

Synthese fluorierter Glycopeptidkonjugate zur Entwicklung von tumorselektiven Vakzinen

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

Manuel Johannes
geboren in Haßfurt
Mainz, Januar 2011

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt
unablässig dafür, dass dem forschenden Menscheist seine
beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder
von neuem angefacht werden: die Begeisterung und die Ehrfurcht.“

Max Planck

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Krebs	1
1.2	Mucine.....	3
1.3	Immuntherapie und tumorassoziierte Antigene (TAA)	8
1.4	Biologisch aktive Fluorzucker	12
2.	Zielsetzung	16
3.	Allgemeiner Teil	20
3.1	Synthese von 3'- bzw. 4'-F-T-Antigen-Analoga	20
3.1.1	Synthese des 3'-F-T-Antigens.....	21
3.1.2	Synthese des 4'-F-T-Antigens.....	48
3.2	Synthese des 6'-Di-F-T-Antigens	61
3.3	Synthese des 6-Di-F-T _N -Antigens.....	69
3.4	Untersuchung zur Stabilität fluorierter T-Antigen-Analoga	74
3.5	Synthese fluorierter MUC1-Glycopeptid-Antigene	92
3.6	Synthese und immunologische Evaluierung fluorierter MUC1-Glycopeptid-Protein-Konjugaten	104
4.	Zusammenfassung und Ausblick	117
5.	Experimentalteil	126
5.1	Allgemeines und Messgeräte	126
5.2	Synthesen zu Kapitel 3.1	130
5.3	Synthesen zu Kapitel 3.2	166
5.4	Synthesen zu Kapitel 3.3.....	176
5.5	Synthesen zu Kapitel 3.4.....	182
5.6	Synthesen zu Kapitel 3.5.....	193
5.7	Synthesen zu Kapitel 3.6.....	206
6.	Literaturverzeichnis.....	211

Abkürzungsverzeichnis

a	spezifischer Drehwert
Abb.	Abbildung
absol.	absolut
Ac	Acetyl-
Ac ₂ O	Acetanhydrid
Ala, A	Alanin
arom.	aromatisch
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
Ausb.	Ausbeute
Äquiv.	Äquivalente
arom.	aromatisch
b	breit
BB	Breitband-Entkopplung
ber.	Berechnet
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Bovine Serum Albumin
c	Konzentration
COSY	Correlated Spectroscopy
Cys, C	Cystein
Δ	chemische Verschiebung
d	Tag
d, dd, ddd	Dublett, Dublett von Dublett, Dublett von Dublett von Dublett
DAST	<i>N,N</i> -Diethylaminoschwefeltrifluorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
Deoxofluor	[Bis(2-methoxyethyl)amino]schwefeltrifluorid
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DFMBA	<i>N,N</i> -Diethyl- α,α -difluor-(<i>m</i> -methylbenzyl)amin
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dt	Dublett von Triplet
ESI-MS	Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
Et	Ethyl
EtOAc	Ethylacetat
Fa.	Firma
FD-MS	Field-desorption-Massenspektrometrie
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
Gal	D-Galactose
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat

HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
^c Hex	Cyclohexan
HMPB	4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxybutansäure
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOAc	Essigsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
i. Hochvak.	im Hochvakuum
Hz	Herz
i. Vak.	im Vakuum
kDa	Kilo-Dalton
J	Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
Lit.	Literatur
Lsg.	Lösung
M	Molarität
m	Multipllett
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
MS	Massenspektrum
NaOMe	Natriummethanolat
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Nuclear magnetic resonance
org.	organisch
Phe, F	Phenylalanin
Pos	positiv
Ppm	parts per million
Pro, P	Prolin
q	Quartett
quant.	quantitativ
R	Rest
Raumtemp.	Raumtemperatur
R _f	Retentionsfaktor für Dünnschichtchromatogramme
RP	Reversed phase
R _t	Retentionszeit
s	Singulett
Sdp.	Siedepunkt
Schmp.	Schmelzpunkt
Ser, S	Serin
T	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid

TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N, N, N', N'- tetramethyluroniumtetrafluoroborat
<i>t</i> Bu	<i>tert.</i> -Butyl
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
Thr, T	Threonin
TIS	Triisopropylsilan
Trp, W	Tryptophan
UV	Ultraviolett
Val, V	Valin
Xaa	Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl

1. Einleitung

1.1 Krebs

Einem Bericht des Robert Koch-Institutes zufolge erkranken deutschlandweit jährlich etwa 450.000 Menschen an Krebs. Weiter ist dort zu lesen, dass im Jahr 2006 knapp 211.000 Menschen an den Folgen maligner Tumore gestorben sind. Obwohl die Krankheit Krebs schon sehr lange bekannt ist, nach Papyri-Funden von E. Smith und G. Elbers aus dem späten 19. Jahrhundert wird bereits um 1600 v. Chr. bei den alten Ägyptern von dieser Krankheit berichtet,^[1] konnte bis heute keine zuverlässige Behandlungsmethode zu ihrer Bekämpfung entwickelt werden. So stellt Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen aktuell die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar.^[2]

Unter dem Begriff Krebs versteht man das Auftreten einer unkontrollierten Proliferation entarteter Körperzellen, die durch eine Vielzahl von Ursachen und Einflüssen ausgelöst werden kann. In gesundem Gewebe unterliegt die Zellteilung einem streng regulierten Prozess, welcher durch die genetische Information im Zellkern gesteuert wird. Das unkontrollierte Wachstum der Zellen wird gehemmt und es liegt ein Gleichgewicht zwischen Zellzyklus und Apoptose vor. In malignen Zellen hingegen liegt eine Störung der genetischen Information zur Regelung eben dieses Gleichgewichtes vor, wodurch bösartige Neoplasien auftreten können, die gesundes Gewebe verdrängen und zerstören. Darüber hinaus können weitere Tochtergeschwulste, sog. Metastasen entstehen. Einige Ursachen für das Auftreten einer solchen Zellentartung sind bekannt. So können etwa radioaktive Strahlung und UV-Strahlung aber auch Viren, Bakterien und Parasiten eine Krebserkrankung auslösen. Mit Blick auf letztere führten Forschungen zur Entwicklung eines Impfstoffs gegen den durch Papillomviren ausgelösten Gebärmutterhalskrebs, wofür 2008 der Nobelpreis für Medizin verliehen wurde.^[3] Die häufigsten Krebserkrankungen beim Menschen sind Brust-, Lungen-, Darm- und Prostatakrebs wobei die Heilungschancen in Deutschland zur Zeit bei etwa 40% liegen. Dieser Wert ist allerdings mit Vorsicht zu betrachten, da in der Onkologie ein Patient bereits nach fünf krebsfreien Jahren als geheilt eingestuft wird. Häufig aber tritt die Krankheit nach diesem für die Statistik entscheidenden Zeitraum erneut auf. In Abb. 1.1 ist eine geschlechtsbezogene prozentuale Verteilung der einzelnen Krebsarten dargestellt.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei Krebs um die Auswirkungen eines genetischen Defekts handelt, kann prinzipiell jede Art von Zelle betroffen werden. Eine effiziente

Behandlung bestünde darin, das maligne Gewebe selektiv zu bekämpfen, während das gesunde Gewebe in direkter Nachbarschaft nicht in Mitleidenschaft gezogen wird. Die heutige Medizin bedient sich zur Krebsbekämpfung grundsätzlich dreier Methoden; Der chirurgische Entfernung des malignen Gewebes, der Bestrahlungs- und der Chemotherapie.^[4,5,6,7,8]

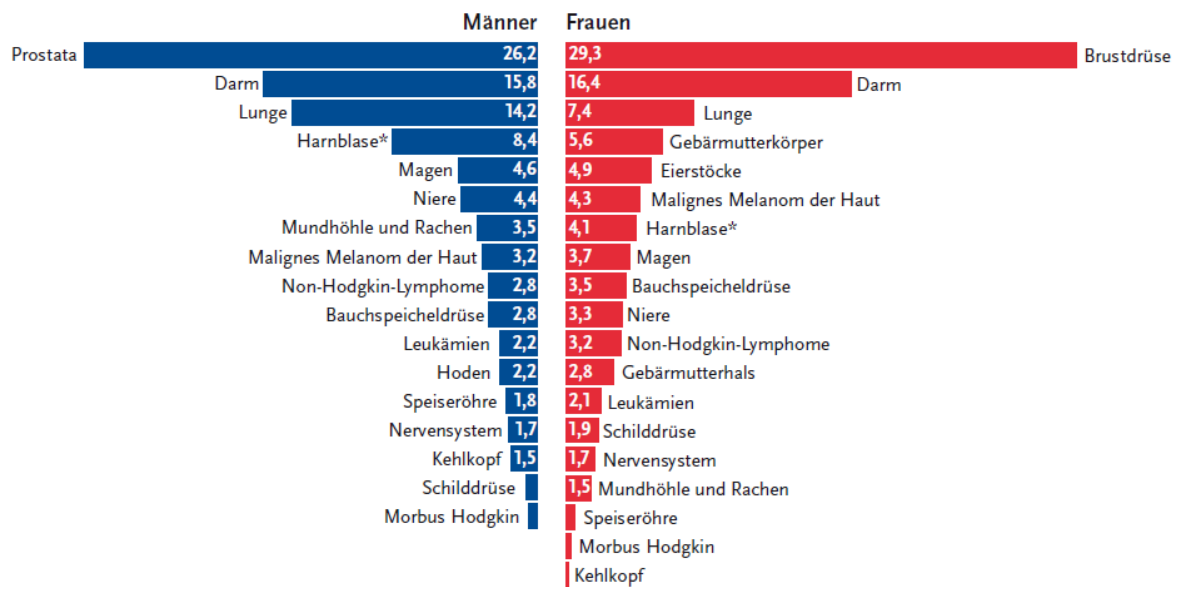


Abb. 1.1: Prozentuale Verteilung der Krebserkrankungen in Deutschland

Bei der chirurgischen Behandlung eines Tumors wird mit Hilfe eines sehr präzisen und örtlich begrenzten Eingriffs versucht, eine komplette Entfernung des Tumorgewebes zu erreichen (kurative Operation). Ist dies nicht möglich, ist es das Ziel, die Tumormasse größtmöglich zu verkleinern, um so die Lebenszeit des Patienten zu verlängern und Beschwerden zu verringern (palliative Operation). Bei der Chemotherapie werden mit Medikamenten, sog. Zytostatika, Zellen bekämpft, die sich im Begriff einer Teilung befinden. Da es sich bei Krebszellen um sich häufig teilende Zellen handelt, werden diese durch die Chemotherapie besonders angegriffen. Allerdings werden auch andere teilungsaktive Zellen, wie z.B. Zellen der Haare, der Haut oder des blutbildenden Knochenmarks beeinträchtigt. Dies führt zu gravierenden Nebenwirkungen wie Übelkeit, Haarausfall und einer allgemeinen Anfälligkeit für Infektionen. Ein Vorteil dieser Therapie ist jedoch die Möglichkeit, Metastasen aufgrund der systemischen Wirkung der Zytostatika bekämpfen zu können. Bei der Bestrahlungstherapie wird demgegenüber ausgenutzt, dass maligne Zellen häufig viel strahlungsempfindlicher sind als gesundes Gewebe. Durch lokale Bestrahlung ist es so möglich, gezielt Tumorzellen abzutöten oder die Zellteilung dieser zu verhindern.

Für einen größtmöglichen Behandlungserfolg werden meist alle drei Therapieansätze kombiniert. Allerdings mangelt es all diesen Methoden an der nötigen Selektivität bei der Bekämpfung des malignen Gewebes, so dass es fast immer auch zu einer (erheblichen) Schädigung von gesunden Zellen kommt. Dies bedingt eine Schwächung des gesamten Immunsystems, was den Heilungsverlauf oftmals negativ beeinflusst. Aus diesem Grund liegt ein Hauptaugenmerk der Tumormedizin auf der ständigen Weiter- bzw. Neuentwicklung der Krebstherapie. Einen vielversprechenden Ansatz stellt hierfür die sog. Krebsimmuntherapie^[5,9,10,11] dar, die auf eine selektive Aktivierung des menschlichen Immunsystems mit Hilfe von Anti-Tumorimpfstoffen abzielt. Durch Applikation eines synthetischen Vakzins soll hierbei eine gezielte und spezifische Bekämpfung maligner Zellen durch das Immunsystem erreicht werden. Im Vergleich zu den bereits bekannten antiviralen und antibakteriellen Vakzinen^[3] sollten Antitumorvakzine nicht nur prophylaktisch einsetzbar sein, sondern vor allem akut zur Induktion einer selektiven und permanenten Immunantwort gegen maligne Zellen führen. Auch eine Bekämpfung der sich frei im Blutstrom befindlichen metastasierenden Zellen wird so ermöglicht. Das immunologische Gedächtnis des adaptiven Immunsystems sollte weiterhin ein erneutes Ausbrechen der Krankheit verhindern. Basis einer solchen Therapie ist allerdings ein signifikanter Unterschied der Zelloberflächenstruktur malignen Gewebes, der zur Identifizierung durch das Immunsystem herangezogen werden kann. Ist die Differenzierung nicht ausreichend, würde das Immunsystem gesunde Zellen ebenfalls angreifen, was schließlich zu Autoimmunreaktionen führen könnte. Bei einem von Krebs befallenen Organ ist im Verlauf des unkontrollierten Zellwachstums eine charakteristische Veränderung des Gewebes zu beobachten. Beispielsweise wird das Zelloberflächenglycoprotein MUC1^[12,13,14,15] auf Karzinomen in erheblichem Maße überexprimiert und stellt so ein geeignetes Unterscheidungsmerkmal zwischen gesundem und Tumorgewebe dar, das im Zuge der Tumorimmuntherapie ausgenutzt werden kann.

1.2 Mucine

Mucine sind hochmolekulare, stark *O*-glycosylierte Zelloberflächen-Glycoproteine, die von den meisten Epithelzellen des Verdauungs- und Bronchialtraktes exprimiert werden. Hierbei dienen sie hauptsächlich dem Schutz der Zelloberfläche vor Einwirkung von Pathogenen, Enzymen sowie hohen Ionenkonzentrationen und Säuren.^[2] Mucine lassen sich grob in zwei Klassen einteilen: Zum einen in die sekretorischen Vertreter und zum anderen in die membrangebundenen Mucine, zu welchen auch das MUC1 gehört. MUC1 ist hauptsächlich

auf der apicalen Seite, also der dem Lumen zugewandten Seite, zu finden und erstreckt sich ca. 200 bis 800 nm in das Lumen hinein.^[16] Man kann eine grobe Unterteilung in einen kurzen cytoplasmatischen Bereich, in eine hydrophobe Transmembranregion, welche das Mucin in der Plasmamembran fixiert, und in eine lange extrazelluläre Einheit vornehmen.^[2] Die Transmembranregion und vor allem die cytoplasmatische Region nehmen sowohl eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion,^[17] als auch in der Zell-Zell-Adhäsion^[18] ein. Klare Indizien hierfür sind die vielfach vorkommenden potentiellen Phosphorylierungsstellen des intrazellulären Bereiches und die direkte, von β -Catenin vermittelte, Interaktion von MUC1 mit dem Cytoskelett.^[19] Die extrazelluläre Region zeichnet sich durch einen sehr hohen Kohlenhydratanteil aus, der 50 bis 90 Gewichtsprozent ausmacht.^[20] Generell ist allen Mucinen eine variable Anzahl (ca. 20 bis 150) sog. *tandem repeats* (repetitive Sequenzeinheiten, *variable number of tandem repeats*, VNTR) zu eigen. Zwar unterscheiden sich die siebzehn bekannten Mucine in der Zahl dieser *tandem repeats*, der Länge und der Aminosäuresequenz, doch besitzen alle einen hohen Gehalt an den Aminosäuren Prolin, Serin und Threonin, wobei die beiden letztgenannten potentielle *O*-Glycosylierungsstellen darstellen. Im Falle des MUC1 bestehen die Wiederholungseinheiten aus 20 Aminosäuren, der Sequenz HGVT SAPDTRPAPGSTAPPA und besitzen so fünf potentielle *O*-Glycosylierungsstellen. Der Grad der Glycosylierung und die Anzahl der vorhandenen *tandem repeat*-Einheiten ist abhängig sowohl vom Gewebe, als auch vom Entwicklungsstadium der jeweiligen Zelle.^[13]

Im Anschluss an die ribosomale Proteinbiosynthese werden im Bereich des *Golgi*-Apparates die komplexen Oligosaccharid-Seitenketten aufgebaut, wobei im *cis-Golgi* eine selektive enzymatische Glycosylierung an den Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren Serin und Threonin erfolgt. Hierbei wird zunächst durch eine *N*-Acetylgalactosaminyltransferase (GalNAcT) die sog. T_N-Antigen-Struktur aufgebaut.^[21,22] Beim weiteren Durchlaufen des *Golgi*-Apparates kommt es nun zu einer schrittweisen Verlängerung der Saccharidketten, wobei durch eine Galactosylierung (β 1,3GalT) die sog. Core1-Struktur ((β Gal(1 \rightarrow 3)- α GalNAc; sog. T-Antigen) resultiert. Diese wiederum dient als Substrat für die β 1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase (C2GnT-1), wodurch die sog. Core2-Struktur^[23,24] entsteht. Durch eine Abfolge von weiteren Glycosyltransferase-katalysierten Glycosylierungen werden anschließend komplexe Kohlenhydratseitenketten aufgebaut, bevor diese im *trans-Golgi* durch das Anbinden einer Sialinsäure, einer Fucose oder durch Sulfatierung terminiert werden. Auf diesem Weg kommt es zur Ausbildung verschiedener Glycosylierungsmuster,

die jedoch alle auf eine von acht Kernstrukturen zurückzuführen sind. Bei MUC1 sind lediglich die beiden Kernstrukturen Core1 und Core 2 (Abb. 1.2) von Bedeutung.

Core1:	βGal-(1,3)-αGalNAc-O-Protein
Core2:	βGal-(1,3)-[βGlcNAc-(1,6)]-αGalNAc-O-Protein
Core3:	β GlcNAc-(1,3)- α GalNAc-O-Protein
Core4:	β GlcNAc-(1,3)-[β GlcNAc-(1,6)]- α GalNAc-O-Protein
Core5:	α GalNAc-(1,3)- α GalNAc-O-Protein
Core6:	β GlcNAc-(1,6)- α GalNAc-O-Protein
Core7:	α GalNAc-(1,3)- α GalNAc-O-Protein
Core8:	α Gal-(1,3)- α GalNAc-O-Protein

Abb. 1.2: Core-Strukturen der O-Glycane bei Mucinen

Das gesunde epitheliale MUC1 nimmt auf der dem Lumen zugewandten Seite eine starre, langgestreckte Konformation ein, wobei das Peptidrückgrat durch den bereits beschriebenen hohen Glycosylierungsgrad vollständig abgeschirmt ist und so dem Immunsystem für Erkennungsprozesse jeglicher Art nicht zur Verfügung steht. (Abb. 1.3) Bei Tumorzellen, die meist runde bis ovale Formen einnehmen, geht diese Polarisation verloren. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass Glycoproteine in veränderter Weise auf der gesamten Zelloberfläche exprimiert sein müssen. (Abb. 1.4) Der Grund hierfür liegt zum einen in einer fehlerhaften Enzymaktivität im *trans-Golgi*, bei der es zu einer vorzeitigen Terminierung des Wachstums der Kohlenhydratseitenketten kommt.^[24] Zum anderen liegt eine starke Überexpression dieser Oberflächenstrukturen auf der gesamten Zelle vor.

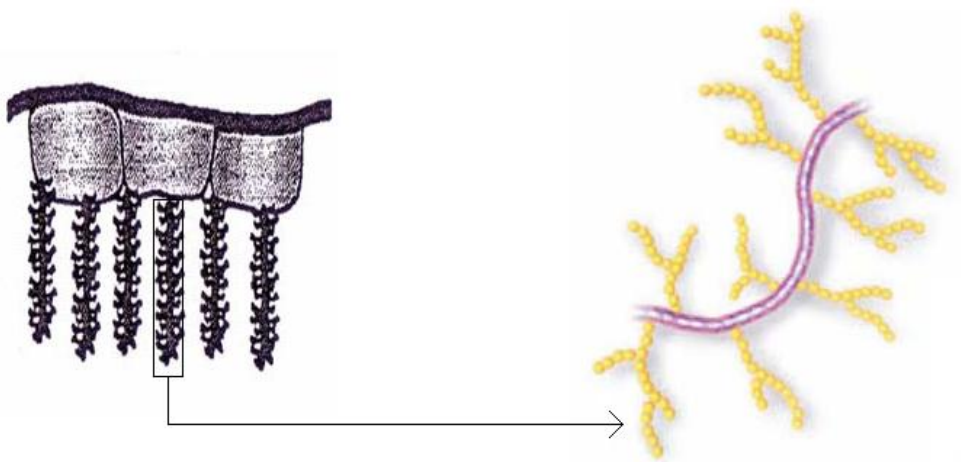


Abb. 1.3: Vorkommen von MUC1 auf einer benignen Zelle

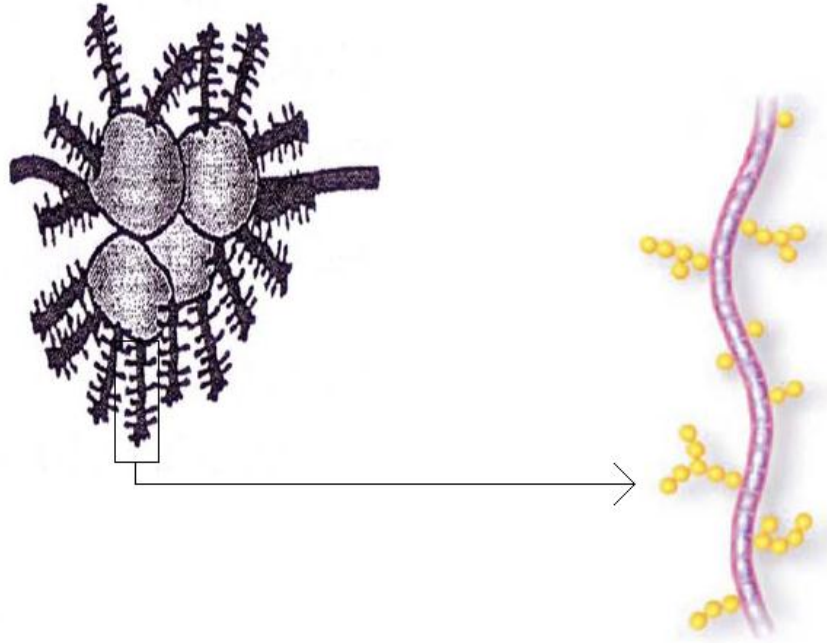


Abb. 1.4: Vorkommen von MUC1 auf einer malignen Zelle

In vielen Krebszelllinien, wie z.B. der Brustkrebszelllinie T47D^[25,26], findet man eine sehr starke Herunterregulierung der β 1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase-Aktivität (C2GnT-1). Durch diese veränderte Enzymaktivität kommt es nicht zur Ausbildung der Core2-Strukturen^[27], sondern der Aufbau der Kohlenhydratseitenketten wird im Vergleich zu gesunden Zellen sehr stark beeinträchtigt. Weiterhin wurde bei der besagten Brustkrebszelllinie ein stark erhöhter Sialinsäuregehalt festgestellt. Dies ist ebenfalls auf eine veränderte Enzymaktivität zurückzuführen, da in malignen Zellen häufig eine Überexpression von Sialintransferasen (ST6GalNAc-I, ST6GalNAc-II, ST3Gal-I) beobachtet werden kann. Hierdurch kommt es zu einem verfrühten Abbruch des Kettenwachstums durch die Anbindung eines Sialinsäuremoleküls. Somit werden lediglich Core1-Strukturen aufgebaut, die als sog. tumorassoziierten Antigenstrukturen (Abb. 1.5), wie etwa das Sialyl-T_N-Antigen oder die beiden regioisomeren (2,3)-Sialyl-T- und (2,6)-Sialyl-T-Antigene,^[28] von Bedeutung sind.

Durch die stark verkürzten Glycanketten kommt es zu einer deutlich geringeren Abschirmung des Peptidrückgrats durch die Kohlenhydratseitenketten, so dass bislang verborgene Peptidepitope dem Immunsystem zugänglich werden. Ein Beispiel für einen immundominanten Peptidabschnitt ist die *tandem repeat*-Teilsequenz PDTRP^[29], welche bereits erfolgreich von mehreren aus Tumorzellisolaten erhaltenen Antikörpern erkannt wurde. Diese Teilsequenz ist offenbar in der Lage eine *turn*-Konformation^[30] einzunehmen, welche durch die vorangehende Glycosylierung induziert wird.^[31] Es wurde jedoch berichtet,

dass eine Glycosylierung des Threonins innerhalb dieser Teilsequenz eine verringerte Immunogenität nach sich zieht.^[32] Ein weiteres Beispiel für eine immundominante Peptidteilsequenz ist das Tetrapeptid GSTA, wobei hier eine Glycosylierung des enthaltenen Threonins eine erhöhte Immunogenität bewirkt.^[33]

Ein weiterer Unterschied zu gesundem Gewebe ist die Tatsache, dass in Tumorgeweben alle fünf potentiellen *O*-Glycosylierungsstellen einer *tandem repeat*-Einheit mit Kohlenhydratepitopen besetzt sind, während etwa in benignem Brustgewebe durchschnittlich nur 2.5 Bindungsstellen besetzt sind.^[13]

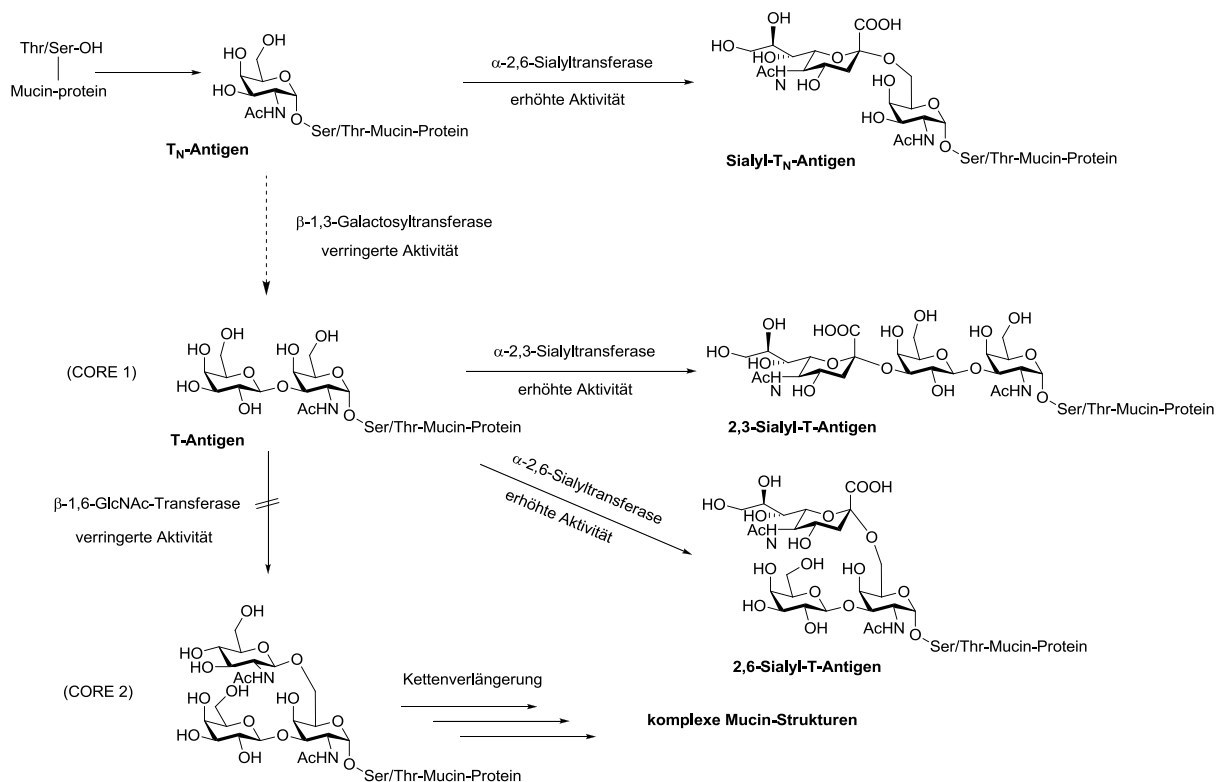


Abb. 1.5: Tumorassoziierte Antigenstrukturen des Mucins MUC1

Vor dem Hintergrund dieser spezifischen Unterschiede der Oberflächenglycoproteine maligner Zellen im Vergleich zu gesundem Gewebe besteht die Möglichkeit, selektive, d.h. ausschließlich gegen Tumorzellen gerichtete, Antikörperreaktionen durch Stimulation des Immunsystems zu erzeugen. Für eine erfolgreiche Immunisierung unabdingbar ist jedoch eine vollständige Homogenität der Glycopeptidstrukturen, wie sie nur mit vollsynthetischen Materialien erreicht werden kann.

1.3 Immuntherapie und tumorassoziierte Antigene (TAA)

Die aktive Immuntherapie zielt neben der Induktion einer starken, selektiven und tumorspezifischen Immunantwort ebenso auf eine Abschwächung bzw. Aufhebung der Immunsuppression ab, die durch den Tumor selbst ausgelöst wird. Der Einsatz einer gezielten Immuntherapie würde in besonderem Maße der Nachbehandlung von Patienten dienen, denen das maligne Gewebe bereits operativ entfernt wurde. Durch die Eliminierung der dabei gegebenenfalls zurückgebliebenen metastasierenden Zellen mit Hilfe des Immunsystems und durch den Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses könnte einem erneuten Ausbruch der Krankheit vorgebeugt werden.^[2] Zur Entwicklung und letztlich auch erfolgreichen Anwendung einer solchen aktiven Krebsimmuntherapie müssen jedoch mehrere entscheidende Voraussetzungen erfüllt sein.

- Zunächst müssen gravierende Unterschiede in den Oberflächenstrukturen maligner und benigner Zellen vorhanden sein. Dies können sowohl qualitative wie auch quantitative Merkmale sein.
- Das Immunsystem sollte in der Lage sein, diese Unterschiede zu erkennen und darauf reagieren zu können. Nur so kann gewährleistet werden, dass eine Stimulierung des Immunsystems in einer Immunantwort mit anschließender Antikörperproduktion mündet.
- Die Lernfähigkeit des adaptiven Immunsystems müsste ausgenutzt werden, damit einem erneuten Ausbrechen einer Krebserkrankung sofort entgegengewirkt werden kann.

Um all diese Voraussetzungen erfüllen zu können, wird eine definierte Struktur benötigt, die in der Lage ist, das Immunsystem in der benötigten Weise zu aktivieren. Hierfür bietet sich die glycosylierte *tandem repeat* Sequenz des MUC1 an (Abb. 1.6), die die hochgradig immunogene Partialsequenz PDTRPAP beinhaltet.^[2,28]

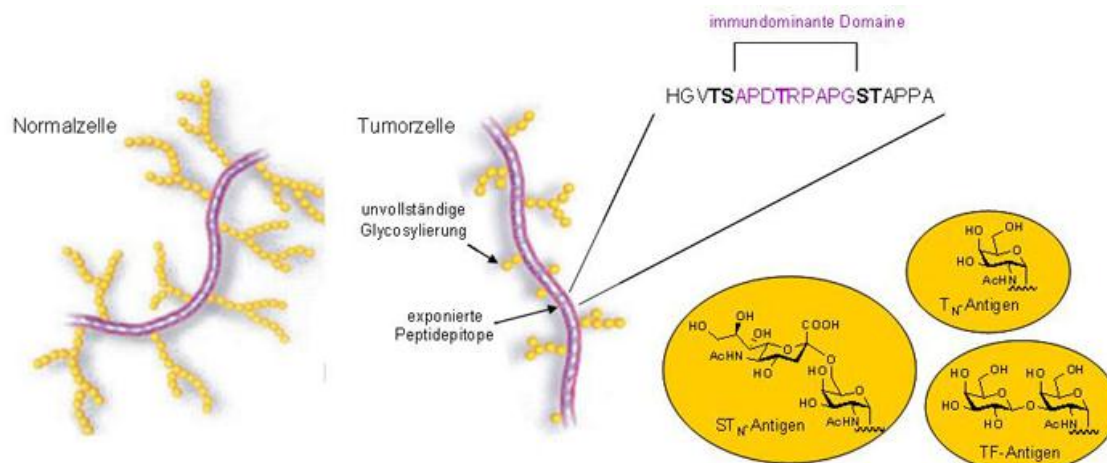


Abb. 1.6: Kohlenhydratseitenketten einer gesunden und malignen Zelle^[34]

Ein eigenständiges Vorgehen des menschlichen Immunsystems gegen Tumorzellen ist aufgrund diverser immunsuppressiver Mechanismen des Tumors nicht möglich.^[35] So sind Tumorzellen beispielsweise in der Lage, durch Sekretion von immunsuppressiven Cytokinen, wie etwa TGF- β , eine Toleranzschwelle aufzubauen. Auch ein Verlust der tumorassoziierten Oberflächenantigene oder die Verminderung bzw. der Verlust der Antigenpräsentation durch eine Veränderung der HLA-Expression kann eine Immunsuppression bewirken. Fehlen dem Immunsystem kostimulierende Faktoren oder befinden sich die Tumorzellen an einem für das Immunsystem nicht erreichbaren Ort, ist eine Bekämpfung des tumorösen Gewebes ohne weitere Stimulation des Immunsystems ebenfalls erschwert.

Um diese suppressiven Mechanismen außer Kraft zu setzen, gilt es, die tumorassoziierten Antigene (TAA) in Form von vollsynthetischen Vakzinen so zu präsentieren, dass sowohl eine humorale als auch zelluläre Immunantwort resultiert. Hierfür sind strukturell exakt definierte Glykokonjugate nötig, da eine ausreichende Strukturhomogenität durch den Einsatz von isolierten MUC1-Antigenen aus Tumorzellisolaten nicht gegeben ist.^[8,36] Für eine größtmögliche Effizienz sollte das synthetisch hergestellte Vakzin neben einer effizienten Antikörperproduktion, vermittelt von T-Helferzellen, auch eine starke cytotoxische T-Zellantwort hervorrufen.

Um B-Zellen zu aktivieren, ist neben einer Wechselwirkung der B-Zelle mit der antigenspezifischen T-Helferzelle auch eine Bindung des Antigens an den B-Zellrezeptor erforderlich. Von membranständigen Immunglobulinen der B-Zellen erkannte Antigene werden zunächst mit Hilfe einer rezeptorvermittelten Endocytose in die Zelle eingeschleust und dort prozessiert. Hierbei kommt es zur Bildung von Proteinfragmenten, die dann über den MHC-II-Komplex (major histocompatibility complex) auf der Zelloberfläche präsentiert

werden. Diese Fragmente wiederum können anschließend von spezifischen T-Helferzellen erkannt werden, die dann ihrerseits die für eine effiziente Immunantwort nötigen kostimulierenden Faktoren beisteuern. Hierzu gehören unter anderem spezielle Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen etwa zwischen dem CD40-Rezeptor der B-Zelle und dem CD40L-Liganden auf der Oberfläche der T-Helferzelle. Weiterhin kommt es zur Sezernierung von Zytokinen wie etwa IL-2, IL-4, IL-6 und TNF- α/β , welche der T-Helferzelle entstammen und die Proliferation und Differenzierung der B-Zelle induzieren. T-Zell-Rezeptoren, welche sich auf der Oberfläche cytotoxischer T-Zellen befinden, sind in der Lage, Antigenstrukturen auf sog. antigenpräsentierenden Zellen zu erkennen und zu binden. Diese werden durch den MHC-II-Komplex präsentiert, und durch eine weitere Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung zwischen dem B7-Liganden der antigenpräsentierenden Zelle und dem CD28-Rezeptor der T-Zelle kann die cytotoxische T-Zelle aktiviert werden. Hierbei kommt es ebenfalls zur Sekretion von kostimulierenden Zytokinen, IL-1 und IL-2, die für die Aktivierung eine entscheidenden Rolle spielen.

Tumorassoziierte Antigene weisen lediglich eine geringe Immunogenität auf. Da aber für eine ausreichende Immunantwort sowohl eine B-Zell- als auch T-Zell-vermittelte Reaktion erfolgen muss, ist es nötig, die tumorspezifischen Antigene über einen selbst nicht immunogenen Spacer an einen Träger (immunogenes Protein) oder an ein Peptidepitop zu binden, welches in der Lage ist, T-Zellen zu stimulieren.^[8] In Abb. 1.7 ist ein schematischer Aufbau eines solchen Vakzins gezeigt.

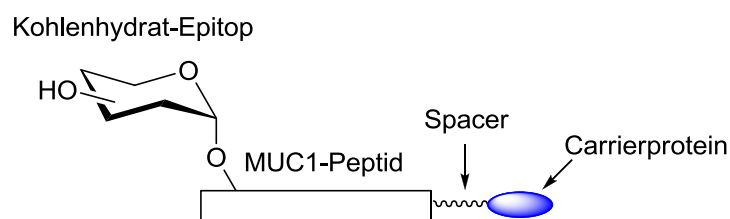


Abb. 1.7: Schematischer Aufbau eines potentiellen Vakzins

In letzter Zeit konnte in immunologischen Studien gezeigt werden, dass der Einsatz solcher vollsynthetischer Vakzine ein vielversprechender Ansatz ist.^[8] In der Arbeitsgruppe um *Kunz* war es möglich, eine Induktion von spezifischen Antikörpern in transgenen Mäusen auf Basis eines vollsynthetischen MUC1-Glycopeptides zu erhalten.^[32,37,38] Das Vakzin enthielt hierbei die komplette *tandem repeat*-Sequenz des MUC1 und wurde mit einer ST_N-Seitenkette versehen. Dieses Glycopeptid wurde anschließend über einen Spacer auf Basis von Triethylenglycol an ein T-Zellepitop des Tetanus-Toxoids gebunden. (Abb. 1.8)

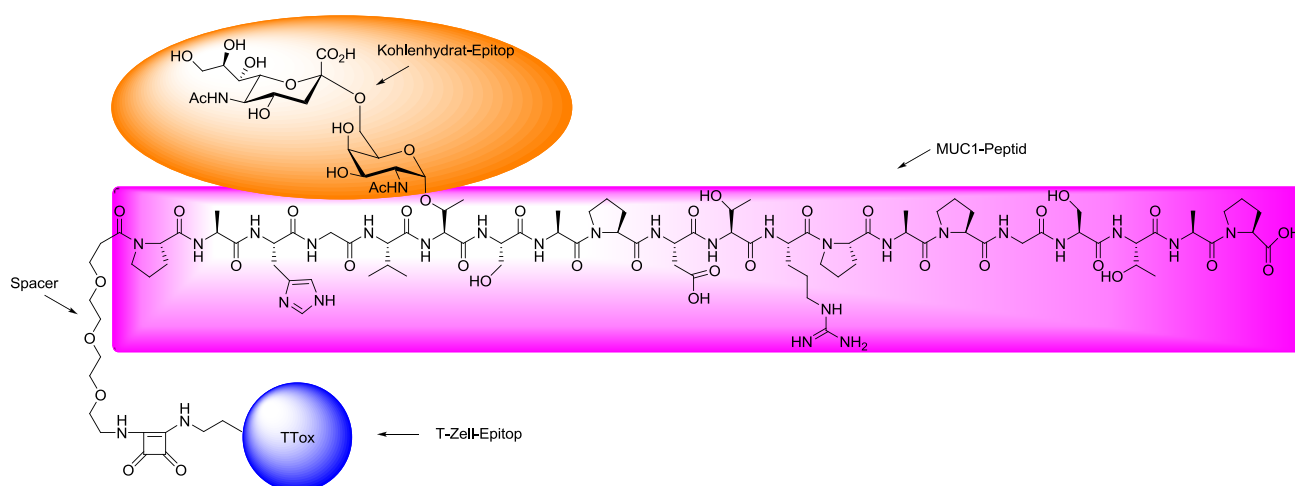


Abb. 1.8: Beispiel eines MUC1-Glycopeptid-Vakzins ^[38]

In jüngster Zeit konnten neben den natürlich auftretenden Kohlenhydrat-Antigenen auch strukturverwandte Glycosylaminosäuren synthetisiert werden, die an Stelle der *O*-glycosidischen Bindung eine *C*-glycosidische Oxim-Verknüpfung zur entsprechenden Aminosäure aufweisen. Diese erwiesen sich in immunologischen Studien nicht nur als immunogener, sondern auch als metabolisch stabiler. ^[39]

In Analogie zu diesen Überlegungen könnte auch der Einbau eines Fluor-Substituenten an Stelle einer Hydroxy-Funktionalität die metabolische Stabilität und Immunogenität der Verbindung positiv beeinflussen. Ein sterisch nachteiliger Effekt ist durch diesen Austausch nicht zu erwarten, da der Größenunterschied zwischen einer Hydroxy-Gruppe (1.40 Å) und einem Fluorsubstituenten (1.47 Å) sehr gering ausfällt. Allerdings sollten sich die durch den Fluorsubstituenten veränderten elektronischen Eigenschaften auf die Reaktivität benachbarter Funktionalitäten auswirken. Hierzu könnten unter anderem eine Beeinflussung der Wasserstoffbrückenbindungen sowie eine größere metabolische Stabilität gehören. Auch ein Einfluss auf die Immunogenität ist denkbar, da durch den Einbau des Fluoratoms keine körpereigene Molekülstruktur gegeben ist. Die Gefahr einer schwächeren bzw. unspezifischeren Immunantwort konnte in jüngster Zeit wiederlegt werden, da ein fluorhaltiges Glycopeptid-Konjugat bereits erfolgreich als Vakzin in transgenen Mäusen getestet wurde und keinerlei Unterschiede zu den natürlichen Vakzin-Vertretern festgestellt werden konnte. ^[40,41,42] Dies gilt jedoch lediglich für die Substitution der Hydroxy-Funktion in der 6- bzw. 6'-Position des Kohlenhydratepitops des T-Antigens. Um die minimal benötigten antigenen Bindungsepitope zu ermitteln, ist ein gezielter F-Einbau in verschiedenen

Positionen des tumorassoziierten Antigens nötig, um so mit Hilfe von Struktur-Aktivitäts-Tests eine optimierte Struktur für selektive und möglichst stabile Vakzinbausteine erhalten zu können.

1.4 Biologisch aktive Fluorzucker

Das Interesse an fluorierten Kohlenhydraten ist in den letzten Jahren stark gestiegen^[43], nicht zuletzt durch ihre Rolle bei der Aufklärung von Rezeptor-Substrat-Wechselwirkungen, der Ermittlung von Enzymspezifitäten oder auch bei der Klärung von Transportmechanismen. Aufgrund des gestiegenen Bedarfs an fluorierten Substanzen kam es zu einer erheblichen Weiter- bzw. Neuentwicklung von Fluorierungsmethoden, wozu beispielsweise die Reagenzien SelectfluorTM, DeoxofluorTM,^[44] DFMBBA,^[45] DAST[®]^[46] und auch HF·NEt₃^[47] zählen.

Fluoratome können aufgrund ihrer Größe durchaus als „bioisoster“ zu Hydroxygruppen bezeichnet werden, da sie häufig zu vergleichbaren biologischen Aktivitäten führen. Darüber hinaus beeinflusst die sehr hohe Elektronegativität des Fluorsubstituenten und dessen geringe Polarisierbarkeit die Elektronendichteverteilung des gesamten Moleküls und damit auch die chemische Reaktivität benachbarter Gruppen. Da fluorierte Wirkstoffe dennoch häufig eine größere biologische Aktivität und/oder eine verbesserte metabolische Stabilität im Vergleich zu ihren nichtfluorierten Analoga zeigen, kommen fluorierte Verbindungen insbesondere in pharmazeutischen Anwendungen zum Einsatz. Schon 1997 wurden mit dem Antidepressivum Paxil[®] und dem antibakteriell wirksamen Ciprofloxacin (Cipro[®]) zwei fluorierte Medikamente auf den Markt gebracht, die schnell zu den meistverkauften Präparaten zählten. (Abb. 1.9)^[48,49]

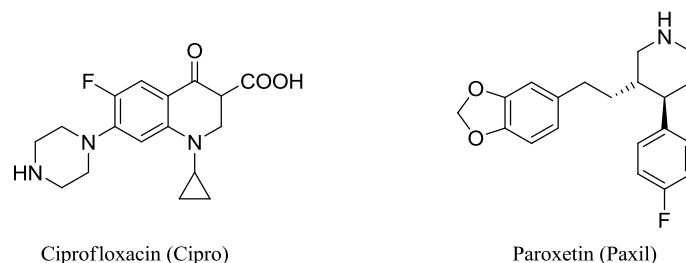


Abb. 1.9: Beispiele für fluorierte Wirkstoffe

Ein weiteres Anwendungsgebiet fluorierter Kohlenhydrate ist die Verwendung von mit ¹⁸F-Atomen markierter Glucose als das am häufigsten eingesetzte Radiopharmazeutikum.^[50]

Hierbei wird 2-Desoxy-2-[¹⁸F]fluor-D-glucose intravenös verabreicht und gelangt mit dem Blutstrom in die Zellen. Mittels Positron-Emissions-Tomographie können anschließend in einer nicht-invasiven Methode pathophysiologische Prozesse der Neurologie, Cardiologie und Onkologie untersucht werden.

Des Weiteren spielen bei einer sehr großen Zahl von molekularen Erkennungsprozessen im Körper, wie etwa bei bakteriellen und viralen Infektionen, der Immunantwort oder auch der Zelladhäsion, komplexe Kohlenhydratstrukturen eine entscheidende Rolle. Diese werden von über 100 verschiedenen Glycosyltransferasen aufgebaut. Die Beeinflussung und selektive Inhibierung dieser Enzyme hat in den letzten Jahren zusehends an Bedeutung gewonnen, gerade auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer Medikamente und das Verständnis enzymatischer Wirkmechanismen.^[51] Systematische Studien auf diesem Gebiet wurden in den letzten Jahren unter anderem anhand von fluorierten Monosacchariden bzw. mucinähnlichen Oligosaccharidderivaten,^[52] die als Inhibitoren für verschiedene Glycosyltransferasen und Glycosidasen wirken,^[53,54] vorangetrieben. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass 2-Desoxy-2-fluorglycoside potente Inhibitoren für β -Glycosidasen darstellen, wobei nicht nur eine kompetitive Hemmung des Enzyms stattfindet, sondern der Inhibitor kovalent an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden wird.^[53] Weiterhin konnte kürzlich gezeigt werden, dass 2,4-Desoxy-2-acetamido-4-fluorgalactose einen sehr wirksamen Inhibitor beim Aufbau des PSGL-1-Polypeptids (P-Selektin Glycoprotein Ligand 1) darstellt. Bei Zugabe des Inhibitors zu einer Zellkultur konnte nach Einbau des fluorierten Kohlenhydrats ein Rückgang der *O*-Glycosylierung, der Sialyl Lewis-X-Bildung und der Selektin-vermittelten Leukozyten-Adhäsion beobachtet werden.^[55] In 4-Position fluorierte Glucose bzw. Galactose stellt als Uridindiphosphat-Addukt ebenfalls einen Inhibitor für UDP-Galactose-4-Epimerase aus *E. coli* dar.^[56] Dies konnte mit Hilfe eines sog. Indikator-displacement-assays nachgewiesen werden, bei dem mittels Fluoreszenzspektroskopie der Austausch eines zu Beginn im aktiven Zentrum befindlichen Farbstoffs durch den Inhibitor gemessen wird.

Wie bereits beschrieben wurde, besteht eine recht große strukturelle Ähnlichkeit zwischen Desoxyfluorzuckern und ihren natürlichen Analoga. Daher könnte im Fall der Kohlenhydratantigene durch den gezielten Einbau von Fluorsubstituenten nicht nur eine verbesserte metabolische Stabilität erreicht werden, sondern auch eine vergleichbare Immunogenität und Antikörperspezifität resultieren. Voraussetzung hierfür wäre allerdings, dass durch die Substitution der Hydroxyfunktionalität keine, für die Erkennung der Antigenstruktur entscheidende Wechselwirkung verloren geht. Ein Beispiel für die erfolgreiche Erkennung eines fluorierten Haptens wurde bereits 1989 von der Gruppe um

Glaudemanns veröffentlicht.^[57] Dabei konnte gezeigt werden, dass 3-Desoxy-3-fluor- α -methylglucopyranosid eine vierfach höhere Bindungsaffinität zu dem Immunglobulin IgA W3129 aufweist als das natürliche, nicht-fluorierte Derivat. Das analoge 2F-Derivat zeigt zu diesem hingegen ein annähernd identisches Bindungsverhalten. (Abb. 1.10) Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung könnte laut der Autoren die Acidifizierung der Hydroxyfunktion in Nachbarschaft zum 3F-Substituenten sein, welche in einer stärkeren Wasserstoffbrückenbindung zum Protein mündet.

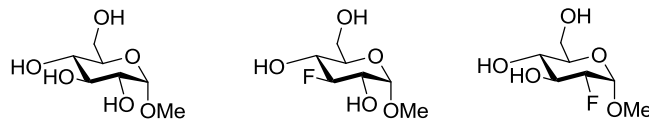


Abb. 1.10: Substrate für Bindungsstudien am Immunglobulin IgA W3129

Die Arbeitsgruppe um *Davis* konnte ebenfalls zeigen, dass bei Substitution einer Hydroxygruppe in 2-Position des Galactosemoleküls eines Sialyllactosamins diese Verbindung eine vergleichbar starke Bindung zu einem micronemalen Protein des Parasiten *Toxoplasma gondii* zeigt, wie das natürliche nicht-fluorierte Substrat. (Abb. 1.11)^[58]

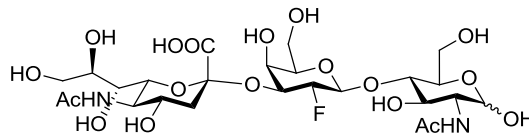


Abb. 1.11: Fluoriertes Sialyllactosamin der Arbeitsgruppe Davis

Erste Beispiele für fluorierte Glycopeptide wurden unter anderem in der Arbeitsgruppe von *Kihlberg* realisiert, indem 4-Fluorgalactose an ein Hydroxylysin angebunden wurde und diese fluorierte Glycosylaminosäure anschließend in ein Peptid bestehend aus 15 Aminosäuren integriert wurde.^[59]

In ersten Studien wurden nun kürzlich auch fluorierte Vertreter tumorassoziierter Kohlenhydrat-Antigene synthetisiert. Nach Einbau eines difluorierten T-Antigen-Analogons in die MUC1 *tandem repeat*-Peptidsequenz konnte so ein vollsynthetische Vakzin erhalten werden, das in Impfstudien an transgenen Mäusen vergleichbare Immunantworten und Antikörperspezifitäten wie bei der Verwendung der natürlichen nicht-fluorierten Vakzinstrukturen induzierte. (Abb. 1.12)^[40]

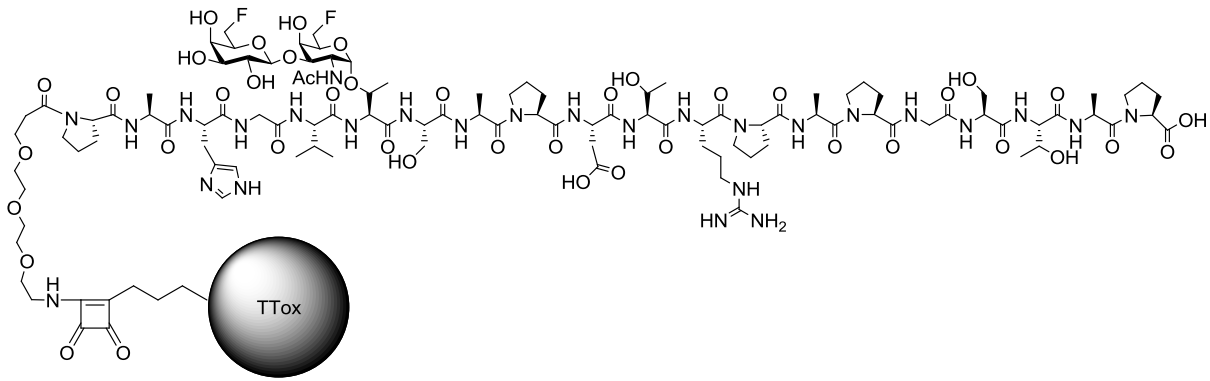


Abb. 1.12: Vertreter eines fluorierten vollsynthetischen Vakzins ^[40]

Solche Vakzine mit fluorierten Kohlenhydrat-Epitopen wären vor allem dann von Interesse, wenn mit dem Einbau des Mimetikums die gegen enzymatischen Abbau empfindlichen Saccharidstrukturen ohne Verlust der immunologischen Wirkung im Metabolismus stabilisiert werden würden, was sich vorteilhaft für Langzeitbehandlungen erweisen würde.^[40]

2. Zielsetzung

Auf epithelialen Tumorzellen wird das Glycoprotein MUC1 stark überexprimiert und besitzt aufgrund einer veränderten Enzymaktivität erheblich verkürzte Kohlenhydratseitenketten. Um die hohe Selektivität des Immunsystems für die selektive Erkennung von Tumorzellen ausnutzen zu können, müssen diese spezifischen Zelloberflächenstrukturen als Haptene präsentiert werden. Dadurch sollte eine gezielte, d.h. ausschließlich gegen Tumorzellen gerichtete, Immunantwort möglich sein. Versuche, mit Hilfe von Tumorzellisolaten eine solche Immunantwort gegen Tumorgewebe hervorzurufen, führten bisher nicht zum Erfolg, da stets neben der gewünschten Anbindung der gebildeten Antikörper an maligne Zellen auch eine Erkennung gesunder Epithelzellen auftrat. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Mikroheterogenität der Zelloberflächenglycoproteine von Tumorzellisolaten, bei denen neben tumorassoziierten auch normale Kohlenhydratseitenketten vorliegen, wodurch Antikörper gegen natürliche Strukturen erhalten werden, die letztlich zu Autoimmunreaktionen führen können. Um dies zu umgehen, müssen strukturell exakt definierte tumorassoziierte Antigenstrukturen auf Basis der extrazellulären repetitiven Sequenz des MUC1 mittels organisch-chemischer Synthese dargestellt werden. Des Weiteren erhofft man sich durch einen selektiven Einbau von Fluorsubstituenten in das Kohlenhydratepitop eine erhöhte metabolische Stabilität bei gleichbleibender oder auch verbesserter Antikörperspezifität. Um die notwendigen minimalen Epitope für eine ausreichend gute Antigenerkennung ermitteln zu können, müssen Fluorsubstituenten in verschiedene Positionen des Kohlenhydrat-Epitops eingebaut werden. Dadurch ist es möglich, den Einfluss der Substitution auf die eben erwähnten Eigenschaften in einer Struktur-Wirkungsbeziehung genauer zu untersuchen. Die synthetisierten fluorierten Glycosylaminosäuren dienen dann als Bausteine für die Festphasenpeptidsynthese zum Aufbau vollsynthetischer, fluorhaltiger Vakzine, welche in einem Vergleich mit den natürlichen Vertretern auf ihre immunologische Wirksamkeit hin getestet werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollen mehrere neuartige Vertreter solcher fluorierten tumorassoziierten Kohlenhydratantigene hergestellt werden. Dies soll in Ergänzung zu den bereits bekannten Fluorderivaten des tumorassoziierten T-Antigens geschehen, die einen Fluorsubstituenten in der 6-, 6'- und 2'-Position enthalten.^[40,41,42] Bei den hier anvisierten Zielverbindungen soll zunächst der Einbau eines Fluorsubstituenten in die 3- und 4-Position bzw. eine Difluorierung der 6-Position des Galactosemoleküls vorgenommen werden. Die

erhaltenen Verbindungen sollen dann in die entsprechende Glycosyldonoren **1**, **2** und **3** als zentrale Synthesebausteine überführt werden und nach Ausarbeitung geeigneter Glycosylierungsmethoden den Aufbau der gewünschten T-Antigen-Analoga **4**, **5** und **6** ermöglichen. (Abb. 2.1)

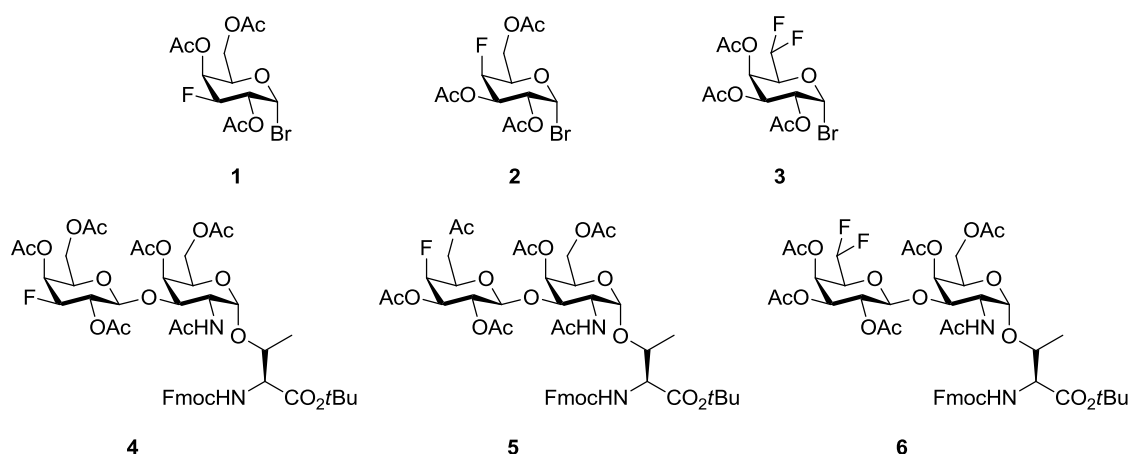


Abb. 2.1: Wichtige fluorierte Zielstrukturen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung eines in der 6-Position difluorierten Analogons des T_N-Antigens **8**. Hierzu soll neben einer Syntheseroute, bei der die Fluorsubstituenten bereits zu einem frühen Zeitpunkt durch Verwendung eines difluorierten Galactosyldonors eingebaut werden, auch die Einführung der Fluoratome an einem bereits bestehenden T_N-Antigenvorläufer untersucht werden. (Abb. 2.2)

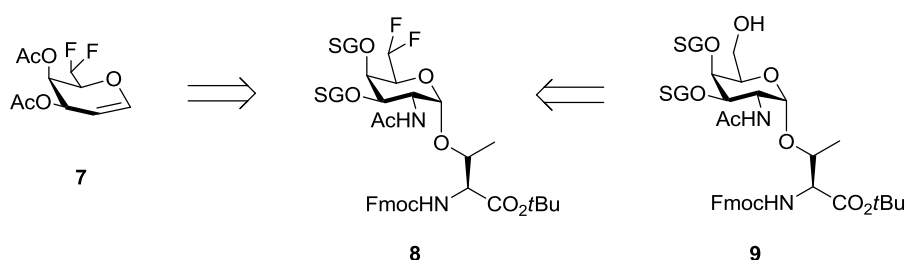


Abb. 2.2: Synthesestrategie zur Darstellung eines difluorierten T_N-Antigen-Analogons

Die Schwierigkeit beim Aufbau der fluorierten Antigene besteht zum einen in der selektiven Einführung des Fluorsubstituenten, und zum anderen in der Wahl eines geeigneten Schutzgruppenmusters, das den späteren Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese erlaubt.

Mit Hilfe der Festphasenglycopeptidsynthese sollen die erhaltenen fluorierten T-Antigen-Analoga in die aus 20 Aminosäuren bestehende Sequenz der MUC1-Wiederholungseinheit eingebaut werden, wobei die Glycosylaminosäure nicht in der immundominanten Domäne

PDTRP enthalten sein soll.^[32] Um eine ausreichend starke Immunantwort induzieren zu können, muss das Glycopeptid noch zusätzlich mit sog. „Immunostimulanzien“ kovalent verknüpft werden. Dies liegt an der Tatsache, dass es sich bei tumorassoziierten Antigenen um Selbst-Antigene handelt, die vom Immunsystem als körpereigene Strukturen erkannt werden und daher nicht zu einer Immunantwort führen. Erst durch die Anbindung von immunogenen Carrier-Proteinen, T-Helferzell-Peptidepitopen oder Mitogenen kann eine ausreichend starke Immunreaktion ausgelöst werden.^[60]

Daher sollen die fluoridierten Glycopeptide über einen nicht immunogenen Spacer mit Rinderserumalbumin (BSA) oder Tetanus-Toxoid (TTox) verknüpft werden (Abb. 2.3), wobei der Abstandhalter neben der selektiven Anbindung auch die Aufgabe hat, die gegenseitige Beeinflussung der Zellepitope von Antigen und Carrier zu minimieren. Die anschließende immunologische Evaluierung der synthetisierten Antitumorimpfstoffe soll in Kooperation mit Prof. Dr. E. Schmitt am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz erfolgen. Hierbei kann in Experimenten mit dem Serum bereits immunisierter Mäuse die Anwendbarkeit der synthetisierten Vakzinkandidaten genauer untersucht werden.

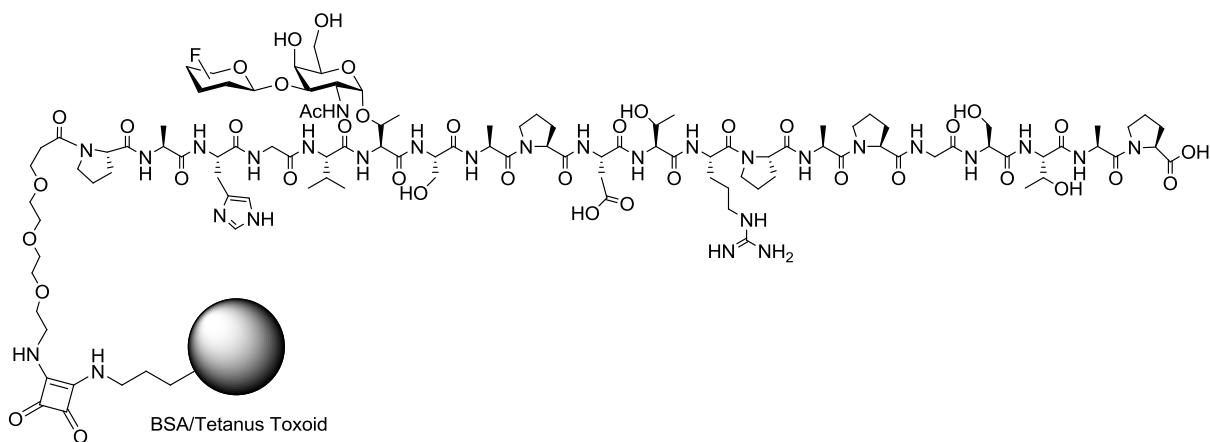


Abb. 2.3: Zielstruktur der vorliegenden Arbeit

Um die metabolische Stabilität der fluoridierten Antigenanaloga genauer untersuchen zu können, sollen des Weiteren Abbaustudien mit einer kommerziell erhältlichen β -Galactosidase durchgeführt werden. Das Ziel ist hierbei eine Aussage zur Abbaugeschwindigkeit der fluoridierten Antigene im Vergleich zur natürlichen Struktur zu erhalten. (Abb. 2.4)

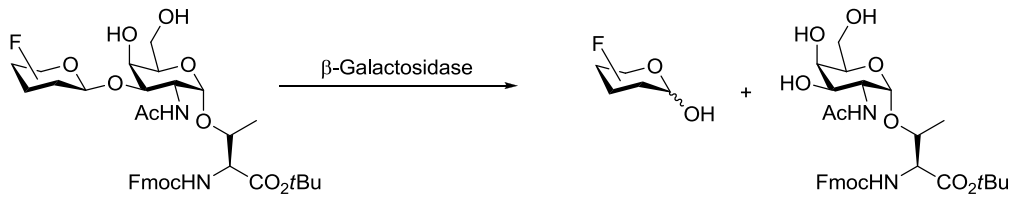


Abb. 2.4: Enzymatischer Abbau der fluorierten T-Antigene durch eine β -Galactosidase

3. Allgemeiner Teil

Fluorierte tumorassoziierte Kohlenhydratantigen-Analoga bieten sich aus den einleitend diskutierten Gründen als geeignete Vertreter zur Entwicklung von neuartigen tumorselektiven Vakzinen an. Hierfür sprechen unter anderem die Immunogenität der modifizierten Strukturen und deren potentiell erhöhte metabolische Stabilitäten.

3.1 Synthese von 3'- bzw. 4'-F-T-Antigen-Analoga

Wie bereits erwähnt wurde, stellt das TF-Antigen (Thomson-Friedenreich-Antigen, oder auch T-Antigen) einen wichtigen Vertreter der tumorassoziierten MUC1-Antigene dar. Im Gegensatz zur Biosynthese,^[20] bei der, wie einleitend beschrieben, zunächst die Peptidsequenz aufgebaut wird und anschließend im *Golgi*-Apparat die Glycosylierung erfolgt, muss bei einer organischen Totalsynthese solcher komplexer Strukturen die Glycosylierung zuvor an einer einzelnen Aminosäure, hier Threonin, stattfinden.^[61]

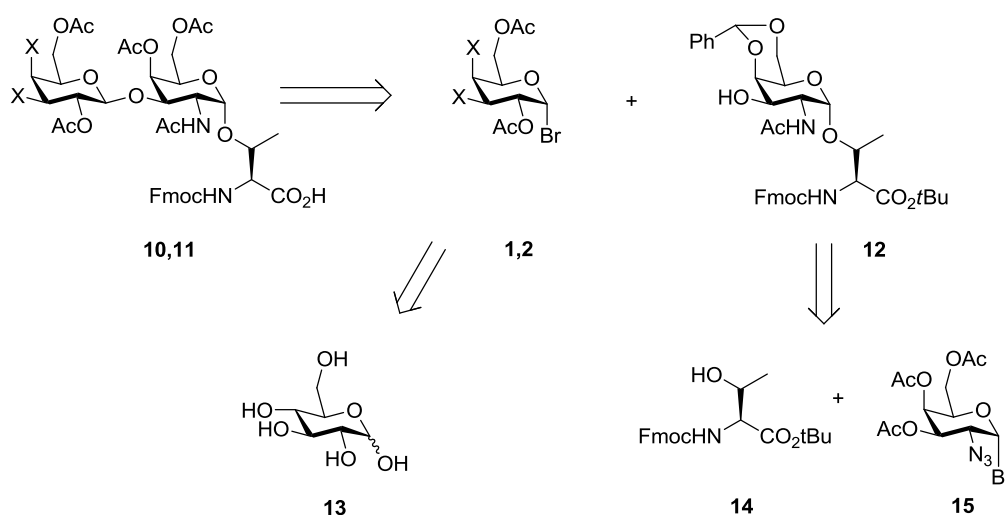


Abb. 3.1: Retrosynthetische Analyse der fluorinierten T-Antigene

Hierfür wird ein orthogonal geschütztes Threonin-Derivat **14** mit einem geeigneten Galactosamindonor **15** in einer Glycosylierungsreaktion umgesetzt. Des Weiteren wird zum Aufbau des T-Antigens ein Galactosyldonor **1,2** benötigt. Dieser wird in einer weiteren Glycosylierungsreaktion an das bereits bekannte T_N-Antigen **12**^[61] angebunden. Die beiden

fluorierten Galactosyldonoren lassen sich in einer divergenten Syntheseroute von Glucose ausgehend über mehrere Stufen darstellen. (Abb. 3.1)

3.1.1 Synthese des 3'-F-T-Antigens

Versuche zur direkten Fluorierung des Galactals

Zur Herstellung des in 3-Position fluorierten Antigens **19**, wurde zunächst versucht, den Fluorsubstituenten auf der Stufe des Galactals **18** einzuführen. Zu diesem Zweck wurde das 4,6 Di-*O*-acetyl-D-galal **17** benötigt, welches ausgehend von 3,4,6-Tri-*O*-galactal **16** in drei Stufen dargestellt werden kann.^[62]

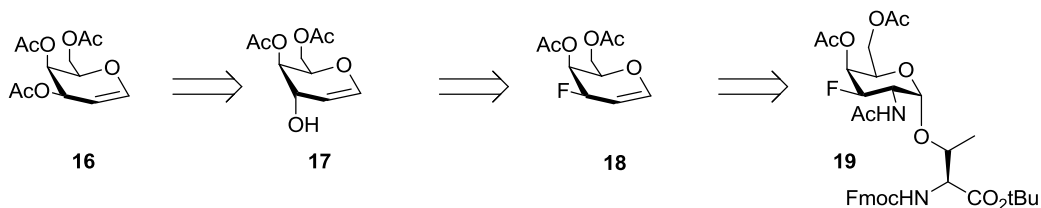


Abb. 3.2: Synthese des 3F-T_N-Antigens **19** ausgehend von Galactal **16**

Ausgehend von Galactose **20** wurde das peracetylierte Galactal **16** hergestellt.^[63] Hierzu wurde nach erfolgter Peracetylierung mit Essigsäureanhydrid (Ac₂O) in Pyridin durch die Umsetzung mit HBr (33%ig) in Eisessig das anomere Bromid erzeugt, welches in einer reduktiven Eliminierung mit Hilfe von aktiviertem Zink und Imidazol in das gewünschte Produkt überführt werden konnte.^[64]

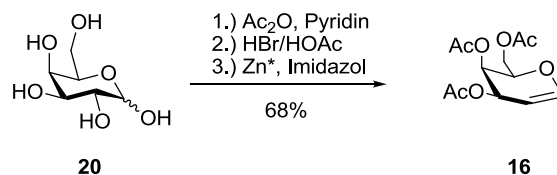


Abb. 3.3: Darstellung des peracetylierten Galactals **16**

In der darauffolgenden Synthesesequenz wurde das Ausgangsmaterial **16** zunächst mit Thiophenol und SnCl₄ bei -60 °C umgesetzt und so in einer S_N'-artigen Ferrier-Reaktion das Thioglycosid **21** aufgebaut. Hierbei koordiniert die Lewis-Säure an den Sauerstoff des Acetyl-Substituenten in der 3-Position und ermöglicht so dessen Austritt als Abgangsgruppe.^[65,66] Es

wurde unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet, da die Anwesenheit von Protonensäuren in einer Addition der Säure an die Doppelbindung (**22**) resultieren würde. (Abb. 3.4)

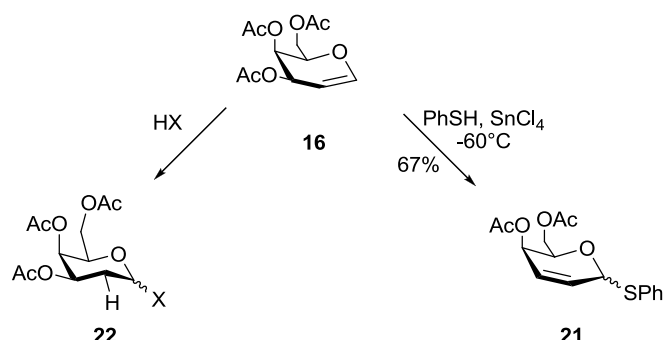


Abb. 3.4: Ferrier-Reaktion im Vergleich zur Protonensäureaddition

Im nächsten Schritt wurde das Thioglycosid **21** durch den Einsatz von *m*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) zunächst zum Sulfoxid **22** oxidiert, welches anschließend in Gegenwart von Piperidin in einer Allyl-Sulfoxid-Umlagerung zum gewünschten Gulalderivat **17** reagiert.^[67,68] Durch Zugabe von Piperidin als thiophiles Reagenz wird der intermediär gebildete Sulfensäureester **23** an der schwächsten Bindung, der S-O-Bindung, gespalten und das Produkt **17** wurde in 62% erhalten.

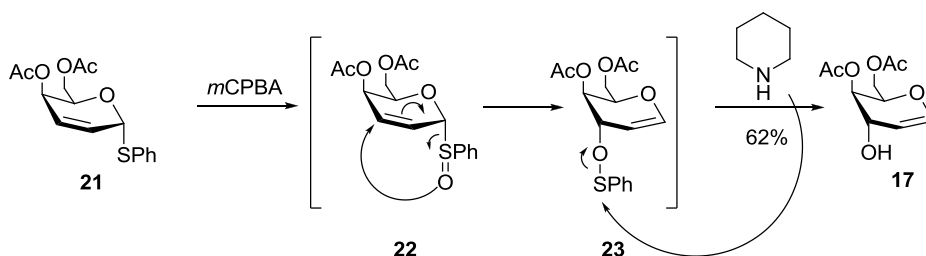


Abb. 3.5: Allylsulfoxid-Umlagerung zum Gulalderivat **17**

Da die [2,3]-sigmatrope Umlagerung ausschließlich aus der α -anomeren Position des Enantiomerengemisches erfolgt, jedoch **21** als Anomerengemisch eingesetzt wurde, erklärt dies die mäßige Ausbeute dieser Umsetzung.

Nach erfolgreicher Synthese des Gulals **17** konnten nun erste Versuche zur Fluorierung unternommen werden. Als Fluorierungsreagenz sollte *N,N*-Diethylaminoschwefeltrifluorid^[46] (DAST[®]) verwendet werden, da es sich in einer Reihe von analogen Fluorierungsreaktionen bereits erfolgreich bewährt hatte.^[43,69]

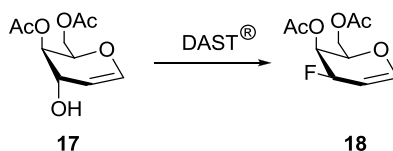


Abb. 3.6: Versuch der direkten Fluorierung des Gulals 17

Mechanistisch lässt sich die Fluorierung mittels DAST[®] als ein nucleophiler Angriff eines in situ erzeugten Fluoridions an den Kohlenstoff der Hydroxyfunktion beschreiben.^[64] Hierbei kommt es zu einer Inversion der Konfiguration am Substitutionszentrum, weshalb zur Erzeugung einer 3F-Galactose-Einheit ein Gulalvorläufer eingesetzt werden muss. (Abb. 3.7)

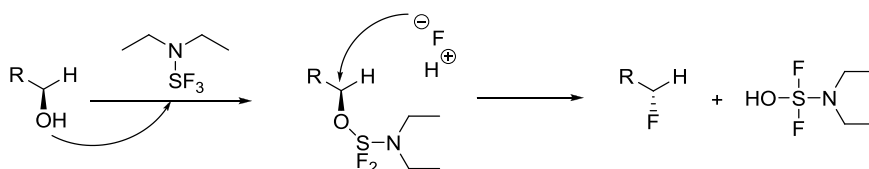


Abb. 3.7: Mechanismus der DAST[®]-Fluorierung

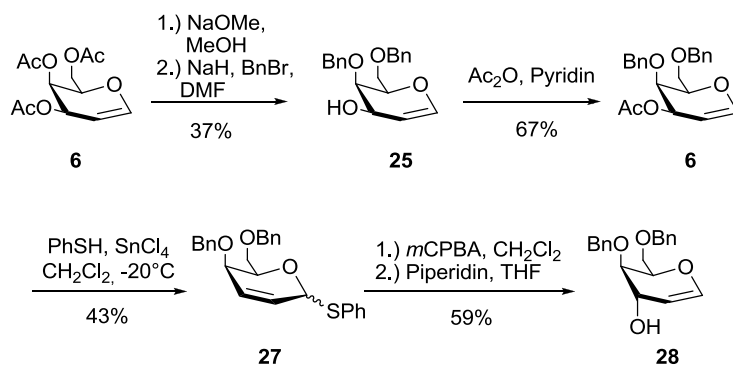
Zunächst wurde die Reaktion bei einer Temperatur von -60 °C durchgeführt, was allerdings zu keinem Umsatz führte. Auch ein Erwärmen auf Raumtemperatur bzw. Erhitzen in Dichlormethan unter Rückfluss führte zu keiner nennenswerten Produktbildung (vgl. Tab. 3.1). Ein Wechsel zu Toluol als Lösungsmittel und einer Reaktionsführung bei 80 °C verlief ebenfalls erfolglos. Zudem wurde unter diesen Bedingungen sowie in Gegenwart von Collidin als HF-Fänger eine allmähliche Zersetzung des Eduktes mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob mit einer besseren Energieübertragung die Produktbildung nicht dennoch begünstigt werden kann, wurden weitere Versuche unter Mikrowelleneinstrahlung durchgeführt. Hierbei wurde wiederum zunächst CH_2Cl_2 als Lösungsmittel verwendet, wobei die Reaktionslösung in einem abgeschlossenen Reaktionsgefäß während 60 Minuten auf 80 °C erhitzt wurde. Da auch unter diesen Bedingungen lediglich Zersetzungsprodukte resultierten, wurde anschließend die zugesetzte Base variiert. Allerdings führte in beiden mikrowellenunterstützten Reaktionen,^[42] sowohl die Verwendung von CH_2Cl_2 bei 80 °C , als auch NEt_3 in einem 3:1-Gemisch aus Toluol und CH_2Cl_2 bei 100 °C zu keiner Produktbildung, sondern zu einer nahezu vollständigen Zersetzung des Eduktes. (Tab. 3.1)

Reagenzien	Bedingungen	Ausbeute
DAST, CH ₂ Cl ₂	-60 °C bis Raumtemperatur	kein Produkt
DAST, CH ₂ Cl ₂	-40 °C bis 40 °C	kein Produkt
DAST, Toluol	80 °C	Zersetzung
DAST, Collidin, Toluol	80 °C	Zersetzung
DAST, Collidin, CH ₂ Cl ₂	MW, 100W, 80 °C, 60 min.	Zersetzung
DAST, DMAP, CH ₂ Cl ₂	MW, 100W, 80 °C, 60 min.	Zersetzung
DAST, NEt ₃ , Toluol/CH ₂ Cl ₂ 3:1	MW, 100W, 100 °C, 60 min.	Zersetzung

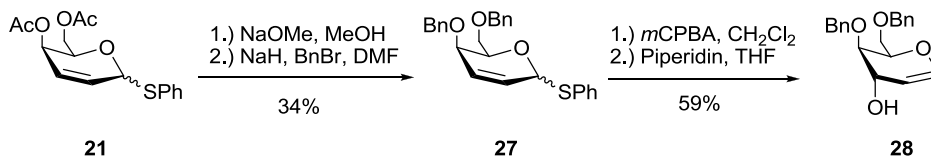
Tab. 3.1: Versuche zur Fluorierung des Gulals 17

Um zu untersuchen, ob das Schutzgruppenmuster die Reaktionsträgheit des Edukts bedingt, sollten die Acetylschutzgruppen gegen Benzylether ausgetauscht werden. So konnten in verwandten Fluorierungsreaktionen Isopropyliden-Schutzgruppen erfolgreich für den Aufbau der Fluorzucker eingesetzt werden, da diese nicht elektronenziehend wirken und somit das Substrat auch nicht für die Substitutionsreaktion desaktivieren.^[42]

Zunächst konnte ausgehend von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-galactal **16** nach Deblockierung aller Alkoholfunktionen in einer Zemplén-Umesterung^[76] unter Verwendung von NaOMe in MeOH das vollständig deblockierte Galactal **24**^[70] erhalten werden. In einer selektiven Benzylierungsreaktion mit Hilfe von NaH und Benzylbromid konnte dieses dann in das erwünschte Produkt **25** überführt werden.^[71] Hierbei gilt allerdings zu bemerken, dass die Ausbeute mit lediglich 37% recht gering ausfiel, was womöglich auf eine ungenügende Differenzierung der beiden sekundären Alkoholfunktionen zurückzuführen ist. Nachdem der gewünschte Alkohol **25** erhalten werden konnte, wurde die verbliebende 3-OH-Funktion durch Reaktion mit Ac₂O in Pyridin als Acetat blockiert und das Galactalderivat **26** wurde erneut in einer bereits beschriebenen Ferrier-Reaktion mit Thiophenol umgesetzt. Die darauffolgende Oxidation zum entsprechenden Sulfoxid mit anschließender Umlagerung lieferte in einer Ausbeute von 59% das für die Fluorierung benötigte Gulalderivat **28**. (Abb. 3.8)

Abb. 3.8: Erster Syntheseweg zur Darstellung von 4,6-Di-O-benzyl-gulal **28**

Aufgrund der insgesamt nur mäßigen Ausbeute wurde nach einer alternativen Syntheseroute gesucht, die das gewünschte Produkt in einer kürzeren Sequenz und mit besseren Ausbeuten liefern sollte. Ausgehend von Thioacetal **21** konnte nach Schutzgruppenmanipulation die entsprechende benzylierte Verbindung **27** erhalten werden,^[72,73] die mit Hilfe der bereits vorgestellten Reaktionssequenz aus Oxidation und [2,3]-sigmatroper Umlagerung in das gewünschte Gulal-Derivat **28** überführt wurde. (Abb. 3.9)

Abb. 3.9: Alternative Syntheseroute zur Darstellung von 4,6-Di-O-benzyl-gulal **28**

Trotz der relativ schlecht verlaufenden Deacetylierung konnte so die Gesamtausbeute an 4,6-Di-O-benzylgulal **28** von 6% auf 20% erhöht werden.

Leider verliefen die Versuche zur Fluorierung des Gulals **28** unter den verschiedensten Reaktionsbedingungen erneut erfolglos. (Tab. 3.2)

Reagenzien	Bedingungen	Ausbeute
DAST, CH ₂ Cl ₂	0 °C bis 40 °C	kein Produkt
DAST, Toluol	80 °C	Zersetzung
DAST, Collidin	80 °C	Zersetzung
DAST, Collidin	MW, 100W, 80 °C	Zersetzung
DAST, DMAP	MW, 100W, 80 °C	Zersetzung
DAST, NEt ₃	MW, 100W, 100 °C	Zersetzung

Tab. 3.2: Bedingungen der Fluorierung des Gulal **28**

Synthese der 3-F-Galactose über ein Gulonolacton

Da alle Versuche einer direkten Fluorierung verschiedener Gulal-Derivate fehlschlagen, musste nach einer geeigneten Alternative gesucht werden, um die Einführung des Fluor-Substituenten an C-3 des Galactoserestes zu erreichen. Naheliegend, jedoch weniger elegant, ist der frühe Einbau des Fluorsubstituenten vor der Bildung des Glycals, d.h. auf der Stufe eines Galactose-Vorläufers, was im Vergleich zur direkten Route eine deutlich größere Anzahl an Transformationen und Reinigungsschritte bedeutet. Der große Vorteil dieser Syntheseroute ist jedoch, dass man mit Hilfe eines gemeinsamen Vorläufers, dem in 3-Position fluorierten, anomeren Bromid **1**, in einer divergenten Synthese sowohl die Darstellung des T_N-Analogons als auch des fluorierten T-Antigens verfolgen kann. (Abb. 3.10)

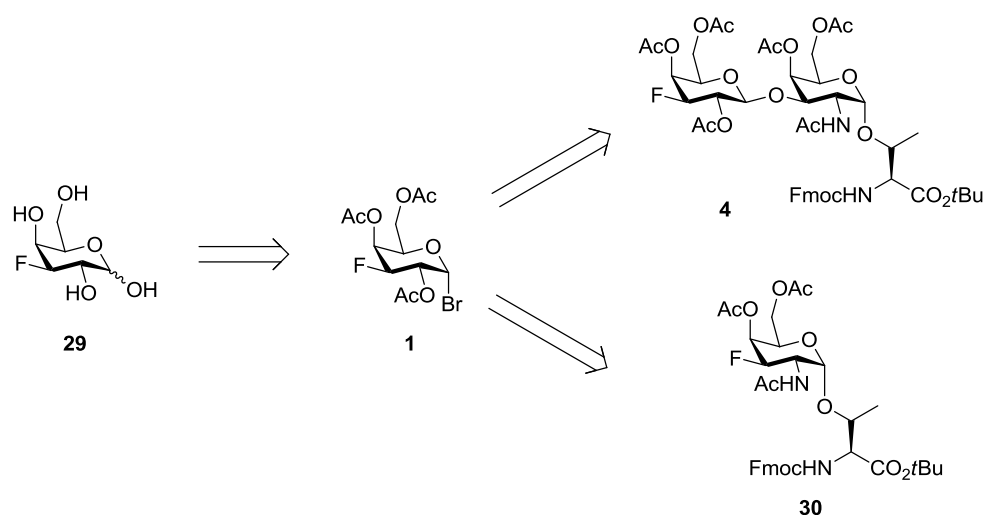


Abb. 3.10: Divergente Synthesestrategie durch frühe Einführung des Fluor-Substituenten

Um die Einführung des Fluor-Substituenten in die 3-Position eines Galactose-Bausteins mit Hilfe einer nucleophilen Fluorierung erreichen zu können, muss wiederum ein geeigneter Gulose-Vorläufer eingesetzt werden, der ausgehend von D-Gulono-1,4-lacton **31** synthetisiert wurde. Reduktion mit NaBH₄ überführte zunächst die Ketofunktion in einen Alkohol der nach Gleichgewichtseinstellung unter den gewählten Reaktionsbedingungen hauptsächlich in der Pyranoseform **32** vorlag.^[74] Durch die anschließende Umsetzung mit Ac₂O in Pyridin wurde somit ein vollständig blockiertes Gulosederivat erhalten, welches in einer Reaktion mit HBr in Eisessig zum anomeren Gulosylbromid **33** reagierte. (Abb. 3.11)

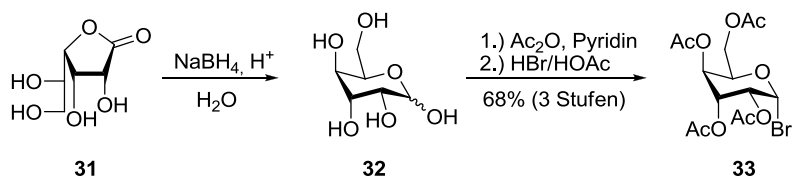


Abb. 3.11: Synthese des anomeren Gulosylbromids 33

Letzteres wurde nun in einer Glycosylierungsreaktion nach *Helperich*^[75] mit Allylalkohol als Akzeptor und $\text{Hg}(\text{CN})_2$ bzw. dem etwas besser löslichen HgBr_2 als Promotoren umgesetzt. Aufgrund der Nachbargruppenbeteiligung des Acetylsubstituenten in der 2-Position konnte bei dieser Glycosylierungsreaktion das reine β -konfigurierte Produkt **34** in einer guten Ausbeute von 72% erhalten werden. In der nachfolgenden Deacetylierung nach *Zemplén*^[76] und Umsetzung mit Benzaldehyddimethylacetal in Gegenwart katalytischer Mengen an *para*-Toluolsulfonsäure bildete sich bei 50 °C das 4,6-*O*-Benzylidenacetal **35** der Gulose, das in einer Ausbeute von 49% über diese beiden Stufen isoliert werden konnte. Um die Synthese zu vervollständigen, musste in einem letzten Schritt die selektive Blockierung der reaktiveren 2-Hydroxyfunktion erfolgen, die durch Umsetzung des Diols **35** mit Benzoylchlorid in CH_2Cl_2 und Pyridin in einer Ausbeute von 63% gelang.^[77] Die zweifach benzylierte Verbindung konnte hingegen lediglich in geringen Spuren nachgewiesen werden.

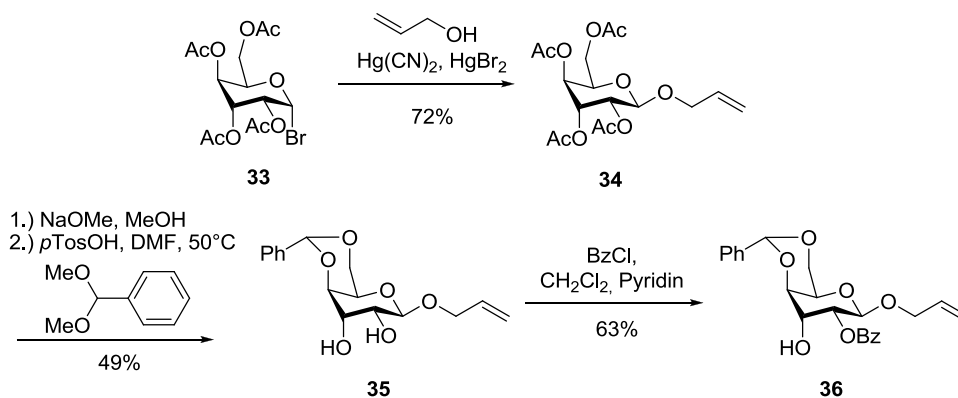


Abb. 3.12: Darstellung des Gulose-Vorläufers 36 für die anschließende Fluorierungsreaktion

Nachdem die Synthese des orthogonal blockierten Gulosederivats **36** erfolgreich durchgeführt werden konnte, sollte nun in einer DAST-vermittelten nucleophilen Substitutionsreaktion ein Fluoratom eingeführt werden.^[43,46] In einem ersten Versuch wurde das Edukt in CH_2Cl_2 vorgelegt und tropfenweise mit DAST[®] versetzt. Bei dieser Reaktionsführung konnte durch Dünnschichtchromatographie auch nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden keinerlei Produktbildung festgestellt werden; nur das Startmaterial konnte unverändert nachgewiesen

werden. Daher wurde in einem weiteren Versuch das Edukt in Gegenwart von Pyridin in Toluol vorgelegt und DAST[®] langsam bei -30°C zugetropft. Nach Erwärmen der Reaktionslösung auf Raumtemperatur über Nacht konnte ein Produkt isoliert werden, das sich nach genauerer Analyse mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie als das Eliminierungsprodukt **38** erwies. (Abb. 3.13)

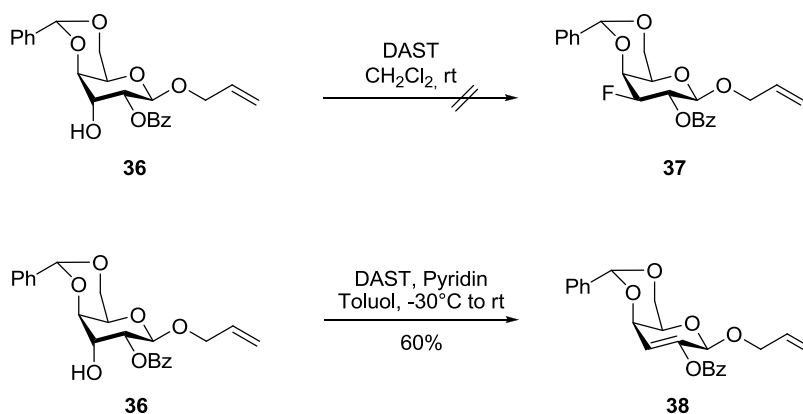


Abb. 3.13: Versuche zur Fluorierung der Gulose **36** mit DAST

Bei näherer Betrachtung dieser Reaktion ist die Eliminierung aus zwei Gesichtspunkten nicht unerwartet. Zunächst wird das Proton in 2-Position durch den elektronenziehenden Benzoyl-Substituenten acidifiziert, was eine Eliminierung nach einem E2-Mechanismus mit sich führt. In Abb. 3.14 ist ein möglicher Mechanismus der beobachteten Eliminierungsreaktion aufgezeigt.

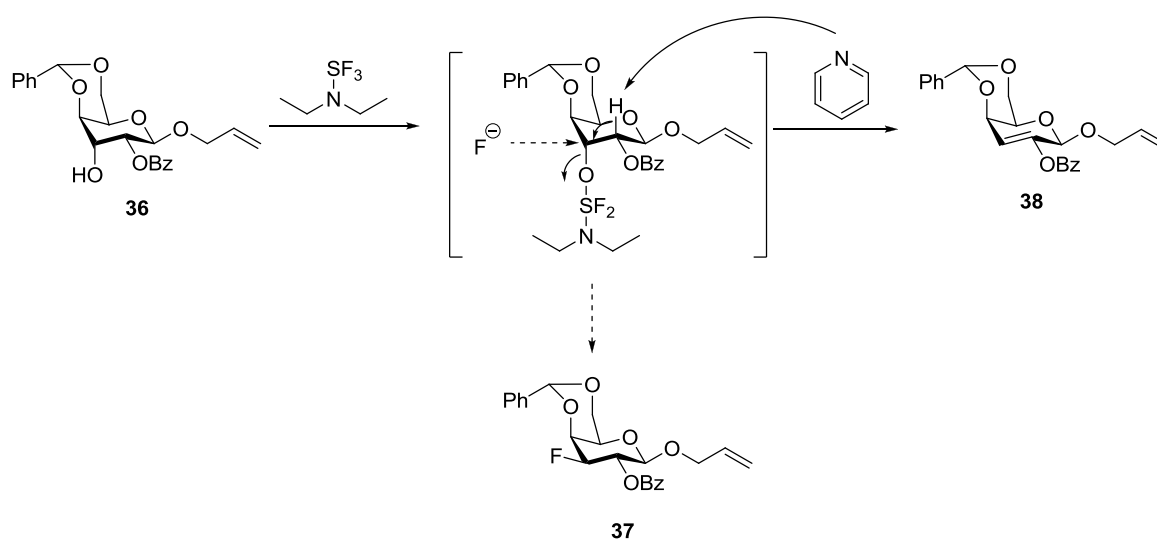


Abb. 3.14: Möglicher Mechanismus der beobachteten Eliminierungsreaktion

Zunächst kommt es zu einem Angriff des Alkohols auf die SF₃-Gruppe des Fluorierungsreagenzes. Nach Substitution eines Fluoratoms sollte in einer normal ablaufenden Substitution nun das eben erzeugte Fluorid-Anion das Kohlenstoffatom des ehemaligen Alkohols angreifen und unter Inversion das gewünschte Produkt bilden. Hier scheint allerdings der Angriff des Fluorids langsamer zu sein als die entsprechende Eliminierung. Daher kann Pyridin das β-ständige Wasserstoffatom angreifen und der nun in eine bessere Austrittsgruppe umgewandelte Alkohol eliminiert unter Ausbildung der Doppelbindung. Darüber hinaus ist die Eliminierung durch die antiperiplanare Anordnung des zu abstrahierenden Protons und der Austrittsgruppe stark begünstigt, da es zu einer idealen Orbitalwechselwirkung zwischen dem σ-Orbital der C-H-Bindung an Position 2 und dem σ*-Orbital der C-O-Bindung des Alkohols kommen kann.^[78] Diese Reaktionsweise konnte unter anderem an einem Glucosamin-Derivat beobachtet werden, welches nach Umsetzung mit DAST[®] lediglich das Eliminierungsprodukt lieferte.^[79] (Abb. 3.15)

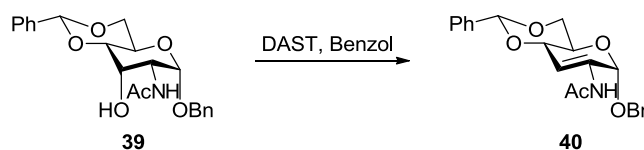


Abb. 3.15: Eliminierungsreaktion bei einer versuchten DAST-vermittelten Fluorierung

Auch beim Einsatz von TBAF als Fluorierungsreagenz konnte eine unerwünschte Eliminierungsreaktion bei diversen Substraten und in verschiedenen Positionen des Kohlenhydratgerüsts beobachtet werden.^[80]

Nachdem es bisher unter Verwendung von DAST[®] nicht gelang, das gewünschte Fluorierungsprodukt **37** zu synthetisieren, sollte in einem weiteren Versuch der Alkohol **36** zunächst in den Aktivester **41** überführt werden. Dadurch sollte die Position 3 selektiv für die anschließende Substitutionsreaktion aktiviert werden. Auf die Ester der Sulfonsäure als Abgangsgruppe wird häufig zurückgegriffen, da sie besonders gute nucleofuge Eigenschaften aufweisen.^[81] Hier sollte die Austrittstendenz zusätzlich durch die Anwesenheit des elektronenziehenden Heterozyklus erhöht sein. Weiterhin gilt zu erwähnen, dass die *N*-Imidazol-1-sulfonyl-Gruppierung während der Substitutionsreaktion in Imidazol und Schwefeltrioxid zerfällt, was das Gleichgewicht vollständig auf die Seite des Produkts verschiebt. Eine entsprechende Fluorierung über den Sulfonylester der Isopropylidenacetalgeschützten Glucofuranose wurde auf diese Weise bereits in guten Ausbeuten beschrieben.^[81]

Um diese Reaktion auf das vorliegende Substrat **36** zu übertragen, wurde zunächst der sekundäre Alkohol mit Sulfurylchlorid und Imidazol bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in den Sulfonylaktivester **41** überführt und ohne Reinigung direkt in einer Fluorierungsreaktion mit Hilfe von Tetrabutylammoniumfluorid eingesetzt. Bei dieser Reaktion in einem Gemisch aus THF und CH_2Cl_2 konnte allerdings keine Produktbildung festgestellt werden. (Abb. 3.16)

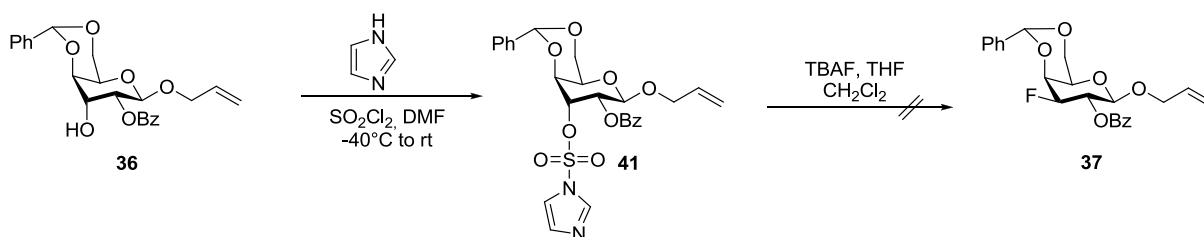


Abb. 3.16: Versuch der Fluorierung mittels Imidazolsulfonylester **41**

Obwohl es durch die geschickte Wahl des Schutzgruppenmusters möglich war, ein geeignetes Gulosederivat für die anschließende Fluorierungsreaktion zu synthetisieren, gelang letztere allerdings weder mit DAST noch unter Einsatz eines Imidazolsulfonylaktivesters. Da auch die Kosten für das benötigte Edukt, D-gulono-1,4-lacton **31**, relativ hoch waren, wurde auf eine weitere Ausarbeitung von geeigneten Fluorierungsbedingungen für dieses Substrat verzichtet.

Synthese der 3-F-Galactose ausgehend von Glucose

Eine weitere Möglichkeit, den zentralen 3F-Galactalbaustein **29** zu erhalten, sollte von der wesentlich kostengünstigeren Glucose **13** aus erfolgen. (siehe Abb. 3.10) Dazu muss jedoch das Stereozentrum in 3-Position zunächst invertiert werden, um die benötigte Konfiguration an C3 bei der nucleophilen Substitution durch Fluor zu erhalten. Des Weiteren gilt es, die Stereochemie der Alkoholfunktion in 4-Position zu invertieren. Hieraus ergeben sich zwei Möglichkeiten: Entweder erfolgt zunächst die Inversion der 3- und 4-Position zu einem Gulosederivat **32**, oder es wird erst die 3-Position invertiert, so dass die Fluorierung an einer Allose **42** erfolgt, die schließlich in den gewünschten Galactosebaustein überführt wird. (Abb. 3.17)

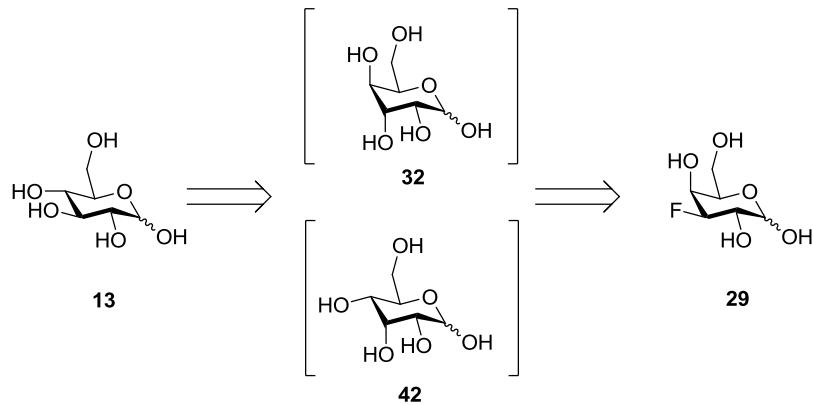


Abb. 3.17: Mögliche Zwischenstufen bei der Synthese der 3-F-Galactose 28 ausgehend von Glucose 13

Bei der hier gewählten Route, die in Anlehnung an die Synthese von *Brimacomb* et al.^[82] erfolgt, kommt es zu einer simultanen Inversion der beiden Stereozentren in 3- und 4-Position der Glucofuranose **43**, woraus ein Gulosederivat **44** resultiert, welches im Anschluss in einer nucleophilen Fluorierung zur fluorierten Galactose **45** umgesetzt werden soll.

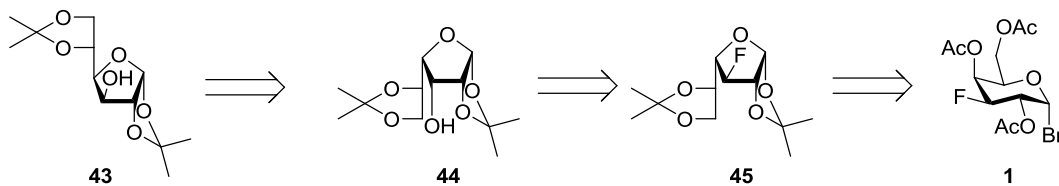


Abb. 3.18: Überblick über die Synthese des 3-F-Galactosebausteins 1 ausgehend von Glucofuranose 43

Hierzu wurde zunächst wasserfreie Glucose **13** mit Aceton und konzentrierter Schwefelsäure zur 1,2;5,6-Di-*O*-isopropyliden-glucofuranose **43** umgesetzt.^[83] Dabei darf die Innentemperatur des Reaktionskolbens zu keiner Zeit einen Wert von 10 °C überschreiten, da sonst die Gleichgewichtseinstellung zwischen Furanose- und Pyranoseform in Richtung letzterer verschoben würde. In einer darauffolgenden Oxidation der resultierenden Hydroxyfunktion in 3-Position durch Pyridiniumdichromat (PDC)^[84] konnte das entsprechende Keton **46** erhalten werden. Dieses wurde ohne Reinigung direkt durch Erhitzen in wässriger Diethylether-Lösung in das korrespondierende Hydrat **47** überführt,^[85,86] bevor in einer β -Eliminierungsreaktion mit Ac_2O in Pyridin das Enolacetat **48** erhalten werden konnte.^[87] (Abb. 3.19)

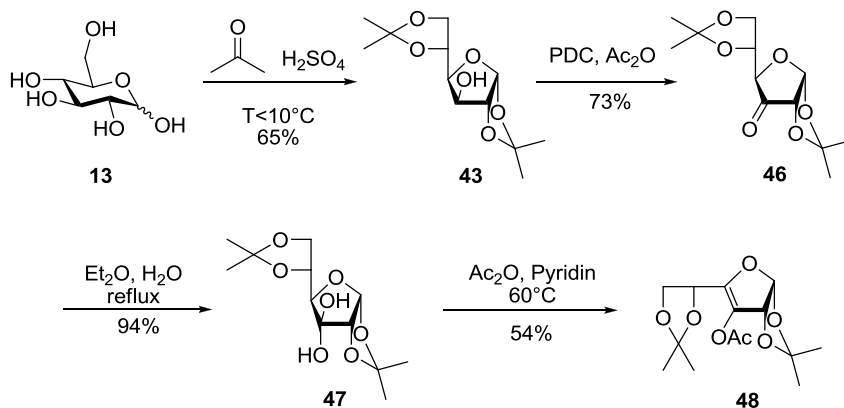


Abb. 3.19: Synthese des Enolacetats **48** ausgehend von D-Glucose **13**

Die anschließende Inversion der beiden Stereozentren in Position 3 und 4 erfolgte in einer Palladium-katalysierten Hydrierung der Doppelbindung des Enolacetats, die selektiv von der Oberseite des Moleküls ablief und so zur Bildung der 1,2;5,6-Di-*O*-Isopropyliden-3-*O*-acetylgulofuranose **49** in einer Ausbeute von 82% führte. (Abb. 3.20) Die Selektivität dieser Reaktion lässt sich sehr anschaulich an Hand der sperrigen 1,2-Di-*O*-Isopropylidengruppe erklären, die eine Annäherung des Katalysators von der Unterseite erschwert. Die ebenfalls in der Literatur beschriebene Reduktion des Enolacetats mit anschließender Reduktion des Esters mit NaBH_4 ^[87] lieferte im Gegensatz dazu das gewünschte Produkt nur in einer Ausbeute von 15%. Nach Deblockierung^[85,87] wurde der Vorläufer der Fluorierungsreaktion in einer Ausbeute von 19% über sechs Stufen ausgehend von Glucose und unter Inversion zweier Stereozentren erhalten. (Abb. 3.20)

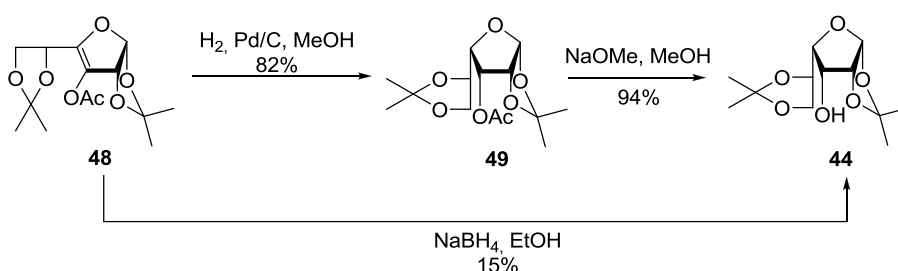


Abb. 3.20: Synthese des Fluorierungsvorläufers 1,2;5,6-Di-*O*-Isopropyliden-gulofuranose **44**

Bei der folgenden DAST-vermittelten nucleophilen Fluorierungsreaktion^[46] von **44** in Gegenwart von Dimethylaminopyridin (DMAP) konnte das gewünschte Produkt **45** nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden bei Raumtemperatur in einer Ausbeute von 78% erhalten werden.^[82,88] Eine in diesem Zusammenhang in der Literatur häufig beobachtete Eliminierung zur 1,2;5,6-Di-*O*-isopropyliden-erythro-hex-3-enofuranose **50**, die insbesondere bei der

Verwendung von TBAF als Fluorierungsreagenz auftrat, wurde nicht beobachtet.^[82] (Abb. 3.21)

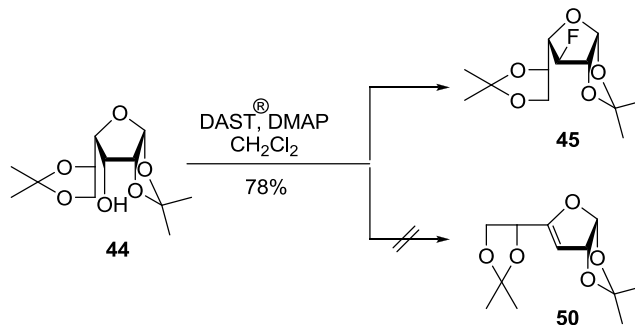


Abb. 3.21: Reaktion zur gewünschten 3-F-Galactofuranose **45** ohne Nebenproduktbildung **50**

Im nächsten Schritt sollte nun die Furanoseform in eine Pyranose umgewandelt werden, wozu der Fluorzucker **45** in einer Wasser/Ethanol-Mischung unter Zugabe von saurem Ionentauscher drei Tage lang auf 65 °C erhitzt wurde.^[87,88] Hierbei kam es zur Abspaltung der Isopropylidengruppen und Freisetzung der deblockierten 3-Desoxy-3-Fluor-galactopyranose **29**, die zur weiteren Verwendung mit Ac₂O in Pyridin peracetyliert wurde.^[87,88] (Abb. 3.22)

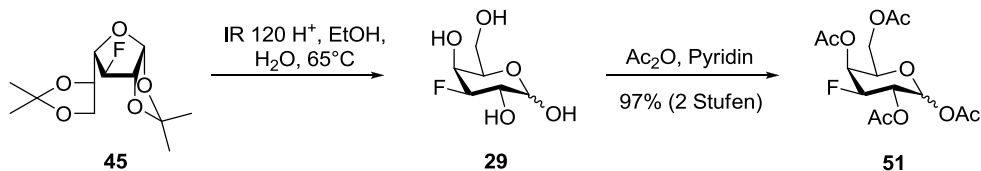


Abb. 3.22: Darstellung der peracetylierten 3-Fluor-Galactopyranose **51**

Für die nachfolgende Glycosylierungsreaktion nach *Helperich*^[75] wurde das Bromid Ac₃FGalBr **1** als Donor hergestellt, (Abb. 3.23) da sich diese Donoren in früheren Umsetzungen zum Aufbau von TF-Antigen-Analoga bewährt hatten, während 3F-Trichloracetimidate zu deutlich schlechteren Ausbeuten führten.^[89,90]

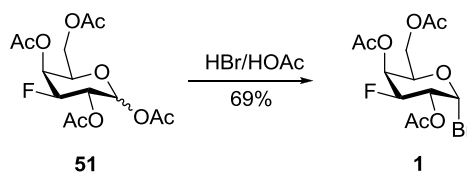


Abb. 3.23: Darstellung des anomeren Bromids **1**

Zur Herstellung des Glycosylbromids **1** wurde die peracetylierte Verbindung **51** vorgelegt und unter Eiskühlung langsam mit HBr in Eisessig (33 Gew.%) versetzt.^[90,91] Obwohl noch nicht sämtliches Startmaterial umgesetzt war, wurde die Reaktion nach 18 Stunden Rührens bei Raumtemperatur abgebrochen und das gewünschte Produkt wurde in 69% Ausbeute isoliert. Letztere konnte auch bei längerer Reaktionsdauer nicht verbessert werden, da hierbei allmählich Hydrolyse eintritt, wie anhand von ESI-Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnte. Bei genauerer Untersuchung des verbliebenen Edukts zeigte sich anhand des ¹H-NMR-Spektrums, dass nur das reaktivere β -Acetat unter den Reaktionsbedingungen umgesetzt wurde. (Abb. 3.24)

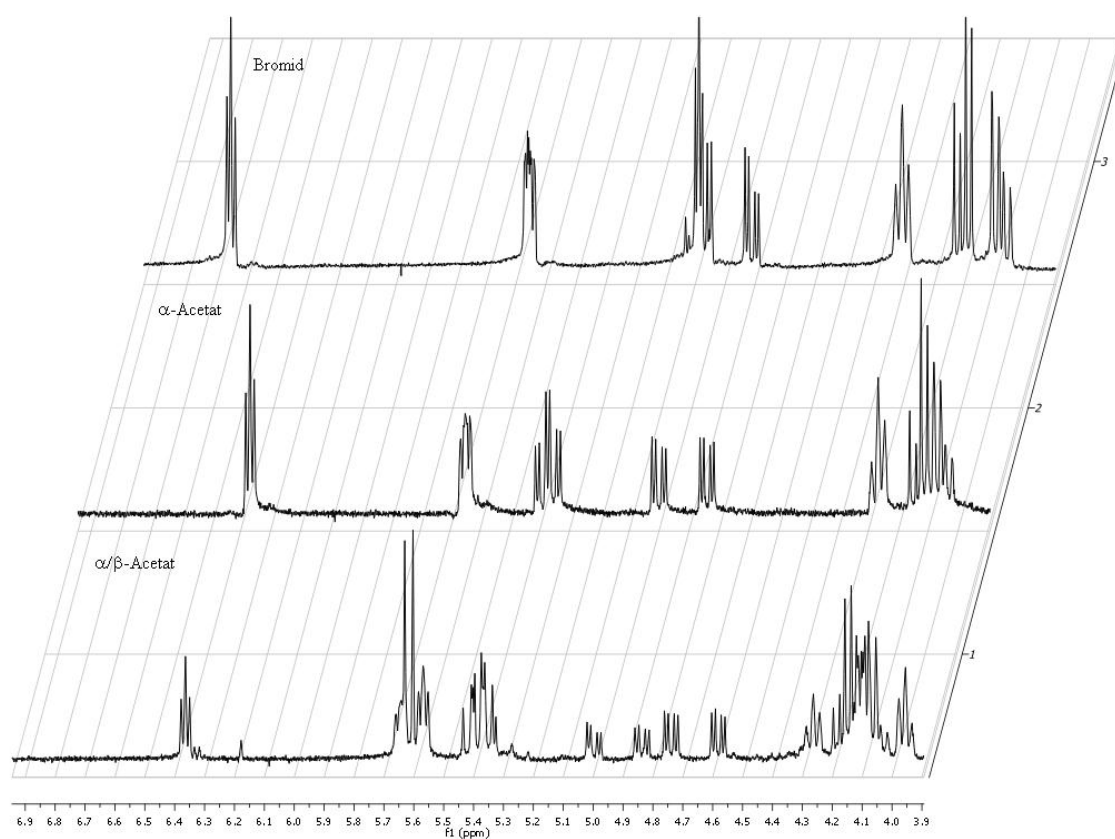


Abb. 3.24: Vergleich der ¹H-NMR-Spektren des fluorierten Bromids, α -Acetats und α/β -Acetats

In Abb. 3.24 sind die jeweiligen ¹H-NMR-Spektren des 3F-Bromids, des α -Acetats und des Anomerengemisches aus α - und β -Acetat dargestellt. Bei genauerer Betrachtung des Spektrums des Anomerengemisches fällt zunächst das Signal bei 6.4 ppm auf, bei dem es sich um das 1-H Proton des α -konfigurierten Acetats handelt, das eine axiale Kopplungskonstante von 4.31 Hz des anomeren Protons zum benachbarten 2-H aufweist.

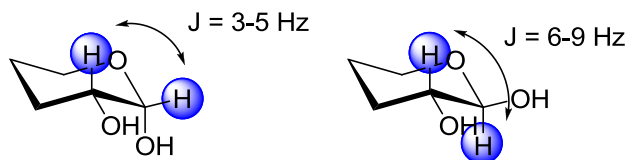


Abb. 3.25: Vergleich der Kopplungskonstanten der α - und β -Konfiguration am Kohlenhydrat

Die im Regelfall erwartete Multiplizität des anomeren Protons, die eine Aufspaltung zu einem Dublett bedingt, wird hier von der Kopplung des Protons zum Fluorsubstituenten überlagert. Da die Kopplungskonstante zum Fluor annähernd identisch mit der des anomeren Protons zum 2-H ist, nimmt das 1-H-Signal die Gestalt eines *pseudo*-Tripletts an. Des Weiteren fällt ein recht intensives Dublett bei etwa 5.6 ppm ins Auge. Hierbei handelt es sich um das Signal des β -konfigurierten Acetats, das eine Kopplungskonstante von 8.22 Hz zum benachbarten 2-H aufweist. Das Spektrum des Bromids zeigt ebenfalls eine relativ kleine Kopplungskonstante von 4.12 Hz (6.7 ppm) und weist auf die α -Konfiguration am anomeren Zentrum hin. Betrachtet man nun das bei der Reaktion zurückgebliebene Edukt (mittleres Spektrum), fällt im Vergleich zum Spektrum des eingesetzten Edukts sofort auf, dass es sich nicht mehr um ein Anomerengemisch handelt, sondern lediglich um das α -Anomer des Acetats, was wiederum durch die Kopplungskonstante des 1-H-Protons ($J = 4.23$ Hz, 6.4 ppm) zum Nachbarproton belegt werden kann. Dieser Wert ist sehr gut vergleichbar mit der aus dem Anomerengemisch ermittelten Kopplungskonstanten von 4.31 Hz.

Die mangelnde Reaktivität des α -anomeren Acetats lässt sich durch den elektronenziehenden und damit desaktivierenden Einfluss des Fluoratoms und den anomeren Effekt erklären. In cyclischen, sesselförmigen Kohlenhydraten nehmen Substituenten in der Regel die äquatoriale, thermodynamisch günstigere Position ein. Am anomeren Zentrum hingegen findet man elektronegative Substituenten in einer axialen Position. Der Grund hierfür liegt im sog. Anomeren Effekt, welcher nach *Lemieux* in der Dipol-Dipol-Wechselwirkung der anomerbenachbarten Gruppen liegt. Einer der beiden Dipole wird durch die freien Elektronenpaare des Ringsauerstoffs erzeugt, während der andere Dipol entlang der, durch den elektronegativen Substituenten polarisierten Bindung zwischen anomeren Kohlenstoffatom und dem Substituenten zeigt. In der β -Konfiguration zeigen beide Dipole in die gleiche Richtung, und verstärken somit die Polarisierung des Moleküls. Demgegenüber neutralisieren sich die beiden Dipole teilweise in der α -Konfiguration, so dass diese Konfiguration elektrostatisch begünstigt ist. (Abb. 3.26)



Abb. 3.26: Darstellung der am anomeren Effekt beteiligten Dipole

Der Anomere Effekt lässt sich auch auf stereoelektronische Effekte zurückzuführen, wobei die Überlappung eines freien Elektronenpaars des O-Atoms mit dem antindenden σ^* -Orbital der C-Br-Bindung betrachtet wird. Die axiale Koordination des Substituenten wird nun dadurch erzwungen, dass diese Hyperkonjugation, d. h. die π -O \rightarrow σ^* -Delokalisierung der nichtbindenden Elektronen, über eine antiperiplanare Anordnung der beteiligten Orbitale optimal erfolgen kann.^[64]

Der Energieunterschied der beiden anomeren Acetate kann daher zur Erklärung der beobachteten Substratselektivität in der Bromierungsreaktion herangezogen werden. Das energetisch günstigere α -Anomer wird durch die desaktivierende Eigenschaft des Fluorsubstituenten in seiner Reaktivität soweit herabgesetzt, dass es unter den vorliegenden Bedingungen nicht reagieren kann. Das β -Anomer hingegen, energetisch höher liegend, kann die Reaktion zum Bromid eingehen. Die erhaltene Ausbeute von 69% spiegelt das Anomerenverhältnis des eingesetzten Edukts in etwa wieder, wodurch diese Beobachtung untermauert werden kann.

Um auch das α -Anomer umsetzen zu können, wäre beispielsweise eine in situ-Anomerisierung des Eduktes denkbar, bei der es ständig zu einer Gleichgewichtseinstellung zwischen den beiden Anomeren kommt. Das β -Anomer könnte in der Reaktion umgesetzt werden und wird selbst wieder unter Säureeinwirkung aus dem unreaktiven α -Anomer nachgebildet. Allerdings konnte durch die weitere Zugabe von HBr in Eisessig und eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 40 °C keine verbesserte Ausbeute erreicht werden, sondern es wurde lediglich eine beschleunigte Bildung des Hydrolyseproduktes beobachtet. Alternativ könnte auch die Acetylierung der vollständig deblockierten Verbindung **29** unter Verwendung von NaOAc^[92] durchgeführt werden, wobei vornehmlich das β -Anomer entsteht, welches dann vollständig mit HBr abreagieren könnte.

Daneben ist noch zu erwähnen, dass das α -Bromid eine recht geringe Lebensdauer besitzt. Beispielsweise sind bei -20 °C bereits nach 2-3 Wochen eindeutige Spuren von (säurekatalysierter) Zersetzung zu erkennen und der formals farblose Feststoff nimmt dann eine bräunlich-schwarze Farbe an.

In einer anschließenden reduktiven Eliminierung mit aktiviertem Zinkstaub^[93] konnte das anomere Bromid **1** in das fluorierte Galactalderivat **18** überführt werden. (Abb. 3.27) Auch dieses Produkt weist eine relativ geringe Stabilität auf, weshalb bereits nach wenigen Stunden in deuteriertem Chloroform Zersetzung auftritt. Verwendet man als Lösungsmittel Chloroform, welches über basischem Aluminiumoxid gelagert wurde, tritt diese Zersetzung erst mit einer Verzögerung ein, was auf einen säurekatalysierten Prozess hindeutet.

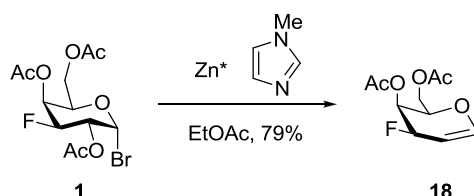


Abb. 3.27: Reduktive Eliminierung zum 3-Desoxy-3-fluor-4,6-di-O-acetylgalactal **18**

Aus Zeitgründen konnte die weitere Reaktion des fluorierten Galactals **18** zum Azidonitrat bzw. Azidobromid mit anschließender Glycosylierung nicht durchgeführt werden, zumal bei der Azidonitratisierungsreaktion, bei der sich ein stark saurer pH-Wert ergibt, aufgrund der eben beschriebenen Säurelabilität mit Problemen gerechnet werden kann.

Nachdem nun der Einbau des Fluorsubstituenten in der 3-Position der Galactose unter Erhalt der benötigten Konfiguration durchführbar war, konnte in der weiterfolgenden Synthese mit dem Aufbau des auf Zelloberflächen maligner Zellen auftretenden T-Antigens fortgeföhren werden. Hierbei soll das eben beschriebene fluorierte Galactose-Derivat **1** in einer Glycosylierungsreaktion als Donor zum Einsatz kommen.

Synthese des 3'-F-T-Antigens

Für die Darstellung des fluorierten T-Antigen-Analogons werden zunächst ein orthogonal geschütztes Threonin-Derivat **14** und als Akzeptor 2-Desoxy-2-azido-4,6-di-O-benzylidengalactopyranose **15** benötigt, welche ausgehend von Threonin **52** bzw. Galactose **20** in mehreren Schritten zugänglich sind.^[94,95,96] (Abb. 3.28)

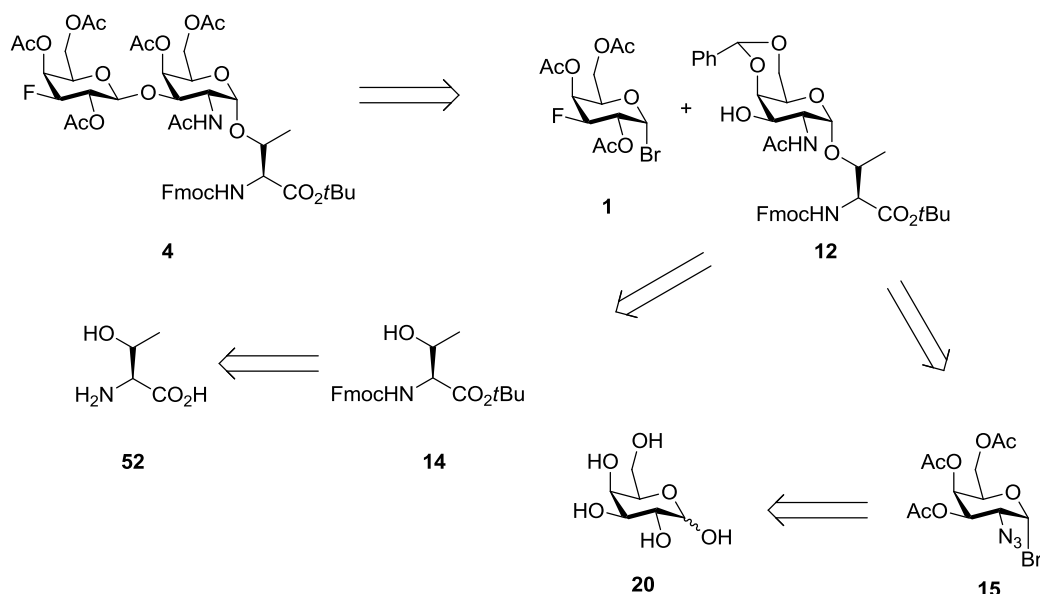


Abb. 3.28: Retrosynthese des fluorierten T-Antigens 4

Die Synthese des T_N-Akzeptors **12** muss so erfolgen, dass die Glycosylierungsreaktion unter Erhalt des Schutzgruppenmusters möglich ist.^[95,97] Dies kann durch den Einsatz der Fmoc-Schutzgruppe für die Aminofunktion und über eine Blockierung der Säuregruppe als *tert*-Butylester geschehen. Zur Einführung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das freie Amin mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-succinimidcarbonats (Fmoc-Osu) in Gegenwart von NaHCO₃ in einem Gemisch aus Aceton und Wasser umgesetzt, während die Umsetzung zum *tert*-Butylester eine Aktivierung der Carbonsäure mit *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) unter Cu(I)-Katalyse und mit einem Überschuss an *tert*-Butanol erforderte.^[96,98,99] Die gewünschte orthogonal blockierte Verbindung **14** konnte so in einer Ausbeute von 37% erhalten werden. (Abb. 3.29)

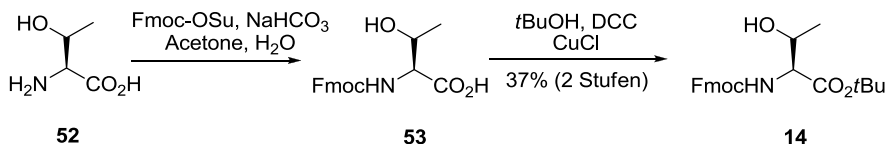


Abb. 3.29: Synthese des orthogonal blockierten Threonins 14

Eine genaue Kontrolle des Reaktionsverlaufes bei der Veresterung ist aufgrund des überschüssigen *tert*-Butanols notwendig, gestaltet sich jedoch schwierig und es tritt in nicht unerheblichem Maße die Veretherung der sekundären Alkoholfunktion als Nebenreaktion auf, wodurch die Gesamtausbeute drastisch reduziert wird.

