup>).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[197]</sup>

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- $\alpha$ -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (28)<sup>[197]</sup>**



Es wurden 976 mg (1.42 mmol) Fmoc-Thr-( $\alpha$ GalNAc)-*O**t*Bu (**10**) in 40 mL absol. Acetonitril gelöst, mit 0.6 mL (3.98 mmol) Benzaldehyddimethylacetal versetzt und der pH-Wert der Lösung wurde mit einer Spatelspitze *para*-Toluolsulfonsäure auf einen Wert von 4 eingestellt. Die Lösung wurde drei Stunden bei 40 °C und weitere zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit wenigen Tropfen Triethylamin neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde per Flashchromatographie an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 0.94 g (96%, 1.37 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = 62.5 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}, \text{ Lit.:}^{[197]} [\alpha]_D^{23} = 64.4 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}$$

R<sub>f</sub> = 0.50 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:2)

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

**ESI-MS** (positiv), m/z: 711.32 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 711.29; 1399.64 [2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1399.59.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 7.78 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 6.8$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.55-7.48 (m, 2H, 3-H, 6-H-Fmoc), 7.45-7.27 (m, 7H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H<sub>aromatisch</sub>-Bzn), 6.92 (d, 1H,  $J_{NH,H2} = 8.1$  Hz, NH (NHAc)), 5.91 (d, 1H,  $J_{NH,T\alpha} = 9.3$  Hz, NH-Fmoc), 5.55 (s, 1H, CH-Bzn), 4.86 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 2.6$  Hz, 1-H), 4.55-4.37 (m, 3H, 2-H, 6<sub>a,b</sub>-H), 4.34-4.22 (m, 2H, CH-Fmoc, T <sup>$\alpha$</sup> ), 4.21-4.05 (m, 3H, 4-H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, T <sup>$\beta$</sup> ), 3.96-3.73 (m, 2H, 3-H, 5-H), 3.45 (bs, 1H, 3  $\times$  OH), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (AcNH)), 1.43 (s, 9H, CH<sub>3</sub> (*t*Bu)), 1.28 (d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 5.9$  Hz, T <sup>$\gamma$</sup> ).

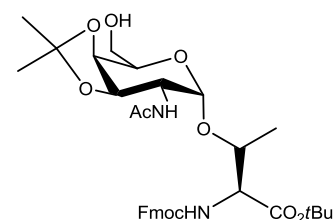
**<sup>13</sup>C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = 172.6, 170.8 (2  $\times$  C=O (AcNH, *t*Bu-Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 (C1<sub>a</sub>-, C8<sub>a</sub>-Fmoc), 141.3, 141.3 (C4<sub>a</sub>-, C5<sub>a</sub>-Fmoc), 137.4 (C<sub>quartär</sub> (Bzn)), 129.1, 128.2 (C<sub>aromatisch</sub> (Bzn)), 127.8, 127.8 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 126.3 (C<sub>aromatisch</sub> (Bzn)), 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 101.2 (CH (Bzn)), 100.4 (C1), 83.4 (C<sub>quartär</sub> (*t*Bu)), 76.6 (T <sup>$\beta$</sup> ), 75.5 (C4), 69.6 (C3),

69.2 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 67.2 (C6), 63.7 (C5), 58.9 (T<sup>α</sup>), 50.4 (C2), 47.2 (CH-Fmoc), 28.1 (CH<sub>3</sub> (*t*Bu)), 23.1 (CH<sub>3</sub> (AcNH)), 19.1 (T<sup>γ</sup>).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[196]</sup>

## Synthese des 6-Fluor-T<sub>N</sub>-Bausteins

*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**35**)<sup>[113]</sup>



### Variante A:

Es wurden 637 mg (1.06 mmol) T<sub>N</sub>-Antigen **10**, gelöst in 30 mL Aceton, mit 533 mg (3.34 mmol) wasserfreiem Kupfer(II)-sulfat und einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und vier Tage bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wurde filtriert, das Filtrat mit festem Calciumhydroxid neutralisiert, welches mittels Absaugen durch *Hyflo*<sup>®</sup> entfernt wurde, und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Produkt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:3) gereinigt.

Ausbeute: 286 mg (42%, 0.45 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

### Variante B:

Es wurden 670 mg (1.05 mmol) T<sub>N</sub>-Antigen **10** in 30 mL Aceton gelöst und auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 540 mg (3.57 mmol) wasserfreies Kupfer(II)-sulfat und eine Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde

innerhalb von 18 Stunden langsam auf Raumtemp. erwärmt. Die Aufarbeitung erfolgte analog zu Variante A.

Ausbeute: 241 mg (36%, 0.38 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

#### Variante C:

Analog der Vorschrift von *Rochepeau-Jobron* und *Jacquinet*<sup>[114]</sup> wurde eine Lösung von 991 mg (1.65 mmol) T<sub>N</sub>-Antigen **10** und 35 mg (0.15 mmol) (-)-Campher-10-sulfonsäure in 20 mL (0.16 mol) 2,2-Dimethoxypropan drei Tage bei Raumtemp. gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktion mit 0.10 mL (0.72 mmol) Triethylamin abgebrochen und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 22 mL eines Methanol/Wasser-Gemisches (10:1) gelöst und bei 65 °C so lange gerührt, bis nur noch ein einziges Produkt per Dünnschichtchromatographie zu erkennen war (ca. drei Stunden). Das Lösungsmittelgemisch wurde i. Vak. abdestilliert, der Rückstand wurde noch zweimal mit je 10 mL Toluol kodestilliert und das Produkt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc 1:4) isoliert.

Ausbeute: 463 mg (85%, 0.72 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = +53.4 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}.$$

$$R_f = 0.55 \text{ (EtOAc)}$$

$$\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10} \quad (\text{M} = 640.72 \text{ g/mol}) \quad [640.30]$$

**ESI-MS** (positiv), m/z: 663.32 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 663.29; 679.31 [M+K]<sup>+</sup>, ber.: 679.26; 1303.65 [2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1303.59.

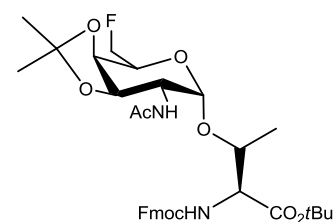
**HR-ESI-MS** (positiv) m/z: 663.2899 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 663.2894.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY), δ [ppm] = 7.78 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.3$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 6.1$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.44-7.37 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.36-7.28 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.03 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.7$  Hz, NHAc), 5.43 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.4$  Hz, NH-Fmoc), 4.80 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.1$  Hz, 1-H), 4.48 (d, 2H,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 6.6$  Hz, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.33-4.20 (m, 3H, 2-H, CH-Fmoc, T<sup>α</sup>), 4.19-4.15 (m, 1H, 4-H), 4.15-4.08 (m, 2H, T<sup>β</sup>, 5-H), 4.05 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 4.9$  Hz,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 9.2$  Hz, 3-H), 3.97 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_5} = 6.4$  Hz,  $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_{6a/b}} = 11.7$  Hz, 6<sub>a/b</sub>-H), 3.84 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_5} = 4.0$  Hz,  $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_{6a/b}} = 11.7$  Hz, 6<sub>a/b</sub>-H), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (AcNH)), 1.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Acetal)), 1.46 (s, 9H, 3 × CH<sub>3</sub> (tBu)), 1.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Acetal)), 1.29 (d, 3H,  $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.4$  Hz, T<sup>γ</sup>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , DEPT, HMQC),  $\delta$  [ppm] = 170.2, 170.1 ( $2 \times \text{C}=\text{O}$  (AcNH, Ester)), 156.3 ( $\text{C}=\text{O}$  (Urethan)), 143.7, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.8 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.0, 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 110.1 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$  (Acetal)), 100.0 (C1), 83.2 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$  (*t*Bu)), 76.7 ( $\text{T}^\beta$ ), 74.9 (C3), 68.1 (C-5), 73.4 (C4), 67.0 ( $\text{CH}_2$ -Fmoc), 62.8 (C6), 58.8 ( $\text{T}^\alpha$ ), 50.1 (C2), 47.2 ( $\text{CH}$ -Fmoc), 28.1 ( $\text{CH}_3$  (*t*Bu)), 27.8, 26.7 ( $2 \times \text{CH}_{3\text{a,b}}$  (Acetal)), 23.4 ( $\text{CH}_3$  (AcNH)), 18.7 ( $\text{T}^\gamma$ ).

**RP-HPLC** (PerfectSil C18(2),  $\lambda = 214$  nm,  $\text{H}_2\text{O}$ -MeCN, 50:50  $\rightarrow$  20:80, 30 min  $\rightarrow$  0:100, 10 min):  $R_t = 8.3$  min

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3,4-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (38)**<sup>[113]</sup>



Es wurden 881 mg (1.38 mmol) Isopropyliden-geschütztes  $\text{T}_\text{N}$ -Antigen **35**, 0.24 mL (1.82 mmol) DAST und 0.47 mL (0.51 mmol) 2,4,6-Collidin in 7 mL absol. Dichlormethan gelöst und in der Mikrowelle (CEM *Discover*,  $P_{\text{max}} = 100$  W,  $p_{\text{max}} = 5.0$  bar,  $T = 80$  °C) eine Stunde zur Reaktion gebracht. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Raumtemp. wurde die Reaktion mit 1.5 mL Methanol abgebrochen. Es wurde dreimal mit je 5 mL verd. Salzsäure (1 M) und einmal mit 10 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt und die organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abtrennen des Lösungsmittel i. Vak. wurde der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:1) gereinigt.

Ausbeute: 670 mg (80%, 1.11 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +67.9$  ( $c = 1.00$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

$R_f = 0.56$  ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 1:2)

$\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{FN}_2\text{O}_9$  (M = 642.71 g/mol) [642.30]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 643.36  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber.: 643.31; 665.34  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 665.29; 681.32  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 681.26.

**HR-ESI-MS** (positiv),  $m/z$ : 665.2829  $[M+Na]^+$ , ber.: 665.2850.

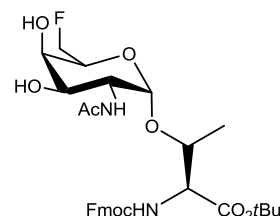
**$^1H$ -NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ , COSY),  $\delta$  [ppm] = 7.78 (d, 2H,  $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H,  $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.3$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.41 (t, 2H,  $J_{H_3,H_2} = J_{H_6,H_7} = 7.3$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.36-7.28 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.02 (d, 1H,  $J_{NH,H_2} = 9.2$  Hz, NHAc), 5.65 (d, 1H,  $J_{NH,T\alpha} = 8.5$  Hz, NH-Fmoc), 4.80-4.69 (m, 2H, 1-H, 6<sub>a/b</sub>-H), 4.62-4.56 (m, 1H, 6<sub>a/b</sub>-H), 4.55-4.46 (m, 2H,  $CH_2$ -Fmoc), 4.33-4.17 (m, 4H, 2-H, 5-H,  $CH$ -Fmoc,  $T^\alpha$ ), 4.17-4.02 (m, 3H, 3-H, 4-H,  $T^\beta$ ), 2.03 (s, 3H,  $CH_3$  (AcNH)), 1.59 (s, 3H,  $CH_3$  (Acetal)), 1.46 (s, 9H, 3  $\times$   $CH_3$  (*t*Bu)), 1.33 (s, 3H,  $CH_3$  (Acetal)), 1.30 (d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$  Hz,  $T^\gamma$ ).

**$^{13}C$ -NMR** (100.6 MHz,  $CDCl_3$ , DEPT, HMQC),  $\delta$  [ppm] = 170.2, 170.1 (2  $\times$  C=O (AcNH, *t*Bu-Ester)), 156.3 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.8 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.0, 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 110.2 ( $C_{\text{quartär}}$  (Acetal)), 100.1 (C1), 82.7 (d,  $J_{F_6,C_6} = 169.8$  Hz, C6), 83.2 ( $C_{\text{quartär}}$  (*t*Bu)), 77.0 ( $T^\beta$ ), 74.8 (C3), 72.0 (d,  $J_{F_6,C_4} = 7.6$  Hz, C4), 67.1 (d,  $J_{F_6,C_5} = 21.4$  Hz, C5), 67.0 ( $CH_2$ -Fmoc), 58.9 ( $T^\alpha$ ), 49.9 (C2), 47.2 ( $CH$ -Fmoc), 28.1 ( $CH_3$  (*t*Bu)), 27.7 ( $CH_{3a/b}$  (Acetal)), 23.3 ( $CH_3$  (AcNH)), 18.7 ( $T^\gamma$ ).

**$^{19}F$ -NMR** (376.5 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  [ppm] = -227.7 (dt,  $J_{F_6,H_5} = 15.3$  Hz,  $J_{F_6,H_6} = 47.0$  Hz).

**RP-HPLC** (PerfectSil C18(2),  $\lambda = 214$  nm,  $H_2O$ -MeCN, 50:50  $\rightarrow$  20:80, 30 min  $\rightarrow$  0:100, 10 min):  $R_t = 14.8$  min, 17.3 min (Konformer).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (29)<sup>[113]</sup>**



Eine Lösung von 347 mg (0.54 mmol) des Isopropyliden-geschützten 6-Desoxy-6-fluor- $T_N$ -Antigens **38** in 20 mL Methanol wurde mit einer Spatelspitze des sauren Ionentauschers *Amberlyst*<sup>®</sup> 15 versetzt und 14 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Nach Abfiltrieren des Ionentauschers, Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck

und zweimaliger Kodestillation des Rückstandes mit je 15 mL Dichlormethan wurde das Produkt erhalten.

Ausbeute: 202 mg (89%, 0.48 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = +26.5 \text{ (} c = 1.00, \text{CHCl}_3\text{)}.$$

$$R_f = 0.65 \text{ (CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH, 5:0.4)}$$

$$\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{FN}_2\text{O}_9 \quad (\text{M} = 602.65 \text{ g/mol}) \quad [602.26]$$

**ESI-MS** (positiv), m/z: 625.28  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 625.25; 641.26  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 641.23; 1227.57  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 1227.52; 1243.55  $[2\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 1243.49.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 625.2540  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 625.2537.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY),  $\delta$  [ppm] = 7.76 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.4$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 6.4$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = J_{\text{H}_6,\text{H}_7} = 7.2$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 (t, 2H,  $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = J_{\text{H}_7,\text{H}_6} = 6.1$  Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.89 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 7.5$  Hz, NHAc), 5.65 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.4$  Hz, NH-Fmoc), 4.86 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.3$  Hz, 1-H), 4.76-4.53 (m, 2H, 6<sub>a,b</sub>-H), 4.52-4.38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.30-4.22 (m, 3H, 2-H, CH-Fmoc, T <sup>$\alpha$</sup> ), 4.19-4.04 (m, 2H, T <sup>$\beta$</sup>  {4.15}, 5-H {4.07}), 3.94 (m, 1H, 4-H), 3.82 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 2.1$  Hz,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 10.2$  Hz, 3-H), 2.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (AcNH)), 1.45 (s, 9H, 3  $\times$  CH<sub>3</sub> (tBu)), 1.31 (d, 3H,  $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.3$  Hz, T <sup>$\gamma$</sup> ).

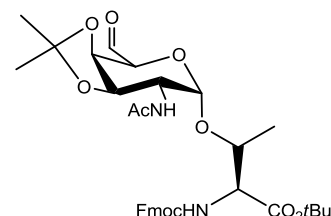
**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, DEPT, HMQC),  $\delta$  [ppm] = 174.0 (C=O (AcNH)), 171.1 (C=O (tBu-Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.8, 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.0, 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 99.5 (C1), 83.3 (d,  $J_{\text{F}_6,\text{C}_6} = 169.0$  Hz, C6), 83.4 (C<sub>quartär</sub> (tBu)), 76.8 (T <sup>$\beta$</sup> ), 71.0 (C3), 69.5 (d,  $J_{\text{F}_6,\text{C}_5} = 20.2$  Hz, C5), 68.1 (d,  $J_{\text{F}_6,\text{C}_4} = 7.1$  Hz, C4), 67.1 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 59.0 (T <sup>$\alpha$</sup> ), 50.9 (C2), 47.2 (CH-Fmoc), 28.0 (CH<sub>3</sub> (tBu)), 22.8 (CH<sub>3</sub> (AcNH)), 18.7 (T <sup>$\gamma$</sup> ).

**<sup>19</sup>F-NMR** (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm] = -229.8 (bs).

**RP-HPLC** (PerfectSil C18(2),  $\lambda = 214$  nm, H<sub>2</sub>O-MeCN, 70:30, 5 min  $\rightarrow$  23:77, 25 min  $\rightarrow$  0:100, 30 min): R<sub>t</sub> = 21.7 min.

## Synthese des 6,6-Bisfluor-T<sub>N</sub>-Bausteins

### *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**48**)<sup>[113]</sup>



#### Variante A:

Eine Lösung von 420 mg (1.12 mmol) Pyridiniumdichromat und 0.32 mL (3.37 mmol) Acetanhydrid in 50 mL absol. Dichlormethan wurde auf 0 °C gekühlt und langsam mit 715 mg (1.12 mmol) Isopropyliden-geschützten T<sub>N</sub>-Antigens **35**, gelöst in 15 mL absol. Dichlormethan, versetzt. Das Gemisch wurde 3.5 Stunden unter Rückfluss erhitzt, bevor die Reaktion mit drei Tropfen Triethylamin abgebrochen wurde. Das Lösungsmittel wurde anschließend i. Vak. abdestilliert und das Rohprodukt mittels Flashchromatographie an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:2 + 0.1% NEt<sub>3</sub>) und darauffolgender Kodestillation mit 20 mL Toluol gereinigt.

Ausbeute: 351 mg (49%, 0.55 mmol) beigefarbener, amorpher Feststoff

#### Variante B:

Eine Lösung von 620 mg (1.63 mmol) Pyridiniumdichromat und 0.42 mL (4.52 mmol) Acetanhydrid in 20 mL absol. Dichlormethan wurde auf 0 °C gekühlt und langsam mit 950 mg (1.48 mmol) <sup>i</sup>Prop-T<sub>N</sub> **35**, gelöst in 20 mL absol. Dichlormethan, versetzt. Das Gemisch wurde innerhalb von 15 Minuten auf Raumtemp. erwärmt und anschließend 3 Stunden unter Rückfluss erhitzt, bevor die Reaktion mit drei Tropfen Triethylamin abgebrochen wurde. Durch Zugabe von 50 mL Essigester wurden die Chromsalze ausgefällt, das Gemisch wurde durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt und das Lösungsmittel wurde mittels Destillation unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:3 + 0.1% NEt<sub>3</sub>) gereinigt.

Ausbeute: 630 mg (67%, 0.99 mmol) beigefarbener, amorpher Feststoff

R<sub>f</sub> = 0.20 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:2)

C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub> (M = 638.71 g/mol) [638.28]

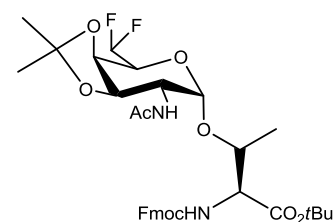
**ESI-MS** (positiv), m/z: 693.28 [M+MeOH+Na]<sup>+</sup>, ber.: 693.30; 1363.58  
[2M+2MeOH+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1363.61.



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 9.68 (s, 1H, CHO), 7.77 (d, 2H,  $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.3$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H,  $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.2$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.45-7.36 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.36-7.27 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.14 (d, 1H,  $J_{\text{NH,H2}} = 9.5$  Hz, NHAc), 5.42 (d, 1H,  $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.7$  Hz, NH-Fmoc), 4.91 (d, 1H,  $J_{\text{H1,H2}} = 2.8$  Hz, 1-H), 4.56-4.42 (m, 3H, 4-H,  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 4.42-4.28 (m, 2H, 2-H, 5-H), 4.28-4.18 (m, 2H, CH-Fmoc,  $\text{T}^\alpha$ ), 4.17-4.05 (m, 2H,  $\text{T}^\beta$ , 3-H), 2.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  (AcNH)), 1.58 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  (Acetal)), 1.47 (s, 9H,  $3 \times \text{CH}_3$  (*t*Bu)), 1.33 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  (Acetal)), 1.22 (d, 3H,  $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.4$  Hz,  $\text{T}^\gamma$ ).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[113]</sup>

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-didesoxy-6-difluor-3,4-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (49)<sup>[113]</sup>**



Es wurden 340 mg (0.53 mmol) des Aldehyds **48** in 20 mL absol. Dichlormethan gelöst, mit 0.14 mL (1.16 mmol) DAST versetzt und drei Stunden bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktion wurde daraufhin mit 2 mL Methanol abgebrochen und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abgetrennt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:1) gereinigt.

Ausbeute: 244 mg (70%, 0.37 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$R_f = 0.65$  ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 1:2)

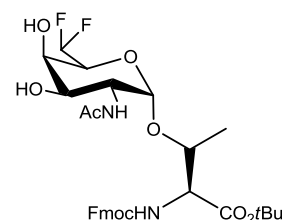
$\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_9$  (M = 660.70 g/mol) [660.29]

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 7.78 (d, 2H,  $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.5$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H,  $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.1$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.41 (t, 2H,  $J_{\text{H3,H4}} = J_{\text{H6,H5}} = 7.1$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.37-7.27 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.06 (d, 1H,  $J_{\text{NH,H2}} = 10.0$  Hz, NHAc), 5.97 (ddd, 1H,  $J_{\text{H6,H5}} = 6.9$  Hz,  $J_{\text{H6,F6a}} = 54.0$  Hz,  $J_{\text{H6,F6b}} = 58.1$  Hz, 6-H), 5.36 (d, 1H,  $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.5$  Hz, NH-Fmoc), 4.82-4.74 (m, 1H, 1-H), 4.58-4.44 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 4.35-4.16 (m, 3H, 4-H, CH-Fmoc,  $\text{T}^\alpha$ ), 4.16-4.01 (m, 3H, 5-H,  $\text{T}^\beta$ , 3-H {4.05, dd,

$J_{H3,H4} = 4.9$  Hz,  $J_{H3,H2} = 9.1$  Hz}), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (AcNH)), 1.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Acetal)), 1.47 (s, 9H, 3 × CH<sub>3</sub> (*t*Bu)), 1.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Acetal)), 1.28 (d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.5$  Hz, T<sup>γ</sup>).  
<sup>19</sup>F-NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = -127.1 (ddd,  $J_{F6a,H5} = 11.4$  Hz,  $J_{F6a,H6} = 57.9$  Hz,  $J_{F6a,F6b} = 298.0$  Hz, F6<sub>a</sub>), -130.7 (dd,  $J_{F6b,H6} = 53.8$  Hz,  $J_{F6b,F6a} = 298.0$  Hz, F6<sub>b</sub>).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[113]</sup>

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-difluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (30)<sup>[113]</sup>**



Zu einer Lösung von 208 mg (0.31 mmol) des Isopropyliden-geschützten 6-Desoxy-6,6-bisfluor-T<sub>N</sub>-Antigens **49** in 20 mL Methanol wurden 30 mg des sauren Ionentauschers *Amberlyst*<sup>®</sup> 15 gegeben und das Gemisch wurde 14 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Nach Entfernen des Ionentauschers mittels Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde zweimal mit je 10 mL Dichlormethan kodestilliert.

Ausbeute: 186 mg (97%, 0.30 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +31.7$  (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

R<sub>f</sub> = 0.40 (EtOAc)

C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> (M = 620.64 g/mol) [620.25]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 643.25 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 643.24; 1263.53 [2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1263.50.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 643.2464 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 643.2443.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY), δ [ppm] = 7.76 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.2$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.39 (t, 2H,  $J_{H3,H2} = J_{H6,H7} = 6.0$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 (t, 2H,  $J_{H2,H3} = J_{H7,H6} = 7.4$  Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 7.21-7.13 (m, 1H, NHAc), 6.01 (dt, 1H,  $J_{H6,H5} = 6.4$  Hz,  $J_{H6,F6} = 56.0$  Hz, 6-H), 5.74 (d, 1H,  $J_{NH,T\alpha} = 8.7$  Hz, NH-Fmoc), 4.88 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 2.9$  Hz, 1-H), 4.54-4.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.36-4.28 (m, 1H, 2-H), 4.28-4.21 (m, 2H, CH-Fmoc, T<sup>α</sup>), 4.18-4.07 (m, 2H, T<sup>β</sup>

{4.15}, 4-H {4.11}), 3.93-3.75 (m, 2H, 3-H, 5-H), 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (AcNH)), 1.45 (s, 9H, 3 × CH<sub>3</sub> (*t*Bu)), 1.30 (d, 3H,  $J_{T\gamma, T\beta} = 6.2$  Hz, T<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, DEPT, HMQC), δ [ppm] = 174.5 (C=O (AcNH)), 171.0 (C=O (*t*Bu-Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.3 (-4a-, C5a-Fmoc), 127.8 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 114.3 (dd,  $J_{C6, F6a} = 238.4$  Hz,  $J_{C6, F6b} = 241.9$  Hz, C6), 99.4 (C1), 83.4 (C<sub>quartär</sub> (*t*Bu)), 77.2 (T<sup>β</sup>), 70.5-69.9 (m, 2C, C3, C5), 67.3-67.0 (m, CH<sub>2</sub>-Fmoc, C4), 58.9 (T<sup>α</sup>), 50.9 (C2), 47.2 (CH-Fmoc), 28.0 (CH<sub>3</sub> (*t*Bu)), 22.5 (CH<sub>3</sub> (AcNH)), 18.6 (T<sup>γ</sup>).

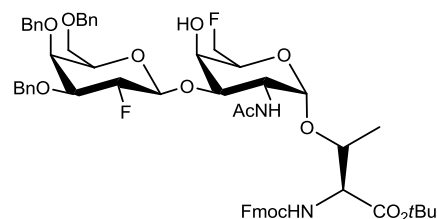
<sup>19</sup>F-NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = -130.8 (dd,  $J_{F6a, H6} = 55.6$  Hz,  $J_{F6a, F6b} = 298.7$  Hz, F6<sub>a</sub>), -129.6 (ddd,  $J_{F6b, H5} = 10.4$  Hz,  $J_{F6b, H6} = 57.8$  Hz,  $J_{F6b, F6a} = 298.2$  Hz, F6<sub>b</sub>).

**RP-HPLC** (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, H<sub>2</sub>O-MeCN, 60:40 → 0:100, 60 min):  
R<sub>t</sub> = 19.6 min.

## 5.4 Synthesen der fluorierten T-Antigene

### Glycosylierungen der fluorierten Glycosylakzeptoren

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-didesoxy-6-fluor-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (50)<sup>[113]</sup>**



Variante A:

Eine Lösung von 292 mg (0.48 mmol) 6-Desoxy-6-fluor-T<sub>N</sub>-Antigens **29** und 353 mg (0.59 mmol) Bn<sub>3</sub>2FGal-TCl **9** (beide Edukte wurden zuvor mehrere Stunden im Vakuum getrocknet) in 20 mL absol. Dichlormethan wurde mit 200 mg frisch aktiviertem Molsieb 4Å eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt, mit 15 µL TMSOTf versetzt und binnen 15 Stunden Rührens langsam auf Raumtemp. erwärmt. Nach beendeter Reaktion wurde mit festem Natriumhydrogen-

carbonat neutralisiert, durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Produkt wurde per Flashchromatographie an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 2:1) isoliert und für die vollständige Charakterisierung wurde ein Teil mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 303 mg (61%, 0.29 mmol, α/β 1:2.5)

216 mg β-Anomer (44%, 0.21 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

#### Variante B:

Eine Lösung von 315 mg (0.52 mmol) des 6-Desoxy-6-fluor-T<sub>N</sub>-Antigens **29** und 475 mg (0.80 mmol) Bn<sub>3</sub>2FGal-TCI **9** (beide Edukte wurden zuvor mehrere Stunden im Vakuum getrocknet) in 20 mL absol. Dichlormethan wurde mit 200 mg frisch aktiviertem Molsieb 4 Å eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf -15 °C gekühlt, es wurden 20 µL TMSOTf zugegeben und binnen 14-stündigem Rühren wurde langsam auf +15 °C erwärmt. Nach beendeter Reaktion wurde mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert, durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Produkt wurde per Flashchromatographie an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 2:1) isoliert und für die vollständige Charakterisierung wurde ein Teil mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 344 mg (63%, 0.33 mmol, α/β 1:1.8)

219 mg β-Anomer (40%, 0.21 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = (c = 1.00, \text{CHCl}_3) = +31.46$$

R<sub>f</sub> = 0.29; Konformer: 0.22 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:1)

C<sub>58</sub>H<sub>66</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> (M = 1037.15 g/mol) [1036.45]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 1059.46 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1059.44; 1075.46 [M+K]<sup>+</sup>, ber.: 1075.42.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 1037.4624 [M+H]<sup>+</sup>, ber.: 1037.4611; 1059.4435 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1059.4431.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY), δ [ppm] = 7.80-7.76 (m, 2H, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.64 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 7.4 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H, J<sub>H3,H2</sub> = J<sub>H6,H7</sub> = 7.6 Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.38-7.25 (m, 17H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H<sub>aromatisch</sub> (Bn)), 5.78 (d, 1H, J<sub>NH,H2</sub> = 9.6 Hz, NHAc), 5.44 (d, 1H, J<sub>NH,Tα</sub> = 9.4 Hz, NH-Fmoc), 4.91 (d, 1H, J<sub>CH2,CH2</sub> = 11.4 Hz, CH<sub>2a</sub> (Bn1)), 4.87 (d, 1H, J<sub>H1,H2</sub> = 3.2 Hz, 1-H), 4.83-4.64 (m, 4H, CH<sub>2b</sub> (Bn1) {4.78, d, J<sub>CH2,CH2</sub> = 12.2 Hz}, 2'-H, 6<sub>a</sub>-H, CH<sub>2a</sub> (Bn2)), 4.63-4.43 (m, 6H, 1'-H, CH<sub>2</sub>-Fmoc {4.49, d, J<sub>CH2,CH</sub> = 6.7 Hz}, CH<sub>2b</sub> (Bn2), 2-H, 6<sub>b</sub>-H), 4.43-4.40 (m, 2H, CH<sub>2a,b</sub> (Bn3)), 4.28 (t, 1H, J<sub>CH,CH2</sub> = 6.7 Hz, CH-Fmoc), 4.24-4.20 (m, 1H, T<sup>α</sup>), 4.19-4.11 (m, 1H, T<sup>β</sup>), 4.10-3.99 (m,

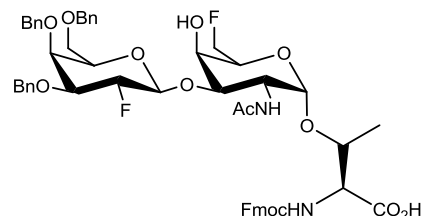
3H, 4-H, 5-H, 5'-H), 3.72-3.64 (m, 1H, 3-H), 3.54 (dd, 1H,  $J_{H3',H4} = 3.1$  Hz,  $J_{H3',H2} = 6.2$  Hz, 3'-H), 3.88-3.85 (m, 1H, 4'-H), 3.60-3.52 (m, 2H, 3-H, 6<sub>a/b</sub>'-H), 3.50-3.45 (m, 1H, 6<sub>a/b</sub>'-H), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (AcNH)), 1.46 (s, 9H, 3 × CH<sub>3</sub> (*t*Bu)), 1.30 (d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.5$  Hz, T<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HMQC), δ [ppm] = 170.4 (C=O (AcNH)), 170.1 (2 × C=O (Ac, *t*Bu-Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.9, 137.8, 137.5 (3 × C<sub>quartär</sub> (Bn)), 128.5, 128.4, 128.3, 127.9, 127.8, 127.5, 127.1 (15 × C<sub>aromatisch</sub> (Bn), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.0, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.5 (d,  $J_{C1',F2'} = 24.0$  Hz, C1'), 100.4 (C1), 91.3 (d,  $J_{C2',F2'} = 185.0$  Hz, C2'), 83.2 (d,  $J_{C6,F6} = 167.6$  Hz, C6), 83.1 (C<sub>quartär</sub> (*t*Bu)), 80.0 (C-3), 79.7 (d,  $J_{C3',F2'} = 13.7$  Hz, C3'), 76.9 (T<sup>β</sup>), 74.8 (CH<sub>2</sub> (Bn)), 74.0 (C4'), 73.6, 72.7 (2 × CH<sub>2</sub> (Bn)), 69.2 (d,  $J_{F6,C5} = 20.9$  Hz, C5), 68.7 (C6'), 68.3 (C5'), 68.0 (d,  $J_{F6,C4} = 7.0$  Hz, C4), 67.0 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 59.1 (T<sup>α</sup>), 47.4 (C2), 47.2 (CH-Fmoc), 28.1 (CH<sub>3</sub> (*t*Bu)), 23.3 (CH<sub>3</sub> (AcNH)), 18.8 (T<sup>γ</sup>).

<sup>19</sup>F-NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = -204.5 – -204.8 (m, F2'), -228.9 (dt,  $J_{F6,H5} = 15.0$  Hz,  $J_{F6,H6} = 47.1$  Hz, F6).

**RP-HPLC** (Phenomenex Jupiter C18(2), λ = 214 nm, H<sub>2</sub>O-MeOH, 30:70 → 15:85, 10 min → 15:85, 10 min → 0:100, 10 min): R<sub>t</sub> = 29.9 min, 31.1 min (Konformer).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl]-*L*-threonin (1)<sup>[43]</sup>**



Es wurden 220 mg (0.21 mmol) Bn<sub>3</sub>2FGal-6FT **50** in 7.70 mL Trifluoressigsäure/Wasser (10:1) gelöst und 2.5 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Es wurde mit 25 mL Toluol verdünnt, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde fünfmal mit je 25 mL Toluol kodestilliert. Das Produkt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc → EtOAc/MeOH/AcOH 10:1:0.1) isoliert.

Ausbeute: 183 mg (90%, 19 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

$R_f = 0.63$  (EtOAc/EtOH/AcOH, 4:1:0.05)

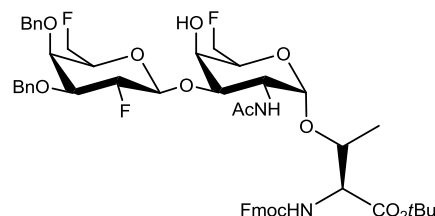
$C_{54}H_{58}F_2N_2O_{13}$  ( $M = 981.04$  g/mol) [980.39]

**ESI-MS** (positive),  $m/z$ : 1003.41  $[M+Na]^+$ , ber.: 1003.38; 1019.45  $[M+K]^+$ , ber.: 1019.35).

**HR-ESI-MS** (positiv),  $m/z$ : 1003.3808  $[M+Na]^+$ , ber.: 1003.3805.

**RP-HPLC** (Phenomenex Luna C18(2),  $\lambda = 214$  nm,  $H_2O$ -MeCN, 70:30, 5 min  $\rightarrow$  10:90, 25 min  $\rightarrow$  0:100, 30 min):  $R_t = 36.3$  min.

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-didesoxy-6-fluor-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-bisfluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (51)<sup>[43]</sup>**



#### Variante A:

Eine Suspension von 150 mg frisch aktiviertem Molsieb 4 Å, 390 mg (0.65 mmol) 6-Desoxy-6-fluor- $T_N$ -Antigen **29** und 420 mg (0.83 mmol)  $Bn_2$ 2,6F<sub>2</sub>Gal-TCI **8** (beide Edukte wurden zuvor mehrere Stunden i. Vak. getrocknet) in 25 mL absol. Dichlormethan wurde 30 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Nach dem Abkühlen des Gemisches auf  $-10$  °C wurden 20  $\mu$ L TMSOTf zugegeben und die Reaktion wurde binnen 19 Stunden Rührens langsam auf Raumtemp. erwärmt. Nach beendeter Reaktion wurde mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert, durch *Hyflo*<sup>®</sup> filtriert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produktgemisch wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel ( $^c$ Hex/EtOAc 2:1) getrennt.

Ausbeute: 354 mg (57%, 0.37 mmol,  $\alpha/\beta$  1:1.9)

229 mg  $\beta$ -Anomer (37%, 0.24 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

#### Variante B:

Eine Suspension von 150 mg frisch aktiviertem Molsieb 4 Å, 505 mg (0.84 mmol) 6-Desoxy-6-fluor- $T_N$ -Antigen **29** und 560 mg (1.10 mmol)  $Bn_2$ 2,6F<sub>2</sub>Gal-TCI **8** (beide Edukte wurden zuvor mehrere Stunden i. Vak. getrocknet) in 30 mL absol. Dichlormethan/absol. Acetonitril (1:1) wurde eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Nach Abkühlen des Gemisches auf  $-20$  °C wurden 12  $\mu$ L TMSOTf zugegeben, die Reaktion wurde binnen zwei Stunden Rührens auf  $-10$  °C und innerhalb einer weiteren Stunde auf  $0$  °C erwärmt.

In den folgenden 18 Stunden wurde die Mischung langsam auf Raumtemp. erwärmt und aufgrund des geringen Umsatzes mit zusätzlichen 6  $\mu\text{L}$  TMSOTf versetzt. Nach weiteren 24 Stunden Röhrens wurde die Reaktion durch Neutralisieren mit festem Natriumhydrogencarbonat abgebrochen. Es wurde durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produktgemisch wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 2:1) getrennt.

Ausbeute: 464 mg (58%, 0.49 mmol,  $\alpha/\beta$  1:3)

354 mg  $\beta$ -Anomer (40%, 0.37 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = +63.2 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}$$

$R_f = 0.39$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:1)

$\text{C}_{51}\text{H}_{59}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_{12}$  (M = 949.02 g/mol) [948.40]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 971.42  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 971.39; 1919.79  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 1919.79.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 971.3959  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 971.3918.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY),  $\delta$  [ppm] = 7.78 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.3$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (m, 2H, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.44-7.39 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.38-7.24 (m, 12H, 2-H-, 7-H-Fmoc,  $\text{H}_{\text{aromatisch}}$  (Bn)), 5.81 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.6$  Hz, NHAc), 5.42 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.4$  Hz, NH-Fmoc), 4.93 (d, 2H,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 11.4$  Hz,  $\text{CH}_{2a}$  (Bn1)), 4.86 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.3$  Hz, 1-H), 4.84-4.63 (m, 6H,  $\text{CH}_{2b}$  (Bn1) {4.82, d,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 12.0$  Hz}, 2'-H {4.76},  $\text{CH}_{2a}$  (Bn2) {4.68, d,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 12.0$  Hz}, 6<sub>a,b</sub>-H {4.64}, 2-H {4.63}), 4.63-4.37 (m, 5H,  $\text{CH}_{2b}$  (Bn2) {4.59, d,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 11.4$  Hz},  $\text{CH}_2$ -Fmoc {4.50, d,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 6.6$  Hz}, 1'-H {4.55}, 6<sub>a</sub>'-H {4.49, ddd,  $J_{\text{H}_{6a}',\text{H}_5} = 6.9$  Hz,  $J_{\text{H}_{6a}',\text{H}_{6b}'} = 9.5$  Hz,  $J_{\text{H}_{6a}',\text{F}6'} = 47.4$  Hz}), 4.37-4.13 (m, 4H, 6<sub>b</sub>'-H {4.31, ddd,  $J_{\text{H}_{6b}',\text{H}_5} = 5.1$  Hz,  $J_{\text{H}_{6b}',\text{H}_{6a}'} = 9.5$  Hz,  $J_{\text{H}_{6b}',\text{F}6'} = 47.4$  Hz}, CH-Fmoc {4.29}, T <sup>$\alpha$</sup>  {4.22, d,  $J_{\text{T}\alpha,\text{T}\beta} = 9.4$  Hz}, T <sup>$\beta$</sup>  {4.18}), 4.14-4.00 (m, 2H, 4-H, 5-H), 3.85-3.79 (m, 1H, 4'-H), 3.72-3.62 (m, 2H, 3-H {3.71}, 5'-H {3.68}), 3.62-3.53 (m, 3'-H), 2.60 (bs, OH), 2.01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  (AcNH)), 1.47 (s, 9H, 3  $\times$   $\text{CH}_3$  (*t*Bu)), 1.30 (d, 3H,  $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.2$  Hz, T <sup>$\gamma$</sup> ).

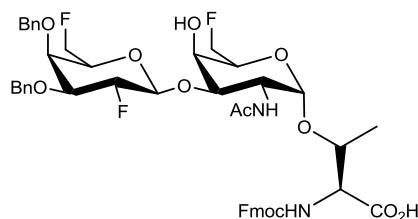
**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , HMQC),  $\delta$  [ppm] = 170.4 (C=O (AcNH)), 170.2 (C=O (*t*Bu-Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.6, 137.5 (2  $\times$  C<sub>quartär</sub> (Bn)), 128.5, 128.4, 128.4, 127.9, 127.8, 127.6, 127.1 (10  $\times$  C<sub>aromatisch</sub> (Bn), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.0, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.5 (d,  $J_{\text{C}1',\text{F}2'} = 24.5$  Hz, C1'), 100.4 (C1), 91.2 (d,  $J_{\text{C}2',\text{F}2'} = 183.5$  Hz, C2'), 83.2 (d,  $J_{\text{C}6,\text{F}6} = 167.8$  Hz, C6), 83.1 (C<sub>quartär</sub> (*t*Bu)), 81.8 (d,  $J_{\text{C}6',\text{F}6'} = 169.3$  Hz, C6'), 79.9 (C3), 79.6 (d,  $J_{\text{C}3',\text{F}2'} = 16.2$  Hz, C3'), 77.2 (T <sup>$\beta$</sup> ), 74.7 ( $\text{CH}_2$  (Bn)), 73.6-73.2 (m, C4', C5'), 73.0 ( $\text{CH}_2$  (Bn)), 69.2 (d,  $J_{\text{C}5,\text{F}6} = 20.7$  Hz, C5), 68.2 (d,  $J_{\text{C}4,\text{F}6} = 6.5$  Hz, C4), 67.0 ( $\text{CH}_2$ -

Fmoc), 59.2 (T<sup>α</sup>), 47.4 (C2), 47.2 (CH-Fmoc), 28.1 (CH<sub>3</sub> (tBu)), 23.3 (CH<sub>3</sub> (AcNH)), 18.8 (T<sup>γ</sup>).

<sup>19</sup>F-NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = -204.7 (dd,  $J_{F2',H3} = 12.1$  Hz,  $J_{F2',H2} = 50.9$  Hz, F2'), -228.9 (dt,  $J_{F6',H5'} = 15.1$  Hz,  $J_{F6',H6} = 47.4$  Hz, F6'), -228.9 (dt,  $J_{F6',H5'} = 11.7$  Hz,  $J_{F6',H6} = 46.6$  Hz, F6).

**RP-HPLC** (PerfectSil C18(2), λ = 214 nm, H<sub>2</sub>O-MeCN, 50:50 → 25:75, 30 min → 0:100, 5 min): R<sub>t</sub> = 26.1 min.

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-bisfluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin(2)<sup>[43]</sup>**



Es wurden 186 mg (0.20 mmol) des Esters **51**, gelöst in 7.7 mL Trifluoressigsäure/Wasser (10:1), drei Stunden bei Raumtemp. gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 30 mL Toluol verdünnt, die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 25 mL Toluol kodestilliert. Das Produkt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc → EtOAc/MeOH/AcOH 10:1:0.1) isoliert.

Ausbeute: 144 mg (80%, 0.16 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

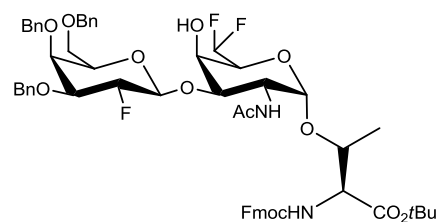
R<sub>f</sub> = 0.28 (EtOAc/MeOH/AcOH, 10:1:0.01)

C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub> (M = 892.91 g/mol) [892.34]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 915.3 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 915.3.