Die Darstellung des Galactosaminyl-Donors **15** folgte ebenfalls einer literaturbekannten Route,^[96] bei der D-Galactose **20** in einer fünfstufigen Synthesesequenz zu 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-azido- α -D-galactopyranosylbromid **16** umgesetzt wird. Hierfür mussten zunächst die freien OH-Gruppen der D-Galactose mit Hilfe von Ac₂O und Pyridin in die entsprechenden Acetylgruppen umgewandelt werden. Anschließend wurde wie zuvor (siehe Abb. 3.23) durch Reaktion mit HBr in Eisessig das anomere Bromid **54** erzeugt, das aufgrund des anomeren Effekts selektiv in Form des α -konfigurierten Produkts entstand.^[64] Nach reduktiver Eliminierung mit aktiviertem Zink konnte so in einer Gesamtausbeute von 68% über drei Stufen der Galactal-Baustein **16** dargestellt werden.^[62,93,100]

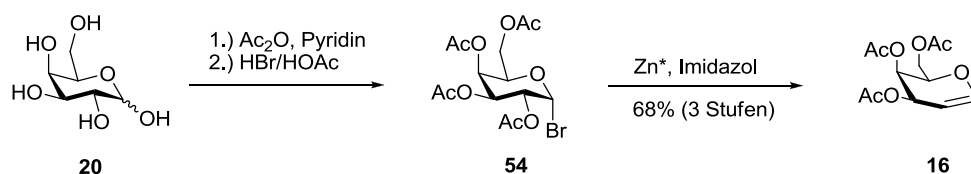


Abb. 3.30: Synthese des Galactals **16**

Letzterer wurde anschließend in einer Azidonitratisierung nach *Lemieux* umgesetzt.^[101] In dieser Reaktion werden mittels Cer(IV)ammoniumnitrat und Natriumazid eine Azid-Funktion in die 2-Position und eine Nitratgruppe an der anomeren Position des Pyranosering eingeführt, wobei das Produkt als Gemisch der beiden Anomere anfällt. (Abb. 3.31)

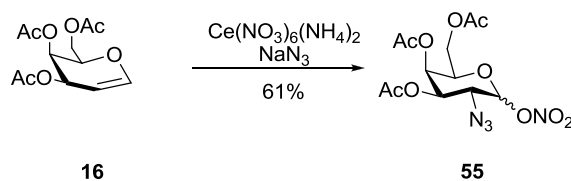


Abb. 3.31: Azidonitratisierung nach *Lemieux*^[101]

Die Bildung des Azidonitrats verläuft gemäß *Lemieux* wahrscheinlich nach einem radikalischen Mechanismus. Dabei wird zunächst durch das starke Oxidationsmittel Ce(IV) ein Elektron des Azids abstrahiert. Das resultierende Azidradikal wiederum ist in der Lage, die Doppelbindung des Galactals **16** anzugreifen und bildet ein radikalisches, cyclisches Zwischenprodukt aus. Dieses wird in einer erneuten Oxidationsreaktion durch Ce(IV) in ein Oxocarbeniumion überführt, welches im Anschluss vom nucleophilen Nitration an der anomeren Position angegriffen werden kann. Aufgrund des anomeren Effekts entsteht dabei zwar vermehrt das α -Anomer, doch ist die zu beobachtende Stereoselektivität der

Nitrataddition nicht vollständig. Für die weitere Reaktion des Azidonitrats **55** ist das Vorliegen eines Anomerengemisches aber nicht von Bedeutung. (Abb. 3.32)

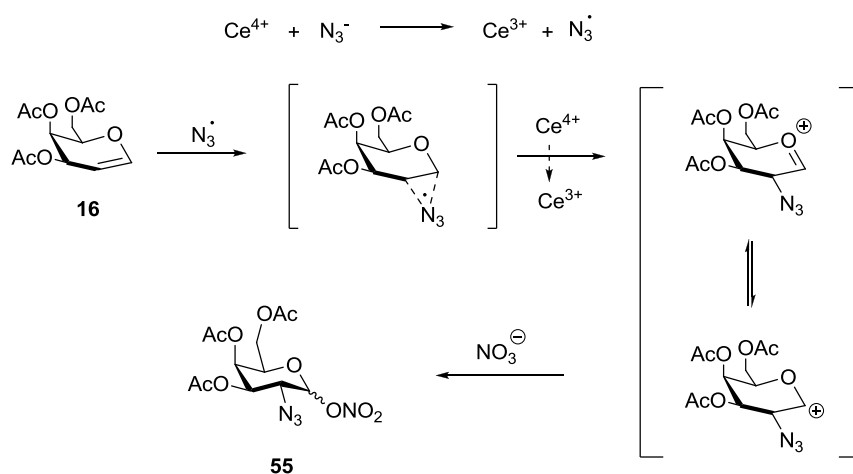


Abb. 3.32: postulierter Mechanismus der Azidonitratisierung nach *Lemieux*

Da bereits bekannt war, dass das Azidonitrat **55** leicht hydrolysiert,^[61,95] wurde es direkt in einer Reaktion mit wasserfreiem Lithiumbromid zum 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-azido- α -D-galactopyranosylbromid **15** umgesetzt. (Abb. 3.33)

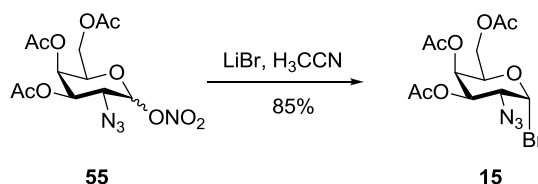


Abb. 3.33: Synthese des Galactosyldonors **15**

In der nachfolgenden Glycosylierungsreaktion, welche eine von *Paulsen* modifizierte Variante der *Königs-Knorr*-Glycosylierungsreaktion darstellt,^[102,103] wurde das Azidobromid **15** unter Aktivierung mit wasserfreiem Silbercarbonat und Silberperchlorat mit dem orthogonal blockierten Threonins-Derivat **14** umgesetzt. Nach einer bekannten Vorschrift^[104] wurden die Aminosäure und die Promotoren in einer Mischung aus Toluol und Dichlormethan über Molsieb vorgelegt und anschließend mit dem Donor versetzt. Obwohl auch hier der anomere Effekt wirkt und das Azid als benachbarte funktionelle Gruppe keinen β -dirigierenden Nachbargruppeneffekt aufweist, entsteht in geringen Mengen das β -Anomer, das sich durch Flashchromatographie nicht vollständig abtrennen lässt.^[61] Folglich wurde auf dieser Stufe das Anomerengemisch nicht weiter getrennt, sondern direkt in der nachfolgenden Synthese eingesetzt. (Abb. 3.34)

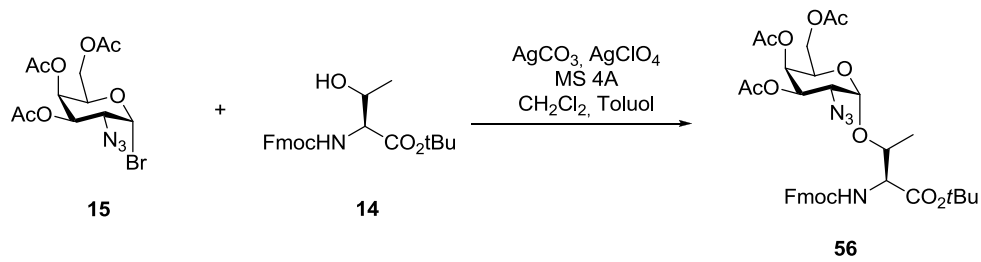


Abb. 3.34: Glycosylierung zum Fmoc-Thr(αAc₃GalN₃)-OtBu 56

Zur Reduktion des erhaltenen Azids **56** wurde Zinkpulver, das zuvor durch Behandlung mit CuSO₄ aktiviert wurde, eingesetzt. Dadurch konnte die Azid-Funktion reduziert werden, wobei die entstandene Aminofunktion bei gleichzeitiger Zugabe von Ac₂O in situ zum Acetamid **57** umgewandelt wurde.^[105] (Abb. 3.35)

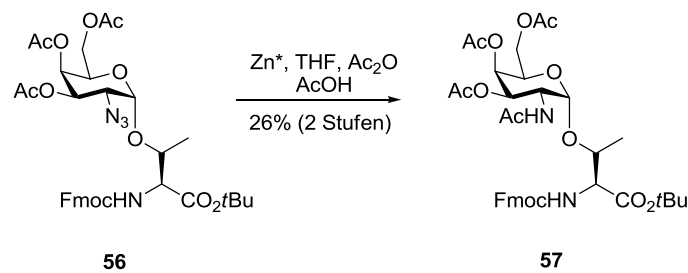


Abb. 3.35: Reduktive N-Acetylierung zum T_N-Antigen 57

Auf dieser Stufe gelang die Abtrennung des noch vorhandenen β-Anomers mittels Flashchromatographie und das reine α-konfigurierte T_N-Antigen-Derivat **57** konnte in einer Ausbeute von 26% isoliert werden.

Um **57** in einen geeigneten Akzeptorbaustein umzuwandeln, ist zunächst die Umesterung der vorhandenen Acetylschutzgruppen in 3-, 4- und 6-Position nach *Zemplén* nötig.^[76] Hierzu wurde **57** in Methanol so lange mit frisch hergestellter NaOMe-Lösung versetzt, bis sich ein pH-Wert von 8.5 – 9.0 einstellte. Während der Reaktion wurde der pH-Wert ständig kontrolliert und ggf. nachreguliert, wobei jedoch zu basische Bedingungen vermieden werden müssen, da es ansonsten zur Abspaltung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe kommen kann. Da ein teilweiser Verlust der Schutzgruppe jedoch meistens zu beobachten ist, wurde diese in einem zweiten Schritt unter Verwendung von Fmoc-OSu und DIPEA wieder installiert. (Abb. 3.36)

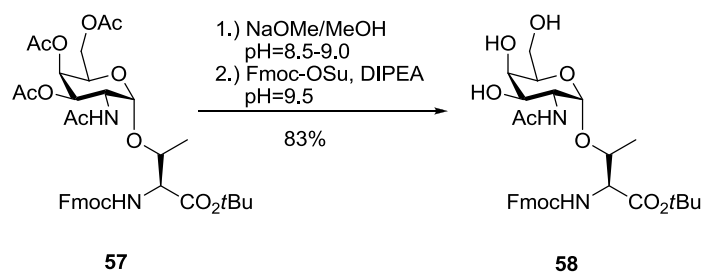
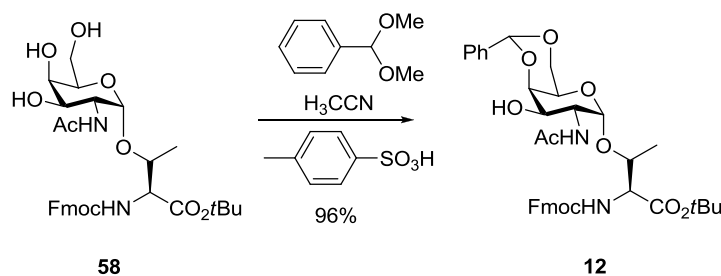


Abb. 3.36: Zemplén Umesterung

Um die Anbindung des Galactoserestes regioselektiv in der 3-Position zu gewährleisten,^[94] müssen die 4- und 6-Position des Triols **58** zunächst selektiv blockiert werden. Dies kann mit Hilfe von Benzylidendimethylacetal in Gegenwart katalytischer Mengen an *p*-Toluolsulfonsäure erfolgen,^[106] wobei der benötigte Glycosylakzeptor **12** in einer Ausbeute von 96% isoliert wurde.

Abb. 3.37: Synthese des Glycosylakzeptors **12**

In einem nächsten Schlüsselschritt sollte das fluorierte *Thomson-Friedenreich*-Antigen-Analogon **59** mit Hilfe einer *Helferich*-Glycosylierung^[75] aufgebaut werden, da sich diese Glycosylierungsreaktion bereits bei strukturell ähnlichen Substraten als erfolgreich erwiesen hatte^[41,42] und bei Verwendung des Bromids, welches auch für die Synthese des fluorierten Galactals **18** benötigt wurde, die Zahl der herzustellenden Vorläufermoleküle für die verschiedenen Antigenanaloge möglichst klein gehalten werden kann.

Unter Aktivierung des Donors durch Hg(CN)₂ konnte mit Hilfe einer konventionellen Reaktionsführung bei Raumtemperatur keine Produktbildung nachgewiesen werden. Lediglich die Hydrolyse des Donors war mittels Dünnschichtchromatographie festzustellen. Da allerdings die verminderte Reaktivität der fluorierten Glycosyldonoren bekannt ist, wurde ein in der Arbeitsgruppe entwickeltes, mikrowellengestütztes Protokoll eingesetzt.^[41,42] Nach drei Stunden bei 80 °C und einer Energieeinstrahlung von 100 Watt konnte das gewünschte fluorierte Disaccharid erstmals und in einer Ausbeute von 67% isoliert werden.

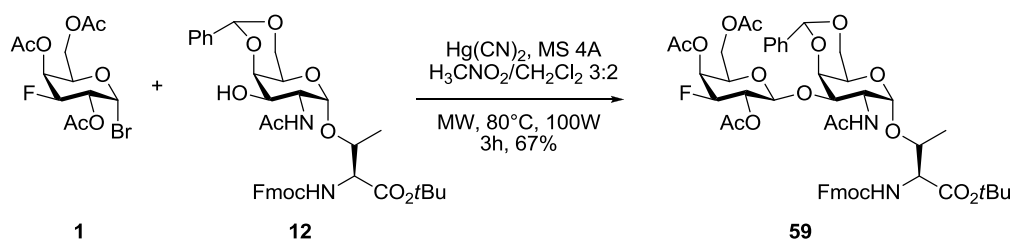


Abb. 3.38: Mikrowellenunterstützte Glycosylierung nach *Helferich* zu **59**

Aufgrund der Koordination der Acetylgruppe in 2-Position des Galactosylbromids **1** an das intermediär gebildete Carbeniumion (Nachbargruppeneffekt) erfolgt der Angriff des Nucleophils lediglich von der äquatorialen Seite aus und es wurde wie erwartet das β -konfigurierte Disaccharid isoliert. (Abb. 3.39)

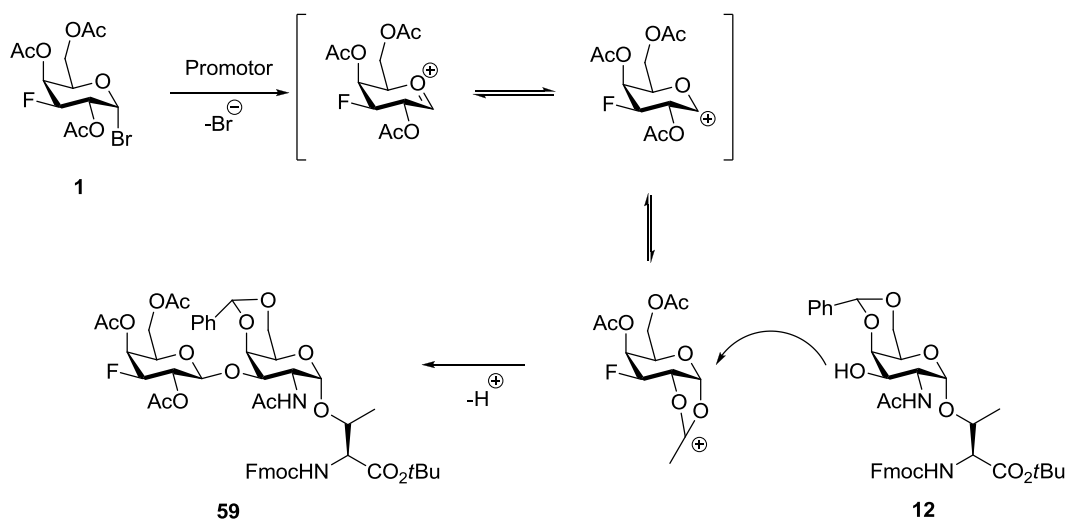


Abb. 3.39: Nachbargruppeneffekt der Acetylschutzgruppe bei der β -Glycosylierung zum T-Antigen **59**

Bei der genauen Charakterisierung des Disaccharids **59** konnten jedoch teilweise doppelte Signalsätze im ^1H -, ^{13}C -, und auch ^{19}F -NMR-Spektrum nachgewiesen werden. In Abb. 3.40 ist der aromatische Bereich des ^1H -NMR-Spektrums des Disaccharids **59** abgebildet, der bei den Signalen deutlich eine Schulter erkennen lässt. Beispielsweise tritt bei dem Dublett bei 7.60 ppm ein weiteres deutliches Signal auf, das zu tieferem Feld verschoben ist. Ähnliche zusätzliche Signale treten auch bei den restlichen Multipletts mehr oder weniger stark auf, wie beispielsweise bei dem Dublett bei 7.76 ppm, das lediglich eine leichte Schulter zu höherem Feld aufweist. Insgesamt ergibt jedoch erst die Integration über alle Signale die richtige Anzahl an Protonen.

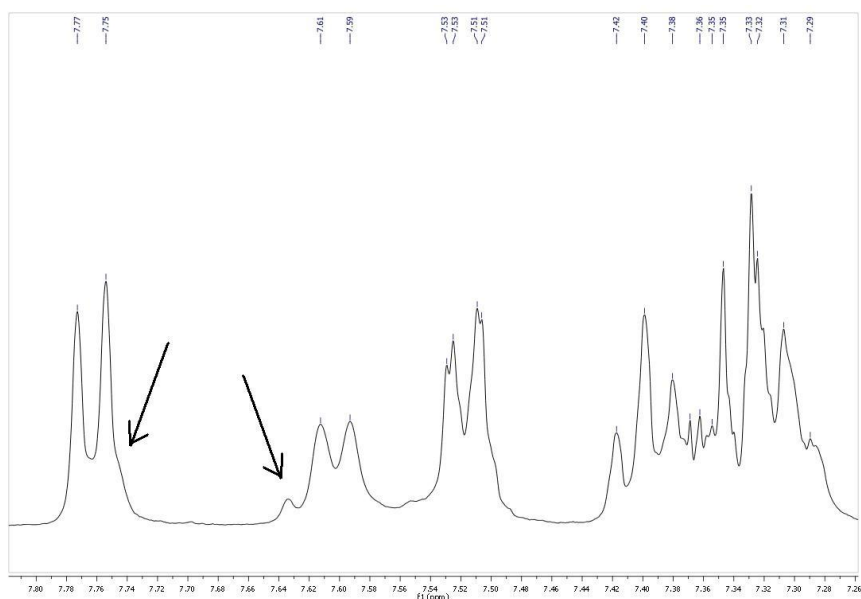
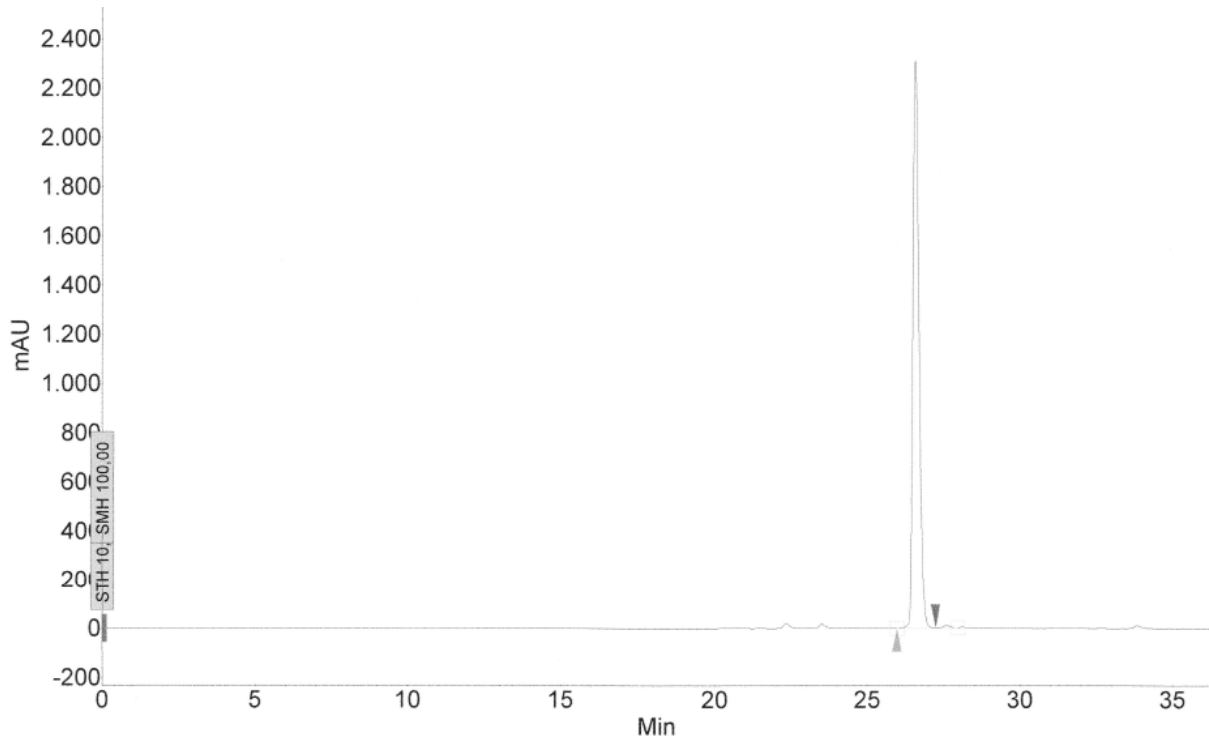
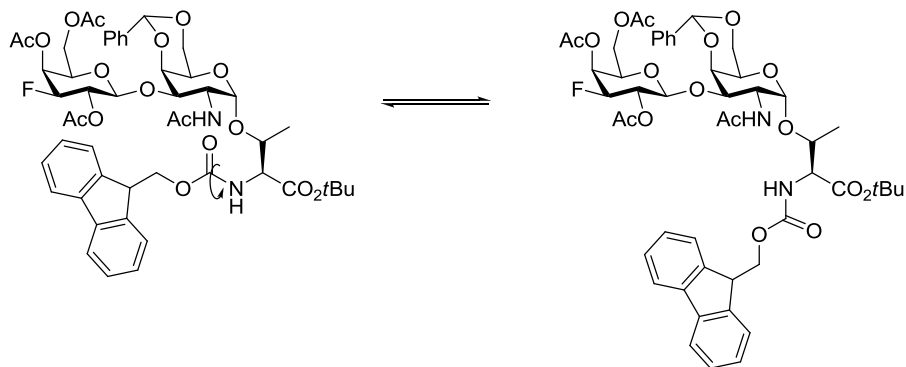


Abb. 3.40: Teilweise verdoppelte Signalsätze der Fmoc-Schutzgruppe im Disaccharid 59

Da die massenspektrometrische Analyse nur die Masse des gewünschten Produktes nachwies und somit ein Nebenprodukt als Verunreinigung ausgeschlossen werden konnte, wurde das Produkt per HPLC untersucht, um so die Anwesenheit von Anteilen des α -Anomers auszuschließen. Das in Abb. 3.41 gezeigte Chromatogramm des analytischen HPLC-Laufs zeigt jedoch eindeutig die Anwesenheit nur eines Produktes an. Aus früheren Arbeiten ist zudem bekannt, dass die anomeren Fluor-Disaccharide in der Regel ausreichend unterschiedliche Retentionszeiten besitzen, um voneinander getrennte Signale zu liefern.^[107] Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei den zusätzlichen NMR-Signalen um die von Rotameren handelt, die auf der eingeschränkten freien Drehbarkeit des Fmoc-Restes um die Carbamatgruppe beruhen. (Abb. 3.42)

Abb. 3.41: HPLC-Profil des fluorierten Disaccharids **59**Abb. 3.42: Rotamerenbildung der Fmoc-Schutzgruppe in **59**

Für den Einbau des erhaltenen fluorierten T-Antigens **59** in die MUC1-Peptidsequenz sind noch abschließende Schutzgruppenmanipulationen nötig, um den Glycosylaminosäurebaustein für die Festphasenpeptidsynthese gegen Acidolyse zu stabilisieren. Hierzu wurde zunächst in einer säurekatalysierten Reaktion mit aktiviertem Kieselgel ($\text{NaHSO}_4 \times \text{SiO}_2$)^[108] das Benzylidenacetal gespalten und die beiden Alkoholfunktionen des Galactosamin-Bausteins wieder freigesetzt. (Abb. 3.43)

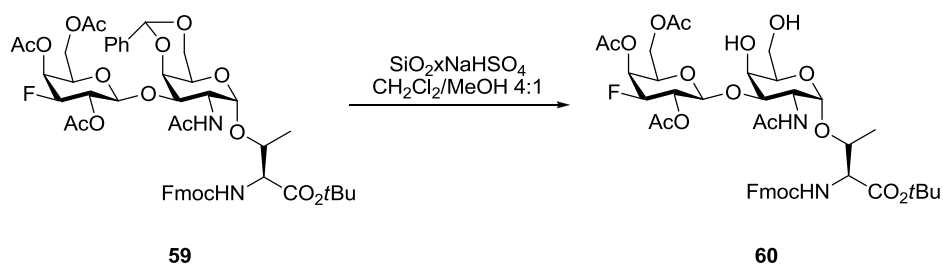


Abb. 3.43: Deblockierung der Alkohole des Galactosamin-Bausteins zum Diol 60

Der erhaltene Baustein **60** zeigte ebenfalls in den NMR-Spektren zusätzliche Signalsätze, die verschiedene Rotameren zugeschrieben werden und im Fall der ^{13}C -Resonanzen vor allem die Signale der Fmoc-Gruppe betreffen. (Abb. 3.44)

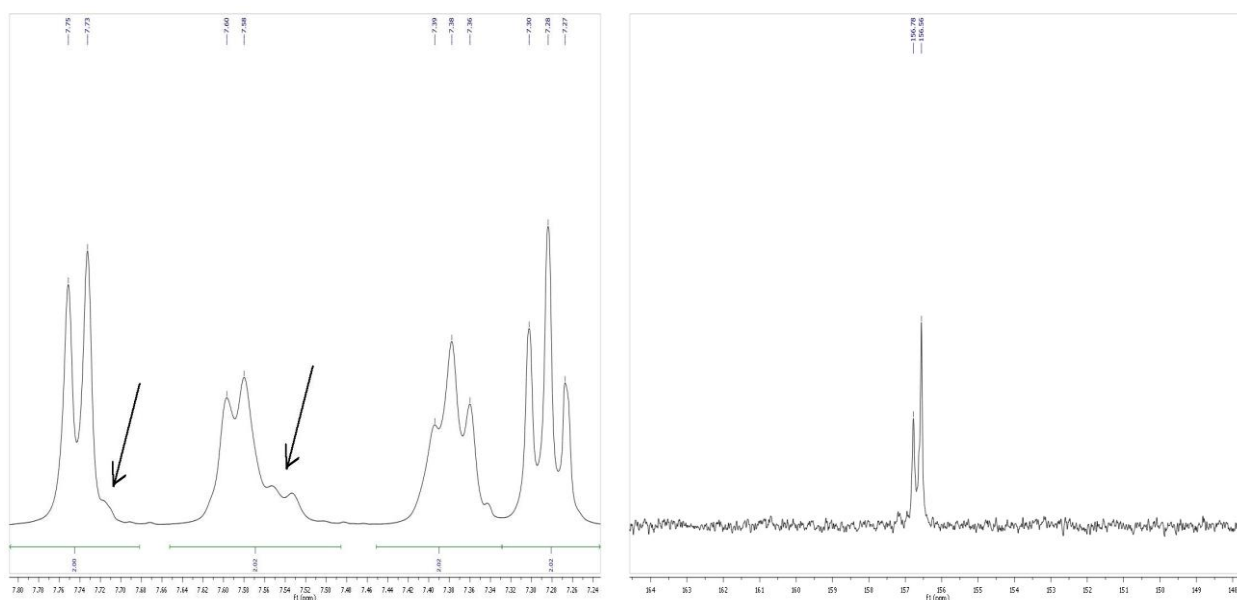


Abb. 3.44: Protonen-NMR-Spektrum (links) und Verdopplung des ^{13}C -Signals des C=O(Urethan) Kohlenstoffatoms (rechts) des Diols 60

Zum Schutz der beiden freien Hydroxyfunktionen wurde das Diol **60** in Pyridin gelöst, mit Ac_2O versetzt und über Nacht gerührt. Das gewünschte Hexaacetat **4** konnte so in einer Ausbeute von 83% über beide Stufen, d.h. Abspalten des Acetals und Umsetzung zum Diacetat, erhalten werden. (Abb. 3.45)

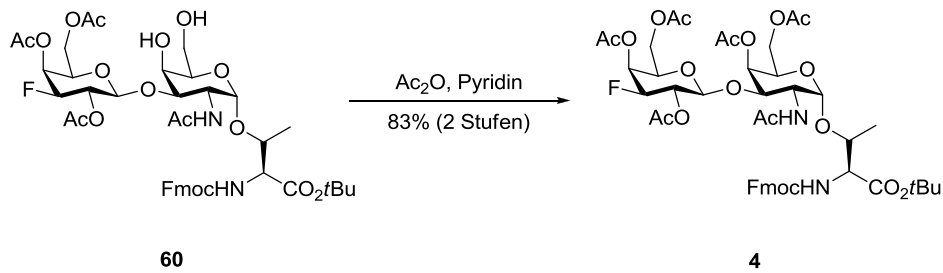


Abb. 3.45: Umsetzung des Diols 60 zum Hexaacetat 4

Um den Glycosylaminosäure-Baustein in der Festphasenpeptidsynthese einzusetzen, wurde der C-Terminus der Aminosäure unter sauren Bedingungen mit TFA/Wasser freigesetzt. (Abb. 3.46)

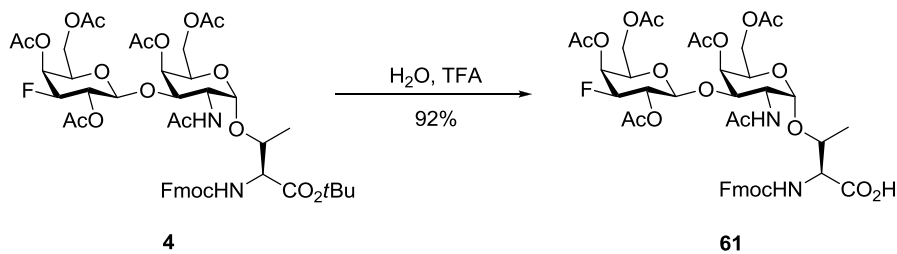


Abb. 3.46: Synthese des in 3-Position fluorierten T-Antigen-Festphasenbausteins 61

Wie bei den beiden Verbindungen zuvor werden in den NMR-Spektren der Verbindung **4** zusätzliche Signale beobachtet, die auf das Vorliegen von Rotameren hindeuten.

Im zweidimensionalen COSY-Spektrum ist deutlich zu erkennen, dass die Protonen des Dubletts bei 7.60 ppm (1-H, 8-H Fmoc) mit den Protonen bei etwa 7.30 ppm (2-H, 7-H Fmoc) wechselwirken, also diesen benachbart sind. Aber auch die beiden zusätzlichen Signale bei 7.55 und 7.47 ppm zeigen ein Kreuzsignal zu diesen Protonen. Da nur eine Integration über alle diese drei Signale die für dieses Strukturelement korrekte Anzahl von 2 Protonen ergibt, liegt die Verbindung in verschiedenen Konformationen vor, die unterschiedliche Resonanzfrequenzen im NMR-Experiment erzeugen. (Abb. 3.47)

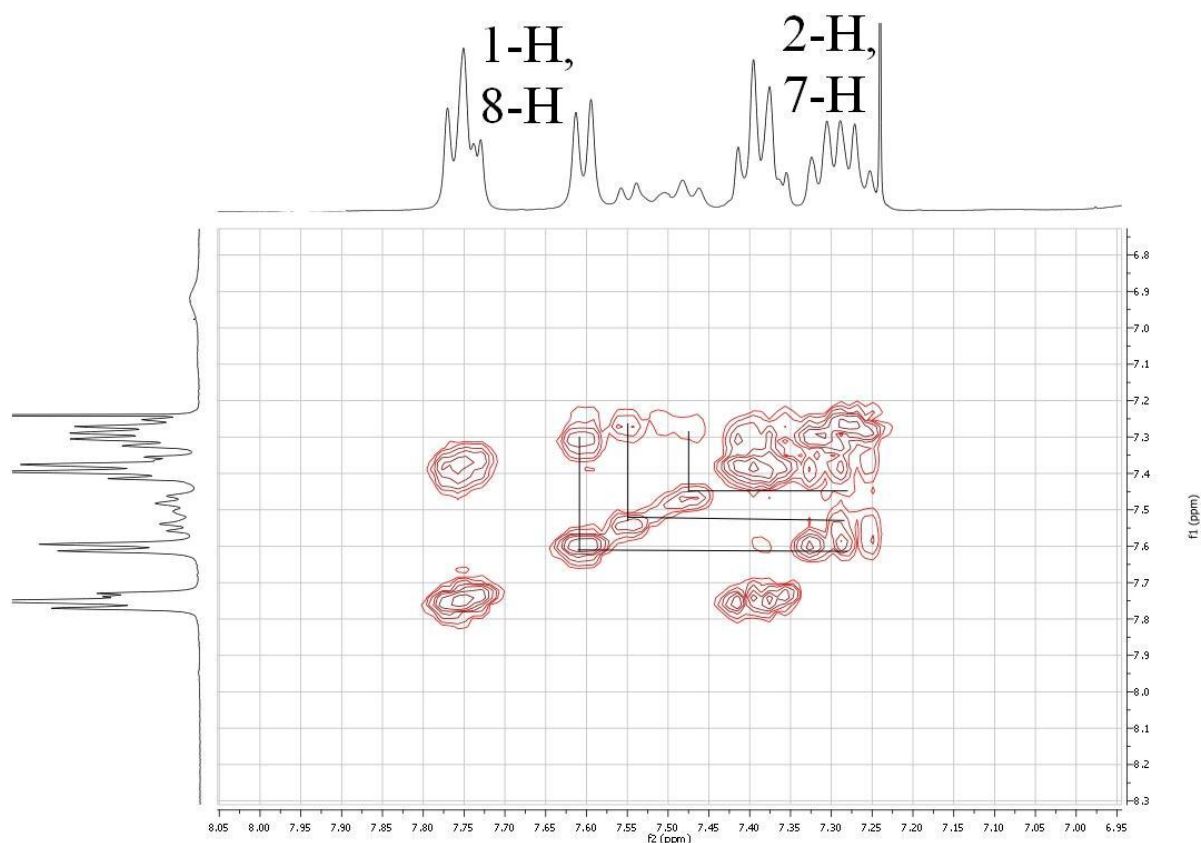


Abb. 3.47: COSY-NMR-Spektrum des Festphasenbausteins **61**

Wie bei Verbindung **4** konnte zudem massenspektrometrisch und durch analytische HPLC nur ein Produkt detektiert werden. Interessanterweise war der Einfluss der Rotamerbildung auf die chemische Verschiebung nicht nur auf die Signale der Fmoc-Gruppe beschränkt (deren eingeschränkte Rotation durch die Carbamat-Struktur naheliegender ist), sondern konnte im Fall des Diols **60** und der Säure **61** auch für die Signale der H-Atome des Galactoserestes beobachtet werden. Dabei scheint die Polarität des Moleküls eine Rolle zu spielen. Welche Wechselwirkungen genau für die Rotamerbildung und deren Erscheinung im NMR-Spektrum entscheidend sind, konnte bisher jedoch noch nicht näher untersucht werden.

3.1.2 Synthese des 4'-F-T-Antigens

Nachdem die Synthese des in 3-Position fluorierten T-Antigens **61** erfolgreich durchgeführt werden konnte, galt es als nächstes, eine Strategie für die Fluorierung der Galactose in 4-Position zu entwickeln, wobei erneut zunächst der Fluor-Einbau auf der Stufe des Glucals untersucht wurde.

Direkte Fluorierung des Glucals

Da die nucleophile Fluorierung zur Inversion des betreffenden Stereozentrums führt, muss die Synthese des in 4-Position fluorierten Galactals **63** von einem Glucose-Baustein aus, dem Glucal **62**, erfolgen.

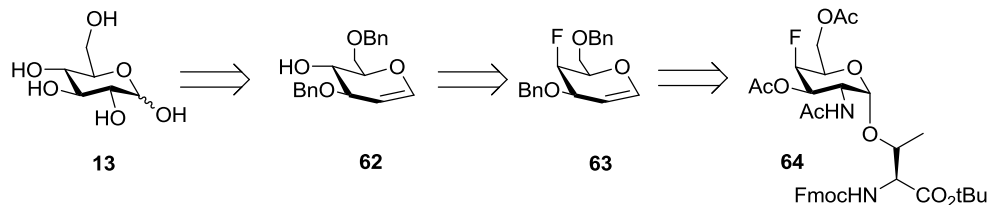


Abb. 3.48: Synthese des 4-F-T_N-Antigens **64** ausgehend von Glucose **13**

Hierzu wurde Glucose **13** durch Peracetylierung mit Ac₂O in Gegenwart von Pyridin, Umsetzung mit HBr in Eisessig und Zink-vermittelte reduktive Eliminierung mit einer Ausbeute von 65% über drei Stufen in das gewünschte Glucal **65** überführt.^[64] (Abb. 3.49)

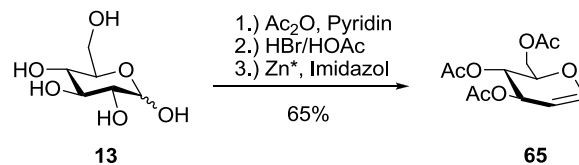


Abb. 3.49: Darstellung des peracetylierten Glucals **65**

Anschließend wurde in einer Zemplén-Umesterung^[76] mit NaOMe in MeOH vollständig deblockiert und das Glucal **66** wurde mit Hilfe der Stannylen-Methode^[109,110,111] selektiv in das 3,6-Di-*O*-benzyl-glucal **62** überführt. (Abb. 3.50)

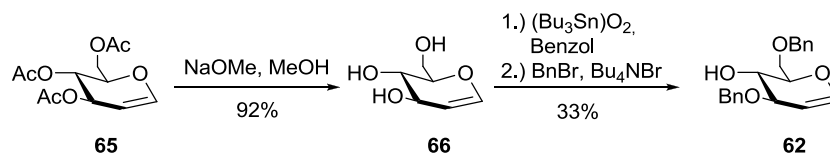


Abb. 3.50: Synthese des 3,6-Di-*O*-Benzylglucals **62**

Dabei wurden die Hydroxygruppen in 3- und der 6-Position des Glucals **66** durch Tributylzinnoxid komplexiert und dadurch für einen elektrophilen Angriff des Alkylhalogenids aktiviert.^[112] (Abb. 3.51)

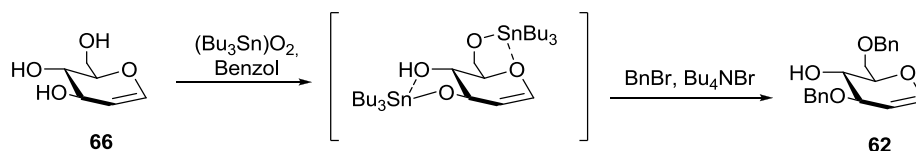


Abb. 3.51: Mechanismus der regioselektiven Benzylierung des Glucals 66

Dieser Angriff wird durch den Einsatz von quartären Ammoniumhalogeniden (Tetrabutylammoniumbromid) deutlich beschleunigt,^[113] was z.B. auf eine Insertion des Halogenidions in die Zinn-Sauerstoffbindung zurückgeführt wird. Dies führt unter Abspaltung von Tributylzinnbromid zur Bildung des Alkoholats in Form eines solvensseparierten Ionenpaares.

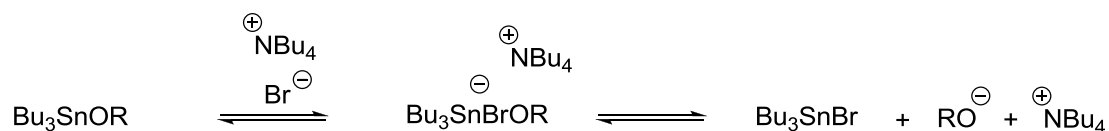


Abb. 3.52: Erklärung der gesteigerten Nucleophilie der Stannylene

Alternativ werden auch neutrale oder anionische pentakoordinierte Zinn-Spezies als reaktive Syntheseintermediate diskutiert.^[114,115,116] (Abb. 3.53)

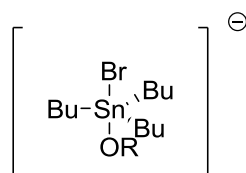


Abb. 3.53: Mögliches reaktives Intermediat bei der Aktivierung von Alkoholen durch Zinnreagenzien

Das gewünschte Produkt konnte allerdings nur in einer Ausbeute von 33% erhalten werden, was jedoch im Wesentlichen auf Probleme bei der Isolierung und Reinigung zurückzuführen ist.^[113]

Für die anschließende nucleophile Substitutionsreaktion wurden das Glucal 62 und Dimethylaminopyridin (DMAP) bei -40 °C in Dichlormethan tropfenweise mit DAST versetzt. (Abb. 3.54)

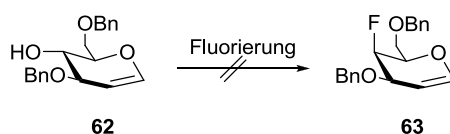


Abb. 3.54: Versuche zur Fluorierung des Glucals 62

Trotz Erwärmen der Mischung auf Raumtemperatur konnte jedoch auch nach 24 Stunden kein Umsatz festgestellt werden. Analoge Umsetzungen mit Pyridin als Base bzw. unter Verwendung von DMAP und DAST in Dichlormethan, sowie Deoxofluor^[117] in Toluol unter gleichzeitiger Mikrowelleneinstrahlung verliefen ebenso wenig erfolgreich. Zudem konnte weder durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 100 °C noch durch Überführung des Alkohols in das Triflat **67** und anschließender Reaktion mit einer 1M Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung das gewünschte Produkt gebildet werden.^[118] (Abb. 3.55)

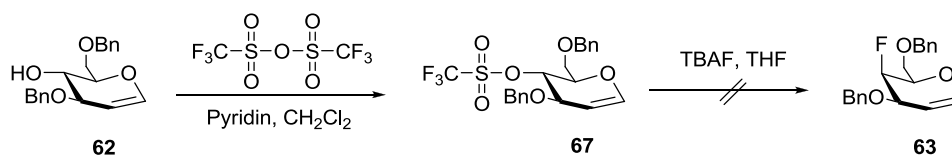


Abb. 3.55: Versuch der Fluorierung des Glucals **62** über das Triflat **67**

Bei allen beschriebenen Versuchen konnte entweder keine Reaktion des Eduktes oder aber dessen Zersetzung beobachtet werden. (siehe Tab. 3.3)

Reagenzien	Bedingungen	Ausbeute
DAST, DMAP, CH ₂ Cl ₂	-40 °C bis 25 °C	kein Produkt
DAST, Pyridin, CH ₂ Cl ₂	40 °C	kein Produkt
DAST, DMAP, CH ₂ Cl ₂	MW, 100W, 80 °C	Zersetzung
Deoxofluor, CH ₂ Cl ₂	0 °C bis 25 °C	Zersetzung
Deoxofluor, Toluol	25 °C bis 100 °C	Zersetzung
Triflat-Anhydrid, TBAF	40 °C	Zersetzung

Tab. 3.3: Übersicht über die Versuche zur Fluorierung des Glucals **62**

Synthese der 4-F-Galactose ausgehend von Glucose

In Analogie zur Synthese des in 3-Position fluorierten Bausteins **18** sollte daher auch das 4F-Galactal **65** über ein entsprechendes Glycosylbromid **2** aufgebaut werden. Letzteres stellt mit einem gemeinsamen Vorläufer für die Glycosylierung zum fluorierten T-Antigen **5** sowie zum Aufbau des entsprechenden T_N-Antigens **64** dar. (Abb. 3.56)

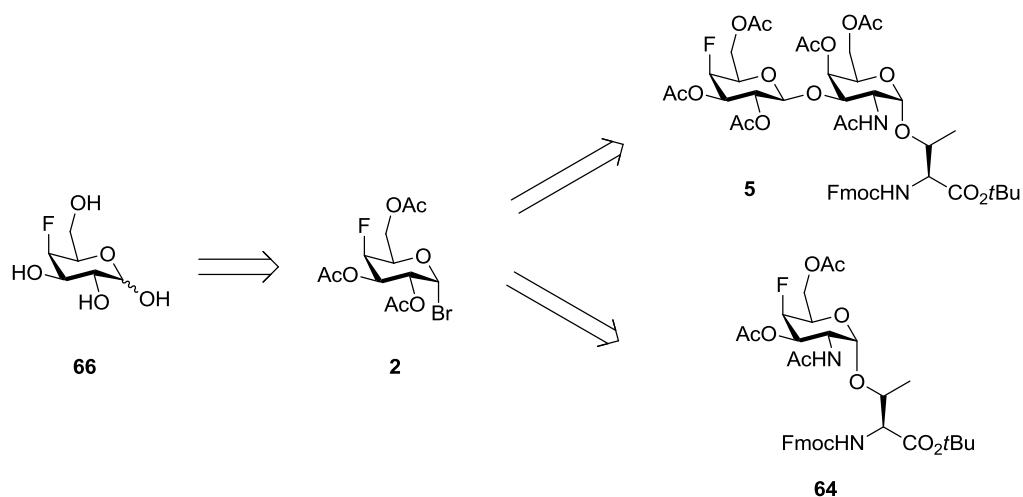


Abb. 3.56: Divergente Synthesestrategie zur Synthese der in 4-Position fluorierter Antigene

Für die Synthese des Bausteins **66** sollte die Hydroxygruppe an C-4 frei bleiben, während alle anderen Hydroxyfunktionen durch Benzylether^[119] blockiert wurden. (Abb. 3.57)

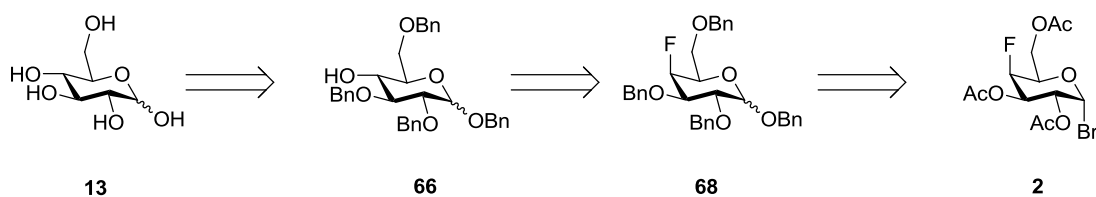


Abb. 3.57: Wichtige Zwischenstufen der Synthese des 4-F-Galactosylbromids **2**

Hierzu wurde zunächst das anomere Zentrum von Glucose **13** durch Umsetzung mit Benzylalkohol und *p*-Toluolsulfonsäure blockiert, und das erhaltene Produkt wurde direkt in einer weiteren Reaktion mit Benzaldehyd und Zn(II)Cl₂ zum 4,6-*O*-Benzylidenacetal **70** umgesetzt.^[120,121] (Abb. 3.58)

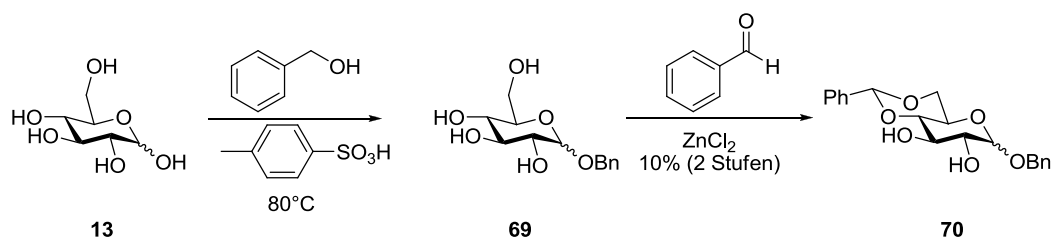


Abb. 3.58: Umsetzung der Glucose **13** zum Benzylidenacetal **70**

Obwohl die Gesamtausbeute dieser beiden Stufen nur bei 10% lag, wurde die Synthese fortgesetzt, wobei die beiden verbliebenen Alkoholfunktionen durch Reaktion mit NaH und Benzylbromid ebenfalls in die Benzylether überführt wurden.^[121] (Abb. 3.59)

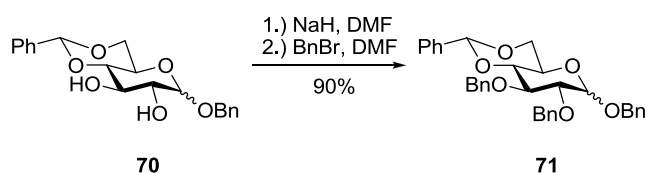


Abb. 3.59: Umsetzung des Acetals **70** zur vollständig blockierten Verbindung **71**

Zur regioselektiven Öffnung des Acetals, die zur Freisetzung der Alkoholfunktion in der 4-Position führte während die 6-Position durch einen Benzylether blockiert blieb, wurde Verbindung **71** in Dichlormethan mit Trifluoressigsäureanhydrid, Triethylsilan und Trifluoressigsäure versetzt. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung konnte so Verbindung **66** in 55% Ausbeute isoliert werden.^[122,123] (Abb. 3.60)

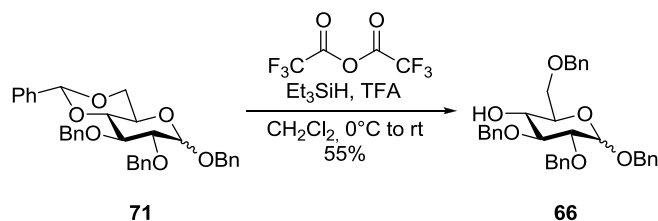


Abb. 3.60: Regioselektive Öffnung des Acetals zum Alkohol **66**

Leider scheiterten jedoch auch an diesem Baustein zunächst alle Versuche der nucleophilen Fluorierung unter Verwendung von DAST und Deoxofluor. (Abb. 3.61)

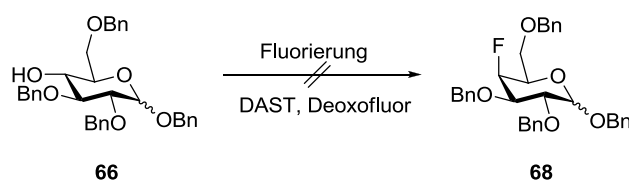


Abb. 3.61: Versuche zur Fluorierung von **66**

Reagenzien	Bedingungen	Ausbeute
DAST, DMAP, CH ₂ Cl ₂	-40 °C bis 0 °C	kein Produkt
DAST, Pyridin, CH ₂ Cl ₂	40 °C	kein Produkt
Deoxofluor, CH ₂ Cl ₂	25 °C	kein Produkt
Deoxofluor, Toluol	0 °C bis 80 °C	Zersetzung

Tab. 3.4: Übersicht über die Versuche zur Fluorierung von **66**

Auch der Einsatz des bereits bei Verbindung **36** beschriebenen Imidazolsulfonyl-Vorläufers für die TBAF-vermittelte Fluorierung (vgl. Abb. 3.16) brachte keine Besserung. (Abb. 3.62)

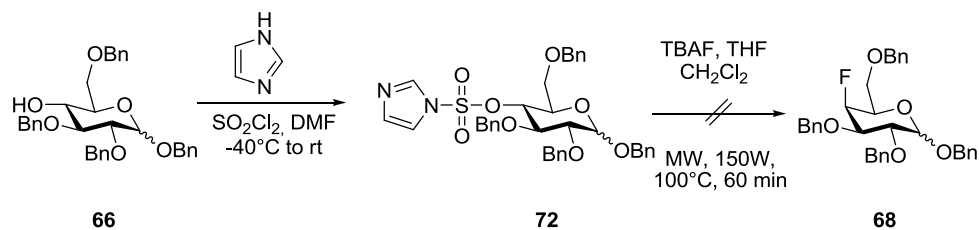


Abb. 3.62: Versuch der Fluorierung von **66** über das *N*-Imidazol-1-sulfonyl-Intermediat **72**

Erst die Umsetzung eines entsprechenden Triflats **73** in Dichlormethan mit TBAF bei 40 °C lieferte das gewünschte Produkt **68** in 71% Ausbeute.^[118] (Abb. 3.63)

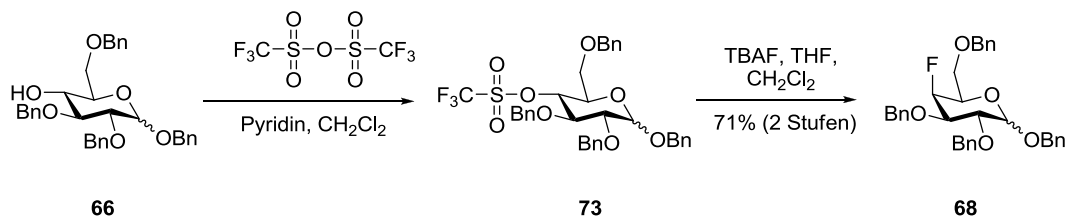


Abb. 3.63: Erfolgreiche Fluorierung des Alkohols **66** über das intermediäre Triflat **73**

Die Deblockierung der Benzylether wurde mit Palladium auf Aktivkohle durchgeführt,^[119] wozu jedoch über einen Zeitraum von drei Tagen bei Raumtemperatur gerührt werden musste, um eine vollständige Abspaltung der Benzylether zu gewährleisten. Anschließend wurde das Tetraol in Pyridin gelöst und mit Ac₂O versetzt. Hierdurch konnte das gewünschte Acetat in einer Ausbeute von 81% über beide Stufen erhalten werden.^[124] (Abb. 3.64)

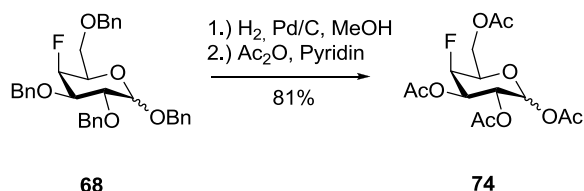


Abb. 3.64: Entfernung der Benzylether und Blockierung der Alkohole durch Acetate zu **74**

Insgesamt erlaubt die beschriebene Syntheseroute die Darstellung des in 4-Position fluorierten Galactopyranose-Vorläufers **74** über acht Stufen und mit einer Gesamtausbeute von 3%. Der Hauptgrund für diese recht geringe Ausbeute liegt in den ersten beiden unbefriedigend

verlaufenden Umsetzungen, weshalb eine verbesserte Synthese für **74** entwickelt werden musste.

Da sowohl die Einführung des anomeren Benzylethers, als auch die Umsetzung zum Acetal mit Hilfe von Zn(II)Cl_2 nur zu geringen Ausbeute führte, wurde neben der Einführung der Allylschutzgruppe für die Hydroxyfunktion des anomeren Zentrums^[125,126,127] auch die Acetalbildung unter veränderten Reaktionsbedingungen, d.h. durch Umsetzung mit Benzaldehyddimethylacetal und katalytischen Mengen *p*-Toluolsulfonsäure durchgeführt.^[125] (Abb. 3.65)

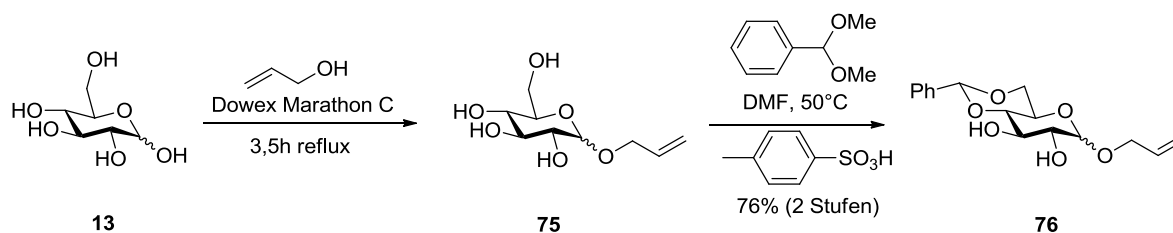


Abb. 3.65: Synthese der Allyl-4,6-*O*-Benzyliden-glucopyranose **76**

Das gewünschte Produkt konnte so in einer Ausbeute von 76% über beide Stufen hergestellt werden.

Deprotonierung der beiden Alkoholfunktionen und anschließende Reaktion mit Benzylbromid lieferte das vollständig blockierte Glucosederivat **77** in 74% Ausbeute.^[126,128] (Abb. 3.66)

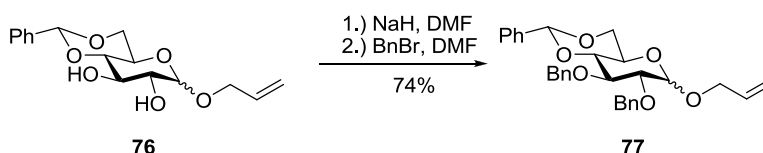


Abb. 3.66: Synthese der vollständig blockierten Verbindung **77**

Dieses wurde durch regioselektive Acetalöffnung in Gegenwart von Trifluoressigsäureanhydrid, Triethylsilan und Trifluoressigsäure in den Fluorierungsvorläufer **78** überführt.^[122,123] (Abb. 3.67)

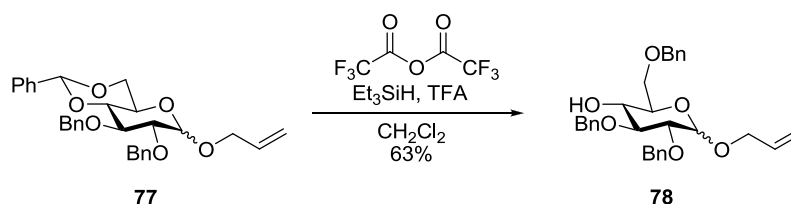


Abb. 3.67: Regioselektive Öffnung des Acetals **77** zum Alkohol **78**

Letzterer wurde erneut durch Trifluormethansulfonsäureanhydrid und Pyridin in das Triflat **79** überführt und ohne weitere Reinigung mit TBAF (1M in THF) in Dichlormethan zum gewünschten Fluorid **80** bei 40 °C umgesetzt. Nach Säulenchromatographie konnte das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 70% über zwei Stufen isoliert werden.^[118] (Abb. 3.68)

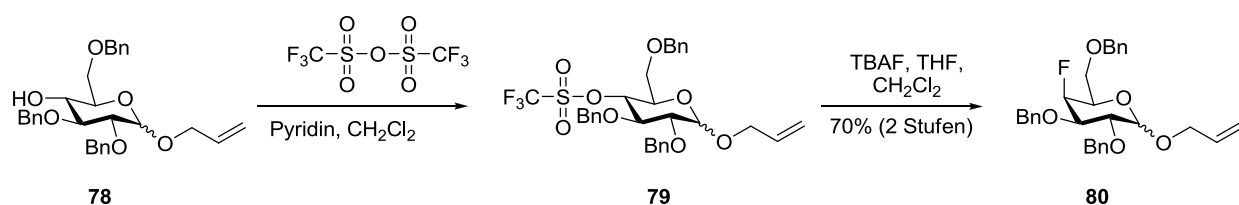


Abb. 3.68: Erfolgreiche Fluorierung des Alkohols **78** über das Triflat **79**

Als nächstes konnte die Allylschutzgruppe der anomeren Position durch Zusatz von Pd(II)Cl₂ in einem Gemisch aus Dichlormethan und Wasser entfernt werden. (Abb. 3.69)

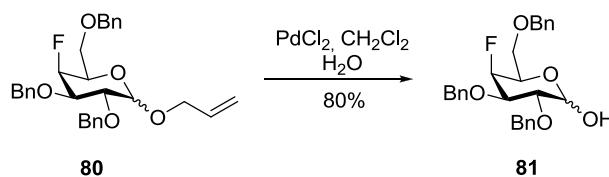


Abb. 3.69: Abspaltung der Allylschutzgruppe

Der genaue Mechanismus dieser Reaktion ist bisher noch nicht vollständig geklärt^[129] und es werden in der Literatur verschiedene Szenarien diskutiert. So kann eine zunächst ablaufende Isomerisierung der Doppelbindung von einem Allylsystem zu einem 1-Propenylether je nach Katalysator über eine Metall-Hydridspezies als aktiver Katalysator (A), oder über ein η -3- π -Allyl-Hydrid-Intermediat verlaufen (B). (Abb. 3.70)

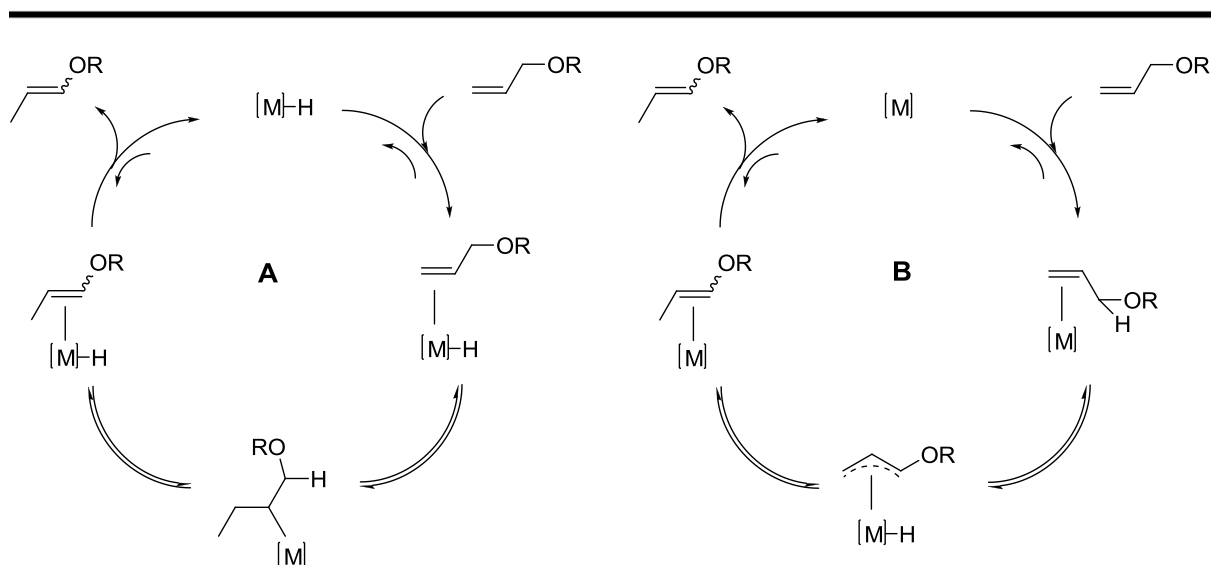


Abb. 3.70: Mögliche Mechanismen der Isomerisierung der Allyldoppelbindung

Der resultierende 1-Propenylether kann leicht unter sauren Bedingungen (in situ durch die Reaktion von Pd(II)Cl₂ mit Wasser gebildetes HCl) gespalten werden.^[130,131,132] (Abb. 3.71)

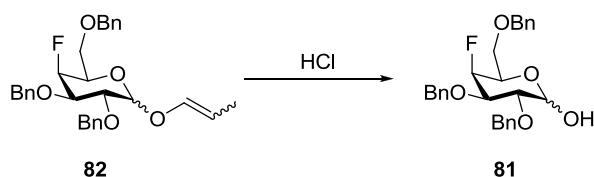


Abb. 3.71: Abspaltung des 1-Propenylethers in 82 zum Hemiacetal 81

Alternativ ist die Bildung einer intermediären dimeren [(allyl)PdCl]₂-Spezies denkbar, die dann durch einen nucleophilen Angriff von Wasser sofort unter Zerfall des Allyl-Komplexes abreagiert.^[133,134]

Zudem wird in der Literatur eine anti-Markovnikov Hydropalladierung diskutiert, durch die es nach Abspaltung eines β-Alkoxy-Restes und Freisetzung des deblockierten Alkohols zur Bildung des Allylalkohols kommt, der in Gegenwart von Palladium weiter oxidiert wird.^[135]

Obwohl der genaue Reaktionsmechanismus nicht bekannt ist, stellt der Einsatz von stöchiometrischen Mengen an PdCl₂ eine praktikable Methode zur Abspaltung der Allylschutzgruppe in nur einem Schritt dar.

Zur Spaltung der restlichen Benzylether unter hydrogenolytischen Bedingungen wurde **81** zwei Tage unter einer Wasserstoffatmosphäre mit Palladium auf Aktivkohle bei Raumtemperatur gerührt^[119] und anschließend mit Pyridin und Ac₂O in die 1,2,3,6-Tetra-O-acetyl-4-desoxy-4-fluorogalactopyranose **74** überführt. (93% Ausbeute)^[124] (Abb. 3.72)

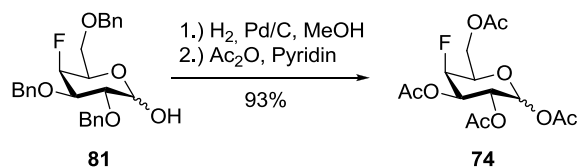


Abb. 3.72: Darstellung der in 4-Position fluorierten peracetylierten Galactose **74**

Bei einem Vergleich der beiden vorgestellten Synthesewege zu **57** erweist sich der letztere trotz der zusätzlichen Stufe und des damit verbundenen synthetischen Mehraufwands mit einer Gesamtausbeute von 18% über 9 Stufen als praktikabler als die zuvor getestete Syntheseroute.

Zur Darstellung des Galactosylbromids **2** wurde das Anomerengemisch des Acetats **74** in Dichlormethan vorgelegt und unter Eiskühlung mit HBr (33%ig) in Eisessig versetzt. Nach 24 Stunden Rührens bei Raumtemperatur konnte das gewünschte Produkt **2** in einer Ausbeute von 60% isoliert werden.^[91] Wie bei Verbindung **1** konnte trotz verlängerter Reaktionszeit kein vollständiger Umsatz erreicht werden, da unter diesen Bedingungen vermehrte Hydrolyse des Produktes auftrat. Eine Analyse des zurückgewonnenen Edukts nach Abbruch der Reaktion zeigte allerdings im Gegensatz zum 3-Fluor-Bromid ein Anomerengemisch aus α - und β -Acetat **74**. (Abb. 3.73)

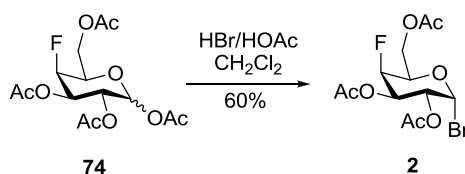


Abb. 3.73: Synthese des 4-F-Bromids **2**

Durch reduktive Eliminierung mit aktiviertem Zinkstaub konnte schließlich das Bromid **2** in einer guten Ausbeute von 69% in das entsprechend fluorierte Galactal **83** überführt werden. (Abb. 3.74)

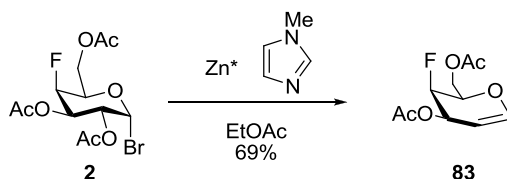


Abb. 3.74: Reduktive Eliminierung des anomeren Bromids **2** zum Galactalderivat **83**

Aus Zeitgründen und aufgrund einer erhöhten Säurelabilität, die bei dieser Verbindung in Analogie zum 3F-Galactal **18** zu beobachten war, wurde die weitere Umsetzung in einer Azidonitratisierungsreaktion nicht durchgeführt, da hierbei ein stark saurer pH-Wert auftritt.

Neben der Verwendung als Baustein für die Herstellung des 4F-Galactals **83** sollte das Glycosylbromid **2** auch zur Synthese des *Thomson-Friedenreich*-Antigens eingesetzt werden. Wie bereits im Fall des 3F-Antigenanalogons **4** sollte die zentrale Verknüpfung zum Disaccharid **84** dabei über eine *Helferich*-Glycosylierung^[75] zwischen dem 4-F-Bromid **2** und dem Akzeptor **12** erreicht werden. (Abb. 3.75)

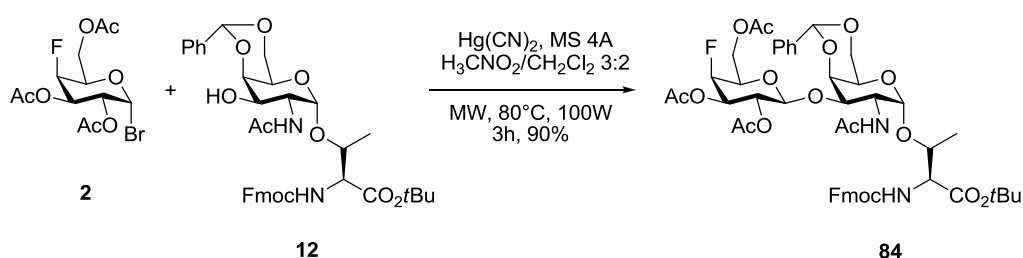


Abb. 3.75: *Helferich*-Glycosylierung zur Darstellung des fluorierten Disaccharids **84**

Hierfür wurde der Glycosylakzeptor **12** zusammen mit Molsieb und dem Promotor $\text{Hg}(\text{CN})_2$ bei Raumtemperatur in einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Dichlormethan (3:2) gerührt, ehe eine Lösung des Akzeptors **2** in eben diesem Gemisch zugegeben wurde. Da aufgrund der geringen Reaktivität des Glycosyldonors nach 24-stündiger Reaktionsdauer keine Produktbildung nachgewiesen werden konnte, wurde die Reaktion unter Einsatz von Mirowellenstrahlung durchgeführt. Unter diesen Reaktionsbedingungen (3h, 80 °C, 100W) konnte das gewünschte β -Anomer des Disaccharids in einer sehr guten Ausbeute von 90% isoliert werden. Aufgrund der Nachbargruppenbeteiligung des *O*-Acetyl-Substituenten in der 2'-Position erfolgte der Angriff des Akzeptors stereoselektiv von der äquatorialen Seite aus, weshalb die Bildung des α -konfigurierten Disaccharids, wie erwartet, nicht beobachtet wurde.^[136,137,138] Bei der Charakterisierung dieser neuen Verbindung traten im ^1H - und ^{19}F -NMR-Spektrum deutliche Signalverbreiterung bzw. zusätzliche Signale im Fmoc-Bereich auf, die aufgrund der einheitlichen HPLC-Chromatogramme ebenfalls Konformationsisomeren (Rotameren) zugeschrieben werden. (Abb. 3.76)

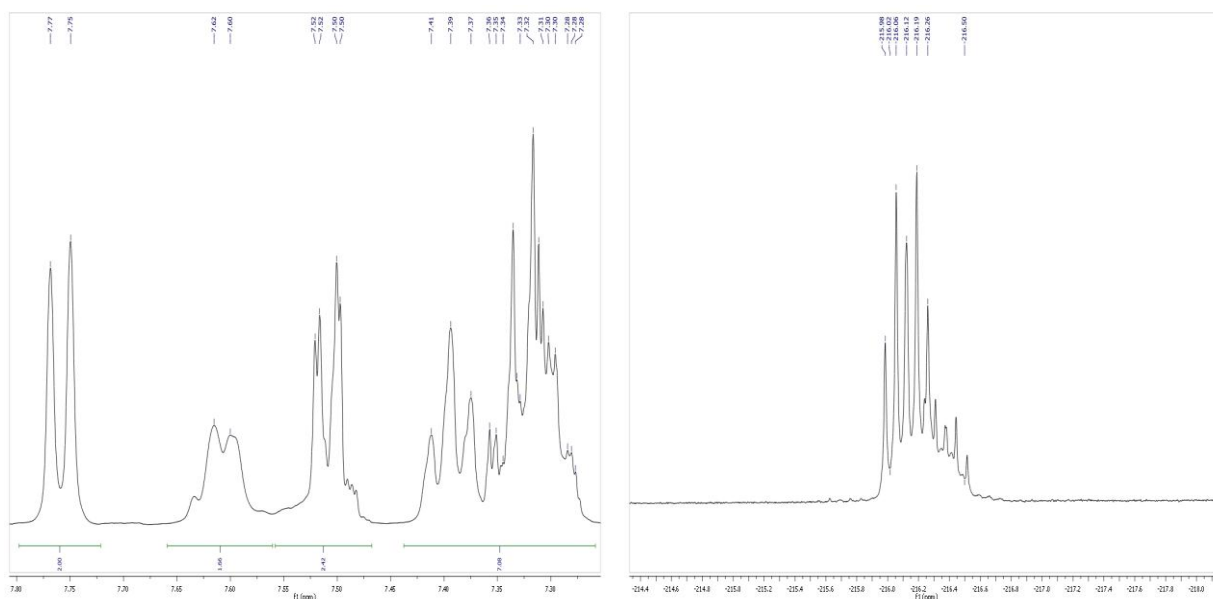


Abb. 3.76: Auftreten von verbreiterten Signalen im ^1H -NMR-Spektrum (links) und ^{19}F -NMR des fluorierten Disaccharids **84**

Weiterhin ist zu erwähnen, dass es nicht nur im Protonen-Spektrum zu solchen Auffälligkeiten gekommen ist. Auch das ^{19}F -NMR-Spektrum weist nicht nur ein isoliertes Signal für den Fluorsubstituenten in der 4-Position auf. Es kann vielmehr eine Überlagerung mit einem weiteren Signalsatz beobachtet werden, (Abb. 3.76 rechts) so dass zwei Dupletts von pseudo-Tripletts zu erkennen sind, die aus einer zufällig identischen Kopplungskonstante zwischen dem Fluor und dem 5-H bzw. 3-H-Proton der Galactose resultieren.^[139,140]

Um die Synthese eines für die Festphasenpeptidsynthese verwendbaren Glycosylaminosäurebausteins zu vervollständigen, wurde das in **84** vorhandene Benzylidenacetal gegen zwei Acetat-Schutzgruppen ausgetauscht. (Abb. 3.77)

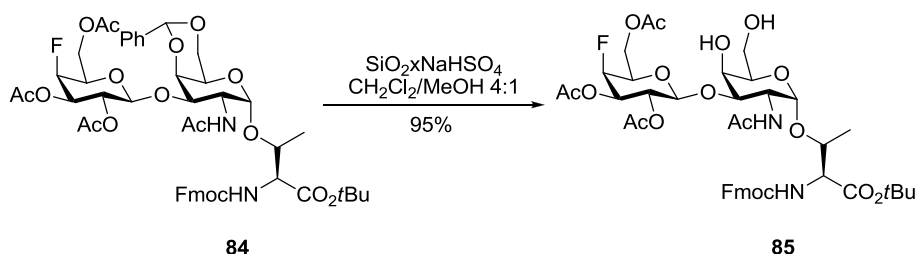


Abb. 3.77: Abspaltung des Acetals in **84 zum fluorierten Diol **85****

Dazu wurde das Acetal **84** in einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol vorgelegt und mit dem hergestellten Kieselgel-Katalysator $\text{SiO}_2 \times \text{NaHSO}_4$ versetzt.^[108] Dies führte zu einer selektiven Spaltung des säurelabilen Acetals, ohne dass dabei der ebenfalls säurelabile *tert*-

Butylester angegriffen wurde. Das erhaltene Diol **85** wurde durch Behandlung mit Ac₂O und Pyridin mit einer Gesamtausbeute von 96% über zwei Stufen in den Baustein **5** überführt. (Abb. 3.78)

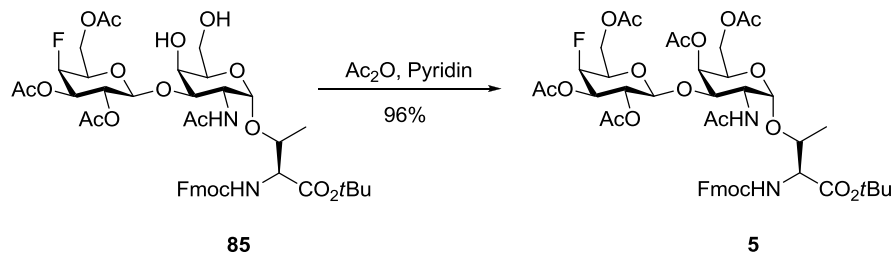


Abb. 3.78: Synthese des peracetylierten Disaccharids **5**

Anschließend wurde der C-Terminus der Glycosylaminosäure acidolytisch mit Wasser und Trifluoressigsäure freigesetzt, wobei die gewünschte Säure **86** in einer Ausbeute von 98% isoliert werden konnte. (Abb. 3.79)

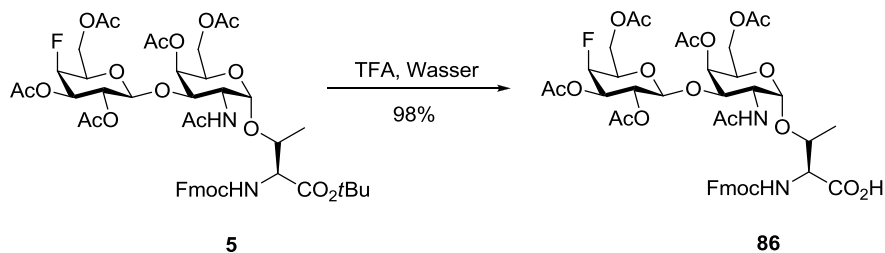


Abb. 3.79: Deblockierung der Säurefunktion zum fluorierten Festphasenbaustein **86**

3.2 Synthese des 6'-Di-F-T-Antigens

In den vorangegangenen Kapiteln konnte die erfolgreiche Synthese der in 3- und 4-Position fluorierten Galactosemoleküle beschrieben werden. Diese wurde weiter zu den entsprechenden Galactosylbromiden **1** und **2** umgesetzt, deren Glycosylierungsreaktionen mit dem Akzeptorbaustein **12** letztlich zu den jeweiligen T-Antigen-Analoga führte. Mit diesen beiden Verbindungen und den bereits zuvor von S. Wagner^[41] und C. Mersch^[42] synthetisierten 6'-F- bzw. 2'-F-T-Antigenanaloga konnte damit die Serie der im Galactoserest monofluorierten T-Antigene komplettiert werden. (Abb. 3.80)

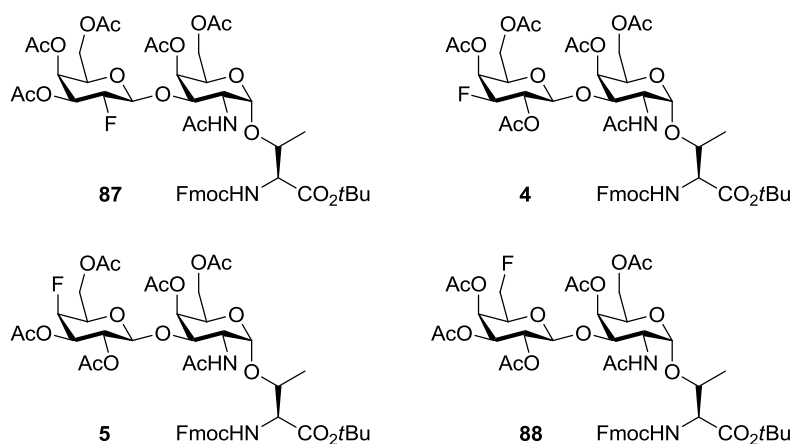


Abb. 3.80: Bereits synthetisierte, im Galactoserest fluorierte T-Antigene 4, 5, 87 und 88

Zusätzlich sollte erstmals auch eine entsprechende difluorierte Verbindung hergestellt werden, wozu der Einbau eines geminalen Difluor-Substituenten in der 6'-Position in Angriff genommen wurde.

Da in den bereits erwähnten Synthesestrategien direkte Fluorierungen am Galactalbaustein nicht zu den gewünschten Produkten führte, sollte die difluorierte Verbindung **90** erneut schrittweise über ein entsprechendes α -Bromid **3** aufgebaut werden, wobei letzteres auch zur Herstellung des 6,6-Di-F-Galactals **7** herangezogen werden kann. (Abb. 3.81)

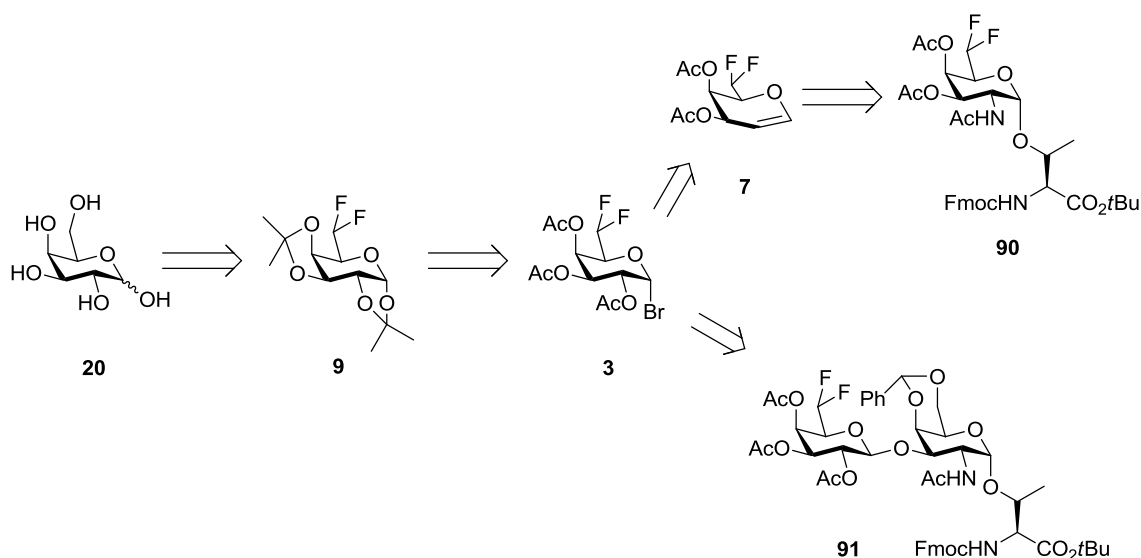


Abb. 3.81: Synthesestrategie zur Darstellung difluorierter Antigen-Analoga

Ein in 6-Position difluoriertes Galactosederivat kann durch zweifache Deoxyfluorierung eines entsprechenden Aldehyds mit DAST bzw. Deoxofluor hergestellt werden. Mechanistisch verläuft die Reaktion dabei wie folgt: Zunächst kommt es bei einem Angriff des Carbonyl-Sauerstoffatoms auf das Schwefelatom des DAST-Reagenzes zu einer Freisetzung eines

Fluoridions, welches ebenfalls in einer S_N2 -Reaktion am Carbonyl-Kohlenstoffatom angreifen kann. Verliert dieses Produkt erneut einen Fluoridsubstituenten am Schwefelatom, so wird ein stabilisiertes Oxoniumion erhalten, das ebenfalls in einer S_N2 -Substitutionsreaktion von einem Fluoridion unter Ausbildung des geminalen Difluorids und einem Fluorsulfonamid angegriffen werden kann.^[64] (Abb. 3.82)

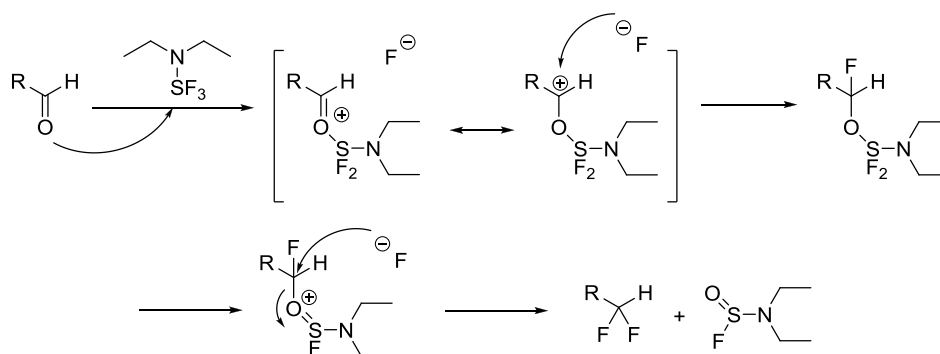


Abb. 3.82: Mechanismus der Difluorierung eines Aldehyds mit DAST

Die Herstellung des benötigten Aldehyds erfolgte ausgehend von 1,2;3,4-Diisopropylidengeschützter Galactose **92**, die durch Umsetzung von Galactose **20** mit Aceton, CuSO_4 und katalytischen Mengen konzentrierter Schwefelsäure erhalten wurde.^[141] (Abb. 3.83)

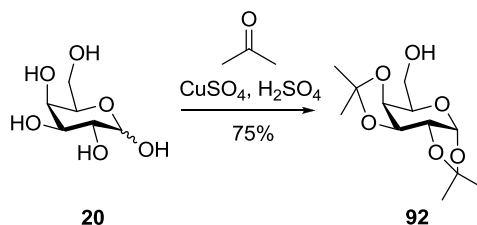


Abb. 3.83: Darstellung der 1,2;3,4-Diisopropylidengalactose **92**

Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde der Alkohol **92** in einer Ausbeute von 75% isoliert und einer Oxidation unter *Swern*-Bedingungen^[142] zum Aldehyd **93** unterworfen.^[143,144] (Abb. 3.84)

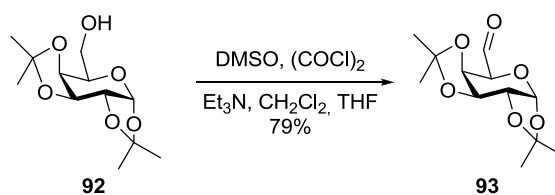


Abb. 3.84: Oxidation des primären Alkohols **92** zum Aldehyd **93** unter *Swern*-Bedingungen

Letzterer konnte in einer Ausbeute von 79% erhalten werden, erwies sich jedoch als leicht zersetzbar und konnte nur kurz bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Daher wurde das Intermediat **93** sofort in der bereits beschriebenen DAST-vermittelten Deoxyfluorierung eingesetzt.^[145,146] (Abb. 3.85)

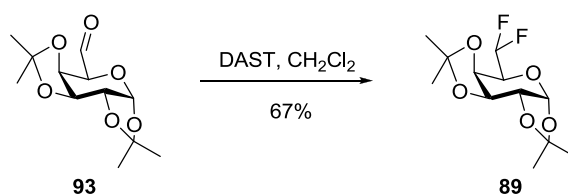


Abb. 3.85: Fluorierung des Aldehyds **93** zur 6,6-gem-Difluorogalactose **89**

Hierdurch war es möglich, in einer Ausbeute von 67% die gewünschte Difluorogalactose **89** zu erhalten.

Anschließend wurden die beiden Isopropylidenacetale unter sauren Bedingungen mit 80%iger Essigsäure abgespalten und die regenerierten Alkoholfunktionen durch Umsetzung mit Ac₂O in Pyridin blockiert.^[146] (Abb. 3.86)

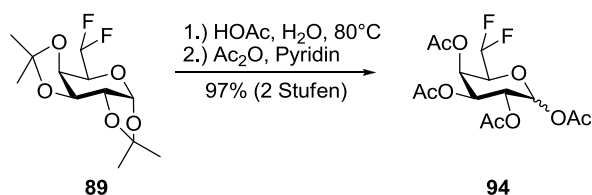


Abb. 3.86: Abspaltung der Isopropylidene in **89** und Umsetzung zur peracetylierten Galactose **94**

Zur Herstellung des Glycosylierungsdonors wurde erneut ein α -Bromsubstituent in anomerer Position eingeführt, wozu die peracetylierte Verbindung **94** mit HBr (33%ig) in Eisessig umgesetzt wurde. Dabei konnte das gewünschte Produkt 6,6-Di-fluor-1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-galactosylbromid **3** nach chromatographischer Reinigung in einer mäßigen Ausbeute von 51% erhalten werden. (Abb. 3.87)

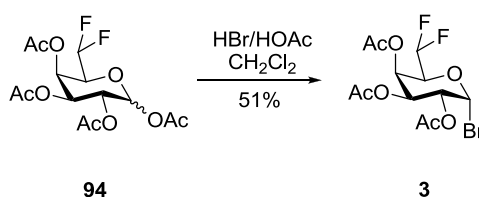


Abb. 3.87: Darstellung des anomeren Bromids **3**

In Analogie insbesondere zur Darstellung des 3-F-Galactosylbromids **1** konnte auch hier durch eine verlängerte Reaktionszeit lediglich eine verstärkte Hydrolyse des Bromids beobachtet werden. Auch eine erneute Zugabe von HBr in Eisessig erhöhte nicht die Ausbeute, weshalb die Reaktion nach drei Tagen trotz unvollständigen Umsatzes abgebrochen wurde. Neben dem gewünschten Produkt konnte auch die 6-Di-F-1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl- α -galactopyranose identifiziert werden, die sich wie das α -3-F-Acetat **51** unter den Reaktionsbedingungen nicht bzw. nur teilweise umsetzte. (Abb. 3.88)

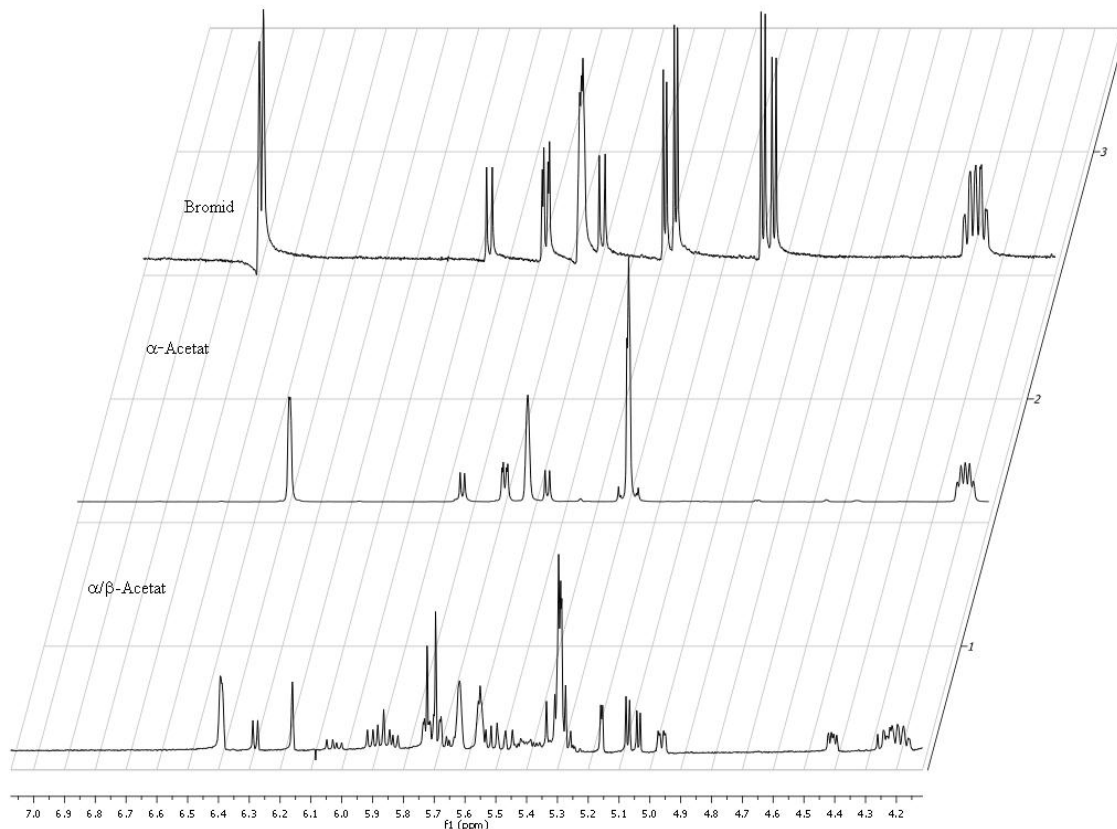


Abb. 3.88: ^1H -NMR-Spektren des 6-Di-F-Bromids, α -Acetats und des α/β -Acetats

Im oberen Spektrum ist das Bromid abgebildet, welches aufgrund der Kopplungskonstante des anomeren Protons bei 6.69 ppm mit $J = 3.96$ Hz klar als α -konfiguriert zu erkennen ist. In der mittleren Abbildung befindet sich das bei der Reaktion nicht umgesetzte α -Acetat, das eine Kopplungskonstante für das anomere Proton bei 6.38 ppm mit einem Wert von $J = 1.73$ aufweist. Interessant bei diesen beiden Spektren ist das Multiplett bei 5.85 bis 5.55 ppm, welches vom Wasserstoffatom in der 6-Position verursacht wird und eine große Aufspaltung von etwa 55 Hz, welche aus der Kopplung des Protons mit den beiden Fluoratomen resultiert, erkennen lässt. Hinzu kommt bei diesem Signal noch die Kopplung der Protonen in 6- und 5-

Position. Diese liegt etwa bei 5.83 Hz, wodurch letztlich ein ddd-Multipllett entsteht. Das unterste Spektrum zeigt das zur Bromierung eingesetzte Anomerengemisch.

Mit dem nun zur Verfügung stehenden difluorierten Galactosyldonor **3**, wurde in einem nächsten Schritt die Glycosylierung des bereits beschriebenen Benzylidenacetals **12** unter *Helferich*-Bedingungen^[75] in der Mikrowelle durchgeführt, wobei das gewünschte Disaccharid **95** in einer recht geringen Ausbeute von lediglich 42% dargestellt werden konnte. (Abb. 3.89)

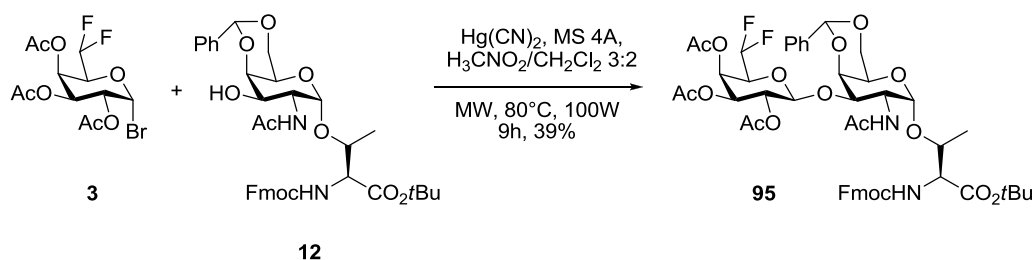


Abb. 3.89: Glycosylierung nach *Helferich* zum difluorierten Disaccharid **95**

Unter konventionellen Bedingungen konnte kein Umsatz zum gewünschten Produkt festgestellt werden und es wurde lediglich Hydrolyse des Galactosylbromids beobachtet. Darüber hinaus wurde auch die alternative Schmidt-Glycosylierung^[147] untersucht, die eine Verwendung von Trichloracetimidaten vorsieht. Vorteile dieser Synthesemethode sind in der Regel eine höhere Lagerstabilität der entsprechenden Glycosyldonoren und deren relativ hohe Reaktivität. Als Promotoren werden katalytische Mengen schwacher Lewis-Säuren wie etwa $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ oder TMSOTf verwendet. Daher wurde in einem weiteren Versuch das bei der Reaktion zum α -Bromid angefallene Hydrolyseprodukt **96** zum entsprechenden Trichloracetimidat **97** umgesetzt. (Abb. 3.90)

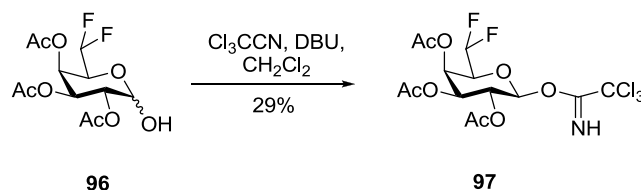


Abb. 3.90: Synthese des difluorierten Trichloracetimidats **97**

Diese Reaktion, bei der das Hemiacetal durch die Base DBU deprotoniert wird und das elektronenarme Nitril angreift, verlief jedoch unvollständig, weshalb das gewünschte Produkt **96** lediglich in 29% und neben größeren Mengen an Edukt isoliert werden konnte.

Auch die anschließende Glycosylierung des Trichloracetimidats **96** unter Aktivierung mit TMSOTf verlief nur sehr schleppend, so dass selbst unter Mikrowelleneinstrahlung durch den desaktivierenden Einfluss der beiden elektronenziehenden Fluorsubstituenten nur eine geringe Produktbildung von 8% beobachtet werden konnte. (Abb. 3.91)

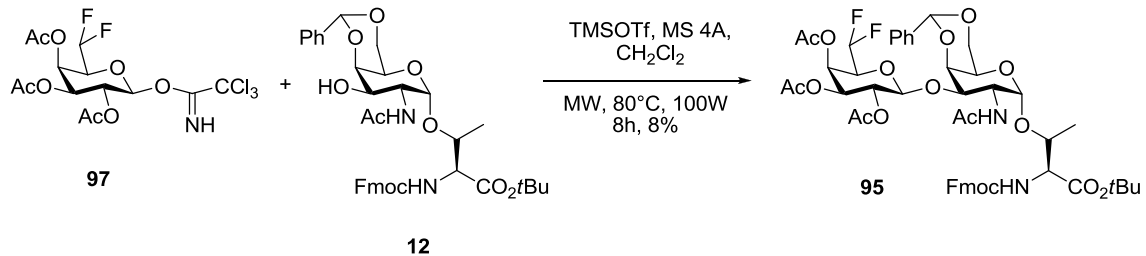


Abb. 3.91: Schmidt-Glycosylierung zum difluorierten Disaccharid **95**

Als Grund für die auffallende Reaktionsträgheit könnten hier elektronische Effekte angeführt werden, mit deren Hilfe die Reaktivität des anomeren Zentrums herabgesetzt werden kann bzw. das intermediäre Oxocarbeniumion stabilisiert werden könnte. Zudem können die negativ polarisierten Fluoratome den Angriff des Nucleophils, der bedingt durch den Nachbargruppeneffekt des Acetylsubstituenten in der 2-Position von der äquatorialen Seite aus erfolgt, sterisch und auch elektronisch behindern. (Abb. 3.92)

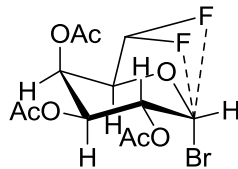


Abb. 3.92: Mögliche Beeinflussung des anomeren Zentrums durch die Difluorsubstitution

Das Benzylidenacetal des erhaltenen Disaccharids **95** wurde wie zuvor unter sauren Bedingungen mit Hilfe von aktiviertem Kieselgel ($\text{SiO}_2 \times \text{NaHSO}_4$)^[108] gespalten und die resultierenden Alkoholfunktionen wurden durch Umsetzung mit Ac_2O in Pyridin in Acetatgruppen überführt. (Abb. 3.93)

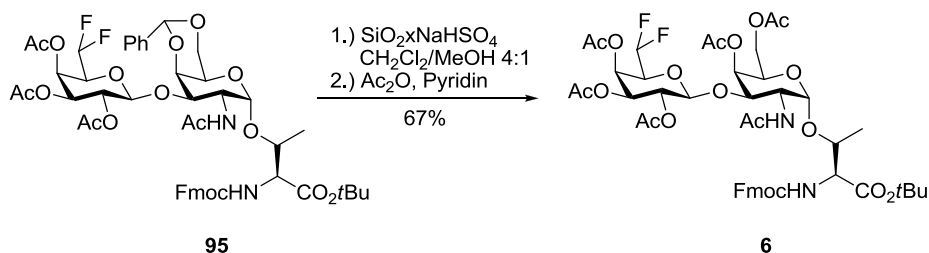


Abb. 3.93: Umschüttung des difluorierten Benzylidenacetals **95 zum Acetat **6****

Abschließende acidolytische Freisetzung der Säurefunktion lieferte den gewünschten Festphasenbaustein **98** in 96% Ausbeute. (Abb. 3.94)

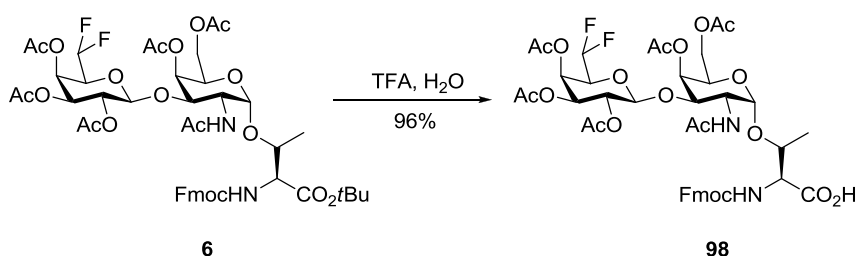
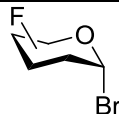
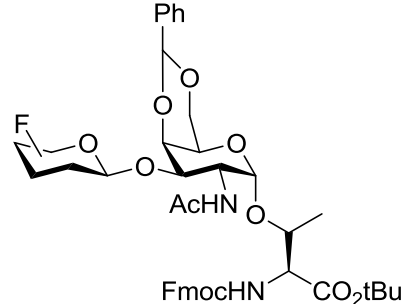


Abb. 3.94: Deblockierung der Carbonsäurefunktion zum fertigen Festphasenbaustein **98**

Nach den bisher beschriebenen Reaktionen konnte die Synthese verschiedener fluorierter T-Antigen-Analoga durchgeführt werden, bei denen der Galactosebaustein einen Fluorsubstituenten in der 3- oder 4-Position bzw. zwei Fluorsubstituenten in der 6-Position enthält (**61**, **86** und **98**). Bei einem Vergleich der jeweiligen Syntheserouten fällt auf, dass das 4'-F-T-Antigen durchweg höhere Ausbeuten, vor allem bei der Darstellung des anomeren Bromids **2** und der Glycosylierung zum T-Antigen **84**, aufweist, die zum Teil sogar mit denen der bekannten, nichtfluorierten Bausteine vergleichbar sind. Im Gegensatz hierzu ist die Reaktivität der 3F-Bausteine deutlich geringer und erreicht mit den difluorierten Verbindungen zur Synthese des 6',6'-F-T-Antigens **95** ein Minimum. Bei diesen Reaktionen ist ein deutlicher Einfluss der Fluorsubstituenten erkennbar. Während die Substitution der 4-Position, am weitesten vom anomeren Zentrum entfernt liegend, einen relativ geringen Einfluss auf die Reaktivität der Galactose ausübt, zeigt eine Substitution in der 3-Position bereits eine deutliche Auswirkung. Dies ist unter anderem auf den größeren induktiven Effekt zurückzuführen, welcher sich über chemische Bindungen auswirkt. Hier ist die 3-Position dem reaktiven Zentrum um eine Bindung näher, was ausreicht, um signifikante Unterschiede in der Reaktivität zu verursachen. Das 6-Di-F-Derivat weist zwei Fluorsubstituenten auf und hat somit eine größere induktive Wirkung. Auch die bereits

angesprochene Flexibilität der 6-Position kann einen Einfluss auf die Reaktionsträgheit besitzen. (vgl. Abb. 3.92) Die Unterschiede in den erhaltenen Ausbeuten und der Reaktivität werden in der nachfolgenden Tabelle nochmals gegenübergestellt.

	4-F-Baustein	3-F-Baustein	6-Di-F-Baustein	nat. Baustein ^[140,148]
	60%	69%	51%	90%
	90%	67%	42%	93%

Tab. 3.5: Übersicht über die Ausbeuten der fluorierten Schlüsselverbindungen

3.3 Synthese des 6-Di-F-T_N-Antigens

Synthese des 6-Di-F-T_N-Antigens über das Galactal

Im vorangegangenen Kapitel wurde die Synthese eines difluorierten Galactosylbromids **3** beschrieben. Von diesem ausgehend sollte nun die Darstellung des ersten Vertreters eines 6,6-Di-F-T_N-Antigens erfolgen, wozu zunächst die reduktive Eliminierung zum Difluorgalactal **7** durchgeführt werden musste. In Analogie zu den bereits diskutierten fluorierten Galactalderivaten wurde hierzu das Bromid **3** mit aktiviertem Zink und Methylimidazol in Essigsäureethylester behandelt. (Abb. 3.95)

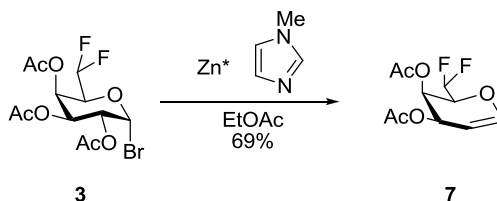


Abb. 3.95: Reduktive Eliminierung des anomeren Bromids **3** zum Galactal **7**

Nachdem diese Reaktion in einer Ausbeute von 69% erfolgreich durchgeführt werden konnte, sollte das erhaltene Produkt **7** in einem nächsten Schritt einer Azidonitratisierung nach *Lemieux*^[96] unterworfen werden.

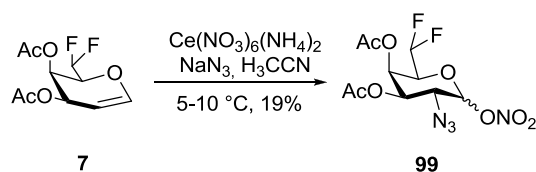


Abb. 3.96: Azidonitratisierung nach *Lemieux* zu **99**

Dazu wurde **7**, wie bei den vorherigen Reaktionen (vgl. Abb. 3.32) zunächst bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ mit Cerammoniumnitrat und Natriumazid in Acetonitril umgesetzt. Während bei dieser Temperatur das nicht-fluorierte Galactal innerhalb von 18 Stunden in einer Ausbeute von 61% zum gewünschten Azidonitrat reagierte, konnte jedoch mit **7** keinerlei Umsatz beobachtet werden. Daher wurde die Temperatur sukzessive erhöht, bis schließlich bei $5-10\text{ }^\circ\text{C}$ die Produktbildung schleppend eintrat. Nach einer Reaktionszeit von insgesamt 96 Stunden wurde die Reaktion schließlich abgebrochen und das difluorierte Azidonitrat neben weiteren nicht identifizierten Zersetzungsprodukten in 19% Ausbeute nach Flashchromatographie isoliert. Aufgrund dessen Instabilität gegenüber Hydrolyse wurde **99** sofort in das anomere Bromid **100** überführt, das ebenfalls nur in einer mäßigen Ausbeute von 10% erhalten werden konnte. (Abb. 3.97)

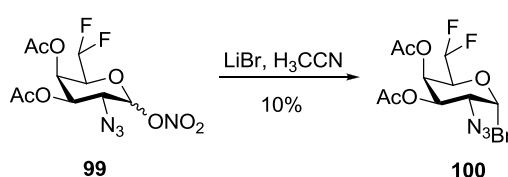


Abb. 3.97: Reaktion zum Azidobromid **100**

Auch bei diesen Reaktionen scheint der elektronenziehende, d.h. desaktivierende Einfluss der beiden Fluorsubstituenten die Produktbildung zu hemmen. So ist sowohl der elektrophile Angriff auf die Doppelbindung von **7** als auch die Substitution der anomeren Abgangsgruppe von **99** im Vergleich zu den nicht-fluorierten Analoga erschwert. Allerdings verliefen diese Umsetzungen noch nicht unter optimierten Reaktionsbedingungen, so dass eine Ausbeutesteigerung durchaus möglich wäre. Vor dem Hintergrund, dass in den bisherigen Synthesen das gewünschte Azidobromid **100** aus **7** über zwei Stufen in einer Ausbeute von

lediglich 0.2% erhalten werden konnte, wurde jedoch auf eine Weiterführung und Optimierung dieser Route verzichtet und stattdessen ein alternativer Syntheseweg zur Darstellung des in 6-Position difluorierten T_N-Antigens **90** gesucht.

Synthese des 6,6-Di-F-T_N-Antigens durch direkte Fluorierung

Um möglichst schnell zu einem difluorierten T_N-Antigen zu gelangen, erschien die Einführung des geminalen Difluorids auf der Stufe eines T_N-Vorläufers reizvoll. Hierfür musste zunächst eine geeignete Schutzgruppenstrategie entwickelt werden, die eine Oxidation der 6-Position zum Aldehyd und die anschließende DAST-vermittelte Fluorierung erlaubt. Da sich hierfür die Isopropyliden-Schutzgruppe bereits beim Aufbau des difluorierten Galactosylbromids als stabil erwiesen hatte, wurde diese in das entsprechende deblockierte T_N-Derivat **102** eingebaut. Dazu wurde **58** in Dimethoxypropan gelöst, mit katalytischen Mengen an Camphersulfonsäure versetzt und über einen Zeitraum von drei Tagen gerührt. (Abb. 3.98) Zwar entstand zunächst das falsche Isomer **101**, doch konnte dieses unter Zugabe einer Wasser-Methanol-Mischung und Erhitzen der Lösung auf 65 °C ^[149] in das gewünschte 3,4-*O*-Isopropyliden-Derivat **102** überführt werden, das in einer Ausbeute von 79% erhalten wurde.

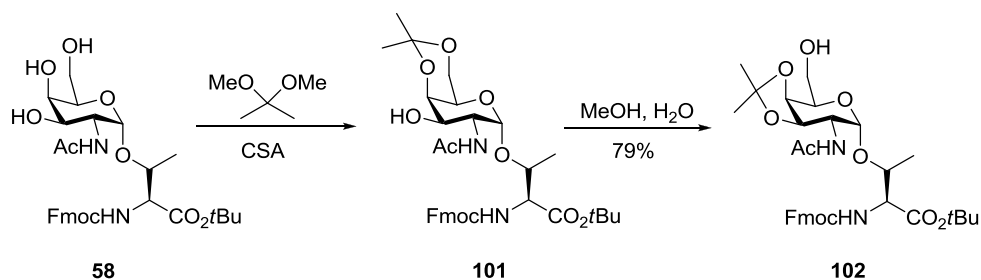


Abb. 3.98: Synthese des isopropyliden-geschützten T_N-Bausteins **102**

Die verbleibende freie OH-Gruppe von **102** sollte anschließend zum entsprechenden Aldehyd oxidiert werden. Aus der Fülle der Oxidationsmethoden in der organischen Synthese wurde hierfür zunächst eine Oxidation unter *Swern*-Bedingungen ^[142,143] ausgewählt, da sich diese bei der Darstellung des Aldehyds **103** der diisopropyliden-geschützten Galactose bewährt hatte. (vgl. Abb. 3.84) Da hierbei jedoch zunächst kein Produkt isoliert werden konnte, wurden die Äquivalente an Oxidationsmittel von zunächst zwei auf fünf erhöht. Doch auch unter diesen Reaktionsbedingungen wurde der gewünschte Aldehyd nicht gebildet und es trat stattdessen die Zersetzung des Edukts auf. Als Alternative wurde daher die Oxidation unter Verwendung

des Dess-Martin-Periodinan-Reagenzes^[150] untersucht, wobei jedoch erneut keine Produktbildung beobachtet wurde. Nachdem auch hier die Äquivalentzahl des oxidierenden Reagenzes von 1.5 auf fünf erhöht wurde, konnte ebenfalls nur die Zersetzung des Eduktes festgestellt werden. (Abb. 3.99)

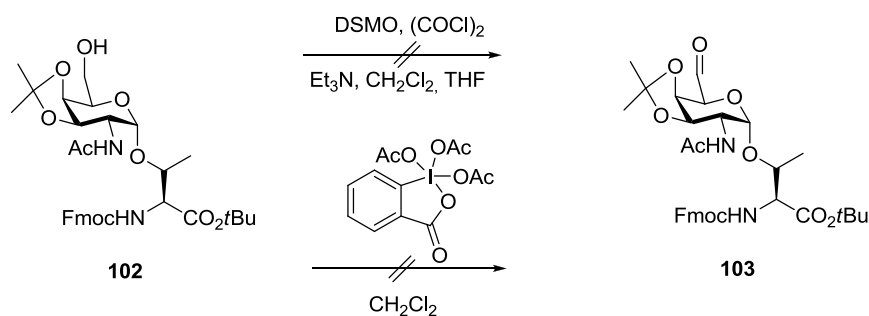


Abb. 3.99: Erfolgreiche Versuche zur Oxidation des Alkohols **102** zum Aldehyd **103**

Eine weitere Möglichkeit zur Oxidation bilden Chromsalze, die ebenfalls in der Lage sind, primäre Alkohole zu Aldehyden umzusetzen, sofern kein Wasser zugegen ist, durch das der gebildete Aldehyd über das Hydrat zur Carbonsäure oxidiert werden würde. Bei Verwendung von Pyridiniumdichromat (PDC), welches bereits erfolgreich in der Oxidation des sekundären Alkohols auf dem Weg zur 3-F-Galactose eingesetzt wurde, (vgl. Abb. 3.19) konnte das gewünschte Produkt in 40% Ausbeute isoliert werden.^[151,152] (Abb. 3.100)

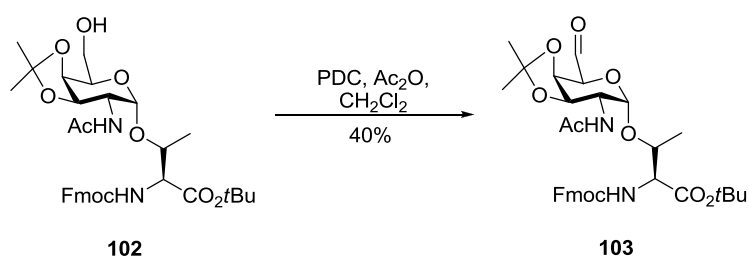


Abb. 3.100: Erfolgreiche Oxidation zum Aldehyd **103** mittels PDC

Hierbei ist zu bemerken, dass laut DC-Kontrolle ein vollständiger Umsatz des primären Alkohols zu dem Aldehyd erfolgt war. Die relativ großen Ausbeuteverluste scheinen daher primär ein Problem der Aufarbeitung bzw. Reinigung zu sein. Der Aldehyd **103** wurde sofort nach der Säulenchromatographie einer Fluorierungsreaktion mit DAST[®] in Dichlormethan unterworfen.^[145,146,153] (Abb. 3.101)

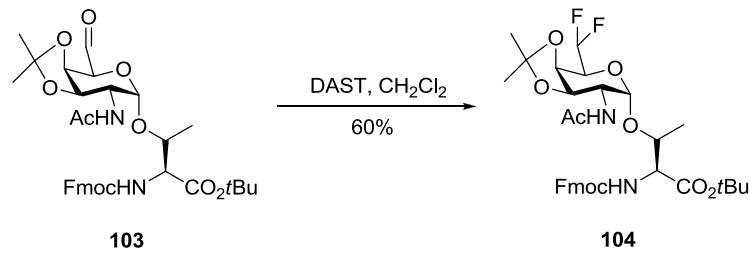


Abb. 3.101: Fluorierung des Aldehyds 103 zum 6,6-Di-F-T_N-Antigen 104

Nach einer Reaktionszeit von lediglich drei Stunden konnte das difluorierte Produkt in einer guten Ausbeute isoliert werden, das somit in einer vergleichsweise kurzen Reaktionssequenz über vier Stufen ausgehend von **58** und mit einer Gesamtausbeute von 16% erhalten wurde. Dieses Produkt stellt einen idealen Vorläufer für weiterführende Synthesen dar, indem durch Deblockierung der beiden Alkoholfunktionen in 3- und 4-Position und selektiver 3 β -Galactosylierung das T-Antigen aufgebaut werden kann, welches wiederum einen Vorläufer für das 2,3-ST-Antigen-Analogon darstellen würde. Auch die Einführung weiterer Fluorzucker zu mehrfach fluorierten T-Antigenderivaten ist ausgehend von diesem Donor denkbar. (Abb. 3.102)

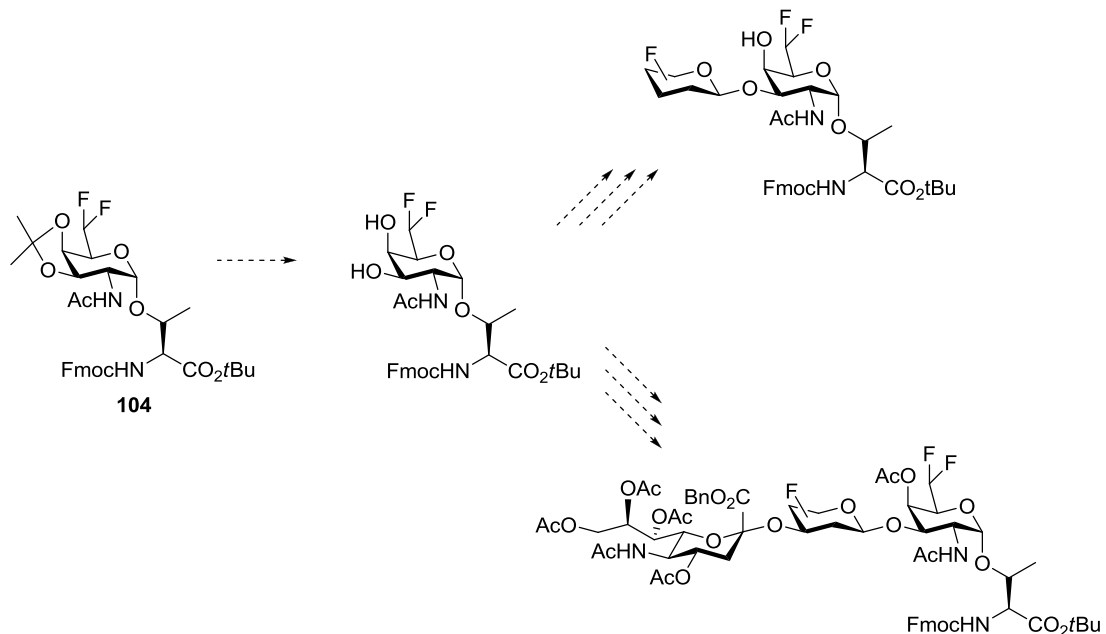


Abb. 3.102: Weitere mögliche Synthesen basierend auf dem difluorierten T_N-Antigen 104

3.4 Untersuchung zur Stabilität fluorierter T-Antigen-Analoga

Nachdem bisher die erfolgreiche Synthese neuartiger fluorierter tumorassoziierter Kohlenhydratantigene beschrieben wurde, soll nun im Folgenden das Augenmerk auf deren metabolische Stabilität gerichtet werden. Beim Einsatz von MUC1-Glycopeptiden in Lebewesen unterliegen diese Strukturen dem Abbau durch Enzyme. Bei Verwendung der T-Antigenstruktur als Kohlenhydratepitop sind hierbei in erste Linie β -Galactosidasen zu nennen, die als Hydrolasen einen Abbau des Disaccharids **105** zur Galactose **20** und zum Galactosamin-Baustein **58** katalysieren. (Abb. 3.103)

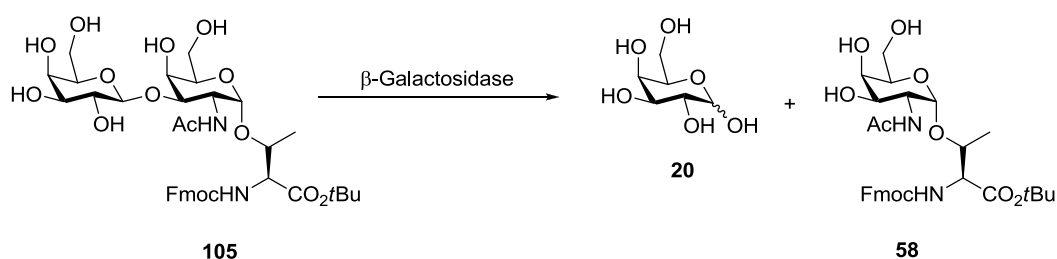


Abb. 3.103: Wirkungsweise der β -Galactosidase

Um aber eine möglichst starke Immunantwort gegen die synthetischen Antigene zu erzeugen, ist eine lange Lebensdauer der Konjugate von großer Wichtigkeit. Je länger der Zeitraum ist, in dem die vollständigen Vakzine dem Immunsystem zur Verfügung stehen, desto stärker sollte die Immunantwort auf diese Strukturen ausfallen.

Die Einführung eines Fluorsubstituenten kann dabei einen großen Einfluss auf die enzymatische Stabilität des Kohlenhydrats ausüben. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass 2-Desoxy-2-fluor-glycoside sehr gute Inhibitoren für Glycosidasen darstellen,^[53] da deren Fluorsubstituenten die bei der Hydrolyse entstehenden Oxocarbeniumionen stark destabilisieren. (Abb. 3.104)

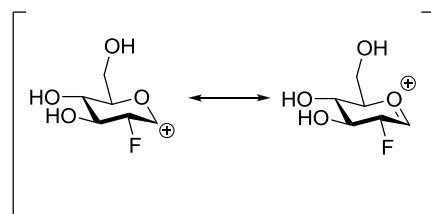


Abb. 3.104: Destabilisiertes fluoriertes Oxocarbeniumion als Intermediat einer Glycosidase-Reaktion

So kommt es mit diesen Verbindungen zwar zu einer Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes, jedoch reagiert dieser nicht unter Hydrolyse weiter, so dass es zu einer

Akkumulation dieses Enzym-Substrat-Komplexes kommt, wodurch die Konzentration an freiem Enzym verringert wird.^[53]

Um einen Hinweis auf die metabolische Stabilität der hergestellten fluorierten T-Antigen-Analoga **106-110** zu erhalten, sollte deren Abbau durch eine kommerziell verfügbare β -Galactosidase untersucht werden. Dazu wurden diese Verbindungen zusammen mit zwei weiteren, zuvor hergestellten, fluorierten T-Antigen-Derivaten^[107,154] in entsprechenden Abbaureaktionen eingesetzt. Da sich alle Verbindungen in ihrem Fluorsubstitutionsmuster unterscheiden, sollte mit diesen Experimenten Hinweise darauf erhalten werden, ob und an welcher Position die Einführung eines Fluoratoms einen Stabilitätsgewinn mit sich bringt. (Abb. 3.105)

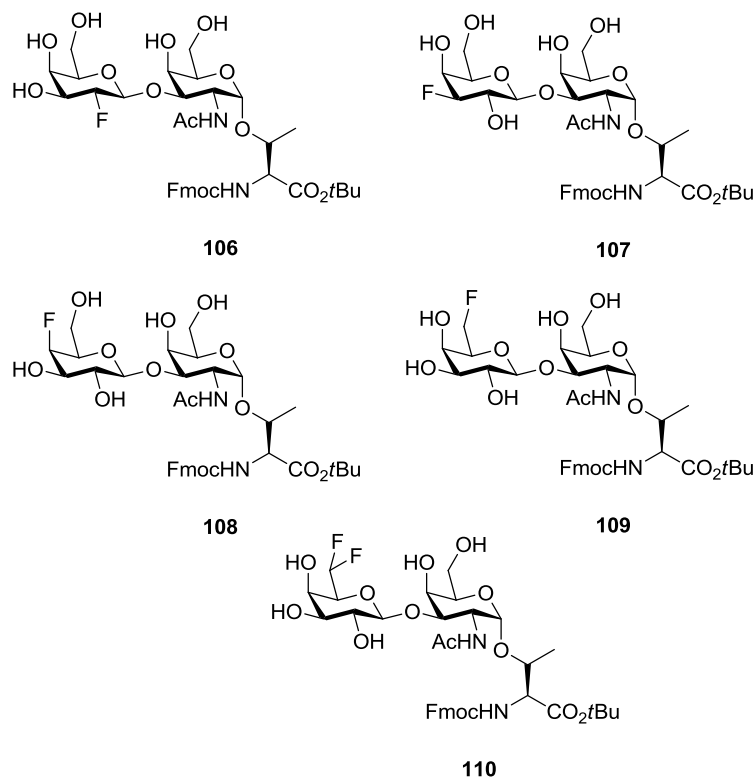


Abb. 3.105: Fluorierte Substrate für die Stabilitätstests

Um geeignete wasserlösliche Substrate für die Enzymreaktion zu erhalten, mussten zunächst in einer Umesterung nach Zemplén sämtliche Alkoholfunktionen deblockiert werden. Dies geschah durch Behandlung mit NaOMe in MeOH bei einem pH-Wert von 8.5. Da bei dieser Reaktion ein teilweiser Verlust der Fmoc-Schutzgruppe meist nicht zu vermeiden ist, wurde diese im Anschluss an die Deblockierung durch Umsetzung des Rohprodukts in Dichlormethan mit Fmoc-OSu und Diisopropylethylamin (DIPEA) bei einem pH-Wert von

9.5 erneut eingeführt. Nach beendeter Reaktion wurden die Produkte jeweils mittels semipräparativer HPLC gereinigt. (Abb. 3.106)

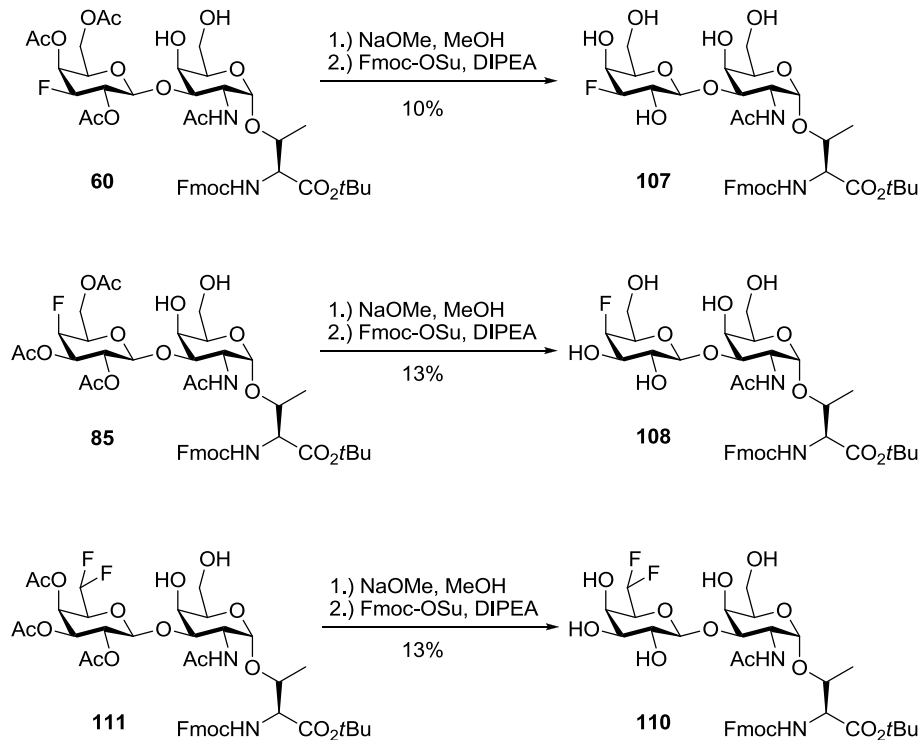


Abb. 3.106: Synthese der für die Enzymtests benötigten Substrate **107**, **108** und **110**

Die geringen Ausbeuten von 10-13% können auf die recht langen Reaktionszeiten von fünf bis sieben Tagen zurückgeführt werden, wobei der pH-Wert ständig nachreguliert werden musste. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass aufgrund der langen Reaktionszeit und bei jedem Nachregulieren des pH-Wertes auch kurzzeitig basischere Bedingungen auftraten, die zu einer β -Eliminierung führen, sind die mäßigen Ausbeuten vermutlich dieser Nebenreaktion geschuldet. (Abb. 3.107)

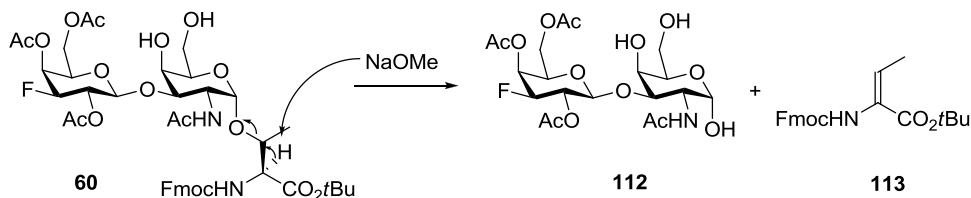


Abb. 3.107: β -Eliminierung an der Glycosylaminosäure **60**

Um eine qualitative Aussage über die Stabilität der deblockierten T-Antigene **107**, **108** und **110** gegenüber einer β -Galactosidase treffen zu können, muss auch die Lebensdauer des

natürlichen, nicht-fluorierten T-Antigens getestet werden. Daher wurde in einer weiteren Synthese dieses Disaccharid unter Verwendung literaturbekannter Vorschriften^[139,140] aufgebaut.

Zunächst wurden ebenfalls mit einer *Helferich*-Glycosylierungsreaktion^[75] der bereits beschriebene Donor **54** und der T_N-Akzeptor **12** zum Disaccharid **114** verknüpft.^[139,140]

Anschließend wurde das vorhandene Benzylidenacetal unter leicht sauren Bedingungen gespalten und die vorhandenen *O*-Acetyl-Gruppen wurden mittels Zemplén-Umesterung entfernt.^[94,106,136] (Abb. 3.108)

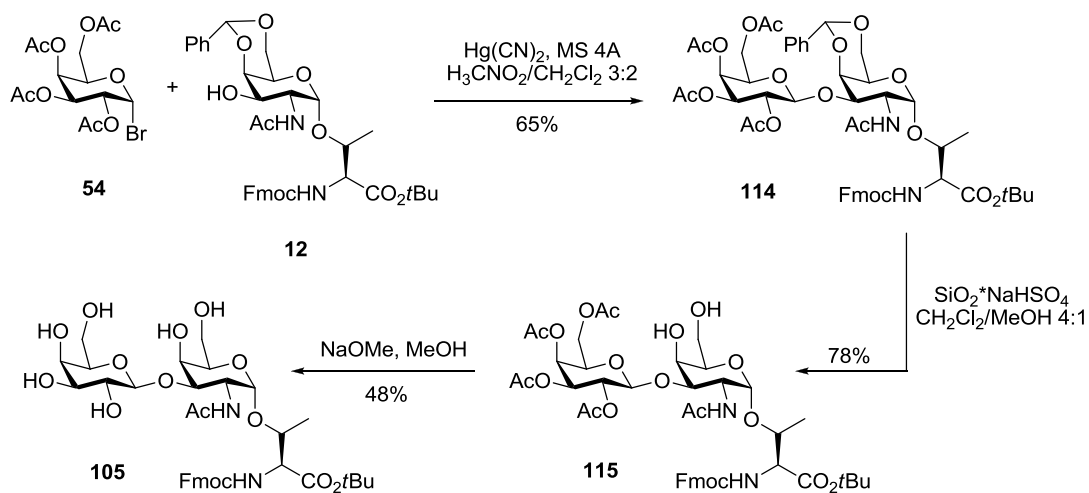


Abb. 3.108: Synthese des natürlichen T-Antigens **105** für die Enzymtests

Nachdem nun alle benötigten Strukturen vorhanden waren, musste anschließend ein geeignetes Verfahren entwickelt werden, mit dessen Hilfe die relative Stabilität der Disaccharide abgeschätzt werden kann. Da die Aminofunktion des Threonins jeweils durch die Fmoc-Schutzgruppe blockiert vorlag, besitzen diese Substanzen einen ausgezeichneten Chromophor, dessen charakteristische Absorptionsbande bei 264 nm sich gut zum Nachweis des beim Abbau erhaltenen T_N-Derivats nutzen lässt. Weiterhin konnte davon ausgegangen werden, dass sowohl das Disaccharid als auch das T_N-Antigen unterschiedliche Polaritäten besitzen, die sich zur Detektion und Identifizierung mittels RP-HPLC eignen. Aufgrund der charakteristischen Retentionszeit sollte somit daher neben dem Edukt auch das bei der Abbaureaktion stets entstehende T_N-Derivat eindeutig zu identifizieren sein.

Bei der Auswahl eines geeigneten Enzyms wurde auf eine β -Galactosidase aus Rinderhoden [E.C. 3.2.1.23] zurückgegriffen, die als Galactosyltransferase bereits zum Aufbau des natürlichen T-Antigens herangezogen worden war.^[155] Galactosidasen sind in der Lage, einen Galactosyl-Rest abzuspalten (Hydrolase) oder auch einen Galactosylsubstituenten anzubinden

(Galactosyltransferase). Die jeweilige Reaktionsweise ist dabei abhängig von den Konzentrationen, der Temperatur und der Reaktionsdauer. Da in den geplanten Stabilitätstests lediglich Disaccharidbausteine vorliegen, kann es zunächst nur zu einer Hydrolaseaktivität des Enzyms kommen. Die Enzymreaktion wurde in einer wässrigen Pufferlösung durchgeführt, wobei der pH-Wert dieser Lösung auf einen Wert von $\text{pH} = 4.5$ eingestellt wurde, da die Enzymreaktion bei kleineren pH-Werten deutlich schneller abläuft. Als Puffer wurde 2-(*N*-Morpholin)ethansulfonsäure (MES-Puffer) verwendet^[138] und zur Löslichkeitsvermittlung^[156,157] der T-Antigen-Derivate β -Cyclodextrin.^[158,159,160] Bei Cyclodextrinen handelt es sich um aus Glucosemolekülen bestehende ringförmige α -(1 \rightarrow 4)-verknüpfte Oligosaccharide. Dabei unterscheidet man zwischen α -, β -, γ -, und δ -Cyclodextrinen, die aus jeweils sechs, sieben, acht oder neun Glucoseeinheiten aufgebaut sind. (Abb. 3.109)

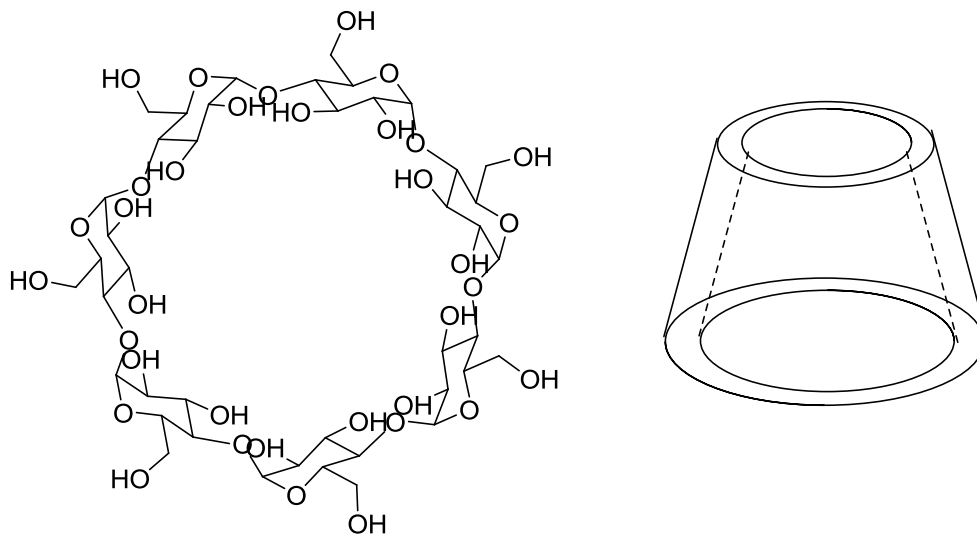


Abb. 3.109: β -Cyclodextrin und schematische Darstellung

Wie in Abb. 3.109 gezeigt, ähneln die Cyclodextrine in ihrer Geometrie einem Kegelstumpf, dessen Innendurchmesser von der Anzahl der Glucoseeinheiten abhängig ist. So sind α -Cyclodextrine sehr gut geeignet, um etwa unverzweigte Alkylketten einzuschließen, während β -Cyclodextrine bereits in der Lage sind, Benzol und Naphthalin aufzunehmen.^[161,162,163] Aufgrund der Komplexierung der Gastmoleküle durch die Cyclodextrine ändern sich die Löslichkeitseigenschaften der eingeschlossenen Verbindung. Die hydrophile Außenseite der Cyclodextrine erhöht die Löslichkeit des Cyclodextrin-Gast-Komplexes in polaren Solventien im Vergleich zur Löslichkeit des Gastmoleküls erheblich. Dieser Effekt der

Löslichkeitsvermittlung wurde bereits erfolgreich in einer Glycosidase-katalysierten Hydrolyse eingesetzt.^[164,165]

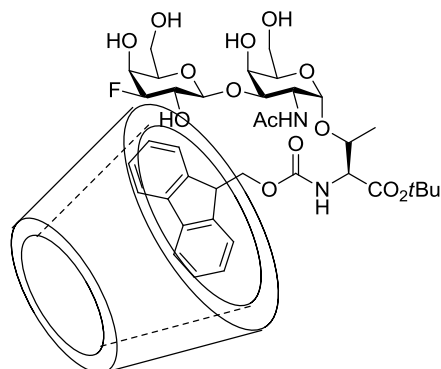


Abb. 3.110: Schematische Darstellung der Komplexierung der Fmoc-Gruppe durch Cyclodextrine

Weiterhin ist bekannt, dass *O*-methylierte Cyclodextrinderivate eine stärkere Komplexierung des Gastmoleküls aufweisen als unsubstituierte Cyclodextrine.^[166] So konnte gezeigt werden, dass Heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- β -cyclodextrin die Löslichkeit des Fmoc-Thr(α GalNAc)-*Or*Bu-Bausteins **58** um das Hundertfache erhöhen kann,^[138] weshalb dieses β -Cyclodextrinderivat auch als Löslichkeitsvermittler bei den hier beschriebenen enzymatischen Tests zum Einsatz kommen sollte.

Hierfür wurde eine 5 mM Lösung des entsprechenden T-Antigens in einer 10 mM Lösung von Heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- β -cyclodextrin in 10 mM MES-Puffer (pH = 4.5) mit 0.5 mg/mL BSA (Rinderserumalbumin) und 0.1 U β -Galactosidase versetzt und stark geschüttelt. Innerhalb fester Zeitabstände wurde mittels HPLC der Fortschritt der Reaktion kontrolliert, wobei ein Zusatz von BSA der Adsorption des Enzyms an der Gefäßinnenwand entgegen wirken sollte.

Mittels analytischer HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264$ nm) wurden die entnommenen Proben untersucht und die Retentionszeit des Produktes der enzymatischen Reaktion ermittelt. Im Falle der natürlichen Antigenstruktur **104** konnte zunächst ausreichend unterschiedliche Retentionszeiten für das T-Antigen und dessen Abbauprodukt, das T_N-Antigen **58**, festgestellt werden. (Abb. 3.111 und Abb. 3.112)

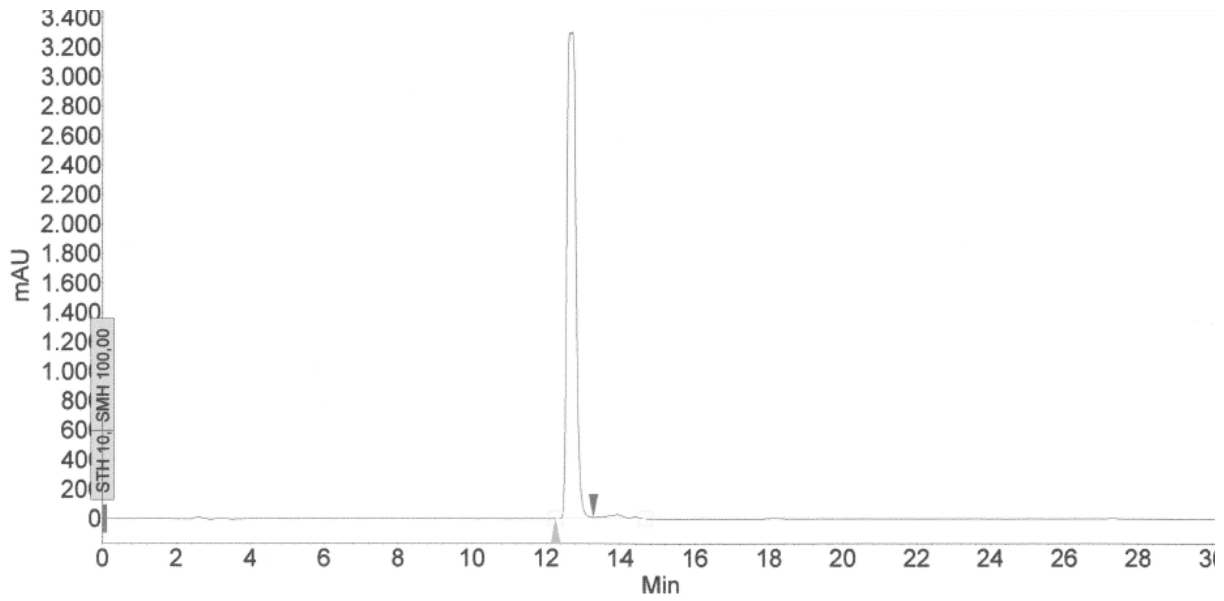


Abb. 3.111: HPLC-Profil des natürlichen T-Antigens 105 in Pufferlösung ($\lambda = 264\text{nm}$)

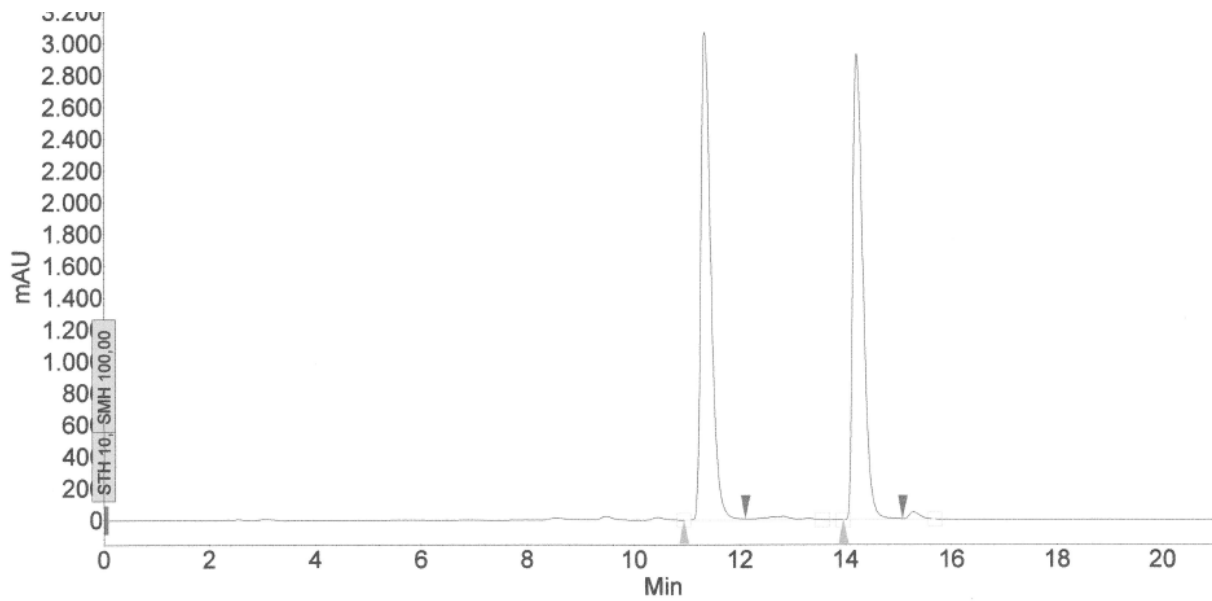


Abb. 3.112: HPLC-Profil des natürlichen Antigen 105 in Pufferlösung 120 Minuten nach Zugabe des Enzyms ($\lambda = 264\text{nm}$)

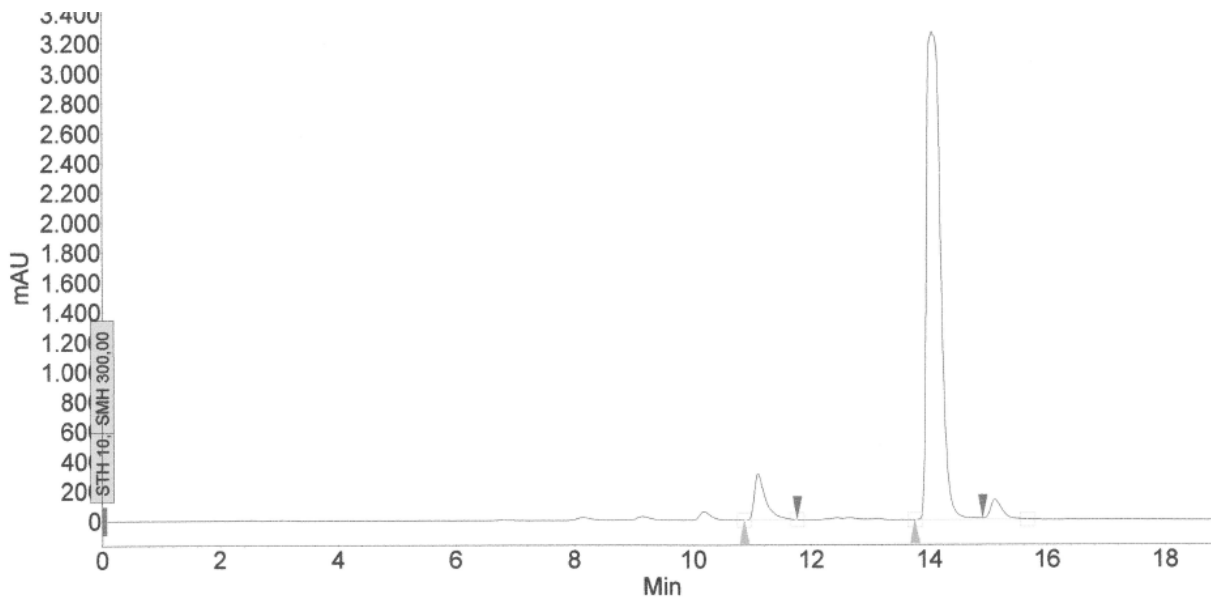


Abb. 3.113: HPLC-Profil des natürlichen TN-Antigens 58 in Pufferlösung 420 Minuten nach Zugabe des Enzyms ($\lambda = 264\text{nm}$)

Bei der Untersuchung der natürlichen Verbindung **105** unter den Assay-Bedingungen konnte das vorgelegte Disaccharid als auch eine zweite UV-aktive Substanz mittels HPLC beobachtet werden. Die Intensitätsabnahme des Signals für **105** erfolgte recht schnell, so dass bereits nach 120 Minuten etwa die Hälfte des eingesetzten T-Antigens abgebaut worden war. (Abb. 3.114) Durch den Vergleich der Retentionszeiten konnte der neu entstandene Peak im Chromatogramm dem sich neubildenden T_N -Antigen zugeordnet werden. Die Reaktion wurde weitergeführt, bis lediglich noch ein ganz schwaches Signal des T-Antigens zu erkennen war. Die vorhandene rohe Reaktionslösung wurde anschließend mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht, wobei neben dem in großem Überschuss vorliegenden β -Cyclodextrin auch das T_N -Antigen mit einer Masse von 601.33 im ESI-Spektrum nachgewiesen werden konnte. In dem Massenspektrum trat jedoch kein Signal mehr auf, welches dem natürlichen T-Antigen zugeordnet werden konnte.

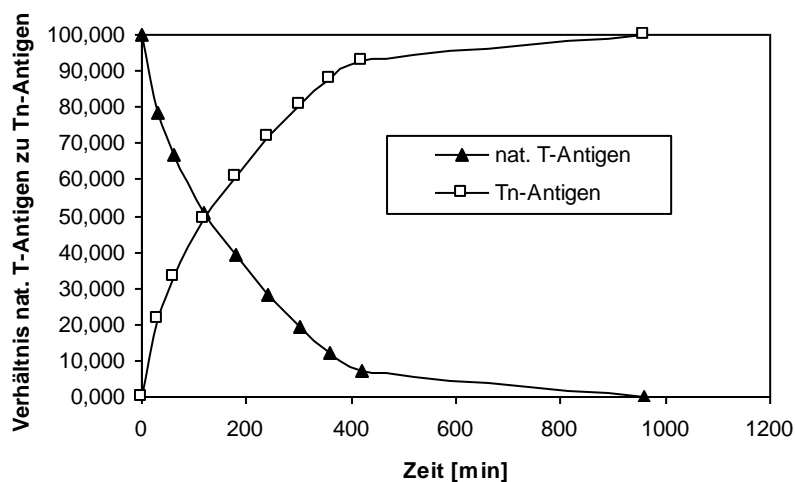


Abb. 3.114: Reaktionsverlauf der enzymatischen Hydrolyse des natürlichen T-Antigen 105

Anschließend wurden die verschiedenen fluorierten T-Antigen-Analoga unter identischen Reaktionsbedingungen hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber der β -Galactosidase aus Rinderhoden getestet. (Abb. 3.115)

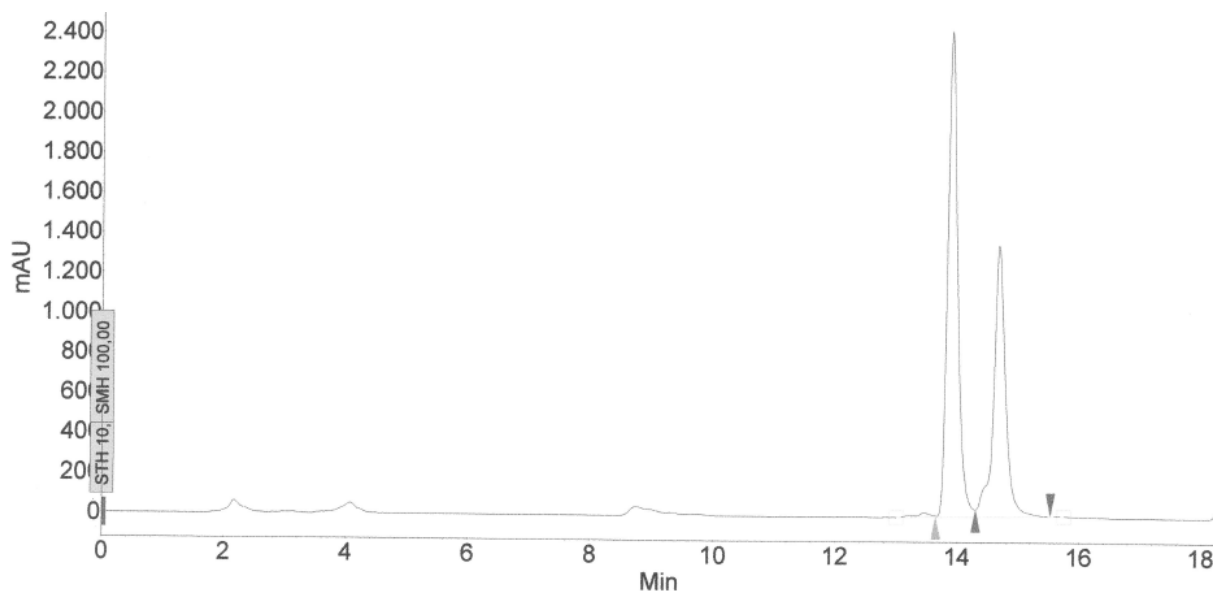


Abb. 3.115: HPLC-Profil des 6'-F-T-Antigen 109 in Pufferlösung 33.5 Stunden nach Zugabe des Enzyms ($\lambda = 264\text{nm}$)

Im Falle des 6'-F-T-Antigen konnte ebenfalls ein Abbau des Disaccharids festgestellt werden, was am zweiten Peak bei einer Retentionszeit von etwa 15 Minuten ersichtlich ist. (Abb. 3.116)

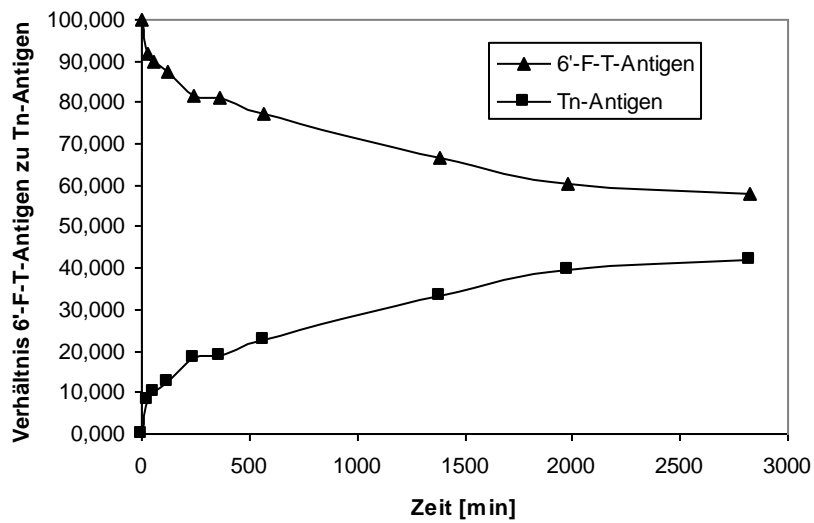


Abb. 3.116: Enzymatischer Abbau des 6'-F-T-Antigens **109**

Wie bei dem natürlichen Antigen wird eine kontinuierliche Abnahme der zum Disaccharid **109** gehörenden Signalintensität beobachtet, wobei die des T_N-Bausteins zunimmt. Allerdings verläuft dieser Abbau deutlich langsamer, so dass nach Ende der Messzeit, in diesem Falle nach knapp zwei Tagen, noch etwa 60% des Substrates vorhanden waren. Als Ursache hierfür kommt neben einer sehr langsamen Hydrolyse des gebildeten Enzym-Substrat-Komplexes auch eine deutlich schlechtere Erkennung des Substrats in Frage. Dadurch entsteht eine Art vorgelagertes Gleichgewicht, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt hier die Spaltung der glycosidischen Bindung ist. (Abb. 3.117)

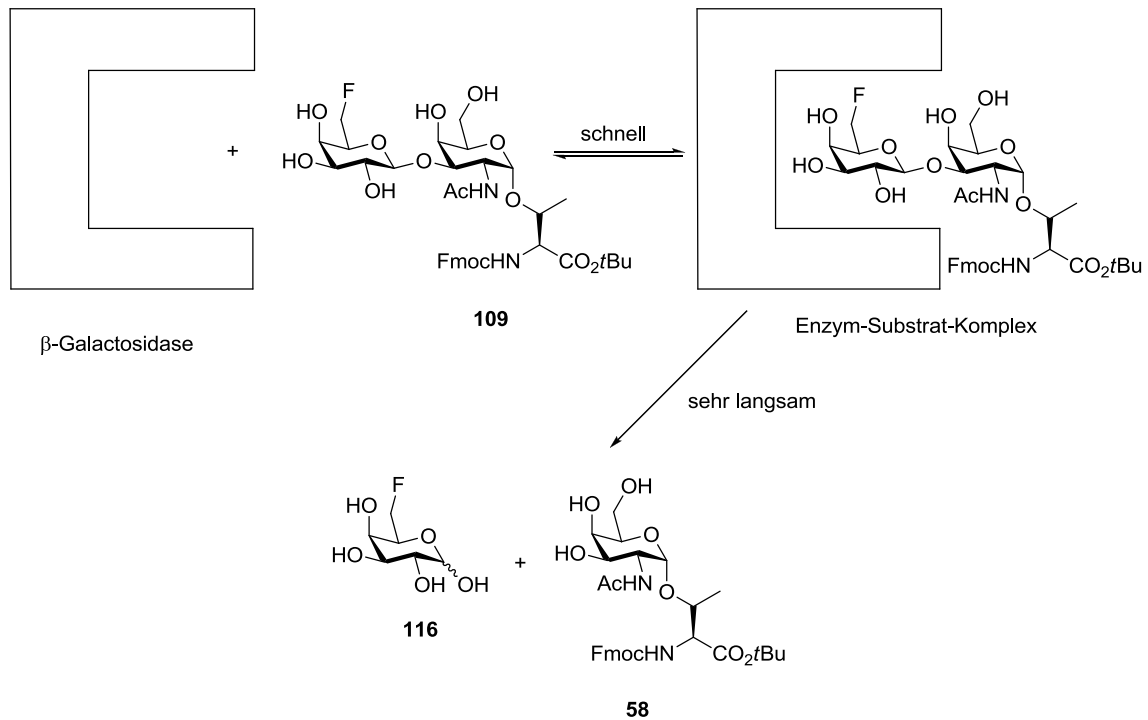


Abb. 3.117: Geschwindigkeit der Reaktion des fluorinierten T-Antigen **109** mit der β -Galactosidase

Zudem besteht die Möglichkeit, dass die bei der Hydrolyse gebildete 6-F-Galactose als Inhibitor der β -Galactosidase wirkt, wodurch das aktive Zentrum des Enzyms blockieren würde. Daher wurde in einem weiteren Versuch der Abbau des natürlichen T-Antigens in Anwesenheit der 6-F-Galactose durchgeführt. Würde es sich bei dieser um einen potenten Inhibitor handeln, so müsste eine deutliche Verlangsamung der Hydrolyse beobachtet werden können.

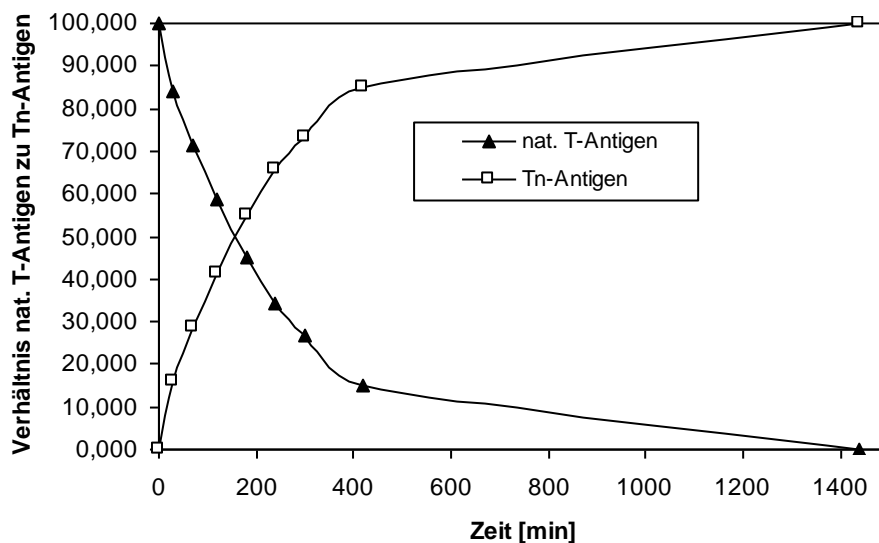


Abb. 3.118: Enzymatischer Abbau des nat. T-Antigen **105** in Anwesenheit der 6-F-Galactose **116**

Aus Abb. 3.118 ist jedoch ersichtlich, dass **115** allenfalls schwach inhibierend wirkt. Nach etwa 180 Minuten ist das Disaccharid **105** in Gegenwart des Fluorzuckers **116** bereits zu 50% abgebaut worden, was in etwa der zuvor beobachteten Halbwertszeit von 120 Minuten entspricht. Vermutlich liegt der Grund für die zuvor beobachtete unvollständige Hydrolyse des 6'-F-T-Antigens in einer Inaktivierung des Enzyms, die aus der langen Reaktionszeit bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 4.5 resultiert. Um genauere Aussagen hierüber zu treffen, wären jedoch weitere Versuche nötig, die aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten.

Anschließend sollte das in 3'-Position fluorierte T-Antigen-Analogon auf dessen Stabilität hin untersucht werden. Leider wurde jedoch festgestellt, dass sich dieses trotz einer relativ kurzen Lagerzeit bei -30 °C bereits zersetzt hatte. Dieser Befund steht allerdings mit verschiedenen, während der Synthese gemachten Beobachtungen im Einklang, die alle auf eine relativ große Instabilität der in 3-Position fluorierten Galactose deuten. (siehe Synthese des anomeren Bromids **1** bzw. des entsprechenden Galactals **18**)

Aus diesem Grund wurde mit dem in 4'-Position fluorierten T-Antigen fortgefahren. Hiervon wurden 3.82 mg in der beschriebenen Vorgehensweise gelöst und nach Ermittlung der Retentionszeit ebenfalls mit 0.1 Einheiten der Galactosidase versetzt. Der Fortschritt der Reaktion wurde erneut in festen Zeitabständen mittels HPLC kontrolliert, wobei jedoch kein Abbau des Substrates nachgewiesen werden konnte. (Abb. 3.119)

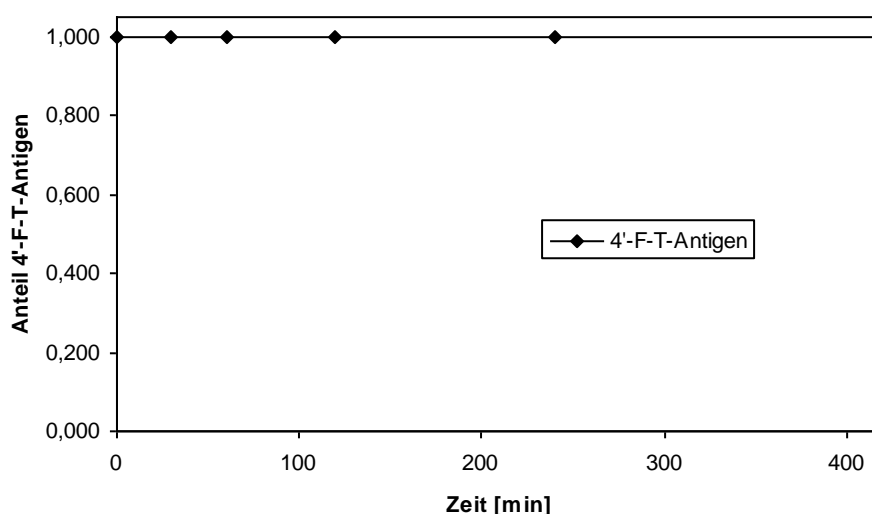


Abb. 3.119: Konstantbleibender Anteil des fluorierten Antigens **108** in Anwesenheit des Enzyms

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass das Enzym während der Lagerzeit beeinträchtigt worden war, wurden nach elf Stunden 1.20 mg des natürlichen T-Antigens der Lösung zugesetzt.

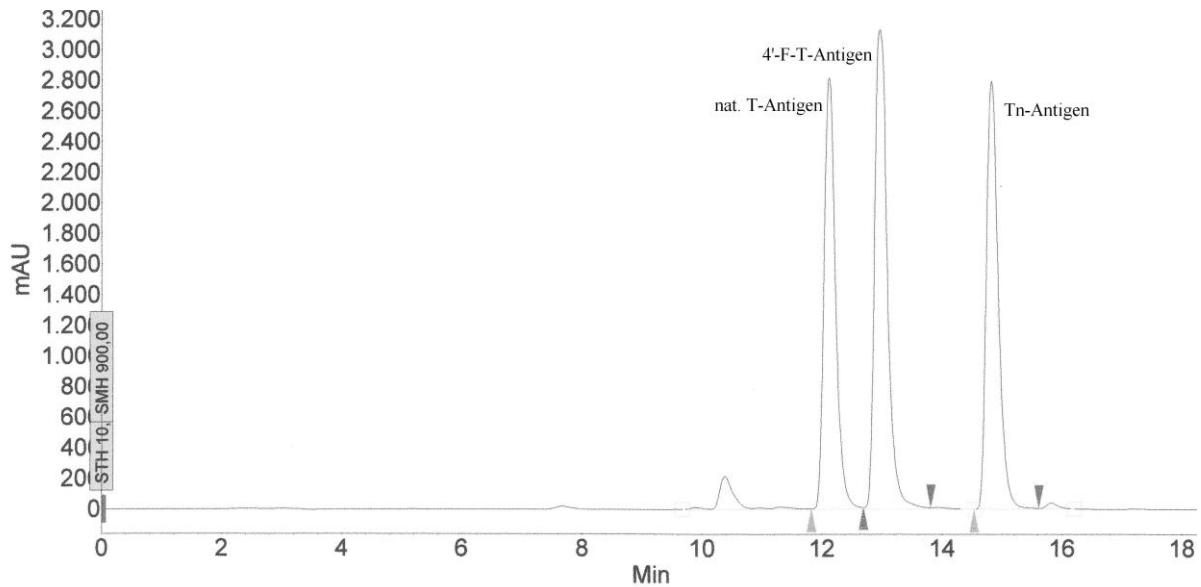


Abb. 3.120: HPLC-Profil des 4'-F-T-Antigens 108 in Pufferlösung 2 Stunden und 45 Minuten nach Zugabe des Enzyms ($\lambda = 264\text{nm}$)

Da diese Verbindung aber wie zuvor mit einer Halbwertszeit von etwa 150 Minuten umgesetzt wurde (siehe Massenspektrum in Abb. 3.122), kann davon ausgegangen werden, dass das Enzym intakt vorlag und das in 4-Position fluorierte T-Antigen gegenüber der hydrolytischen Spaltung stabil ist bzw. nicht vom Enzym als Substrat erkannt wird. (Abb. 3.121)

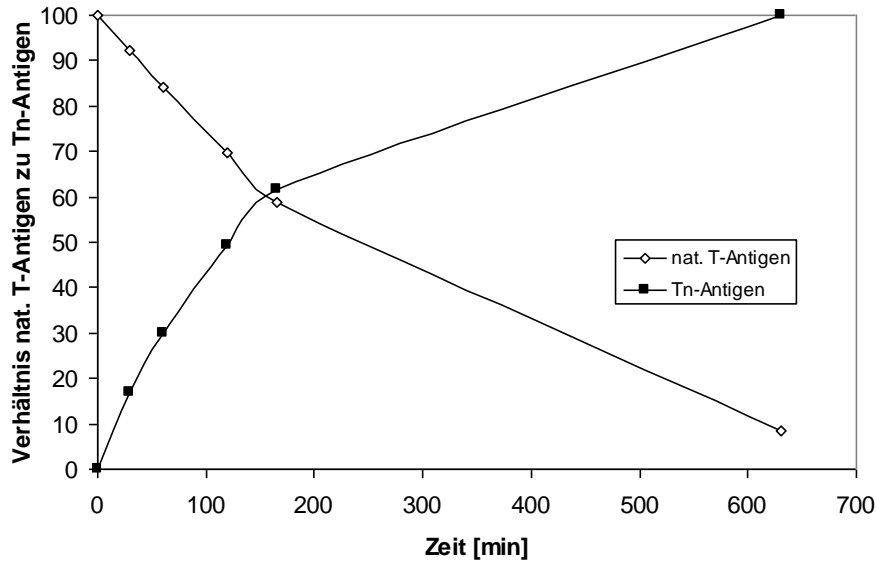


Abb. 3.121: Enzymatischer Abbau des natürlichen T-Antigens 105 in Anwesenheit des 4'-F-T-Antigens 108

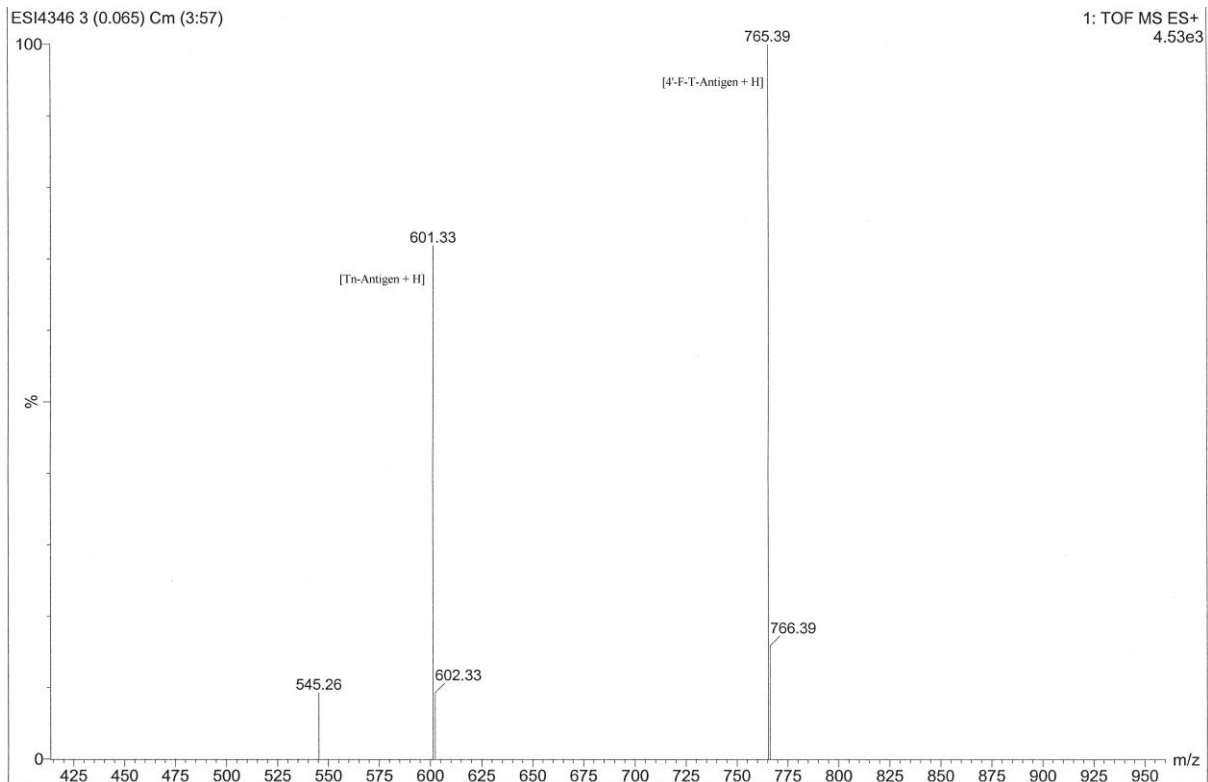


Abb. 3.122: ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Abbaus des natürlichen T-Antigens 105 zum T_N-Antigen 58 in Anwesenheit des 4'-F-T-Antigens 108

Interessanterweise verläuft der Abbau des nicht-fluorierten Antigens in Anwesenheit des 4'-F-Disaccharids etwas langsamer. Allerdings muss hierbei die Menge an zugesetztem Substrat berücksichtigt werden. Bei der Umsetzung des nicht-fluorierten Disaccharids **105** wurden

2.71 mg (3.55 mmol) eingesetzt, während hier nun lediglich 1.20 mg (1.57 mmol) **108** verwendet wurden. Während also zuvor in einer Stunde etwa 0.68 mg (0.89 mmol) des natürlichen Antigens von 0.1 Einheiten des Enzyms in 1 mL Pufferlösung abgebaut wurden, müssten bei einem Zeitraum von zweieinhalb Stunden 1.36 mg (2.22 mmol) Substrat hydrolysiert werden. Innerhalb dieser Zeit konnte bei Anwesenheit des in 4'-Position fluorierten Antigens jedoch nur eine Menge von etwa 0.60 mg (0.78 mmol) gespalten werden. Folglich wäre in etwa die 2.8-fache Zeit nötig, um in Gegenwart des 4'-F-Disaccharids **108** eine bestimmte Menge des natürlichen Substrats zu hydrolysieren.

Dies deutet darauf hin, dass das Enzym auch mit dem fluorierten Antigen einen Enzym-Substrat-Komplex eingeht, der jedoch praktisch nicht unter Bindungsspaltung weiterreagiert, sondern nach einer gewissen Lebensdauer das fluorierte Disaccharid wieder freisetzt.

Somit konnte mit dem 4'-F-T-Antigen **108** ein erster Vertreter eines fluorierten Antigens entwickelt werden, das aufgrund des Fluorsubstituenten eine deutlich erhöhte Stabilität gegenüber einer β -Galactosidase aufweist.

In analogen Tests wurde nun auch die Stabilität des in 6'-Position difluorierten Antigens untersucht. Hierbei konnte ebenfalls festgestellt werden, dass es nicht zu einem Abbau dieser Verbindung kommt. (Abb. 3.123)

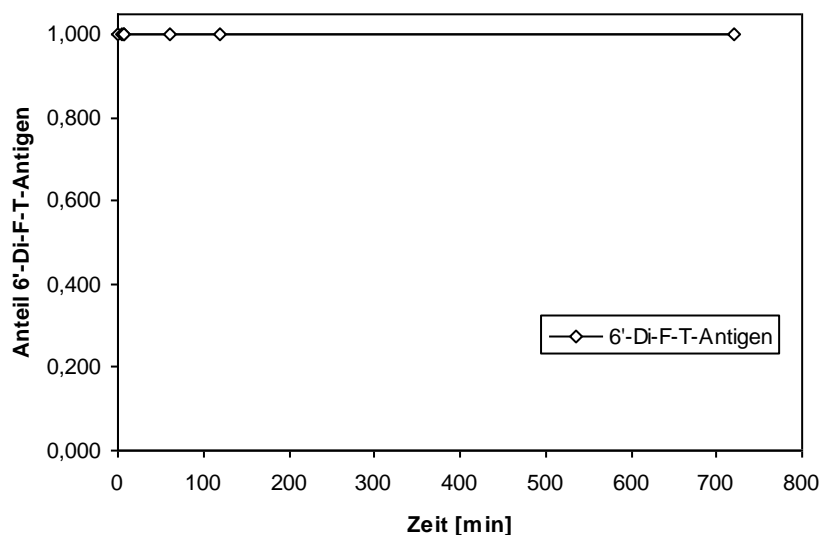


Abb. 3.123: Konstantbleibender Anteil des difluorierten Antigens 110 trotz Anwesenheit des Enzyms

Das zugesetzte natürliche Substrat wurde hingegen bereits nach kurzer Zeit zu den entsprechenden Monosacchariden umgesetzt, (Abb. 3.124) wie eine massenspektrometrische Analyse bestätigte.

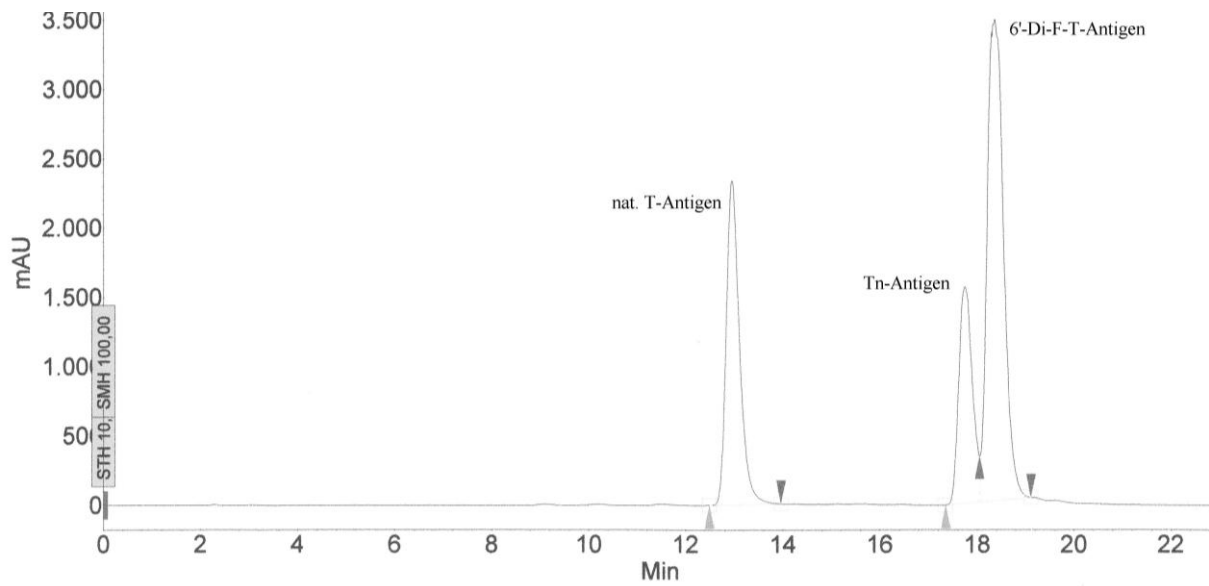


Abb. 3.124: HPLC-Profil des 6'-Di-F-T-Antigens 110 in Pufferlösung 2 Stunden nach Zugabe des Enzyms ($\lambda = 264\text{nm}$)

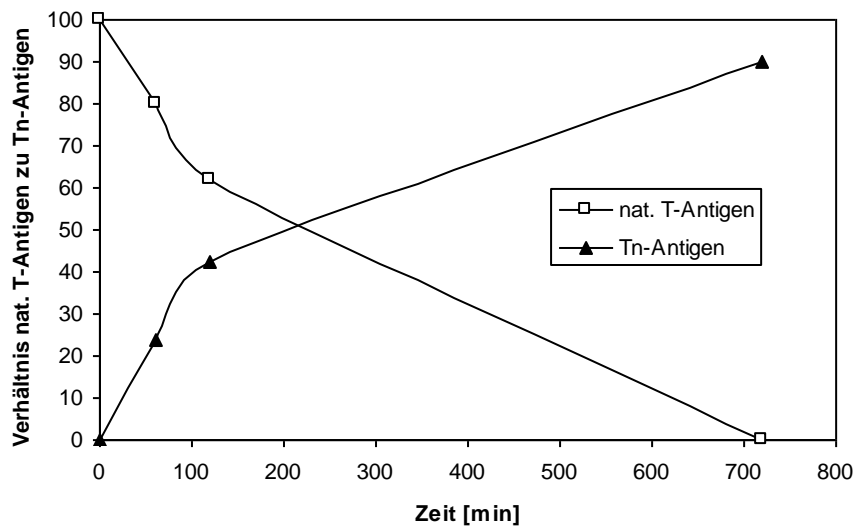


Abb. 3.125: Enzymatischer Abbau des natürlichen T-Antigens 105 in Anwesenheit des 6'-Di-F-T-Antigens 110

Aus dem Vergleich der beobachteten Halbwertszeiten und eingesetzten Massen resultiert eine etwa 2.2-fach geringere Aktivität des Enzyms in Gegenwart des difluorierten Disaccharids. In Analogie zum bereits diskutierten 4'-F-T-Antigen-Analogen könnte die fluorierte Verbindung **110** einen Enzym-Substrat-Komplex eingehen, der aber nicht in einer Bindungsspaltung resultiert, sondern nach einer gewissen Zeit das Disaccharid wieder freisetzt.

Schließlich wurde noch die Stabilität des 2'-F-T-Antigens gegenüber der β -Galactosidase in einer analogen Versuchsreihe untersucht. Nach einem ersten analytischen HPLC-Lauf, der zur Ermittlung der Retentionszeit des Substrates diente, wurde in Gegenwart von 0.1 Einheiten des Enzyms das Abbauverhalten geprüft. Hierbei konnte über einen Zeitraum von sechs Stunden ebenfalls keinerlei Hydrolyse festgestellt werden. (Abb. 3.126)

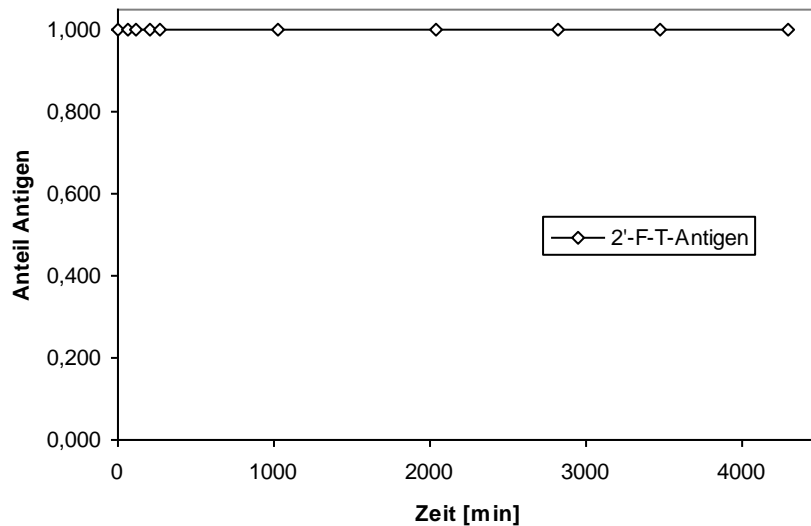


Abb. 3.126: Konstantbleibender Anteil des fluorierten Antigens 106 trotz Anwesenheit des Enzyms

Daher wurde erneut das nicht-fluorierte Antigen zugegeben und die Lösung in festen Zeitabständen mittels HPLC auf die Bildung des T_N-Antigens untersucht. (Abb. 3.127)

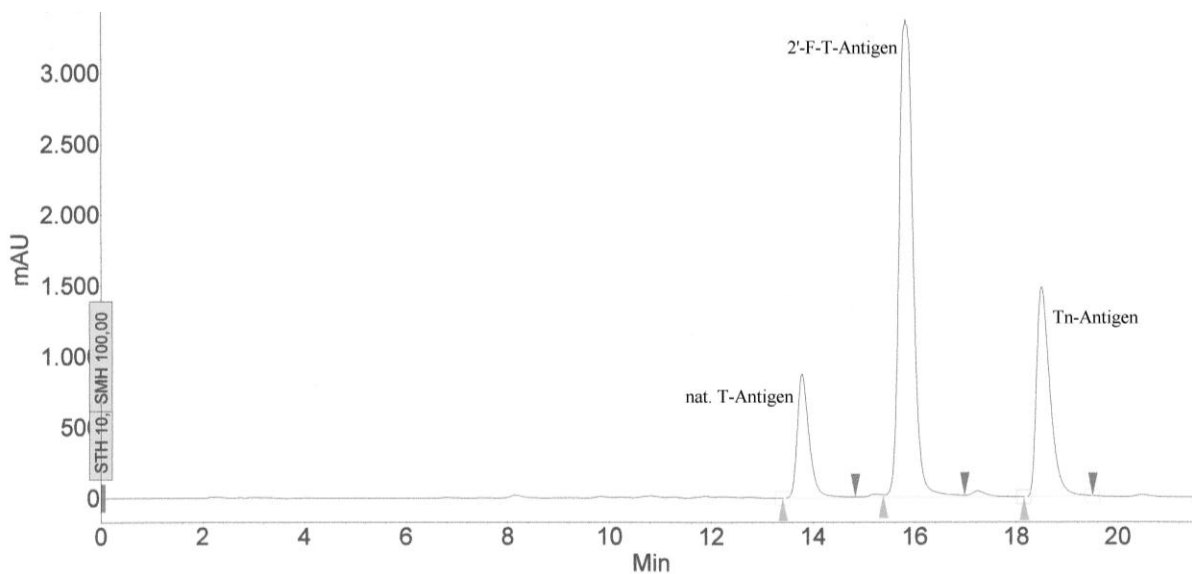


Abb. 3.127: HPLC-Profil des 2'-F-T-Antigens 106 in Pufferlösung 3 Tage nach Zugabe des Enzyms
($\lambda = 264\text{nm}$)

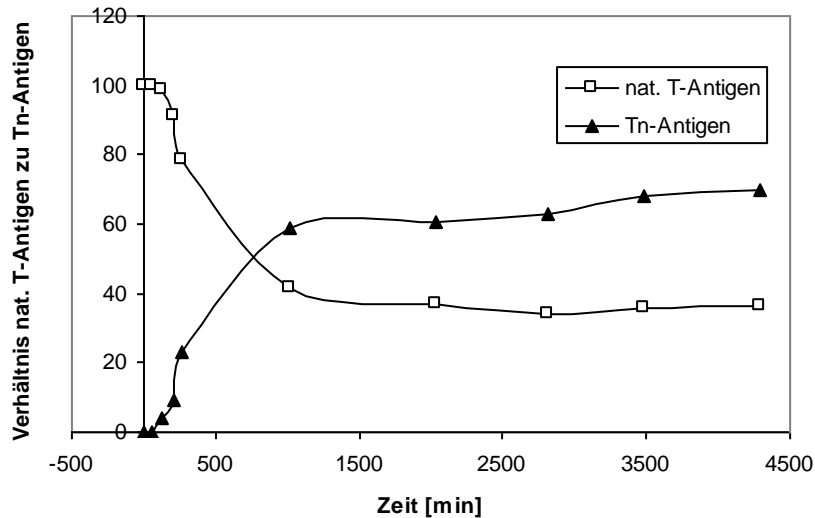


Abb. 3.128: Enzymatischer Abbau des natürlichen T-Antigen 105 in Anwesenheit des 2'-F-T-Antigen

106

Wie aus Abb. 3.128 deutlich hervorgeht, kommt es unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen zu einem Abbau des natürlichen Antigen und der Bildung des T_N-Derivats. Das fluorierte Antigen hingegen wird nicht vom Enzym hydrolysiert. Allerdings kann auch nach einer Reaktionszeit von nahezu drei Tagen kein kompletter Abbau des natürlichen Substrats beobachtet werden. Vielmehr deuten die erhaltenen Daten darauf hin, dass es nach einer Umsetzung von etwa 65% zu einer Stagnation im Abbau kommt, was unter anderem analog zum Abbau des 6'-F-T-Antigenanalogons einen Grund in der recht langen Reaktionsdauer besitzen könnte.

In den vorhergehenden Tests konnte die gewünschte Stabilisierung der interglycosidischen Bindung durch einen gezielten Einbau von Fluoratomen qualitativ nachgewiesen werden. Ein solches Verhalten ist für den Einsatz in synthetischen Vakzinen von enormem Vorteil, da die antigenen Strukturen so über einen längeren Zeitraum unverändert vorliegen und dem Immunsystem zugänglich sind. Dies ist unter anderem in Hinblick auf Langzeitanwendungen von erheblicher Bedeutung, da die benötigte Menge an Vakzin zur Stimulierung des Immunsystems deutlich reduziert werden kann.

3.5 Synthese fluorierter MUC1-Glycopeptid-Antigene

Molekülstrukturen, die entweder von B-Zellen, T-Zellen oder auch von beiden spezifisch erkannt werden, bezeichnet man als Antigene.^[167,168] Spricht man dagegen von Immunogenen, so bedeutet dies, dass das Immunsystem diese Struktur sowohl erkennt, als auch in der Lage ist, Antikörper eben gegen diese Struktur zu bilden. Kleinere Moleküle können zwar spezifisch von entsprechenden Antikörpern gebunden werden, sind allerdings selbst nicht in der Lage, eine Antikörperproduktion hervorzurufen.^[169] Erst ab einer Molekularmasse von 10.000 g/mol kann man in der Regel von Immunogenen sprechen. Hierbei handelt es sich meist um hochmolekulare Verbindungen wie etwa Peptide, Polysaccharide, Proteine oder andere biologische Makromoleküle. Ein Antikörper reagiert allerdings nicht spezifisch auf die gesamte Struktur des Immunogens, sondern bindet ein Teilstück daraus, das sog. Epitop, das vom Immunsystem präsentiert wird.

Wie bereits einleitend erwähnt wurde, besitzt das tumorassoziierte Mucin MUC1 kombinierte B-Zell-Epitope, die sich für die Entwicklung eines Antitumor-Impfstoffes eignen würden und aus einem Kohlenhydratteil und dem dazugehörigen Peptidrückgrat bestehen.^[170]

Tumorzellen des epithelialen Gewebes besitzen im Vergleich zu gesunden Zellen eine veränderte Oberflächenstruktur. Das Mucin MUC1 ist stark überexprimiert, und aufgrund fehlerhafter Enzymaktivitäten besitzt das Peptidrückgrat nur stark verkürzte Kohlenhydrat-Seitenketten. Diese Unterschiede zu gesunden Zellen stellen einen möglichen Ansatz zur Entwicklung von tumorselektiven Vakzinen dar. Dafür müssen die tumorassoziierten Glycopeptidantigene allerdings vollsynthetisch aufgebaut werden, da eine Isolierung aus biologischen Systemen nicht die nötige Strukturhomogenität liefert. Diese ist nötig, um eine Immunantwort gegen eine exakte Struktur zu erzeugen. Weiterhin liefert die Isolierung eine zu geringe Menge der gewünschten Strukturen zur Produktion eines Impfstoffes, so dass die Synthese der einzige praktikable Zugang zu diesen Strukturen darstellt.

Peptid- und Glycopeptidfestphasensynthese

In der heutigen Zeit ist die wohl effektivste Art, Peptide mit einer Länge von bis zu 20 Aminosäuren aufzubauen, die Festphasensynthese nach *Merrifield*. Ein wesentlicher Vorteil hierbei ist die Geschwindigkeit mit der das Peptid an einer Polymermatrix aufgebaut werden kann, da im Überschuss eingesetzte Reagenzien bzw. nicht umgesetzte Reaktanden nach Ende eines jeden Kupplungsschrittes einfach gewaschen werden können. Voraussetzung hierfür

ist, dass die Startamino­säure zu Beginn der Synthese an einem Harz angebunden vorliegen muss. Anschließend wird die Aminofunktion dieser Aminosäure deblockiert und mit einer weiteren, *N*-geschützten Aminosäure gekuppelt. Dieser Prozess wird wiederholt und kann automatisiert ablaufen, wodurch sich Oligopeptide in sehr kurzer Zeit aufbauen lassen. Eine tragende Rolle spielt hierbei die Blockierung und Deblockierung des *N*-Terminus. Dessen Schutzgruppe muss den Bedingungen der Peptidbindung standhalten und es muss eine Deblockierung der Aminofunktion möglich sein, ohne dass die wachsende Peptidkette frühzeitig vom Harz abgespalten wird. Des Weiteren muss die Schutzgruppe günstig und leicht bei allen Aminosäuren in sehr guten Ausbeuten anwendbar sein. Diesen Anforderungen werden nur wenige Schutzgruppen gerecht, weshalb in der automatisierten Peptidsynthese in der Regel nur zwei Verfahren angewendet werden. So wird in der sog. Boc-Strategie die säurelabile *tert*-Butyloxycarbonyl-(Boc) Schutzgruppe als temporäre Aminoschutzgruppe verwendet,^[171,172] während die Fmoc-Strategie die Verwendung der basenlabilen Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc) Schutzgruppe zur Blockierung des *N*-Terminus vorsieht.^[173,174] Die Boc-Gruppe wird allerdings durch Umsetzung mit 20-50%iger Trifluoressigsäure abgespalten, weshalb diese nicht zur Glycopeptidfestphasensynthese eingesetzt werden kann, da Glycane und auch einige Seitenkettenschutzgruppen unter diesen Bedingungen abgespalten werden.^[175] Die Fmoc-Gruppe hingegen hat sich als vollständig kompatibel mit der Synthese von Glycopeptiden erwiesen,^[176,177,178] da bei Verwendung von milden Basen wie Piperidin oder Morpholin zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe die baseninduzierte β -Eliminierung der *O*-Glycane vermieden werden kann.^[176,179] (Abb. 3.129) Mit Hilfe der Fmoc-Schutzgruppenstrategie ist es daher möglich, ein Glycopeptid an der festen Phase aufzubauen, wobei die glycosidische Bindung und die durch säurelabile Schutzgruppen wie etwa *tert*-Butyl-, Trityl-, oder 2,2,5,7,8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonyl-Gruppe (Pmc) geschützten Seitenketten der Aminosäuren nicht angegriffen werden. Da nach Beendigung der Festphasensynthese das Peptid vom polymeren Trägerharz abgespalten werden muss, sollte auch dieser Schritt unter möglichst milden Bedingungen ablaufen, um eine Beeinträchtigung der glycosidischen Bindung bzw. der eben aufgebauten Amidbindungen auszuschließen. Daher kommt der Wahl des Ankersystems ebenfalls eine entscheidende Bedeutung für den Erfolg der Peptidsynthese zu.^[180]

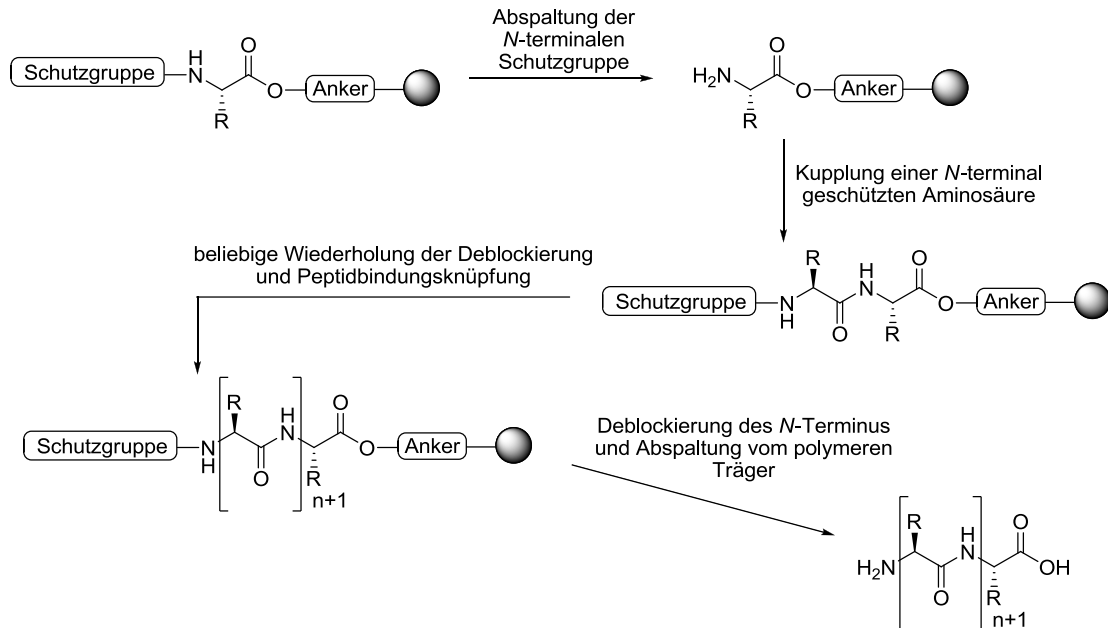


Abb. 3.129: Prinzip der automatisierten Festphasenpeptidsynthese

In der Glycopeptidfestphasensynthese kommen hierzu am häufigsten säurelabile Ankersysteme zum Einsatz, da neben der Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger gleichzeitig auch die säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen entfernt werden. Auf diese Weise können zusätzliche Syntheseschritte eingespart werden. Die bekanntesten Vertreter dieser Klasse sind neben dem Merrifield-Harz, das Wang-Harz,^[181] das SASRIN-Harz,^[182] das Rink-Ester-Harz^[183] und das Trityl-Harz.^[184] (Abb. 3.130)

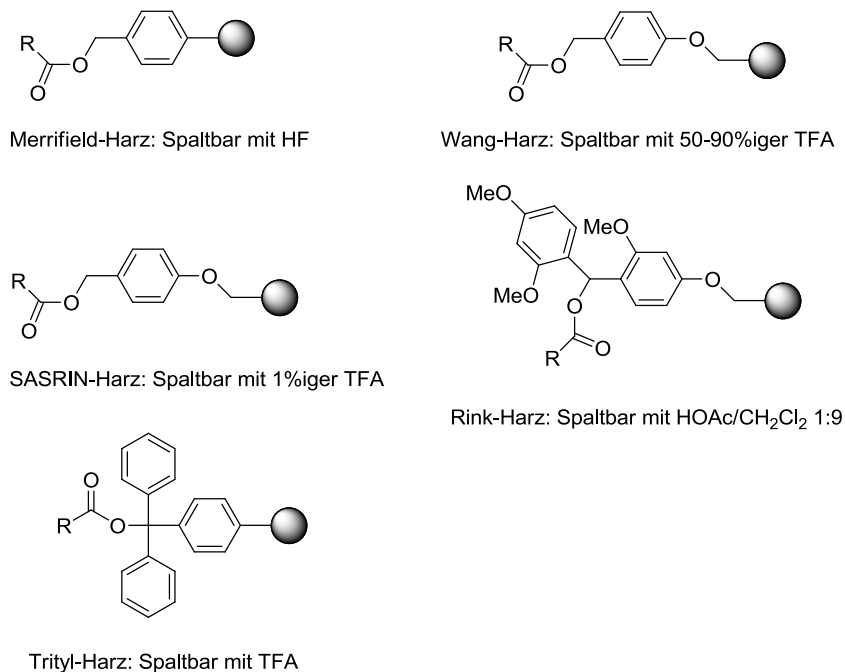
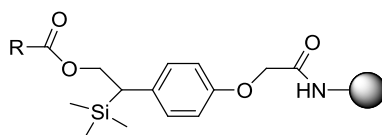


Abb. 3.130: Säurelabile Anker für die Festphasenpeptidsynthese

Neben den sauer abzusplattendenden Anker nehmen auch die basenlabilen Anker eine wichtige Rolle ein. Die bekanntesten Vertreter hierzu sind der HMBA-Linker^[185] und der *Kaiser-Oxim-Linker*.^[186] Allerdings finden diese Linkertypen relativ selten eine Anwendung in der komplexen (Glyco-)Peptidsynthese, da ihre Abspaltung drastische Reaktionsbedingungen erfordert, die häufig zu Nebenreaktionen wie Racemisierung oder Aspartimidbildung führen. Daneben wurden auch Ankersysteme entwickelt, die unter Einwirkung eines zugesetzten Nucleophils gespalten werden können. Bei Verwendung sog. Silylankersysteme kann eine Abspaltung von der festen Phase durch die Einwirkung von Fluoridionen erfolgen. Hierzu sind die Ankersysteme von *Ramage*^[187], *Chao*^[188] und *Barany*^[189] zu zählen, welche sich in der Regel mit Tetrabutylammoniumfluorid-trihydrat in THF oder DMF spalten lassen. In diesen Lösungsmitteln wirken Fluoridionen allerdings bereits so basisch, dass Racemisierungen als Nebenreaktionen auftreten können. Dies wird bei dem von *Kunz* et al.^[190] entwickelten PTMSEL-Linker nicht beobachtet, da das Silylsystem mit Tetrabutylammoniumfluorid in Dichlormethan gespalten wird. In diesem Solvens weisen Fluoridionen einen nahezu neutralen pH-Wert auf und die baseninduzierten Nebenreaktionen können so vermieden werden. (Abb. 3.131)



Kunz-Silylethyl-Harz

Abb. 3.131: Silylankersystem nach *Kunz*

Um eine erfolgreiche Kupplung der Aminosäurebausteine zu erreichen, ist eine Aktivierung der Carbonsäurefunktion unerlässlich. Hierfür gibt es eine Vielzahl an Kupplungsreagenzien, mit deren Hilfe die Säurefunktion zunächst in einen reaktiven Aktivester überführt wird,^[191,192] der dann wiederum von der Aminofunktion der sich am Harz befindenden terminalen Aminosäure unter Bildung der Peptidbindung angegriffen wird. Zur Aktivierung werden heutzutage Uroniumsalze wie etwa *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU)^[193], *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)^[194,195] und *O*-(Azobenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (HATU)^[196,197] eingesetzt. Aber auch Carbodiimide wie Cyclohexylcarbodiimid (DCC),^[198] Diisopropylcarbodiimid (DIC) und *N*-

Ethyl-*N*'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC)^[199] finden Ihre Verwendung in der Festphasenpeptidsynthese. (Abb. 3.132)

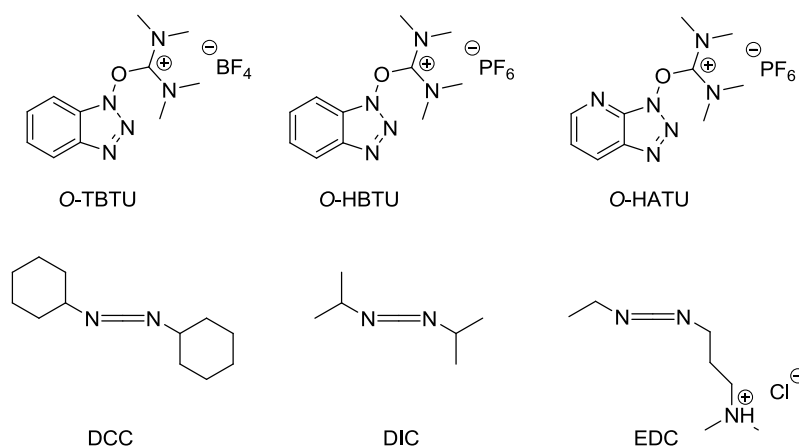


Abb. 3.132: Kupplungsreagenzien

Im Laufe der Zeit haben sich die Uroniumsalze als die am besten geeigneten Kupplungsreagenzien herausgestellt, da sie hoch reaktiv sind, jedoch in Gegenwart von Additiven, wie 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)^[200] bzw. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt),^[201] die Racemisierung der Aminosäuren deutlich reduziert werden kann.

Um Glycopeptide an der festen Phase aufbauen zu können, werden Fmoc-geschützte, glycosylierte Aminosäurebausteine^[202] benötigt, welche in Kohlenhydratseitenketten Acetyl- oder auch Benzylschutzgruppen tragen. Diese können dann in Kombination mit einem der bereits vorgestellten säurelabilen oder nucleophil spaltbaren Anker eingesetzt werden. Nach dem Abschluss der Festphasensynthese wird das erhaltene Glycopeptid vom polymeren Träger abgespalten, bevor schließlich die Deblockierung der Kohlenhydrat-Hydroxygruppen erfolgt. Letztere kann basenkatalytisch in Anwesenheit der Acetyl-Schutzgruppen bzw. bei Abspaltung von Benzylgruppen hydrogenolytisch durchgeführt werden.

Protokoll zur Festphasen-Glycopeptidsynthese

Der Fmoc-Strategie folgend, wurden die Glycopeptide mit Hilfe eines Peptidsynthesizers der Firma *Perkin-Elmer Applied Biosystems* synthetisiert. Hierzu wurde ein mit der Start-Aminosäure Fmoc-Prolin vorbeladenes Tentagel-Harz eingesetzt, dessen Beladung mit 0.20 und 0.25 mmol/g relativ gering gewählt wurde, um Problemen durch eine gegenseitige Beeinflussung der wachsenden Peptidketten entgegen zu wirken. Der Einsatz einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie spielt vor allem beim Aufbau polyfunktionaler

Glycopeptide eine entscheidende Rolle. So werden die Hydroxyfunktion der Serin bzw. der Threoninreste ebenso wie die Säurefunktionen von Asparaginsäure und Glutaminsäure als *tert*-Butylester blockiert. Die Guanidino-Funktion des Arginins hingegen wird mit der säurelabilen 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-Gruppe (Pmc) blockiert. Die Hydroxyfunktionen der Kohlenhydratseitenketten sind hingegen stets als Acetylgruppen geschützt und erfordern als letzten Schritt der Glycopeptidsynthese eine Abspaltung unter basischen Bedingungen. (Abb. 3.133)

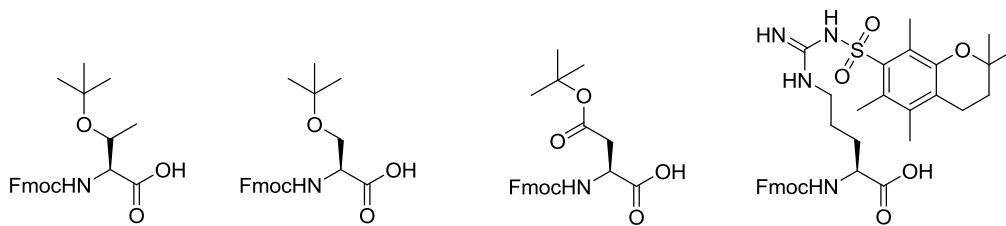


Abb. 3.133: Sekundäre Schutzgruppen des Threonins, Serins, der Asparaginsäure und des Arginins

Die im Verlauf der Festphasenpeptidsynthese regelmäßig freizusetzenden Aminogruppen des wachsenden Peptidstranges werden durch basenkatalysierte Spaltung der temporären Fmoc-Gruppe mit Piperidin in DMF wieder freigelegt. Hierbei kommt es zur Bildung eines Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes, (Abb. 3.134) welches photometrisch quantifiziert wird, um den Verlauf und die Vollständigkeit des Deblockierungsschrittes zu verfolgen. (Abb. 3.135)

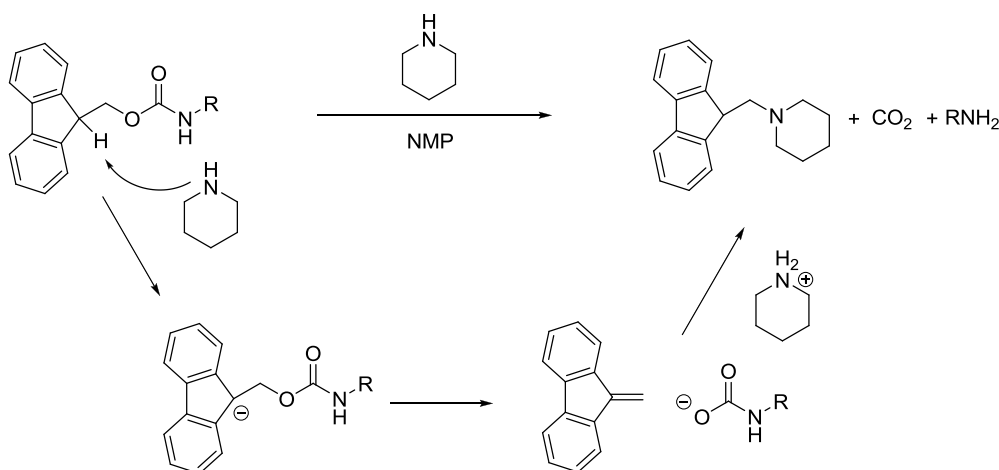


Abb. 3.134: Baseninduzierte Deblockierung einer Fmoc-geschützten Aminofunktion

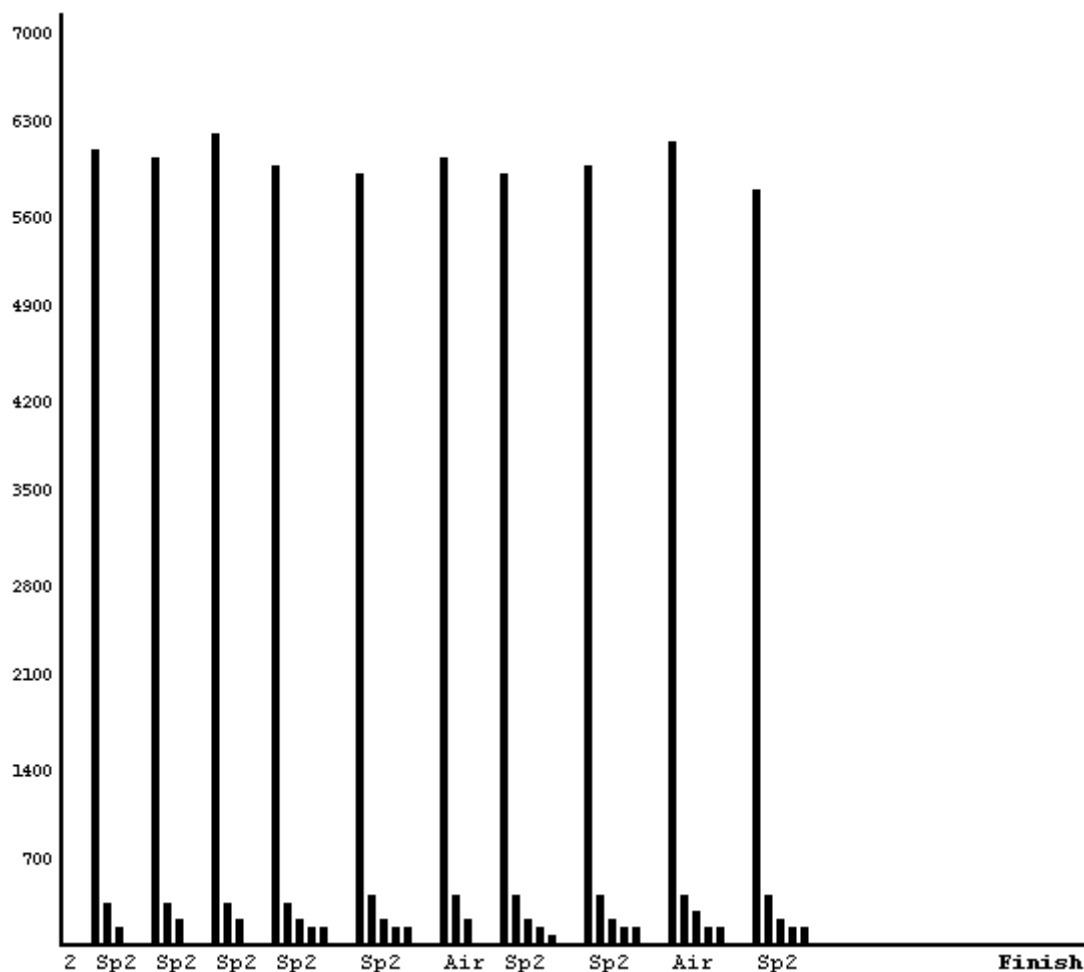


Abb. 3.135: Abspaltprotokoll einer Peptidsynthese

Im Peptidsynthesizer kommt es in iterativen Synthesesyklen zu einer vollautomatisierten Verknüpfung der einzelnen Fmoc-geschützten Aminosäurebausteine. Jeder dieser Zyklen umfasst drei Teilschritte: Zunächst wird die temporäre Fmoc-Schutzgruppe am *N*-Terminus des Peptids mittels Piperidin deblockiert. Anschließend wird die Kupplungsreaktion mit 1 mmol (10 Äquiv.) der Fmoc-Aminosäure über einen Zeitraum von 20 bis 30 Minuten durchgeführt, wobei die Kupplungsreagenzien HBTU, HOBt sowie Hünigs-Base zugesetzt werden. Um der Bildung von Fehlsequenzen entgegen zu wirken, werden die nicht umgesetzten freien Aminofunktionen nach der Kupplung mit dem sog. Capping-Reagenz umgesetzt. Dieses enthält Ac₂O, Hünigs-Base und HOBt, wodurch es zu einer Acetylierung der verbliebenen freien Aminofunktionen kommt, die somit in einem nächsten Kupplungsschritt nicht mehr zur Verfügung stehen. Die Kupplung der Fmoc-Glycosylaminosäure-Bausteine erfolgt halbautomatisch, indem diese mit HOAt^[203] und HATU sowie NMM aktiviert wird, bevor sie im Festphasenreaktor des Synthesizers acht Stunden zur Reaktion gebracht wird. Bei unreaktiveren Kupplungen wurde die Menge zu

kuppelnder Glycosylaminosäure geteilt und in zwei separaten Kupplungsschritten mit dem vorhandenen Peptid umgesetzt, wobei zwischen den beiden Kupplungen kein Capping-Schritt durchgeführt wurde. So war es möglich, auch bei der Kupplung der unreaktiven fluorierten Glycosylaminosäuren relativ gute Ausbeuten zu erhalten. Nach Fertigstellung der gewünschten Peptidsequenz wurde das Harz schließlich in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt und das Glycopeptid wurde manuell durch Behandlung mit Trifluoressigsäure vom polymeren Träger abgespalten.

Synthese eines *N*-Fmoc-geschützten Triethylenglycol-Spacers

Zur Entwicklung von vollsynthetischen tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid-Vakzinen ist nicht nur die erfolgreiche Synthese von Glycopeptiden entscheidend. Vielmehr muss auch eine Möglichkeit für eine spätere Anbindung an Trägerproteine bzw. immunstimulierende Substanzen geschaffen werden. Da die Mucine meist eine gestreckte Konformation einnehmen, ist eine erfolgreiche Festphasensynthese mucinartiger Glycopeptide mit über 20 Aminosäuren in guten Ausbeuten realisierbar.^[32] Um eine chemoselektive Funktionalisierung vornehmen zu können, werden geeignete funktionelle Gruppen über eine Oligoethyleneinheit mit dem Hapten verbunden. Diese Oligoethylen-Einheiten haben sich in der Entwicklung synthetischer Vakzine als Abstandhalter etabliert, da sie weder immunogen sind, noch die Konformation und Eigenschaften der Vakzinbausteine beeinflussen,^[204,205] so dass diese unabhängig voneinander ihre Eigenschaften bei der Immunisierung wahrnehmen können. Eine geeignete Funktionalisierung eines solchen auf einer Oligoethylenglycol-Einheit basierenden Abstandhalters ist die Aminofunktion. Hierdurch ist eine Knüpfung einer Amid-Bindung etwa zu einem Carrierprotein oder durch Fortsetzung der Peptidsynthese zum Aufbau eines weiteren immunogenen Peptids denkbar. Wird die Aminofunktion mit der Fmoc-Schutzgruppe versehen, kann die automatisierte Kupplung dieses Abstandhalters im Synthesizer durch anschließende Deblockierung und photometrische Bestimmung des gebildeten Benzofulven-Piperidinadduktes quantifiziert werden. (siehe Abb. 3.134)

Die Synthese der Spacer-Aminosäure folgt literaturbekannten Vorschriften^[140,206,207,208] und beinhaltet in einem ersten Schritt zunächst eine Hetero-Michael-Addition von Triethylenglycol **117** an Acrylsäure-*tert*-Butylester unter Verwendung von katalytischen Mengen an Natrium in THF. Aus der resultierenden Hydroxyfunktion in **118** wurde im Folgenden zunächst durch Umsetzung mit Methansulfonsäurechlorid und Triethylamin das entsprechende Mesylat gebildet, welches direkt durch Reaktion mit Natriumazid in das

korrespondierende Azid **119** überführt wurde. Dieses wurde durch Reduktion mit Wasserstoff in Gegenwart von Raney-Nickel zum freien Amin **120** umgesetzt, welches anschließend in einer Reaktion mit Fmoc-OSu in das für die Festphasensynthese benötigte Fmoc-blockierte Carbamat **121** überführt wurde. Als abschließenden Schritt musste noch die Säurefunktion deblockiert werden, was durch Umsetzung mit Trifluoressigsäure gelang. Insgesamt konnte die freie Säure **122** in einer fünfstufigen Synthese mit einer Gesamtausbeute von 24% erhalten werden. (Abb. 3.136)

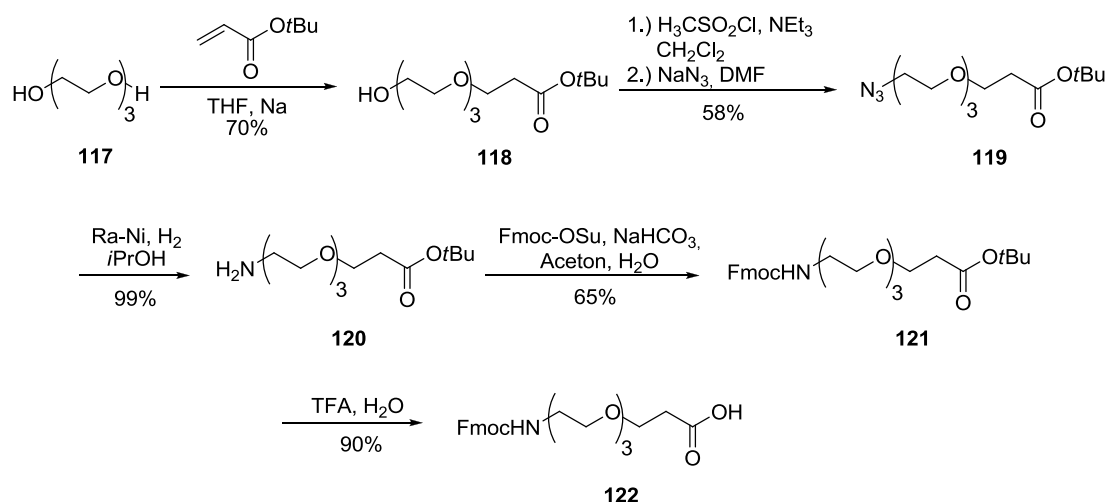


Abb. 3.136: Synthese des Triethylglycolspacers **122**

Um zu einem späteren Zeitpunkt Vakzin-Kandidaten mit fluorierten Kohlenhydratepitopen herstellen zu können, wurden entsprechende fluorierte Glycopeptide aus der *Tandem-Repeat*-Sequenz des epithelialen Mucins MUC1 ausgehend von den hergestellten, in unterschiedlicher Positionen fluorierten T-Antigen-Threonin-Konjugaten synthetisiert. Hierbei wurde ausschließlich das Threonin⁶ der *Tandem-Repeat*-Sequenz durch die fluorierte Glycosylaminosäure ersetzt, da sich diese Position bereits in verschiedenen Vakzinen als vielversprechende Glycosylierungsstelle erwiesen hatte.^[40] Weiterhin ist auf diese Weise ein direkter Vergleich der Wirksamkeit der fluorierten Glycopeptid-Vakzine mit den zuvor synthetisierten natürlichen Vertretern^[32] möglich.

Für die Synthese wurde ein mit Fmoc-Prolin beladenes Trityl-Tentagel-Harz verwendet. Da der Trityl-Anker unter sauren Bedingungen gespalten wird, kommt es zu einer gleichzeitigen Entfernung aller Seitenkettenschutzgruppen. Weiterhin verhindert der hohe Raumanspruch des Trityl-Ankers die Diketopiperazinbildung, die häufig ein Problem zu Beginn einer Peptidsynthese darstellt. Diese verläuft über eine basenkatalysierte intramolekulare

Aminolyse, wobei es unter Abbruch des Kettenwachstums zur Bildung des cyclischen Diketopiperazins kommt. (Abb. 3.137)

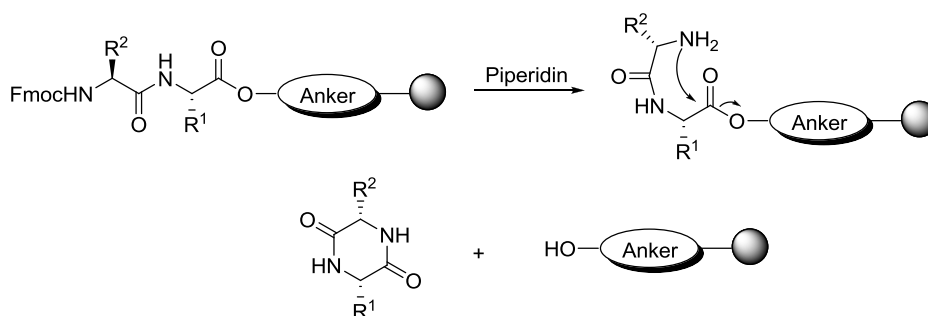


Abb. 3.137: Diketopiperazinbildung

Bei der Synthese des Glycopeptids erfolgte die Kupplung der ersten 13 Aminosäuren nach dem Standardprotokoll. Hierzu wurde, wie bereits beschrieben, der *N*-Terminus des Peptids durch Umsetzung des terminal blockierten Amins mit 20%igem Piperidin in DMF deblockiert, bevor die Kupplung der nächsten Aminosäure mit den Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt/DIPEA in DMF erfolgte. Nach Ende der Reaktion wurde nicht umgesetztes Amin mit dem Capping-Reagenz (kat. HOBt/Ac₂O/DIPEA in NMP) acetyliert und der gesamte Zyklus wurde bis zur Deblockierung der Aminofunktion des Serins¹⁴ wiederholt. Die Kupplung der fluorierten Glycosylaminosäuren **61**, **86** oder **98** erfolgte unter Verwendung der reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt/NMM in NMP über acht Stunden. Bei der Kupplung der difluorierten Glycosylaminosäure **98** wurde zudem ein Doppelkupplungsschritt ohne zwischenzeitliches Capping über jeweils acht Stunden durchgeführt. Auch die Kupplung der nächsten Aminosäure Valin, die zum Teil bereits in früheren Synthesen Probleme bereitet hatte, wurde mit Hilfe einer Doppelkupplung angebunden. Die Kupplung der restlichen vier Aminosäuren und des Spacers erfolgte wiederum unter Standardbedingungen, wobei der Abstandhalter nach Zugabe von ca. 0.2 mL NMP in den Synthesizer gegeben wurde. Allerdings führte ein technisches Problem am Synthesizer zu einem Abbruch der Synthese des in 6'-Position difluorierten Glycopeptids, so dass die Peptidsequenz nach der erfolgreichen Kupplung des Valins durch Acetylierung der Aminofunktion beendet wurde. Dennoch wurde auch dieses verkürzte Peptid weiter umgesetzt.

Nach Ende der Glycopeptidsynthese wurde das Harz jeweils in einen *Merrifield*-Reaktor überführt, bevor das Peptid durch Zugabe von TFA, Triethylsilan und Wasser vom polymeren Träger abgespalten wurde. Die Rohpeptide wurden nach Zugabe von Toluol vom Lösungsmittel befreit und Lyophilisiert, bevor durch Reaktion mit NaOMe in MeOH die

Acetyl-Schutzgruppen der Kohlenhydratepitope entfernt wurden. Dies wurde jeweils durch Einstellen eines pH-Wertes von 8.5 erreicht, der bei Bedarf nachreguliert wurde. Die Lösungen wurde nach etwa 18 Stunden und vollständiger Deblockierung (HPLC-Kontrolle) mit verdünnter Essigsäure neutralisiert und erneut lyophilisiert. Abschließende semipräparative RP-HPLC lieferte die verschiedenen fluorierten Glycopeptide in Ausbeuten von 13 bis 50% bezogen auf das eingesetzte Harz. (Abb. 3.138)

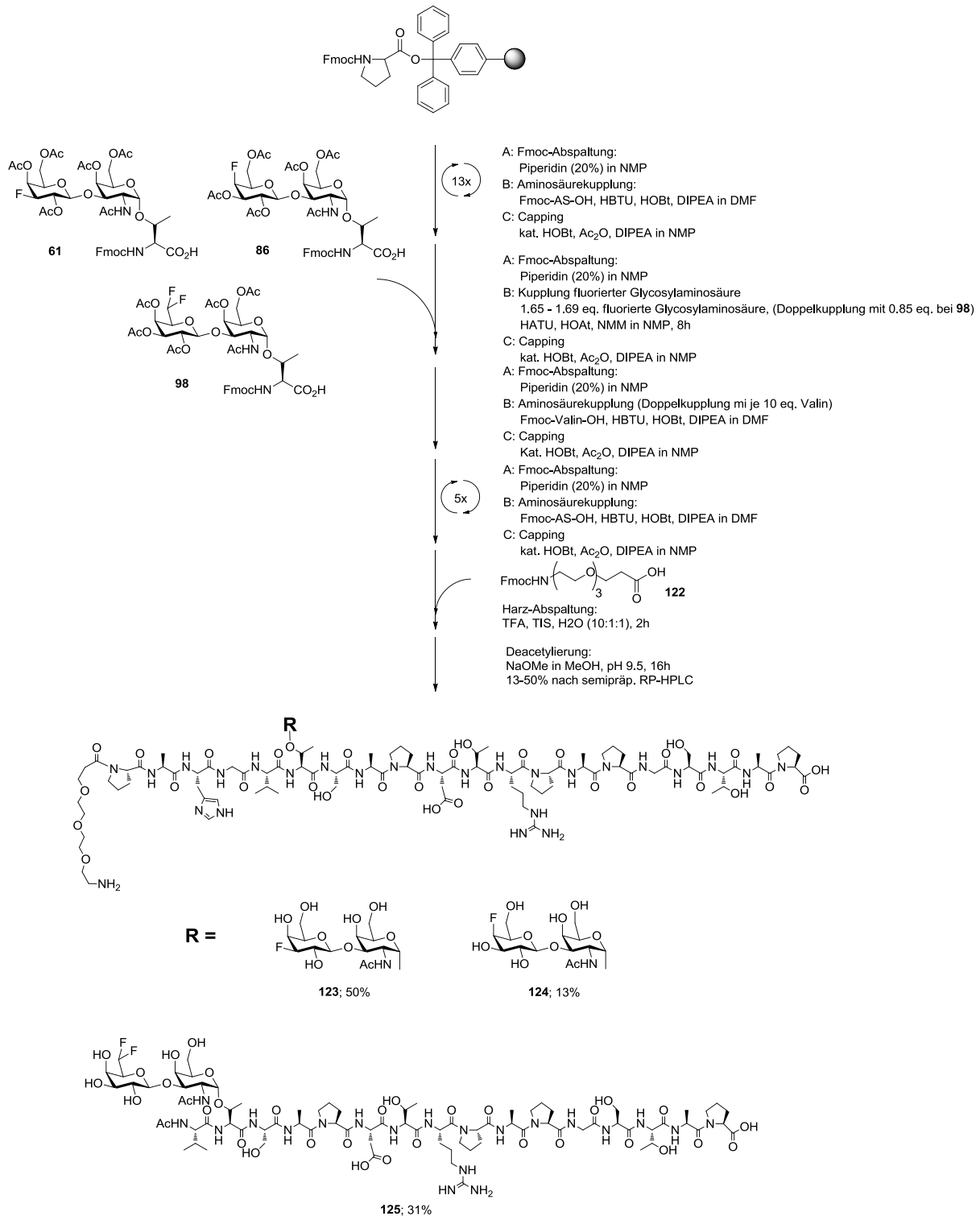


Abb. 3.138: Festphasenglycopeptidsynthese der MUC1-Glycopeptide **123**, **124** und **125**

Die exakten Strukturen der Amino-funktionalisierten fluorierten Glycopeptide wurden mittels ESI-MS, MALDI-TOF Massenspektrometrie und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie eindeutig nachgewiesen. So konnten neuartige fluorierte Glycopeptide synthetisiert werden,

die in weiteren Umsetzungen mit Trägerproteinen zu vollsynthetischen Tumor-Vakzinen umgesetzt werden können.

3.6 Synthese und immunologische Evaluierung fluorierter MUC1-Glycopeptid-Protein-Konjugaten

Um eine Immunantwort gegen ein bestimmtes Hapten-Molekül zu erreichen, nutzt man sehr häufig sog. Hapten-Protein-Konjugate.^[209,210] Diese induzieren in der Regel eine schnelle und zuverlässige Immunantwort gegen das Hapten, wodurch eine Untersuchung sowohl der Intensität als auch der Spezifität der Immunantwort möglich ist. Um eine MHC-II restringierte Immunantwort zu erhalten, ist es notwendig, B-Zellen effektiv zu aktivieren. Hierfür ist nicht nur eine Bindung des Antigens an die B-Zellrezeptoren erforderlich, sondern die B-Zelle muss auch von T_H2-Helferzellen erkannt und stimuliert werden. Um die Selbsttoleranz des Immunsystems zu überwinden, ist diese sog. gekoppelte Erkennung unbedingt erforderlich. Proteine bestehen in der Regel aus langen, meist linearen Polypeptiden. Daher ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass ein an das Hapten gebundenes Trägerprotein ein T_H2-Zell-Epitop besitzt. Trifft dies zu, so ist das Immunsystem des immunisierten Organismus in der Lage, die im MHC-II-Komplex der Antigen-präsentierenden Zelle vorhandenen Peptidfragmente des Trägerproteins zu erkennen. Dies geschieht durch T_H-Zellen des CD4⁺-Typs, welche mit einem geeigneten Rezeptor (TCR) ausgestattet sind.

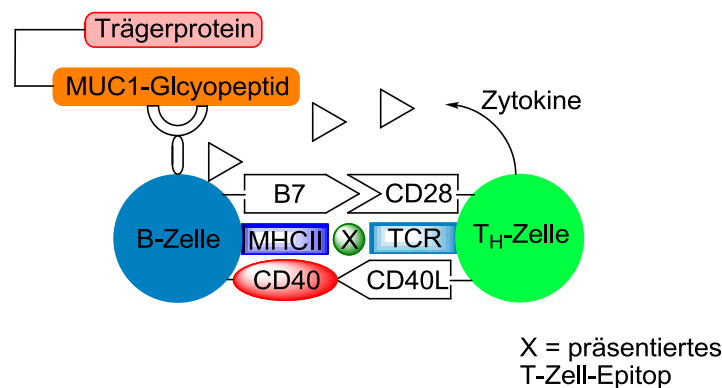


Abb. 3.139: Vereinfachtes Schema der MHCII-restringierten Immunantwort

Nach erfolgreicher Immunisierung mit einem solchen Konjugat, bestehend aus dem Hapten-Molekül und einem T_H2-Zell-Epitop, wird dieses von sog. Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und prozessiert. Bei diesem Vorgang werden Fragmente des Trägerproteins gebildet und auf der Oberfläche der B-Zellen, genauer auf dem MHC-II-Komplex, präsentiert.^[211] (Abb. 3.139) Werden diese T-Zell-Epitop-MHC-II-Komplexe von Rezeptoren

auf der Oberfläche von T_H2-Zellen erkannt, senden die T_H-Zellen kostimulatorische Signale aus, welche eine selektive Aktivierung der B-Zellen induzieren. Zu diesen kostimulierenden Signalen zählt unter anderem die Sekretion von Zytokinen wie etwa IL-2, welches eine Proliferation induziert, IL-4, verantwortlich für eine initiale Aktivierung der B-Zell-Proliferation, oder auch IL-6, das die B-Zell-Differenzierung beeinflusst. Hinzu kommen noch weitere wichtige Signal-Wechselwirkungen, die eine Induktion einer adaptiven MHC-II-restringierten Immunantwort hervorrufen. Hierzu zählen unter anderem die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung zwischen dem B7-Liganden der B-Zelle und dem CD28-Rezeptor der T-Helferzelle. Ähnliche Wechselwirkungen finden zwischen LFA3 und CD2 bzw. CD40L und CD40 statt. Auf diese Weise kommt es nach der Erkennung, Prozessierung und Präsentation des B-Zell-Epitops zu einer selektiven Aktivierung der B-Zellen, wodurch deren Teilung und Differenzierung eingeleitet wird. Auch der sog. Ig-Klassen-Switch wird durch die Einwirkung einer Vielzahl von Zytokinen erreicht, die durch die Wechselwirkung der B-Zelle mit der T_H-Zelle von dieser ausgeschüttet werden.^[211]

MUC1-Glycopeptid-Protein-Konjugate

Wie bereits erwähnt wurde, muss für eine effiziente und wirksame Immunantwort ein Antigen in der Lage sein, eine spezifische humorale Immunantwort auszulösen. Für die Entwicklung eines therapeutisch und prophylaktisch wirksamen Antitumor-Vakzins werden hierzu synthetisch hergestellte tumorassoziierte Oberflächenglycopeptidstrukturen des epithelialen Mucins MUC1^[33,169] an geeignete Trägerproteine angebunden. Durch die Präsentation der T_H2-Zell-Epitope des Trägerproteins über die MHC-II-Komplexe der B-Zellen soll die Induktion einer adaptiven humoralen und zellulären Immunantwort gewährleistet werden.^[38]

Als Trägerproteine können hierfür neben Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin),^[212] das Hämocyanin der Schlüssellochnapfschnecke (KLH, keyhole limpet hemocyanin)^[213] und Tetanus-Toxoid verwendet werden.^[214,215,216,217,218] All diese Proteine enthalten die nötigen T_H2-Helferzell-Epitope, die für die erwähnte Überwindung der Toleranz des Immunsystems von großer Bedeutung sind. Ein sehr wichtiger Schritt in der Synthese eines potentiellen Vakzins ist die Anbindung des MUC1-Glycopeptids an das Trägerprotein. Diese Reaktion muss chemoselektiv und unter möglichst milden Reaktionsbedingungen ablaufen, da weder das Protein noch die Glycopeptidstruktur beeinträchtigt werden darf. Es sind eine Reihe von Konjugationsmöglichkeiten bekannt, die jedoch stets Vor- und Nachteile aufweisen.^[219,220,221,222,223,224] Einer dieser Nachteile beruht auf der häufig vorhandenen

Immunogenität des Spacermoleküls, welches das Hapten mit dem Trägerprotein verknüpfen soll. Eine selektive Verknüpfung kann z.B. über einen Maleinimid-Spacer erfolgen, der eine Funktionalisierung des Haptens über Thiolgruppen erlaubt.^[225] Da dieser Spacer jedoch selbst ebenfalls hoch immunogen ist, führt dessen Einsatz in Impfstudien zu Immunreaktionen, die nahezu vollständig gegen die Linkerstruktur gerichtet sind und die Immunantwort gegen das Antigen unterdrücken.^[226] Auch eine 1,3-dipolare *Huisgen*-Cycloaddition ist zur Verknüpfung der beiden Zell-Epitope verwendet worden, indem ein Azid mit einer Alkinfunktionalität zur Reaktion gebracht wurde. Allerdings ist hierbei die Immunogenität des entstehenden Triazols noch weitgehend unbekannt.^[227,228] Aus diesem Grund soll auf eine von *Tietze* et al. entwickelte Strategie zurückgegriffen werden, bei der das freie Amin des Spacermoleküls in einer nucleophilen Substitutionsreaktion mit einem Quadratsäurediethylester umgesetzt wird.^[229,230,231,232] Diese Konjugation weist eine hohe Chemoselektivität auf und hat sich bereits in früheren Arbeiten als gut geeignet erwiesen.^[38]

Funktionalisierung der fluorierten MUC1-Glycopeptide mit Quadratsäureestern

Um die hergestellten fluorierten MUC1-Glycopeptidkonjugate über die terminale Aminofunktion des Oligoethylenglycol-Spacers an die Aminogruppen der Lysinseitenketten der Trägerproteine anbinden zu können, muss ein Dielektrophil, hier der Quadratsäurediethylester, eingesetzt werden. Zudem muss hierbei eine hohe Chemoselektivität der Anbindung gewährleistet sein, da weitere, im fluorierten Glycopeptid vorhandene, funktionelle Gruppen diese Reaktion nicht beeinflussen dürfen. Die Anbindung des Diesters **126** an die freien Amine der vollständig deblockierten fluorierten Glycopeptide **123** und **124** gelang in einer Lösung aus Wasser und Ethanol (1:1) und einem pH-Wert von 8,0, wobei unter diesen Bedingungen lediglich die Monosquarate **127** und **128** in einer Ausbeute von 25% bzw. 31% (nach semipräparativer RP-HPLC) gebildet wurden. (Abb. 3.140) Wird dieselbe Reaktion anschließend in Gegenwart eines weiteren Nucleophils, beispielsweise des Trägerproteins und bei einem höheren pH-Wert wiederholt, so kann eine Lysinseitenkette des Proteins an die verbleibende Esterfunktion nucleophil angreifen.

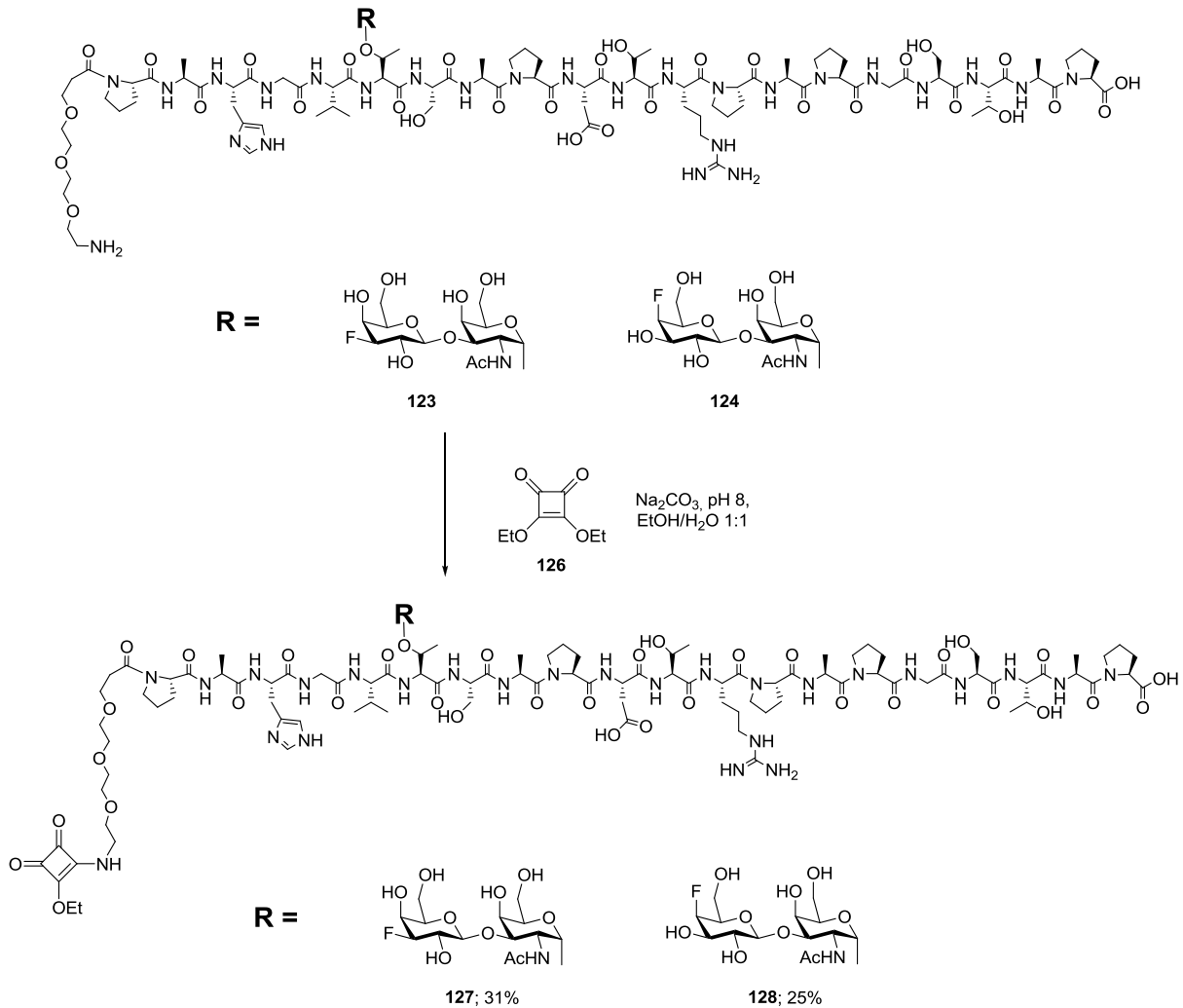


Abb. 3.140: Synthese der Quadransäure-funktionalisierten fluorierten MUC1-Glycopeptide 127 und 128

BSA-Glycopeptid-Konjugate

Bei Rinderserumalbumin handelt es sich mit 582 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 66.500 g/mol um ein vergleichsweise kleines Protein. Obwohl es zur Induktion einer starken Immunantwort nur bedingt geeignet ist, besitzen Hapten-BSA-Konjugate den großen Vorteil, dass sie durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie detektiert und analysiert werden können. Dadurch ist eine Aussage über den Beladungsgrad, also die Anzahl der gebundenen fluorierten Glycopeptid-Quadransäuremonoester-Einheiten, pro Protein möglich, wodurch beispielsweise die Konjugationsbedingungen der Vakzinbausteine optimiert werden können. Des Weiteren ist mit Hilfe der BSA-Konjugate eine Analyse der nach einer Impfung erhaltenen Antikörper in ELISA-Tests sehr gut möglich, da die BSA-Konjugate auf den entsprechenden Mikrotiterplatten haften.

Die Konjugationen der Quadratsäuremonoethylester **127** und **128** mit BSA erfolgten in einer wässrigen Pufferlösung aus Na_2HPO_4 bei einem pH-Wert von 9.5 über einen Zeitraum von fünf Tagen bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die BSA-Konjugate durch eine Membran filtriert, die alle Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 30.000 g/mol passieren lässt, wodurch Reste der nicht umgesetzten Glycopeptide abgetrennt wurden. (Abb. 3.141)

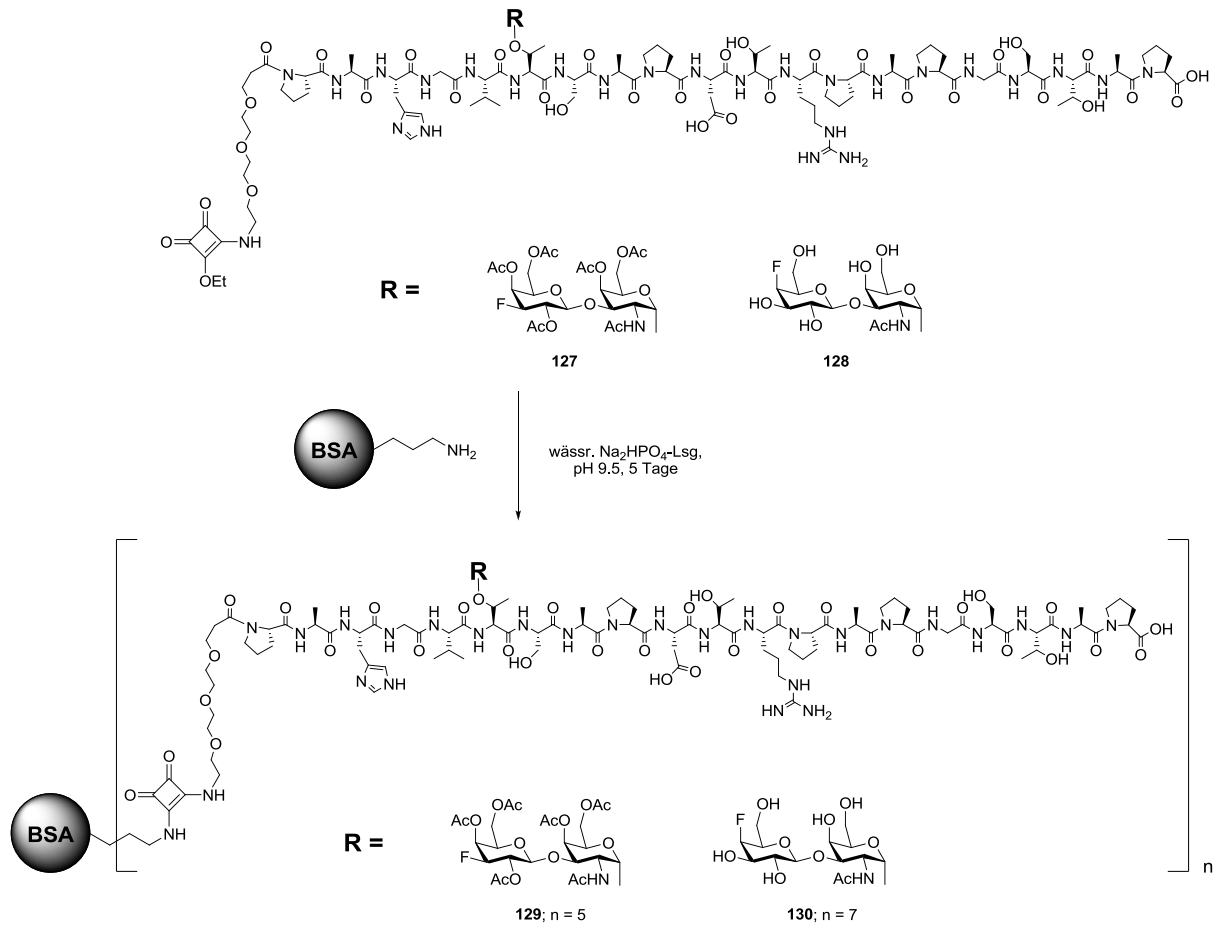


Abb. 3.141: BSA-Konjugate **129** und **130** von fluorierten MUC1-Glycopeptiden und deren Beladung

Nach der Lyophilisation des Filtrerrückstands konnten mit **129** und **130** erstmals neue fluoridierte Vakzin-Konjugate erhalten werden, deren durchschnittliche Beladung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie auf etwa 5 bzw. 7 Molekülen des fluorierten MUC1-Glycopeptid-Antigens pro BSA Molekül bestimmt wurde. (Abb. 3.142, Abb. 3.143)

Kratos PC Axima CFR V2.4.1: Mode linear_neg_1805, Power: 135, Blanked, P.Ext. @ 3000 (bin 82)

%Int. 0.0 mV[sum= 1 mV] Profiles 1-67 Smooth Av 100 -Baseline 20

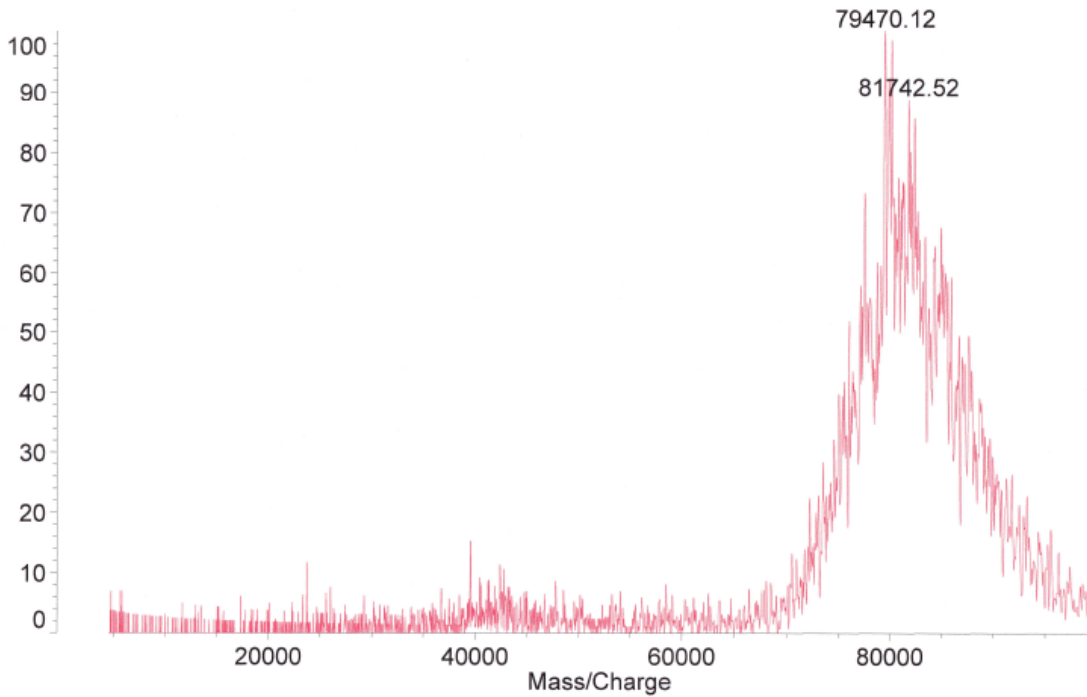


Abb. 3.142: MALDI-TOF-Analyse des 3'-F-T-Glycopeptid-BSA-Konjugats 129

Kratos PC Axima CFR V2.4.1: Mode linear_neg_1805, Power: 135, Blanked, P.Ext. @ 3000 (bin 82)

%Int. 0.0 mV[sum= 0 mV] Profiles 1-98 Smooth Av 100 -Baseline 20

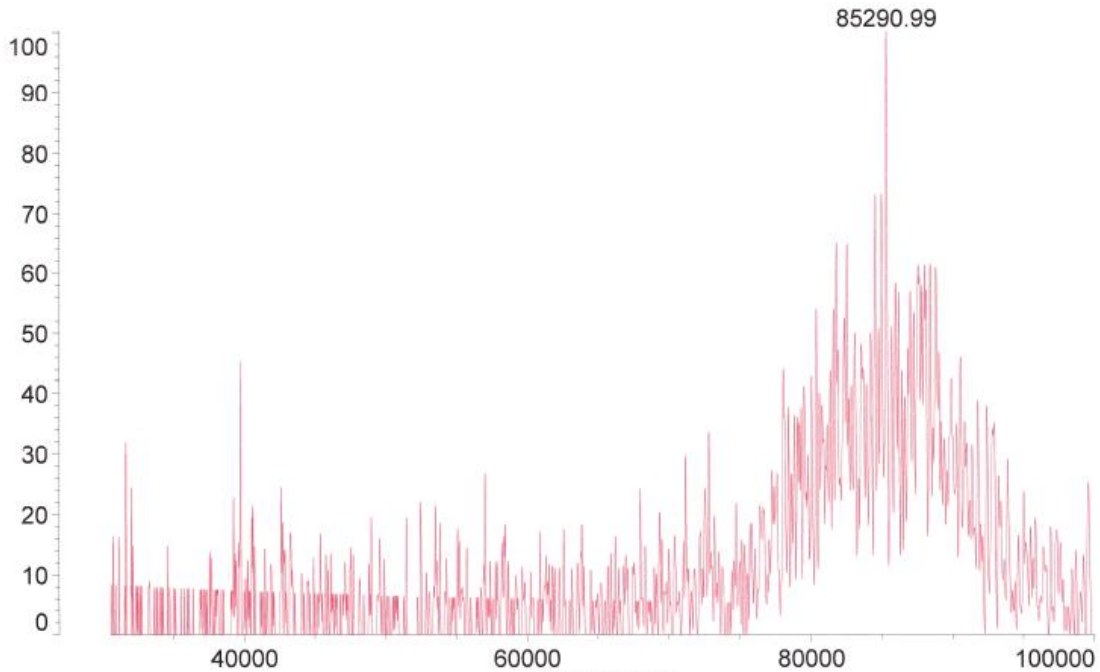


Abb. 3.143: MALDI-TOF-Analyse des 4'-F-T-Glycopeptid-BSA-Konjugats 130

Tetanus-Toxoid-Glycopeptid-Konjugat

Wie bereits einleitend erwähnt wurde, sind immunogene Trägerproteine zur Induktion einer toleranzbrechenden Immunantwort gegen spezifische Antigenstrukturen unbedingt notwendig. Neben dem KLH-Protein bietet sich hierfür vor allem das Tetanus-Toxoid an, welches bereits erfolgreich in Vakzinen eingesetzt wurde.^[38,40] Der große Vorteil von Impfstoffen, die mit MUC1-Tetanus-Toxoid (150.000 g/mol) als Trägerprotein verknüpft sind, beruht auf der Tatsache, dass dieses T_H2-Zellepitope besitzt, die sowohl von Tieren als auch vom Menschen erkannt werden. Damit sind solche Vakzine für eine spätere klinische Anwendung besonders reizvoll, zumal die meisten Menschen gegen Wundstarrkrampf bereits geimpft wurden und folglich starke Immunantworten mit hohen Antikörpertitern bei Einsatz der Glycopeptidvakzine resultieren.

Die Synthese des Tetanus-Toxoid-Konjugats mit dem 4'-F-Glycopeptid **131** verläuft analog zur bereits vorgestellten BSA-Konjugat-Synthese. Dazu wird der Monoquadratsäureethylester **128** in einer Pufferlösung aus Na₂HPO₄ bei einem pH-Wert von 9.5 über einen Zeitraum von fünf Tagen bei Raumtemperatur mit dem Tetanus-Toxoid zur Reaktion gebracht. Nach dem Abtrennen der verbleibenden nicht umgesetzten Glycopeptide (Ultrafiltration), und Gefriertrocknung konnte ein farbloses Lyophilisat **131** erhalten werden. (Abb. 3.144)

Zur Synthese des Tetanus-Toxoid-Konjugats wurde lediglich auf das in 4'-Position fluorierte Glycopeptid **128** zurückgegriffen, da dieses in den vorangegangenen Tests zur metabolischen Stabilität sehr gute Ergebnisse zeigte.