***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-didesoxy-6-difluor-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl]-L-threonin-*tert*-butylester (53)<sup>[113]</sup>**



Variante A:

Eine Suspension von 150 mg frisch aktiviertem Molsieb 4 Å, 146 mg (0.24 mmol) 6-Desoxy-6,6-bisfluor-T<sub>N</sub>-Antigen **30** und 215 mg (0.36 mmol) Bn<sub>3</sub>2FGal-TCI **9** (beide Edukte wurden zuvor mehrere Stunden i. Vak. getrocknet) in 20 mL absol. Dichlormethan wurde eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Das Gemisch wurde auf -20 °C gekühlt, 12  $\mu$ L TMSOTf wurden zugegeben und es wurde drei Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Im Anschluss wurde erst innerhalb von zwei Stunden auf 0 °C und binnen 18 Stunden langsam auf 10 °C erwärmt. Die Reaktion wurde durch Neutralisation mit festem Natriumhydrogencarbonat abgebrochen. Es wurde durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde per Flashchromatographie an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 147 mg (58%, 0.14 mmol,  $\alpha/\beta$  1:1)

74.0 mg  $\beta$ -Anomer (29%, 0.07 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

Variante B:

Eine Suspension von 150 mg frisch aktiviertem Molsieb 4 Å, 123 mg (0.20 mmol) 6-Desoxy-6,6-bisfluor-T<sub>N</sub>-Antigen **30** und 239 mg (0.40 mmol) Bn<sub>3</sub>2FGal-TCI **9** (beide Edukte wurden zuvor mehrere Stunden i. Vak. getrocknet) in 30 mL absol. Dichlormethan/absol. Acetonitril (1:1) wurde eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Das Gemisch wurde auf -20 °C gekühlt, mit 6  $\mu$ L TMSOTf versetzt und es wurde innerhalb von 1.5 Stunden auf -10 °C erwärmt. Aufgrund des niedrigen Umsatzes wurden weitere 6  $\mu$ L TMSOTf zugegeben, bevor binnen 18 Stunden langsam auf 10 °C erwärmt wurde. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde noch eine Stunde bei Raumtemp. gerührt, bevor durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert wurde. Es wurde durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt, das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde per Flashchromatographie an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 107 mg (50%, 0.10 mmol,  $\alpha/\beta$  1:4)

81 mg  $\beta$ -Anomer (40%, 0.08 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

Variante C:

Eine Suspension von 150 mg frisch aktiviertem Molsieb 4 Å, 240 mg (0.39 mmol) 6-Desoxy-6,6-bisfluor-T<sub>N</sub>-Antigen **30** und 400 mg (0.67 mmol) Bn<sub>3</sub>2FGal-TCI **9** (beide Edukte wurden zuvor mehrere Stunden i. Vak. getrocknet) in 30 mL absol. Dichlormethan/absol. Acetonitril (1:1) wurde eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Das Gemisch wurde auf 0 °C gekühlt, mit 12 µL TMSOTf versetzt und binnen 18 Stunden langsam auf 15 °C erwärmt. Zur Vervollständigung der Reaktion wurden weitere 5 Stunden bei Raumtemp. gerührt, bevor die Reaktion durch Neutralisieren mit festem Natriumhydrogencarbonat abgebrochen wurde. Es wurde durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt, das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde per Flashchromatographie an Kieselgel (°Hex/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 148 mg (36%, 0.14 mmol, α/β 1:2.5)

106 mg β-Anomer (25%, 0.10 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = +29.5 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}.$$

R<sub>f</sub> = 0.35 (°Hex/EtOAc, 1:1)

C<sub>58</sub>H<sub>65</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> (M = 1055.14 g/mol) [1054.44]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 1077.38 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1077.43; 1093.36 [M+K]<sup>+</sup>, ber.: 1093.41; 2131.78 [2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 2131.88.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 1077.4337 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1077.4336.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY), δ [ppm] = 7.78-7.76 (m, 2H, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 7.3 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H, J<sub>H3,H2</sub> = J<sub>H6,H7</sub> = 7.4 Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.37-7.25 (m, 17 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H<sub>aromat</sub> (Bn)), 6.15-5.82 (m, 2H, 6-H {6.00, dt, J<sub>H6,H5</sub> = 6.3 Hz, J<sub>H6,F6</sub> = 57.7 Hz}, NHAc {5.83, d, 1H, J<sub>NH,H2</sub> = 10.0 Hz}), 5.49 (d, 1H, J<sub>NH,Tα</sub> = 8.9 Hz, NH-Fmoc), 4.91-4.88 (m, 2H, 1-H, CH<sub>2a</sub> (Bn1)), 4.79-4.60 (m, 4H, CH<sub>2a,b</sub> (Bn2), 2'-H, 2-H), 4.58-4.47 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH<sub>2b</sub> (Bn1), 1'-H), 4.44 (d, 1H, J<sub>CH2,CH2</sub> = 11.8 Hz, CH<sub>2a</sub> (Bn3)), 4.39 (d, 1H, J<sub>CH2,CH2</sub> = 11.8 Hz, CH<sub>2b</sub> (Bn3)), 4.27-4.20 (m, 3H, CH-Fmoc, 4-H, T<sup>α</sup>), 4.20-4.13 (m, 1H, T<sup>β</sup>), 3.91-3.79 (m, 3H, 4'-H, 5-H, 5'-H), 3.72-3.67 (m, 1H, 3-H), 3.60-3.50 (m, 2H, 3'-H, 6<sub>a</sub>'-H), 3.60-3.50 (m, 1H, 3'-H), 3.49-3.43 (m, 1H, 6<sub>b</sub>'-H), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (AcNH)), 1.46 (s, 9H, 3 × CH<sub>3</sub> (tBu)), 1.29 (d, 3H, J<sub>Tγ,Tβ</sub> = 6.3 Hz, T<sup>γ</sup>).

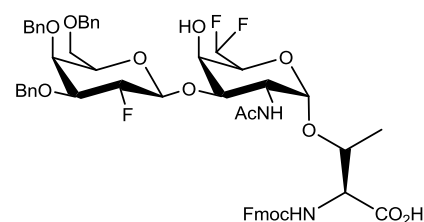
**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HMQC), δ [ppm] = 170.5 (C=O (AcNH)), 170.2 (2 × C=O (Ac, tBu-Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.9, 137.8, 137.5 (3 × C<sub>quartär</sub> (Bn)), 128.5, 128.3, 127.9, 127.8, 127.6, 127.1 (15 × C<sub>aromat</sub> (Bn), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.0, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 114.2 (dd, J<sub>C6,F6a</sub> = 238.6 Hz, J<sub>C6,F6b</sub> = 243.6 Hz, C6), 102.6 (d, J<sub>C1',F2'</sub> =

23.9 Hz, C1'), 100.5 (C1), 91.3 (d,  $J_{C2',F2'} = 185.5$  Hz, C2'), 83.2 ( $C_{\text{quartär}} (t\text{Bu})$ ), 79.9 (d,  $J_{C3',F2'} = 16.1$  Hz, C3'), 79.2 (C3), 77.2 ( $T^{\beta}$ ), 74.8 ( $\text{CH}_2$  (Bn)), 74.0 (C4'), 73.9 (C5'), 73.6, 72.7 ( $2 \times \text{CH}_2$  (Bn)), 69.9 (dd,  $J_{C5,F6a} = 22.7$  Hz,  $J_{C5,F6a} = 29.1$  Hz, C5), 68.6 (C6'), 67.6 (C4), 66.9 ( $\text{CH}_2$ -Fmoc), 59.1 ( $T^{\alpha}$ ), 47.3 (C2), 47.2 ( $\text{CH}$ -Fmoc), 28.1 ( $\text{CH}_3$  ( $t\text{Bu}$ )), 23.2 ( $\text{CH}_3$  (AcNH)), 18.7 ( $T^{\gamma}$ ).

$^{19}\text{F-NMR}$  (376.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = -131.0 (dd,  $J_{F6a,H6} = 54.5$  Hz,  $J_{F6a,F6b} = 296.8$  Hz, F6a), -129.7 (ddd,  $J_{F6b,H5} = 10.2$  Hz,  $J_{F6b,H6} = 57.7$  Hz,  $J_{F6b,F6a} = 297.1$  Hz, F6b), -205.1 (dd,  $J_{F2',H3} = 12.6$  Hz,  $J_{F2',H2} = 51.5$  Hz, F2').

**RP-HPLC** (PerfectSil C18(2),  $\lambda = 214$  nm,  $\text{H}_2\text{O-MeCN}$ , 25:75  $\rightarrow$  10:90, 30 min  $\rightarrow$  0:100, 10 min):  $R_t = 11.5$  min.

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-didesoxy-6-difluor-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin (3)**



Es wurden 208 mg (0.20 mmol) des Esters **53**, gelöst in 11 mL Trifluoressigsäure/Wasser (10:1), drei Stunden bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit 25 mL Toluol verdünnt, die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde fünfmal mit je 25 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wurde per Flashchromatographie an Kieselgel ( $\text{EtOAc} \rightarrow \text{EtOAc/MeOH/AcOH}$  10:1:0.1) gereinigt.

Ausbeute: 113 mg (55%, 0.11 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

$R_f = 0.59$  ( $\text{EtOAc/MeOH/AcOH}$ , 10:1:0.01)

$\text{C}_{54}\text{H}_{57}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_{13}$  ( $M = 999.03$  g/mol) [998.38]

**ESI-MS** (positiv),  $m/z$ : 999.38  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber.: 999.39; 1021.36  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 1021.37; 1037.34  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 1037.47.

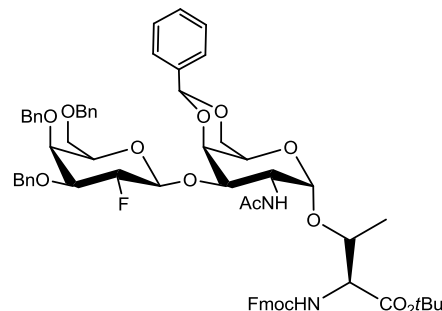
**HR-ESI-MS** (positiv),  $m/z$ : 999.3934  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber.: 999.3891.

**RP-HPLC** (Phenomenex Luna C18(2),  $\lambda = 214$  nm,  $\text{H}_2\text{O-MeCN}$ , 70:30, 5 min  $\rightarrow$  10:90, 25 min  $\rightarrow$  0:100, 30 min):  $R_t = 30.3$  min.

## Glycosylierungen des benzyliden-geschützten T<sub>N</sub>-Bausteins

### Glycosylierungen im Batch-Verfahren

*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**54**)<sup>[41]</sup>



Es wurden 616 mg (0.89 mmol) 4,6-*O*-Bzn-T<sub>N</sub> **28** und 697 mg (1.17 mmol) Bn<sub>3</sub>2Fgal-TCI **9** (beide Edukte wurden zuvor mehrere Stunden i. Vak. getrocknet) in 25 mL absol. Dichlormethan eine Stunde mit frisch aktiviertem Molsieb 4 Å bei Raumtemp. gerührt. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µL TMSOTf gestartet. Binnen 18-stündigem Rühren wurde das Gemisch langsam auf Raumtemp. erwärmt. Es wurde mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt. Nach Abtrennung des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 764 mg (76%, 0.68 mmol, α/β 1:6)

648 mg β-Anomer (65%, 0.58 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

R<sub>f</sub> = 0.50 (°Hex/EtOAc, 1:1)

C<sub>65</sub>H<sub>71</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>14</sub> (M = 1123.26 g/mol) [1122.49]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 1123.64 [M+H]<sup>+</sup>, ber.: 1123.50; 1145.63 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1145.48; 1161.61 [M+K]<sup>+</sup>, ber.: 1161.45.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 1123.4948 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1123.4967.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY), δ [ppm] = 7.79-7.74 (m, 2H, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.64 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 7.3 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.55-7.51 (m, 2H, H<sub>aromat</sub> (Bzn)), 7.43-7.22 (m, 22H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc, H<sub>aromat</sub> (Bzn, Bn)), 5.75 (d, 1H, J<sub>NH,H2</sub> = 9.1 Hz, NHAc), 5.59 (d, 1H, J<sub>NH,Tα</sub> = 9.4 Hz, NH-Fmoc), 5.50 (s, 1H, CH (Bzn)), 5.02 (d, 1H, J<sub>H1,H2</sub> = 3.4 Hz, 1-H), 4.95-4.62 (m, 5H, CH<sub>2a</sub> (Bn1) {4.92, d, J<sub>CH2,CH2</sub> = 11.6 Hz}, CH<sub>2a</sub> (Bn2) {4.78, d, J<sub>CH2,CH2</sub> = 12.2 Hz}, 2'-H {4.77}, 2-H {4.73}, CH<sub>2b</sub> (Bn2) {4.67, d,

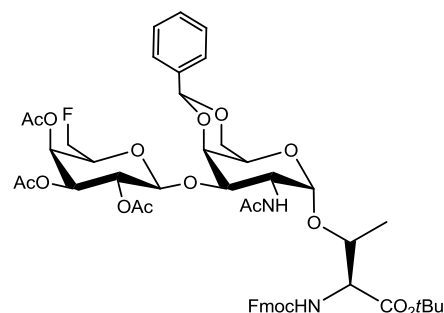
$J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 12.1 \text{ Hz}$ }), 4.61-4.54 (m, 2H,  $\text{CH}_{2b}$  (Bn1) {4.58, d,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 11.6 \text{ Hz}$ }, 1'-H {4.58}), 4.54-4.39 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ,  $\text{CH}_2$  (Bn3)), 4.35-4.12 (m, 5H, 4-H {4.32}, CH-Fmoc {4.27},  $\text{T}^\beta$  {4.24},  $\text{T}^\alpha$  {4.22}, 6<sub>a'</sub>-H {4.17}), 3.99-3.83 (m, 3H, 6<sub>b'</sub>-H {3.93}, 4'-H {3.89}, 3-H {3.88}), 3.69-3.49 (m, 5H, 5'-H {3.63}, 5-H {3.60}, 6<sub>a,b</sub>-H {3.60, 3.53}, 3'-H {3.57}), 1.99 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  (AcNH)), 1.46 (s, 9H, 3  $\times$   $\text{CH}_3$  (*t*Bu)), 1.27 (d, 3H,  $J_{\text{T}^\gamma,\text{T}^\beta} = 6.8 \text{ Hz}$ ,  $\text{T}^\gamma$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, HMQC,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 170.4, 169.9 (2  $\times$  C=O (AcNH, *t*Bu-Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.2, 137.9, 137.7, 137.6 (4  $\times$   $\text{C}_{\text{quartär}}$  (Bzn, Bn)), 128.7, 128.4, 128.4, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.1, 126.4 (20  $\times$   $\text{C}_{\text{aromatisch}}$  (Bn, Bzn), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.0, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.8 (d,  $J_{\text{C1}',\text{F2}'} = 23.2 \text{ Hz}$ , C1'), 100.8 (CH (Bzn)), 100.6 (C1), 91.2 (d,  $J_{\text{C2}',\text{F2}'} = 183.1 \text{ Hz}$ , C2'), 83.0 ( $\text{C}_{\text{quartär}}$  (*t*Bu)), 80.1 (d,  $J_{\text{C3}',\text{F2}'} = 15.9 \text{ Hz}$ , C3'), 76.6 (C3), 76.4 ( $\text{T}^\beta$ ), 75.8 (C4), 74.6 ( $\text{CH}_2$  (Bn)), 74.1 (d,  $J_{\text{C4}',\text{F2}'} = 9.0 \text{ Hz}$ , C4'), 73.5, 72.7 (2  $\times$   $\text{CH}_2$  (Bn)), 73.7 (C5), 69.1 (C6'), 68.8 (C6), 67.0 ( $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 63.7 (C5'), 59.2 ( $\text{T}^\alpha$ ), 48.0 (C2), 47.2 (CH-Fmoc), 28.1 ( $\text{CH}_3$  (*t*Bu)), 23.4 ( $\text{CH}_3$  (AcNH)), 19.1 ( $\text{T}^\gamma$ ).

$^{19}\text{F-NMR}$  (376.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = -204.3 (dd,  $J_{\text{F2}',\text{H2}} = 51.7 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{F2}',\text{H3}} = 10.9 \text{ Hz}$ , F2').

**RP-HPLC** (PerfectSil C18(2),  $\lambda = 214 \text{ nm}$ ,  $\text{H}_2\text{O-MeCN}$ , 25:75  $\rightarrow$  10:90, 30 min  $\rightarrow$  0:100, 10 min):  $R_t = 16.0 \text{ min}$ .

***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-desoxy-6-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (55)**



Eine Lösung aus 500 mg (0.73 mmol) 4,6-*O*-Bzn- $\text{T}_N$  **28** und 498 mg (1.10 mmol)  $\text{Ac}_3\text{6FGal-TCl}$  **7** (beide Edukte wurden zuvor mehrere Stunden i. Vak. getrocknet) in 25 mL absol. Dichlormethan wurde eine Stunde mit frisch aktiviertem Molsieb 4 Å bei Raumtemp. gerührt. Zum Starten der Reaktion wurden 20  $\mu\text{L}$  TMSOTf zugegeben und es

wurde weitere drei Stunden bei Raumtemp. gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Es wurde durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Produkt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 2:3) isoliert.

Ausbeute: 325 mg (89%, 0.33 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

$R_f = 0.32$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:3)

$C_{50}H_{59}FN_2O_{17}$  (M = 979.01 g/mol) [979.01]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 1001.37 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1001.37; 1017.35 [M+K]<sup>+</sup>, ber.: 1017.35.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 1001.3658 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1001.3695.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY), δ [ppm] = 7.79 (d, 2H,  $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.2$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2H,  $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.5$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.57-7.52 (m, 2H, H<sub>aromatisch</sub> (Bzn)), 7.45-7.29 (m, 7H, 2-H, 3-H-, 6-H, 7-H-Fmoc, H<sub>aromatisch</sub> (Bzn)), 5.96-5.88 (m, 1H, NHAc), 5.55 (s, 1H, CH-Bzn), 5.46 (d, 1H,  $J_{NH,T\alpha} = 8.9$  Hz, NH-Fmoc), 5.40-5.38 (m, 1H, 4'-H), 5.28-5.18 (m, 1H, 2'-H), 4.98-4.90 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 4.75 (d, 1H,  $J_{H_1',H_2'} = 7.2$  Hz, 1'-H), 4.67-4.60 (m, 1H, 2-H), 4.51-4.33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, 6<sub>a</sub>'-H, 4-H), 4.31-4.19 (m, 5H, 6<sub>b</sub>'-H, CH-Fmoc, T<sup>α</sup>, 6<sub>a</sub>-H, T<sup>β</sup>), 4.15-4.04 (m, 2H, 6<sub>b</sub>-H, 5'-H), 3.89 (d, 1H,  $J_{H_3,H_2} = 9.1$  Hz, 3-H), 3.69 (s, 1H, 5-H), 2.15, 2.07, 2.04, 1.97 (s, 12H, 4 × CH<sub>3</sub> (Ac, AcNH)), 1.45 (s, 9H, 3 × CH<sub>3</sub> (tBu)), 1.29 (d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$  Hz, T<sup>γ</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, HMQC, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = 170.5 (C=O (AcNH)), 170.2, 170.0, 170.0 (3 × C=O (OAc, Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.6 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 137.5 (C<sub>quartär</sub> (Bzn)), 128.5, 128.3, 128.1, 127.9, 127.8, 127.6, 127.1, 126.5 (5 × C<sub>aromatisch</sub> (Bzn), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.0, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C-5-Fmoc), 101.6 (C1), 100.6 (CH (Bzn)), 100.1 (C1), 83.2 (C<sub>quartär</sub> (tBu)), 81.1 (d,  $J_{C_6',F_6'} = 172.1$  Hz, C6'), 77.2 (T<sup>β</sup>), 75.4 (C4), 75.2 (C3), 70.9 (d,  $J_{C_5',F_6} = 23.7$  Hz, C5'), 70.3 (C3), 69.5 (C6), 68.6 (C2'), 67.6 (d,  $J_{C_4',F_6'} = 5.1$  Hz, C4), 66.9 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 64.0 (C5), 59.0 (T<sup>α</sup>), 48.1 (C2), 47.2 (CH-Fmoc), 28.1 (CH<sub>3</sub> (tBu)), 20.9, 20.7, 20.6, 20.0 (4 × CH<sub>3</sub> (Ac, AcNH)), 18.7 (T<sup>γ</sup>).

**<sup>19</sup>F-NMR** (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = -228.9 – -228.3 (m, F6'), -229.7 (dt,  $J_{F_6,H_5} = 13.3$  Hz,  $J_{F_6,H_6} = 46.7$  Hz, F6' (Rotamer)), -231.8 (dt,  $J_{F_6,H_5} = 14.0$  Hz,  $J_{F_6b,H_6} = 46.3$  Hz, F6' (Rotamer)).

**RP-HPLC** (PerfectSil C18(2), λ = 214 nm, H<sub>2</sub>O-MeCN, 30:70 → 15:85, 30 min → 0:100, 10 min): R<sub>t</sub> = 7.1 min.

## Glycosylierungen im Durchflussreaktor

### Allgemeiner Aufbau:

Für die mikroreaktorunterstützten Glycosylierungen wurden als Pumpen ein Perfusor V der Firma *Braun*, Melsungen, beziehungsweise eine PHD 2000 Infusion des Herstellers *Harvard Apparatus*, Holliston (USA), sowie als Mischelement ein SIMM-V2 der Firma *IMM*, Mainz, verwendet. Nach Passieren des Mikromischers wurde als Verweilschleife eine Teflonkapillare (Durchmesser: 1/16 Zoll) mit einem Gesamtvolumen von 3 mL durchlaufen. Die Temperierung von Mischer und Verweilschleife erfolgte bei niedrigen Temperaturen in einem Aceton-Kältebad mit einem FT-402-Kryostaten der Firma *Julabo*, Seelbach, und bei Reaktionen über Raumtemperatur in einem C6-Thermostaten der Firma *Lauda*, Lauda-Königshofen.

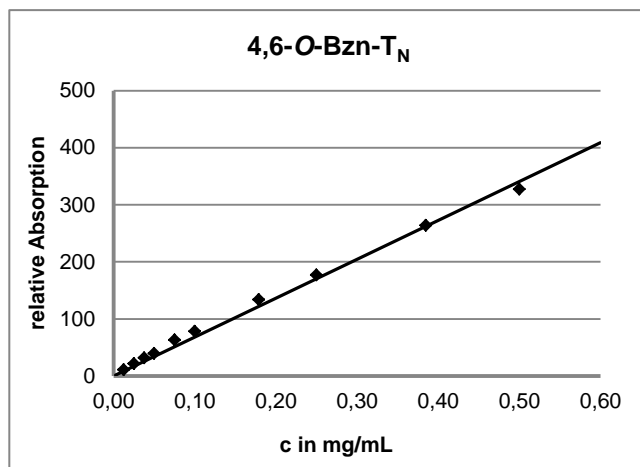
### Standardprotokoll:

Es wurden 1.0 Äquivalente des Glycosylakzeptors und 2.5 Äquivalente des Galactosyldonors mehrere Stunden am Hochvakuum getrocknet, bevor sie getrennt in absol. Dichlormethan gelöst wurden. Die Lösung des Akzeptors wurde mit 0.3 Äquivalenten des Promotors versetzt und beide Lösungen wurden in Omnifix<sup>®</sup>-Spritzen der Firma *Braun*, Melsungen, aufgezogen. Die Spritzen wurden in die Pumpe eingespannt und durch Festlegen der Flussrate wurde die Verweilzeit in der Reaktionsschleife eingestellt. Nach Verlassen der Schleife wurde die Reaktion durch Eintropfen in eine ges. Natriumchlorid-Lösung abgebrochen. Die organische Phase wurde abgetrennt und unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt. Die Zusammensetzung des Rohproduktes wurde mittels HPLC quantitativ bestimmt.

### Kalibrierung:

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen der Mikroreaktorversuche und Quantifizierung mittels HPLC wurde anhand von Verdünnungsreihen die Abhängigkeit der relativen UV-Absorption von der Konzentration der Edukte beziehungsweise der Produkte bestimmt. Die UV-Absorption wurde hierbei über die Peakfläche bestimmt.

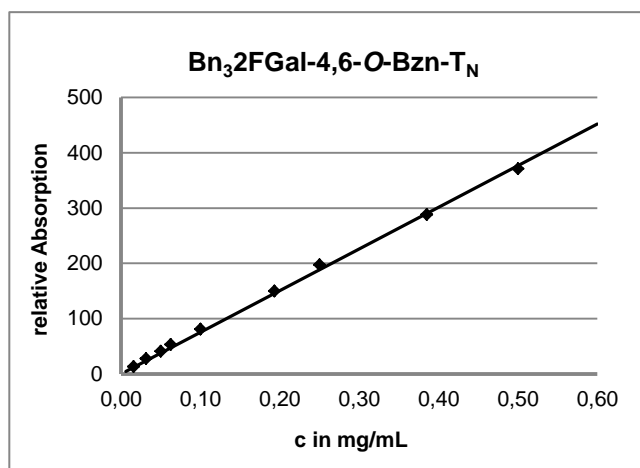
*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**28**):



c in mg/mL	Absorption
0.0125	11.0
0.0250	21.3
0.0375	31.7
0.0500	39.4
0.0750	63.0
0.1000	77.9
0.1790	133.9
0.2500	176.9
0.3850	263.8
0.5000	327.0

Abb. 5.1 Kalibrierung mit 4,6-*O*-Bzn- $T_N$ .

*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**54**):



c in mg/mL	Absorption
0.0157	12.6
0.0313	27.5
0.0500	40.4
0.0625	52.9
0.1000	80.3
0.1930	149.5
0.2500	196.7
0.3850	287.7
0.5000	370.7

Abb. 5.2 Kalibrierung mit Bn<sub>3</sub>2FGal-4,6-*O*-Bzn- $T_N$ .



*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-desoxy-6-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**55**):

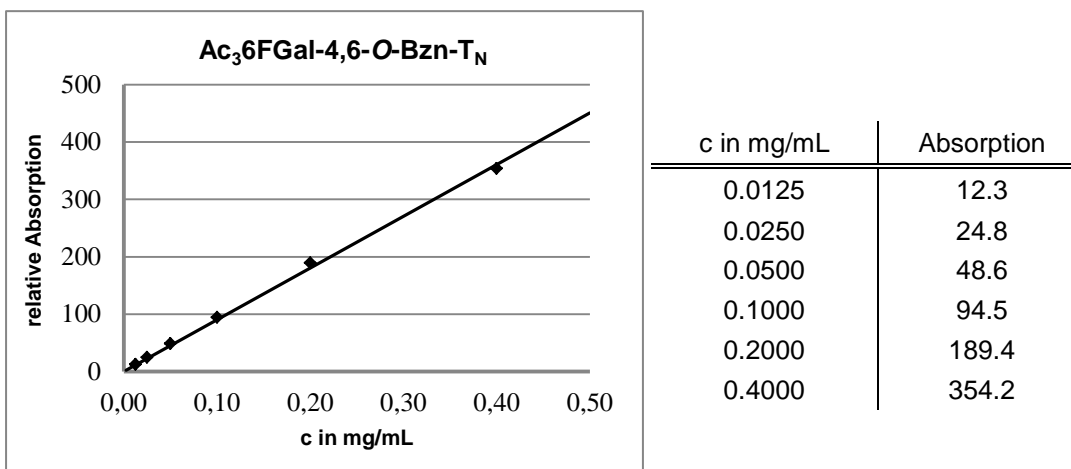
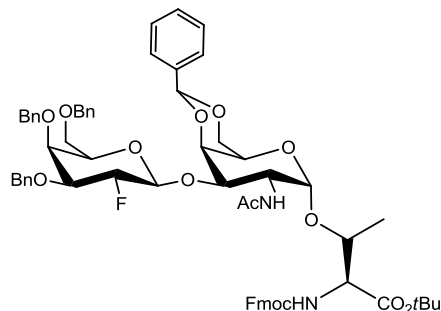


Abb. 5.3 Kalibrierung mit  $Ac_36FGal-4,6-O-Bzn-T_N$ .

*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**54**)



#### Optimierung der Reaktionsparameter:

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen erfolgte nach dem Standardprotokoll. Es wurden 20.0 mg (0.03 mmol) des Akzeptors **28** mit 48.0 mg (0.08 mmol) des Donors **9** unter Zusatz von 1.5  $\mu$ L TMSOTf bei unterschiedlichen Temperaturen und Verweilzeiten zur Reaktion gebracht. Die Ausbeuten wurden mittels HPLC bestimmt.

Reaktionszeit	T in °C	Ausbeute in %	$\alpha/\beta$	$\beta$ in %
22.5 min	-10	35	1:8	31
	0	28	1:8	25
	10	24	2:9	20
	25	25	1:3	19
45.0 min	-10	47	1:6	40
	-5	42	1:7	37
	0	52	1:5	44
	10	42	1:4	37
	25	49	1:3	36
90.0 min	-10	45	1:8	40
	-5	55	1:9	50
	0	72	1:6	60
	8	64	2:7	50
	25	73	3:7	52

Tab. 5.1 Screening der Glycosylierung zum  $Bn_32FGal-4,6-O-Bzn-T_N$ .

### Optimierung des Lösungsmittels:

Nach dem Standardprotokoll wurde bei einer Reaktionszeit von 90 Minuten und einer Temperatur von 0 °C das Lösungsmittel variiert.

Solvens	Ausbeute in %	$\alpha/\beta$	$\beta$ in %
Acetonitril	6	0:1	6
Tetrahydrofuran	15	5:1	3
1,2-Dichlorethan	33	1:6	28

Tab. 5.2 Variation des Lösungsmittels.

### Alternativer Promotor:

Nach dem Standardprotokoll wurde bei einer Reaktionszeit von 90 Minuten die Reaktion mit Bortrifluorid-Etherat ( $BF_3 \times Et_2O$ ) als Promotor durchgeführt.

T in °C	Ausbeute in %	$\alpha/\beta$	$\beta$ in %
0	39	1:5	32
25	38	1:2	25

Tab. 5.3  $BF_3 \times Et_2O$  als Promotor.

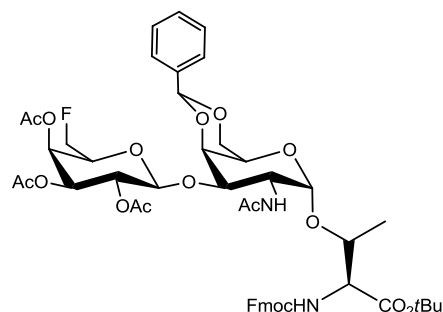
### Präparativer Ansatz im Mikroreaktor:

Es wurde nach dem Standardprotokoll verfahren, wobei eine Lösung von 100 mg (0.15 mmol) des Akzeptors **28** und 10  $\mu$ L TMSOTf in 8 mL absol. Dichlormethan sowie eine Lösung von 240 mg (0.40 mmol) des Donors **9** in 8 mL absol. Dichlormethan im Mikroreaktor umgesetzt wurden. Nach Abbruch der Reaktion durch Einleiten in eine ges. Natriumchlorid-Lösung wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel ( $^{\circ}$ Hex/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 112 mg (71%, 0.10 mmol,  $\alpha/\beta$  1:7)

100 mg  $\beta$ -Anomer (61%, 0.09 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

### *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-desoxy-6-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**55**)



### Optimierung der Reaktionsparameter:

Die Optimierung der Reaktionstemperatur erfolgte ebenfalls mithilfe des Standardprotokolls. Es wurden 20 mg (0.03 mmol) des Akzeptors **28** mit 36 mg (0.08 mmol) des Donors **7** unter Zusatz von 1.5  $\mu$ L TMSOTf bei unterschiedlichen Temperaturen zur Reaktion gebracht. Die Ausbeuten wurden mittels HPLC bestimmt.

Reaktionszeit in min	T in $^{\circ}$ C	Ausbeute in %	Orthoester/ Produkt
90	0	36	0:1
90	10	34	11:6
90	25	47	3:7
90	30	48	1:11
120	30	50	9:34

Tab. 5.4 Screening der Glycosylierung zum *Ac*<sub>3</sub>*6FGal-4,6-O-Bzn-T<sub>N</sub>*.

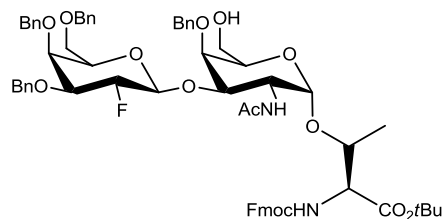
Um höhere Reaktionstemperaturen zu ermöglichen wurde 1,2-Dichlorethan als Lösungsmittel eingesetzt.

Reaktionszeit in min	T in °C	Ausbeute in %	Orthoester/ Produkt
90	45	19	0:1

Tab. 5.5 Variation des Lösungsmittels.

## Regioselektive Acetalöffnung an T-Antigen-Bausteinen

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4-benzyl-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (60)**



### Variante A:<sup>[198]</sup>

Eine Lösung aus 24.0 mg (0.02 mmol)  $\text{Bn}_3\text{2FGal-Bzn-T}_\text{N}$  **54** in 2 mL absol. Dichlormethan wurde mit 20.0  $\mu\text{L}$  (20.0  $\mu\text{mol}$ ) einer Boran-THF-Lösung (1 M) versetzt und eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde eine Spatelspitze Kupfer(II)-triflat zugegeben und weitere 35 Minuten bei derselben Temperatur gerührt. Aufgrund fehlenden Umsatzes wurden weitere 10.0  $\mu\text{L}$  (10.0  $\mu\text{mol}$ ) der Boran-THF-Lösung (1 M) zugegeben und es wurde weitere 30 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde mit einem Tropfen Triethylamin beendet und das Reaktionsgemisch wurde i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde per HPLC-MS untersucht.

### Variante B:<sup>[133]</sup>

Es wurden 200 mg (0.18 mmol)  $\text{Bn}_3\text{2FGal-Bzn-T}_\text{N}$  **54** (zuvor mehrere Stunden im Vakuum getrocknet) in 20 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 100 mg frisch aktiviertem Molsieb 4 Å eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Nach Kühlen der Suspension auf  $-78^\circ\text{C}$  wurden sukzessive 150  $\mu\text{L}$  (0.90 mmol) Triethylsilan und 79.2  $\mu\text{L}$  (0.61 mmol) Dichlorphenylboran zugegeben und es wurde eine Stunde bei gleicher Temperatur gerührt. Die Reaktion wurde bei  $-78^\circ\text{C}$  mit 1 mL MeOH abgebrochen. Das Gemisch wurde

sukzessive mit 10 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 10 mL verd. Salzsäure (1 M) und 10 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Produkt wurde per Flashchromatographie an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:2) isoliert.

Ausbeute: 168 mg (83%, 0.15 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = +10.6 (c = 1.00, \text{CHCl}_3).$$

R<sub>f</sub> = 0.34 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:1).

C<sub>65</sub>H<sub>73</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>14</sub> (M = 1125.28 g/mol) [1124.50]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 1125.62 [M+H]<sup>+</sup>, ber.: 1125.51; 1147.59 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1147.49; 1163.57 [M+K]<sup>+</sup>, ber.: 1163.47.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 1147.4971 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1147.4944.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY), δ [ppm] = 7.79-7.73 (m, 2H, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.64 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 7.4 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.42-7.20 (m, 24H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc, H<sub>aromatisch</sub> (Bn)), 5.91 (bs, 1H, NHAc), 5.61 (d, 1H, J<sub>NH,Tα</sub> = 8.1 Hz, NH-Fmoc), 5.01-4.64 (m, 8H, CH<sub>2a</sub> (Bn1) {4.99, d, J<sub>CH2,CH2</sub> = 11.4 Hz}, CH<sub>2a</sub> (Bn2) {4.97}, 1-H {4.92}, 2'-H {4.82}, CH<sub>2a</sub> (Bn3) {4.81, d, J<sub>CH2,CH2</sub> = 12.1 Hz}, 2-H {4.77}, CH<sub>2b</sub> (Bn2) {4.75}, CH<sub>2b</sub> (Bn3) {4.69, d, J<sub>CH2,CH2</sub> = 12.1 Hz}), 4.63-4.51 (m, 2H, 1'-H {4.60}, CH<sub>2b</sub> (Bn1) {4.56, d, J<sub>CH2,CH2</sub> = 11.5 Hz}), 4.51-4.31 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Fmoc {4.47}, CH<sub>2</sub> (Bn4)), 4.27 (t, 1H, J<sub>CH,CH2</sub> = 6.8 Hz, CH-Fmoc), 4.24-4.08 (m, 2H, T<sup>α</sup> {4.22}, T<sup>β</sup> {4.19}), 3.98-3.87 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.81-3.50 (m, 7H, 3-H, 3'-H, 5-H, 4-H, 6<sub>a</sub>-H, 6<sub>a,b'</sub>-H), 3.41 (dd, 1H, J<sub>H6b,H5</sub> = 5.0 Hz, J<sub>H6b,H6a</sub> = 11.4 Hz, 6<sub>b</sub>-H), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (AcNH)), 1.93 (bs, 1H, OH), 1.45 (s, 9H, 3 × CH<sub>3</sub> (tBu)), 1.29-1.19 (m, 3H, T<sup>γ</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HMQC), δ [ppm] = 170.6, 170.0 (2 × C=O (AcNH, tBu-Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.4, 138.3, 138.0, 137.5 (4 × C<sub>quartär</sub> (Bn)), 129.1, 129.0, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.1 (20 × C<sub>aromatisch</sub> (Bn), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 103.3 (d, J<sub>C1',F2'</sub> = 24.1 Hz, C1'), 100.2 (C1), 92.0 (d, J<sub>C2',F2'</sub> = 183.8 Hz, C2'), 83.0 (C<sub>quartär</sub> (tBu)), 80.0 (d, J<sub>C3',F2'</sub> = 15.9 Hz, C3'), 80.0 (C3), 76.2 (T<sup>β</sup>), 74.7 (C5'), 74.7 (CH<sub>2</sub> (Bn)), 74.3 (d, J<sub>C4',F2'</sub> = 9.1 Hz, C4'), 73.6, 73.6 (2 × CH<sub>2</sub> (Bn)), 73.5 (C4), 72.7 (CH<sub>2</sub> (Bn)), 70.9 (C5), 68.5 (C6'), 67.0 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 62.4 (C6), 59.1 (T<sup>α</sup>), 48.5 (C2), 47.2 (CH-Fmoc), 28.0 (CH<sub>3</sub> (tBu)), 23.2 (CH<sub>3</sub> (AcNH)), 18.9 (T<sup>γ</sup>).

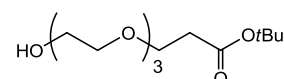
**<sup>19</sup>F-NMR** (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = -204.3 (dd,  $J_{F2',H3} = 12.2$  Hz,  $J_{F2',H2} = 51.7$  Hz, F2').

**RP-HPLC** (PerfectSil C18(2), λ = 214 nm, H<sub>2</sub>O-MeCN, 25:75 → 10:90, 30 min → 0:100, 10 min): R<sub>t</sub> = 11.8 min.

## 5.5 Synthesen der Glycopeptide und Proteinkonjugate

### Synthese des Ethylenglykol-Spacers

#### 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (64)<sup>[135]</sup>



Zu einer Lösung von 26.0 mL (0.19 mol) wasserfreiem Triethylenglykol in 100 mL absol. Tetrahydrofuran wurden 45.0 mg (1.96 mmol) Natrium gegeben und es wurde so lange gerührt, bis kein Natrium mehr zu sehen war. Anschließend wurden 9.60 mL (66.0 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester zugegeben und das Gemisch wurde 21 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 1.60 mL verd. Salzsäure (1 M) neutralisiert und die Lösung wurde i. Vak. soweit wie möglich eingengt. Der Rückstand wurde in 70 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung aufgenommen, es wurde dreimal mit je 50 mL Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit 30 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 13.8 g (75%, 49.5 mol), farbloser, amorpher Feststoff

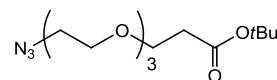
$R_f = 0.27$  (EtOAc).

$C_{13}H_{26}O_6$  (M = 278.34 g/mol) [278.17]

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  [ppm] = 3.74-3.58 (m, 14H,  $CH_2OH$ ), 2.52-2.46 (m, 2H,  $CH_2-CO_2tBu$ ), 1.44-1.42 (m, 9H,  $3 \times CH_3$  (*tBu*)).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[136]</sup>

### 12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (65)<sup>[28,199]</sup>



Es wurden 13.6 g (48.7 mmol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**64**) in 20 mL absol. Dichlormethan gelöst, mit 17.7 mL (0.13 mol) Triethylamin versetzt und die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 8.20 mL (0.11 mol) Mesylchlorid zugetropft, das Gemisch wurde auf Raumtemp. erwärmt und es wurde weitere 4.5 Stunden gerührt. Nach Absaugen durch *Hyflo*<sup>®</sup> wurde sukzessive mit 75 mL Eiswasser und 75 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 25 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst und es wurden 19.5 g (0.30 mol) Natriumazid zugegeben. Nach 18-stündigem Rühren bei 60 °C wurde erneut das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde in 65 mL Wasser aufgenommen. Es wurde fünfmal mit je 50 mL Essigester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und der Essigester wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Produkt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 10.1 g (69%, 33.4 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

$R_f = 0.25$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 3:1).

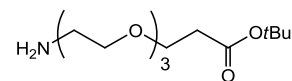
$C_{13}H_{25}N_3O_5$  (M = 303.35 g/mol) [303.18]

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = 3.73-3.57 (m, 12H, CH<sub>2</sub>OH), 3.37 (t, 2H,  $J_{CH_2,CH_2} = 5.1$  Hz, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.49 (t, 2H,  $J_{CH_2,CH_2} = 6.6$  Hz, CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>*t*Bu), 1.44-1.42 (m, 9H, 3 × CH<sub>3</sub> (*t*Bu)).

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2868 (C-H), 2101 (N<sub>3</sub>), 1726 (C=O), 1455, 1366 (C-H), 1253, 1112 (C-O).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[199]</sup>



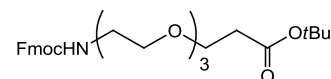
**12-Amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (66)**<sup>[28,199]</sup>

Eine Suspension von 8.49 g einer Ni-Al-Legierung in 250 mL Wasser wurde so lange mit fester Natronlauge versetzt, bis kein Schäumen mehr zu beobachten war. Nach 30-minütigem Erhitzen auf 70 °C wurde die überstehende Lösung vom gebildeten Raney-Nickel dekantiert. Der Katalysator wurde mit Wasser neutral gewaschen und im Anschluss mit Isopropanol getrocknet. Das Azid **65**, gelöst in 80 mL Isopropanol, wurde zur Katalysator-Suspension gegeben, und durch mehrfaches Evakuieren und Belüften des Kolbens mit Argon wurde das Gemisch von Sauerstoff befreit. Nach dem letzten Evakuierungsvorgang wurde mit Wasserstoff belüftet und das Gemisch wurde drei Tage bei Raumtemp. unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Suspension wurde durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Rohausbeute: 9.27 g (quant., 33.4 mmol), gelbliches Öl

C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub> (M = 277.36 g/mol) [277.19]

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[199]</sup>

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (67)**<sup>[196]</sup>

Zu einer Lösung von 9.27 g (33.4 mmol) des rohen Amins **66** in 300 mL eines Aceton/Wasser-Gemisches (1:1) wurden 2.81 g (33.4 mmol) festes Natriumhydrogencarbonat sowie portionsweise 11.3 g (33.7 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-succinimidylcarbonat gegeben und die Suspension wurde zwei Tage bei Raumtemp. gerührt. Nach dem Ansäuern der mittlerweile klaren Lösung mit halbkonzentrierter Salzsäure (pH = 6) wurde das Aceton i. Vak. abdestilliert. Der wässrige Rückstand wurde viermal mit je 75 mL Dichlormethan ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen wurden mit 150 mL verd. Salzsäure (1 M) ausgeschüttelt und es wurde mit 150 mL Wasser

neutral gewaschen. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 8.50 g (51% bzgl. **65**, 17.0 mmol), gelbes Öl

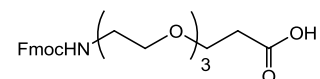
R<sub>f</sub> = 0.28 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1).

C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>7</sub> (M = 499.60 g/mol) [499.26]

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, J<sub>H4,H2</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = 7.5 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 7.3 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H, J<sub>H3,H4</sub> = J<sub>H6,H5</sub> = 7.2 Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.34-7.28 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.42 (bs, 1H, NH-Fmoc), 4.40 (d, 2H, J<sub>CH2,CH</sub> = 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.22 (t, 1H, J<sub>CH,CH2</sub> = 7.0 Hz, CH-Fmoc), 3.69 (t, 2H, J<sub>H8,H7</sub> = 6.6 Hz, 11-CH<sub>2</sub>), 3.66-3.52 (m, 10H, CH<sub>2</sub>OH), 3.44-3.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH-Fmoc), 2.49 (t, 2H, J<sub>CH2,CH2</sub> = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>*t*Bu), 1.43 (s, 9H, 3 × CH<sub>3</sub> (*t*Bu)).

Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[196]</sup>

### *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadodecansäure (**63**)<sup>[196]</sup>



Eine Lösung von 8.32 g (16.7 mmol) des Esters **67** in 71.5 mL eines Trifluoressigsäure/Wasser-Gemisches (10:1) wurde zwei Stunden bei Raumtemp. gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 70 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde noch fünfmal mit je 30 mL Toluol und dreimal mit je 30 mL Dichlormethan kodestilliert, bevor das Produkt per Flashchromatographie an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH 40:1:0.5) isoliert wurde.

Ausbeute: 6.87 g (93%, 15.5 mmol), gelbes Öl

R<sub>f</sub> = 0.37 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH, 40:1:0.5).

C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>7</sub> (M = 443.49 g/mol) [443.19]

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, J<sub>H4,H2</sub> = J<sub>H5,H6</sub> = 7.5 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60 (d, 2H, J<sub>H1,H2</sub> = J<sub>H8,H7</sub> = 7.5 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.39 (t, 2H, J<sub>H3,H4</sub> = J<sub>H6,H5</sub> = 7.3 Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.35-7.27 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.51 (bs, 1H, NH-Fmoc), 4.41 (d, 2H, J<sub>CH2,CH</sub> = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.28-4.17 (m, 1H, CH-Fmoc), 3.78-3.48 (m,

12H, CH<sub>2</sub>OH), 3.46-3.28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH-Fmoc), 2.60 (t, 2H,  $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 5.9$  Hz, CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H).

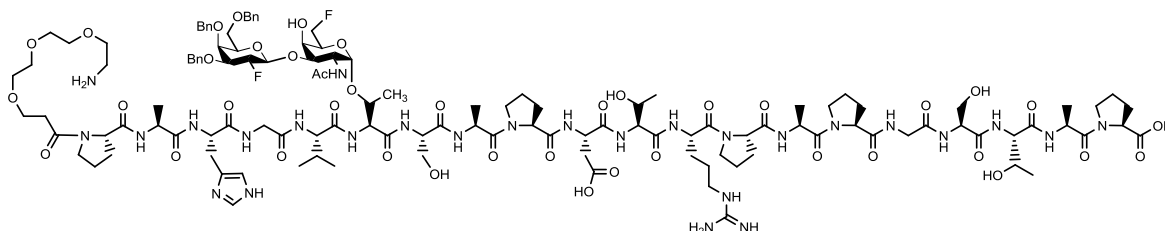
Weitere analytische Daten sind der Literatur zu entnehmen.<sup>[196]</sup>

## Synthese der Glycopeptide und der Glycopeptidkonjugate

### Standardprotokoll der automatisierten Festphasensynthese:

Jeder Kupplungszyklus wurde mit der Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe durch dreimaliges Schütteln für 2.5 Minuten mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin-2-on (NMP) eingeleitet. Die Kupplung der jeweiligen Aminosäure (1.0 mmol, 10 Äquivalente bezüglich Harz) erfolgte mit HOBt (1.0 mmol), HBTU (1.0 mmol) und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA, 2.0 mmol) in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) unter kräftigem Schütteln (20-30 Minuten). Im Anschluss wurden noch freie Aminogruppen unter Verwendung einer Lösung aus Acetanhydrid (Ac<sub>2</sub>O, 0.5 M), DIPEA (0.125 M) und HOBt (0.015 M) in NMP (*Capping*-Reagenz) acetyliert. Das Harz wurde nach jedem Teilschritt mit NMP gewaschen, sowie nach Abschluss der Synthese zusätzlich mit Dichlormethan gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

**Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -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-proline (71)**<sup>[43]</sup>



Die Peptidsynthese erfolgte automatisiert nach dem Standardprotokoll an 417 mg (0.10 mmol) eines Fmoc-Pro-*O*-Trt-Tentagel S-Harzes (Beladung: 0.24 mmol/mg). Die fluoridierte Glycosylaminosäure **1** wurde halbautomatisch im Peptidsynthesizer angebunden. Dazu wurden 173 mg (1.80 Äquivalente) der Glycosylaminosäure **1**, 80.3 mg HATU und 28.7 mg HOAt (je 1.2 Äquivalente bezüglich der Glycosylaminosäure) in 2 mL NMP gelöst und zur Aktivierung mit 46.4  $\mu$ L *N*-Methylmorpholin (2.4 Äquivalente bezüglich der Glycosylaminosäure) versetzt. Die Kupplungszeit betrug acht Stunden, wobei wechselweise 30 Sekunden geschüttelt und 30 Sekunden stehengelassen wurde. Die darauffolgende Aminosäure Fmoc-Val-OH wurde ohne Acetylierungsschritt doppelt gekuppelt. Die verbleibenden Aminosäuren und der Spacer **63** wurden erneut nach dem Standardprotokoll angebunden. Zur Abspaltung vom Harz und zur globalen Deblockierung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wurde das Harz in einen *Merrifield*-Reaktor überführt und drei Stunden mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) geschüttelt. Anschließend wurde abgesaugt und es wurde dreimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure und viermal mit je 5 mL Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand wurde dreimal mit je 10 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wurde mit wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

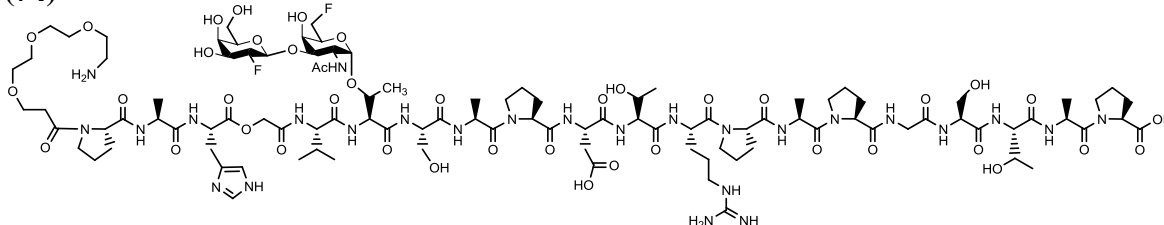
Rohausbeute: 252 mg (90%, 0.09 mmol), blassgelber Feststoff

C<sub>124</sub>H<sub>183</sub>F<sub>2</sub>N<sub>27</sub>O<sub>40</sub> (M = 2729.93 g/mol) [2728.31]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 910.83 [M+3H]<sup>3+</sup>, ber.: 910.44; 918.15 [M+2H+Na]<sup>3+</sup>, ber.: 917.77; 925.16 [M+H+2Na]<sup>3+</sup>, ber.: 925.10; 932.48 [M+3Na]<sup>3+</sup>, ber.: 932.43; 1365.73 [M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 1365.16; 1376.71 [M+H+Na]<sup>2+</sup>, ber.: 1376.15; 1387.72 [M+2Na]<sup>2+</sup>, ber.: 1387.14.

**RP-HPLC** (Phenomenex Luna C18(2),  $\lambda$  = 214 nm, H<sub>2</sub>O-MeCN + 0.1% TFA, 95:5  $\rightarrow$  75:25, 30 min  $\rightarrow$  100:0, 10 min): R<sub>t</sub> = 35.2 min.

**Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3-*O*-[2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -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-proline (74)<sup>[43]</sup>**



Es wurden 252 mg (0.09 mmol) des rohen Peptides **71** in 50 mL Methanol gelöst und der Kolben wurde sechsmal wechselweise evakuiert bzw. mit Argon belüftet. Daraufhin wurden 15.0 mg (0.07 mmol) Palladium(II)-acetat zugegeben und die Argonatmosphäre wurde durch Wasserstoff ausgetauscht. Nach zwei Tagen Rühren bei Raumtemperatur wurde die Suspension durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt und das Methanol wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 46.0 mg (22%, 0.02 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = -88.5 \text{ (c = 1.00, H}_2\text{O)}$$

C<sub>103</sub>H<sub>163</sub>F<sub>2</sub>N<sub>26</sub>O<sub>41</sub> (M = 2459.54 g/mol) [2458.14]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 820.75 [M+3H]<sup>3+</sup>, ber.: 820.40; 1230.11 [M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 1230.09.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 1230.0884 [M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 1230.0916.

**MALDI-TOF-MS** (DHB, positiv), m/z: 2460.03 [M+H]<sup>+</sup>, ber.: 2459.18.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O, COSY, TOCSY, NOESY),  $\delta$  [ppm]: 8.62 (d, 1H,  $J_{\text{H}\epsilon, \text{H}\delta} = 1.3$  Hz, H <sup>$\epsilon$</sup> ), 7.32 (s, 1H, H <sup>$\delta$</sup> ), 5.04 (d, 1H,  $J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.7$  Hz, 1-H), 4.75-4.50 (m, 11H, D <sup>$\alpha$</sup>  {4.74}, 1'-H {4.72}, H <sup>$\alpha$</sup>  {4.70}, 6<sub>a,b</sub>-H {4.70, 4.58}, T <sup>$\alpha^*$</sup>  {4.68}, R <sup>$\alpha$</sup>  {4.65}, A<sub>(3,4)</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.61, q,  $J_{\text{A}3,4\alpha, \text{A}3,4\beta} = 7.1$  Hz}, S<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.53, t,  $J_{\text{S}1\alpha, \text{S}1\beta} = 5.4$  Hz}, A<sub>4</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.56}), 4.49-4.18 (m, 15H, S<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.47}, P<sub>(1-5)</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.44, 4.40, 4.38, 4.36}, T<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.36}, T <sup>$\beta^*$</sup>  {4.34}, V <sup>$\alpha$</sup>  {4.32}, T<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.31}, A<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.26}, 2-H {4.24}, T<sub>(1,2)</sub> <sup>$\beta$</sup>  {4.22, 4.20}, 4'-H {4.21}), 4.38-4.22 (m, 1H, 2'-H), 4.08-3.55 (m, 37H, 3-H {4.06}, G<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {3.99}, 4-H {3.97}, G<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {3.96}, 3'-H {3.90}, S<sub>1</sub> <sup>$\beta$</sup>  {3.88}, 5-H {3.87}, P<sub>(1-5)</sub> <sup>$\delta$</sup>  {3.84, 3.81, 3.68, 3.63, 3.59}, S<sub>2</sub> <sup>$\beta$</sup>  {3.78}, 3<sub>a,b</sub>-H, 5<sub>a,b</sub>-H, 6<sub>a,b</sub>-H, 8<sub>a,b</sub>-H, 9<sub>a,b</sub>-H, 11<sub>a,b</sub>-H (Spacer) {3.78, 3.75, 3.72, 3.70, 3.67}, 6'<sub>a,b</sub>-H {3.75}, 5'-H {3.69}), 3.38-3.31 (m, 1H, H <sup>$\beta$ a</sup>), 3.31-3.14 (m, 5H, R <sup>$\delta$</sup>  {3.21}, 12<sub>a,b</sub>-H (Spacer) {3.20}, H <sup>$\beta$ b</sup> {3.19}), 3.02-2.85 (m, 2H, D <sup>$\beta$ a</sup> {2.97}, D <sup>$\beta$ b</sup> {2.91}), 2.81-2.61 (m, 2H, 2<sub>a,b</sub>-H

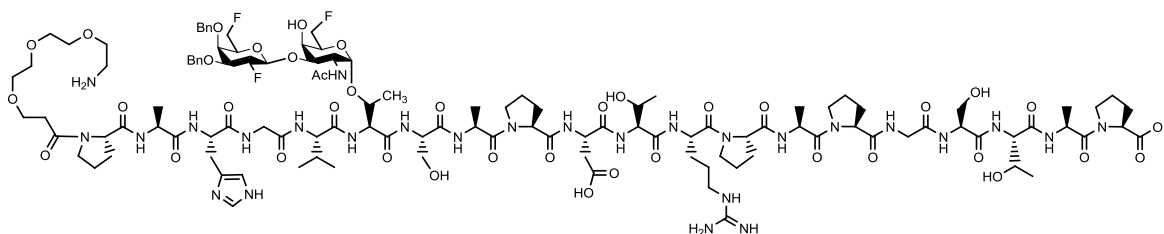
(Spacer)), 2.39-2.20 (m, 4H,  $P_{(1,2)}^{\beta}$  {2.32, 2.28}), 2.12-1.80 (m, 21H,  $V^{\beta}$  {2.09},  $P_{(1-5)}^{\gamma}$  {2.08, 2.05, 2.02, 1.98},  $P_{(3-5)}^{\beta}$  {2.04, 1.94, 1.88},  $\text{CH}_3$  (AcNH) {1.99},  $R^{\beta a}$  {1.83}), 1.77-1.69 (m, 3H,  $R^{\beta b}$  {1.72},  $R^{\gamma}$  {1.67}), 1.37 (d, 3H,  $J_{A4\beta, A4\alpha} = 6.9$  Hz,  $A_4^{\beta}$ ), 1.37 (d, 6H,  $J_{A2,3\beta, A2,3\alpha} = 7.1$  Hz,  $A_{2,3}^{\beta}$ ), 1.33 (d, 3H,  $J_{A1\beta, A1\alpha} = 7.2$  Hz,  $A_1^{\beta}$ ), 1.26 (d, 3H,  $J_{T1\gamma, T1\beta} = 6.2$  Hz,  $T1^{\gamma*}$ ), 1.20 (d, 3H,  $J_{T1\gamma, T1\beta} = 6.5$  Hz,  $T_1^{\gamma}$ ), 1.18 (d, 3H,  $J_{T2\gamma, T2\beta} = 6.5$  Hz,  $T_2^{\gamma}$ ), 0.98 (d, 3H,  $J_{V\gamma a, V\beta} = 5.7$  Hz,  $V^{\gamma a}$ ), 0.96 (d, 3H,  $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.4$  Hz,  $V^{\gamma b}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , DEPT, HMQC),  $\delta$  [ppm]: 175.8, 174.9, 174.3, 174.0, 173.7, 173.5, 173.1, 172.6, 172.5, 171.9, 171.8, 171.5, 171.3, 171.3, 171.2, 171.1, 170.9, 170.7 (22  $\times$  C=O, C=O (Ac, Carboxyl, AcNH)), 156.7 (C=NH (Arg)), 133.4 ( $\text{H}^{\epsilon}$ ), 128.4 ( $\text{H}^{\gamma}$ ), 117.3 ( $\text{H}^{\delta}$ ), 102.1 (d,  $J_{C1', F2} = 21.0$  Hz,  $C1'$ ), 99.2 ( $C1$ ), 90.9 (d,  $J_{C2', F2} = 187.7$  Hz,  $C2'$ ), 83.5 (d,  $J_{C6, F6} = 163.6$  Hz,  $C6$ ), 77.6 ( $C3$ ,  $T^{\beta*}$ ), 75.2 ( $C5'$ ), 71.3 (d,  $J_{C5, F6} = 19.5$  Hz,  $C5$ ), 71.3 (d,  $J_{C3', F2} = 17.7$  Hz,  $C3'$ ), 69.6, 69.6, 69.5 ( $C5$ ,  $C6$ ,  $C8$ ,  $C11$  (Spacer)), 69.1 (d,  $J_{C4, F6} = 9.5$  Hz,  $C4$ ), 67.0 ( $T_{(1,2)}^{\beta}$ ), 66.3, 66.1 ( $C3$ ,  $C9$  (Spacer)), 61.4, 61.1 ( $S_{(1,2)}^{\beta}$ ), 60.9 ( $C6$ ), 60.5, 60.1, 60.0 ( $P_{(1-5)}^{\alpha}$ ), 59.4 ( $V^{\alpha}$ ), 58.9 ( $T_2^{\alpha}$ ), 58.8 ( $T_1^{\alpha}$ ), 57.0 ( $T^{\alpha*}$ ), 55.5 ( $S_1^{\alpha}$ ), 55.0 ( $S_2^{\alpha}$ ), 52.3 ( $\text{H}^{\alpha}$ ), 51.1 ( $R^{\alpha}$ ), 50.1 ( $D^{\alpha}$ ), 49.6 ( $C2$ ,  $A_1^{\alpha}$ ), 48.0, 47.9, 47.8 ( $P_{(2-5)}^{\delta}$ ), 47.7, 47.6 ( $A_{(2-4)}^{\alpha}$ ), 47.4 ( $P_1^{\delta}$ ), 42.4 ( $G_{(1,2)}^{\alpha}$ ), 40.5 ( $R^{\delta}$ ), 39.0 ( $C12$  (Spacer)), 35.0 ( $D^{\beta}$ ), 34.0 ( $C2$  (Spacer)), 30.2 ( $V^{\beta}$ ), 29.6, 29.3, 29.2, 28.7 ( $P_{(1-5)}^{\beta}$ ), 27.5 ( $R^{\beta}$ ), 26.4 ( $\text{H}^{\beta}$ ), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 ( $P_{(1-5)}^{\gamma}$ ), 24.0 ( $R^{\gamma}$ ), 22.1 ( $\text{CH}_3$  (AcNH)), 18.8, 18.7 ( $T_{(1,2)}^{\gamma}$ ), 18.4 ( $V^{\gamma b}$ ), 18.2 ( $T^{\gamma*}$ ), 17.9 ( $V^{\gamma a}$ ), 16.3 ( $A_{(1)}^{\beta}$ ), 15.2, 15.1 ( $A_{(2-4)}^{\beta}$ ).

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = -207.6 (dd,  $J_{F2, H3} = 14.9$  Hz,  $J_{F2, H2} = 52.1$  Hz,  $F2'$ ), -229.9 (dt,  $J_{F6, H5} = 16.1$  Hz,  $J_{F6, H6} = 47.2$  Hz,  $F6$ ).

***RP-HPLC*** (Phenomenex Luna C18(2),  $\lambda = 214$  nm,  $\text{H}_2\text{O-MeCN} + 0.1\%$  TFA, 95:5  $\rightarrow$  90:10, 10 min  $\rightarrow$  89:11, 10 min  $\rightarrow$  87.5:12.5, 10 min):  $R_t = 24.7$  min.

**Amino-4,7,10-trioxadodecylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-bisfluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -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-proline (72)<sup>[43]</sup>**



Die Peptidsynthese erfolgte automatisiert nach dem Standardprotokoll an 455 mg (0.10 mmol) eines Fmoc-Pro-*O*-Trt-Tentagel S-Harzes (Beladung: 0.22 mmol/mg). Die fluoridierte Glycosylaminosäure **2** wurde halbautomatisch im Peptidsynthesizer angebunden. Dazu wurden 134 mg (1.5 Äquivalente) der Glycosylaminosäure **2**, 68.4 mg HATU und 24.5 mg HOAt (je 1.2 Äquivalente bezüglich der Glycosylaminosäure) in 2 mL NMP gelöst und zur Aktivierung mit 39.6  $\mu$ L *N*-Methylmorpholin (2.4 Äquivalente bezüglich der Glycosylaminosäure) versetzt. Die Kupplungszeit betrug acht Stunden, wobei wechselweise 30 Sekunden geschüttelt und 30 Sekunden stehengelassen wurde. Die darauffolgende Aminosäure Fmoc-Val-OH wurde ohne Acetylierungsschritt doppelt gekuppelt. Die verbleibenden Aminosäuren und der Spacer **63** wurden erneut nach dem Standardprotokoll angebunden. Zur Abspaltung vom Harz und zur globalen Deblockierung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wurde das Harz in einen *Merrifield*-Reaktor überführt und drei Stunden mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) geschüttelt. Anschließend wurde abgesaugt und es wurde dreimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure und viermal mit je 5 mL Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand wurde dreimal mit je 10 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wurde mit wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

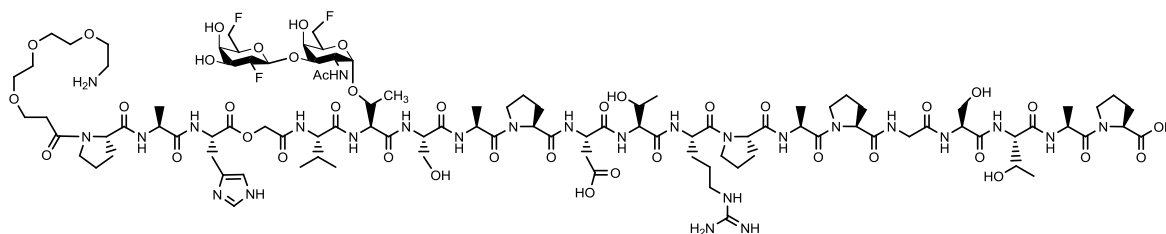
Rohausbeute: 185 mg (80%, 0.08 mmol), blassgelber Feststoff

$C_{117}H_{176}F_3N_{27}O_{39}$  (M = 2641.80 g/mol) [2640.26]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 881.42  $[M+3H]^3+$ , ber.: 881.09; 1321.62  $[M+2H]^2+$ , ber.: 1321.14.

**RP-HPLC** (Phenomenex Luna C18(2),  $\lambda = 214$  nm, H<sub>2</sub>O-MeCN + 0.1% TFA, 95:5  $\rightarrow$  75:25, 30 min  $\rightarrow$  100:0, 10 min):  $R_t = 34.0$  min.

**Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3-*O*-[2,6-dideoxy-2,6-bisfluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -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-proline (75)<sup>[43]</sup>**



Es wurden 185 mg (0.08 mmol) des rohen Peptides **72** in 50 mL Methanol gelöst und der Kolben wurde sechsmal wechselweise evakuiert bzw. mit Argon belüftet. Daraufhin wurden 15.0 mg (0.07 mmol) Palladium(II)-acetat zugegeben und die Argonatmosphäre wurde durch Wasserstoff ausgetauscht. Nach sechs Tagen Rühren bei Raumtemperatur wurde die Suspension durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt und das Methanol wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 76.0 mg (30%, 0.03 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = -91.2 \text{ (c = 1.00, H}_2\text{O)}$$

C<sub>103</sub>H<sub>164</sub>F<sub>3</sub>N<sub>27</sub>O<sub>39</sub> (M = 2461.56 g/mol) [2460.16]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 821.15 [M+3H]<sup>3+</sup>, ber.: 821.06; 1231.20 [M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 1231.09.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 1231.0852 [M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 1231.0894.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O, COSY),  $\delta$  [ppm]: 8.57 (d, 1H,  $J_{\text{H}\epsilon, \text{H}\delta} = 1.3$  Hz, H <sup>$\epsilon$</sup> ), 7.29-7.27 (m, 1H, H <sup>$\delta$</sup> ), 4.99 (d, 1H,  $J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.8$  Hz, 1-H), 4.73-4.46 (m, 13H, D <sup>$\alpha$</sup>  {4.69}, 1'-H {4.71}, H <sup>$\alpha$</sup>  {4.67}, T <sup>$\alpha^*$</sup>  {4.64}, 6<sub>a,b</sub>-H, 6'<sub>a,b</sub>-H {4.64, 4.53}, R <sup>$\alpha$</sup>  {4.61}, A<sub>(2-4)</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.57, 4.54, 4.51}, S<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.47, t,  $J_{\text{S}1\alpha, \text{S}1\beta} = 5.4$  Hz}), 4.45-4.14 (m, 17H, S<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.43}, P<sub>(1-5)</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.37, 4.35, 4.34, 4.33, 4.32}, T<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.32}, V <sup>$\alpha$</sup>  {4.30}, T <sup>$\beta^*$</sup>  {4.29}, T<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.27}, 2'-H {4.27}, 5-H {4.25}, 2-H {4.22}, A<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {4.20}, T<sub>(1,2)</sub> <sup>$\beta$</sup>  {4.19, 4.16}, 4-H {4.15}), 4.02-3.68 (m, 34H, 3-H {3.99}, 4'-H {3.97}, G<sub>1</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {3.94}, 5'-H {3.92}, G<sub>2</sub> <sup>$\alpha$</sup>  {3.90}, 3'-H {3.87}, S<sub>1</sub> <sup>$\beta$</sup>  {3.83}, P<sub>(1-5)</sub> <sup>$\delta$</sup>  {3.78, 3.76, 3.72, 3.66, 3.63}, S<sub>2</sub> <sup>$\beta$</sup>  {3.75}, 3<sub>a,b</sub>-H, 5<sub>a,b</sub>-H, 6<sub>a,b</sub>-H, 8<sub>a,b</sub>-H, 9<sub>a,b</sub>-H, 11<sub>a,b</sub>-H (Spacer) {3.68-3.59}), 3.26 (dd, 1H,  $J_{\text{H}\beta\text{a}, \text{H}\alpha} = 5.8$  Hz,  $J_{\text{H}\beta\text{a}, \text{H}\beta\text{b}} = 15.9$  Hz, H <sup>$\beta\text{a}$</sup> ), 3.21-3.09 (m, 5H, R <sup>$\delta$</sup>  {3.17}, 12<sub>a,b</sub>-H (Spacer) {3.16}, H <sup>$\beta\text{b}$</sup>  {3.15}), 2.93 (dd, 1H,  $J_{\text{D}\beta\text{a}, \text{D}\alpha} = 6.3$  Hz,  $J_{\text{D}\beta\text{a}, \text{D}\beta\text{b}} = 17.1$  Hz, D <sup>$\beta\text{a}$</sup> ), 2.85 (dd, 1H,  $J_{\text{D}\beta\text{b}, \text{D}\alpha} = 7.4$  Hz,  $J_{\text{D}\beta\text{b}, \text{D}\beta\text{a}} = 16.5$  Hz, D <sup>$\beta\text{b}$</sup> ), 2.76-2.59 (m, 2H, 2<sub>a,b</sub>-H (Spacer)), 2.35-2.15 (m, 6H, P<sub>(1-3)</sub> <sup>$\beta$</sup> ), 2.08-1.77 (m, 19H, V <sup>$\beta$</sup>



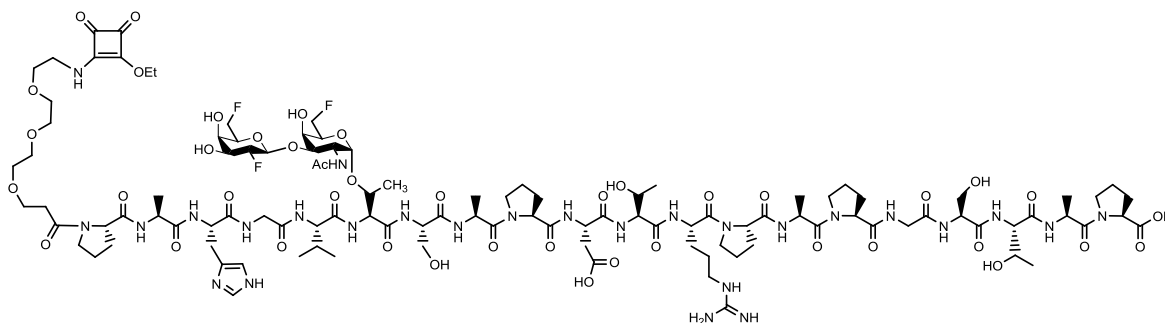
{2.04},  $P_{(1-5)}^\gamma$  {2.01-1.82},  $P_{(4,5)}^\beta$  {2.00, 1.89},  $\text{CH}_3$  (AcNH) {1.94},  $R^{\beta a}$  {1.80}), 1.77-1.69 (m, 3H,  $R^{\beta b}$  {1.70},  $R^\gamma$  {1.64}), 1.33 (d, 3H,  $J_{A4\beta, A4\alpha} = 6.9$  Hz,  $A_4^\beta$ ), 1.32 (d, 6H,  $J_{A2,3\beta, A2,3\alpha} = 7.1$  Hz,  $A_{2,3}^\beta$ ), 1.28 (d, 3H,  $J_{A1\beta, A1\alpha} = 7.2$  Hz,  $A_1^\beta$ ), 1.21 (d, 3H,  $J_{T\gamma^*, T\beta^*} = 6.3$  Hz,  $T^{\gamma^*}$ ), 1.16 (d, 3H,  $J_{T2\gamma, T2\beta} = 6.5$  Hz,  $T_2^\gamma$ ), 1.13 (d, 3H,  $J_{T1\gamma, T1\beta} = 6.4$  Hz,  $T_1^\gamma$ ), 0.92 (d, 3H,  $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.7$  Hz,  $V^{\gamma a}$ ), 0.92 (d, 3H,  $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.6$  Hz,  $V^{\gamma b}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , DEPT, HMQC),  $\delta$  [ppm]: 175.8, 175.0, 174.4, 174.0, 174.0, 173.8, 173.7, 173.5, 173.5, 173.1, 173.0, 172.7, 172.5, 172.4, 172.0, 172.0, 171.6, 171.4, 171.3, 171.2, 171.2, 171.0, 170.7 ( $20 \times \text{C}=\text{O}$ ,  $2 \times \text{C}=\text{O}$  (Carboxyl),  $1 \times \text{C}=\text{O}$  (AcNH)), 156.7 ( $\text{C}=\text{NH}$  (Arg)), 133.5 ( $\text{H}^\epsilon$ ), 128.4 ( $\text{H}^\gamma$ ), 117.3 ( $\text{H}^\delta$ ), 101.8 (d,  $J_{C1', F2'} = 23.8$  Hz,  $C1'$ ), 99.4 ( $C1$ ), 90.9 (d,  $J_{C2', F2'} = 180.1$  Hz,  $C2'$ ), 83.6 (d,  $J_{C6, F6} = 164.9$  Hz,  $C6$ ), 82.8 (d,  $J_{C6', F6'} = 165.8$  Hz,  $C6'$ ), 77.8 ( $T^{\beta^*}$ ), 77.7 ( $C3$ ), 73.2 (d,  $J_{C5', F6'} = 19.9$  Hz,  $C5'$ ), 71.1 (d,  $J_{C3', F2'} = 16.9$  Hz,  $C3'$ ), 69.6 ( $C5$ ), 69.6, 69.5, 69.5 ( $C5$ ,  $C6$ ,  $C8$ ,  $C11$  (Spacer)), 68.7 (d,  $J_{C4', F6'} = 9.0$  Hz,  $C4'$ ), 68.2 (d,  $J_{C4, F6} = 8.3$  Hz,  $C4$ ), 67.0 ( $T_{(1,2)}^\beta$ ), 66.3, 66.1 ( $C3$ ,  $C9$  (Spacer)), 61.4, 61.2 ( $S_{(1,2)}^\beta$ ), 60.8, 60.6, 60.4, 60.1, 60.0 ( $P_{(1-5)}^\alpha$ ), 59.4 ( $V^\alpha$ ), 58.9 ( $T_2^\alpha$ ), 58.8 ( $T_1^\alpha$ ), 57.0 ( $T^{\alpha^*}$ ), 55.6 ( $S_1^\alpha$ ), 55.1 ( $S_2^\alpha$ ), 52.4 ( $\text{H}^\alpha$ ), 51.1 ( $R^\alpha$ ), 50.5 ( $D^\alpha$ ), 49.6 ( $C2$ ), 48.1 ( $A_1^\alpha$ ), 47.8, 47.7, 47.7 ( $P_{(2-5)}^\delta$ ), 47.9, 47.9, 47.8 ( $A_{(2-4)}^\alpha$ ), 47.4 ( $P_1^\delta$ ), 42.4, 42.3 ( $G_{(1,2)}^\alpha$ ), 40.5 ( $R^\delta$ ), 39.1 ( $C12$  (Spacer)), 34.9 ( $D^\beta$ ), 34.0 ( $C2$  (Spacer)), 30.1 ( $V^\beta$ ), 29.7, 29.4, 29.3, 29.2, 28.8 ( $P_{(1-5)}^\beta$ ), 27.5 ( $R^\beta$ ), 26.3 ( $\text{H}^\beta$ ), 24.8, 24.7, 24.6, 24.4 ( $P_{(1-5)}^\gamma$ ), 24.0 ( $R^\gamma$ ), 22.1 ( $\text{CH}_3$  (AcNH)), 18.9, 18.8 ( $T_{(1,2)}^\gamma$ ), 18.5 ( $V^{\gamma a}$ ), 18.2 ( $T^{\gamma^*}$ ), 17.9 ( $V^{\gamma b}$ ), 16.3, 15.2, 15.1 ( $A_{(1-4)}^\beta$ ).

**$^{19}\text{F-NMR}$**  (376.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  [ppm] = -207.7 (dd,  $J_{F2', H3} = 14.7$  Hz,  $J_{F2', H2} = 51.4$  Hz,  $F2'$ ), -229.7 – -230.1 (m,  $F6$ ,  $F6'$ ).

**RP-HPLC** (Phenomenex Luna C18(2),  $\lambda = 214$  nm,  $\text{H}_2\text{O}$ -MeCN + 0.1% TFA, 95:5  $\rightarrow$  75:25, 30 min  $\rightarrow$  100:0, 10 min  $\rightarrow$  100:0, 10 min):  $R_t = 18.9$  min.

**1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3-O-[2,6-dideoxy-2,6-difluor-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 (77)**



Eine Lösung von 30 mg (12.2 μmol) des Peptides **75** in 5 mL eines Ethanol/Wasser-Gemisches (1:1) wurde mit 1.92 μL (13.0 μmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,3-dion versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von ges. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung auf einen Wert von pH = 8 eingestellt und die Lösung wurde drei Stunden bei Raumtemp. gerührt. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Kontrolle) wurde mit verd. Essigsäure neutralisiert und das Gemisch wurde i. Vak. eingengt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde mittels semipräparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 13.0 mg (42%, 5.00 μmol), farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = -90.7 \quad (c = 1.00, \text{H}_2\text{O})$$

C<sub>109</sub>H<sub>168</sub>F<sub>3</sub>N<sub>27</sub>O<sub>42</sub> (M = 2585.65 g/mol) [2584.18]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 870.06 [M+3H]<sup>3+</sup>, ber.: 869.73; 1293.61 [M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 1293.10; 1304.60 [M+H+Na]<sup>2+</sup>, ber.: 1304.09.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 1293.0935 [M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 1293.00974.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O, COSY) δ [ppm]: 8.55 (s, 1H, H<sup>ε</sup>), 7.25 (s, 1H, H<sup>δ</sup>), 4.97 (d, 1H, J<sub>H1,H2</sub> = 3.6 Hz, 1-H), 4.70-4.46 (m, 14H, 1'-H {4.69}, OCH<sub>2</sub> (Squarat) {4.66}, D<sup>α</sup> {4.65}, H<sup>α</sup> {4.62}, T<sup>α\*</sup> {4.60}, 6<sub>a,b</sub>-H {4.58}, 6'<sub>a,b</sub>-H {4.52}, R<sup>α</sup> {4.56}, A<sub>(2-4)</sub><sup>α</sup> {4.52, 4.49, 4.37}), 4.45 (t, 1H, J<sub>S1α,S1β</sub> = 5.3 Hz, S<sub>1</sub><sup>α</sup>), 4.42-4.11 (m, 17H, S<sub>2</sub><sup>α</sup> {4.39}, P<sub>(1-5)</sub><sup>α</sup> {4.37-4.25}, T<sub>1</sub><sup>α</sup> {4.23}, V<sup>α</sup> {4.34}, T<sup>β\*</sup> {4.25}, T<sub>2</sub><sup>α</sup> {4.28}, 2'-H {4.24}, 5-H {4.22}, 2-H {4.17}, A<sub>1</sub><sup>α</sup> {4.17}, T<sub>(1,2)</sub><sup>β</sup> {4.15, 4.12}, 4-H {4.12}), 3.98-3.50 (m, 36H, 3-H {3.96}, 4'-H {3.94}, G<sub>1</sub><sup>α</sup> {3.92}, 5'-H {3.87}, G<sub>2</sub><sup>α</sup> {3.86}, 3'-H {3.85}, S<sub>1</sub><sup>β</sup> {3.84}, P<sub>(1-5)</sub><sup>δ</sup> {3.77-3.69, 3.61, 3.52}, S<sub>2</sub><sup>β</sup> {3.78}, 12<sub>a</sub>-H (Spacer) {3.72}, 3<sub>a,b</sub>-H, 9<sub>a,b</sub>-H, {3.67}, 12<sub>b</sub>-H (Spacer) {3.61}, 5<sub>a,b</sub>-H, 6<sub>a,b</sub>-H, 8<sub>a,b</sub>-H, 11<sub>a,b</sub>-H (Spacer) {3.61-3.54}), 3.24 (dd, 1H, J<sub>Hβa,Hα</sub> = 5.3 Hz, J<sub>Hβa,Hβb</sub> = 15.6 Hz, H<sup>βa</sup>), 3.16-3.08 (m, 3H, R<sup>δ</sup> {3.13}, H<sup>βb</sup> {3.12}), 2.90 (dd, 1H, J<sub>Dβa,Dα</sub> = 6.5 Hz,

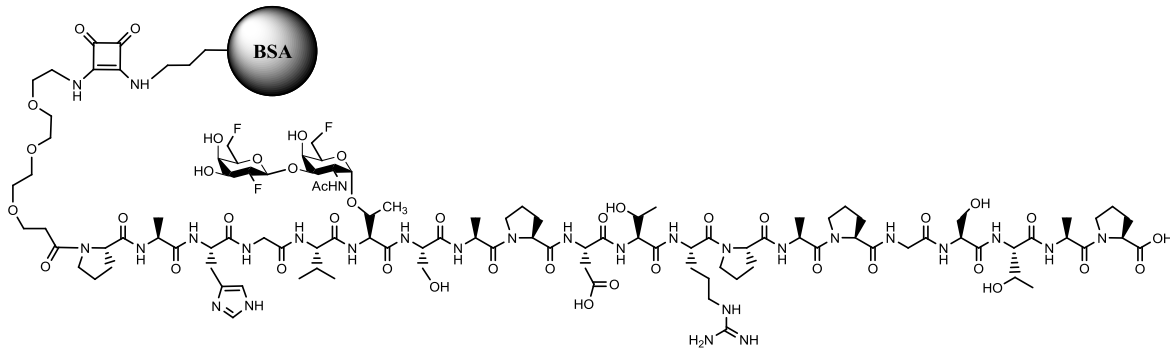
$J_{D\beta a, D\beta b} = 17.2$  Hz,  $D^{\beta a}$ ), 2.83 (dd, 1H,  $J_{D\beta b, D\alpha} = 6.9$  Hz,  $J_{D\beta b, D\beta a} = 17.1$  Hz,  $D^{\beta b}$ ), 2.70-2.55 (m, 2H, 2<sub>a,b</sub>-H (Spacer)), 2.30-2.13 (m, 6H,  $P_{(1-3)}^{\beta}$ ), 2.04-1.73 (m, 19H,  $V^{\beta}$  {2.00},  $P_{(1-5)}^{\gamma}$  {2.05-1.89},  $P_{(4,5)}^{\beta}$  {1.96, 1.88},  $CH_3$  (AcNH) {1.91},  $R^{\beta a}$  {1.77}), 1.70-1.53 (m, 3H,  $R^{\beta b}$  {1.68},  $R^{\gamma}$  {1.62}), 1.38-1.32 (m, 3H,  $CH_3$  (Squarat)), 1.32-1.27 (m, 9H,  $A_{(2-4)}^{\beta}$ ), 1.25 (d, 3H,  $J_{A1\beta, A1\alpha} = 7.3$  Hz,  $A_1^{\beta}$ ), 1.18 (d, 3H,  $J_{T\gamma^*, T\beta^*} = 6.1$  Hz,  $T^{\gamma^*}$ ), 1.13 (d, 3H,  $J_{T2\gamma, T2\beta} = 6.4$  Hz,  $T_2^{\gamma}$ ), 1.11 (d, 3H,  $J_{T1\gamma, T1\beta} = 6.3$  Hz,  $T_1^{\gamma}$ ), 0.90 (d, 3H,  $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.3$  Hz,  $V^{\gamma a}$ ), 0.89 (d, 3H,  $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.4$  Hz,  $V^{\gamma b}$ ).

**$^{13}C$ -NMR** (100.6 MHz,  $D_2O$ , DEPT, HMQC),  $\delta$  [ppm]: 188.8, 183.4 (C=O (Squarat)), 177.3, 177.1, 175.9, 175.0, 175.0, 174.5, 174.1, 174.0, 173.8, 173.6, 173.2, 172.8, 172.6, 172.5, 172.1, 172.0, 171.6, 171.4, 171.4, 171.3, 171.2, 171.0, 170.8 ( $20 \times C=O$ ,  $2 \times C=O$  (Carboxyl),  $1 \times C=O$  (AcNH), C=C (Squarat)), 156.7 (C=NH (Arg)), 133.5 ( $H^{\epsilon}$ ), 128.5 ( $H^{\gamma}$ ), 117.4 ( $H^{\delta}$ ), 102.1 (d,  $J_{C1', F2'} = 23.1$  Hz,  $C1'$ ), 99.4 ( $C1$ ), 90.8 (d,  $J_{C2', F2'} = 181.0$  Hz,  $C2'$ ), 83.7 (d,  $J_{C6', F6'} = 166.0$  Hz,  $C6'$ ), 82.9 (d,  $J_{C6, F6} = 165.7$  Hz,  $C6$ ), 77.8 ( $T^{\beta^*}$ ), 77.7 ( $C3$ ), 73.3 (d,  $J_{C5', F6'} = 20.8$  Hz,  $C5'$ ), 71.1 (d,  $J_{C3', F2'} = 16.8$  Hz,  $C3'$ ), 70.6 ( $OCH_2$  (Squarat)), 69.6 ( $C5$ ), 69.7, 69.6, 69.6, 69.4 ( $C5$ ,  $C6$ ,  $C8$ ,  $C11$  (Spacer)), 68.7 (d,  $J_{C4', F6'} = 8.1$  Hz,  $C4'$ ), 68.3 (d,  $J_{C4, F6} = 7.3$  Hz,  $C4$ ), 67.1 ( $T_{(1,2)}^{\beta}$ ), 66.2 ( $C3$ ,  $C9$  (Spacer)), 61.4, 61.2 ( $S_{(1,2)}^{\beta}$ ), 60.8, 60.6, 60.1, 60.1, 59.5 ( $P_{(1-5)}^{\alpha}$ ), 59.4 ( $V^{\alpha}$ ), 59.0 ( $T_2^{\alpha}$ ), 58.8 ( $T_1^{\alpha}$ ), 57.0 ( $T^{\alpha^*}$ ), 55.6 ( $S_1^{\alpha}$ ), 55.1 ( $S_2^{\alpha}$ ), 52.4 ( $H^{\alpha}$ ), 51.1 ( $R^{\alpha}$ ), 50.1 ( $D^{\alpha}$ ), 49.7 ( $C2$ ), 48.1 ( $A_1^{\alpha}$ ), 47.9, 47.9, 47.8 ( $A_{(2-4)}^{\alpha}$ ), 47.8, 47.7, 47.7, 47.4 ( $P_{(1-5)}^{\delta}$ ), 44.0 ( $C12$  (Spacer)), 42.4, 42.3 ( $G_{(1,2)}^{\alpha}$ ), 40.5 ( $R^{\delta}$ ), 34.9 ( $D^{\beta}$ ), 34.1 ( $C2$  (Spacer)), 30.1 ( $V^{\beta}$ ), 29.7, 29.4, 29.4, 29.2, 28.8 ( $P_{(1-5)}^{\beta}$ ), 27.5 ( $R^{\beta}$ ), 26.2 ( $H^{\beta}$ ), 24.8, 24.7, 24.6, 24.4 ( $P_{(1-5)}^{\gamma}$ ), 24.0 ( $R^{\gamma}$ ), 22.1 ( $CH_3$  (AcNH)), 18.9, 18.8 ( $T_{(1,2)}^{\gamma}$ ), 18.5 ( $V^{\gamma a}$ ), 18.3 ( $T^{\gamma^*}$ ), 18.0 ( $V^{\gamma b}$ ), 16.1 ( $A_1^{\beta}$ ), 15.2, 15.1 ( $A_{(2-4)}^{\beta}$ ), 15.0 ( $CH_3$  (Squarat)).

**$^{19}F$ -NMR** (376.5 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  [ppm] = -207.7 (dd, 1F,  $J_{F2', H3} = 14.3$  Hz,  $J_{F2', H2} = 52.0$  Hz,  $F2'$ ), -229.7 – -230.2 (m, 2F,  $F6$ ,  $F6'$ ).

**RP-HPLC** (Phenomenex Luna C18(2),  $\lambda = 214$  nm,  $H_2O$ -MeCN + 0.1% TFA, 95:5  $\rightarrow$  75:25, 30 min  $\rightarrow$  100:0, 10 min  $\rightarrow$  100:0, 10 min):  $R_t = 22.8$  min.

### Konjugation an Rinderserumalbumin (BSA):

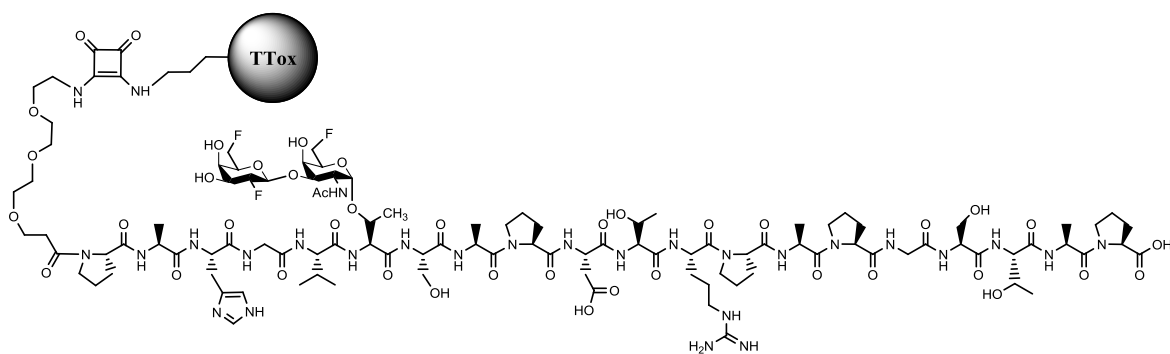


Eine Lösung aus 2 mg (0.77  $\mu\text{mol}$ ) des Glycopeptid-Squarates **77** in 1 mL eines Dinatriumphosphat-Puffers (130 mg in 2 mL Wasser) wurde mit 2 mg (0.03  $\mu\text{mol}$ ) Rinderserumalbumin versetzt und die Lösung wurde sechs Tage bei Raumtemp. gerührt. Das Gemisch wurde in einer Ultrafiltrationsanlage (Filter: 30 000 Da) dreimal mit 50 mL Wasser filtriert, um nicht gebundene Peptidmoleküle abzutrennen. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Ausbeute: 3 mg farbloser, amorpher Feststoff

Aufgrund eines längerfristigen Gerätedefektes konnte kein MALDI-TOF-Spektrum zur Bestimmung der Beladungsdichte des Proteins gemessen werden.