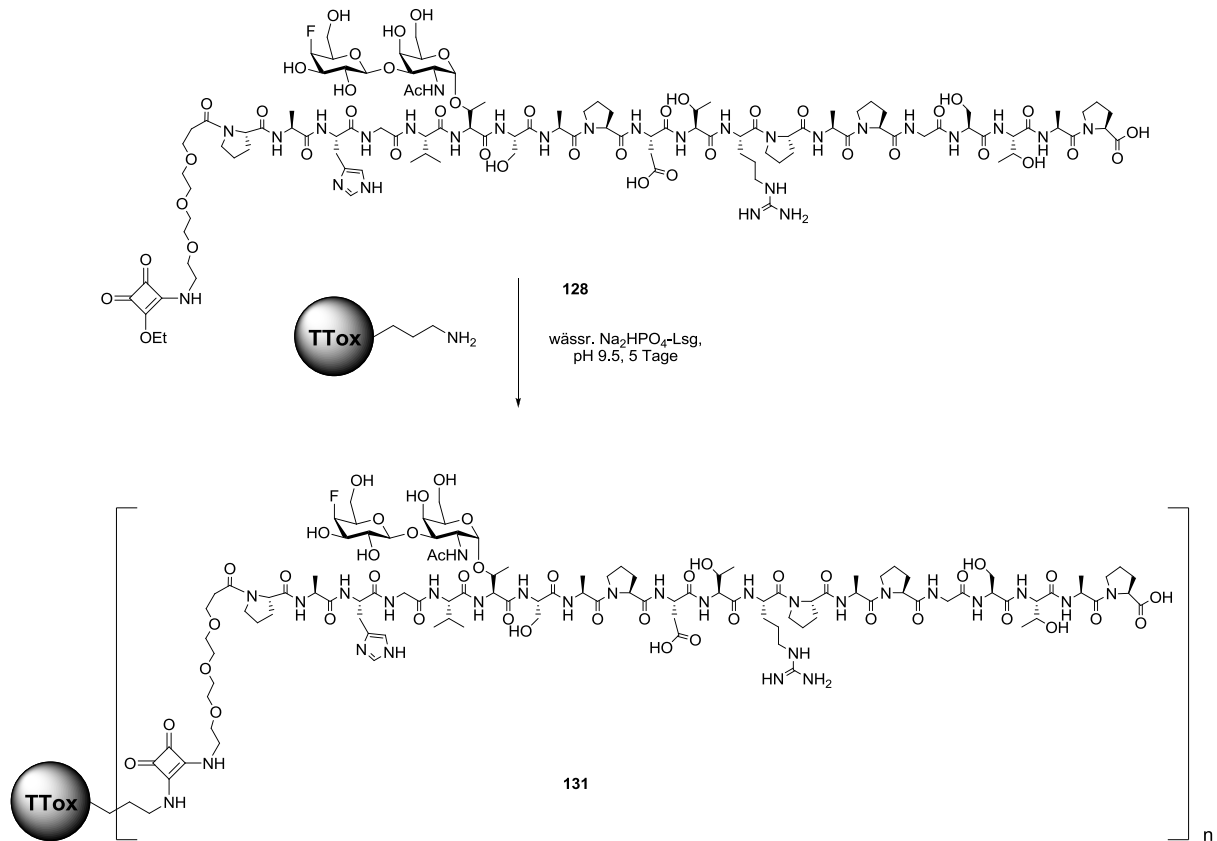


Abb. 3.144: Synthese des fluorierten Tetanus-Toxoids mit in 4'-Position fluoriertem MUC1-Glycopeptid

Immunologische Evaluierung der fluorierten Glycopeptidanaloga

Nachdem die beiden BSA-Konjugate **129** und **130** bzw. das Tetanus-Toxoid-Konjugat **131** erfolgreich hergestellt werden konnten, sollte nun in ersten Tests die immunologischen Eigenschaften der fluorierten Antigene untersucht werden. Hierzu wurde anhand von Neutralisationsexperimenten geprüft, ob die fluorierten Glycopeptide spezifisch an Antikörper, die bei der Impfung von Mäusen mit einer analogen natürlichen bzw. eng verwandten fluorierten Glycopeptidstruktur erhalten wurden, binden. Zur Erzeugung der Antikörper wurden dabei MUC1-Glycopeptidstrukturen verwendet, die ebenfalls an Thr⁶ mit der T-Antigeneinheit^[38] **132** bzw. mit einem difluorierten Analogon, das in Position 6 und 6' Fluoratome trägt (**133**),^[40,41] funktionalisiert waren. (Abb. 3.145)

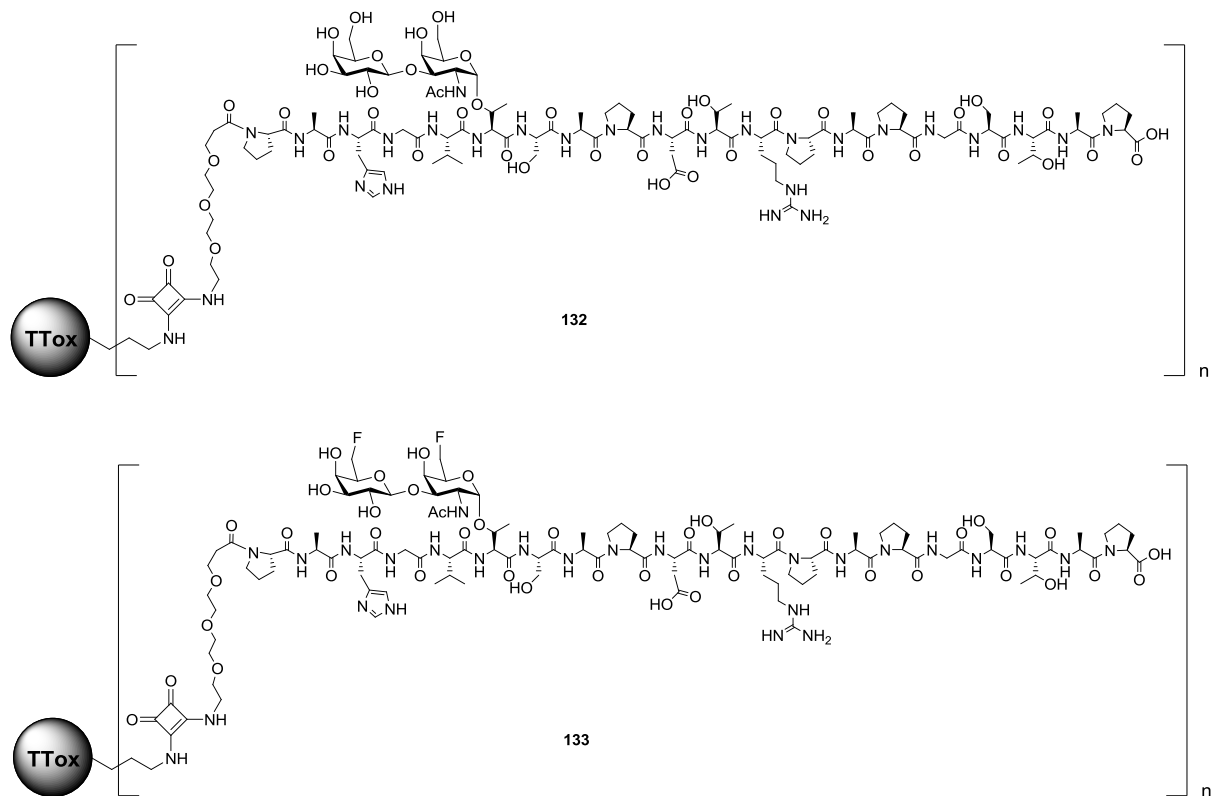


Abb. 3.145: Bereits als Vakzine eingesetzte natürliche bzw. fluoridierte Tetanus-Toxoid-Konjugate 132 und 133

Neutralisationsexperimente mittels ELISA-Tests dienen in erster Linie dazu, die Selektivität der Antikörper zu studieren, um so Aufschluss über deren strukturelle Erkennungsmotive zu erhalten. Bei diesen Experimenten sollte herausgefunden werden, ob die gegen T-Antigen-Strukturen gerichteten Antikörper in der Lage sind, die fluoridierten Antigenanaloge zu erkennen und an sie zu binden. Dies würde bedeuten, dass die Einführung des Fluorsubstituenten das grundlegende Erkennungsmotiv des Antigens nicht verändert hat, so dass mit Hilfe der nicht-natürlichen Konstrukte ebenfalls tumorselektive Antikörper erhalten werden könnten.

In diesen Tests wird die Verteilung eines Antikörpers zwischen zwei verschiedenen antigenen Strukturen untersucht, wobei eine der Strukturen auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert ist, während das zweite Antigen frei in Lösung vorliegt und daher später gewaschen werden kann. Durch eine Farbreaktion kann die Bindung des Antikörpers an die fixierte Antigenstruktur visualisiert werden. Bei der Verwendung von Antikörpern aus Maus-Serum kann hierzu ein biotinylierter Anti-Maus-Antikörper eingesetzt werden, welcher spezifisch die an das BSA-Konjugat gebundenen Serum-Antikörper erkennt. (Abb. 3.146)

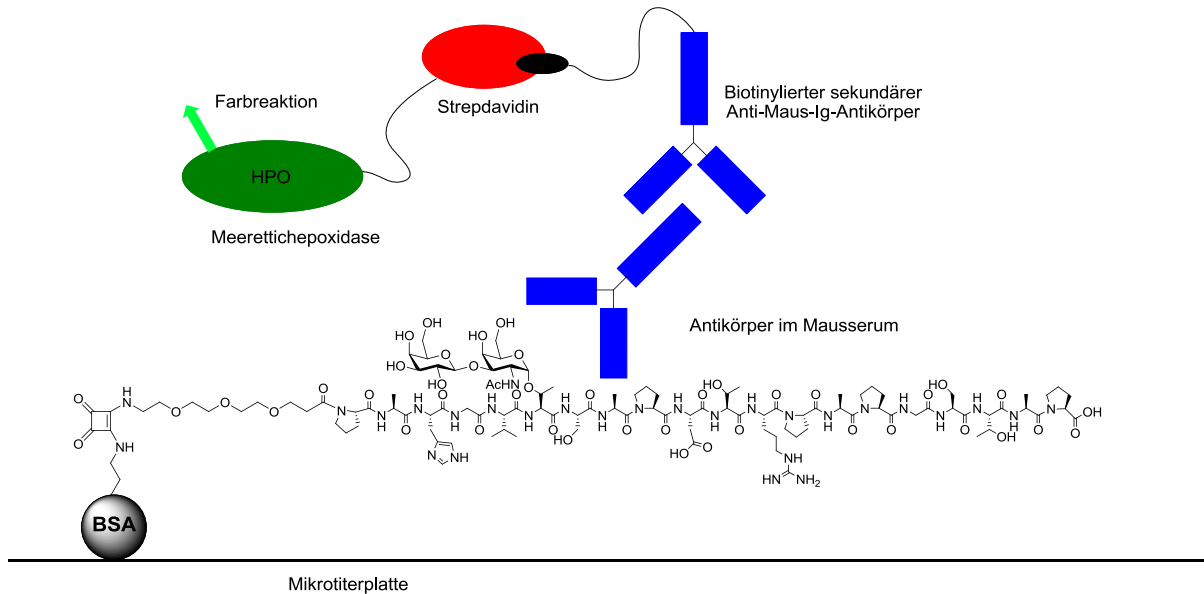


Abb. 3.146: Prinzip des ELISA-Tests

Der biotinylierte Anti-Maus-Antikörper wird anschließend mit einem Streptavidin-Meerrettichepoxidase-Konjugat nachgewiesen, indem die Peroxidase den farblosen Stoff ABTS (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)) zum freien, grünfarbigen Radikal oxidiert, dessen charakteristische Absorptionsbande bei $\lambda = 410 \text{ nm}$ detektiert werden kann. (Abb. 3.147)

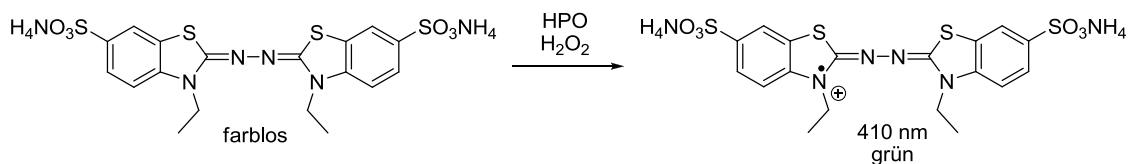


Abb. 3.147: Oxidation des ABTS-Farbstoffs

Bei der Auftragung der Absorptionswerte gegen die Verdünnung resultieren so Informationen über die Konzentration der Antikörper gegen das auf der Mikrotiterplatte immobilisiert vorliegende Antigen.

In ELISA-Tests wurden die jeweiligen fluoridierten MUC1-Glycopeptide **123** und **124** und das difluorierte Glycopeptid **125**, das anstelle der vollständigen 20 Aminosäuren umfassenden *Tandem-Repeat*-Sequenz ein um vier Aminosäuren verkürztes Teilstück enthält, bezüglich ihrer Bindung durch die Maus-Antikörper untersucht. (Abb. 3.148)

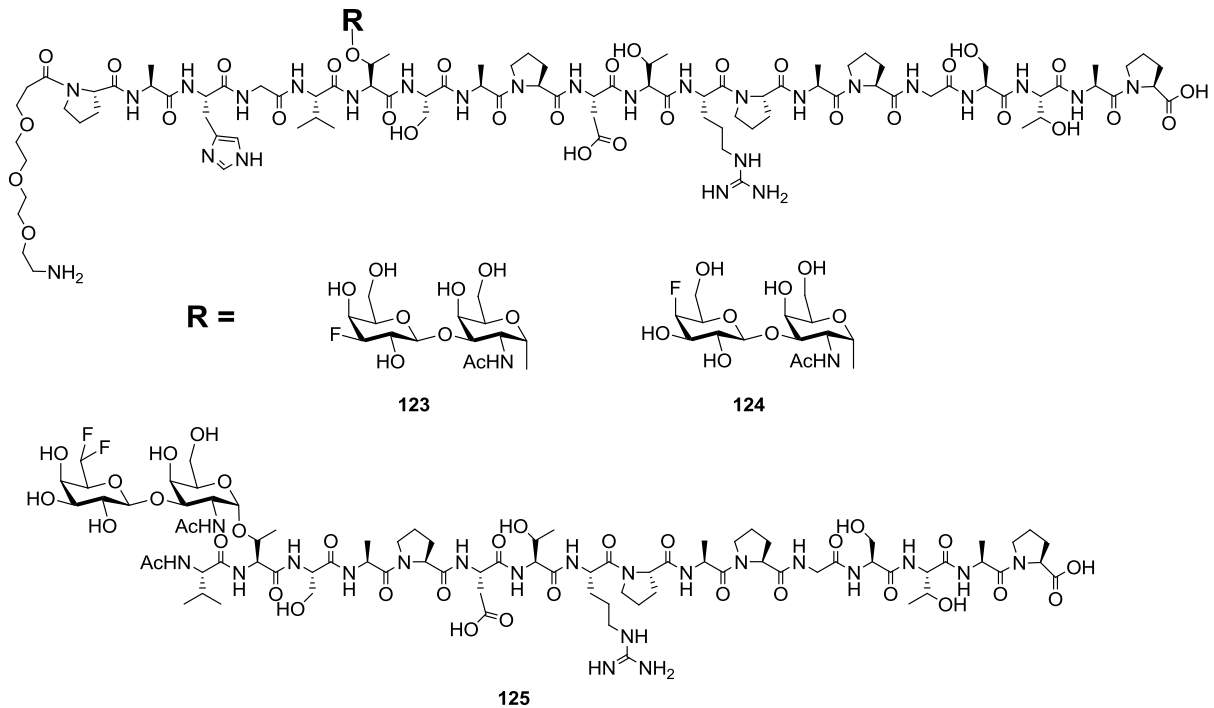


Abb. 3.148: Struktur der in Neutralisationstests untersuchten fluorierten Glycopeptide 123, 124 und 125

Dazu wurden die Glycopeptide zunächst auf einer Mikrotiterplatte mit dem bis in die Nähe des Titerpunktes verdünnten Serum der vakzinierten Maus inkubiert. Gleichzeitig wurde eine weitere Platte mit einem MUC1-BSA-Konjugat beschichtet, das der Struktur des bei der Impfung verwendeten Vakzins entsprach. Nach einer Stunde wurden die inkubierten Seren auf die mit den BSA-Konjugaten beschichtete Platte übertragen und es wurde ein ELISA-Test durchgeführt, wobei die Restbindefähigkeit der Antikörper an die immobilisierten Antigene überprüft wird.

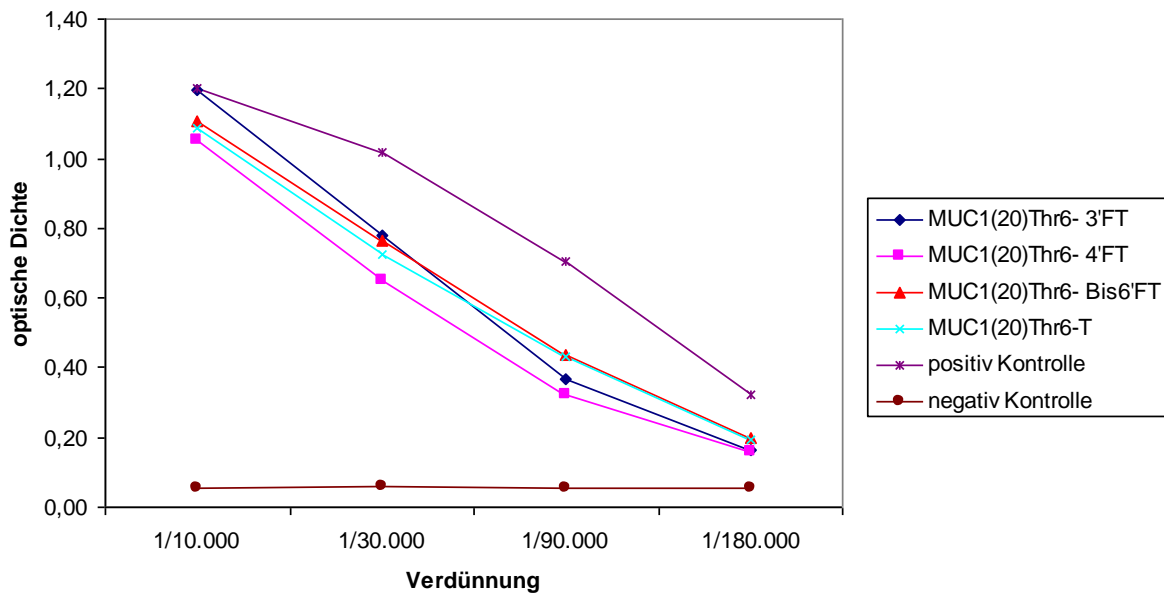


Abb. 3.149: Neutralisations-ELISA des Serums einer mit einem natürlichen Glycopeptid-Antigen vakzinierter Maus

In Abb. 3.149 ist das Ergebnis des Neutralisations-ELISA-Tests gezeigt, bei dem die Bindung der Glycopeptide an Mausantikörper untersucht wird, die mit einem MUC1-Glycopeptid-Vakzin mit einer T-Antigen-Einheit als Kohlenhydratepitop und dem Tetanus-Toxoid als T-Zell-Epitop erhalten wurden. Bei der positiven Kontrollreaktion wurde dem Serum keinerlei Antigen zugesetzt, so dass die vorhandenen Antikörper vollständig an das immobilisierte Antigen binden und den maximalen Absorptionswert des ELISA-Tests widerspiegeln. Die negative Kontrollreaktion enthält keinerlei Serum, so dass keine Antikörper zugegen sind und keine Farbreaktion auftritt. Diese Versuchsanordnung dient damit lediglich zum Nachweis der korrekten Durchführung des Tests. Alle weiteren Daten im abgebildeten Diagramm belegen eine Bindung der fluorierten Antigene **123**, **124** und **125** an die zugesetzten Antikörper. Da selbst die unvollständige MUC1-Sequenz des in 6'-Position difluorierten T-Antigens **125** erkannt wird, scheinen auch in diesem Fall alle wichtigen Bindungskontakte in der verkürzten Sequenz vorhanden zu sein.

In einem weiteren ELISA-Experiment wurde die Bindungsaffinität von Serum-Antikörpern an die synthetisierten Strukturen untersucht, die durch Immunisierung einer Maus mit einem MUC1-Glycopeptid mit difluoriertem T-Antigen-Struktur gewonnen werden konnte (**133**).

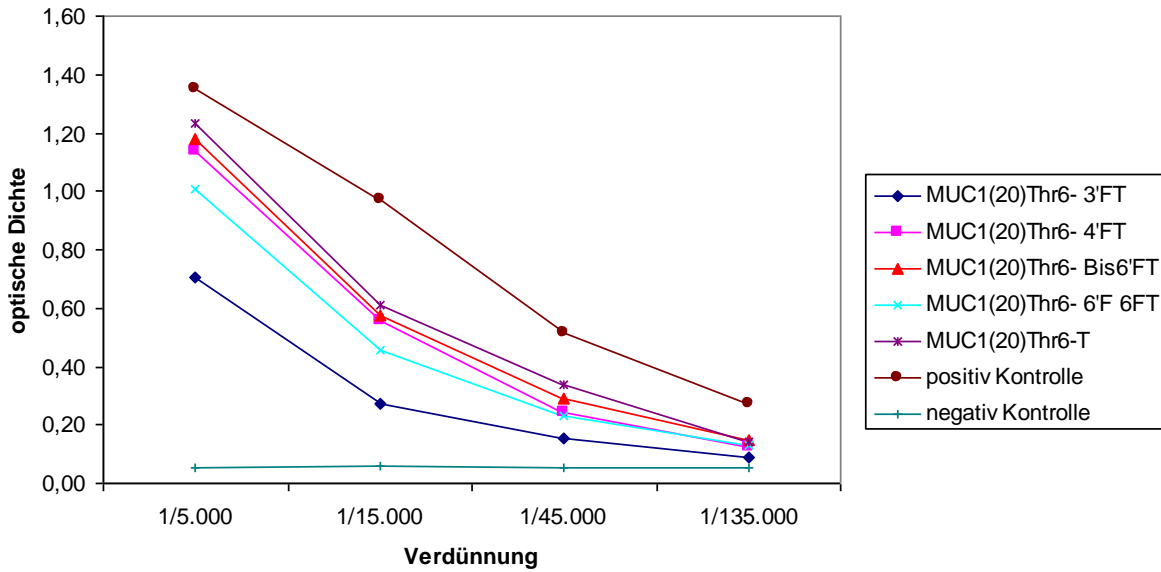


Abb. 3.150: Neutralisations-ELISA des Serums einer mit einem difluorierten Glycopeptid-Antigen vakzinierter Maus

In diesem Test (Abb. 3.150) ist wiederum zu erkennen, dass alle drei fluorierten Antigenstrukturen inklusive der verkürzten 6',6'-Di-F-MUC1-Glycopeptidstruktur von den Antikörpern gebunden werden. Wie zuvor zeigen die verschiedenen Antigene alle eine vergleichbare Bindungsaffinität zu den Antikörpern, wobei hier das in 3'-Position fluorierte Glycopeptid am besten an die vorhandenen Antikörper bindet. Um die Ursache hierfür finden zu können, wären jedoch weitergehende Untersuchungen, wie z.B. STD-NMR-Studien nötig, mit deren Hilfe Bindungskontakte zwischen Antigen und Antikörper untersucht werden können.

Insgesamt belegen die durchgeführten ELISA-Neutralisationsexperimente jedoch, dass die in den verschiedenen Positionen fluorierten MUC1-Glycopeptide **123**, **124** und **125** von Antikörpern, die gegen eng verwandte Antigenstrukturen gerichtet sind, gut erkannt werden. Damit erscheint es vielversprechend, die neu synthetisierten Glycopeptide in Antitumor-Vakzinen für weitergehende Studien einzusetzen. Ein Nachweis der Immunogenität dieser Verbindungen ist allerdings noch zu erbringen. Da jedoch strukturell eng verwandte fluorierte Glycopeptide auf Basis eines T-Antigen-Analogons ebenfalls eine mit natürlichen Strukturen vergleichbare Immunogenität und Antikörperspezifität gezeigt haben,^[41] sollte dies auch für die vorgestellten Verbindungen zutreffen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Eine wünschenswerte Alternative bzw. Ergänzung zu den bereits etablierten Behandlungsmethoden von Krebs ist die Immuntherapie, bei der mit Hilfe von Antitumorimpfstoffen ein selektiver Angriff auf Tumorgewebe erreicht werden soll, ohne dass es dabei zur Schädigung von gesundem Gewebe kommt. Bedingt durch charakteristische Veränderungen der Expression und Aktivität verschiedener Enzyme (z.B. Glycosyltransferasen) werden auf malignen Zelloberflächen stark verkürzte, hochgradig sialylierte Glycoproteine des Mucintyps exprimiert. Die ungenügende Abschirmung durch die verkürzten Glycanketten führt dabei zu einer Freilegung des Peptidrückgrats, wodurch Bindungsepitope für eine Erkennung zugänglich werden. Um das Immunsystem zur Bekämpfung des charakteristisch veränderten malignen Gewebes aktivieren zu können, ohne dabei Autoimmunreaktionen zu initiieren, müssen exakt definierte tumorassoziierte Glycopeptide in Anti-Tumor-Vakzinen eingesetzt werden.

Da Glycopeptide jedoch einem raschen Abbau durch im Körper ubiquitär vorkommende Glycosidasen unterliegen, wäre es von großer Bedeutung, wenn die metabolische Stabilität des Impfstoffs und damit auch dessen Verweilzeit im Organismus erhöht werden könnte, da so ggf. stärkere Immunantworten resultieren würden.

Denkbar wäre es, eine größere Verweilzeit der Verbindung durch den Einsatz von hydrolysestabilen Kohlenhydratmimetika zu erreichen. Dabei ist allerdings eine große strukturelle und konformative Ähnlichkeit zwischen dem Mimetikum und der natürlichen Struktur zu gewährleisten, um ausreichend selektive Antikörperantworten zu erhalten.

Ein interessanter und bisher noch kaum genutzter Ansatz hierzu beruht auf dem Einsatz von selektiv fluorierten Kohlenhydratseitenketten in mucinanalogen Glycopeptidantigenen. Da die gezielte Substitution einer Hydroxyfunktion des Kohlenhydratpitops durch einen Fluorsubstituenten die Konformation des Saccharids in der Regel nicht drastisch ändert, wird zwar eine nicht-natürliche Struktur erhalten, die jedoch antigene Epitope enthält, die denen der natürlichen Verbindung sehr stark ähneln. Zudem führt der Einbau von Fluoratomen in strategischen Positionen aufgrund dessen elektronenziehender Wirkung zu einer veränderten Stabilität der glycosidischen Bindung. Um Einblicke in die Struktur-Wirkungsbeziehung von fluorierten Glycosiden zu erhalten und die gewonnenen Erkenntnisse für die gezielte Herstellung von metabolisch stabilen Glycopeptidmimetika nutzen zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit neue MUC1-Glycopeptidantigenanaloge mit fluorierten Thomson-Friedenreich-Antigeneinheiten (T-Antigen) synthetisiert werden, wobei die Einführung der

Fluorsubstituenten in den Positionen 3, 4 und 6 der terminalen Kohlenhydrat-Einheit erfolgen sollte. (Abb. 4.1)

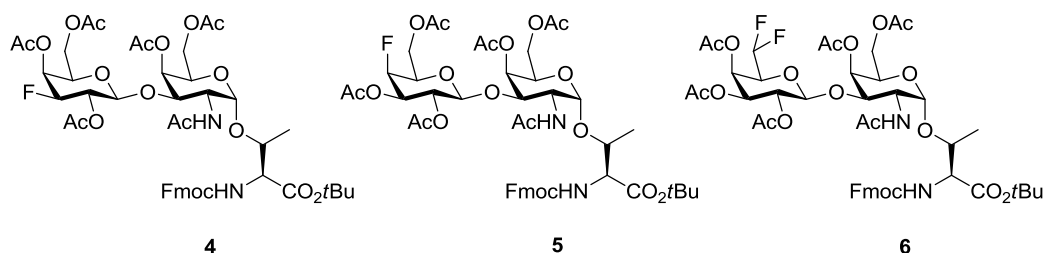


Abb. 4.1: Fluorierte Disaccharide

Zum Aufbau dieser Substanzen musste zunächst ein synthetischer Zugang zu reaktiven fluorierten Glycosyldonoren gefunden werden. Im Fall des 3F-Galactosyldonors wurde hierzu von Glucose **13** ausgegangen, aus der nach Inversion der beiden in 3- und 4-Position befindlichen Stereozentren zunächst ein Gulosederivat **44** als Fluorierungsvorläufer hergestellt wurde. Durch Umsetzung mit DAST[®] in einer nucleophilen Fluorierungsreaktion mit nachfolgender Schutzgruppenmanipulation konnte schließlich das gewünschte Galactosylbromid **1** für die zentrale Glycosylierungsreaktion bereitgestellt werden. (Abb. 4.2)

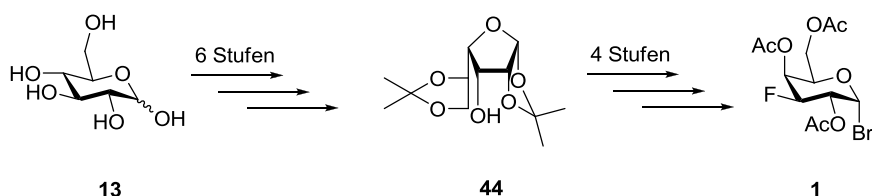
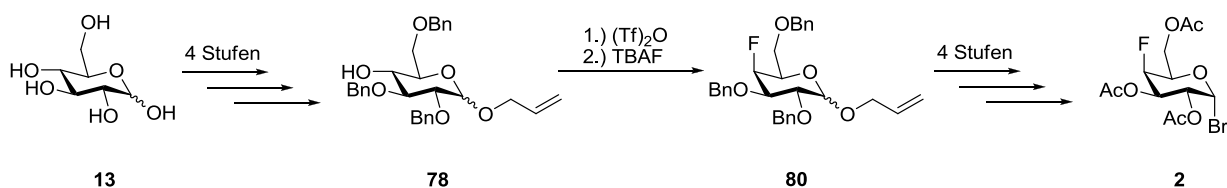
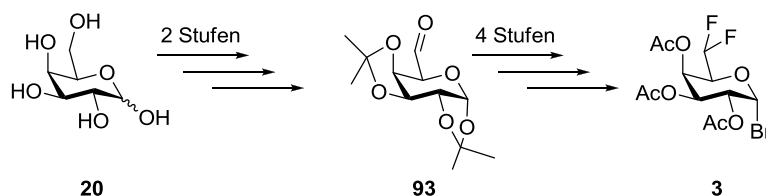


Abb. 4.2: Synthese des in 3-Position fluorierten Galactosylbromids **1**

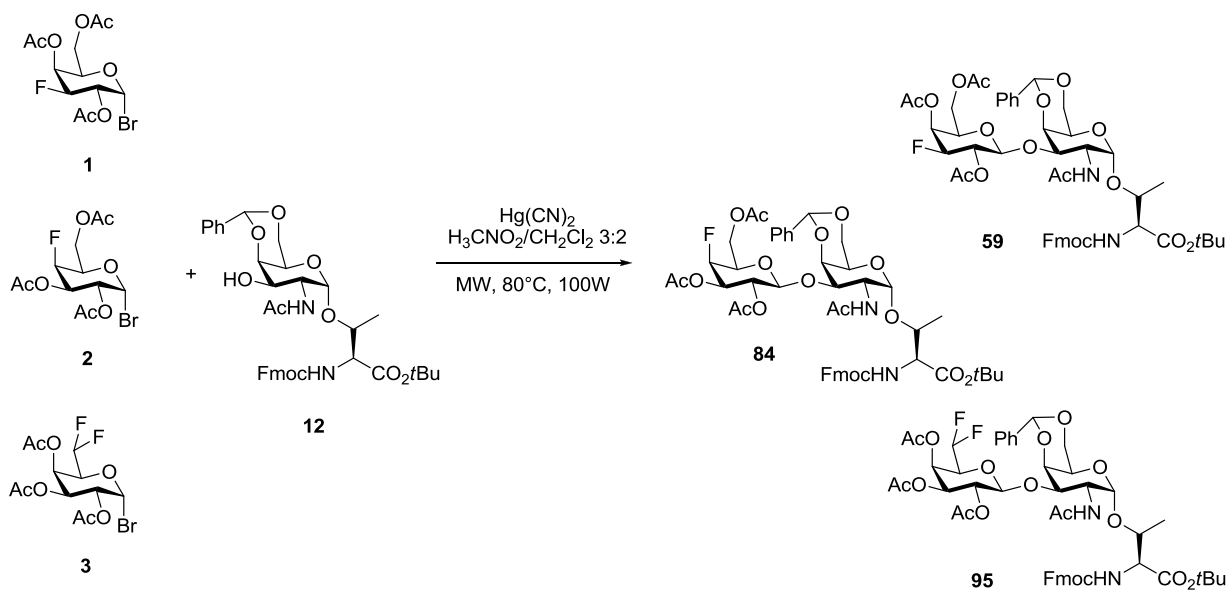
Zur Synthese des in 4-Position fluorierten Donors wurde ebenfalls von Glucose **13** ausgegangen, die nach Einführung eines geeigneten Schutzgruppenmusters und Überführung der 4-OH-Funktion in ein Triflat einen entsprechenden Fluorierungsvorläufer **79** darstellte. Nucleophile Substitution des Triflats mit Tetrabutylammoniumfluorid führte zu dem Fluorid **80**, welches schließlich über weitere vier Stufen in das gewünschte 4F-Galactosylbromid **2** umgewandelt werden konnte. (Abb. 4.3)

Abb. 4.3: Synthese des 4-F-Galactosylbromids **2**

Zur Synthese des difluorierten Galactosylbromids **3** wurde hingegen aus Galactose **20** zunächst der Aldehyd **93** dargestellt, welcher nach Umsetzung mit DAST[®] und erneuter Schutzgruppenmanipulation über insgesamt sechs Stufen den benötigten Donor **3** lieferte. (Abb. 4.4)

Abb. 4.4: Synthese des difluorierten Glycosyldonors **3**

In den darauffolgenden Glycosylierungsreaktionen nach *Helferich* wurden die Bromide **1**, **2** und **3** mit einem literaturbekannten T_N-Akzeptor-Baustein **12**, der aus Galactose und Fmoc-Thr-*O*tBu in neun Stufen mit einer Gesamtausbeute von 6% hergestellt werden konnte, zu den entsprechenden Disacchariden **59**, **84** und **95** umgesetzt. (Abb. 4.5)

Abb. 4.5: Synthese der fluorierten Disaccharide **59**, **84** und **95**

In Abhängigkeit von der Anzahl und Position der Fluorsubstituenten traten bei dieser Reaktion deutliche Reaktivitätsunterschiede auf. Während das in 4'-Position fluorierte Disaccharid **84** mit Hilfe einer mikrowellenunterstützten Glycosylierungsreaktion in einer Ausbeute von 90% erhalten werden konnte, lieferten die Umsetzungen zu den in 3'- bzw. in 6'-Position fluorierten Disacchariden deutlich geringere Ausbeuten von 67% bzw. 42%, die weder durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen noch durch die Verwendung der reaktiveren Trichloracetimidat-Donoren signifikant verbessert werden konnten.

Zum Einsatz der fluorierten T-Antigene in der Festphasenpeptidsynthese mussten zunächst die Benzylidenacetale in Acetyl-Schutzgruppen überführt und die Carbonsäurefunktion deblockiert werden. (Abb. 4.6)

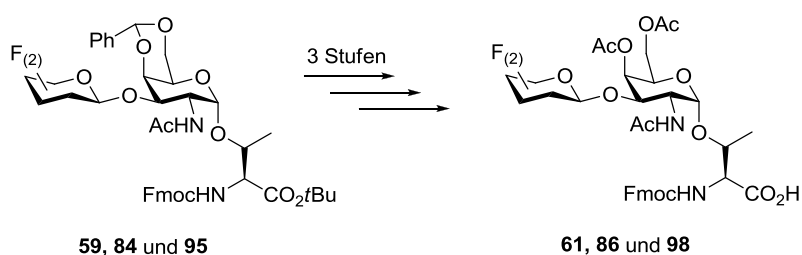
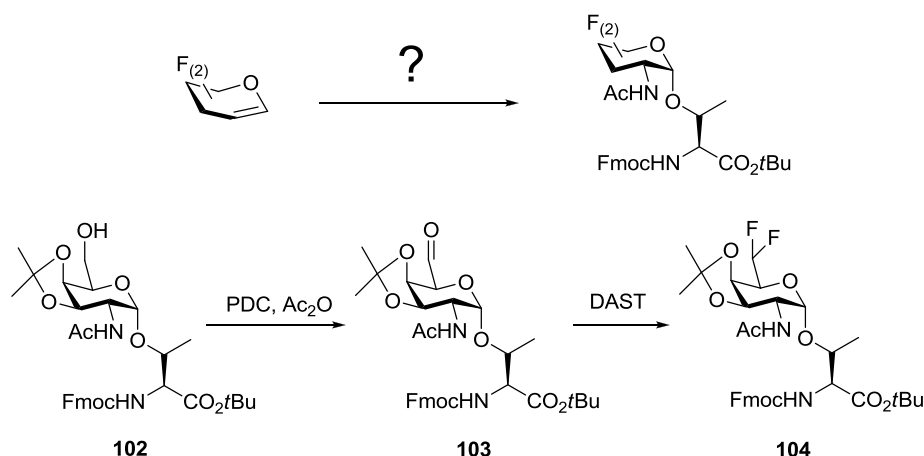


Abb. 4.6: Synthese der fluorierten Festphasenbausteine **61**, **86** und **98**

Da auf den Oberflächen maligner Zellen neben dem T-Antigen auch das T_N-Antigen als tumorassoziierte Antigenstruktur auftritt, sollte dieses ebenfalls in fluorierte Form synthetisiert werden. Da die schrittweise Synthese der 3-Fluor-, 4-Fluor- und 6,6-Difluor-T_N-Antigene ausgehend von den jeweiligen Galactalvorläufern Probleme bereitete, wurden erste Versuche zum Einbau der CHF₂-Gruppe durch direkte nucleophile Desoxyfluorierung eines Glycosylaminosäurebausteins **103** unternommen. So konnte ausgehend von einem Isopropyliden-geschützten Vorläufer (**102**) eine geeignete Oxidation der primären Alkoholfunktion zum Aldehyd **103** unter Verwendung von Pyridiniumdichromat ausgearbeitet werden. Letzterer wurde durch Umsetzung mit DAST[®] in das entsprechende difluorierte T_N-Antigen **104** überführt, ohne dass die labile Glycanseitenkette bzw. Schutzgruppen beeinträchtigt wurden. (Abb. 4.7)

Abb. 4.7: Direkte Fluorierung des T_N-Antigens 103

Das erhaltene T_N-Derivat **104** stellt ein zentrales Ausgangsprodukt für die Synthese weiterer komplexer Antigene dar, da nach Entfernung der Schutzgruppe sowohl eine Umsetzung zum T-Antigen wie auch zum 2,3-ST-Antigen denkbar ist.

Da es für eine Weiterentwicklung von Glycopeptid-Wirkstoffen von enormer Bedeutung ist, deren metabolische Stabilität zu erhöhen, wurden fluorierte Disaccharide diesbezüglich in ersten Tests untersucht. In einem Galactosidase-Assay unter Verwendung von β -Galactosidase aus Rinderhoden wurde die Stabilität von vier verschiedenen fluorierten T-Antigen-Analoga (Abb. 4.8) im Vergleich zur natürlichen Struktur ermittelt, wobei ein deutlicher Einfluss der Fluorierung auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse nachgewiesen werden konnte.

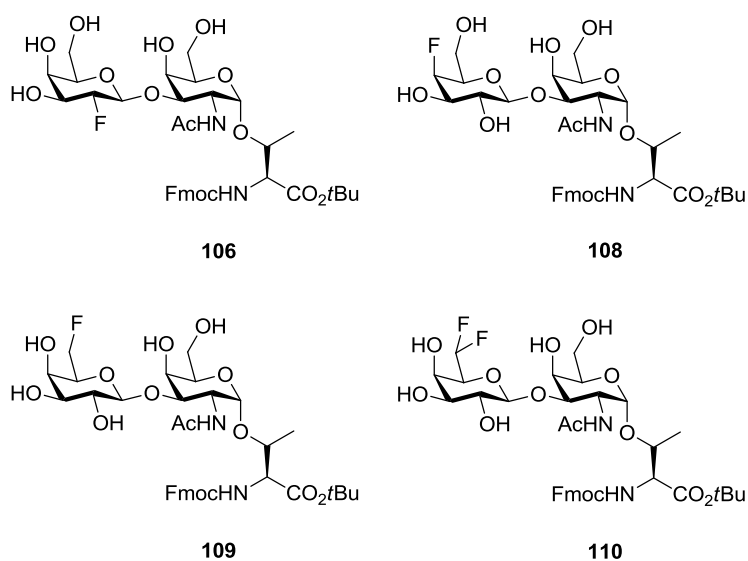


Abb. 4.8: Substrate für die enzymatischen Stabilitätstests

So benötigte der enzymatische Abbau des in 6'-Position monofluorierten Antigens **109** zu Galactose und dem entsprechenden T_N-Antigen eine erheblich längere Zeitspanne. Während das natürliche Substrat bereits nach zwei Stunden zur Hälfte abgebaut wurde, war das 6'-F-T-Antigen nach 2 Tagen lediglich zu 40% in die beiden Monosaccharide gespalten.

Das in 2'-Position fluorierte Substrat (**106**) hingegen zeigte sich wesentlich stabiler. Im Rahmen der gewählten Messmethoden konnte keinerlei Abbau des Disaccharids beobachtet werden. Vielmehr scheint diese Verbindung Inhibitoreigenschaften zu besitzen, da bei Zugabe des natürlichen Antigens auch dieses nur unvollständig abgebaut wurde. Der genaue Mechanismus dieser Hemmung konnte jedoch nicht bestimmt werden und muss daher in folgenden Untersuchungen geklärt werden.

Sowohl das in 4'-Position monofluorierte als auch das in 6'-Position difluorierte Antigen **108** bzw. **110** wurde nicht vom vorhandenen Enzym abgebaut. Allerdings zeigte sich nach Zugabe des natürlichen Substrates allenfalls eine sehr geringe inhibierende Wirkung der fluorierten Disaccharide, wobei die Abbaugeschwindigkeit um den Faktor 2.8 (**108**) bzw. 2.2 (**110**) gesenkt wurde. Dieser recht geringe Wert macht den Einsatz fluoriierter Disaccharid-Strukturen als Vakzinbausteine besonders interessant, da hier keine störenden Effekte durch die irreversible Inhibierung zentraler metabolisch aktiver Enzyme zu erwarten wäre. Damit könnte die verlängerte Exposition des Glycopeptids in einer verstärkten Reaktion des Immunsystems münden, was sich günstig auf die Antikörperbildung auswirken könnte.

Um dies untersuchen zu können, wurden entsprechend fluorierte MUC1-Glycopeptide durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Diese wurden selektiv mit einem nicht immunogenen Oligoethylenglycol-Abstandhalter verknüpft, so dass eine spätere chemoselektive Konjugation dieser MUC1-Glycopeptid-Epitope (**123**, **124**) an immunstimulierende Trägerproteine möglich war. Durch einen technischen Defekt führte die Synthese des difluorierten MUC1-Glycopeptids zwar nicht zum Aufbau der vollständigen *Tandem-Repeat*-Sequenz, doch konnte auch dieses Glycopeptid **125** für erste immunologische Tests verwendet werden. Im Anschluss an die Festphasensynthese wurden die Alkoholfunktionen des Kohlenhydrat-Epitops deblockiert und die fluorierten Glycopeptide wurden mittels semipräparativer HPLC gereinigt. (Abb. 4.9)

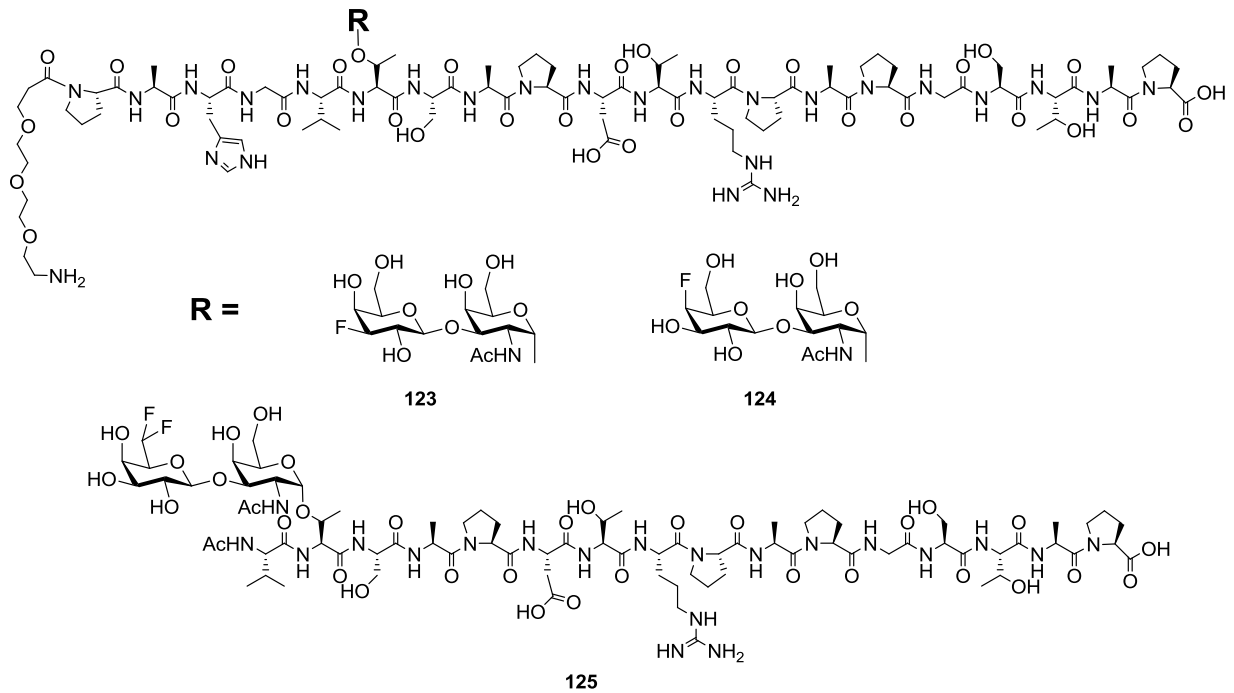


Abb. 4.9: Synthetisierte fluorierte Glycopeptide

Zur Entwicklung eines Anti-Tumor-Vakzins wurde das aminofunktionalisierte fluorierte Glycopeptid **128** über eine Quadratsäure mit einem geeigneten Trägerprotein, wie Tetanus-Toxoid, verknüpft. Hierbei wirkt die Quadratsäure als bifunktioneller Linker, der zunächst bei einem pH-Wert von 8.0 eine Amidbindung mit der Aminofunktion der *N*-terminalen Spaceramino­säure eingeht. Bei einem pH-Wert von 9.5 findet anschließend die Knüpfung einer Amidbindung zwischen der Quadratsäure und der Aminofunktion einer Lysinseitenkette des Trägerproteins statt. (Abb. 4.10)

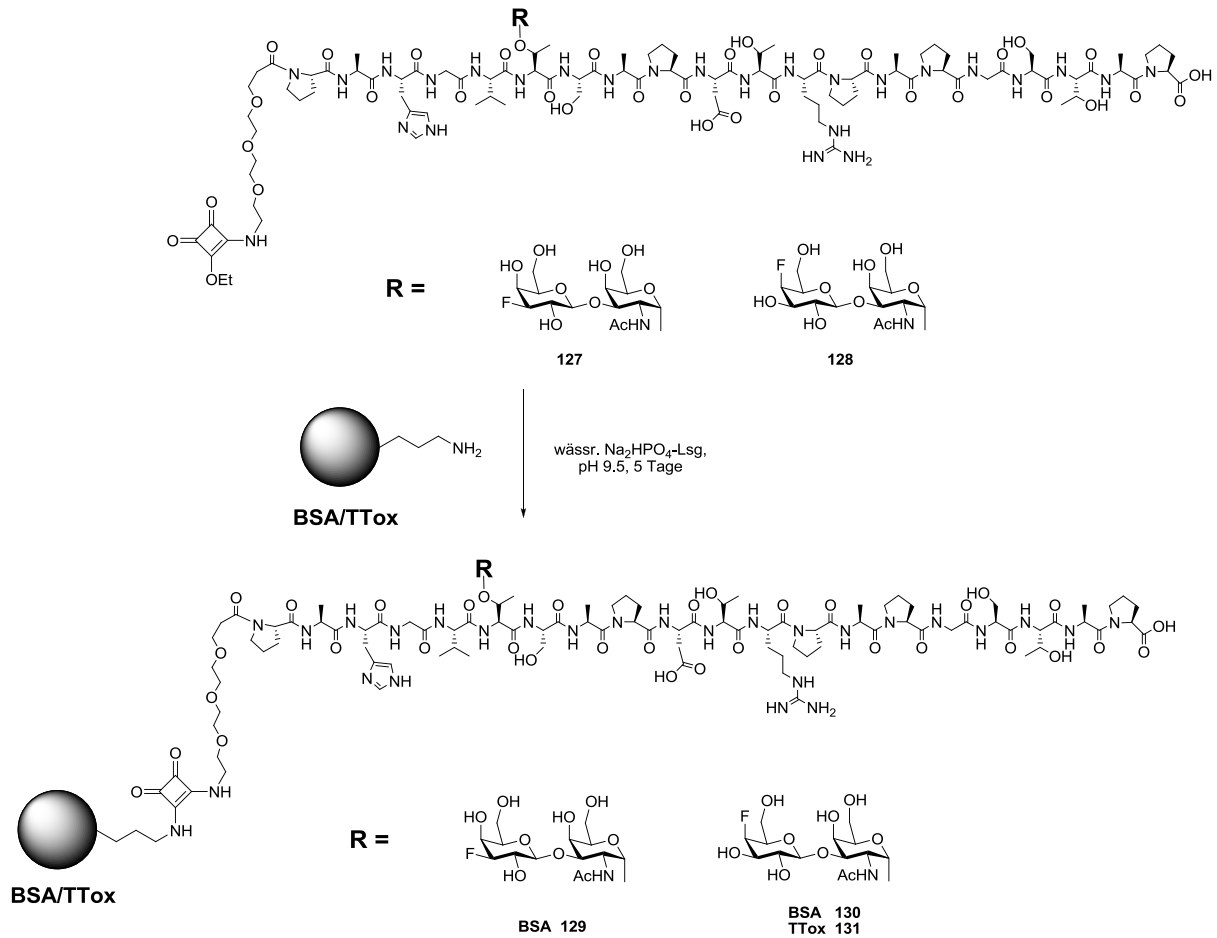


Abb. 4.10: Fluorierte MUC1-Neoglycoproteine aus BSA und Tetanus-Toxoid

In analoger Weise wurde das Rinderserumalbumin (BSA) ebenfalls mit den fluorierten MUC1-Glycopeptiden **127** und **128** verknüpft. Diese Konjugate dienen zwar weniger der Immunisierung, werden aber unter anderem zur Beschichtung von Mikrotiterplatten für immunologische Studien eingesetzt.

In ersten immunologischen Neutralisationstests (Abb. 4.11 und Abb. 4.12) wurde die Affinität bereits vorhandener Antikörper, welche gegen ein natürliches und ein fluoriertes T-Antigen induziert wurden, zu den hergestellten fluorierten Glycopeptidantigenen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle Glycopeptide von den Antikörpern mit ähnlicher Affinität erkannt werden. Selbst die nicht vollständige MUC1-Sequenz wurde erkannt, so dass die fehlenden Aminosäuren keinen direkten Einfluss auf die für die Antikörper entscheidenden Bindungspeptide haben können.

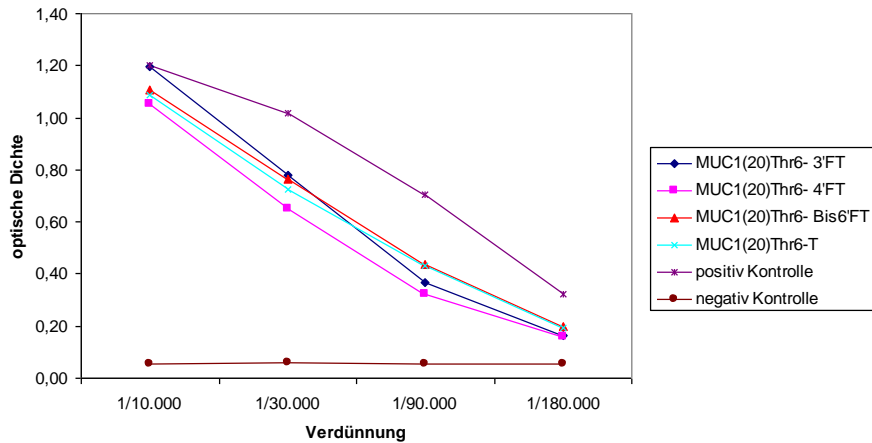


Abb. 4.11: Neutralisations-ELISA des Serums einer mit einem natürlichen Antigen vakzierten Maus

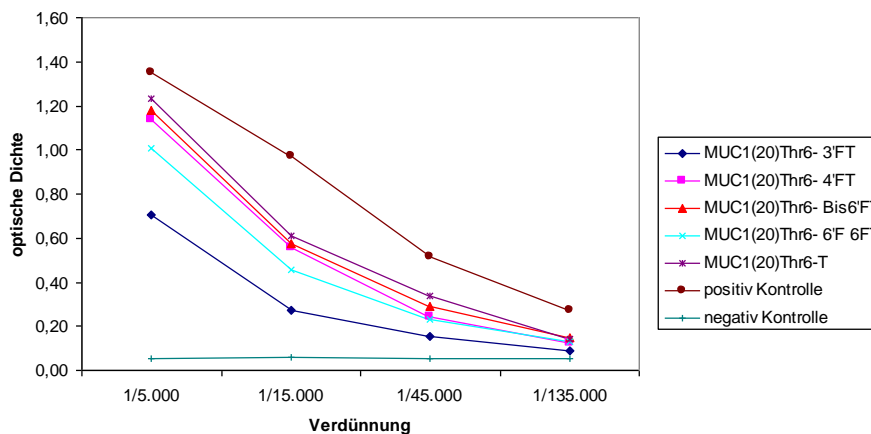


Abb. 4.12: Neutralisations-ELISA des Serums einer mit einem difluorierten Antigen vakzierten Maus

Die Ergebnisse der Neutralisationstests zeigen, dass Antikörper, die gegen strukturverwandte Konjugate gewonnen wurden, in der Lage sind, die hergestellten fluorierten Antigenanaloga zu binden. Aus diesem Grund wäre in einem nächsten Schritt eine Vakzinierung von Mäusen mit diesen Verbindungen von großem Interesse, zumal mit **131** nun auch erstmals ein Glycopeptidantigen-TTox-Konjugat mit signifikant erhöhter metabolischer Stabilität als Vakzinkandidat bereitsteht.

5. Experimententeil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

Lösungsmittel: Alle Lösungsmittel wurden in der Qualität *pro analysi* (p.a.) bezogen und vor Gebrauch destilliert. Absolute Lösungsmittel wurden durch Trocknen nach literaturbekannten Verfahren und anschließende Destillation gewonnen.^[233]

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

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

Flashchromatographie:^[234] Für die Flashchromatographie der in Lösung erzeugten Verbindungen unter erhöhtem Druck (0.5 - 1 mbar), wurde Kieselgel mit einer Partikelgröße von 0.032-0.063 nm der Firma *Acros Organics*, Geel (Belgien) eingesetzt. Das Laufmittel wurde in der Regel durch Redestillation der Eluate anderer Chromatographien gewonnen. Durch Zusatz der polaren oder unpolaren Komponente wurde das Lösungsmittelgemisch so eingestellt, dass die zu isolierende Substanz einen R_f -Wert von 0.05-0.20 aufwies.

Massenspektrometrie:

- MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Tofspec E-Gerät der Firma *Micromass*, Eschborn, bzw. einem *Bruker* Time-of-flight REFLEX-Spektrometer, Billerica (USA) gemessen. Als Matrices dienten 2,5-Dihydroxybenzoesäure (dhb, 17 mg/mL in

H₂O/Acetonitril 1:1, + 0.1% TFA), bzw. Sinapinsäure (10 mg/mL in H₂O/Acetonitril 1:1, + 0.1% TFA).

- ESI-Massenspektren wurden mit einem *Micromass* LCT-Spektrometer, Manchester (England) gemessen.
- Hochaufgelöste HR-ESI-TOF-Spektren wurden mit einem *Micromass* Q-TOF Ultima Spektrometer, Manchester (England) aufgenommen.
- FD-Massenspektren wurden mit einem *Finnigan* MAT-95-Spektrometer der Firma *ThermoElectron*, Boston (USA), gemessen.

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

NMR-Spektroskopie: Die ¹H-, ¹³C- und ¹⁹F-NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten aufgenommen:

- *Bruker* WT-300: 300 MHz-¹H-NMR und 75.5 MHz-¹³C-NMR (Bremen)
- *Bruker* AM-400: 400 MHz-¹H-NMR und 100.6 MHz-¹³C-NMR (Bremen)
- *Bruker* AM-400: 400 MHz-¹H-NMR und 376.4 MHz-¹⁹F-NMR (Bremen)

Die angegebenen Werte für die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das Signal des deuterierten Lösungsmittels bei relativer Kalibrierung zu Tetramethylsilan als Standard. Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffsignale erfolgte unter Verwendung von COSY-, HSQC- und HMBC-Experimenten, soweit angegeben.

Für die Multiplizitäten der Signale gilt:

bs	breites Singulett
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett
pt	pseudo Triplet
t	Triplet
td	Triplet vom Dublett
m	Multiplet

In der schriftlichen Interpretation der ¹H-, ¹³C- und ¹⁹F-Signale wurden die Atome des D-Galactosamins ohne () und die der D-Galactose mit einfacher Apostrophierung (')

gekennzeichnet. Die Atome der Aminosäuren wurden durch indizierte griechische Buchstaben markiert.

RP-HPLC:^[235] Analytische RP-HPLC wurde mit einer *Jasco*-HPLC-Pumpe (PU-2080 Plus), Easton (USA) einer tenären *Jasco*-Gradienteneinheit (LG-2080-02), Easton (USA) und einem *Jasco*-3-Wege-Entgaser (DG-2080-53), Easton (USA) sowie einem *Jasco*-Diodenarraydetektor MD-2010Plus, Easton (USA) durchgeführt. Als Säule wurde eine *Phenomenex Luna*-Säule, Torrance (USA) (C18, 5 μm , 250 \times 4.6 mm) benutzt. Es wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min gearbeitet.

Semipräparative RP-HPLC wurden mit Hilfe zweier *Jasco* Gradientenpumpen (PU-2087Plus), Easton (USA) und einem variablen Wellenlängendetektor, ebenfalls von der Firma *Jasco*, Easton (USA) durchgeführt. Als Säule für die semipräparative HPLC wurde eine *Phenomenex Luna*-Säule, Torrance (USA) (300, C18, 5 μm , 250 \times 20 mm) bei einer Flussrate von 20 mL/min genutzt.

Als Eluenten für die analytische und semipräparative HPLC dienten Gemische aus Acetonitril (A) und Wasser (B), gegebenenfalls unter Zusatz von 0.1% Trifluoressigsäure. Die jeweiligen Gradienten sowie die Wellenlänge, bei der die Detektion erfolgte, sind bei den entsprechenden Verbindungen angegeben. Acetonitril (HPLC-grade) wurde bei der Fa. *Fisher-Scientific*, Schwerte, erworben, das HPLC-Wasser wurde einer Simplicity185-Anlage der Firma *Millipore*, Billerica (USA) entnommen.

Festphasenpeptidsynthese: Die Peptid- und Glycopeptidsynthesen an der Festphase wurden an einem *Perkin-Elmer* ABI 433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems*, Carlsbad (USA) durchgeführt, der zur Kontrolle des Syntheseverlaufs mit einem externen *Perkin-Elmer* Series 200 UV/Vis-Detektor der Firma *Applied Biosystems*, Carlsbad (USA) ausgestattet ist. Die polymeren Träger für die Festphasensynthese wurden von der Firma *Calbiochem-Novabiochem AG*, Läfelingen, Schweiz, und der Firma *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, erworben. Die verwendeten Aminosäurebausteine wurden von den Firmen *Orpegen Pharma*, Heidelberg, bzw. *Calbiochem-Novabiochem AG*, Läfelingen (Schweiz), bezogen. In den sich wiederholenden Syntheseabschnitten wird zunächst die *Fmoc*-Schutzgruppe durch Behandlung (3 \times 2.5 min) des Harzes mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon (NMP) abgespalten. Zur Überprüfung des Abspaltungsvorgangs wird über UV-Absorption das gebildete Dibenzofulven-Piperidin-Addukt in NMP bei einer Wellenlänge von $\lambda = 301$ nm detektiert.

Die darauf folgenden sequentiellen Aminosäurekupplungen werden jeweils mit einer Reaktionslösung von 1 mmol des *Fmoc*-geschützten Aminosäurebausteins, 1 mmol HBTU,

1 mmol 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 2 mmol *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA) in DMF unter starkem Schütteln (Vortex, 20-30 min) durchgeführt. Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz zur Acetylierung verbleibender freier Aminofunktionen 5 min mit einer Lösung aus 0.5 M Acetanhydrid, 0.125 M DIPEA und 0.015 M HOBt in NMP (Capping-Reagenz) behandelt. Das Harz wird nach jedem Syntheseschritt mit NMP gespült, nach Abschluss der Synthese mit Dichlormethan gewaschen und schließlich im Stickstoffstrom getrocknet.

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

Tetanus-Toxoid wurde von der Firma *CLS Behring*, Marburg, bezogen und wurde in einer Natriumchlorid-Pufferlösung (17mg Tetanus-Toxoid/mL) ohne weitere Reinigung eingesetzt.

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

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

ELISA-Materialien

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

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

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

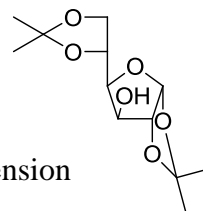
Citrat-Puffer: 40 mM Zitronensäure, 60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -Lösung, pH = 4.4 – 4.5 BTS/ H_2O_2 -Lsg. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzylthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz (Sigma), c(ABTS) = 1 mg/mL Citrat-Puffer; Zugabe von 25 μl einer 0.3%-igen H_2O_2 -Lösung in Citrat-Puffer / mL ABTS-Lösung.

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

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

5.2 Synthesen zu Kapitel 3.1

1,2;5,6-Di-*O*-isopropyliden- α -D-glucofuranose (**43**)^[83]



Zu 400 mL Aceton wurden 20.00 g (0.111 mol) **13** gegeben und die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt. Es wurde tropfenweise mit 16 mL (0.299 mol) konz. Schwefelsäure versetzt, wobei die Temperatur nicht über 10 °C anstieg, und fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Neutralisation wurde in die nun klare gelbe Reaktionslösung unter Eiskühlung mit 11.97 g (0.299 mol) Natriumhydroxid, gelöst in 30 mL Wasser, gegeben, wobei die Innentemperatur 10 °C nicht überstieg. Der Ansatz wurde mit festem NaHCO₃ versetzt, so dass sich ein pH-Wert von 8.0 einstellte, und über Nacht stehen gelassen. Der entstandene Feststoff wurde über *Hyflo* abfiltriert, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 18.85 g (65%, 72.42 mmol) farbloser Feststoff

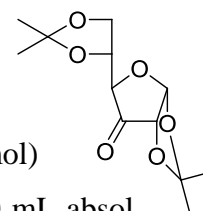
R_f = 0.46 (^cHex/EtOAc, 1:1)

C₁₂H₂₀O₆ (M=260.284 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 5.90 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 3.65 Hz, 1-H), 4.49 (d 1H, $J_{H2,H1}$ = 3.64 Hz, 2-H), 4.34 – 4.25 (m, 2H, 6a-H, 6b-H), 4.13 (dd, 1H, $J_{H4,H5}$ = 8.62 Hz, $J_{H4,H3}$ = 7.07 Hz, 4-H), 4.02 (dd, 1H, $J_{H3,H4}$ = 7.04 Hz, $J_{H3,H2}$ = 2.76 Hz, 3-H), 3.96 (dd, 1H, $J_{H5,H4}$ = 8.64 Hz, $J_{H5,H6a/b}$ = 5.26 Hz, 5-H), 2.78 (s, 1H, OH), 1.46, 1.41, 1.33, 1.28 (4s, 12H, 4 × CH₃).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[83]

1,2;5,6-Di-*O*-isopropyliden- α -D-ribo-hexofuranos-3-ulose (**46**)^[84]



Zu einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus 26.23 g (69.738 mmol) Pyridiniumdichromat und 19.64 mL (209.2 mmol) Essigsäureanhydrid in 80 mL absol. Dichlormethan wurden 18.15 g (69.738 mmol) des Alkohols **43** gelöst in 40 mL absol. Dichlormethan, langsam zugetropft. Anschließend wurde der Reaktionsansatz drei Stunden

unter Rückfluss erhitzt, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt durch eine Kieselgelschicht (Eluent: EtOAc) filtriert wurde. Das Lösungsmittel wurde erneut unter vermindertem Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 12.74 g (71%, 49.33 mmol) farbloser Feststoff

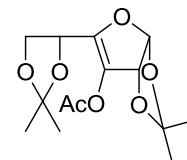
$R_f = 0.60$ (c Hex/EtOAc, 1:1)

$C_{12}H_{18}O_6$ (M=258.268 g/mol)

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[85]

3-O-Acetyl-1,2;5,6-di-O-isopropyliden- α -D-erythro-3-hexenofuranose

(48)^[85,86,87]



Die Ketoverbindung **46** wurde in 200 mL Diethylether und 30 mL Wasser gelöst und über sieben Stunden auf 40 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde zweimal mit je 50 mL Toluol kodestilliert. Nach Trocknen im Hochvakuum wurde das Rohprodukt direkt weiter umgesetzt und mit 100 mL Pyridin und 40 mL Essigsäureanhydrid über Nacht auf 75 °C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde zweimal mit je 50 mL Toluol kodestilliert und das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

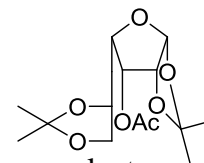
Ausbeute: 8.18 g (59%, 27.25 mmol) leicht gelber Feststoff

$R_f = 0.21$ (c Hex/EtOAc, 5:1)

$C_{14}H_{20}O_7$ (M=300.304 g/mol)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = 5.99 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 5.52$ Hz, 1-H), 5.35 (d, 1H, $J_{H2,H1} = 5.54$ Hz, 2-H), 4.66 (t, 1H, $J_{H5,H6a/b} = 6.45$, 5-H), 4.02 (dd, 2H, $J_{H6a/b,H6a/b} = 6.37$ Hz, $J_{H6a/b,H5} = 2.92$ Hz, 6a/b-H), 2.16 (s, 3H, $CH_3(OAc)$), 1.49, 1.42, 1.40, 1.33 (4s, 12H, 4 \times CH_3).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[85,86,87]

3-O-Acetyl-1,2;5,6-di-O-isopropyliden- α -D-gulofuranose (49)^[87]

In einem Schlenkcolben wurden 300 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) vorgelegt, mehrmals evakuiert und mit Wasserstoff belüftet. Nun wurden 6.57 g (21.88 mmol) des Enolacetats **48**, gelöst in 50 mL Methanol, zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde erneut je zweimal evakuiert und mit Wasserstoff belüftet. Die Reaktionslösung wurde fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt und durch *Hyflo* filtriert. Der Filtrückstand wurde sorgfältig mit Methanol gewaschen und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

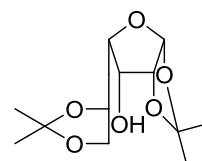
Ausbeute: 5.02 g (76%, 16.62 mmol) farbloser Feststoff

$R_f = 0.07$ (^cHex/EtOAc, 4:1)

$C_{14}H_{22}O_7$ (M=302.320 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 5.80 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 4.15$ Hz, 1-H), 5.05 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 5.62$ Hz, $J_{H3,H4} = 6.78$ Hz, 3-H), 4.79 (dd, 1H, $J_{H2,H1} = 4.17$ Hz, $J_{H2,H3} = 5.66$ Hz, 2-H), 4.67 – 4.54 (m, 1H, 5-H), 4.14 – 4.02 (m, 2H, 4-H, 6a/b-H), 3.58 – 3.43 (m, 1H, 6a/b-H), 2.12 (s, 3H, CH₃(OAc)), 1.56, 1.43, 1.37, 1.33 (4s, 12H, 4 × CH₃).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[87]

1,2;5,6-Di-O-isopropyliden- α -D-gulofuranose (44)^[85,87]

Zu einer Lösung aus 4.83 g (15.96 mmol) der vollständig blockierten Verbindung **49** wurde eine Lösung aus 54.02 mg Natriummethanolat in 75 mL Methanol gegeben, so dass ein pH-Wert von 9.5 erreicht wurde. Das Reaktionsgemisch wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Neutralisation wurde Trockeneis zugegeben, wobei durch den Einsatz eines Wasserbades die Reaktionslösung vor dem Einfrieren bewahrt wurde. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.90 g (94%, 14.98 mmol) farbloser Feststoff

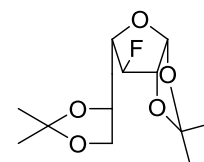
$R_f = 0.31$ ($^6\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:1)

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$ ($M=260.284$ g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 5.73 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 4.12$ Hz, 1-H), 4.61 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 4.14$ Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 6.27$ Hz, 2-H), 4.44 (dt, 1H, $J_{\text{H}_5,\text{H}_4} = 8.63$ Hz, $J_{\text{H}_5,\text{H}_{6a/b}} = 7.02$ Hz, 5-H), 4.22 – 4.14 (m, 2H, 3-H, 6a/b-H), 3.85 (dd, 1H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 8.72$ Hz, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 5.86$ Hz, 4-H), 3.66 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_5} = 8.62$ Hz, $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_{6a/b}} = 7.36$ Hz, 6a/b-H), 2.68 (d, 1H, $J_{\text{OH},\text{H}_3} = 6.42$ Hz, OH), 1.58, 1.40, 1.37, 1.33 (4s, 12H, $4 \times \text{CH}_3$).

1,2;5,6-Di-*O*-isopropyliden-3-desoxy-3-fluor- α -D-galactofuranose

(45)^[82,88]



In 75 mL absol. Dichlormethan wurden 3.23 g (12.39 mmol) des Alkohols **44** und 3.03 g (24.78 mmol) Dimethylaminopyridin vorgelegt und auf -10 °C gekühlt. Anschließend wurden 2.74 mL (22.31 mmol) *N,N*-Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) tropfenweise zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und zwei Tage bei dieser Temperatur gerührt. Nach Zusatz von 10 mL Methanol wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel ($^6\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.73 g (84%, 10.41 mmol) farbloser Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = -24.3$.

$R_f = 0.50$ ($^6\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 4:1)

$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{FO}_5$ ($M=262.275$ g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 5.89 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.82$ Hz, 1-H), 4.79 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3,\text{F}} = 51.46$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.32$ Hz, 3-H), 4.71 (dd 1H, $J_{\text{H}_2,\text{F}} = 14.78$ Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 3.91$ Hz, 2-H), 4.31 (dd, 1H, $J_{\text{H}_5,\text{H}_{6a}} = 13.75$ Hz, $J_{\text{H}_5,\text{H}_{6b}} = 6.62$ Hz, 5-H), 4.08 (ddd, 1H, $J_{\text{H}_4,\text{F}} = 24.31$ Hz, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 7.22$ Hz, $J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 3.35$ Hz, 4-H), 4.05 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_{6a/b}} = 8.42$ Hz, $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_5} = 6.67$ Hz, 6a/b-H), 3.79 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_{6a/b}} = 8.42$ Hz, $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_5} = 6.54$ Hz, 6a/b-H), 1.52, 1.43, 1.35, 1.33 (4s, 12H, $4 \times \text{CH}_3$).

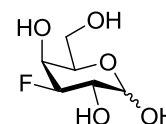
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 113.8, 110.2 ($2 \times \text{C}_q$ (Acetal)), 105.0 (d, $J_{\text{F,C1}} = 2.09$ Hz, C-1), 94.7 (d, $J_{\text{F,C3}} = 182.26$ Hz, C-3), 84.8 (d, $J_{\text{F,C4}} = 25.06$ Hz, C-4), 84.5 (d, $J_{\text{F,C2}} = 30.15$ Hz, C-2), 74.9 (d, $J_{\text{F,C5}} = 7.85$ Hz, C-5), 66.7 (C-6), 27.1, 26.6, 26.4, 25.3 ($2 \times \text{CH}_3$ (Ac)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = -187.2 (ddd, $J_{\text{F,H3}} = 51.46$ Hz, $J_{\text{F,H4}} = 24.31$ Hz, $J_{\text{F,H2}} = 14.78$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 285.08 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 285.11), 547.23 ($[2 \times \text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 547.23).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 285.1108 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 285.1114).

3-Desoxy-3-fluor- α -D-galactopyranose (**29**)^[82,88]



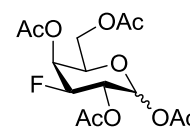
In 50 mL Ethanol und 100 mL Wasser wurde 2.14 g (8.147 mmol) des fluorierten Furanosederivats **45** gelöst und mit 3.00 g Ionentauscher IR 120H⁺ drei Tage auf 65 °C erhitzt. Das Harz wurde abfiltriert, mit Methanol gewaschen und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum wurde das erhaltene Rohprodukt ohne weitere Reinigung in der nächste Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 1.48 g (quant., 8.15 mmol) farbloser Feststoff

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FO}_5$ (M=182.147 g/mol)

ESI-MS (positiv), m/z : 205.05 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 205.05), 387.13 ($[2 \times \text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 387.12),

1,2,4,6-Tetra-*O*-acetyl-3-desoxy-3-fluor- α/β -D-galactopyranose (**51**)^[82,88]



Zu 1.48 g (8.147 mmol) des vollständig deblockierten Galactosederivats **29** wurden 50 mL Pyridin und 7.65 mL (81.47 mmol) Essigsäureanhydrid gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel wurde im

Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 50 mL Toluol kodestilliert und das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.85 g (quant., 8.15 mmol) gelbes Öl

R_f = 0.21 (^cHex/EtOAc, 2:1)

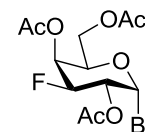
C₁₄H₁₉FO₉ (M=350.294 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), Charakteristische Signale: δ [ppm] = 6.35 (t, 1H, J_{H1,H2} = J_{H1,F} = 4.23 Hz, α-Anomer, 1-H), 5.61 (d, 1H, J_{H1,H2} = 8.23 Hz, β-Anomer).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -204.3 (ddt, J_{F,H3} = 48.32 Hz, J_{F,H4} = 10.73 Hz, J_{F,H2} = 5.32 Hz, J_{F,H1} = 5.32 Hz, α-Anomer), -200.5 (ddd, J_{F,H3} = 47.34 Hz, J_{F,H4} = 11.54 Hz, J_{F,H2} = 5.61 Hz, β-Anomer). Verhältnis α:β = 1:1.7

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[82,88]

2,4,6-Tri-O-acetyl-3-desoxy-3-fluor-α-D-galactosylbromid (**1**)^[90,91]



In 50 mL absol. Dichlormethan wurden 3.90 g (11.15 mmol) des Fluorzuckers **51** vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 7.70 mL (44.590 mmol) einer 33%igen Lösung aus HBr in Eisessig versetzt. Die braune Lösung wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt und nochmals mit 3.00 mL (17.38 mmol) HBr (33%ig in Eisessig) versetzt. Nach weiteren drei Tagen Rührens wurde die Lösung auf 300 mL Eiswasser gegeben, mit festem NaHCO₃ neutralisiert und dreimal mit jeweils 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden zweimal mit je 50 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.84 g (69%, 7.65 mmol) farbloser Feststoff

R_f = 0.50 (^cHex/EtOAc, 2:1)

C₁₂H₁₆BrFO₇ (M=371.154 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 6.65. (pt, 1H, J_{H1,H2} = 4.23 Hz, J_{H1,F} = 4.23 Hz, 1-H), 5.65 (ddd, 1H, J_{H4,F} = 6.01 Hz, J_{H4,H3} = 3.62 Hz, J_{H4,H5} = 1.17 Hz, 4-H), 5.06 (ptd, 1H, J_{H2,F} =

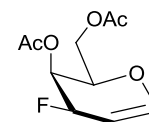
9.91 Hz, $J_{H_2,H_3} = 9.91$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 3.87$ Hz, 2-H), 5.01 (ddd, 1H, $J_{H_3,F} = 68.11$ Hz, $J_{H_3,H_2} = 9.92$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 3.81$ Hz, 3-H), 4.40 (pt, 1H, $J_{H_1,F} = 6.41$ Hz, $J_{H_1,H_2} = 6.41$ Hz, 5-H), 4.20 (dd, 1H, $J_{H_{6a/b},H_{6a/b}} = 11.60$ Hz, $J_{H_6,H_5} = 6.08$ Hz, 6_{a/b}-H), 4.07 (ddd, 1H, $J_{H_{6a/b},H_{6a/b}} = 11.62$ Hz, $J_{H_{6a/b},H_5} = 6.91$ Hz, $J_{H_{6a/b},H_4} = 0.88$ Hz, 6_{a/b}-H), 2.14, 2.14, 2.05 (3s, 9H, 3 × CH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 170.3, 170.1, 169.6 (3 × C=O (OAc)), 87.5 (d, $J_{C_1,F} = 8.82$ Hz, C-1), 86.0 (d, $J_{C_3,F} = 192.91$ Hz, C-3), 71.2 (d, $J_{C_5,F} = 5.46$ Hz, C-5), 68.8 (d, $J_{C_2,F} = 19.64$ Hz, C-2), 66.8 (d, $J_{C_4,F} = 17.33$ Hz, C-4), 60.8 (d, $J_{C_6,F} = 1.96$ Hz, C-6), 20.7, 20.6, 20.6 (3 × CH₃(OAc)).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -206.4 – -206.7 (m).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[91]

3-Desoxy-3-fluor-4,6-di-O-acetylgalactal (18)^[93]



Zur Aktivierung wurden 1.80 g (27.48 mmol) Zink zweimal mit verd. Salzsäure (2 M) kurzzeitig versetzt und mit Wasser, Essigsäureethylester und Diethylether gewaschen. Das so behandelte Zink wurde anschließend in 40 mL Essigsäureethylester aufgeschlämmt, mit 0.26 mL (3.298 mmol) *N*-Methylimidazol versetzt und zum Sieden erhitzt. Binnen einer Stunde wurden 1.02 g (2.748 mmol) des anomeren Bromids **1**, gelöst in 10 mL Essigsäureethylester, zugetropft, ehe für weitere zwei Stunden refluxiert wurde. Nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung wurde diese durch *Hyflo* filtriert, die org. Phase wurde zweimal mit je 50 mL verd. Salzsäure (1 M) und 50 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das erhaltene Produkt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.51 g (79%, 2.18 mmol) farbloser Feststoff

R_f = 0.50 (°Hex/EtOAc, 2:1)

C₁₀H₁₈FO₅ (M=232.206 g/mol)

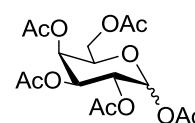
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 6.44 (ddd, 1H, $J_{H_1,H_2} = 6.21$ Hz, $J_{H_1,H_3} = 2.97$ Hz, $J_{H_1,F} = 0.82$ Hz, 1-H), 5.39 – 5.31 (m, 1H, $J_{H_4,F} = 13.63$ Hz, 4-H), 5.22 – 5.05 (m, 1H, $J_{H_3,F} =$

51.26 Hz, 3-H), 4.98 – 4.92 (m, 1H, 2-H), 4.42 – 4.24 (m, 3H, 5-H, 6a/b-H), 2.14, 2.07 (2s, 6H, 2 × CH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 170.6, 170.0 (2 × C=O (OAc)), 146.3 (d, J_{C1,F} = 8.33 Hz, C-1), 98.5 (d, J_{C2,F} = 20.44 Hz, C-2), 80.4 (d, J_{C3,F} = 179.11 Hz, C-3), 72.5 (C-5), 65.5 (d, J_{F4,F} = 16.49 Hz, C-4), 61.4 (d, J_{C6,F} = 6.76 Hz, C-6), 20.8, 20.7 (2 × CH₃(OAc)).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -183.7 (d, J_{F,H3} = 49.12 Hz).

Penta-*O*-acetyl- α/β -D-galactopyranose (**134**)^[62,100,236]



Unter Argonatmosphäre wurden 25.00 g (138.8 mmol) D-Galactose **20** in 200 mL Pyridin gelöst und unter Rühren bei 0 °C langsam mit 130 mL (1.388 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt. Die Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt bis eine klare Lösung entstand, auf Eiswasser gegossen und die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

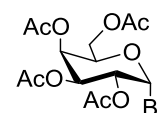
Ausbeute: 54.17 g (quant., 138.8 mmol), gelbliches Öl (Anomerengemisch).

R_f = 0.34 (°Hex/EE 1:1).

C₁₆H₂₂O₁₁ (M = 390.339 g/mol)

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[236]

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactosylbromid (**54**)^[62,100]



Es wurden 54.17 g (0.139 mol) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- α -D-galactopyranose (**134**), gelöst in 100 mL Dichlormethan, bei 0 °C innerhalb einer Stunde mit 100 mL HBr (33%ig in Eisessig) versetzt. Anschließend wurde die Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Zur Hydrolyse wurde das Reaktionsgemisch mit 100 mL Dichlormethan verdünnt, auf Eiswasser gegossen und mit festem NaHCO₃ unter Eiskühlung neutralisiert. Die wässrige Phase wurde

zweimal mit je 150 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden zweimal mit je 150 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und 150 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 55.11 g (96%, 0.13 mol) gelbes Öl

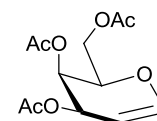
R_f = 0.47 (°Hex/EtOAc, 2:1)

C₁₄H₁₉BrO₉ (M = 411.199 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 6.68 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.92 Hz, 1-H), 5.50 (d, 1H, J_{H4,H3} = 2.35 Hz, 4-H), 5.39 (dd, 1H, J_{H3,H2} = 10.64 Hz, J_{H3,H4} = 3.32 Hz, 3-H), 5.03 (dd, 1H, J_{H2,H3} = 10.62 Hz, J_{H2,H1} = 4.05 Hz, 2-H), 4.47 (t, 1H, J_{H5,H6a/b} = 6.68 Hz, 5-H), 4.20 – 4.06 (m, 2H, 6a/b-H), 2.14, 2.10, 2.04, 2.00 (4s, 12H, 4 × CH₃)

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[237,238]

3,4,6-Tri-O-acetylgalactal (**16**)^[93]



Es wurden 87.54 g (1.339 mol) Zinkpulver durch zweimaliges Behandeln mit verd. Salzsäure (2 M) und Waschen mit Wasser, Essigsäureethylester und Diethylether aktiviert. Das so behandelte Zink wurde anschließend in 400 mL Essigsäureethylester aufgeschlämmt, mit 12.68 mL (0.161 mol) *N*-Methylimidazol zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden 55.05 g (0.134 mol) des anomeren Bromids **54**, gelöst in 240 mL Essigsäureethylester, über eine Stunde zugetropft und das Gemisch wurde weitere zwei Stunden refluxiert. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung durch *Hyflo* filtriert. Die org. Phase wurde zweimal mit je 150 mL verd. Salzsäure (1 M) und ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Flashchromatographie an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 2:1) lieferte das Produkt **16**.

Ausbeute: 25.88 g (71%, 95.13 mmol) farbloses Öl

R_f = 0.35 (°Hex/EtOAc, 2:1)

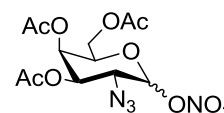
C₁₂H₁₆O₇ (M = 272.251 g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 6.43 (dd, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 6.36$ Hz, $J_{\text{H1,H3}} = 1.72$ Hz, 1-H), 5.57 – 5.45 (m, 1H, 3-H), 5.44 – 5.40 (m, 1H, 4-H), 4.72 – 4.67 (m, 1H, 2-H), 4.32 – 4.29 (m, 1H, 5-H), 4.24 – 4.14 (m, 2H, 6a/b-H), 2.09, 2.05, 2.00 (3s, 9H, $3 \times \text{CH}_3(\text{OAc})$)

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[239]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosyl-nitrat

(55)^[96]



Es wurden 18.61 g (33.94 mmol) Cerammoniumnitrat und 1.10 g (16.97 mmol) Natriumazid, das zuvor vier Stunden im Hochvakuum getrocknet wurde, in 80 mL absol. Acetonitril bei 5 °C tropfenweise mit 3.08 g (11.31 mmol) Galactal **16**, gelöst in 10 mL absol. Acetonitril, versetzt. Nach zwei Tagen Reaktionszeit wurde die Suspension mit 250 mL kaltem Diethylether versetzt und die Mischung wurde auf 300 mL Eiswasser gegossen. Die erhaltene org. Phase wurde dreimal mit je 100 mL Wasser gewaschen und mit MgSO_4 getrocknet. Das resultierende Anomerengemisch wurde ohne weitere Charakterisierung in der nächsten Stufe eingesetzt.

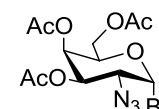
Ausbeute: 2.71 g (61%, 6.89 mmol) gelbes Öl

$R_f = 0.40$ ($^c\text{Hex/EtOAc}$, 2:1)

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_{10}$ ($M = 376.086$ g/mol)

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[96]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (15)^[240,241,242]



Zu einer Suspension aus 4.79 g (55.14 mmol) LiBr in 30 mL absol. Acetonitril wurden langsam 3.46 g (9.191 mmol) Azidonitrat **55**, gelöst in 20 mL absol. Acetonitril, gegeben. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und die erhaltene org. Phase wurde zweimal mit je 60 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem

Trocknen mit MgSO₄ wurden die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (Hex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.08 g (85%, 7.81 mmol) gelbes Öl

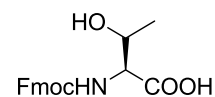
R_f = 0.38 (Hex/EtOAc, 2:1)

C₁₂H₁₆BrN₃O₇ (M = 394.175 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 6.45 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.75 Hz, 1-H), 5.52 – 5.46 (m, 1H, 4-H), 5.34 (dd, 1H, J_{H3,H2} = 10.71 Hz, J_{H3,H4} = 2.96 Hz, 3-H), 4.45 (pt, 1H, J_{H5,H6a/b} = 6.33 Hz, 5-H), 4.16 – 4.07 (m, 2H, 6a/b-H), 3.99 (dd, 1H, J_{H2,H3} = 10.71 Hz, J_{H2,H1} = 2.98 Hz, 2-H), 2.14, 2.04, 2.03 (3s, 9H, 3 × CH₃(OAc)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[243,244]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-Threonin (53)**^[98,99]



Zu einer Lösung aus 31.75 g (0.267 mol) L-Threonin **52** und 22.38 g (0.267 mol) NaHCO₃ in 1600 mL Aceton und Wasser (1:1) wurden 89.86 g (0.267 mol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) portionsweise unter Rühren gegeben. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde mit konz. Salzsäure auf pH = 2.0 angesäuert und Aceton wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten org. Phasen wurden anschließend zweimal mit je 100 mL verd. Salzsäure (1 M) und 100 mL Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit Toluol und zweimal mit Dichlormethan kodestilliert.

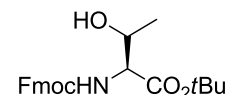
Ausbeute: 83.71 g (92%, 0.25 mol) farbloser kristalliner Feststoff

C₁₉H₁₉NO₅ (M = 341.358 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.72 (d, 2H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.43 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60 – 7.54 (m, 2H, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.38 – 7.22 (m, 4H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc), 6.07 (d, 1H, J_{NH,Tα} = 8.82 Hz, NH-Urethan), 4.45 – 4.31 (m, 4H, CH₂-Fmoc, T^α, T^β), 4.16 (t, 1H, J_{CH,CH2} = 6.96 Hz, CH-Fmoc), 1.23 (d, 3H, J_{Tγ, Tβ} = 6.28 Hz, T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[245]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-threonin-*tert*-butylester(14)**^[98,99]



Eine Mischung aus 67.14 g (0.325 mol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, 31.43 g (0.424 mol) *tert*-Butanol und 0.68 g (6.902 mmol) wasserfreiem Kupferchlorid wurden unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss vier Tage lang gerührt. Die dunkelgrüne Reaktionsmischung wurde mit 40 mL absol. Dichlormethan verdünnt und binnen 45 Minuten unter Eiskühlung mit 33.66 g (98.61 mmol) Fmoc-Thr-OH **53**, gelöst in 100 mL absol. Dichlormethan, versetzt. Es wurden 90 Minuten gerührt, wobei farbloser Harnstoff ausfiel, der durch *Hyflo* abfiltriert wurde. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, da aus dem Filtrat immer wieder Harnstoff auskristallisierte. Das Filtrat wurde anschließend im Vakuum eingeeengt und der ausgefallene Harnstoff wurde abgesaugt. Die so erhaltene org. Phase wurde dreimal mit je 100 mL ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in wenig Essigsäureethylester aufgenommen und über Nacht im Tiefkühlfach aufbewahrt. Nach erneuter Abtrennung des ausgefallenen Harnstoffs wurde das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EE 4:1 → 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 14.55 g (37%, 36.61 mmol), farbloser kristalliner Feststoff

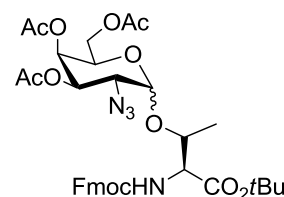
R_f = 0.16 (^cHex/EE 4:1)

C₂₃H₂₇NO₅ (M = 397.464 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.77 (d, 2H, *J*_{H4,H3} = *J*_{H5,H6} = 7.42 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H, *J*_{H1,H2} = *J*_{H8,H7} = 7.47 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.43 – 7.29 (m, 4H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc), 5.60 (d, 1H, *J*_{NH,Tα} = 8.45 Hz, NH-Urethan), 4.41 (d, 2H, *J*_{CH2,CH} = 7.02 Hz, CH₂-Fmoc), 4.31 – 4.21 (m, 3H, CH-Fmoc, T^α, T^β), 1.49 (s, 9H, 3 × CH₃(*t*Bu)), 1.25 (d, 3H, *J*_{Tγ,Tβ} = 6.32 Hz, T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[246]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-azido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α/β -D-galacto-pyranosyl)-L-Threonin-*tert*-butylester (56)**^[140]



Eine Mischung aus 25.35 g (63.35 mmol) Fmoc-Thr-*O*tBu **14**, gelöst in 150 mL absol. Toluol und absol. Dichlormethan (1:1), wurde mit 13 g frisch aktiviertem Molekularsieb (4 Å) eine Stunde unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde bei 0 °C mit 26.03 g (94.41 mmol) Silbercarbonat und 4.60 g (20.41 mmol) Silberperchlorat, gelöst in 20 mL absol. Toluol, versetzt. Anschließend wurden 20.12 g (51.03 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid **15**, gelöst in 200 mL absol. Toluol und absol. Dichlormethan (1:1), binnen einer Stunde zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und drei Tage gerührt, bevor mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und durch *Hyflo* filtriert wurde. Die org. Phase wurde zweimal mit je 100 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. und mit 100 mL einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/EtOAc, 10:1) gereinigt. Das erhaltene Anomerengemisch wurde ohne weitere Trennung zur Reduktion eingesetzt.

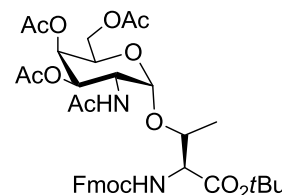
Ausbeute: Anomerengemisch: 31.11 g (85%, 43.38 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$R_f = 0.71$ (Dichlormethan/EtOAc, 10:1)

C₃₅H₄₂N₄O₁₂ (M = 710.728 g/mol)

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[140,247]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-L-Threonin-*tert*-butylester (57)**^[140]



Zu 37.18 g (52.46 mmol) Fmoc-Thr-(α Ac₃GalN₃)-*O*tBu **56**, gelöst in 600 mL THF, Acetanhydrid und Essigsäure (3:2:1), wurden 34.30 g (0.525 mol) Zinkstaub gegeben, welcher zunächst durch eine 2%ige CuSO₄-Lösung (5.68 g in 160 mL dest. Wasser) aktiviert und mit Wasser, Essigsäureethylester und Diethylether gewaschen wurde. Die

Suspension wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, durch *Hyflo* filtiert und der Filterkuchen wurde mit 200 mL THF gewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt wurde anschließend fünfmal mit je 50 mL Toluol und zweimal mit je 50 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Produkt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 9.87 g (26%, 13.58 mmol, über 2 Stufen) farbloser Feststoff

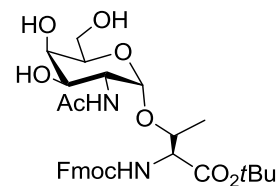
R_f = 0.13 (^cHex/EtOAc, 1:1)

C₃₇H₄₆N₂O₁₃ (M = 726.767 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.78 (d, 2H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.36 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2H, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.23 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.43 – 7.26 (m, 4H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc), 6.03 (d, 1H, J_{NH,Tα} = 10.21 Hz, NH-Urethan), 5.63 (d, 1H, J_{NH,H2} = 8.96 Hz, NH-Ac), 5.39 (s, 1H, 4-H), 5.10 (dd, 1H, J_{H3,H2} = 11.45 Hz, J_{H3,H4} = 3.21 Hz, 3-H), 4.89 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.53 Hz, 1-H), 4.65 – 4.57 (m, 1H, 2-H), 4.48 – 4.43 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.28 – 4.08 (m, 6H, 5-H, 6a/b-H, CH-Fmoc, T^α, T^β), 2.16 (s, 3H, CH₃(OAc)), 2.04 (s, 3H, CH₃(AcNH)), 1.99 (s, 6H, 2 × CH₃(OAc)), 1.46 (s, 9H, 3 × CH₃(*t*Bu)), 1.32 (d, 3H, J_{Tβ,Tγ} = 6.44 Hz, T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[140]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-Threonin-*tert*-butylester (58)^[248]**



Zu 4.00 g (5.504 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-*O**t*Bu **57**, gelöst in 40 mL Methanol, wurde tropfenweise eine frisch hergestellte Natriummethanolatlösung (1% in Methanol) gegeben, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur und unter strikter Kontrolle des pH-Werts gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von saurem Ionenaustauscher *Amberlyst IR 120* neutralisiert. Es wurde filtiert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 10:0.8) gereinigt.

Ausbeute: 2.76 g (83%, 4.59 mmol), farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.21$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:0.8)

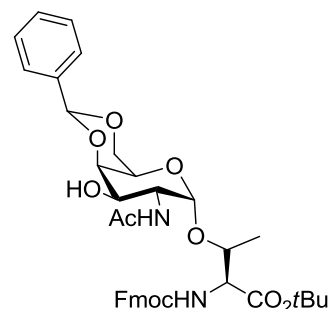
$\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{10}$ ($M = 600.657$ g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7.77 (d, 2H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.46$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.44$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = J_{\text{H}_6,\text{H}_7} = 7.01$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.31 (t, 2H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = J_{\text{H}_7,\text{H}_6} = 7.47$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.90 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 8.14$ Hz, NH-Ac), 5.82 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.22$ Hz, NH-Urethan), 4.87 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.76$ Hz, 1-H), 4.44 – 4.24 (m, 4H, CH_2 -Fmoc, CH-Fmoc, 2-H) 4.16 – 4.07 (m, 3H, T^α , T^β , 4-H), 3.86 – 3.83 (m, 4H, 3-H, 5-H, 6a/b-H), 2.10 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{NHAc})$), 1.45 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3(t\text{Bu})$), 1.29 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma, \text{T}\beta} = 6.21$ Hz, T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[248]

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (12)^[106,140]**

Zu 0.75 g (1.247 mmol) Fmoc-Thr(α -GalNAc)-*O**t*Bu **58**, gelöst in 25 mL Acetonitril, wurden tropfenweise 0.47 mL (3.117 mmol) Benzaldehyddimethylacetal gegeben. Durch Zugabe von *p*-Toluolsulfonsäure wurde ein pH-Wert von 4.0 eingestellt und die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Triethylamin neutralisiert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:3) gereinigt.



Ausbeute: 0.80 g (94%, 1.17 mmol), farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.46$ ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:3)

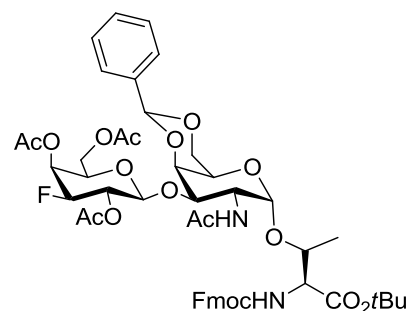
$\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}$ ($M = 688.763$ g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7.78 (d, 2H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.42$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 6.93$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.54 – 7.47 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.43 – 7.26 (m, 7H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{ar} (Bzn)), 6.50 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 8.29$ Hz, NH-Ac), 5.55 (bs, 2H, NH-Urethan, CH (Bzn)), 4.93 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.15$ Hz, 1-H), 4.54 – 4.38 (m, 3H, 2-H, 6a/b-H), 4.28 – 4.21 (m, 2H, CH-Fmoc, T^α), 4.21 – 3.98 (m, 4H, 4-H, CH_2 -

Fmoc, T^β), 3.85 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 10.85$ Hz, $J_{H3,H4} = 2.86$ Hz, 3-H), 3.69 (s, 1H, 5-H), 2.08 (s, 3H, CH₃(NHAc)), 1.45 (s, 9H, 3 × CH₃(*t*Bu)), 1.27 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.26$ Hz, T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[140]

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[2,4,6-tri-*O*-acetyl-β-D-3-desoxy-3-fluorgalacto-pyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (59)**



Eine Lösung von 0.68 g (0.984 mmol) Fmoc-Thr-(α-4,6-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu **12** in 12.5 mL einer Mischung aus absol. Nitromethan und absol. Dichlormethan (3:2) wurde mit 900 mg frisch aktiviertem Molekularsieb (4 Å) und 0.50 g (1.967 mmol) Quecksilber(II)cyanid versetzt. Das Gemisch wurde 30 min unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt, bevor eine Lösung aus 0.73 g (1.967 mmol) Ac₃GalFBr (**1**) in 12.5 mL absol. Nitromethan und absol. Dichlormethan (2:3) zugegeben wurde. Es wurde drei Stunde in der Mikrowelle bei 80 °C und 100W (5 min Aufheizphase, $p_{\max}=5.0$ bar) erhitzt und anschließend durch *Hyflo* in 80 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. filtriert. Die erhaltene wässrige Phase wurde mit 80 mL Dichlormethan extrahiert und die org. Phase wurde mit je 40 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. und einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 2:3) gereinigt. Zur vollständigen Charakterisierung wurde eine kleine Menge der Verbindung mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 0.64 g (67%, 0.66 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +67.04.$

$R_f = 0.38$ (°Hex/EtOAc, 2:3)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264$ nm)

R_t = 26.7 min

Zeit (min)	0	10	25	60
Acetonitril (%)	50	50	77	100
Wasser (%)	50	50	23	0

C₅₀H₅₉FN₂O₁₇ (M=979.005 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.54 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60 (d, 2H, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.79 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.55 – 7.47 (m, 2H, H_{ar}-Bzn), 7.43 – 7.26 (m, 7H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc, H_{ar}-Bzn), 5.84 (d, 1H, J_{NH,2H} = 9.19 Hz, NH-Ac), 5.62 (d, 1H, J_{NH,Tα} = 9.22 Hz, NH-Urethan), 5.56 – 5.50 (m, 2H, CH-Bzn, 4'-H), 5.24 (dd, 1H, J_{H2',F} = 19.15 Hz, J_{H2',H1'} = 9.85 Hz, 2'-H), 4.93 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.26 Hz, 1-H), 4.71 – 4.62 (m, 2H, 1'-H, 2-H), 4.61 – 4.36 (m, 3H, CH₂-Fmoc, 3'-H), 4.28 – 3.98 (m, 8H, T^α, CH-Fmoc, 4-H, T^β, 6a/b-H, 6a/b'-H), 3.88 (dd, 1H, J_{H3,H2} = 10.34 Hz, J_{H3,H4} = 2.73 Hz, 3-H), 3.83 – 3.74 (m, 1H, 5'-H), 3.71 – 3.59 (m, 1H, 5-H), 2.13, 2.08, 2.02, 2.00 (4s, 12H, 4 × CH₃), 1.43 (s, 9H, 3 × CH₃(tBu)), 1.24 (d, 3H, J_{Tγ,Tβ} = 6.3 Hz, T^γ).

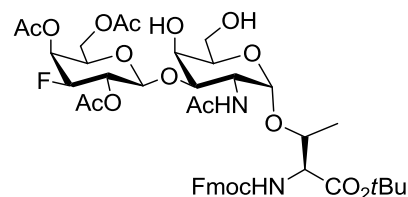
¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl₃), δ [ppm] = 170.5 (C=O (NHAc)), 170.1, 169.8, 169.5 (3 × C=O (OAc, Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.4 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 137.5 (Cq-Bzn), 128.9, 128.2, 127.9 (C_{ar} (Bzn)), 127.1 (C-3-, C-6- Fmoc), 126.2 (C-2-, C-7-Fmoc), 126.0 (C_{ar} (Bzn)), 124.9 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 100.7 (CH-Bzn), 100.5 (C-1), 100.3 (C-1'), 88.8 (d, J_{C3',F} = 195.82 Hz, C-3'), 83.2 (Cq(tBu)), 76.2 (T^β), 75.6 (C-4), 74.0 (C-3), 70.3 (d, J_{C5',F} = 6.26 Hz, C-5'), 69.8 (d, J_{C2',F} = 19.14 Hz, C-2'), 69.1 (C-6), 67.0 (CH₂-Fmoc), 66.9 (d, J_{C4',F} = 14.72 Hz, C-4'), 63.7 (C-5), 61.4 (d, J_{C6',F} = 2.49 Hz, C-6'), 59.1 (T^α), 47.8 (C-2), 47.3 (CH-(Fmoc)), 28.1 (CH₃(tBu)), 20.8, 20.7, 20.7, 20.7 (4 × CH₃(OAc)), 19.1 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -200.1 – -200.6 (m).

ESI-MS (positiv), m/z: 979.41 ([M]⁺, ber.: 979.38), 1002.41 ([M + Na]⁺, ber.: 1002.37).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1001.3715 ([M + Na]⁺, ber.: 1001.3695).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-3-desoxy-3-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (60)**



Eine Lösung aus 324 mg (0.331 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃-GalF-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O*tBu **59** in 50 mL eines Gemisches aus Dichlormethan und Methanol (4:1) wurde mit 350 mg aktiviertem Kieselgel (SiO₂*NaHSO₄)^[108] versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit festem NaHCO₃ neutralisiert, dreimal mit je 50 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 50 mL einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 268 mg (83%, 0.28 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +42.0$$

R_f = 0.33 (EtOAc)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264$ nm)

R_t = 13.9 min

Zeit (min)	0	10	25	60
Acetonitril (%)	50	50	77	100
Wasser (%)	50	50	23	0

C₄₃H₅₅FN₂O₁₇ (M = 890.898 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.74 (d, 2H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.50$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 6.77$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.38 (t, 2H, $J_{\text{H3,H4}} = J_{\text{H6,H5}} = 6.86$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.28 (t, 2H, $J_{\text{H2,H1}} = J_{\text{H7,H8}} = 7.00$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.25 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.41$ Hz, NH-Ac), 5.89 (d, 1H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 8.84$ Hz, NH-Urethan), 5.53 – 5.42 (m, 1H, 4'-H), 5.26 – 5.08 (m, 1H, 2'-H), 4.88 – 4.74 (m, 1H, 1-H), 4.64 – 4.19 (m, 6H, 3'-H, 2-H, CH₂-Fmoc, 1'-H, CH-Fmoc), 4.19 – 4.08 (m, 4H, 4-H, T ^{β} , 6a/b-H), 3.92 – 3.72 (m, 5H, 6a/b'-H, 5-H, 5'-H, T ^{α}), 3.72 – 3.58 (m, 1H, 3-H), 3.41 – 3.16 (m, 1H, OH), 2.84 (bs, 1H, OH), 2.11, 2.10, 2.01, 2.00 (4s, 12H, 4 \times CH₃), 1.42 (s, 9H, 3 \times CH₃(tBu)), 1.27 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.22$ Hz, T ^{γ}).

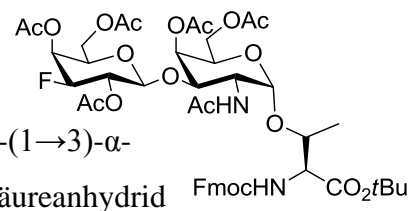
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl_3), δ [ppm] = 170.5 (C=O (NHAc)), 170.3, 170.0, 169.7 (3 \times C=O (OAc, Ester)), 156.6 (C=O (Urethan)), 143.7 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.8 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.0 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.0 (C-4-, C-5-Fmoc), 100.7 (C-1'), 100.0 (C-1), 88.5 (d, $J_{\text{C}3',\text{F}} = 193.81$ Hz, C-3'), 83.0 (Cq(*t*Bu)), 78.1 (C-6), 76.1 (T^β), 70.0 (C-5), 69.9, 68.5, 67.6 (C-5', C-4, C-2'), 66.9 (d, $J_{\text{C}4',\text{F}} = 16.63$ Hz, C-4'), 66.9 (CH_2 -Fmoc), 62.4 (C-6), 61.4 (C-6'), 59.3 (T^α), 47.7 (C-2), 47.2 (CH -Fmoc), 28.0 (CH_3 (*t*Bu)), 20.8, 20.7, 20.7, 20.7 (4 \times CH_3 (OAc)), 18.8 (T^γ).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = -200.0 – -200.5 (m).

ESI-MS (positiv), m/z : 913.30 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 913.34), 1803.65 ($[2 \times \text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 1803.69).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 913.3350 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 913.3382).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(4,6-di-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-3-desoxy-3-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (4)**



Eine Lösung aus 227 mg (0.2546 mmol) Fmoc-Thr(βAc_3 -GalF-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-*Ot*Bu **60** in 10 mL Pyridin wurde mit 5 mL Essigsäureanhydrid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wurde dreimal mit je 30 mL Toluol kodestilliert und das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 1:3) gereinigt.

Ausbeute: 248 mg (quant., 0.26 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +48.7$

$R_f = 0.51$ (c Hex/EtOAc, 1:3)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264$ nm)

$R_t = 22.1$ min

Zeit (min)	0	10	25	60
Acetonitril (%)	50	50	77	100
Wasser (%)	50	50	23	0

$C_{47}H_{59}FN_2O_{19}$ ($M = 974.972$ g/mol)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.53$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.17$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.44$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.31 (t, 2H, $J_{H2,H1} = J_{H7,H8} = 7.41$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.91 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.37$ Hz, NH-Ac), 5.51 – 5.48 (m, 1H, 4'-H), 5.46 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.10$ Hz, NH-Urethan), 5.33 (s, 1H, 4-H), 5.19 – 5.10 (m, 1H, 2'-H), 4.82 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 2.83$ Hz, 1-H), 4.61 – 4.36 (m, 5H, 3'-H, 2-H, CH_2 -Fmoc, 1'-H), 4.28 – 4.01 (m, 7H, 5-H, T^α , T^β , 6a-H, 6'-Ha/b, CH -Fmoc), 3.96 (dd, 1H, $J_{H6b,H6a} = 11.06$ Hz, $J_{H6b,H5} = 7.25$ Hz, 6b-H), 3.83 – 3.73 (m, 2H, 3-H, 5'-H), 2.15, 2.11, 2.11, 2.03, 2.02, 2.00 (6s, 18H, $6 \times CH_3$), 1.44 (s, 9H $3 \times CH_3$ (tBu)), 1.27 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 5.65$ Hz, T^γ).

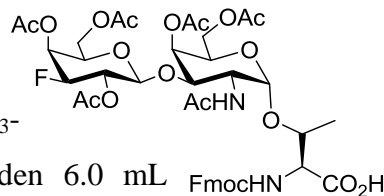
^{13}C -NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, $CDCl_3$), δ [ppm] = 170.7 (C=O (NHAc)), 170.4, 170.3, 170.2, 170.1, 169.7 ($5 \times C=O$ (OAc, Ester)), 156.6 (C=O (Urethan)), 143.9 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.6 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 128.1 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.3 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.1 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.3 (C-4-, C-5-Fmoc), 100.5 (d, $J_{C1',F} = 10.38$ Hz, C-1'), 100.3 (C-1), 88.85 (d, $J_{C3',F} = 194.33$ Hz, C-3'), 83.5 (Cq(tBu)), 77.4 (T^β), 73.7 (C-3), 70.2 (d, $J_{C5',F} = 5.95$ Hz, C-5'), 70.0 (d, $J_{C3',F} = 19.26$ Hz, C-2'), 69.2 (C-4), 68.2 (C-5), 67.2 (CH_2 -Fmoc), 66.9 (d, $J_{C4',F} = 16.68$ Hz, C-4'), 63.2 (C-6), 61.2 (d, $J_{C6',F} = 2.28$ Hz, C-6'), 59.3 (T^α), 48.6 (C-2), 47.4 (CH -Fmoc), 28.3 (CH_3 (tBu)), 21.0, 20.9, 20.9, 20.9, 20.9, 20.9 ($6 \times CH_3$ (OAc)), 18.8 (T^γ).

^{19}F -NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = -200.4 (ddd, $J_{F,H3'} = 47.62$ Hz, $J_{F,H4'} = 11.12$ Hz, $J_{F,H2'} = 4.41$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 997.34 ($[M + Na]^+$, ber.: 997.36), 1971.73 ($[2 \times M + Na]^+$, ber.: 1971.73).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 997.3593 ($[M + Na]^+$, ber.: 997.3594).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(4,6-di-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-3-desoxy-3-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (61)**



Zu einer Mischung aus 276 mg (0.283 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃-GalF-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂-GalNAc)-OtBu **4** in 0.6 mL Wasser wurden 6.0 mL Trifluoressigsäure gegeben und die Lösung wurde zweieinhalb Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 50 mL Toluol zugegeben und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach fünfmaligem Kodestillieren mit je 30 mL Toluol und zweimaligem Kodestillieren mit je 30 mL Dichlormethan wurde das Rohprodukt mittels Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/MeOH/HOAc, 9:1:0.1) gereinigt.

Ausbeute: 225 mg (87%, 0.25 mmol) gelblicher, amorpher Feststoff

R_f = 0.11 (EtOAc/MeOH/HOAc, 9:1:0.1)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, λ = 264 nm)

R_t = 19.4 min

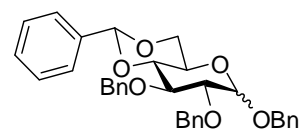
Zeit (min)	0	5	30	60
Acetonitril + 0.1% TFA (%)	30	30	90	100
Wasser + 0.1% TFA (%)	70	70	10	0

C₄₃H₅₁FN₂O₁₉ (M = 918.865 g/mol)

ESI-MS (positiv), m/z : 941.30 ([M + Na]⁺, ber.: 941.30).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 941.2979 ([M + Na]⁺, ber.: 941.2968).

Benzyl-2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzyliden- α / β -D-glucopyranose (71)^[120,121]



Zu einer Suspension aus 80 mL Benzylalkohol und 40.00 g (0.222 mol) D-Glucose **13** wurden 2.00 g (10.514 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure gegeben und die Reaktionsmischung

wurde fünf Stunden lang auf 90 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 800 mL Diethylether zugegeben und der Ansatz wurde 15 Minuten gerührt und dann über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel vom weißen Bodensatz abdekantiert, bevor 80 mL (0.792 mol) Benzaldehyd und 25.00 g (0.183 mol) Zink(II)chlorid zugegeben wurden. Das Gemisch wurde vier Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene rote Lösung wurde in ein auf 0 °C gekühltes Gemisch aus 100 mL Wasser und 100 mL Petrolether (40-60) gegeben, 30 Minuten gerührt und der entstandene weiße Niederschlag wurde abfiltriert. Der Filtrerrückstand wurde in heißem Methanol und wenig Ammoniak gelöst und in 400 mL Wasser gegossen. Der resultierende weiße Niederschlag wurde erneut abfiltriert, im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 9.41 g (12%, 26.27 mmol) farbloser Feststoff

$C_{20}H_{22}O_6$ (M=358.385 g/mol)

Zu einer auf 0 °C gekühlten Suspension aus 0.79 g (19.82 mmol) Natriumhydrid in 20 mL absol. DMF wurden 3.23 g (9.013 mmol) des rohen Diols **70**, gelöst in 20 mL absol. DMF, langsam getropft. Es wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, ehe 2.37 mL (19.83 mmol) Benzylbromid bei 0 °C zugetropft wurden. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde der Ansatz über Nacht gerührt und in ein Gemisch aus 100 mL Toluol und 50 mL Wasser gegeben. Die Wasserphase wurde zweimal mit je 50 mL Toluol extrahiert, die vereinigten org. Phasen wurden mit 50 mL einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen und mit $MgSO_4$ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

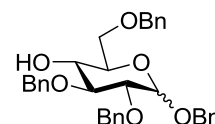
Ausbeute: 4.27 g (88%, 7.94 mmol) farbloser Feststoff

$R_f = 0.62$ (c Hex/EtOAc, 4:1)

$C_{34}H_{34}O_6$ (M=538.630 g/mol)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), Charakteristische Signale: δ [ppm] = 7.52 – 7.25 (m, 20 H, H_{Ar}), 5.54 (s, 1H, C- H_{Bn})

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[120,121]

Benzyl-2,3,6-tri-*O*-benzyl- α/β -D-glucopyranose (66)^[122]

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 4.99 g (9.265 mmol) des Benzylidenacetals **71** in 50 mL absol. Dichlormethan wurden langsam 3.87 mL (27.79 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid und 7.48 mL (46.32 mmol) Triethylsilan zugetropft. Die Lösung wurde fünf Minuten gerührt, bevor 3.44 mL (46.32 mmol) Trifluoressigsäure über einen Zeitraum von 30 Minuten zugegeben wurden. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Es wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und die org. Phase wurde zunächst dreimal mit je 50 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg., zweimal mit je 50 mL Wasser und mit 50 mL einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen mit Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.69 g (54%, 4.976 mmol) farbloser Feststoff

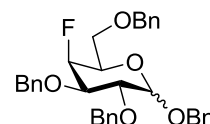
R_f = 0.22 (°Hex/EtOAc, 5:1)

C₃₄H₃₆O₆ (M=540.646 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), Charakteristische Signale: δ [ppm] = 7.49 – 7.26 (m, 20H, H_{Ar}), 2.48 (d, J_{OH,H4} = 3.40 Hz, OH)

ESI-MS (positiv), m/z: 563.22 ([M + Na]⁺, ber.: 563.24), 1103.49 ([2 × M + Na]⁺, ber.: 1103.49).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[249]

Benzyl-2,3,6-tri-*O*-benzyl-4-desoxy-4-fluor- α/β -D-glucopyranose (68)^[118]

Zu 7.32 g (13.55 mmol) einer auf -20 °C gekühlten Lösung des Alkohols **66** in 100 mL absol. Dichlormethan und 10 mL Pyridin wurden langsam 4.50 mL (27.09 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid getropft und die gelb-orange Lösung wurde innerhalb von zwei Stunden auf 10 °C erwärmt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle, R_f = 0.80 °Hex/EtOAc, 2:1) wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und die organische Phase wurde mit je 50 mL verd. Salzsäure (1 M), ges. NaHCO₃-Lsg. und Wasser gewaschen. Das

Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur abgetrennt und das erhaltene Triflat wurde anschließend in 100 mL absol. Dichlormethan gelöst. Bei 0 °C wurde tropfenweise mit 27.09 mL (27.09 mmol) Tetrabutylammoniumfluorid (1 M in THF) versetzt. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die rot-orange Lösung 48 Stunden zum Sieden erhitzt und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 6:1) konnte das fluorierte Produkt **68** erhalten werden.

Ausbeute: 1.09 g (69%, 2.01 mmol) farbloser Feststoff

$R_f = 0.32$ (^cHex/EtOAc, 6:1)

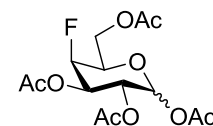
$C_{34}H_{35}FO_5$ (M=542.637 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), Charakteristische Signale: δ [ppm] = 7.44 – 7.26 (m, 20H, H_{Ar}), 4.88 (dd, 1H, $J_{H4,F} = 50.09$ Hz, $J_{H4,H3} = 2.67$ Hz, 4-H), 3.67 (dd, 1H, $J_{H6a,H6b} = 9.44$ Hz, $J_{H6a,H5} = 7.26$ Hz, H-6a), 3.55 (ddd, 1H, $J_{H6b,H6a} = 9.45$ Hz, $J_{H6b,H5} = 6.16$ Hz, $J_{H6b,H4} = 1.36$ Hz, H-6b).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -219.1 (dt, $J_{F,H4} = 50.35$ Hz, $J_{F,H3} = J_{F,H5} = 28.66$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 565.37 ([M + Na]⁺, ber.: 565.24), 1107.74 ([2 × M + Na]⁺, ber.: 1107.48).

1,2,3,6-Tetra-O-acetyl-4-desoxy-4-fluor- α/β -D-glucopyranose (**74**)^[124]



In einem Schlenkkolben wurde eine Spatelspitze Pd(OAc)₂ vorgelegt und der Kolben wurde evakuiert und anschließend mit Wasserstoff geflutet. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt, ehe unter Wasserstoffatmosphäre 1.27 g (2.335 mmol) Tetrabenzylgalactose **68**, gelöst in 40 mL Methanol, zugegeben wurden. Es wurde erneut Vakuum angelegt und mit Wasserstoff geflutet, bevor die Suspension sechs Tage bei Raumtemperatur gerührt wurde. Anschließend wurde durch *Hyflo* filtriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mit 15 mL Pyridin und 4 mL Essigsäureanhydrid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das

Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.66 g (81%, 1.89 mmol) farbloser Feststoff

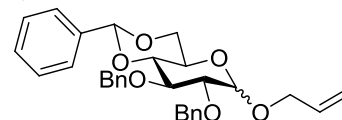
R_f = 0.21 (^cHex/EtOAc, 2:1)

C₁₄H₁₉FO₉ (M=350.294 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), Charakteristische Signale: δ [ppm] = 6.33 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.54 Hz, H-1 (α-Anomer)), 5.65 (d, 1H, J_{H1,H2} = 8.29 Hz, H-1 (β-Anomer)), Anomerenverhältnis α:β = 1.00:1.02.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[91]

Allyl-2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzyliden-α/β-D-glucopyranose (77)^[125,127,128]



Zu 150 mL (2.195 mol) Allylalkohol wurden 18.00 g (99.91 mmol) wasserfreie D-Glucose **13** und 10.00 g saurer Ionentausche Dowex 50WX8 gegeben. Die Suspension wurde dreieinhalb Stunden refluxiert, der Ionentauscher wurde abfiltriert und mit Ethanol gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand wurde mit je 30 mL eines Gemisches aus Ethanol und Benzol (1:1) kodestilliert. Anschließend wurde der Rückstand mit 75 mL (0.498 mol) Benzaldehyddimethylacetal und zwei Spatelspitzen *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit 120 mL *n*-Pentan verdünnt und mit 80 mL Wasser versetzt, bevor 40 mL einer 10%igen NaHCO₃-Lsg. zugegeben wurden. Nach 15 Minuten Rührens wurde der ausgefallene farblose Feststoff abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 23.28 g (76%, 75.53 mmol) farbloser Feststoff

R_f = 0.57 (MeOH/EtOAc, 1:14).

C₁₆H₂₀O₆ (M=308.326 g/mol).

Es wurden 2.87 g (71.81 mmol) Natriumhydrid in 50 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und anschließend mit 10.06 g (32.64 mmol) **75**, gelöst in 70 mL DMF, tropfenweise versetzt.

Die erhaltene Suspension wurde 40 Minuten bei 0 °C gerührt, bevor 8.59 mL (71.81 mmol) Benzylbromid zugetropft wurden. Die Lösung wurde zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt und mit 150 mL Toluol und 100 mL Wasser verdünnt. Die org. Phase wurde abgetrennt und die Wasserphase wurde zweimal mit je 80 mL Toluol extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden zweimal mit je 80 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (c^oHex/EtOAc, 6:1) gereinigt.

Ausbeute: 11.72 g (74%, 23.99 mmol) farbloser Feststoff

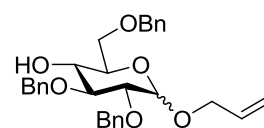
R_f = 0.16 (c^oHex/EtOAc, 6:1).

C₃₀H₃₂O₆ (M=488.572 g/mol).

ESI-MS (positiv), m/z: 511.19 ([M + Na]⁺, ber.: 511.21).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[128]

Allyl-2,3,6-tri-O-benzyl-α/β-D-glucopyranose (**78**)^[122,123]



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 7.43 g (15.20 mmol) Benzylidenacetal **77** in 80 mL absol. Dichlormethan wurden langsam 6.34 mL (45.59 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid und 12.27 mL (75.998 mmol) Triethylsilan getropft. Die Lösung wurde fünf Minuten gerührt, bevor 5.65 mL (75.99 mmol) Trifluoressigsäure über einen Zeitraum von 30 Minuten zugegeben wurden. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht bei dieser Temperatur gerührt. Es wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und die org. Phase wurde dreimal mit je 50 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg., zweimal mit je 50 mL Wasser sowie mit 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Es wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c^oHex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.70 g (63%, 9.575 mmol) farbloser Feststoff

R_f = 0.18 (c^oHex/EtOAc, 5:1)

C₃₀H₃₄O₆ (M=540.646 g/mol)

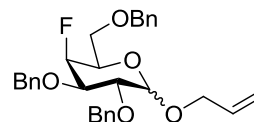
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), Charakteristische Signale: δ [ppm] = 7.48 – 7.19 (m, 15H, H_{Ar}).

ESI-MS (positiv), m/z : 513.21 ($[M + Na]^+$, ber.: 513.23), 1003.46 ($[2 \times M + Na]^+$, ber.: 1003.46).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[128]

Allyl-2,3,6-tri-*O*-benzyl-4-desoxy-4-fluor- α/β -D-galactopyranose

(80)^[118]



Zu 9.54 g (19.45 mmol) einer auf -20 °C gekühlten Lösung des Alkohols **78** in 140 mL absol. Dichlormethan und 12.38 mL (153.7 mmol) Pyridin wurden langsam 6.46 mL (38.91 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid getropft. Die gelb-orange Lösung wurde innerhalb von zwei Stunden auf 10 °C erwärmt und nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle, $R_f = 0.81$ $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1) mit 50 mL Dichlormethan verdünnt. Die org. Phase wurde mit je 50 mL verd. Salzsäure (1 M), ges. NaHCO_3 -Lsg. und Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wurde bei Raumtemperatur unter vermindertem Druck abgetrennt und das Triflat wurde anschließend in 80 mL absol. Dichlormethan gelöst. Bei 0 °C wurden anschließend 38.91 mL (38.91 mmol) Tetrabutylammoniumfluorid (1 M in THF) tropfenweise zugesetzt und das Gemisch wurde anschließend 72 Stunden lang zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 6:1) gereinigt.

Ausbeute: 6.23 g (70%, 12.66 mmol) gelbliches Öl

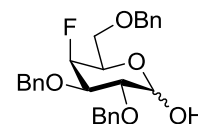
$R_f = 0.34$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 6:1)

$\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{FO}_5$ ($M = 542.637$ g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), Charakteristische Signale: δ [ppm] = 7.44 – 7.23 (m, 15H, H_{Ar}), 6.00 – 5.83 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = -216.9 – -217.3 (m, $J_{\text{F,H4}} = 51.16$ Hz, $J_{\text{F,H5}} = 27.68$ Hz), -218.9 (dt, $J_{\text{F,H4}} = 51.23$ Hz, $J_{\text{F,H5}} = 29.96$ Hz); Anomerenverhältnis $\alpha:\beta = 1.00:6.07$.

ESI-MS (positiv), m/z : 515.24 ($[M + Na]^+$, ber.: 515.22).

2,3,6-tri-*O*-benzyl-4-desoxy-4-fluor- α/β -D-galactopyranose (81)^[130]

Zu 6.23 g (12.66 mmol) des vollständig blockierten Zuckers **80** in 80 mL Dichlormethan und 5 mL Wasser wurden 2.69 g (15.19 mmol) Palladium(II)-chlorid gegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Der Filtrerrückstand wurde mit Dichlormethan gewaschen und die vereinigten Filtrate wurden mit je 50 mL Wasser und ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Es wurde mit MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 6:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.55 g (79%, 10.05 mmol) gelblicher Feststoff

R_f = 0.13 (^cHex/EtOAc, 6:1)

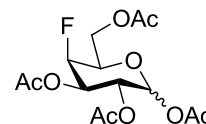
C₂₇H₂₉FO₅ (M=542.637 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) Charakteristische Signale: δ [ppm] = 7.44 – 7.22 (m, 15H, H_{Ar}), 5.22 (d, 1H, J_{H1,H2} = 2.73 Hz, 1-H), 4.16 (dt, 1H, J_{H3,F} = 29.7 Hz, J_{H3,H2} = 6.63 Hz).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -216.7 (dt, J_{F,H4} = 51.30 Hz, J_{F,H5} = 27.70 Hz, J_{F,H3} = 27.70 Hz), -219.3 (m, J_{F,H4} = 51.76 Hz, J_{F,H5} = 30.91 Hz).

ESI-MS (positiv), m/z: 475.22 ([M + Na]⁺, ber.: 475.19), 927.49 ([2 × M + Na]⁺, ber.: 927.39).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 475.1901 ([M + Na]⁺, ber.: 475.1897).

1,2,3,6-Tetra-*O*-acetyl-4-desoxy-4-fluor- α/β -D-galactopyranose (74)^[91,124]

In einen Schlenk Kolben wurde eine Spatelspitze Pd(OAc)₂ vorgelegt, bevor der Kolben evakuiert und anschließend mit Wasserstoff geflutet wurde. Es wurde noch jeweils dreimal evakuiert und mit Wasserstoff geflutet, ehe 4.06 g (8.966 mmol) Tribenzylgalactose **81**, gelöst in 50 mL Methanol, unter Wasserstoffatmosphäre zugegeben wurden. Nach erneutem Evakuieren und Fluten mit Wasserstoff wurde die Suspension fünf Tage bei Raumtemperatur

gerührt. Anschließend wurde durch *Hyflo* filtriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung sofort weiter umgesetzt.

ESI-MS (positiv), m/z : 205.05 ($[M + Na]^+$, ber.: 205.05), 387.13 ($[2 \times M + Na]^+$, ber.: 387.11).

Dazu wurde der Rückstand mit 50 mL Pyridin und 9.32 mL (89.66 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.57 g (82%, 7.33 mmol) farbloser Feststoff

$R_f = 0.21$ (c Hex/EtOAc, 2:1)

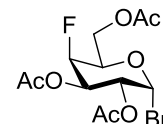
$C_{14}H_{19}FO_9$ (M=350.294 g/mol)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$), Charakteristische Signale: δ [ppm] = 6.33 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.54$ Hz, H-1 (α -Anomer)), 5.65 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 8.29$ Hz, H-1 (β -Anomer)), Anomerenverhältnis $\alpha:\beta = 1.00:1.02$.

^{19}F -NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = -200.0 (m, $J_{F,H4} = 47.74$ Hz), -203.9 (m, $J_{F,H4} = 48.30$ Hz).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[91]

2,3,6-Tetra-*O*-acetyl-4-desoxy-4-fluor- α -D-galactopyranosylbromid (**2**)^[91]



In 50 mL absol. Dichlormethan wurden 3.75 g (10.70 mmol) des Fluorzuckers **74** vorgelegt. Die Lösung wurde bei 0 °C tropfenweise mit 3.24 mL (42.80 mmol) HBr (33%ig in Eisessig) versetzt und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt, bevor erneut 3.00 mL (17.38 mmol) HBr in Eisessig (33%ig) zugegeben wurden. Nach weiteren drei Tagen Rührens wurde die Lösung auf 300 mL Eiswasser gegeben, mit festem $NaHCO_3$ neutralisiert und dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden zweimal mit je 50 mL einer ges. $NaHCO_3$ -Lsg. gewaschen, mit $MgSO_4$ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel wurde im

Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.38 g (60%, 6.42 mmol) farbloser Feststoff

R_f = 0.52 (^cHex/EtOAc, 2:1)

C₁₂H₁₆BrFO₇ (M = 371.154 g/mol)

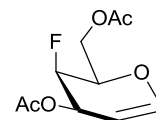
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 6.64 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.92 Hz, 1-H), 5.28 (ddd, 1H, J_{H3,F} = 26.61 Hz, J_{H3,H2} = 10.66 Hz, J_{H3,H4} = 2.58 Hz, 3-H), 5.05 (dd, 1H, J_{H2,H3} = 10.42 Hz, J_{H2,H1} = 4.01 Hz, 2-H), 4.94 (dd, 1H, J_{H4,F} = 49.98 Hz, J_{H4,H3} = 2.55 Hz, 4-H), 4.32 (dt, 1H, J_{H5,F} = 33.28 Hz, J_{H5,H6a/b} = 6.47 Hz, 5-H), 4.31 – 4.20 (m, 2H, 6a/b-H), 2.09, 2.07, 2.04, (3s, 9H, 3 × CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 170.3, 170.0, 169.8 (3 × C=O(OAc)), 87.8 (C-1), 85.8 (d, J_{C4,F} = 185.76 Hz, C-4), 71.3 (d, J_{C5,F} = 18.12 Hz, C-5), 68.5 (d, J_{C3,F} = 17.19 Hz, C-3), 67.5 (d, J_{C2,F} = 1.76 Hz, C-2), 60.9 (d, J_{C6,F} = 6.10 Hz, C-6), 20.7 (3 × CH₃(OAc)).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -216.5 (dt, J_{F,H4} = 50.39 Hz, J_{F,H3} = 27.57 Hz, J_{F,H5} = 27.57 Hz).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[91]

3,6-Di-O-acetyl-4-desoxy-4-fluorgalactal (83)



Es wurden 1.13 g (17.27 mmol) Zinkpulver durch zweimaliges Behandeln mit verd. Salzsäure (2 M) und Waschen mit Wasser, Essigsäureethylester und Diethylether aktiviert. Das so behandelte Zink wurde anschließend in 40 mL Essigsäureethylester aufgeschlämmt, mit 0.16 mL (2.07 mmol) *N*-Methylimidazol versetzt und zum Sieden erhitzt. Es wurden 0.64 g (1.73 mmol) des anomeren Bromids **2**, gelöst in 10 mL Essigsäureethylester, binnen einer Stunde zugetropft und das Gemisch wurde weitere zwei Stunden refluxiert. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung durch *Hyflo* filtriert. Die org. Phase wurde zweimal mit je 50 mL verd. Salzsäure (1 M) und ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) lieferte das Produkt **83**.

Ausbeute: 0.28 g (69%, 1.192 mmol) gelblicher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +14.4.$

$R_f = 0.48$ ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}, 2:1$)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 214 \text{ nm}$)

$R_t = 16.2 \text{ min}$

Zeit (min)	0	5	40	60
Acetonitril (%)	20	20	70	100
Wasser (%)	80	80	30	0

$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{FO}_5$ ($M = 232.206 \text{ g/mol}$)

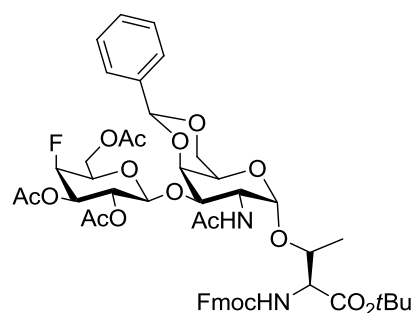
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 6.48 (dd, 1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 6.30 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_1, \text{H}_3} = 1.90 \text{ Hz}$, 1-H), 5.49 – 5.40 (m 1H, $J_{\text{H}_3, \text{F}} = 22.20 \text{ Hz}$, 3-H), 5.08 – 4.92 (m, 1H, $J_{\text{H}_4, \text{F}} = 50.27 \text{ Hz}$, 4-H), 4.73 (dt, 1H, $J_{\text{H}_2, \text{H}_1} = 6.32 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_2, \text{H}_4} = 2.02$, $J_{\text{H}_2, \text{F}} = 2.02 \text{ Hz}$, 2-H), 4.39 (ddd, 1H, $J_{\text{H}_{6a}, \text{H}_{6b}} = 11.57 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_{6a}, \text{H}_5} = 7.25 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_{6a}, \text{F}} = 0.89 \text{ Hz}$, 6a-H), 4.31 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{6b}, \text{H}_{6a}} = 11.52 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_{6b}, \text{H}_5} = 5.58 \text{ Hz}$, 6b-H), 4.21 (ddd, 1H, $J_{\text{H}_5, \text{F}} = 27.47 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_5, \text{H}_{6a}} = 7.03 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_5, \text{H}_{6b}} = 5.93 \text{ Hz}$, 5-H), 2.14, 2.11 (2s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 170.6, 170.5 ($2 \times \text{C}=\text{O}(\text{OAc})$), 145.4 (C-1), 98.0 (C-2), 81.7 (d, $J_{\text{C}_4, \text{F}} = 186.54 \text{ Hz}$, C-4), 72.7 (d, $J_{\text{C}_5, \text{F}} = 18.69 \text{ Hz}$, C-5), 65.0 (d, $J_{\text{C}_3, \text{F}} = 17.57 \text{ Hz}$, C-3), 62.0 (d, $J_{\text{C}_6, \text{F}} = 3.91 \text{ Hz}$, C-6), 20.9, 20.8 ($2 \times \text{CH}_3(\text{OAc})$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = -218.9 (ddd, $J_{\text{F}, \text{H}_4} = 49.70 \text{ Hz}$, $J_{\text{F}, \text{H}_5} = 27.14 \text{ Hz}$, $J_{\text{F}, \text{H}_3} = 22.38 \text{ Hz}$).

FD-MS, m/z : 233.33 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, ber.: 233.07).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-4-desoxy-4-fluorogalactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (84)**



Eine Lösung aus 550 mg (0.799 mmol) Fmoc-Thr-(α -4,6-

Bzn-GalNAc)-OtBu **12** in 12.5 mL absol. Nitromethan und absol. Dichlormethan (2:3) wurde mit 900 mg frisch aktiviertem Molekularsieb (4 Å) und 404 mg (1.597 mmol) Quecksilber(II)-cyanid versetzt. Die Mischung wurde 30 min unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt, bevor 593 mg (1.597 mmol) Ac₃GalFBr **2**, gelöst in 12.5 mL absol. Nitromethan und absol. Dichlormethan (2:3), zugegeben wurden. Es wurde drei Stunde in der Mikrowelle bei 80 °C und 100 W (5 min Aufheizphase, p_{max}=5.0 bar) erhitzt und durch *Hyflo* in 80 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. filtriert. Die wässrige Phase wurde mit 80 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten org. Phasen wurde mit je 40 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. und einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:3) gereinigt. Zur vollständigen Charakterisierung wurde eine kleine Menge der Verbindung mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 0.70 g (90%, 0.72 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +59.39.$$

R_f = 0.24 (^cHex/EtOAc, 2:3).

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, λ = 264 nm)

R_t = 25.9 min

Zeit (min)	0	10	25	60
Acetonitril (%)	50	50	77	100
Wasser (%)	50	50	23	0

C₅₀H₅₉FN₂O₁₇ (M=979.005 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.54 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.05 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J_{H,H} = 7.90 Hz, J_{H,H} = 1.54 Hz, H_{Ar}-Bzn), 7.39 (t, 2H, J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 6.86 Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.36 – 7.26 (m, 5H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}-Bzn), 5.91 (d, 1H, J_{NH,2H} = 9.54 Hz, NH-Ac), 5.84 (d, 1H, J_{NH,Tα} = 9.44 Hz, NH-Urethan), 5.52 (s, 1H, CH-Bzn), 5.23 (dd, 1H, J_{H2',H1'} = 9.90 Hz, J_{H2',H3'} = 8.27 Hz, 2'-H), 4.97 – 4.71 (m, 4H, 1-H, 1'-H, 3'-H, 4'-H,), 4.71 – 4.62 (dd, 1H, J_{H2,NH} = 9.75 Hz, J_{H2,H3} = 8.27 Hz, J_{H2,H1} = 3.55 Hz, 2-H), 4.68 – 4.60 (m, 3H, CH₂-Fmoc, 6a'-H), 4.32 – 4.10 (m, 6H, T^α, CH-Fmoc, 4-H, T^β, 6a-H, 6b'-H), 4.10 – 3.93 (m, 2H,

3-H, 6b-H), 3.80 (ddd, 1H, $J_{H5',F} = 26.33$ Hz, $J_{H5',H6a'} = 6.22$ Hz, $J_{H2',H6b'} = 6.22$ Hz, 5'-H), 3.73 – 3.60 (m, 1H, 5-H), 2.07, 2.03, 1.99, 1.98 (4s, 12H, 4 × CH₃), 1.43 (s, 9H 3 × CH₃(*t*Bu)), 1.26 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 5.94$ Hz, T^γ).

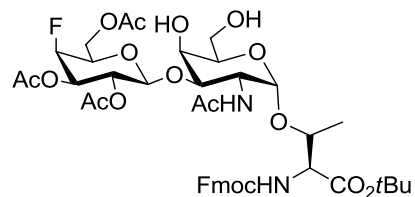
¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl₃), δ [ppm] = 170.5 (C=O(NHAc)), 170.0, 169.8, 169.6 (3 × C=O(OAc, Ester)), 156.7 (C=O(Urethan)), 143.8, 143.8 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 137.6 (Cq-Bzn), 128.8, 128.1, 127.8 (C_{Ar}(Bzn)), 127.1 (C-3-, C-6-Fmoc), 126.3 (C-2-, C-7-Fmoc), 126.0 (C_{Ar}(Bzn), 125.0 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 100.8 (CH-Bzn), 100.6 (C-1), 100.2 (C-1'), 85.9 (d, $J_{C4',F} = 186.62$ Hz, C-4'), 83.1 (Cq(*t*Bu)), 76.3 (T^β), 75.5 (C-4), 72.5 (C-3), 71.4 (d, 2C, $J_{C5',F} = 17.73$ Hz, $J_{C3',F} = 17.73$ Hz, C-3', C-5'), 69.1 (C-6), 68.5 (C-2'), 66.9 (CH₂-Fmoc), 63.7 (C-5), 61.6 (d, $J_{C6',F} = 5.15$ Hz, C-6'), 59.2 (T^α), 47.8 (C-2), 47.3 (CH-(Fmoc)), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 20.8, 20.7, 20.7, 20.7 (4 × CH₃(OAc)), 19.2 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -215.9 – -216.6 (m, $J_{F,H4'} = 50.29$ Hz, $J_{F,H5'} = 26.69$ Hz, $J_{F,H3'} = 25.83$ Hz; ein weiterer Signalsatz deutet auf das Auftreten von Konformeren hin).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 979.43 ([M]⁺, ber.: 979.38), 1001.35 ([M + Na]⁺, ber.: 1001.37), 1979.80 ([2 × M + Na]⁺, ber.: 1979.75).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 1001.3712 ([M + Na]⁺, ber.: 1001.3695).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-D-4-desoxy-4-fluor-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (85)**



Eine Lösung aus 560 mg (0.572 mmol) Fmoc-Thr(βAc₃-GalF-(1→3)-α-4,6-*O*-Bzn-GalNac)-*O**t*Bu **84** in 75 mL Dichlormethan und Methanol (4:1) wurde mit 500 mg aktiviertem Kieselgel (SiO₂*NaHSO₄)^[108] versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit festem NaHCO₃ neutralisiert und die org. Phase wurde dreimal mit je 50 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 484 mg (90%, 0.544 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +35.6$

$R_f = 0.23$ (EtOAc)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264$ nm)

$R_t = 16.1$ min

Zeit (min)	0	10	25	60
Acetonitril (%)	50	50	77	100
Wasser (%)	50	50	23	0

$\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{FN}_2\text{O}_{17}$ ($M = 890.898$ g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.72 (d, 2H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.52$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.57 (d, 2H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 6.57$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.35 (t, 2H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = J_{\text{H}_6,\text{H}_5} = 7.44$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.26 (t, 2H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = J_{\text{H}_7,\text{H}_8} = 7.15$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.19 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.55$ Hz, NH-Ac), 5.83 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.04$ Hz, NH-Urethan), 5.20 – 5.01 (m, 1H, 2'-H), 5.00 – 4.66 (m, 3H, 1-H, 3'-H, 4'-H), 4.59 (d, 1H, $J_{\text{H}_1',\text{H}_2'} = 7.68$ Hz, 1'-H), 4.53 – 4.23 (m, 4H, 2-H, 6a'-H, CH_2 -Fmoc), 4.24 – 3.98 (m, 5H, 4-H, 6b'-H, T^α , T^β , CH-Fmoc), 3.93 – 3.72 (m, 4H, 6a/b-H, 5-H, 5'-H), 3.72 – 3.59 (m, 1H, 3-H), 2.03, 2.03, 1.98, 1.95 (4s, 12H, $4 \times \text{CH}_3$), 1.40 (s, 9H; $3 \times \text{CH}_3$ (*t*Bu)), 1.24 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 5.78$ Hz, T^γ).

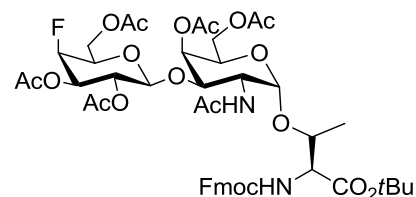
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl_3), δ [ppm] = 170.6 (C=O(NHAc)), 170.4, 170.1, 169.7 ($3 \times \text{C=O(OAc}$, Ester)), 156.6 (C=O(Urethan)), 143.7, 143.7 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.8 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.0 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 101.3 (C-1'), 100.0 (C-1), 85.8 (d, $J_{\text{C}_3',\text{F}} = 186.30$ Hz, C-4'), 83.0 (Cq(*t*Bu)), 77.8 (C-3), 76.0 (T^β), 71.1 (d, $J_{\text{C}_5',\text{F}} = 17.46$ Hz, C-5'), 70.8 (d, $J_{\text{C}_3',\text{F}} = 17.99$ Hz, C-3'), 70.1 (C-5), 69.3 (C-4), 68.5 (C-2'), 66.9 (CH_2 -Fmoc), 62.4 (C-6), 61.2 (d, $J_{\text{C}_6',\text{F}} = 3.78$ Hz, C-6'), 59.2 (T^α), 47.7 (C-2), 47.2 (CH-(Fmoc)), 28.0 (CH_3 (*t*Bu)), 20.6 ($4 \times \text{CH}_3$ (OAc)), 18.8 (T^γ).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = -216.1 – -216.4 (m, $J_{\text{F},\text{H}_4'} = 50.65$ Hz, $J_{\text{F},\text{H}_5'} = 27.26$ Hz, $J_{\text{F},\text{H}_3'} = 25.97$ Hz; ein weiterer Signalsatz deutet auf das Auftreten von Konformeren hin).

ESI-MS (positiv), m/z : 913.36 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 913.34), 1803.74 ($[2 \times \text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 1803.69).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 913.3371 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 913.3382).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(4,6-di-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-4-desoxy-4-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (5)**



Eine Lösung aus 286 mg (0.321 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃-GalF-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-*O*tBu **85** in 10 mL Pyridin wurde mit 5 mL Essigsäureanhydrid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wurde dreimal mit je 30 mL Toluol kdestilliert und das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:3) gereinigt.

Ausbeute: 301 mg (96%, 0.309 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +43.1$$

$$R_f = 0.38 \text{ (}^c\text{Hex/EtOAc, 1:3)}$$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264 \text{ nm}$)

$$R_t = 22.8 \text{ min}$$

Zeit (min)	0	10	25	60
Acetonitril (%)	50	50	77	100
Wasser (%)	50	50	23	0

C₄₇H₅₉FN₂O₁₉ (M = 974.972 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.44 \text{ Hz}$, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60 (d, 2H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 6.89 \text{ Hz}$, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{\text{H3,H4}} = J_{\text{H6,H5}} = 7.34 \text{ Hz}$, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.31 (t, 2H, $J_{\text{H2,H1}} = J_{\text{H7,H8}} = 6.43 \text{ Hz}$, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.01 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.36 \text{ Hz}$, NH-Ac), 5.85 (d, 1H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.04 \text{ Hz}$, NH-Urethan), 5.33 (s, 1H, 4-H), 5.18 – 5.11 (m, 1H, 2'-H), 5.00 – 4.67 (m, 3H, 1-H, 3'-H, 4'-H), 4.60 (d, 1H, $J_{\text{H1}',\text{H2}'}} = 7.55 \text{ Hz}$, 1'-H), 4.56 – 4.43 (m, 3H, 2-H, CH₂-Fmoc), 4.37 (dd, 1H, $J_{\text{H6a}',\text{H6b}'}} = 11.19 \text{ Hz}$, $J_{\text{H6a}',\text{H5}} = 5.69 \text{ Hz}$, 6a'-H), 4.29 – 4.05 (m, 6H, 5-H, 6b'-H, 6a-H, T^a, T^{\beta}, CH-Fmoc), 4.02 – 3.89 (m, 1H, 6b-H), 3.88 – 3.68 (m, 2H, 3-H, 5'-H), 2.10, 2.07, 2.07, 2.05, 2.03, 1.99 (6s, 18H, 6 \times CH₃), 1.43 (s, 9H 3 \times CH₃(*t*Bu)), 1.28 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.00 \text{ Hz}$, T^{\gamma}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl₃) δ [ppm] = 170.8 (C=O(NHAc)), 170.7, 170.3, 170.3, 170.2, 169.8 (5 \times C=O(OAc, Ester)), 156.7 (C=O(Urethan)), 143.9 (C-1a-, C-

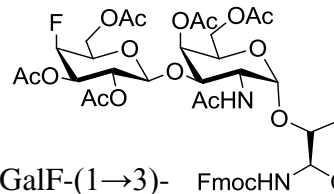
8a-Fmoc), 141.6 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 128.1 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.3 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.1 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.3 (C-4-, C-5-Fmoc), 100.7 (C-1'), 100.4 (C-1), 85.7 (d, $J_{C4',F} = 187.41$ Hz, C-4'), 83.5 (Cq(*t*Bu)), 77.4 (T^{β}), 72.8 (C-3), 71.5 (d, $J_{C3',F} = 17.73$ Hz, C-3'), 71.1 (d, $J_{C5',F} = 18.07$ Hz, C-5'), 69.3 (C-4), 68.5 (C-2'), 68.1 (C-5), 67.2 (CH₂-Fmoc), 63.0 (C-6), 63.4 (d, $J_{C6',F} = 5.77$ Hz, C-6'), 59.3 (T^{α}), 48.6 (C-2), 47.4 (CH-(Fmoc)), 28.3 (CH₃(*t*Bu)), 20.7 (6 × CH₃(OAc)), 18.9 (T^{γ}).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -216.4 (dt, $J_{F,H4'} = 51.58$ Hz, $J_{F,H5'} = 26.63$ Hz, $J_{F,H3'} = 26.63$ Hz), -217.2 (dt, $J_{F,H4'} = 51.58$ Hz, $J_{F,H5'} = 26.63$ Hz, $J_{F,H3'} = 26.63$ Hz); Es liegen zwei Konformere vor.

ESI-MS (positiv), m/z : 997.31 ([M + Na]⁺, ber.: 997.36), 1971.72 ([2 × M + Na]⁺, ber.: 1971.73).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 997.3576 ([M + Na]⁺, ber.: 997.3594).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(4,6-di-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-4-desoxy-4-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (86)**



Zu einer Mischung aus 301 mg (0.309 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃-GalF-(1→3)- α Ac₂-GalNAc)-*Ot*Bu **5** in 0.6 mL Wasser wurden 6 mL Trifluoressigsäure gegeben und die Lösung wurde zweieinhalb Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 50 mL Toluol zugegeben und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach fünfmaligem Kodestillieren mit je 30 mL Toluol und zweimaligem Kodestillieren mit je 30 mL Dichlormethan wurde das Rohprodukt mittels Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/MeOH/HOAc, 9:1:0.1) gereinigt.

Ausbeute: 278 mg (98%, 0.30 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$R_f = 0.13$ (EtOAc/MeOH/HOAc, 9:1:0.1)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264$ nm)

$R_t = 19.1$ min

Zeit (min)	0	5	30	60
Acetonitril + 0.1% TFA (%)	30	30	90	100
Wasser + 0.1% TFA (%)	70	70	10	0

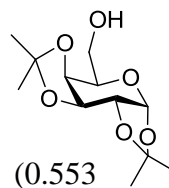
$C_{43}H_{51}FN_2O_{19}$ ($M = 918.865$ g/mol)

ESI-MS (positiv), m/z : 941.13 ($[M + Na]^+$, ber.: 941.30), 1859.35 ($[2 \times M + Na]^+$, ber.: 1859.60).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 941.2968 ($[M + Na]^+$, ber.: 941.2968).

5.3 Synthesen zu Kapitel 3.2

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**92**)^[141]



Zu einer Suspension aus 39.60 g (0.220 mol) D-Galactose **20** und 88.62 g (0.553 mol) wasserfreiem Kupfer(II)-sulfat in 700 mL Aceton wurden unter Rühren 5.30 mL konz. Schwefelsäure gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und das Filtrat wurde mit festem $Ca(OH)_2$ neutralisiert. Anschließend wurde durch *Hyflo* filtriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

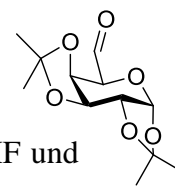
Ausbeute: 46.5 g (81%, 0.18 mol), gelbes Öl

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

$C_{12}H_{20}O_6$ ($M = 260.126$ g/mol)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = 5.56 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 5.12$ Hz, 1-H), 4.61 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 2.23$ Hz, $J_{H3,H2} = 8.15$ Hz, 3-H) 4.34 – 4.32 (m, 1H, 2-H), 4.27 (dd, 1H, $J_{H4,H5} = 1.53$ Hz, $J_{H4,H3} = 8.12$ Hz, 4-H), 3.87 – 3.83 (m, 2H, 6a-H, 5-H), 3.74 (dd, 1H, $J_{H6b,H5} = 7.41$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 14.35$ Hz, 6b-H), 1.53, 1.46, 1.33 (3 s, 12 H, $4 \times CH_3$).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[141]

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranose (93**)**^[143,144]

Zu einem Gemisch aus 8.71 mL (0.102 mol) Oxalylchlorid, 10 mL absol. THF und 10 mL absol. Dichlormethan wurden bei -60 °C 14.43 mL (0.203 mol) absol. Dimethylsulfoxid gegeben. Anschließend wurden innerhalb von fünf Minuten 11.02 g (42.34 mmol) des Alkohols **92**, gelöst in 10 mL absol. Dichlormethan, zugegeben und die Lösung wurde zehn Minuten gerührt. Innerhalb von 15 Minuten wurden 56.90 mL (0.406 mol) Triethylamin zugegeben und die Suspension wurde weitere 30 min bei -60 °C gerührt, bevor auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Nach Zusatz von 50 mL Wasser wurde zweimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die org. Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Hex/EtOAc, 7:3) gereinigt.

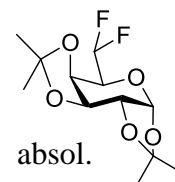
Ausbeute: 8.62 g (79%, 33.39 mmol), gelbes Öl

R_f = 0.330 (Hex/EtOAc, 7:3)

C₁₂H₁₈O₆ (M=258.268 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 9.57 (s, 1H, CHO), 5.63 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 4.91 Hz, 1-H), 4.63 – 4.53 (m, 2H, 3-H, 4-H), 4.34 (dd, 1H, $J_{H2,H1}$ = 4.91 Hz, $J_{H2,H3}$ = 2.46 Hz, 2-H), 4.15 (d, 1H, $J_{H5,H4}$ = 2.14 Hz, 5-H), 1.46, 1.39, 1.30, 1.27 (4 × s, 12 H, 4 × CH₃).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[250]

6-Desoxy-6,6-difluor-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (89**)**^[145,146]

Zu einer Lösung aus 0.81 g (3.14 mol) des Aldehyds **93** in 25 mL absol. Dichlormethan wurden bei 0 °C langsam 0.85 mL (6.91 mmol) *N,N*-Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) getropft und die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Nachdem über Nacht bei dieser Temperatur gerührt wurde, wurden 5 mL Methanol zugegeben. Die org. Phase wurde zweimal mit je 50 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (Hex/EtOAc, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.40 g (67%, 5.00 mmol), gelblicher Feststoff

$R_f = 0.59$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 3:1)

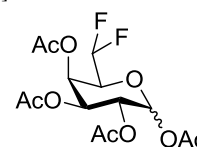
$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{O}_5$ ($M=280.265$ g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 5.81 (ddd, 1H, $J_{\text{H}_6,\text{F}_a} = 53.76$ Hz, $J_{\text{H}_6,\text{F}_b} = 53.76$ Hz, $J_{\text{H}_6,\text{H}_5} = 6.62$ Hz, 6-H), 5.53 (dd, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 4.86$ Hz, $J_{\text{H}_1,\text{H}_3} = 1.98$ Hz, 1-H), 4.62 (ddd, 1H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 7.96$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 2.51$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{F}} = 2.51$ Hz, 3-H), 4.37 – 4.31 (m, 2H, 2-H, 4-H), 3.92 – 3.83 (m, 1H, 5-H), 1.52, 1.44, 1.33, 1.32 (4s, 12 H, $4 \times \text{CH}_3$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = -129.2 (ddd, 1F, $J_{\text{F}_a,\text{F}_b} = 296.99$ Hz, $J_{\text{F}_a,\text{H}_6} = 58.26$ Hz, $J_{\text{F}_a,\text{H}_5} = 11.63$ Hz, 6-Fa), -131.0 (ddd, 1F, $J_{\text{F}_b,\text{F}_a} = 298.29$ Hz, $J_{\text{F}_b,\text{H}_6} = 54.00$ Hz, $J_{\text{F}_b,\text{H}_5} = 3.86$ Hz, $J_{\text{F}_b,\text{H}_4} = 2.07$ Hz, 6-Fb).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[146]

6-Desoxy-6,6-difluor-1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl- α/β -D-galactopyranose (**94**)^[146]



Es wurden 1.36 g (4.87 mmol) des geschützten Zuckers **89** in 30 mL eines Gemisches aus konz. Essigsäure und Wasser (8:2) zwei Tage auf 80 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde viermal mit je 30 mL Toluol kdestilliert. Die erhaltene vollständig deblockierte Galactose wurde anschließend in 20 mL Pyridin gelöst, mit 4.57 mL (48.65 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde erneut viermal mit je 50 mL Toluol kdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1) gereinigt.

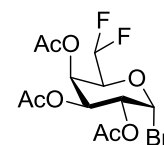
Ausbeute: 1.70 g (97%, 4.72 mmol), gelbes Öl

$R_f = 0.37$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1)

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{O}_9$ ($M=360.204$ g/mol)

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = -128.0 – -131.3 (m, 2F, 6-Fa/b).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[146]

6-Desoxy-6,6-difluor-1,2,3,4-tetra-O-acetyl- α -D-galactosylbromid (3)

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 5.46 g (15.16 mmol) des peracetylierten Zuckers **94** in 50 mL absol. Dichlormethan wurden langsam 10.47 mL (60.63 mmol) einer 33%igen Lösung von HBr in Eisessig getropft. Die Lösung wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt, auf 300 mL Eiswasser gegossen und mit festem NaHCO₃ neutralisiert. Die erhaltene Wasserphase wurde dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten org. Phasen wurden zweimal mit je 50 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.01 g (51%, 7.74 mmol) gelblicher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +185.0.$$

R_f = 0.55 (°Hex/EtOAc, 2:1)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, λ = 214 nm)

R_t = 20.0 min

Zeit (min)	0	5	40	60
Acetonitril (%)	20	20	70	100
Wasser (%)	80	80	30	0

C₁₂H₁₅BrF₂O₇ (M=389.144 g/mol)

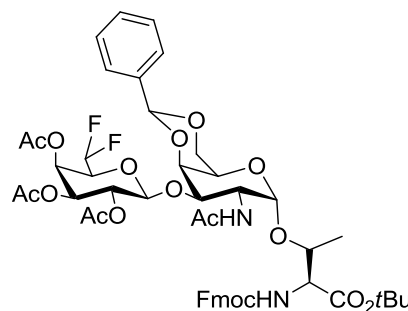
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 6.69 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.98 Hz, 1-H), 5.77 (ddd 1H, J_{H6,Fa} = 54.27 Hz, J_{H6,Fb} = 55.89 Hz, J_{H6,H5} = 5.44 Hz, 6-H), 5.67 – 5.64 (m, 1H, 4-H), 5.36 (dd, 1H, J_{H3,H2} = 10.65 Hz, J_{H3,H4} = 3.27 Hz, 3-H), 5.04 (dd, 1H, J_{H2,H1} = 10.65 Hz, J_{H2,H3} = 4.01 Hz, 2-H), 4.37 (ddd, 1H, J_{H5,F} = 10.74 Hz, J_{H5,H6} = 7.62 Hz, J_{H5,H4} = 2.77 Hz, 5-H), 2.13, 2.09, 1.99 (3s, 9H, 3 × CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 170.0, 169.7, 169.3 (3 × C=O(OAc)), 112.3 (dd, J_{Fa,C6} = 246.71 Hz, J_{Fb,C6} = 241.40 Hz, C-6), 87.0 (C-1), 72.3 (dd, J_{C5,Fa} = 30.64 Hz, J_{C5,Fb} = 26.34 Hz, C-5), 67.4 (C-3), 67.4 (C-2), 65.9 (dd, J_{C4,Fa} = 5.51 Hz, J_{C4,Fb} = 2.40 Hz, C-4), 20.7, 20.5, 20.5 (3 × CH₃(OAc)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = -129.0 (ddd, $J_{\text{Fa,Fb}} = 302.59$ Hz, $J_{\text{Fa,H6}} = 55.75$ Hz, $J_{\text{Fa,H5}} = 10.80$ Hz, 6-Fa), -130.4 (ddd, $J_{\text{Fb,Fa}} = 302.26$ Hz, $J_{\text{Fb,H6}} = 54.16$ Hz, $J_{\text{Fb,H5}} = 5.20$ Hz, 6-Fb).

FD-MS, m/z : 309.35 ($[\text{M} - \text{Br}]^+$, ber.: 309.08), 389.34 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, ber.: 389.00).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-6-desoxy-6,6-difluorgalactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (95)**



Eine Lösung aus 1.13 g (1.634 mmol) Fmoc-Thr-(α -4,6-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu **12** in 12.5 mL absol. Nitromethan und absol. Dichlormethan (2:3) wurde mit 900 mg frisch aktiviertem Molekularsieb (4 Å) und 0.40 g (1.597 mmol) Quecksilber(II)-cyanid versetzt. Die Mischung wurde 30 min unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt, bevor eine Lösung aus 1.27 g (3.267 mmol) $\text{Ac}_3\text{GalF}_2\text{Br}$ (**3**), gelöst in 12.5 mL absol. Nitromethan und absol. Dichlormethan (2:3), zugegeben wurde. Es wurde neun Stunden in der Mikrowelle bei 80 °C und 100 W (5 min Aufheizphase, $p_{\text{max}}=5.0$ bar) erhitzt, durch *Hyflo* in 80 mL einer ges. NaHCO_3 -Lsg. filtriert und die wässrige Phase wurde mit 80 mL Dichlormethan extrahiert. Die org. Phase wurde mit je 40 mL ges. NaHCO_3 -Lsg. und ges. NaCl -Lsg. gewaschen und mit MgSO_4 getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^c\text{Hex/EtOAc}$, 2:3) gereinigt.

Ausbeute: 0.57 g (35%, 0.57 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +55.77.$

$R_f = 0.33$ ($^c\text{Hex/EtOAc}$, 2:3)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264$ nm)

$R_t = 28.5$ min

Zeit (min)	0	10	25	60
Acetonitril (%)	50	50	77	100
Wasser (%)	50	50	23	0

$C_{50}H_{58}F_2N_2O_{17}$ ($M = 996.996$ g/mol)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.77 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.62$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.66$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.52 (dd, 2H, $J_{H,H} = 7.85$ Hz, $J_{H,H} = 1.52$ Hz, H_{Ar} -Bzn), 7.45 – 7.24 (m, 7H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar} -Bzn), 5.89 (d, 1H, $J_{NH,2H} = 9.23$ Hz, NH-Ac), 5.82 (ddd, 1H, $J_{H6',Fa} = 55.55$ Hz, $J_{H6',Fb} = 55.31$ Hz, $J_{H6',H5'} = 5.93$ Hz, 6'-H), 5.55 – 5.50 (m, 2H, 4'-H, CH-Bzn), 5.45 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.34$ Hz, NH-Urethan), 5.18 (dd, 1H, $J_{H2',H1'} = 7.30$ Hz, $J_{H2',H3'} = 10.05$ Hz, 2'-H), 4.96 (dd, 1H, $J_{H3',H2'} = 10.13$ Hz, $J_{H3',H4'} = 2.47$ Hz, 3'-H), 4.92 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 2.47$ Hz, 1-H), 4.77 – 4.62 (m, 2H, 1'-H, 2-H), 4.52 (d, 1H, $J_{CH_2-Fmoc,CH-Fmoc} = 6.29$ Hz, CH_2 -Fmoc), 4.33 – 4.11 (m, 5H, T^{α} , CH-Fmoc, 4-H, T^{β} , 6a-H), 4.04 (d, 1H, $J_{H6'b,H6'a} = 12.41$ Hz, 6b-H), 3.92 – 3.75 (m, 2H, 3-H, 5'-H), 3.70 – 3.59 (m, 1H, 5-H), 2.11, 2.05, 1.99, 1.95 (4s, 12H, $4 \times CH_3$), 1.43 (s, 9H $3 \times CH_3(tBu)$), 1.23 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 4.80$ Hz, T^{γ}).

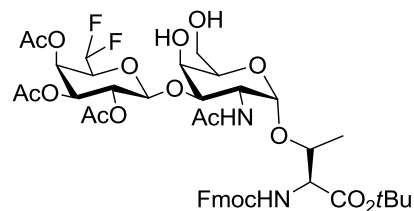
^{13}C -NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, $CDCl_3$), δ [ppm] = 170.1 (C=O(NHAc)), 169.9, 169.8, 169.4 ($3 \times C=O(OAc, Ester)$), 156.4 (C=O(Urethan)), 143.7, 143.7 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.4 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 137.6 (Cq-Bzn), 128.9, 128.2, 127.9 (C_{Ar} (Bzn)), 127.1 (C-3-, C-6-Fmoc), 126.3 (C-2-, C-7-Fmoc), 126.1 (C_{Ar} (Bzn)), 124.9 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 113.1 (dd, $J_{C6',Fa} = 243.52$ Hz, $J_{C6',Fb} = 243.52$ Hz, C-6'), 101.9 (C-1'), 100.8 (CH-Bzn), 100.4 (C-1), 83.3 (Cq(tBu)), 76.3 (T^{β}), 76.0 (C-4), 75.3 (C-3), 72.6 (dd, $J_{C5',Fa} = 27.67$ Hz, $J_{C5',Fb} = 27.67$ Hz, C-5'), 70.2 (C-3'), 69.1 (C-6), 68.5 (C-2'), 66.8 (CH_2 -Fmoc), 65.9 (C-4'), 63.6 (C-5), 59.0 (T^{α}), 47.8 (C-2), 47.3 (CH-(Fmoc)), 28.1 ($CH_3(tBu)$), 20.7, 20.6, 20.6, 20.5 ($4 \times CH_3(OAc)$), 18.9 (T^{γ}).

^{19}F -NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = -128.3 (dd, $J_{Fa,H6'} = 52.82$ Hz, $J_{Fb,H6'} = 52.82$ Hz, Fa), -128.9 – -129.2 (m, Fb).

ESI-MS (positiv), m/z : 997.41 ($[M + H]^+$, ber.: 997.38), 1019.35 ($[M + Na]^+$, ber.: 1019.36), 2016.77 ($[2 \times M + Na]^+$, ber.: 2015.73).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 997.3776 ($[M + H]^+$, ber.: 997.3782).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-6-desoxy-6,6-difluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (110)**



Eine Lösung aus 404 mg (0.405 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃-GalF₂-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O*tBu **95** in 50 mL

Dichlormethan und Methanol (4:1) wurde mit 400 mg aktiviertem Kieselgel (SiO₂*NaHSO₄)^[108] versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit festem NaHCO₃ neutralisiert, und die org. Phase wurde dreimal mit je 50 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und mit 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 302 mg (82%, 0.33 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +27.8$$

R_f = 0.27 (EtOAc)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264$ nm)

R_t = 17.1 min

Zeit (min)	0	10	25	60
Acetonitril (%)	50	50	77	100
Wasser (%)	50	50	23	0

C₄₃H₅₄F₂N₂O₁₇ (M = 908.889 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HMQC) δ [ppm] = 7.75 (d, 2H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.45$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.58 (d, 2H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 6.95$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.38 (t, 2H, $J_{\text{H3,H4}} = J_{\text{H6,H5}} = 7.35$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 – 7.25 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.08 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.65$ Hz, NH-Ac), 5.73 (td, 1H, $J_{\text{H6',Fa}} = 55.50$ Hz, $J_{\text{H6',Fb}} = 55.50$ Hz, $J_{\text{H6',H5'}} = 5.70$ Hz, 6'-H), 5.63 – 5.56 (m, 1H, NH-Urethan), 5.49 (s, 1H, 4'-H), 5.20 – 5.10 (m, 1H, 2'-H), 4.93 (dd, 1H, $J_{\text{H3',H2'}} = 10.52$ Hz, $J_{\text{H3',H4'}} = 2.62$ Hz, 3'-H), 4.81 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 2.45$ Hz, 1-H), 4.63 (d, 1H, $J_{\text{H1',H2'}} = 7.93$ Hz, 1'-H), 4.59 – 4.43 (m, 3H, 2-H, CH₂-Fmoc), 4.25 – 3.98 (m, 4H, 4-H, T^a, T ^{β} , CH-Fmoc), 3.95 – 3.73 (m, 4H, 6a/b-H, 5-H, 5'-H), 3.69 (d, 1H, $J_{\text{H3,H2}} =$

10.68 Hz, 3-H), 2.11, 2.06, 1.98, 1.94 (4s, 12H, 4 × CH₃), 1.41 (s, 9H, 3 × CH₃(*t*Bu)), 1.24 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.39$ Hz, T^γ).

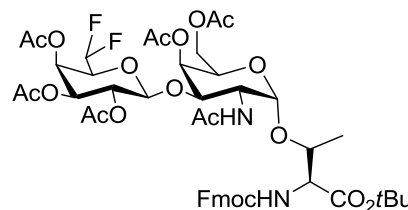
¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl₃), δ [ppm] = 170.1 (C=O(NHAc)), 170.1, 169.7, 169.7 (3 × C=O(OAc, Ester)), 156.4 (C=O(Urethan)), 143.7, 143.6 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.9 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.9, 125.9 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 112.8 (t, $J_{C6', Fa} = 243.34$ Hz, $J_{C6', Fb} = 243.34$ Hz, C-6'), 101.8 (C-1'), 100.0 (C-1), 83.2 (Cq(*t*Bu)), 78.1 (C-3), 76.3 (T^β), 72.7 (dd, $J_{C5', Fa} = 27.66$ Hz, $J_{C5', Fb} = 27.66$ Hz, C-5'), 70.2 (C-3'), 70.0 (C-5), 69.6 (C-4), 68.1 (C-2'), 66.8 (CH₂-Fmoc), 66.1 (C-4'), 62.7 (C-6), 59.1 (T^α), 47.6 (C-2), 47.3 (CH-(Fmoc)), 28.0 (CH₃(*t*Bu)), 20.7, 20.7, 20.5, 20.5 (4 × CH₃(OAc)), 18.6 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -228.7 – -129.2 (m, $J_{F, H6'} = 55.69$ Hz, $J_{F, H5'} = 25.05$ Hz, $J_{F, H4'} = 8.16$ Hz).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 931.35 ([M + Na]⁺, ber.: 931.33), 1839.72 ([2 × M + Na]⁺, ber.: 1839.67).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 931.3260 ([M + Na]⁺, ber.: 931.3288).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(4,6-di-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-β-D-6-desoxy-6,6-difluor-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (6)**



Eine Lösung aus 302 mg (0.255 mmol) Fmoc-Thr(βAc₃-GalF₂-(1→3)-α-GalNAc)-*O**t*Bu **110** in 12 mL Pyridin wurde mit 6 mL Essigsäureanhydrid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wurde dreimal mit je 30 mL Toluol kodestilliert und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:3) gereinigt.

Ausbeute: 271 mg (82%, 0.273 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +42.1$

$R_f = 0.48$ (^cHex/EtOAc, 1:3)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, λ = 264 nm)

$R_t = 24.1$ min

Zeit (min)	0	10	25	60
Acetonitril (%)	50	50	77	100
Wasser (%)	50	50	23	0

$C_{47}H_{58}F_2N_2O_{19}$ ($M = 992.962$ g/mol)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY, HMQC) δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 5.41$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.66 – 7.46 (m, 2H, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.44 – 7.36 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.35 – 7.25 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.11 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.79$ Hz, NH-Ac), 5.79 (td, 1H, $J_{H6',Fa} = 54.55$ Hz, $J_{H6',Fb} = 54.55$ Hz, $J_{H6',H5} = 5.87$ Hz, 6'-H), 5.59 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.57$ Hz, NH-Urethan), 5.49 (s, 1H, 4'-H), 5.37 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 3.06$ Hz, 4-H), 5.07 (dd, 1H, $J_{H2',H3'} = 10.47$ Hz, $J_{H2',H1'} = 7.78$ Hz, 2'-H), 4.91 (dd, 1H, $J_{H3',H2'} = 10.38$ Hz, $J_{H3',H4'} = 3.10$ Hz, 3'-H), 4.77 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 2.83$ Hz, 1-H), 4.62 (d, 1H, $J_{H1',H2'} = 7.83$ Hz, 1'-H), 4.57 – 4.47 (m, 3H, 2-H, CH_2 -Fmoc), 4.26 – 4.16 (m, 2H, T^a , CH-Fmoc), 4.16 – 4.04 (m, 3H, T^b , 5-H, 6a-H), 4.04 – 3.94 (m, 1H, 6b-H), 3.88 – 3.73 (m, 2H, 3-H, 5'-H), 2.14, 2.13, 2.11, 2.04, 1.98, 1.95 (6s, 18H, $6 \times CH_3$), 1.42 (s, 9H, $3 \times CH_3(tBu)$), 1.26 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.06$ Hz, T^y).

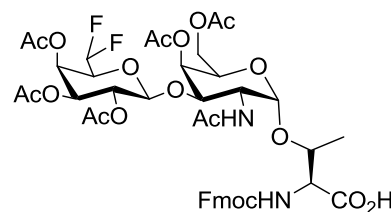
^{13}C -NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, $CDCl_3$), δ [ppm] = 175.3 (C=O(NHAc)), 170.5, 170.3, 170.2, 169.8, 169.6 ($5 \times C=O(OAc, Ester)$), 156.5 (C=O(Urethan)), 143.6 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.4, 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.9 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.2 (C-2-, C-7-Fmoc), 124.9 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 113.0 (dd, $J_{C6',Fa} = 245.13$ Hz, $J_{C6',Fb} = 241.57$ Hz, C-6'), 101.0 (C-1'), 100.2 (C-1), 83.4 (Cq(tBu)), 76.9 (T^b), 73.0 (C-3), 72.6 (d, $J_{C5',F} = 30.55$ Hz, C-5'), 70.2 (C-3'), 69.3 (C-4), 68.0 (C-2'), 67.8 (C-5), 66.8 (CH_2 -Fmoc), 66.0 (d, $J_{C4',F} = 5.68$ Hz, C-4'), 62.8 (C-6), 59.1 (T^a), 48.5 (C-2), 47.3 (CH-Fmoc), 28.1 ($CH_3(tBu)$), 20.9, 20.7, 20.7, 20.6, 20.6, 20.5 ($6 \times CH_3(OAc)$), 18.6 (T^y).

^{19}F -NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = -127.6 – -131.7 (m, 2F).

ESI-MS (positiv), m/z : 1015.29 ($[M + Na]^+$, ber.: 1015.35), 2008.69 ($[2 \times M + Na]^+$, ber.: 2008.71).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1015.3503 ($[M + Na]^+$, ber.: 1015.3500).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(4,6-di-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-6-desoxy-6,6-difluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin**
(98)



Zu einer Mischung aus 271 mg (0.273 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃-GalF₂-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂-GalNAc)-*O*tBu **6** in 0.6 mL Wasser wurden 6 mL Trifluoressigsäure gegeben und die Lösung wurde 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 50 mL Toluol zugegeben und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach fünfmaligem Kodestillieren mit je 30 mL Toluol und zweimaligem Kodestillieren mit je 30 mL Dichlormethan wurde das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/MeOH/HOAc, 9:1:0.1) gereinigt.

Ausbeute: 239 mg (93%, 0.26 mmol) gelblicher, amorpher Feststoff

R_f = 0.20 (EtOAc/MeOH/HOAc, 9:1:0.1)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, λ = 264 nm)

R_t = 21.6 min

Zeit (min)	0	5	30	60
Acetonitril + 0.1% TFA (%)	30	30	90	100
Wasser + 0.1% TFA (%)	70	70	10	0

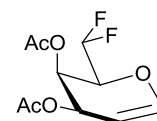
C₄₃H₅₀F₂N₂O₁₉ (M = 936.856 g/mol)

ESI-MS (positiv), m/z : 959.22 ([M + Na]⁺, ber.: 959.29), 1895.49 ([2 × M + Na]⁺, ber.: 1895.58).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 959.2827 ([M + Na]⁺, ber.: 959.2874).

5.4 Synthesen zu Kapitel 3.3

3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluorogalactal (7)



Es wurden 3.66 g (55.93 mmol) Zinkpulver durch zweimaliges Digerieren in verd. Salzsäure (2 M) und Waschen mit Wasser, Essigsäureethylester und Diethylether aktiviert. Das so behandelte Zink wurde anschließend in 70 mL Essigsäureethylester aufgeschlämmt, mit 0.53 mL (6.711 mmol) *N*-Methylimidazol versetzt und zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden 2.18 g (5.593 mmol) des anomeren Bromids **3**, gelöst in 10 mL Essigsäureethylester, binnen einer Stunde zugetropft und das Gemisch wurde weitere zwei Stunden refluxiert. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung durch *Hyflo* filtriert und die org. Phase wurde zweimal mit je 50 mL verd. Salzsäure (1 M) und ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.22 g (87%, 4.88 mmol) gelblicher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = -39.0.$$

$$R_f = 0.46 \text{ (}^c\text{Hex/EtOAc, 2:1)}$$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 214 \text{ nm}$)

$$R_t = 16.8 \text{ min}$$

Zeit (min)	0	5	40	60
Acetonitril (%)	20	20	70	100
Wasser (%)	80	80	30	0

C₁₀H₁₂F₂O₅ (M=232.206 g/mol)

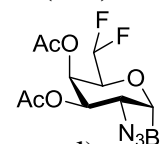
¹**H-NMR** (400 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 6.50 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 6.31 \text{ Hz}$, 1-H), 5.86 (td, 1H, $J_{\text{H6,Fa}} = 55.45 \text{ Hz}$, $J_{\text{H6,Fb}} = 55.45 \text{ Hz}$, $J_{\text{H6,H5}} = 5.99 \text{ Hz}$, 6-H), 5.62 – 5.47 (m, 2H, 3-H, 4-H), 4.75 (dt, 1H, $J_{\text{H2,H1}} = 6.31 \text{ Hz}$, $J_{\text{H2,H4}} = 1.96$, $J_{\text{H2,F}} = 1.96 \text{ Hz}$, 2-H), 4.20 (dd, 1H, $J_{\text{H5,F6a/b}} = 14.23 \text{ Hz}$, $J_{\text{H5,H6}} = 7.61 \text{ Hz}$, 5-H), 2.14, 2.03 (2s, 6H, 2 × CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 170.2, 169.8 ($2 \times \text{C}=\text{O}(\text{OAc})$), 144.8 (C-1), 112.7 (t, $J_{\text{C6,Fa}} = J_{\text{C6,Fb}} = 243.78$ Hz, C-6), 99.6 (C-2), 73.8 (t, $J_{\text{C5,Fa}} = J_{\text{C5,Fb}} = 27.19$ Hz, C-5), 63.5 (3C), 62.0 (d, $J_{\text{C4,Fa}} = J_{\text{C4,Fb}} = 4.21$ Hz C-4), 20.7, 20.6 ($2 \times \text{CH}_3(\text{OAc})$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = -129.6 (d, $J_{\text{Fa/b,H6}} = 55.07$ Hz).

FD-MS, m/z : 251.29 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, ber.: 251.20).

2-Deoxy-2-azido-6-desoxy-6,6-difluor-3,4-di-O-acetyl- α -D-galactalosylbromid (100)



Es wurden 9.91 g (18.09 mmol) Cerammoniumnitrat und 0.89 g (9.043 mmol) Natriumazid, das zuvor vier Stunden im Hochvakuum getrocknet wurde, in 70 mL absol. Acetonitril bei 5 °C tropfenweise mit 1.51 g (6.029 mmol) Difluorgalactal **7**, gelöst in 30 mL absol. Acetonitril, versetzt. Nach drei Tagen Reaktionszeit wurden der Suspension 100 mL kalter Diethylether zugegeben und die Mischung wurde auf 300 mL Eiswasser gegossen. Die erhaltene org. Phase wurde dreimal mit je 50 mL Wasser gewaschen und mit MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 5:1) gereinigt. Das erhaltene Anomerengemisch wurde ohne weitere Charakterisierung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 0.40 g (19%, 1.14 mmol) farbloses Öl

Zu einer Suspension aus 0.50 g (5.700 mmol) Lithiumbromid in 20 mL absol. Acetonitril wurden langsam 0.40 g (1.140 mmol) Azidonitrat **99**, gelöst in 10 mL absol. Acetonitril, gegeben. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und die erhaltene org. Phase wurde zweimal mit je 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO_4 wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 43 mg (10%, 0.12 mmol) farbloser Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +195.0.$

$R_f = 0.27$ ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 5:1)

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 214$ nm)

$R_t = 30.4$ min

Zeit (min)	0	5	40	60
Acetonitril (%)	20	20	70	100
Wasser (%)	80	80	30	0

$C_{10}H_{12}BrF_2N_3O_5$ ($M = 372.120$ g/mol)

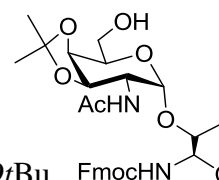
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = 6.50 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.85$ Hz, 1-H), 5.79 (ddd, 1H, $J_{H6a,F} = 55.80$ Hz, $J_{H6b,F} = 55.61$ Hz, $J_{H6,H5} = 5.47$ Hz, 6-H), 5.69 – 5.64 (m, 1H, 4-H), 5.33 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 10.74$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.18$ Hz, 3-H), 4.40 (dddd, 1H, $J_{H5,H6} = 6.46$ Hz, $J_{H5,Fa} = 5.49$ Hz, $J_{H5,Fb} = 5.48$ Hz, $J_{H5,H4} = 0.93$ Hz, 5-H), 4.03 (dd, 1H, $J_{H2,H3} = 10.73$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.87$ Hz, 2-H), 2.17, 2.07 (2s, 6H, $2 \times CH_3$).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = 169.3, 169.1 ($2 \times C=O(OAc)$), 112.2 (dd, $J_{Fa,C6} = 246.67$ Hz, $J_{Fb,C6} = 241.87$ Hz, C-6), 87.7 (C-1), 72.6 (dd, $J_{C5,Fa} = 30.24$ Hz, $J_{C5,Fb} = 26.47$ Hz, C-5), 69.4 (C-3), 65.4 (dd, $J_{C4,Fa} = 5.05$ Hz, $J_{C4,Fb} = 2.21$ Hz, C-4), 58.3 (C-2), 20.5, ($2 \times CH_3(OAc)$).

^{19}F -NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = -128.9 (ddd, $J_{Fa,Fb} = 301.33$ Hz, $J_{Fa,H6} = 55.21$ Hz, $J_{Fa,H5} = 10.66$ Hz, 6-Fa), -130.3 (ddd, $J_{Fb,Fa} = 301.66$ Hz, $J_{Fb,H6} = 53.88$ Hz, $J_{Fb,H5} = 5.52$ Hz, 6-Fb).

FD-MS, m/z : 292.35 ($[M - Br]^+$, ber.: 292.07).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4-isopropyliden- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonine-*tert*-butylester (102)**



Zu einer Lösung aus 0.82 g (1.365 mmol) Fmoc-Thr(α Ac $_3$ GalNAc)-*O*tBu **58** in 20 mL Dimethoxypropan wurden 27.30 mg (0.118 mmol) (-)-Camphersulfonsäure gegeben und die Mischung wurde drei Tage bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Nachdem 0.093 mL Triethylamin zugesetzt wurden, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde vier Stunden auf 65°C in 22 mL einer Mischung

aus Methanol und Wasser (10:1) erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 0.69 g (79%, 1.07 mmol) farbloser amorpher Feststoff.

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

$R_f = 0.34$ (^cHex/EtOAc, 1:4)

RP-HPLC (PerfectSil C18(2), $\lambda = 214$ nm)

$R_t = 8.3$ min

Zeit (min)	0	30	40	
Acetonitril (%)	50	80	100	
Wasser (%)	50	20	0	

$\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}$ (M= 640.721 g/mol)

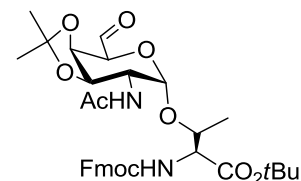
¹**H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ [ppm] = 7.75 (d, 2H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.34$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.34$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.41 – 7.35 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.33 – 7.26 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.01 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.65$ Hz, NHAc), 5.43 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.41$ Hz, NH-Urethan), 4.77 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.03$ Hz, 1-H), 4.45 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 6.69$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.32 – 4.17 (m, 3H, 2-H, CH-Fmoc, T^α), 4.19 – 4.15 (m, 1H, 4-H), 4.15 – 4.08 (m, 2H, T^β, 5-H), 4.03 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 9.20$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 4.89$ Hz, 3-H), 3.94 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_{6a/b}} = 11.77$ Hz, $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_5} = 6.38$ Hz, 6_{a/b}-H), 3.82 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_{6a/b}} = 11.67$ Hz, $J_{\text{H}_{6a/b},\text{H}_5} = 3.98$ Hz, 6_{a/b}-H), 2.02 (s, 3H, CH₃(NHAc)), 1.57 (s, 3H, CH₃(Acetal)), 1.44 (s, 9H, 3 × CH₃(*t*Bu)), 1.32 (s, 3H, CH₃(Acetal)), 1.27 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.41$ Hz, T^γ).

¹³**C-NMR** (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ [ppm] = 170.2, 170.1 (2 × C=O(NHAc, Ester)), 156.3 (C=O(Urethan)), 143.7, 143.6 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.8 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.0, 124.9 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C-4-, C-5-Fmoc), 110.1 (C_q(Acetal)), 100.0 (C-1), 83.2 (C_q(*t*Bu)), 76.7 (T^β), 74.9 (C-3), 68.1 (C-5), 73.4 (C-4), 67.0 (CH₂-Fmoc), 62.8 (C-6), 58.8 (T^α), 50.1 (C-2), 47.2 (CH-Fmoc), 28.1 (CH₃(*t*Bu)), 27.8, 26.7 (2 × CH₃(Acetal)), 23.4 (CH₃(NHAc)), 18.7 (T^γ).

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

HRMS (ESI), m/z : 663.2899 ([M + Na]⁺, ber.: 663.2894).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4-*O*-isopropyliden- α -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranosyl)-L-threonine-*tert*-butylester(103)**



Zu einer auf 0 °C gekühlten Suspension aus 60 mg (0.160 mmol) Pyridiniumdichromat und 0.045 mL (0.481 mmol) Essigsäureanhydrid in 15 mL absol. Dichlormethan wurden 102 mg (0.159 mmol) des Alkohols **102**, gelöst in 2 mL absol. Dichlormethan, gegeben. Das Gemisch wurde vier Stunden refluxiert, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}$ Hex/EtOAc, 1:2) gereinigt wurde.

Ausbeute: 41 mg (40%, 0.064 mmol) farbloser amorpher Feststoff.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +62.1$$

$$R_f = (^{\circ}\text{Hex/EtOAc, 1:2}) 0.20$$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214 \text{ nm}$)

$$R_t = 11.6 \text{ min}$$

Zeit (min)	0	10	25	60
Acetonitril (%)	50	50	77	100
Wasser (%)	50	50	23	0

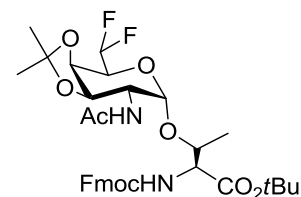
$\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{10}$ (M = 638.705 g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ [ppm] = 9.66 (s, 1H, CHO), 7.78 – 7.71 (m, 2H, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.58 (d, 2H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.32 \text{ Hz}$, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.42 – 7.34 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.33 – 7.25 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.07 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.61 \text{ Hz}$, NHAc), 5.40 (d, 1H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.07 \text{ Hz}$, NH-Urethan), 4.89 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 2.83 \text{ Hz}$, 1-H), 4.55 – 4.42 (m, 3H, 4-H, CH_2 -Fmoc), 4.42 – 4.28 (m, 2H, 2-H, 5-H), 4.25 – 4.16 (m, 2H, CH-Fmoc, T^{α}), 4.15 – 4.03 (m, 2H, T^{β} , 3-H), 2.02 (s, 3H, CH_3 (NHAc)), 1.56 (s, 3H, CH_3 (Acetal)), 1.45 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$ (*t*Bu)), 1.31 (s, 3H, CH_3 (Acetal)), 1.20 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.87 \text{ Hz}$, T^{γ}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , DEPT, HMQC), δ [ppm] = 198.0 (C=O(Aldehyd)), 170.4 (C=O(NHAc)), 170.3 (C=O(Ester)), 156.4 (C=O(Urethan)), 143.6 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.4 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.9 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.0, 124.9 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 110.6 (C_q (Acetal)), 100.1 (C-1), 83.4 (C_q (*t*Bu)), 76.9 (T^{β}),

74.6 (C-3), 73.3 (C-5), 72.5 (C-4), 67.0 (CH₂-Fmoc), 58.7 (T^α), 49.8 (C-2), 47.3 (CH-Fmoc), 28.1 (CH₃(*t*Bu)), 27.7 (CH₃(Acetal)), 26.6 (CH₃(NHAc)), 23.4 (CH₃(Acetal)), 18.6 (T^γ).
FD-MS, *m/z*: 638.78 ([M + H]⁺, ber.: 639.28).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-desoxy-6,6-difluoro-3,4-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranosyl)-L-threonine-*tert*-butylester (104)**



Zu einer Lösung aus 41 mg (0.064 mmol) Aldehyd **103** in 3 mL absol. Dichlormethan wurden 0.017 mL (0.14 mmol) *N,N*-Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) gegeben und die Lösung wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde 1.0 mL Methanol zugegeben und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Flashchromatographische Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:2) lieferte das bisfluorierte Produkt **104**.

Ausbeute: 25.4 mg (60%, 0.038 mmol) farbloser amorpher Feststoff.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +83.5$

$R_f = (^c\text{Hex/EtOAc, 1:2}) 0.62$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214 \text{ nm}$)

$R_t = 26.4 \text{ min}$

Zeit (min)	0	10	25	60
Acetonitril (%)	50	50	77	100
Wasser (%)	50	50	23	0

C₃₄H₄₂F₂N₂O₉ (M = 660.70 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.41 \text{ Hz}$, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.34 \text{ Hz}$, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.43 – 7.36 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.34 – 7.28 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.10 (ddd, 1H, $J_{\text{H6,F6a}} = 54.29 \text{ Hz}$, $J_{\text{H6,F6b}} = 11.23 \text{ Hz}$, $J_{\text{H6,H5}} = 6.47 \text{ Hz}$, 6-H), 5.97 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.76 \text{ Hz}$, NHAc), 5.29 (d, 1H, $J_{\text{NH,T}\alpha}$

= 7.55 Hz, NH-Urethan), 4.78 (s, 1H, 1-H), 4.57 – 4.41 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.35 – 4.26 (m, 1H, 2-H), 4.26 – 4.15 (m, 3H, 4-H, CH-Fmoc, T^α), 4.14 – 4.01 (m, 2H, 5-H, T^β), 4.02 (dd, 1H, J_{H3,H2} = 9.00 Hz, J_{H3,H4} = 4.86 Hz, 3-H), 2.02 (s, 3H, CH₃(NHAc)), 1.59 (s, 3H, CH₃(Acetal)), 1.44 (s, 9H, 3 × CH₃(*t*Bu)), 1.33 (s, 3H, CH₃(Acetal)), 1.26 (d, 3H, J_{Tγ,Tβ} = 6.36 Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ [ppm] = 170.2, 170.0 (2 × C=O(NHAc, Ester)), 156.3 (C=O(Urethan)), 143.8, 143.6 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.4 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.8 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.0, 124.9 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 114.27 (dd, J_{F6a,F6b} = 245.46 Hz, J_{F6,C5} = 238.31 Hz, C-6), 110.5 (C_q(Acetal)), 100.2 (C-1), 83.3 (C_q(*t*Bu)), 77.5 (T^β), 74.6 (C-3), 70.8 (d, J_{F6,C4} = 6.47 Hz, C-4), 68.0 (dd, J_{F6a/b,C5} = 31.58 Hz, J_{F6a/b,C5} = 22.72 Hz, C-5), 66.9 (CH₂-Fmoc), 58.8 (T^α), 49.8 (C-2), 47.3 (CH-Fmoc), 28.1 (CH₃(*t*Bu)), 27.7 (CH₃(Acetal)), 26.6 (CH₃(NHAc)), 23.4 (CH₃(Acetal)), 18.5 (T^γ).

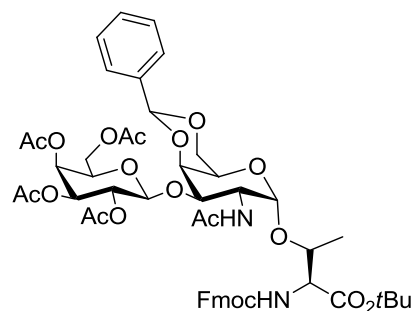
¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -127.1 (ddd, J_{F6a,F6b} = 298.14 Hz, J_{F6a,H6} = 57.95 Hz, J_{F6b,H6} = 11.21 Hz, 6b-F), -130.7 (dd, J_{F6b,F6a} = 298.13 Hz, J_{F6b,H6} = 53.80 Hz, 6b-F).

ESI-MS (positive), *m/z*: 683.27 ([M + Na]⁺, ber.: 643.31);

HRMS (ESI), *m/z*: 683.2767 ([M + Na]⁺, ber.: 683.2756).

5.5 Synthesen zu Kapitel 3.4

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-pyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (114)**^[139,140]



Zu einer Suspension aus 443 mg (0.643 mmol) Fmoc-Thr(α-4,6-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu **12**, 325 mg (1.286 mmol) Quecksilber(II)-cyanid und 400 mg Molekularsieb (4 Å) in 10 mL absol. Dichlormethan und absol. Nitromethan (2:3) wurden nach einer Stunde Rühren 529 mg (1.259 mmol) Donor **54**, gelöst in 10 mL absol. Dichlormethan und absol. Nitromethan (2:3) gegeben. Die Mischung wurde zwei Tage unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt und durch *Hyflo* in 80 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. filtriert. Die

wässrige Phase wurde mit 80 mL Dichlormethan extrahiert und die org. Phase wurde mit je 40 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 425 mg (65%, 0.42 mmol) farbloser amorpher Feststoff.

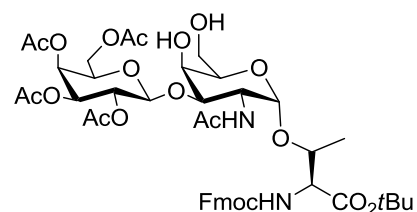
R_f = 0.27 (^cHex/EtOAc, 1:1)

C₅₃H₆₄N₂O₁₈ (M = 1019.051 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.78 (d, 2H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.42 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2H, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.65 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.56 – 7.48 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.47 – 7.28 (m, 7H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H(Bzn)), 5.96 (d, 1H, J_{NH,H2} = 9.21 Hz, NH-Urethan), 5.89 (d, 1H, J_{NH,Tα} = 9.62 Hz, NH-Ac), 5.56 (s, 1H, CH(Bzn)), 5.39 (d, 1H, J_{H4',H3'} = 2.75 Hz, 4'-H), 5.22 – 5.10 (m, 1H, 2'-H), 5.00 – 4.89 (m, 2H, 3'-H {4.99}, 1-H {4.94}), 4.82 – 4.65 (m, 2H, 1'-H {4.74}, 2-H {4.70}), 4.62 – 4.39 (m, 3H, T^α {4.22}, CH₂-Fmoc {4.54}), 4.30 – 4.18 (m, 5H, CH-Fmoc, T^β {4.27}, 4-H {4.26}, 6a-H {4.22}, 6a'-H {4.24}), 4.15 – 4.03 (m, 2H, 6b-H {4.07}, 6b'-H {4.12}), 3.92 – 3.84 (m, 2H, 3-H {3.88}, 5-H), 3.73 – 3.62 (m, 1H, 5'-H), 2.17 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 2.04 (s, 3 H, CH₃(NHAc)), 2.00, 1.97 (2s, 6H, 2 × CH₃(Ac)), 1.47 (s, 9H, CH₃(*t*Bu)), 1.27 (d, 3H, J_{Tγ,Tβ} = 6.23 Hz, T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[139]

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-pyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (115)^[140]**



Eine Lösung aus 538 mg (0.528 mmol) Fmoc-Thr(βAc₄-Gal-(1→3)-α-4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu **114** in 50 mL Dichlormethan/Methanol (4:1) wurde mit 500 mg aktiviertem Kieselgel (SiO₂*NaHSO₄)^[108] versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit festem NaHCO₃ neutralisiert, dreimal mit je 50 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und mit 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 383 mg (78%, 0.41 mmol) farbloser amorpher Feststoff.

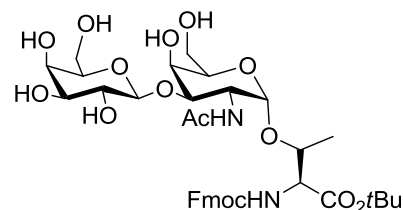
$R_f = 0.31$ (EtOAc)

$C_{45}H_{58}N_2O_{19}$ ($M = 930.944$ g/mol)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = 7.91 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 8.66$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.75 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.42$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.53 – 7.46 (m, 2H, NH-Urethan {7.51, d, $J_{NH,T\alpha} = 8.87$ Hz}, NH-Ac {7.48, d, $J_{NH,H_2} = 9.61$ Hz}), 7.45 – 7.38 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.36 – 7.28 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.28 (d, 1H, $J_{H_3',H_4'} = 3.42$ Hz, 3'-H), 5.05 – 4.94 (m, 2H, 4'-H {5.02, d, $J_{H_4',H_3'} = 3.43$ Hz}, 2'-H {4.99}), 4.74 (d, 1H, $J_{H_1',H_2'} = 7.67$ Hz, 1'-H), 4.58 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 4.15$ Hz, 1-H), 4.54 – 4.40 (m, 2H, CH_2 -Fmoc), 4.32 (t, 1H, $J_{CH,CH_2} = 6.7$ Hz, CH-Fmoc), 4.28 – 4.19 (m, 2H, 2-H {4.24}, T^β {4.22}), 4.18 – 4.11 (m, 2H, 6a-H {4.15}, 5-H {4.15}), 4.07 (dd, 1H, $J_{T\alpha,H_2} = 9.96$ Hz, $J_{T\alpha,T\beta} = 1.7$ Hz, T^α), 4.02 – 3.94 (m, 1H, 6b-H), 3.91 – 3.88 (m, 1H, 4-H), 3.64 (t, 1H, $J_{H_5,H_{6a/b}} = 6.72$ Hz, 5-H), 3.56 (dd, 1H, $J_{H_3,H_2} = 11.27$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 2.7$ Hz, 3-H), 3.50 – 3.44 (m, 2H, 6'a/b-H), 2.12, 2.07, 2.00, 1.99, 1.91 (4s, 12H, 4 × CH_3 (OAc)), 1.84 (s, 3H, CH_3 (NHAc)), 1.34 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)), 1.14 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.44$ Hz, T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[140]

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (105)**



Eine Lösung aus 200 mg (0.225 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₄-Gal-

(1→3)- α -GalNAc)-*O**t*Bu **115** in 10 mL Methanol wurde tropfenweise mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 g Na in 25 mL MeOH) versetzt, bis sich ein pH-Wert von 8.5 einstellte. Es wurde über Nacht gerührt und mit verdünnter Essigsäure neutralisiert, bevor das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert wurde. Das erhaltene Produkt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 14 mg (48%, 0.0187 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, CHCl_3) = +49.3$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264$ nm)

$R_t = 11.6$ min

Zeit (min)	0	5	30	60
Acetonitril (%)	30	30	90	100
Wasser (%)	70	70	10	0

$C_{37}H_{50}N_2O_{15}$ ($M = 762.797$ g/mol)

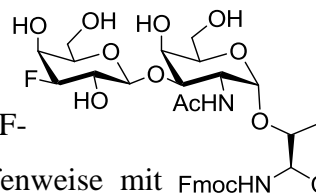
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY, HMQC) δ [ppm] = 7.67 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.51$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.58 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 7.05$ Hz, 1-H-Fmoc), 7.45 (d, 1H, $J_{H8,H7} = 6.95$ Hz, 8-H-Fmoc), 7.31 (t, 2H, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.06$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.28 – 7.26 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.95 (bs, 1H, NH-Ac), 6.53, 6.40 (2bs, 1H, NH-Urethan), 4.80, 4.71 (2s, 1H, 1-H), 4.51 – 4.23 (m, 5H, 1'-H, 2'-H, 2-H, CH_2 -Fmoc), 4.23 – 4.01 (m, 3H, CH-Fmoc, T^α , T^β), 4.01 – 3.72 (m, 6H, 3-H, 4-H 5-H, 6a/b-H, 4'-H), 3.72 – 3.46 (m, 4H, 3'-H, 5'-H, 6a/b'-H), 3.01 (bs, 6H, 6 \times OH), 2.01 (s, 3H, CH_3), 1.33 (s, 9H, 3 \times CH_3 (*t*Bu)), 1.20 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.89$ Hz, T^γ).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, $CDCl_3$), δ [ppm] = 170.3 (C=O(NHAc)), 156.9 (C=O(Urethan)), 143.9 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.2 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.7 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.2, 124.8 (C-1-, C-8-Fmoc), 119.9 (C-4-, C-5-Fmoc), 105.3 (C-1'), 99.9 (C-1), 82.7 (Cq(*t*Bu)), 79.2 (C-3), 77.2 (T^β), 74.7 (C-5'), 73.1 (C-3'), 71.0 (C-5), 70.1 (C-4'), 68.9 (C-4), 68.4 (C-2'), 67.1 (CH_2 -Fmoc), 61.4 (C-6), 60.8 (C-6'), 59.5 (T^α), 48.4 (C-2), 47.1 (CH-Fmoc), 28.0 (CH_3 (*t*Bu)), 23.3 (CH_3 (NHAc)), 18.9 (T^γ).

ESI-MS (positiv), m/z : 785.31 ($[M + Na]^+$, ber.: 785.31), 1547.64 ($[2 \times M + Na]^+$, ber.: 1547.63), 2311.00 ($[3 \times M + Na]^+$, ber.: 2310.96).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 785.3119 ($[M + Na]^+$, ber.: 785.3109).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β-D-3-desoxy-3-fluor-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (107)**



Eine Lösung aus 196 mg (0.220 mmol) Fmoc-Thr(βAc₃-GalF-(1→3)-α-GalNAc)-OtBu **60** in 20 mL Methanol wurde tropfenweise mit FmocHN(CH₂CH₂CO₂tBu) einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 g Na in 25 mL MeOH) versetzt, bis sich ein pH-Wert von 8.5 einstellte. Es wurde über Nacht gerührt und mit verdünnter Essigsäure neutralisiert, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Zum Rückstand, gelöst in 20 mL absol. Dichlormethan, wurden 74 mg (0.220 mmol, 1.0 Äquiv.) FmocOSu gegeben und mit Diisopropylethylamin wurde ein pH-Wert von 9.5 eingestellt. Nachdem über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde erneut mit verdünnter Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 17 mg (10%, 0.022 mmol) farbloses Lyophilisat

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +40.7$$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, λ = 264 nm)

R_t = 17.5 min

Zeit (min)	0	5	30	60
Acetonitril (%)	30	30	90	100
Wasser (%)	70	70	10	0

C₃₇H₄₉FN₂O₁₄ (M = 764.788 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, COSY, HMQC) δ [ppm] = 7.92 – 7.81 (m, 3H, 1-H-, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.73 (dd, 1H, J_{H8,H7} = 7.27 Hz, J_{H8,H6} = 2.88 Hz, 8-H-Fmoc), 7.60 (d, 1H, J_{NH,Tα} = 9.82 Hz, NH-Urethan), 7.48 (d, 1H, J_{NH,H2} = 9.80 Hz, NH-Ac), 7.45 – 7.25 (m, 4H, 2-H-, 7-H-, 3-H-, 6-H-Fmoc), 5.02 (bs, 1H, prim.-OH), 4.93 (bs, 1H, prim.-OH), 4.77 – 4.55 (m, 4H, 1-H, 3 × sek.-OH), 4.50 – 4.35 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.35 – 4.13 (m, 5H, 1'-H, 2-H, 3'-H, CH-Fmoc, T^β), 4.07 (dd, 1H, J_{HTα,NH} = 9.91 Hz, J_{HTα,HTβ} = 1.52 Hz, T^α), 3.96 – 3.83 (m, 2H, 2'-H, 4-H), 3.71 – 3.42 (m, 8H, 3-H, 4'-H, 5-H, 5'-H, 6a/b'-H, 6a/b-H), 1.81 (s, 3H, CH₃), 1.35 (s, 9H, 3 × CH₃(tBu)), 1.14 (d, 3H, J_{Tγ,Tβ} = 6.43 Hz, T^γ).

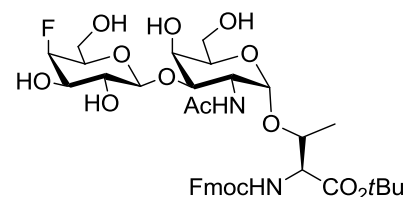
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DEPT, HMQC, DMSO), δ [ppm] = 169.5 (C=O(NHAc)), 157.3 (C=O(Urethan)), 144.1 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.2 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 129.4 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.5 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.7, 125.6 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.5 (C-4-, C-5-Fmoc), 104.6 (C-1'), 99.8 (C-1), 94.5 (d, $J_{\text{C}3',\text{F}} = 181.22$ Hz, C-3'), 81.7 (Cq(*t*Bu)), 78.0 (C-3), 77.0 (d, $J_{\text{C}2',\text{F}} = 32.40$ Hz, C-2'), 74.3 (T^{β}), 72.1 (C-5'), 69.2 (C-5), 69.1 (d, $J_{\text{C}4',\text{F}} = 18.59$ Hz, C-4'), 68.2 (C-2), 68.3 (C-4), 66.2 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 61.2 (C-6), 60.4 (C-6'), 59.8 (T^{α}), 47.8 (C-2), 47.2 (CH-Fmoc), 28.1 ($\text{CH}_3(\textit{t}\text{Bu})$), 23.5 ($\text{CH}_3(\text{NHAc})$), 19.6 (T^{γ}).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = -195.8 – -196.5 (m, $J_{\text{F},\text{H}3'} = 48.80$ Hz, $J_{\text{F},\text{H}2'} = 12.35$ Hz, $J_{\text{F},\text{H}4'} = 6.63$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 787.29 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 787.31), 1551.62 ($[2 \times \text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 1551.62), 2317.01 ($[3 \times \text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 2316.94).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 787.3064 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 787.3066).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-4-desoxy-4-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (108)**



Eine Lösung aus 200 mg (0.225 mmol) Fmoc-Thr($\beta\text{Ac}_3\text{-GalF-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-GalNAc-O}t\text{Bu}$) **85** in 20 mL Methanol wurde tropfenweise mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 g Na in 25 mL Methanol) versetzt, bis sich ein pH-Wert von 8.5 einstellte. Es wurde über Nacht gerührt und mit verdünnter Essigsäure neutralisiert, bevor das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert wurde. Das erhaltene Produkt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 22.9 mg (13%, 0.030 mmol) farbloses Lyophilisat

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{MeOH}) = +42.5$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264$ nm)

$R_t = 14.1$ min

Zeit (min)	0	5	30	60
Acetonitril (%)	30	30	90	100
Wasser (%)	70	70	10	0

$C_{37}H_{49}FN_2O_{14}$ ($M = 764.788$ g/mol)

1H -NMR (400 MHz, DMSO, COSY, HMQC) δ [ppm] = 7.91 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.71$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.74 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.79$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.61 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.83$ Hz, NH-Urethan), 7.47 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 10.10$ Hz, NH-Ac), 7.43 (t, 2H, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.66$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.36 – 7.28 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.27 (d, 1H, $J_{prim.-OH,H6} = 5.42$ Hz, prim.-OH), 4.89 (dd, 1H, $J_{prim.-OH,H6} = J_{OH,H6} = 5.33$ Hz, prim.-OH), 4.69 – 4.49 (m, 5H, 1-H, 4'-H, 3 \times sek.-OH), 4.49 – 4.37 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.37 – 4.17 (m, 4H, 1'-H, 2-H, CH-Fmoc, T ^{β}), 4.08 (dd, 1H, $J_{HT^{\alpha},NH} = 9.92$ Hz, $J_{HT^{\alpha},HT^{\beta}} = 1.51$ Hz, T ^{α}), 3.94 – 3.89 (m, 1H, 4-H), 3.71 – 3.58 (m, 2H, 3-H, 5-H), 3.55 – 3.39 (m, 5H, 5'-H, 6a/b'-H, 6a/b-H), 3.39 – 3.27 (m, 2H, 2'-H, 3'-H), 1.82 (s, 3H, CH₃), 1.35 (s, 9H 3 \times CH₃(*t*Bu)), 1.15 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.39$ Hz, T ^{γ}).

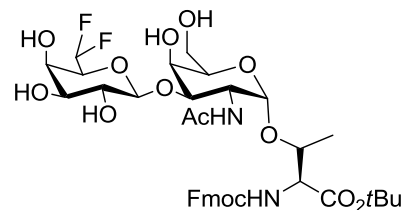
^{13}C -NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, DMSO), δ [ppm] = 169.5 (C=O(NHAc)), 157.3 (C=O(Urethan)), 144.2 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 128.2 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.5 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.8, 125.7 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.7 (C-4-, C-5-Fmoc), 105.0 (C-1'), 99.8 (C-1), 89.4 (d, $J_{C4',F} = 179.56$ Hz, C-4'), 81.7 (Cq(*t*Bu)), 78.1 (C-3), 74.5 (T ^{β}), 73.8 (d, $J_{C5',F} = 18.36$ Hz, C-5'), 72.2 (C-5), 72.0 (d, $J_{C3',F} = 17.60$ Hz, C-3'), 71.1 (C-2'), 68.2 (C-4), 66.1 (CH₂-Fmoc), 61.2 (C-6), 59.8 (T ^{α}), 59.6 (d, $J_{C6',F} = 4.84$ Hz, C-6'), 47.8 (C-2), 47.2 (CH(Fmoc)), 28.1 (CH₃(*t*Bu)), 23.5 (CH₃(NHAc)), 19.6 (T ^{γ}).

^{19}F -NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -216.6 (ddd, $J_{F,H4'} = 50.66$ Hz, $J_{F,H3'} = 30.63$ Hz, $J_{F,H5'} = 30.63$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 787.30 ([M + Na]⁺, ber.: 787.31), 1551.67 ([2 \times M + Na]⁺, ber.: 1551.62).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 787.3071 ([M + Na]⁺, ber.: 787.3066).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β-D-6-desoxy-6,6-difluor-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (110)**



Eine Lösung aus 318 mg (0.350 mmol) Fmoc-Thr(βAc₃-GalF₂-(1→3)-α-GalNAc)-*O**t*Bu **111** in 20 mL Methanol wurde tropfenweise mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 g Na in 25 mL Methanol) versetzt, bis sich ein pH-Wert von 8.5 einstellte. Es wurde über Nacht gerührt und mit verdünnter Essigsäure neutralisiert, bevor das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert wurde. Das erhaltene Produkt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 35 mg (13%, 0.045 mmol) farbloses Lyophilisat

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +53.9$$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264 \text{ nm}$)

$R_t = 16.1 \text{ min}$

Zeit (min)	0	5	30	60
Acetonitril (%)	30	30	90	100
Wasser (%)	70	70	10	0

$\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_{14}$ ($M = 782.779 \text{ g/mol}$)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, COSY, HMQC) δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, $J_{\text{H}4,\text{H}3} = J_{\text{H}5,\text{H}6} = 7.00 \text{ Hz}$, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{\text{H}1,\text{H}2} = J_{\text{H}8,\text{H}7} = 6.70 \text{ Hz}$, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.43 – 7.36 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.35 – 7.23 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.61 (bs, 1H, NH-Ac), 6.03 (dd, 1H, $J_{\text{H}6',\text{F}a} = 56.14 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}6',\text{F}b} = 56.14 \text{ Hz}$, 6'-H), 5.88 (bs, 1H, NH-Urethan), 4.85 (s, 1H, 1-H), 4.63 – 4.31 (m, 4H, 1'-H, 2'-H, CH₂-Fmoc), 4.31 – 4.00 (m, 5H, 2'-H, 4-H, CH-Fmoc, T^α, T^β), 3.99 – 3.45 (m, 12H, 3-H, 5-H, 6a/b-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 5 × OH), 2.07 (s, 3H, CH₃), 1.43 (s, 9H, 3 × CH₃(*t*Bu)), 1.26 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.76 \text{ Hz}$, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, DMSO), δ [ppm] = 170.5 (C=O(NHAc)), 156.5 (C=O(Urethan)), 143.8, 143.7 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.8 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.0 (C-4-, C-5-Fmoc), 113.9 (t, $J_{\text{C}6',\text{F}a} = 247.76 \text{ Hz}$, $J_{\text{C}6',\text{F}b} = 247.76 \text{ Hz}$, C-6'), 105.2 (C-1'), 99.9 (C-1), 83.2

(Cq(*t*Bu)), 79.2 (C-3), 77.2 (T^β), 74.2 (dd, $J_{C5',Fa} = 26.20$ Hz, $J_{C5',Fb} = 26.20$ Hz, C-5'), 72.5 (C-3'), 70.5 (C-4'), 69.9 (C-5), 69.7 (C-4), 67.6 (C-2'), 66.9 (CH₂-Fmoc), 62.1 (C-6), 59.1 (T^α), 48.3 (C-2), 47.2 (CH-(Fmoc)), 28.0 (CH₃(*t*Bu)), 23.3 (CH₃(NHAc)), 18.7 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -129.6 (d, $J_{F,H6} = 44.61$ Hz, 2F).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 805.28 ([M + Na]⁺, ber.: 805.30), 1587.62 ([2 × M + Na]⁺, ber.: 1587.60), 2370.97 ([3 × M + Na]⁺, ber.: 2370.92).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 805.3000 ([M + Na]⁺, ber.: 805.2971).

Durchführung der Stabilitätstests mit Hilfe einer β-Galactosidase aus Rinderhoden

[3.2.1.23]

Für die Stabilitätstests wurde zunächst eine Puffer-Stammlösung hergestellt: Es wurden 21.32 mg (0.109 mmol) 2-(*N*-Morpholin)ethansulfonsäure (MES-Puffer) in 10 mL Millipore-Wasser gelöst (10mM Lösung). In einem Reagenzglas wurden das jeweilige T-Antigen (natürliches T-Antigen: 3.814 mg (5.0 mmol), einfach fluorierte T-Antigene: 3.824 mg (5.0 mmol), zweifach fluorierte T-Antigene: 3.914 mg (5.0 mmol)), 13.31 mg (10.0 mmol) Dimethyl-β-cyclodextrin und 0.5 mg (0.077 μmol) Rinderserumalbumin vorgelegt und mit 1 mL der frisch hergestellten Pufferlösung versetzt. Es wurde so lange stark geschüttelt, bis sich eine klare Lösung bildete. Es wurde jeweils ein pH-Wert von 4.5 gemessen. Nun wurden 0.1 Einheiten der β-Galactosidase aus Rinderhoden (0.112 mL, Suspension in 3.2 M (NH₄)₂SO₄-Puffer) zugegeben, wobei sich anfangs Schlieren bildeten, die sich aber innerhalb von 20 Sekunden wieder auflösten. In festen Zeitabständen wurden Aliquote von 30 μL entnommen und durch analytische RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, λ = 264 nm) auf die Bildung des T_N-Antigens untersucht. Zum Ende der jeweiligen Enzymreaktion wurde das Gemisch massenspektrometrisch bzgl. der vorhandenen Antigenverhältnisse untersucht.

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 264$ nm)

Gradient 1

Zeit (min)	0	5	30	60
Acetonitril (%)	30	30	90	100
Wasser (%)	70	70	10	0

Gradient 2

Zeit (min)	0	50	45	60
Acetonitril (%)	30	30	70	100
Wasser (%)	70	70	30	0

Daten für die enzymatische Hydrolyse des natürlichen T-Antigens (Gradient 1)

Zeit [min]	nat. T-Antigen	Tn
0	100,000	0
30	78,295	21,705
60	66,739	33,261
120	50,764	49,236
180	39,048	60,952
240	27,962	72,038
300	19,518	80,482
360	12,142	87,858
420	7,167	92,833
960	0,000	100

Daten für die enzymatische Hydrolyse des 6'-F-T-Antigens (Gradient 1)

Zeit [min]	6'-F-T-Antigen	Tn
0	100,000	0
30	91,759	8,241
60	89,835	10,165
120	87,301	12,699
240	81,638	18,362
360	81,221	18,779
570	77,173	22,827
1380	66,561	33,439
1980	60,569	39,431
2820	57,981	42,019

Daten für die enzymatische Hydrolyse des natürlichen T-Antigens mit Zusatz von 6-F-Galactose (Gradient 1)

Zeit [min]	nat. T-Antigen	Tn
0	100,000	0
30	84,047	15,953
70	71,180	28,820
120	58,686	41,314
180	45,063	54,937
240	34,472	65,528
300	26,710	73,290
420	14,880	85,120
1440	0,000	100

Daten für die Hydrolyse des 4'-F-T-Antigens (Gradient 1)

Zeit [min]	Verhältnis
0	1,000
30	1,000
60	1,000
120	1,000
240	1,000
420	1,000

Nach Zugabe des natürlichen T-Antigens

Zeit [min]	nat.-T	Tn
0	100	0
30	92,312	16,846
60	84,153	29,913
120	69,687	49,303
165	58,744	61,737
630	8,539	100

Daten für die enzymatische Hydrolyse des 6'-Di-F-T-Antigens (Gradient 2)

Zeit [min]	Verhältnis
0	1,000
30	1,000
60	1,000
120	1,000
300	1,000
420	1,000
480	1,000

Nach Zugabe des natürlichen T-Antigens

Zeit [min]	nat.-T	Tn
0	100	0
60	79,912	23,923
120	62,03	42,618
720	0	90,094

Daten für die enzymatische Hydrolyse des 2'-F-T-Antigens (Gradient 1)

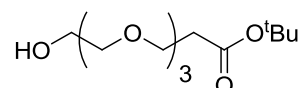
Zeit [min]	Verhältnis
0	1,000
30	1,000
60	1,000
180	1,000
300	1,000
330	1,000

Nach Zugabe des natürlichen T-Antigens

Zeit [min]	nat.-T	Tn
0	100	0
60	100	0
120	98,634	3,92
210	91,077	9,012
270	78,362	23,259
1020	41,816	58,863
2040	37,011	60,497
2820	34,273	62,813
3480	35,637	67,891
4290	36,105	69,723

5.6 Synthesen zu Kapitel 3.5

12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (118)^[140,206]



Eine Lösung aus 25.00 mL (0.186 mol) wasserfreiem Triethylenglycol **117** in 100 mL absol. THF wurden unter Argonatmosphäre mit 40 mg (1.740 mmol) Natrium versetzt. Nachdem letzteres vollständig gelöst war, wurden 9.60 mL (66.14 mmol) Acrylsäure-*tert*butylester zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 21 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von 1.60 mL verd. Salzsäure (1 M) wurde neutralisiert und das Lösungsmittel wurde

im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 70 mL einer ges. NaCl-Lsg. aufgenommen, dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinigten org. Phasen wurden mit 50 mL einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Trocknen mit MgSO₄ wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 12.96 g (70%, 45.57 mmol) farbloser Feststoff

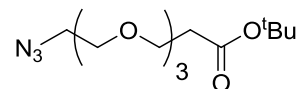
R_f = 0.21 (EtOAc)

C₁₃H₂₆O₆ (M=278.342 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 3.70 – 3.29 (m, 14H, CH₂OH), 2.43 – 2.38 (m, 2H, CH₂-CO₂*t*Bu), 1.45 – 1.40 (m, 9H, 3 × CH₃(*t*Bu)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[140,206]

12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (119)^[206]



Zu 12.96 g (46.57 mmol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester **118**, gelöst in 25 mL absol. Dichlormethan, wurden 16.36 mL (116.4 mmol) Triethylamin gegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, tropfenweise mit 7.57 mL (97.80 mmol) Mesylchlorid versetzt und vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das gebildete Triethylamin-Hydrochlorid durch *Hyflo* filtriert und der Filterkuchen wurde mit 100 mL Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit jeweils 50 mL Eiswasser und mit 20 mL einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 25 mL DMF aufgenommen und mit 18.77 g (0.289 mol) Natriumazid versetzt. Es wurde über Nacht bei 60 °C gerührt, bevor das DMF im Vakuum entfernt und der Rückstand in 60 mL Wasser gelöst wurde. Die wässrige Phase wurde viermal mit jeweils 50 mL Diethylether extrahiert, die vereinigten org. Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 8.17 g (58%, 26.93 mmol) farbloser Feststoff

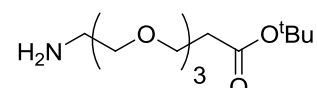
R_f = 0.24 (^cHex/EtOAc, 3:1)

$C_{13}H_{25}N_3O_6$ (M=278.342 g/mol)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = 3.76 – 3.62 (m, 12H, CH_2OH), 3.38 (t, 2H, $J_{CH_2,CH_2} = 5.06$ Hz, N_3-CH_2), 2.48 – 2.45 (m, 2H, CH_2-CO_2tBu), 1.43 (s, 9H, $3 \times CH_3(tBu)$).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[206]

12-Amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**120**)^[140]



In einem Schlenkkolben wurden 8.60 g einer Raney-Nickel-Emulsion in Wasser je zweimal mit 50 mL Isopropanol gewaschen. Anschließend wurde der Kolben evakuiert und mit Wasserstoff geflutet. Es wurde noch jeweils dreimal evakuiert und mit Wasserstoff geflutet, ehe zunächst 20 mL Isopropanol und anschließend 8.17 g (26.93 mmol) Azid **119**, gelöst in 40 mL Isopropanol, unter einer Wasserstoffatmosphäre zugegeben wurden. Nach erneutem Evakuieren und Fluten mit Wasserstoff wurde die Suspension vier Tage unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde durch *Hyflo* filtriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde sofort ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Rohausbeute: 7.41 g (99%, 26.70 mmol) gelbliches Öl.

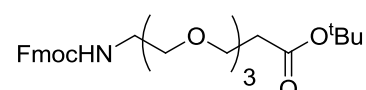
$R_f = 0.12$ ($Et_2O/MeOH$, 1:1)

$C_{13}H_{27}NO_5$ (M = 277.36 g/mol).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = 3.76 – 3.62 (m, 12H, CH_2OH), 3.38 (t, 2H, $J_{CH_2,CH_2} = 5.08$ Hz, NH_2-CH_2), 2.50 – 2.46 (m, 2H, CH_2-CO_2tBu), 1.44 (s, 9H, $3 \times CH_3(tBu)$).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[140]

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**121**)^[140]



Zu 7.41 g (26.70 mmol) Amin **120**, gelöst in 200 mL Aceton und Wasser (1:1), wurden 2.24 g (26.70 mmol) $NaHCO_3$ gegeben und die Reaktionsmischung wurde unter Rühren

portionsweise mit 9.01 g (26.70 mmol) Fmoc-OSu versetzt. Die Mischung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, ehe mit verd. Salzsäure (2 M) auf pH = 6.0 angesäuert wurde, wobei sich das Produkt als Öl abschied. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand wurde viermal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die org. Phase wurde mit 300 mL verd. Salzsäure (1 M) und 150 mL Wasser gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 9.91 g (74%, 19.84 mmol) gelbliches Öl.

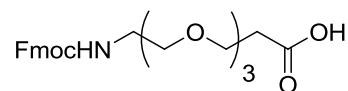
R_f = 0.30 (^cHex/EtOAc, 2:1)

C₂₈H₃₇NO₇ (M=499.596 g/mol).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.71 (d, 2H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.39 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.56 (d, 2H, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.32 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.35 (t, 2H, J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.38 Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.26 (t, 2H, J_{H2,H1} = J_{H7,H8} = 7.40 Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.47 (bs, 1H, NH-Urethan), 4.36 (d, 2H, J_{CH2,H9} = 6.82 Hz, CH₂-Fmoc), 4.18 (t, 1H, J_{H9,CH2} = 6.72 Hz, CH-Fmoc), 3.71 – 3.46 (m, 12H, CH₂OH), 3.39 – 3.63 (m, 2H, FmocNH-CH₂), 2.44 (t, 2H, J_{COCH2,CH2} = 6.42 Hz, COCH₂), 1.40 (s, 9H, 3 × CH₃(*t*Bu)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[140]

N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadodecansäure (**122**)^[140]



Zu 8.64 g (17.29 mmol) Ester **121**, gelöst in 3 mL Wasser, wurden 30 mL Trifluoressigsäure gegeben und das Gemisch wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol und zweimal mit je 50 mL Dichlormethan kodestilliert und das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 4:0.2:0.1) gereinigt. Das Produkt wurde anschließend noch viermal mit je 50 mL Toluol und dreimal mit je 50 mL Dichlormethan kodestilliert.

Ausbeute: 8.36 g (95%, 18.84 mmol) gelbliches Öl.

R_f = 0.29 (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 4:0.2:0.1)

$C_{24}H_{29}NO_7$ (M=443.490 g/mol).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = 7.74 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.46$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.30$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.38 (t, 2H, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.35$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.34 – 7.26 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.64 (bs, 1H, COOH), 5.53 (bs, 1H, NH-Urethan), 4.40 (d, 2H, $J_{CH2,H9} = 6.80$ Hz, CH_2 -Fmoc), 4.21 (t, 1H, $J_{H9,CH2} = 6.66$ Hz, CH-Fmoc), 3.78 – 3.48 (m, 12H, CH_2OH), 3.48 – 3.25 (m, 2H, FmocNH- CH_2), 2.59 (t, 2H, $J_{COCH2,CH2} = 6.15$ Hz, $COCH_2$).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[140]

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-Alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-[3-desoxy-3-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-porlyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (123)

Die Glycopeptidsynthese erfolgte automatisiert und von 417 mg (0.100 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt vorbeladenen Tentagel-S Harzes (Rapp Polymere, Beladung 0.24 mmol/g) ausgehend. Es wurden jeweils zehn Äquivalente der *Fmoc*-Aminosäuren nach dem Standardprotokoll am Peptidsynthesizer gekuppelt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgte halbautomatisch. Zunächst wurde die *Fmoc*-Schutzgruppe des am Harz gebundenen Peptides durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Anschließend wurden 152 mg (0.165 mmol) der Glycosylaminosäure **61** zusammen mit 75 mg (0.198 mmol) HATU und 27 mg (0.198 mmol) HOAt in 2 mL *N*-Methylpyrrolidon gelöst und mit 44 μ L (0.396 mmol) *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wurde in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt und das Gemisch wurde acht Stunden geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung wurde das Harz mit *N*-Methylpyrrolidon gewaschen und noch freie Aminogruppen wurden mit dem Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der restlichen fünf Aminosäuren und des Triethylenglycolspacers erfolgte nach dem Standardprotokoll. Abschließend wurde die terminale Fmoc Schutzgruppe durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Zur Abspaltung des Glycopeptids wurde das Harz in einen Merrifield-Reaktor überführt, mit Dichlormethan gewaschen und zwei Stunden in einer Mischung aus 15 mL Trifluoressigsäure, 0.8 mL dest Wasser und 0.8 mL Triisopropylsilan

geschüttelt. Anschließend wurde filtriert und das Harz wurde zweimal mit ca. 10 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt, mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Die Hälfte des so erhaltenen Rohpeptids wurde anschließend in 30 mL Methanol gelöst und tropfenweise mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 g Na in 25 mL Methanol) versetzt, bis ein pH-Wert von 9.0 erreicht wurde. Es wurde unter ständiger pH-Kontrolle über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit verd. Essigsäure (1 M) neutralisiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt

Ausbeute: 61 mg (50%, 0.025 mmol) farbloses Lyophilisat.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{H}_2\text{O}) = -112.2$$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 214$ nm)

$R_t = 9.2$ min

Zeit (min)	0	1	40	60
Acetonitril + 0.1% TFA (%)	5	5	70	100
Wasser + 0.1% TFA(%)	95	95	30	0

$\text{C}_{103}\text{H}_{166}\text{FN}_{27}\text{O}_{41}$ ($M = 2457.575$ g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , COSY, HMQC), δ [ppm] = 8.51 (d, 1H, $J_{\text{H}_\epsilon, \text{H}_\delta} = 1.30$ Hz, H_ϵ), 7.20 (d, 1H, $J_{\text{H}_\delta, \text{H}_\epsilon} = 1.04$ Hz, H_δ), 4.84 (d, 1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.67$ Hz, 1-H), 4.65 – 4.00 (m, 25H, D_α {4.60}, H_α {4.57}, $\text{T}_{\text{T}^*\alpha}$ {4.53}, R_α {4.52}, $\text{A}_{3\alpha}$ {4.48}, $\text{A}_{2\alpha}$ {4.42}, $\text{S}_{2\alpha}$ {4.41}, 1'-H {4.37}, $\text{S}_{1\alpha}$ {4.36}, $\text{A}_{4\alpha}$ {4.35}, $\text{P}_{1-5\alpha}$ {4.33, 4.32, 4.28, 4.26, 4.24}, $\text{T}_{2\alpha}$ {4.24}, $\text{T}_{1\alpha}$ {4.20}, V_α {4.20}, $\text{T}_{\text{T}^*\beta}$ {4.20}, $\text{A}_{1\alpha}$ {4.13}, $\text{T}_{1\beta}$ {4.10}, 2-H {4.10}, $\text{T}_{2\beta}$ {4.07}, 2'-H {4.06}), 3.98 – 3.45 (m, 37H, $\text{G}_{1\alpha}$ {3.96}, 5-H {3.93}, 3-H {3.90}, $\text{G}_{2\alpha}$ {3.78}, $\text{S}_{2\beta}$ {3.77}, $\text{S}_{1\beta}$ {3.66}, 6a,b'-H {3.66}, 4'-H {3.65}, 6a,b-H {3.64}, CH_2 -Spacer {3.64}, 4 × CH_2O -Spacer {3.64 – 3.52}, 4-H {3.60}, $\text{P}_{1-5\delta}$ {3.69, 3.67, 3.64, 3.57, 3.50}, 5'-H {3.52}), 3.19 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{\beta\text{a}}, \text{H}_{\beta\text{b}}} = 15.52$ Hz, $J_{\text{H}_{\beta\text{a}}, \text{H}_\alpha} = 5.49$ Hz, $\text{H}_{\beta\text{a}}$), 3.14 – 3.02 (m, 7H, CH_2 -Spacer {3.11}, R_δ {3.08}, $\text{H}_{\beta\text{b}}$ {3.07}), 2.91 – 2.72 (m, 2H, $\text{D}_{\beta\text{a}}$, $\text{D}_{\beta\text{b}}$), 2.70 – 2.48 (m, 2H, CH_2 -Spacer), 2.29 – 2.07 (m, 6H, $\text{P}_{1-3\beta}$ {2.27, 2.18, 2.09}), 2.03 – 1.67 (m, 19H, $\text{P}_{1-5\gamma}$ {1.96-1.80}, V_β {1.96}, $\text{P}_{4-5\beta}$ {1.92, 1.76}, AcNH (s, 1.87), $\text{R}_{\beta\text{a}}$ {1.69}), 1.67 – 1.48 (m, 3H, $\text{R}_{\beta\text{b}}$ {1.59}, R_γ {1.54}), 1.31 – 1.18 (m, 12H, $\text{A}_{2\beta}$, {1.29}, $\text{A}_{3\beta}$ {1.26}, $\text{A}_{4\beta}$ {1.22}, {1.21, d, $J_{\text{A}_{\beta}, \text{A}_\alpha} = 7.20$ Hz, $\text{A}_{1\beta}$ }), 1.15 (d, 3H, $J_{\text{T}^*\gamma, \text{T}\beta} = 6.27$ Hz, $\text{T}_{\text{T}^*\gamma}$), 1.10 – 1.02 (m, 6H, $\text{T}_{2\gamma}$, $\text{T}_{1\gamma}$), 0.85 (t, 6H, $J_{\text{V}_\gamma, \text{V}_\beta} = 6.96$ Hz, V_γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, D_2O , DEPT, HMQC), δ [ppm] = 175.92, 174.89, 174.38, 174.01, 173.95, 173.71, 173.58, 173.46, 173.09, 172.61, 172.49, 172.35, 171.98, 171.93, 171.52, 171.34, 171.22, 171.20, 171.11, 170.89, 170.67 (C=O, C=O(Acetyl)), 156.66 (C=NH), 133.42 ($\text{H}_{\text{C}\gamma}$), 128.38 ($\text{H}_{\text{C}\epsilon}$), 117.25 ($\text{H}_{\text{C}\delta}$), 103.83 (d, $J_{\text{C-1}',\text{F}} = 11.68$ Hz, C-1'), 99.12 (C-1), 92.75 (d, $J_{\text{C-3}',\text{F}} = 182.83$ Hz, C-3'), 77.37 (C-3), 76.96 ($\text{T}_{\text{T}*\beta}$), 73.66 (d, $J_{\text{C-5}',\text{F}} = 6.24$ Hz, C-5'), 70.93 (C-5), 69.56, 69.49, 69.44, 69.41 (CH_2 -Spacer), 68.76 (C-4), 66.99 ($\text{T}_{1\beta}$), 66.99 ($\text{T}_{2\beta}$), 66.72 (d, $J_{\text{C-2}',\text{F}} = 16.05$ Hz, C-2'), 66.29 (CH_2 -Spacer), 60.76 (C-6'), 60.49, 60.04, 59.99, 59.43, 59.29 ($\text{P}_{1-5\alpha}$), 60.49 (C-6), 60.24, 60.14 ($\text{S}_{1\beta}$, $\text{S}_{2\beta}$), 58.88 (V_α), 58.88 ($\text{T}_{1\alpha}$), 58.74 ($\text{T}_{2\alpha}$), 56.97 ($\text{T}_{\text{T}*\alpha}$), 55.53 ($\text{S}_{1\alpha}$), 54.94 ($\text{S}_{2\alpha}$), 52.29 (H_α), 51.09 (R_α), 50.09 (D_α), 48.24 (C-2), 48.24 ($\text{A}_{1\alpha}$), 48.03 ($\text{A}_{2\alpha}$), 47.73 ($\text{A}_{3\alpha}$), 47.65 ($\text{A}_{4\alpha}$), 48.03, 47.82, 47.72, 47.65, 47.38 ($\text{P}_{1-5\delta}$), 42.38 ($\text{G}_{2\alpha}$), 42.30 ($\text{G}_{1\alpha}$), 40.48 (R_δ), 39.02 (CH_2 -Spacer), 34.97 (D_β), 33.99 (CH_2 -Spacer), 30.21 (V_β), 29.62, 29.31, 29.26, 29.16, 28.74 ($\text{P}_{1-5\beta}$), 27.43 (R_β), 26.19 (H_β), 24.70, 24.60, 24.52, 24.31, 23.95 ($\text{P}_{1-5\gamma}$), 23.95 (R_γ), 22.27 (CH_3 -AcNH), 18.81 ($\text{T}_{1\gamma}$), 18.73 ($\text{T}_{2\gamma}$), 18.46 ($\text{V}_{\gamma\alpha}$), 18.33 ($\text{T}_{\text{T}*\gamma}$), 17.80 ($\text{V}_{\gamma\beta}$), 16.26, 15.17, 15.06 ($\text{A}_{1-4\beta}$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = -199.17 (ddd, $J_{\text{F},3'-\text{H}} = 48.12$ Hz, $J_{\text{F},4'-\text{H}} = 12.86$ Hz, $J_{\text{F},2'-\text{H}} = 5.62$ Hz, 4'-F).

ESI-MS (positiv), m/z : 1229.65 ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1229.09); 820.09 ($[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$, ber.: 819.72).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1229.0948 ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1229.0937).

MALDI-TOF-MS (dmb, positiv) m/z : 2458.48 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 2458.57).

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-N-L-prolyl-L-Alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-[4-desoxy-4-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-prolin (124)

Die Glycopeptidsynthese erfolgte automatisiert ausgehend von 455 mg (0.100 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt vorbeladenen Tentagel-S Harzes (Rapp Polymere, Beladung 0.22 mmol/g). Es wurden jeweils zehn Äquivalente der Fmoc-Aminosäuren nach dem Standardprotokoll am Peptidsynthesizer gekuppelt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgte halbautomatisch. Zunächst wurde die Fmoc Schutzgruppe des am Harz gebundenen

Peptides durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Anschließend wurden 155 mg (0.169 mmol) der Glycosylaminosäure **86** zusammen mit 77 mg (0.203 mmol) HATU und 27 mg (0.203 mmol) HOAt in 2 mL *N*-Methylpyrrolidon gelöst und mit 45 μ L (0.405 mmol) *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wurde in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt und acht Stunden geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung wurde das Harz mit *N*-Methylpyrrolidon gewaschen und noch freie Aminogruppen wurden mit dem Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der restlichen fünf Aminosäuren und des Triethylenglycolspacers erfolgte nach dem Standardprotokoll. Abschließend wurde die terminale Fmoc Schutzgruppe durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Zur Abspaltung des Glycopeptids wurde das Harz in einen *Merrifield*-Reaktor überführt, mit Dichlormethan gewaschen und zwei Stunden in einer Mischung aus 15 mL Trifluoressigsäure, 0.8 mL dest Wasser und 0.8 mL Triisopropylsilan geschüttelt. Anschließend wurde filtriert, ehe das Harz zweimal mit ca. 10 mL Trifluoressigsäure gewaschen wurde. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt, mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das so erhaltenen Rohpeptid wurde anschließend in 30 mL Methanol gelöst und tropfenweise mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 g Na in 25 mL Methanol) versetzt, bis ein pH-Wert von 9.0 erreicht wurde. Es wurde unter ständiger pH-Kontrolle über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit verd. Essigsäure (1 M) neutralisiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt

Ausbeute: 33 mg (13%, 0.014 mmol) farbloses Lyophilisat.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{H}_2\text{O}) = -103.0$$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 214$ nm)

$R_t = 8.3$ min

Zeit (min)	0	1	40	60
Acetonitril + 0.1% TFA (%)	5	5	70	100
Wasser + 0.1% TFA(%)	95	95	30	0

$\text{C}_{103}\text{H}_{166}\text{FN}_{27}\text{O}_{41}$ ($M = 2457.575$ g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , COSY, HMQC), δ [ppm] = 8.50 (d, 1H, $J_{\text{H}_\epsilon, \text{H}_\delta} = 1.31$ Hz, H_ϵ), 7.19 (s, 1H, H_δ), 4.82 (d, 1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.80$ Hz, 1-H), 4.65 – 4.00 (m, 23H, 4'-H {4.69}, D_α {4.62}, H_α {4.57}, R_α {4.52}, $\text{T}_{1^* \alpha}$ {4.52}, $\text{A}_{3\alpha}$ {4.49}, $\text{A}_{2\alpha}$ {4.43}, 1'-H {4.41}, $\text{S}_{2\alpha}$ {4.38}, $\text{A}_{4\alpha}$

{4.36}, S_{1α} {4.33}, P_{1-5α} {4.35, 4.32, 4.28, 4.23, 4.22}, T_{2α} {4.24}, T_{1α} {4.21}, V_α {4.19}, T_{T*β} {4.19}, A_{1α} {4.12}, T_{1β} {4.10}, 2-H {4.10}), 3.98 – 3.45 (m, 38H, T_{2β} {3.98}, 3-H {3.92}, G_{1α} {3.92}, 5-H {3.92}, G_{2α} {3.84}, S_{2β} {3.77}, 6a,b-H {3.69}, S_{1β} {3.69}, 6a,b'-H {3.67}, 5'-H {3.64}, CH₂-Spacer {3.64}, 3'-H {3.60, d, J_{H3',F} = 17.42 Hz}, 4 × CH₂O-Spacer {3.59 – 3.49}, 4-H {3.59}, P_{1-5δ} {3.68, 3.54, 3.48, 3.45}), 3.45 – 3.35 (m, 1H, 2'-H), 3.18 (dd, 1H, J_{Hβa,Hβb} = 15.45 Hz, J_{Hβa,Hα} = 5.50 Hz, H_{βa}), 3.13 – 3.01 (m, 7H, CH₂-Spacer {3.11}, H_{βb} {3.06}, R_δ {3.08}), 2.91 – 2.71 (m, 2H, D_{βa}, D_{βb}), 2.70 – 2.47 (m, 2H, CH₂-Spacer), 2.29 – 2.06 (m, 6H, P_{1-3β} {2.22, 2.18, 2.15}), 2.04 – 1.66 (m, 20H, P_{1-5γ} {1.98 – 1.82}, V_β {1.96}, P_{4-5β} {1.91, 1.79}, AcNH (s, 1.89), R_{βa} {1.73}), 1.68 – 1.48 (m, 3H, R_{βb} {1.63}, R_γ {1.53}), 1.30 – 1.16 (m, 12H, A_{2β}, {1.29}, A_{3β} {1.26}, A_{4β} {1.22}, {1.20, d, J_{Aβ,Aα} = 7.38 Hz, A_{1β}}), 1.14 (d, 3H, J_{T*γ,Tβ} = 6.17 Hz, T_{T*γ}), 1.10 – 1.02 (m, 6H, T_{2γ}, T_{1γ}), 0.84 (t, 6H, J_{Vγ,Vβ} = 6.94 Hz, V_γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, DEPT, HMQC), δ [ppm] = 175.78, 174.89, 174.79, 174.38, 173.92, 173.70, 173.61, 173.45, 173.09, 172.65, 172.61, 172.46, 172.36, 172.06, 171.98, 171.93, 171.54, 171.52, 171.32, 171.20, 171.11, 170.89, 170.86 (C=O, C=O(Acetyl)), 156.66 (C=NH), 133.55 (H_{Cγ}), 128.20 (H_{Cε}), 117.13 (H_{Cδ}), 104.31 (C-1'), 99.05 (C-1), 89.41 (d, J_{C-4',F} = 176.24 Hz, C-4'), 77.20 (C-3), 76.92 (T_{T*β}), 73.50 (d, J_{C-5',F} = 18.01 Hz, C-5'), 71.20 (d, J_{C-3',F} = 17.42 Hz, C-3'), 70.97 (C-5), 70.48 (C-2'), 69.56, 69.49, 69.44, 69.41 (CH₂-Spacer), 68.82 (C-4), 66.99 (T_{1β}), 66.90 (T_{2β}), 66.24 (CH₂-Spacer), 61.14, 61.11 (S_{1β}, S_{2β}), 60.76, 59.99, 59.79, 59.33 (P_{1-5α}), 60.76 (C-6), 60.02 (d, J_{C-6',F} = 5.12 Hz, C-6'), 58.83 (V_α), 58.88 (T_{1α}), 58.75 (T_{2α}), 56.93 (T_{T*α}), 55.84 (S_{1α}), 55.53 (S_{2α}), 52.27 (H_α), 51.08 (R_α), 50.06 (D_α), 49.59 (C-2), 48.66 (A_{1α}), 47.67 (A_{2α}), 47.59 (A_{3α}), 47.38 (A_{4α}), 47.73, 47.67, 47.59, 47.38 (P_{1-5δ}), 42.37 (G_{2α}), 42.31 (G_{1α}), 40.48 (R_δ), 39.30 (CH₂-Spacer), 34.90 (D_β), 34.00 (CH₂-Spacer), 30.23 (V_β), 29.62, 29.31, 29.25, 29.17, 28.72 (P_{1-5β}), 27.44 (R_β), 26.18 (H_β), 24.70, 24.66, 24.60, 24.52, 24.31 (P_{1-5γ}), 23.97 (R_γ), 22.28 (CH₃-AcNH), 18.81 (T_{1γ}), 18.73 (T_{2γ}), 18.47 (V_{γa}), 18.34 (T_{T*γ}), 17.80 (V_{γb}), 16.29, 15.19, 15.07 (A_{1-4β}).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -217.21 (ddd, J_{F4,4'-H} = 50.84 Hz, J_{F4,3'-H} = 31.63 Hz, J_{F4,3'-H} = 29.62 Hz, 4-F).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 1229.15 ([M + 2H]²⁺, ber.: 1229.09); 819.77 ([M + 3H]³⁺, ber.: 819.72).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 1229.0951 ([M + 2H]²⁺, ber.: 1229.0937).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv) *m/z*: 2458.45 ([M+H]⁺, ber.: 2458.57).

Ac-N-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-[2,3,4-tri-O-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]-4,6-di-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-porlyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (135)

Die Glycopeptidsynthese erfolgte automatisiert ausgehend von 455 mg (0.100 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt vorbeladenen Tentagel-S Harzes (Rapp Polymere, Beladung 0.22 mmol/g). Es wurden jeweils zehn Äquivalente der *Fmoc*-Aminosäuren nach dem Standardprotokoll am Peptidsynthesizer gekuppelt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgte halbautomatisch. Zunächst wurde die *Fmoc*-Schutzgruppe des am Harz gebundenen Peptides durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Anschließend wurden je zweimal 80 mg (0.085 mmol) der Glycosylaminosäure **98** zusammen mit je 38.8 mg (0.102 mmol) HATU und 13.9 mg (0.102 mmol) HOAt in 2 mL *N*-Methylpyrrolidon gelöst und mit je 22.5 μ L (0.204 mmol) *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wurde in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt und acht Stunden geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung wurde das Harz mit *N*-Methylpyrrolidon gewaschen und noch freie Aminogruppen wurden mit dem Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der folgenden Aminosäure Valin erfolgte ebenfalls zweimal mit je zehn Äquivalenten unter Standardbedingungen. Aufgrund eines technischen Defektes am Peptidsynthesizer wurde das Glycopeptid im Anschluss an diese Kupplung nach Abspaltung der terminalen Fmoc-Schutzgruppe acetyliert. Dennoch wurde das Glycopeptid zur Abspaltung in einen *Merrifield*-Reaktor überführt, mit Dichlormethan gewaschen und zwei Stunden in einer Mischung aus 15 mL Trifluoressigsäure, 0.8 mL dest Wasser und 0.8 mL Triisopropylsilan geschüttelt. Es wurde filtiert und das Harz wurde zweimal mit ca. 10 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt, mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt

Ausbeute: 67 mg (31%, 0.031 mmol), farbloses Lyophilisat.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{H}_2\text{O}) = -54.9$$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 214$ nm)

$R_t = 19.0$ min

Zeit (min)	0	1	40	60
Acetonitril + 0.1% TFA (%)	5	5	70	100
Wasser + 0.1% TFA(%)	95	95	30	0

$C_{90}H_{138}F_2N_{20}O_{39}$ (M= 2162.166 g/mol)

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY, HMQC), δ [ppm] = 5.84 (ddd, 1H, $J_{H6',Fa} = 54.23$ Hz, $J_{H6',Fb} = 54.09$ Hz, $J_{H6',H5'} = 5.03$ Hz, 6'-H), 5.47 (d, 1H, $J_{H4',H3'} = 3.28$ Hz, 4'-H), 5.37 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 2.28$ Hz, 4-H), 5.07 (dd, 1H, $J_{H3',H2'} = 10.18$ Hz, $J_{H3',H4'} = 3.36$ Hz, 3'-H), 4.95 – 4.72 (m, 3H, 1-H, 1'-H, 2'-H), 4.65 - 4.01 (m, 22H, D_α {4.60}, $T_{T*\alpha}$ {4.53}, R_α {4.51}, $A_{1\alpha}$ {4.48}, $A_{2\alpha}$ {4.42}, $S_{2\alpha}$ {4.40}, $A_{3\alpha}$ {4.36}, $S_{1\alpha}$ {4.34}, $P_{1-4\alpha}$ {4.34, 4.30, 4.27, 4.23}, 5-H {4.27}, $T_{2\alpha}$ {4.25}, $T_{1\alpha}$ {4.19}, $T_{T*\beta}$ {4.19}, 2-H {4.15}, 3-H {4.12}, $T_{1\beta}$ {4.08}, 5'-H {4.07}, V_α {4.07}, $T_{2\beta}$ {4.05}), 4.01 – 3.30 (m, 16H, 6a,b-H {3.95}, G_α {3.85}, $S_{2\beta}$ {3.78}, $S_{1\beta}$ {3.68}, $P_{1-4\delta}$ {3.72, 3.68, 3.57, 3.48}), 3.15 – 3.00 (m, 2H, R_δ {3.07}), 2.90 – 2.72 (m, 2H, $D_{\beta a}$, $D_{\beta b}$), 2.27 – 1.67 (m, 39H, $P_{1-4\beta a}$ {2.26, 2.20, 2.15, 2.09}, NHAc (s, 2.07, 2.06), OAc (s, 1.99, 1.96, 1.94, 1.90, 1.87}, $P_{1-4\gamma}$ {1.97-1.83}, $P_{1-4\beta b}$ {1.93, 1.91, 1.86, 1.83}, V_β {1.91}, $R_{\beta a}$ {1.69}), 1.67 - 1.46 (m, 3H, $R_{\beta b}$ {1.58}, R_γ {1.54}), 1.30-1.20 (m, 9H, $A_{1\beta}$, {1.29}, $A_{2\beta}$ {1.24}, $A_{3\beta}$ {1.20}), 1.14 (d, 3H, $J_{T*\gamma,T\beta} = 6.33$ Hz, $T_{T*\gamma}$), 1.11 – 1.01 (m, 6H, $T_{2\gamma}$, $T_{1\gamma}$), 0.84 (t, 6H, $J_{V\gamma,V\beta} = 7.42$ Hz, V_γ).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , DEPT, HMQC), δ [ppm] = 175.76, 174.88, 174.18, 174.15, 174.13, 173.94, 173.90, 173.56, 173.45, 173.12, 173.10, 173.08, 173.02, 172.90, 172.64, 172.49, 172.43, 172.42, 171.92, 171.51, 171.32, 171.19, 171.10, 170.86 (C=O, C=O(Acetyl)), 156.65 (C=NH), 112.93 (dd, $J_{C-6',Fa} = 243.35$ Hz, $J_{C-6',Fb} = 242.22$ Hz, C-6'), 100.56 (C-1'), 98.89 (C-1), 77.32 ($T_{T*\beta}$), 74.28 (C-3), 71.55 (d, $J_{C-5',F} = 25.72$ Hz, C-5'), 70.52 (C-3'), 70.24 (C-4), 69.05 (C-2'), 67.28 (C-5), 68.99 ($T_{2\beta}$), 66.99 ($T_{1\beta}$), 66.44 (C-4'), 63.14 (C-6), 61.34, 61.14 ($S_{1\beta}$, $S_{2\beta}$), 60.76, 60.52, 60.04, 59.31 ($P_{1-4\alpha}$), 59.66 (V_α), 58.88 ($T_{1\alpha}$), 58.73 ($T_{2\alpha}$), 56.73 ($T_{T*\alpha}$), 55.52 ($S_{1\alpha}$), 54.92 ($S_{2\alpha}$), 51.07 (R_α), 51.07 (D_α), 48.45 (C-2), 47.84 ($A_{1\alpha}$), 47.77 ($A_{2\alpha}$), 47.64 ($A_{3\alpha}$), 47.73, 47.64, 47.59, 47.37 ($P_{1-4\delta}$), 42.37 (G_α), 40.47 (R_δ), 34.87 (D_β), 29.83 (V_β), 29.29, 29.27, 29.16, 28.71 ($P_{1-4\beta}$), 27.44 (R_β), 24.69, 24.65, 24.60, 24.52 ($P_{1-4\gamma}$), 23.95 (R_γ), 22.20, 21.48 (CH_3 (NHAc)), 20.30, 20.21, 20.06, 19.86, 19.83 (CH_3 (OAc)), 18.80 ($T_{1\gamma}$), 18.72 ($T_{2\gamma}$), 18.40 ($V_{\gamma a}$), 18.15 ($T_{T*\gamma}$), 17.85 ($V_{\gamma b}$), 15.29, 15.16, 15.06 ($A_{1-3\beta}$).