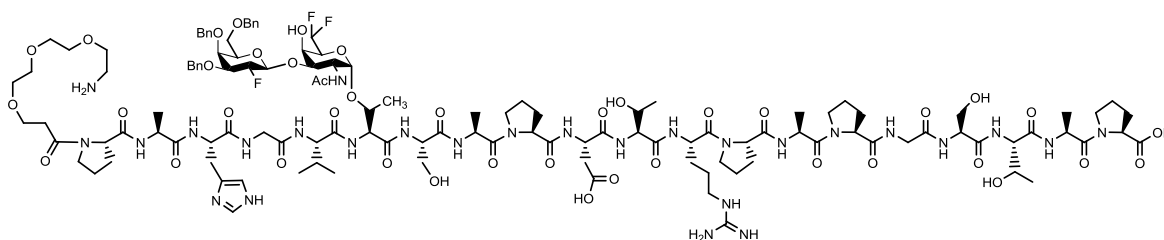
### Konjugation an Tetanus-Toxoid (TTox):



Eine Lösung aus 2 mg (0.77  $\mu\text{mol}$ ) des Glycopeptid-Squarates **77** in 1 mL eines Dinatriumphosphat-Puffers (130 mg in 2 mL Wasser) wurde mit 2 mg (0.01  $\mu\text{mol}$ ) Tetanus-Toxoid versetzt und die Lösung wurde sechs Tage bei Raumtemp. gerührt. Das Gemisch wurde in einer Ultrafiltrationsanlage (Filter: 30 000 Da) dreimal mit 50 mL Wasser filtriert, um nicht gebundene Peptidmoleküle abzutrennen. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Ausbeute: 4 mg farbloser, amorpher Feststoff

**Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-difluor-3-*O*-[3,4,6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -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-proline (73)**



Die Peptidsynthese erfolgte automatisiert nach dem Standardprotokoll an 455 mg (0.10 mmol) eines Fmoc-Pro-*O*-Trt-Tentagel S-Harzes (Beladung: 0.22 mmol/mg). Die fluoridierte Glycosylaminosäure **3** wurde halbautomatisch im Peptidsynthesizer angebunden. Dazu wurden 112 mg (1.12 Äquivalente) der Glycosylaminosäure **3**, 51.1 mg HATU und 18.3 mg HOAt (je 1.2 Äquivalente bezüglich der Glycosylaminosäure) in 2 mL NMP gelöst und zur Aktivierung mit 29.6  $\mu$ L *N*-Methylmorpholin (2.4 Äquivalente bezüglich der Glycosylaminosäure) versetzt. Die Kupplungszeit betrug acht Stunden, wobei wechselweise 30 Sekunden geschüttelt und 30 Sekunden stehengelassen wurde. Die darauffolgende Aminosäure Fmoc-Val-OH wurde ohne Acetylierungsschritt doppelt gekuppelt und die verbleibenden Aminosäuren wurden nach dem Standardprotokoll angebunden. Der Spacer **63** wurde analog zum Fmoc-Val-OH ohne zwischenzeitliche Acetylierung zweimal gekuppelt, wobei pro Kupplung je fünf Äquivalente bezüglich des Harzes eingesetzt wurden. Zur Abspaltung vom Harz und zur globalen Deblockierung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wurde das Harz in einen *Merrifield*-Reaktor überführt und drei Stunden mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) geschüttelt. Anschließend wurde abgesaugt. Es wurde dreimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure und viermal mit je 5 mL Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand wurde dreimal mit je 10 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wurde mit wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Zur Abtrennung der Abspaltprodukte der Seitenkettenschutzgruppen wurde das Lyophilisat in 0.5 mL Methanol gelöst und in eiskalten Diethylether getropft. Nach Zentrifugation bei 4 °C wurde vom gefällten Peptid dekantiert. Das Rohpeptid wurde im Vakuumexsikkator getrocknet und abschließend mittels semipräparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 54.0 mg (20%, 0.02 mmol), farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = -89.0 \text{ (} c = 1.00, \text{H}_2\text{O)}$$

$C_{124}H_{182}F_3N_{27}O_{40}$  (M = 2747.92 g/mol) [2746.30]

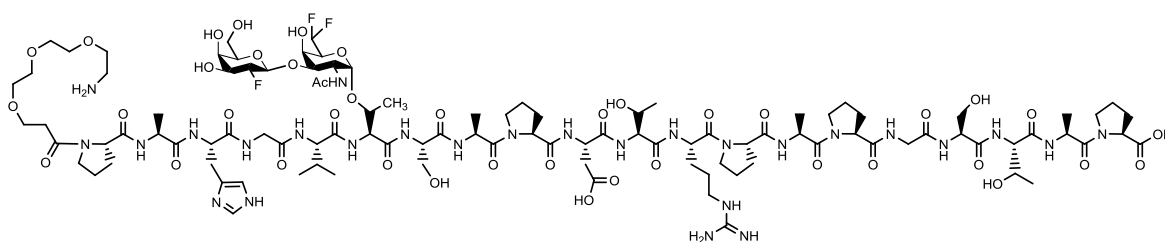
**ESI-MS** (positiv), m/z: 916.83 [M+3H]<sup>3+</sup>, ber.: 916.44; 1374.75 [M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 1374.16.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 1374.1617 [M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 1374.1573.

**<sup>19</sup>F-NMR** (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm] = -129.5 – -130.3 (m, F<sub>6a,b</sub>), -206.4 (dd, J<sub>F2',H3</sub> = 11.7 Hz, J<sub>F2',H2</sub> = 52.3 Hz, F2').

**RP-HPLC** (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, H<sub>2</sub>O-MeCN + 0.1% TFA, 95:5 → 75:25, 30 min → 100:0, 10 min → 100:0, 10 min): R<sub>t</sub> = 35.3 min.

**Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-difluor-3-O-[2-desoxy-2-fluor-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-proline (76)**



Eine Spatelspitze Palladium(II)-hydroxid auf Kohle (15% ig, 50 Gew.% Wasser) wurde in 20 mL eines Isopropanol/Wasser-Gemisches (3:1) gegeben und der Kolben wurde zehnmal wechselweise evakuiert und mit Argon belüftet. Nach dem letzten Evakuieren wurde mit Wasserstoff belüftet und die Suspension wurde zur Aktivierung des Katalysators eine Stunde unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurden 48 mg (17.5 μmol) des Peptides **73** in 10 mL desselben Lösungsmittelgemisches gelöst, zugegeben und die Suspension wurde elf Tage bei Raumtemp. gerührt. Nach beendeter Reaktion (HPLC-Kontrolle) wurde die Wasserstoffatmosphäre durch mehrfaches Evakuieren und Belüften mit Argon ausgetauscht. Die Reaktionslösung wurde durch *Hyflo*<sup>®</sup> abgesaugt, der Filterkuchen wurde mit 150 mL Methanol gewaschen und die Lösung wurde i. Vak. eingengt und lyophilisiert. Das Produkt wurde mittels semipräparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 16.0 mg (37%, 6.50 μmol), farbloses Lyophilisat

$[\alpha]_D^{23} = -100.3$  (c = 1.00, H<sub>2</sub>O)

$C_{103}H_{164}F_3N_{27}O_{40}$  (M = 2477.56 g/mol) [2476.16]

**ESI-MS** (positiv), m/z: 625.68 [M+3H+Na]<sup>4+</sup>, ber.: 625.54; 826.38 [M+3H]<sup>3+</sup>, ber.: 826.39; 833.71 [M+2H+Na]<sup>3+</sup>, ber.: 833.72; 1239.09 [M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 1239.08; 1250.08 [M+H+Na]<sup>2+</sup>, ber.: 1250.08.

**HR-ESI-MS** (positiv), m/z: 1239.0869 [M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 1239.0826.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O, COSY), δ [ppm]: 8.58 (s, 1H, H<sup>ε</sup>), 7.28 (s, 1H, H<sup>δ</sup>), 5.97 (dt, 1H, J<sub>H6,H5</sub> = 5.6 Hz, J<sub>H6,F6</sub> = 56.1 Hz, 6-H), 5.05 (d, 1H, J<sub>H1,H2</sub> = 3.5 Hz, 1-H), 4.71-4.63 (m, 4H, D<sup>α</sup> {4.69}, 1'-H {4.68}, H<sup>α</sup> {4.65}, T<sup>α\*</sup> {4.65}), 4.62-4.40 (m, 8H, R<sup>α</sup> {4.61}, A<sub>(2-4)</sub><sup>α</sup> {4.56, 4.54, 4.43}, S<sub>1</sub><sup>α</sup> {4.49, t, J<sub>S1α,S1β</sub> = 5.3 Hz}, S<sub>2</sub><sup>α</sup> {4.43}), 4.40-4.11 (m, 16H, P<sub>(1-5)</sub><sup>α</sup> {4.40-4.32}, T<sub>1</sub><sup>α</sup> {4.32}, T<sup>β\*</sup> {4.31}, 4-H {4.31}, T<sub>2</sub><sup>α</sup> {4.27}, V<sup>α</sup> {4.27}, 2'-H {4.26}, 2-H {4.24}, A<sub>1</sub><sup>α</sup> {4.21}, T<sub>(1,2)</sub><sup>β</sup> {4.17}, 5-H {4.13}), 4.04 (dd, 1H, J<sub>H3,H4</sub> = 2.4 Hz, J<sub>H3,H2</sub> = 11.1 Hz, 3-H), 4.00-3.53 (m, 35H, 4'-H {3.92}, G<sub>1</sub><sup>α</sup> {3.96}, G<sub>2</sub><sup>α</sup> {3.90}, S<sub>1</sub><sup>β</sup> {3.88, 3.83}, 3'-H {3.85}, P<sub>(1-5)</sub><sup>δ</sup> {3.78, 3.62, 3.56}, 3<sub>a,b</sub>-H, 9<sub>a,b</sub>-H, {3.76-3.70}, S<sub>2</sub><sup>β</sup> {3.74, 3.71}, 5<sub>a,b</sub>-H, 6<sub>a,b</sub>-H, 8<sub>a,b</sub>-H, 11<sub>a,b</sub>-H (Spacer), 6<sub>a,b</sub>'-H {3.67-3.59}, 5'-H {3.64}), 3.26 (dd, 1H, J<sub>Hβa,Hα</sub> = 5.7 Hz, J<sub>Hβa,Hβb</sub> = 15.5 Hz, H<sup>βa</sup>), 3.20-3.11 (m, 5H, R<sup>δ</sup> {3.17}, 12<sub>a,b</sub>-H (Spacer) {3.16}, H<sup>βb</sup> {3.16}), 2.92 (dd, 1H, J<sub>Dβa,Dα</sub> = 6.6 Hz, J<sub>Dβa,Dβb</sub> = 17.0 Hz, D<sup>βa</sup>), 2.85 (dd, 1H, J<sub>Dβb,Dα</sub> = 6.9 Hz, J<sub>Dβb,Dβa</sub> = 17.0 Hz, D<sup>βb</sup>), 2.73 (dt, 1H, J<sub>H2a,CH2</sub> = 6.5 Hz, J<sub>H2a,H2b</sub> = 16.0 Hz, 2<sub>a</sub>-H (Spacer)), 2.63 (dt, 1H, J<sub>H2b,CH2</sub> = 5.9 Hz, J<sub>H2b,H2b</sub> = 16.2 Hz, 2<sub>b</sub>-H (Spacer)), 2.35-2.16 (m, 6H, P<sub>(1-3)</sub><sup>β</sup>), 2.08-1.77 (m, 19H, V<sup>β</sup> {2.04}, P<sub>(1-5)</sub><sup>γ</sup> {2.08-1.88}, P<sub>(4,5)</sub><sup>β</sup> {2.00, 1.87}, CH<sub>3</sub> (AcNH) {1.94}, R<sup>βa</sup> {1.80}), 1.74-1.58 (m, 3H, R<sup>βb</sup> {1.70}, R<sup>γ</sup> {1.64}), 1.35-1.31 (m, 9H, A<sub>(2-4)</sub><sup>β</sup>), 1.29 (d, 3H, J<sub>A1β,A1α</sub> = 7.3 Hz, A<sub>1</sub><sup>β</sup>), 1.22 (d, 3H, J<sub>Tγ\*,Tβ\*</sub> = 6.1 Hz, T<sup>γ\*</sup>), 1.17 (d, 3H, J<sub>T2γ,T2β</sub> = 6.4 Hz, T<sub>2</sub><sup>γ</sup>), 1.14 (d, 3H, J<sub>T1γ,T1β</sub> = 6.3 Hz, T<sub>1</sub><sup>γ</sup>), 0.95-0.89 (m, 6H, V<sup>γa,b</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, D<sub>2</sub>O, HMQC), δ [ppm]: 176.0, 174.9, 174.9, 174.4, 174.0, 173.9, 173.7, 173.5, 173.2, 173.1, 173.1, 172.6, 172.5, 172.3, 172.0, 171.9, 171.5, 171.3, 171.2, 171.2, 171.1, 170.9, 170.7 (20 × C=O, 2 × C=O (Carboxyl), 1 × C=O (AcNH)), 156.6 (C=NH (Arg)), 133.4 (H<sup>ε</sup>), 128.3 (H<sup>γ</sup>), 117.3 (H<sup>δ</sup>), 114.3 (pt, J<sub>C6,F6a,b</sub> = 240.0 Hz, C6), 102.1 (d, J<sub>C1',F2'</sub> = 23.3 Hz, C1'), 99.4 (C1), 91.0 (d, J<sub>C2',F2'</sub> = 181.3 Hz, C2'), 78.0 (T<sup>β\*</sup>), 76.8 (C3), 75.2 (d, C5'), 71.3 (d, J<sub>C3',F2'</sub> = 17.5 Hz, C3'), 69.8 (dd, J<sub>C5,F6a</sub> = 22.3 Hz, J<sub>C5,F6b</sub> = 28.3 Hz, C5), 69.6, 69.5, 69.4, 69.4 (C5, C6, C8, C11 (Spacer), C6'), 69.0 (d, J<sub>C4',F2'</sub> = 9.5 Hz, C4'), 67.1 (C4), 67.0 (T<sub>(1,2)</sub><sup>β</sup>), 66.3, 66.0 (C3, C9 (Spacer)), 61.3 (S<sub>1</sub><sup>β</sup>), 61.1 (S<sub>2</sub><sup>β</sup>), 60.7, 60.7, 60.5, 60.0, 60.0 (P<sub>(1-5)</sub><sup>α</sup>), 59.4 (V<sup>α</sup>), 58.9 (T<sub>2</sub><sup>α</sup>), 58.7 (T<sub>1</sub><sup>α</sup>), 56.8 (T<sup>α\*</sup>), 55.5 (S<sub>1</sub><sup>α</sup>), 55.0 (S<sub>2</sub><sup>α</sup>), 52.3 (H<sup>α</sup>), 51.1 (R<sup>α</sup>), 50.1 (D<sup>α</sup>), 49.6 (A<sub>1</sub><sup>α</sup>), 48.0, 47.8, 47.7 (P<sub>(2-5)</sub><sup>δ</sup>), 47.9 (C2), 47.9, 47.7, 47.6 (A<sub>(2-4)</sub><sup>α</sup>), 47.4 (P<sub>1</sub><sup>δ</sup>), 42.3, 42.2 (G<sub>(1,2)</sub><sup>α</sup>), 40.5 (R<sup>δ</sup>), 39.0 (C12

(Spacer)), 35.0 ( $D^\beta$ ), 34.0 (C2 (Spacer)), 30.1 ( $V^\beta$ ), 29.6, 29.3, 29.3, 29.2, 28.7 ( $P_{(1-5)}^\beta$ ), 27.4 ( $R^\beta$ ), 26.2 ( $H^\beta$ ), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 ( $P_{(1-5)}^\gamma$ ), 23.9 ( $R^\gamma$ ), 22.0 ( $CH_3$  (AcNH)), 18.8 ( $T_2^\gamma$ ), 18.7 ( $T_1^\gamma$ ), 18.4 ( $V^{\gamma a}$ ), 18.1 ( $T^{\gamma*}$ ), 17.9 ( $V^{\gamma b}$ ), 16.2 ( $A_1^\beta$ ), 15.1, 15.0 ( $A_{(2-4)}^\beta$ ).

$^{19}F$ -NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  [ppm] = -129.7 – -130.2 (m,  $F_{6a,b}$ ), -207.6 (dd,  $J_{F_2',H_3} = 14.8$  Hz,  $J_{F_2',H_2} = 51.9$  Hz,  $F_2'$ ).

**RP-HPLC** (Phenomenex Luna C18(2),  $\lambda = 214$  nm,  $H_2O$ -MeCN + 0.1% TFA, 95:5  $\rightarrow$  75:25, 30 min  $\rightarrow$  100:0, 10 min  $\rightarrow$  100:0, 10 min):  $R_t = 16.4$  min.



## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. Ferlay, H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D. M. Parkin, *GLOBOCAN 2008* **2010**.
- [2] Robert-Koch-Institut, **2012**.
- [3] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- [4] D. Hanahan, Robert A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
- [5] H. zur Hausen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5798-5808.
- [6] M. C. Rose, *Am. J. Physiol.* **1992**, *263*, L413-L429.
- [7] M. A. Hollingsworth, B. J. Swanson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 45-60.
- [8] J. Dekker, J. W. A. Rossen, H. A. Buller, A. W. C. Einerhand, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 126-131.
- [9] P. Pandey, S. Kharbanda, D. Kufe, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 4000-4003.
- [10] J. Hilkens, M. J. L. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 359-363.
- [11] Y. Q. Li, A. Bharti, D. S. Chen, J. L. Gong, D. Kufe, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 7216-7224.
- [12] R. E. Beatson, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, *Immunotherapy* **2010**, *2*, 305-327.
- [13] T. Z. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cummings, *J. Cell Biol.* **2008**, *182*, 531-542.
- [14] D. M. Swallow, S. Gendler, B. Griffiths, G. Corney, J. Taylor-Papadimitriou, M. E. Bramwell, *Nature* **1987**, *328*, 82-84.
- [15] F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439-449.
- [16] F. G. Hanisch, G. Uhlenbruck, J. Peter-Katalinic, H. Egge, J. Dabrowski, U. Dabrowski, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 872-883.
- [17] S. Muller, F. G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26103-26112.
- [18] 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*, 4901-4909.
- [19] I. Brockhausen, J. M. Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607-617.
- [20] J. Burchell, G. Picco, S. Julien, I. Brockhausen, R. Beatson, A. Antonopoulos, S. Haslam, U. Mandel, A. Dell, S. Pinder, J. Taylor-Papadimitriou, *Glycobiology* **2010**, *20*, 1241-1250.
- [21] J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691-696.
- [22] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5386-5394.
- [23] M. A. Cheever, J. P. Allison, A. S. Ferris, O. J. Finn, B. M. Hastings, T. T. Hecht, I. Mellman, S. A. Prindiville, J. L. Viner, L. M. Weiner, L. M. Matrisian, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5323-5337.
- [24] H. K. S. Wittrock, *Rot-Grün-Weiss* **2006**, 2-5.
- [25] T. Pfitzner, S. Barth, A. Engert, *Der Onkologe* **2000**, *1*, 31-35.
- [26] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882-912.
- [27] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 354-355.
- [28] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366-369.
- [29] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551-7556.
- [30] S. Ingale, T. Buskas, G.-J. Boons, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5785-5788.
- [31] S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 663-667.
- [32] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9977-9981.
- [33] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551-7555.

- [34] U. Westerlind, H. Schroder, A. Hobel, N. Gaidzik, A. Kaiser, C. M. Niemeyer, E. Schmitt, H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8263-8267.
- [35] S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, K. Olkiewicz, D. Verbel, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, D. Sames, S. Danishefsky, P. O. Livingston, H. I. Scher, *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 4292-4298.
- [36] W. Bessler, M. Cox, A. Lex, B. Suhr, K. Wiesmuller, G. Jung, *J. Immunol.* **1985**, *135*, 1900-1905.
- [37] R. Spohn, U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, K.-H. Wiesmüller, *Vaccine* **2004**, *22*, 2494-2499.
- [38] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y. M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3688-3692.
- [39] B. L. Wilkinson, S. Day, L. R. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1635-1639.
- [40] S. Ingale, M. A. Wolfert, T. Buskas, G. J. Boons, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 455-463.
- [41] S. Wagner, C. Mersch, A. Hoffmann-Röder, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7319-7330.
- [42] A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8676-8681.
- [43] T. Oberbillig, C. Mersch, S. Wagner, A. Hoffmann-Roder, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1487-1489.
- [44] E. Bousquet, A. Spadaro, M. S. Pappalardo, R. Bernardini, R. Romeo, L. Panza, G. Ronsisvalle, *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, *19*, 527-541.
- [45] D. P. Galonic, W. A. van der Donk, D. Y. Gin, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5997-6006.
- [46] T. Eisele, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann.-Recl.* **1997**, 1303-1313.
- [47] F. Peri, L. Cipolla, M. Rescigno, B. La Ferla, F. Nicotra, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 325-328.
- [48] L. Cipolla, M. Rescigno, A. Leone, F. Peri, B. La Ferla, F. Nicotra, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1639-1646.
- [49] L. Awad, J. Riedner, P. Vogel, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3565-3573.
- [50] B. Kuberan, S. A. Sikkander, H. Tomiyama, R. J. Linhardt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2073-2075.
- [51] G. S. Lal, G. P. Pez, R. J. Pesaresi, F. M. Prozonic, H. Cheng, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7048-7054.
- [52] K. Dax, M. Albert, J. Ortner, B. J. Paul, *Carbohydr. Res.* **2000**, *327*, 47-86.
- [53] W. J. Middleton, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 574-578.
- [54] P. T. Nyffeler, S. G. Duron, M. D. Burkart, S. P. Vincent, C. H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 192-212.
- [55] R. E. Banks, S. N. Mohialdinkhaffaf, G. S. Lal, I. Sharif, R. G. Syvret, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1992**, 595-596.
- [56] S. G. Withers, K. Rupitz, I. P. Street, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 7929-7932.
- [57] I. P. Street, J. B. Kempton, S. G. Withers, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9970-9978.
- [58] M. D. Percival, S. G. Withers, *Biochemistry* **1992**, *31*, 505-512.
- [59] J. D. McCarter, M. J. Adam, C. Braun, M. Namchuk, D. Tull, S. G. Withers, *Carbohydr. Res.* **1993**, *249*, 77-90.
- [60] J. D. McCarter, M. J. Adam, N. G. Hartman, S. G. Withers, *Biochem. J.* **1994**, *301*, 343-348.
- [61] R. Zhang, J. D. McCarter, C. Braun, W. Yeung, G. D. Brayer, S. G. Withers, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3070-3077.
- [62] D. J. Vocadlo, S. G. Withers, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 379-388.
- [63] R. P. Gibson, C. A. Tarling, S. Roberts, S. G. Withers, G. J. Davies, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 1950-1955.
- [64] D. B. Berkowitz, K. R. Karukurichi, R. de la Salud-Bea, D. L. Nelson, C. D. McCune, *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 731-742.
- [65] C. P. J. Glaudemans, P. Kovac, A. S. Rao, *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 267-277.
- [66] S. A. Allman, H. H. Jensen, B. Vijayakrishnan, J. A. Garnett, E. Leon, Y. Liu, D. C. Anthony, N. R. Sibson, T. Feizi, S. Matthews, B. G. Davis, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2522-2529.

- [67] S. Neelamegham, D. Marathe, A. Buffone, J. Xue, E. Chandrasekaran, K. Matta, M. Nasirikenari, J. Lau, *Glycobiology* **2008**, *18*, 949-949.
- [68] D. D. Marathe, A. Buffone, E. V. Chandrasekaran, J. Xue, R. D. Locke, M. Nasirikenari, J. T. Y. Lau, K. L. Matta, S. Neelamegham, *Blood* **2010**, *115*, 1303-1312.
- [69] B. Holm, S. M. Baquer, L. Holm, R. Holmdahl, J. Kihlberg, *Biorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3981-3987.
- [70] A. Hoffmann-Röder, M. Johannes, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9903-9905.
- [71] M. Johannes, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2011**.
- [72] V. Koch, K. M. VandenBussche, R. W. Chrisman, *Micro Instrumentation*, Wiley-VCH, **2007**.
- [73] V. Hessel, S. Hardt, H. Löwe, *Chemical Micro Process Engineering Fundamentals, Modeling and Reactions*, Wiley-VCH, **2004**.
- [74] J. J. Brandner, L. Bohn, T. Henning, U. Schygulla, K. Schubert, *Heat Transfer Eng.* **2007**, *28*, 761-771.
- [75] W. Ehrfeld, V. Hessel, H. Löwe, *Microreactors*, Wiley-VCH, **2000**.
- [76] V. Hessel, H. Lowe, *Chem. Eng. Technol.* **2005**, *28*, 267-284.
- [77] J. Wegner, S. Ceylan, A. Kirschning, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 17-57.
- [78] C. Wiles, P. Watts, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1655-1671.
- [79] D. M. Ratner, E. R. Murphy, M. Jhunjhunwala, D. A. Snyder, K. F. Jensen, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2005**, 578-580.
- [80] K. Geyer, P. H. Seeberger, *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 395-403.
- [81] F. R. Carrel, K. Geyer, J. D. C. Codee, P. H. Seeberger, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2285-2288.
- [82] D. S. Negi, L. Koppling, K. Lovis, R. Abdallah, J. Geisler, U. Budde, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 345-348.
- [83] T. Gustafsson, R. Gilmour, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2008**, 3022-3024.
- [84] M. Baumann, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Synlett* **2008**, 2111-2114.
- [85] M. Baumann, I. R. Baxendale, L. J. Martin, S. V. Ley, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6611-6625.
- [86] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1980**, *19*, 731-732.
- [87] R. R. Schmidt, G. Grundler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 781-782.
- [88] C. Mersch, S. Wagner, A. Hoffmann-Röder, *Synlett* **2009**, 2167-2171.
- [89] J. Zhang, P. Kovac, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 461-469.
- [90] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [91] A. P. Kozikowski, J. Lee, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 863-870.
- [92] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129 - 132.
- [93] S. Koto, K. Asami, M. Hirooka, K. Nagura, M. Takizawa, S. Yamamoto, N. Okamoto, M. Sato, H. Tajima, T. Yoshida, N. Nonaka, T. Sato, S. Zen, K. Yago, F. Tomonaga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 765-777.
- [94] W. Lu, L. Navidpour, S. D. Taylor, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1213-1217.
- [95] R. E. Banks, S. N. Mohialdin-Khaffaf, G. S. Lal, I. Sharif, R. G. Syvret, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1992**.
- [96] M. Albert, K. Dax, J. Ortner, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4839-4848.
- [97] M. D. Burkart, Z. Zhang, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11743-11746.
- [98] S. P. Vincent, M. D. Burkart, C. Y. Tsai, Z. Y. Zhang, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5264-5279.
- [99] T. Oberbillig, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2008**.
- [100] G. Zemplén, E. Pacsu, *Ber. dtsh. chem. Ges. (A and B Series)* **1929**, *62*, 1613-1614.
- [101] J.-C. Jaquinet, *Carbohydr. Res.* **1990**, *199*, 153-181.
- [102] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 629-631.
- [103] H. Kunz, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 563-573.
- [104] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976-980.
- [105] H. Kunz, M. Schultz, *Glycopeptides and Related Compounds*, M. Dekker, Inc., New York, **1997**.
- [106] M. Schultz, H. Kunz, *Tetrahedron-Asymmetr* **1993**, *4*, 1205-1220.

- [107] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.
- [108] R. Lemieux, R. M. Ratcliffe, in *Deutsche Patentanmeldung, Vol. AZ: P 2816340.8*, **1978**.
- [109] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 751-769.
- [110] C. Brocke, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2003**.
- [111] S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 880-885.
- [112] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525-542.
- [113] M. Johannes, T. Oberbillig, A. Hoffmann-Röder, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5541-5546.
- [114] L. Rochepeau-Jobron, J.-C. Jacquinet, *Carbohydr. Res.* **1997**, *305*, 181-191.
- [115] S. Wagner, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2008**.
- [116] F. Andersson, B. Samuelsson, *Carbohydr. Res.* **1984**, *129*, C1-C3.
- [117] L. Ayala, C. G. Lucero, J. A. C. Romero, S. A. Tabacco, K. A. Woerpel, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15521-15528.
- [118] J. A. C. Romero, S. A. Tabacco, K. A. Woerpel, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 168-169.
- [119] J. Dinkelaar, A. R. de Jong, R. van Meer, M. Somers, G. Lodder, H. S. Overkleeft, J. D. C. Codee, G. A. van der Marel, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4982-4991.
- [120] C. G. Lucero, K. A. Woerpel, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2641-2647.
- [121] M. T. C. Walvoort, J. Dinkelaar, L. J. van den Bos, G. Lodder, H. S. Overkleeft, J. D. C. Codée, G. A. van der Marel, *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 1252-1263.
- [122] E. Durantie, C. Bucher, R. Gilmour, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 8208-8215.
- [123] A. A. Pavia, S. N. Ungchhun, J. L. Durand, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3158-3160.
- [124] A. J. Ratcliffe, B. Fraser-Reid, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 747-750.
- [125] C. Mersch, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2011**.
- [126] R. R. Schmidt, A. Toepfer, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3353-3356.
- [127] K. Baumann, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2007**.
- [128] M. Dekker, *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Ed.: S. Hanessian), New York, **1997**.
- [129] T. Greene, P. Wuts, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, **2007**.
- [130] P. Fügedi, A. Lipták, P. Nánási, J. Szejtli, *Carbohydr. Res.* **1982**, *104*, 55-67.
- [131] A. Lipták, I. Jodál, P. Nánási, *Carbohydr. Res.* **1975**, *44*, 1-11.
- [132] A. Lipták, I. Jodál, P. Nánási, *Carbohydr. Res.* **1976**, *52*, 17-22.
- [133] M. Sakagami, H. Hamana, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5547-5551.
- [134] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551-7555.
- [135] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 803-805.
- [136] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813-826.
- [137] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [138] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801-812.
- [139] F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686-4690.
- [140] G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180-6183.
- [141] C.-D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246-249.
- [142] C.-D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. D. Haug, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, *15*, 59-66.
- [143] P. Schultheiß-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1983**, *22*, 62-63.
- [144] A. J. Mort, D. T. A. Lamport, *Anal. Biochem.* **1977**, *82*, 289-309.
- [145] I. W. James, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855-4946.
- [146] W. F. Degrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295-1300.
- [147] R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, *20*, 451-454.
- [148] S.-S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [149] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005-4008.
- [150] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
- [151] J. M. J. Frechet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 3055-3056.
- [152] A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.

- [153] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268-274.
- [154] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- [155] J. Sheehan, P. Cruickshank, G. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2525-2528.
- [156] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- [157] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- [158] V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269-1272.
- [159] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, 572-574.
- [160] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279-2282.
- [161] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1994**, 201-203.
- [162] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [163] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [164] M. Rothe, J. Mazánek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1972**, *11*, 293-&.
- [165] M. Rothe, J. Mazánek, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 439-459.
- [166] Y. Yang, W. V. Sweeney, K. Schneider, S. Thörnqvist, B. T. Chait, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9689-9692.
- [167] M. H. S. Cezari, L. Juliano, *Peptide Res.* **1996**, *9*, 88-91.
- [168] R. Ramage, J. Green, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2287-2290.
- [169] J. Green, O. M. Ogunjobi, R. Ramage, A. S. J. Stewart, S. McCurdy, R. Noble, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4341-4344.
- [170] T. Peters, *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 161-245.
- [171] K. M. Murphy, A. B. Heimberger, D. Y. Loh, *Science* **1990**, *250*, 1720-1723.
- [172] K. E. van Holde, K. I. Miller, *Adv. Protein Chem.*, Academic Press, **1995**, 1-81.
- [173] D. W. Scheifele, W. Meekison, R. Guasparini, A. Roberts, L. Barreto, J. Thippawong, S. Wiltsey, *Vaccine* **1995**, *13*, 104-108.
- [174] S. Kurikka, H. Kayhty, H. Peltola, L. Saarinen, J. Eskola, P. H. Makela, *Pediatrics* **1995**, *95*, 815-822.
- [175] R. E. Huebner, M. Nicol, R. Mothupi, H. Kayhty, N. Mbelle, E. Khomo, K. P. Klugman, *Vaccine* **2004**, *23*, 802-806.
- [176] T. Nolan, S. Lambert, D. Robertson, H. Marshall, P. Richmond, C. Streecon, J. Poolman, D. Boutriau, *Vaccine* **2007**, *25*, 8487-8499.
- [177] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Vol. 1, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [178] L. F. Tietze, C. Schroeter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H. J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 148-153.
- [179] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1215-1221.
- [180] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624-7630.
- [181] C. Mersch, S. Wagner, B. Gerlitzki, E. Schmitt, A. Hoffmann-Röder, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [182] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, Vol. 4th, Elsevier **1996**.
- [183] G. Lippke, H. Thaler, *Stärke* **1970**, *22*, 344-351.
- [184] C. Filser, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- [185] O. T. Schmidt, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. II, Academic Press, New York, **1963**.
- [186] W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 2096-2098.
- [187] Z. Y. Zhang, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1996**, *295*, 41-55.
- [188] N. V. Bovin, S. É. Zurabyan, A. Y. Khorlin, *Carbohydr. Res.* **1981**, *98*, 25-35.
- [189] L. Barbieri, V. Costantino, E. Fattorusso, A. Mangoni, N. Basilico, M. Mondani, D. Taramelli, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3279-3285.
- [190] M. J. Adam, B. D. Pate, J.-R. Nesser, L. D. Hall, *Carbohydr. Res.* **1983**, *124*, 215-224.
- [191] R. U. Lemieux, R. Cromer, U. Spohr, *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 3083-3098.
- [192] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473-1482.
- [193] M. Liu, G. Barany, D. Live, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2111-2122.

- [194] K. A. Winans, D. S. King, V. R. Rao, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **1999**, *38*, 11700-11710.
- [195] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981-4993.
- [196] S. Dziadek, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- [197] S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4150-4162.
- [198] C.-R. Shie, Z.-H. Tzeng, S. S. Kulkarni, B.-J. Uang, C.-Y. Hsu, S.-C. Hung, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1665-1668.
- [199] S. Keil, A. Kaiser, F. Syed, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, 1355-1369.

## Spektroskopischer Anhang

2,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-6-desoxy-6-fluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-trichloracetimidat (7)	
$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{19}\text{F}$	IV
3,4,6-Tri- <i>O</i> -benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-trichloracetimidat (9)	
$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{19}\text{F}$	V
3,4-Di- <i>O</i> -benzyl-2,6-didesoxy-2,6-bisfluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (8)	
$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{19}\text{F}$	VII
<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(2-acetamido-2,6-didesoxy-6-fluor-3- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin- <i>tert</i> -butylester (29)	
$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC, $^{19}\text{F}$	VIII
<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(2-acetamido-2,6-didesoxy-6-difluor- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin- <i>tert</i> -butylester (30)	
$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC, $^{19}\text{F}$	X
<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(2-acetamido-2-desoxy-3,4-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin- <i>tert</i> -butylester (35)	
$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC	XII
<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(2-acetamido-2,6-didesoxy-6-fluor-3,4-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin- <i>tert</i> -butylester (38)	
$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC, $^{19}\text{F}$	XIV
<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(2-acetamido-2-desoxy-3,4- <i>O</i> -isopropyliden- $\alpha$ -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranosyl)-L-threonin- <i>tert</i> -butylester (48)	
$^1\text{H}$	XVI

---

*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-difluor-3,4-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**49**)

$^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$

**XVI**

*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**50**)

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC,  $^{19}\text{F}$

**XVII**

*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-bisfluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**51**)

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC,  $^{19}\text{F}$

**XX**

*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-difluor-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**53**)

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC,  $^{19}\text{F}$

**XXII**

*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4-benzyl-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**60**)

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC,  $^{19}\text{F}$

**XXV**

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3-*O*-[2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -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-proline (**74**)

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC,  $^{19}\text{F}$

**XXVII**

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3-*O*-[2,6-dideoxy-2,6-bisfluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -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-proline (**75**)

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC,  $^{19}\text{F}$

**XXX**



1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluor-3-*O*-[2,6-dideoxy-2,6-difluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -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 (**77**)

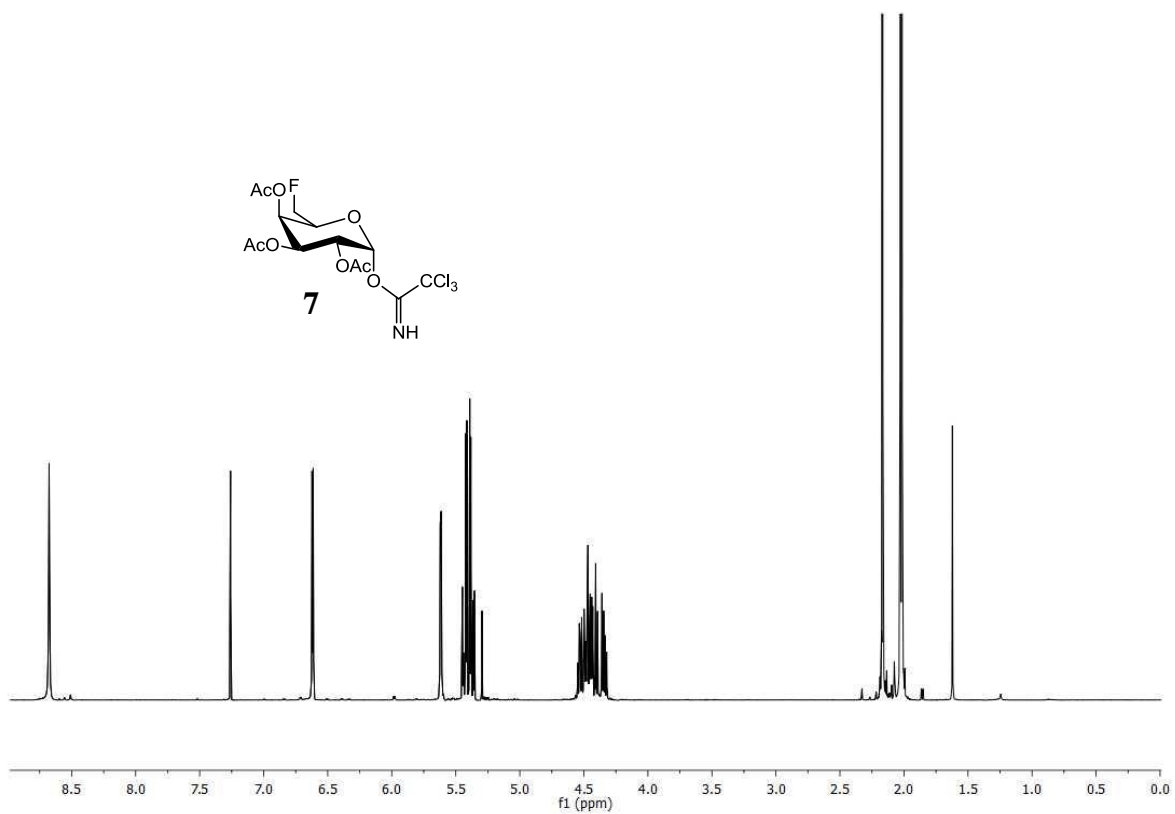
$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC,  $^{19}\text{F}$

XXXII

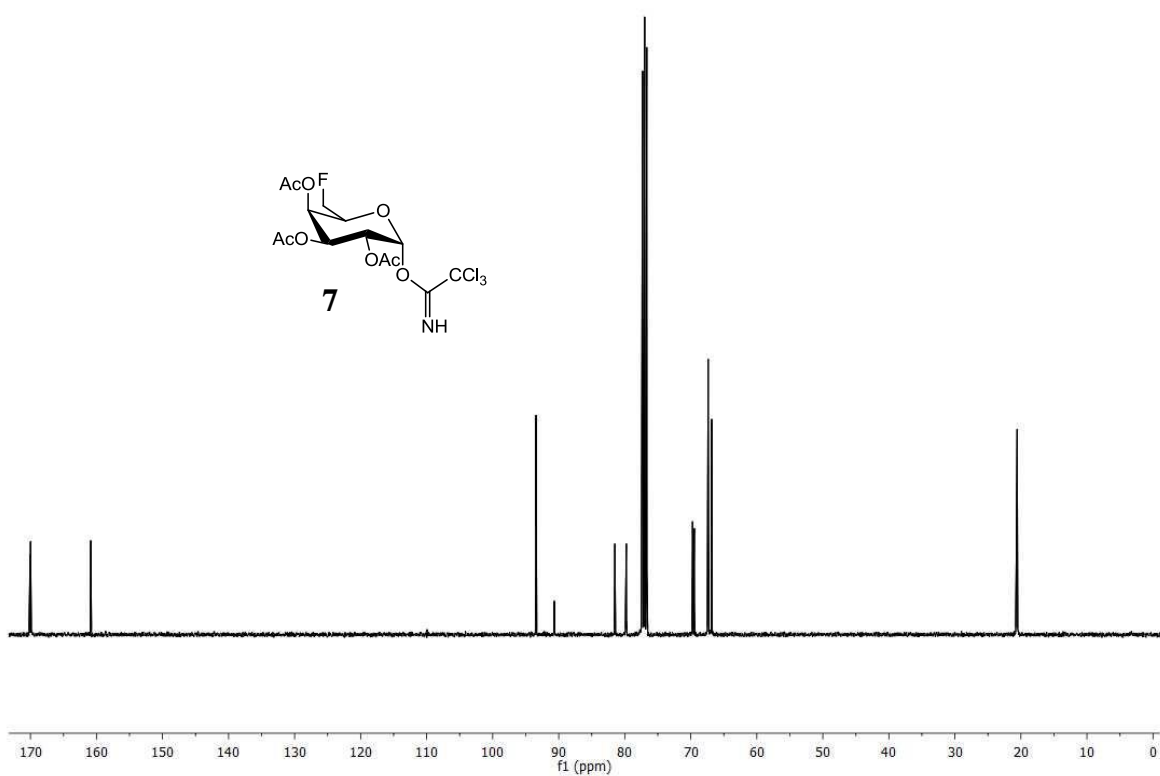
Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-difluor-3-*O*-[2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-galactopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-proline (**76**)

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC,  $^{19}\text{F}$

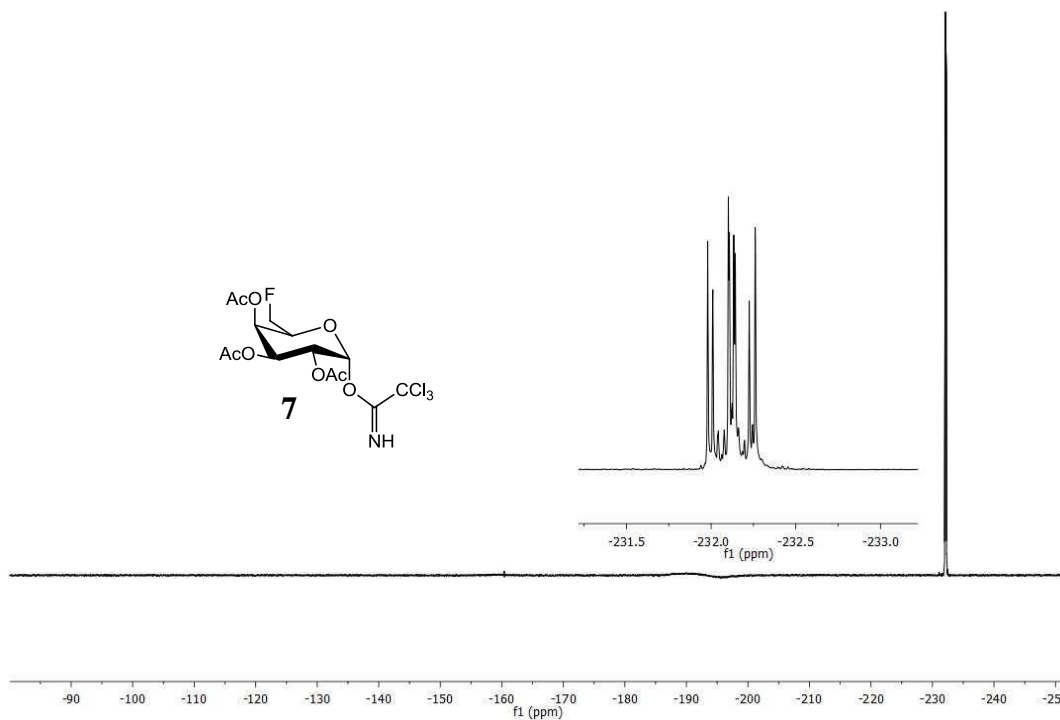
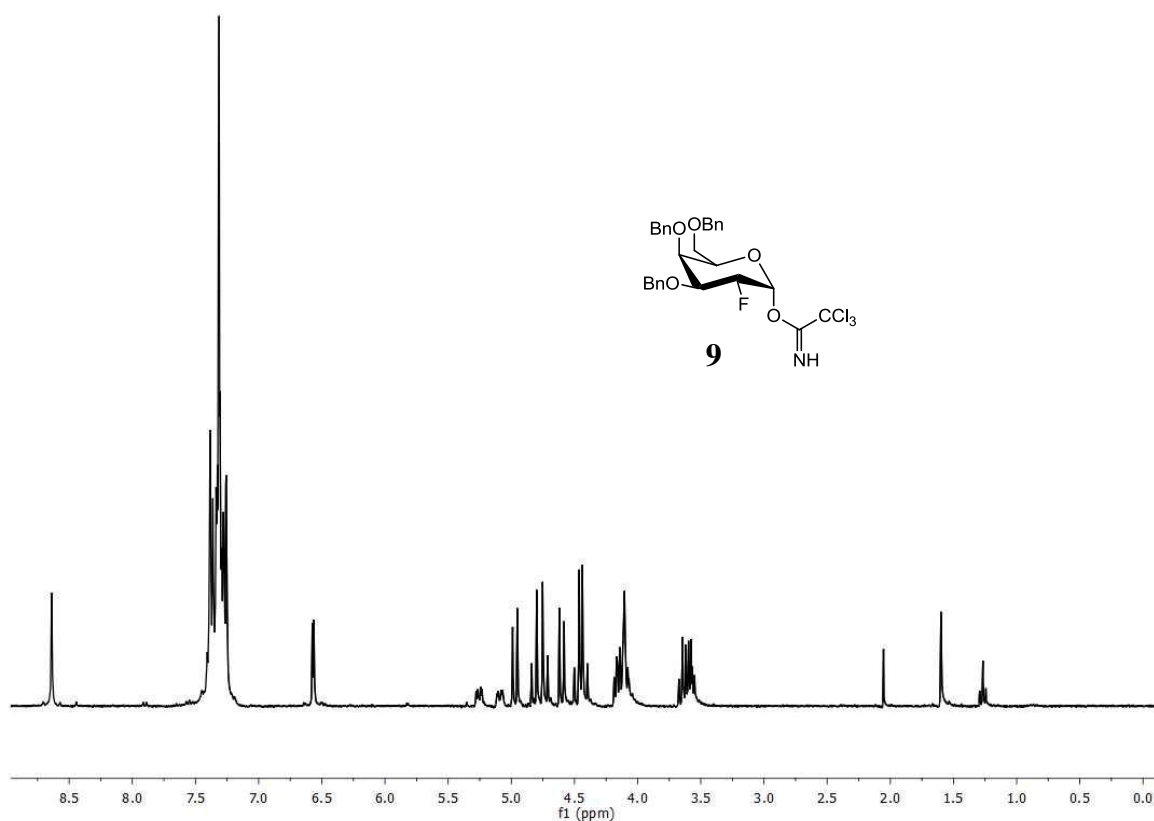
XXXV