^{19}F -NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = -129.78 (dd, $J_{F6a,H6} = 55.21$ Hz, $J_{F6a,H5} = 10.49$ Hz, 6a-F), -130.7 (dd, $J_{F6b,H6} = 54.41$ Hz, $J_{F6b,H5} = 7.38$ Hz, 6b-F).

ESI-MS (positiv), m/z : 2161.38 ($[M + H]^+$, ber.: 2160.94), 1092.52 ($[M + H + Na]^{2+}$, ber.: 1092.47).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1081.4725 ($[M + 2H]^{2+}$, ber.: 1081.4777).

MALDI-TOF-MS (dmb, positiv) m/z : 2163.55 ($[M+H]^+$, ber.: 2163.17).

Ac-N-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-[6-desoxy-6,6-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-prolin (125)

Zu einer Lösung aus 29.3 mg (0.014 mmol) des Glycopeptids **135** in 20 mL Methanol wurde tropfenweise eine frisch hergestellte Natriummethanolat-Lösung (0.5 g Na in 25 mL Methanol) gegeben, bis ein pH-Wert von 9.0 erreicht wurde. Es wurde unter ständiger pH-Kontrolle über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit verd. Essigsäure (1 M) neutralisiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt

Ausbeute: 25.4 mg (96%, 0.013 μ mol) farbloses Lyophilisat.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, H_2O) = -60.4$$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, $\lambda = 214$ nm)

$R_t = 11.0$ min

Zeit (min)	0	1	40	60
Acetonitril + 0.1% TFA (%)	5	5	70	100
Wasser + 0.1% TFA (%)	95	95	30	0

$C_{80}H_{128}F_2N_{20}O_{34}$ (M= 1951.983 g/mol)

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY, HMQC), δ [ppm] = 5.84 (ddd, 1H, $J_{H6',Fa} = 55.21$ Hz, $J_{H6',Fb} = 55.21$ Hz, $J_{H6',H5'} = 6.20$ Hz, 6'-H), 4.84 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.77$ Hz, 1-H), 4.65 – 4.01 (m, 21H, D_α {4.60}, $T_{T*\alpha}$ {4.53}, R_α {4.51}, $A_{1\alpha}$ {4.48}, $S_{2\alpha}$ {4.41}, $A_{2\alpha}$ {4.40}, 1'-H {4.39}, $S_{1\alpha}$ {4.35}, $A_{3\alpha}$ {4.34}, $P_{1-4\alpha}$ {4.34, 4.31, 4.26, 4.23}, $T_{1\alpha}$ {4.23}, $T_{T*\beta}$ {4.20}, $T_{2\alpha}$ {4.19}, 2-H {4.09}, V_α {4.09}, $T_{1\beta}$ {4.09}, 4-H {4.08}, $T_{2\beta}$ {4.05}), 4.01 - 3.33 (m, 22H, 4'-H {3.97}, 5-

H {3.93}, 3-H {3.86}, G_α {3.86}, S_{2β} {3.77}, P_{1-4δ} {3.75, 3.69, 3.56, 3.42}, 5⁻-H {3.69}, S_{1β} {3.67}, 6a,b-H {3.67}, 3⁻-H {3.50}, 2⁻-H {3.41}), 3.15 – 3.01 (m, 2H, R_δ {3.10}), 2.91 – 2.70 (m, 2H, D_{βa}, D_{βb}), 2.27 – 2.08 (m, 4H, P_{1-4βa} {2.26, 2.20, 2.12, 2.05}), 2.02 – 1.66 (m, 20H, P_{1-4γ} {1.99 – 1.68}, V_β {1.92}, P_{1-4βb} {1.93, 1.91, 1.89, 1.85}, NHAc {1.91}, NHAc (s, 1.87}, R_{βa} {1.66}), 1.66 – 1.48 (m, 3H, R_{βb} {1.57}, R_γ {1.54}), 1.31 – 1.21 (m, 9H, A_{1β}, {1.30}, A_{2β} {1.25}, A_{3β} {1.21}), 1.16 (d, 3H, J_{T*γ,Tβ} = 6.32 Hz, T_{T*γ}), 1.12 – 1.02 (m, 6H, T_{2γ}, T_{1γ}), 0.85 (t, 6H, J_{Vγ,Vβ} = 6.18 Hz, V_γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, DEPT, HMQC), δ [ppm] = 176.06, 174.99, 174.21, 174.16, 174.11, 173.97, 173.62, 173.47, 173.09, 173.06, 172.58, 172.53, 171.93, 171.51, 171.35, 171.27, 171.20, 171.11, 170.69 (C=O, C=OAcetyl), 156.65 (C=NH), 113.99 (dd, J_{C-6',Fa} = 242.79 Hz, J_{C-6',Fb} = 242.79 Hz, C-6'), 104.63 (C-1'), 99.14 (C-1), 77.64 (C-3), 77.20 (T_{T*β}), 73.23 (d, J_{C-5',F} = 25.87 Hz, C-5'), 71.84 (C-3'), 70.90 (C-5), 70.16 (C-2'), 68.75 (T_{2β}), 67.10 (C-4'), 67.04 (C-4), 66.99 (T_{1β}), 61.38, 61.31 (C-6), 61.14 (S_{1β}, S_{2β}), 60.76, 60.51, 60.04, 59.66 (P_{1-4α}), 59.54 (V_α), 58.88 (T_{1α}), 58.75 (T_{2α}), 56.86 (T_{T*α}), 55.52 (S_{1α}), 54.96 (S_{2α}), 51.09 (R_α), 50.15 (D_α), 48.18 (C-2), 47.85 (A_{1α}), 47.80 (A_{2α}), 47.74 (A_{3α}), 47.74, 47.64, 47.60, 47.39 (P_{1-4δ}), 42.37 (G_α), 40.48 (R_δ), 35.03 (D_β), 29.87 (V_β), 29.31, 29.27, 29.16, 28.76 (P_{1-4β}), 27.43 (R_β), 24.70, 24.60, 24.59, 24.52 (P_{1-4γ}), 23.95 (R_γ), 22.24 (CH₃(NHAc)), 21.47 (CH₃(NHAc)-Valin), 18.80 (T_{1γ}), 18.72 (T_{2γ}), 18.42 (V_{γa}), 18.32 (T_{T*γ}), 17.83 (V_{γb}), 15.21, 15.17, 15.05 (A_{1-3β}).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -129.86 (dd, J_{F6a,H6} = 54.66 Hz, J_{F6a,H5} = 6.72 Hz, 6a-F), -130.05 (dd, J_{F6b,H6} = 56.48 Hz, J_{F6b,H5} = 10.26 Hz, 6b-F).

ESI-MS (positiv), m/z: 1951.83 ([M + H]⁺, ber.: 1951.89); 987.43 ([M + H + Na]²⁺, ber.: 987.44), 976.46 ([M + 2H]²⁺, ber.: 976.44).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1951.8915 ([M + H]⁺, ber.: 1951.8948).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv) m/z: 1952.53 ([M+H]⁺, ber.: 1952.98).

5.7 Synthesen zu Kapitel 3.6

1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-Alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[3-desoxy-3-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-prolyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (**127**)

Zu einer Lösung aus 20 mg (8.138 μmol) Glycopeptid **123** in 5 mL Ethanol und Wasser (1:1) wurden 1.26 μL (8.545 μmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,3-dion **126** gegeben. Anschließend wurden ca. 15 μL einer ges. NaHCO₃-Lsg. zugegeben bis ein pH-Wert von 8.0 erreicht wurde. Die Reaktionslösung wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt (HPLC-Kontrolle), mit verd. Essigsäure (1 M) neutralisiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt

Ausbeute: 6.8 mg (31%, 2.63 μmol) farbloses Lyophilisat.

$$[\alpha]_D^{23} = (0.68, \text{H}_2\text{O}) = -92.7$$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, λ = 214 nm)

R_t = 22.2 min

Zeit (min)	0	5	40	60
Acetonitril + 0.1% TFA (%)	5	5	25	70
Wasser + 0.1% TFA (%)	95	95	75	30

C₁₀₉H₁₇₀FN₂₇O₄₄ (M = 2581.669 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HMQC), δ [ppm] = 8.50 (d, 1H, J_{H_ε,H_δ} = 1.36 Hz, H_ε), 7.20 (d, 1H, J_{H_δ,H_ε} = 1.09 Hz, H_δ), 4.83 (d, 1H, J_{H₁,H₂} = 3.96 Hz, 1-H), 4.70 – 4.00 (m, 27H, CH₂O-Squarat {4.62}, D_α {4.60}, H_α {4.57}, T_{T*α} {4.54}, R_α {4.51}, A_{3α} {4.48}, 3'-H {4.40}, A_{2α} {4.41}, S_{2α} {4.41}, 1'-H {4.36}, A_{4α} {4.35}, S_{1α} {4.35}, P_{1-5α} {4.35, 4.31, 4.27, 4.20, 4.17}, T_{1α} {4.23}, T_{T*β} {4.22}, V_α {4.19}, T_{2α} {4.19}, A_{1α} {4.13}, 2-H {4.11}, T_{1β} {4.10}, T_{2β} {4.06}, 2'-H {4.06}), 3.97 – 3.41 (m, 41H, G_{1α} {3.93}, 5-H {3.92}, 3-H {3.90}, G_{2α} {3.80}, S_{2β} {3.77}, S_{1β} {3.69}, 6a,b'-H {3.66}, CH₂-Spacer {3.68}, 4'-H {3.66}, CH₂-Spacer {3.64},

6a,b-H {3.61}, 4 × CH₂O-Spacer {3.61 – 3.48}, 4-H {3.60}, P_{1-5δ} {3.75, 3.70, 3.57, 3.53, 3.50}, 3.52 {CH₂-Spacer}, 5⁻-H {3.52}), 3.20 (dd, 1H, $J_{H_{\beta a}, H_{\beta b}} = 15.52$ Hz, $J_{H_{\beta a}, H_{\alpha}} = 5.57$ Hz, H_{βa}), 3.13 – 3.01 (m, 3H, R_δ {3.09}, H_{βb} {3.08}), 2.88 – 2.69 (m, 2H, D_{βa}, D_{βb}), 2.67 – 2.47 (m, 2H, CH₂-Spacer), 2.26 – 2.07 (m, 5H, P_{1-5βa} {2.25, 2.23, 2.19, 2.15, 2.07}), 2.03 – 1.66 (m, 20H, P_{1-5γ} {1.97 – 1.86}, V_β {1.95}, P_{1-5βb} {1.95, 1.91, 1.85, 1.82, 1.79}, AcNH (s, 1.87), R_{βa} {1.68}), 1.67 – 1.48 (m, 3H, R_{βb} {1.59}, R_γ {1.55}), 1.31 (t, 3H, $J_{CH_3, CH_2} = 6.97$ Hz, H₃C-CH₂-Squarat), 1.29 – 1.18 (m, 12H, A_{2β}, {1.29}, A_{3β} {1.25}, A_{4β} {1.22}, {1.21, d, $J_{A_{\beta}, A_{\alpha}} = 7.21$ Hz, A_{1β}}), 1.14 (d, 3H, $J_{T^*_{\gamma}, T_{\beta}} = 6.32$ Hz, T_{T*γ}), 1.11 – 1.03 (m, 6H, T_{2γ}, T_{1γ}), 0.84 (t, 6H, $J_{V_{\gamma}, V_{\beta}} = 6.86$ Hz, V_γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, DEPT, HMQC), δ [ppm] = 175.78, 174.89, 174.79, 174.38, 173.92, 173.70, 173.61, 173.45, 173.09, 172.65, 172.61, 172.46, 172.36, 172.06, 171.98, 171.93, 171.54, 171.52, 171.32, 171.20, 171.11, 170.89, 170.86 (C=O, C=O(Acetyl)), 156.66 (C=NH), 133.53 (H_{Cγ}), 128.22 (H_{Cε}), 117.04 (H_{Cδ}), 103.78 (C-1'), 99.02 (C-1), 90.92 (d, $J_{C-3', F} = 186.62$ Hz, C-3'), 77.29 (C-3), 76.92 (T_{T*β}), 73.68 (C-5'), 70.92 (C-5), 70.46 (CH₂-Squarat), 69.55 (CH₂-Spacer), 69.16 (C-4'), 68.74 (T_{2β}), 68.05 (C-4), 66.97 (C-2'), 66.86 (T_{1β}), 66.11 (CH₂-Spacer), 61.16, 61.13 (S_{1β}, S_{2β}), 61.05 (C-6), 60.76, 60.62, 60.07, 59.73, 59.28 (P_{1-5α}), 60.60 (C-6'), 58.97 (T_{1α}), 58.87 (T_{2α}), 58.77 (V_α), 56.89 (T_{T*α}), 55.46 (S_{1α}), 54.98 (S_{2α}), 52.23 (H_α), 51.08 (R_α), 50.15 (D_α), 49.61 (C-2), 48.35 (A_{1α}), 47.72 (A_{2α}), 47.62 (A_{3α}), 47.38 (A_{4α}), 48.03, 47.83, 47.73, 47.63, 47.38 (P_{1-5δ}), 43.79 (CH₂-Spacer), 42.27 (G_{2α}), 42.27 (G_{1α}), 40.46 (R_δ), 35.28 (D_β), 34.00 (CH₂-Spacer), 30.19 (V_β), 29.75, 29.62, 29.31, 28.97, 28.79 (P_{1-5β}), 27.56 (R_β), 26.21 (H_β), 24.71, 24.61, 24.51, 24.41, 24.31 (P_{1-5γ}), 23.93 (R_γ), 22.42 (CH₃-AcNH), 18.80 (T_{1γ}), 18.74 (T_{2γ}), 18.47 (V_{γa}), 18.30 (T_{T*γ}), 17.80 (V_{γb}), 16.27, 15.17, 15.07 (A_{1-4β}), 15.03 (H₃C-CH₂-Squarat).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -199.17 (ddd, $J_{F, 3'-H} = 47.83$ Hz, $J_{F, 4'-H} = 13.27$ Hz, $J_{F, 2'-H} = 6.14$ Hz, 4'-F).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 1291.05 ([M + 2H]²⁺, ber.: 1291.10); 868.40 ([M + 2H + Na]³⁺, ber.: 868.39).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 1291.0972 ([M + 2H]²⁺, ber.: 1291.1018).

MALDI-TOF-MS (dmb, positiv) *m/z*: 2582.80 ([M+H]⁺, ber.: 2582.67).

Konjugation an Rinderserumalbumin (BSA) (129)

Zu einer Lösung aus 130 mg Na₂HPO₄ in 2 mL Wasser (pH = 9.5) wurden 2.0 mg (0.031 µmol) BSA und 2.0 mg (0.775 µmol) Glycopeptid-Quadratsäure-Konjugat **127** gegeben. Die Mischung wurde fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 000 Da) überführt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 mL entionisiertem Wasser filtriert. Nach Gefriertrocknung wurden 5.1 mg (0.076 µmol) Konjugat erhalten.

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv) m/z: 79470.12.

Durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie wird eine Belegung von durchschnittlich fünf Molekülen **127** pro Molekül BSA ermittelt.

1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-N-L-prolyl-L-Alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-[4-desoxy-4-fluor-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-porlyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (128)

Zu einer Lösung aus 23 mg (9.359 µmol) Glycopeptid **124** in 5 mL Ethanol und Wasser (1:1) wurden 1.45 µL (9.827 µmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,3-dion **126** gegeben. Anschließend wurden ca. 15 µL einer ges. NaHCO₃-Lsg. zugesetzt, bis ein pH-Wert von 8.0 erreicht wurde. Die Reaktionslösung wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt (HPLC Kontrolle), mit verd. Essigsäure (1 M) neutralisiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt

Ausbeute: 6.0 mg (25%, 2.324 µmol) farbloses Lyophilisat.

$$[\alpha]_D^{23} = (0.60, \text{H}_2\text{O}) = -71.0$$

RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, λ = 214 nm)

$R_t = 21.3$ min

Zeit (min)	0	5	40	60
Acetonitril + 0.1% TFA (%)	5	5	25	70
Wasser + 0.1% TFA (%)	95	95	75	30

$C_{109}H_{170}FN_{27}O_{44}$ (M = 2581.669 g/mol)

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY, HMQC), δ [ppm] = 8.51 (d, 1H, $J_{H\epsilon, H\delta} = 1.35$ Hz, H_ϵ), 7.20 (d, 1H, $J_{H\delta, H\epsilon} = 1.08$ Hz, H_δ), 4.83 (d, 1H, $J_{H1, H2} = 4.00$ Hz, 1-H), 4.70 - 4.00 (m, 25H, 4'-H {4.70}, CH_2O -Squarat {4.62}, D_α {4.59}, H_α {4.58}, R_α {4.53}, $T_{T^*\alpha}$ {4.53}, $A_{3\alpha}$ {4.49}, 1'-H {4.42}, $A_{2\alpha}$ {4.40}, $S_{2\alpha}$ {4.39}, $A_{4\alpha}$ {4.36}, $S_{1\alpha}$ {4.36}, $P_{1-5\alpha}$ {4.35, 4.31, 4.26, 4.24, 4.22}, $T_{1\alpha}$ {4.22}, $T_{T^*\beta}$ {4.20}, V_α {4.19}, $T_{2\alpha}$ {4.14}, $A_{1\alpha}$ {4.12}, 2-H {4.12} $T_{1\beta}$ {4.09}), 3.98 - 3.48 (m, 42H, $T_{2\beta}$ {3.98}, $G_{1\alpha}$ {3.96}, 5-H {3.93}, 3-H {3.92}, $G_{2\alpha}$ {3.83}, $S_{2\beta}$ {3.77}, $S_{1\beta}$ {3.71}, 6a,b'-H {3.68}, CH_2 -Spacer {3.68}, CH_2 -Spacer {3.65}, 6a,b-H {3.62}, 4-H {3.61}, 5'-H {3.60}, 3'-H {3.60}, 4 \times CH_2O -Spacer {3.59 - 3.50}, $P_{1-5\delta}$ {3.76, 3.71, 3.57, 3.51}, 3.57 (CH_2 -Spacer)), 3.48 - 3.39 (m, 1H, 2'-H), 3.25 - 3.15 (m, 1H, $H_{\beta a}$), 3.13 - 3.01 (m, 3H, R_δ {3.10}, $H_{\beta b}$ {3.09}), 2.91 - 2.68 (m, 2H, $D_{\beta a}$, $D_{\beta b}$), 2.68 - 2.49 (m, 2H, CH_2 -Spacer), 2.26 - 2.07 (m, 5H, $P_{1-5\beta a}$ {2.27, 2.22, 2.18, 2.15, 2.08}), 2.02 - 1.68 (m, 20H, $P_{1-5\gamma}$ {1.97 - 1.85}, V_β {1.96}, $P_{1-5\beta b}$ {1.93, 1.91, 1.86, 1.79, 1.74}, NHAc (s, 1.88), $R_{\beta a}$ {1.70}), 1.67 - 1.48 (m, 3H, $R_{\beta b}$ {1.59}, R_γ {1.54}), 1.32 (t, 3H, $J_{CH_3, CH_2} = 6.98$ Hz, H_3C - CH_2 -Squarat), 1.29 - 1.18 (m, 12H, $A_{2\beta}$, {1.29}, $A_{3\beta}$ {1.27}, $A_{4\beta}$ {1.22}, {1.21, d, $J_{A\beta, A\alpha} = 7.22$ Hz, $A_{1\beta}$ }), 1.15 (d, 3H, $J_{T^*\gamma, T\beta} = 6.32$ Hz, $T_{T^*\gamma}$), 1.11 - 1.03 (m, 6H, $T_{2\gamma}$, $T_{1\gamma}$), 0.84 (t, 6H, $J_{V\gamma, V\beta} = 6.83$ Hz, V_γ).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , DEPT, HMQC), δ [ppm] = 175.78, 174.89, 174.79, 174.38, 173.92, 173.70, 173.61, 173.45, 173.09, 172.65, 172.61, 172.46, 172.36, 172.06, 171.98, 171.93, 171.54, 171.52, 171.32, 171.20, 171.11, 170.89, 170.86 (C=O, C=O(Acetyl)), 156.66 (C=NH), 133.57 ($H_{C\gamma}$), 128.20 ($H_{C\epsilon}$), 116.74 ($H_{C\delta}$), 104.21 (C-1'), 98.85 (C-1), 89.30 (d, $J_{C-4', F} = 174.58$ Hz, C-4'), 77.25 (C-3), 76.88 ($T_{T^*\beta}$), 73.57 (C-5'), 70.95 (C-5), 70.89 (C-3'), 70.62 (CH_2 -Squarat), 69.87 (C-2'), 69.64, 69.56, 69.44, 69.41 (CH_2 -Spacer), 68.69 (C-4), 68.66 ($T_{2\beta}$), 66.87 ($T_{1\beta}$), 66.10 (CH_2 -Spacer), 61.19 (C-6), 61.15, 61.11 ($S_{1\beta}$, $S_{2\beta}$), 60.79, 60.29, 60.08, 59.28 ($P_{1-5\alpha}$), 59.81 (C-6'), 58.96 ($T_{1\alpha}$), 58.94 (V_α), 58.75 ($T_{2\alpha}$), 56.87 ($T_{T^*\alpha}$), 55.48 ($S_{1\alpha}$), 55.05 ($S_{2\alpha}$), 52.30 (H_α), 51.07 (R_α), 50.07 (D_α), 49.47 (C-2), 48.41 ($A_{1\alpha}$), 47.72 ($A_{2\alpha}$), 47.61 ($A_{3\alpha}$), 47.52 ($A_{4\alpha}$), 47.72, 47.67, 47.56, 47.39 ($P_{1-5\delta}$), 43.83 (CH_2 -Spacer), 42.25 ($G_{2\alpha}$), 42.21 ($G_{1\alpha}$), 40.44 (R_δ), 35.37 (D_β), 33.86 (CH_2 -Spacer), 30.23 (V_β), 29.36, 29.27, 29.18, 29.09, 28.77 ($P_{1-5\beta}$), 27.51 (R_β), 26.31 (H_β), 24.70, 24.68, 24.57, 24.51, 24.33 ($P_{1-5\gamma}$),

23.92 (R_γ), 22.28 ($\text{CH}_3(\text{NHAc})$), 18.77 ($T_{1\gamma}$), 18.56 ($T_{2\gamma}$), 18.40 ($T_{T^*\gamma}$), 18.36 ($V_{\gamma a}$), 17.73 ($V_{\gamma b}$), 16.23, 15.22, 15.11 ($A_{1-4\beta}$), 15.00 ($\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2$ -Squarat).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = -217.2 (ddd, $J_{\text{F}_{4,4'}-\text{H}} = 50.87$ Hz, $J_{\text{F}_{4,3'}-\text{H}} = 30.78$ Hz, $J_{\text{F}_{4,3'}-\text{H}} = 29.86$ Hz, 4-F).

ESI-MS (positiv), m/z : 1291.09 ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1291.10); 868.39 ($[\text{M} + 2\text{H} + \text{Na}]^{3+}$, ber.: 868.39).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1291.1011 ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1291.1018).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv) m/z : 2583.44 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 2582.67).

Konjugation an Rinderserumalbumin (BSA) (**130**)

Zu einer Lösung aus 130 mg Na_2HPO_4 in 2 mL Wasser (pH= 9.5) wurden 2.0 mg (0.031 μmol) BSA und 2.0 mg (0.775 μmol) Glycopeptid-Quadratsäure-Konjugat **128** gegeben. Die Mischung wurde fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt und in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 000 Da) überführt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 mL entionisiertem Wasser filtriert. Nach Gefriertrocknung wurden 5.6 mg (0.083 μmol) Konjugat erhalten.

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv) m/z : 85290.99.

Durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie wird eine Belegung von durchschnittlich 7.3 Molekülen **128** pro Molekül BSA ermittelt.

Konjugation an Tetanus-Toxoid (**131**)

Zu einer Lösung aus 130 mg Na_2HPO_4 in 1 mL Wasser (pH = 9.5) wurden 2.0 mg (0.014 μmol) Tetanus-Toxoid und 2.0 mg (0.775 μmol) Glycopeptid-Quadratsäure-Konjugat **128** gegeben. Die Mischung wurde fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 000 Da) überführt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 mL entionisiertem Wasser filtriert. Nach Gefriertrocknung wurden 6.2 mg (0.041 μmol) Konjugat erhalten.

6. Literaturverzeichnis

- [1] B. Nosse, *Chem. Unserer Zeit* **2006**, *40*, 164-172.
- [2] S. Wittrock, H. Kunz, *Rot-Grün-Weiss* **2006**, 2-5.
- [3] H. zu Hausen, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5910-5920.
- [4] J. N. Blattman, P. D. Greenberg, *Science* **2004**, *305*, 200-205.
- [5] Z. Yu, N. P. Restifo, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 289-294.
- [6] J. A. Berzofsky, M. Terabe, S. Oj, I. M. Belayakov, J. D. Ahlers, J. E. Janik, J. C. Morris, *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1515-1525.
- [7] I. Espinoza-Delgado, *The Oncologist* **2002**, *7*, 20-33.
- [8] S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882-911.
- [9] M. S. Mitchell, *Int. Immunopharmacol.* **2003**, *3*, 1051-1059.
- [10] P. Moingeon, *Vaccine* **2001**, *19*, 1305-1326.
- [11] E. Jäger, D. Jäger, A. Knuth, *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 817-820.
- [12] J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 301-313.
- [13] F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439-449.
- [14] J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, T. Plunkett, R. Graham, I. Correria, D. Miles, M. Smith, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2002**, *7*, 209-221.
- [15] S. Yonezawa, M. Goto, N. Yamada, M. Higashi, M. Nomoto, *Proteomics* **2008**, *8*, 3329-3341.
- [16] J. Hilkins, M. J. L. Lightenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 359-363.
- [17] P. Pandey, S. Kharbanda, D. Kufe, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 4000-4003.
- [18] M. Yamamoto, A. Bharti, Y. Li, D. Kufe, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12492-12494.
- [19] Y. Li, A. Bharti, D. Chen, J. Gong, D. Kufe, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 7216-7224.
- [20] T. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cumming, *J. Cell. Biol.* **2008**, *182*, 531-542.
- [21] J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, *6*, 355-364.
- [22] I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 67-95.
- [23] F.-G. Hanisch, G. Uhlenbruck, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 872-883.
- [24] F.-G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbruck, *Glycoconjugate J.* **1990**, *7*, 524-543.
- [25] 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.
- [26] S. Müller, F.-G. Hanisch, *J. Biomol. Chem.* **2002**, *277*, 26103-26112.
- [27] I. Brockhausen, J. M. Yang, J. M. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607-617.
- [28] T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz, *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 491-517.
- [29] J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691-696.
- [30] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montenaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5386-5394.
- [31] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheidt, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981-4993.

-
- [32] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662-7667.
- [33] M. A. Trap, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, *17*, 197-209.
- [34] S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 197-204.
- [35] T. Pfitzner, S. Barth, A. Engert, *Der Onkologe* **2000**, *1*, 31-35.
- [36] A. J. Pantuck, A. von Ophoven, B. J. Gitlitz, C.-L. Tso, B. Acres, P. Squiban, M. E. Ross, A. S. Beldegrun, R. A. Figlin, *J. Immunother.* **2004**, *27*, 240-253.
- [37] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803-7808.
- [38] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688-7692.
- [39] F. Peri, L. Cipolla, M. Rescigno, B. La Ferla, F. Nicotra, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 325-328.
- [40] 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.
- [41] S. Wagner, C. Mersch, A. Hoffmann-Röder, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7319-7339.
- [42] C. Mersch, S. Wagner, A. Hoffmann-Röder, *Synlett* **2009**, *13*, 2167-2171.
- [43] K. Dax, M. Albert, D. Hammond, C. Illaszewicz, T. Purkarthofer, M. Tscherner, H. Weber, *Monatsh. Chem.* **2002**, *133*, 427-448.
- [44] T. Furuya, T. Fukuhara, S. Hara, *J. Fluorine Chem.* **2005**, *126*, 721-725.
- [45] S. Kobayashi, A. Yoneda, T. Fukuhara, S. Hara, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1287-1289.
- [46] K. Dax, M. Albert, J. Ortner, B. J. Paul, *Carbohydr. Res.* **2000**, *327*, 47-86.
- [47] G. Haufe, *J. prakt. Chem.* **1996**, *338*, 99-113.
- [48] F. M. D. Ismail, *J. Fluorine Chem.* **2002**, *118*, 27-33.
- [49] W. R. Dolbier, Jr., *J. Fluorine Chem.* **2005**, *126*, 157-163.
- [50] B. Beuthien-Baumann, K. Hamacher, F. Oberdorfer, J. Steinbach, *Carbohydrate Res.* **2000**, *327*, 107-118.
- [51] M. D. Burkart, S. P. Vincent, A. Düffels, B. W. Murray, S. V. Ley, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1937-1946.
- [52] J. Xia, J. Xue, R. D. Locke, E. V. Chandrasekaran, T. Srikrishnan, K. L. Matta, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3696-3706.
- [53] J. D. McCarter, M. J. Adam, C. Braun, M. Namchuk, D. Tull, S. G. Withers, *Carbohydr. Res.* **1993**, *249*, 77-90.
- [54] C. L. Schengrund, P. Kováč, *Carbohydrate Res.* **1999**, *319*, 24-28.
- [55] D. D. Marathe, A. Buffone Jr., E. V. Chandrasekaran, J. Xue, R. D. Locke, M. Nasirikenari, J. T. Y. Lau, K. L. Matta, S. Neelamegham, *Blood* **2010**, *115*, 1303-1312.
- [56] M.-C. Chapeau, P. A. Frey, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6994-6998.
- [57] P. J. Glaudemans, P. Kováč, A. S. Rao, *Carbohydrate Res.* **1989**, *190*, 267-277.
- [58] S. A. Allman, H. H. Jensen, B. Vijaykrishnan, J. A. Garnett, E. Leon, Y. Liu, D. C. Anthony, N. R. Sibson, T. Feizi, S. Matthews, B. G. Davis, *Chem. Bio. Chem.* **2009**, *10*, 2522-2529.
- [59] B. Holm, S. M. Baquer, R. Holmdahl, J. Kihlberg, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3981-3987.
- [60] V. P. Butler Jr., S. M. Beiser, *Adv. Immun.* **1973**, *17*, 255-310.
- [61] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473-1482.

-
- [62] J. Habermann, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz **1998**.
- [63] W. Roth, W. Pigman, *Methods Carbohydr. Chem.* **1963**, 2, 211
- [64] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry (2nd Ed.)*, Wiley-VCH, Weinheim **2003**.
- [65] R. J. Ferrier, N. Prasad, *J. Chem. Soc.* **1969**, 570-575.
- [66] S. Valverde, S. Garcia.Ochoa, M. Martin-Lomas, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 383-384.
- [67] D. Evans, G. C. Andrews, *Acc. Chem. Res.* **1974**, 7, 147-155.
- [68] M. D. Wittmann, R. L. Halcomb, S. J. Dannishefsky, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 1979-1981.
- [69] S. G. Withers, D. J. MacLennan, I. P. Street, *Carbohydr. Res.* **1986**, 154, 127-144.
- [70] R. Kuhn, H. H. Baer, *Chem. Ber.* **1995**, 88, 1537-1543.
- [71] H. Kessler, A. Kling, M. Kottenhahn, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 452-454.
- [72] S. Koto, K. Asami, M. Sato, K. Nagura, M. Takizawa, S. Yamamoto, N. Okamoto, M. Sato, H. Tajima, T. Yoshida, N. Nonaka, T. Sato, S. Zen, K. Yago, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, 72, 765-777.
- [73] W. Lu, L. Navidpour, S. D. Taylor, *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 1213-1217.
- [74] A. M. Horneman, I. Lundt, *Synthesis* **1999**, 2, 317-325.
- [75] B. Helferich, K.-F. Wedemeyer, *Liebigs Ann. Chem.* **1949**, 563, 139-145.
- [76] G. Zemplén, A. Kunz, *Chem. Ber.* **1923**, 56, 1705-1710.
- [77] J. R. Rich, W. W. Wakarchuk, D. R. Bundle, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 845-858.
- [78] W. J. Middleton, *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 574-578.
- [79] M. Sharma, R. J. Bernacki, M. J. Hillman, W. Korytnyk, *Carbohydr. Res.* **1993**, 240, 89-105.
- [80] K. Dax, M. Albert, J. Ortner, B. J. Paul, *Carbohydr. Res.* **2000**, 327, 47-86.
- [81] J.-M. Vatéle, S. Hanessian, *Tetrahedron* **1996**, 52, 10557-10568.
- [82] J. S. Brimacombe, A. B. Foster, J. H. Westwood, L. D. Hall, *Can. J. Chem.* **1970**, 48, 3946-3952.
- [83] M. Th. Schmitt, *Meth. Carbohydr. Chem.* Vol.II, 83.
- [84] G. Legler, S. Pohl, *Carbohydr. Res.* **1986**, 155, 119-129.
- [85] W. M. zu Reckendorf, *Angew. Chem.* **1967**, 3, 151-152.
- [86] P. J. Beynon, P. M. Collins, P. T. Doganges, W. G. Overend, *J. Chem. Soc.* **1966**, 1131-1136.
- [87] W. M. zu Reckendorf, *Chem. Ber.* **1969**, 102, 1071-1075.
- [88] P. Kovác, P. J. Glaudemans, *Carbohydr. Res.* **1983**, 123, 326-331.
- [89] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, 92, 763-764.
- [90] J. Xia, J. J. Alderfer, C. F. Piskorz, R. D. Locke, K. L. Matta, *Synlett* **2003**, 1291-1294.
- [91] J. Xia, J. Xue, R. D. Locke, E. V. Chandrasekaran, T. Srikrishnan, K. L. Matta, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 3696-3706.
- [92] M. L. Wolfrom, A. Thompson, *Meth. Carbohydr. Chem.* **1963**, Vol.II, 211-215.
- [93] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, 13, 129-132.
- [94] M. Leuck, H. Kunz, *J. Prakt. Chem.* **1997**, 339, 322-334.
- [95] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 629-631.
- [96] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliff, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244-1251.
- [97] R. M. Valerio, P. F. Alewood, R. B. Johns, *Synthesis* **1988**, 786-789.
- [98] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 976-980.
- [99] M. Schultz, H. Kunz, *Tetraherdon: Assym.* **1993**, 4, 1205-1220.
- [100] R. Pfau, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz **2001**.

-
- [101] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliff, *Deutsche Patentanmeldung* **1987**, AZ: P 2816340.8.
- [102] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89-107.
- [103] W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957-981.
- [104] C. Brocke, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2003**.
- [105] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1996**, 985-993.
- [106] S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**, 880-885.
- [107] C. Mersch, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2011**.
- [108] Y. Niu, N. Wang, X. Xiao, X.-S. Ye, *Synlett* **2007**, 2116-2120.
- [109] S. J. Danishefsky, V. Behar, J. T. Randolph, K. O. Lloyd, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5701-5711.
- [110] T. K. Park, I. J. Kim, S. Hu, M. T. Bilodeau, J. T. Dandolph, O. Kwon, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11488-11500.
- [111] C. Cruzado, M. Bernabé, M. Martin-Lomas, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 465-469.
- [112] S. David, S. Hanessian, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 643-663.
- [113] J. Alais, Al Veyrières, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1981**, 377-381.
- [114] B. Jousseume, P. Villeneuve, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 513-514.
- [115] E. Vedejs, S. M. Duncan, A. R. Haight, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3046-3050.
- [116] R. J. P. Corriu, J. Colin Young, *Hypervalent Silicon Compounds in The Chemistry of Organic Silicon Compounds, Part II*, S. Patai, Z. Rappoport Eds. Wiley, **1989**, 1241-1288.
- [117] R. P. Singh, J. M. Shreeve, *Synthesis* **2002**, *17*, 2561-2578.
- [118] A. Burton, P. Wyatt, G.-J. Boons, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1997**, 2375-2382.
- [119] C. H. Heathcock, R. Ratcliff, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 1746-1757.
- [120] T. D. Inch, G. J. Lewis, *Carbohydr. Res.* **1972**, *22*, 91-101.
- [121] A. Lubineau, A. Thieffry, Al Veyrières, *Carbohydr. Res.* **1976**, *46*, 143-148.
- [122] M. P. DeNinno, J. B. Etienne, K. C. Duplantier, *Tetrahedr. Lett.* **1995**, *36*, 669-672.
- [123] M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6149-6159.
- [124] A. B. Foster, J. H. Westwood, *Carbohydr. Res.* **1972**, *25*, 228-231.
- [125] I. Pelyvás, T. Lindhorst, J. Thiem, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 761-769.
- [126] S. Garneau, L. Qiao, L. Chen, S. Walker, J. C. Vederas, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 6437-6494.
- [127] H. A. El-Shenawy, C. Schuerch, *Carbohydr. Res.* **1984**, *131*, 227-238.
- [128] P. P. Kanakamma, N. S. Mani, U. Maitra, V. Nair, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1995**, 2339-2344.
- [129] F. Guibé, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 13509-13556.
- [130] E. J. Corey, J. W. Suggs, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 3224.
- [131] T. Ogawa, H. Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 475-482.
- [132] J. Liaigre, D. Dubreuil, J.-P. Pradère, J.-F. Bouhours, *Carbohydr. Res.* **2000**, *325*, 265-277.
- [133] R. Pietropaolo, F. Faraone, S. Sergi, *J. Organomet. Chem.* **1972**, *42*, 177-182.
- [134] M. Mori, Y. Ban, *Chem. Pharm. Bull.* **1976**, *24*, 1992-1999.
- [135] A. Heumann, K.-J. Jens, M. Réglie, *Progress in Inorganic Chemistry* **1994**, *42*, 483-576.
- [136] T. Reipen, H. Kunz, *Synthesis* **2003**, 2487-2502.
- [137] T. Reipen, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2002**.
- [138] N. Bézay, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.

-
- [139] A. Kuhn, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
[140] S. Dziadek, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
[141] O. T. Schmitt, *Meth. Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 319-325.
[142] K. Omura, D. Swern, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1651-1660.
[143] B. Streicher, B. Wünsch, *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2375-2385.
[144] M. M. Midland, G. Asirwatham, J. C. Cheng, J. A. Miller, L. A. Morell, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4438-4442.
[145] R. A. Sharma, I. Kawai, Y. L. Fu, M. Bobek, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *39*, 3433-3436.
[146] J. A. May Jr., A. C. Sartorelli, *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 971-976.
[147] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 763-764.
[148] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525-542.
[149] L. Rochepeau-Jobron, J.-C. Jaquinet, *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 181-191.
[150] J. Neumann, J. Thiem, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 900-908.
[151] E. J. Corey, G. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *5*, 399-402.
[152] F. Andersson, B. Samuelsson, *Carbohydr. Res.* **1984**, *129*, C1-C3.
[153] H. H. Lee, P. G. Hodgson, R. J. Bernacki, W. Korytnyk, M. Sharma, *Carbohydr. Res.* **1988**, *176*, 59-72.
[154] S. Wagner, *Arbeiten zur Dissertation*
[155] U. Gambert, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* **1997**, *299*, 85-89.
[156] W. Saenger, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 343-361.
[157] G. Wenz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 851-870.
[158] F. Cramer, *Chem. Ber.* **1951**, *84*, 851-854.
[159] F. Cramer, F. M. Henglein, *Chem. Ber.* **1957**, *90*, 2561-2571.
[160] N. Bezay, G. Dudziak, A. Liese, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2350-2353.
[161] Y. Matsui, T. Nishioka, T. Fujita, *Top. Curr. Chem.* **1985**, *128*, 61-89.
[162] N. Kobayashi, S. Minato, T. Osa, *Makromol. Chem.* **1983**, *184*, 2123-2132.
[163] Y. Yamashoji, M. Tanaka, T. Shono, *Chem. Lett.* **1990**, *19*, 945-948.
[164] Y. Matahira, A. Tashiro, T. Sato, H. Kawagishi, T. Usui, *Glycoconj. Journ.* **1995**, *12*, 664-671.
[165] B. Perkic, Z. Lepojevic, *Biotechnol. Lett.* **1991**, *13*, 399-404.
[166] B. Casu, M. Reggiani, G. R. Sanderson, *Carbohydr. Res.* **1979**, *76*, 59-66.
[167] H. Kunz, *Pure & Appl. Chem.* **1993**, *65*, 1223-1232.
[168] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798-7803.
[169] P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1336-1348.
[170] F.-G. Hanisch, *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 705-708.
[171] F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686-4690.
[172] G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180-6183.
[173] C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *11*, 246-249.
[174] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. D. Chang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35-42.
[175] A. J. Mort, D. T. Lampion, *Anal. Biochem.* **1977**, *82*, 289-309.
[176] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
[177] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
[178] L. A. Carpino, *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 401-407.
[179] P. Schufheiss-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 64.
[180] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157.
[181] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
[182] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005-4008.

-
- [183] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 3787-3790.
- [184] D. Fréchet, K. E. Haque, *tetrahedron Lett.* 1975, 16, 3055-30
- [185] R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Int J. Pept. Protein Res.* **1982**, 20, 451-454.
- [186] W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1295.
- [187] R. Ramage, C. A. Barron, S. Bielecki, D. W. Thomas, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 4105-4108.
- [188] H.-G. Chao, M. S. Bernatowicz, P. D. Reiss, C. E. Klimas, G. R. Matsudea, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1746-1752.
- [189] D. G. Mullen, G. Barany, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 491-494.
- [190] M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 315-319.
- [191] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, 60, 2447-2467.
- [192] F. Albericio, R. Chinchilla, D. J. Dodsworth, C. Najera, *Org. Prep. Proced. Int.* **2001**, 33, 203-303.
- [193] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927-1930.
- [194] V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 1269-1272.
- [195] V. Dourtoglou, B. Gross, *Synthesis* **1984**, 572-574.
- [196] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201-203.
- [197] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2279-2282.
- [198] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067-1077.
- [199] J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2525-2528.
- [200] W. Koenig, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-198.
- [201] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398.
- [202] G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 2839-2876.
- [203] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2460-2465.
- [204] O. Seitz, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1995**.
- [205] G. Fuchs, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1995**.
- [206] T. Becker, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- [207] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 901-904.
- [208] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 813-826.
- [209] V. P. Butler Jr., S. M. Beiser, *Adv. Immun.* **1973**, 17, 255-310.
- [210] B. F. Erlanger, *Methods Enzymol.* **1980**, 70, 85-104
- [211] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, *Immunobiology*, 7. Auflage **2008**, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- [212] T. Peters Jr., *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 161-245.
- [213] K. E. van Holde, K. I. Miller, *Adv. Protein Chem.* **1995**, 47, 1-81.
- [214] A. Barra, C. Cordonnier, M.-P. Preziosi, L. Intrator, L. Hessel, B. Fritzell, J.-L. Preud'homme, *J. Infect. Dis.* **1992**, 166, 1021-1028.
- [215] D. W. Scheifele, W. Meekison, R. Guasparini, A. Roberts, L. Barreto, J. Thippawong, S. Wiltsey, *Vaccine* **1995**, 13, 104-108.
- [216] H. J. Hennings, R. K. Snood, *Neoglycoconjugates, Preparation and Application*, Academic, San Diego, **1994**.
- [217] R. E. Huebner, M. Nicol, R. Mothupi, H. Käyhty, N. Mbelle, E. Khomo, K. P. Klugman, *Vaccine* **2004**, 23, 802-806.
- [218] T. Nolan, S. Lambert, D. Robertson, H. Marshall, P. Richmond, C. Streeton, J. Poolman, D. Boutriau, *Vaccine* **2007**, 25, 8487-8499.
- [219] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 354-355.

-
- [220] H. Kunz, S. Birnbach, P. Wernig, *Carbohydr. Res.* **1990**, *202*, 207-223.
- [221] K. v. d. Bruch, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 87-89.
- [222] T. H. Ji, *Methods Enzymol.* **1983**, *91*, 580-609.
- [223] A. F. S. A. Habeeb, R. Hiramoto, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *126*, 16-26.
- [224] R. B. Mikkelsen, D. F. H. Wallach, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 7413-7416.
- [225] J. Carlsson, H. Drevin, R. Axen, *Biochem. J.* **1978**, *173*, 723-737.
- [226] T. Buskas, Y. Li, G.-J. Boons, *Chemistry Eur. J.* **2004**, *10*, 3517-3524.
- [227] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, J. R. Heath, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708-2711.
- [228] H. D. Agnew, R. D. Rohde, S. W. Millward, A. Nag, W.-S. Yeo, J. E. Hein, S. M. Pitram, A. A. Tariq, V. M. Burns, R. J. Krom, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, J. R. Heath, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5044-5048.
- [229] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1215-1221.
- [230] L. F. Tietze, C. Schröter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H.-J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 148-153.
- [231] S. Spjut, M. Pudelko, M. Hartmann, M. Elofsson, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 349-357.
- [232] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798-7803.
- [233] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3 ed., Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- [234] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923.
- [235] G. Szepesi, *Reverse-Phase HPLC*, VCH, Weinheim, **1992**.
- [236] R. Kumar, P. Tiwari, P. R. Maulik, A. K. Misra, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2335-2339.
- [237] G. J. L. Bernardes, E. J. Grayson, S. Thompson, J. M. Chalker, J. C. Errey, F. El Oualid, T. D. W. Claridge, B. G. Davis, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2276-2279.
- [238] Z. Thang, G. Magnussen, *Carbohydr. Res.* **1996**, *295*, 41-55.
- [239] O. Varela, G. M. de Fina, R. M. de Lederkremer, *Carbohydr. Res.* **1987**, *167*, 187-196.
- [240] B. Liebe, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1997**.
- [241] M. Liu, V. G. Young, Jr., S. Lohani, D. Live, G. Barany, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1273-1285.
- [242] K. A. Winans, D. A. King, V. Rao, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **1999**, *38*, 11700-11710.
- [243] H. Paulsen, A. Richter, V. Sinnwell, W. Stenzel, *Carbohydr. Res.* **1987**, *64*, 339-362.
- [244] Y. Saito, T. Watanabe, H. Hashimoto, J. Yoshimura, *Carbohydr. Res.* **1987**, *169*, 171-188.
- [245] L. Kisfaludy, I. Schön, *Synthesis* **1983**, *4*, 325-327.
- [246] D. M. Rothman, M. E. Vazquez, E. M. Vogel, B. Imperiali, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6795-6798.
- [247] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheidt, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981-4993.
- [248] S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4150-4162.
- [249] J.-M. Petit, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1978**, *64*, 9-16.
- [250] D. Horton, J. Nakadate, J. M. Tronchet, *Carbohydr. Res.* **1986**, *7*, 56-65.

Anhang

2,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-3-desoxy-3-fluor- α -D-galactosylbromid		
(1)	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{19}\text{F}$	222
4,6-Di- <i>O</i> -acetyl-3-desoxy-3-fluorgalactal		
(18)	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{19}\text{F}$	223
<i>N</i> -(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(2-acetamido-2-desoxy-4,6- <i>O</i> -benzyliden-3- <i>O</i> -[2,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-3-desoxy-3-fluorgalacto-pyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin- <i>tert</i> -butylester		
(59)	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{19}\text{F}, ^1\text{H}-^1\text{H-COSY}, ^1\text{H}-^{13}\text{C-HSQC}$	225
<i>N</i> -(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(2-acetamido-2-desoxy-3- <i>O</i> -[2,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-3-desoxy-3-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin- <i>tert</i> -butylester		
(60)	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{19}\text{F}, ^1\text{H}-^1\text{H-COSY}, ^1\text{H}-^{13}\text{C-HSQC}$	227
<i>N</i> -(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(4,6-di- <i>O</i> -acetyl-2-acetamido-2-desoxy-3- <i>O</i> -[2,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-3-desoxy-3-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin- <i>tert</i> -butylester		
(4)	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{19}\text{F}, ^1\text{H}-^1\text{H-COSY}, ^1\text{H}-^{13}\text{C-HSQC}$	230
2,3,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-4-desoxy-4-fluor- α -D-galactoyranosylbromid		
(2)	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{19}\text{F}$	232
3,6-Di- <i>O</i> -acetyl-4-desoxy-4-fluorgalactal		
(83)	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{19}\text{F}$	234
<i>N</i> -(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(2-acetamido-2-desoxy-4,6- <i>O</i> -benzyliden-3- <i>O</i> -[2,3,6-tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-4-desoxy-4-fluorgalacto-pyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin- <i>tert</i> -butylester		
(84)	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{19}\text{F}, ^1\text{H}-^1\text{H-COSY}, ^1\text{H}-^{13}\text{C-HSQC}$	235

-
- N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-4-desoxy-4-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester
(85) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 238
- N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(4,6-di-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-4-desoxy-4-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester
(5) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 240
- 6-Desoxy-6,6-difluor-1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl- α -D-galactosylbromid
(3) ^1H , ^{13}C , ^{19}F 243
- 3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluorgalactal
(7) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY 244
- N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-6-desoxy-6,6-difluorgalacto-pyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester
(95) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 246
- N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-6-desoxy-6,6-difluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester
(111) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 249
- N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(4,6-di-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-6-desoxy-6,6-difluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester
(6) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 251
- 2-Deoxy-2-azido-6-desoxy-6,6-difluor-3,4-di-*O*-acetyl- α -D-galactalosylbromid
(100) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 254

-
- N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4-*O*-isopropylidene- α -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranosyl)-L-threonine-*tert*-butylester
(103) ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 256
- N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-desoxy-6,6-difluoro-3,4-*O*-isopropylidene- α -D-galactopyranosyl)-L-threonine-*tert*-butylester
(104) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 258
- N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester
(105) ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 261
- N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-3-desoxy-3-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester
(107) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 263
- N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-4-desoxy-4-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester
(108) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 265
- N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-6-desoxy-6,6-difluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester
(110) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 268
- Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-Alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[3-desoxy-3-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-porlyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin
(123) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 270

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-Alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-[4-desoxy-4-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-porlyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin

(124) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 273

Ac-N-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-[2,3,4-tri-O-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]-4,6-di-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-porlyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin

(135) ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 275

Ac-N-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-[6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-porlyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin

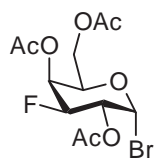
(125) ^1H , ^{13}C DEPT, ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 278

1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-Alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-[3-desoxy-3-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-porlyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion

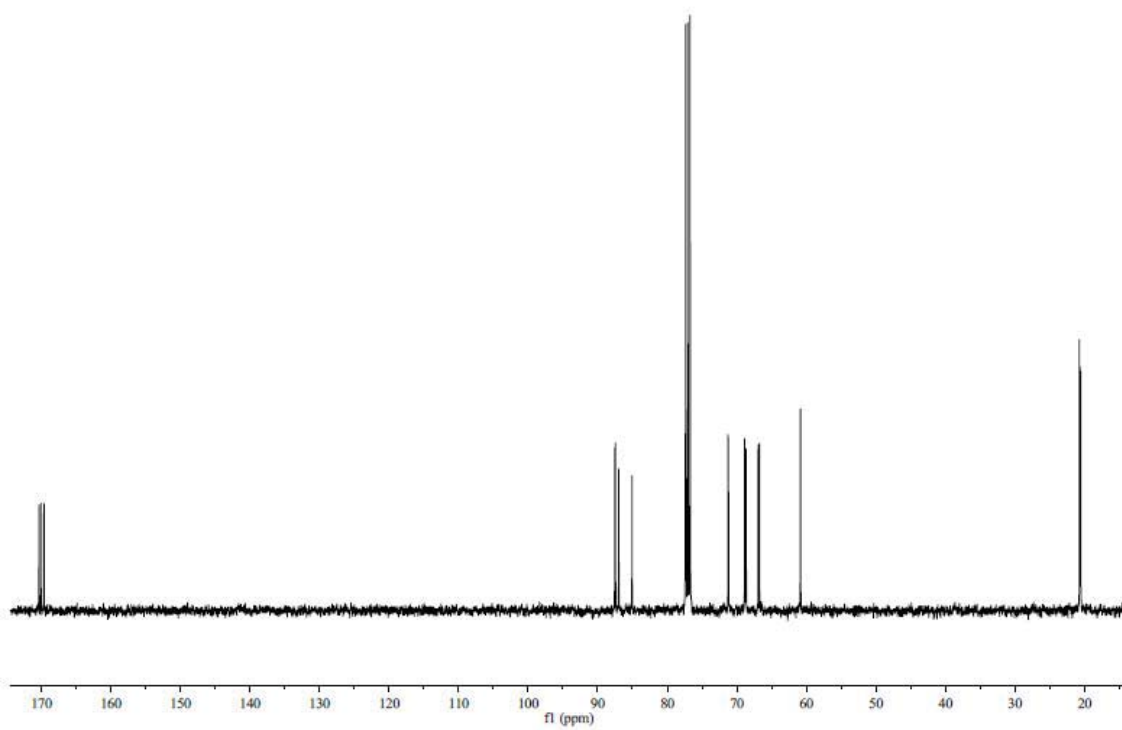
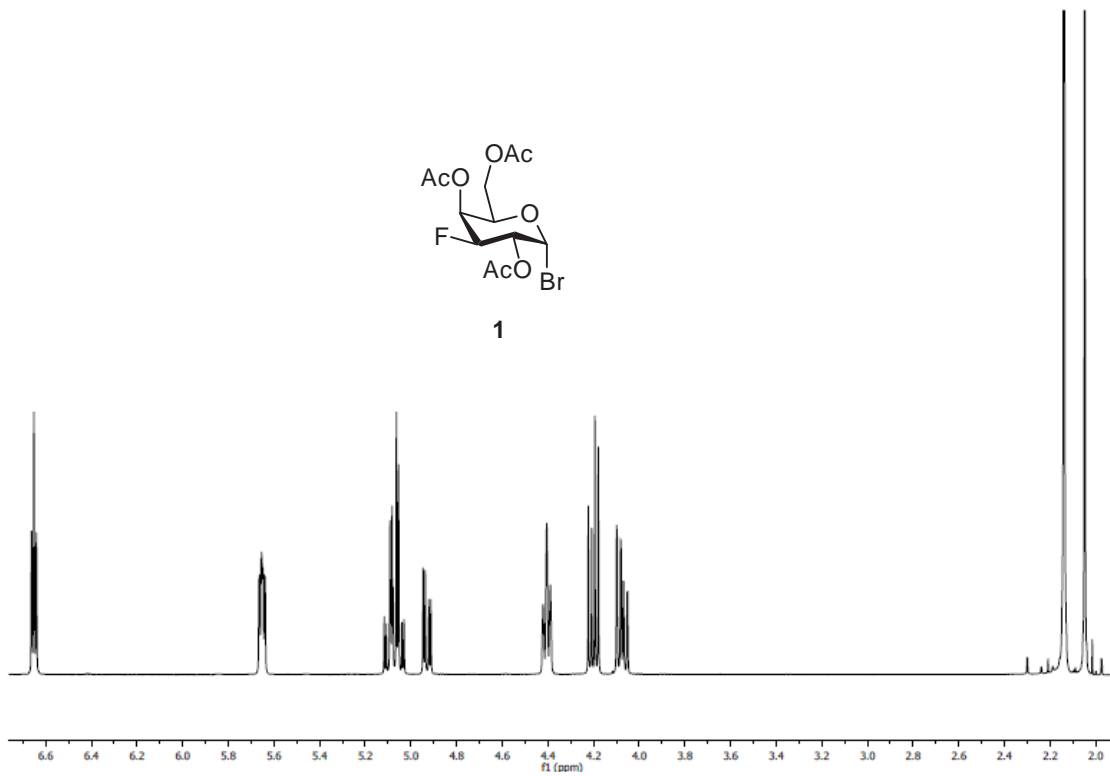
(127) ^1H , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 280

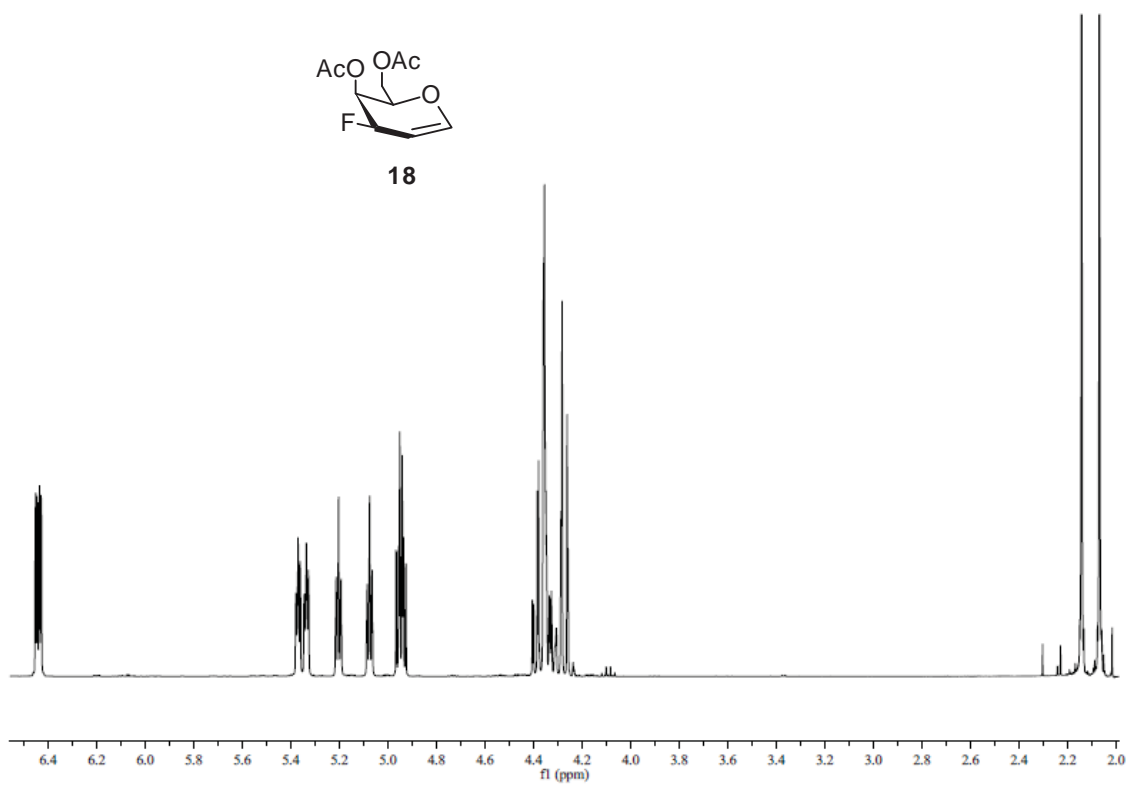
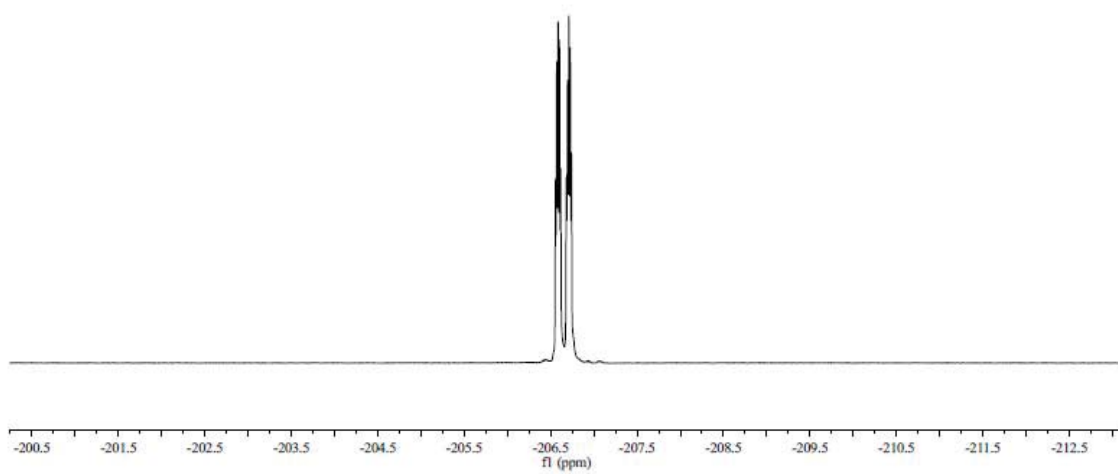
1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-prolyl-L-Alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-[4-desoxy-4-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-porlyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion

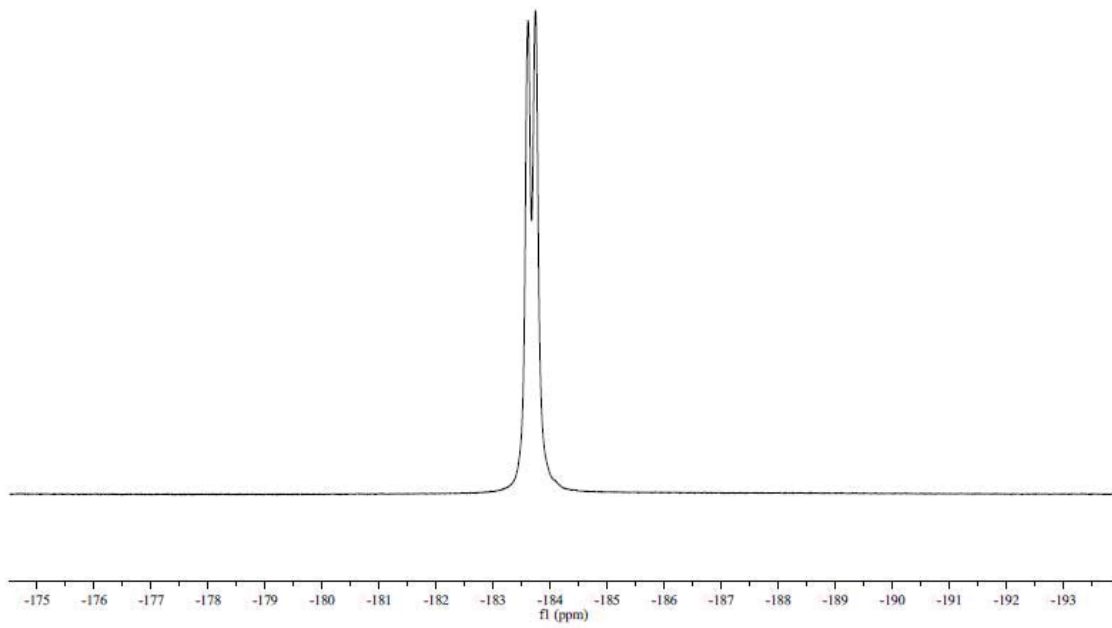
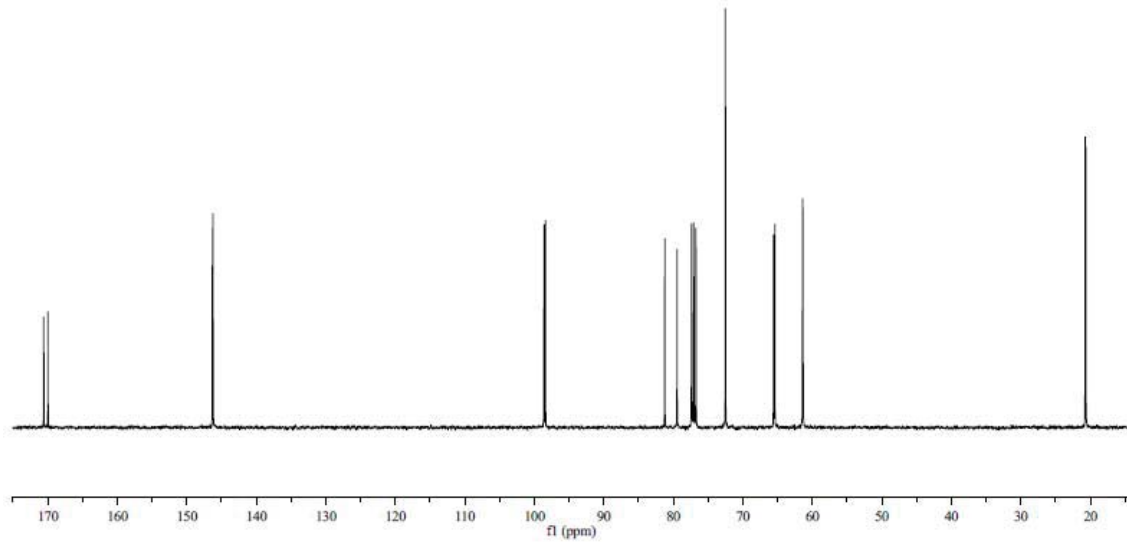
(128) ^1H , ^{19}F , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 282

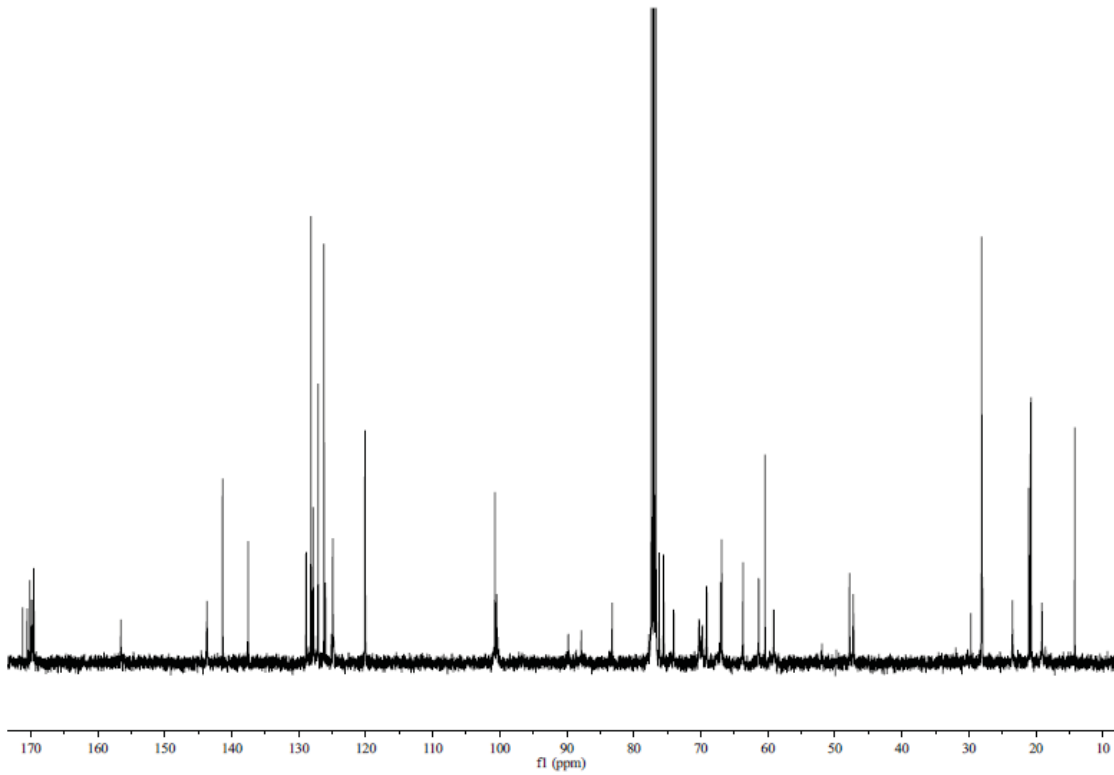
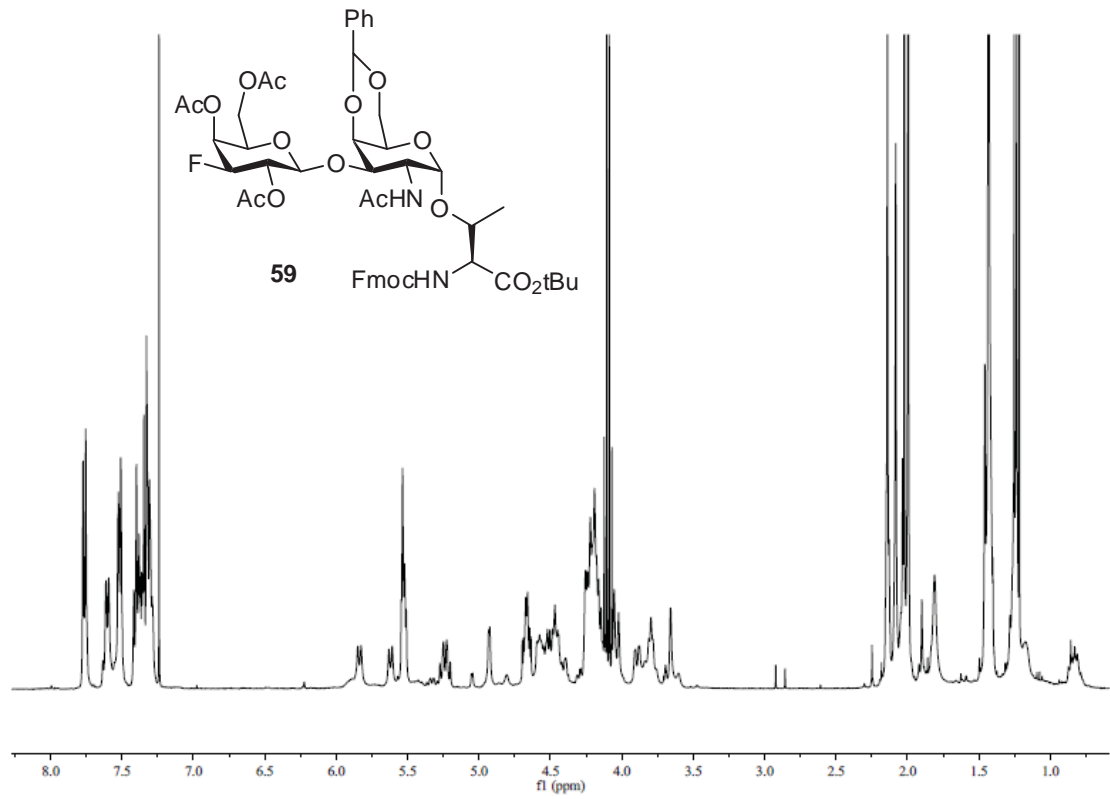


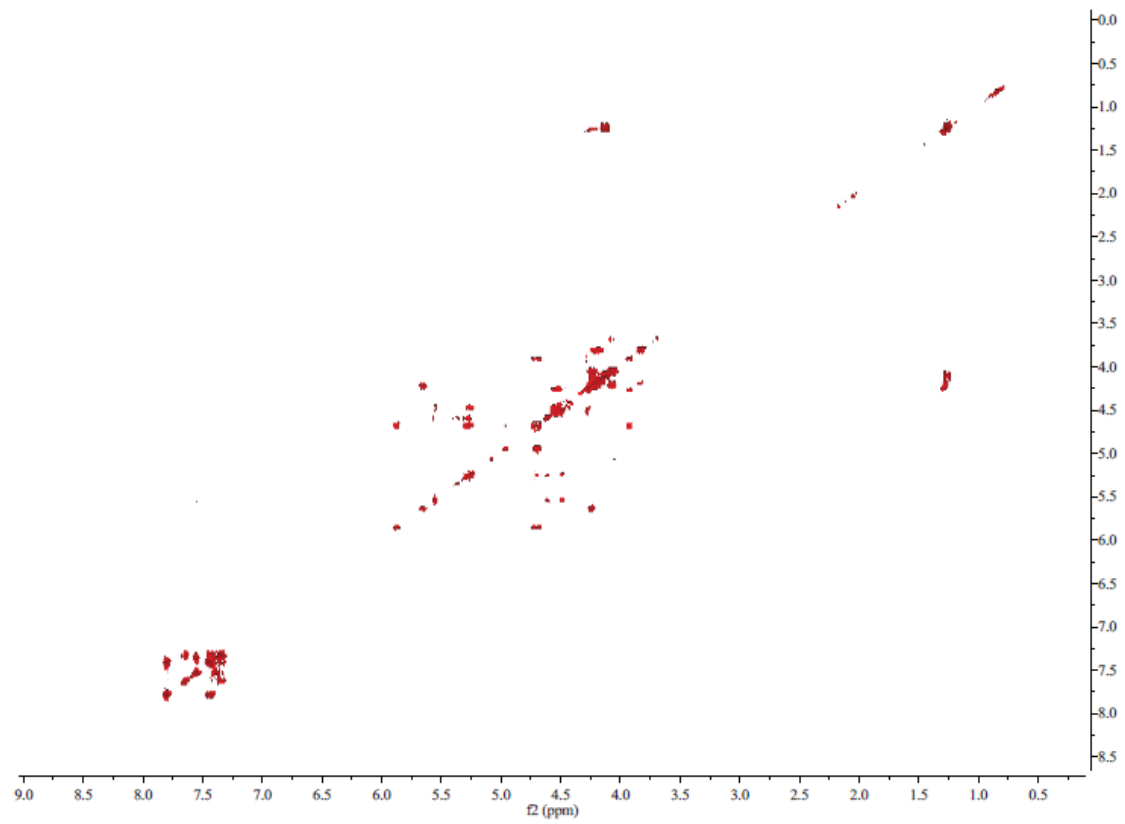
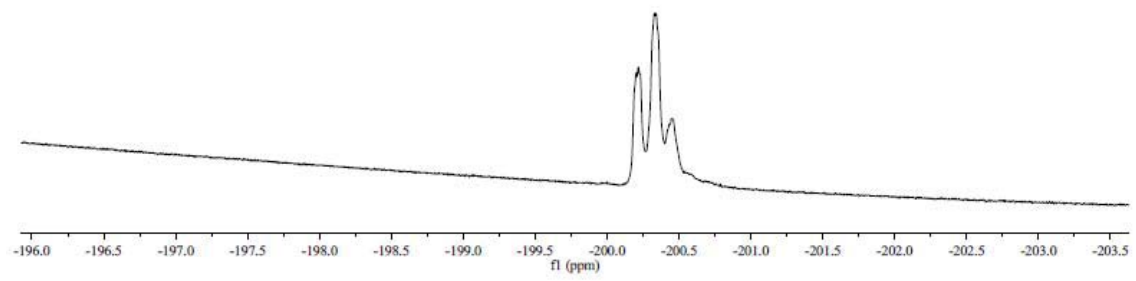
1

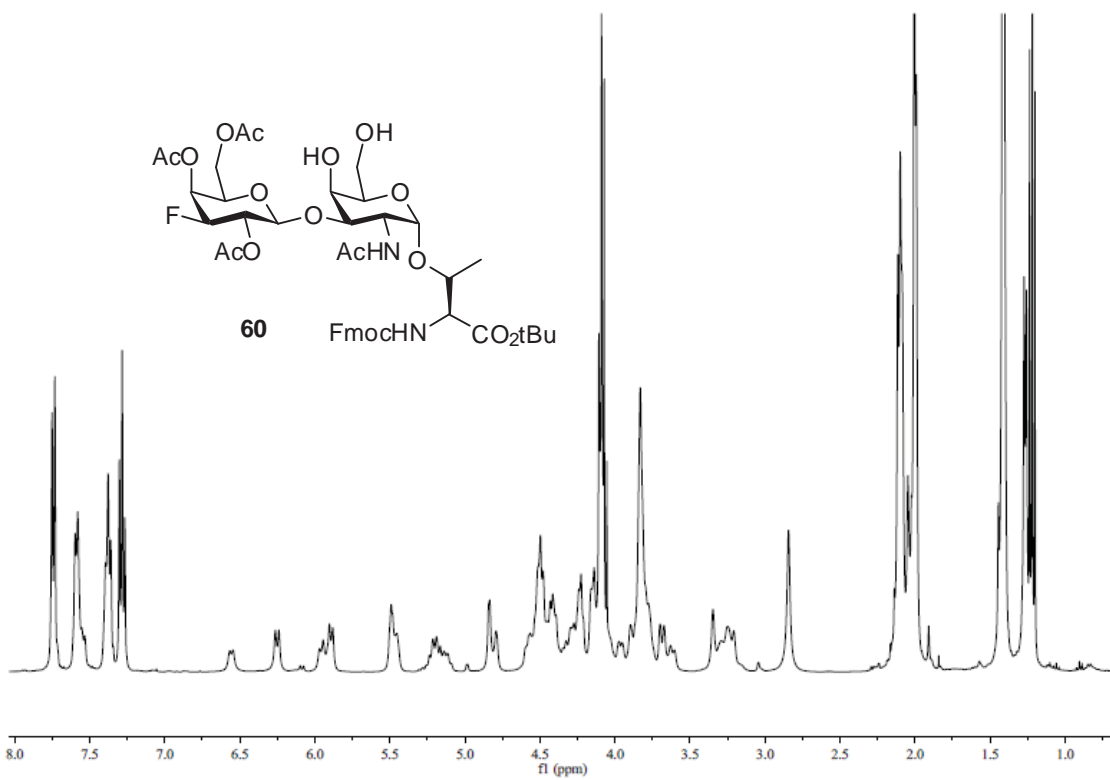
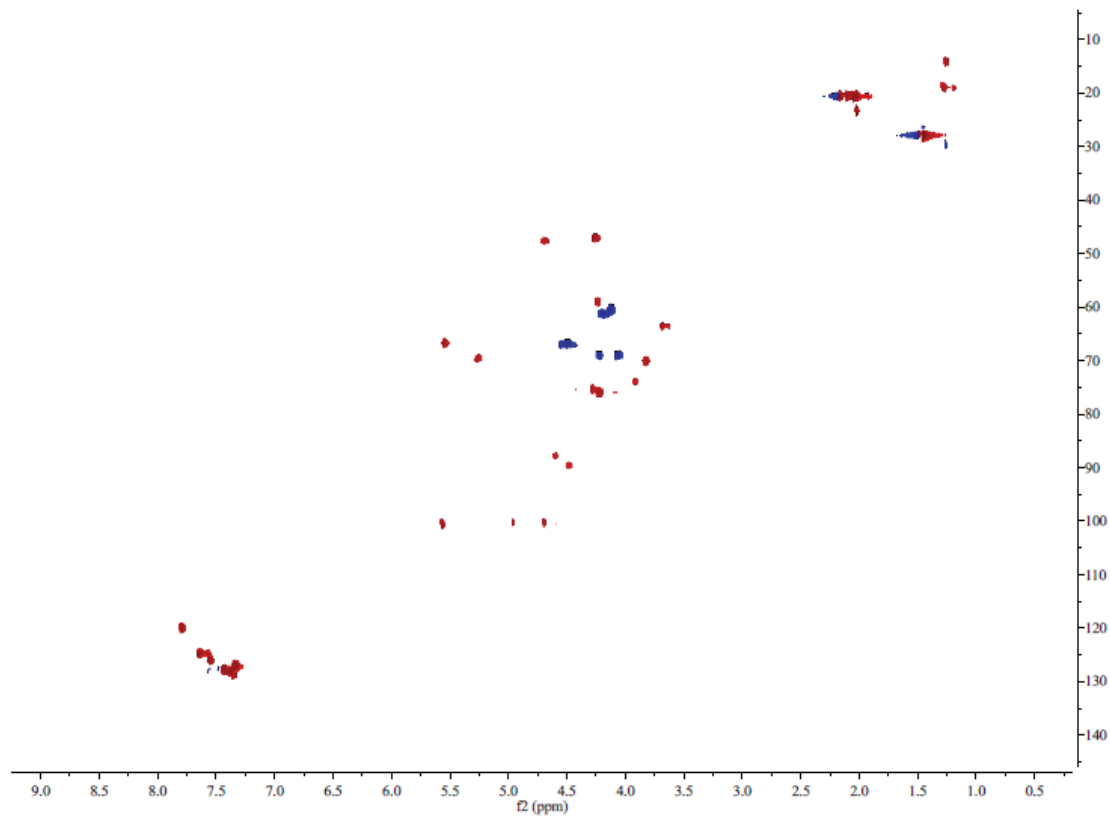


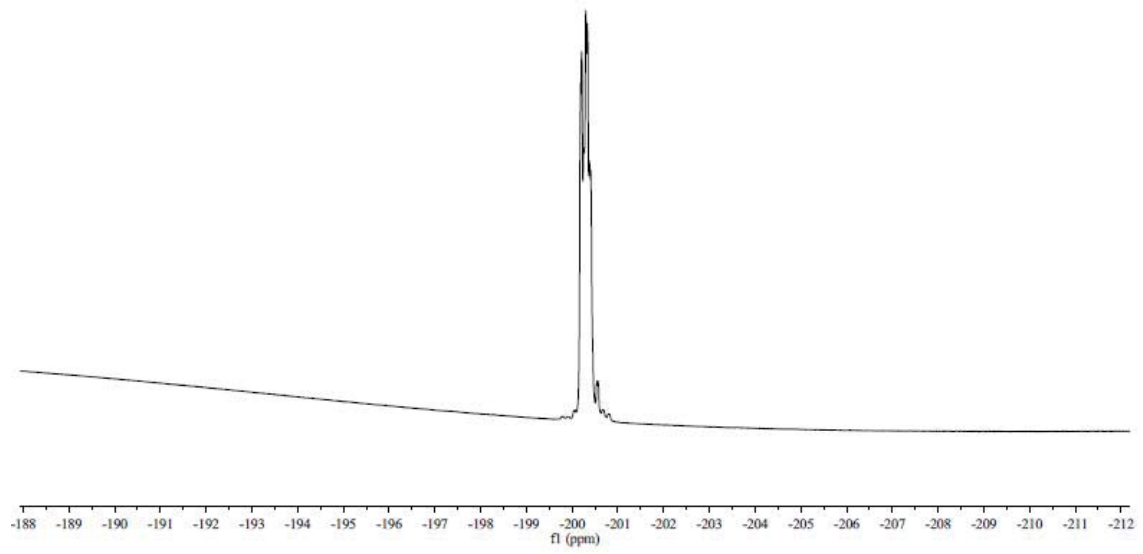
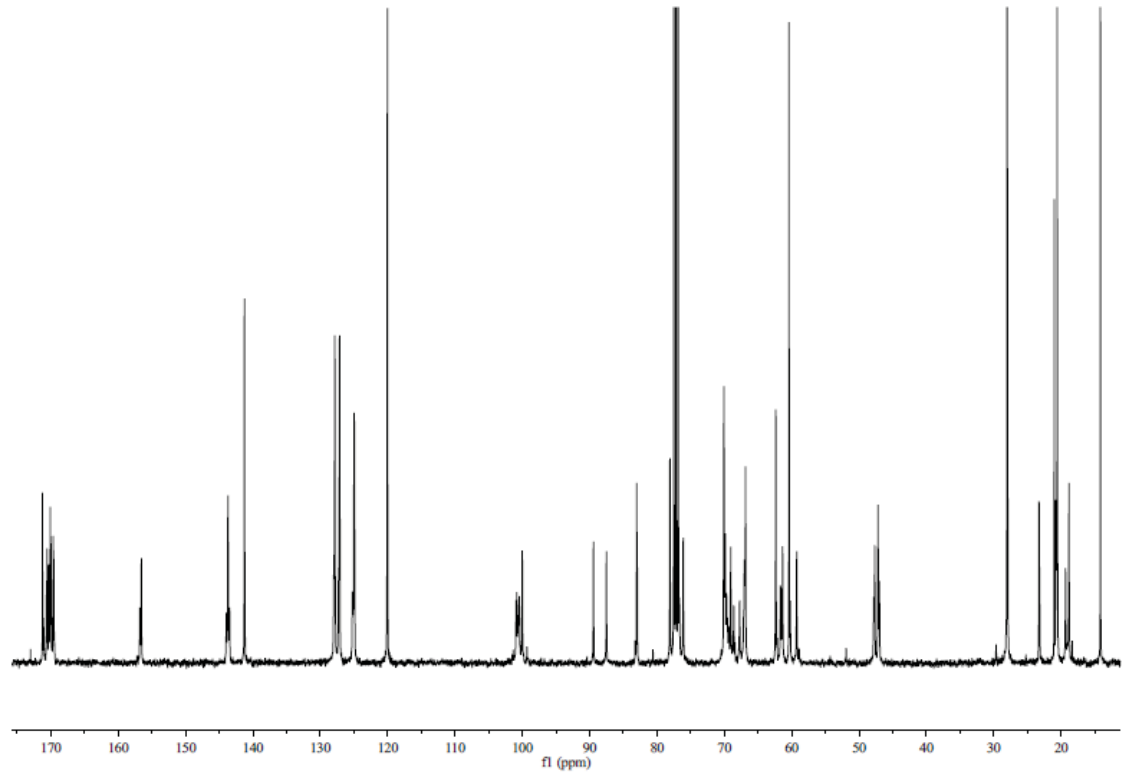


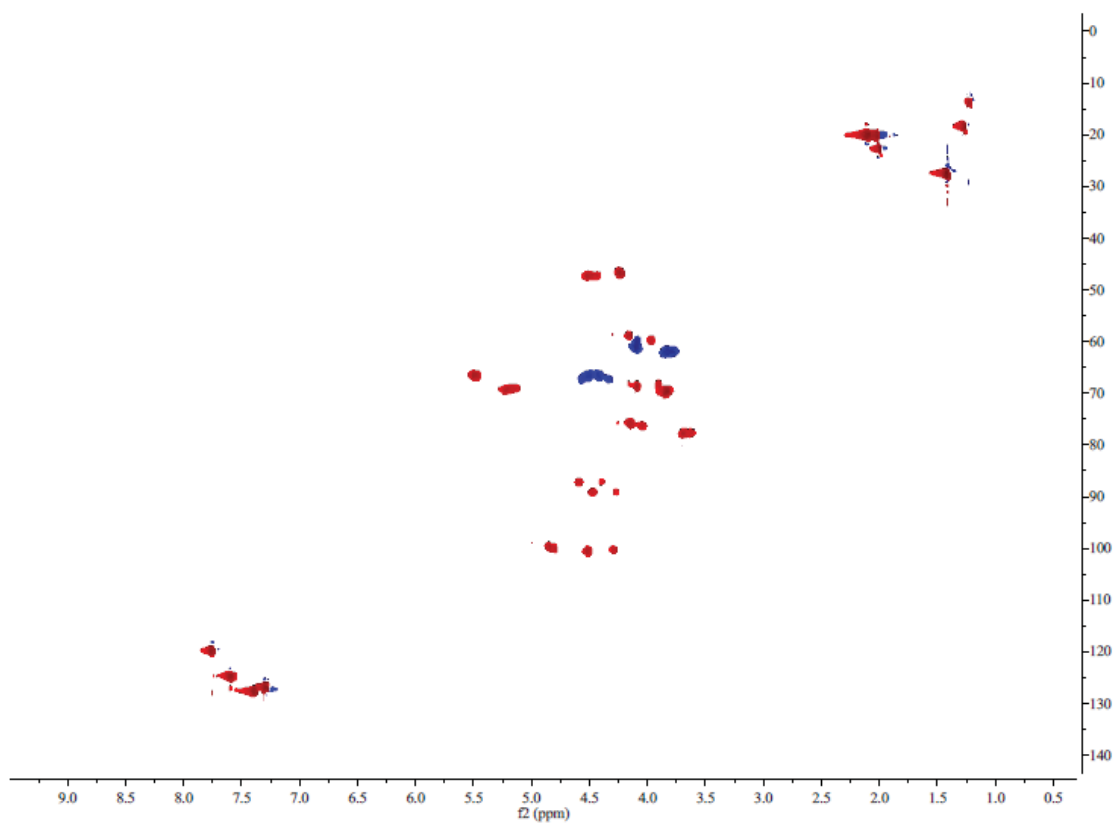
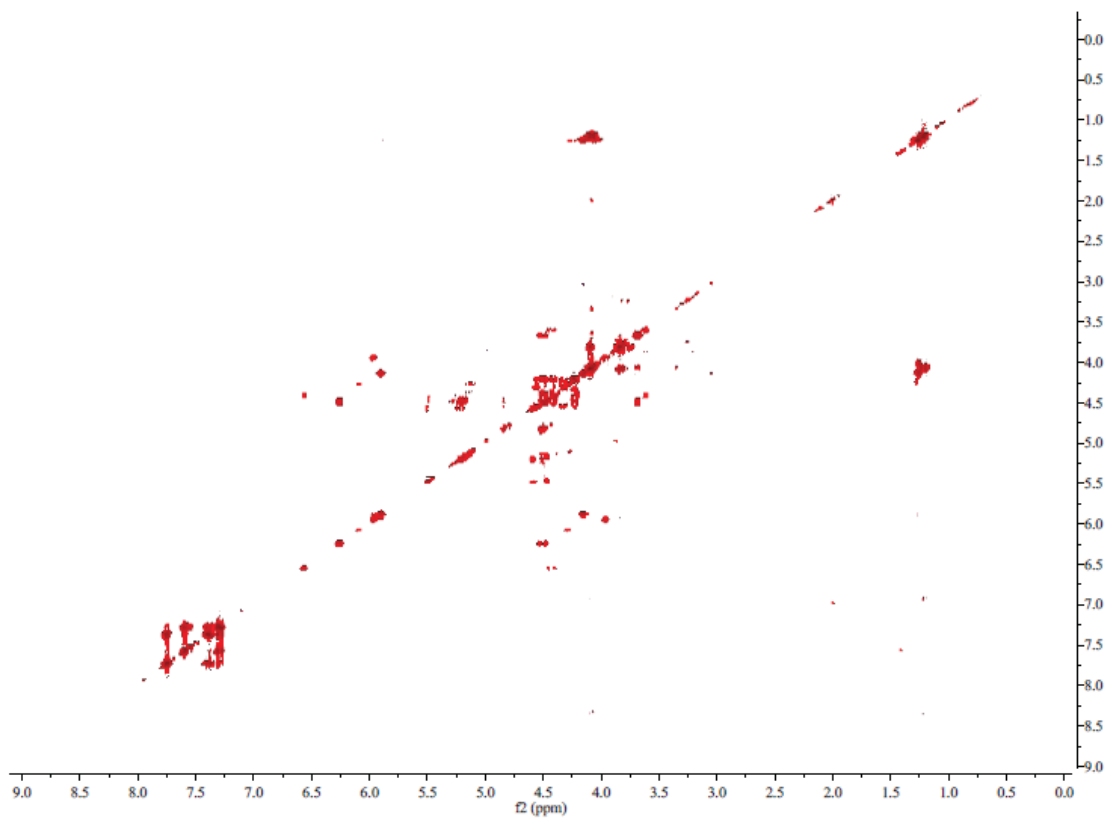


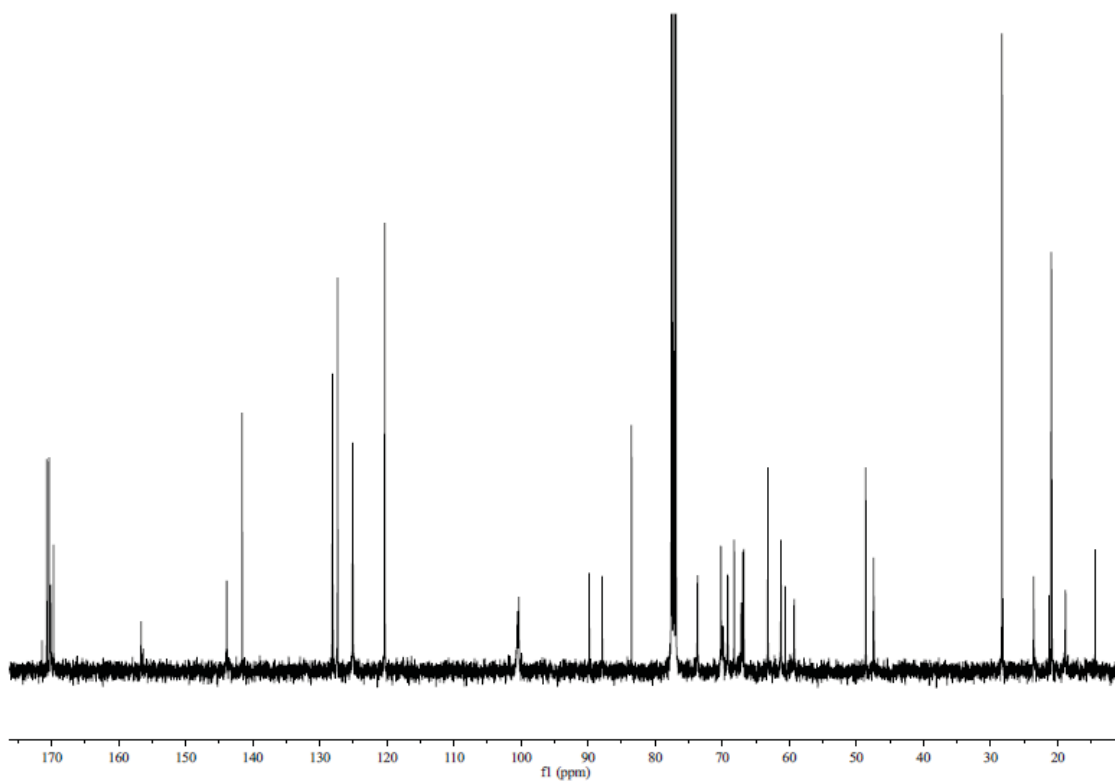
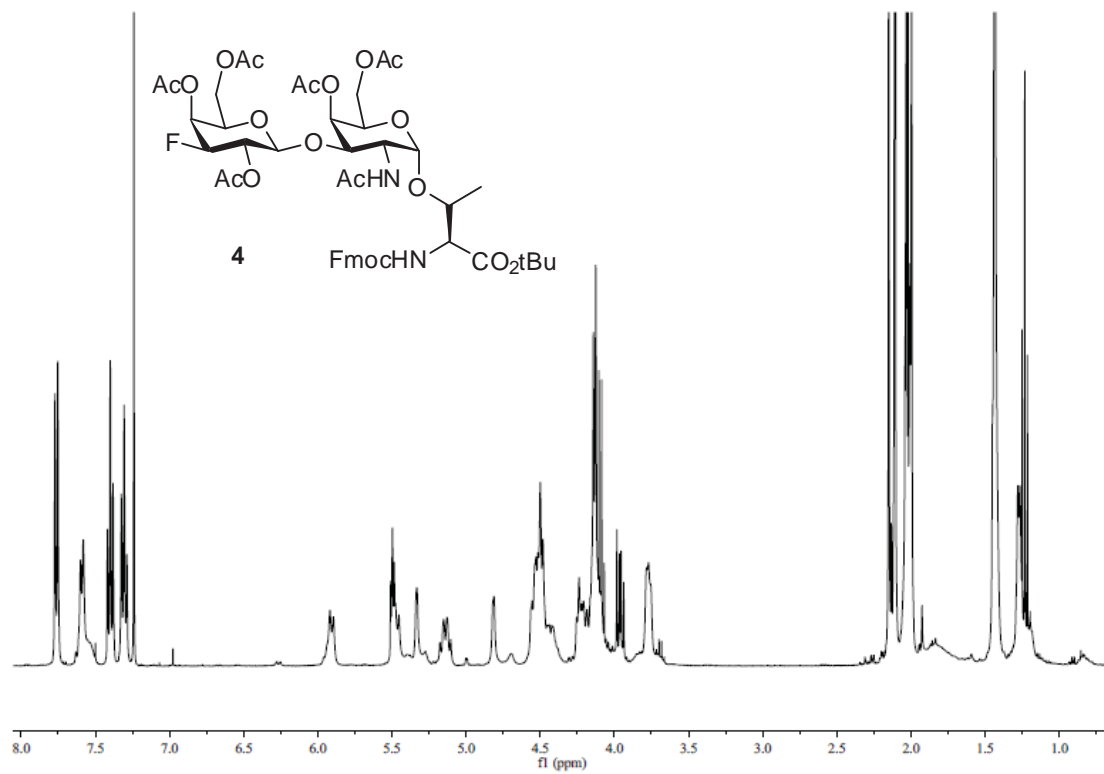


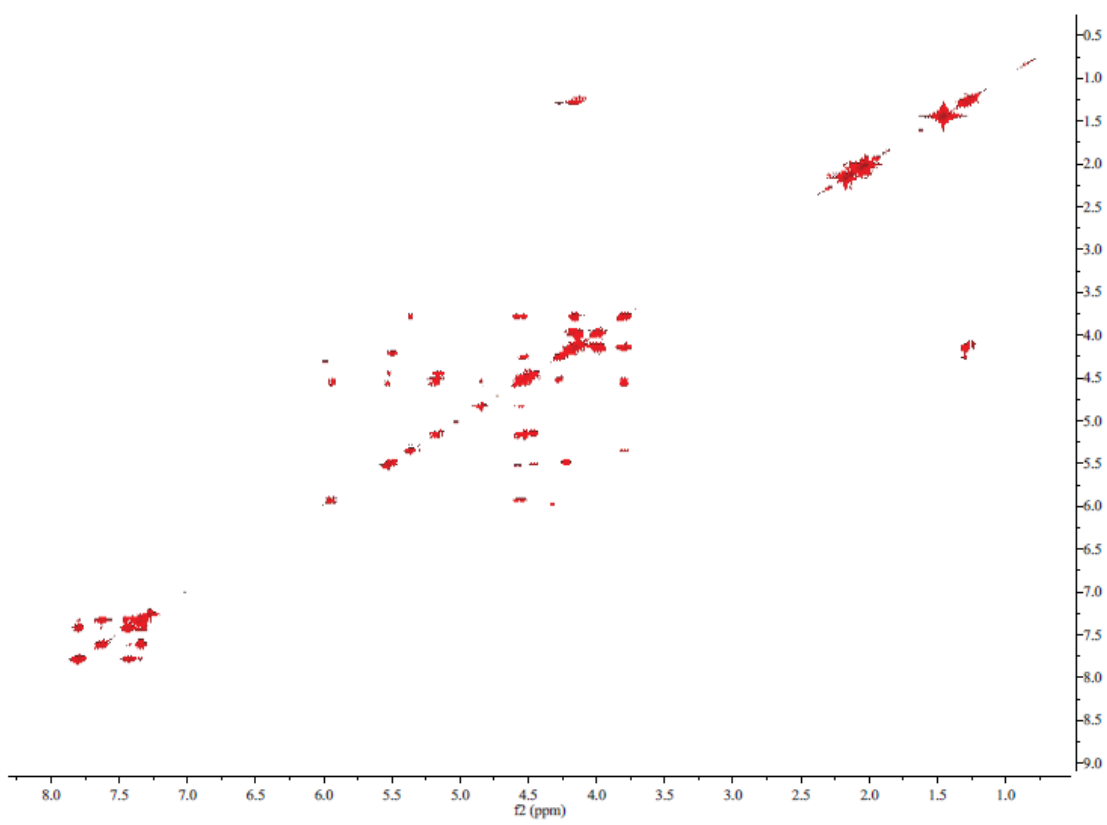
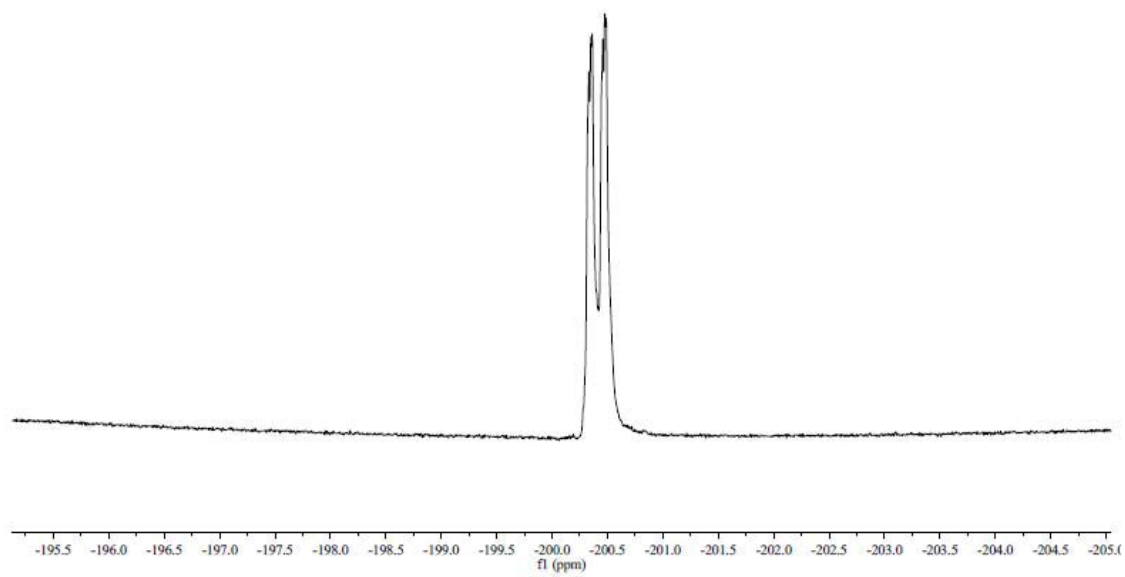


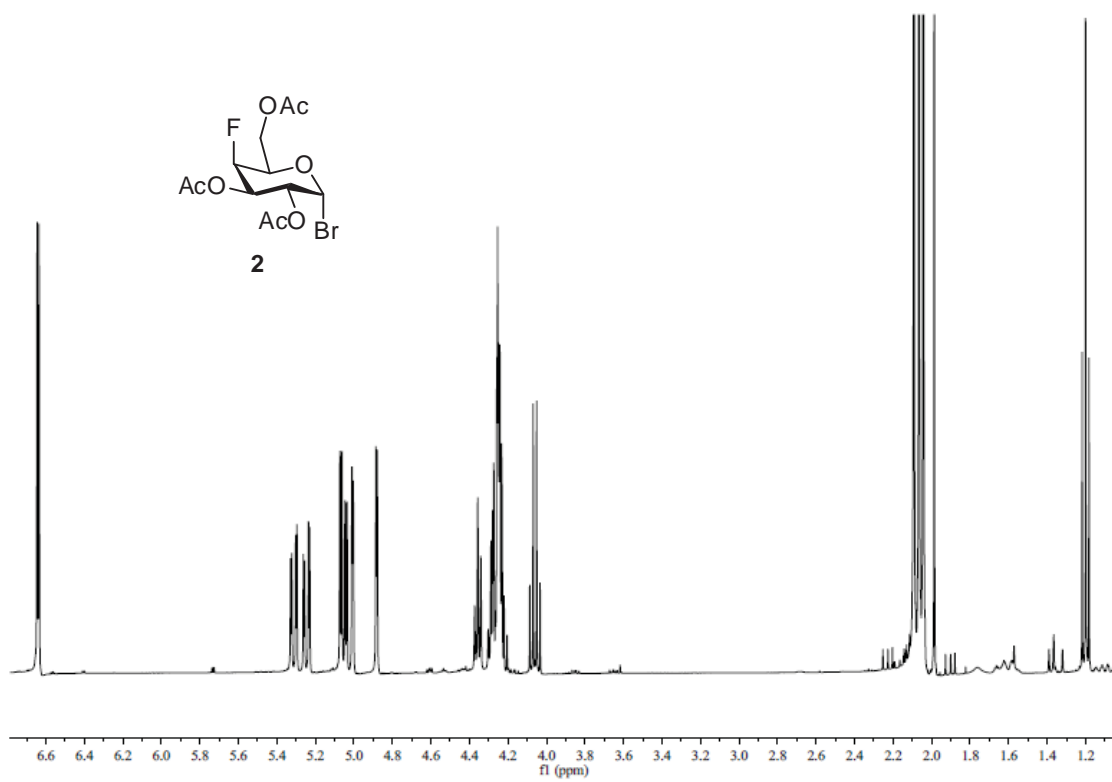
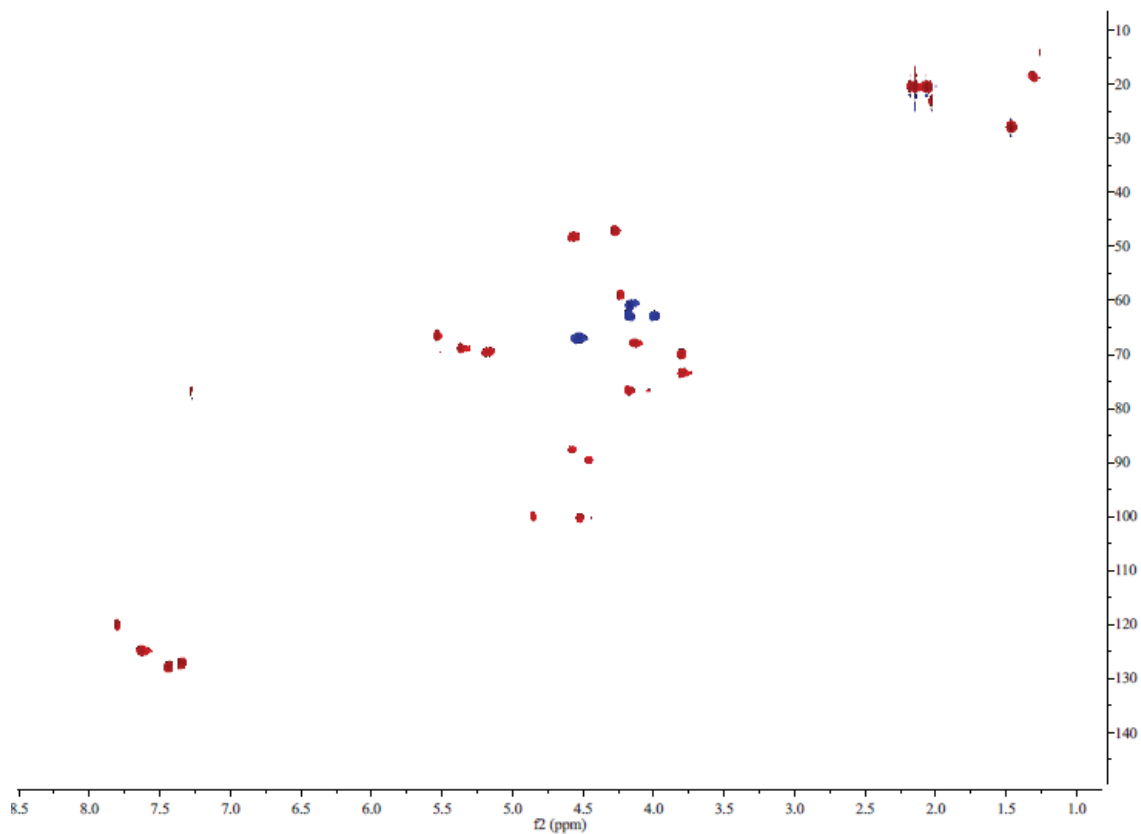


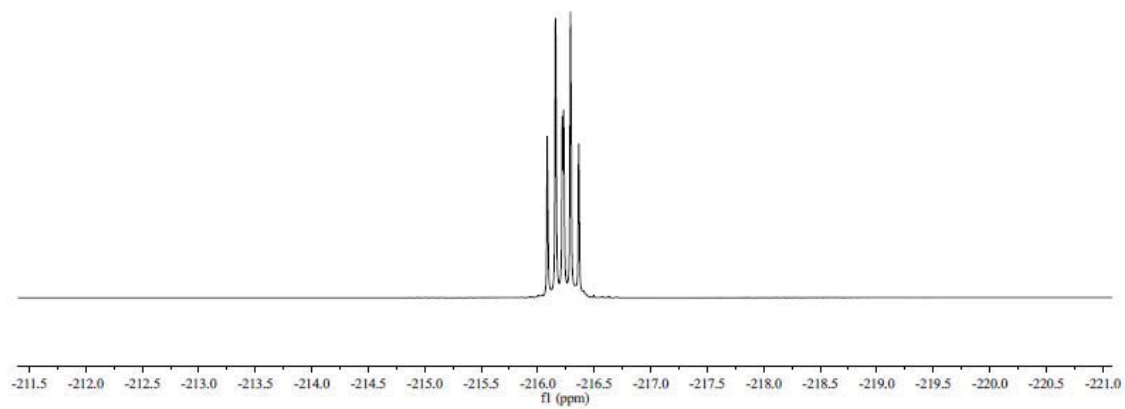
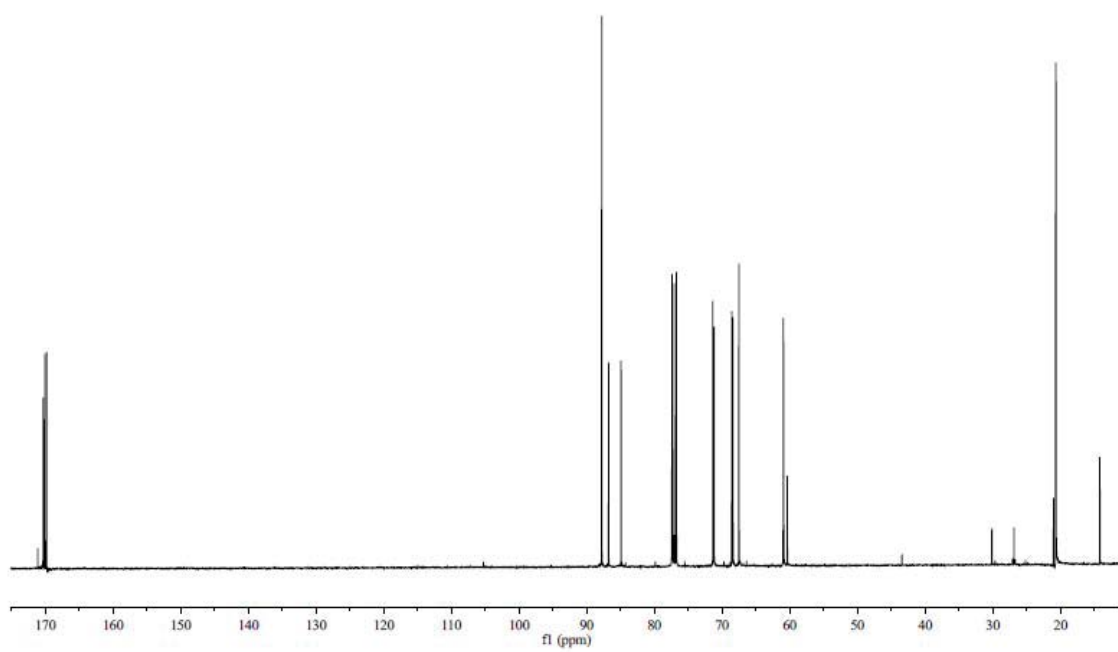


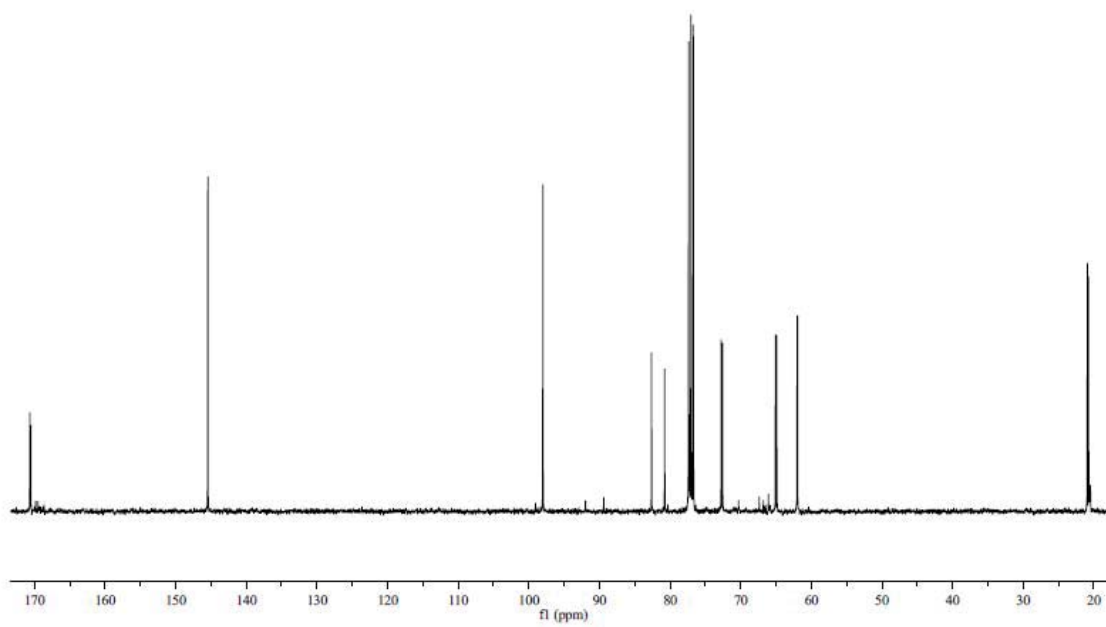
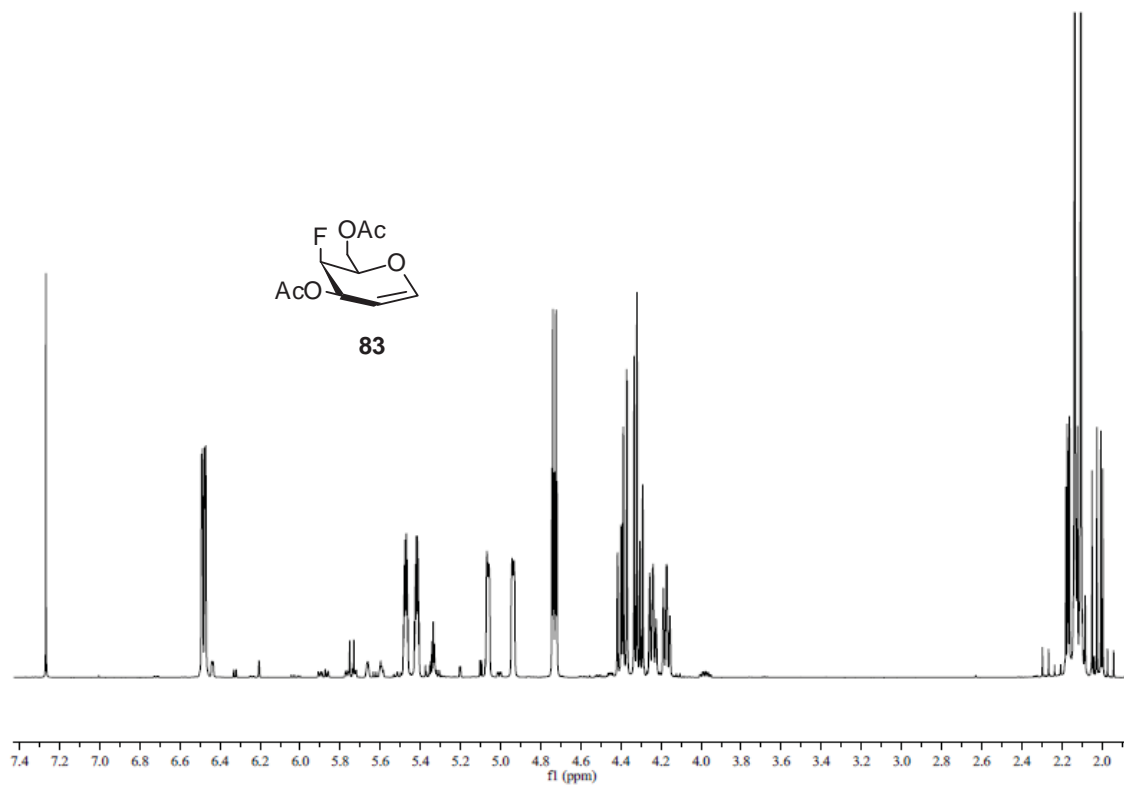


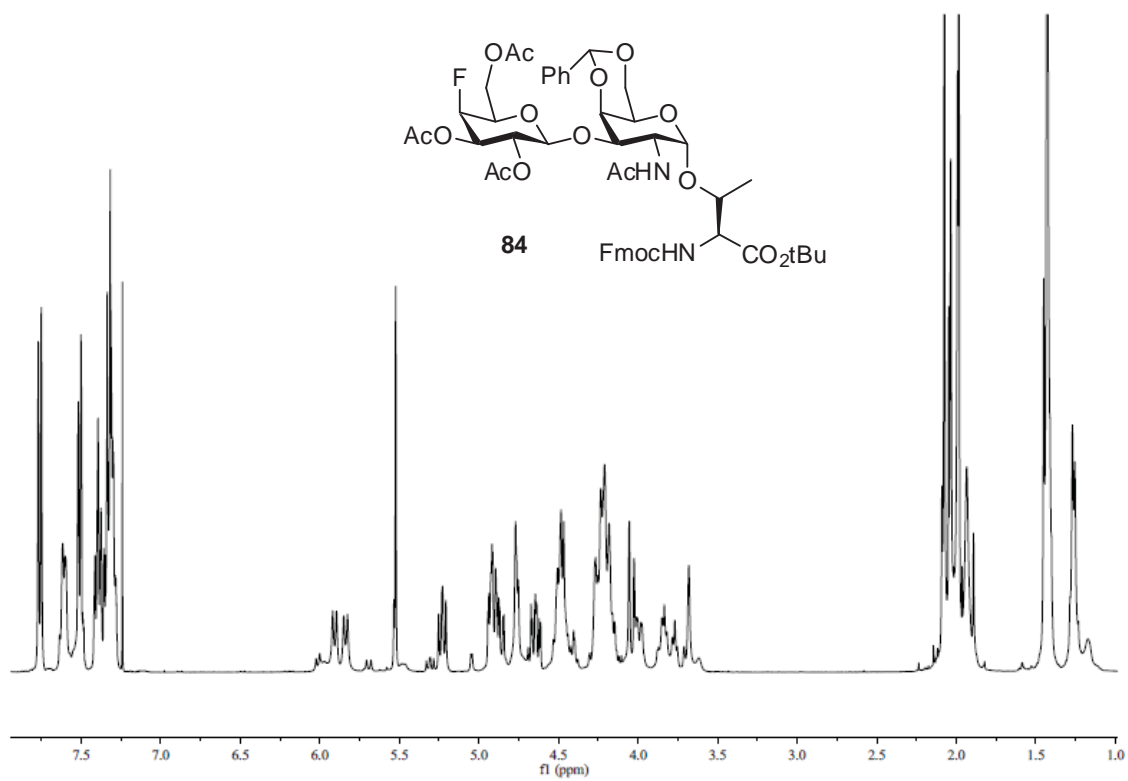
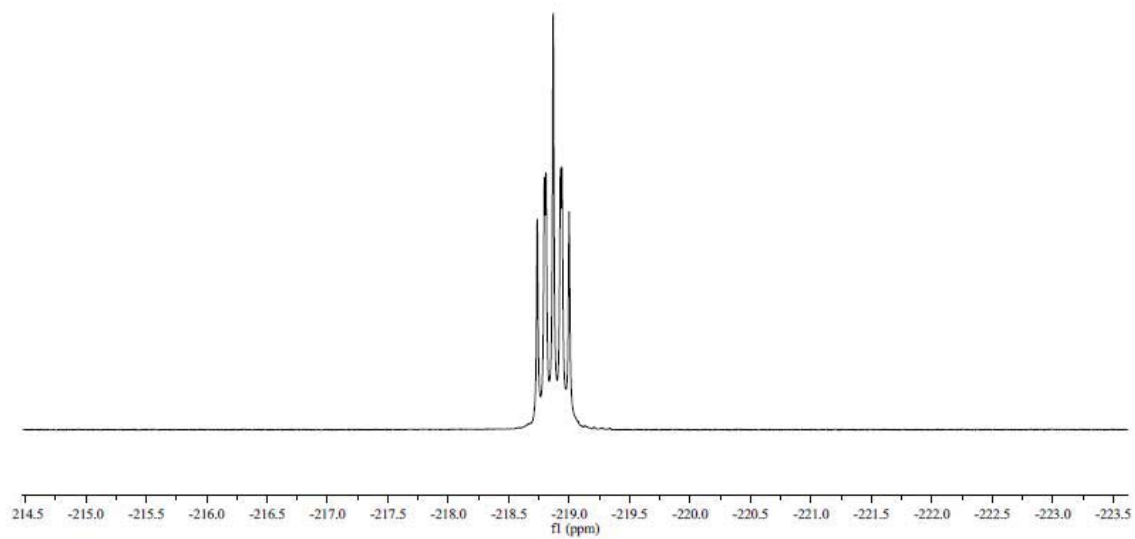


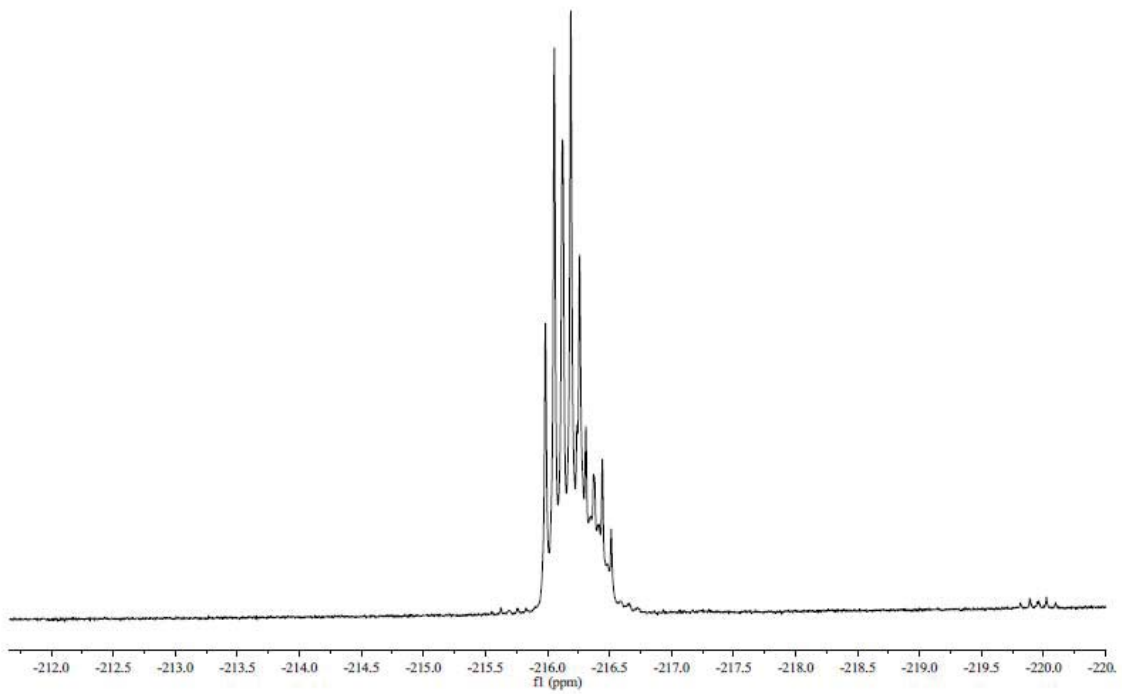
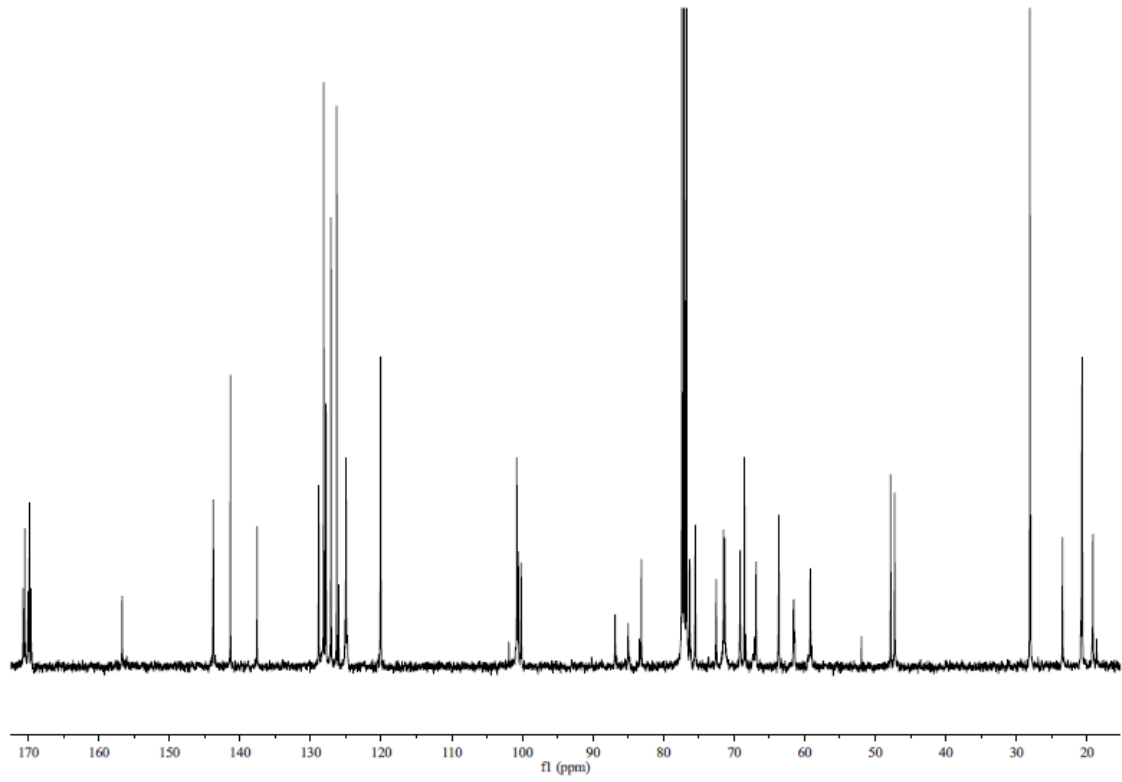


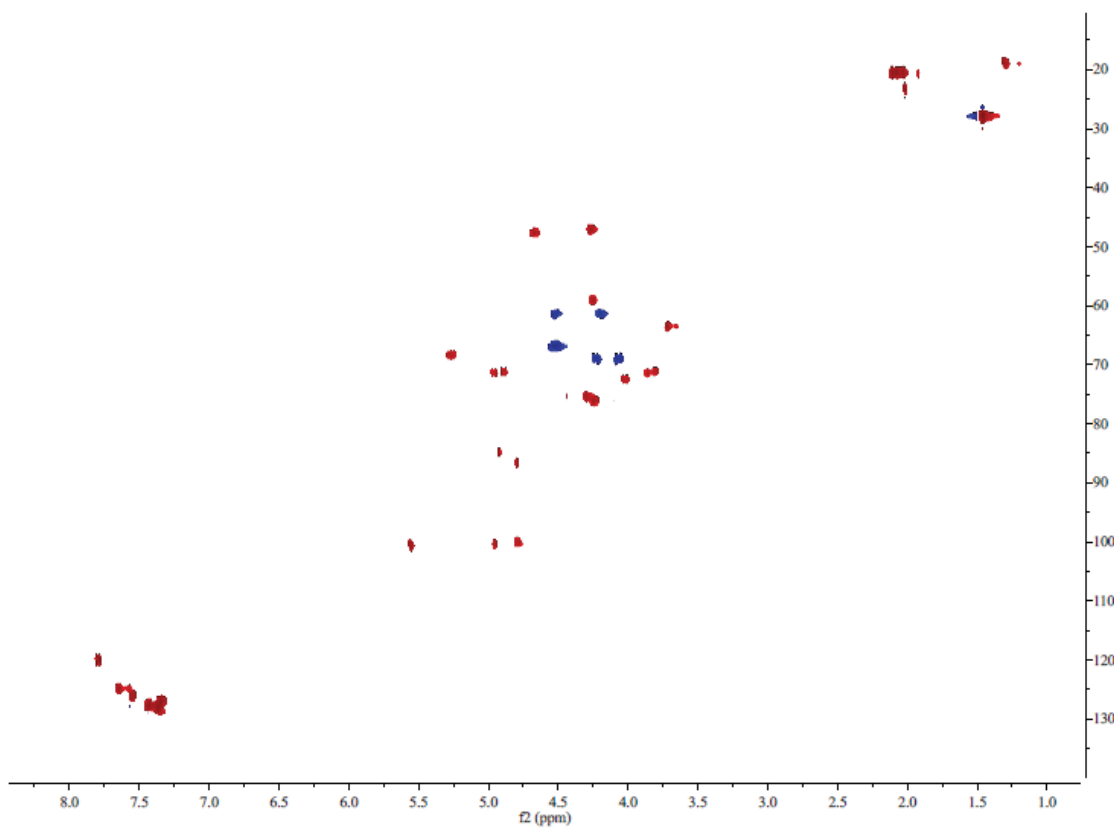
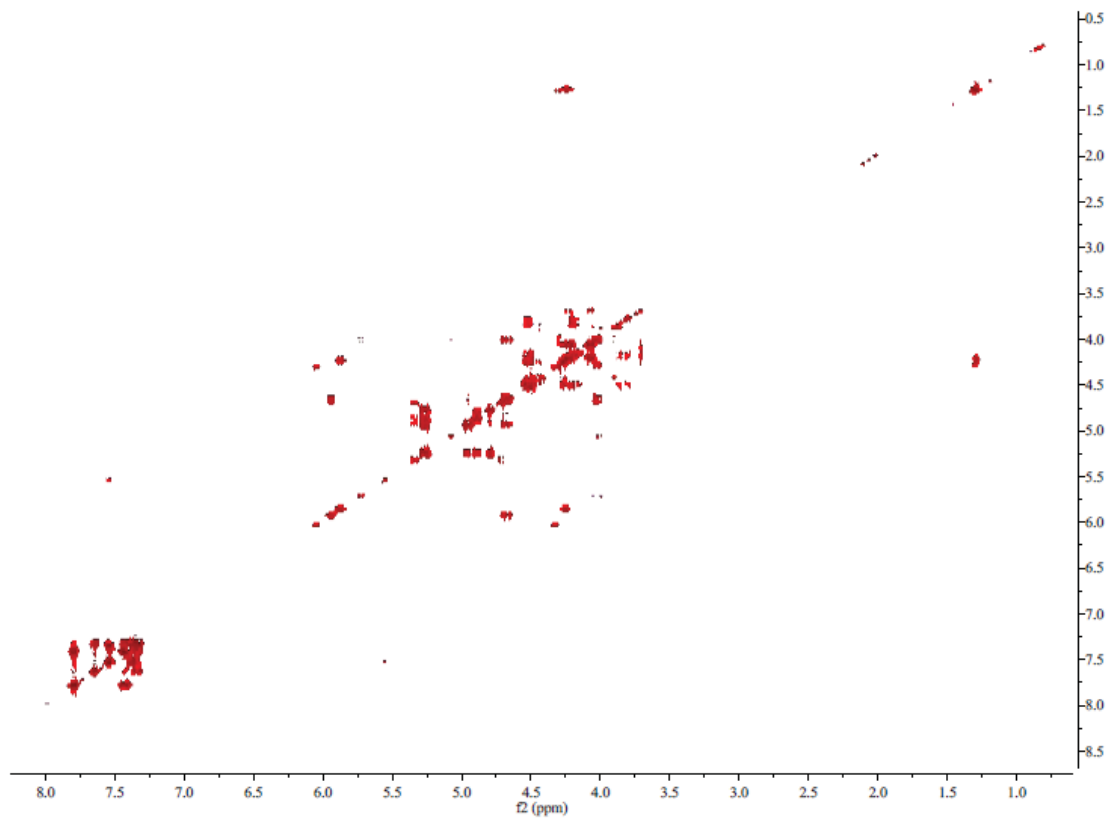


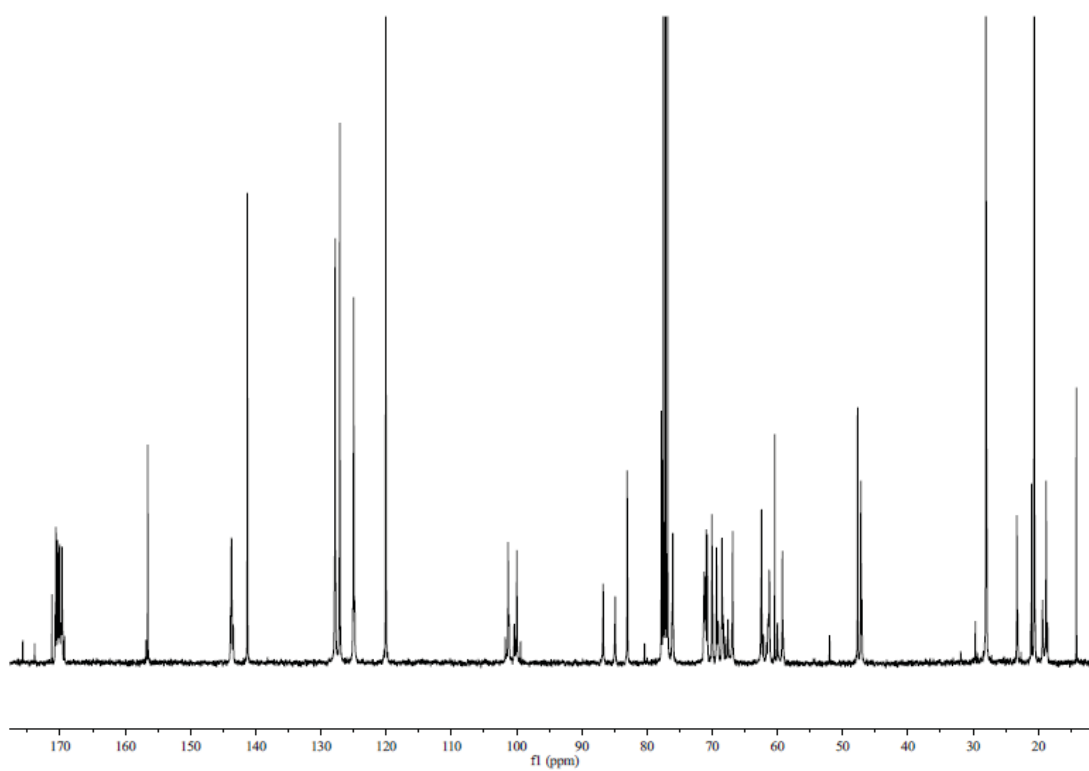
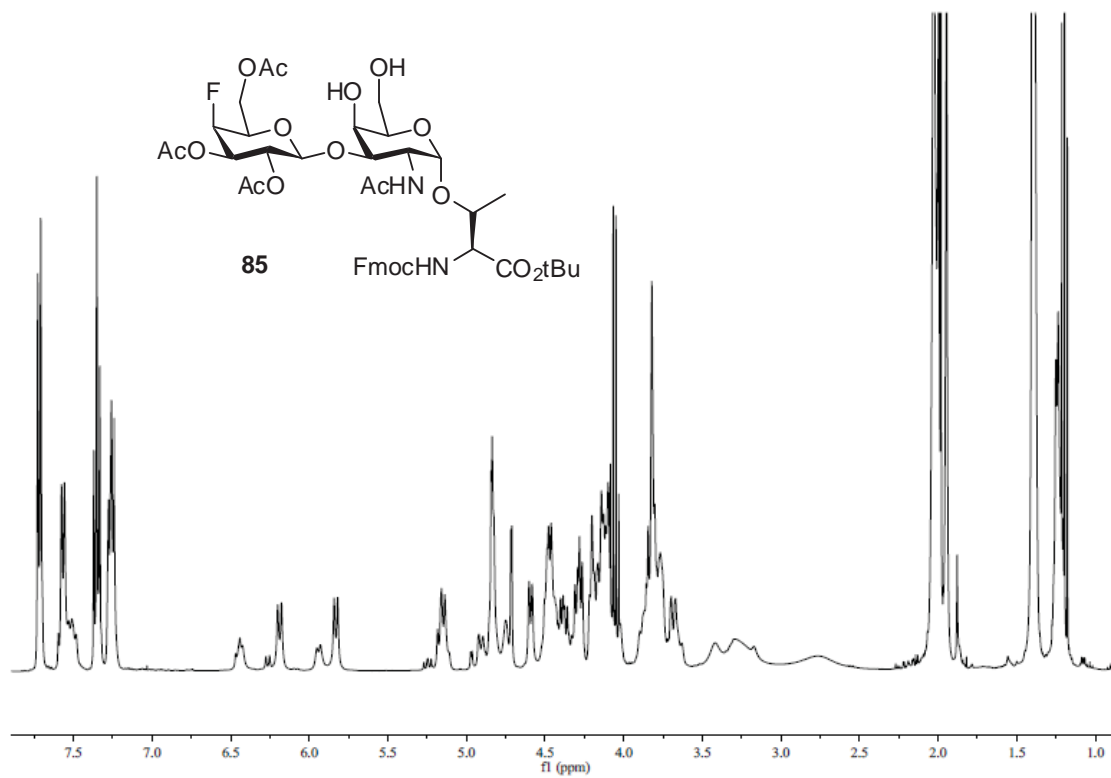


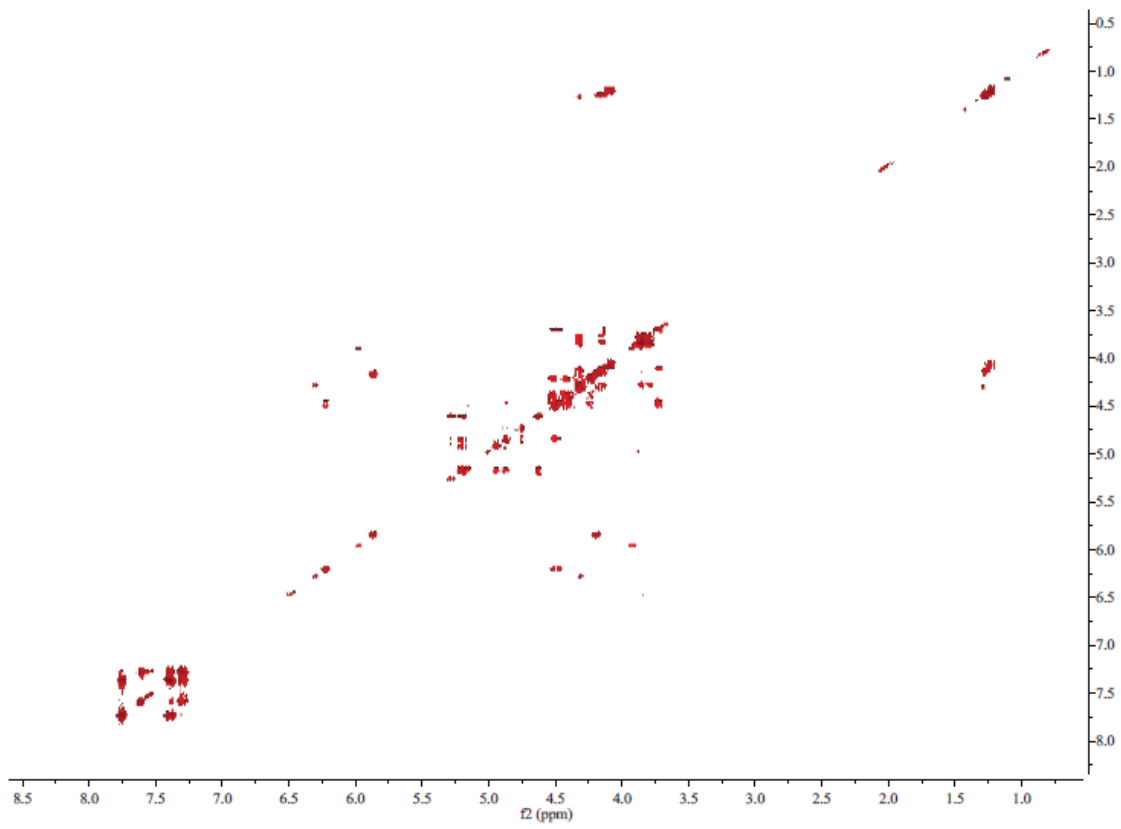
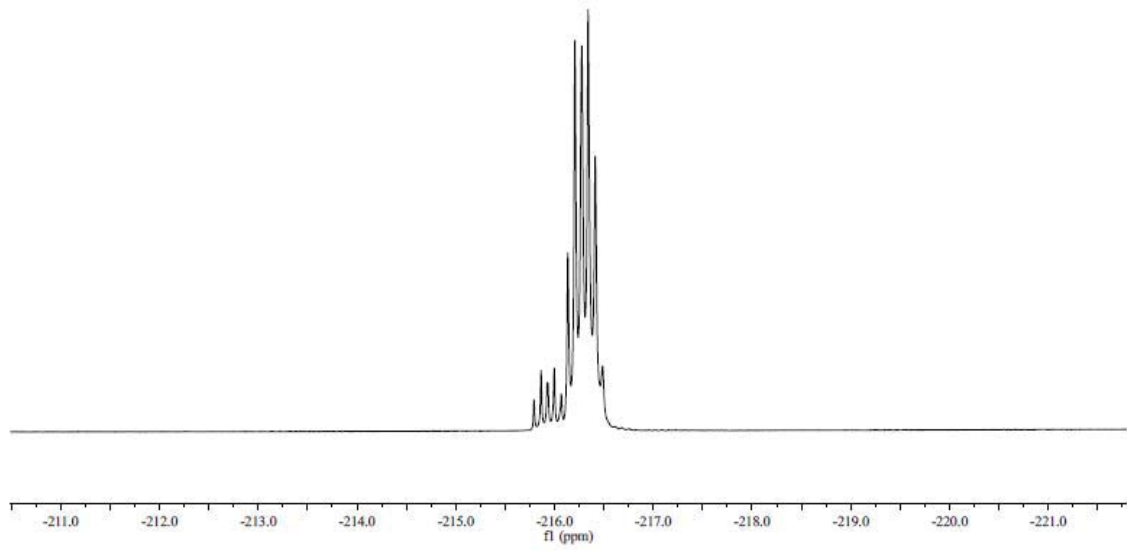


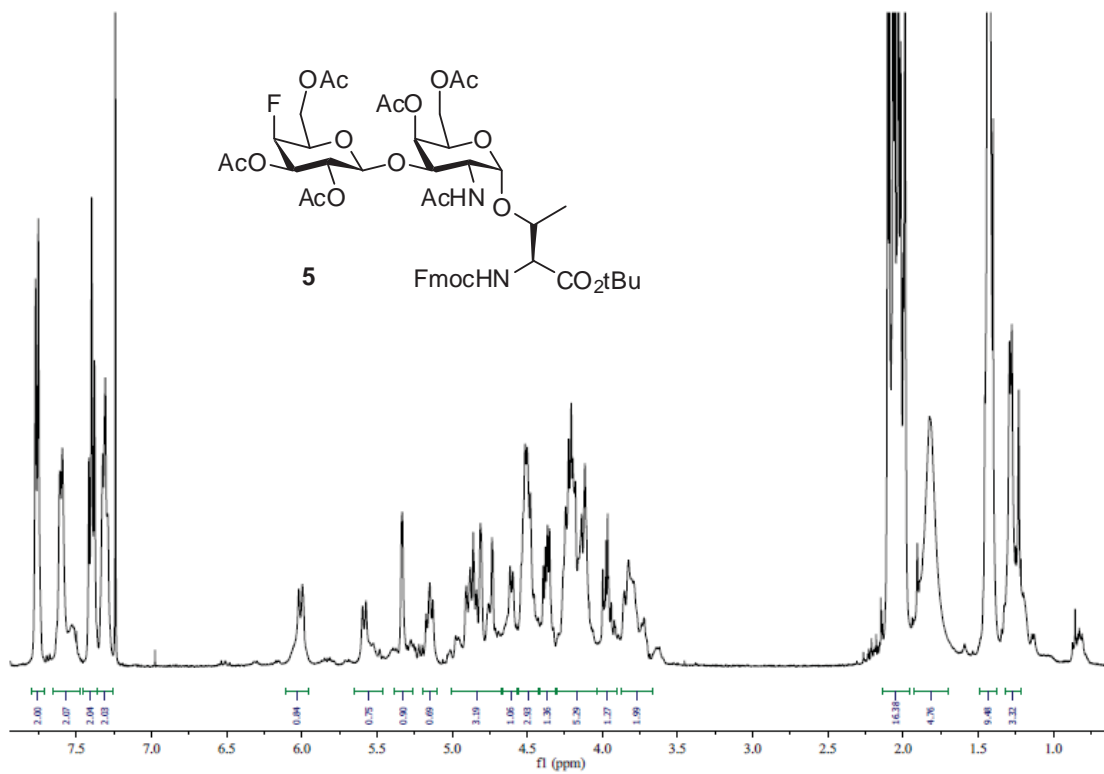
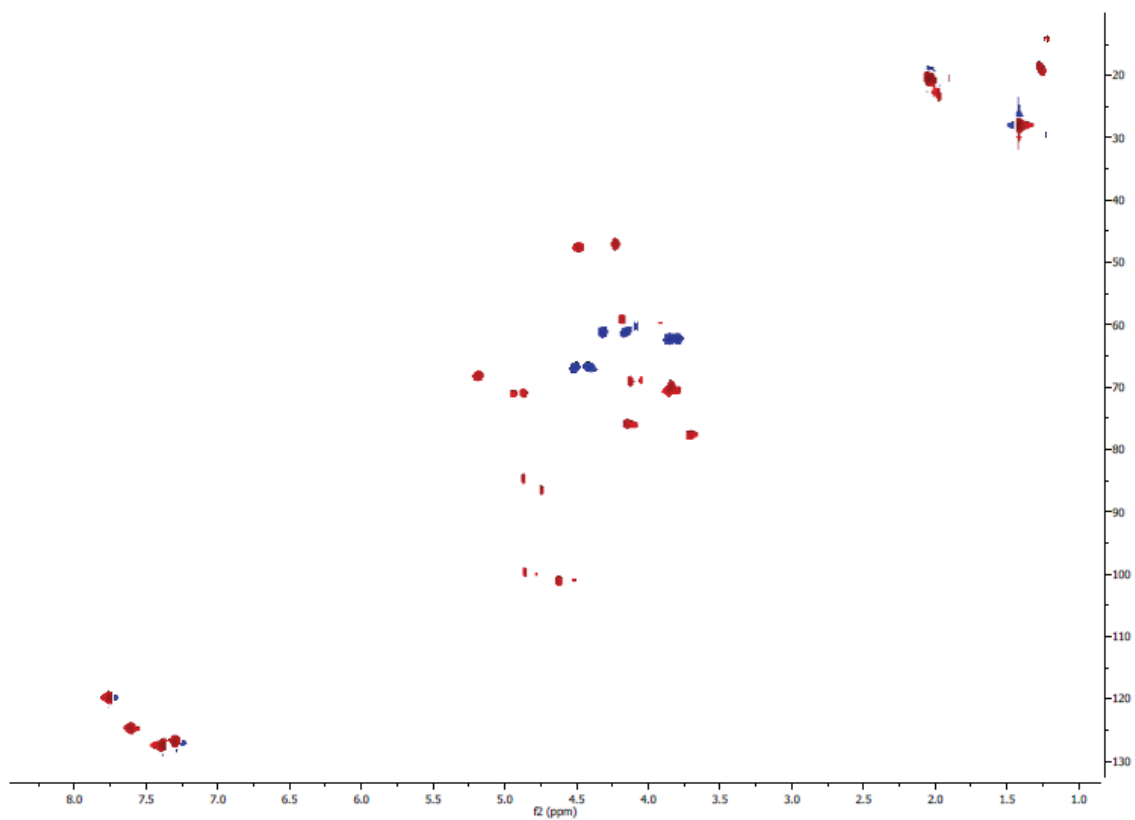


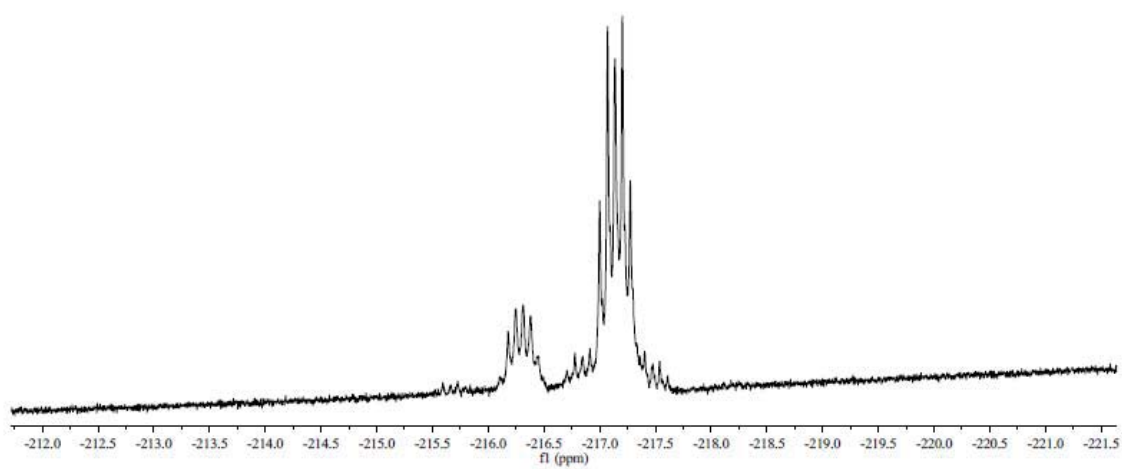
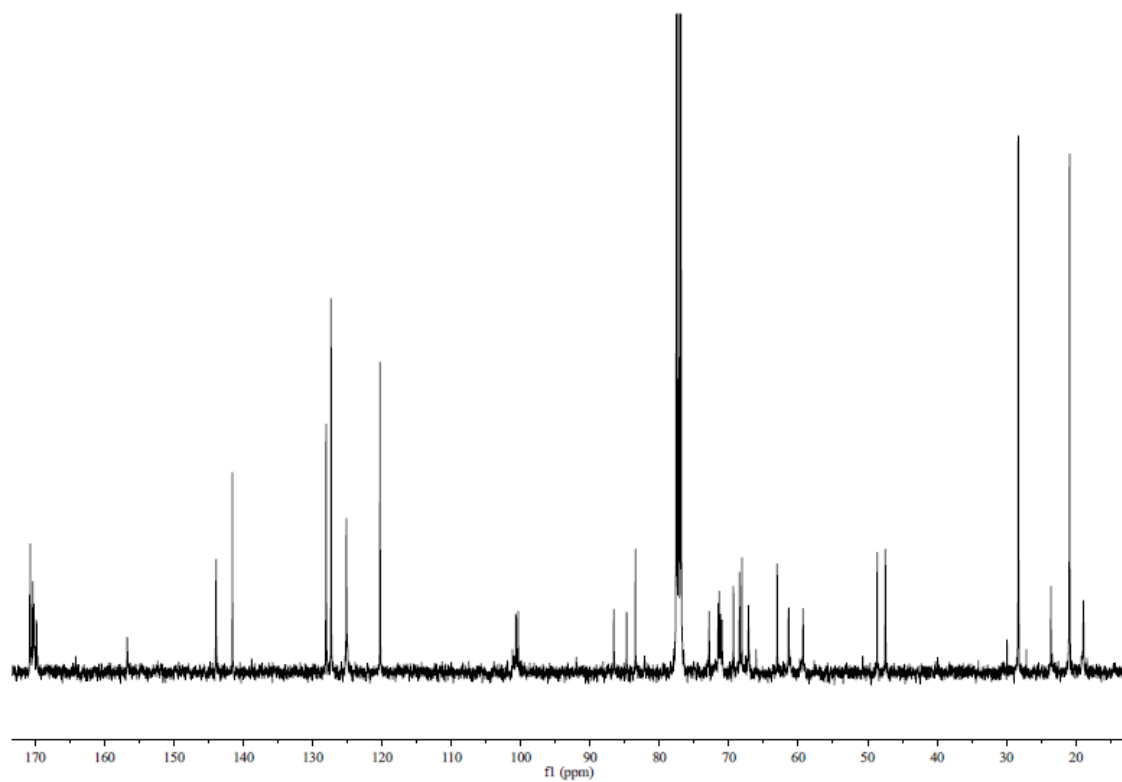


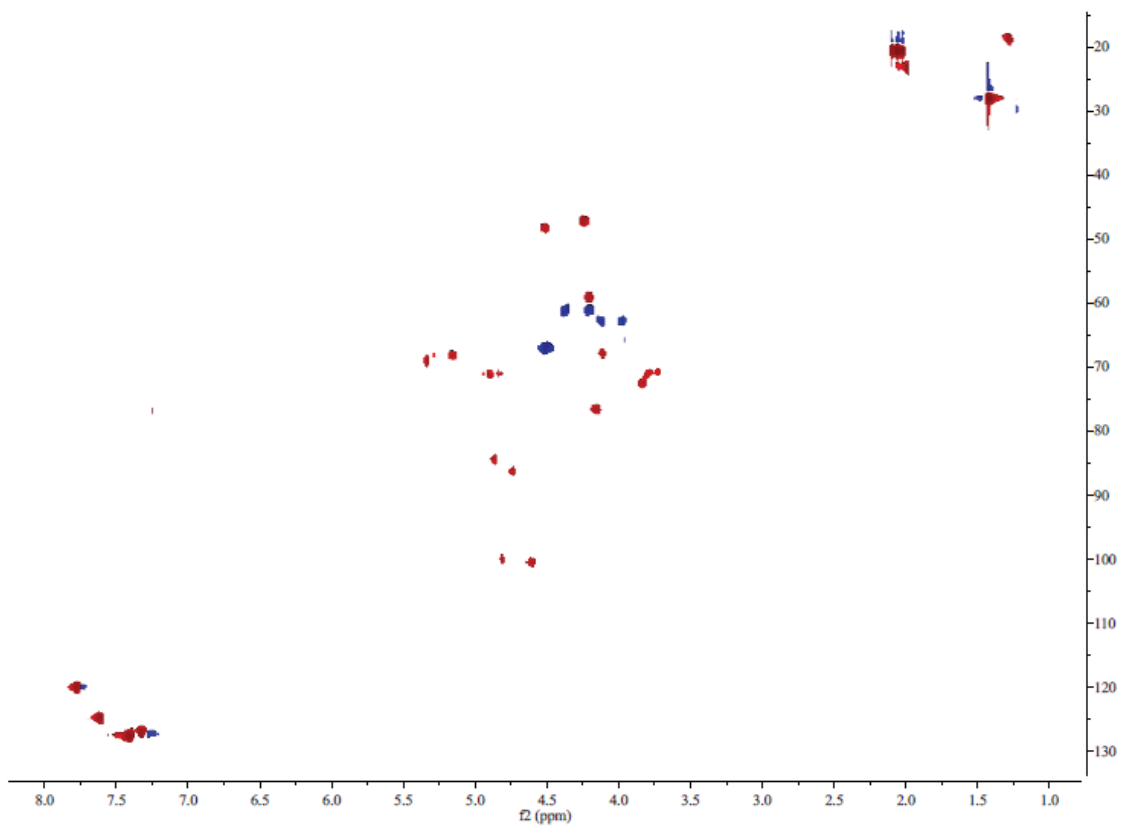
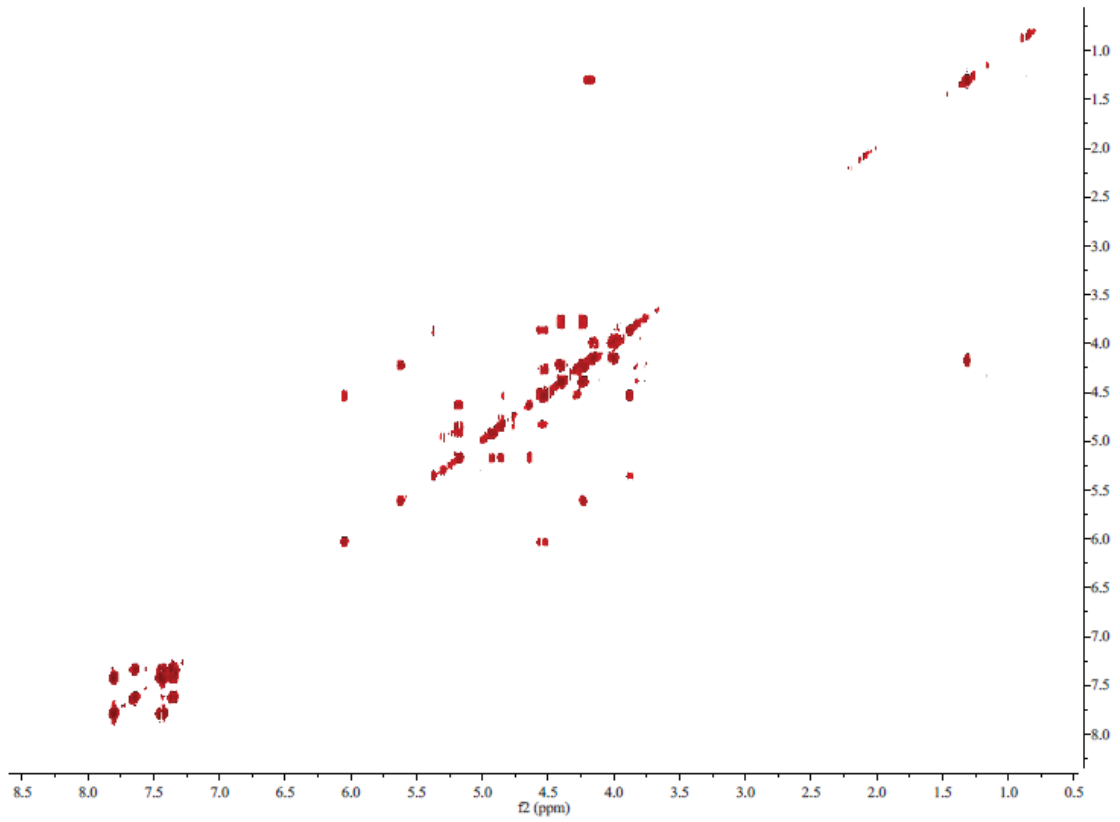


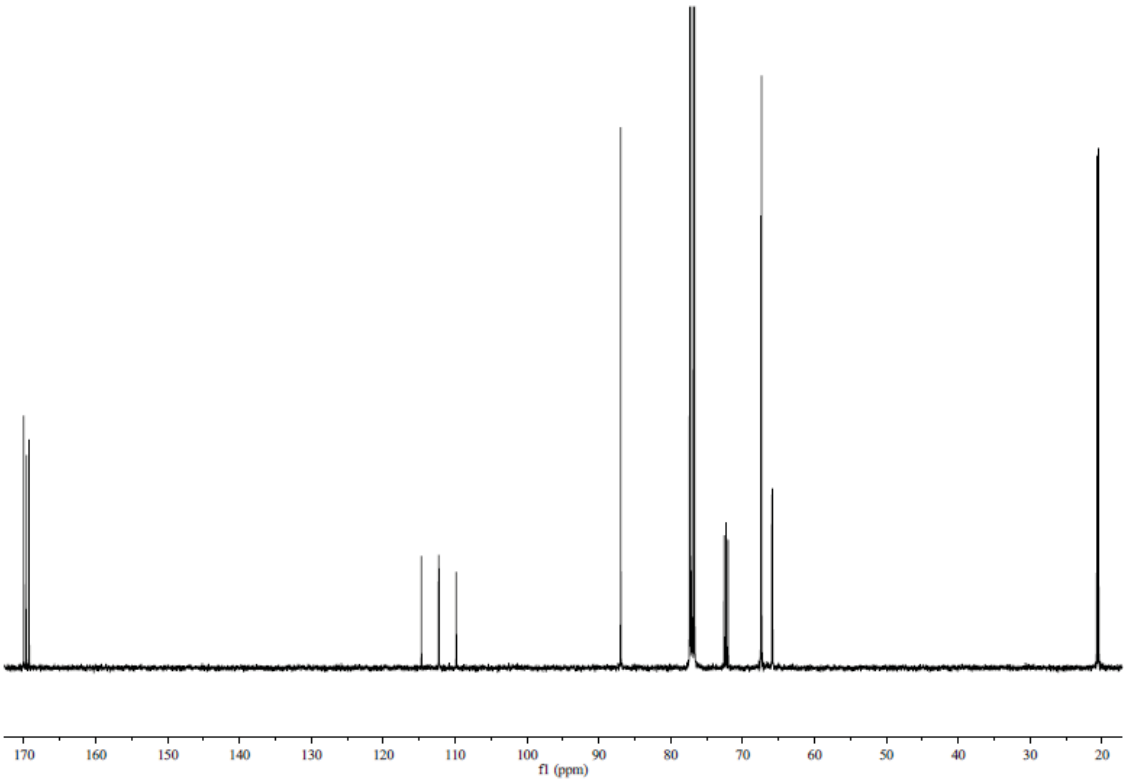
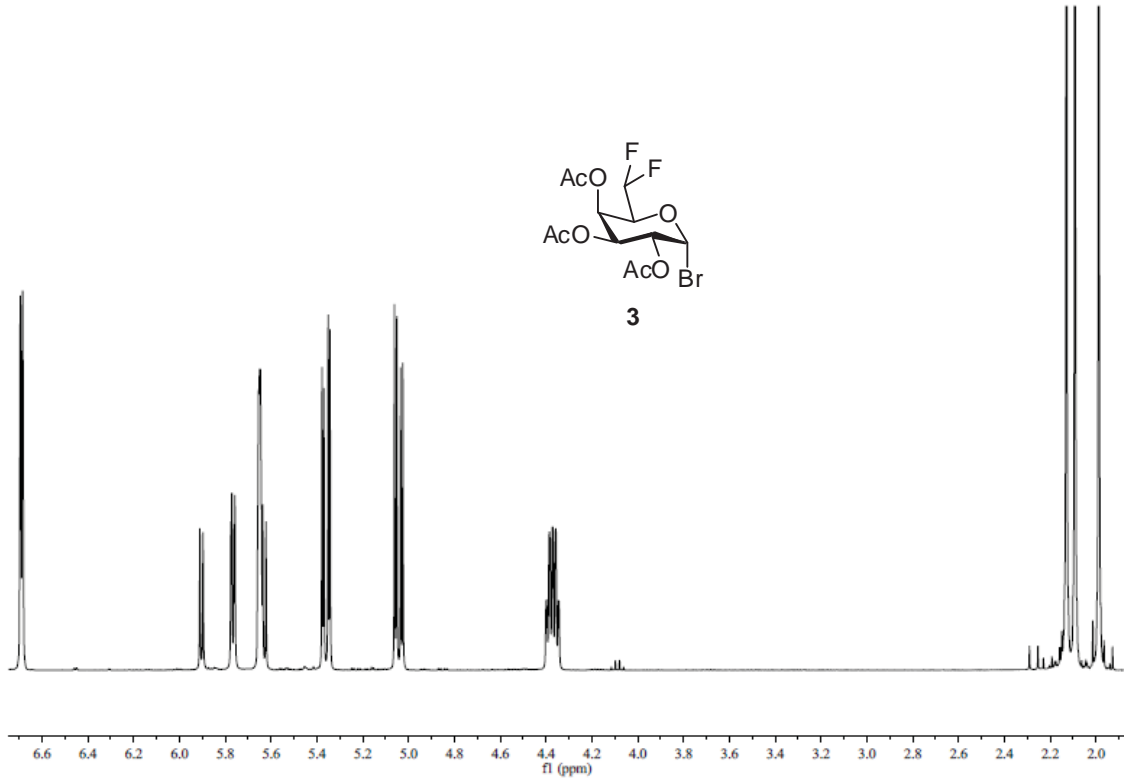


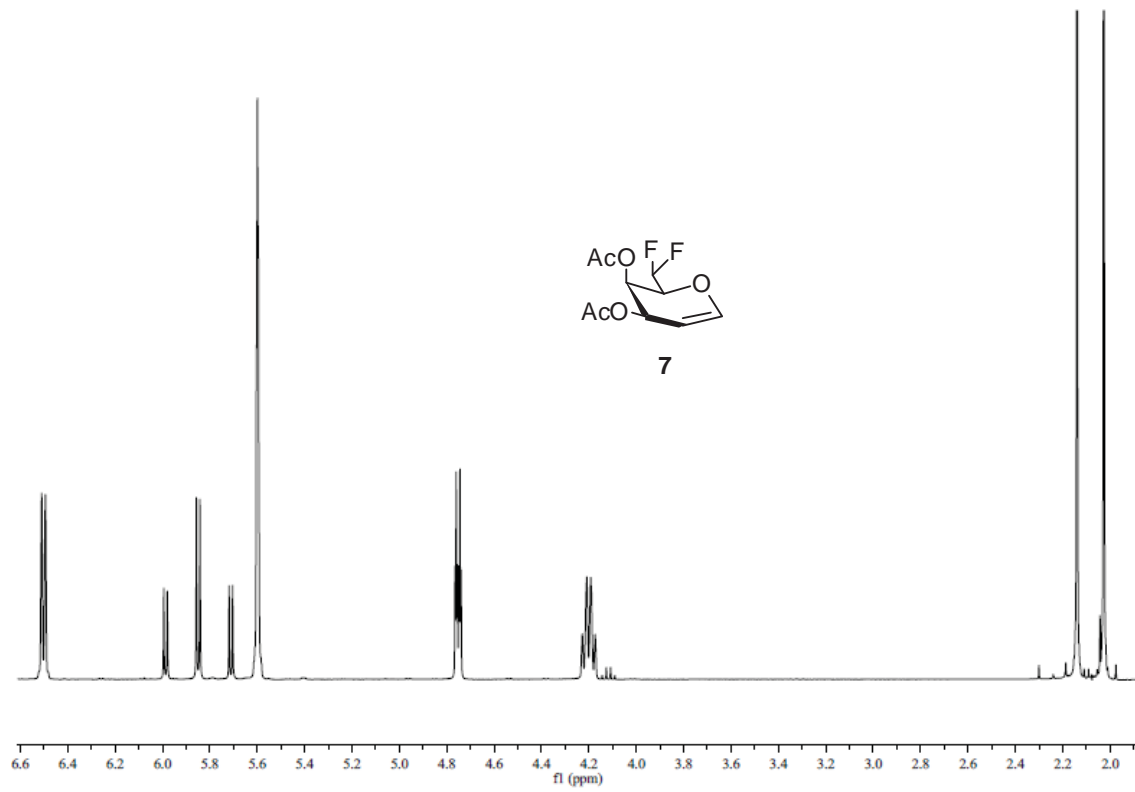
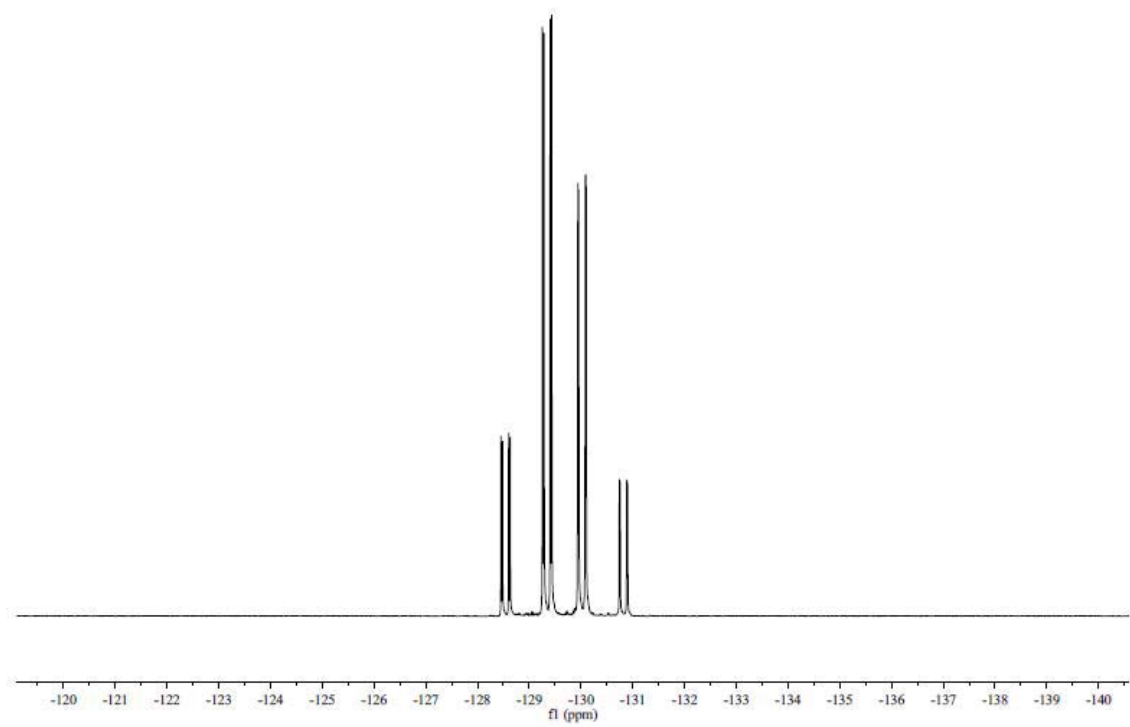


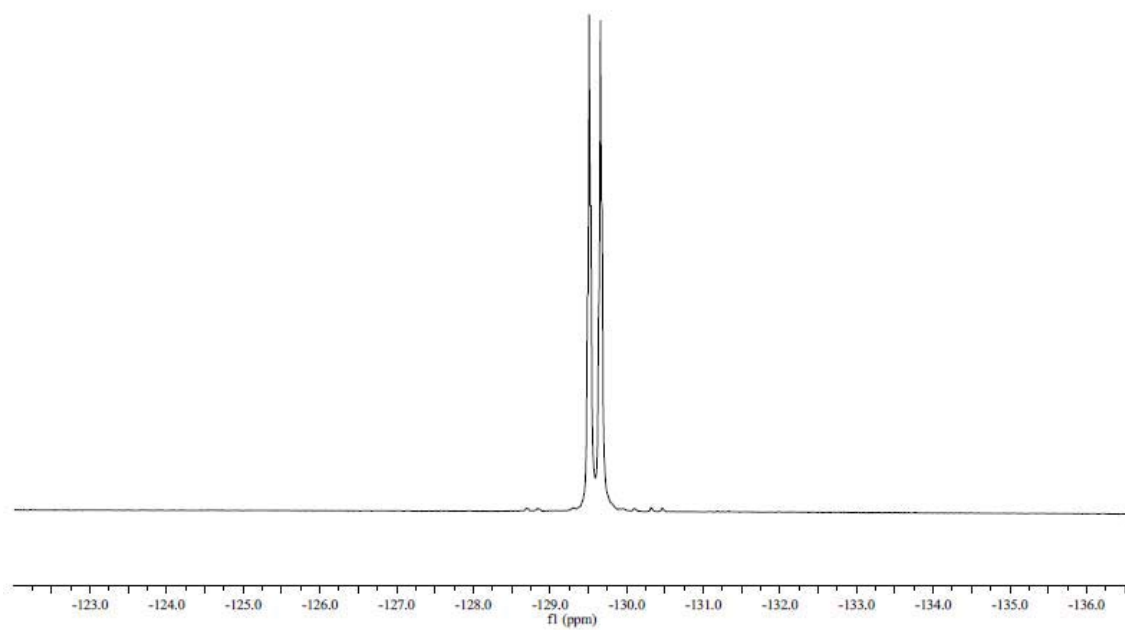
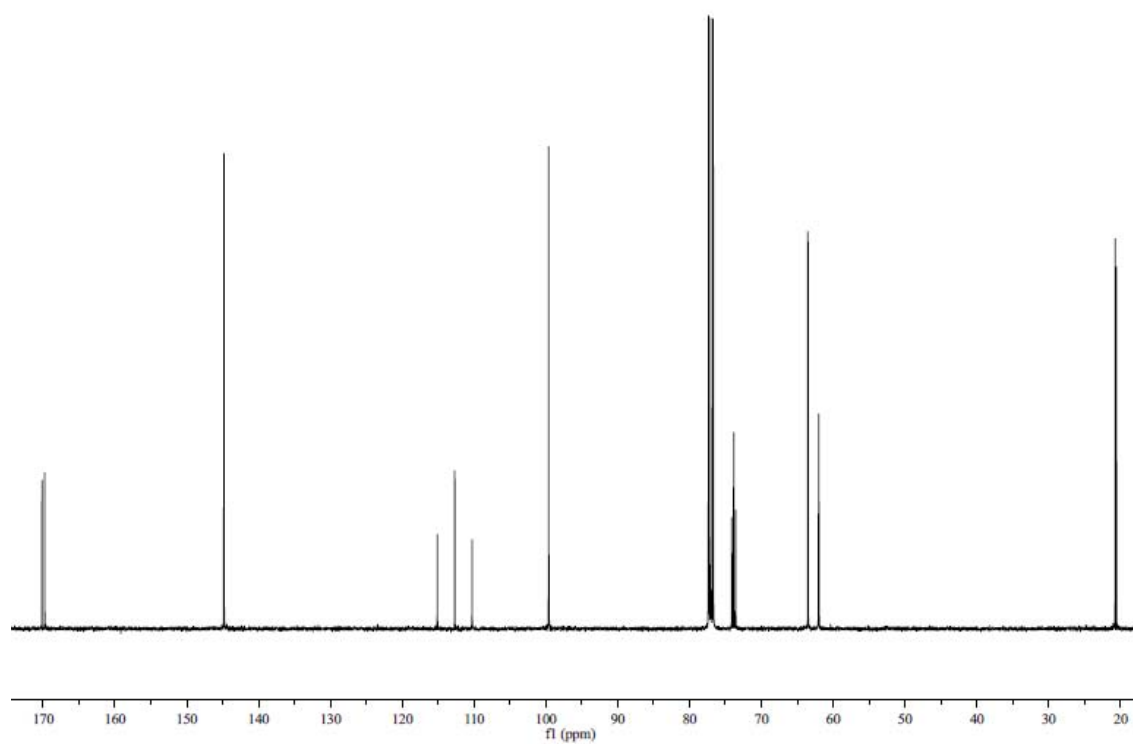


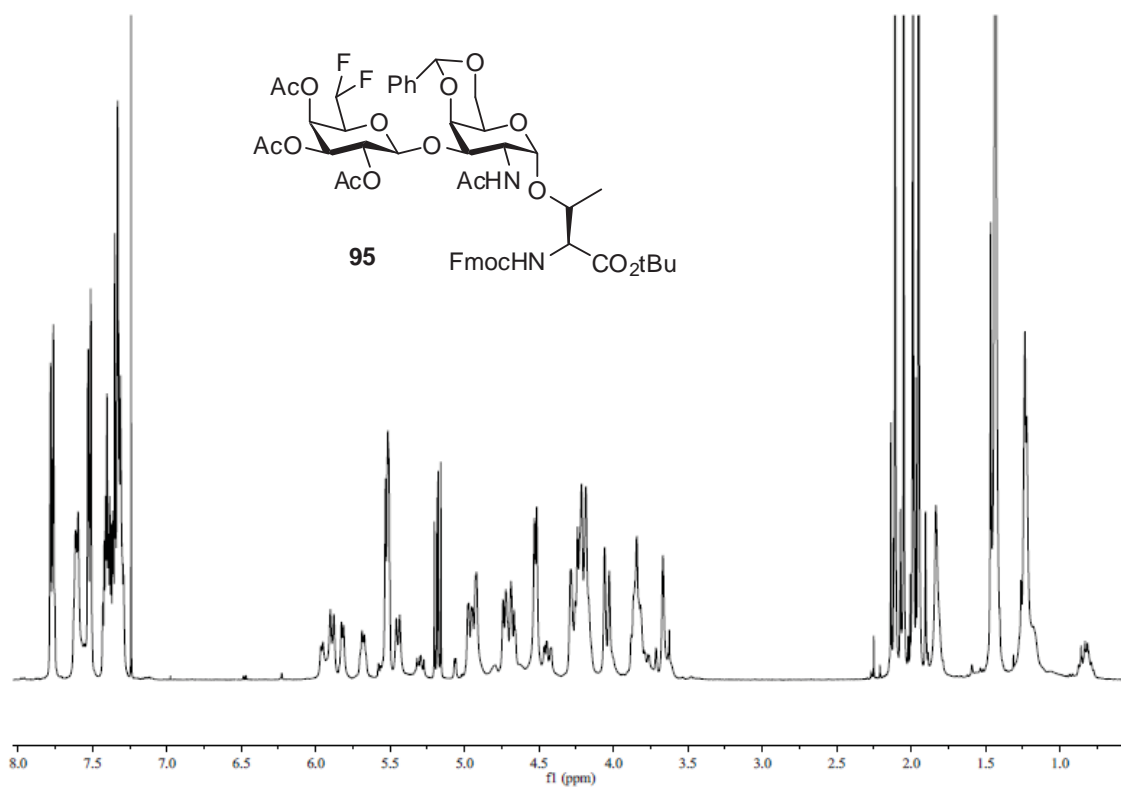
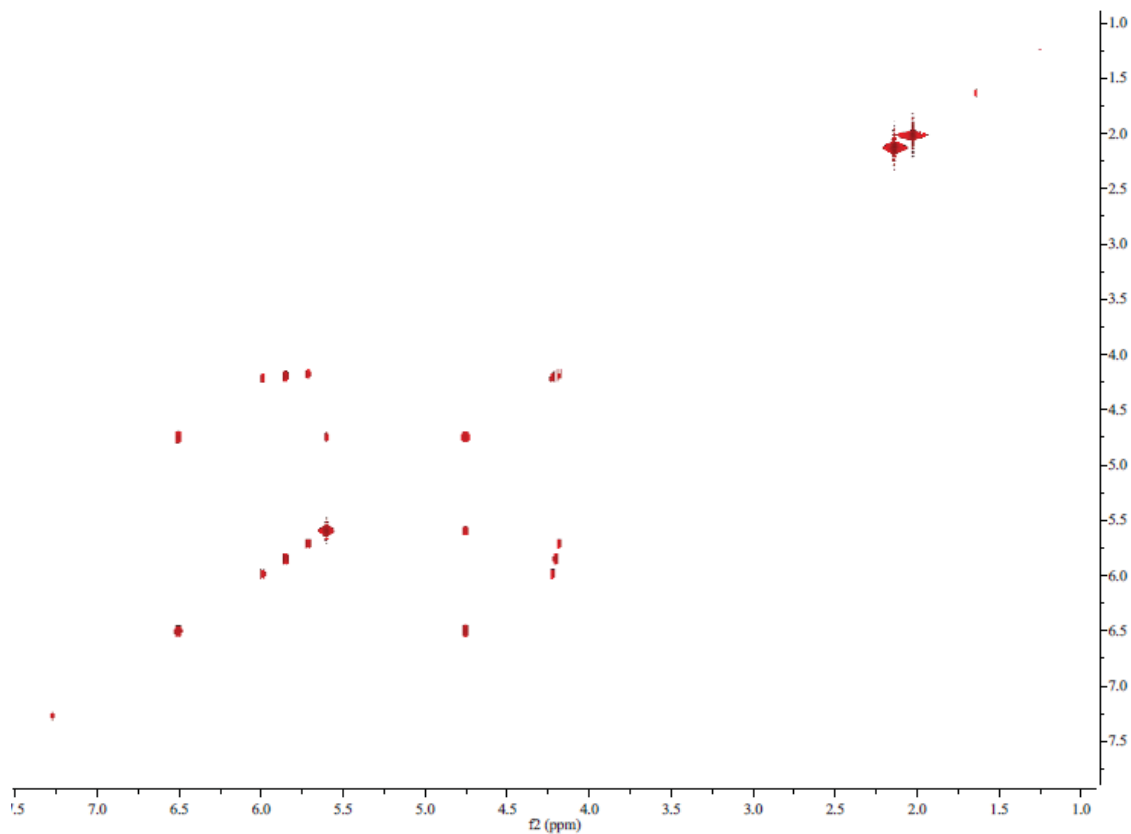


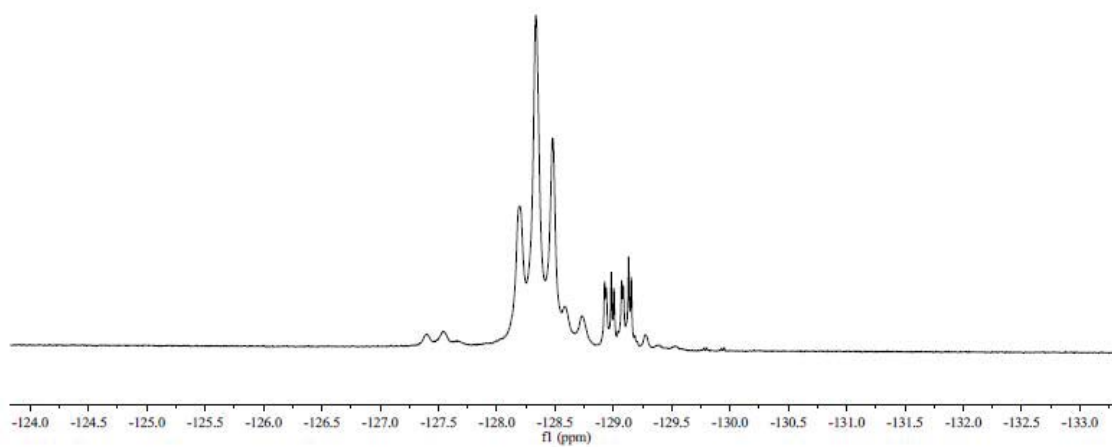
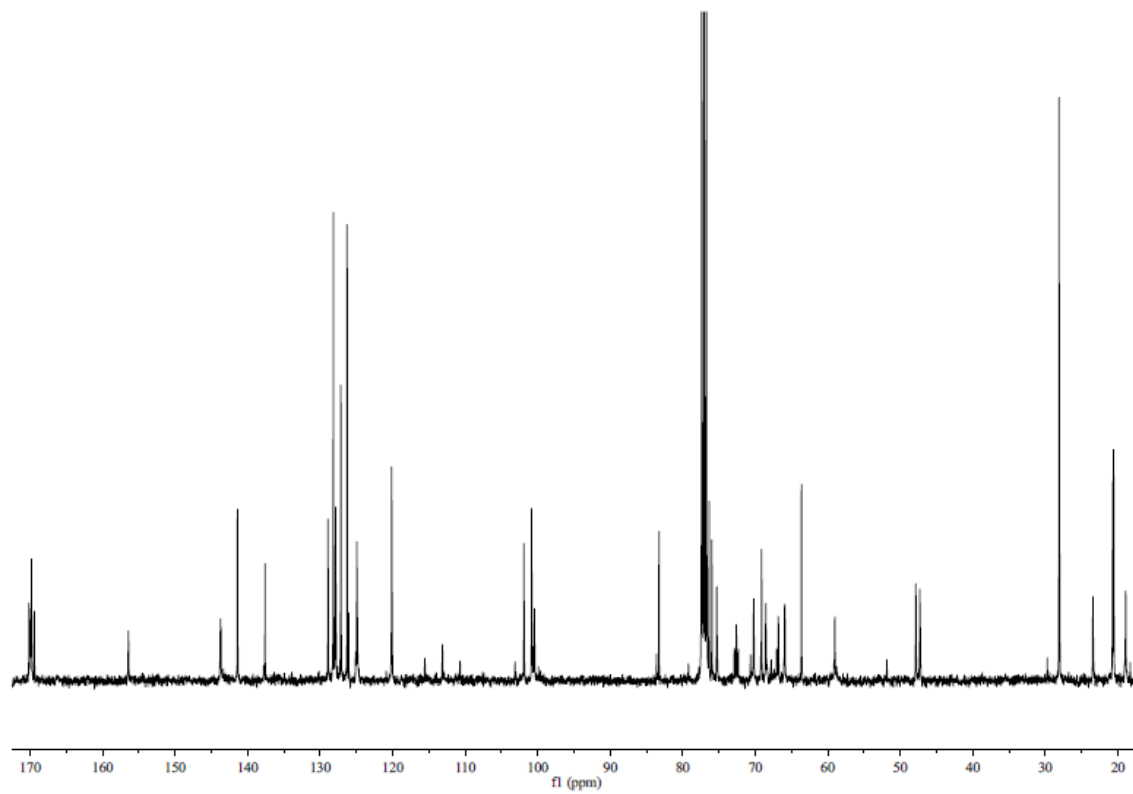


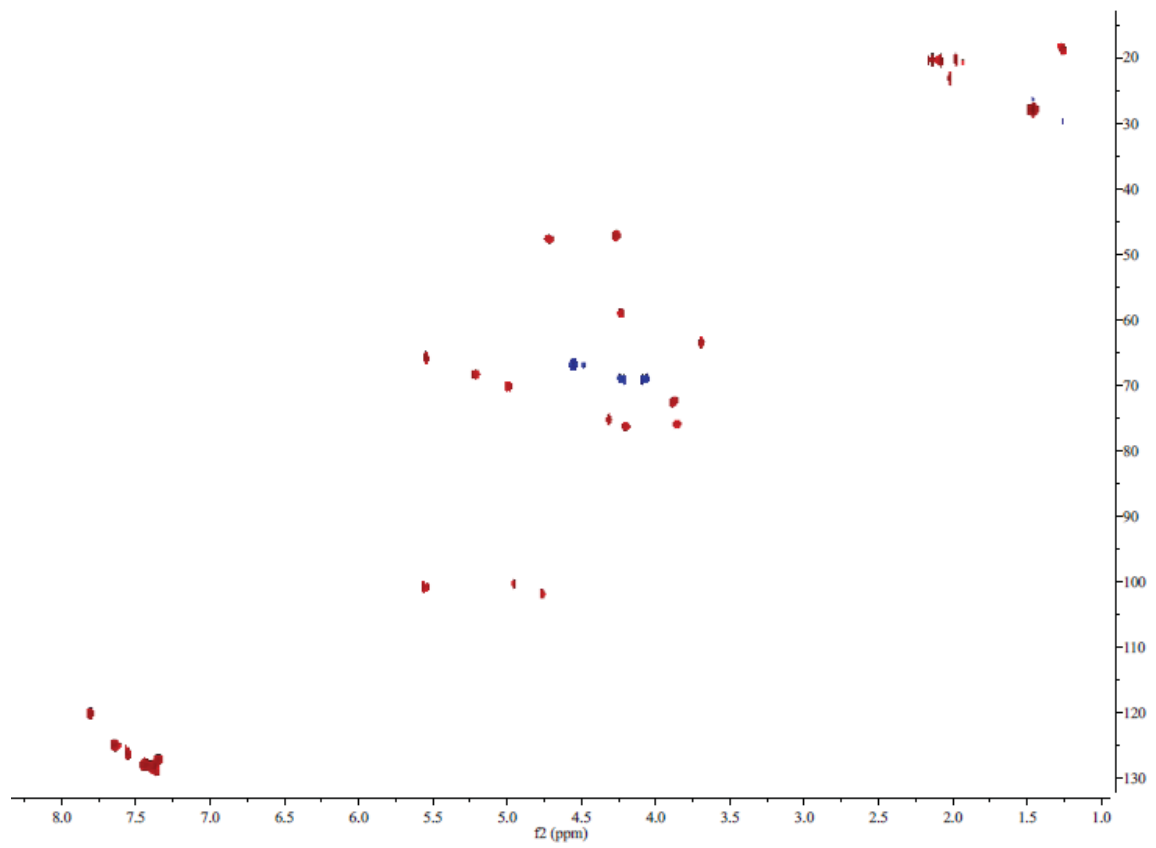
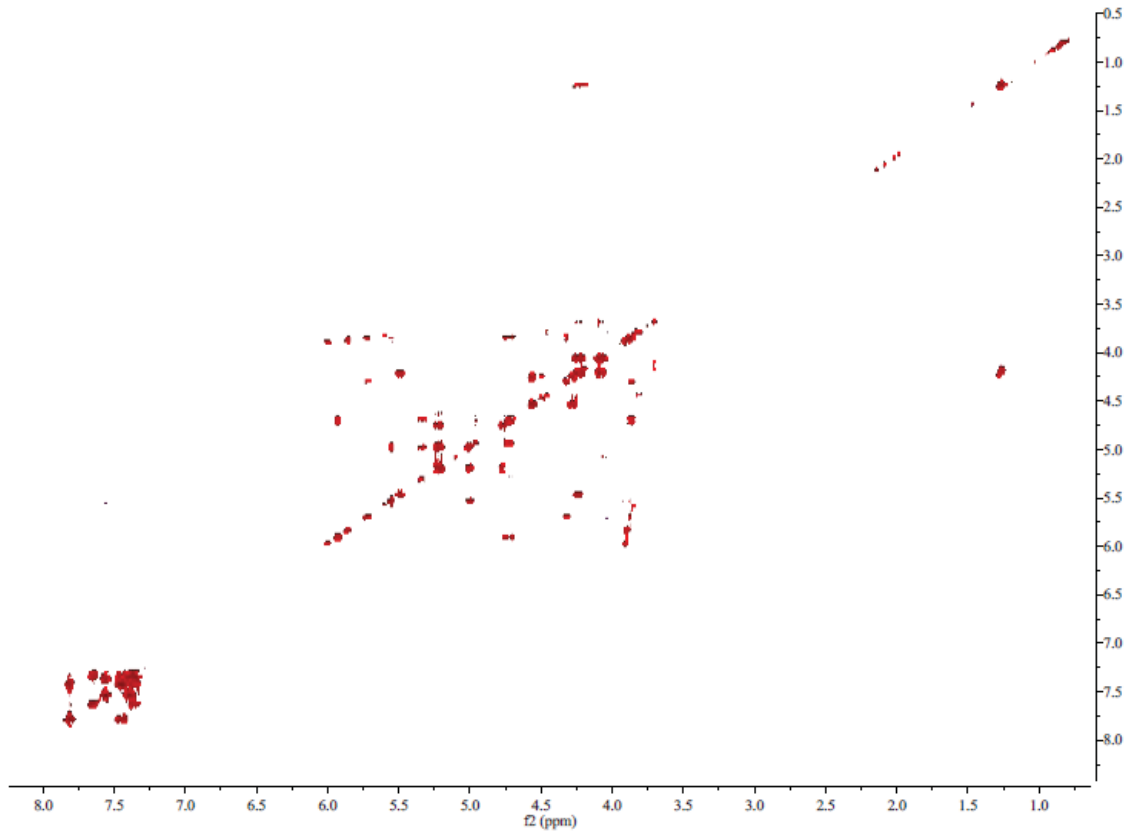


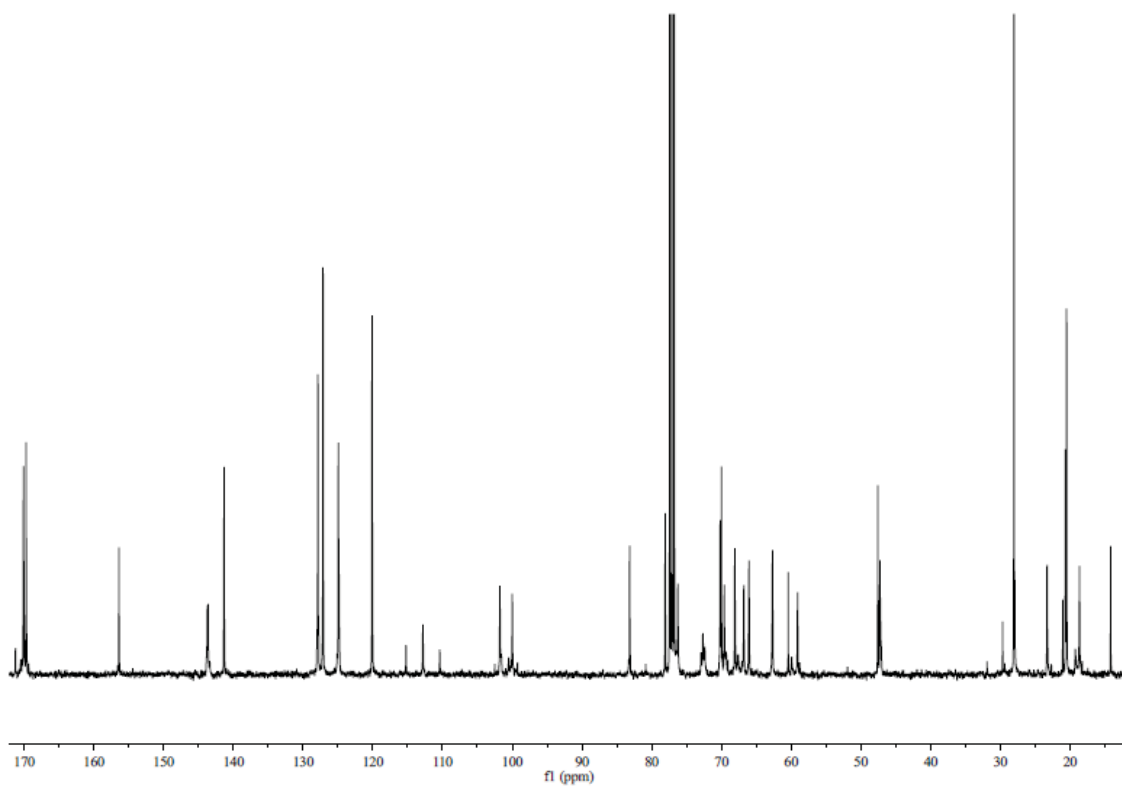
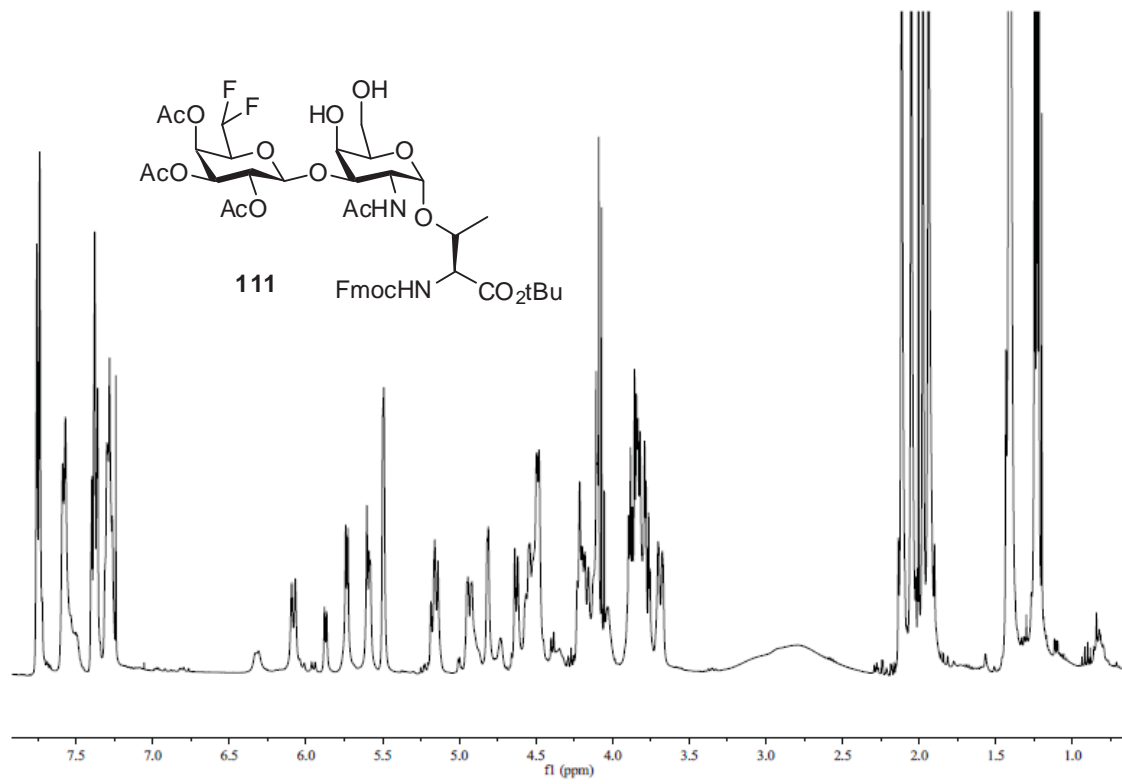


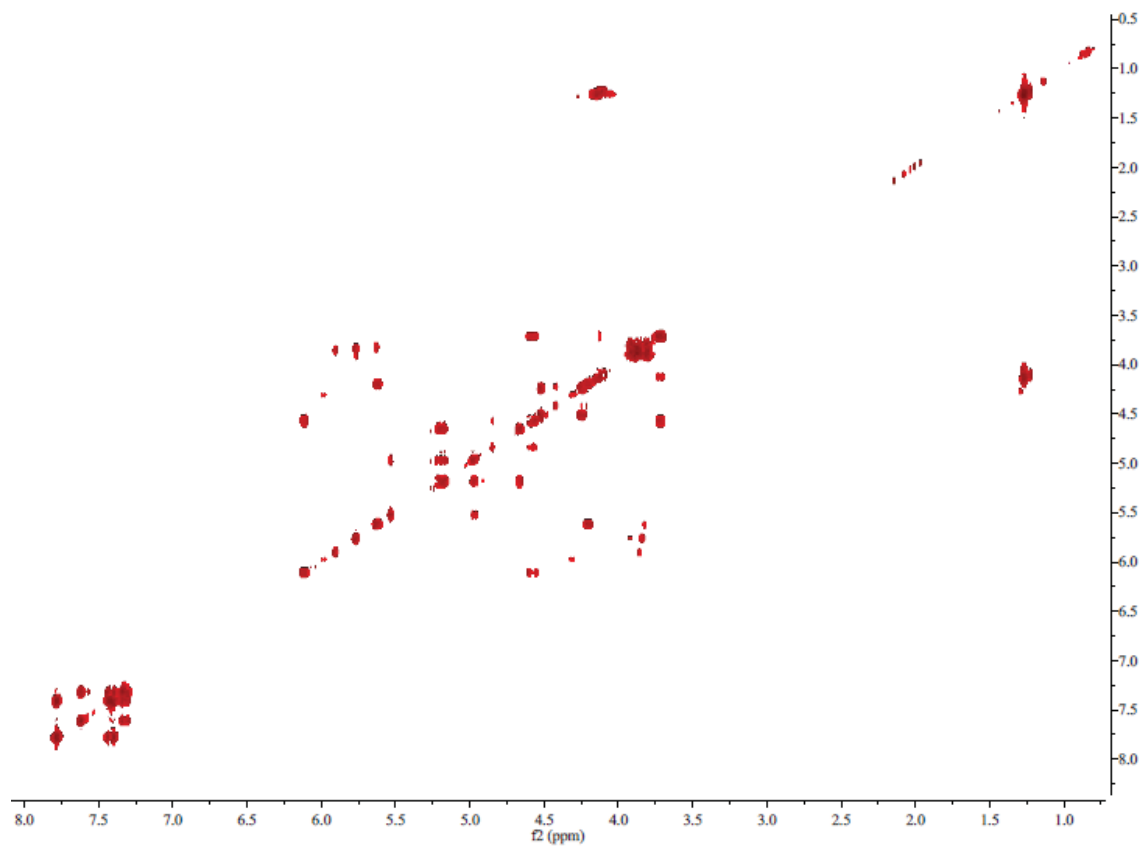
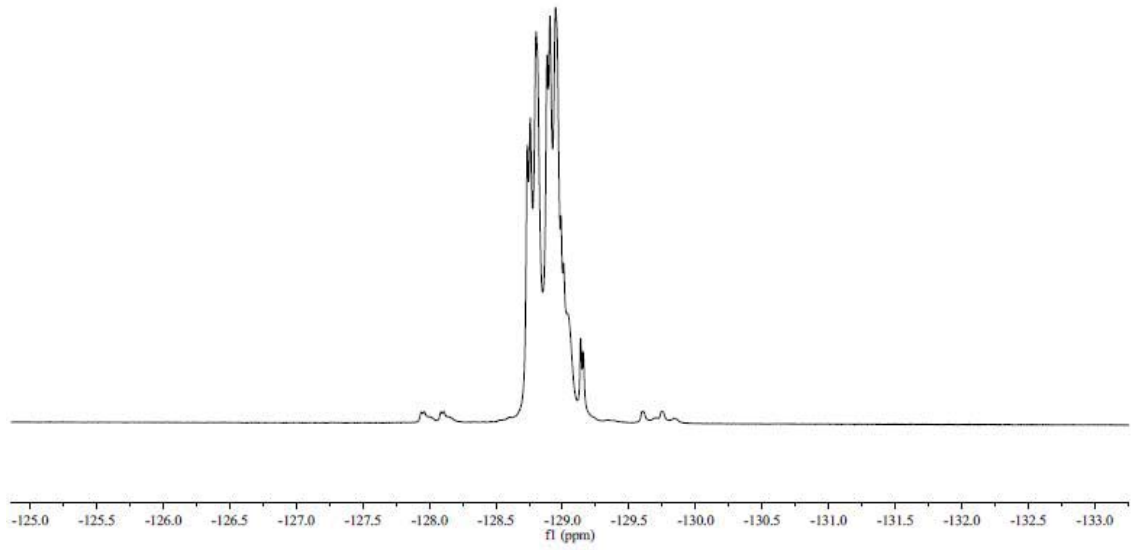


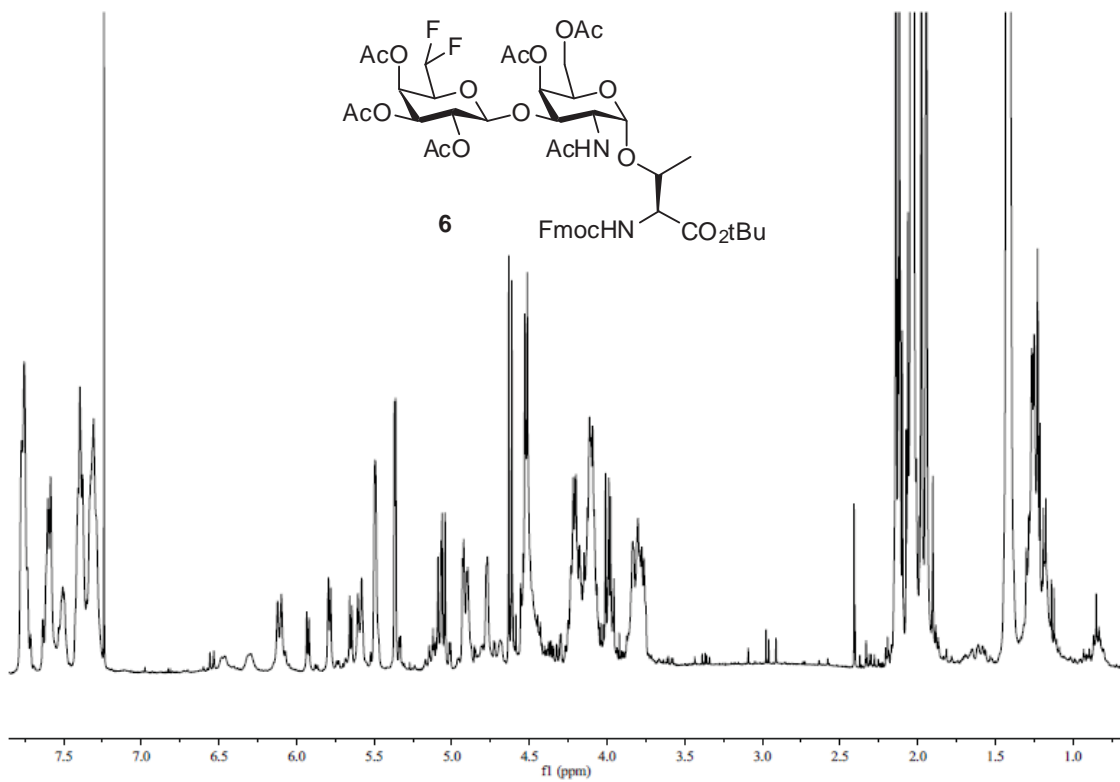
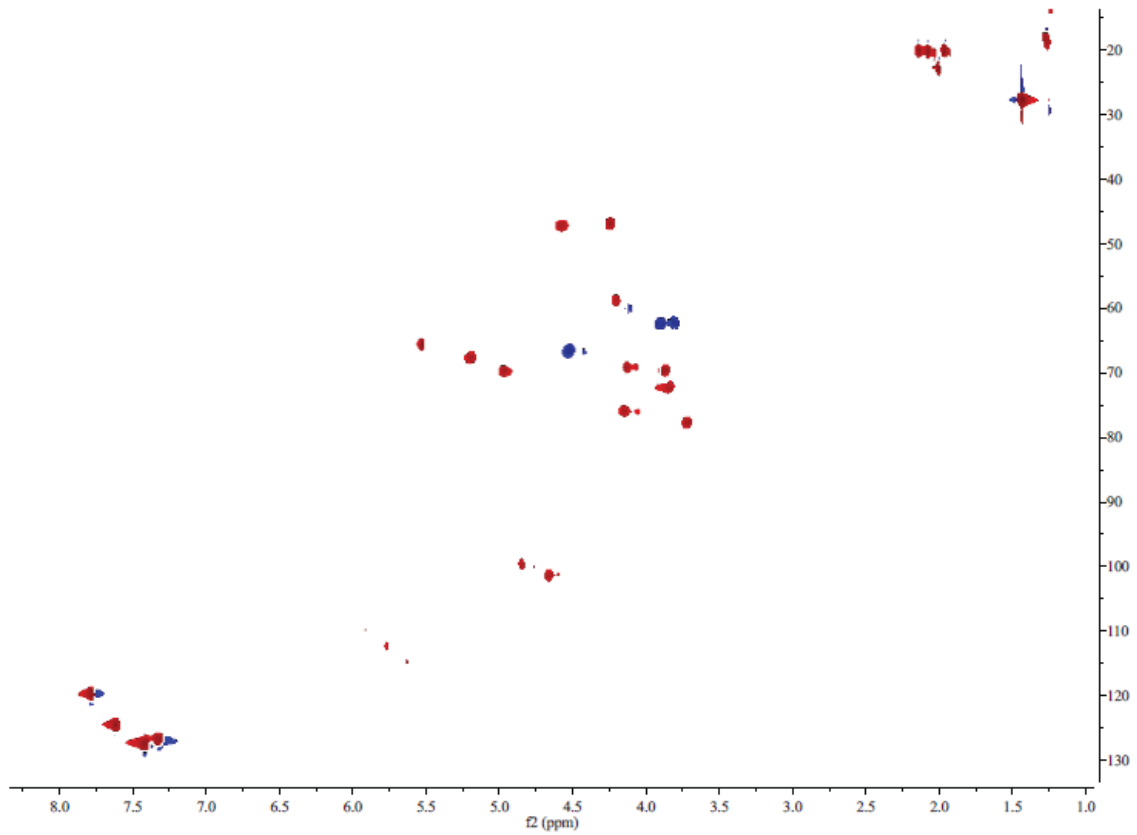


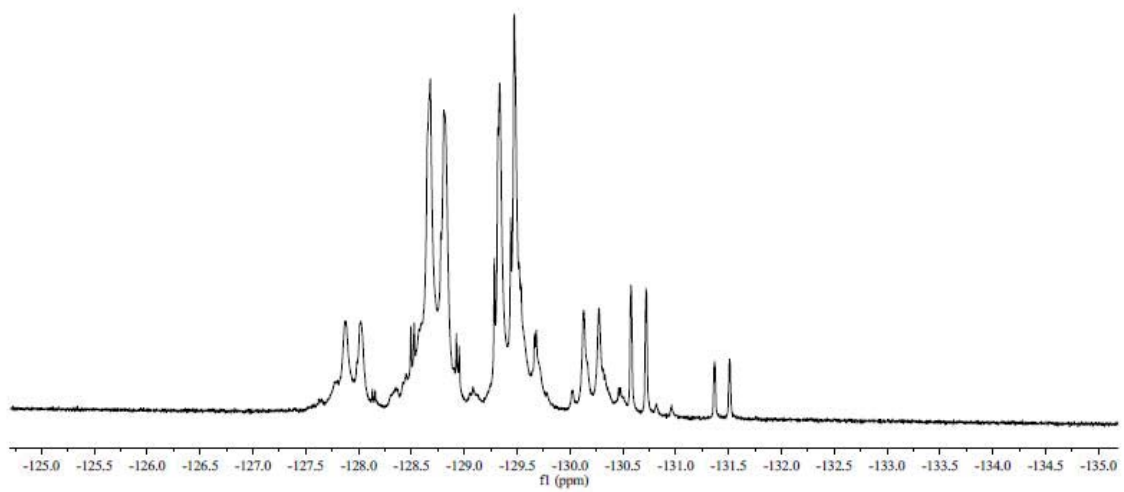
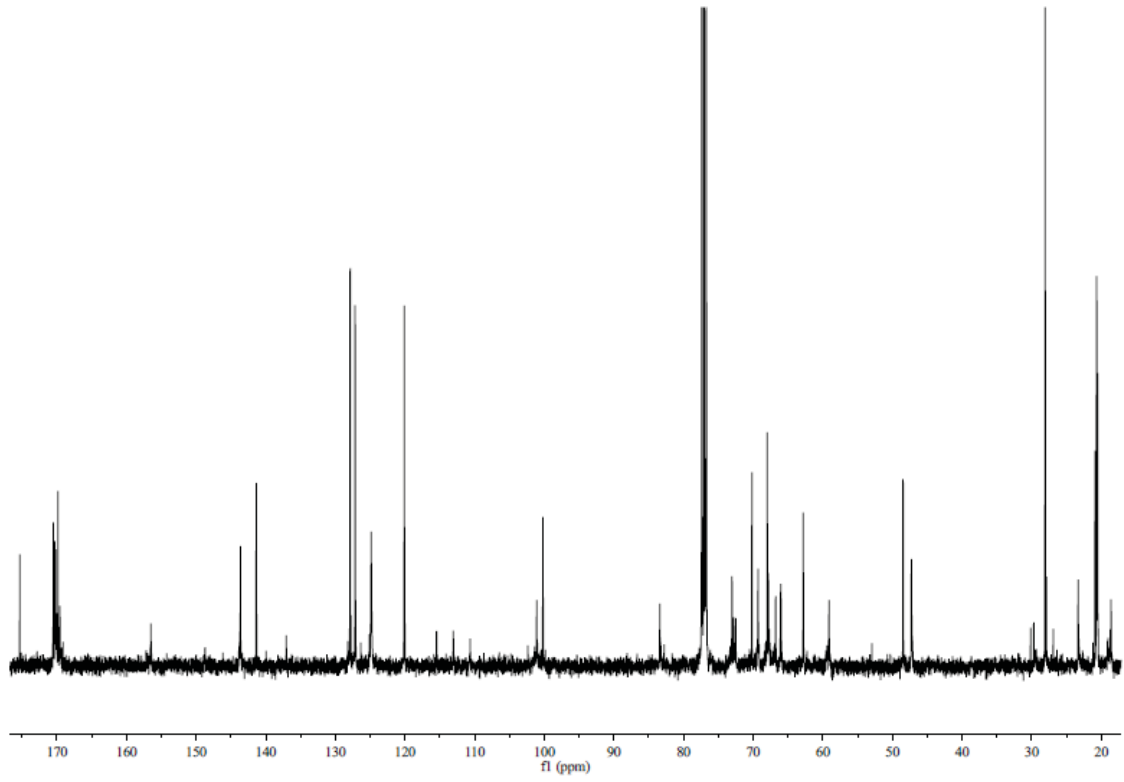


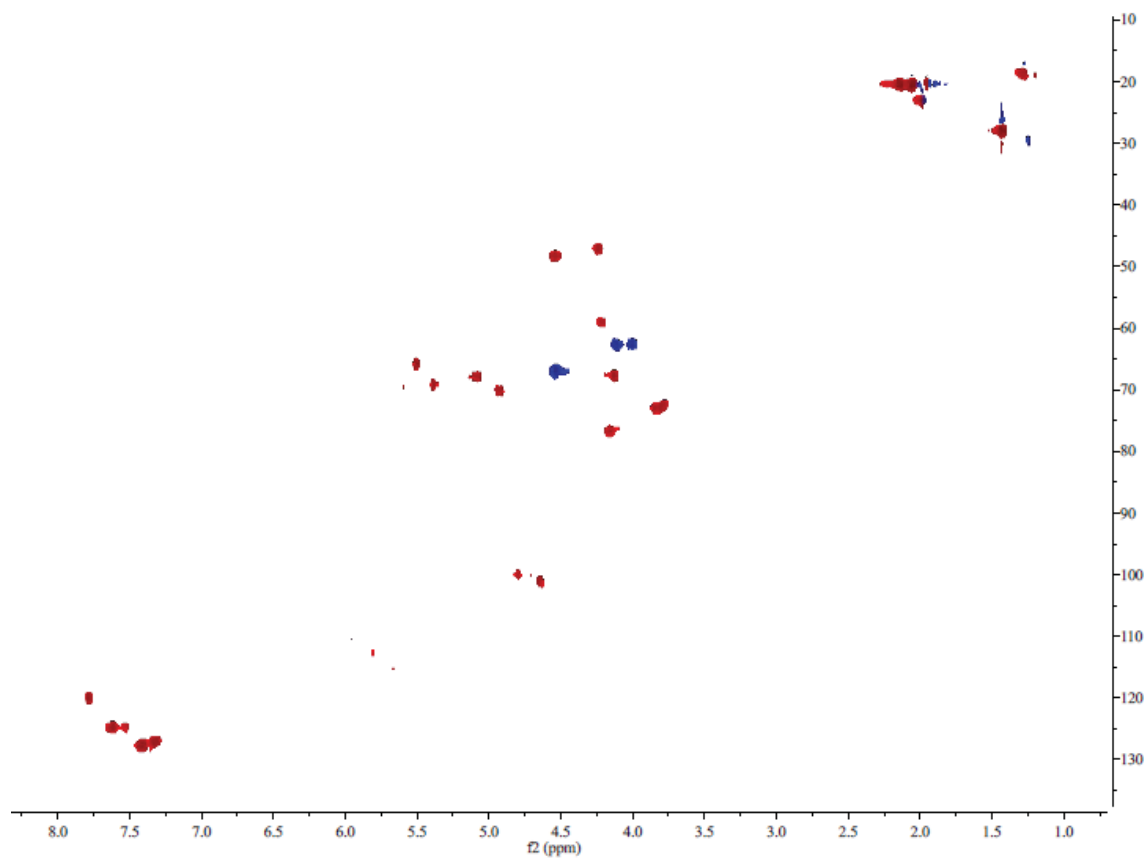
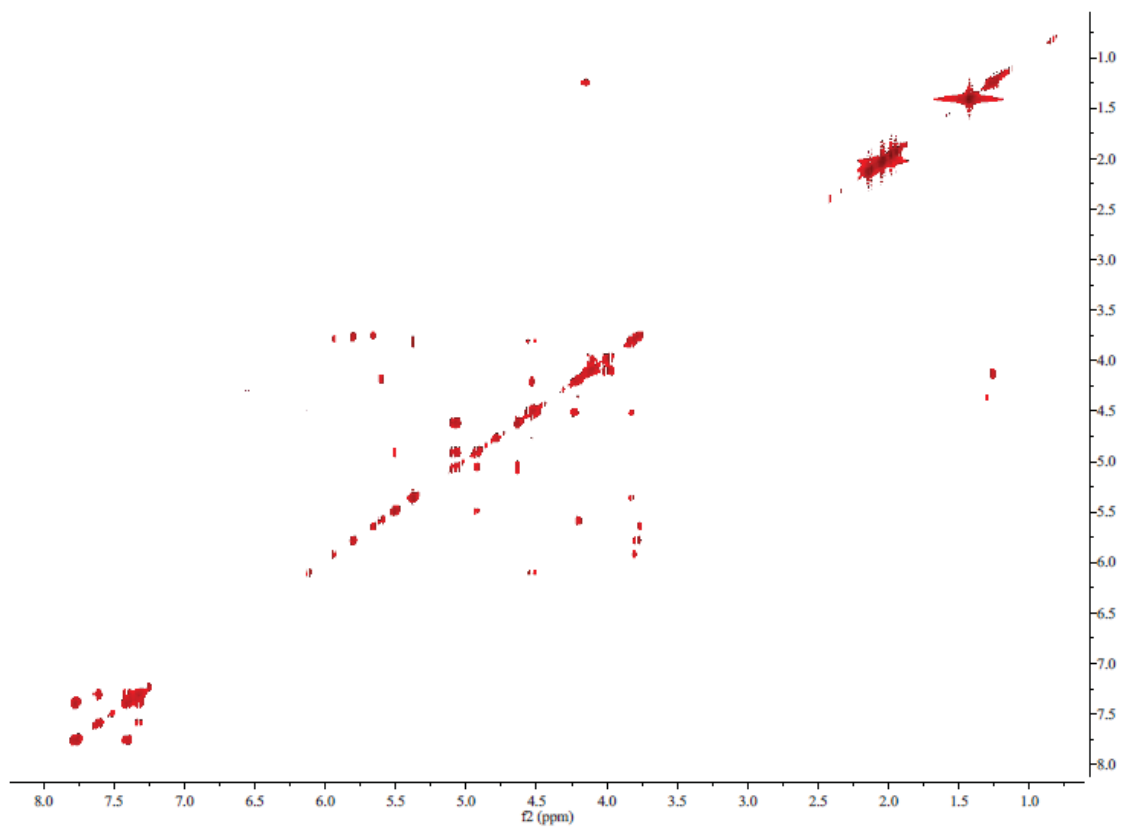


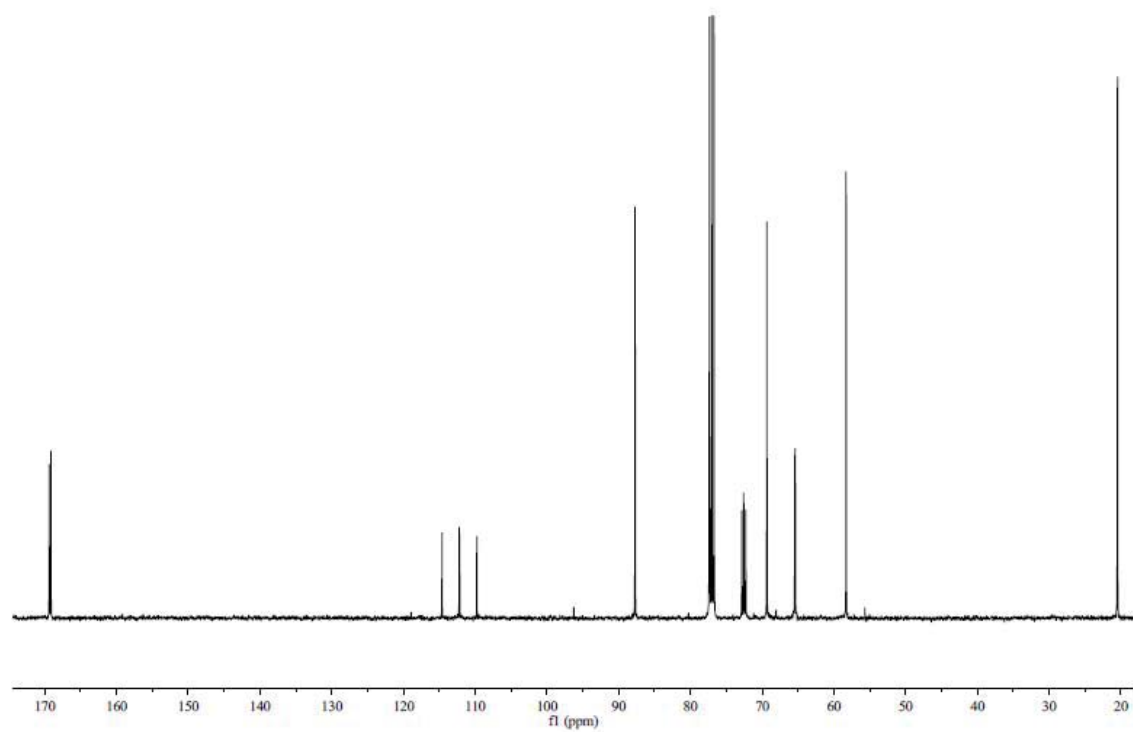
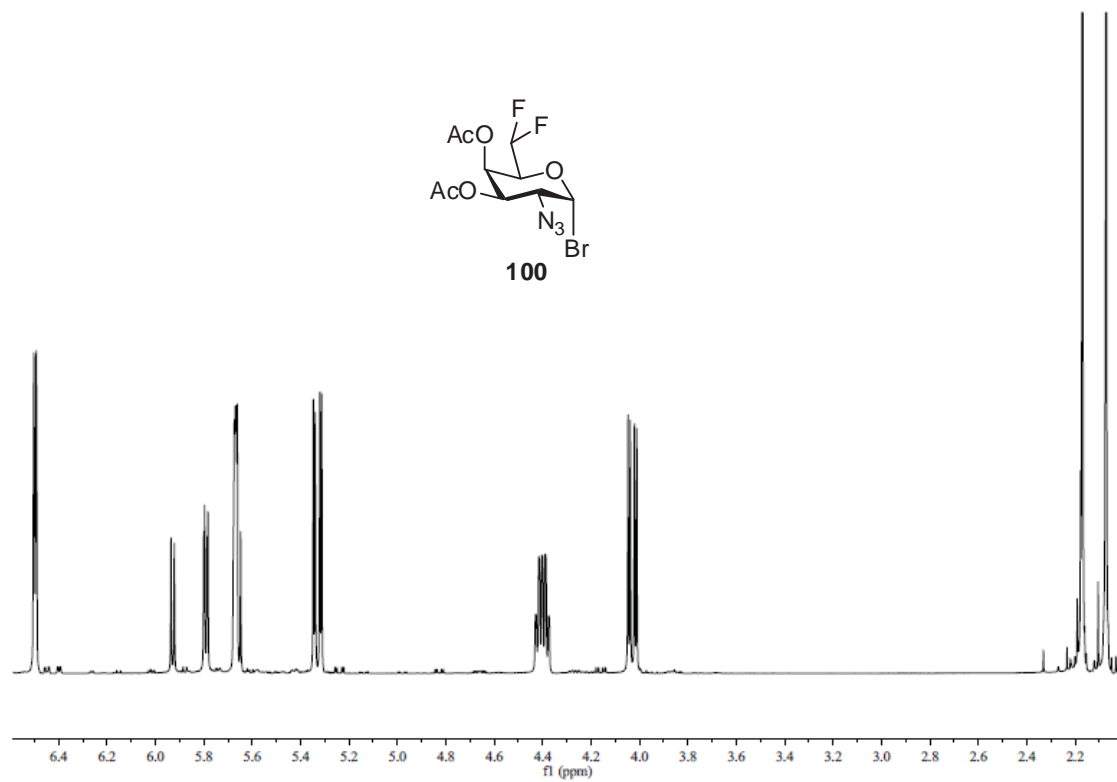


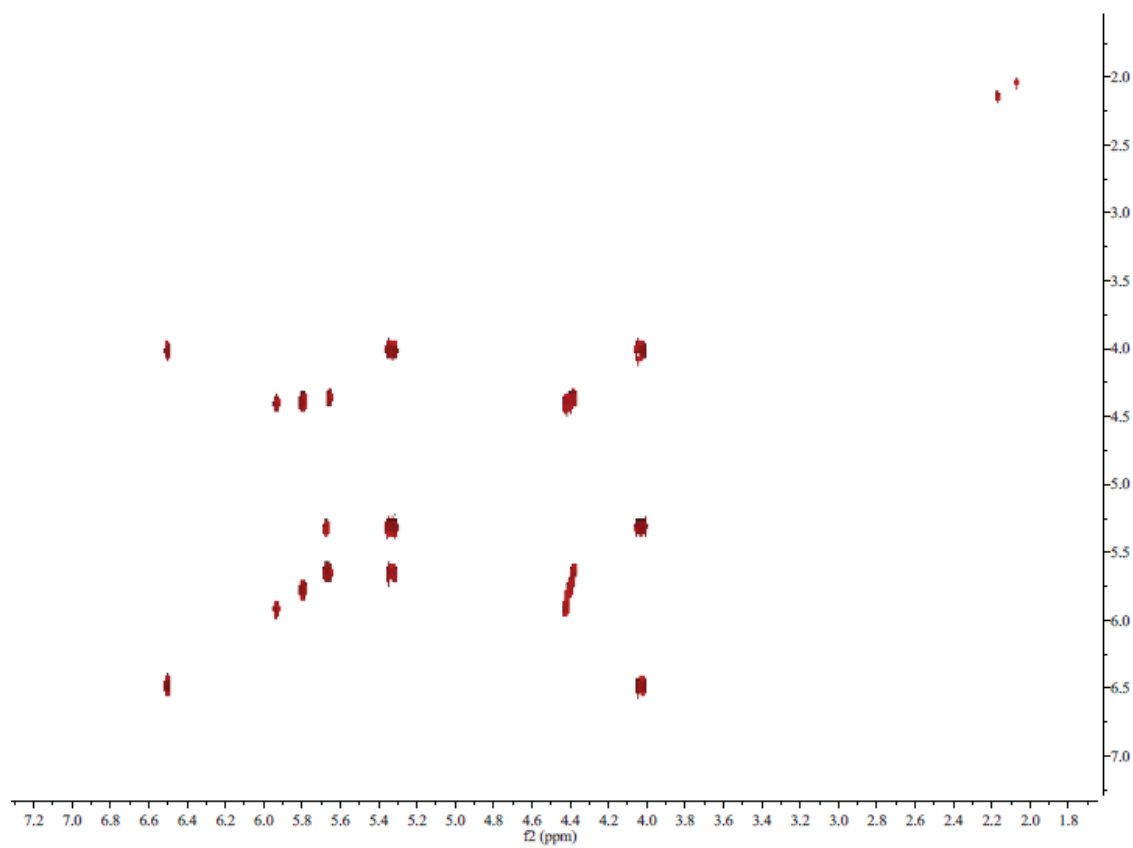
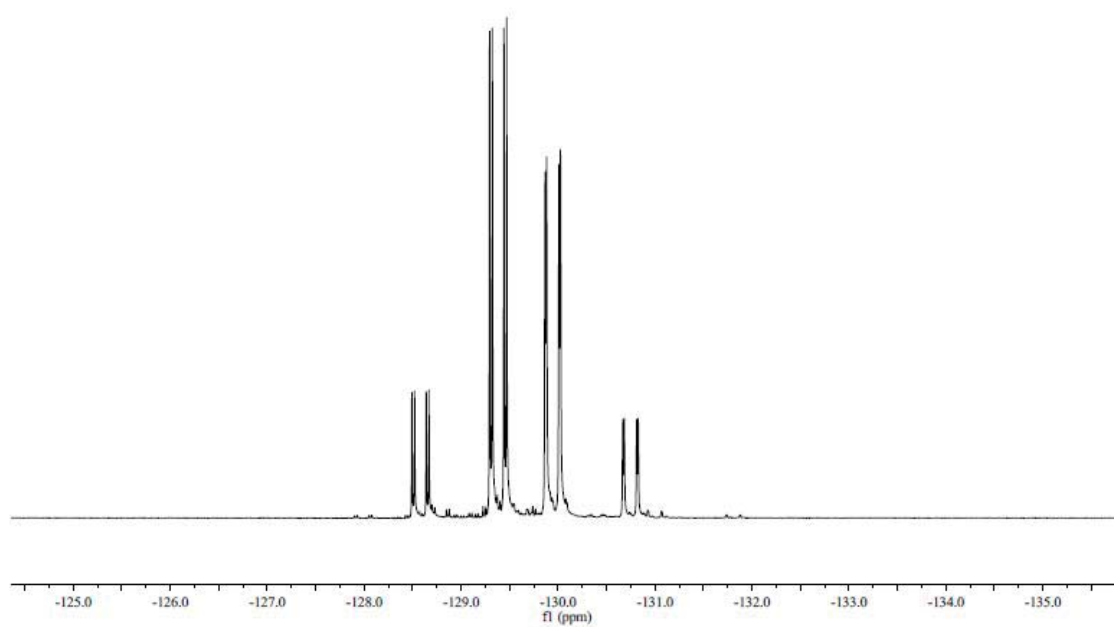


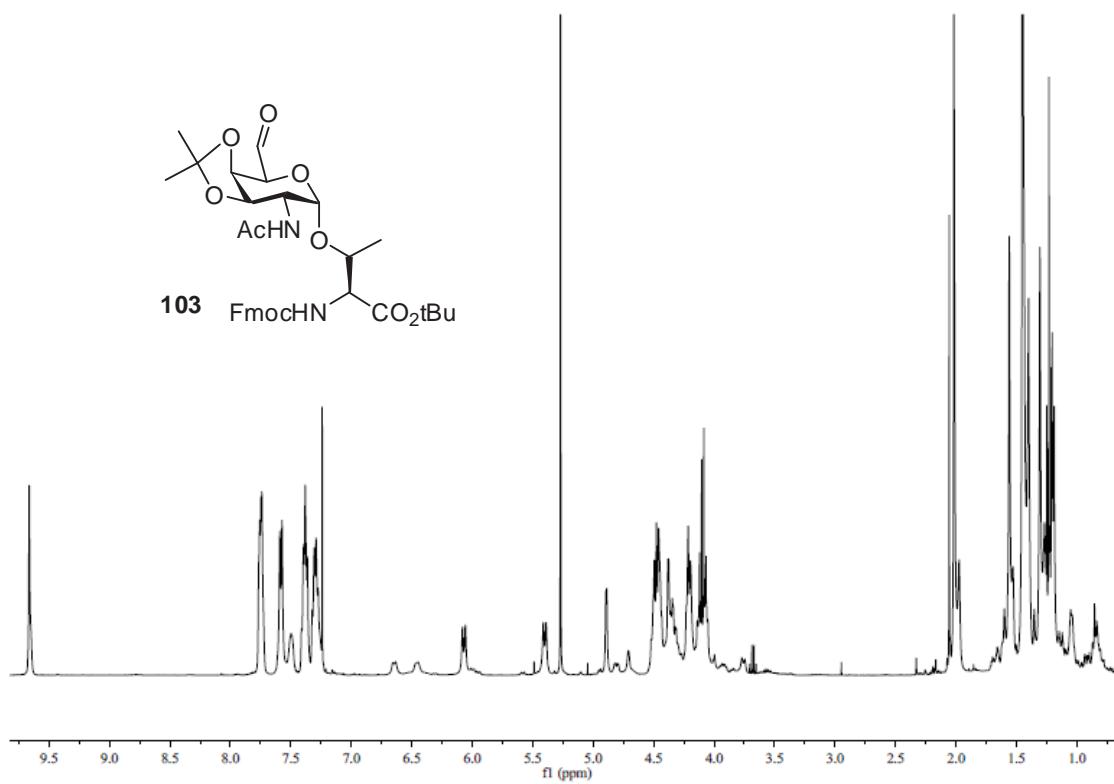
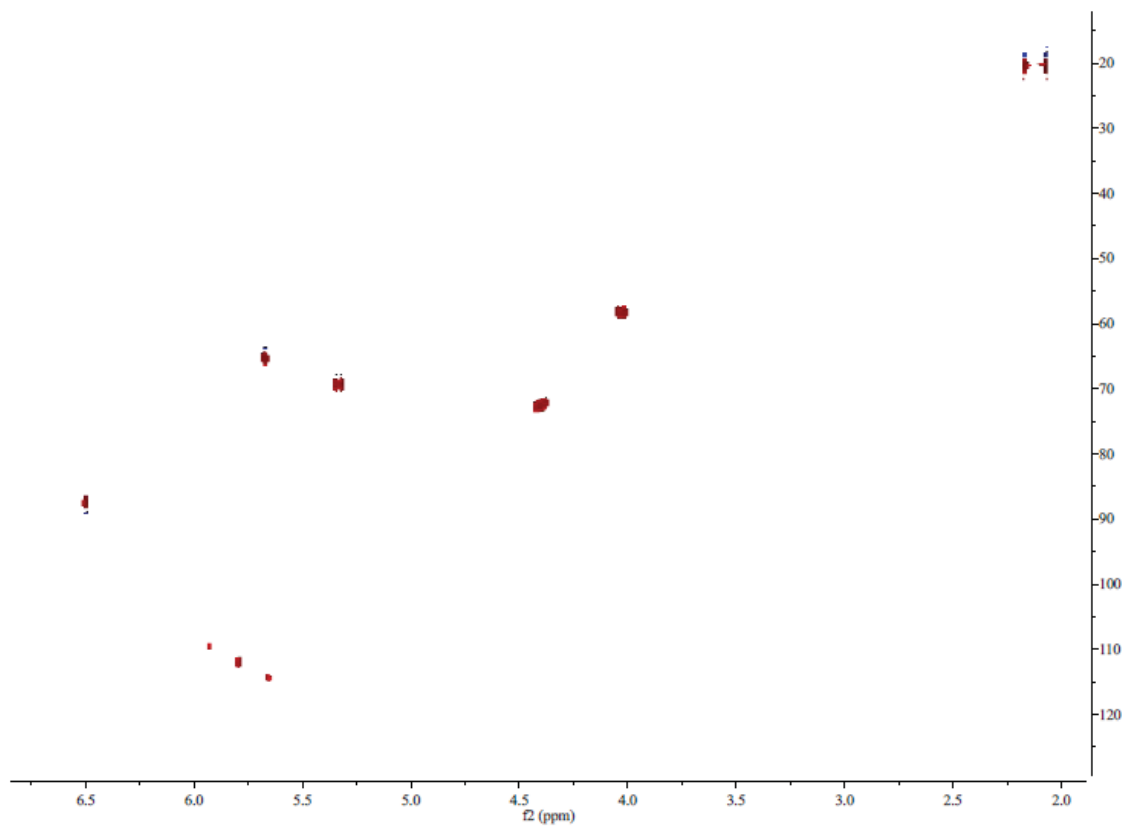


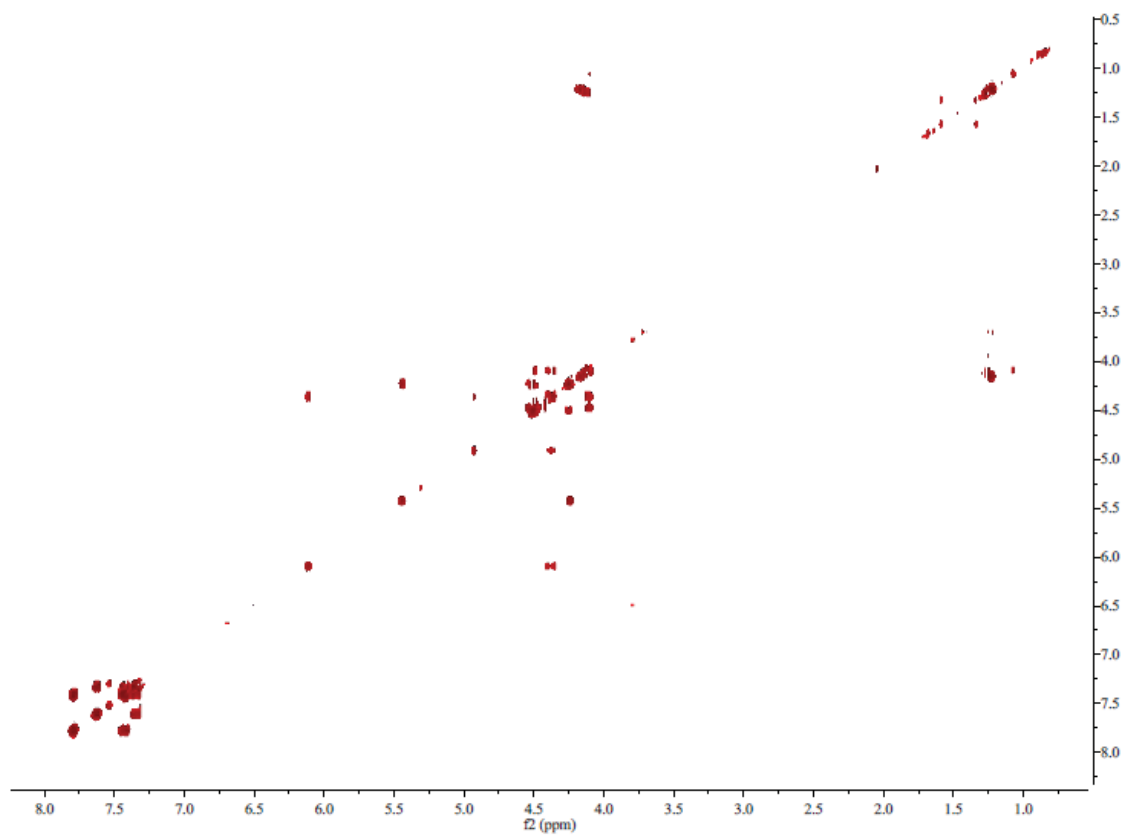
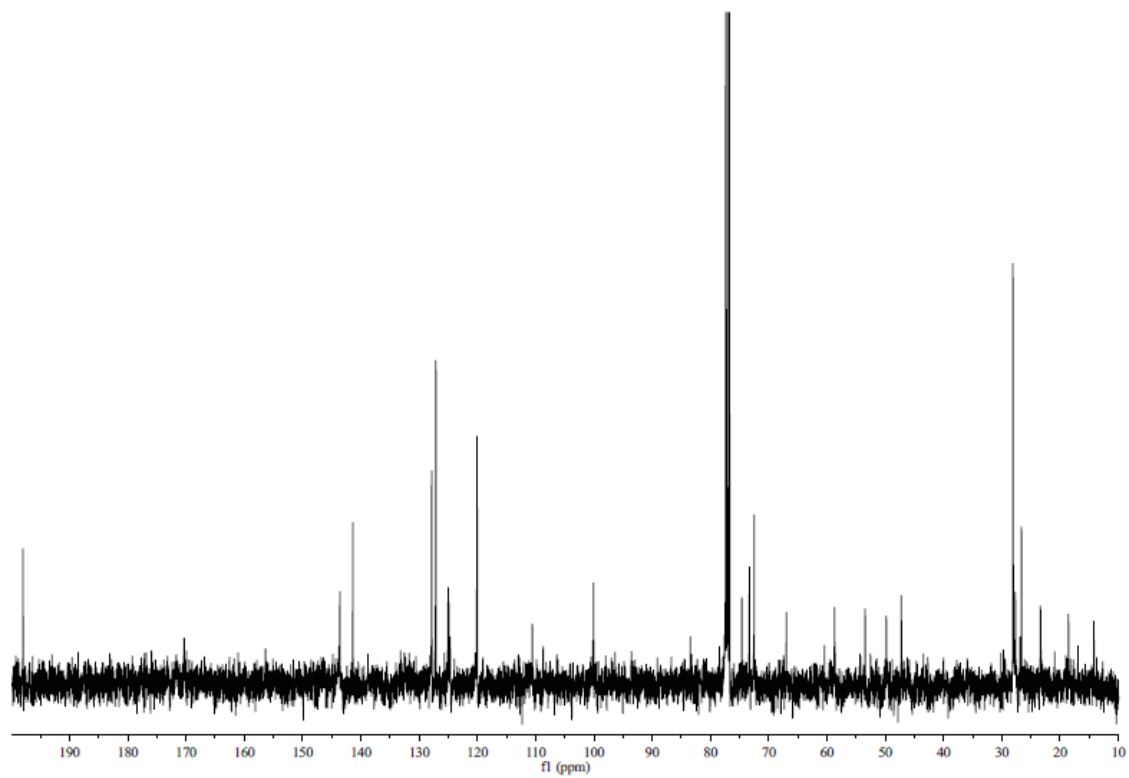


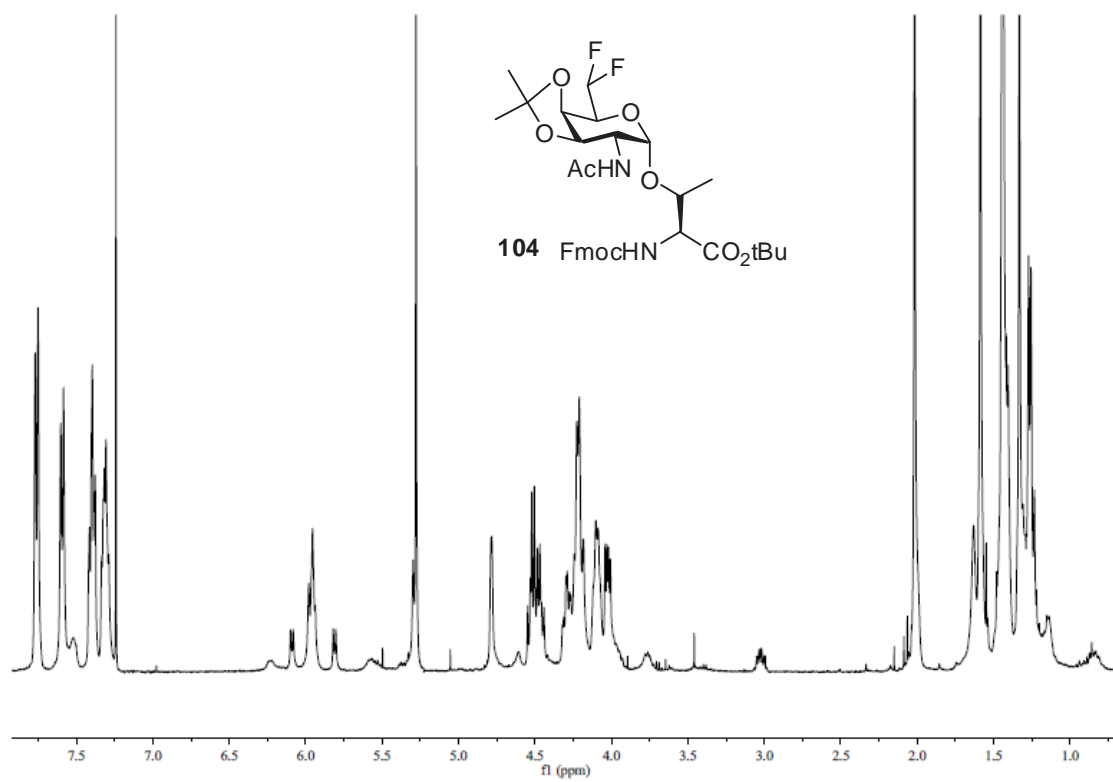
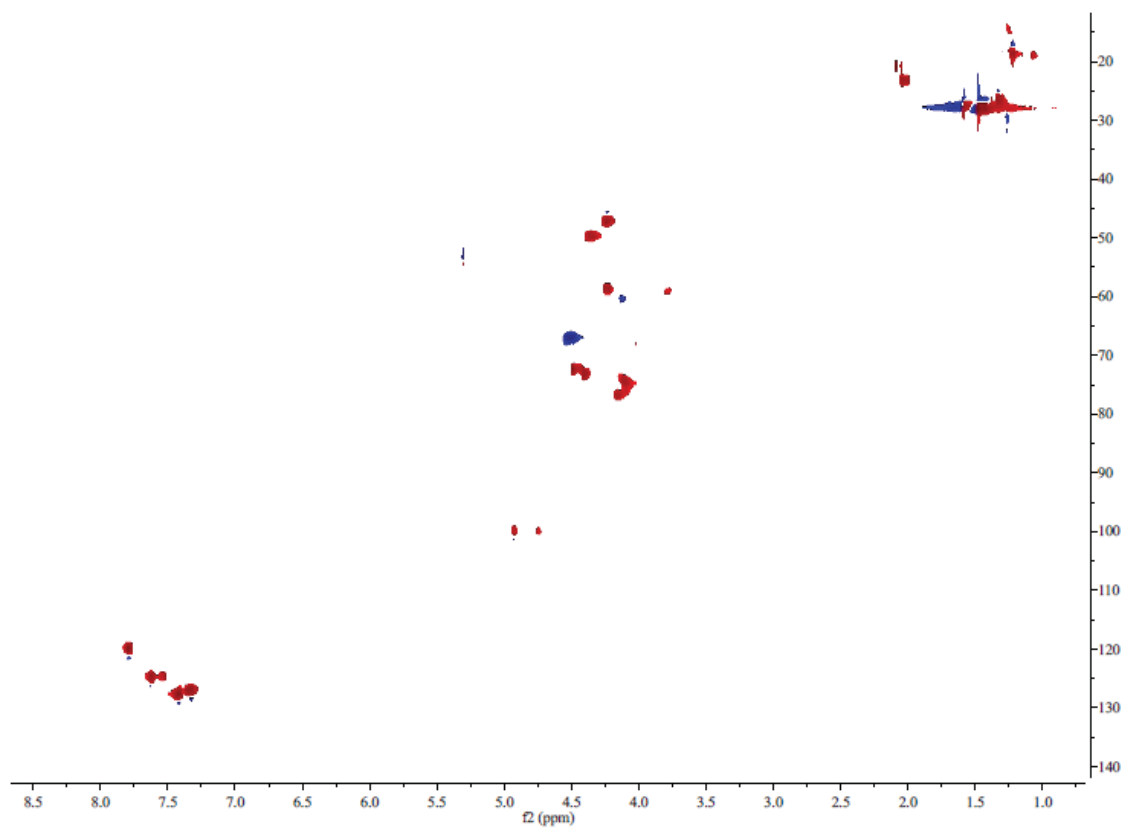


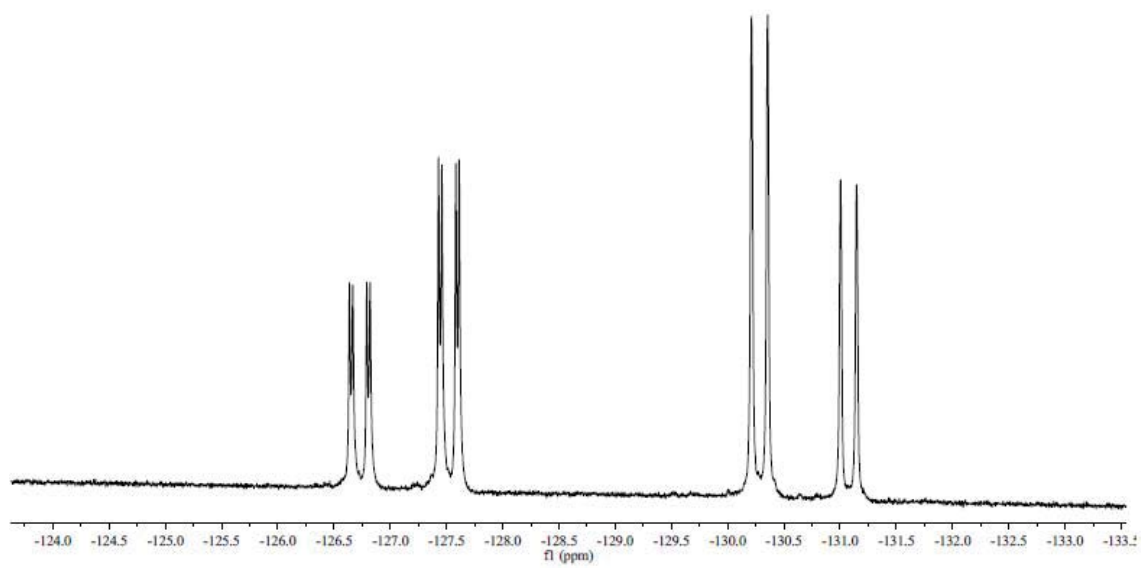
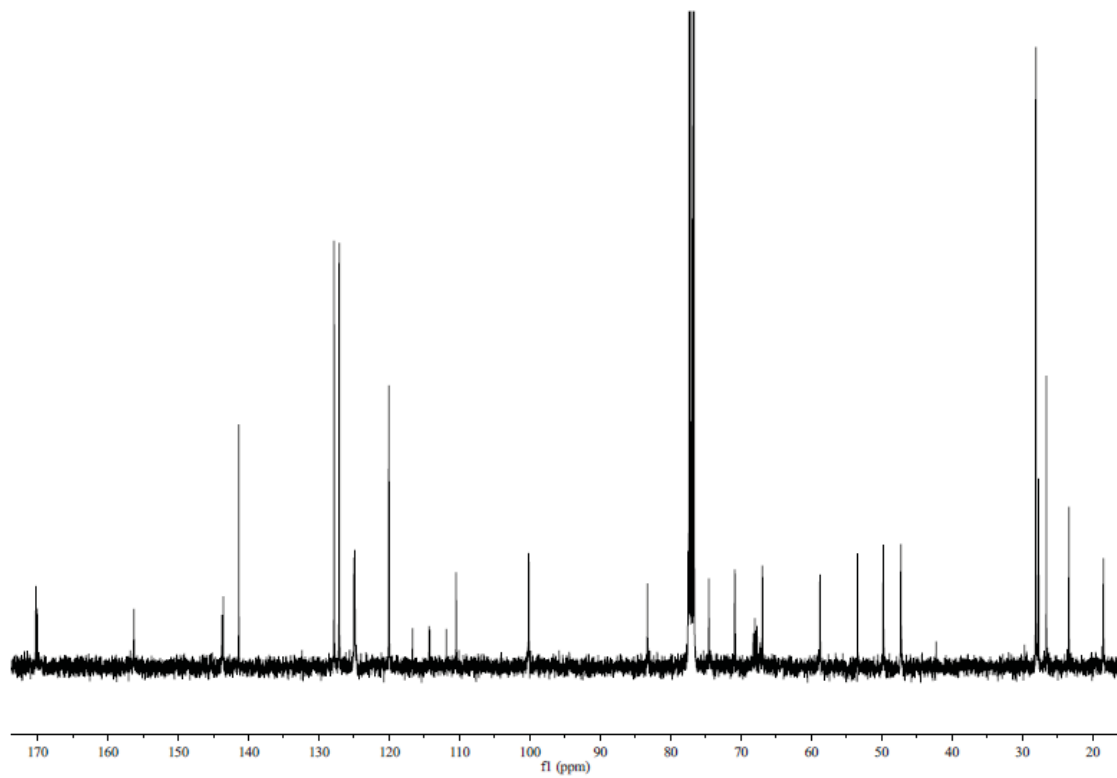