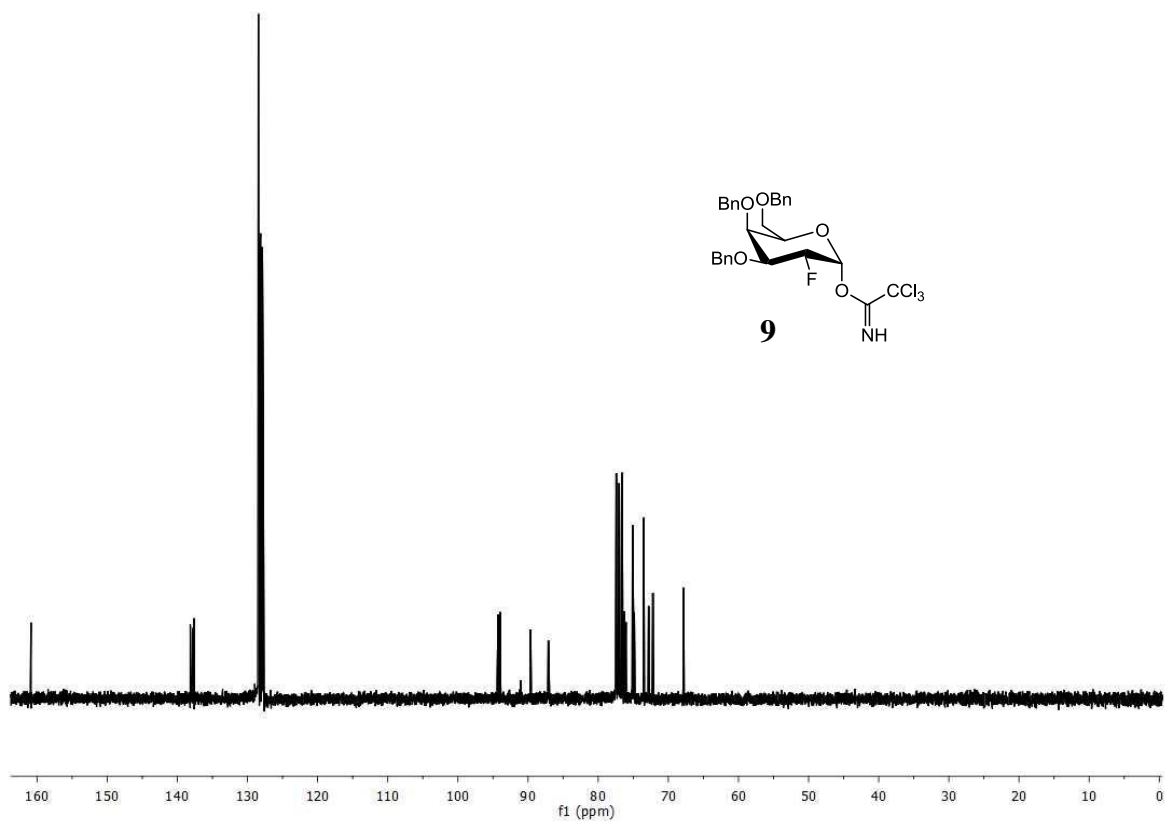


<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

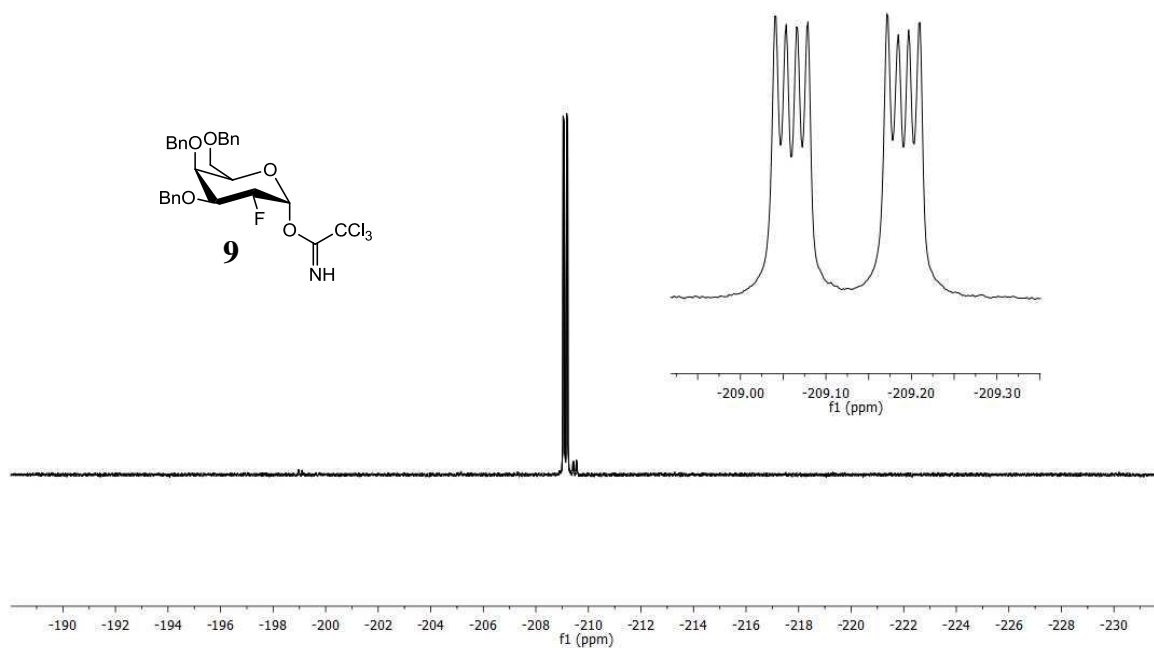


<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

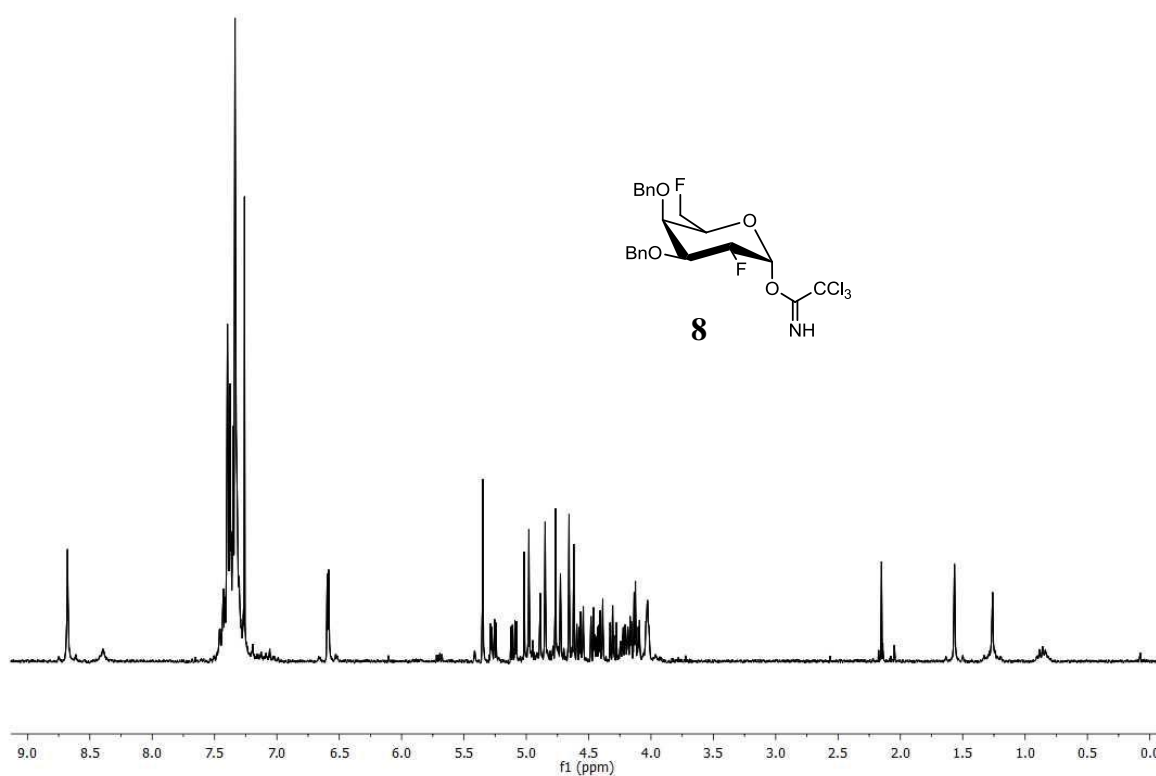
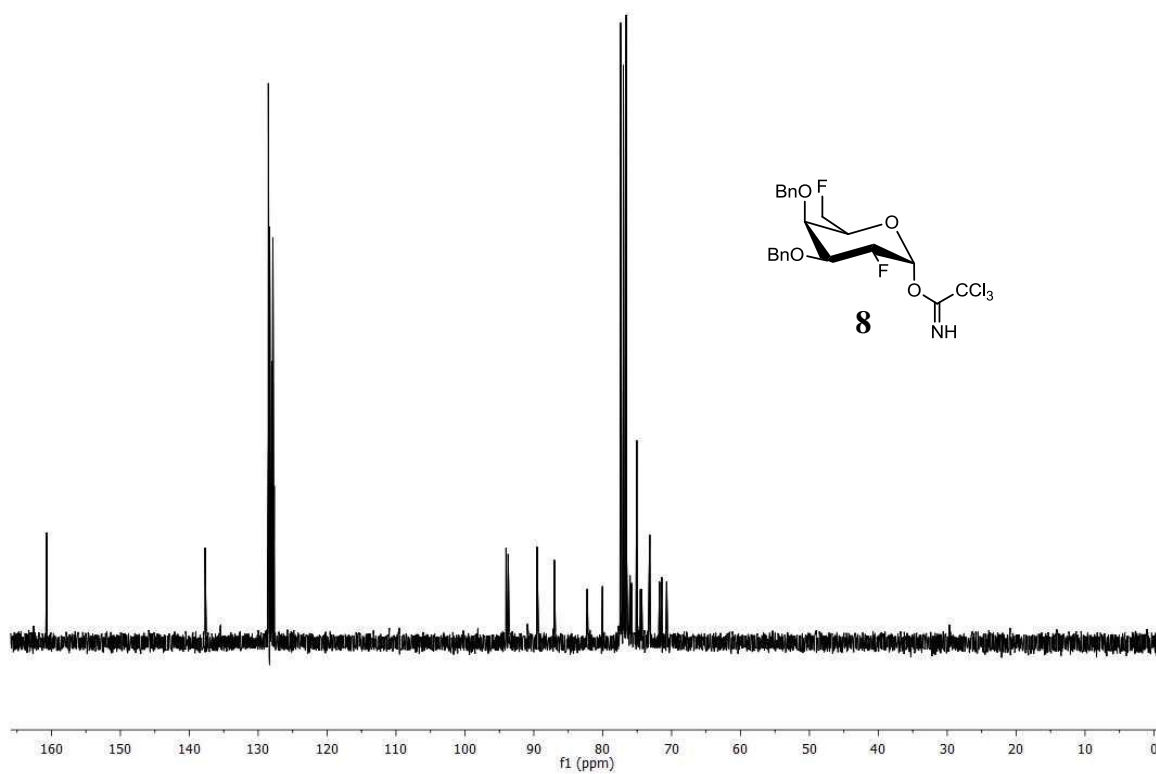
 $^{19}\text{F}$ -NMR (376.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

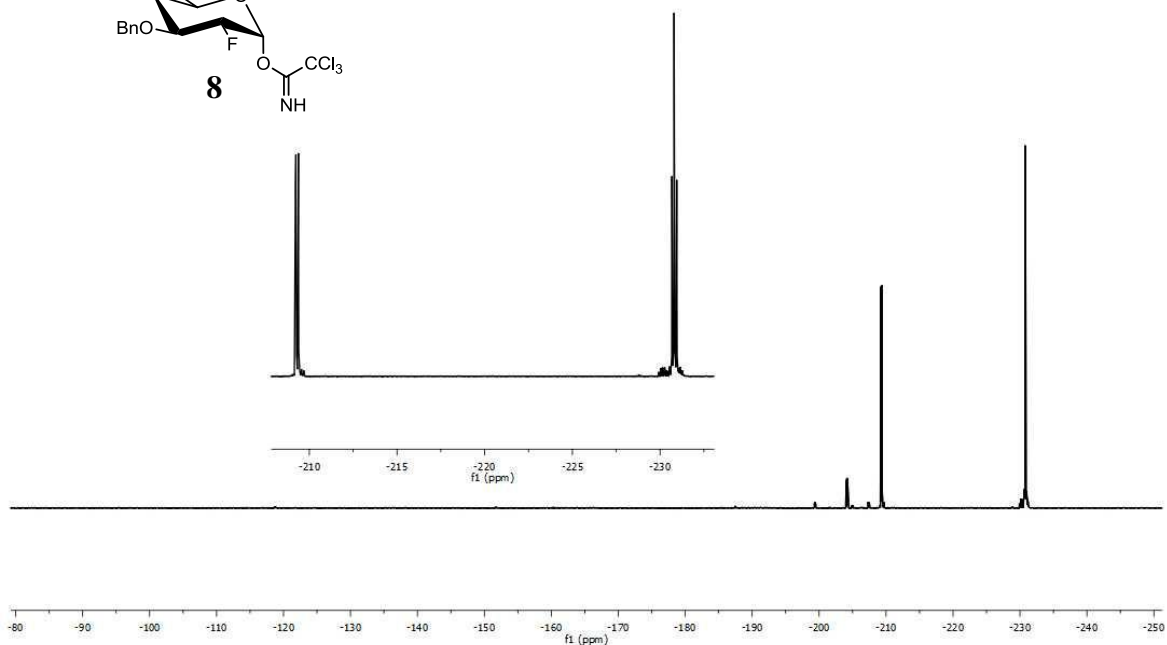
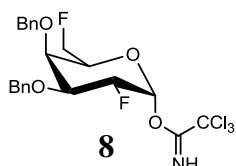


$^{13}\text{C}$ -NMR (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

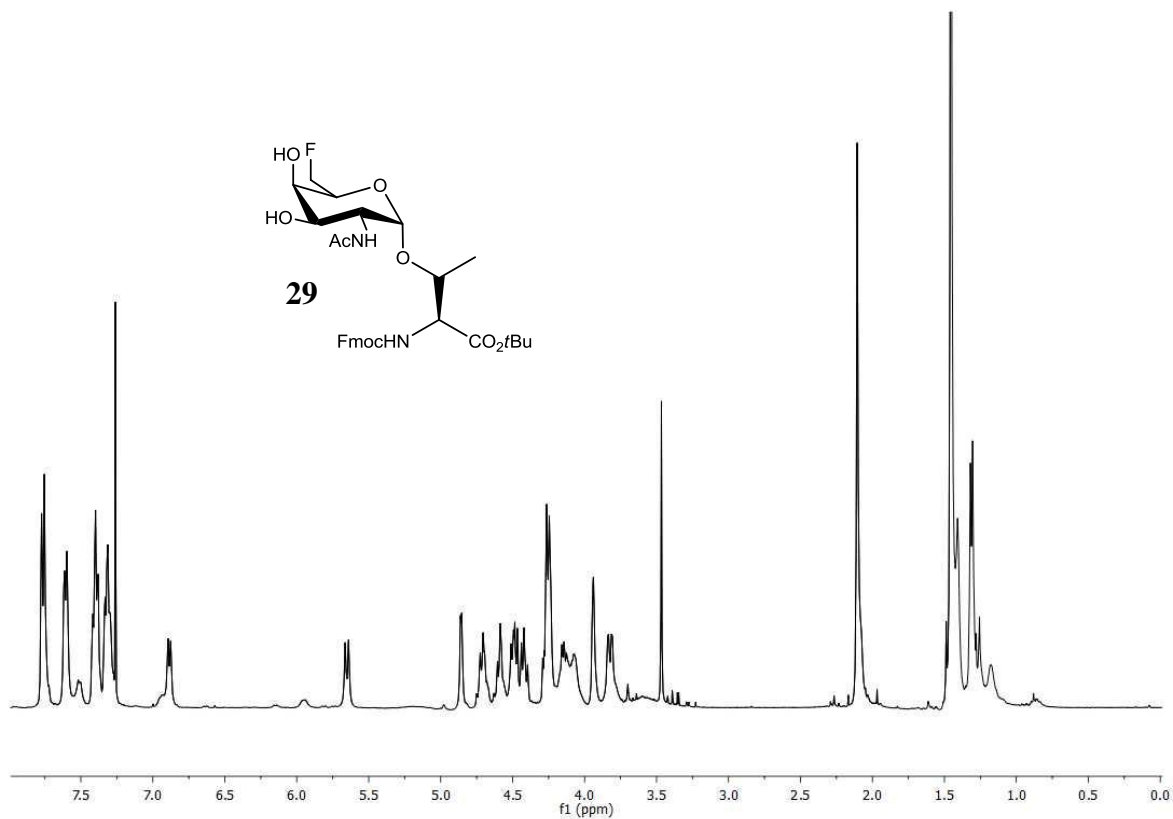
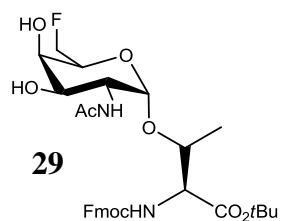


$^{19}\text{F}$ -NMR (376.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

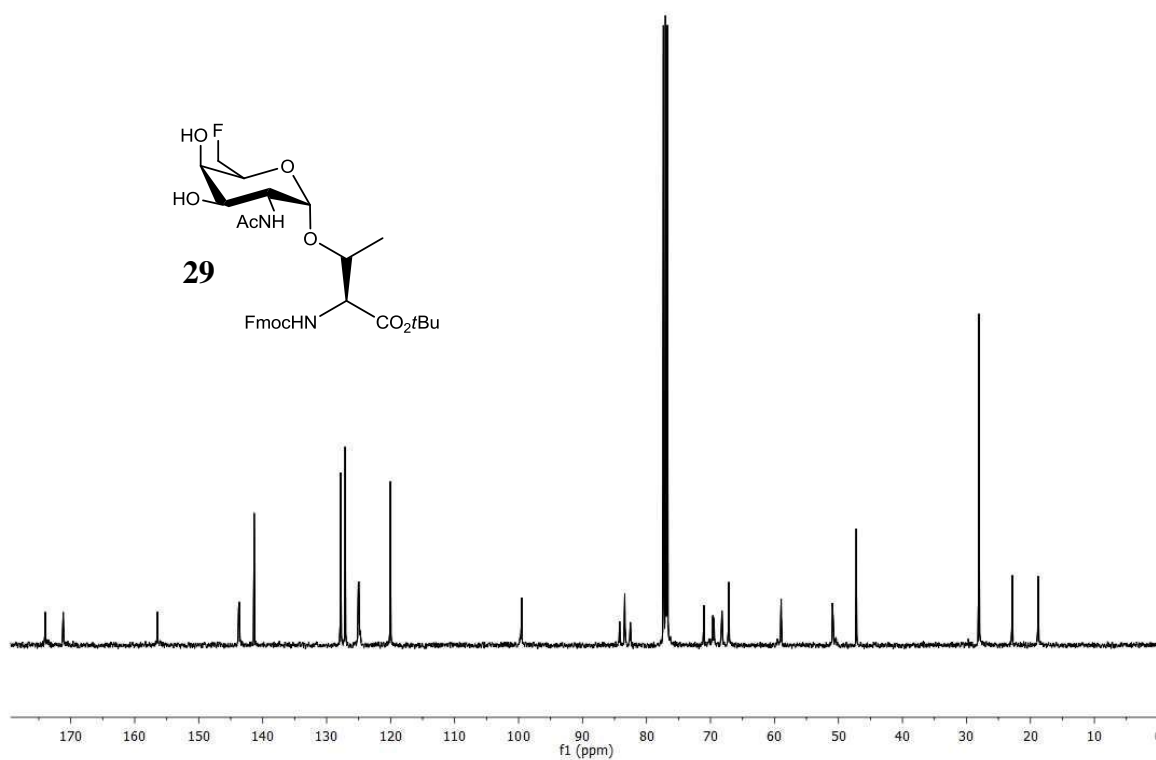
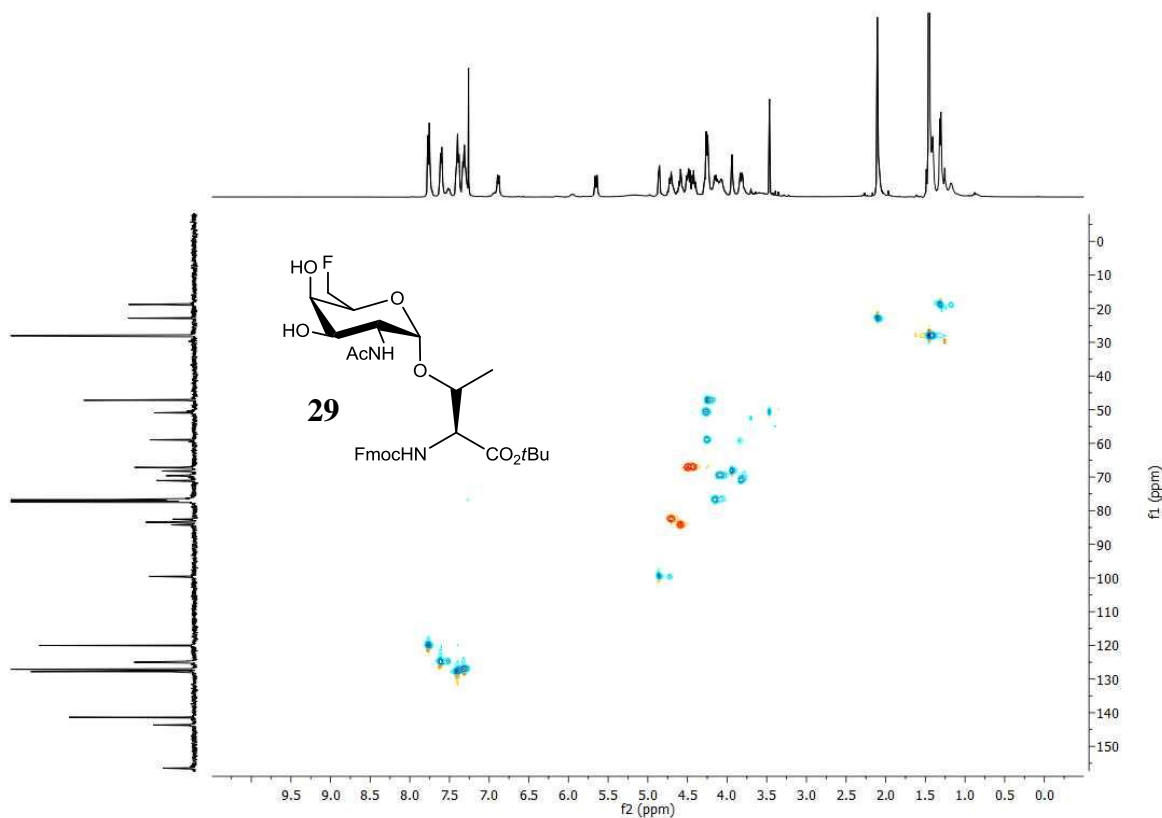
 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

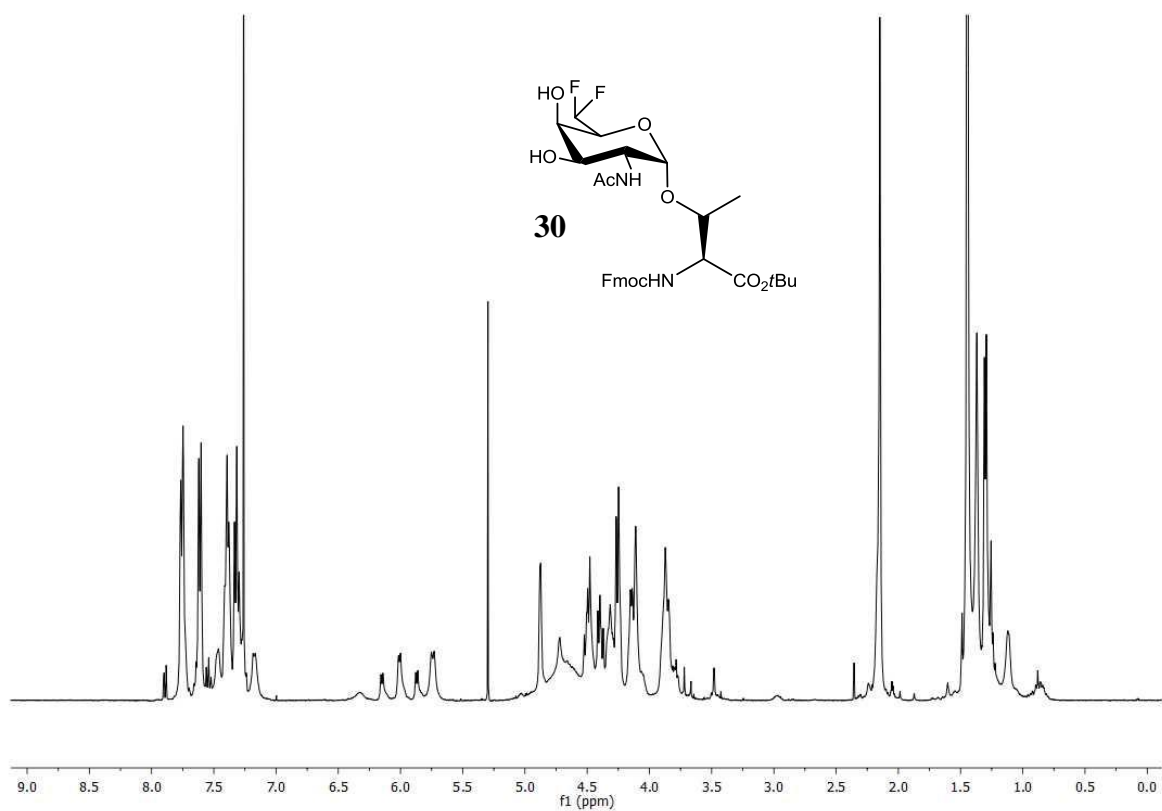
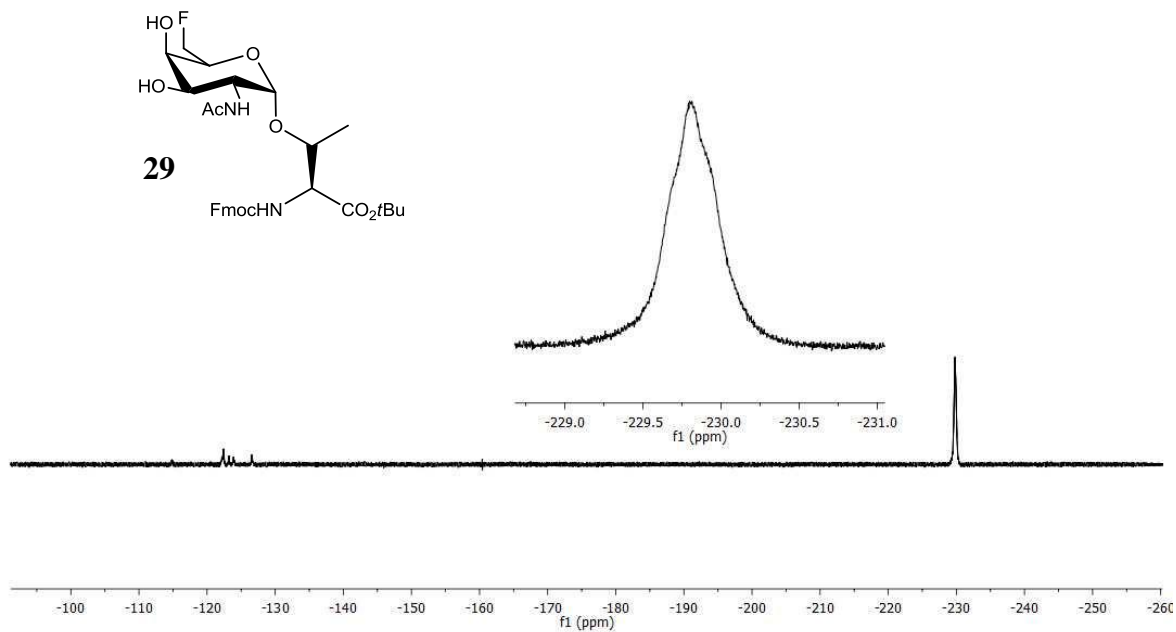


$^{19}\text{F}$ -NMR (376.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

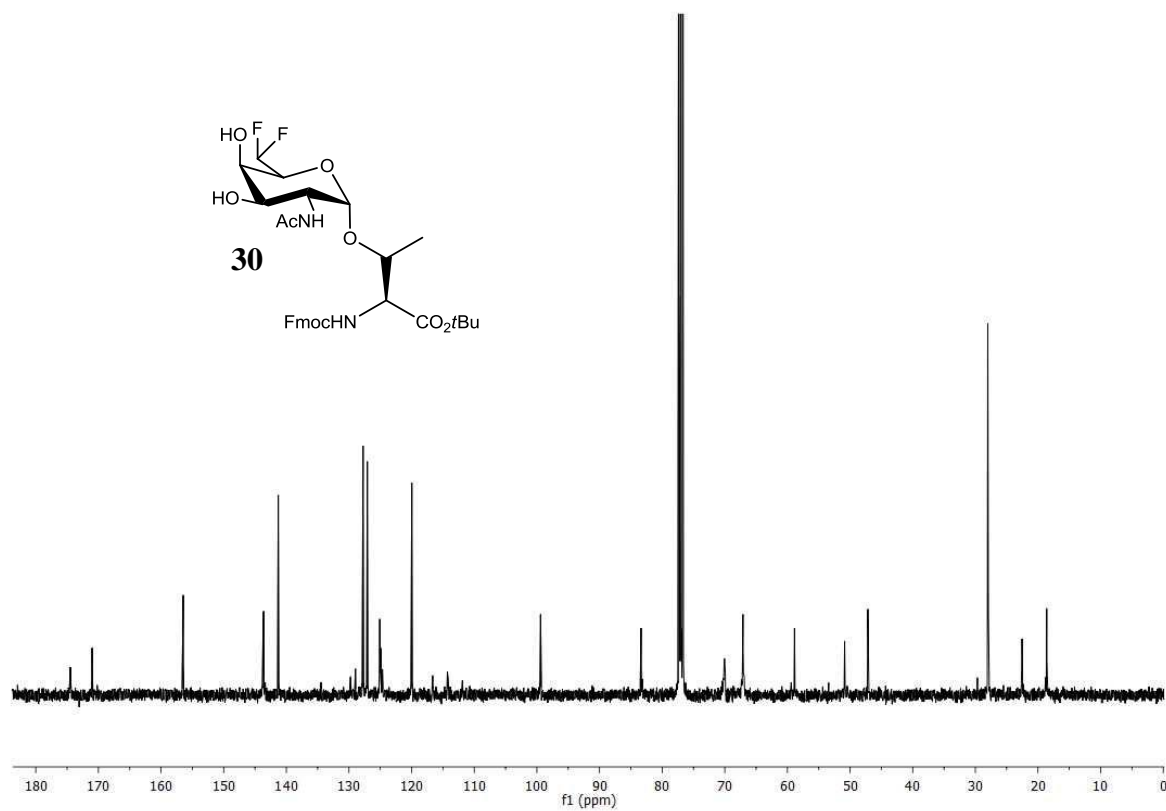
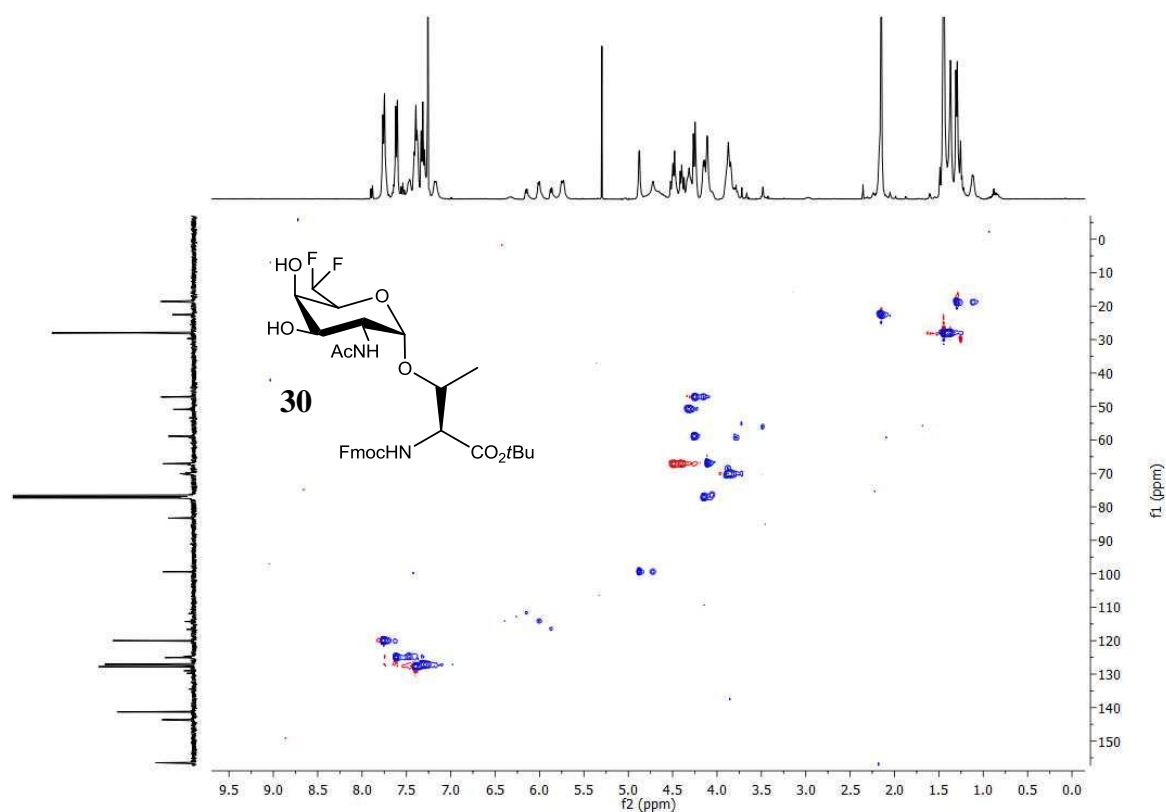


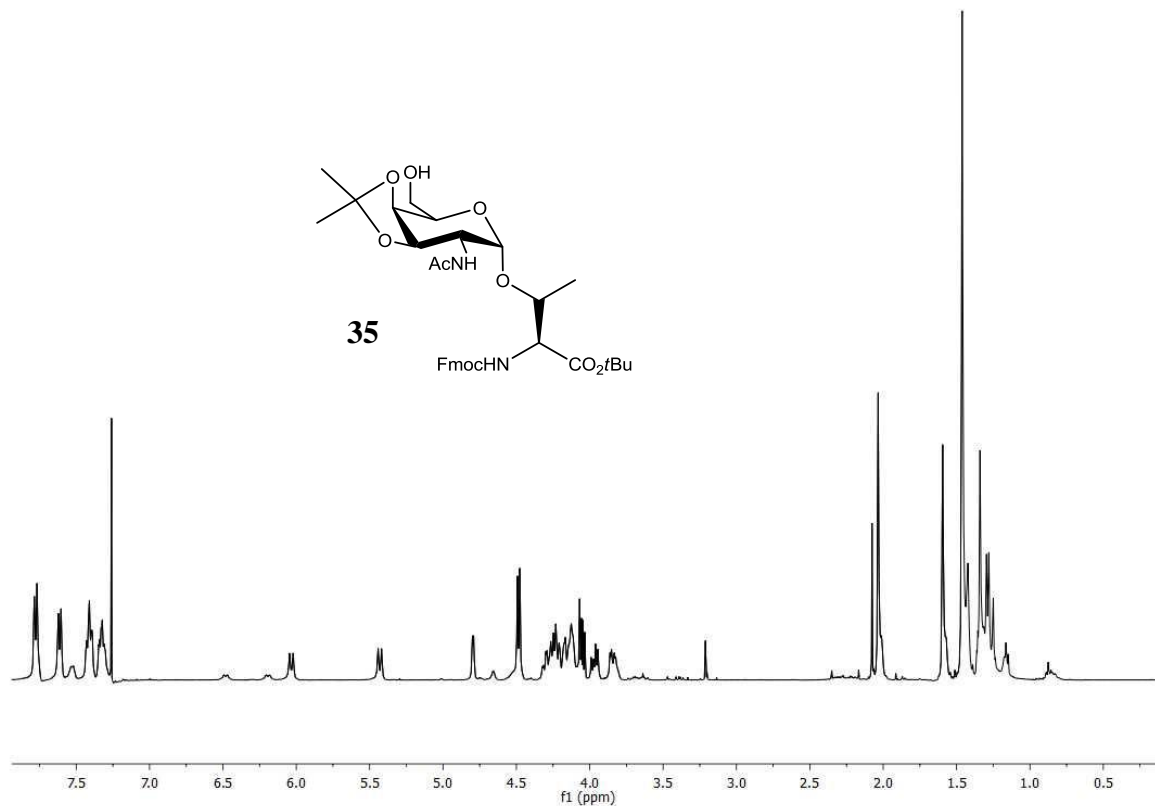
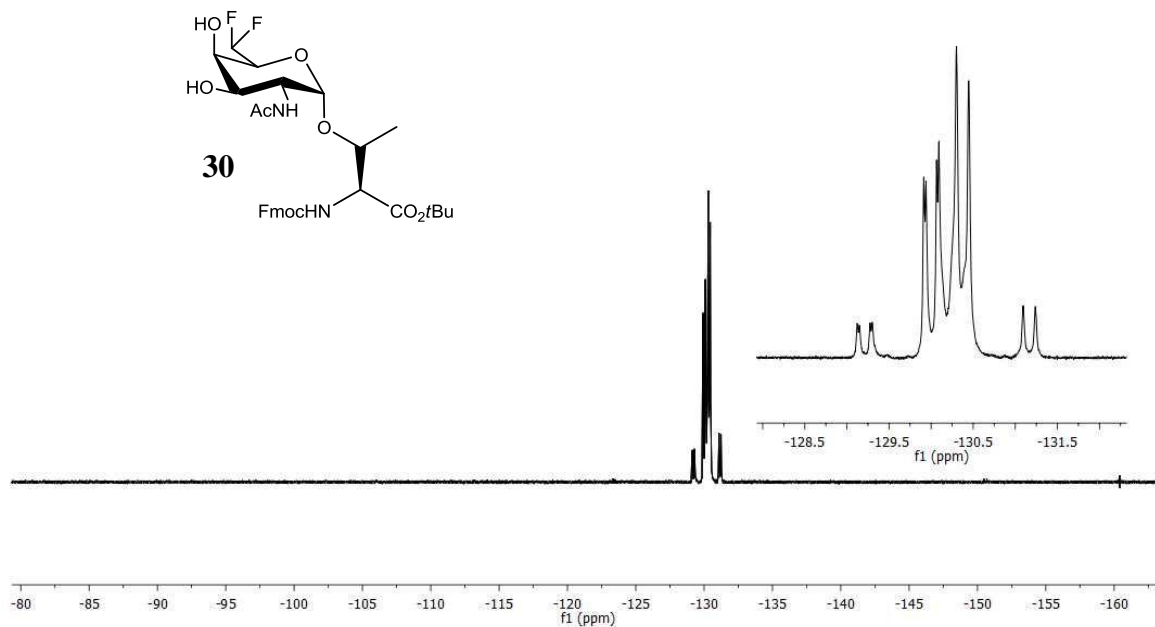
$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

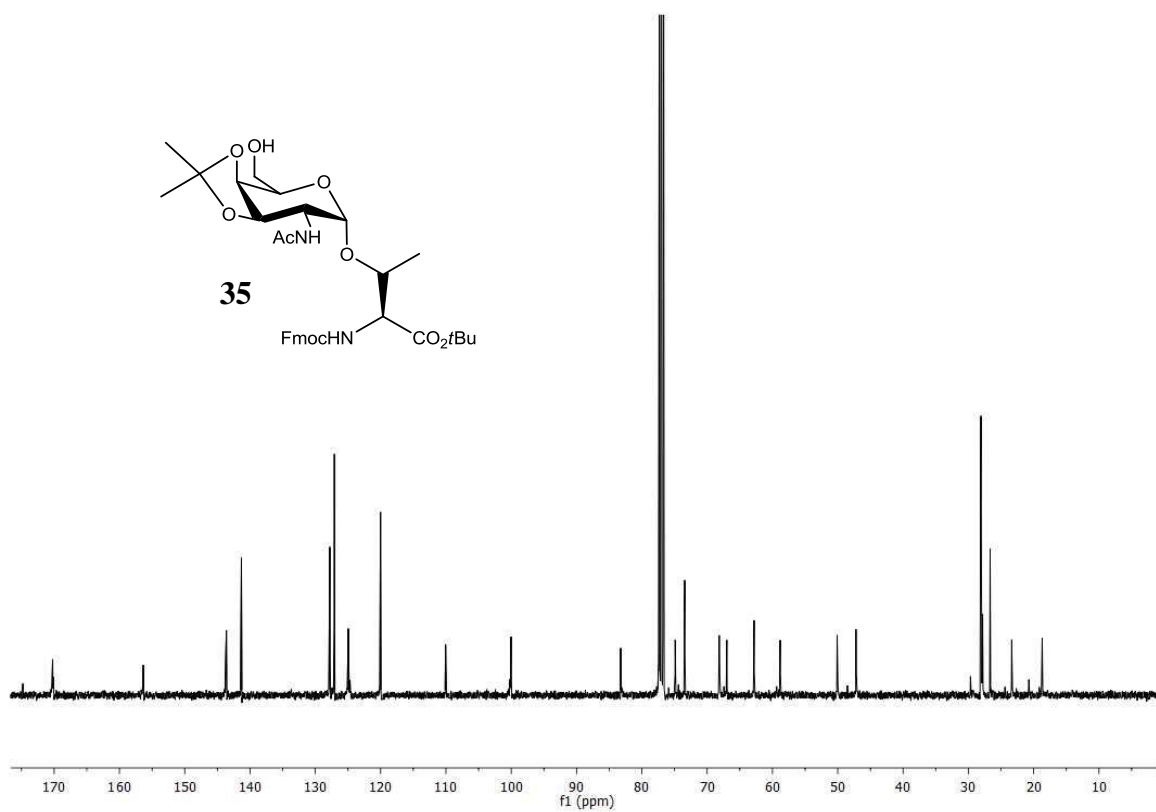
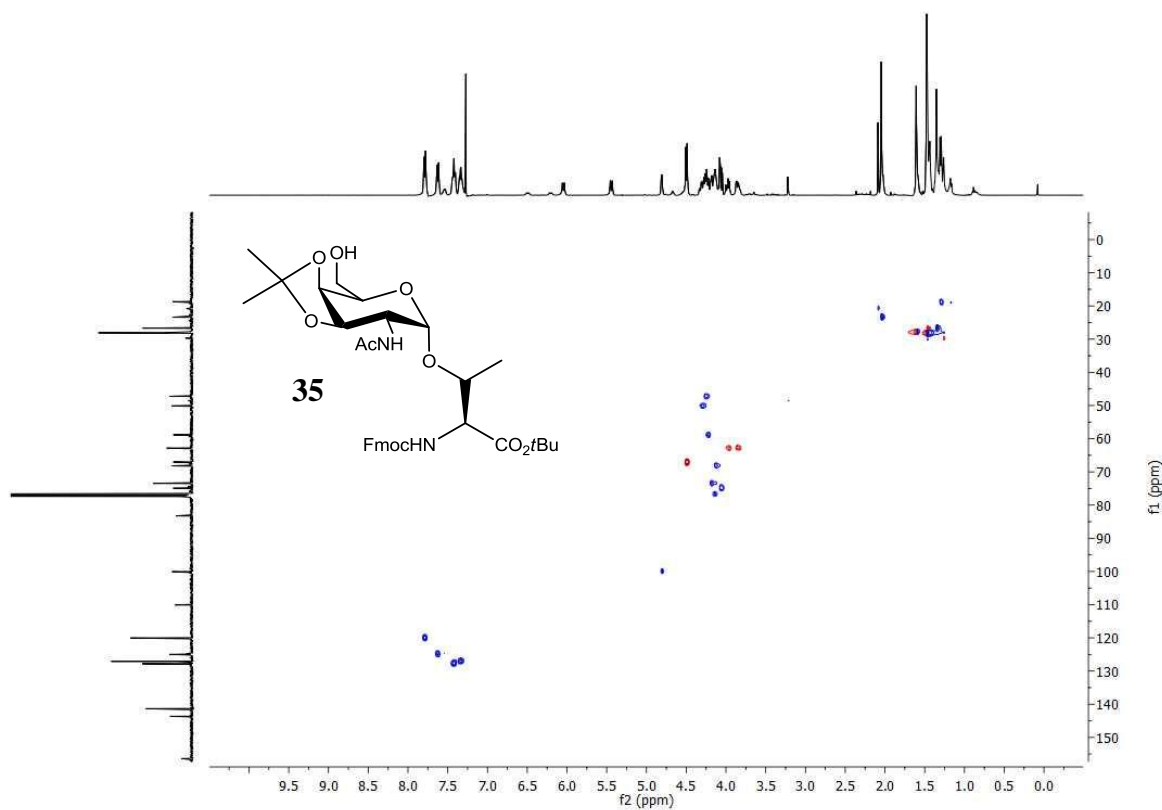
 $^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