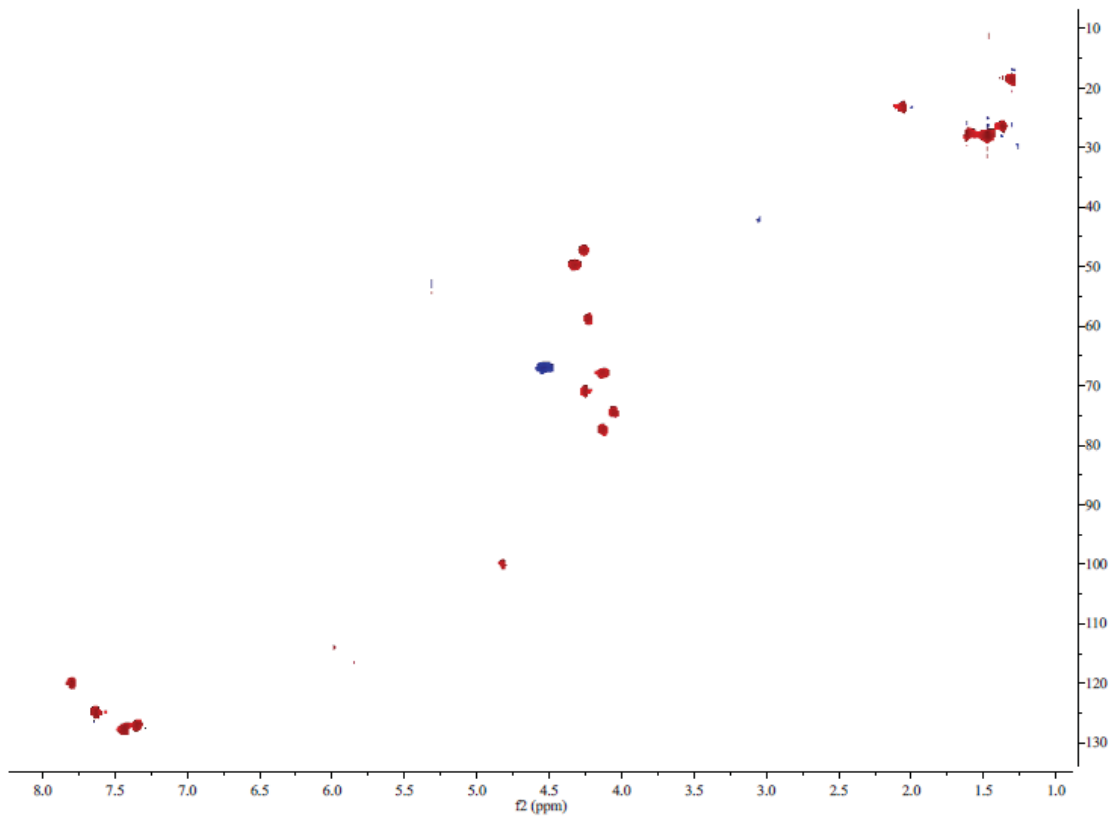
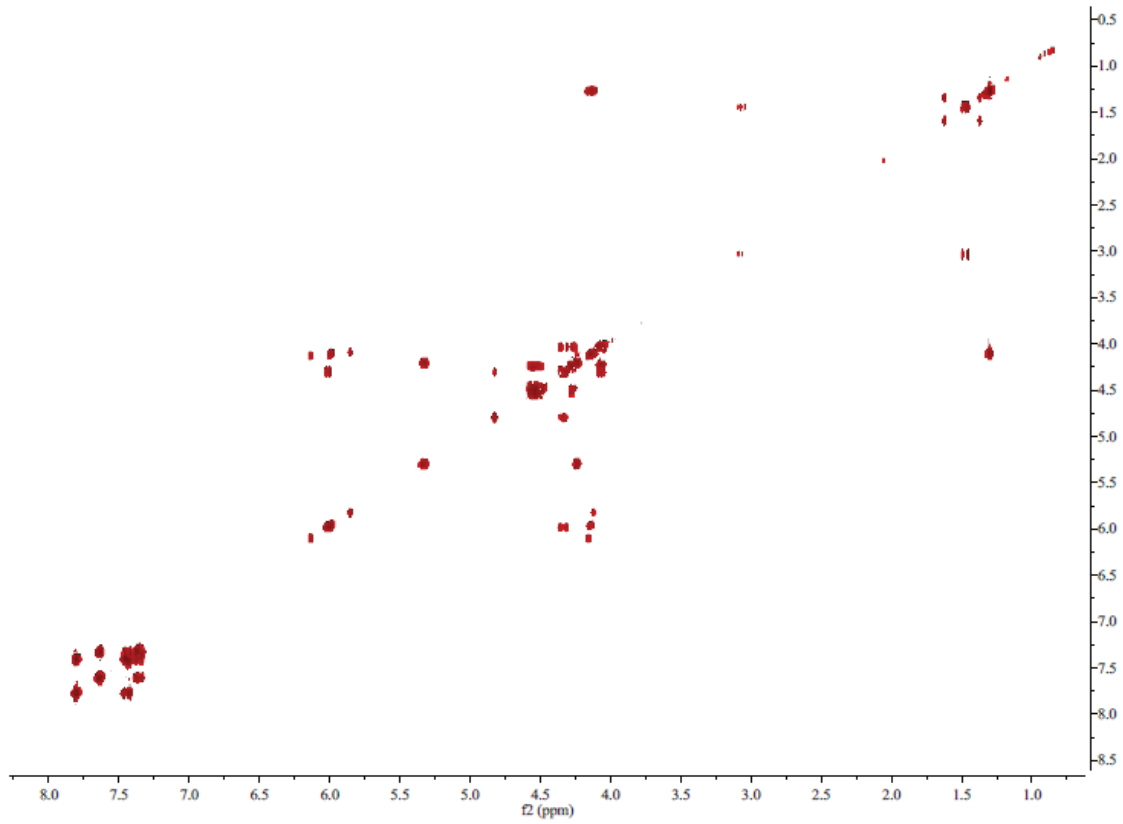


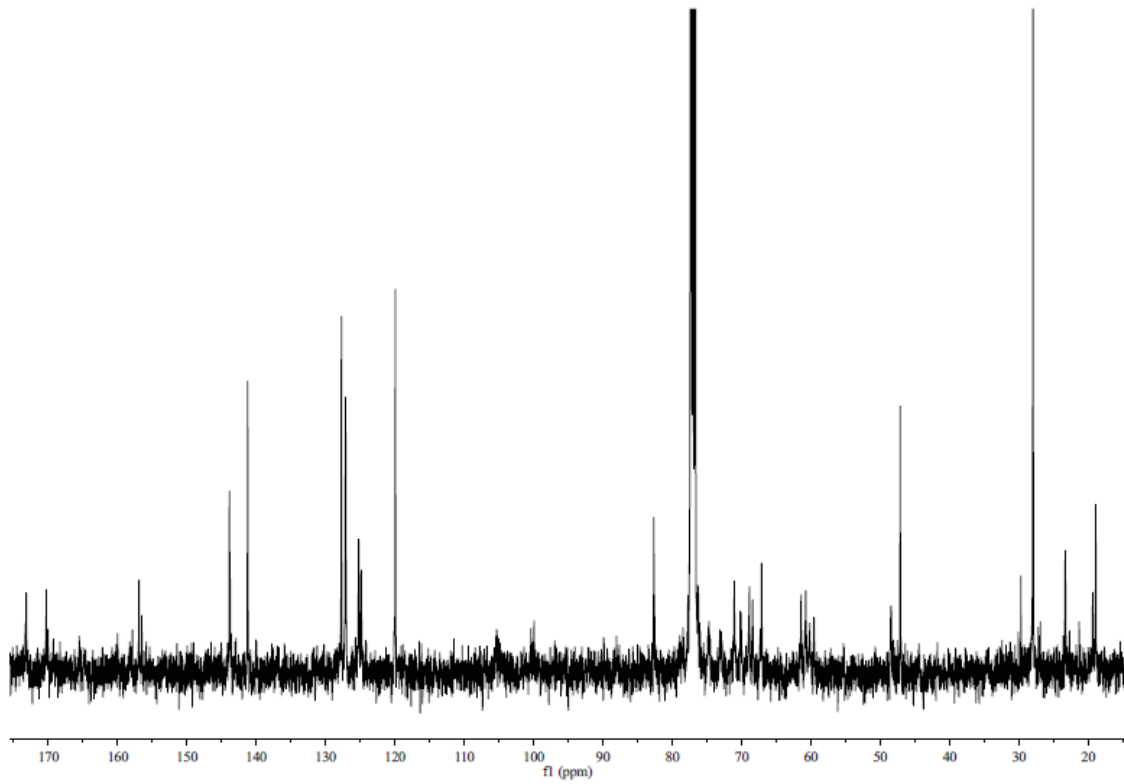
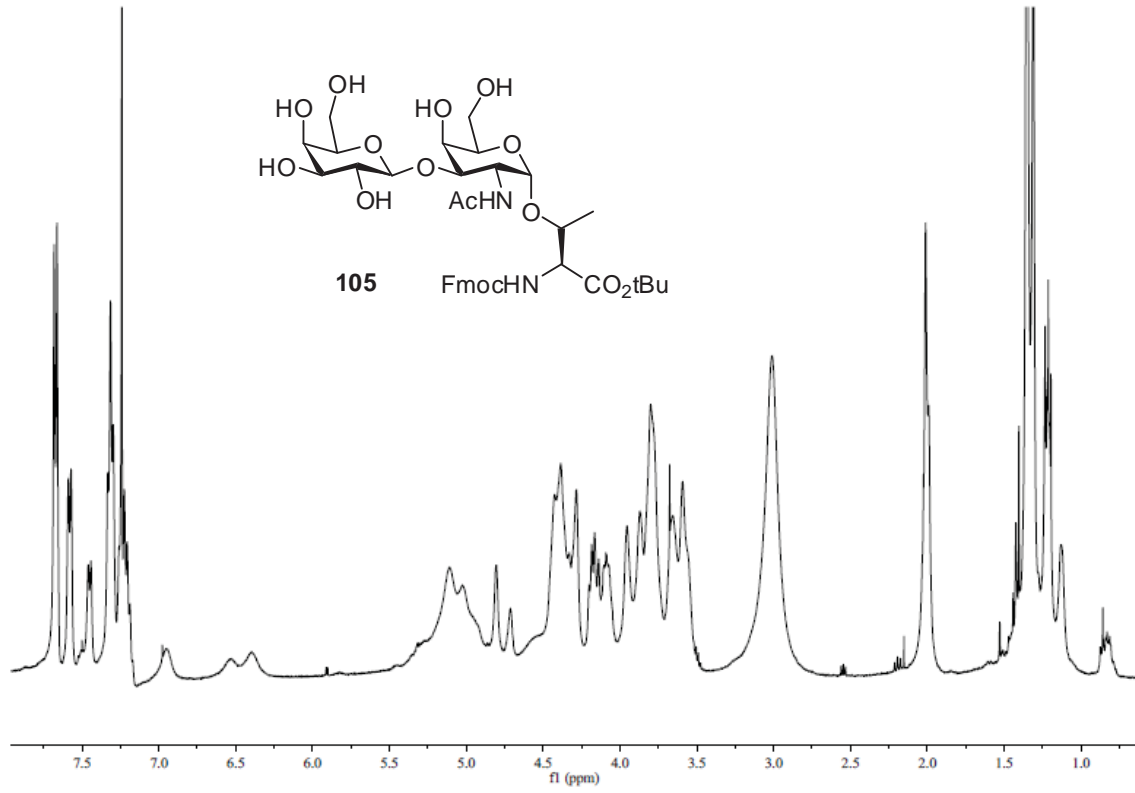


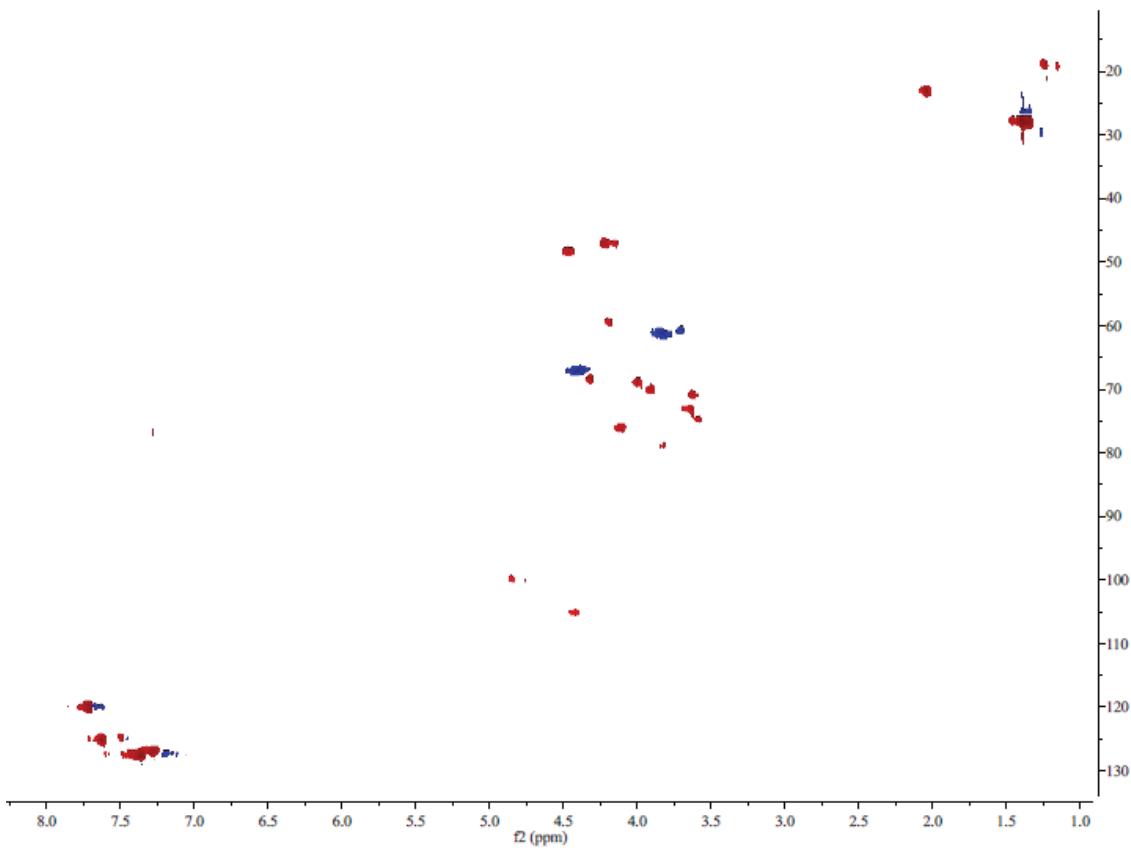
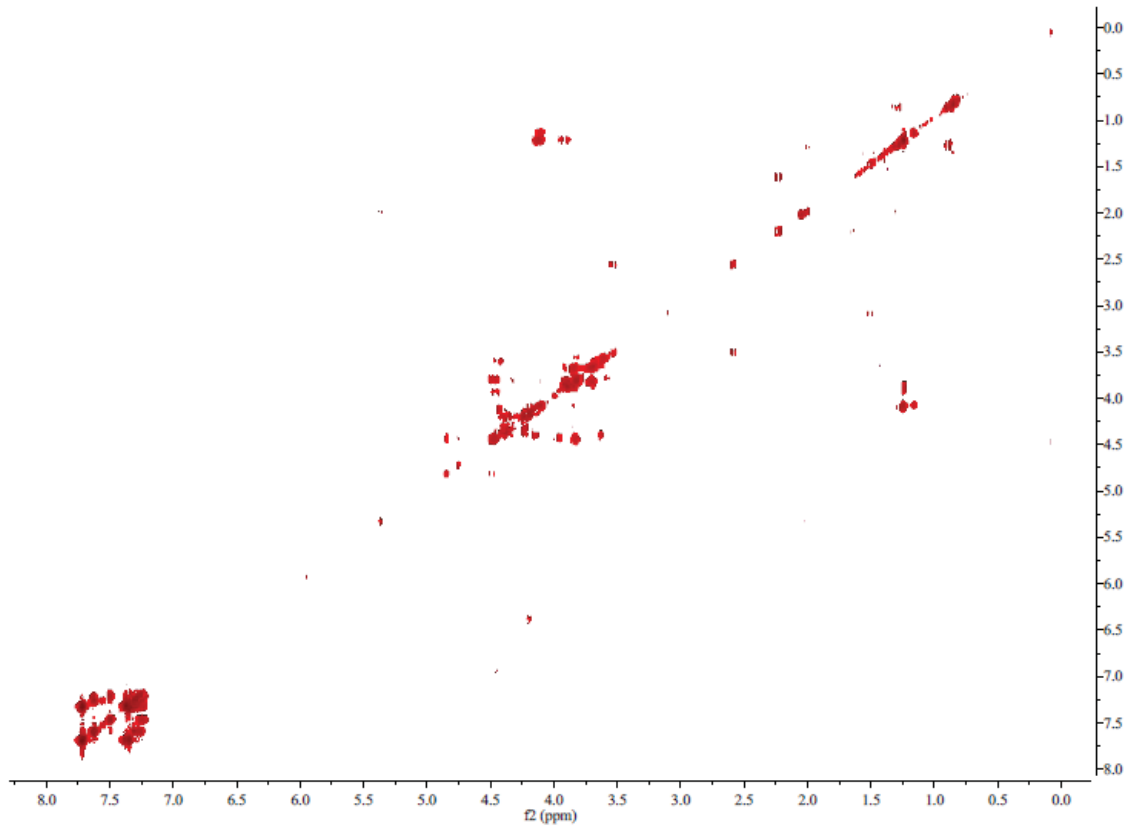


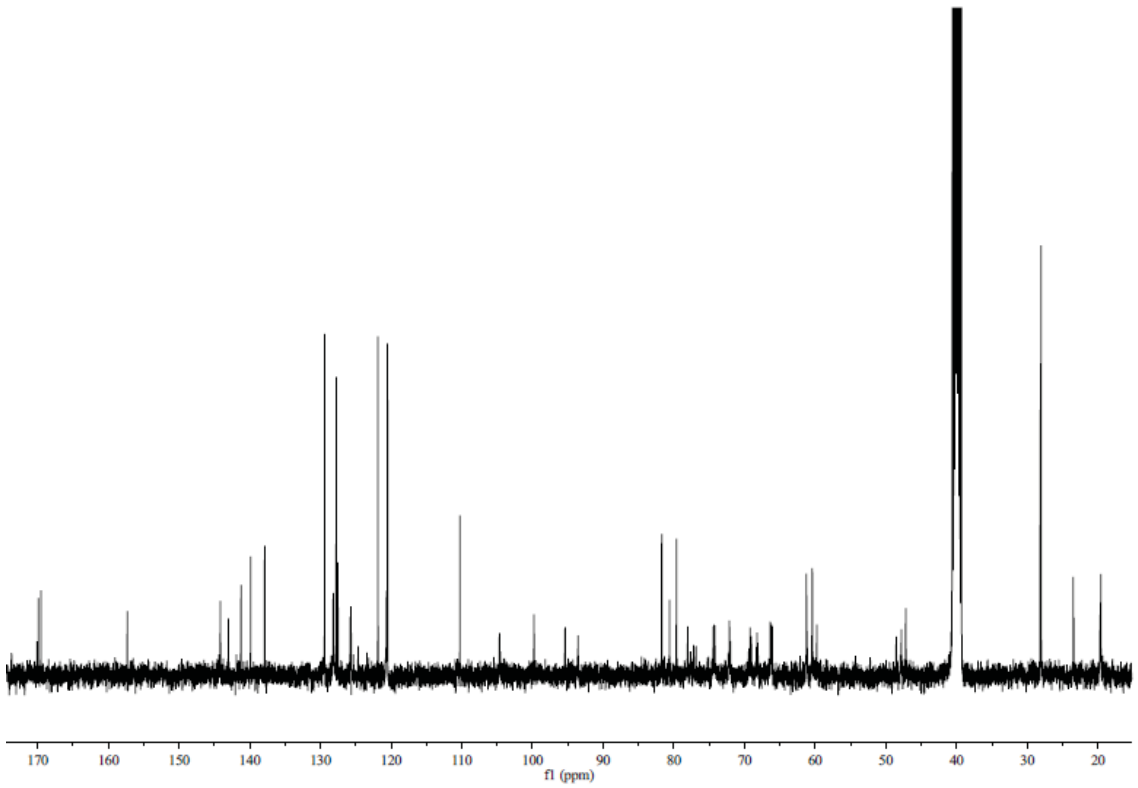
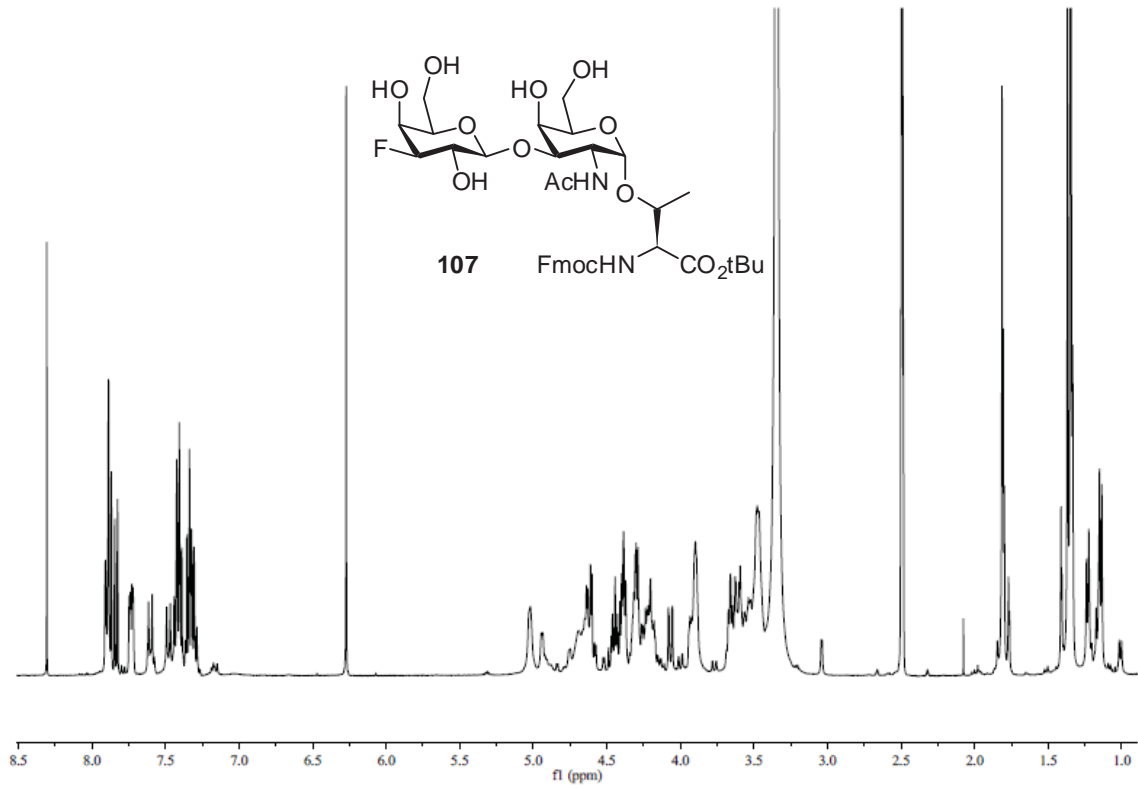


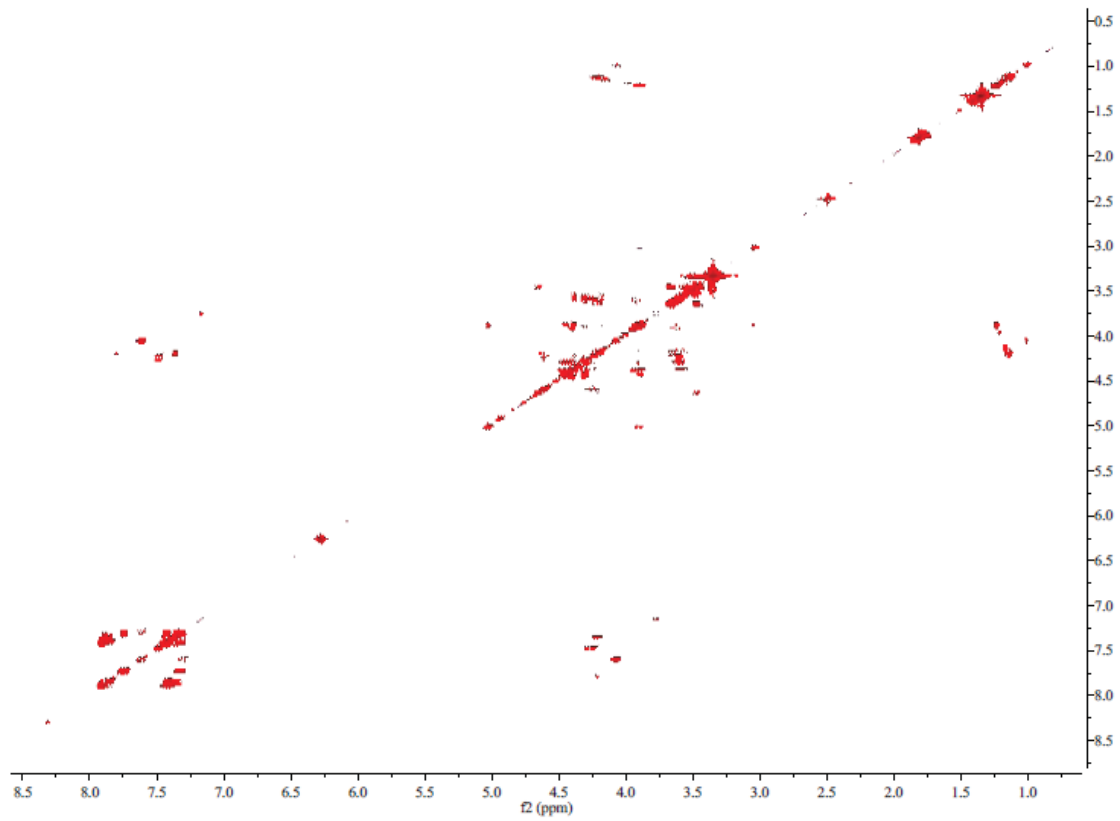
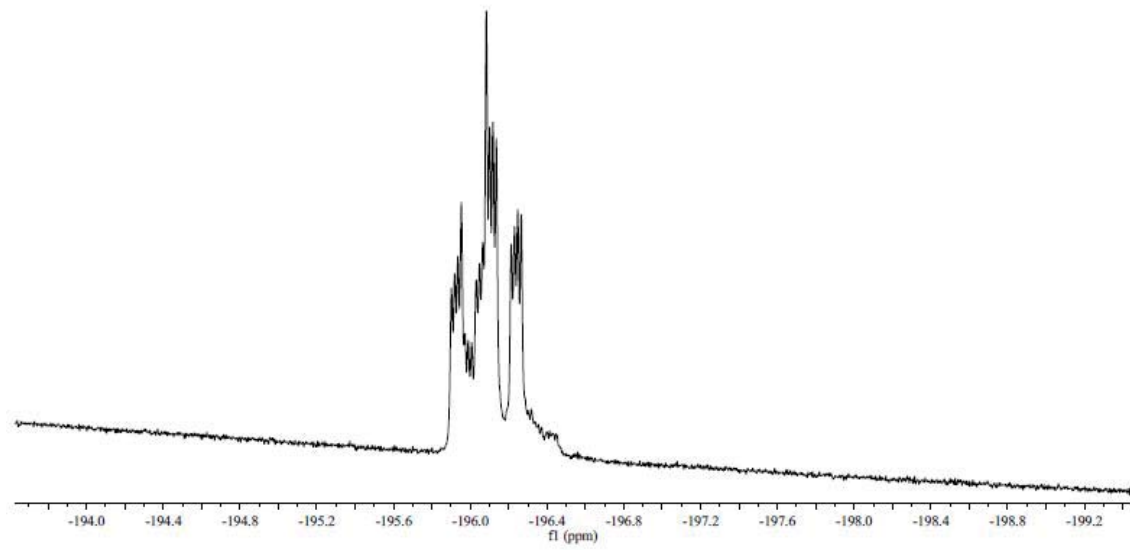


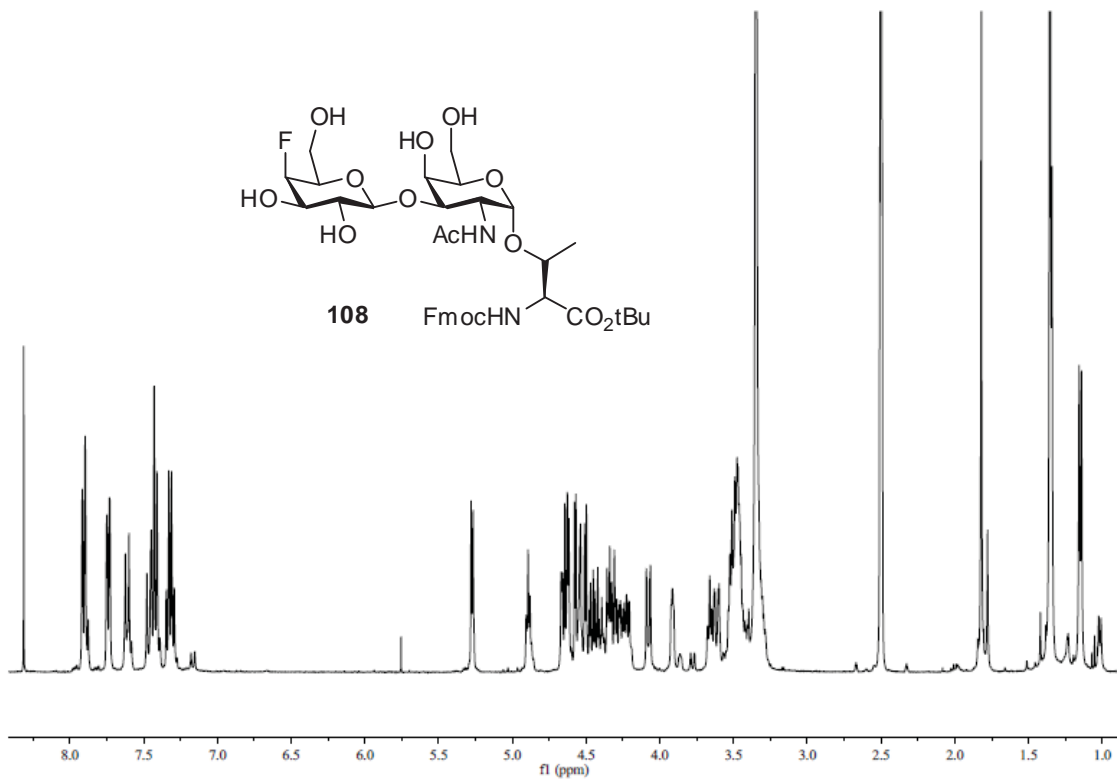
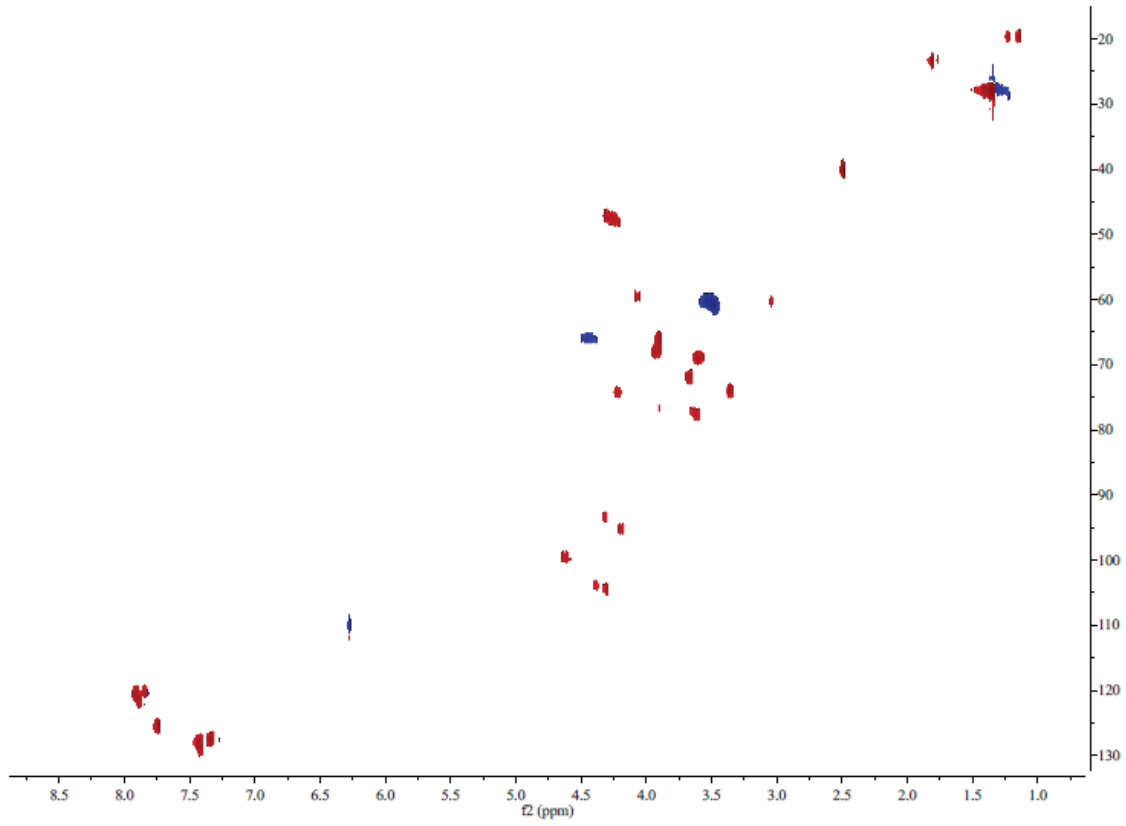


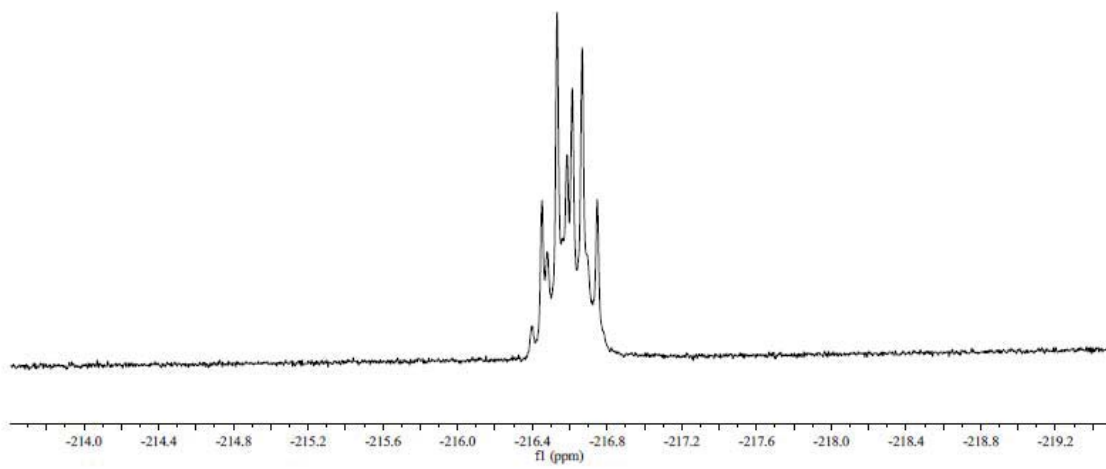
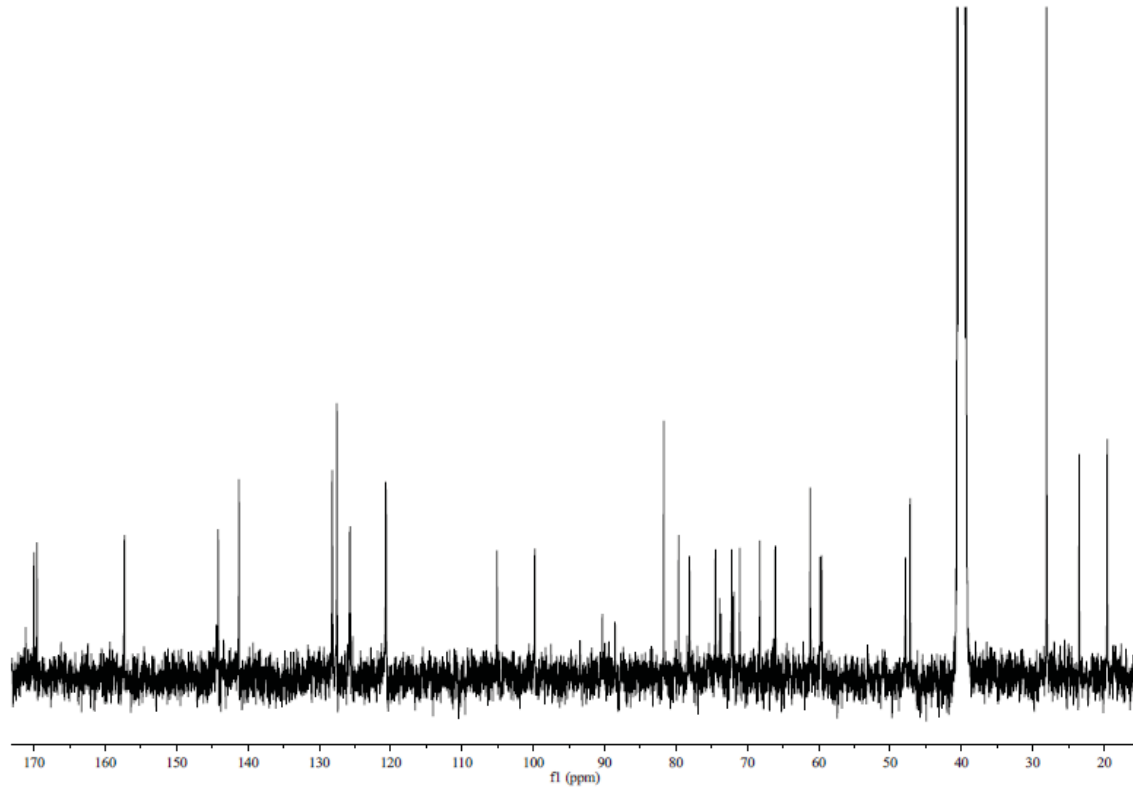


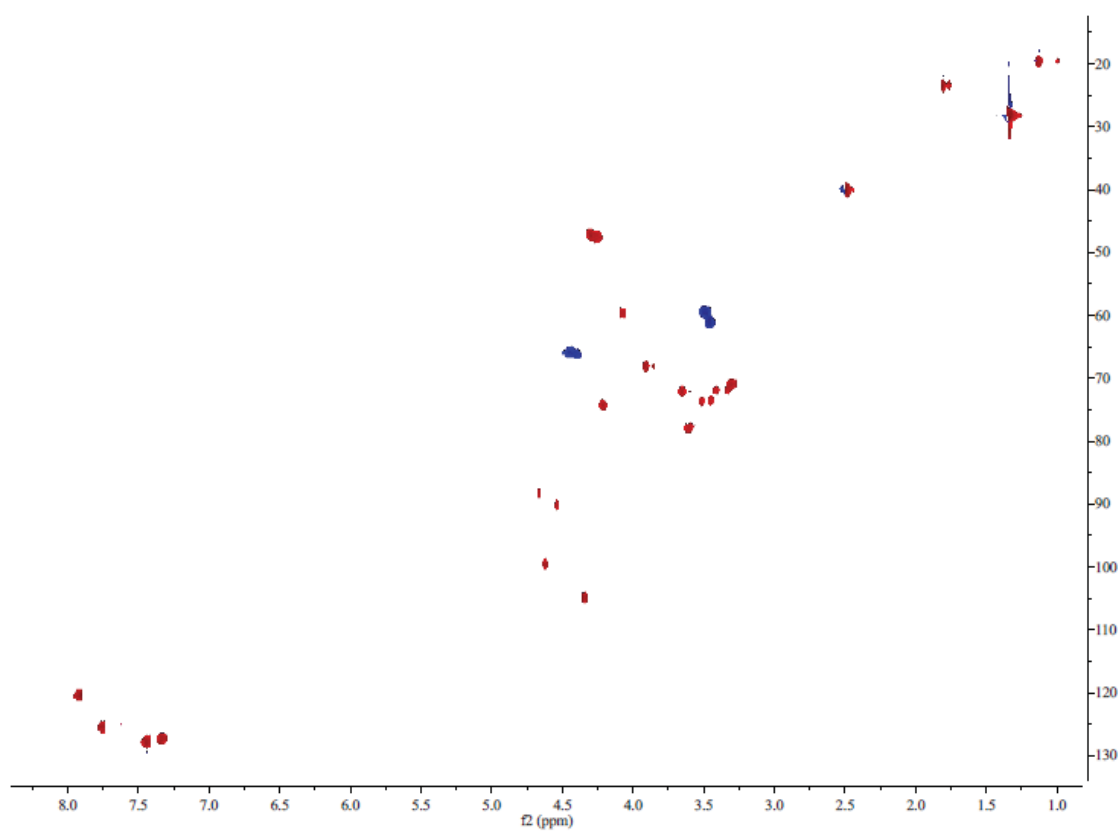
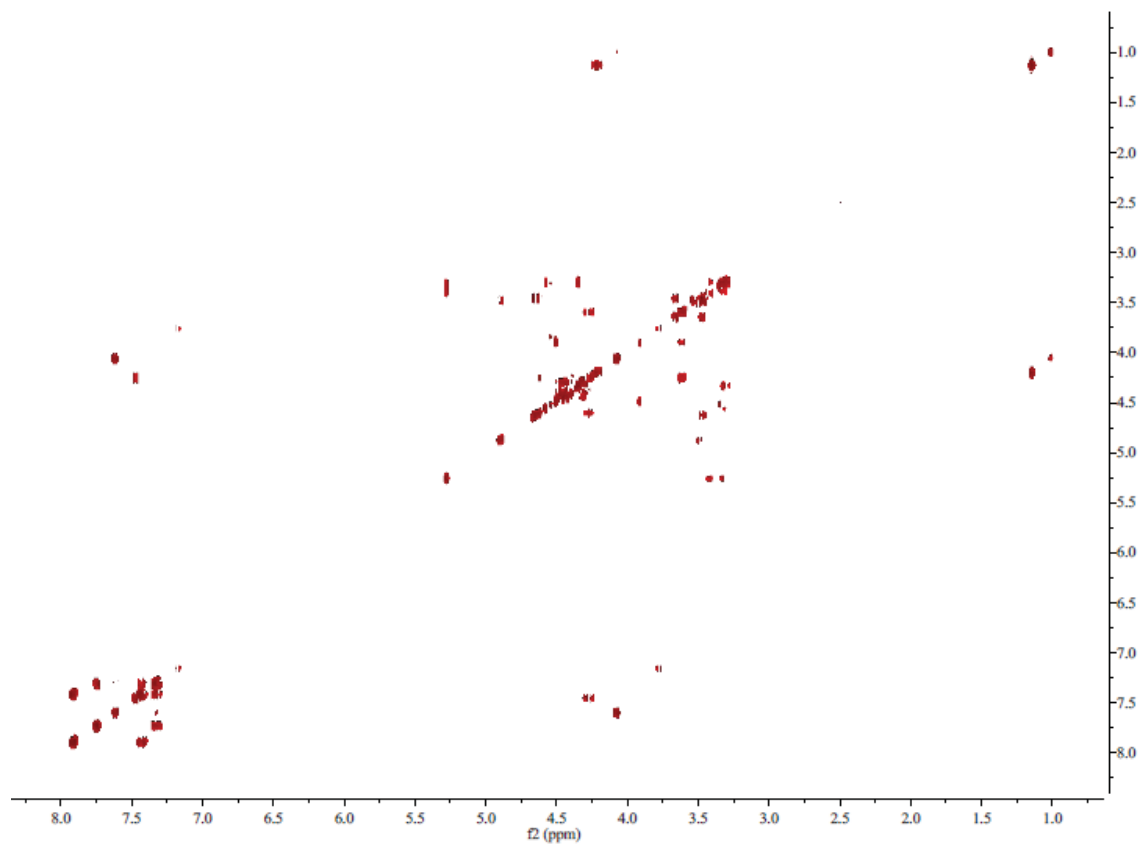


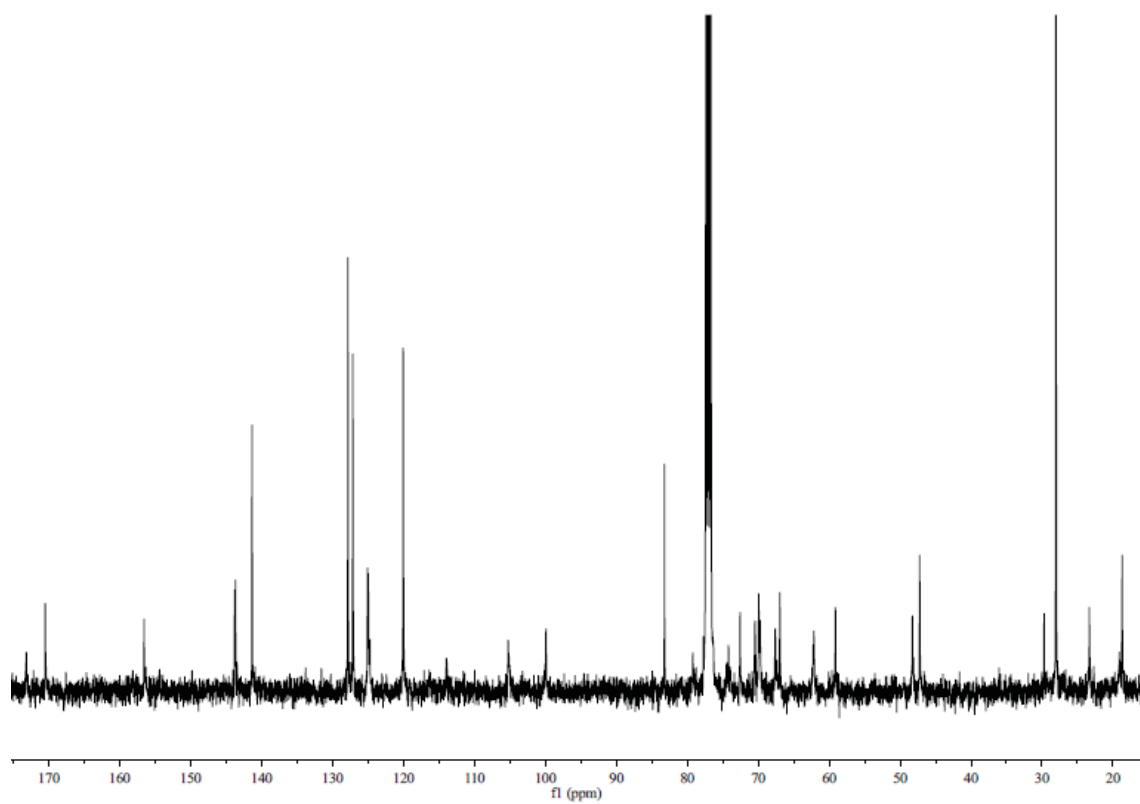
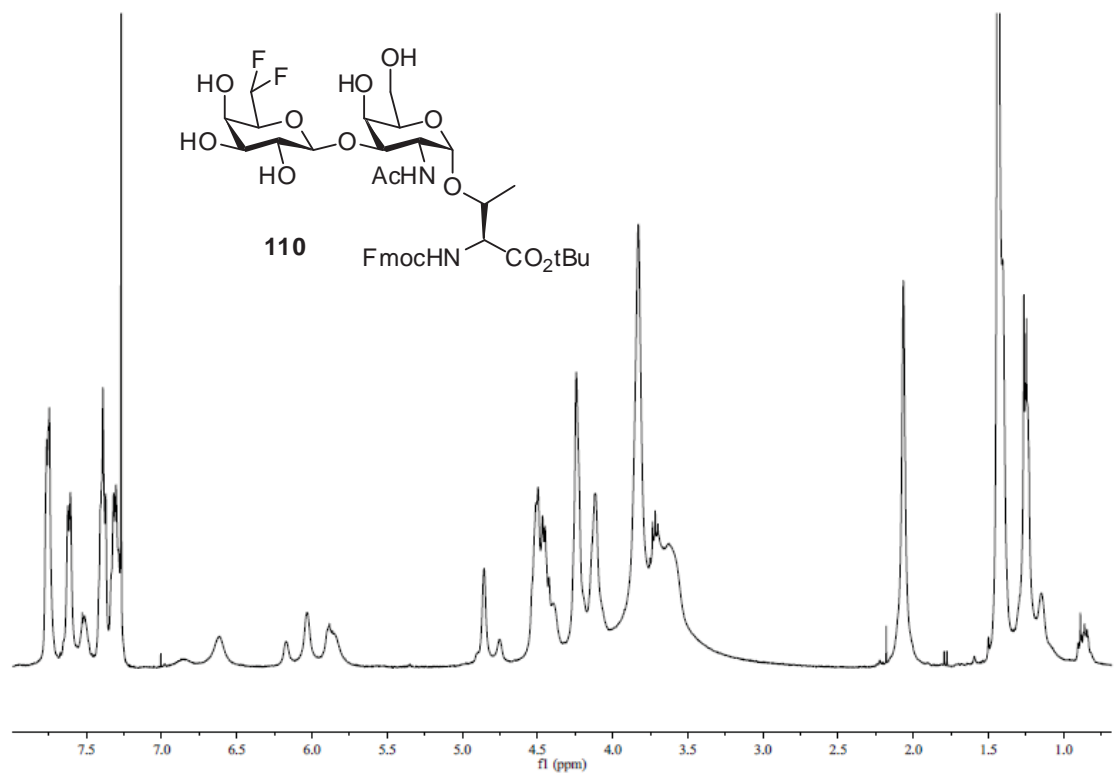


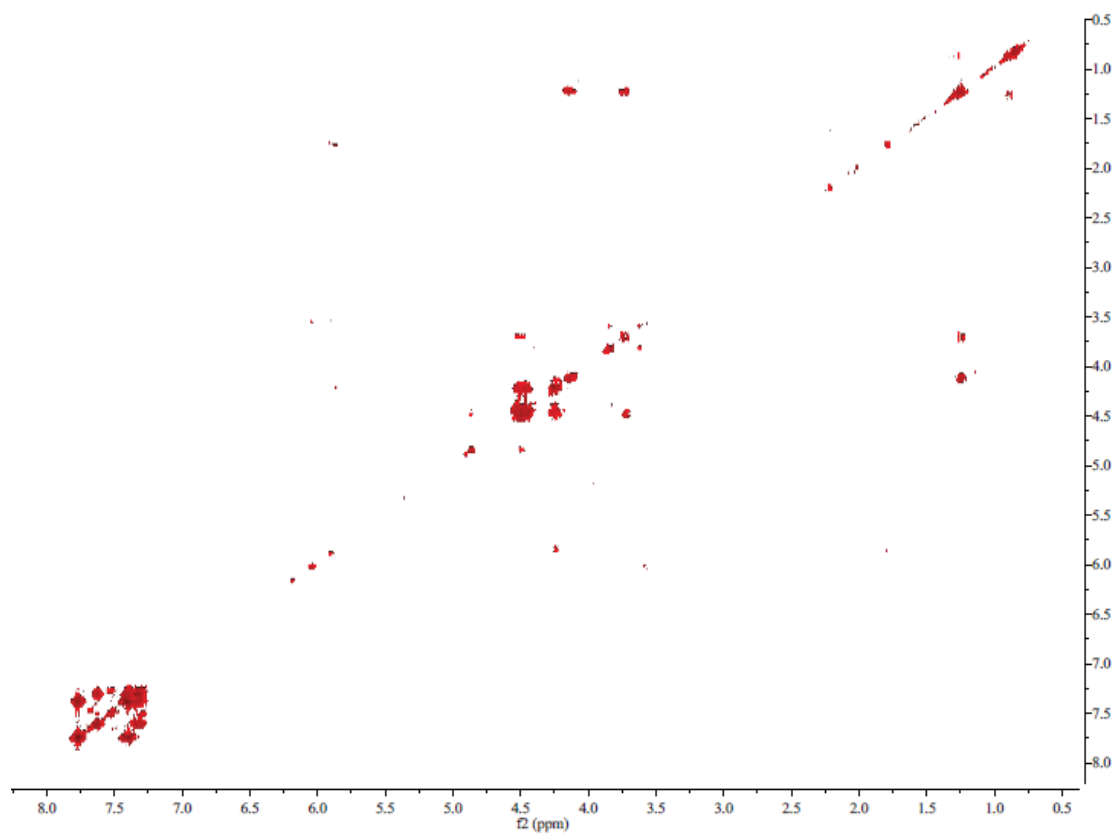
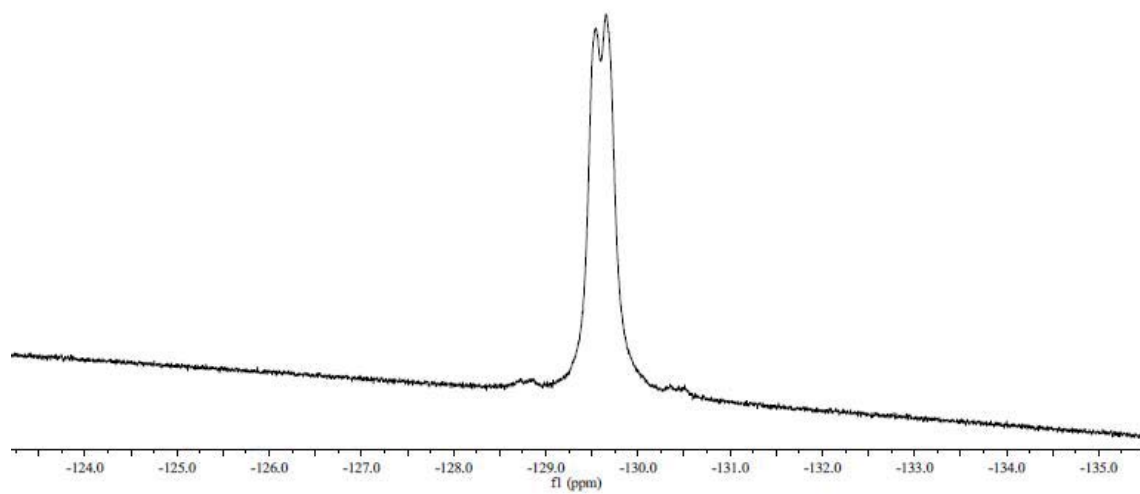


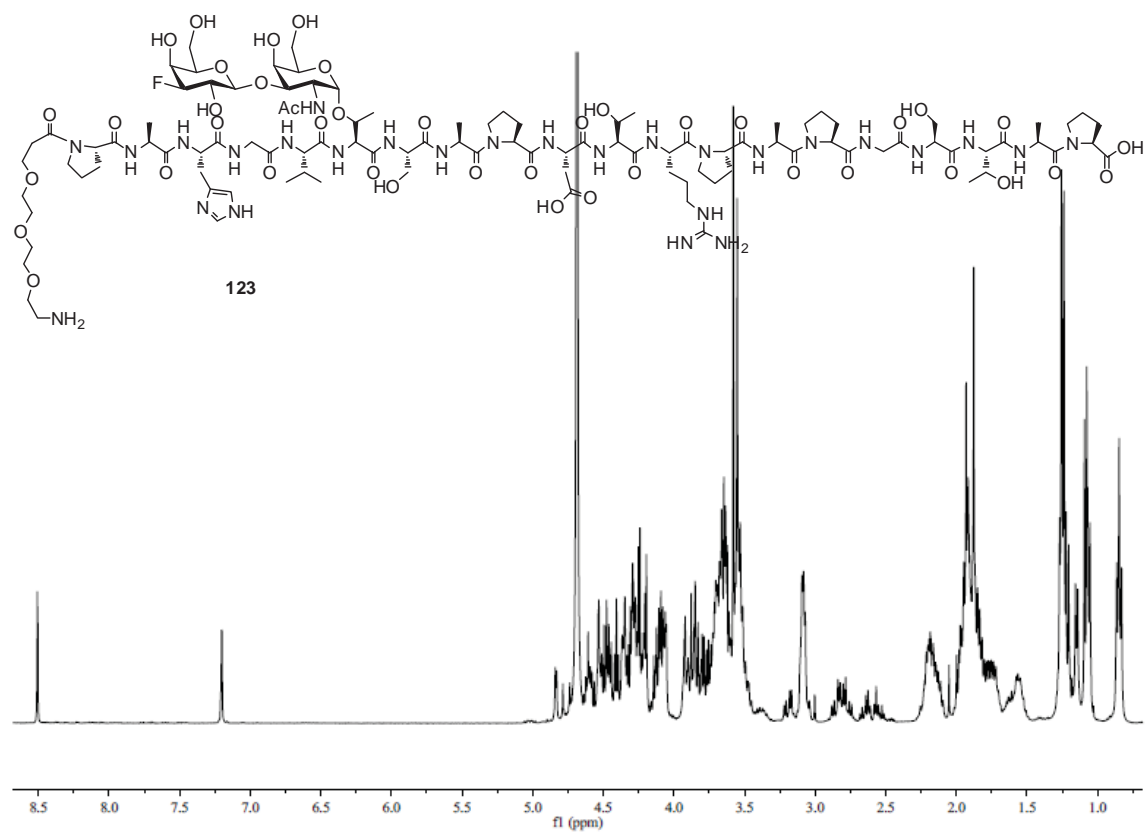
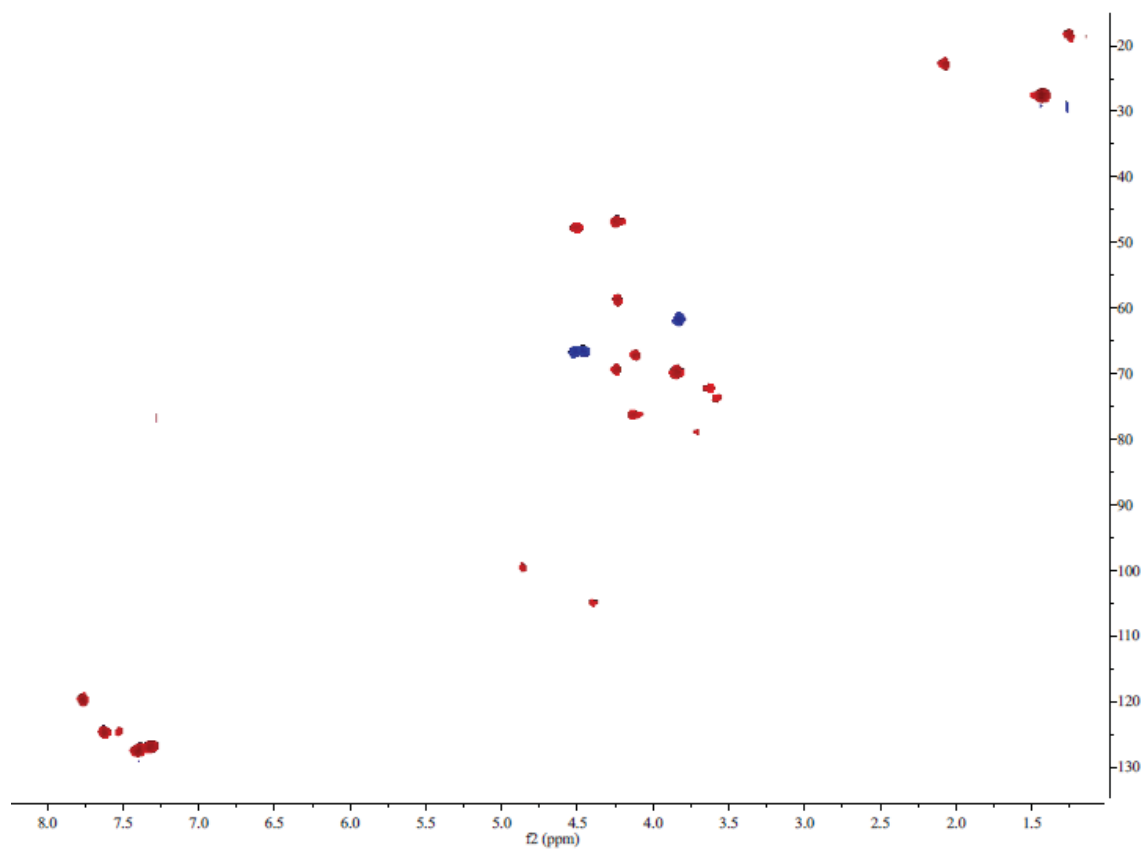


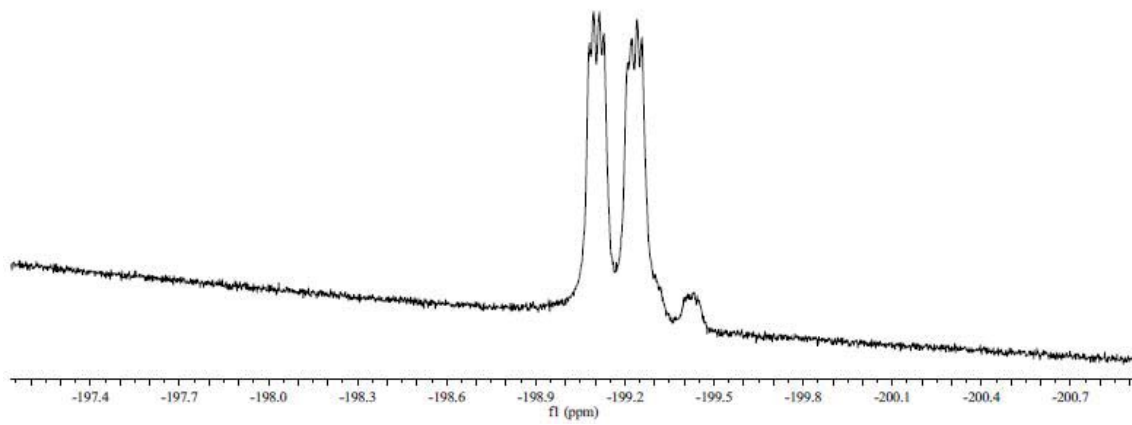
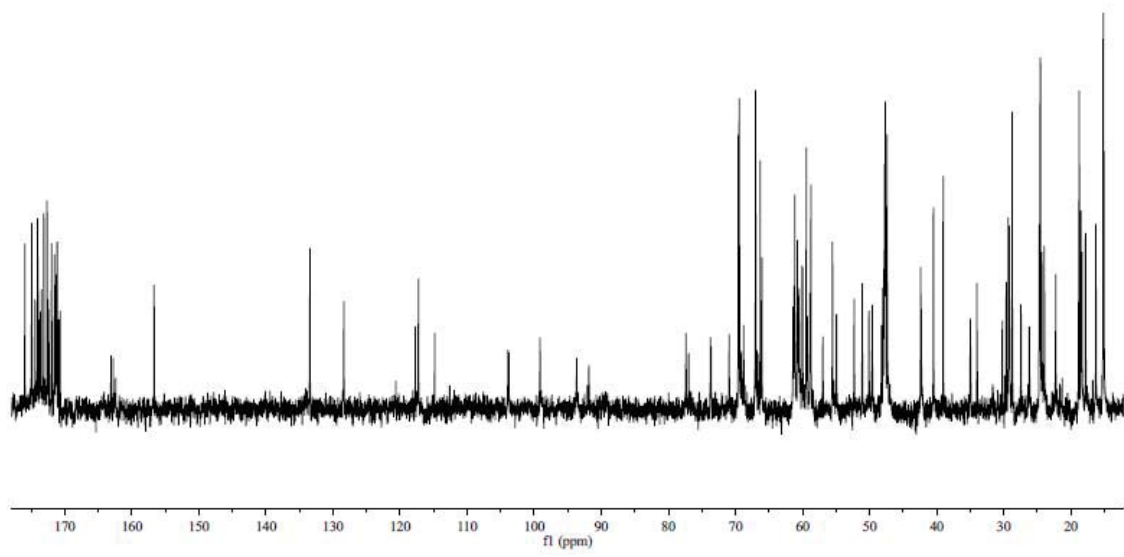


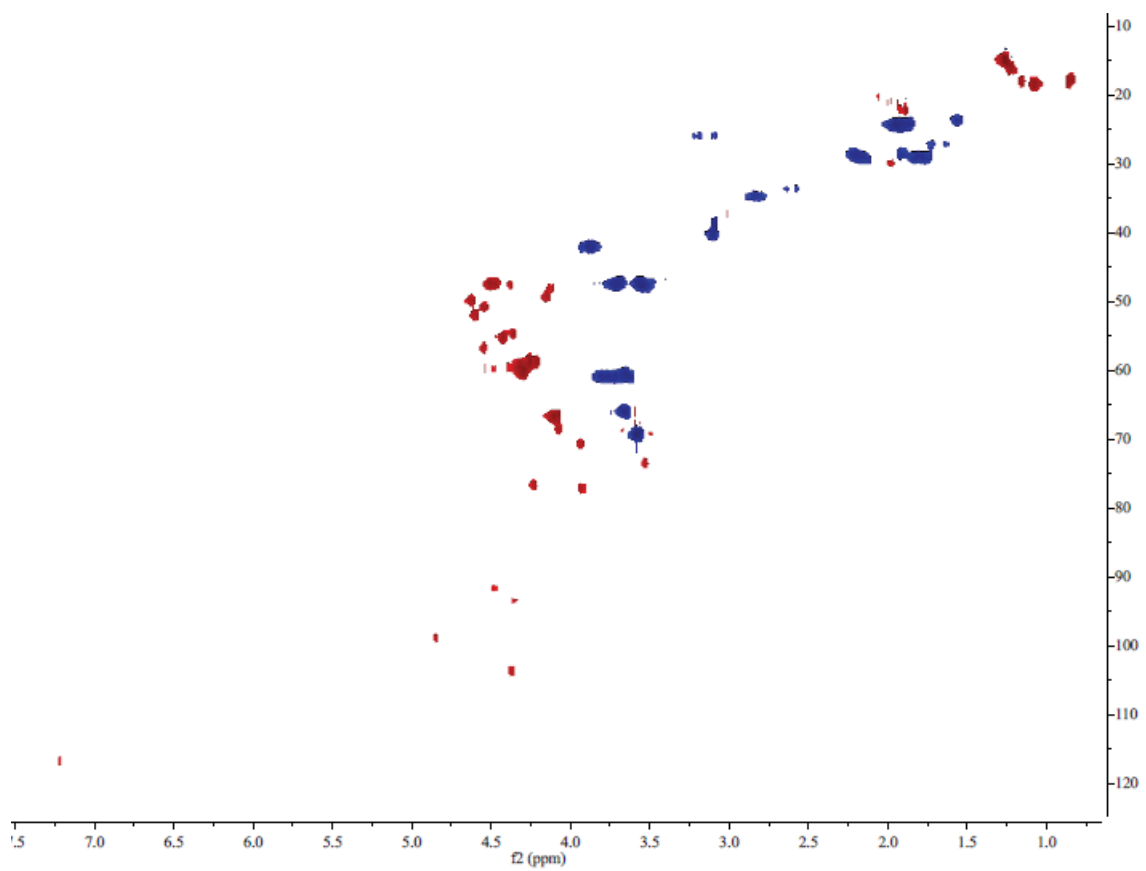
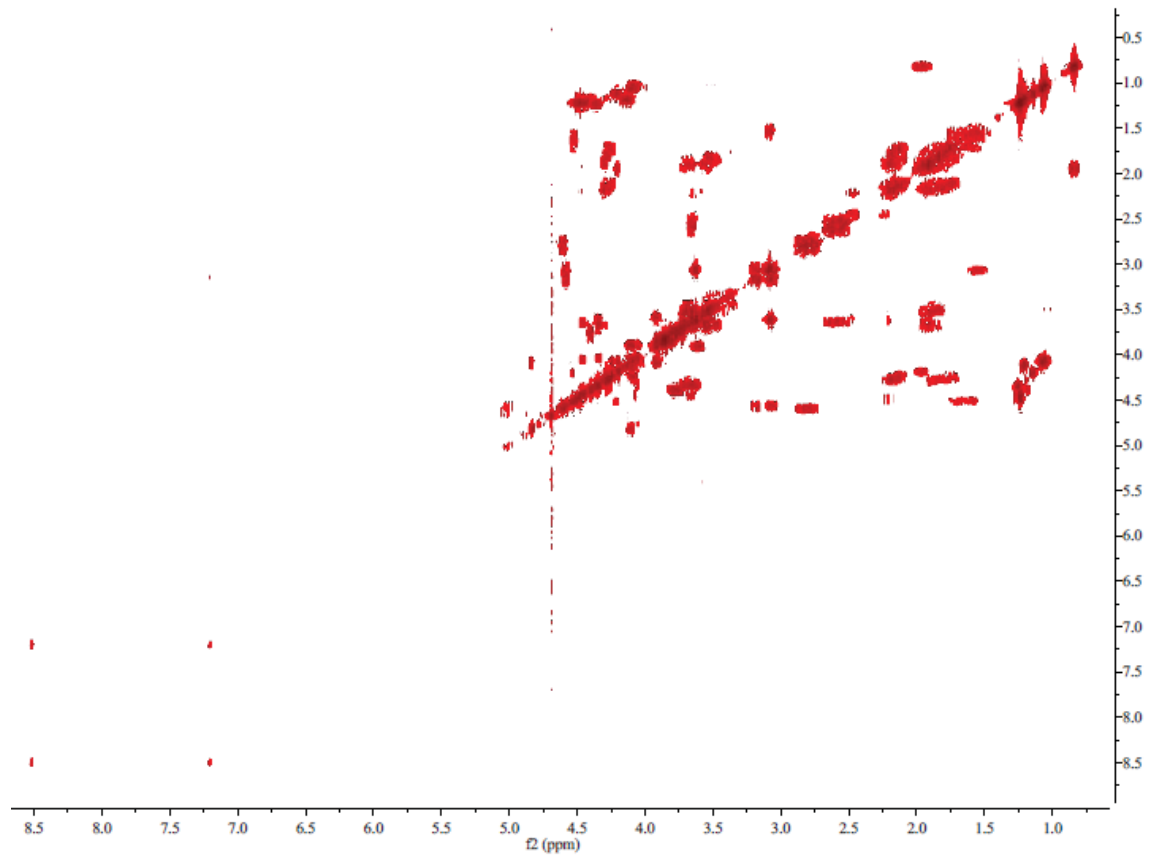


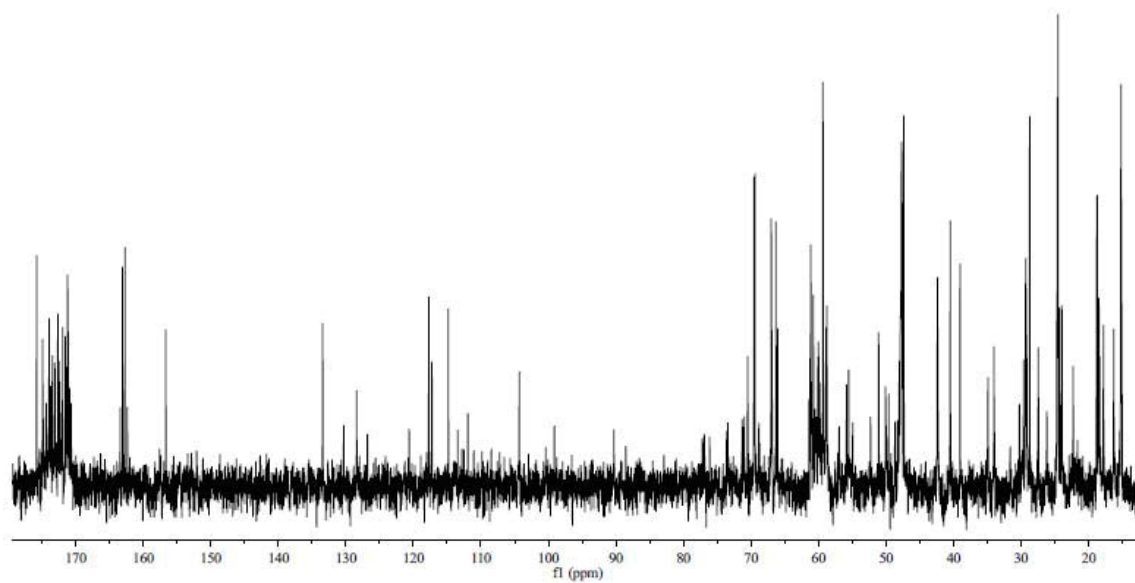
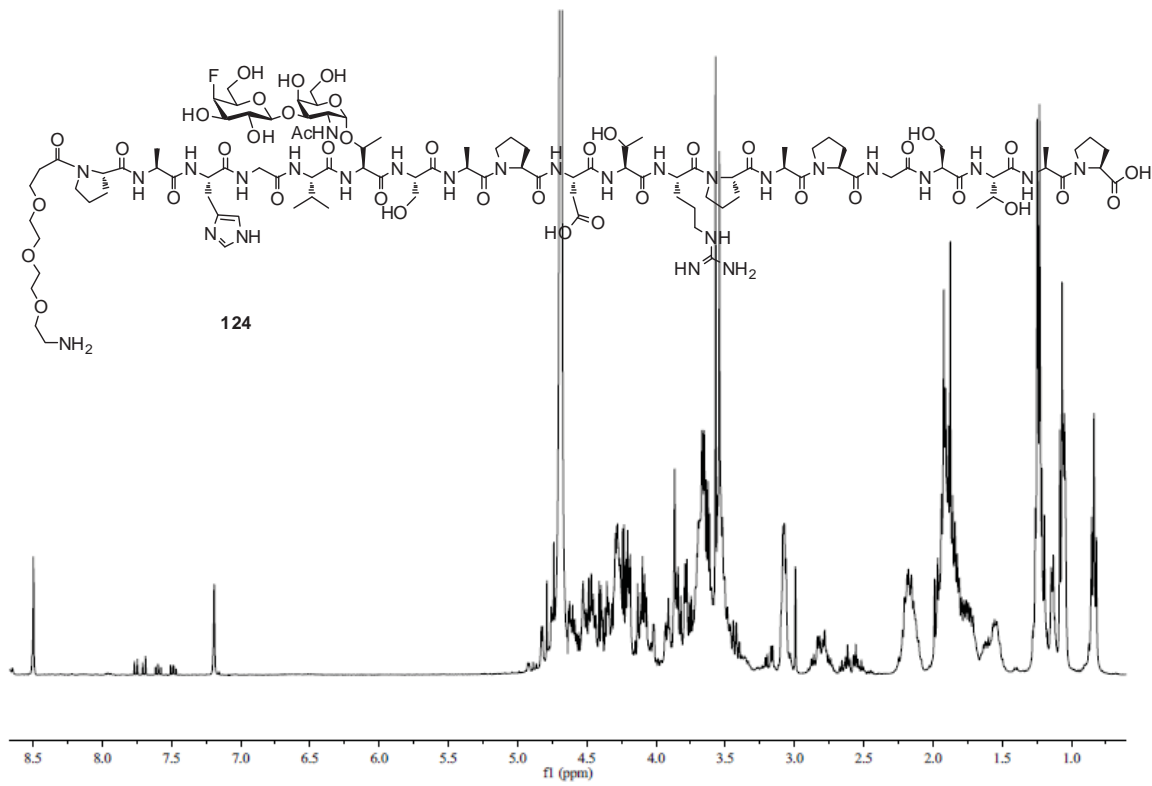


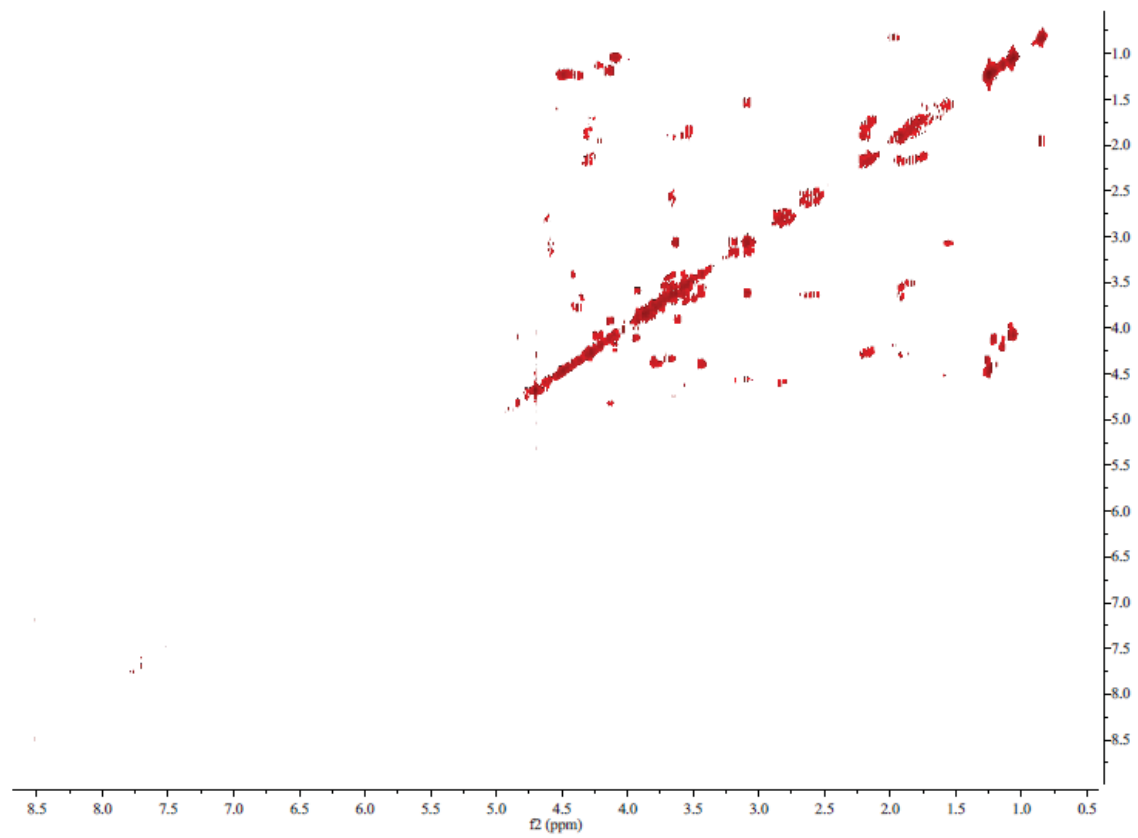
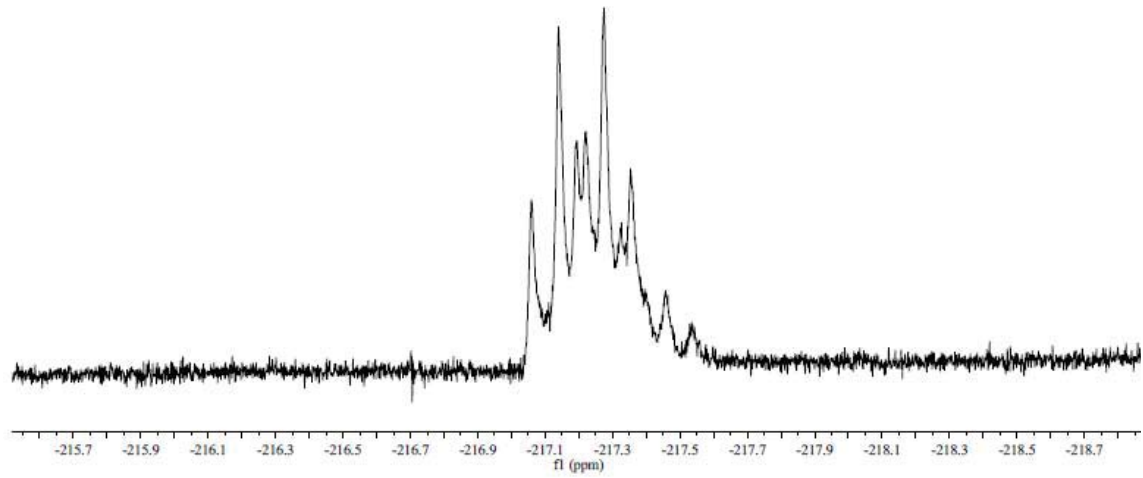


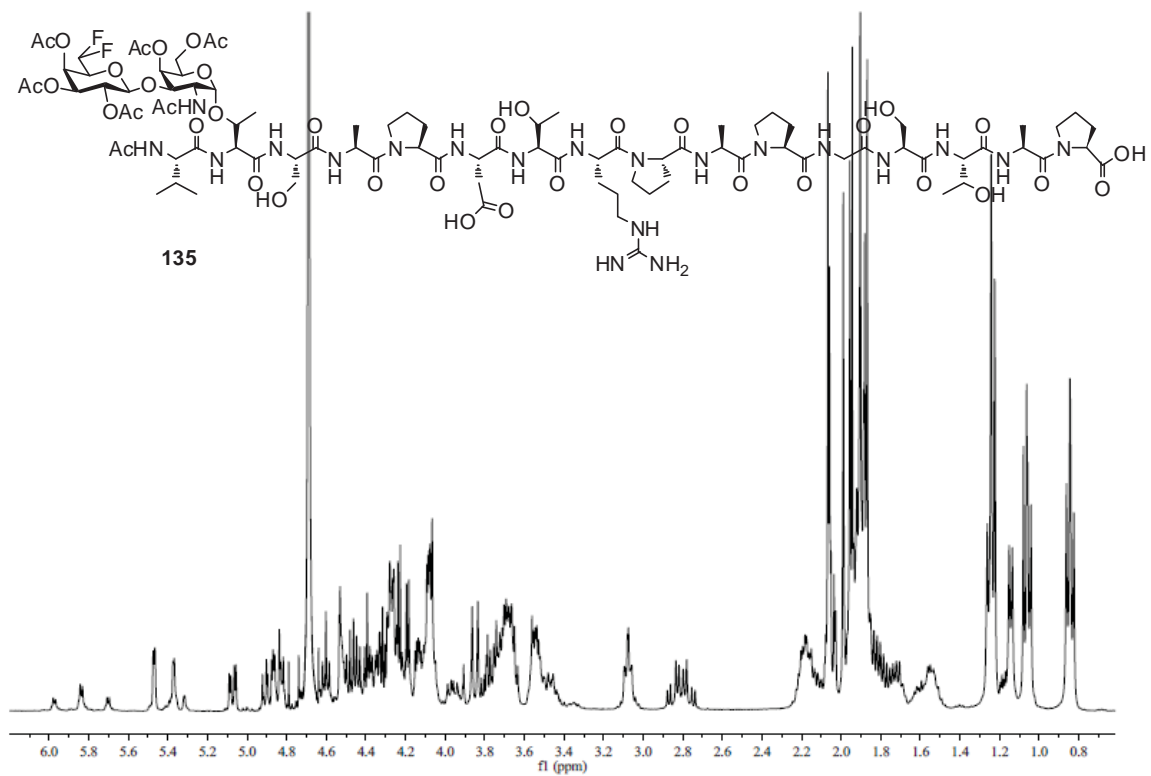
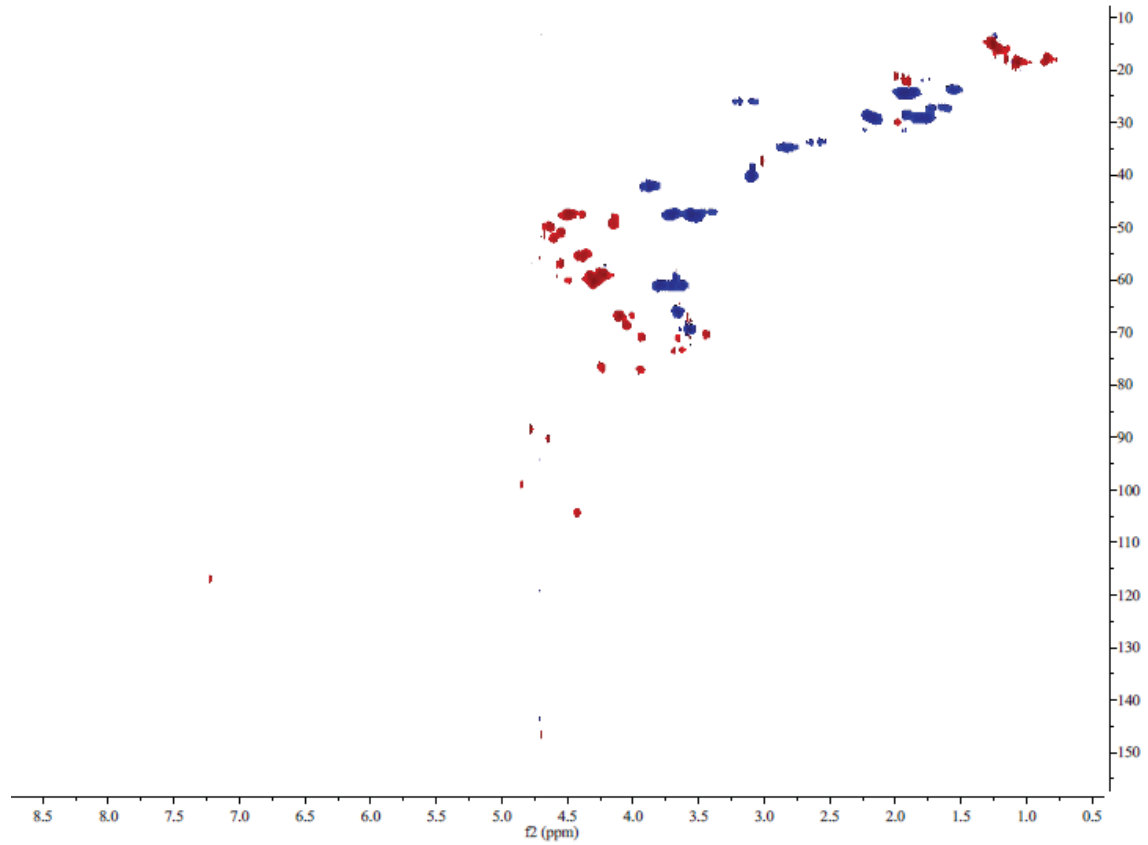


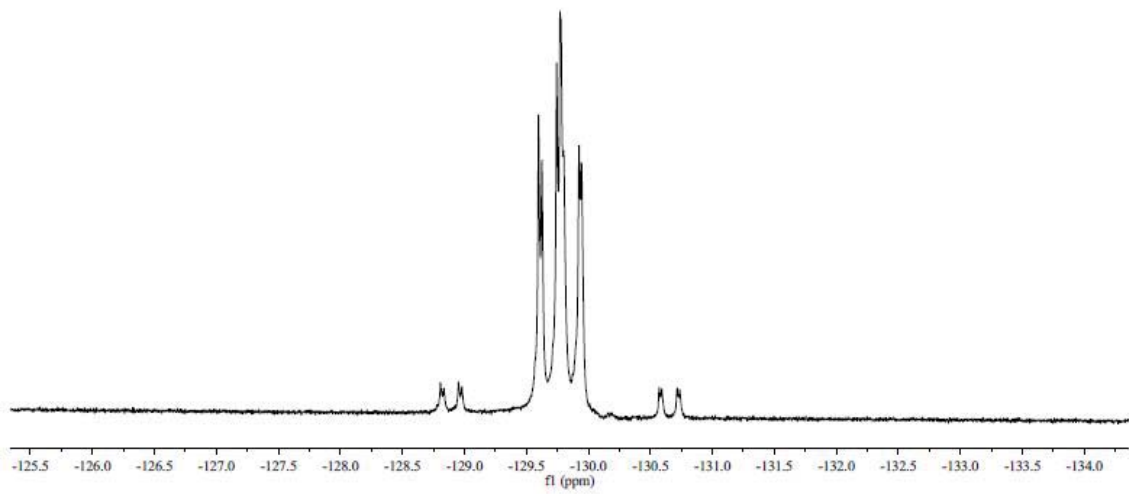
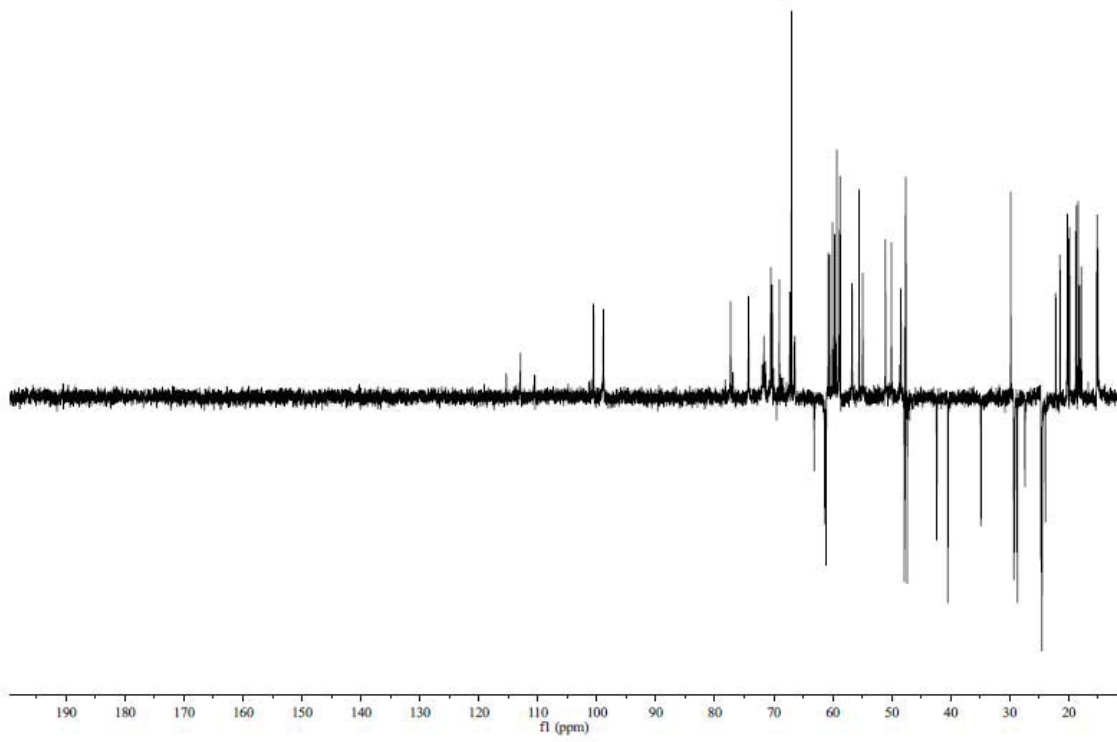


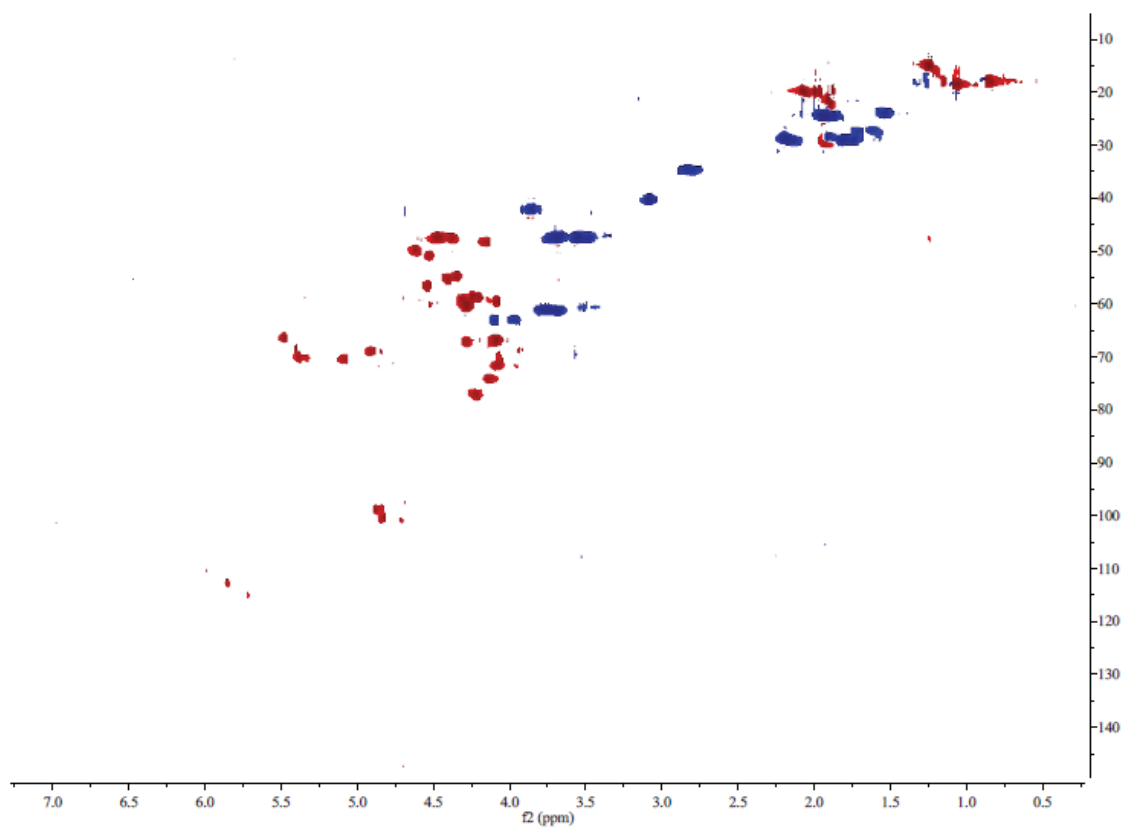
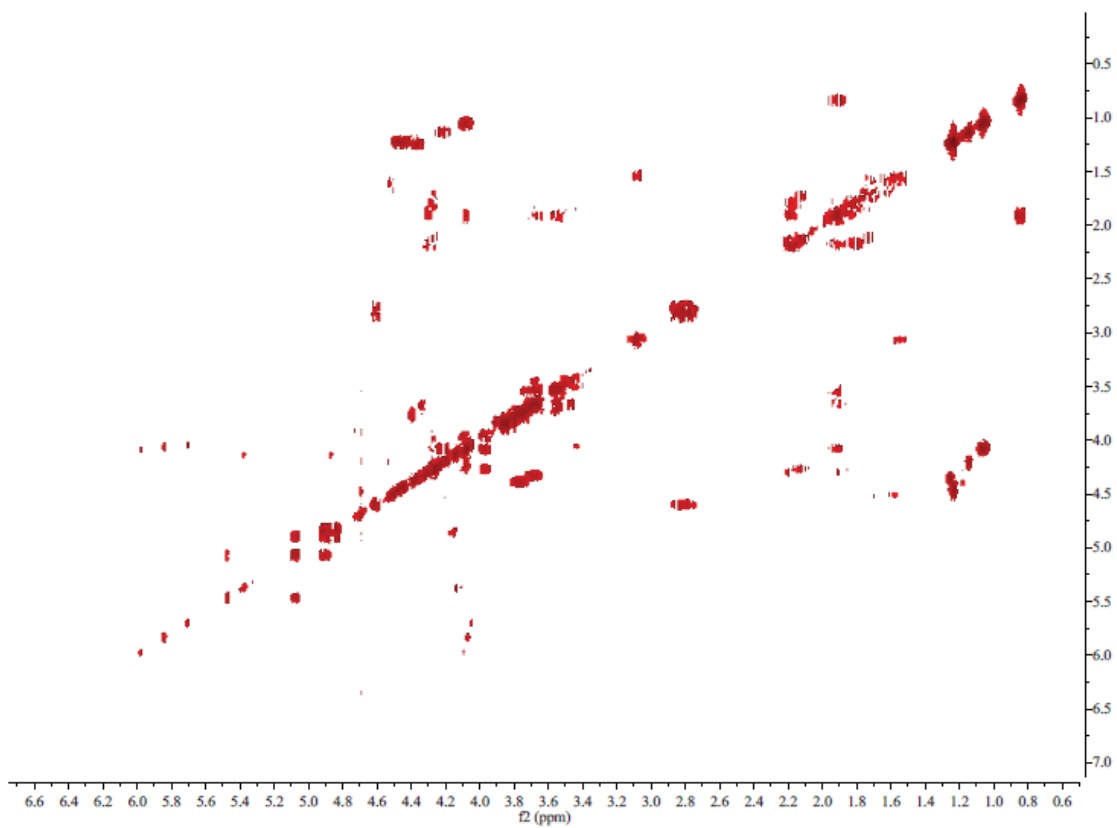


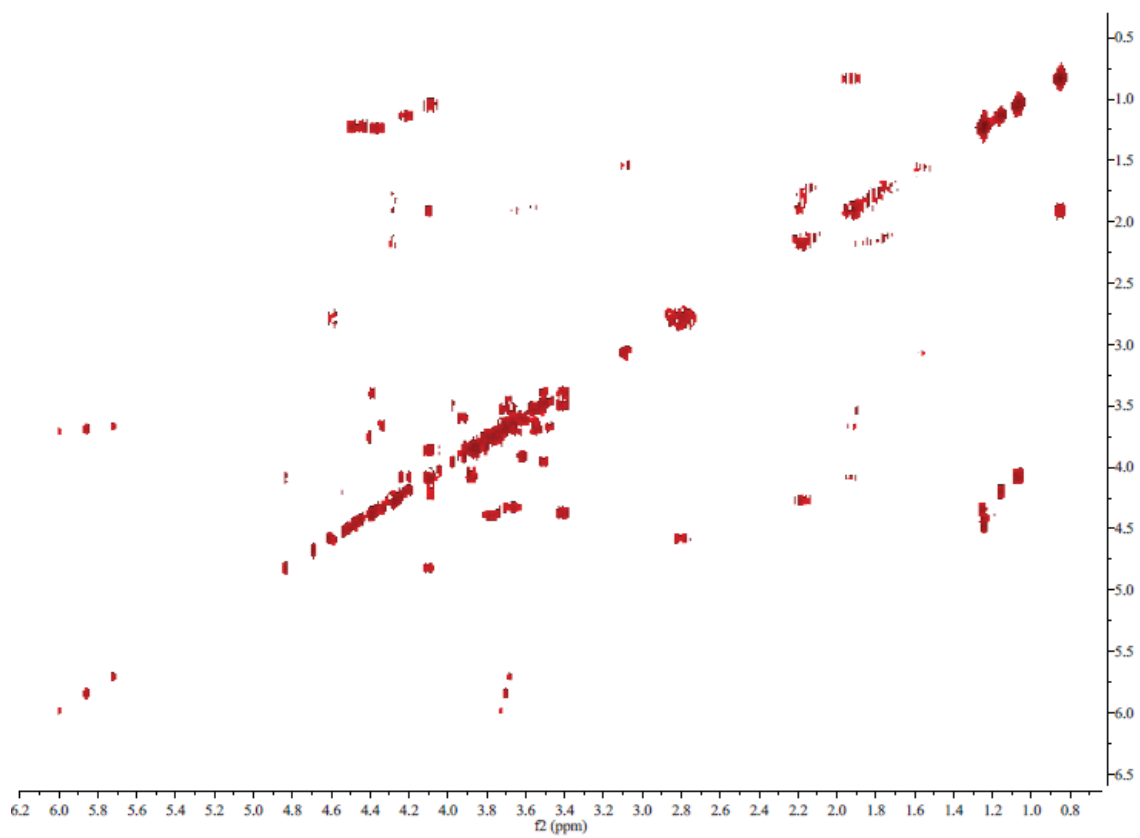
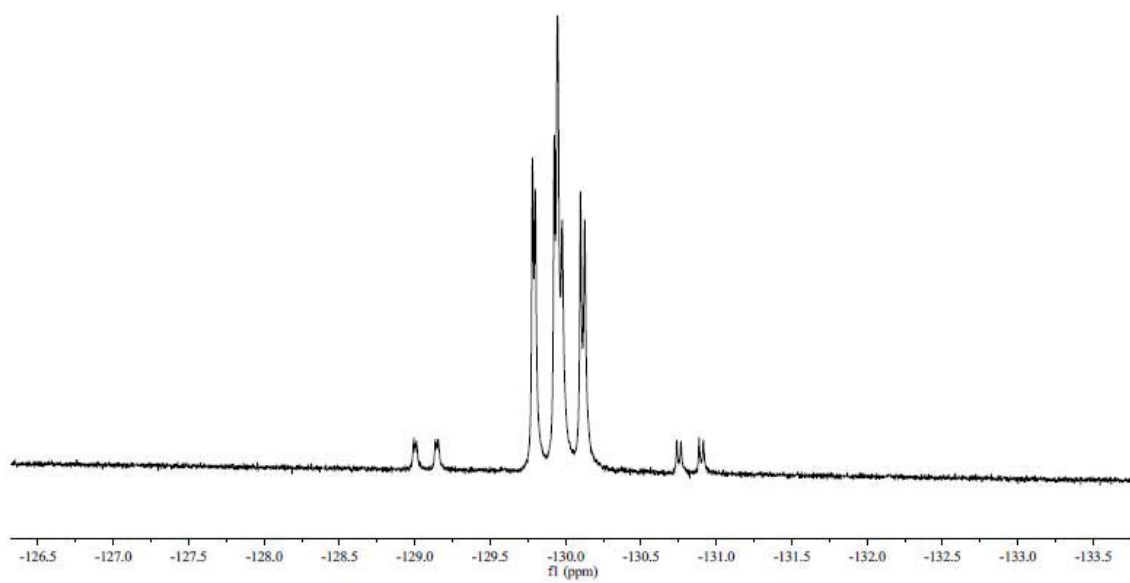


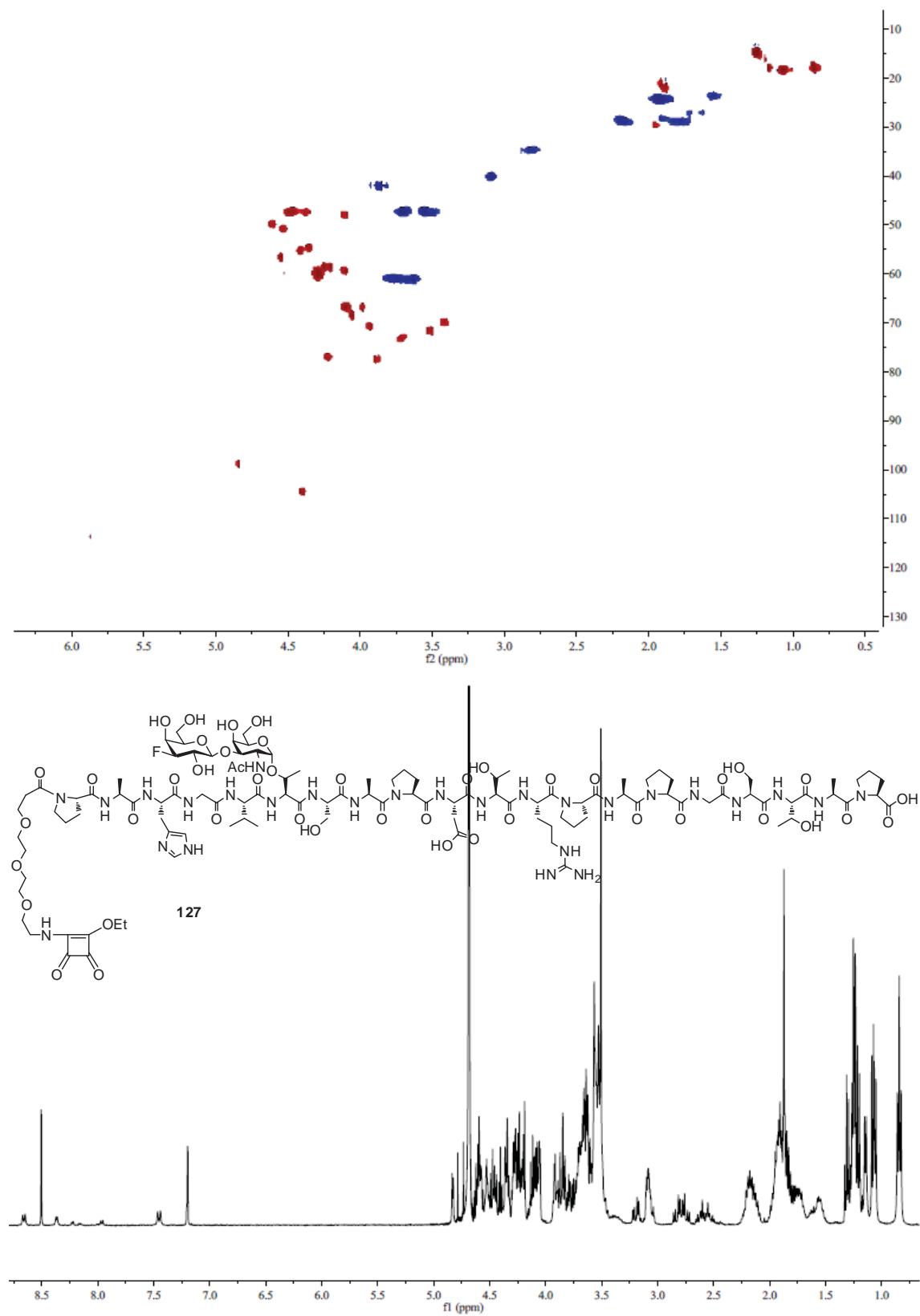


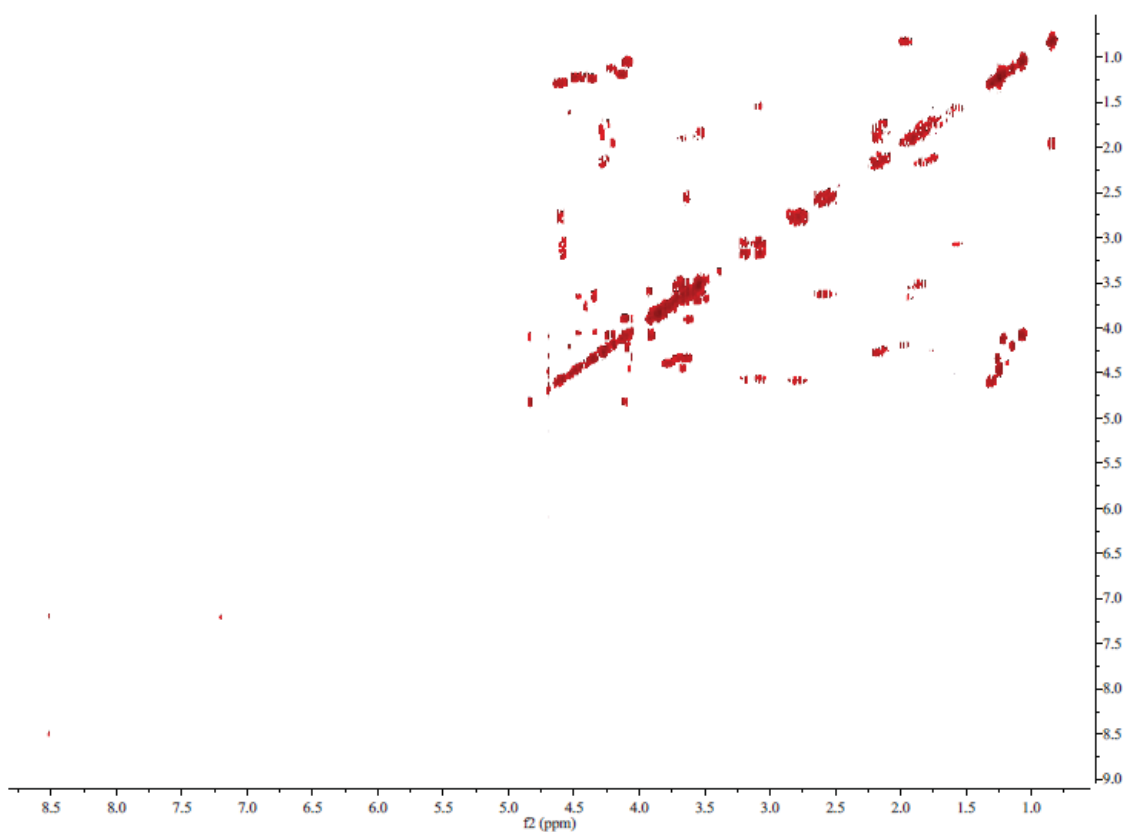
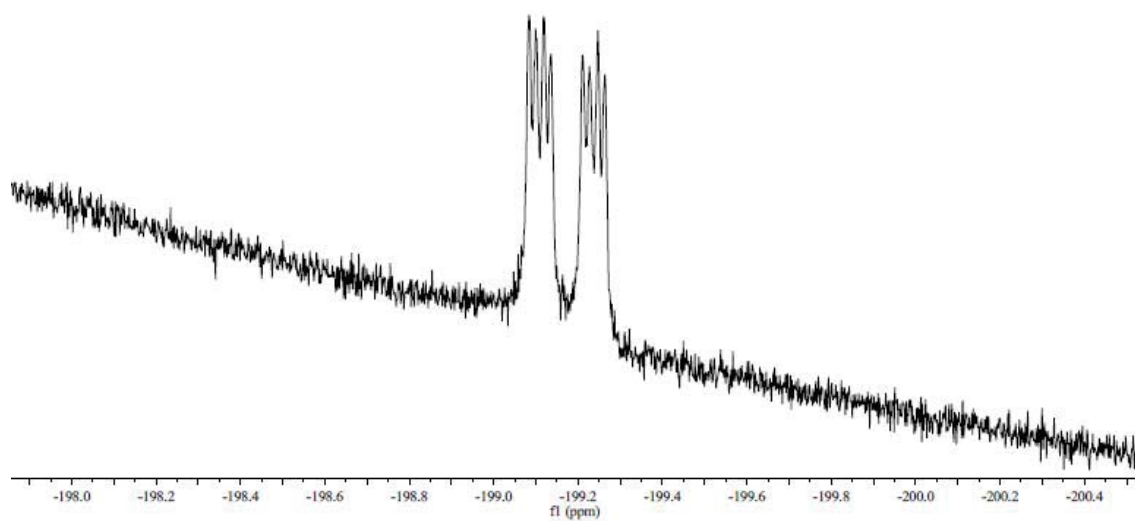


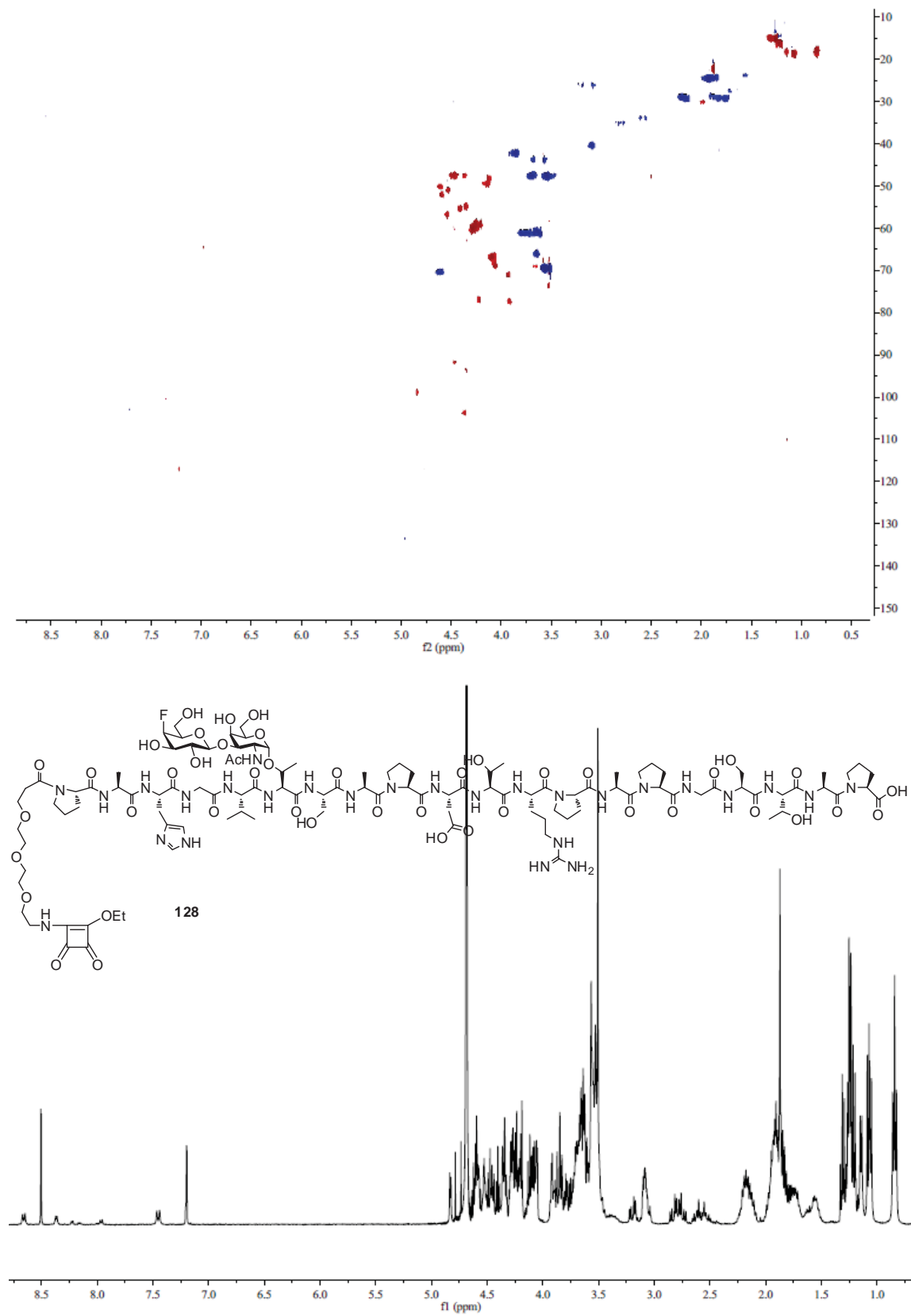


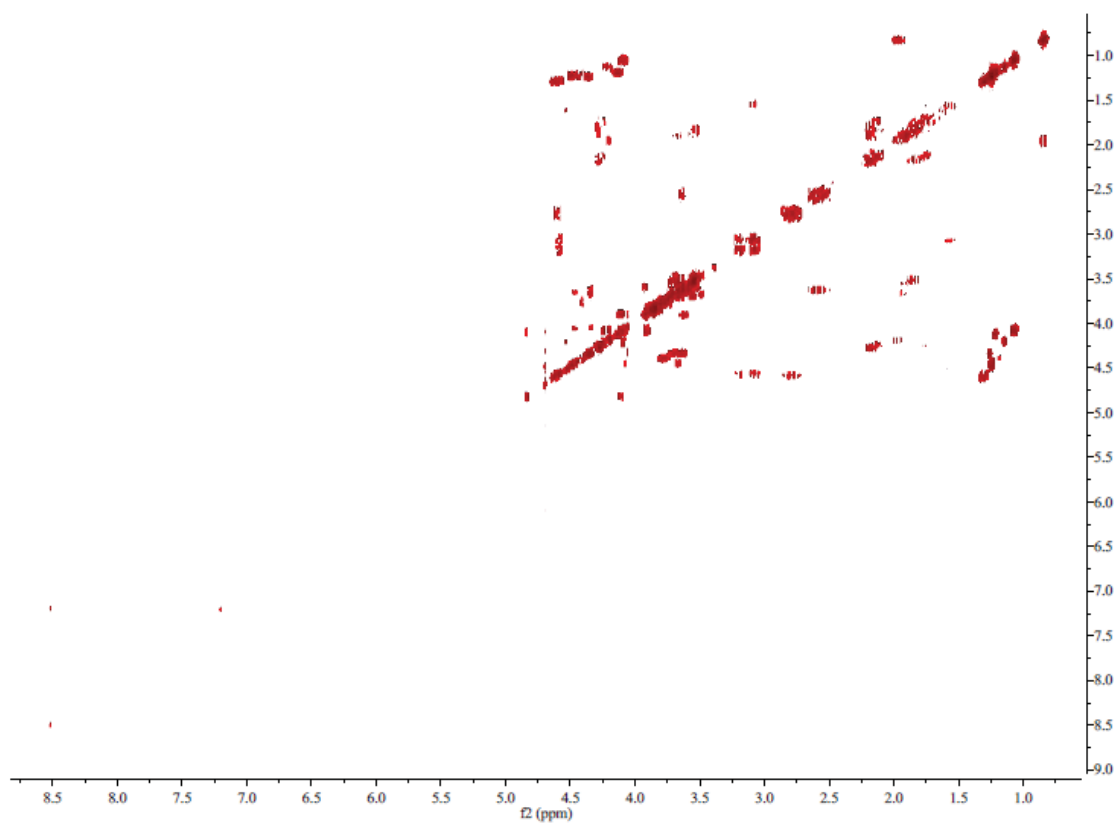
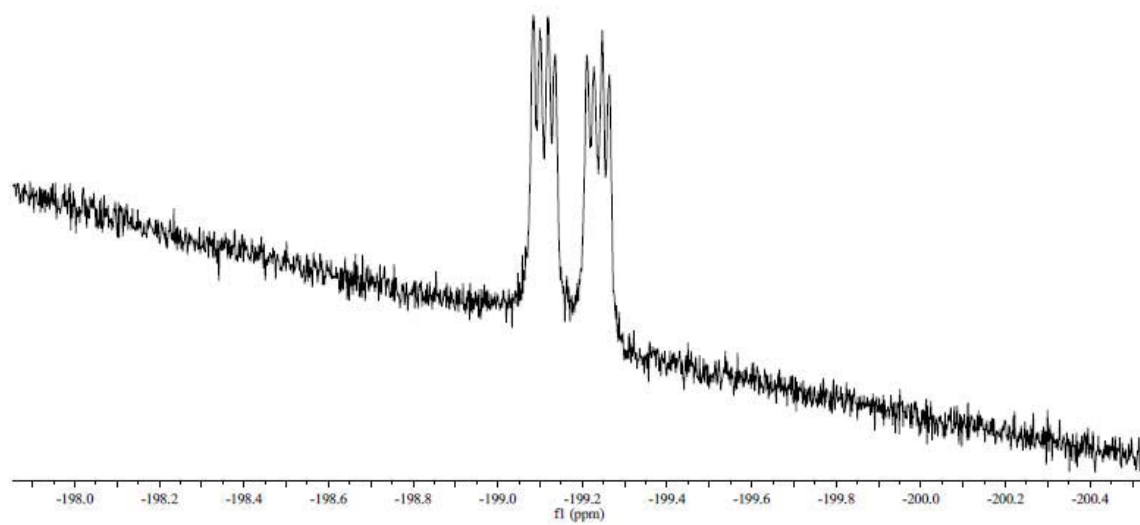


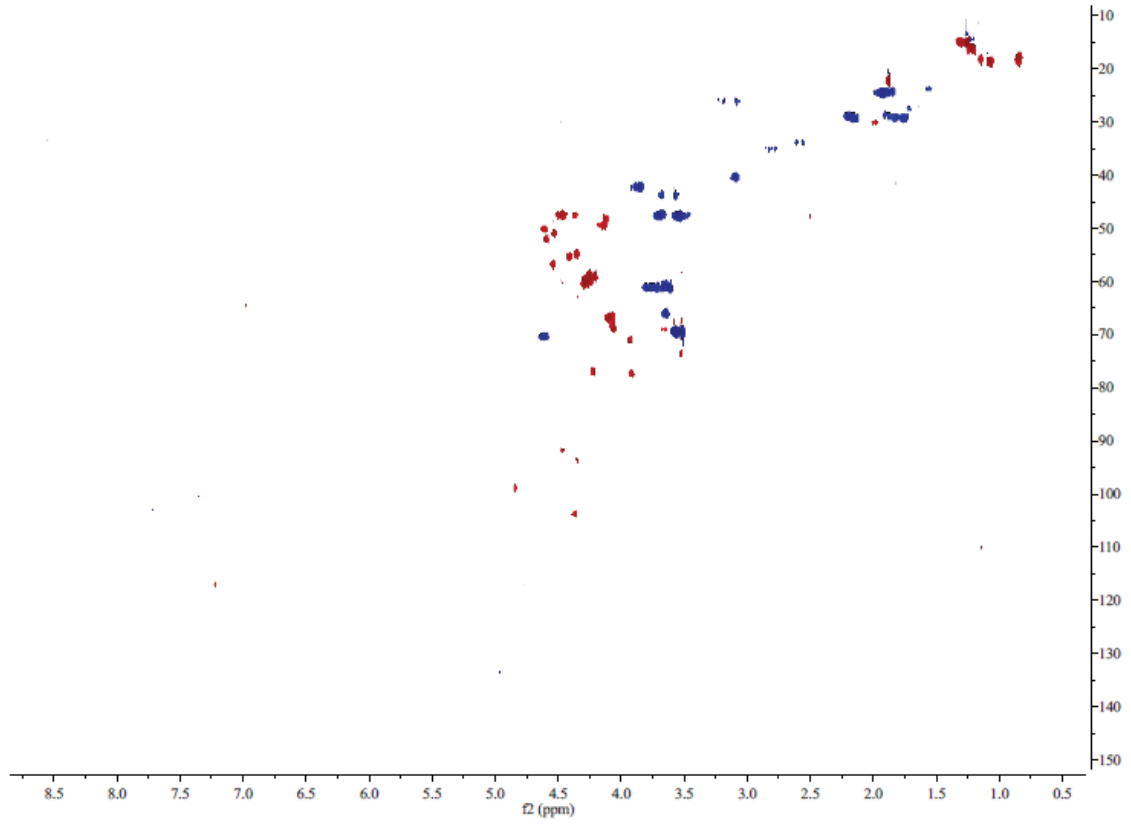


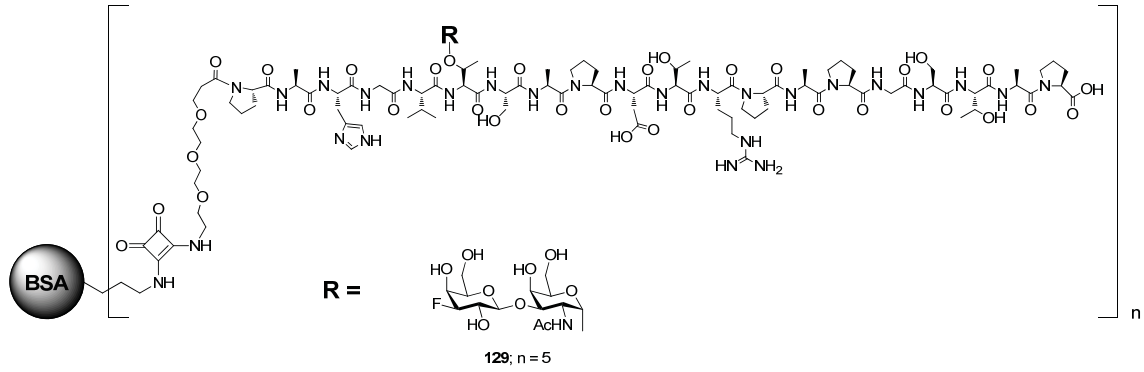






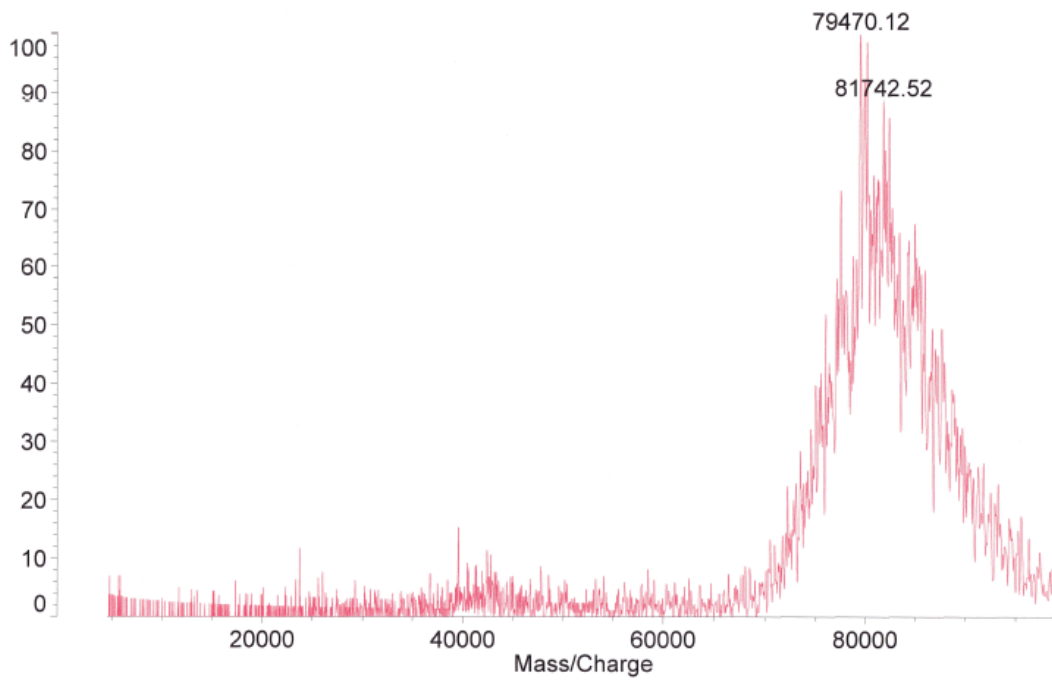


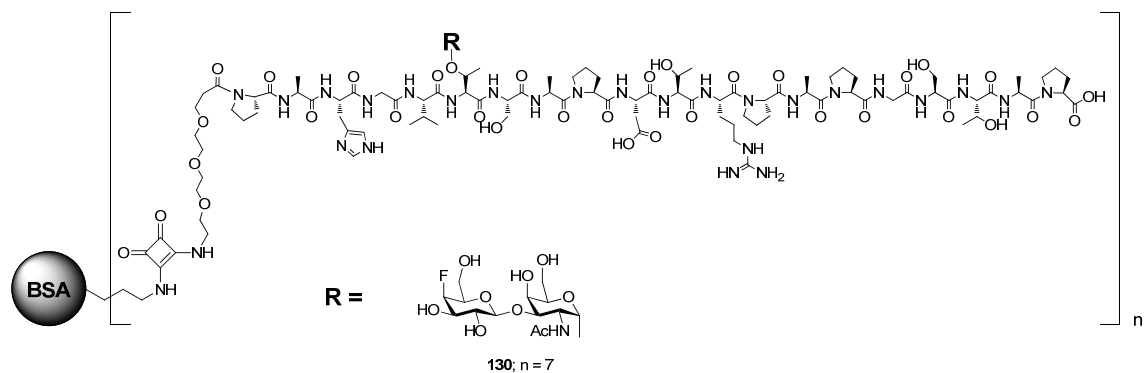




Kratos PC Axima CFR V2.4.1: Mode linear_neg_1805, Power: 135, Blankēd, P.Ext. @ 3000 (bin 82)

%Int. 0.0 mV[sum= 1 mV] Profiles 1-67 Smooth Av 100 -Baseline 20





Kratos PC Axima CFR V2.4.1: Mode linear_neg_1805, Power: 135, Blanked, P.Ext. @ 3000 (bin 82)

%Int. 0.0 mV[sum= 0 mV] Profiles 1-98 Smooth Av 100 -Baseline 20