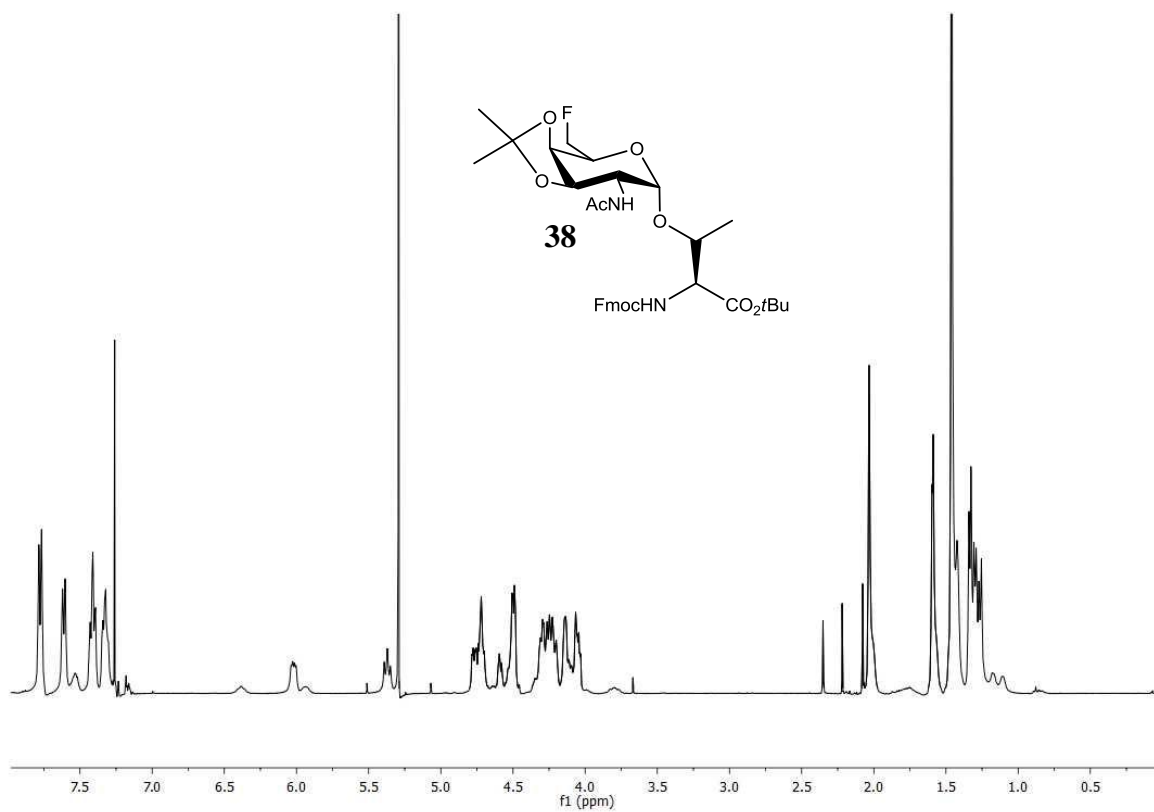




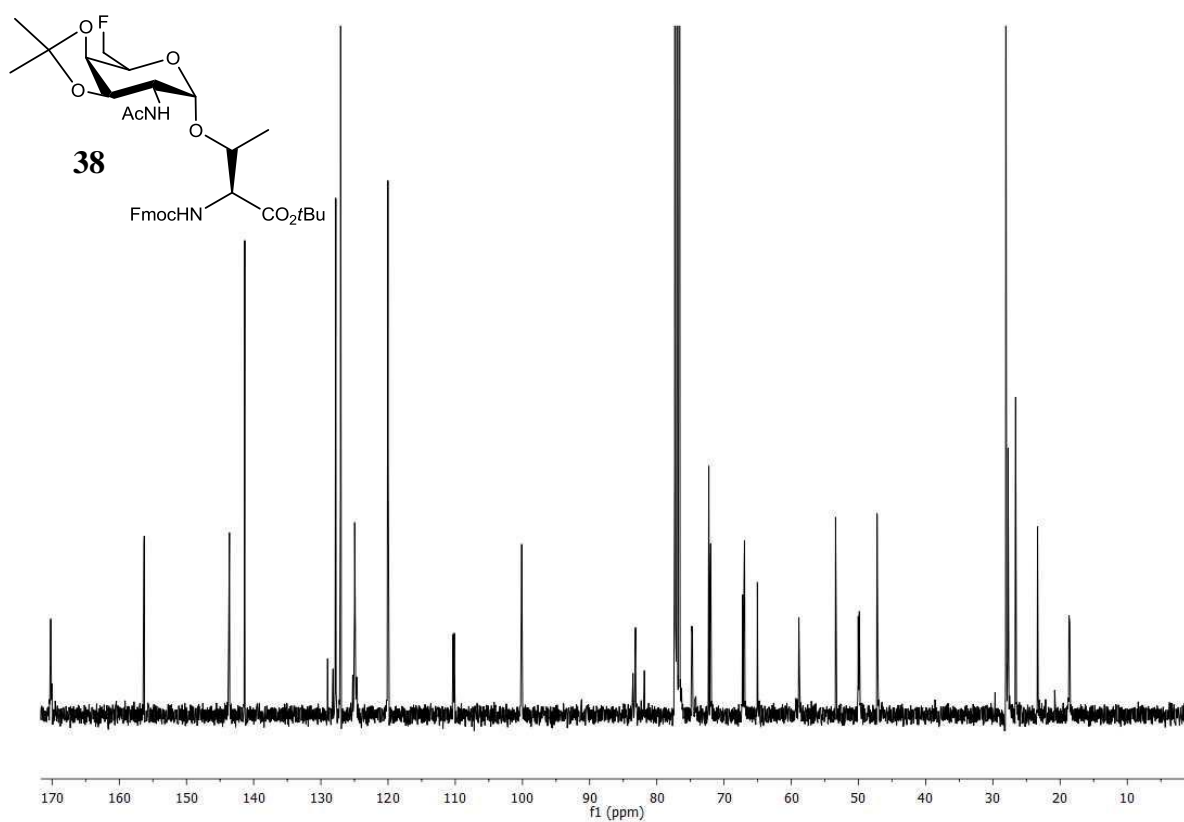
 $^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC-NMR ( $\text{CDCl}_3$ )



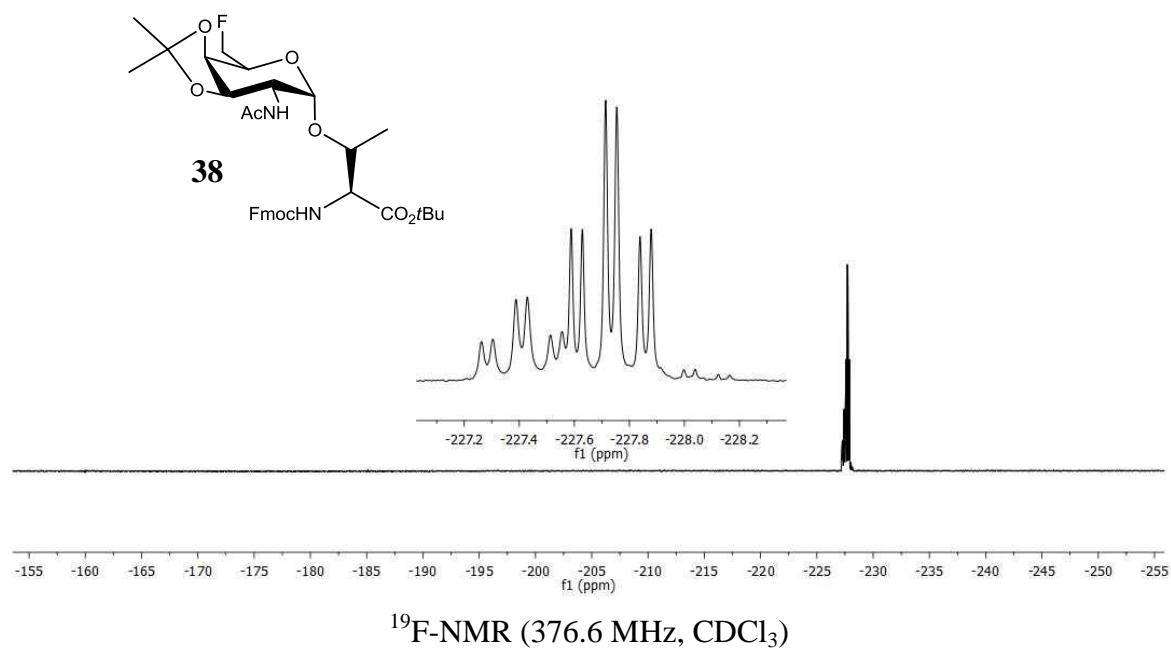
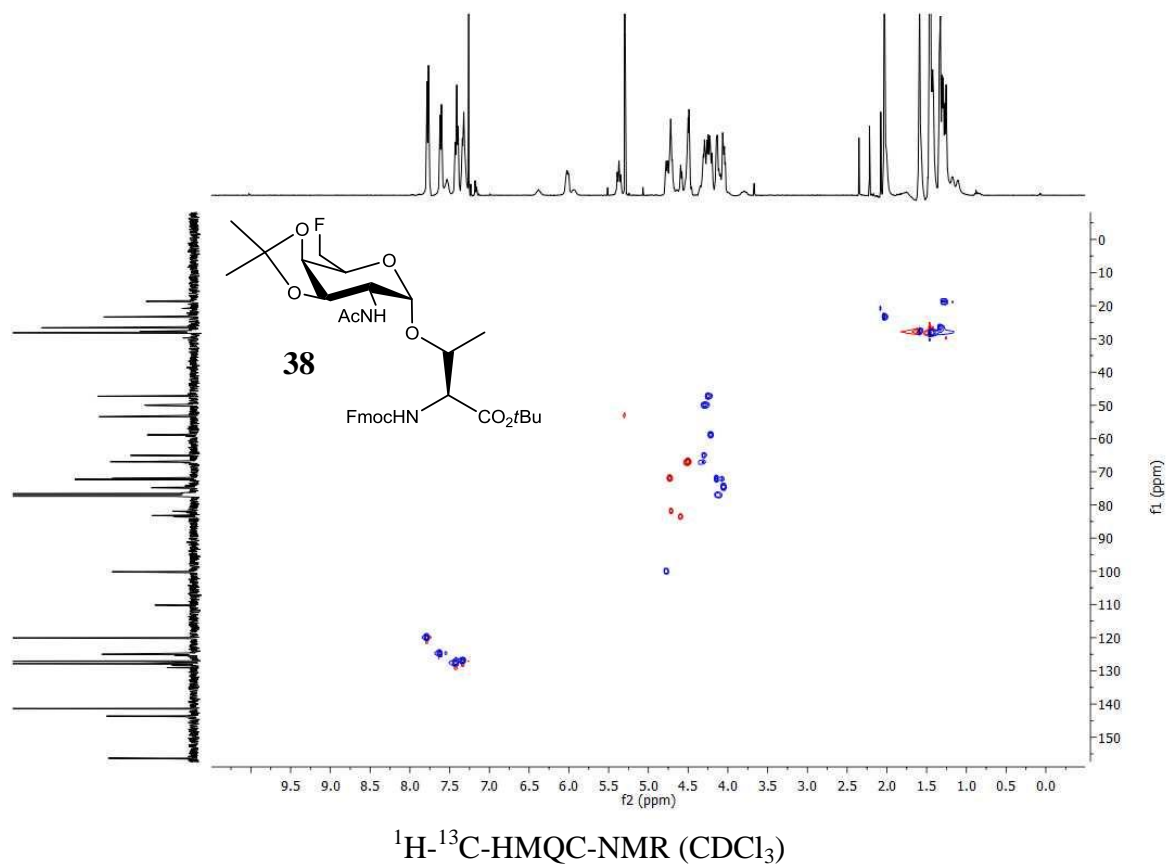
 $^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

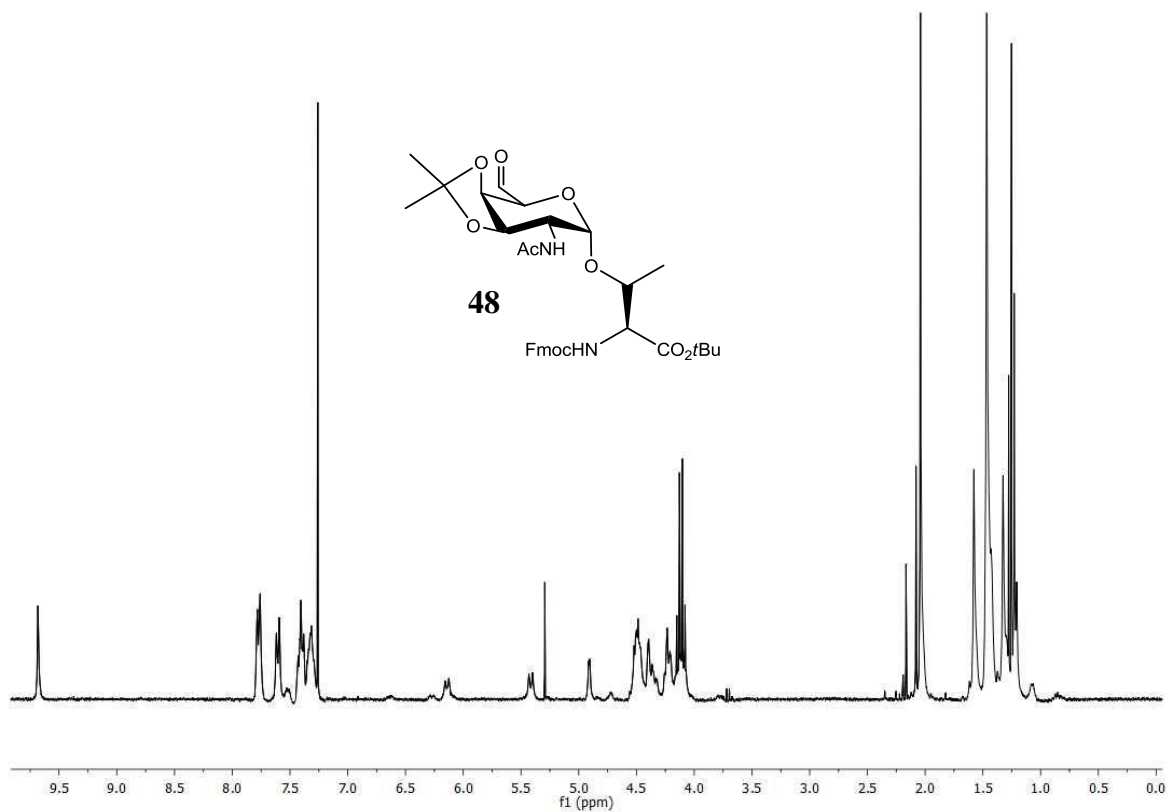


$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

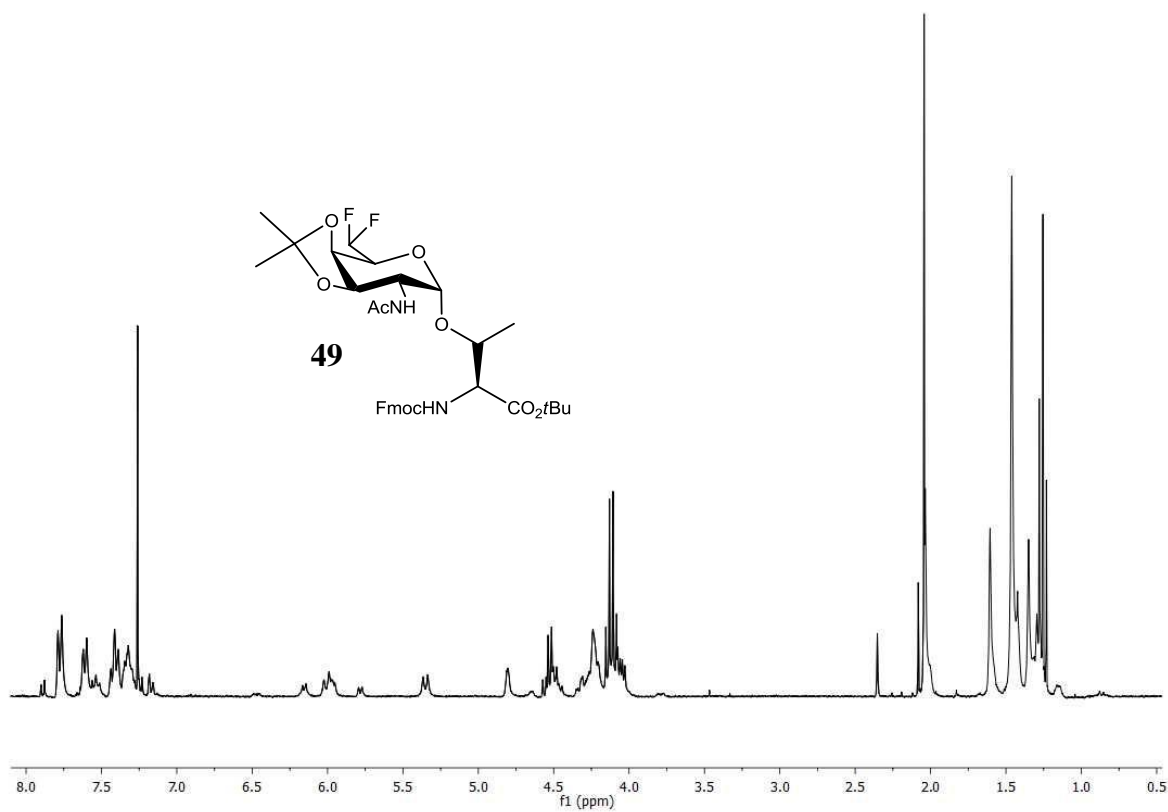


$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

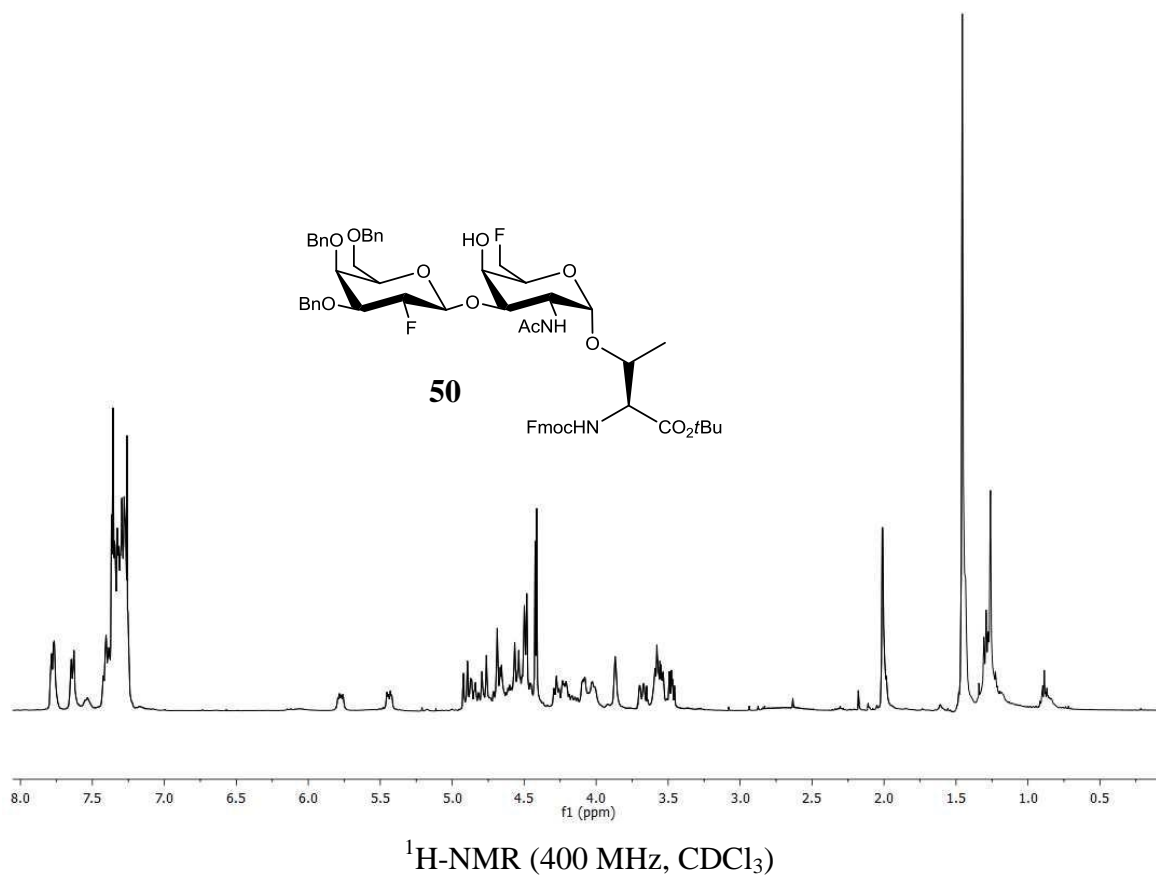
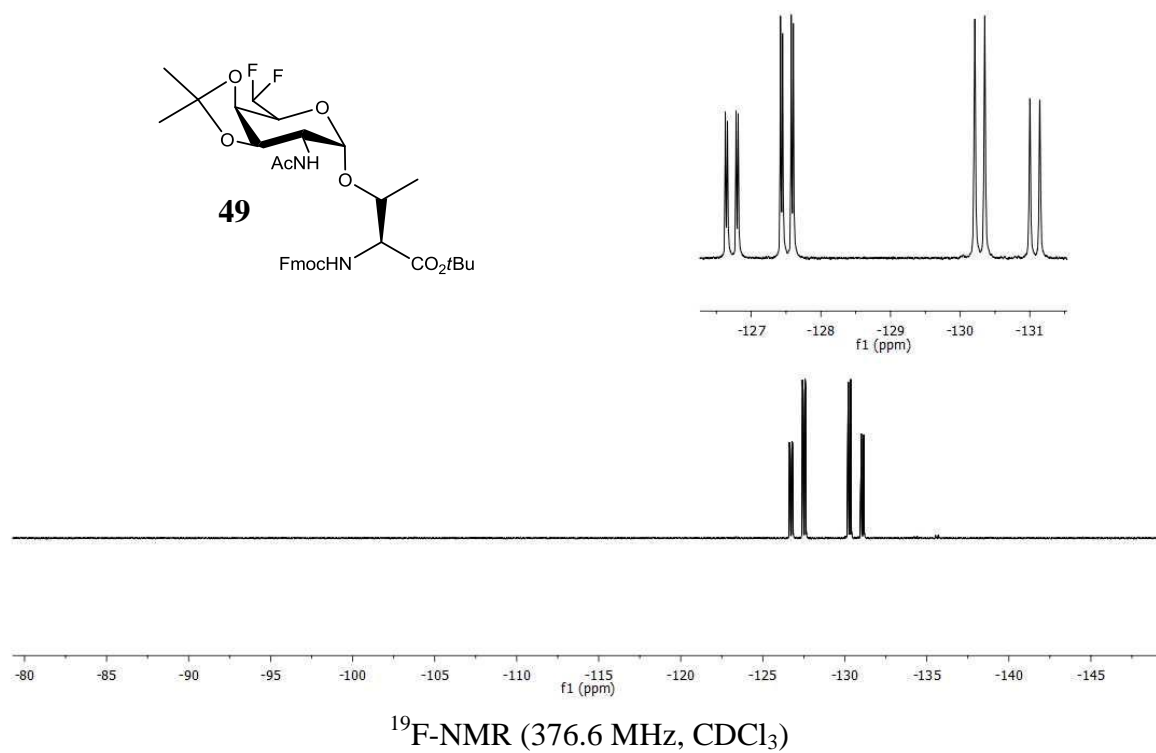


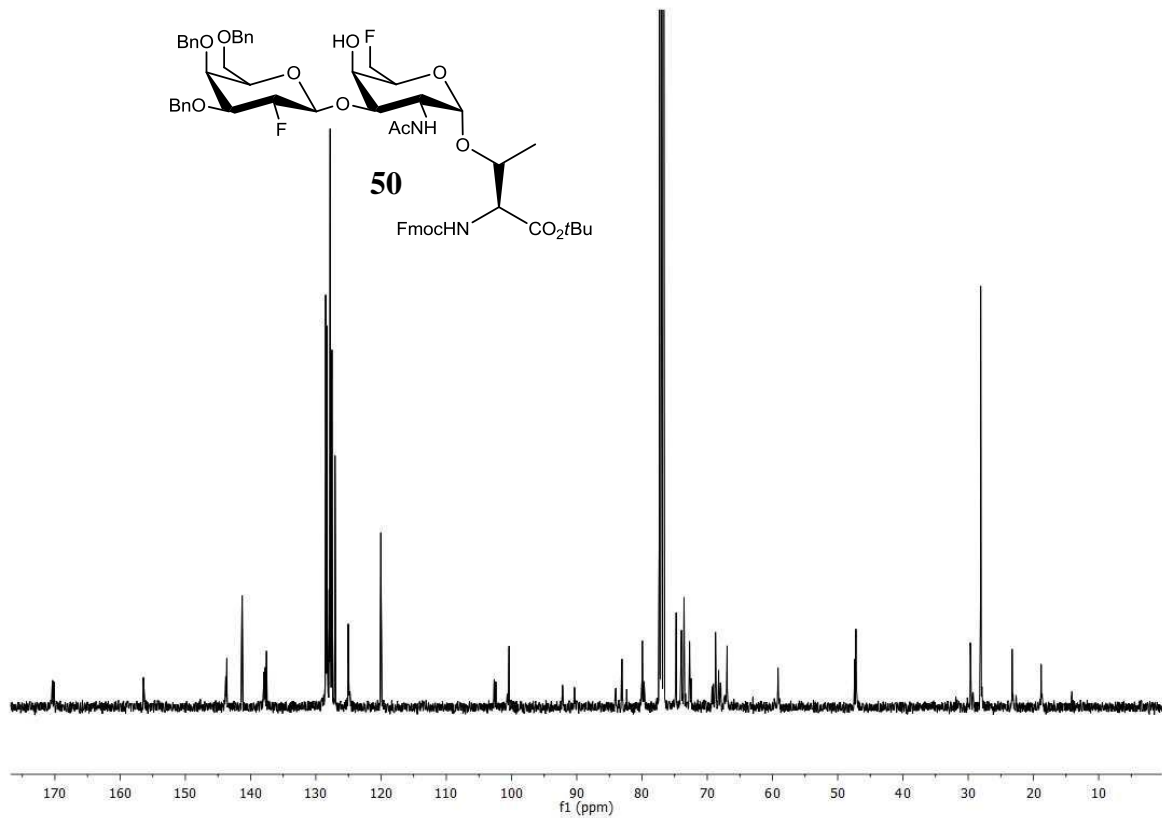


<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

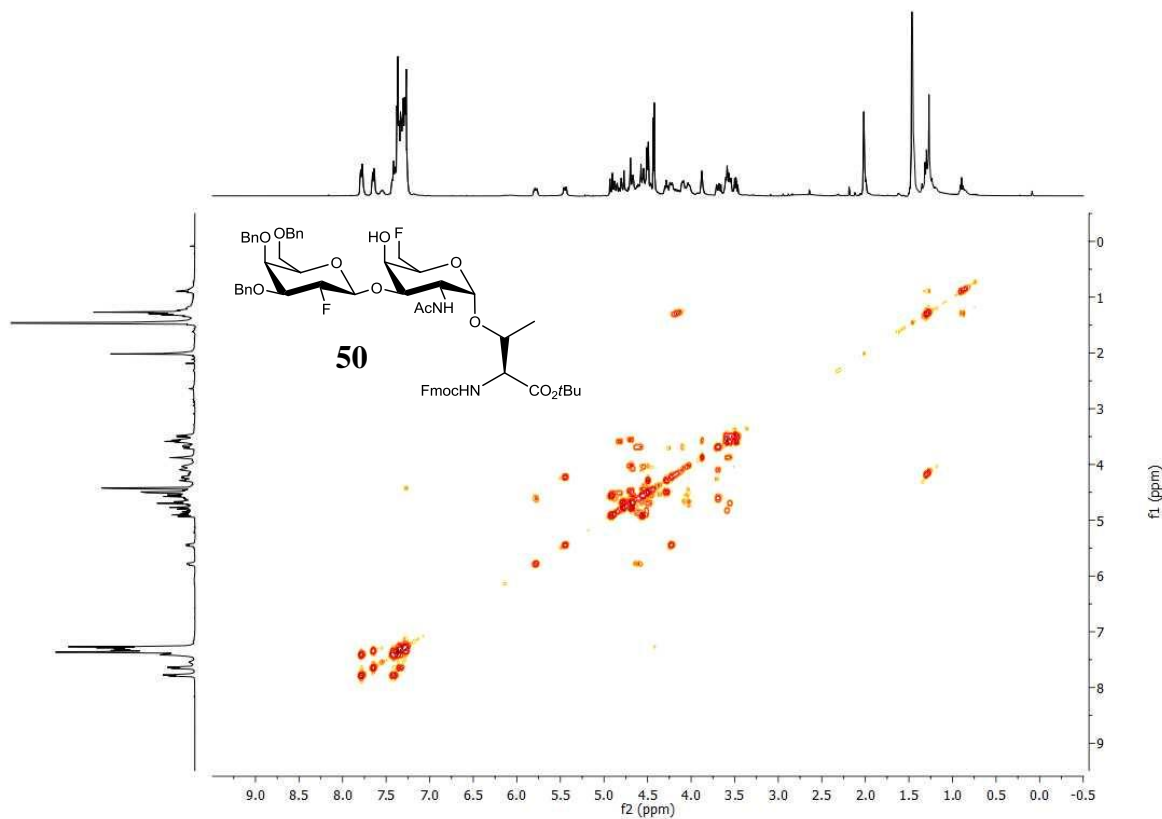


<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



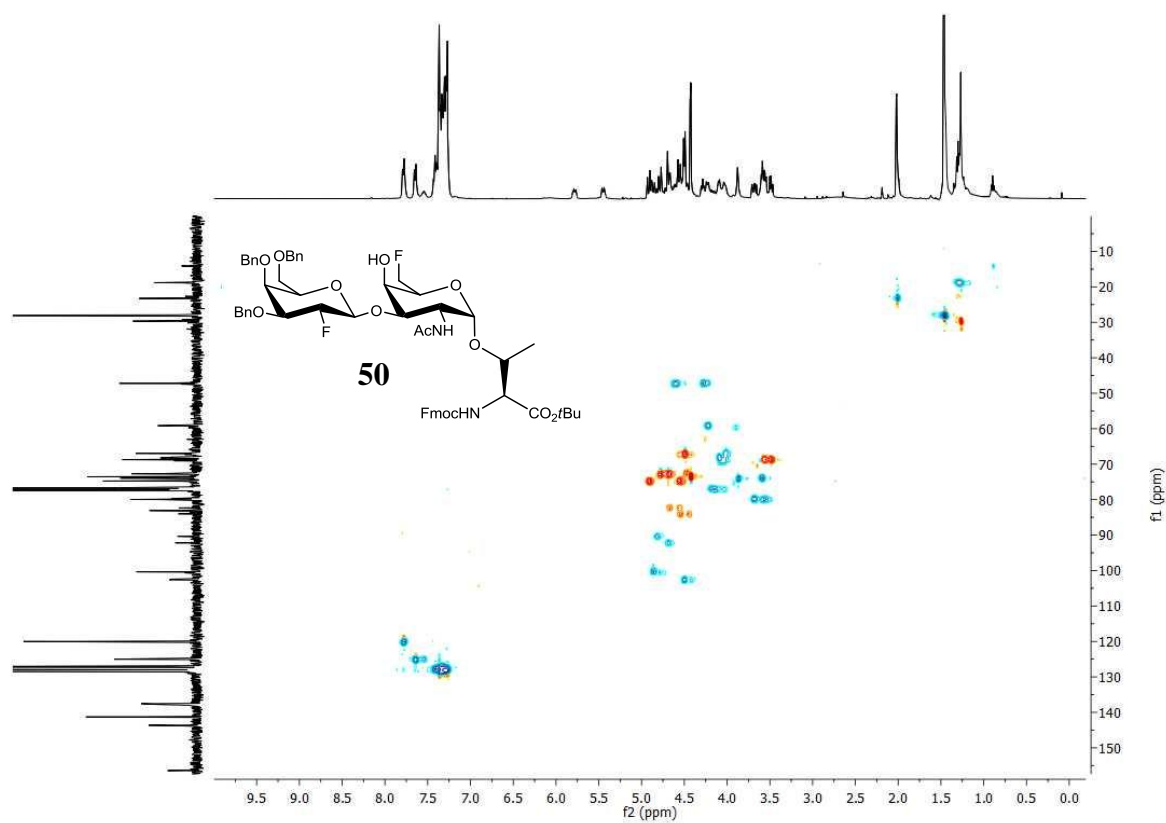
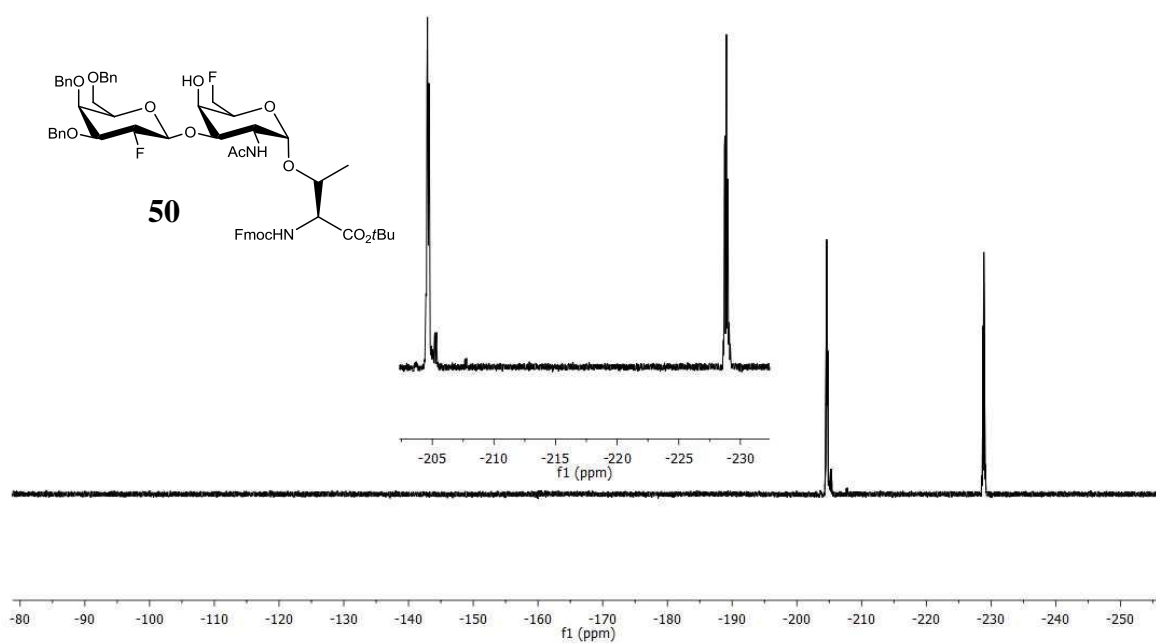


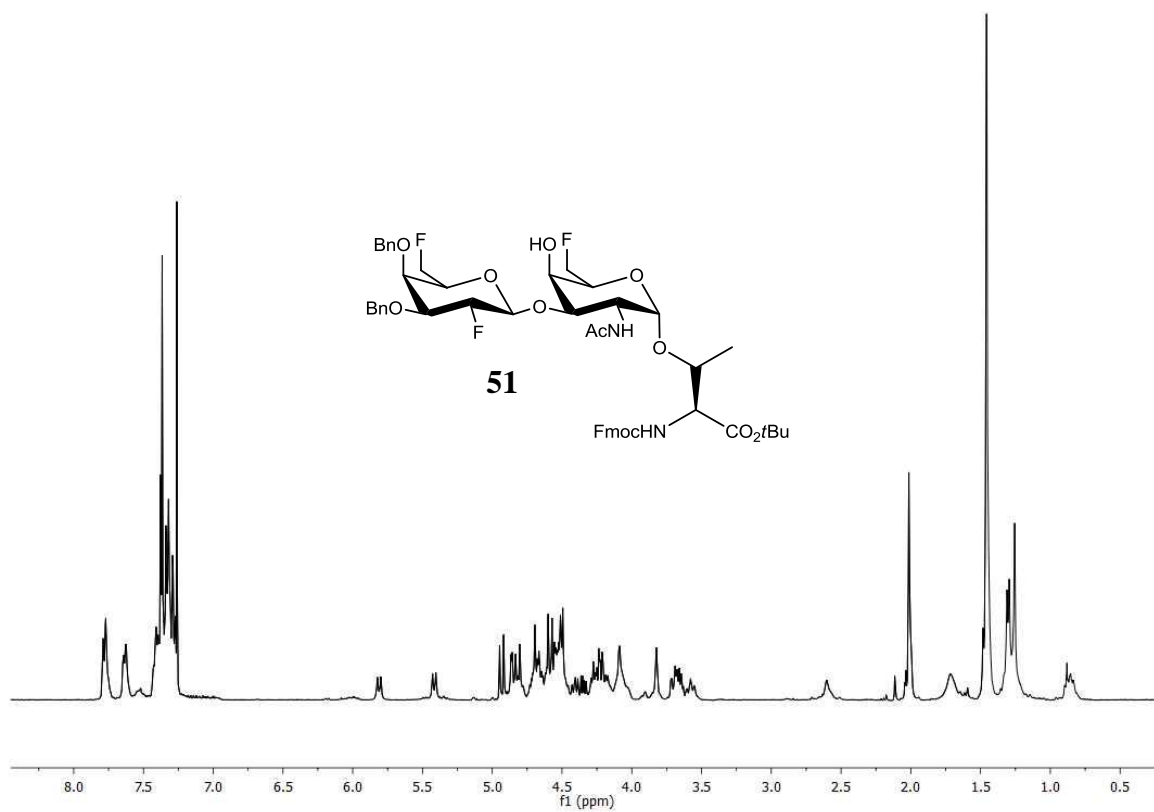
$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



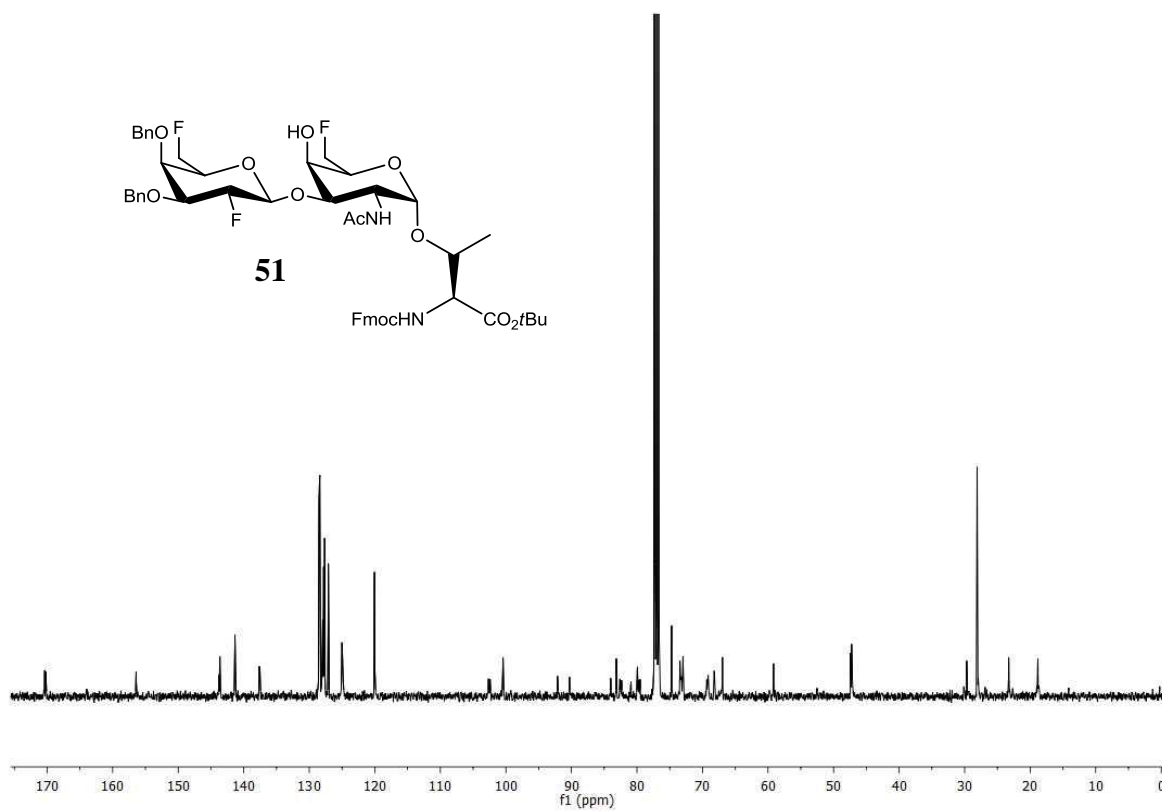
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR ( $\text{CDCl}_3$ )



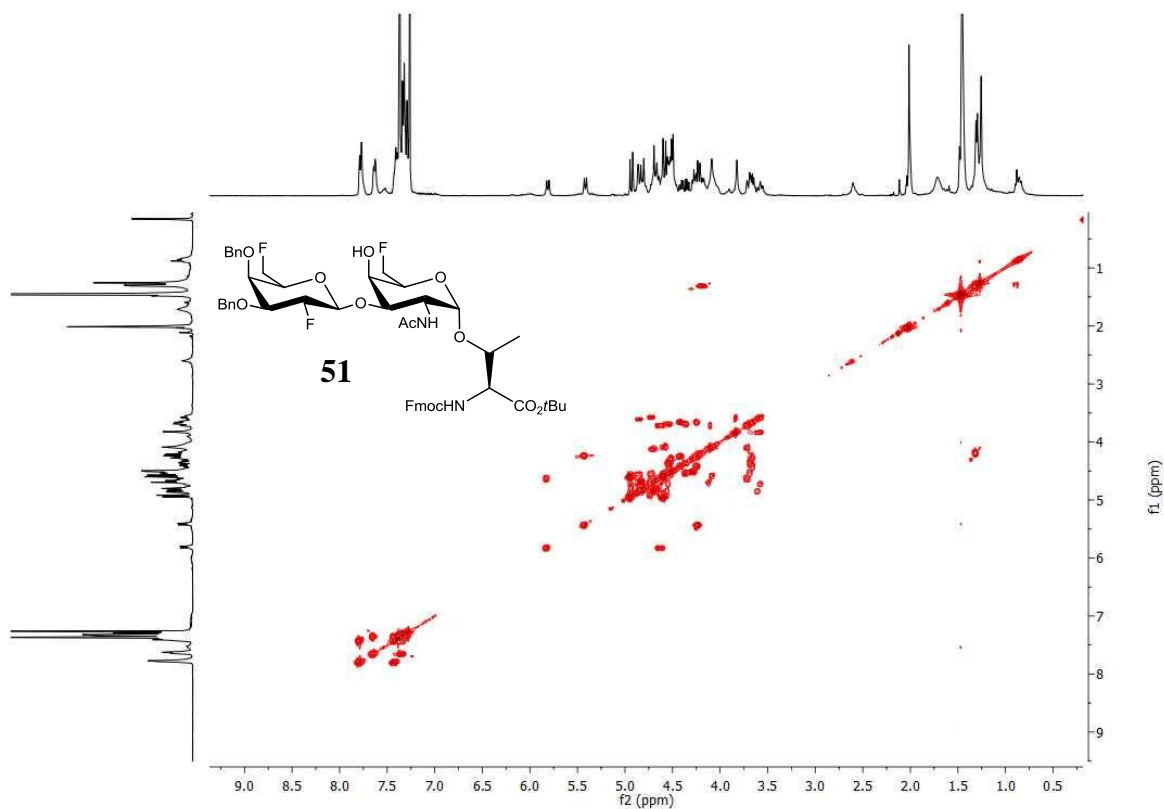
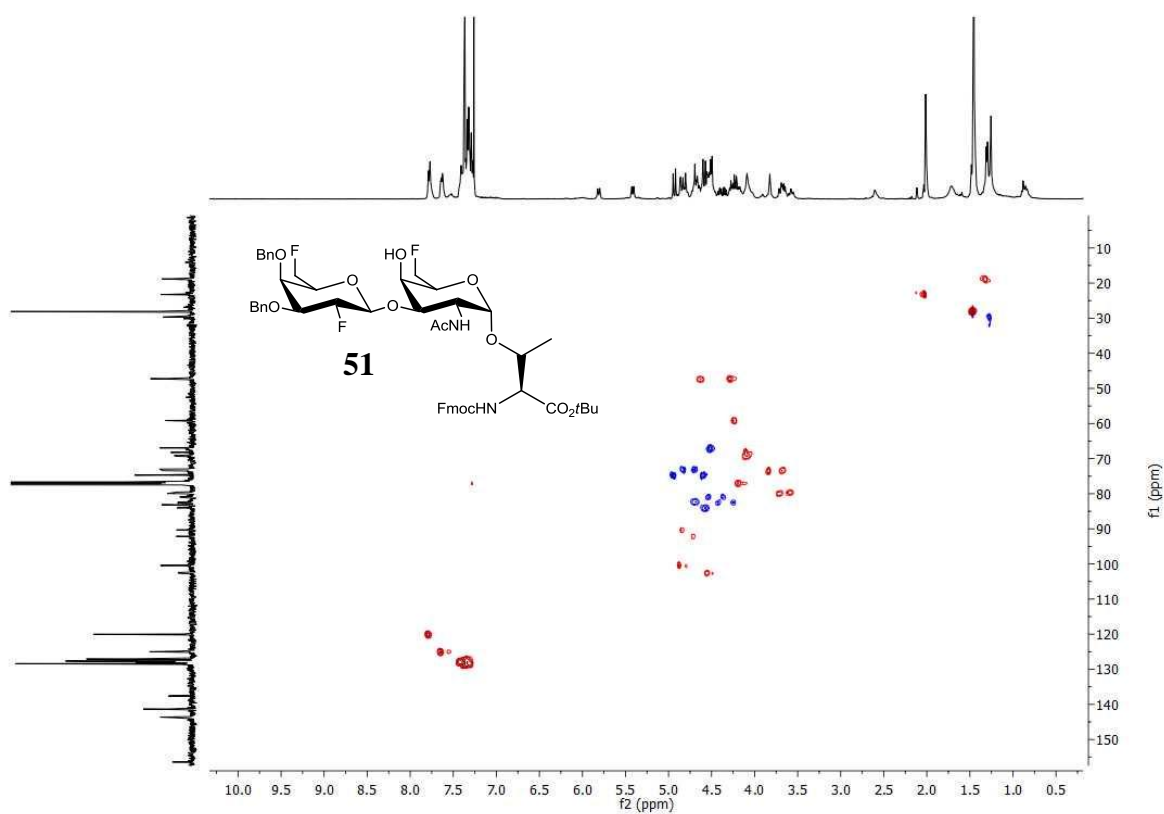
 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMOC-NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) $^{19}\text{F}$ -NMR (376.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

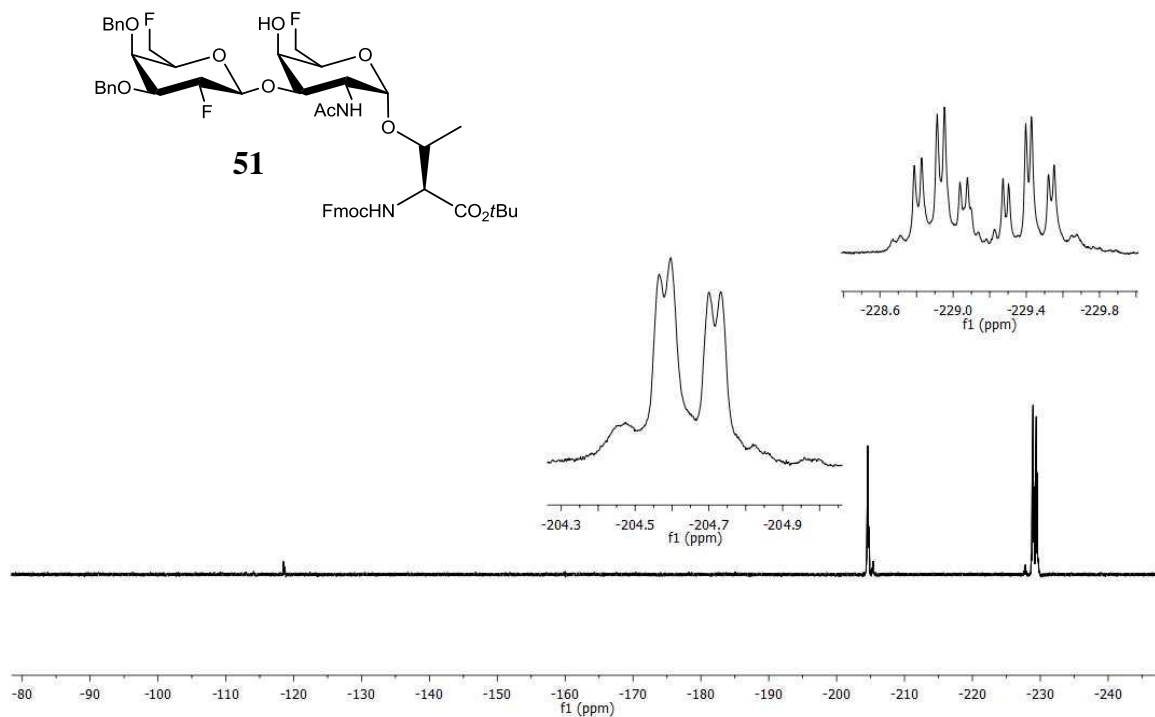


<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

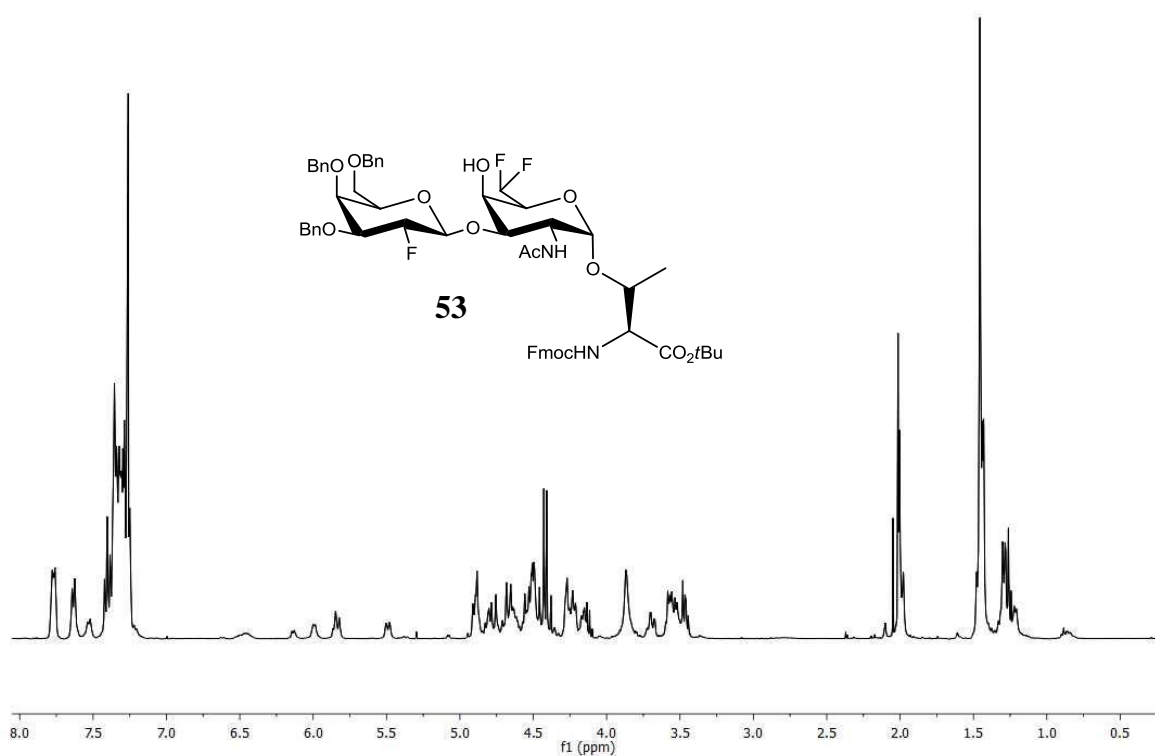


<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

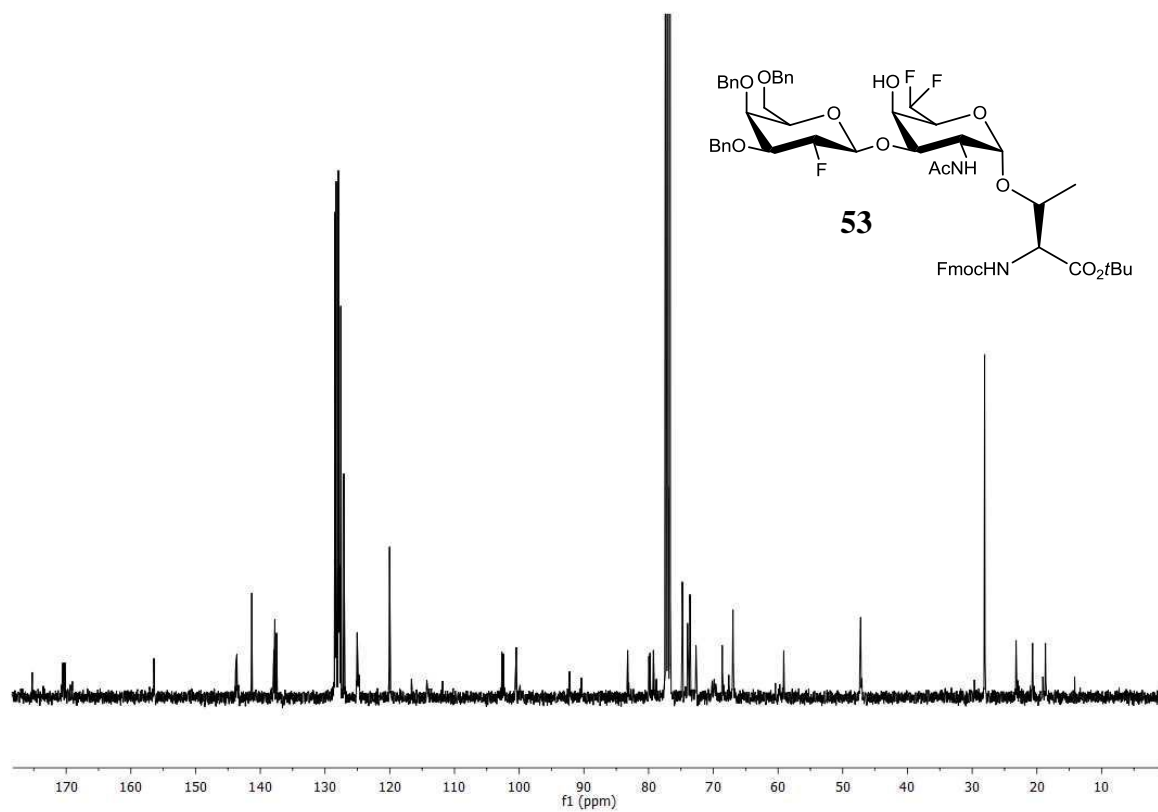
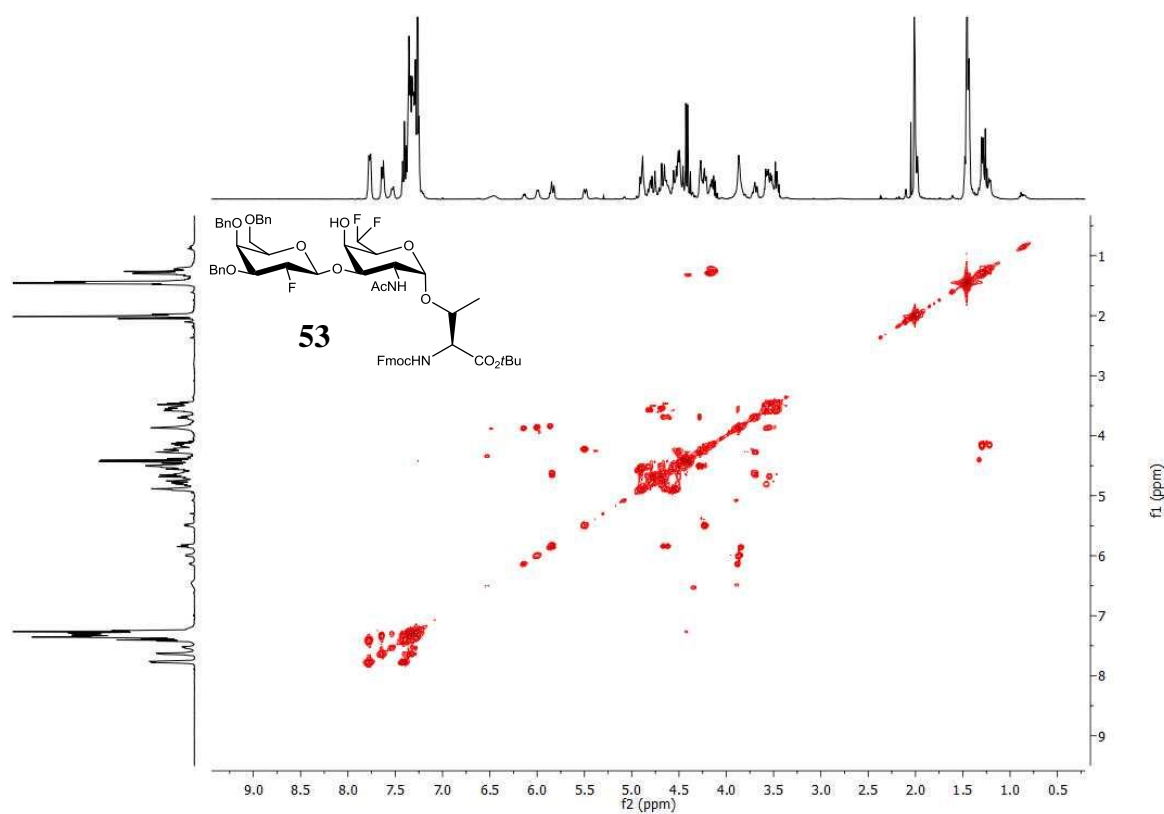
 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR (CDCl<sub>3</sub>) $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

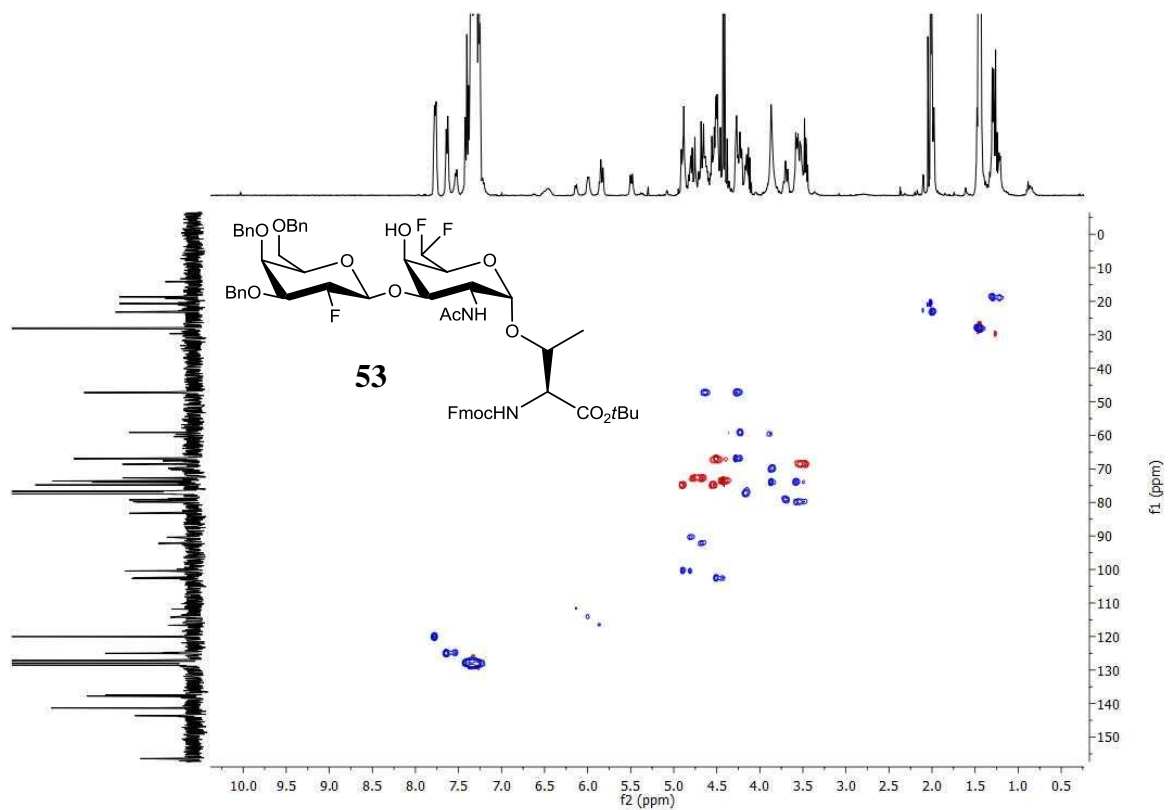


<sup>19</sup>F-NMR (376.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

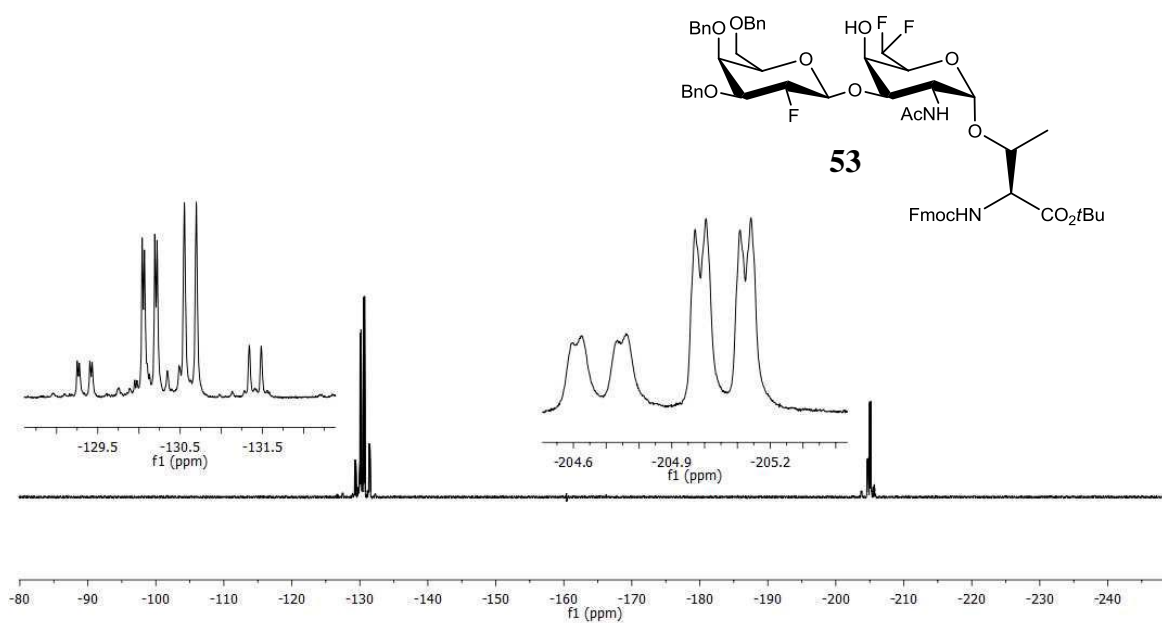


<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

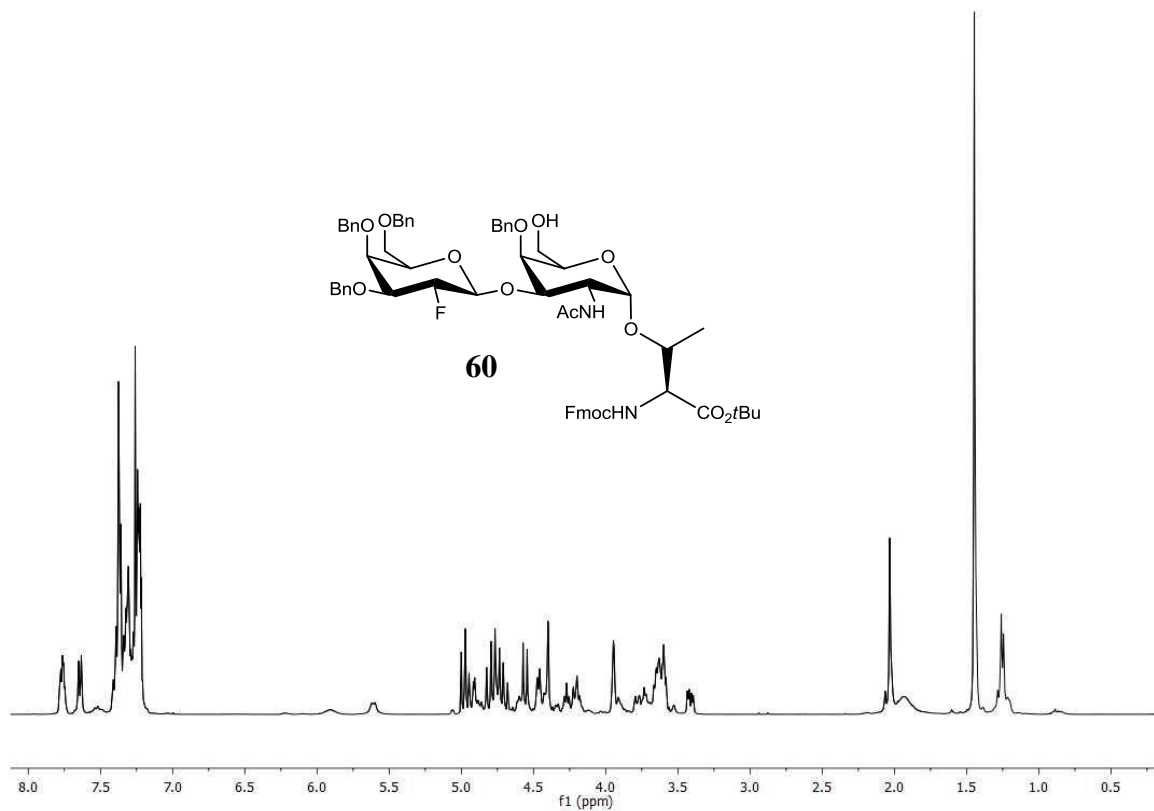
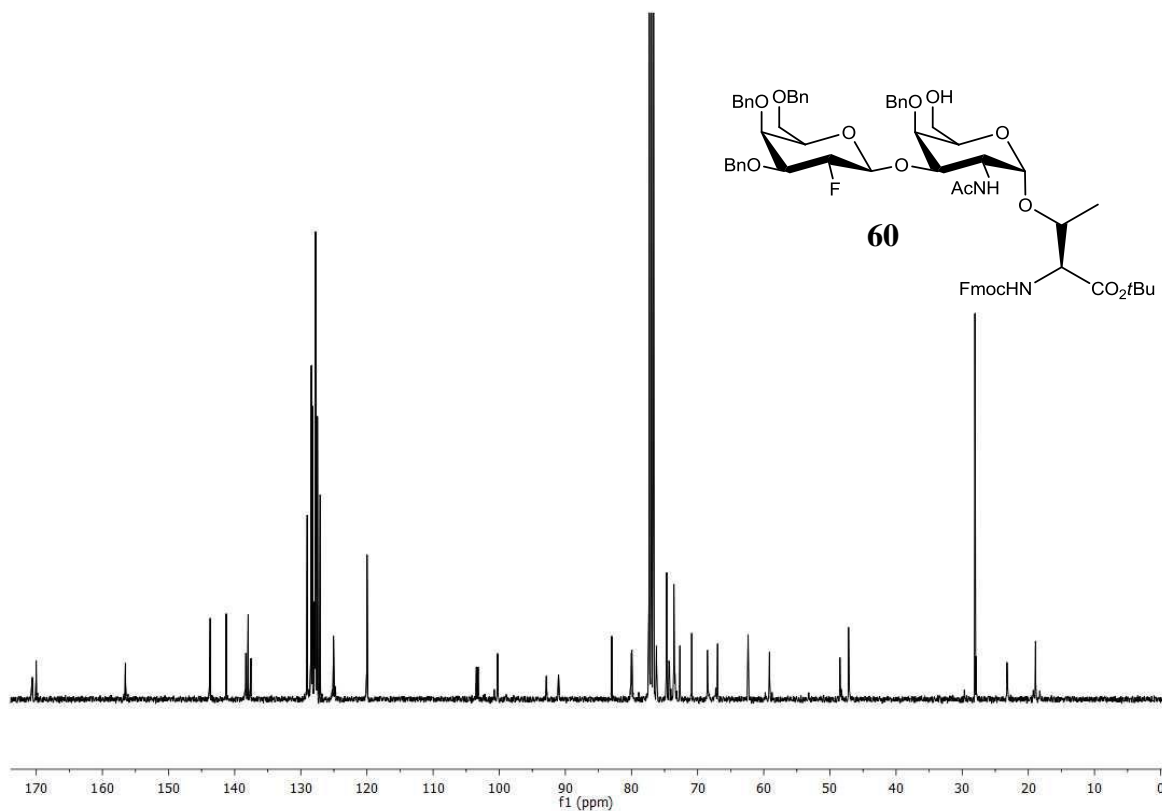
 $^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR ( $\text{CDCl}_3$ )

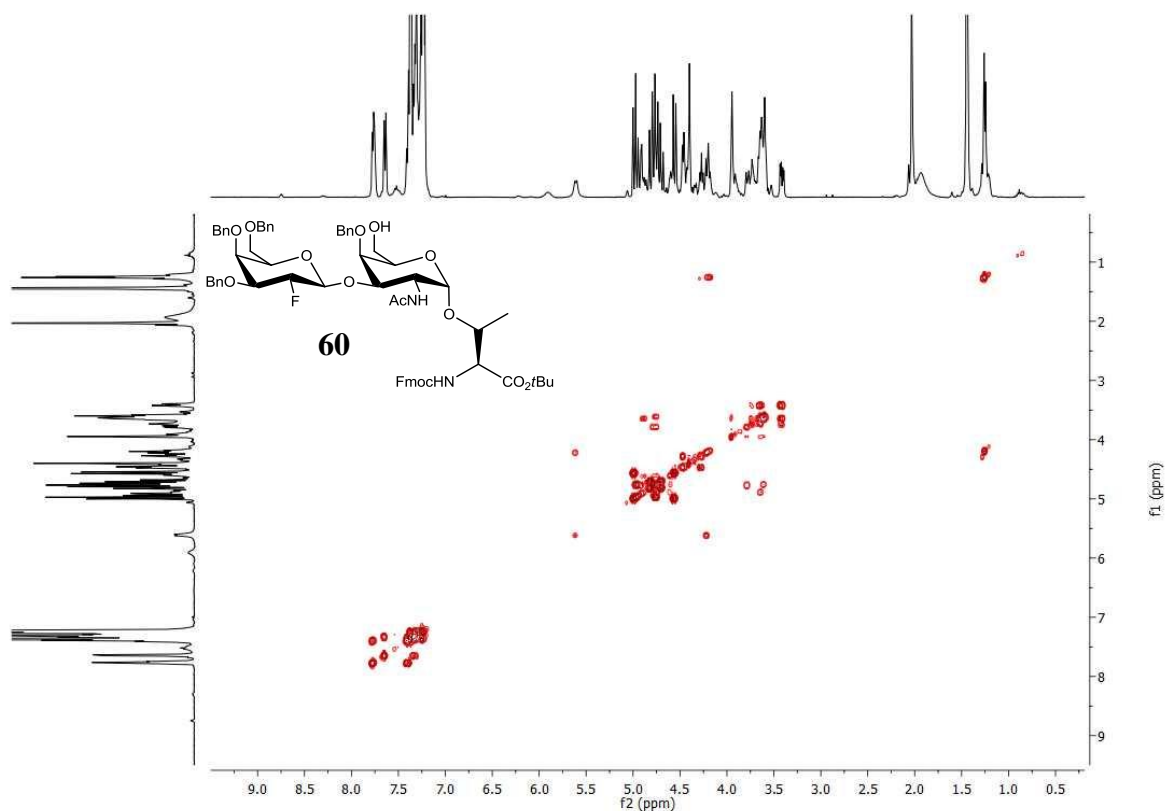


$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC-NMR ( $\text{CDCl}_3$ )

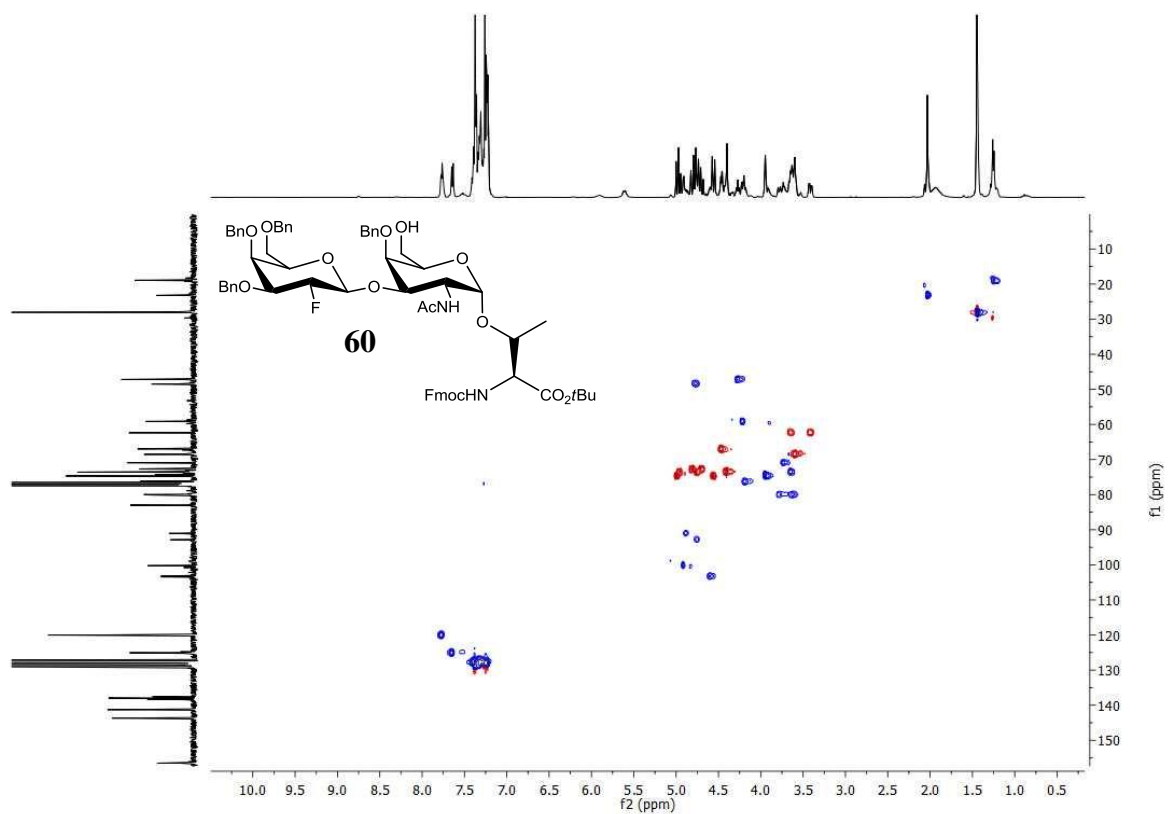


$^{19}\text{F}$ -NMR (376.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

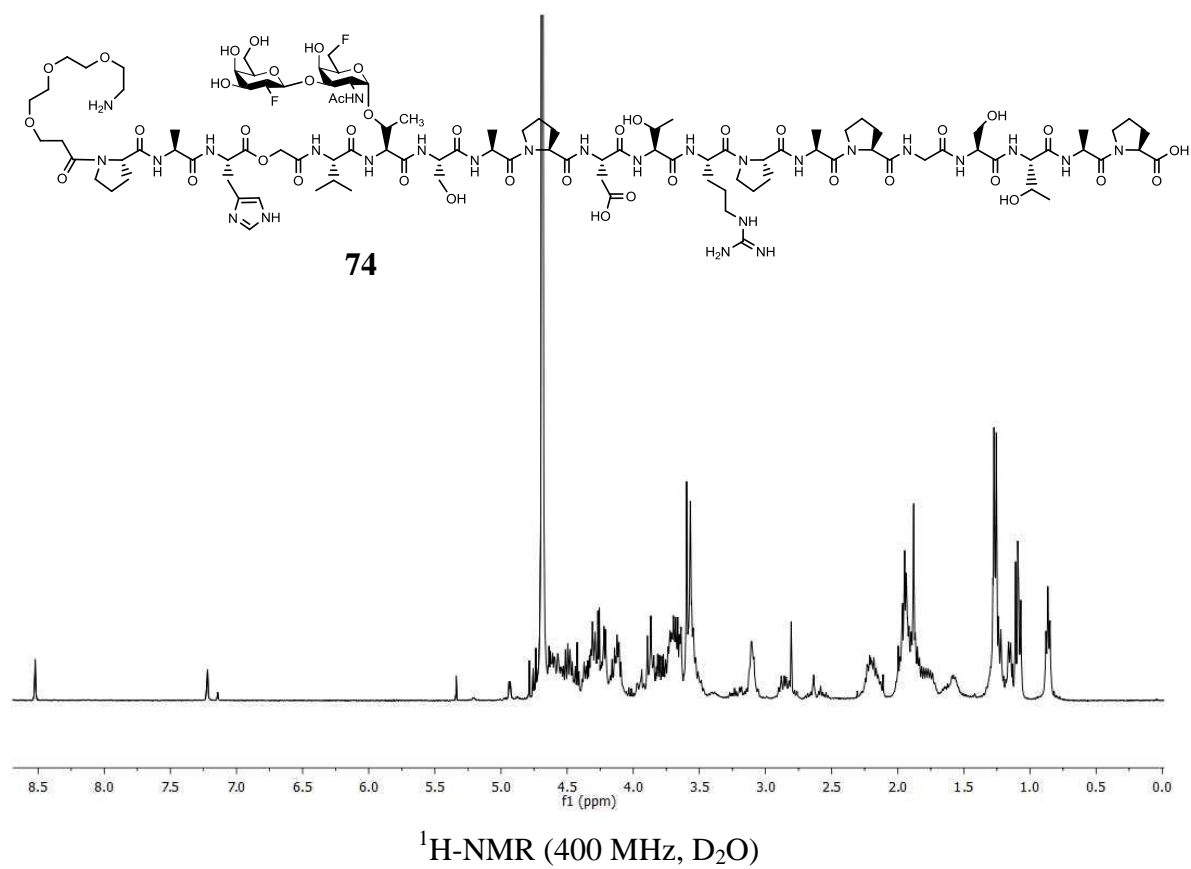
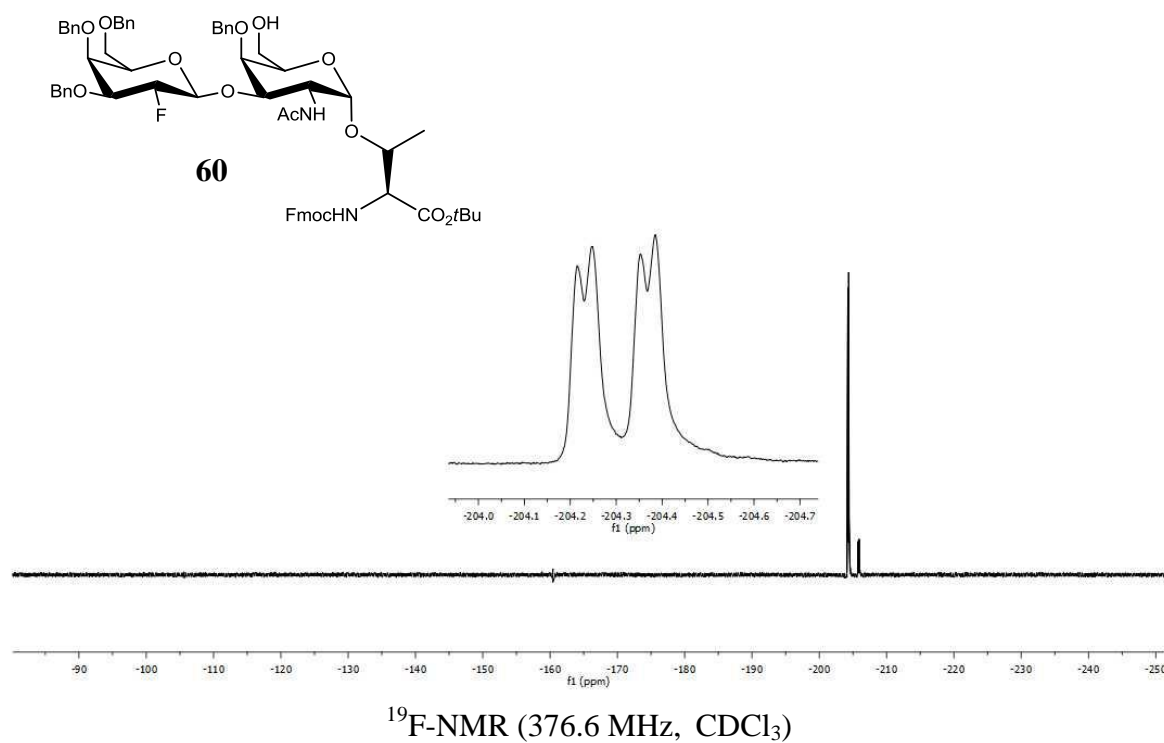


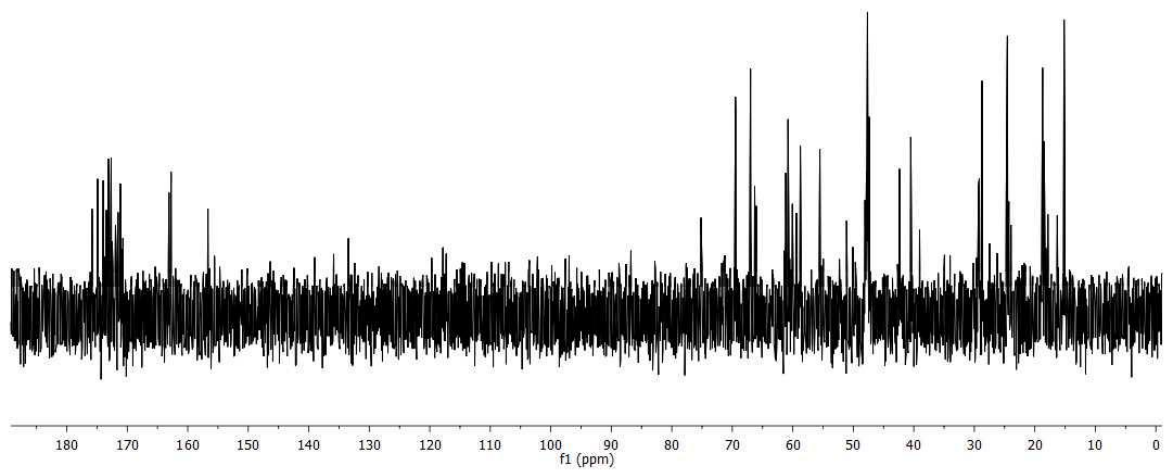
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR ( $\text{CDCl}_3$ )



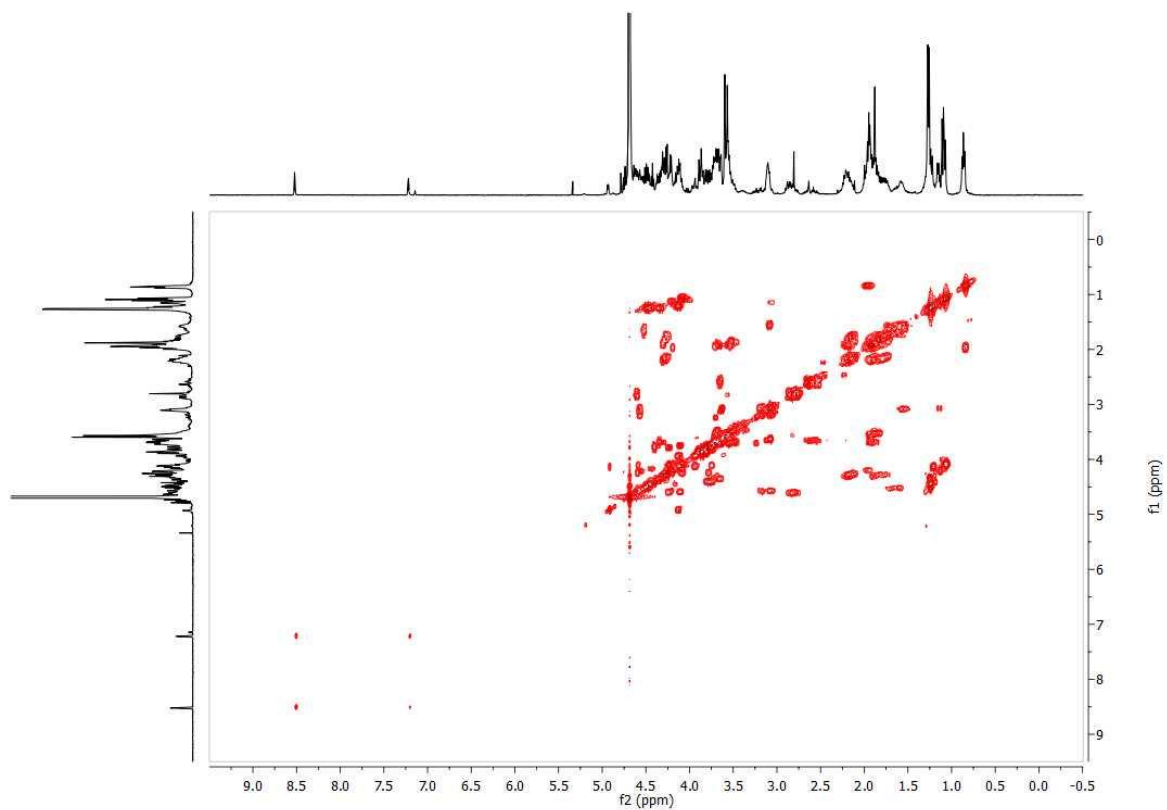
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC-NMR ( $\text{CDCl}_3$ )



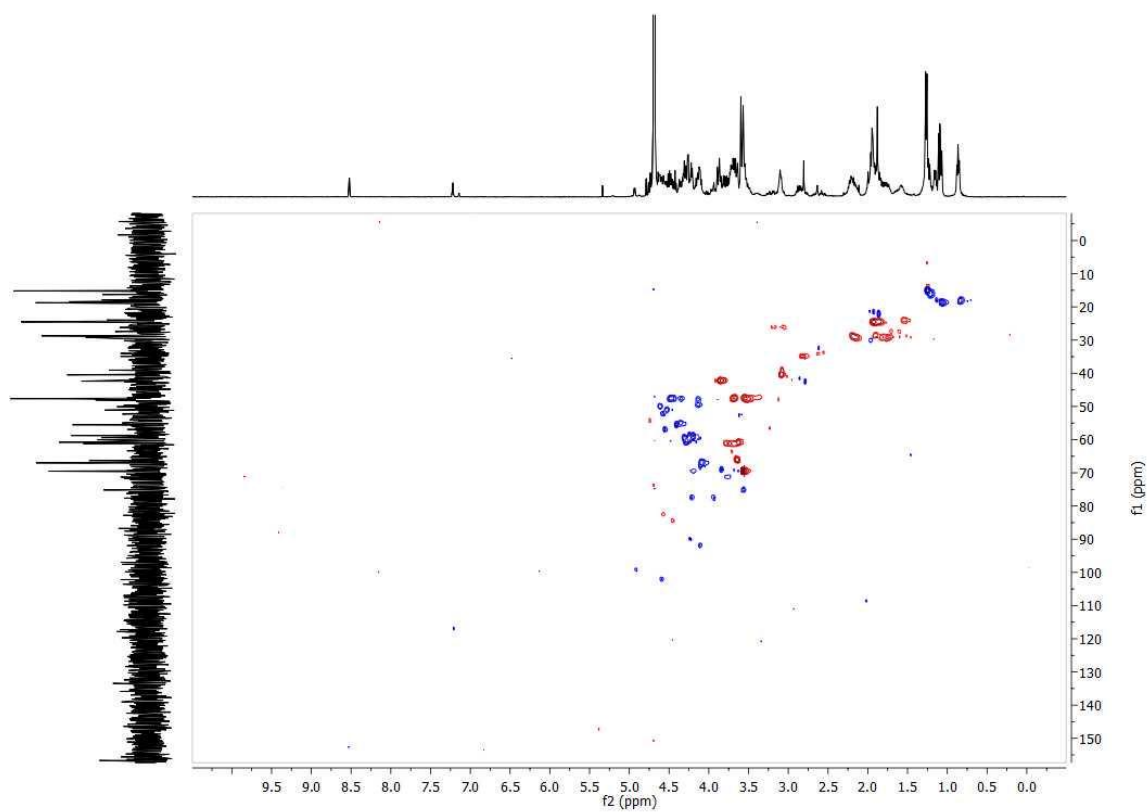
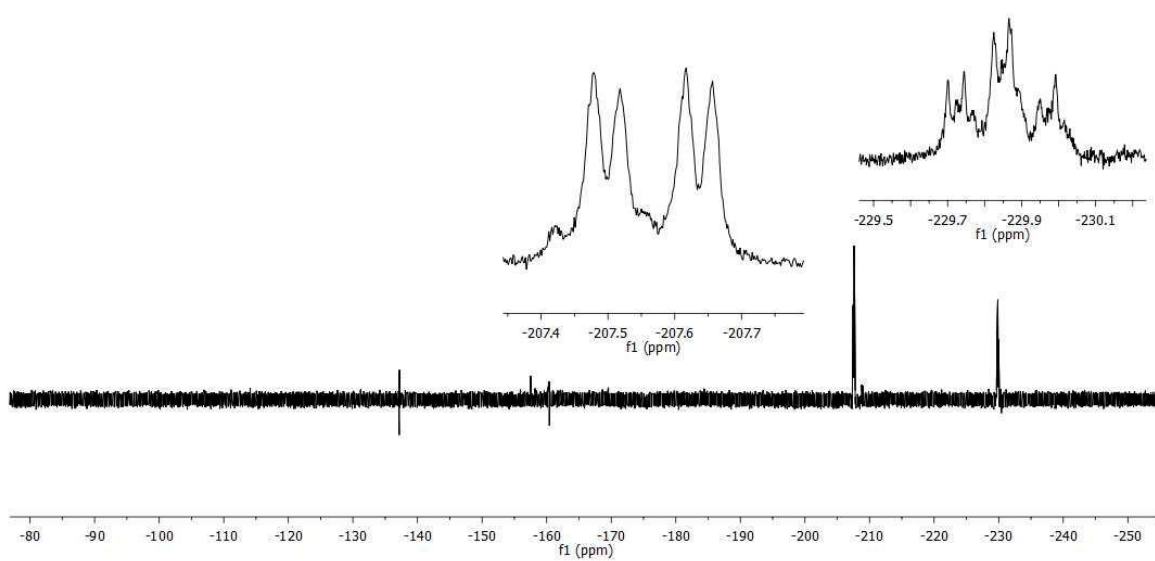


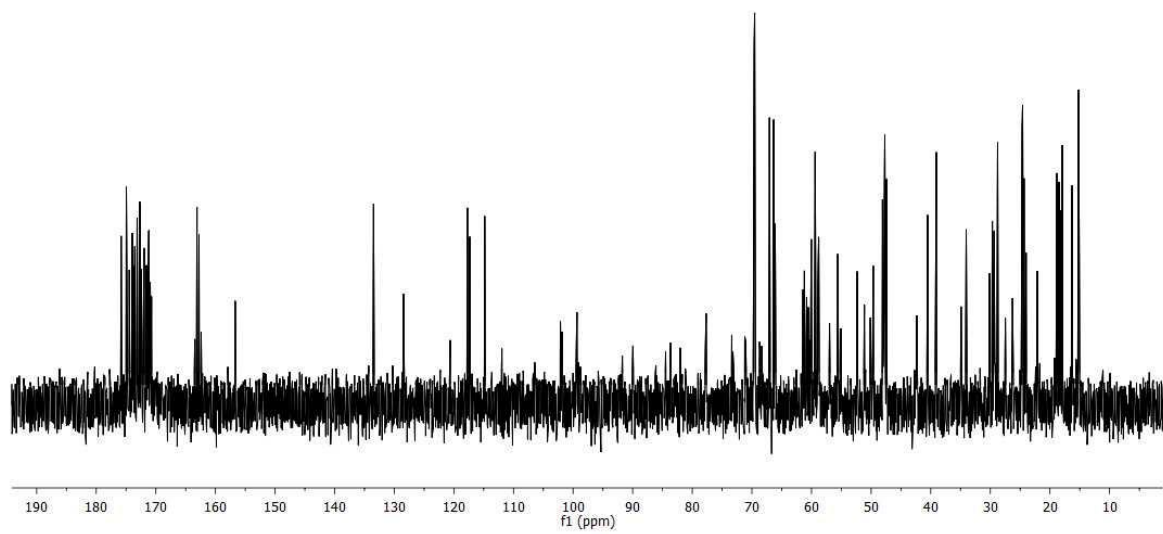
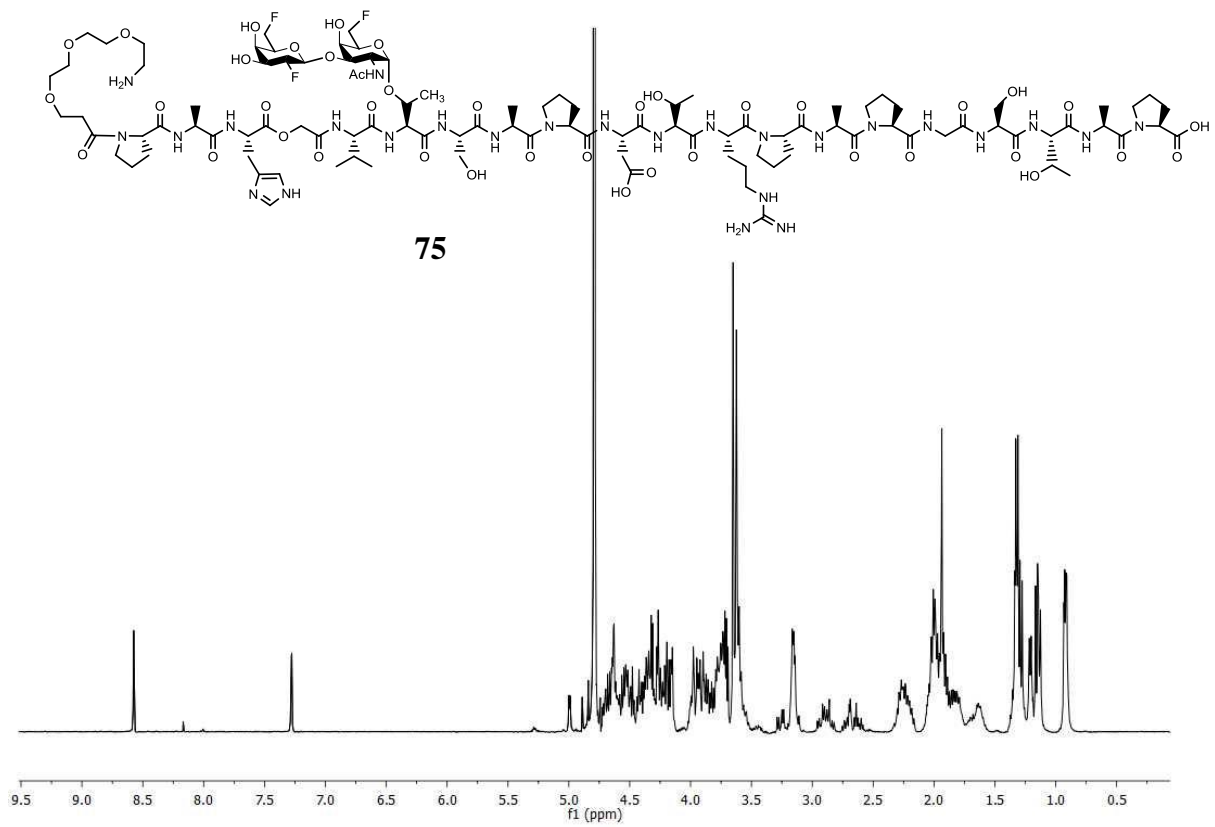


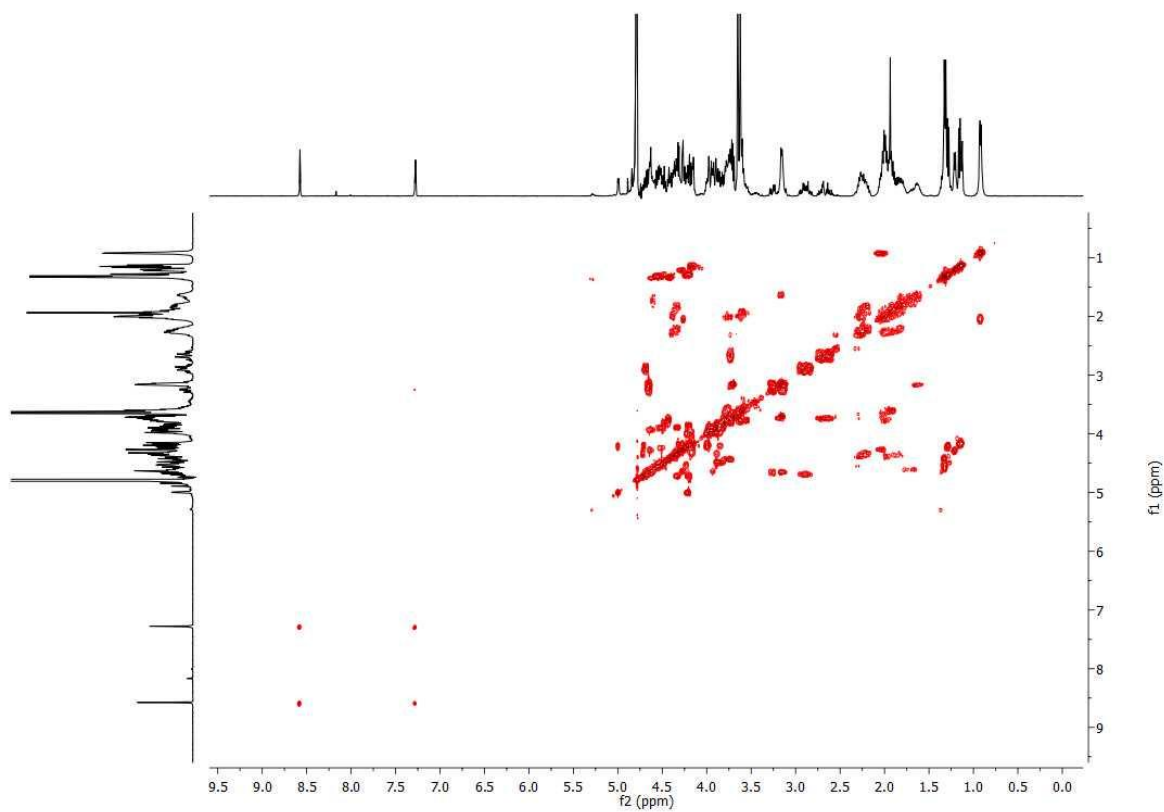
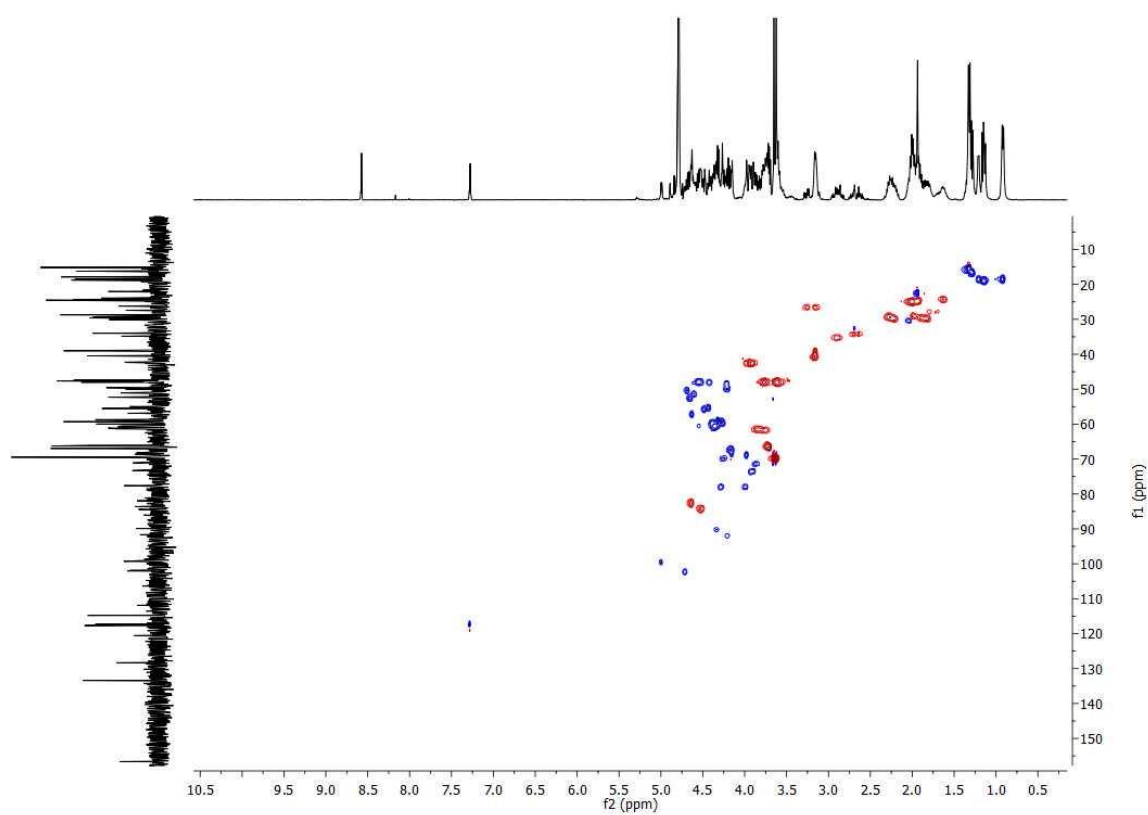
$^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

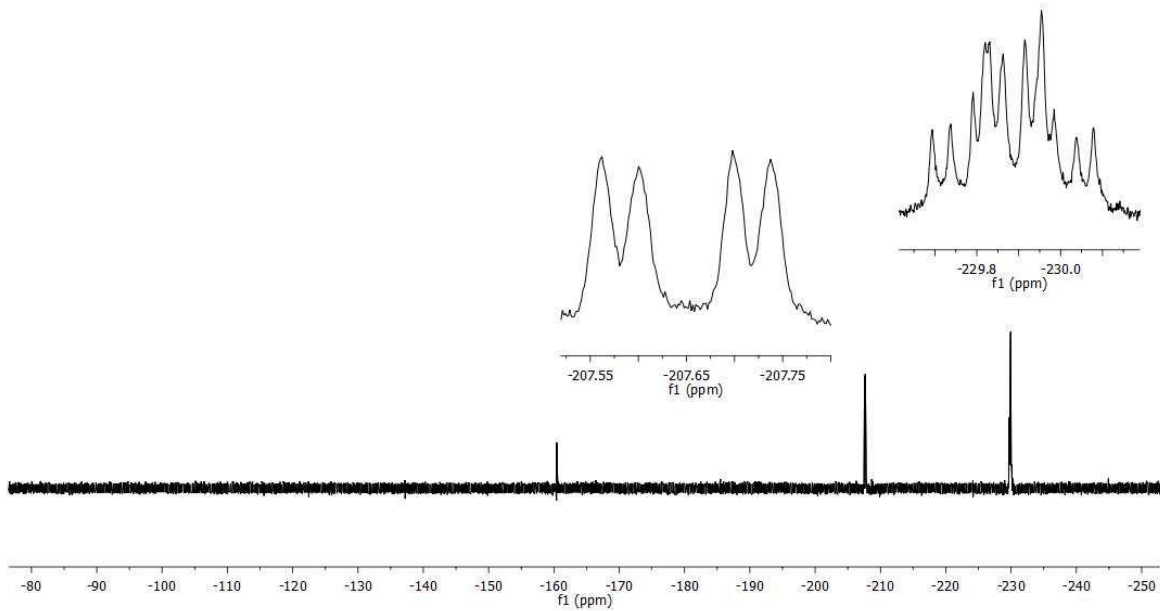


$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )

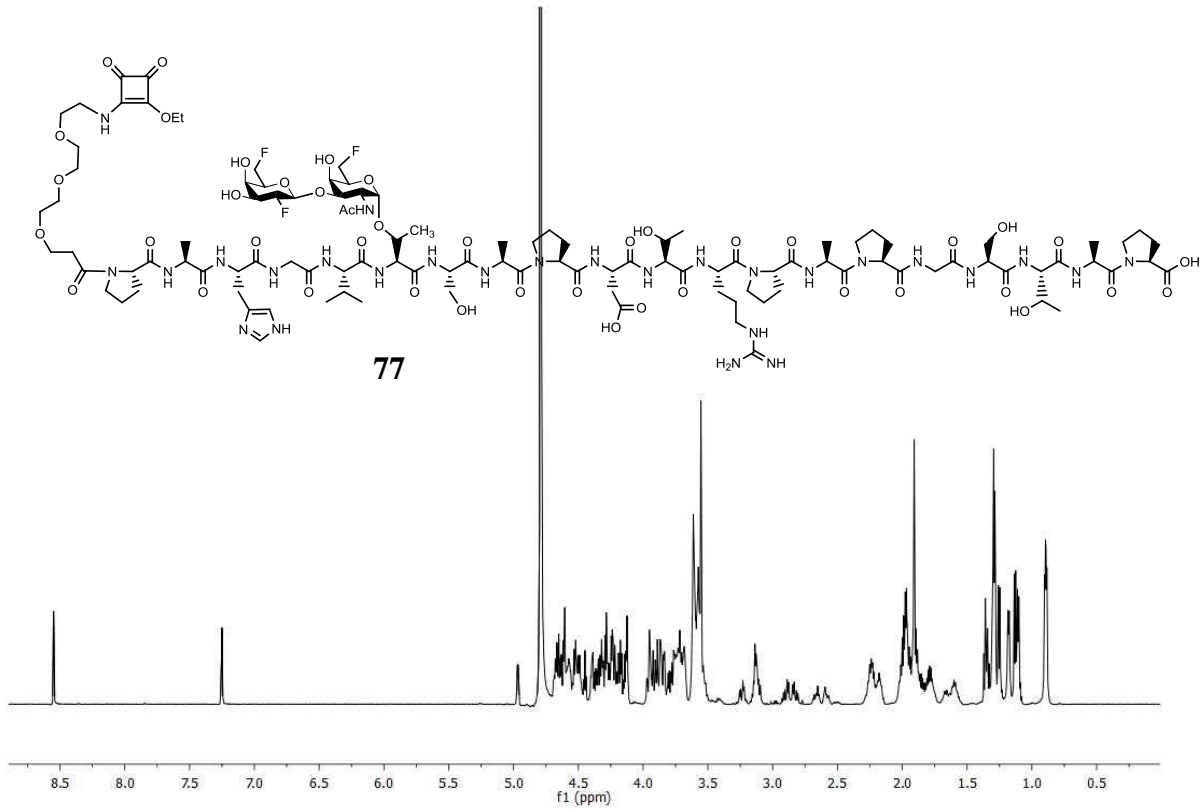
 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -HMQC-NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) $^{19}\text{F}$ -NMR (376.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



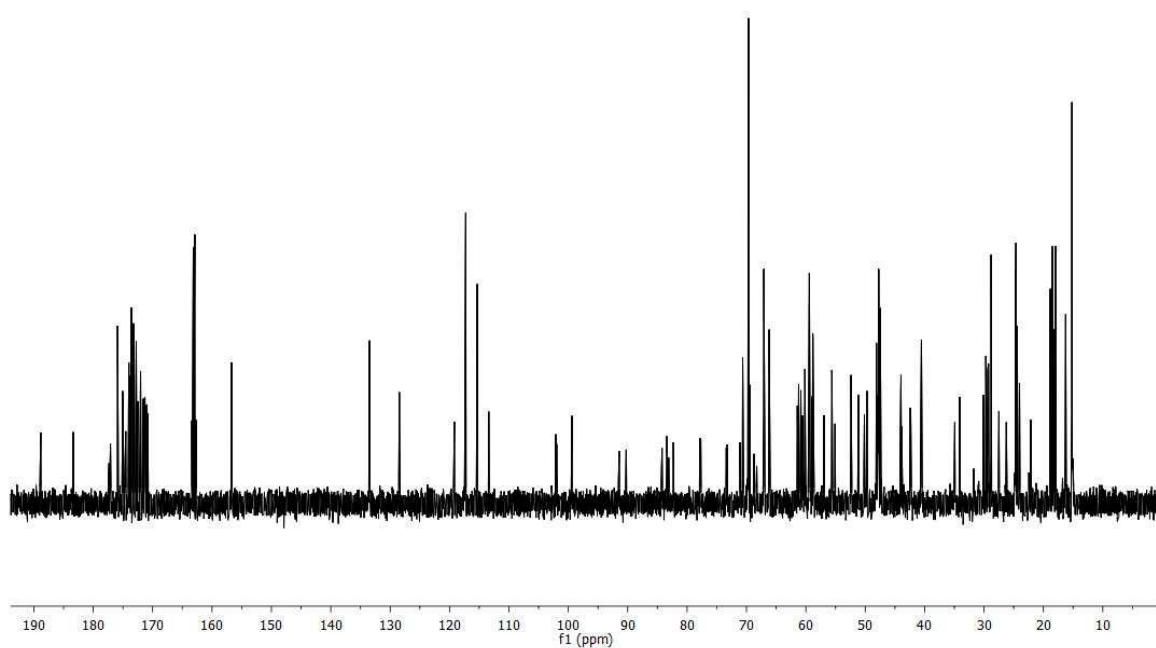
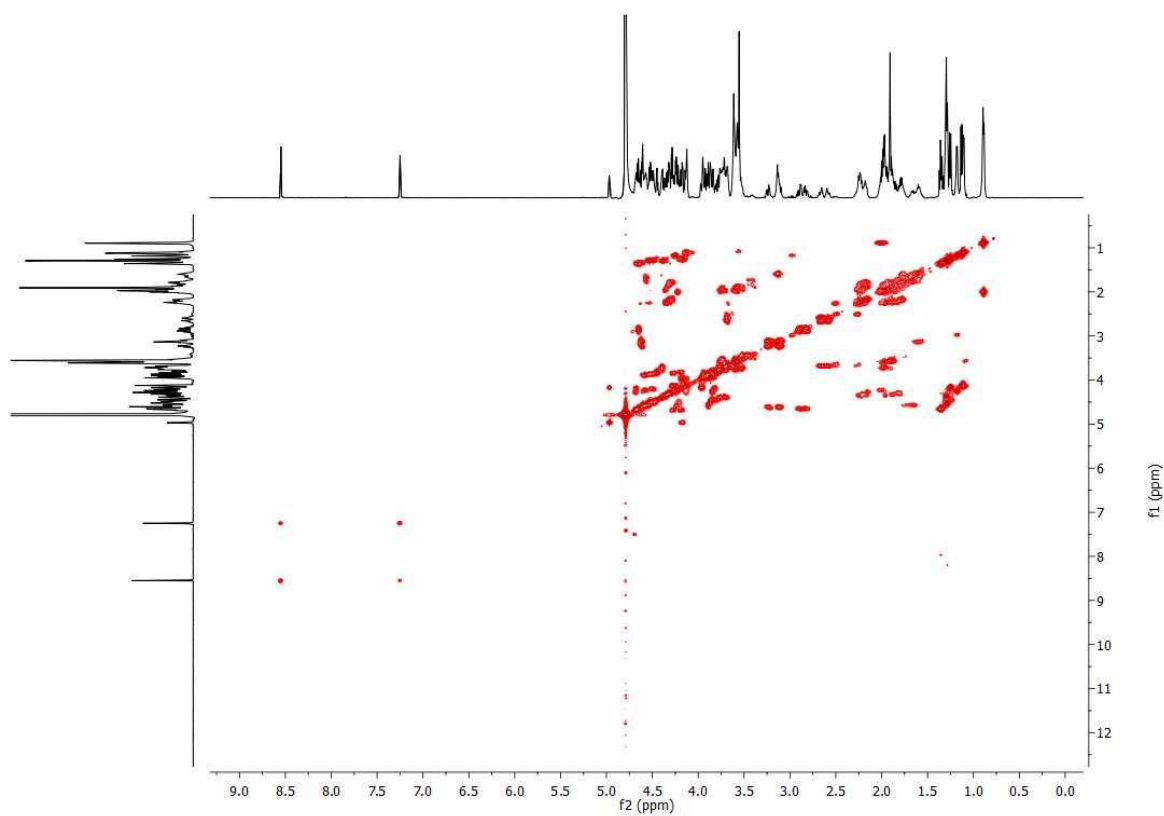
 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC-NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )

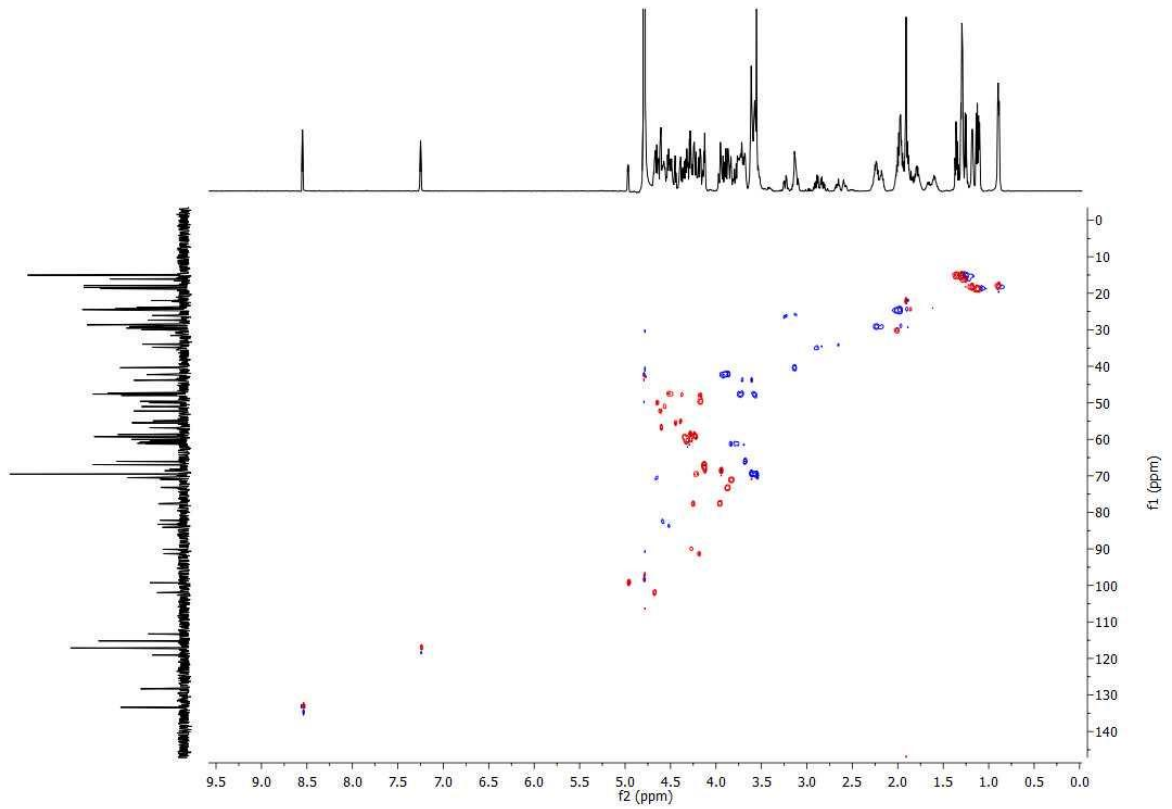


$^{19}\text{F}$ -NMR (376.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

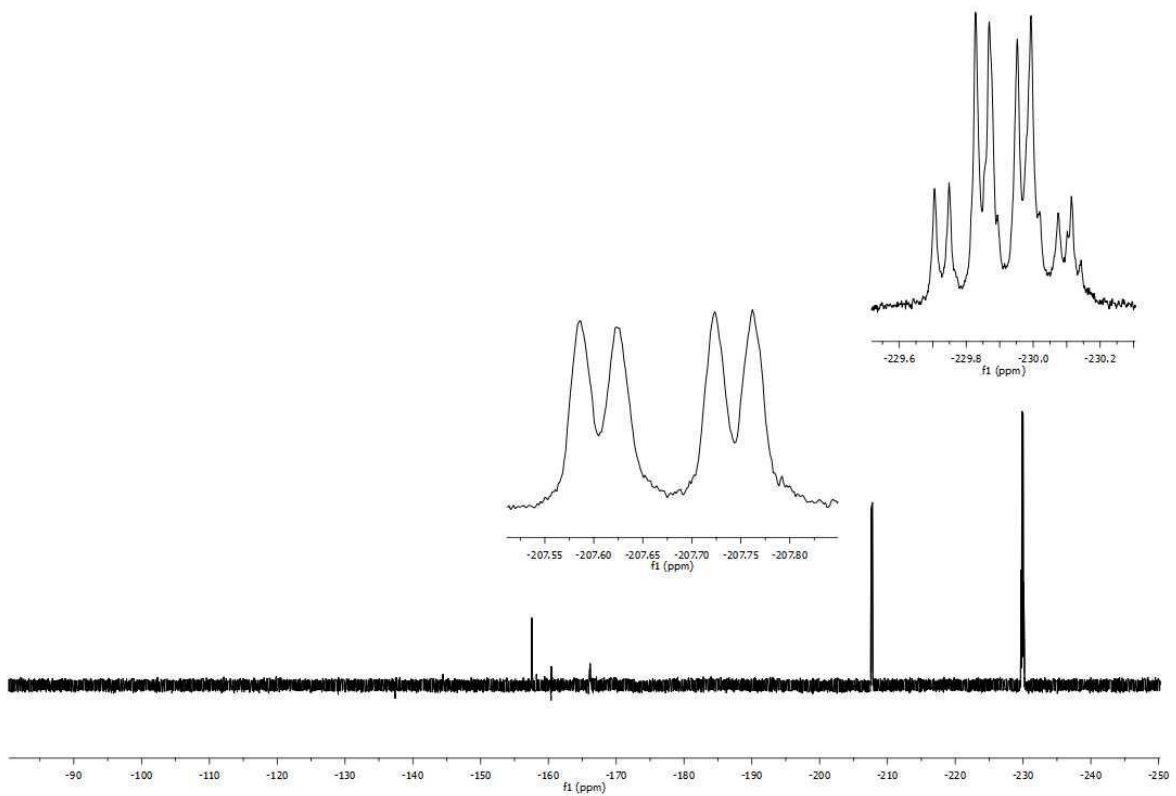


$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

 $^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )

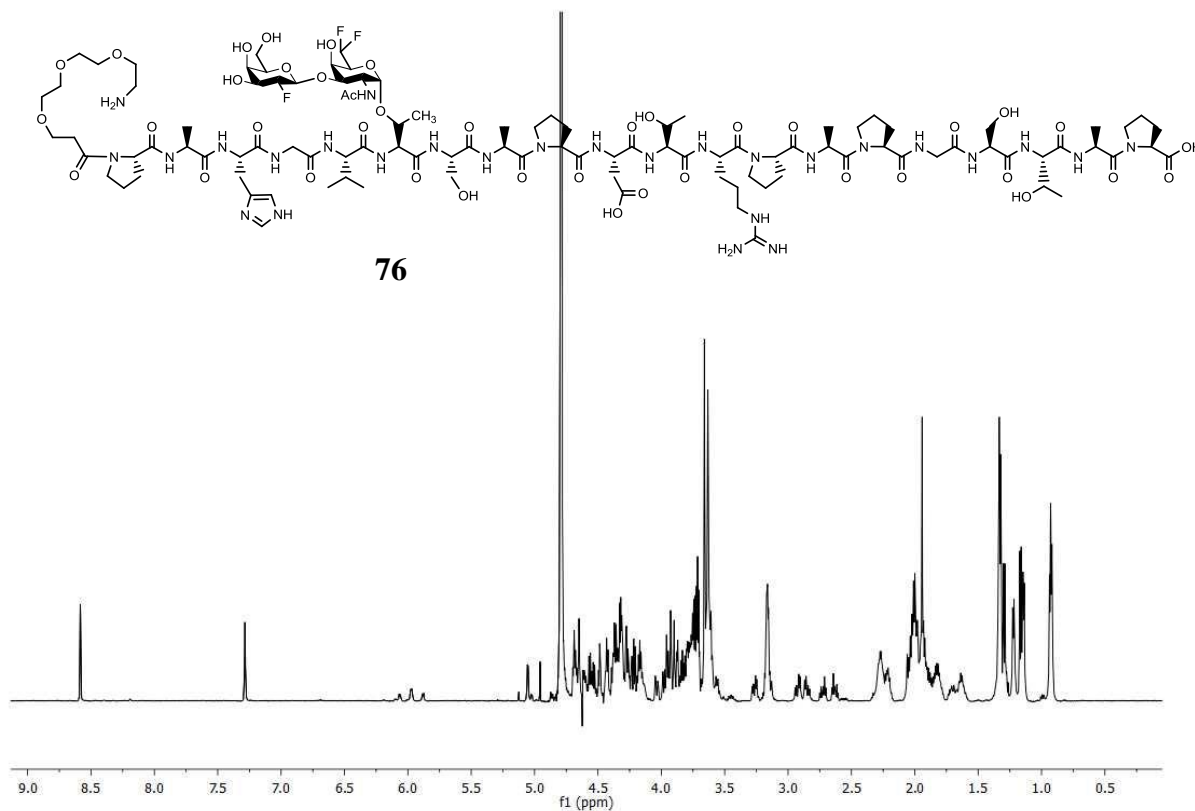
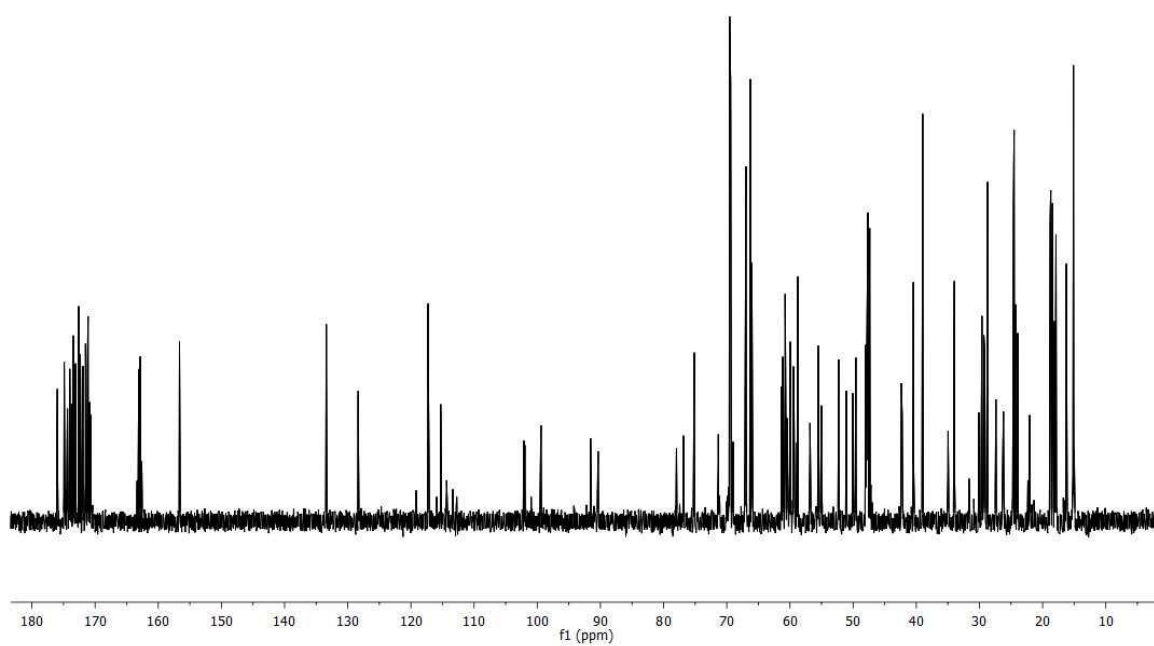


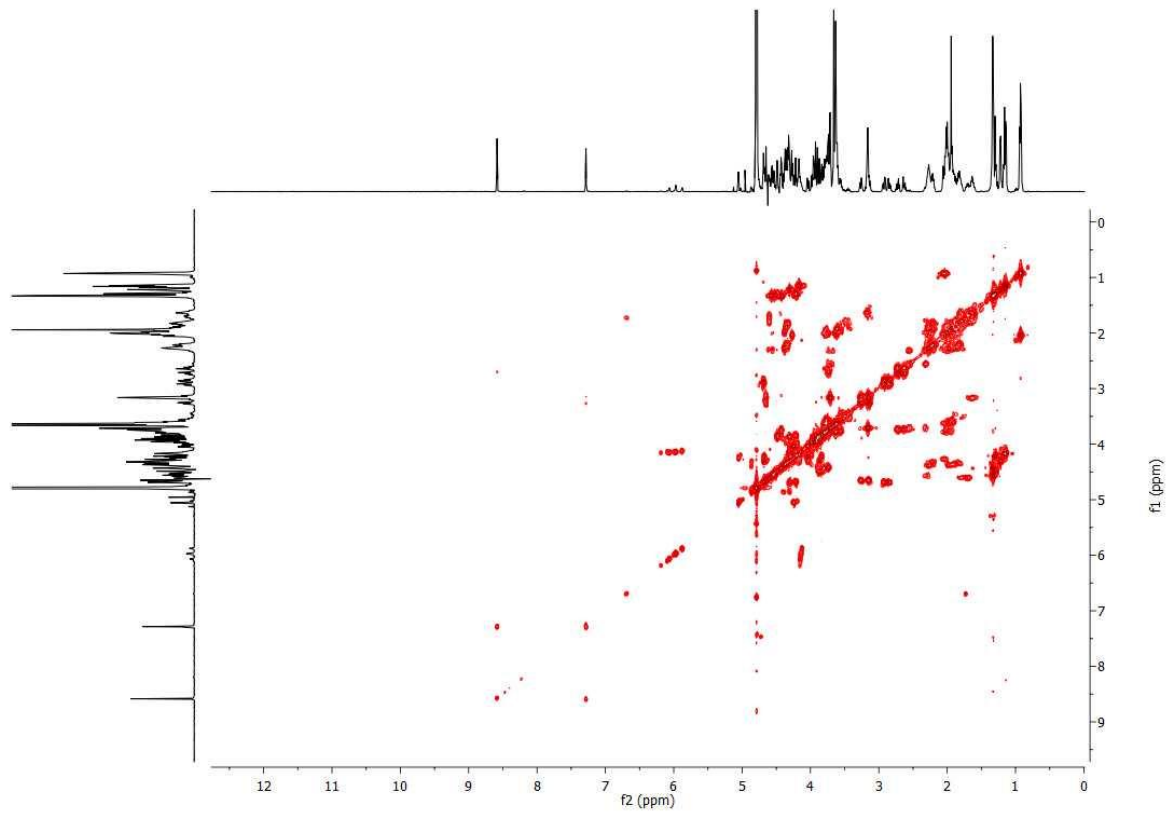
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC-NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )



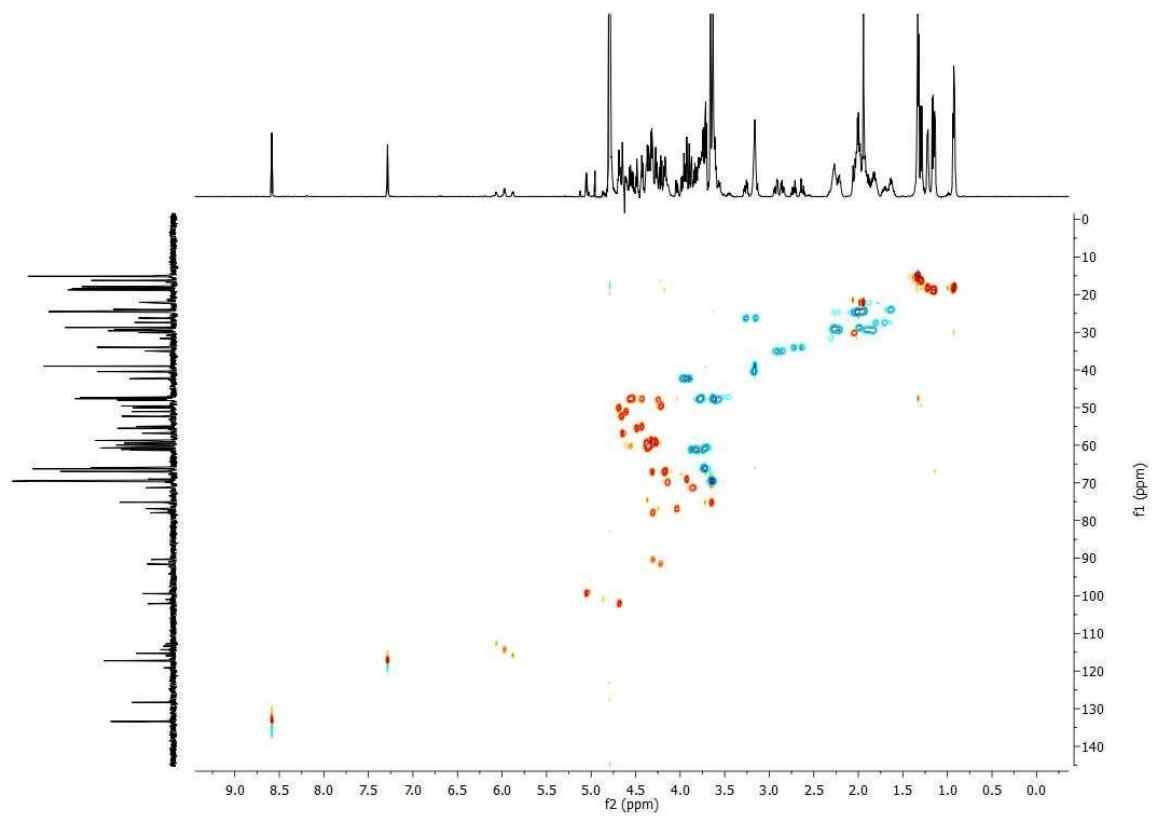
$^{19}\text{F}$ -NMR (376.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



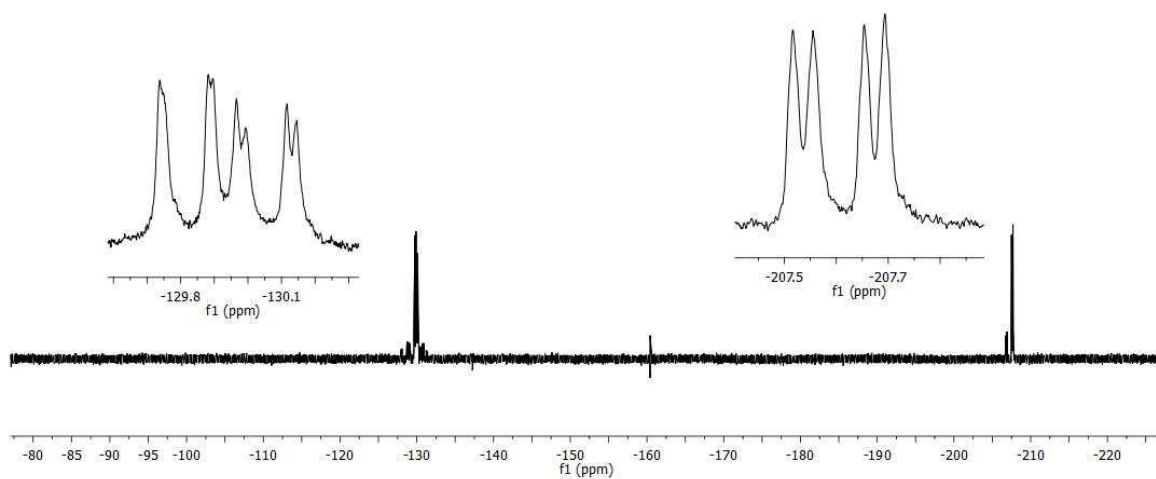
 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) $^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )



$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC-NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )

 $^{19}\text{F}$ -NMR (376.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )