

**Synthetische Glycopeptide
mit Sulfatyl-Lewis^x-Struktur
als potenzielle Inhibitoren der Zelladhäsion**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Tobias Gutjahr

geboren in Mainz

Mainz, im November 2008

Dekan:

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Horst Kunz

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2008

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum
von Januar 2005 bis November 2008
am Institut für Organische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
unter Anleitung von Prof. Dr. Horst Kunz angefertigt

MEINER FAMILIE

Die Ballade vom doppelt maskierten Tyrosin (1988)

Melodie: „Humba-tätärä“

- 1.) Man hört so oft, ein Dipeptid, das bilde sich so leicht,
obwohl schon mancher Koch das Ziel noch nie erreicht.
Die Vorschrift, die man diesmal braucht, ist publiziert im JACS,
und wer sie liest, der denkt es sei ein Klacks.

Refrain:

Am Schluß bleibt Tyro-tyro-tyro-tyrosin, Tyrosin, Tyrosin!
Was soll das Tyro-tyro-tyro-tyrosin?
Es sagt uns: Ätsch, die Zwischenstufe ist dahin!

- 2.) In Natronlauge wird das Tyrosin erst vorgelegt,
sodaß man wohlgemut noch große Hoffnung hegt.
An Stickstoff und OH maskiert soll werden die Substanz –
bei pH 10 gelingt dies nur nicht ganz ...
- 3.) Mit Carbobenzoxýchlorid auf keinen Fall gezeit,
Auch wenn's erbärmlich stinkt und stark zu Tränen reizt.
Tropft man getreu nach dem Rezept noch Lauge in den Pott,
Dann geht der Ester hops und liefert Schrott!
- 4.) Nun äthert man die Pampe aus, obgleich man nicht mehr mag:
der Trichter ist versaut mit Öl und Niederschlag.
Zu diesem Zeitpunkt liegt der Misserfolg schon auf der Hand:
Drei Phasen schichten sich übereinand'!
- 5.) Trotz allem voller Illusion die Säure frisch hinzu,
es fällt sogar was aus – zunächst bewahrt man Ruh.
Doch plötzlich schäumts, und ist erst das Produkt mal untersucht,
so speit man Gift und Galle, tobt und flucht!
- 6.) Von diesem Ärger leite man sich eine Lehre her:
Trau nie der Rezeptur, sonst bleibt dein Kolben leer.
Selbst wenn der Autor für Erfolg sich namentlich verbürgt,
sind gute Resultate meist getürkt!

Aus: H. Hopf, R. A. Jacobi, *Humoristische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Von Kohlenhydraten und Glycopeptiden.....	1
1.2 Zelladhäsion	1
1.3 Die Selektine	4
1.4 Die Liganden der Selektine	6
1.4.1 L-Selektin und seine Liganden	7
1.4.2 P-Selektin und seine Liganden	8
1.4.3 E-Selektin und seine Liganden	9
1.5 Zelladhäsion als pharmakologisches Target.....	10
1.6 Die pharmakophoren Gruppen von Sialyl-Lewis ^x	11
1.7 Mimetika von Sialyl-Lewis ^x	13
1.8 Literaturbekannte Sialyl-Lewis ^x -Synthesen	17
1.8.1 Die konvergente Synthesestrategie.....	18
1.8.2 Die linearen Synthesestrategien.....	18
2 Zielsetzung	22
3 Allgemeiner Teil	25
3.1 Der Galactose-Baustein	25
3.2 Der Glucosaminbaustein	26
3.3 Der Fucose-Baustein	27
3.4 Der Arabinose-Baustein	28
3.5 Der <i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Baustein.....	29
3.6 Die Disaccharid-Bausteine	30
3.7 Die Lewis ^x -Trisaccharide	33
3.8 Sulfatierungen.....	35
3.9 Die Sialyl-Lewis ^x -Tetrasaccharide – Sialylierungen.....	38
3.10 Der Asparaginsäure-Baustein.....	43
3.11 Die glycosylierten Aminosäuren	43
3.12 Der sulfatierte Tyrosin-Baustein	50
3.13 Die (Glyco-)Peptide aus dem PSGL-1	51

3.13.1 Strategien bei der Synthese von Peptiden an der festen Phase.....	52
3.13.2 Das photolabile Ankersystem.....	55
3.13.3 Das Protokoll der automatisierten Festphasensynthese.....	58
3.13.4 Die Synthesen der (Glyco-)Peptide aus dem PSGL-1.....	59
4 Zusammenfassung und Ausblick.....	70
5 Experimenteller Teil	76
5.1 Allgemeines und Messgeräte.....	76
5.2 Synthesen.....	81
5.2.1 Synthese des Galactose-Bausteins.....	81
5.2.2 Synthese des <i>N</i> -Acetylglucosamin-Bausteins	85
5.2.3 Synthese des Fucose-Bausteins	89
5.2.4 Synthese des Arabinose-Bausteins	92
5.2.5 Synthese des <i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Bausteins	94
5.2.6 Synthese der Disaccharide.....	97
5.2.7 Synthese der Lewis ^x -Azide und Deacetylierung	101
5.2.8 Sulfatierungen.....	105
5.2.9 Sialylierungen – Synthese von Sialyl-Lewis ^x	108
5.2.10 Synthese des Asparaginsäure-Bausteins.....	111
5.2.11 Synthese der glycosylierten Aminosäuren	113
5.2.12 Synthese des sulfatierten Tyrosin-Bausteins	125
5.2.13 Synthese der (Glyco-)Peptide	127
6 Literaturverzeichnis.....	135
7 Spektrenanhang.....	142

Verwendete Abkürzungen:

[α]_b	spezifischer Drehwert	DVB	Divinylbenzol
Abb.	Abbildung	EE	Essigester
abs.	absolutiert	EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Ac	Acetyl	ELAM-1	<i>endothelial leucocyte adhesion molecule-1</i>
Ac₂O	Acetanhydrid	engl.	englisch
Ala, A	Alanin	ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
All	Allyl	ESL-1	E-Selektin Ligand-1
AMPS	Aminomethylpolystyrol	et al.	et alii
Äq	Äquivalent(e)	FD-MS	<i>field desorption mass spectrometry</i>
Ar	Aryl	Fmoc	(9H-Fluoren-9-yl)- methoxycarbonyl
Ara	D-Arabinose	FmocOSu	9-Fluorenylmethyl- succinimidylcarbonat
aromat.	aromatisch	Fuc	L-Fucose
AS	Aminosäure	Gal	D-Galctose
BB	¹ H-breitbandenkoppelt	gef.	Gefunden
ber.	Berechnet	ges.	gesättigt
Bn	Benzyl	Glc	D-Glucose
Bz	Benzoyl	GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
Bzn	Benzyliden	Glu, E	Glutaminsäure
c	Konzentration	GlyCAM-1	<i>glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i>
CAN	Cerammoniumnitrat	GMP-140	<i>granule membrane protein-140</i>
CH	Cyclohexan	h	Stunde(n)
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>	HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- N,N,N',N'-tetra- methyluroniumhexa- fluorophosphat
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>	HBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- N,N,N',N'-tetra- methyluroniumhexa- fluorophosphat
d	Dublett	HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
dd	doppeltes Dublett	HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum correlation</i>
δ	chemische Verschiebung	HOAt	1-Hydroxy-7- azabenzotriazol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]- undec-7-en	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
DC	Dünnschicht- chromatographie		
DCM	Dichlormethan		
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyan- 1,4-benzochinon		
DIPA	Diisopropylamin		
DIPEA	Diisopropylethylamin		
DMAP	4-Dimethylaminopyridin		
DMF	N,N-Dimethylformamid		
DMP	2,2-Dimethoxypropan		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DMTST	Dimethyl-(methylthio)- sulfoniumtriflat		
DTBP	Di- <i>tert.</i> -butylperoxid		

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	PE	Petrolether
HR	<i>high resolution</i>	Ph	Phenyl
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>	Phe, F	Phenylalanin
IC₅₀	<i>inhibition concentration (50 %)</i>	Piv	Pivaloyl
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>	pos.	positiv
iPrn	<i>iso-Propyliden</i>	ppm	<i>parts per million</i>
i. Hochvak.	im Hochvakuum	PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -Toloulsulfonat
i. Vak.	im Vakuum	Pro, P	Prolin
J	Kopplungskonstante	PSGL-1	P-Selektin Glycoprotein Ligand-1
Kat.	Katalysator	Py	Pyridin
konz.	konzentriert	q	Quartett
λ	Wellenlänge	quant.	quantitativ
LECAM-1	<i>leucocyte adhesion molecule-1</i>	R_f	Retentionsfaktor
Leu, L	Leucin	RP	<i>reversed phase</i>
LFA-1	Leukozytenfunktionsantigen-1	R_t	Retentionszeit
Lit.	Literatur(wert)	Raumtemp.	Raumtemperatur
Lsg.	Lösung	s	Singulett
m	Multipllett, meta	s_b	breites Singulett
m_c	zentriertes Multipllett	Schmp.	Schmelzpunkt
M	molar	SCR	<i>short consensus repeat</i>
MAdCAM-1	<i>mucosal addressing cell adhesion molecule-1</i>	sgp200	<i>sulfated glycoprotein 200</i>
Me	Methyl	sLe^a	Sialyl-Lewis ^a
MeOH	Methanol	sLe^x	Sialyl-Lewis ^x
min	Minute(n)	t	Tripllett
m / Z	Masse pro Ladung	TBDPS	<i>tert.</i> -Butyldiphenylsilyl
neg.	negativ	TBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-tetrafluoroborat
NMA	<i>N</i> -Methylanilin	TCI	Trichloracetimidat
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin	TFA	Trifluoessigsäure
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidin-2-on	TFAA	Trifluoessigsäureanhydrid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>	TfOH	Triflourmethansulfonsäure
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>	THF	Tetrahydrofuran
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>	Thr, T	Threonin
o	ortho	TMSOTf	Trimethylsilyltri-fluormethansulfonat
p	para	<i>p</i>-TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
p.a.	pro analysi / zur Analyse	Tyr, Y	Tyrosin
		u	Atommasseneinheit
		UV	ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Von Kohlenhydraten und Glycopeptiden

Die chemisch völlig unterschiedlichen Stoffklassen der Kohlenhydrate und Proteine kommen, wie seit Langem bekannt, in der Natur nur selten als reine Substanzen vor, sondern liegen bevorzugt in Form von Proteoglycanen sowie Glycopeptiden und Glycoproteinen vor. Als Glycoproteine bezeichnet man solche Proteine, in denen ein Kohlenhydratanteil – ein Mono- oder Polysaccharid – an eine oder mehrere Aminosäuren der Sequenz gebunden ist.^{1, 2} Diese Substanzen sind im Körper weit verbreitet. Sie kommen im Inneren der Zelle, auf der Membran³ und auch in extrazellulären Flüssigkeiten vor und erfüllen dort zahlreiche Aufgaben. So können sie etwa als Enzyme, Hormone, Toxine sowie als Struktur- und Gerüstsubstanzen fungieren. Eine weitere wichtige Funktion üben bestimmte Glycopeptide als Rezeptoren in Zelladhäsionsprozessen aus.

1.2 Zelladhäsion

Für den Aufbau und die Funktion komplexer mehrzelliger Organismen ist die Kommunikation zwischen den Zellen unerlässlich. So spielen Zelladhäsionsprozesse bei der Differenzierung der Zellen während der Embryogenese eine entscheidende Rolle. Außerdem sind Adhäsionsprozesse an zahlreichen weiteren biologischen Abläufen beteiligt. So etwa an der Wundheilung, der Immunantwort, an der Tumormetastasierung und an inflammatorischen Prozessen.^{4, 5, 6}

Diese interzelluläre Verständigung erfolgt dabei primär zwischen membranständigen Adhäsionsmolekülen mit ihren jeweiligen ebenfalls membranständigen Liganden, die auf der Oberfläche der jeweils benachbarten Zelle präsentiert werden. Die Gruppe dieser endothelialen Zelladhäsionsmoleküle beinhaltet unter Anderem die Cadherine⁷, die Integrine⁸,

¹ E. Fischer, *Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine I und II*, J. Springer Verlag, Berlin, **1925**.

² A. Gottschalk, *Glycoproteins*, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, **1970**.

³ R. C. Hughes, *Membrane Glycoproteins*, Butterworth, London, **1976**.

⁴ R. Kannagi, *Glycoconjugate J.*, **1997**, *14*, 577-584.

⁵ H.Kunz, *Angew. Chem.*, **1987**, *99*, 297-311.

⁶ J. Sprent, *Cell*, **1994**, *76*, 315.

⁷ K. Vleminckx, R. Kemler, *BioEssays*, **1999**, *21*, 211-220.

⁸ S. Shattil, M. H. Ginsberg, *J. Clin. Invest.*, **1997**, *100*, 1.

die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie⁹ sowie die drei Selektine E-, L- und P-Selektin.^{10, 11, 12}

Als Beispiele sollen hier die Wechselwirkungen der weißen Blutkörperchen mit Rezeptormolekülen auf der Gefäßoberfläche und die Ausbreitung von Karzinomzellen erläutert werden.

Zur Gruppe der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) zählen die Lymphozyten, Monozyten und neutrophile, eosinophile sowie basophile Granulozyten. Alle diese Zellen zirkulieren im Blut, müssen jedoch um ihre Aufgabe bei der Immunantwort auf körperfremde Stoffe erfüllen zu können, zuerst an die betreffende Stelle dirigiert werden und anschließend dort die Gefäßwand durchdringen. Beim ersten Schritt, dem so genannten „Homing“, kommt es zunächst zu einer durch Wechselwirkung mit Rezeptoren gesteuerten Adhäsion an die Gefäßwand und anschließend zur Passage durch das Endothel hindurch in die lymphatischen Organe.¹³

Die Metastasierung bösartiger Tumore erfolgt wie bereits erwähnt ebenfalls durch Adhäsionsprozesse. So gelingt es im Blutstrom zirkulierenden Tumorzellen, durch Bindung an endotheliale Zelladhäsionsmoleküle umliegendes Gewebe zu erreichen und dort Tochtergeschwüre auszubilden. Die genaue Rolle der Adhäsionsrezeptoren bei der Metastasierung ist ebenfalls Objekt zahlreicher Untersuchungen.¹⁴ So deutet die erfolgreiche Anwendung anti-inflammatorischer Medikamente in der Krebstherapie darauf hin, dass sowohl die Tumormetastasierung als auch Entzündungsprozesse nach ähnlichen Mechanismen ablaufen.

Bei inflammatorischen Prozessen findet nämlich ebenfalls eine wie oben beschriebene rezeptorvermittelte Wechselwirkung zwischen Leukozyten und Endothelzellen statt. Die Initialphase der Leukozytenadhäsion wird dabei maßgeblich durch die drei Selektine bestimmt.

Durch Ausschüttung zahlreicher spezifischer Signalmoleküle, wie z. B. des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α), von Interleukin-1, Thrombin oder Histamin, sowie von Peroxidradikalen am Endzündungsherd werden die Endothelzellen angeregt, Selektine (E- und P-Selektin) auf ihrer Oberfläche zu exprimieren.¹⁵ Da das P-Selektin im Innern der Zelle gespeichert vorliegt,

⁹ G. M. Edelmann, K. L. Crossin, *Annu. Rev. Biochem.*, **1991**, 60, 155.

¹⁰ E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C.-H. Wong, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 833.

¹¹ F. M. Unger, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **2001**, 57, 207.

¹² C. Ehrhardt, C. Kneuer, U. Bakowsky, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2004**, 56, 527.

¹³ N. Sharon, H. Lis, *Spektrum der Wissenschaft*, **1993**(3), 66.

¹⁴ H. Kobayashi, K. C. Boelte, P. C. Lin, *Curr. Med. Chem.*, **2007**, 14, 377-386.

¹⁵ M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S. I. Hakomori, J. C. Paulson, *Science*, **1990**, 250, 1130.

wird es bereits binnen weniger Minuten auf der Zelloberfläche präsentiert, während bis zur Expressierung des E-Selektins mehrere Stunden vergehen.¹⁶ Diese auf der Endothel-Oberfläche befindlichen Selektine treten nun in Wechselwirkung mit den membranständig auf Leukozyten befindlichen kohlenhydrathaltigen Selektin-Liganden, wie z. B. dem P-Selektin-Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) oder dem E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1). Durch diese Wechselwirkung werden die Leukozyten zunächst im Blutstrom abgebremst und beginnen entlang des vaskulären Endothels zu „rollen“. Die anschließend folgende feste Adhäsion erfolgt schließlich durch starke Protein-Protein-Wechselwirkungen von Molekülen der Integrin-Familie (z. B. dem Leukozytenfunktionsantigen-1, LFA-1) mit ihren jeweiligen Liganden (z. B. dem *intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1). Ist der Leukozyt so an das Endothel gebunden, flacht er sich ab und es beginnt die Diapedese, die Wanderung entlang eines Chemokin-Gradienten (z. B. Interleukin-8) durch das Endothel hindurch in das entzündete Gewebe, wo daraufhin die Abwehrprozesse beginnen.¹⁰ Dieser Mechanismus ist in der nachstehenden Abbildung veranschaulicht.¹⁷

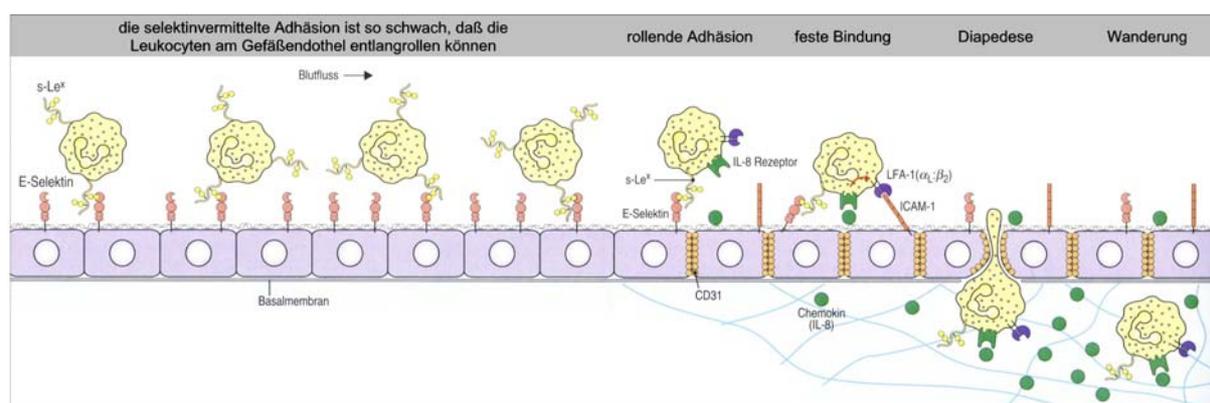


Abb. 1.1: Die Reaktionskaskade bei inflammatorischen Prozessen

Die rollende Adhäsion wurde von *Dwir* und *Schwarz* mittels Flusskammer-Experimenten und Computersimulationen eingehend untersucht.¹⁸ Es zeigt sich, dass bei niedrigen Flussraten nur kurze Einzelbindungen zwischen L-Selektin und seinen Liganden existieren, deren Lebensdauer im Millisekundenbereich liegt. Erst oberhalb einer kritischen Durchflussrate kommt es zur Ausbildung von Mehrfachbindungen, was in einer Verstärkung der Adhäsion um den Faktor 14 und einer Verlängerung der Lebensdauer der Bindung in den

¹⁶ M. P. Bevilacqua, S. Stengelin, M. A. Gimbrone jr., B. Seed, *Science*, **1989**, 243, 1160.

¹⁷ C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *Immunologie*, 5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **2002**.

¹⁸ O. Dwir, A. Solomon, S. Mangan, G. S. Kansas, U. S. Schwarz, R. Alon, *J. Cell Biol.*, **2003**, 163, 649.

Sekundenbereich resultiert. Dies hat zur Folge, dass es nur innerhalb des Blutstroms zu einer wirkungsvollen Zelladhäsion kommen kann, während sie außerhalb der Blutgefäße wirkungsvoll unterdrückt wird.

Das Zusammenspiel der verschiedenen Adhäsionsrezeptoren im „Recruiting“ der Leukozyten wurde durch Experimente mit Knockout-Mäusen, denen einzelne oder Kombinationen von E-, P- und L-Selektin sowie ICAM-1 fehlten, untersucht.^{19, 20, 21} Dieser hochkomplexe Prozess ist jedoch noch nicht im Detail verstanden.

1.3 Die Selektine

Während die Cadherine und Integrine sowie die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie eine Vielzahl von Zell-Zell-Wechselwirkungen im gesamten Organismus beeinflussen, ist die Wirkung der Selektine auf die Wechselwirkung von Endothelzellen mit Leukozyten und Thrombozyten (Blutplättchen) während der Zelladhäsion beschränkt. In dieser Selektivität sowie ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den Lektinen liegt der Name Selektine (früher: *lectin adhesion molecule*, LECAM) begründet.¹³

Es sind drei Arten von Selektinen bekannt, die jeweils nach dem Zelltyp benannt sind, auf dem sie zuerst entdeckt wurden:

- **L-Selektin:** Der erste Nachweis gelang mit Hilfe des Antikörpers MEL-14 auf Lymphozyten.²² In der älteren Literatur wird L-Selektin auch CD62L, LECAM-1 (*lectin adhesion molecule-1*) oder MEL-14 genannt.
- **P-Selektin** wurde erstmals in den Granula der Blutplättchen (engl.: *platelets*) identifiziert.²³ Ältere Bezeichnungen sind CD62P, LECAM-3, PADGEM und GMP-140 (*granule membrane protein-140*).
- **E-Selektin:** Die Entdeckung erfolgte mittels monoklonaler Antikörper auf Endothelzellen.²⁴ E-Selektin wurde früher auch als CD62E, LECAM-2 und ELAM-1 (*endothelial leucocyte adhesion molecule-1*) bezeichnet.

¹⁹ S. B. Forlow, K. Ley, *Am. J. Heart Circ. Physiol.*, **2001**, 280, 634.

²⁰ T. N. Mayadas, R. C. Johnson, H. Rayburn, R. O. Hynes, D. D. Wagner, *Cell*, **1993**, 74, 541-554.

²¹ M. L. Arbones, D. C. Ord, K. Ley, H. Ratech, C. Maynard-Curry, D. J. Capon, T. F. Tedder, *Immunity*, **1994**, 1, 247-260.

²² W. M. Gallatin, I. L. Weissman, E. C. Butcher, *Nature*, **1983**, 305, 30.

²³ S. Hsu-Lin, C. L. Berman, B. C. Furie, D. August, B. Furie, *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 9121-9126.

²⁴ M. P. Bevilacqua, J. S. Prober, D. L. Mendrick, R. S. Cotran, M. A. Gimbrone jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 9238-9242.

Alle drei Selektine weisen eine charakteristische extrazelluläre Region auf. So befindet sich am Aminoterminus eine den calciumabhängigen Lektinen²⁵ homologe Domäne, die so genannte CR-Domäne (*carbohydrate recognition domain*, CRD), welche in Wechselwirkung mit den Kohlenhydratanteilen der Liganden tritt und aus ungefähr 120 Aminosäuren aufgebaut ist. Der CRD folgt eine dem *epidermal growth factor* (EGF) ähnliche Domäne und eine für das jeweilige Selektin typische Anzahl kurzer Wiederholungseinheiten (*short consensus repeat*, SCR). Diese dienen vermutlich als Abstandhalter zur Zellmembran, um einem einfachen Zugang zu den Kohlenhydratliganden zu gewährleisten.²⁶ Die Verankerung der Selektine in der Zellmembran erfolgt durch eine einzige Transmembran-Peptidkette, an die sich ein kurzer cytoplasmatischer Teil anschließt.¹⁶

Der Aufbau der drei Selektine ist in der nachstehenden Abbildung schematisch dargestellt.

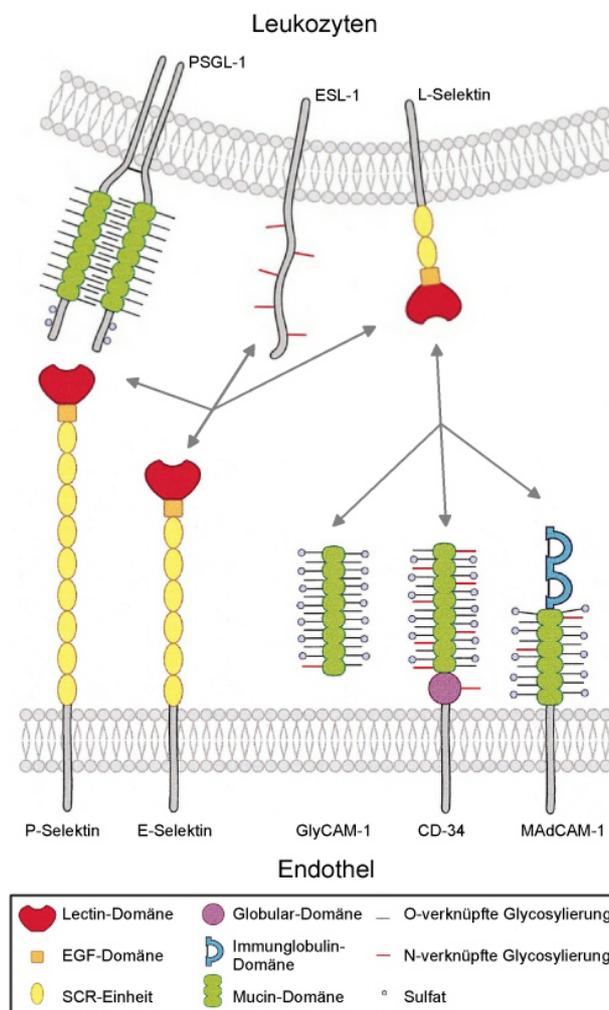


Abb. 1.2: Schematischer Aufbau der drei Selektine

²⁵ H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 637-674

²⁶ K.-S. Huang, B. J. Graces, B. A. Wolitzki, in *Functional Analysis of Selectin Structure*, Vol. 3, (Ed.: D. Vestweber), Harwood, Amsterdam, **1997**, S. 1.

1.4 Die Liganden der Selektine

Die homologen CR-Domänen aller drei Selektine erkennen und binden jeweils die charakteristischen Kohlenhydrat-Epitope Sialyl-Lewis^x (sLe^x) und Sialyl-Lewis^a (sLe^a) sowie verwandte Strukturen.^{10, 16}

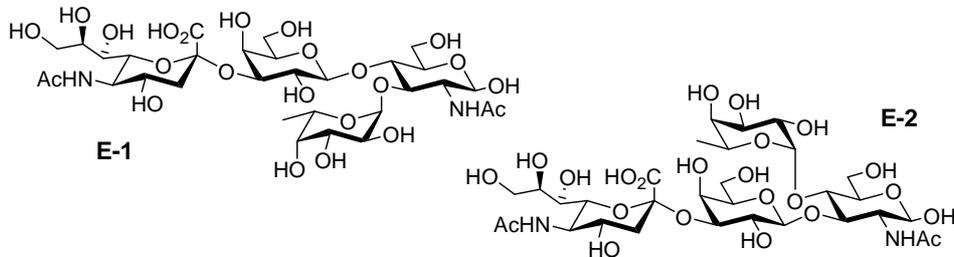


Abb. 1.3: Strukturen von Sialyl-Lewis^x (**E-1**) und Sialyl-Lewis^a (**E-2**)

Die beiden Isomere unterscheiden sich hierbei lediglich in der Anordnung der Fucosyl- und Galactosyl-Komponenten am Glucosamin-Baustein. Störungen im Fucose-Stoffwechsel, wie sie bei Patienten mit der Erbkrankheit LAD-II (Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-II)²⁷ auftreten, verhindern den Aufbau der beschriebenen Tetrasaccharide.²⁸ Durch das Fehlen dieser Bausteine wird ein wesentlicher Schritt in der Infektabwehr, nämlich die Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen gestört, wodurch die betroffenen Patienten an häufig wiederkehrenden, schweren Infektionen leiden. Durch die tägliche Gabe von Fucose können LAD-II-Patienten wieder die benötigten Selektinliganden aufbauen und somit einen normalen Leukozyten-Spiegel im Blut erreichen.²⁹

Jedoch beruht die spezifische Rezeptorbindung nicht ausschließlich auf den genannten Tetrasacchariden, sondern auch auf weiteren Partialstrukturen. So wird unter anderem eine Wechselwirkung der Selektinliganden mit der EGF-Domäne diskutiert. Chimäre Selektine mit der CR-Domäne von L-Selektin und der EGF-Domäne von P-Selektin zeigen duale Ligandenbindungsspezifitäten.³⁰

²⁷ M. L. Phillips, B. R. Schwartz, A. Etzioni, R. Bayer, H. D. Ochs, J. C. Paulson, J. M. Harlan, *J. Clin. Invest.*, **1995**, *96*, 2898.

²⁸ A. Karsan, C. J. Cornejo, R. K. Winn, B. R. Schwartz, W. Way, N. Lannir, R. Gershoni-Baruch, A. Etzioni, H. D. Ochs, J. M. Harlan, *J. Clin. Invest.*, **1998**, *101*, 2438.

²⁹ K. Lühn, T. Marquardt, E. Harms, D. Vestweber, *Blood*, **2001**, *97*, 330-332.

³⁰ G. S. Kansas, K. B. Saunders, K. Ley, A. Zakrzewics, R. M. Gibson, B. Furie, B. C. Furie, T. F. Tedder, *J. Cell. Biol.*, **1994**, *124*, 609.

1.4.1 L-Selektin und seine Liganden

L-Selektin wird im Gegensatz zu P- und E-Selektin nicht auf Endothelzellen, sondern auf Leukozyten und Lymphozyten konstitutiv exprimiert und dient dort als „Homing-Rezeptor“ bei der Diapedese in peripheres Gewebe. Beim Ablauf von Entzündungsprozessen bewerkstelligt das L-Selektin kooperativ mit dem P-Selektin auf der Oberfläche des Endothels die Rekrutierung der Leukozyten.³¹ Die Regulierung dieser durch L-Selektin vermittelten Zelladhäsion erfolgt durch eine gesteigerte Expression von L-Selektinliganden auf der Oberfläche der Endothelzellen.

Als solche Liganden wurden bisher die fünf Glycoproteine GlyCAM-1 (*glycosylation dependent cell adhesion molecule-1*), CD34, MadCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*), sgp200 (*sulfated glycoprotein 200*) und PSGL-1 identifiziert. Untersuchungen am GlyCAM haben gezeigt, dass der Ligand in der 6-Position des Glucosamin- oder Galactose-Teils des Sialyl-Lewis^x-Epitops sulfatiert sein muss, damit eine effektive Bindung an L-Selektin erfolgen kann.³² Bei CD34³³, sgp200³⁴ und GlyCAM-1³⁵ handelt es sich um mucinartige Glycoproteine mit *O*-glycosidisch verknüpften Kohlenhydraten. Im Gegensatz zu diesen besitzt der L-Selektinligand MadCAM-1 sowohl Immunglobulin- als auch mucinartige Domänen und ist in der Lage außer mit L-Selektin auch mit dem Integrinrezeptor $\alpha_4\beta_7$ in Wechselwirkung zu treten. Somit ermöglicht MadCAM-1 den Leukozyten sowohl das selektinvermittelte Rollen als auch die feste, durch Integrine vermittelte Adhäsion.^{36, 37}

Von besonderer Bedeutung ist auch die Bindung an PSGL-1, den natürlichen Liganden des P-Selektins. Durch diese Akzeptanz ist es Leukozyten möglich mit dem L-Selektin auf ihrer Oberfläche an PSGL-1 zu binden, das wiederum auf der Oberfläche bereits adhärrierter Zellen oder Blutplättchen präsentiert wird. Es kommt somit zur rollenden Adhäsion auf den bereits am Endothel gebundenen Zellen. Dieser Prozess der verstärkten Leukozyten-Rekrutierung am Entzündungsherd wird als „*secondary tethering*“ bezeichnet.³⁸

Als weitere Liganden für L-Selektin fungieren außerdem Sulfatide, Heparinsulfat und Fucoidin.

³¹ A. Giannis, *Angew. Chem.*, **1994**, 106, 188.

³² S. Hemmerich, H. Leffler, S. D. Rosen, *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 12035-12047.

³³ S. Baumhueter, M. S. Singer, W. Henzel, S. Hemmerich, M. Renz, S. D. Rosen, L. A. Lasky, *Science*, **1993**, 262, 436-438.

³⁴ S. Hemmerich, E. C. Butcher, S. D. Rosen, *J. Exp. Med.*, **1994**, 180, 2219-2226.

³⁵ D. Crommie, S. D. Rosen, *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 22614-22624.

³⁶ E. L. Berg, L. M. McEvoy, C. Berlin, R. F. Bargatze, E. C. Butcher, *Nature*, **1993**, 366, 695-698.

³⁷ C. Berlin, E. L. Berg, M. J. Briskin, D. P. Andrew, P. J. Kilshaw, B. Holzmann, I. L. Weissman, A. Hamann, E. C. Butcher, *Cell*, **1993**, 74, 185-195.

³⁸ B. Walchek, K. L. Moore, R. P. McEver, T. K. Kishimoto, *J. Clin. Invest.*, **1996**, 98, 1081.

1.4.2 P-Selektin und seine Liganden

P-Selektin liegt in den Weibel-Palade-Vesikeln nicht aktivierter endothelialer Zellen sowie in den α -Granula der Blutplättchen gespeichert vor.³⁹ Durch diese Speicherung kann das P-Selektin bei Anregung durch Botenstoffe wie Histamin, Thrombin, Peroxidradikale, Proteinfragmente des Komplement-Systems u. a. binnen Minuten mobilisiert und auf der Zelloberfläche exprimiert werden.⁴⁰ Diese schnelle Expressionskinetik ist charakteristisch für P-Selektin. In Experimenten mit Knockout-Mäusen, denen P-Selektin fehlt, wurde gezeigt, dass dort die Leukozytenrekrutierung um zwei bis vier Stunden verzögert ist.

Nach 30 bis 60 Minuten wird das exprimierte P-Selektin durch Endozytose wieder in die Zelle aufgenommen und dort entweder proteolytisch abgebaut oder aber nach spezifischer Erkennung in der Transmembran-Domäne wieder in den Weibel-Palade-Vesikeln gespeichert.⁴¹

Der natürliche Ligand des P-Selektins ist der PSGL-1, ein aus zwei jeweils circa 120 kDa großen Untereinheiten bestehendes, disulfidverbrücktes Homodimer.⁴² Er besteht aus 402 Aminosäuren und ist mit bis zu drei *N*-glycosidisch und zahlreichen *O*-glycosidisch gebundenen Kohlenhydraten besetzt. Wie *Sako*⁴³ und *Seed*⁴⁴ zeigen konnten, sind die 19 Aminosäuren des *N*-Terminus für die Bindung an P-Selektin von entscheidender Bedeutung. Dort liegt Sialyl-Lewis^x *O*-glycosidisch über eine Core-2-Struktur an Threonin (Thr⁵⁷) gebunden vor. Ebenfalls in diesem Bereich finden sich drei Tyrosine (Tyr⁴⁶, Tyr⁴⁸ und Tyr⁵¹), von denen mindestens eines sulfatiert vorliegen muss, damit eine effektive Bindung an P-Selektin zustande kommt.⁴⁵ Dies konnte von *Camphausen* et al. mittels Röntgenstrukturanalyse eines an P-Selektin gebundenen gentechnisch modifizierten PSGL-1 Fragmentes⁴⁶ (bestehend nur aus CR- und EGF-Domäne) belegt werden.⁴⁷

³⁹ R. P. McEver, J. H. Beckstead, K. L. Moore, L. Marshal-Carlson, D. F. Bainton, *J. Clin. Invest.*, **1989**, *84*, 92-99.

⁴⁰ T. F. Tedder, D. A. Steeber, A. Chen, P. Engel, *FASEB J.*, **1995**, *9*, 866-873.

⁴¹ C. J. Fleming, G. Berger, J. Guichard, E. M. Cramer, D. D. Wagner, *Eur. J. Cell. Biol.*, **1998**, *75*, 331.

⁴² K. L. Moore, N. L. Stults, S. Diaz, D. L. Smith, R. D. Cummings, A. Varki, R. P. McEver, *J. Cell. Biol.*, **1992**, *118*, 445.

⁴³ D. Sako, K. M. Commess, K. M. Barone, R. T. Camphausen, D. A. Cumming, G. D. Shaw, *Cell*, **1995**, *83*, 323.

⁴⁴ T. Pouyani, B. Seed, *Cell*, **1995**, *83*, 333.

⁴⁵ V. Rmachandran, M. U. Nollert, H. Qiu, W.-J. Liu, R. D. Cummings, C. Zhu, R. P. McEver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 13771.

⁴⁶ P. Mehta, K. D. Patel, T. M. Laue, H. P. Erickson, R. P. McEver, *Blood*, **1997**, *90*, 2381.

⁴⁷ W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen, *Cell*, **2000**, *103*, 467.

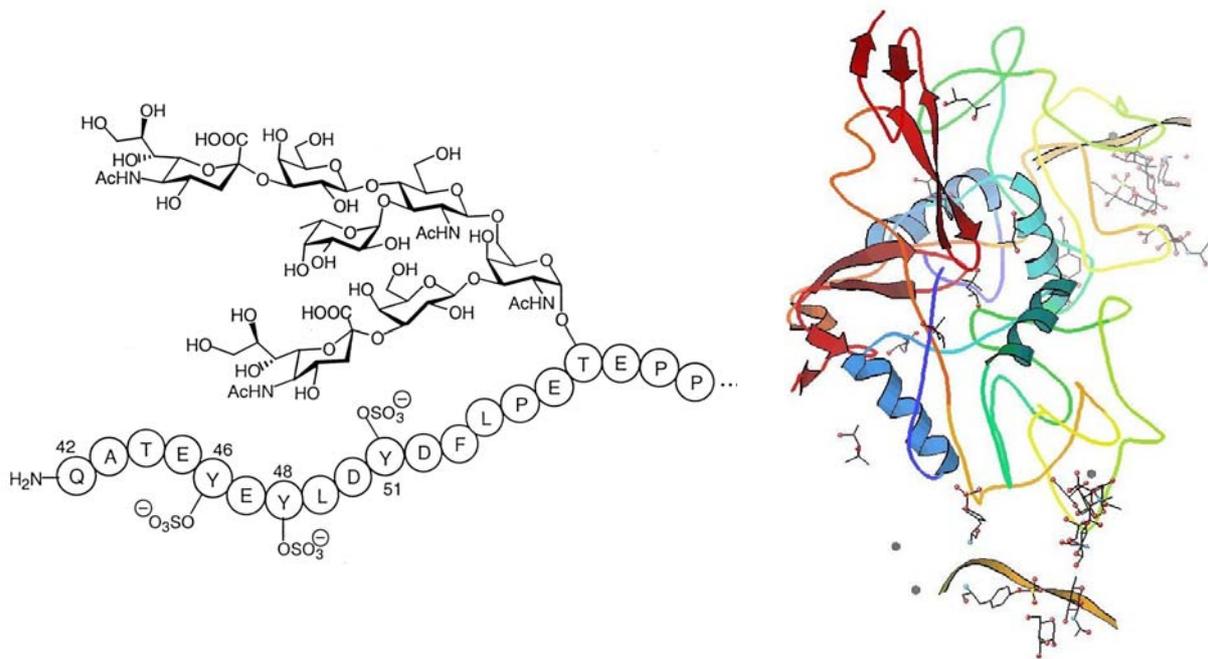


Abb. 1.4: Struktur der N-terminalen Domäne des PSGL-1 (links) und Kristallstruktur des Komplexes von P-Selektin mit einem PSGL-1-Fragment⁴⁸ (rechts)

Als weitere Liganden für P-Selektin wurden Sulfatide, Heparin, Fucoidin und Dextransulfate identifiziert.¹⁰

1.4.3 E-Selektin und seine Liganden

Im Gegensatz zu P-Selektin ist die Expression von E-Selektin auf Endothelzellen beschränkt. Es liegt auch nicht gespeichert in den Endothelzellen vor, sondern wird erst nach Aktivierung durch Mediatoren wie z. B. TNF- α oder Interleukin-1 auf transkriptioneller Ebene exprimiert. Daher dauert es bis zur maximalen Präsentation von E-Selektin auf der Zelloberfläche bis zu vier Stunden. Diese verzögerte Expressionskinetik, sowie die Tatsache, dass E-Selektin – wenn auch deutlich schwächer als P-Selektin – auch an PSGL-1 bindet, deutet darauf hin, dass das E-Selektin nach der Wiedereinlagerung des P-Selektins in die Zelle dessen Aufgaben im Rahmen der inflammatorischen Kaskade weitgehend übernimmt. Die Reduktion der Selektinkonzentration auf der Zelloberfläche wird durch endocytotische Internalisierung und Abbau in den Lysosomen erreicht. So stellt sich zehn bis zwölf Stunden nach Aktivierung der Zelle wieder der Ausgangszustand ein.⁴⁹

⁴⁸ W. S. Somers, R. T. Camphausen, *RCSB Protein Data Bank*, **2001**.

⁴⁹ G. S. Kansas, *Blood*, **1996**, 88, 3259.

Als spezifischen Liganden in der Maus konnten Vestweber et al. mittels Affinitätschromatographie den ESL-1 (E-Selektin-Ligand-1) identifizieren.⁵⁰ Dieses aus 1148 Aminosäuren bestehende Glycoprotein weist fünf potenzielle N-Glycosylierungsstellen sowie 16 cysteinreiche Wiederholungseinheiten auf.⁵¹ Massenspektrometrische Untersuchungen an enzymatisch N-deglycosyliertem ESL-1 sowie der unglycosylierten Peptidsequenz legen nahe, dass im ESL-1 keine O-glycosylierten Kohlenhydrate vorliegen.⁵²

Das nichtglycosylierte Proteinrückgrad des ESL-1 findet sich auch auf anderen Zelltypen wieder. Dies lässt vermuten, dass das Protein neben der Leukozyten-Rekrutierung noch weitere wichtige biologische Funktionen besitzt.⁵³

1.5 Zelladhäsion als pharmakologisches Target

Die Adhäsion von Leukozyten an das vaskuläre Endothel ist wie oben beschrieben ein wichtiger Mechanismus des Körpers zur Abwehr von Fremdkörpern oder Bakterien im Rahmen der Immunantwort. Eine übermäßige durch Selektin-Ligand-Wechselwirkungen induzierte Zelladhäsion ist jedoch an zahlreichen Krankheiten beteiligt. So gehen z. B. verschiedene Erkrankungen der Herzkranzgefäße,⁵⁴ chronische Endzündungsprozesse wie Psoriasis und rheumatoide Arthritis⁵⁵ sowie das Reperfusionssyndrom⁵⁶ mit einer gesteigerten Adhäsion einher.

Zum Letztgenannten kommt es, wenn Blutgefäße – aufgrund einer schweren Verletzung, einer komplizierten Operation oder einem Myokardinfarkt – längere Zeit nicht durchblutet werden. Die Selektine auf den Endothelzellen werden hierbei aktiviert, was zur Folge hat, dass beim Wiedereinsetzen des Blutstroms große Mengen an Leukozyten in das umliegende Gewebe ausgeschleust werden, wodurch dieses schwer geschädigt werden kann.

Ein Ansatz zur Behandlung derartiger Krankheiten besteht in der Gabe löslicher Selektin-Liganden, die die Bindung an die Selektine kompetitiv hemmen und somit die übermäßige Zelladhäsion unterbinden. Derartige Adhäsionsinhibitoren basieren vor allem auf Sialyl-Lewis^x als Leitstruktur, da dieses Tetrasaccharid einen essenziellen Bestandteil der endogenen

⁵⁰ A. Levinovitz, J. Mühlhoff, S. Isenmann, D. Vestweber, *J. Cell. Biol.*, **1993**, *121*, 449.

⁵¹ M. Steegmaier, A. Levinovitz, S. Isenmann, E. Borges, M. Lenter, H. P. Kocher, B. Kleuser, D. Vestweber, *Nature*, **1995**, *373*, 615.

⁵² M. Lenter, A. Levinovitz, S. Isenmann, D. Vestweber, *J. Cell. Biol.*, **1994**, *125*, 471.

⁵³ D. Vestweber, J. E. Blanks, *Physiological Reviews*, **1999**, *79*, 181.

⁵⁴ W. Sluiter, A. Pietersma, J. M. J. Lamers, J. F. Koster, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1993**, *22*, 37-44.

⁵⁵ T. Ochi, S. hokomori, M. Fujimoto, M. Okamura, H. Owaki, S. Wakitani, Y. Shimaoka, K. Hayashida, T. Tomita, S. Kawamura, K. Ono, *J. Rheumatol.*, **1993**, 2038-2045.

⁵⁶ M. Buerke, A. S. Weyrich, Z. Zheng, F. C. A. Gaeta, M. J. Forrest, A. M. Lefer, *J. Clin. Invest.*, **1994**, *93*, 1140-1148.

Liganden darstellt. Im Tierversuch konnte Sialyl-Lewis^x erfolgreich zur Therapie von durch Cobra-Venom ausgelösten P-Selektin-abhängigen Lungenerkrankungen⁵⁷ sowie von myokardialen Reperfusionverletzungen⁵⁶ eingesetzt werden.

Weitere potenzielle Anwendungsgebiete für antiadhäsive Medikamente stellen Autoimmunerkrankungen wie akute Polyarthrit, entzündliche allergische Hautreaktionen und Herz-Kreislauf-Störungen dar. Des Weiteren wird momentan untersucht, ob es möglich ist, mittels antiadhäsiver Therapien die Ausbreitung von Krebszellen über den Blutkreislauf zu unterdrücken, da die Metastasierung wie bereits erwähnt, ebenfalls auf Selektin-vermittelter Zelladhäsion beruht.^{58, 59, 60, 61}

1.6 Die pharmakophoren Gruppen von Sialyl-Lewis^x

Durch systematischen Austausch oder Deletion bestimmter Hydroxylgruppen der jeweiligen Kohlenhydratbausteine von Sialyl-Lewis^x sowie durch Röntgenkristallstruktur-Analysen weiß man heute, dass die besagte Bindung auf den drei Hydroxy-Funktionen der Fucose^{62, 63} sowie der 4- und 6-Position der Galactose^{64, 65} beruht. Außerdem ist die Carboxylgruppe der Neuraminsäure unerlässlich.⁶⁶ Im P-Selektin ist von den drei Hydroxylgruppen der Fucose nur diejenige in der 3-Position für die Bindung essenziell, während der Verlust einer der anderen lediglich zu einer reduzierten Affinität führt.⁶³ Hingegen völlig unbeteiligt an der Bindung sind die Acetamidofunktion und die Glycerinseitenkette der Neuraminsäure sowie der Glucosamin-Baustein. Letzterer scheint lediglich als Scaffold zu fungieren, der die für die Bindung notwendigen Fucose- und Galactose-Bausteine in der richtigen räumlichen Anordnung fixiert.⁶⁷

⁵⁷ M. S. Mulligan, J. C. Paulson, S. DeFrees, Z.-L. Zheng, J. B. Lowe, P. A. Ward, *Nature*, **1993**, *364*, 149-151.

⁵⁸ T. Nakashio, T. Narita, M. Sato, S. Akiyama, Y. Kasai, M. Fujiwara, K. Ito, H. Takagi, R. Kannagi, *Anticancer Res.*, **1997**, *17*, 293-299.

⁵⁹ R. Renkonen, P. Mattila, M.-L. Majuri, J. Rabinä, S. Toppila, J. Renkonen, L. Hirvas, J. Niitymäki, J. P. Turunen, O. Renkonen, T. Paavonen, *Glycoconjugate J.*, **1997**, *14*, 593-600.

⁶⁰ R. Kanagi, *Glycoconjugate J.*, **1997**, *14*, 577-584.

⁶¹ L. Borsig, *News Physiol. Sci.*, **2004**, *19*, 16-21.

⁶² J. Y. Ramphal, Z.-L. Zheng, C. Perez, L. E. Walker, S. A. DeFrees, F. C. A. Gaeta, *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 3459-3463.

⁶³ B. K. Bradley, M. Kiso, S. Abbas, P. Nikrad, O. Srivasatava, C. Foxall, Y. Oda, A. Hasegawa, *Glycobiology*, **1993**, *3*, 633-641.

⁶⁴ W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **1994**, *106*, 2186-2188.

⁶⁵ R. Banteli, B. Ernst, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 459-462.

⁶⁶ D. Tyrell, P. James, N. Rao, C. Foxall, S. Abbas, F. Dasgupta, M. Nashed, A. Hasegawa, M. Kiso, D. Asa, J. Kidd, B. K. Bradley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, 10372-10376.

⁶⁷ M. J. Bamford, M. Bird, P. M. Gore, D. S. Holmes, R. Priest, J. C. Prodger, V. Saez, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 239-244.

Durch gezielten Austausch einzelner Aminosäuren in molekularbiologischen Punktmutations-Experimenten konnten genaue Erkenntnisse über entscheidende Wechselwirkungen von Aminosäuren der CR-Domäne von E-Selektin mit Sialyl-Lewis^x gewonnen werden.⁶⁸

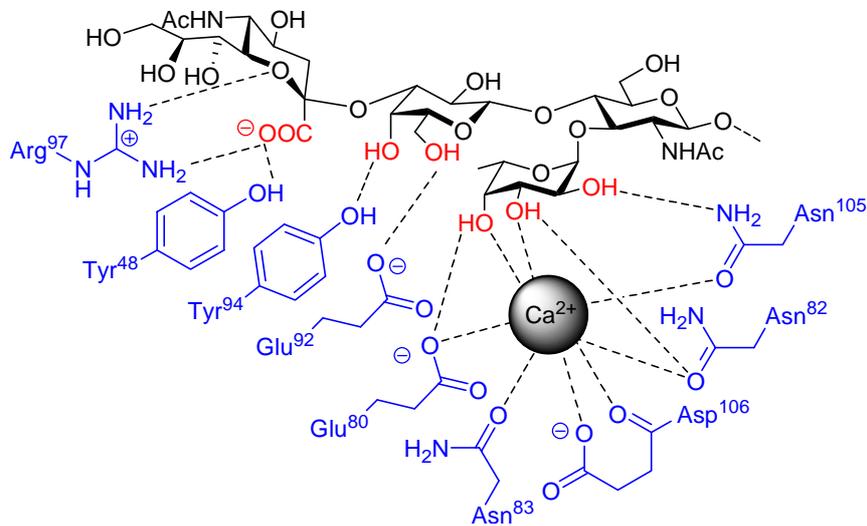


Abb. 1.5: Wechselwirkungen zwischen Sialyl-Lewis^x und E-Selektin

Die von *Camphausen* et al. veröffentlichte Röntgenstrukturanalyse der Komplexe von Sialyl-Lewis^x mit den EGF- und CR-Domänen von P- und E-Selektin⁴⁷ zeigt, dass die Bindungsstelle in beiden Selektinen hochkonserviert vorliegt und somit die Bindung durch Koordination von Ca²⁺ an die Seitenketten von Glu⁸⁰, Asn⁸², Asn⁸³, Asn¹⁰⁵, Asp¹⁰⁶, an die α -Carbonylgruppe von Asp¹⁰⁶ sowie an die 3- und 4- Hydroxyfunktion der Fucose bewirkt.

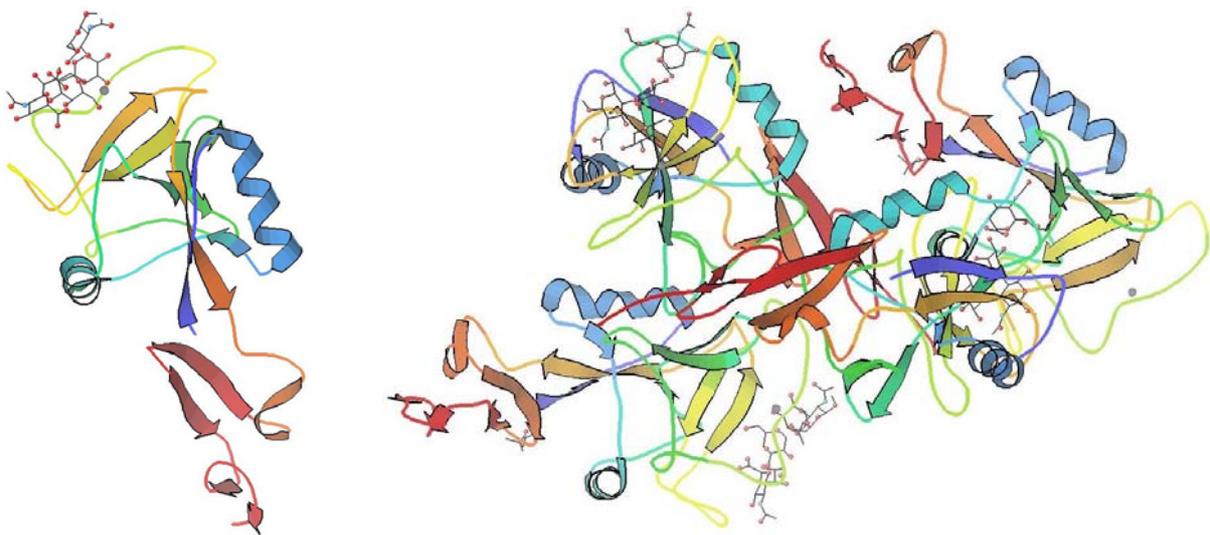


Abb. 1.6: Kristallstruktur der Komplexe von Sialyl-Lewis^x mit E-Selektin (links) und P-Selektin (rechts)

⁶⁸ T. B. Kogan, B. M. Revelle, S. Tapp, D. Scott, P. J. Beck, *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 14047.

Weitere Wasserstoffbrücken zwischen der 3-OH-Funktion der Fucose mit Asn¹⁰⁵ und der 4-OH-Funktion mit Glu⁸⁰ und Asn⁸² verstärken die Bindung zusätzlich. Des Weiteren binden die 4- und 6-Hydroxygruppen der Galactose an Tyr⁹⁴ bzw. Glu⁹² und die Neuraminsäure mit ihrer Carboxyfunktion an Tyr⁴⁸ und Arg⁹⁷. Die letztgenannte Aminosäure koordiniert außerdem den Ringsauerstoff der Neuraminsäure.

1.7 *Mimetika von Sialyl-Lewis^x*

Die Synthese von Sialyl-Lewis^x ist sowohl auf chemischem als auch auf enzymatischem Wege aufwendig und teuer. Außerdem ist Sialyl-Lewis^x bei oraler Gabe nicht aktiv und besitzt eine Affinität zu den Selektinen, welche nur im millimolaren Bereich liegt. Ziel der Forschung ist es daher, hochwirksame Mimetika für Sialyl-Lewis^x zu synthetisieren.

Ein Ansatz besteht in der Substitution der Neuraminsäure, zum einen da Sialylierungsreaktionen in der Regel nur in mäßigen Ausbeuten verlaufen und zum anderen auf Grund des hohen Preises der *N*-Acetylneuraminsäure (*Acros Organics*, 2006/07: 100 mg: € 105.90). Da die Carboxyfunktion der Sialinsäure die einzige pharmakophore Gruppe dieses Bausteins darstellt, lässt sich dieser durch einfache anionische Substituenten wie Sulfat- oder Phosphat- oder Glykolsäurereste ersetzen.⁶⁹ Ein besonders vielversprechender Ansatz unter Verwendung von (*S*)-Cyclohexylmilchsäure als Substitut der Neuraminsäure wurde von *Kolb* und *Ernst* präsentiert.⁷⁰ *Thoma* et al. von der schweizer Firma Novartis gelang aufbauend darauf die Synthese zahlreicher Mimetika, von den die unten dargestellte Verbindung **E-3** in einem zellfreien Bindungsassay eine 30fach höhere Affinität zu E-Selektin verglichen mit Sialyl-Lewis^x zeigt.⁷¹

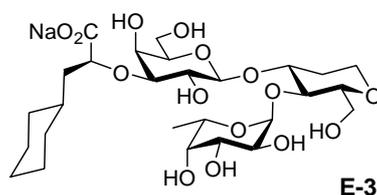


Abb. 1.7: Das *sLe^x*-Mimetikum **E-3** von Novartis unter Verwendung von (*S*)-Cyclohexylmilchsäure als Substitut der Neuraminsäure

⁶⁹ H. Ohmoto, K. Nakamura, T. Inoue, N. Kondo, Y. Inoue, K. Yoshino, H. Kondo, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 1339.

⁷⁰ H. C. Kolb, B. Ernst, *Chem. Eur. J.*, **1997**, 3, 1571-1578.

⁷¹ G. Thoma, W. Kinzy, C. Brums, J. T. Patton, J. L. Magnani, R. Banteli, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 4909-4913.

Einen weiteren Ansatz zur Substitution stellt das Glucosamin-Scaffold dar, da es nicht selbst aktiv an der Bindung beteiligt ist und daher leicht durch verschiedene vicinale Dirole ersetzt werden kann.^{67, 71} Wichtig ist hierbei, dass dieser Baustein entscheidend für die Präorganisation der bioaktiven Konformation des Moleküls ist.^{72, 73} Je ähnlicher sich die Konformationen des Substrats im gebundenen und im ungebundenen Zustand sind, desto höher ist auch die Affinität des entsprechenden Mimetikums (Entropieeffekt).

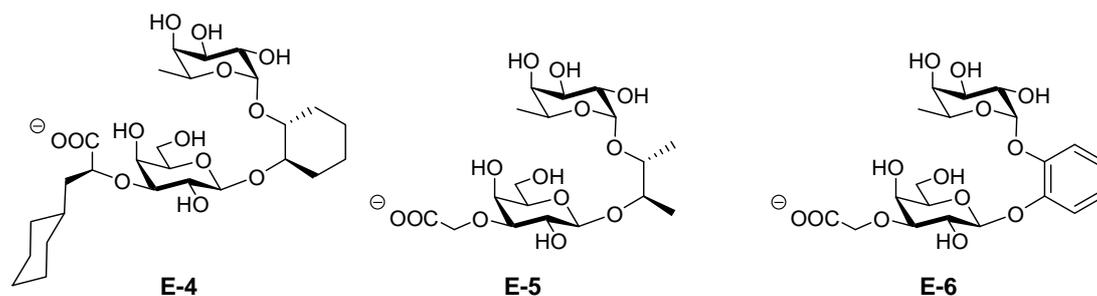


Abb. 1.8: Mimetika mit ersetzten Glucosamin- und Neuraminsäurekomponenten

Die Substitution der Galactose stellt sich als weitaus schwieriger dar, da zwei der Hydroxylgruppen (4 und 6) essenziell für die Bindung zu den Selektinen sind.⁷⁴ Mögliche Substitute für die Galactose sind z. B. α,β -Dihydroxyprolin, α -Methylolserin oder 2-Amino-3,4-dihydroxybuttersäure.

Die Fucose, ebenfalls ein sehr teurer Baustein, lässt sich durch andere Saccharide wie D-Mannose^{75, 76}, D-Arabinose^{62, 77} und L-Galactose^{78, 79} ersetzen, da diese die für die Bindung an die Selektine essenzieller Hydroxylgruppen in der gleichen räumlichen Anordnung präsentieren. Der Einsatz nichtsaccharidischer Strukturen als Mimetika der Fucose gelang bisher nur in wenigen Fällen.⁸⁰

⁷² S. A. DeFrees, F. C. A. Gaeta, Y.-C. Lin, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 7549-7550.

⁷³ G. Thoma, J. L. Magnani, J. T. Patton, B. Ernst, W. Jahnke, *Angew. Chem.*, **2001**, *113*, 1995-1999.

⁷⁴ R. Banteli, B. Ernst, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 4059.

⁷⁵ T. P. Kogan, B. Dupré, K. M. Keller, I. L. Scott, H. Bui, R. V. Market, P. J. Beck, J. A. Voytus, B. M. Revelle, D. Scott, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 4976-4984.

⁷⁶ N. Kaila, L. Chen, B. E. Thomas IV, D. Tsao, S. Tam, P. W. Bedard, R. T. Camphausen, J. C. Alvarez, G. Ullas, *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 1563.

⁷⁷ M. Rösch, H. Herzner, W. Dippold, M. Wild, D. Vestweber, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **1997**, *5*, 238.

⁷⁸ M. W. Cappi, W. J. Moree, L. Qiao, T. G. Marron, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*, 283.

⁷⁹ G. Baisch, R. Öhrlein, A. Katopodis, M. Streiff, F. Kolbinger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 2447.

⁸⁰ C. L. Martens, S. E. Cwirla, R. Y.-W. Lee, E. Whitehorn, E. Y.-F. Chen, A. Bakker, E. L. Martin, C. Wagstrom, P. Gopalan, C. W. Smith, E. Tate, K. J. Koller, P. J. Schatz, W. J. Dower, R. W. Barrett, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 21129.

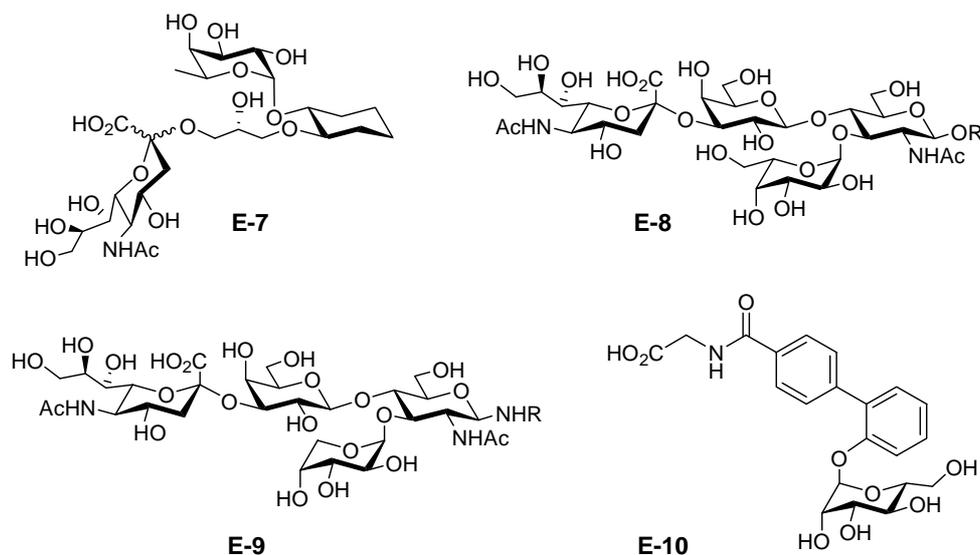


Abb. 1.9: *Mimetika mit substituierten Galactose und/oder Fucose-Bausteinen*

Eine Affinitätssteigerung der Mimetika lässt sich jedoch nicht nur durch Substitution einzelner oder mehrerer Kohlenhydratbausteine, sondern auch durch Einführung geeigneter Substituenten in das tetrasaccharidische Grundgerüst^{81, 82} oder durch multivalentes Präsentieren von Sialyl-Lewis^x bzw. Sialyl-Lewis^x-Mimetika bewirken.^{83, 84}

Wie bereits oben erwähnt ist nicht nur das Kohlenhydrat-Epitop Sialyl-Lewis^x für die Bindung zum Selektin verantwortlich, sondern auch weitere Strukturen des jeweiligen Liganden. So spielt die peptidische Umgebung des Kohlenhydrats im ESL-1 eine große Rolle in der Bindung zum E-Selektin.^{77, 85, 86} C. Filser gelang die Synthese zahlreicher Sialyl-Lewis^x-Glycopeptide mit der Aminosäuresequenz 672-681 aus dem natürlichen Selektinliganden ESL-1.⁸⁷

In Durchflusszytometrie-Experimenten wurden die IC₅₀-Werte der Bindungsinhibierung eines E-Selektin-IgG-Konstrukts⁸⁸ an die neutrophile Maus-Zell-Linie 32Dcl3 ermittelt und mit Sialyl-Lewis^x als Standard verglichen. Hierbei zeigte von den Sialyl-Lewis^x-enthaltenden Glycopeptiden **E-11a** die größte Bindungsstärke. Mit einem IC₅₀-Wert von 0.21 mM bindet es 13fach stärker als nicht modifiziertes Sialyl-Lewis^x. Der Austausch der

⁸¹ C.-H. Wongm F. Moris-Varas, S.-C. Hung, T. G. Marron, C.-C. Lin, K. W. Gong, G. Weitz-Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 8152-8158.

⁸² M. Hayashi, M. Tanaka, M. Itoh, H. Myauchi, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 2938-2945.

⁸³ J. P. Turunen, M.-L. Majuri, A. Seppo, S. Tiisala, T. Paavonen, M. Miyasaka, K. Lemström, L. Pentillä, O. Renkonen, R. Renkonen, *J. Exp. Med.*, **1995**, *182*, 1133-1142.

⁸⁴ V. H. Thomas, Y. Yang, K. G. Rice, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 19035-19040.

⁸⁵ U. Sprengard, G. Kretzschmar, E. Bartnik, C. Hüls, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **1995**, *107*, 1104.

⁸⁶ U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 359-362.

⁸⁷ C. Filser, D. Kowalczyk, C. Jones, M. Wild, D. Vestweber, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **2007**, *119*, 2155-2159.

⁸⁸ M. Hahne, U. Jäger, S. Isenmann, R. Hallmann, D. Vestweber, *J. Cell. Biol.*, **1993**, *121*, 655.

N-Acetylneuraminsäure gegen (*S*)-Cyclohexylmilchsäure bewirkt eine weitere Reduktion des IC_{50} -Wertes um einen Faktor 10. Somit bindet **E-12a** mehr als 100fach stärker als der Standard.

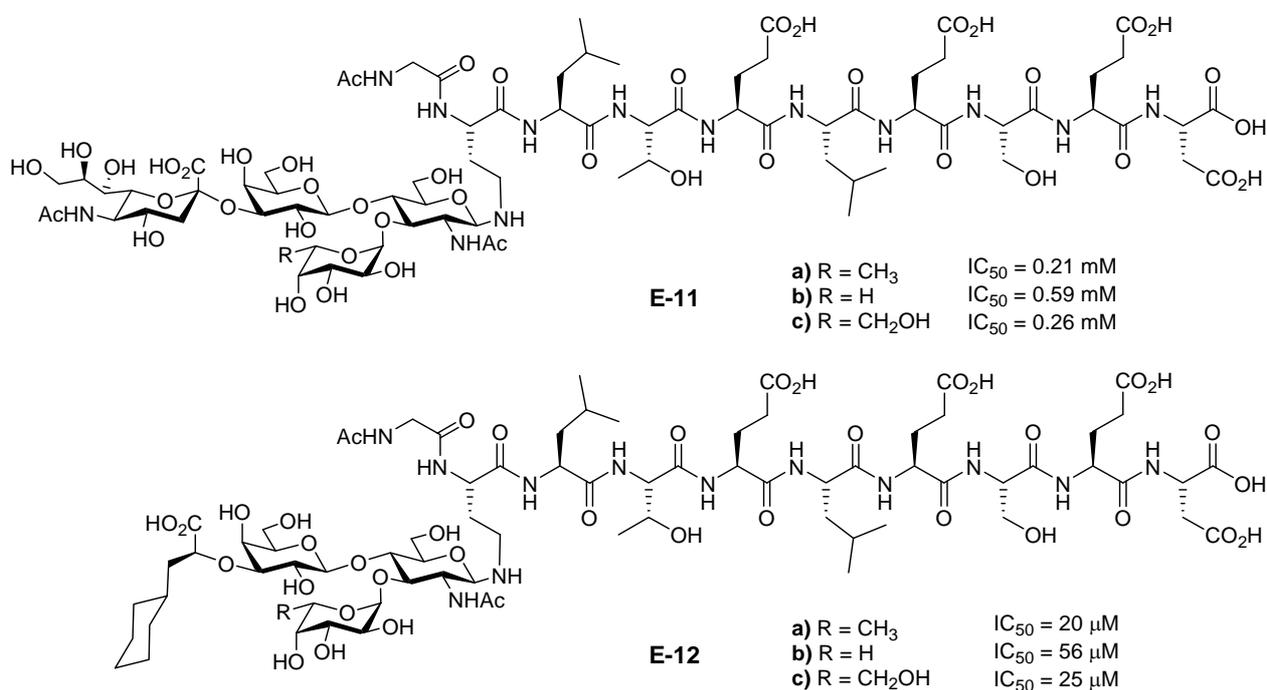


Abb. 1.10: Die von C. Filser dargestellten Glycopeptide und deren IC_{50} -Werte

K. Baumann gelang die Synthese zweier hochkomplexer Glycopeptidstrukturen aus der *N*-terminalen Domäne des PSGL-1 (Tyr⁴⁸ – Pro⁵⁹).⁸⁹

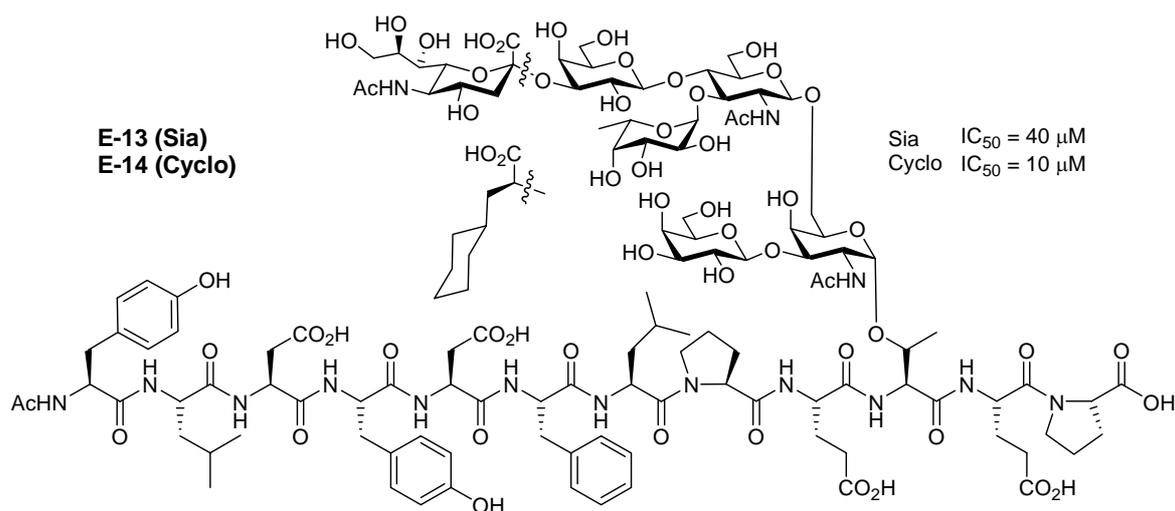


Abb. 1.11: Die von K. Baumann synthetisierte Glycopeptide aus der *N*-terminalen Domäne des PSGL-1 und deren IC_{50} -Werte für die Bindung an E-Selektin.

⁸⁹ K. Baumann, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, 47, 3445-3449.

Hierbei sind das Sialyl-Lewis^x-Epitop bzw. das mit (S)-Cyclohexylmilchsäure substituierte Mimetikum über die für die Mucine typische N-Acetyl- α -D-galactosamin-Einheit O-glycosidisch an Threonin (Thr⁵⁷) gebunden. Die Bestimmung des Potentials der dargestellten Glycopeptid-Strukturen als Selektin-Liganden zur kompetitiven Inhibierung unerwünschter selektinvermittelter Zelladhäsionsphänome ist momentan Gegenstand biologischer Untersuchungen.

Zahlreiche weitere Mimetika sind in den Übersichtsartikeln von Kaila und Thomas⁹⁰, Unger¹¹ und Wong¹⁰ zu finden.

1.8 Literaturbekannte Sialyl-Lewis^x-Synthesen

Die große Zahl an Veröffentlichungen zur Synthese von Sialyl-Lewis^x-Derivaten zeigt einmal mehr dessen große biologische Bedeutung. Eine solche Synthese stellt hohe Ansprüche an Regio- und Stereoselektivität. Neben diesen allgemein bei Kohlenhydraten geltenden Anforderungen birgt die Synthese von Sialyl-Lewis^x einige spezielle Hürden. So muss die Galactose in die unreaktive 4-Position des Glucosamin-Scaffolds eingeführt werden. Die Säurelabilität der α -fucosidischen Bindung stellt ein weiteres Problem dar, das bei allen Glycosylierungsreaktionen und Schutzgruppenmanipulationen beachtet werden muss. Die größte Schwierigkeit birgt jedoch die regio- und stereoselektive Sialylierung. Aufgrund des Fehlens einer Funktionalität in der 3-Position kann bei der Glycosylierung nicht auf den Nachbargruppeneffekt zur Kontrolle der Stereochemie zurückgegriffen werden. Die Carboxyfunktion erschwert durch elektronische und sterische Effekte die Reaktion zusätzlich. Bei der Aktivierung der reaktiven Neuraminsäure-Donoren kann es leicht zur Eliminierung eines Protons in der 3-Position kommen, weshalb der teure Donor in großen Überschüssen eingesetzt werden muss. Aufgrund dieser Nachteile wird bei der Synthese sialylierter Oligosaccharide häufig auf enzymatische Methoden unter Verwendung sowohl von Glycosyltransferasen als auch von Glycosidasen zurückgegriffen.^{91, 92, 93}

Die Synthese kann nach zwei grundlegenden Strategien erfolgen. Bei der konvergenten Synthese werden zwei Disaccharide nach dem [2+2]-Konzept verknüpft, bei der linearen Synthese wird das Tetrasaccharid sukzessive aus Monosacchariden aufgebaut. Diese beiden Strategien sollen im Nachfolgenden anhand jeweils eines Beispiels näher erläutert werden.

⁹⁰ N. Kaila, B. E. Thomas IV, *Med. Res. Rev.*, **2002**, *6*, 566-601.

⁹¹ B. Neubacher, D. Schmidt, P. Ziegelmüller, J. Thiem, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 1551-1556.

⁹² O. Blixt, J. C. Paulson, *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, *345*, 687-690.

⁹³ C. Unverzagt, *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 2507-2510.

1.8.1 Die konvergente Synthesestrategie

Die erste Totalsynthese eines Sialyl-Lewis^x-Derivates gelang *Hasegawa* nach der konvergenten Strategie im Jahr 1991.⁹⁴ Der Vorteil hierbei liegt darin, dass die beiden notwendigen Disaccharide völlig unabhängig voneinander aufgebaut werden, wodurch sich die Reaktionsbedingungen der jeweiligen Teilreaktion leichter optimieren lassen. Jedoch verlaufen zum einen Sialylierungsreaktionen an Monosacchariden nicht mit bemerkenswert höheren Ausbeuten verglichen mit Sialylierungen an Oligosacchariden,⁹⁵ zum anderen muss der teure Neuraminsäure-Donor sehr früh – und damit in größeren Mengen – in die Synthese eingebracht werden. Aus diesen Gründen findet die konvergente Strategie zum Aufbau von Sialyl-Lewis^x-Strukturen heute kaum noch Anwendung.

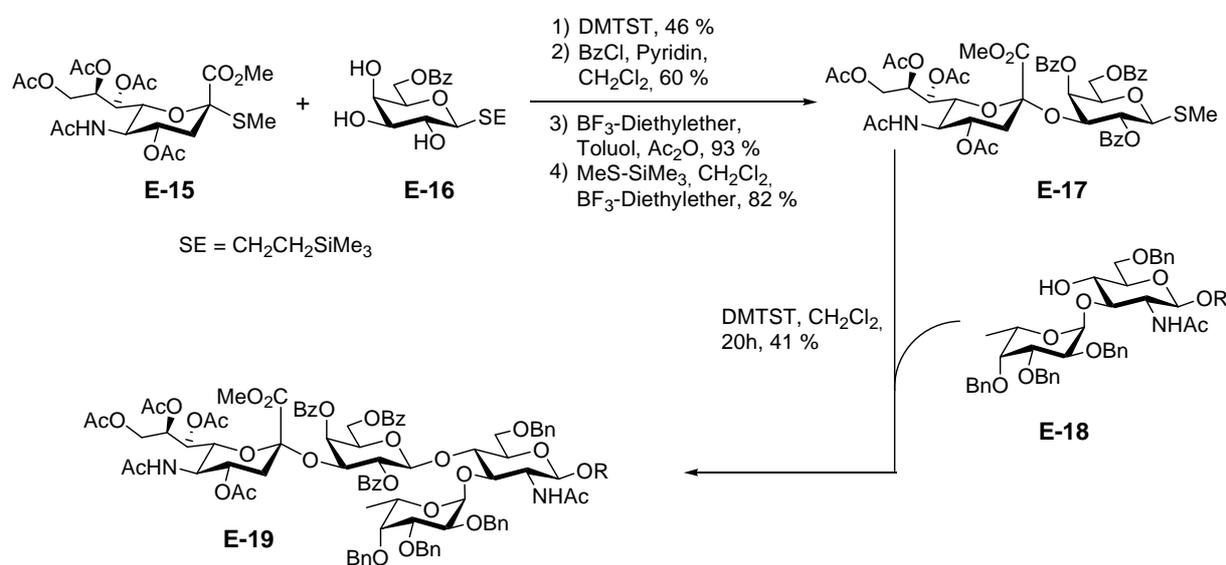


Abb. 1.12: Konvergente Totalsynthese eines Sialyl-Lewis^x-Derivates nach *Hasegawa et al.*

1.8.2 Die linearen Synthesestrategien

Bei den linearen Synthesestrategien wird in der Regel der Neuraminsäure-Baustein als teuerster der vier Bausteine als letzter angeknüpft. *Nicolaou et al.* gelang die Synthese eines Sialyl-Lewis^x-Derivates nach linearer Strategie unter Verwendung eines 3-Thiophenyl-substituierten Neuraminsäure-Donors.⁹⁶ Dieser dirigierende Substituent gewährleistet nach

⁹⁴ A. Kameyama, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.*, **1991**, 209, c1-c4.

⁹⁵ A. Kameyama, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.*, **1990**, 200, 269-285.

⁹⁶ K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, N. J. Bockovich, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 870-872.

Ogawa die stereoselektive Bildung des gewünschten α -Anomers.⁹⁷ Jedoch muss dieser Rest im Anschluss an die Synthese in einem zusätzlichen Schritt wieder entfernt werden.

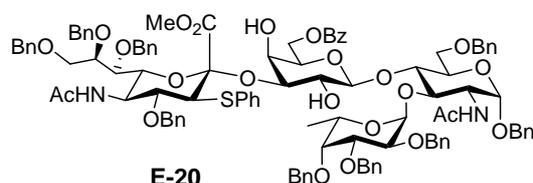


Abb. 1.13: Von Nicolaou et al. synthetisiertes Sialyl-Lewis^x-Derivat

Aufgrund dieses höheren Syntheseaufwandes und aufgrund der Tatsache dass vergleichbare Selektivitäten durch geeignete Wahl von Reaktionstemperatur und Lösungsmittel erreicht werden können, wird diese Methode allerdings nur noch selten angewendet.

In der Regel wird bei linearen Sialyl-Lewis^x-Synthesen zunächst die Fucose mit dem Glucosamin-Scaffold verbunden und anschließend nacheinander Galactose und Neuraminsäure angeknüpft. Nach diesem Schema synthetisierten Danishefsky et al. ein Sialyl-Lewis^x-Derivat ausgehend von einem Glucal.⁹⁸ Diese Synthese soll nun beispielhaft für alle linearen Strategien im Detail behandelt werden.

Bei der Bildung der α -fucosidischen Bindung wird hier zum einen ausgenutzt, dass die Benzylether-Schutzgruppe in der 2-Position der Fucose keinen Nachbargruppeneffekt ausübt und daher das stabile α -Anomer gebildet wird, und zum anderen den Reaktivitätsunterschied zwischen 3- und 4-OH-Funktion des Akzeptors **E-22**, wodurch die Glycosylierung selektiv in der 3-Position erfolgt. Die Einführung der Galactose erfolgt mit Hilfe des reaktiven Trichloracetimidats. Die Sialylierung erfolgt unter *Königs-Knorr*-Bedingungen und liefert das tetrasaccharidische Glucal **E-25**, das an der Doppelbindung je nach Bedarf weiter funktionalisiert werden kann.

⁹⁷ Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron*, **1990**, *46*, 89-102.

⁹⁸ S. J. Danishefsky, J. Gervay, J. M. Peterson, F. E. McDonald, K. Koseki, D. A. Griffith, T. Oriyama, S. P. Marsden, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 1940-1953.

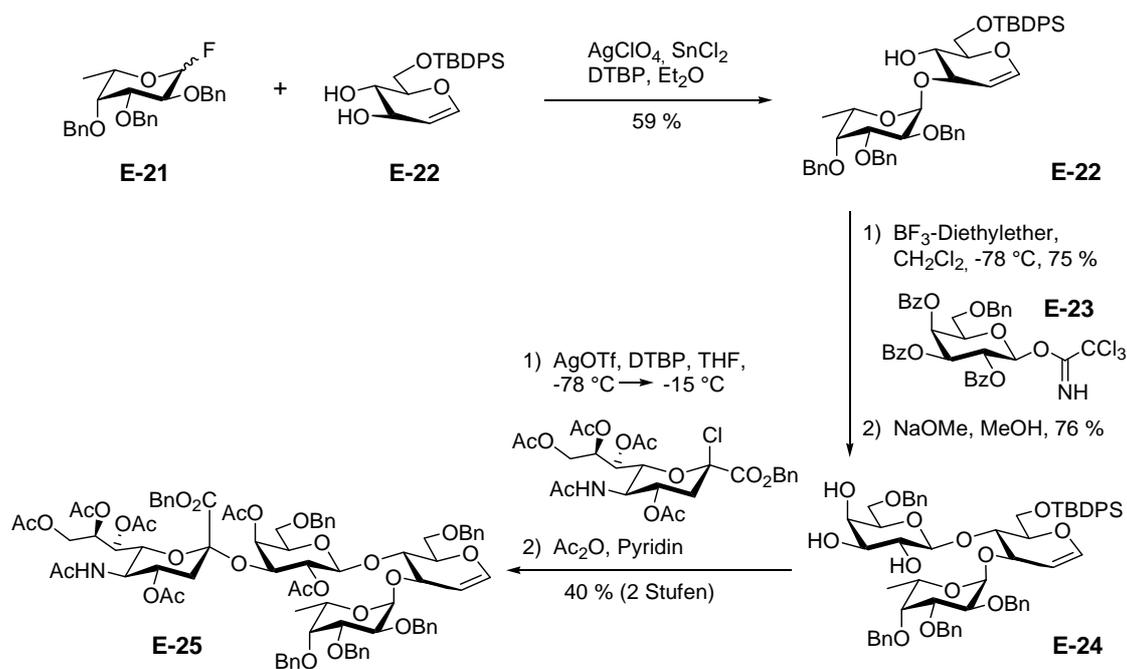


Abb. 1.14: Synthese eines Sialyl-Lewis^x-Derivates nach Danishefsky et al.

Eine weitere lineare Synthese stellten *Kunz* et al. vor.⁸⁵ Anders als bei *Danishefsky* wird hierbei die anomere Position temporär durch eine Azidofunktion blockiert. Dies hat mehrere Vorteile gegenüber dem Glucal:

- Das anomere Azid des *N*-Acetylglucosamins ist problemlos und in guten Ausbeuten zugänglich.
- Derartige Glycosylazide sind aufgrund des *exo*-anomeren Effekts im Gegensatz zu den Alkylaziden stabile Verbindungen. Dieser *exo*-anomere Effekt lässt sich als Überlappung des π -Orbitals der N-N-Doppelbindung mit dem energetisch niedrig liegenden σ^* -Orbital der C-O-Bindung des Kohlenhydrats verstehen.
- Das Glycosylazid fungiert nicht ausschließlich als Schutzgruppe, sondern stellt auch eine Vorstufe für die Synthese von *N*-Glycosiden dar. So kann das β -Azid leicht unter Verwendung eines heterogenen Katalysators geringer Aktivität zum β -Glycosylamin reduziert werden. Unter Verwendung von neutral gewaschenem Raney-Nickel bleiben etwaige im Molekül vorhandene Benzylether-Schutzgruppen stabil. Des Weiteren sind aus den anomeren Aziden durch 1,3-dipolare Cycloaddition an Acetylendicarbonsäure-di-*tert.*-butylester und anschließende Behandlung mit Fluorwasserstoff / Pyridin die jeweiligen Glycosylfluoride und damit potente Glycosyldonoren zugänglich.

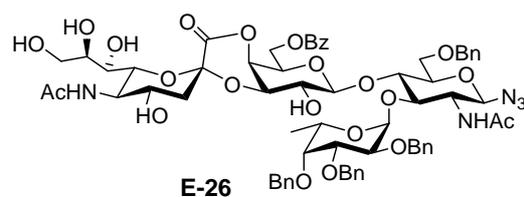


Abb. 1.15: Anomeres Sialyl-Lewis^x-Azid nach Kunz et al.

Keine der oben genannten Synthesen kommt jedoch ohne den Einsatz von Schwermetallen aus, was vor dem Hintergrund einer pharmazeutischen Herstellung im Kilogramm-Maßstab ein großes Problem darstellt. Eine Synthese ohne Verwendung von Schwermetallen stellten Dekany et al. vor.⁹⁹ Sie verwendeten dabei ausschließlich Thioglycoside als Donoren, die sich ohne Zusatz von Schwermetallen aktivieren lassen. Vergleichende Studien zur Synthese von Sialyl-Lewis^x im Labor- und im Multikilogramm-Maßstab wurden von Kretzschmar und Stahl veröffentlicht.¹⁰⁰ Eine chemoenzymatische Route publizierten Wong et al.^{101, 102} Bei einem solchen Ansatz kann auf komplizierte Schutzgruppenchemie verzichtet werden. Jedoch beschränken der hohe Preis der jeweiligen Donoren und Glycosyltransferasen sowie die geringe Anwendbarkeit auf die Synthese von Mimetika die Anwendung dieser Strategie.

Auch in Zukunft bleiben Sialyl-Lewis^x-Derivate aufgrund ihres großen biologischen Interesses ein interessantes Forschungsgebiet und das Interesse an kostengünstigen und effizienten Syntheseansätzen für derartige Strukturen bleibt unverändert hoch.

⁹⁹ G. Dekany, K. Wright, I. Toth, *J. Carbohydr. Chem.*, **1997**, *16*, 983-999.

¹⁰⁰ G. Kretzschmar, W. Stahl, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 6341-6358.

¹⁰¹ H. Kondo, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 8748-8750.

¹⁰² G. J. McGarvey, C.-H. Wong, *Liebigs Ann. Recl.*, **1997**, 1059-1074.

2 Zielsetzung

An der Rekrutierung von Leukozyten im Rahmen inflammatorischer Prozesse ist eine Vielzahl verschiedener Zelladhäsionsmoleküle beteiligt. Eine zentrale Rolle nehmen dabei die Selektine ein, die durch calciumabhängige Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen mit ihren spezifischen Liganden die einleitende „rollende“ Adhäsion der Leukozyten an das Endothel des entzündeten Gewebes initiieren. Eine pathogene Überexpression der Selektine resultiert in verschiedenen Krankheiten wie rheumatoider Arthritis oder Erkrankungen der Herzkranzgefäße. Eine Beteiligung der Selektin-vermittelten Zelladhäsion an der Metastasierung von Karzinom-Zellen wird ebenfalls diskutiert.

Die calciumabhängige Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung erfolgt primär über die beiden Tetrasaccharid-Motive Sialyl-Lewis^x und Sialyl-Lewis^a, weshalb diese beiden Strukturen als Leitstrukturen zur Synthese von Selektin-Liganden dienen, welche durch kompetitive Hemmung zu einer Reduktion der übersteigerten Zelladhäsion führen sollen. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich durch die Anbindung von Sialyl-Lewis^x-Sacchariden bzw. von Mimetika dieser Strukturen an die entsprechende Peptid-Sequenz des jeweiligen endogenen Liganden die Bindungsaffinitäten deutlich steigern lassen. Ein großer Nachteil bei der pharmakologischen Verwendung von Sialyl-Lewis^x besteht in der geringen metabolischen Stabilität. So werden sowohl die fucosidische Bindung als auch die Bindung zur Sialinsäure leicht und schnell durch die entsprechenden Enzyme gespalten und das Molekül so inaktiviert.

Das Ziel dieser Arbeit liegt daher in der Synthese metabolisch stabilerer Sialyl-Lewis^x-Mimetika und deren Anbindung an eine Sequenz aus der Kohlenhydrat-bindenden Domäne des natürlichen Liganden des P-Selektins, des PSGL-1. Der labile Fucose-Teil des Moleküls soll dazu gegen die im Körper nicht vorkommende Arabinose, die *N*-Acetylneuraminsäure durch einen Sulfat-Rest ersetzt werden. Beides dient dem Zweck unter Erhalt der räumlichen Präsentation der für die Bindung essentiellen funktionellen Gruppen Strukturen einzuführen, die nicht oder nur sehr viel langsamer durch Enzyme abgebaut werden und somit eine deutlich gesteigerte Halbwertszeit aufweisen sollten.

Die Synthese der Sialyl-Lewis^x-Derivate soll nach einer linearen Synthese-Strategie erfolgen. Zunächst wird das Glucosamin-Scaffold mit Fucose bzw. Arabinose in der 3-Position, anschließend mit Galactose in der 4-Position glycosyliert. Die so erhaltenen Trisaccharide

werden nun sulfatiert bzw. sialyliert und schließlich mit dem Aminosäure-Baustein verknüpft, um so die Glycosyl-Aminosäuren für die Peptidsynthese zu erhalten.

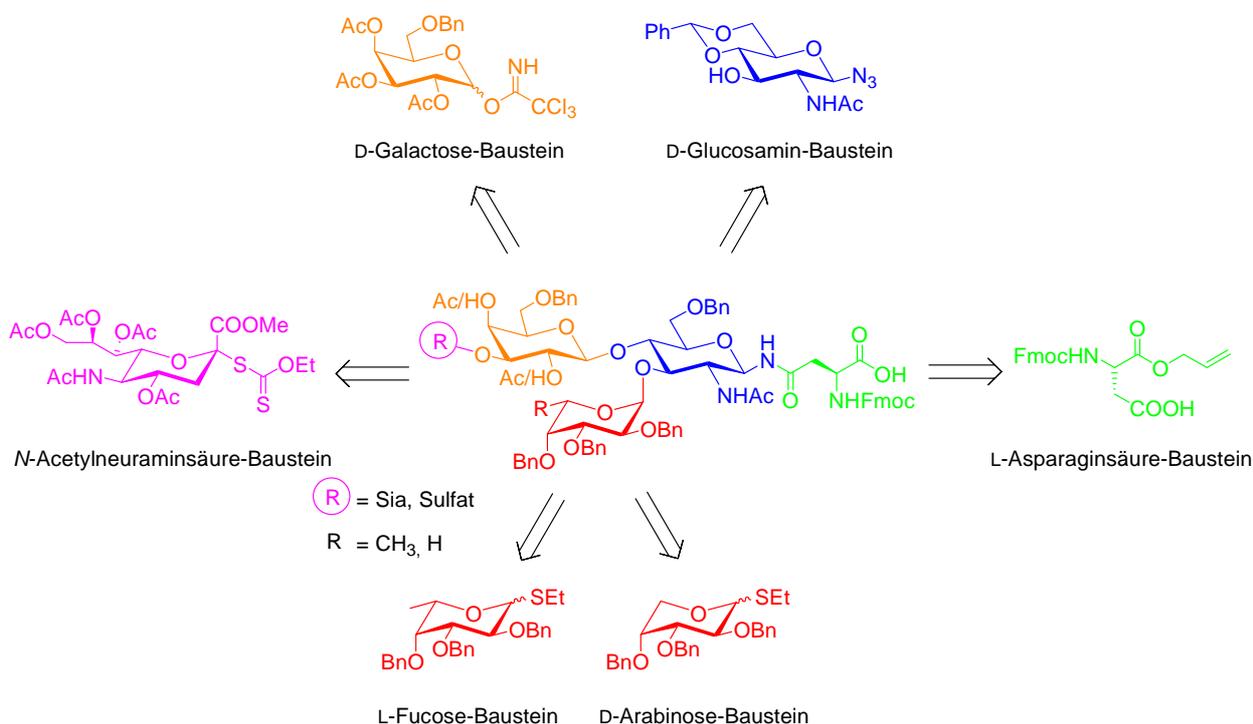


Abb. 2.1: Retrosynthetische Analyse der Glycosylaminosäuren für die Festphasenpeptidsynthese

Mit Hilfe der so erhaltenen Glycosylaminosäuren sollen im Anschluss die Glycopeptide dargestellt werden. Die Zielstruktur ist eine Sequenz aus der für die Bindung an P-Selektin verantwortlichen *N*-terminalen Domäne des PSGL-1. In dieser Sequenz (Pro⁵⁹ – Thr⁴⁴) liegen drei Tyrosin-Reste, von denen mindestens einer in Form seines Schwefelsäureesters vorliegen muss, um eine ausreichende Bindung zu gewährleisten, sowie ein über einen Poly-*N*-Lactosamin-Linker *O*-glycosidisch an Threonin (Thr⁵⁷) gebundenes Sialyl-Lewis^x-Motiv. Diese Anbindung des Kohlenhydrat-Epitops soll im Zielmolekül jedoch direkt *N*-glycosidisch über Asparagin erfolgen. Des Weiteren sollen alle drei Tyrosine in Form in sulfatierter Form in die Sequenz eingebaut werden. Auf diesem Wege sollte sich eine aufwendige enzymatische oder chemische Sulfatierung im Anschluss an die Peptidsynthese umgehen lassen.

Aufgrund der großen Hydrolyseempfindlichkeit der Schwefelsäureester an Kohlenhydrat und Threonin, sowie der Säurelabilität der fucosidischen bzw. arabinosidischen Bindung scheiden die in der Regel eingesetzten säurelabilen Ankersystem und Seitenkettenschutzgruppen hier aus. Es wird daher auf ein UV-labiles Ankersystem zurückgegriffen, welches die Abspaltung von der festen Phase nach erfolgter Glycopeptidsynthese unter äußerst milden Bedingungen

und unter Erhalt aller weiteren Schutzgruppen erlaubt. Diese Synthesestrategie soll zunächst anhand der Synthese der nichtglycosylierten Peptidsequenz erprobt werden.

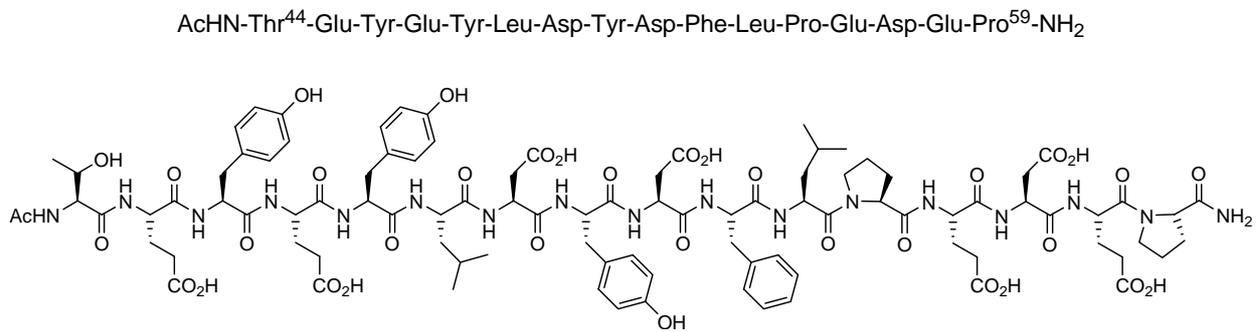


Abb. 2.2: Struktur des nichtglycosylierten Peptids aus dem PSGL-1.

Im Anschluss soll die Synthese der entsprechenden Glycopeptide und schließlich der Einbau der drei für die Bindung an P-Selektin essentiellen sulfatierten Tyrosine erfolgen.

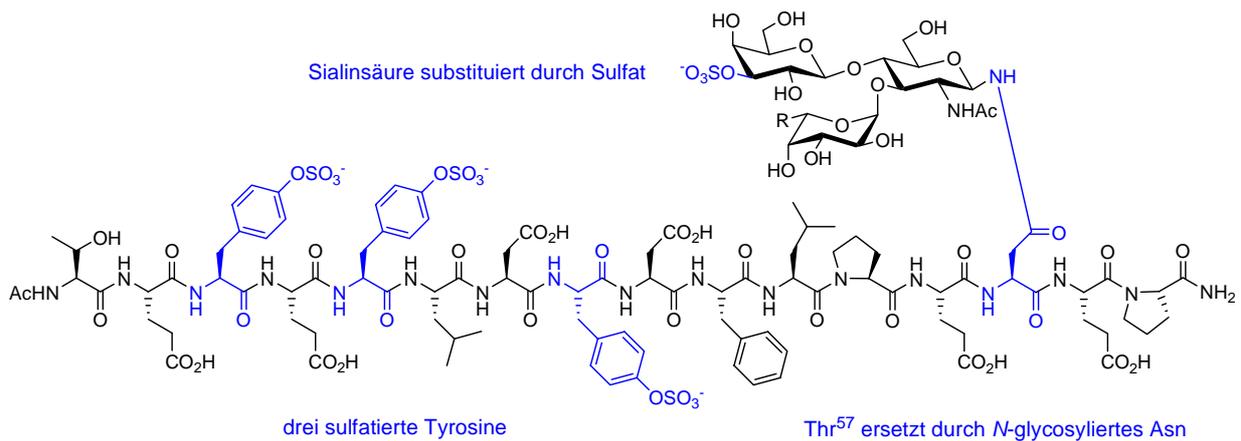


Abb. 2.3: Struktur der Zielmoleküle

Zum Schutz der Seitenkettenfunktionen der jeweiligen Fmoc-Aminosäuren sollen hier ausschließlich Benzylether bzw. Benzylester eingesetzt werden. Diese sollen sich alle in einem letzten Schritt hydrogenolytisch entfernen lassen und so die vollständig deblockierten Glycopeptidstrukturen liefern.

3 Allgemeiner Teil

3.1 Der Galactose-Baustein

Für den Aufbau der Lewis^x-Struktur muss der Galactosyl-Donor an die wenig reaktive 4-Position des Glucosamin-Scaffolds gekuppelt werden. Hierzu hat sich der Einsatz des sehr reaktiven Trichloracetimidats nach *Schmidt* bewährt. Dieses wird in einem literaturbekannten Verfahren ausgehend von D-Galactose in sechs Stufen erhalten.

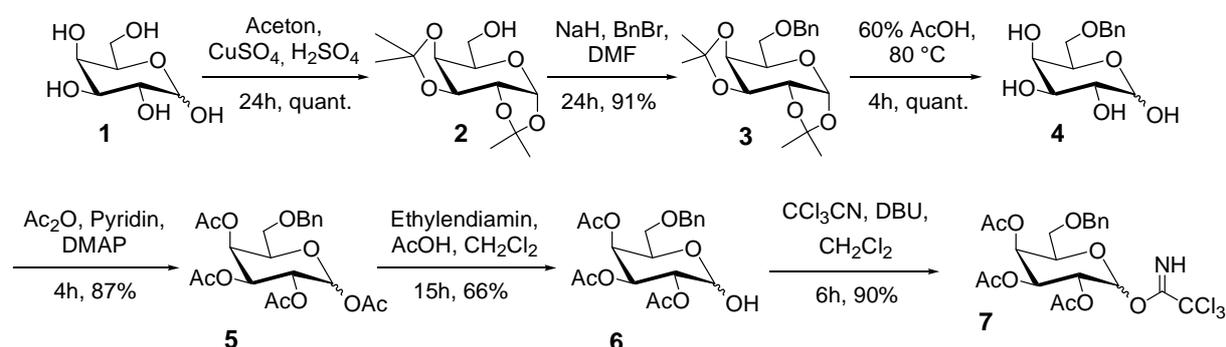


Abb. 3.1.1: Synthese des Galactose-Bausteins 7.

Zunächst werden die 1-, 2-, 3- und 4-Positionen der Galactose durch säurekatalysierte Reaktion mit Aceton in quantitativer Ausbeute als Isopropyliden-Acetale geschützt.¹⁰³ Anschließend wird die 6-Position mit Natriumhydrid und Benzylbromid in einer *Williamson'schen* Synthese verethert¹⁰⁴ und die Acetonide in warmer 60%iger Essigsäure wieder gespalten. Anschließend werden alle verbleibenden OH-Gruppen mit Acetanhydrid in Pyridin quantitativ acetyliert und durch Reaktion mit dem Diacetat von Ethylendiamin in THF die anomere Position selektiv deblockiert.¹⁰⁵ Diese Variante birgt gegenüber der häufig angewendeten Reaktion mit Hydrazinacetat¹⁰⁶ einige Vorzüge. Aufgrund der geringeren Reaktivität verläuft die Reaktion mit dem Ethylendiaminacetat deutlich langsamer und damit selektiver als die Hydrazinolyse. Des Weiteren muss bei der Hydrazinolyse eine genaue Reaktionskontrolle erfolgen und die Reaktion zum richtigen Zeitpunkt beendet werden, um die Abspaltung weiterer Acetylgruppen zu verhindern. Die etwas bessere Ausbeute, die einfachere Reaktionsführung sowie die geringere Toxizität der verwendeten Reagenzien sind

¹⁰³ O. T. Schmidt in: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. II, (Hrsg.: R. L. Whistler, M. L. Wolfrom, J. N. BeMiller), Academic Press Inc., New York, London, **1963**, 318-325.

¹⁰⁴ X. Pannecouke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 6569-6578.

¹⁰⁵ J. Zhang, P. Kováč, *J. Carbohydr. Chem.*, **1999**, *18*, 461.

¹⁰⁶ H. Herzner, J. Eberling, M. Schultz, J. Zimmer, H. Kunz, *J. Carbohydr. Chem.*, **1999**, *17*, 759-776.

weitere Vorteile. In der letzten Stufe erfolgt die Umsetzung zum Trichloracetimidat durch Reaktion mit Trichloracetonitril in Dichlormethan unter Zusatz einer katalytischen Menge 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en als Base.^{107, 108}

Um die Hydrolyse des äußerst säurelabilen Produktes bei der Chromatographie zu vermeiden wird dem Laufmittelgemisch 1% Triethylamin zugesetzt. Man erhält eine Fraktion des α -Anomeren sowie eine Mischfraktion. Eine exakte Trennung der Anomeren ist nicht notwendig, da aufgrund des Nachbargruppeneffekts der Acetylgruppe in 2-Position bei der nachfolgenden Glycosylierung auch aus dem α,β -Gemisch des Donors selektiv das β -Glycosid gebildet wird.

3.2 Der *N*-Acetylglucosamin-Baustein

Benzylidengeschütztes *N*-Acetyl- β -D-glucosaminazid **13** lässt sich nach einer literaturbekannten fünfstufigen Synthese ausgehend von D-Glucosaminhydrochlorid (**8**) darstellen.

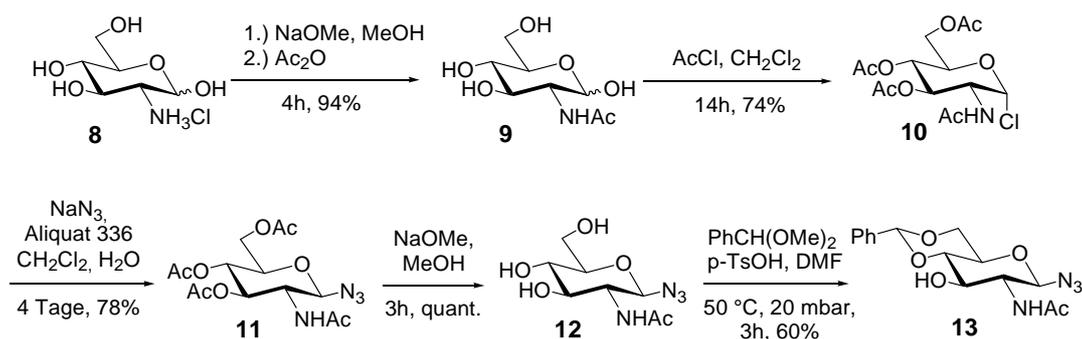


Abb. 3.2.1: Synthese des Glucosamin-Bausteins **13**.

Im ersten Schritt wird aus dem Hydrochlorid durch 5-minütiges Schütteln mit einer äquimolaren Menge Natriummethanolat in Methanol die freie Base dargestellt und das ausgefallene Natriumchlorid abfiltriert. Wird hierbei zu lange geschüttelt oder mechanisch gerührt, so fällt ein erheblicher Teil des freienamins zusammen mit dem Salz aus und kann nicht mehr abgetrennt werden. Das methanolische Filtrat wird anschließend direkt mit Essigsäureanhydrid in 94%iger Ausbeute an der 2-Aminoposition zum *N*-Acetylglucosamin (**9**) umgesetzt.¹⁰⁹ In der zweiten Stufe folgt die Acetylierung der restlichen OH-Funktionen mit Acetylchlorid. Gleichzeitig wird durch den bei der Acetylierung freigesetzten Chlorwasserstoff

¹⁰⁷ E. Eichler, H. J. Jennings, M. Gilbert, D. M. Whitfield, *Carbohydr. Res.*, **1999**, 319, 1-16.

¹⁰⁸ R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.*, **1980**, 92, 763-764.

¹⁰⁹ Y. Inouye, K. Onodera, S. Kitaoka, S. Hirano, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 4722-4726.

das anomere Glucosylchlorid **10** erzeugt.^{110, 111} Das wegen des anomeren Effektes ausschließlich gebildete α -Anomere wird anschließend unter Phasentransferkatalyse mit Aliquat[®] 336 (Tri-capryl-methyl-ammoniumchlorid) mit Natriumazid im Zweiphasensystem Dichlormethan-Wasser umgesetzt. Die Substitution verläuft unter Inversion der Konfiguration und führt so selektiv zum β -Glucosylazid **11** in 78%iger Ausbeute.^{112, 113, 114} Anschließend wird unter *Zemplén*-Bedingungen quantitativ deacetyliert¹¹⁵ und durch sauer katalysierte Umacetalisierung mit Benzaldehyddimethylacetal in DMF das 4,6-*O*-Benzylidenacetal erhalten (60%).¹¹⁶ Die Reaktion wird bei einer Temperatur von 50 °C und einem Druck von 20 mbar am Rotationsverdampfer durchgeführt, um so durch Entfernen des gebildeten Methanols das Gleichgewicht vollständig auf die Seite des Produkts zu verschieben. Die Bildung des Isomeren 3,4-Acetals wird aufgrund der geringeren Stabilität des fünfgliedrigen Ringes nicht beobachtet. Alle zuvor genannten Stufen liefern kristalline Produkte, die sich einfach durch Umkristallisieren, bzw. Umfällen, reinigen lassen.

3.3 Der Fucose-Baustein

Die Darstellung des Fucosyl-Donors erfolgt nach der vierstufigen Synthese von *Lönn* ausgehend von L-Fucose.¹¹⁷

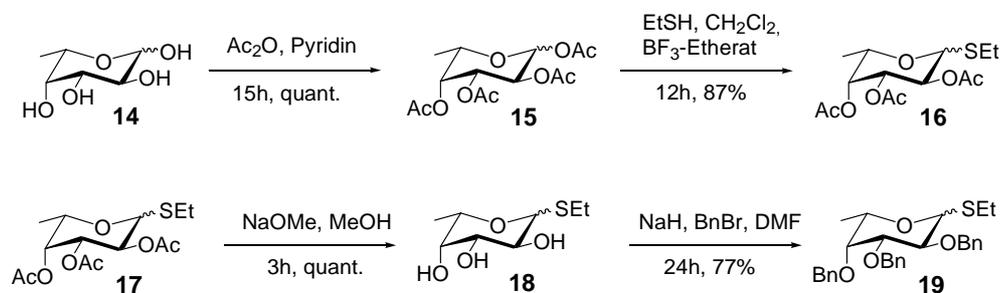


Abb. 3.3.1: Synthese des Fucosyl-Donors **19**.

Im ersten Schritt wird L-Fucose (**14**) mit Acetanhydrid in Pyridin vollständig acetyliert. Anschließend wird durch Reaktion mit Ethanthiol und Bortrifluorid-Diethyletherat als

¹¹⁰ F. Micheel, F.-P. van de Kamp., H. Petersen, *Chem. Ber.*, **1957**, 90, 521-526.

¹¹¹ D. Horton, *Org. Synth.*, **1966**, 46, 1-5.

¹¹² K. von dem Bruch, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1993**.

¹¹³ C. Unverzagt, H. Kunz, *J. Prakt. Chem.*, **1992**, 334, 570-578.

¹¹⁴ F. Micheel, H. Wulff, *Chem. Ber.*, **1956**, 89, 1521-1530.

¹¹⁵ G. Zemplén, A. Kunz, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1923**, 56, 1705-1710.

¹¹⁶ M. A. E.-M. Shaban, R. W. Jeanloz, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1981**, 54, 3570-3576.

¹¹⁷ H. Lönn, *Carbohydr. Res.*, **1985**, 139, 105-113.

Promotor das Ethylthioglycosid **16** in 87%iger Ausbeute gewonnen. Die Acetylgruppen werden mit Natriummethanolat in Methanol umgeestert und die freien Hydroxylgruppen schließlich nach Deprotonierung mit Natriumhydrid in DMF mit Benzylbromid zum dreifach benzylierten Fucosyl-Donor **19** in 77%iger Ausbeute umgesetzt. Der Wechsel zur nicht nachbargruppenaktiven Benzylether-Schutzgruppe ist nötig, um die selektive Reaktion zum α -Fucosid zu gewährleisten. Eine Trennung der beiden Anomeren ist nicht nötig. Da beide Anomere des Fucosyl-Donors die α -glycosidische Bindung ausbilden, kann das α,β -Gemisch für die nachfolgende Glycosylierung an den Glucosamin-Baustein eingesetzt werden.

3.4 Der Arabinose-Baustein

Die Synthese des Arabinose-Bausteins erfolgt analog zur Darstellung des Fucose-Bausteins ausgehend von D-Arabinose.

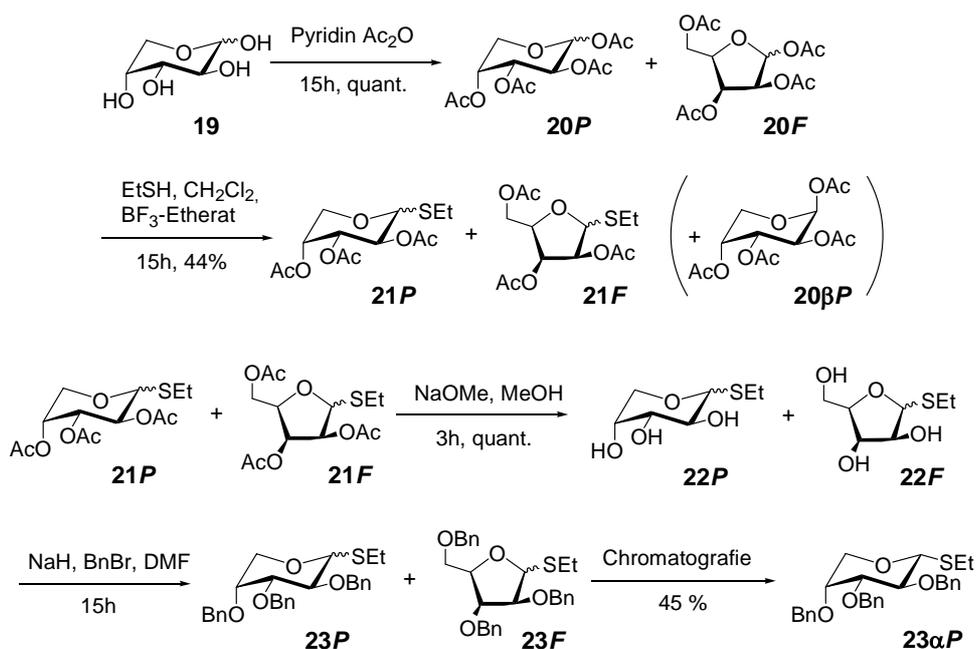


Abb. 3.4.1: Synthese des Arabinosyl-Donors **23**.

Nach quantitativer Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin wird das Anomerengemisch **20** erhalten, welches im Anschluss mit Ethanthiol und Bortrifluorid-Diethyletherat zum Anomerengemisch des Thioglycosids **21** reagiert.

Die geringe Ausbeute von nur 44% bei diesem Schritt liegt in der geringen Reaktivität des axialen β -Anomers der peracetylierten Verbindung **20βP** begründet. Dieses ist durch den anomeren Effekt derart stabilisiert, dass es, anders als das β -Anomere der peracetylierten

Fucose, selbst mit starken Lewis-Säuren wie Bortrifluorid-Diethyletherat nicht zur Reaktion gebracht werden kann. Diese Stabilisierung der axialen anomeren Acetylverbindungen ist in der Literatur auch für weitere Kohlenhydrate beschrieben.¹¹⁸ Die nicht umgesetzte Verbindung **20βP** kann nach der Reaktion chromatographisch abgetrennt und zurückgewonnen werden. Man erhält hier trotz der milden Reaktionsbedingungen bei der Acetylierung in nicht unerheblichem Maße auch die Furanose-Formen **21F** des acetylierten Thiodonors. Diese lassen sich auf dieser Stufe jedoch nicht chromatographisch von den Pyranose-Formen **21P** trennen. Das Isomerengemisch wird im Folgenden unter *Zemplén*-Bedingungen quantitativ deacetyliert und anschließend in einer *Williamson'schen* Ethersynthese mit Benzylbromid und Natriumhydrid umgesetzt. Die chromatografische Reinigung liefert ein Gemisch aus den Furanose-Formen und der β-Pyranose-Form, sowie eine Fraktion der reinen α-Pyranose **23αP**.

3.5 Der *N*-Acetylneuraminsäurebaustein

Als Neuraminsäure-Donor wird in dieser Arbeit das von *Marra* und *Sinay* erstmals verwendete Neuraminsäurexanthogenat **28** verwendet.¹¹⁹ Dieses lässt sich in vier Stufen ausgehend von *N*-Acetylneuraminsäure (**24**) erhalten.

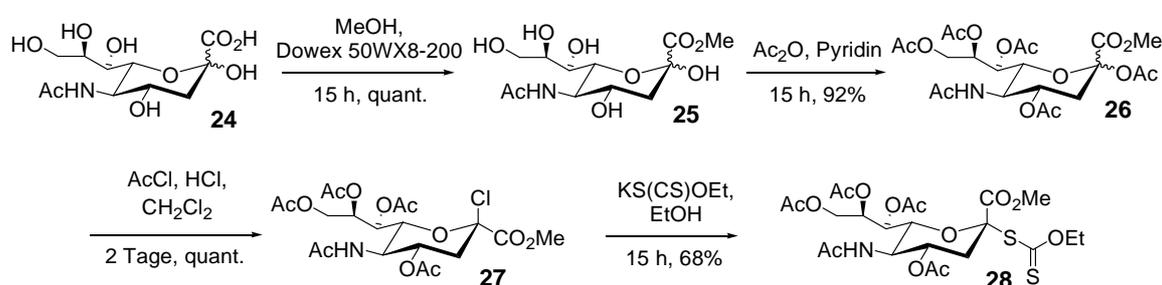


Abb. 3.5.1: vierstufige Synthese des Neuraminsäurexanthogenats **28**.

Zunächst wird unter Katalyse mit dem sauren Ionenaustauscherharz Dowex[®] 50WX8-200 in Methanol die Säurefunktion verestert und anschließend die freien OH-Gruppen mit Acetanhydrid in Pyridin in einer Ausbeute von 92% acetyliert.^{120, 121, 122} Durch Umsetzung mit Acetylchlorid und konzentrierter Salzsäure wird daraus quantitativ das anomere Chlorid **27**

¹¹⁸ B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay (Hrsg.), *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.

¹¹⁹ A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 187, 35-42.

¹²⁰ R. Kuhn, P. Lutz, D. L. MacDonald, *Chem. Ber.*, **1966**, 99, 611-617.

¹²¹ A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 190, 317-322.

¹²² J. Xue, Y. Pan, Z. Guo, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 1599-1602.

erhalten, wobei ausschließlich das durch den anomeren Effekt begünstigte α -Anomer entsteht. Dieses wird aufgrund seiner geringen Stabilität sofort im Anschluss roh mit Kaliummethylxanthogenat in trockenem Ethanol unter S_N2 -Bedingungen zum fertigen Neuraminsäure-Donor **28** umgesetzt.¹¹⁹ Das so gewonnene Xanthogenat ist hierbei stets noch zu einem gewissen Teil mit seinem Eliminierungsprodukt **30** verunreinigt.

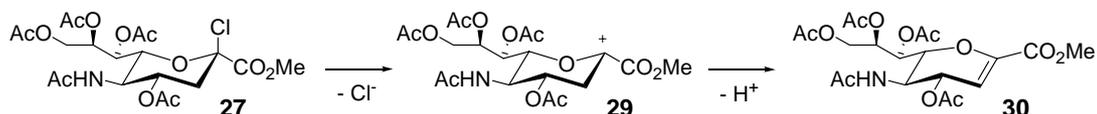


Abb. 3.5.2: Bildung des Glycals **30** durch Eliminierung von Chlorwasserstoff aus dem anomeren Neuraminsäurechlorid **27**.

Eine flashchromatographische Trennung ist jedoch nicht möglich. Da das Glycal bei der anschließend folgenden Sialylierung aber nicht stört, da es dort stets ohnehin entsteht, wird auf eine aufwändige Trennung verzichtet, diese Verunreinigung so hingenommen und lediglich bei der Berechnung der Ansätze berücksichtigt. Der Anteil des Glycals am Produktgemisch wird durch Integration charakteristischer Peaks im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Gemisches zu 9.5% bestimmt. Die Ausbeute an reinem Xanthogenat berechnet sich damit zu 68%. Für die Aufnahme von NMR-Spektren, die Bestimmung des optischen Drehwerts und eine Elementaranalyse werden ca. 100 mg des reinen Xanthogenats mittels präparativer RP-HPLC isoliert.

3.6 Die Disaccharid-Bausteine

Zur Synthese der Disaccharide (β -3-(α -Bn₃-Fuc)-4,6-Bzn-GlcNAc-N₃) **33** und (β -3-(β -Bn₃-Ara)-4,6-Bzn-GlcNAc-N₃) **34** aus den Bausteinen **13** sowie **23 α P** und **18** werden die oben beschriebenen Thioglycoside nach Ogawa¹²³ mit Kupfer(II)bromid zu den Glycosylbromiden **31** und **32** umgesetzt, welche direkt unter *in situ*-Anomerisierung nach Lemieux¹²⁴ mit dem Akzeptor **13** selektiv zu den α -Glycosiden **33** und **34** reagieren.

¹²³ S. Sato, M. Mori, Y. Ito, T. Ogawa, *Carhydr. Res.*, **1986**, 155, C6.

¹²⁴ R. U. Lemieux, K. B. Hendriks, R. V. Stick, K. James, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 4056.

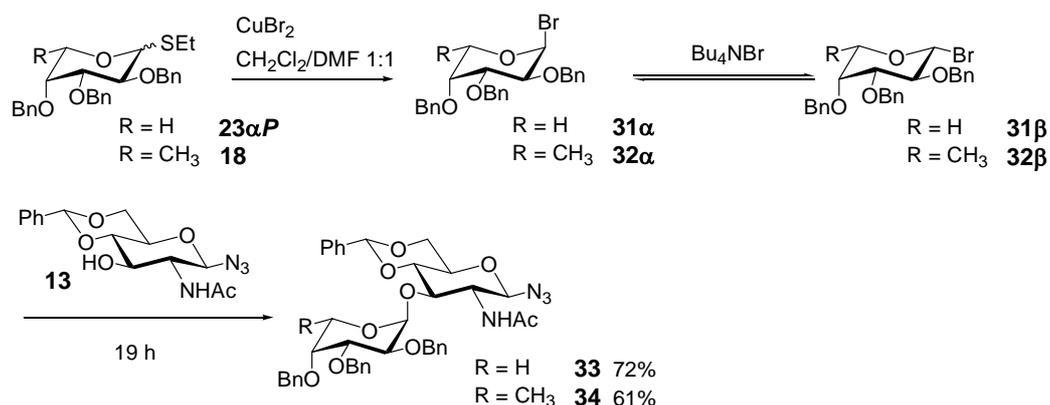


Abb. 3.6.1: Glycosylierung unter *in situ*-Anomerisierung nach Ogawa und Lemieux zu den Disacchariden **33** und **34**.

Im Zuge der *in situ*-Anomerisierung wird mit Hilfe eines quartären Ammoniumsalzes ein Gleichgewicht zwischen den beiden anomeren Halogeniden eingestellt. Da das β -Anomere im Gegensatz zum α -Anomeren nicht durch den anomeren Effekt stabilisiert ist, reagiert nur dieses mit der freien OH-Funktion des Akzeptors in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion zum α -Glycosid. Verbrauchtes β -Halogenid wird durch das Gleichgewicht permanent nachgebildet, bis kompletter Umsatz der Unterschusskomponente erreicht ist. Voraussetzung für diesen stereochemischen Verlauf ist, dass die Schutzgruppe an der 2-Position des Fucosyldonors keine nachbargruppenaktive Carbonylgruppe trägt. Dies wurde durch den Wechsel von Acetyl- zu Benzylgruppen bei der Synthese der Donoren erreicht. Die Disaccharide können in guten Ausbeuten von 61% (Fuc) bzw. 72% (Ara) erhalten werden.

Um die so dargestellten Disaccharide mit dem Galactosyl-Donor zum Lewis^x-Trisaccharid umsetzen zu können, muss zunächst das 4,6-*O*-Benzyliden-Acetal regioselektiv zum 6-*O*-Benzylether geöffnet werden. Dazu setzt man in der Regel mit Natriumcyanoborhydrid und einer gesättigten Lösung von Chlorwasserstoff in Diethylether bei tiefen Temperaturen um.¹²⁵ Diese Reaktion muss jedoch genauestens kontrolliert werden, um Zersetzung des Produktes zu verhindern. Weitere Nachteile sind die anfallenden Bor-Verunreinigungen, die in nachfolgenden Reaktionen stören können, der Einsatz der nicht ungefährlichen etherischen Chlorwasserstoff-Lösung sowie der generell sehr hohe präparative Aufwand. Daher werden andere Versuche zur Öffnung des Acetals unternommen.

Ein erster Versuch nach einer Vorschrift von *DeNinno*¹²⁶ unter Verwendung von Triethylsilan und Trifluoressigsäure in Dichlormethan bei 0 °C schlägt fehl. Es wird dabei binnen weniger

¹²⁵ P. J. Garegg, H. Hultberg, S. Wallin, *Carbohydr. Res.*, **1982**, 108, 97.

¹²⁶ M. P. DeNinno, J. B. Etienne, K. C. Duplantier, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 669.

Minuten lediglich die fucosidische Bindung angegriffen, aber kein Umsatz zum benzylgeschützten Produkt **36** beobachtet.

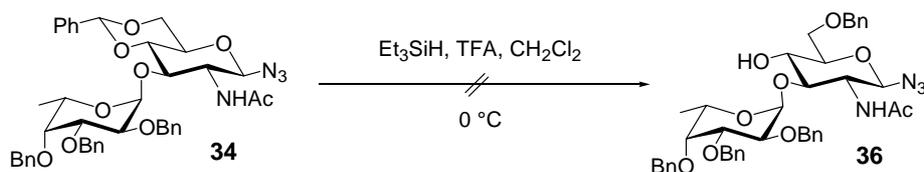


Abb. 3.6.2: Versuch der Acetalöffnung nach DeNinno.

Eine Variante dieser Reaktion wurde von Sakagami et al. präsentiert.¹²⁷ Anders als *DeNinno* verwenden sie die noch stärkere Trifluormethansulfonsäure als Protonenquelle und arbeiten bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das Substrat wird in absolutem Dichlormethan gelöst mit drei Äquivalenten Triethylsilan als Hydridspender versetzt und abgekühlt. Zugabe von drei Äquivalenten Trifluormethansulfonsäure liefert in kurzer Zeit den 6-*O*-Benzylether in hoher Ausbeute.

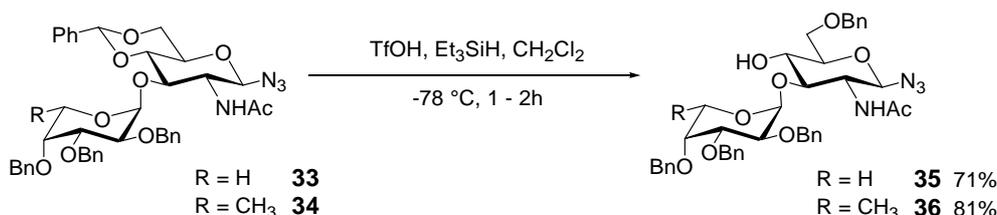


Abb. 3.6.3: regioselektive Öffnung der Benzyliden-Acetale zu den 6-*O*-Benzylethern **35** und **36**.

Die Reaktion muss bei tiefen Temperaturen und die Zugabe der Säure sehr vorsichtig erfolgen, da bei zu niedrigem pH-Wert bzw. bei Temperaturen über $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ die äußerst säurelabile fucosidische bzw. arabinosidische Bindung gespalten würde. Die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie gestaltet sich hier jedoch als äußerst schwierig. Eine entnommene Probe wird schnell mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung geschüttelt und anschließend auf die Kieselgelplatte aufgetragen. Jedoch liefert auch diese Methode keine reproduzierbaren und aussagekräftigen Ergebnisse, da es bereits beim Entnehmen der Proben zur Zersetzung kommen kann. In zahlreichen Versuchen hat sich die folgende Vorgehensweise als praktikabel erwiesen: Es werden zunächst entgegen der Vorschrift nur jeweils 1.5 Äquivalente Silan und Säure zugegeben. Die Säure wird dabei unverdünnt binnen etwa 30 Minuten zugetropft. Nach etwa einer Stunde werden dann weitere 1.5 Äquivalenten Säure und Silan zugegeben und die Reaktion nach zwei Stunden ohne

¹²⁷ M. Sakagami, H. Hamana, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 5547.

DC-Kontrolle durch Zugabe von Triethylamin und Methanol in der Kälte abgebrochen. Außerdem zeigt sich, dass perlenförmiges Molekularsieb dem pulverförmigen vorzuziehen ist, da nur so vollständige Umsätze ohne merkliche Zersetzung des Substrates zu erreichen sind. Dies liegt daran, dass an der größeren Oberfläche des Pulvers ein großer Teil der Säure abgefangen wird, was die Reaktion stark verlangsamt und bei zunehmender Dauer der Reaktion auch der Anteil an Zersetzungsprodukt zunimmt.

Die Verwendung der starken *Brønsted*-Säure ermöglicht es, das basischere aber auch sterisch weniger zugängliche Sauerstoffzentrum in der 4-Position zu protonieren und so bei der anschließenden Hydridübertragung die Öffnung zum 6-*O*-Benzylether zu erreichen.¹²⁵

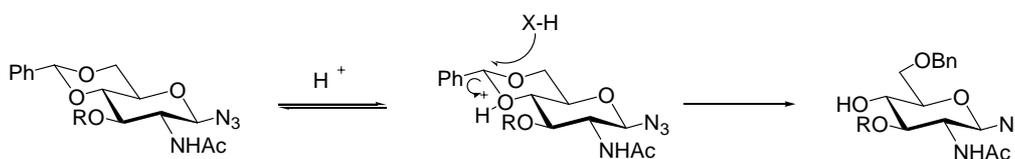


Abb. 3.6.4: Öffnung des Benzylidenacetals mit Protonen.

Würde man anstelle von Protonen sterisch anspruchsvolle *Lewis*-Säuren wie zum Beispiel Aluminiumtrichlorid verwenden, ist die 4-Position sterisch nicht mehr zugänglich und die Acetalöffnung erfolgt zum 4-*O*-Benzylether.¹²⁸

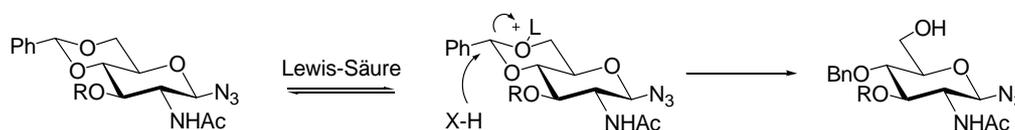


Abb. 3.6.5: Öffnung des Benzylidenacetals mit *Lewis*-Säuren.

3.7 Die *Lewis*^x-Trisaccharide

Zur Synthese der *Lewis*^x-Trisaccharide muss der Galactosyl-Donor in die unreaktive 4-Position der jeweiligen Glucosamin-Scaffolds **35** bzw. **36** eingeführt werden. Dazu hat sich die Verwendung des sehr reaktiven Trichloracetimidats **7** nach der Methode von *Schmidt* bewährt.¹²⁹

¹²⁸ S. S. Bhattacharjee, P. A. J. Gorin, *Can. J. Chem.*, **1969**, 47, 1195.

¹²⁹ R. R. Schmidt, *Angew. Chem.*, **1986**, 98, 213.

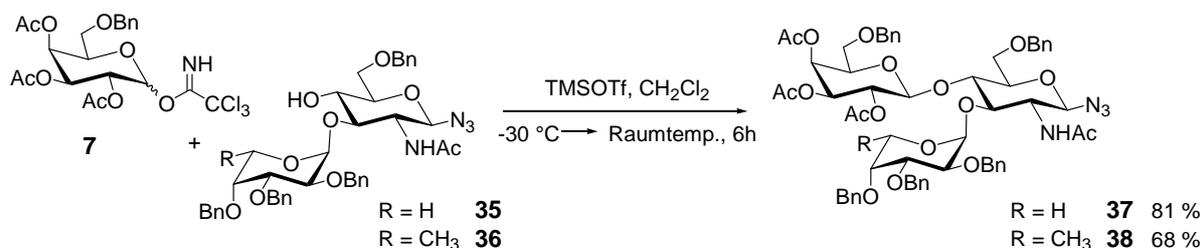


Abb. 3.7.1: Synthese der vollständig geschützten Lewis^x-Derivate **37** und **38**.

Dazu werden die in 4-Position deblockierten Disaccharide **35** und **36** mit dem Galactosyl-Donor **7** in Dichlormethan und Trimethylsilyltrifluormethansulfonat als Promotor umgesetzt. Aufgrund des Nachbargruppeneffekts der Acetylgruppe in 2-Position des Galactosyl-Donors werden dabei ausschließlich die β -verknüpften Trisaccharide gebildet.¹³⁰ Deshalb lassen sich sowohl das α - als auch das β -Anomere des Trichloracetimidats zur Glycosylierung einsetzen (Schema 3.7.1). Nach dessen Aktivierung wird die axiale Position durch den Carbonylsauerstoff der Acetylgruppe in 2-Position abgeschirmt und der Angriff des Nukleophils kann nur äquatorial erfolgen.

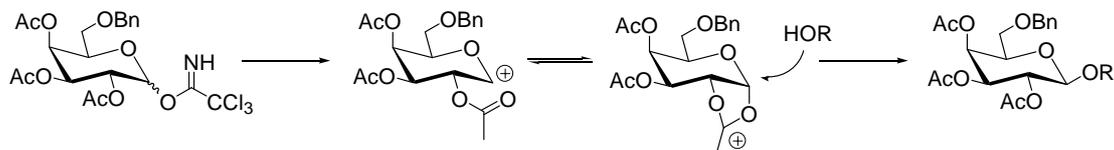


Abb. 3.7.2: Der Nachbargruppeneffekt bei Glycosylierungsreaktionen.

Die β -Konfiguration der Produkte wird durch die Kopplungskonstante des Dubletts von H-1 der Galactose eindeutig belegt. Es werden Kopplungskonstanten von $^3J_{1,2} = 7.8$ Hz (Fuc, **37**) bzw. $^3J_{1,2} = 8.2$ Hz (Ara, **38**) gefunden, was charakteristisch für eine β -glycosidische Verknüpfung ist. Eine α -glycosidische Bindung würde sich in einer deutlich kleineren Kopplungskonstante ($2 \text{ Hz} < ^3J_{1,2} < 4 \text{ Hz}$) sowie einer signifikanten Tieffeldverschiebung des Signals bemerkbar machen.

Im Anschluss an die Glycosylierung werden die erhaltenen Trisaccharide unter *Zemplén*-Bedingungen in quantitativer Ausbeute deacetyliert und stehen somit für die nachfolgenden Sulfatierungen und Sialylierungen als Akzeptoren zur Verfügung.

¹³⁰ H. Paulsen, *Angew. Chem.*, **1982**, 94, 184.

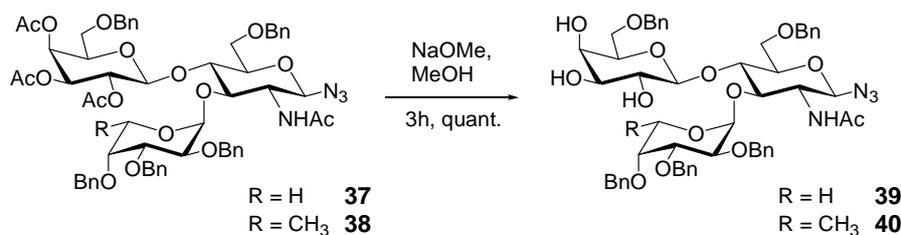


Abb. 3.7.3: Umesterung der Acetylgruppen nach Zemplén.

3.8 Sulfatierungen

Zum Einführen einer Sulfat-Gruppe gibt es verschiedene Möglichkeiten. So können einfache Systeme, z. B. einfache Kohlenhydrat-Bausteine, mit Reagenzien wie Sulfurylchlorid, Chlorsulfonsäure oder Schwefelsäure sulfatiert werden. Jedoch ist hier die Gefahr der Zersetzung gegeben, und auch die Bildung von mehrfach substituierten Produkten ist wahrscheinlich.¹³¹ Eine mildere Methode stellt die Verwendung verschiedener Schwefeltrioxid-Amin-Komplexe in *N,N*-Dimethylformamid oder Pyridin als Lösungsmittel dar. In der Literatur wurde die selektive Sulfatierung der 3-Position der Galactose in Lewis^x- und Lewis^a-Strukturen beschrieben.¹³² Kunz et al. konnten dies jedoch nicht bestätigen und fanden hingegen die Sulfatierung der 4-Position, sowie Mehrfachsubstitution.^{133, 134}

Eine Kombination der milden Schwefeltrioxid-Komplexe als Sulfatierungsreagenz mit der Stannylen-Methode zur Kontrolle der Regioselektivität stellt hier einen vielversprechenden Weg dar. Bereits 1974 beschrieben Moffat et al. die Aktivierung vicinaler Hydroxygruppen bei der selektiven Acetylierung von Nukleosiden unter Verwendung von Dibutylzinnoxid.¹³⁵ Dieses bildet mit dem Diol das cyclische 2-Stannan-1,3-dioxolan **42** aus, welches an nur einer Stelle bevorzugt mit Acetanhydrid acetyliert wird (Schema 3.8.1).

¹³¹ J. R. Turvey, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **1965**, 20, 183-218.

¹³² R. K. Jain, R. Vig, R. D. Lock, A. Mohamad, K. L. Matta, *J. Chem. Comm.*, **1996**, 65-67.

¹³³ W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretzschmar, D. W. Schmidt, H. Kunz, *J. Prakt. Chem.*, **1995**, 337, 441-445.

¹³⁴ O. Knöll, *Dissertation*, **2004**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

¹³⁵ D. Wagner, J. P. H. Verheyden, J. G. Moffat, *J. Org. Chem.*, **1974**, 39, 24-30.

Analog sind durch Alkylierung mit Benzylhalogeniden die entsprechenden Benzylether in regioselektiver Weise zugänglich.

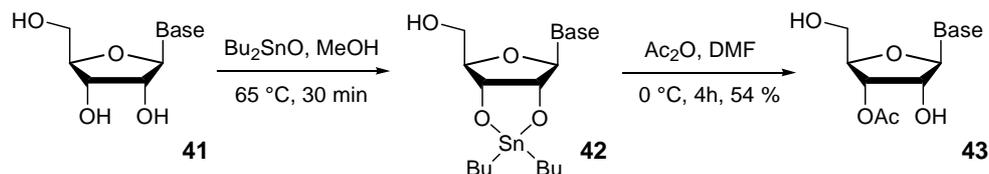


Abb. 3.8.1: Regioselektive Acetylierung von Nucleosiden nach der Stannylene-Methode.

Kurze Zeit später gelang es diese Methode auch auf Kohlenhydrate anzuwenden.^{136, 137, 138, 139}

Die selektive Sulfatierung nach vorheriger Bildung des Stannyleneacetals gelang gleichzeitig *Flitsch*¹⁴⁰ und *Lubineau*¹⁴¹. Aufbauend auf diesen Veröffentlichungen und in Analogie zu der von *A. Rösch* beschriebenen Sulfatierung von Lewis^a-Derivaten¹⁴² gelingt eine milde und selektive Sulfatierung der 3-Position des Lewis^x-Trisaccharids. Die 1,3-Dioxostannane **44** bzw. **45** werden durch dreistündiges Erhitzen in Methanol mit einem 1.1-fachen Überschuss an Dibutylzinnoxid erhalten. Nach Entfernen des Lösungsmittels und mehrmaligem Kodestillieren mit Toluol zur Entfernung letzter Wasserspuren werden die Stannyleneacetale ohne weitere Reinigung zu den Sulfaten umgesetzt.

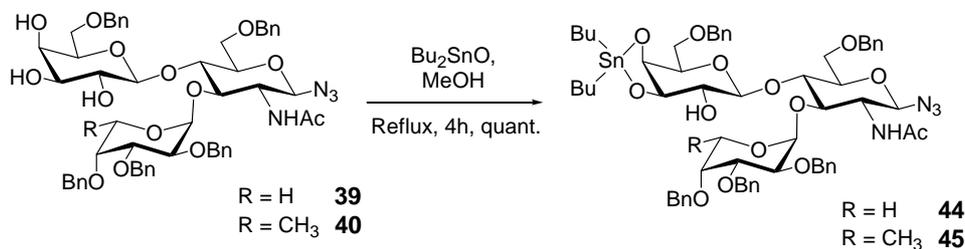


Abb. 3.8.2: Darstellung der Stannylene-Acetale **44** und **45**.

Die Struktur der Stannylene sowie der Mechanismus sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Kristallstrukturanalysen lassen jedoch darauf schließen, dass die Stannylene trigonal-bipyramidale Dimere ausbilden, wobei die sterisch anspruchsvollen Butylreste die

¹³⁶ C. Augé, S. David, A. Veyrières, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1976**, 375-376.

¹³⁷ R. M. Munavu, H. H. Szmant, *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 1832-1836.

¹³⁸ M. A. Nashed, L. Anderson, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 3503-3506.

¹³⁹ M. A. Nashed, L. Anderson, *Carbohydr. Res.*, **1977**, *56*, 325-329.

¹⁴⁰ B. Guilbert, N. J. Davis, S. L. Flitsch, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 6563-6566.

¹⁴¹ A. Lubineau, R. Lemoine, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 8795-8796.

¹⁴² A. Rösch, *Dissertation*, **2005**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

äquatorialen Positionen besetzen.¹⁴³ In dieser Struktur werden nun die Sauerstoffe in 3- und 4-Position unterschieden. Der elektroneivere Sauerstoff in 3-Position sitzt an der Spitze einer trigonalen Bipyramide und ist nur an ein Zinn-Zentrum koordiniert, während der Sauerstoff in 4-Position an zwei Zinnatome in Form einer Sn_2O_2 -Brücke gebunden ist (Abb. 3.8.3).¹⁴⁴ In dieser Koordination liegt die hohe Regioselektivität der nachfolgenden Sulfatierung begründet.

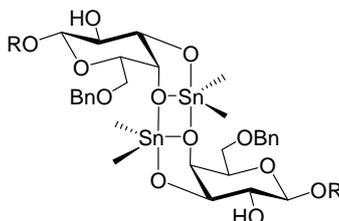


Abb. 3.8.3: *postulierte Struktur eines dimeren Stannylene-Acetals.*

Die Stannylene werden dazu in Dimethylformamid bei Raumtemperatur mit 1.1 Äquivalenten Schwefeltrioxid-Trimethylamin-Komplex umgesetzt. Dabei kommt es zur Öffnung des Stannylene-Acetals und zur selektiven Sulfatierung der 3-Position. Die Produkte können nach flashchromatographischer Reinigung in durchweg sehr guten Ausbeuten von 85% (Ara) bzw. 90% (Fuc, jeweils über zwei Stufen) rein erhalten werden.

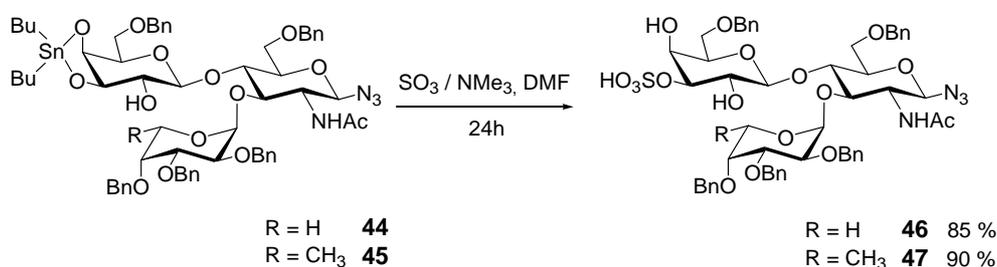


Abb. 3.8.4: *Regioselektive Umsetzung der Stannylene-Acetale zu den Lewis^x-Sulfaten 46 und 47.*

Das Vorhandensein des Sulfatrestes kann massenspektrometrisch eindeutig belegt werden. Der Vergleich der NMR-Spektren der sulfatierten und nichtsulfatierten Saccharide liefert den Beleg für den regioselektiven Verlauf der Reaktion. Wie zu erwarten findet man für den Kohlenstoff C-3 der Galactose aufgrund des starken elektronenziehenden Effektes der SO_3 -Gruppe, der die Elektronendichte und damit die magnetische Abschirmung stark herabsetzt, eine starke Tieffeldverschiebung. Gleiches gilt in etwas geringerem Maße auch für die

¹⁴³ S. J. Blunden, P. A. Cusack, P. J. Smith, *J. Organomet. Chem.*, **1987**, 325, 141-152.

¹⁴⁴ S. David, S. Hanessian, *Tetrahedron*, **1985**, 41, 643-663.

Protonenspektren. Das Signal von H-3 erfährt im Vergleich zur nicht sulfatierten Verbindung ebenfalls eine deutliche Tieffeldverschiebung. Die genauen chemischen Verschiebungen der Protonen und Kohlenstoffe in 3-Position sowie deren direkte Nachbarn sind in der nachstehenden Tabelle vermerkt.

	R =	¹ H			¹³ C		
		H	SO ₃ H	Δ	H	SO ₃ H	Δ
	Gal-2	3.33	3.49	+0.16	70.9	69.5	-1.4
	Gal-3	3.23	3.94	+0.71	73.4	79.2	+5.8
	Gal-4	3.62	3.81	+0.19	67.7	66.0	-1.7
	Gal-2	3.36	3.53	+0.17	71.3	69.5	-1.8
	Gal-3	3.24	3.92	+0.68	73.2	79.1	+5.9
	Gal-4	3.60	3.90	+0.30	67.8	66.0	-1.8

Tab. 3.8.1: Chemische Verschiebungen in ppm der Protonen bzw. Kohlenstoffe 2, 3 und 4 des Galactosyl-Restes vor und nach der Sulfatierung, 400 bzw. 100.6 MHz in DMSO-*d*₆.

A. Rösch konnte in seiner Arbeit zeigen, dass es im weiteren Verlauf der Synthese von sulfatierten Lewis^a-Glycokonjugaten nicht zur Wanderung des Sulfatrestes kommt.¹⁴² Da es bei der Entfernung von Acetylschutzgruppen in 2- und 4-Position der Galactose jedoch häufig zu Problemen kommt, und dies außerdem einen weiteren Schritt nach der Festphasensynthese bedeuten würde, wird hier auf einen solchen Schutz verzichtet.

3.9 Die Sialyl-Lewis^x-Tetrasaccharide - Sialylierungen

Um eine vergleichbare Aussage über die Stärke der Bindung der dargestellten sulfatierten Glycopeptide an die Selektine zu erhalten, soll die Adhäsionsfähigkeit in den biologischen Tests relativ zu den analogen sialylierten Glycopeptiden bestimmt werden. Um diese zu erhalten werden zunächst die jeweiligen Le^x-Azide sialyliert und anschließend an die Aminosäure gekuppelt. Die analoge Festphasenpeptidsynthese liefert dann die sialylierten Glycokonjugate als Vergleichssubstanzen.

Sialylierungen gestalten sich im Allgemeinen etwas schwieriger als andere Glycosylierungsreaktionen.¹⁴⁵ Zum einen wird der Angriff des aktivierten Neuraminsäure-Donors an den Akzeptor durch die am anomeren Zentrum vorhandenen Estergruppe sterisch erschwert und zum anderen destabilisieren die elektronenziehenden mesomeren und induktiven Effekte der Carbonylfunktion das während der Reaktion intermediär gebildete Carbokation. Dies hat zur Folge, dass sich leicht durch Eliminierung eines der benachbarten Protonen das entsprechende Glycal bilden kann und somit Donor für die Sialylierung verloren geht. Der sehr teure Neuraminsäure-Baustein muss daher im großen (2 – 2.5-fachen) Überschuss eingesetzt werden.

Ein weiteres Problem stellt das Fehlen einer OH-Funktion in der 3-Position der Sialinsäure dar. Es ist daher also nicht möglich, über den Nachbargruppeneffekt einer funktionellen Gruppe in Nachbarschaft zum anomeren Zentrum Einfluss auf den stereochemischen Verlauf der Reaktion zu nehmen, also selektiv die α - bzw. β -glycosidische Bindung zu erhalten. Macht man sich jedoch den so genannten Nitrileffekt zunutze, lässt sich die Reaktion über die Wahl der Reaktionsbedingungen (Lösungsmittel, Temperatur) in Richtung des gewünschten Produkts verschieben.^{146, 147, 148, 149}

Wird die Reaktion in Acetonitril durchgeführt, so bilden sich nach Aktivierung des Xanthogenats Nitriliumkonjugate, deren Konfiguration temperaturabhängig ist. So entsteht bei tiefer Temperatur ausschließlich das kinetisch begünstigte β -Nitrilium-Konjugat **50 β** , während bei höherer Temperatur das thermodynamisch stabilere (weil äquatoriale) α -Konjugat **50 α** entsteht. Beim anschließenden nukleophilen S_N2 -artigen Angriff entsteht dann im Idealfall unter Inversion der Konfiguration nur ein einziges Produkt.

Um die benötigten tiefen Temperaturen zur selektiven Synthese der gewünschten α -Glycoside erreichen zu können, wird dem Acetonitril (Schmp.: -45.7 °C) ein Drittel Dichlormethan zur Erniedrigung des Schmelzpunktes zugesetzt und die Reaktion bei -50 °C geführt. Die Regioselektivität stellt im hier betrachteten Fall kein Problem dar, da die primäre Position blockiert ist und der Reaktivitätsunterschied der verbliebenen Hydroxylfunktionen groß genug ist, um einen regioselektiven Verlauf der Reaktion zu gewährleisten. Dies beruht auf der höheren Nukleophilie der äquatorialen 3-Position sowie der sterischen Hinderung durch Nachbargruppen an den beiden anderen Stellen. Somit kann auf weitere

¹⁴⁵ G. J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 4539-4565.

¹⁴⁶ A. J. Ratliffe, B. Fraser-Reid, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1990**, 747-750.

¹⁴⁷ R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett*, **1990**, 694-696.

¹⁴⁸ A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, K. Hotta, H. Ishida, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.*, **1991**, *10*, 493-498.

¹⁴⁹ I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. Hervé du Penhoat, J.-M. Mallet, V. Michon, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.*, **1993**, *246*, 13-22.

Schutzgruppenmanipulationen, welche die zu sialylierende Position sterisch und / oder elektronisch hindern würden, verzichtet werden.¹⁵⁰

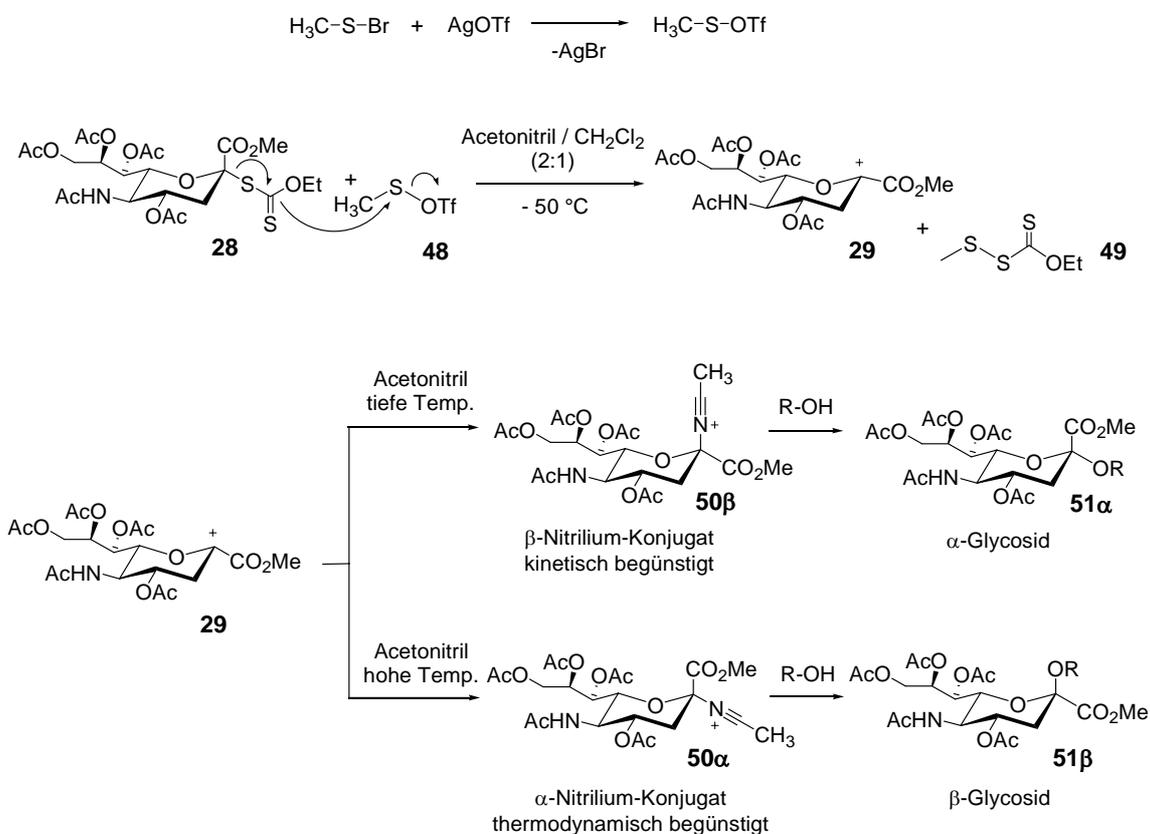


Abb. 3.9.1: Auswirkungen des Nitrileffekts auf den stereochemischen Verlauf von Sialylierungsreaktionen.

Die Aktivierung erfolgt durch bei der Reaktion *in situ* aus Methylsulfenylbromid und Silbertriflat gebildetes Methylsulfenyltriflat. Zur Vervollständigung des Umsatzes wird nach zwei Stunden auf -30 °C erwärmt und der Ansatz weitere 15 Stunden bei dieser Temperatur belassen. Auch dabei kommt es noch nicht zur Bildung des unerwünschten β -Glycosids **51 β** . Nach Neutralisieren des Reaktionsgemisches mit Diisopropylamin in der Kälte und grober flashchromatographischer Reinigung werden die beiden verbliebenen OH-Gruppen in den Positionen 2 und 4 mit Acetanhydrid in Pyridin unter Katalyse mit dem *Steglich*-Katalysator *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) verestert und anschließend erneut flashchromatographisch gereinigt. Es werden für Sialylierungen gute Ausbeuten von 68% (Ara) bzw. 62% (Fuc, jeweils über zwei Stufen) erzielt.

¹⁵⁰ W. Birberg, H. Lönn, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 7457-7458.

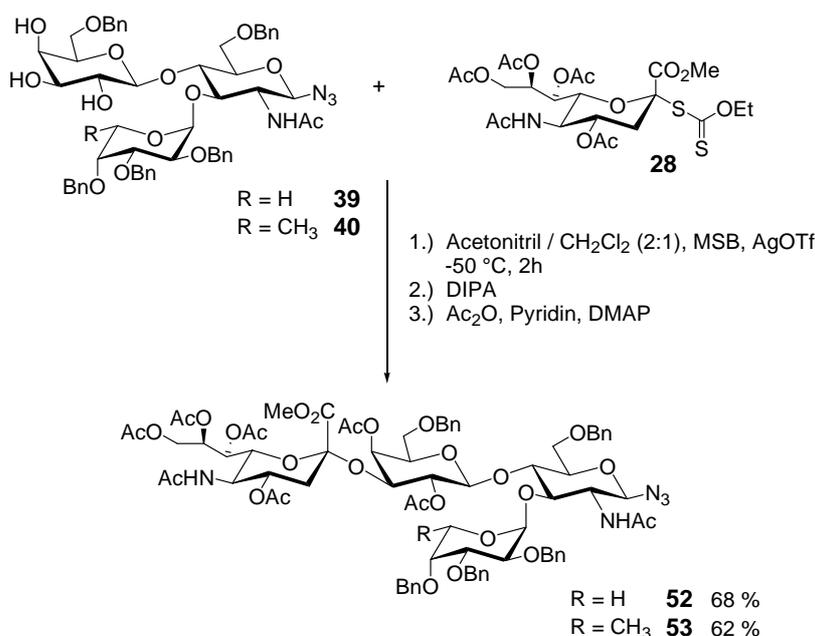


Abb. 3.9.2: Silylierung der Lewis^x-Azide **39** und **40** unter Verwendung des Neuraminsäurexanthogenats und Aktivierung mit in situ erzeugtem Methylsulfonyltriflat.

Eine weitere Besonderheit der Neuraminsäure stellt das Fehlen eines anomeren Protons dar. Aufgrund dieser Tatsache kann die anomere Konfiguration des gebildeten Glycosids nicht wie bei den anderen dargestellten Sacchariden durch einfache Messung der Kopplungskonstanten $^3J_{1,2}$ (im ^1H -Spektrum) und $^1J_{\text{C}1, \text{H}1}$ (im HMQC- bzw. HSQC-Spektrum) bestimmt werden. Die Literatur gibt hier einige empirische Regeln zur Bestimmung der anomeren Konfiguration solcher peracetylierter Neuraminsäure-Verbindungen an.¹⁵¹

Diese basieren auf Unterschieden in den chemischen Verschiebungen δ bzw. den Kopplungskonstanten J :

- $\delta_{\text{H-3}\ddot{\alpha}\text{q}} (\alpha\text{-Anomer}) > \delta_{\text{H-3}\ddot{\alpha}\text{q}} (\beta\text{-Anomer})$ ¹⁵²
- $\delta_{\text{H-4}} (\alpha\text{-Anomer}) < \delta_{\text{H-4}} (\beta\text{-Anomer})$ ^{153, 154}
- $|\delta_{\text{H-9a}} - \delta_{\text{H-9b}}| (\alpha\text{-Anomer}) < |\delta_{\text{H-9a}} - \delta_{\text{H-9b}}| (\beta\text{-Anomer})$ ¹⁵⁵
- $^3J_{7,8} (\alpha\text{-Anomer}) > ^3J_{7,8} (\beta\text{-Anomer})$ ¹⁵⁵

¹⁵¹ H. Hori, T. Nakajima, Y. Nishida, H. Ohru, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 6317-6320.

¹⁵² U. Dabrowski, H. Friebolin, R. Brossmer, M. Supp, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 4637.

¹⁵³ D. J. M. van der Vleugel, W. A. R. van Heeswijk, J. F. G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.*, **1982**, 102, 121.

¹⁵⁴ H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.*, **1984**, 125, 47.

¹⁵⁵ K. Okamoto, H. Kondo, T. Goto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1987**, 60, 637.

Leider sind diese Regeln nicht allgemein gültig. Daher wird die anomere Konfiguration durch Untersuchung der Kopplungen der Protonen an C-3 mit den benachbarten Kohlenstoffen im HMBC-Spektrum bewiesen.

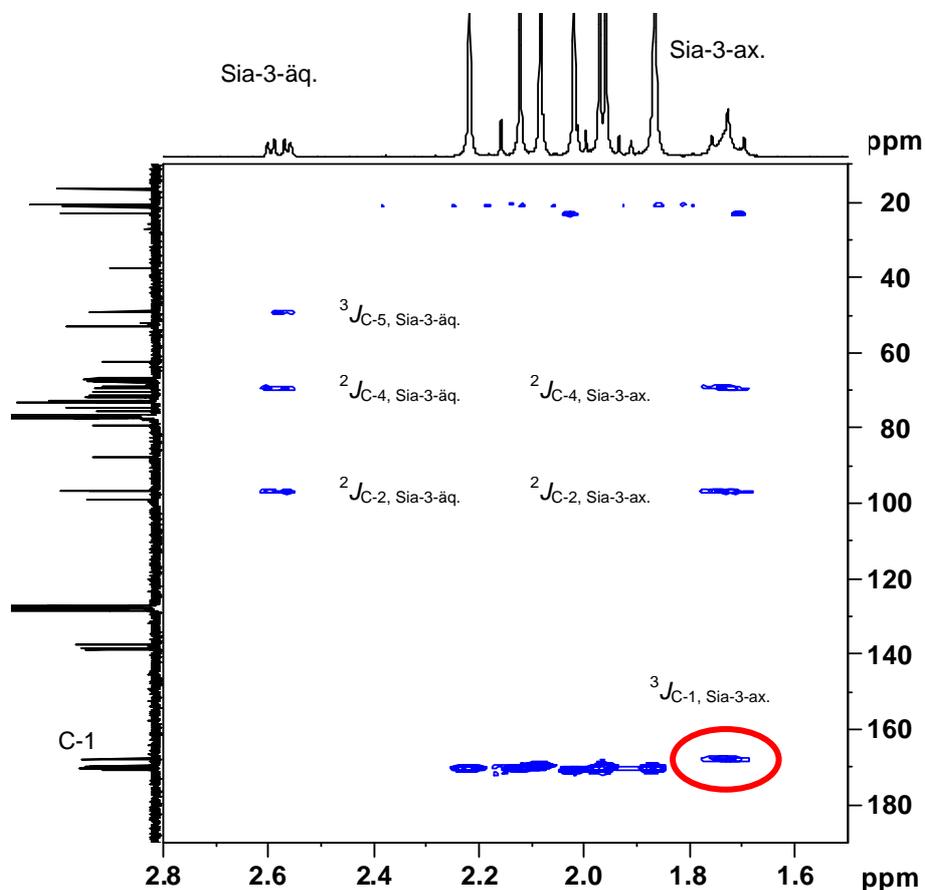


Abb. 3.9.3: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum des Sialyl-Lewis^x-Derivates **53**.

Wichtig ist hierbei die Kopplung ${}^3J_{\text{H-3}, \text{C-1}}$. Entsprechend der Karplusbeziehung würde lediglich im α -Anomeren das axiale Proton an C-3 mit C-1 eine starke, im HMBC-Spektrum sichtbare, Kopplung ergeben, da nur hier ein Winkel von 180° in den beteiligten Bindungen vorliegt. Alle anderen denkbaren Kopplungen, H-3ax-C-1 und H-3äq-C-1 im β -Anomer und H-3äq-C-1 im α -Anomer, sind aufgrund der Winkel $\neq 180^\circ$ derart schwach, dass sie im HMBC-Spektrum nicht erkennbar sind. Dies sei exemplarisch am dargestellten Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum des Sialyl-Lewis^x-Derivates **53** gezeigt (Abb. 3.9.1). Das Vorhandensein des oben beschriebenen Kreuzpeaks zwischen H-3ax und C-1 belegt zweifelsfrei das Vorhandensein der α -glycosidischen Bindung zwischen Sialinsäure und Galactose.

3.10 Der Asparaginsäure-Baustein

Die Kupplung der Lewis^x-Derivate soll an den bewährten *N*-terminal Fmoc-geschützten Asparaginsäure- α -allylester **56** erfolgen^{156, 157} und die so gewonnene glycosylierte Aminosäure, nach Deblockierung des *C*-Terminus durch palladiumkatalysierten Allyltransfer auf *N*-Methylanilin, in der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-)Strategie eingesetzt werden. Der in der Seitenkette deblockierte α -Allylester **56** ist zwar kommerziell erhältlich, jedoch um den Faktor 5 teurer (*novabiochem*: 5g - € 196,-) als das in der Seitenkette *tert.*-butyl-geschützte Derivat **54** (*novabiochem*: 25g - € 196,-). Aus diesem ist der gewünschte α -Allylester in 2 Stufen leicht und schnell zugänglich.

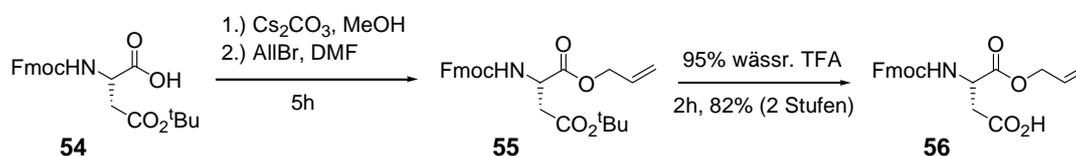


Abb. 3.10.1: Synthese des in der Seitenkette deblockierten Fmoc-Asparaginsäure- α -allylesters **56**.

Zunächst wird **54** mit 0.5 Äquivalenten Cäsiumcarbonat in Methanol in das Cäsiumsalz überführt und dieses anschließend mit Allylbromid in DMF verestert. Nach Entfernen des ausgefallenen Cäsiumbromids wird der vollständig orthogonal blockierte Diester **55** in für die Folgestufe ausreichender Reinheit erhalten.¹⁵⁸ Die Abspaltung des *tert.*-Butylesters in der Seitenkette erfolgt mit Trifluoressigsäure und 5% Wasser als Abfangnukleophil und liefert den gewünschten Baustein **56** nach Chromatographie in 82%iger Ausbeute über beide Stufen.¹⁵⁹

3.11 Die glycosylierten Aminosäuren

Zur chemischen Synthese von Glycopeptiden gibt es generell zwei Möglichkeiten. Zum einen die Deblockierung der potenziellen Glycosylierungstelle nach der Synthese der Peptidsequenz und anschließende Glycosylierung an das fertige Peptid und zum anderen kann eine bereits im Vorfeld glycosylierte Aminosäure in die Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden. Hier soll der letztgenannte Weg besprochen werden. Zum Aufbau *N*-glycosidisch verknüpfter

¹⁵⁶ H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem.*, **1985**, 97, 885.

¹⁵⁷ H. Kunz, H. Waldmann, J. März, *Liebigs Ann. Chem.*, **1989**, 45-49.

¹⁵⁸ S. A. Kales, S. B. Daniels, F. Alberico, *Anal. Biochem.*, **1993**, 212, 208.

¹⁵⁹ A. Trezeciak, W. Bannwarth, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 4557-4560.

Glycopeptidstrukturen hat sich die Verwendung von in der Seitenkette deblockierten Asparaginsäure-Derivaten sowie der entsprechenden Glycosylamine bewährt.^{156, 157}

Der sequentielle Aufbau soll nach der Fmoc-Strategie erfolgen. Der C-Terminus der Asparaginsäure wird daher orthogonal zu allen anderen Schutzgruppen (Fmoc-, Acetyl- und Benzyl-Gruppen) als Allylester blockiert. Dieser lässt sich, nach erfolgter Kupplung mit dem Glycosylamin, unter milden Bedingungen Palladium(0)-katalysiert durch Allyltransfer auf ein geeignetes Scavenger-Molekül spalten. Die Verwendung des kommerziell günstiger erhältlichen *tert.*-Butylesters verbietet sich im vorliegenden Fall, da Abspaltungsreaktionen im sauren Medium (95%ige wässrige Trifluoressigsäure) in Gegenwart der säurelabilen fucosidischen Bindung sowie des Sulfats nicht anwendbar sind.

Wie *U. Sprengard* gezeigt hat, eignen sich die in der Peptid-Chemie häufig verwendeten Uroniumsalze (TBTU¹⁶⁰, HBTU¹⁶¹, HATU¹⁶², u. a.) sehr gut für die Kupplung an die Aminosäure und sind dabei den klassischen Reagenzien wie Carbodiimiden (DCC¹⁶³, EDC¹⁶⁴) und Dihydrochinolinen (EEDQ¹⁶⁵, IIDQ¹⁶⁶) deutlich überlegen.¹⁶⁷ Derartige Kupplungen verlaufen in der Regel in guten Ausbeuten und nahezu anomerisierungsfrei.

Die Strukturen der genannten Reagenzien sind in der nachstehenden Abbildung gezeigt. Röntgenstrukturuntersuchungen zeigten, dass HBTU und HATU als Guanidiniumsalze vorliegen.¹⁶⁸ Die deutlich reaktiveren Uroniumsalze dieser Verbindungen sind jedoch durch Modifikation des Herstellungsprozesses (rasche Aufarbeitung, Ausschluss von tertiären Aminen) zugänglich.¹⁶⁹

¹⁶⁰ R. Knorr, A. Trezeciak, W. Bannwarth, D. Gillesen, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 1927-1930.

¹⁶¹ V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 19, 1269-1272.

¹⁶² L. A. Carpino, A. El-Faham, C. Minor, F. Alberico, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 201-203.

¹⁶³ J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 1067-1068.

¹⁶⁴ J. C. Sheehan, P. A. Cruikshank, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 2492-2493.

¹⁶⁵ B. Belleau, G. Malek, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 1651-1652.

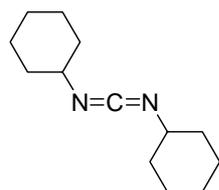
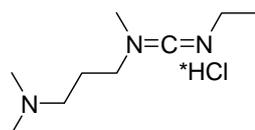
¹⁶⁶ Y. Kiso, H. Yajima, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1972**, 942-943.

¹⁶⁷ U. Sprengard, *Dissertation*, **1996**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

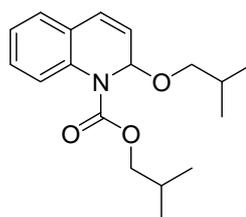
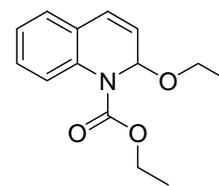
¹⁶⁸ L. Abdelmoty, F. Alberico, L. A. Carpino, B. M. Foxman, S. A. Kates, *Lett. Pept. Sci.*, **1994**, 57.

¹⁶⁹ L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.*, **2002**, 114, 458-461.

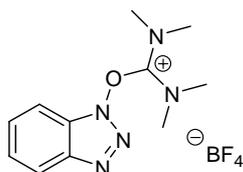
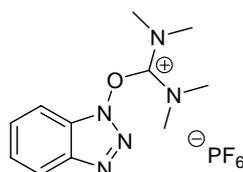
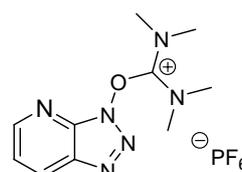
Carbodiimide:

DCC
DicyclohexylcarbodiimidEDC
N-Ethyl-N'-dimethylamino-propylcarbodiimid-hydrochlorid

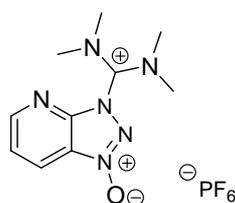
Dihydrochinoline:

IIDQ
1-Isobutyloxy-carbonyl-2-isobutyloxy-1,2-dihydrochinolinEEDQ
1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin

Uroniumsalze:

TBTU
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroboratHBTU
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphatHATU
O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat

HATU als Guanidiniumsalz:



Additive:

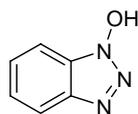
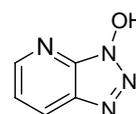
HOBt
1-HydroxybenzotriazolHOAt
7-Aza-1-hydroxybenzotriazol

Abb. 3.11.1: Strukturen einiger gebräuchlicher Reagenzien für die Peptidkupplung.

Die Anomerisierung stellt ein großes Problem bei der Synthese der Glycosylaminosäuren dar, die sie nur schwer zu trennende Gemische liefert und die Ausbeute am gewünschten, in der Natur vorkommenden β -verknüpften *N*-Glycosid¹⁷⁰ herabsetzt. Da die benötigten Glycosylamine sehr anfällig für Anomerisierungsreaktionen sind, werden sie stets erst unmittelbar vor der Kupplung aus den Aziden dargestellt. Die Synthese muss daher schnell und möglichst anomerisierungsfrei verlaufen und erfolgt durch Reduktion der Azide mit Wasserstoff an neutralgewaschenem Raney-Nickel. Hierbei ist die genaue Kontrolle des pH-Wertes (6.5 – 7.5) essentiell, da bei zu hoher Aktivität des Katalysators (zu hohem pH-Wert) nicht nur das Azid reduziert, sondern auch die Benzyletherschutzgruppen hydrogenolytisch gespalten würden. Außerdem würde das Halbaminal sowohl im basischen als auch im sauren schnell der Anomerisierung unterliegen. Bei der Reduktion hat sich die Verwendung von

¹⁷⁰ H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 4495-4537.

käuflichem Raney-Nickel (*Acros Organics*) bewahrt. Die erhaltene 50%ige wässrige Suspension wird dazu mehrfach mit Wasser aufgeschlämmt und dekantiert, bis ein neutraler pH-Wert erreicht ist. Das zu reduzierende Glycosylazid wird dann zusammen mit stöchiometrischen Mengen des so präparierten Katalysators in einem Isopropanol-Wasser-Gemisch (9:1) unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach 1 – 2 Stunden kann vollständiger Umsatz beobachtet werden.

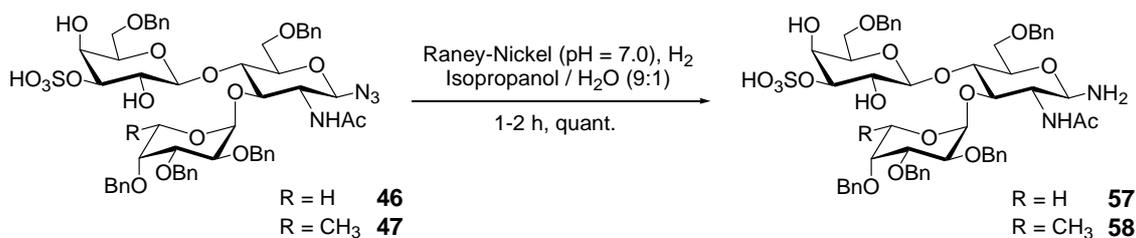


Abb. 3.11.2: Hydrogenolytische Reduktion der Lewisite-Azide zu den entsprechenden anomeren Aminen.

Die Kupplung der so erhaltenen Glycosylamine an den entsprechend funktionalisierten Asparaginsäurebaustein verläuft bei allen Uroniumsalzen gleich.

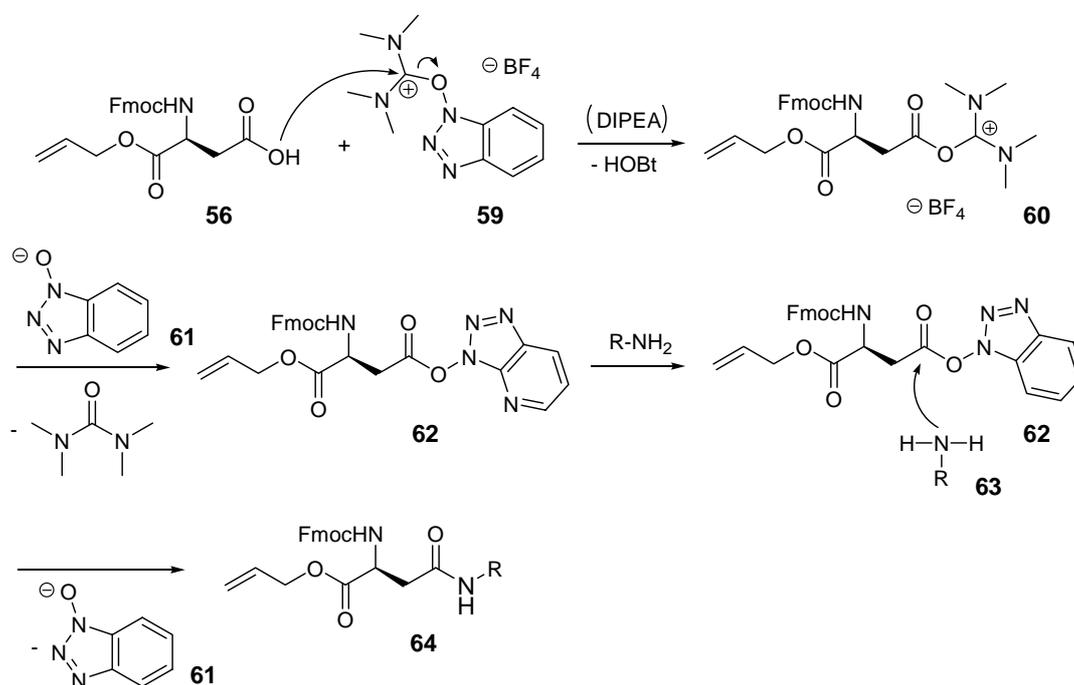


Abb. 3.11.3: Mechanismus der Kupplung des Glycosylamins an den Asparaginsäurebaustein unter Aktivierung mit TBTU und HOBT.

Im ersten Schritt wird die zu kuppelnde Carbonsäurekomponente (hier: der Asparaginsäurebaustein) zusammen mit dem Kupplungsreagenz und dem entsprechenden

Additiv in einem geeigneten Lösungsmittel vorgelegt. Bei Reaktionen mit HBTU und TBTU wird HOBt¹⁷¹, bei Reaktionen mit HATU entsprechen HOAt¹⁷² zugesetzt. Als Lösungsmittel werden in der Regel *N,N*-Dimethylformamid oder *N*-Methylpyrrolidin-2-on verwendet.

Nun werden sowohl die Carbonsäure als auch das zugesetzte Additiv mit je einem Äquivalent Base (in der Regel Diisopropylethylamin oder *N*-Methylmorpholin) deprotoniert, wobei sich unter Austritt des Benzotriazols das reaktive *O*-Acyl-uroniumsalz **60** bildet. Dieses reagiert im Anschluss daran mit dem deprotonierten, aufgrund des α -Effekts supernukleophilen Additiv zum *O*-Acyl-hydroxybenzotriazolaktivester **62**. Die Carbonsäure ist somit hinreichend aktiviert und bildet beim nukleophilen Angriff des Glycosylamins **63** das entsprechende Glycosylamid **64**.

Im vorliegenden Falle wird die Aktivierung mit TBTU und HOBt in Dimethylformamid durchgeführt. Dazu wird der Asparaginsäure-Baustein zusammen mit dem Kupplungsreagenz TBTU und dem Additiv HOBt in DMF vorgelegt, mit zwei Äquivalenten Hünigs Base versetzt und fünf bis zehn Minuten bis zur Ausbildung des Aktivesters gerührt. Anschließend tropft man langsam die entsprechende Aminkomponente hinzu und rührt weitere 15 Stunden bis zur vollständigen Aminolyse zu den sulfatierten Glycosylaminosäuren **65** bzw. **66**.

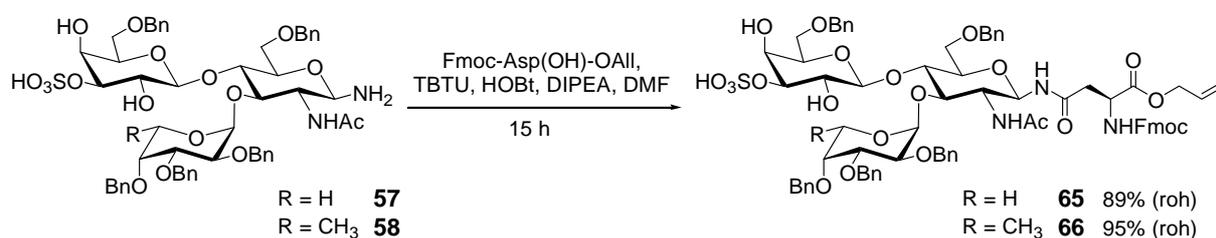


Abb. 3.11.4: Synthese der glycosylierten Asparagin-Bausteine **65** und **66**.

Eine chromatographische Reinigung der so erhaltenen Bausteine gelingt jedoch nur unter erheblichen Verlusten, weshalb die Produkte nur durch Waschen mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung zur Entfernung der Kupplungssalze vorgereinigt werden und derart roh in die nächste Stufe eingesetzt werden. Lediglich ein kleiner Teil wird zur Bestimmung der analytischen Daten chromatographisch weiter aufgereinigt.

Die Deblockierung des C-Terminus gelingt glatt durch Palladium(0)-katalysierten Allyltransfer auf *N*-Methylanilin als Abfangnukleophil.^{173, 174} Dessen geringe Basizität gewährleistet die Stabilität der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe unter den Bedingungen der Allylesterspaltung.

¹⁷¹ W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **1970**, 103, 788-798.

¹⁷² L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 4397-4398.

¹⁷³ M. Ciommer, H. Kunz, *Synlett.*, **1991**, 593-595.

¹⁷⁴ B. M. Trost, *Pure and Appl. Chem.*, **1981**, 53, 2357-2370.

Die jeweiligen Allylester werden dazu in absolutem, sauerstofffreiem Tetrahydrofuran vorgelegt, mit einem Überschuss *N*-Methylanilin und katalytischen Mengen Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) versetzt und bis zum vollständigen Umsatz unter Licht- und Sauerstoffausschluss gerührt. Die fertigen Bausteine für die Festphasensynthese werden nach Chromatographie in Ausbeuten von 51% (Ara) bzw. 70% (Fuc, jeweils über drei Stufen, ausgehend vom entsprechenden Glycosylazid) erhalten.

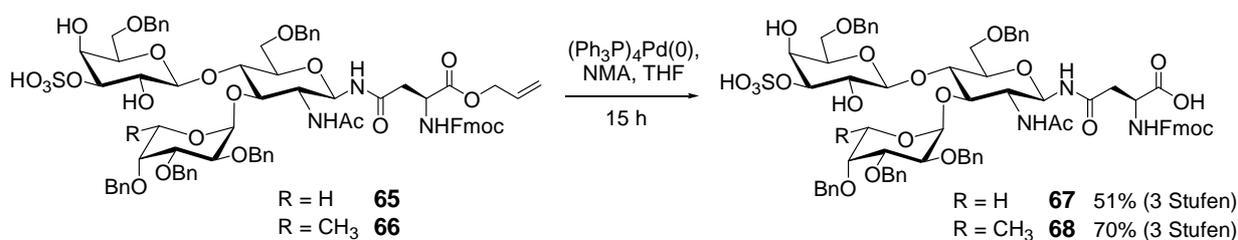


Abb. 3.11.5: Deblockierung des C-Terminus zu den fertigen Glycosylaminosäure-Bausteinen **67** und **68**.

Der Mechanismus des Allyltransfers wird durch den nachstehenden Katalysezyklus beschrieben. Dieser liegt sowohl der Allylesterspaltung als auch der Abspaltung der Alloc-(Allyloxycarbonyl)-Schutzgruppe zugrunde.^{175, 176}

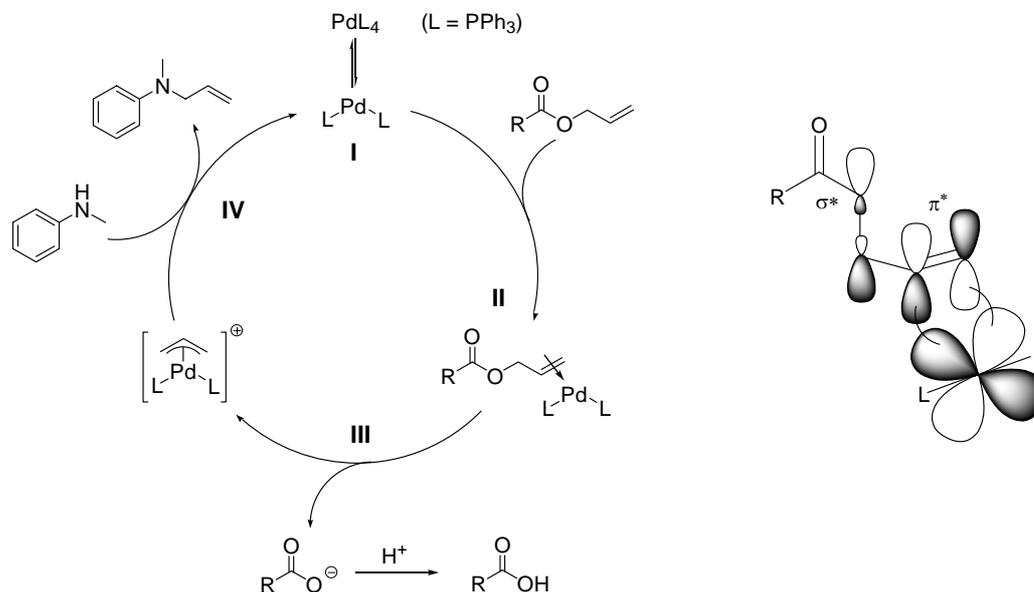


Abb. 3.11.6: Mechanismus des Palladium-katalysierten Allyltransfers auf ein Abfangnukleophil.

Zunächst bindet ein koordinativ ungesättigter Palladiumkomplex (**I**) in Form einer π -Hinbindung an die allylische Doppelbindung (**II**). Dabei wird Elektronendichte vom

¹⁷⁵ H. Waldmann, H. Kunz., *Angew. Chem.*, **1984**, 96, 49-50.

¹⁷⁶ H. X. Zhang, F. Guibé, G. Balavoine, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 619-622.

besetzten π -Orbital des Allylsystems in ein unbesetztes p-Orbital des Palladiumkomplexes übertragen. Gleichzeitig kommt es zu einer π -Rückbindung, also zu einer Übertragung von Elektronendichte aus einem besetzten d-Orbital des Palladiums in das unbesetzte antibindende π^* -Orbital der allylischen Doppelbindung. Delokalisierung dieser Elektronen vom π^* -Orbital der Doppelbindung in das σ^* -Orbital der benachbarten Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung (vgl. Abb. 3.11.6 rechts) führt zu einer Schwächung dieser Bindung und schließlich zum Bindungsbruch unter Austritt des entsprechenden Carboxylat-Anions (**III**). Aus dem positiv geladenen Allyl-Palladiumkomplex wird durch Übertragung des Allyl-Kations auf ein geeignetes Abfangnukleophil (hier: *N*-Methylanilin) der koordinativ ungesättigte Palladium-Spezies für den nächsten katalytischen Zyklus regeneriert (**IV**).

Die Struktur der dargestellten Glycosylaminosäuren lässt sich durch zweidimensionale NMR-Experimente sowie massenspektrometrisch eindeutig beweisen. Die charakteristischen Verschiebungen der Protonen und Kohlenstoffe an den anomeren Zentren belegen klar die jeweilige Stereochemie. Die Verschiebungen von Protonen und Kohlenstoffen in Position 3 der Galactose zeigt das Vorhandensein der Sulfatgruppe. (Abb. 3.11.6).

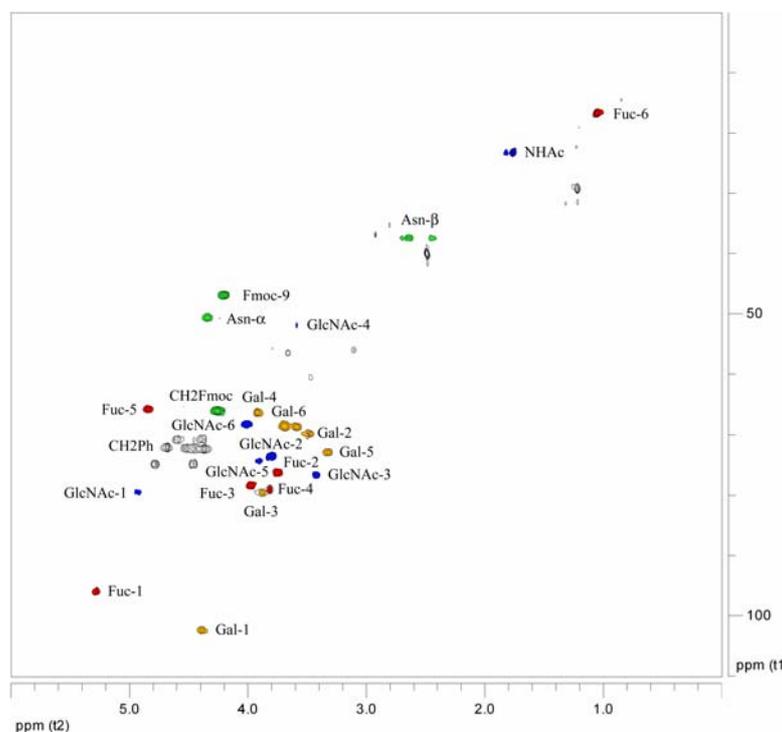


Abb. 3.11.6: Ausschnitt aus dem ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum von Verbindung **68**.

Die Synthese der mit den Sialyl-Lewis^x-Sacchariden glycosylierten Asparagin-Bausteine **71** und **72** erfolgt in analoger Weise. Zunächst werden die anomeren Azide an neutral

gewaschenem Raney-Nickel in quantitativer Ausbeute zu den entsprechenden β -Glycosylaminen **69** bzw. **70** reduziert und diese anschließend mit TBTU und HOBT an den Asparaginsäure-Baustein **56** gekuppelt.

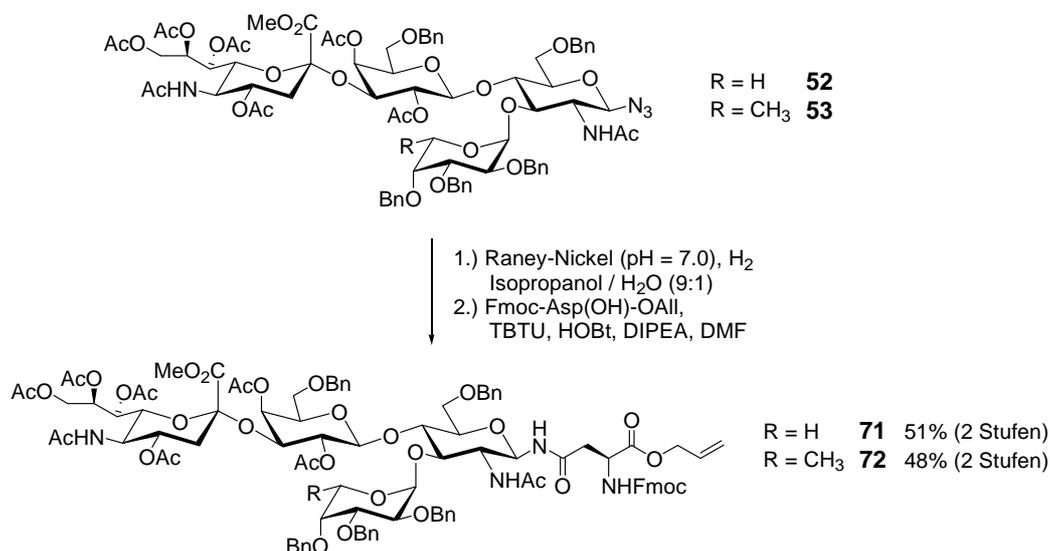
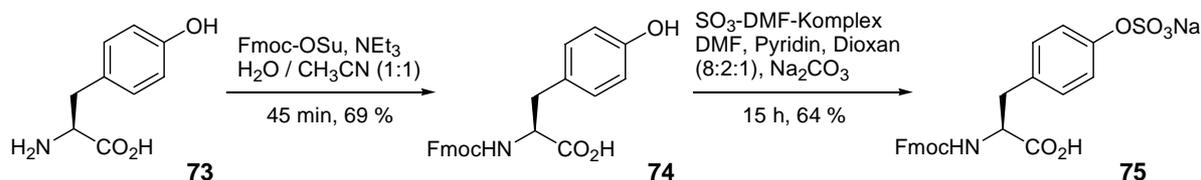


Abb. 3.11.6: Synthese der vollständig geschützten Sialyl-Lewis^x-Asparagin-Bausteine **71** und **72**.

Auf die Abspaltung der Allylesterschutzgruppe und den Einsatz in der Festphasensynthese wird an dieser Stelle zunächst verzichtet.

3.12 Der sulfatierte Tyrosin-Baustein

Zur Synthese von Peptidsequenzen mit sulfatierten Tyrosinen soll der bereits im Vorfeld sulfatierte Tyrosinbaustein **75** in Form des Mononatriumsalzes eingesetzt werden. Dieses wird in zwei Stufen ausgehend von L-Tyrosin erhalten.



Schema 3.12.1: Synthese des sulfatierten Fmoc-Tyrosin-Bausteins.

Dazu wird zunächst der *N*-Terminus durch basenkatalysierte Reaktion mit 9-Fluorenylmethylsuccinimidylcarbonat (FmocOSu) blockiert. Die im Vergleich mit anderen

Aminosäurederivaten geringe Ausbeute von 69% ist durch die schlechte Löslichkeit des Fmoc-geschützten Phenols **74** zu erklären, von dem ein erheblicher Teil zusammen mit dem Hydroxysuccinimid aus dem Reaktionsgemisch ausfällt und nicht zurückgewonnen werden kann. Die geschützte Aminosäure **74** wird anschließend mit dem sehr reaktiven Schwefeltrioxid-Dimethylformamid-Komplex in einem Gemisch aus DMF, Pyridin und 1,4-Dioxan in den Schwefelsäurehalbester überführt und dieser durch Aufarbeitung mit Natriumcarbonat bei pH = 6.5 als Mononatriumsalz **75** in 64%iger Ausbeute erhalten.¹⁷⁷

3.13 Die (Glyco-)Peptide aus dem PSGL-1

Die erstmals im Jahre 1963 von *Merrifield* veröffentlichte festphasengestützte Synthese von Peptiden¹⁷⁸ stellt einen Meilenstein in der Peptidchemie dar und wurde 1984 mit dem Nobelpreis belohnt. *Merrifield* setzte dazu quervernetztes Polystyrol als Trägermaterial ein.

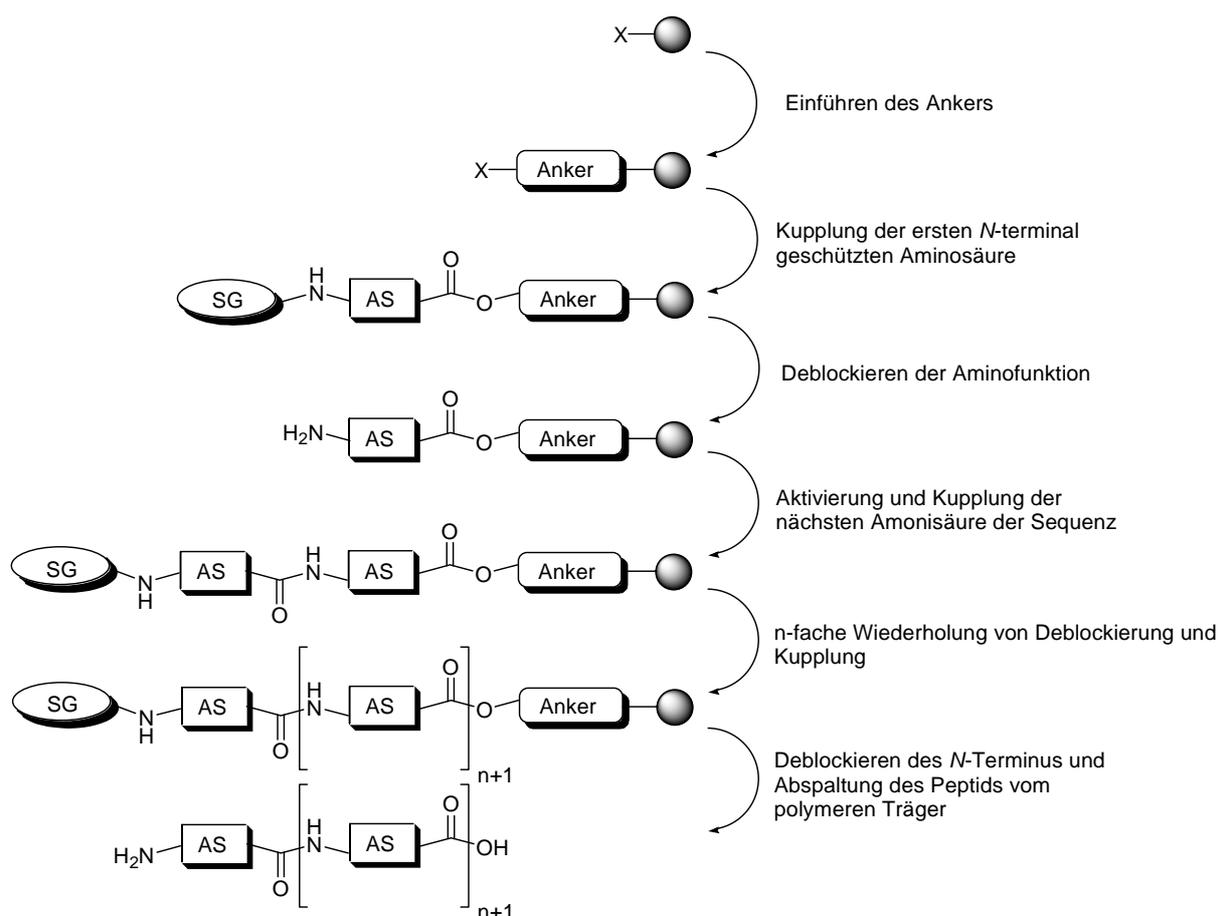


Abb. 3.13.1: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield.

¹⁷⁷ T. Yagami, S. Shiwa, S. Futaki, K. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, 41(2), 376.

¹⁷⁸ R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154.

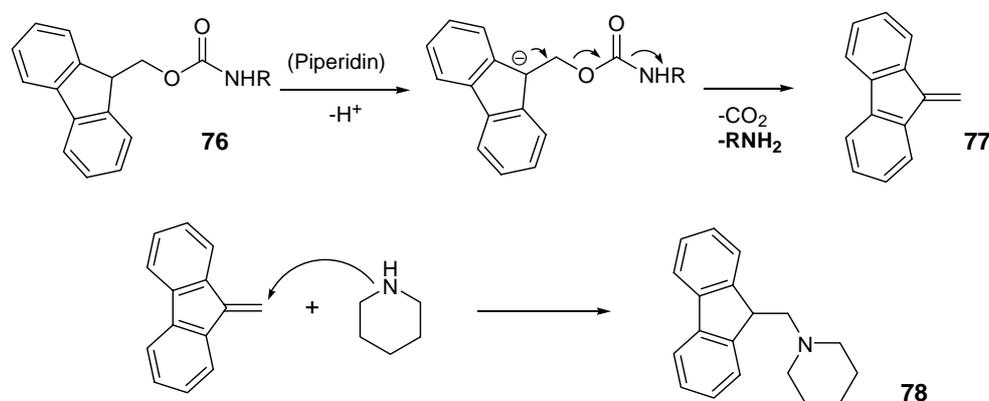
Bei einer solchen Synthesesequenz wird zunächst eine *N*-terminal geschützte Aminosäure über ein geeignetes Linkermolekül an einen polymeren Träger angebunden. Von der so immobilisierten Aminosäure wird die *N*-terminale Schutzgruppe entfernt und das nun freie Amin mit der bereits voraktivierten, *N*-terminal geschützten nächsten Aminosäure der Sequenz umgesetzt. Es schließt sich ein „capping“-Schritt an, bei dem nicht umgesetzte Amin-Funktionen acetyliert und damit der weiteren Peptidsynthese entzogen werden. Dadurch können etwaige Fehlsequenzen im Anschluss an die Synthese leichter abgetrennt werden. Durch iteratives Wiederholen dieser Reaktionsfolge lässt sich die gewünschte Peptidsequenz sukzessive vom *C*-terminalen Ende her aufbauen. Nach Beendigung der Synthese wird der Anker zum polymeren Träger gespalten und das Harz durch einfache Filtration entfernt. Abschließende Entfernung aller eventuell noch vorhandenen Schutzgruppen liefert das fertige Peptid.

Der große Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der Synthese in Lösung besteht darin, dass alle eingesetzten Lösungsmittel und Reagenzien durch einfache Filtrations- und Waschschriffe vom Substrat entfernt werden können. Dadurch können sehr große Überschüsse an den verwendeten Reagenzien eingesetzt werden, was in der Regel für einen nahezu quantitativen Umsatz der einzelnen Kupplungen sorgt. Da der komplette Reaktionszyklus nur einfache Operationen (Mischen, Schütteln, Filtrieren, Waschen) beinhaltet, ist er leicht automatisierbar.

3.13.1 Strategien bei der Synthese von Peptiden an der festen Phase

Für die Synthese von Peptiden und Glycopeptiden haben sich zwei Strategien etabliert. Bei der Boc-Strategie wird als *N*-terminale Schutzgruppe die Boc-(*tert.*-Butyloxycarbonyl)-Gruppe verwendet. Diese wird acidolytisch unter Verwendung von 20-50%iger Trifluoressigsäure gespalten. Unter diesen Bedingungen müssen sämtliche Seitenkettenschutzgruppen sowie der Linker stabil sein. Es werden dazu häufig Benzylether und nicht säurelabile Anker eingesetzt. Der große Nachteil der Boc-Strategie bei der Synthese von Glycopeptiden besteht in der Säurelabilität vieler Kohlenhydratbausteine. Die Boc-Strategie wird daher heute nur noch begrenzt angewendet.

Eine deutlich mildere Alternative zur Boc-Strategie stellt die Fmoc-Strategie dar.¹⁷⁹ Man greift hier zum Schutz der Aminofunktion auf die Fmoc-Gruppe¹⁸⁰ zurück. Diese wird unter sehr milden Bedingungen mit sekundären Basen wie Morpholin oder Piperidin gespalten.



Schema 3.13.2: Der Mechanismus der Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin.

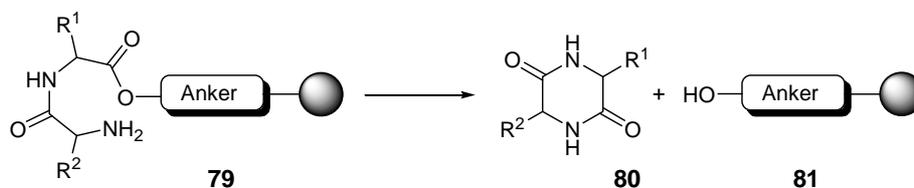
Dabei wird zunächst an der aciden 9-Position des Fluorenyl-Systems **76** deprotoniert, und es entstehen nach Eliminierung von Kohlendioxid das freie Amin sowie das Dibenzofulven **77**. Dieses reagiert im Anschluss mit einem zweiten Molekül der Base zum stabilen Dibenzofulven-Morpholin- bzw. Dibenzofulven-Piperidin-Addukt **78**. Die starke UV-Absorption dieses Adduktes wird in der automatisierten Synthese zur Reaktionskontrolle der Schutzgruppenspaltung verwendet. Dabei wird der Abspaltschritt solange wiederholt, bis die UV-Absorption der Abspaltung unter einen bestimmten Grenzwert gesunken ist.

Die Blockierung von Funktionalitäten in den Seitenketten der jeweiligen Aminosäure erfolgt in der Regel mit säurelabilen *tert.*-Butylester- sowie hydrogenolytisch spaltbaren Benzyl-Gruppen. Verwendet man neben den säurelabilen Schutzgruppen in der Seitenkette auch einen säurelabilen Anker, so können die beiden Abspaltreaktionen vereinigt und somit ein Reaktionsschritt eingespart werden.

Eine Gefahr bei Synthesen nach der Fmoc-Strategie stellt die Bildung des 2,5-Diketopiperazins **80** auf der Stufe des deblockierten Dipeptids **79** dar.

¹⁷⁹ E. Atherton, R. C. Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **1989**.

¹⁸⁰ L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 5748-5749.

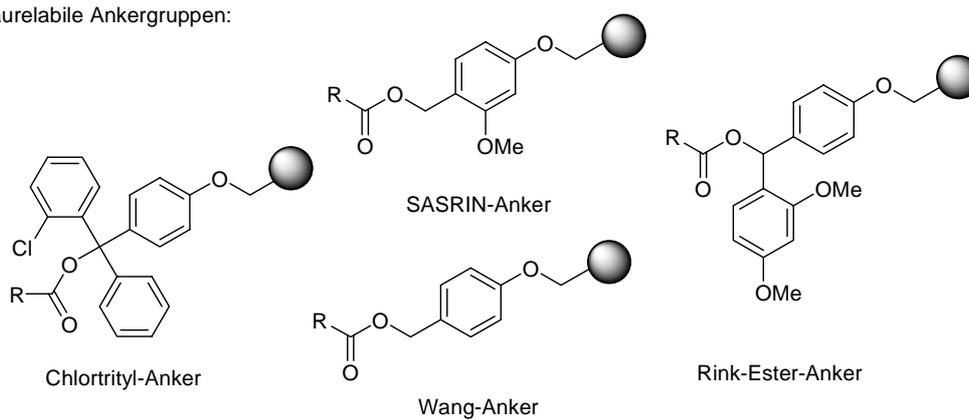


Schema. 3.13.2: Bildung des Diketopiperazins auf der Stufe des Dipeptids.

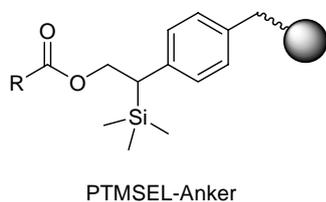
Diese Nebenreaktion wird durch Sequenzen, die Prolin, Glycin oder Serin als Startamino­säuren enthalten, begünstigt. Sie lässt sich durch Verwendung sterisch anspruchsvoller Ankergruppen oder die Kupplung eines Dipeptids an die Startamino­säure reduzieren.

Zur Anbindung der Startamino­säure an den polymeren Träger kommen wie erwähnt diverse Ankergruppen zum Einsatz, deren Stabilität gegenüber allen bei der Synthese eingesetzten Reagenzien gegeben sein muss, und die sich im Anschluss an den erfolgreichen Aufbau der Peptidsequenz quantitativ spalten lassen, ohne dass das Produkt angegriffen wird.

säurelabile Ankergruppen:



fluoridlabile Anker:



allylische Anker:

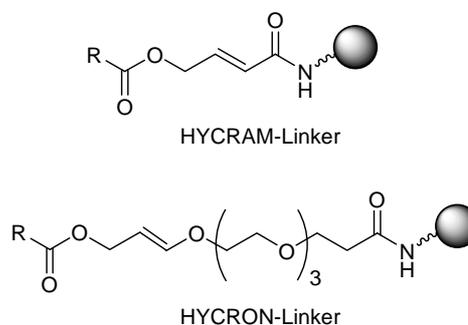


Abb. 3.13.2: verschiedene Ankergruppen für die Festphasenpeptidsynthese.

Sind im Produkt keine säurelabilen Funktionalitäten vorhanden, so werden in der Regel säurelabile Ankersysteme verwendet. Beispiele hierfür stellen der häufig verwendete Wang-Anker¹⁸¹, der extrem säurelabile SASRIN-Anker¹⁸² (*super acid sensitive resin*), der es erlaubt säurelabile Schutzgruppen in der Seitenkette bei der Abspaltung zu erhalten, der Rink-Anker¹⁸³ und der Chlortrityl-Anker¹⁸⁴. Im Gegensatz dazu werden basenlabile Ankersysteme nur begrenzt eingesetzt, da es bei den sehr drastischen Bedingungen vermehrt zu Nebenreaktionen wie der Racemisierung der Aminosäuren und der Aspartimidumlagerung kommen kann. Ein Beispiel für fluoridlabile Systeme^{185, 186, 187} stellt der von Kunz et al. vorgestellte PTMSE-Linker ((2-Phenyl-2-trimethylsilyl)-ethyl-Linker) dar.¹⁸⁸ Dieser ist bereits unter sehr milden Bedingungen (Tetrabutylammoniumfluorid in Dichlormethan) spaltbar und erlaubt so eine Spaltung in Gegenwart der Fmoc-Gruppe. Eine weitere Klasse von Linkersystemen sind die allylischen Anker^{189, 190, 191, 192}, die durch Palladium(0)-katalysierten Allyltransfer auf ein geeignetes Abfangnukleophil gespalten werden können. Eine Auswahl der verschiedenen Klassen von Ankersystemen ist in Abb. 3.13.3 aufgeführt. Ausführliche Zusammenstellungen der in der Festphasensynthese verwendeten Anker sind in der Literatur zu finden.¹⁹³

3.13.2 Das photolabile Ankersystem

Da aufgrund der Säurelabilität der sulfatierten Kohlenhydratstrukturen die Verwendung von säurelabilen Ankersystemen vom Wang-Typ ausscheidet und auch beim Einsatz des fluoridlabilen PTMSE-Linkers große Probleme bei der Reinigung auftraten, soll hier ein durch einfaches Bestrahlen mit UV-Licht spaltbarer Linker verwendet werden.

¹⁸¹ S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 1328.

¹⁸² M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 4005.

¹⁸³ H. Rink, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 1145.

¹⁸⁴ K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1991**, 37, 513.

¹⁸⁵ D. G. Mullen, G. Barany, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 5240.

¹⁸⁶ R. Ramage, C. A. Barron, S. Bielecki, D. W. Thomas, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 4105.

¹⁸⁷ H.-G. Chao, M. S. Bernatowicz, P. D. Reiss, C. E. Klimas, G. R. Matsueda, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 1746.

¹⁸⁸ M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **2002**, 114, 315.

¹⁸⁹ H. Kunz, B. Dombo, *Angew. Chem.*, **1988**, 100, 732.

¹⁹⁰ B. Blankenmeyer-Menge, R. Frank, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 5871.

¹⁹¹ F. Guibe, O. Dangles, G. Bavaloin, A. Loffet, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 2641.

¹⁹² O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **1995**, 107, 901.

¹⁹³ R. Warras, G. Jung (Hrsg.), *Combinatorial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

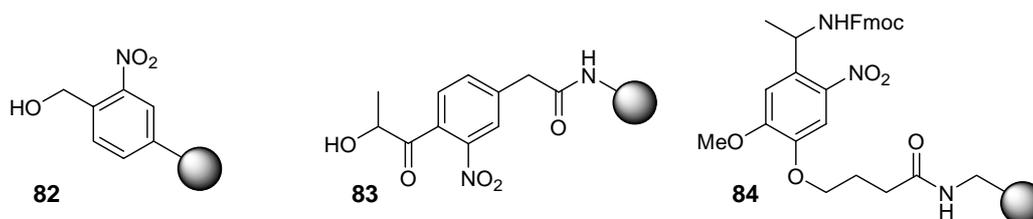
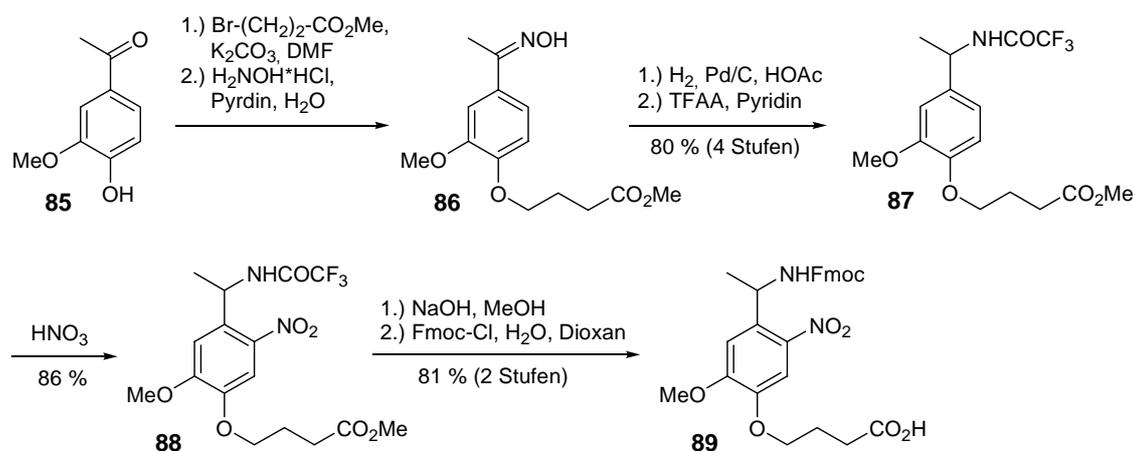


Abb. 3.13.3: verschiedene photolabile Ankergruppen.

Derartige Systeme wurden erstmals von *Rich* und *Zehavi* in der Festphasenchemie verwendet. Sie bestehen aus entsprechend substituierten Nitroaromaten, die bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 320 – 365 nm die Produkte der Festphasenreaktion freigeben. Drei Beispiele für photolabile Ankergruppen sind in der nachstehenden Abbildung zu finden.^{194, 195, 196}

Das gebräuchlichste System stellt in diesem Zusammenhang die 4-{4-[1-(9-Fluorenylmethoxycarbonylamino)ethyl]-2-methoxy-5-nitrophenoxy}buttersäure (**89**) dar. Dieses wurde erstmals von *Holmes* und *Jones* vorgestellt. Sie beschrieben eine Synthese des Linkers ausgehend von Acetovanillon (**85**).



Schema 3.13.4: von *Jones* und *Holmes* publizierte Synthese des Fmoc-Aminoethyl-Photolinkers **89**.

Dieses wird zunächst unter *Williamson*-Bedingungen mit δ -Brombuttersäuremethylester verethert und anschließend in das Oxim **86** überführt. Hydrogenolytische Reduktion des Oxims und nachfolgende Acetylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid liefern das geschützte Amin **87**, welches im nächsten Schritt *para*-ständig zur Methoxygruppe nitriert werden kann. Nach gleichzeitiger Abspaltung des Trifluoracetats und des Methylesters und anschließender

¹⁹⁴ D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1973**, 610.

¹⁹⁵ F. S. Tjoeng, G. A. Heavner, *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 355.

¹⁹⁶ C. P. Holmes, D. G. Jones, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 2318.

Im ersten Schritt erfolgt die intramolekulare Abstraktion des benzylständigen Wasserstoffs durch die durch UV-Bestrahlung angeregte Nitrogruppe in Nachbarstellung. Die nachfolgende Wanderung des Hydroxidradikals vom Stickstoff auf den Kohlenstoff liefert die äußerst instabile Halbaminalspezies **93**. Der Zerfall des Halbaminals setzt schließlich das (Glyco)-Peptid in Form des Carbonsäureamids **95** frei. Auf der festen Phase bleibt nach Tautomersierung das *m*-Nitrosoacetophenon-Derivat **94** zurück. Dieses wird durch Zusatz von 1% eines Abfangnukleophils zur Abspaltung gebunden.

Im Gegensatz zu den meisten anderen üblichen Ankersystemen wird bei der Spaltung des Photolinkers keine der gängigen Seitenkettenschutzgruppen angegriffen.

3.13.3 Das Protokoll der automatisierten Festphasensynthese

Die in dieser Arbeit beschriebenen automatgestützten Festphasensynthesen wurden an einem ABI-433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems* nach der Fmoc-Strategie durchgeführt. Als polymerer Träger wird das oben beschriebene, mit dem Photolinker beladene Aminomethylpolystyrol-Harz verwendet. Polystyrol-Harze besitzen eine gute Quellbarkeit in organischen Solventien wie Tetrahydrofuran, welches im Anschluss an die erfolgte Synthese als Lösungsmittel für die Abspaltreaktion dient. Die Beladung von 0.78 mmol/g sollte eine ausreichende Menge an Produkt bei gleichzeitig ausreichender räumlicher Trennung der wachsenden Peptidketten voneinander gewährleisten. Die Seitenkettenfunktionen der Aminosäurebausteine sind allesamt als Benzylether bzw. Benzylester blockiert.

Beim automatisierten iterativen Aufbau der Peptidsequenz wird für jede zu kuppelnde Aminosäure der gleiche Zyklus an Syntheseschritten durchlaufen. Zur Deblockierung des Aminoterminus wird das Harz 2.5 Minuten mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin-2-on behandelt und dieser Vorgang mindestens zwei weitere Male wiederholt. Durch Messung der charakteristischen UV-Absorption des gebildeten Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes **78** kann dessen Gehalt in der Abspaltung bestimmt werden. Bei einer Änderung um mehr als 10% im Vergleich zur vorherigen Messung wird ein weiterer Abspaltzyklus durchgeführt. Die Kupplung der nächsten Aminosäure an den nun deblockierten *N*-Terminus erfolgt in 10fachem Überschuss unter Aktivierung mit HBTU und HOBt in *N,N*-Dimethylformamid. Als Base werden 20 Äquivalente *N*-Etyhldiisopropylamin zugesetzt, die Reaktionszeit beträgt 20 Minuten. Eventuell nicht umgesetzte freie Aminfunktionen werden im Anschluss mit einem Reagenz bestehend aus Acetanhydrid, *N*-Etyhldiisopropylamin und einer katalytischen Menge HOBt in *N*-Methylpyrrolidin-2-on

aceetyliert. Dadurch lassen sich Fehlsequenzen vermeiden. Es werden stattdessen bei unvollständiger Kupplung (in der Regel) deutlich kürzere Abbruchsequenzen erhalten, die sich leichter chromatographisch vom gewünschten Produkt abtrennen lassen als nahezu gleichlange Fehlsequenzen. Zwischen den jeweiligen Syntheseschritten wird die Reaktionslösung durch Filtration entfernt und das Harz gründlich mit *N*-Methylpyrrolidin-2-on gewaschen. Die Durchmischung der heterogenen Reaktionsmischung erfolgt durch starkes Schütteln des Reaktors (Vortex). Nach erfolgter Synthese der Zielsequenz wird das Harz zusätzlich mit Dichlormethan gewaschen und mit Stickstoff getrocknet.

3.13.4 Die Synthesen der (Glyco-)Peptide aus dem PSGL-1

Als Zielsequenz wurde wie bereits erwähnt ein Bereich aus der für die Bindung an das P-Selektin maßgeblichen *N*-terminalen Domäne (Pro⁵⁹ – Thr⁴⁴) gewählt. Aus dieser Domäne soll eine Sequenz von 16 Aminosäuren dargestellt werden, die anstelle von Thr⁵⁷ den *N*-glycosylierten Asparaginsäurebaustein enthält.

Vor der Synthese der Glycopeptide soll die Strategie zunächst anhand der Synthese des nichtglycosylierten Peptidbackbones **97** erprobt werden.

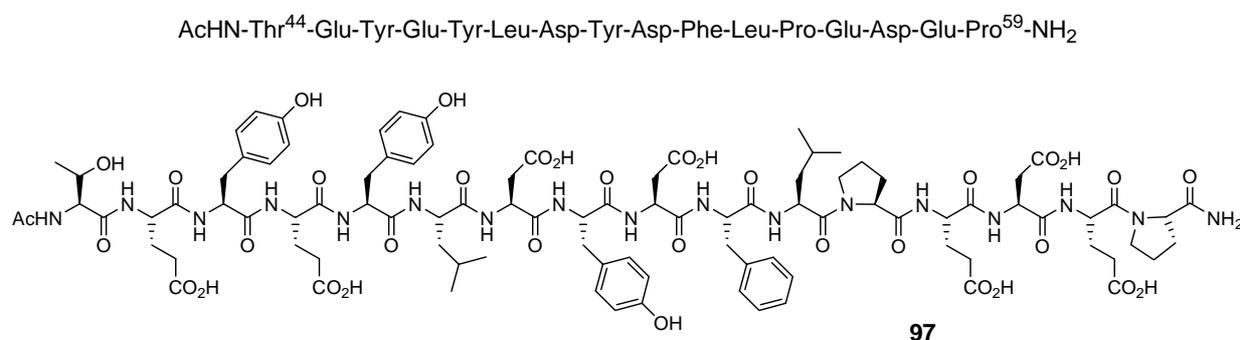


Abb. 3.13.7: Primärstruktur des Peptidrückgrats Pro⁵⁹ – Thr⁴⁴.

Die Kupplung der Aminosäurebausteine erfolgt nach dem in Abschnitt 3.13.3 beschriebenen Protokoll unter Verwendung von zehn Äquivalenten des zu kuppelnden Bausteins und den Kupplungsreagenzien HBTU und HOBT. Das Abspaltprotokoll der automatisierten Synthese ist in der nachstehenden Abbildung zu sehen.

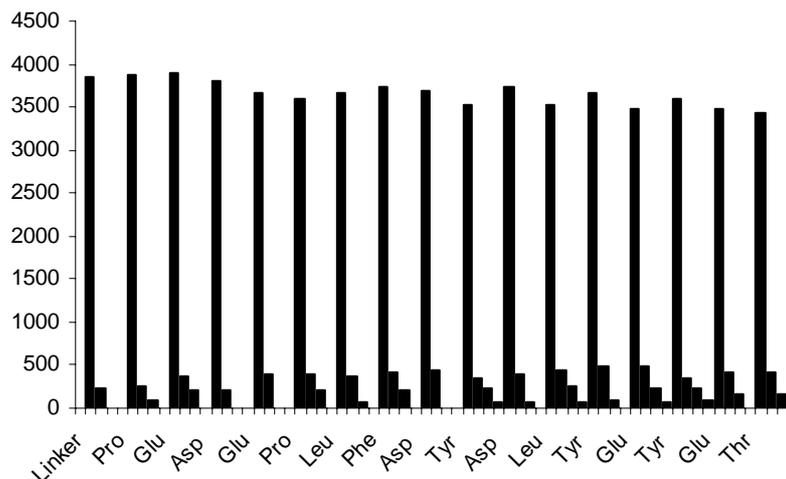


Abb. 3.13.8: Syntheseprotokoll in Form der UV-Messungen des Fmoc-Addukts für das Peptid **96**.

Wie deutlich zu erkennen ist, kommt es bei keiner der 17 Fmoc-Abspaltungen zu signifikanten Einbrüchen in der UV-Absorption. Alle Kupplungsschritte können somit als nahezu vollständig angesehen werden. Zur anschließenden Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger wurde das beladene Harz in einen Festphasenreaktor nach *Merrifield* überführt, in THF gequollen, mit 1% Propandithiol als Abfangnukleophil versetzt und drei Stunden mit einer 450W Quecksilberdampf-Lampe ($\lambda > 350$ nm) bestrahlt. In dieser Zeit verfärbt sich das anfangs leuchtend gelbe Harz nach dunkelbraun bis schwarz (Abb. 3.13.8).



Abb. 3.13.9: Das mit dem photolabilen Linker beladene AMPS-Harz vor (links) und nach der UV-Bestrahlung (rechts).

Nach mehrfachem Waschen des Harzes mit THF erhält man das rohe Peptid **96** in 23%iger Ausbeute. Dieses wird mittels analytischer RP-HPLC auf Einheitlichkeit geprüft und NMR-spektroskopisch untersucht. Ein korrektes Massenspektrum konnte jedoch nicht erhalten werden.

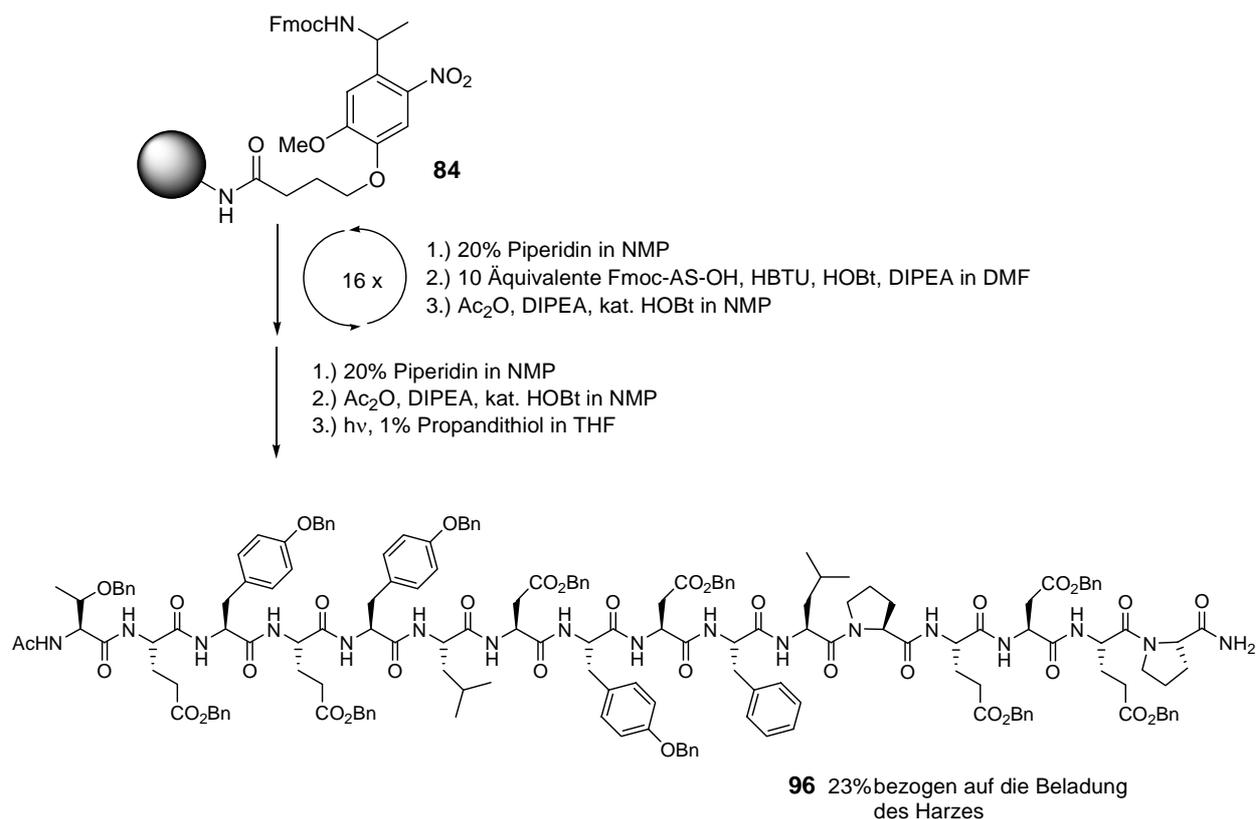


Abb. 3.13.10: Synthese des vollständig benzylgeschützten Peptids **96**.

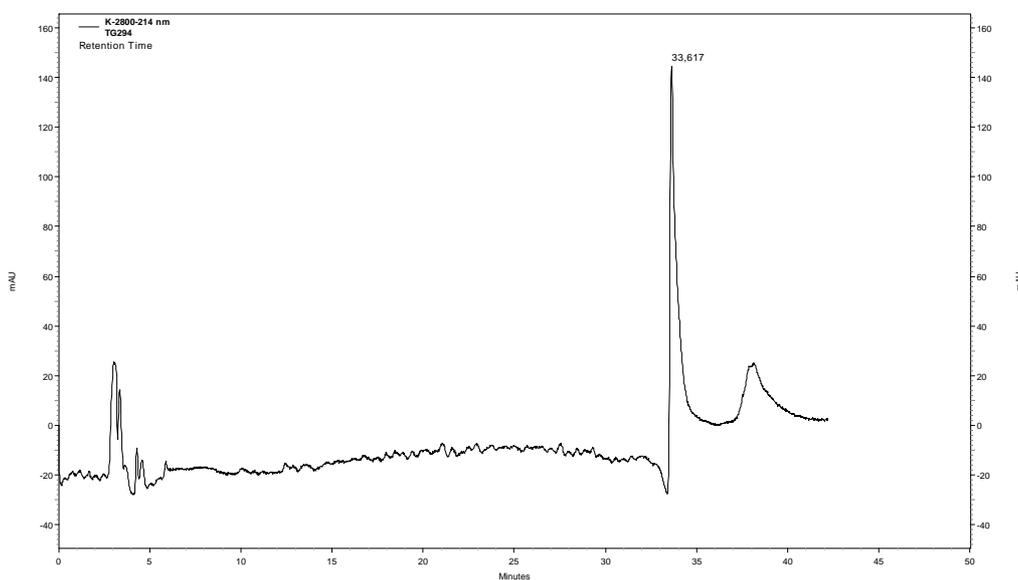


Abb. 3.13.11: HPLC-Chromatogramm des rohen benzylgeschützten Peptids **96** (Säule A2, Grad. A5).

Die abschließende Entfernung der Benzylschutzgruppen erfolgt durch katalytische Hydrierung an Palladium (10% auf Aktivkohle) in Ethanol als Lösungsmittel. Das so erhaltene Rohprodukt wird mehrfach mit Wasser extrahiert und dieser Auszug

gefriergetrocknet. Man erhält das deblockierte Peptid **97** in 83%iger Ausbeute bezogen auf das Rohpeptid **96**.

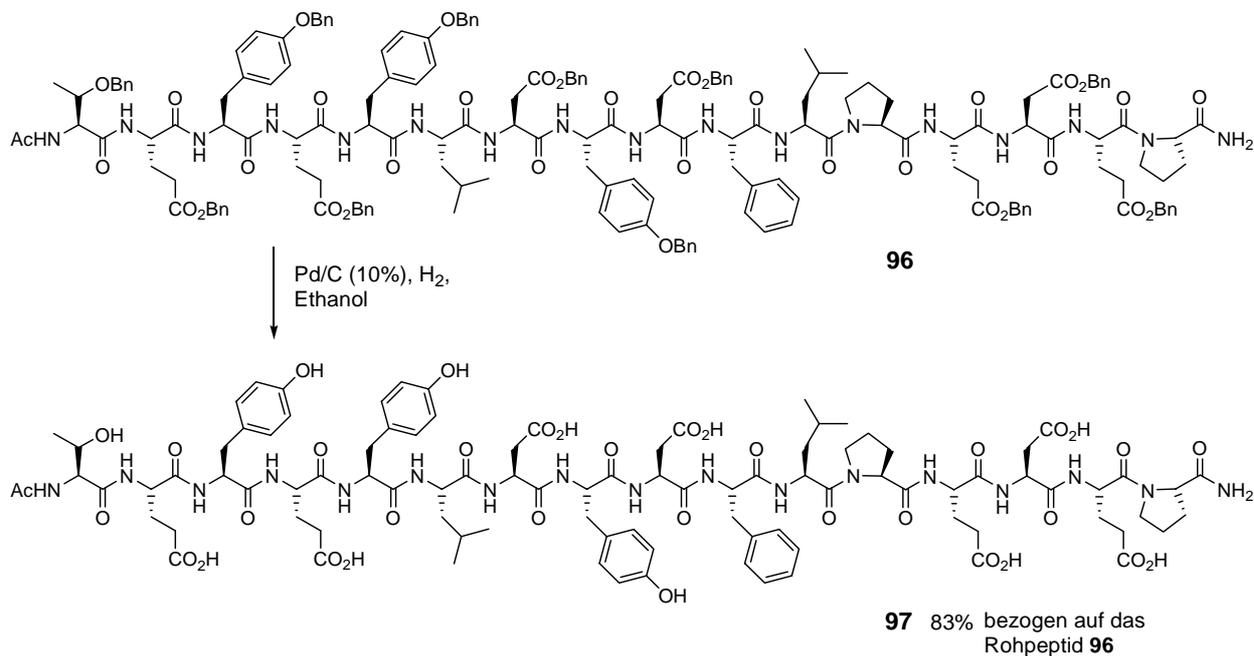


Abb. 3.13.12: Debenzylierung zum Peptid **97**.

Zur Glycopeptidsynthese soll zunächst nur der fucosylierte Glycosylaminosäurebaustein **68** eingesetzt werden. Die Aminosäurebausteine werden nach dem Standard-Protokoll (siehe oben) gekuppelt. Zur Kupplung des sterisch anspruchsvollen Glycosylaminosäurebausteins werden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU und HOAt sowie *N*-Methylmorpholin als Base eingesetzt. Die Carbonsäurekomponente wird manuell in *N*-Methylpyrrolid-2-on voraktiviert und anschließend sechs Stunden am Synthesizer gekuppelt. (Abb. 3.13.14)

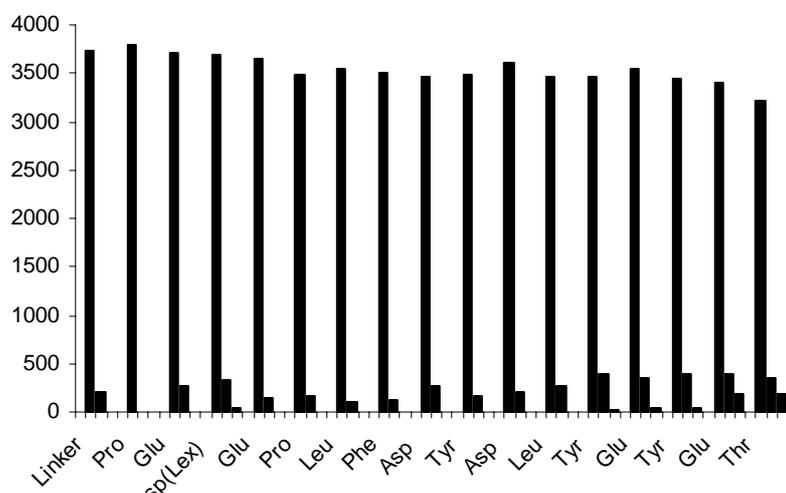


Abb. 3.13.13: Syntheseprotokoll des Glycopeptids **98**.

Wie im oben angegebenen Syntheseprotokoll zu erkennen, ist auch bei der Kupplung der glycosylierten Aminosäure kein signifikanter Abfall der Absorption zu erkennen. (Abb. 3.13.13).

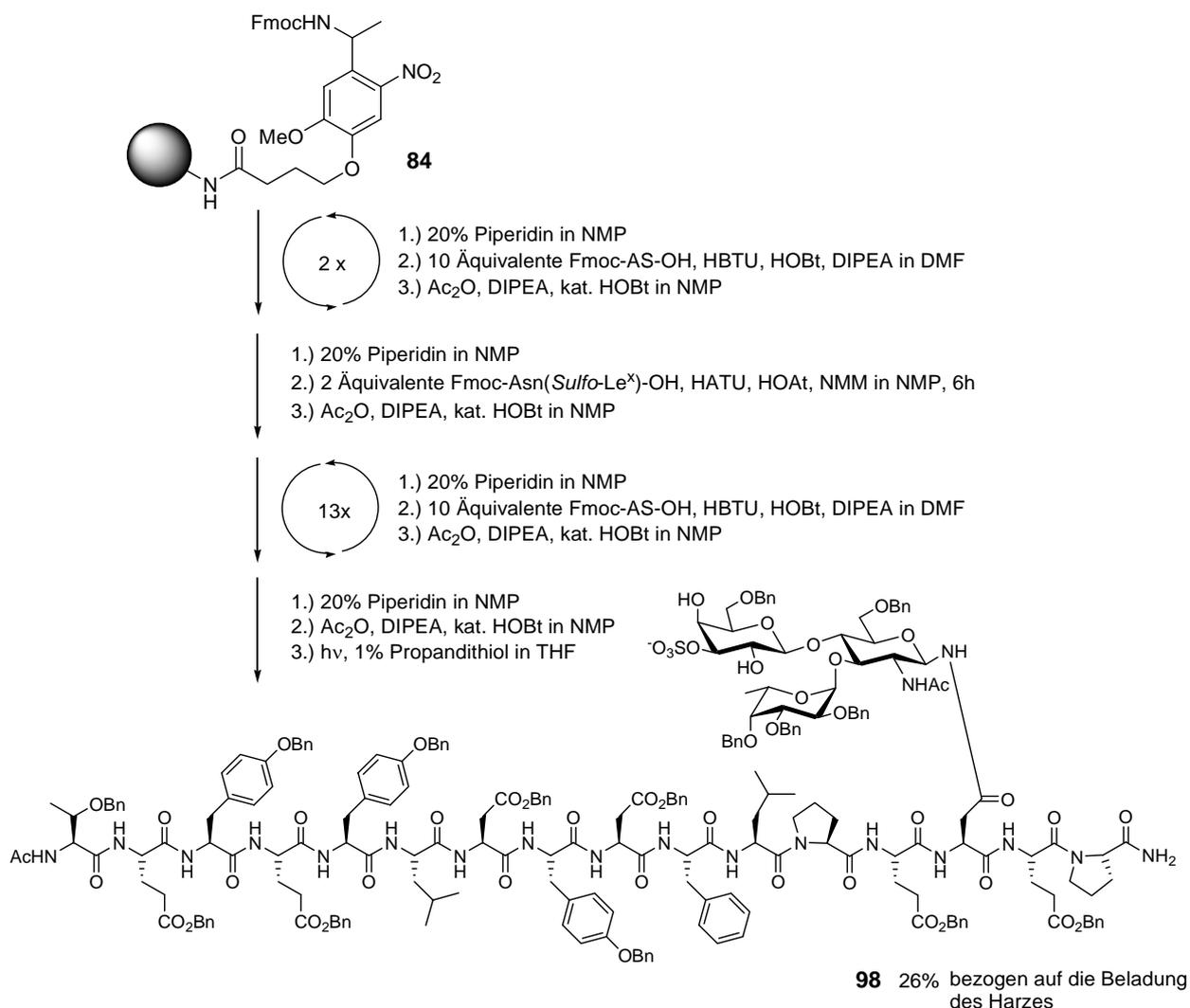


Abb. 3.13.13: Synthese des vollständig benzylgeschützten Glycopeptids **98**.

Die Abspaltung vom polymeren Träger erfolgt ebenfalls nach dem oben beschriebenen Verfahren. Dreistündige Bestrahlung des Harzes und gründliches Waschen mit Tetrahydrofuran liefert das rohe Glycopeptid in 26%iger Ausbeute. Die Struktur wird mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie belegt, jedoch konnte auch hier kein korrektes Massenspektrum erhalten werden. Das HPLC-Chromatogramm (Abb. 3.13.15) belegt ebenfalls die Einheitlichkeit des erhaltenen Produkts.

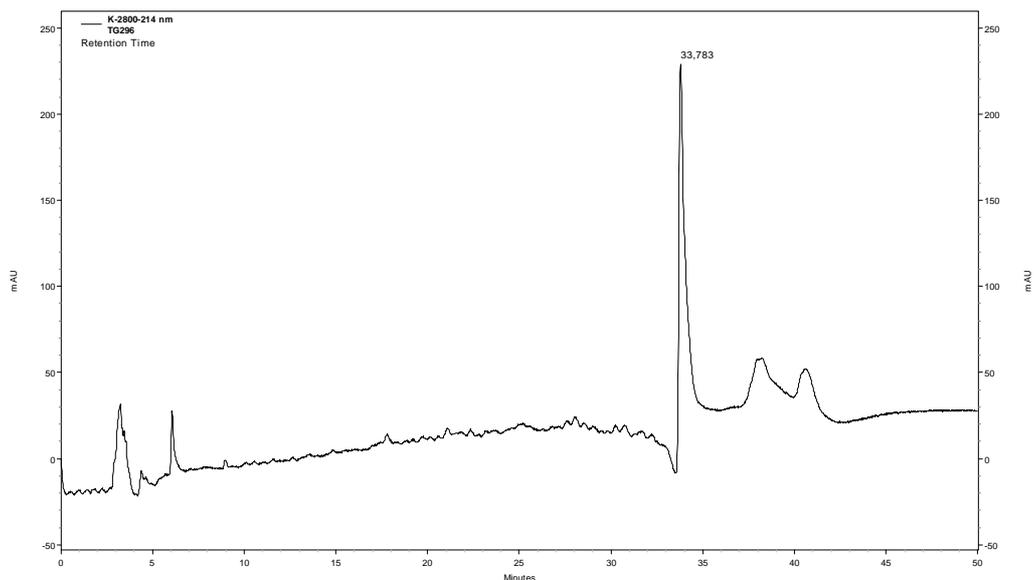


Abb. 3.13.16: HPLC-Chromatogramm des rohen benzylgeschützten Glycopeptids **98** (Säule A2, Grad. A5).

Zur Debenzylierung wurde das rohe Glycopeptid ebenfalls an katalytischen Mengen Palladium (10% auf Aktivkohle) in Ethanol hydriert.

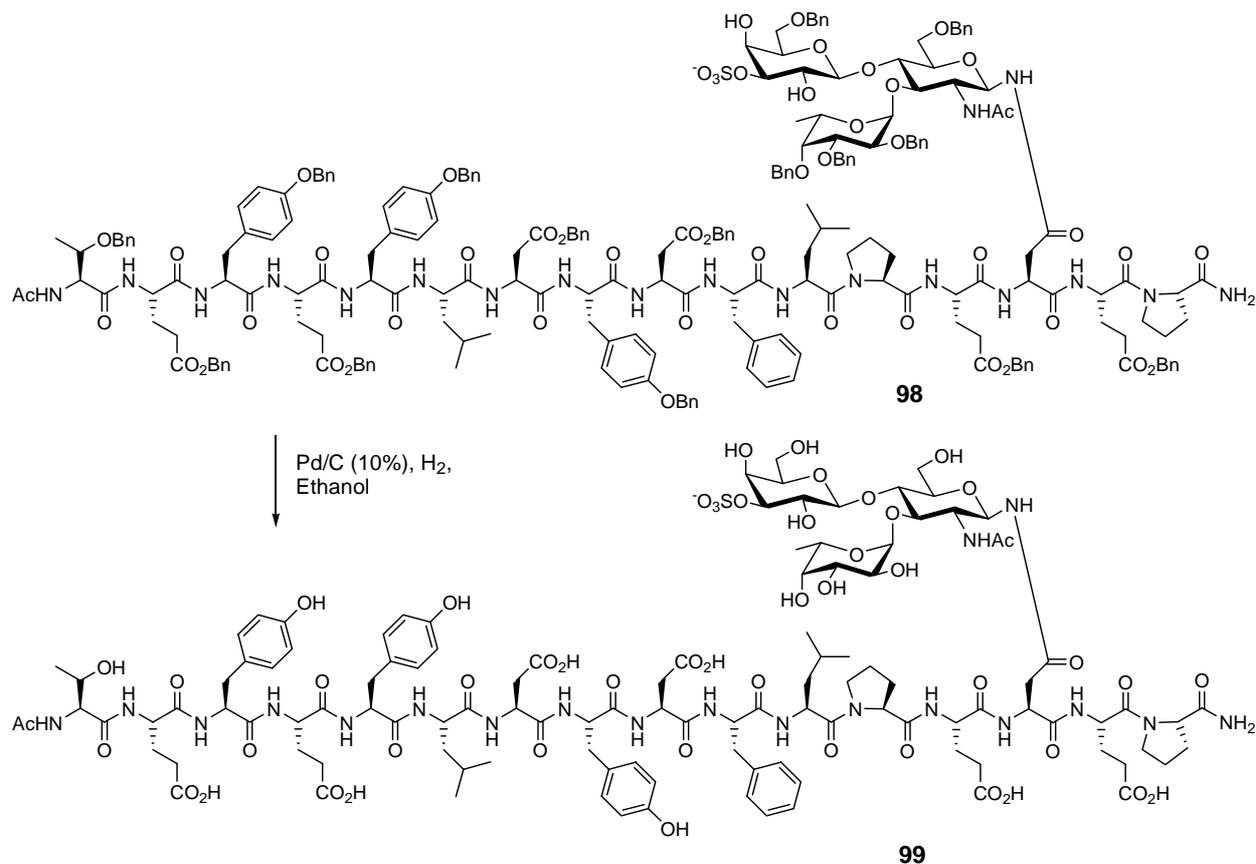


Abb.3.13.17: Hydrogenolytische Debenzylierung zum Glycopeptid **99**.

Nach Reaktionskontrolle mit analytischer RP-HPLC wird die Reaktion nach sieben Tagen beendet. (Abb. 3.13.18).

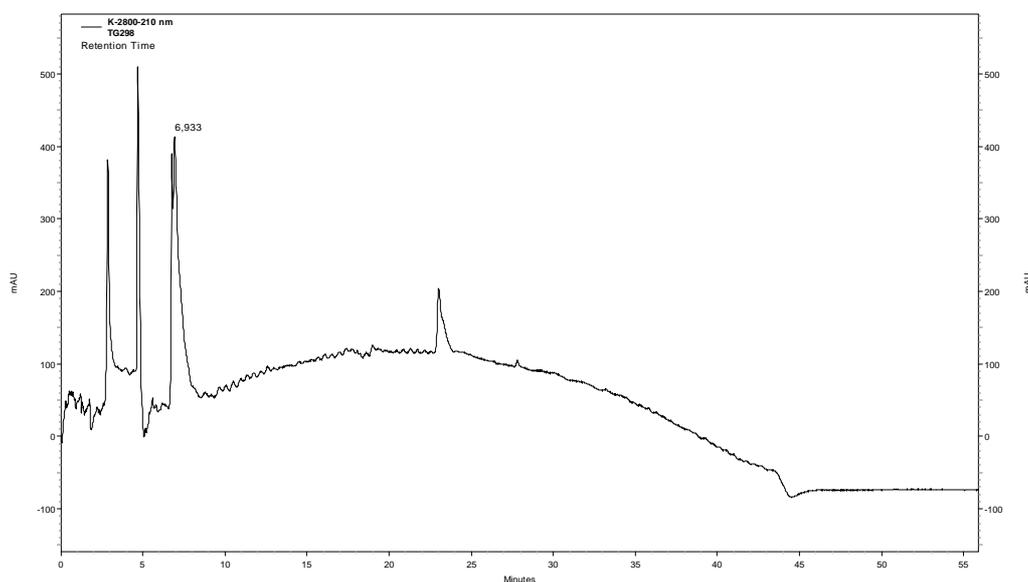


Abb.3.13.18: HPLC-Chromatogramm des erhaltenen Rohprodukts der Hydrierung (Säule A2, Grad. A6).

Reinigung sowie Charakterisierung des so erhaltenen Rohproduktes gelingen jedoch nicht. Die Reinigung des Produktes durch semipräparative RP-HPLC gelingt nicht, genauso wie die wiederholte wässrige Extraktion des Rohproduktes zur Abtrennung unpolarer Verunreinigungen. Die Aufnahme korrelierter NMR-Spektren des Rohprodukts lässt ebenfalls keine Rückschlüsse auf die Struktur zu, korrekte Massenspektren konnten nicht erhalten werden.

Die Synthese des vierfach sulfatierten Glycopeptids **101** wird eine zweistufige Synthese angewendet. Zunächst werden die ersten acht Aminosäuren der Sequenz (Pro⁵⁹ – Asp⁵²) unter Verwendung des Standard-Protokolls mit HBTU und HOBT am Synthesizer gekuppelt. Der sterisch anspruchsvolle Glycosylaminosäurebaustein wird wiederum manuell mit HATU und HOAt aktiviert und unter Verlängerung der Reaktionszeit auf sechs Stunden angeknüpft. Im nachstehenden Abspaltprotokoll für die ersten acht Aminosäurekupplungen ist wiederum allenfalls ein kleiner Einbruch der Absorption nach der Kupplung der glycosylierten Aminosäure zu erkennen.

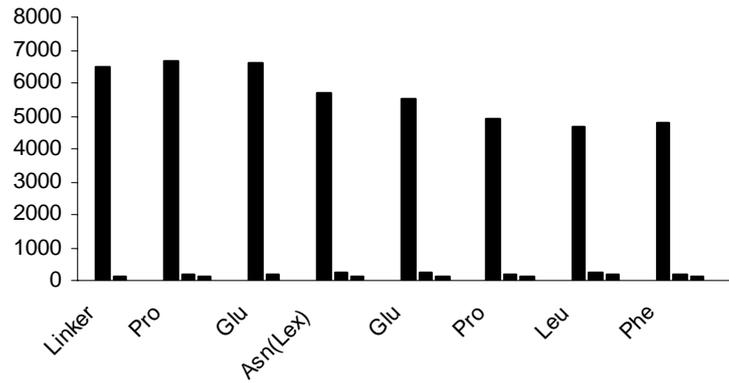


Abb.3.13.19: Syntheseprotokoll der ersten sieben Aminosäurekupplungen von **100**.

Nach erfolgter Synthese des ersten Teils des Peptids am Synthesizer erfolgen die verbleibenden Kupplungsschritte manuell in einem Festphasenreaktor nach *Merrifield*. Dies hat sich als notwendig erwiesen, da die schlechte Löslichkeit des sulfatierten Fmoc-Tyrosins in den für die Peptidsynthese gebräuchlichen Lösungsmitteln wie DMF oder NMP zu erheblichen Problemen bei deren Verwendung am Synthesizer führt. Zum manuellen Aufbau der verbleibenden Sequenz (Tyr⁵¹ – Thr⁴⁴) wird nach dem nachstehenden Protokoll verfahren. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe erfolgt durch 90minütiges Schütteln in einem Gemisch aus Morpholin und DMF (1:1). Die Kupplung des nächsten Aminosäure-Baustein erfolgt unter Aktivierung mit TBTU, HOBt und *N*-Methylmorpholin als Base und zehnfachem Überschuss DMF. Die Reaktionszeit beträgt 20 Stunden. Das Capping von nicht umgesetzten Amingruppen erfolgt durch 30minütige Behandlung mit einer 25%igen Lösung von Acetanhydrid in Pyridin. Nach jedem erfolgten Reaktionsschritt werden die Reagenzien durch Filtration abgetrennt und das Harz gründlich mit DMF gewaschen.

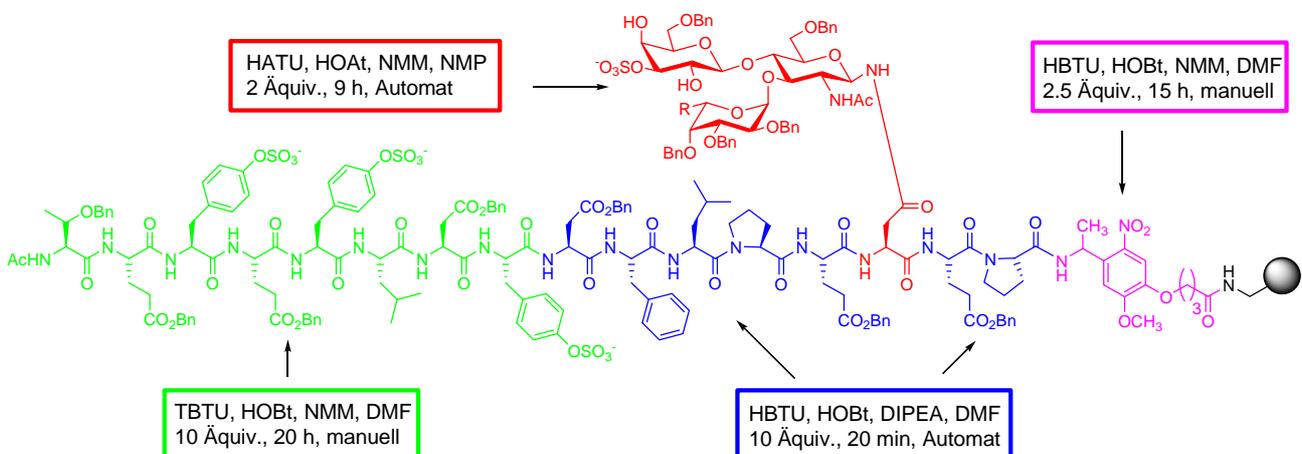
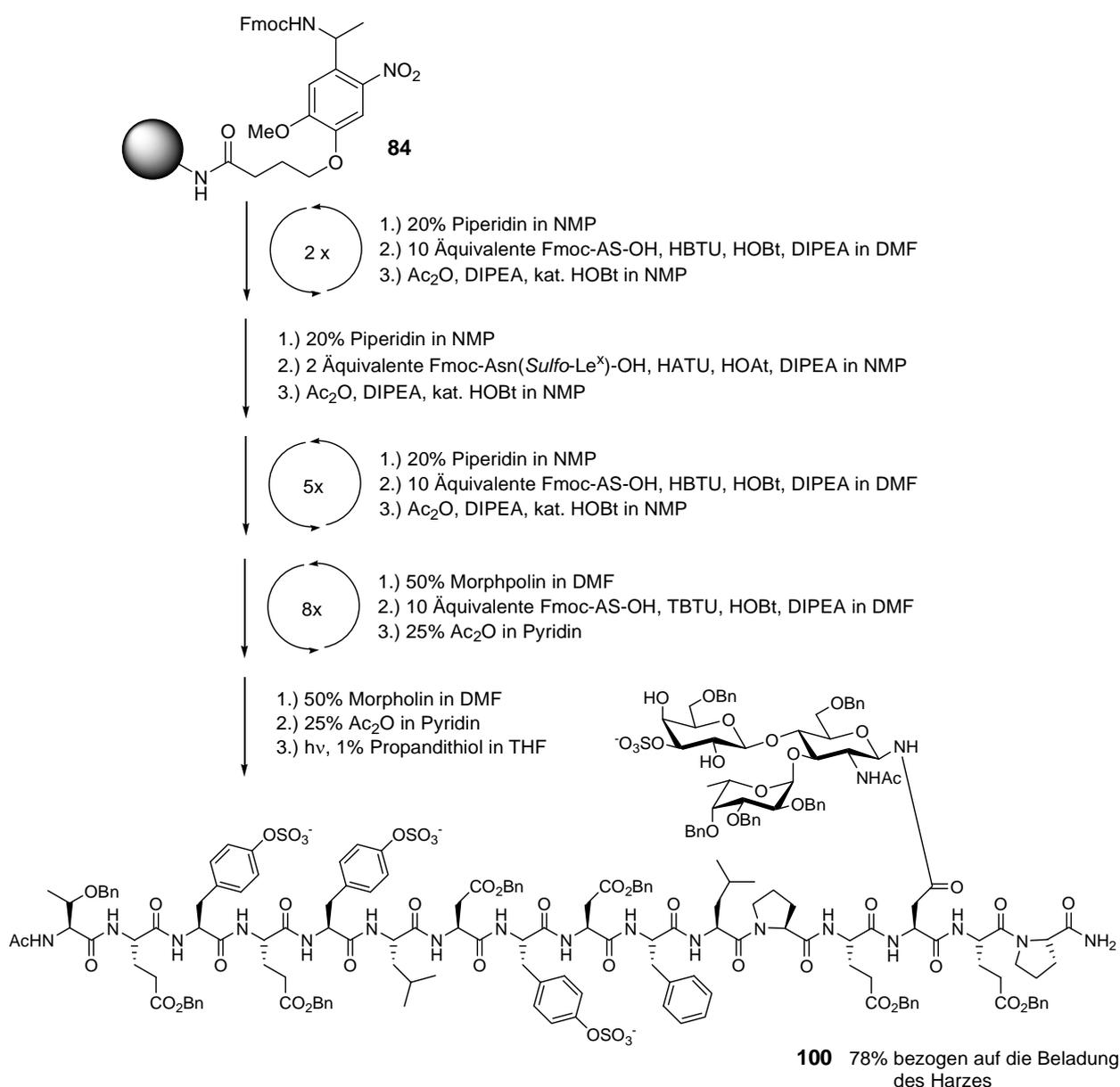


Abb.3.13.20: Reagenzien und Bedingungen zum Aufbau der vierfach sulfatierten Glycopeptidsequenz.

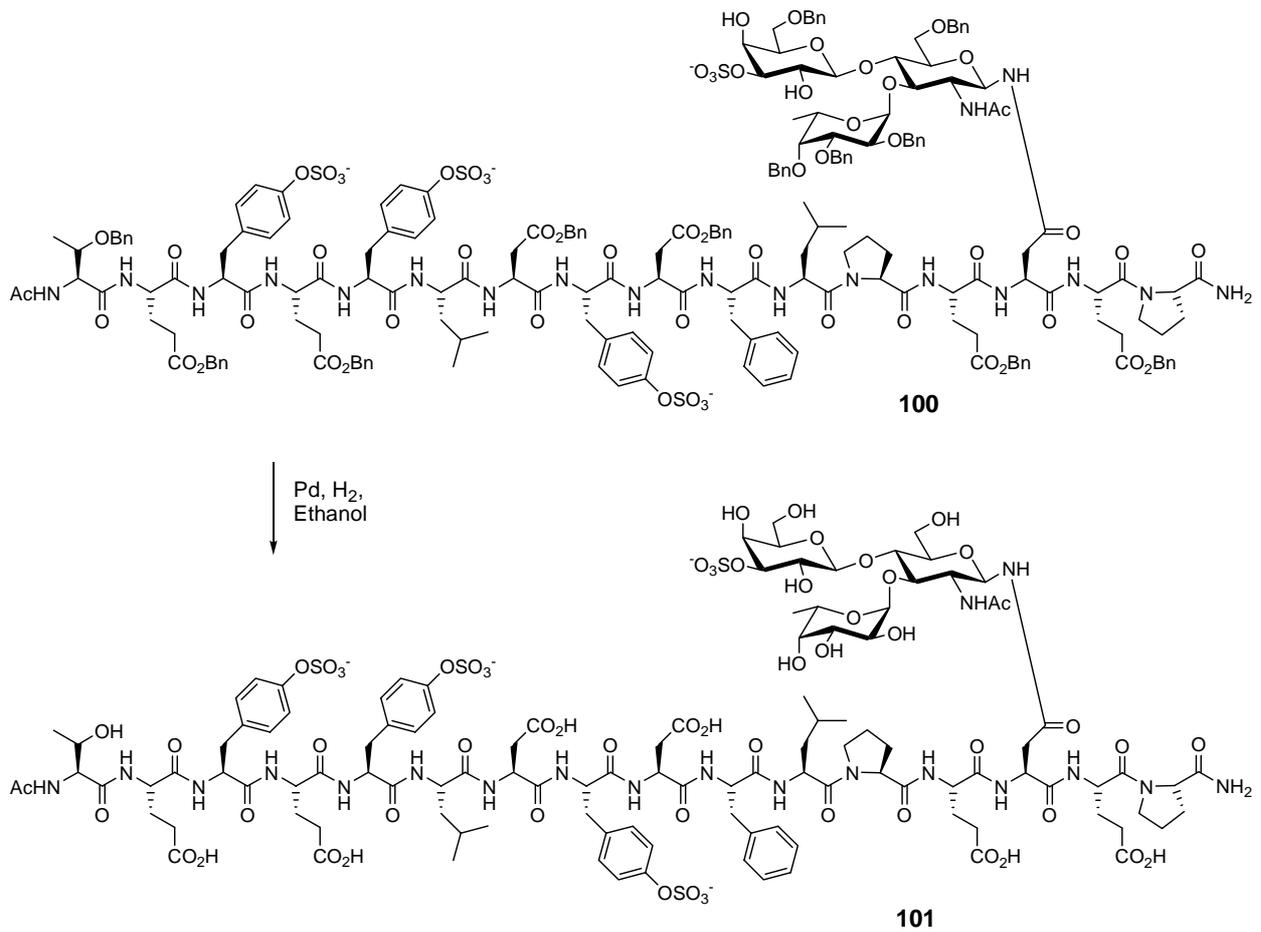
Nach dem erfolgten Aufbau der Peptidsequenz an der festen Phase wird die *N*-terminale Schutzgruppe entfernt und das freie Amin acetyliert. Die beim sequenziellen Aufbau des Glycopeptids angewendeten Bedingungen sind in Abb. 3.13.20 zusammengefasst.

Zur Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger wird das Harz mit 15 ml Tetrahydrofuran gequollen mit 1% Propandithiol als Abfangnukleophil versetzt und unter Bestrahlung mit einer 450W-Quecksilberdampf-Lampe geschüttelt. Nach drei Stunden wird filtriert nach Nachwaschen des Harzes mit Tetrahydrofuran wird das rohe Produkt als farbloses Öl in 78%iger Ausbeute erhalten.



Schema 3.13.21: Synthese des vierfach sulfatierten Glycopeptids **100**.

Das so erhaltene Rohprodukt wird anschließend an frisch hergestelltem Palladium(0) in Ethanol als Lösungsmittel hydriert. Nach einer Reaktionszeit von drei Tagen wird die Reaktion beendet.



Schema 3.13.22: Hydrogenolytische Entfernung der Benzylschutzgruppen zum vollständig deblockierten vierfach sulfatierten Glycopeptid **101**.

Die Kontrolle mit analytischer RP-HPLC zeigt das völlige Verschwinden des Edukt-Peaks ($R_t = 25.9$ min, Abb.3.13.23) und das Erscheinen eines neuen polareren Produkts bei $R_t = 11.2$ min, Abb. 3.13.24).

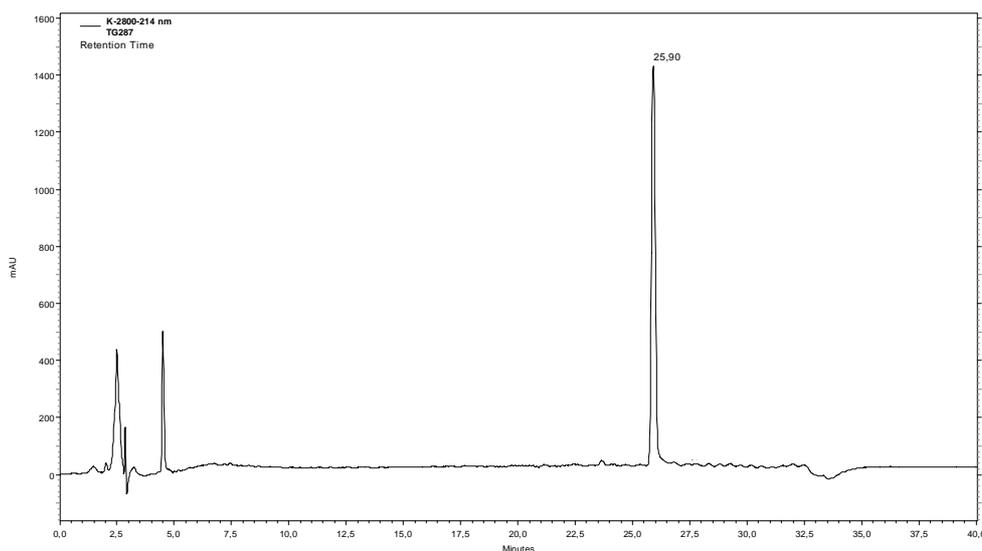


Abb.3.13.23: HPLC-Chromatogramm des benzylgeschützten vierfach sulfatierten Glycopeptids **100** (Säule A2, Grad A5).

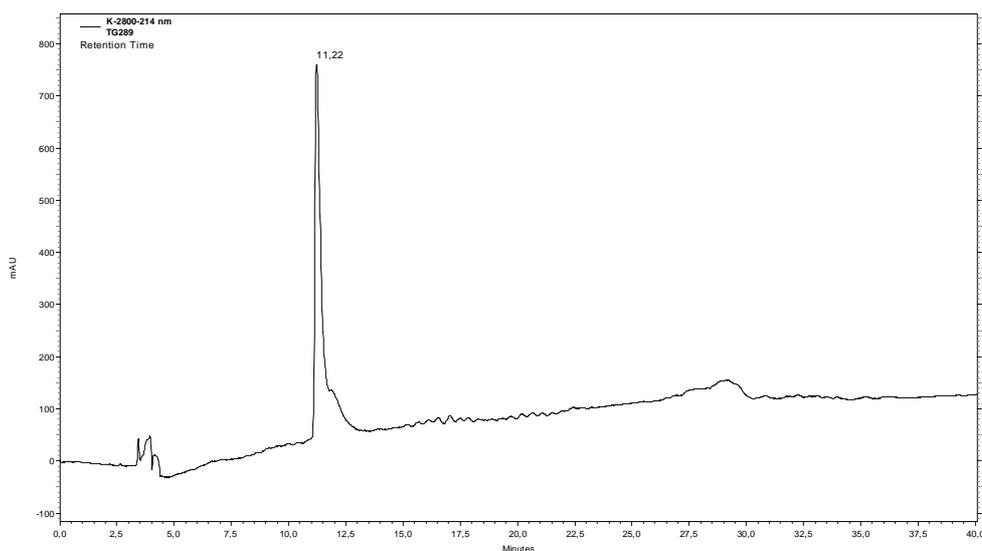


Abb.3.13.24: HPLC-Chromatogramm des vierfach sulfatierten Glycopeptids **101** (Säule A2, Grad A6).

Die Isolierung des Produkts der Hydrierung liefert jedoch ein verunreinigtes Gemisch, welches keine Charakterisierung mittel NMR-spektroskopische Methoden zulässt. Im MALDI-ToF-Massenspektrum lässt sich Verbindung **101** jedoch nachweisen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Selektine als Familie von Zelladhäsionsmolekülen, sind an zahlreichen biologischen Vorgängen beteiligt. So ermöglichen sie in der Initialphase eines Entzündungsprozesses die rollende Adhäsion von Leukozyten aus dem Blutstrom an die Gefäßwand am entzündeten Gewebe. Eine krankhafte Überexpression von Selektinen resultiert jedoch in zahlreichen chronischen Krankheiten, wie z. B. rheumatoider Arthritis, Erkrankungen der Herzkranzgefäße und dem Reperfusionssyndrom. Des Weiteren wird eine wesentliche Beteiligung der durch die Selektine vermittelten Zellkontakte an der Metastasierung von Krebszellen angenommen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese von kompetitiven Inhibitoren der selektinvermittelten Zelladhäsion auf der Basis von Sialyl-Lewis^x als Leitstruktur. Zur Steigerung der metabolischen Stabilität sollten im Sialyl-Lewis^x-Tetrasaccharid die labilen Fucose- und Sialinsäure-Komponenten durch Arabinose bzw. einen Sulfatrest ausgetauscht werden. (Vgl. Abb. 4.1) Beide sollten aufgrund der gleichen räumlichen Präsentation der pharmakophoren Gruppen (Hydroxygruppen der Fucose bzw. Carboxylgruppe der Neuraminsäure) vergleichbare Bindungscharakteristika aufweisen.

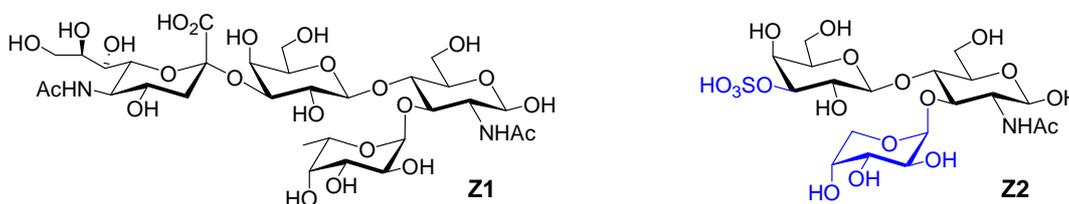


Abb. 4.1: Das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x (Z1) und das Mimetikum Z2

Da die Bindung der endogenen Selektin-Liganden jedoch nicht nur auf den beschriebenen Sacchariden (Sialyl-Lewis^x und Sialyl-Lewis^a), sondern auch auf der Struktur des Peptidrückgrats beruht, sollen die Lewis^x-Saccharide *N*-glycosidisch an eine Sequenz (Pro⁵⁹ - Thr⁴⁴) aus der für die Bindung essentiellen *N*-terminalen CR-Domäne des P-Selektin-Glycoprotein-Liganden 1 angebunden werden. Dazu wurden zunächst in parallelen Synthesen die vier Glycosylazide **46**, **47**, **52** und **53** dargestellt. Die Synthese erfolgte nach einer linearen Strategie. Zunächst wurde der Glucosamin-Baustein unter Verwendung des *in-situ*-Anomerisierungsverfahrens von Lemieux¹²⁴ in einer Variante von Ogawa¹²³ mit dem Fucose- bzw. Arabinose-Baustein glycosyliert. Die regioselektive Öffnung der

4,6-*O*-Benzylidenacetale gelingt in – im Hinblick auf die Säurelabilität der Substrate – in exzellenten Ausbeuten, und man erhält nach Glycosylierung mit dem Trichloracetimidat des Galactose-Bausteins nach *Schmidt*¹²⁹ die Lewis^x-Trisaccharide **37** und **38** in Ausbeuten von 68 bzw. 81%. Diese lassen sich nun entweder nach der Stannylene-Methode¹³⁶⁻¹⁴² regioselektiv in die 3-*O*-Sulfate **46** und **47** überführen (85 bzw. 90%) oder unter Ausnutzung des Nitrileffektes¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ mit dem von *Sinay* vorgestellten Neuraminsäureexanthogenat¹¹⁹ mit Methylsulfonyltriflat als Promotor stereo- und regioselektiv sialylieren (62 bzw. 68%).

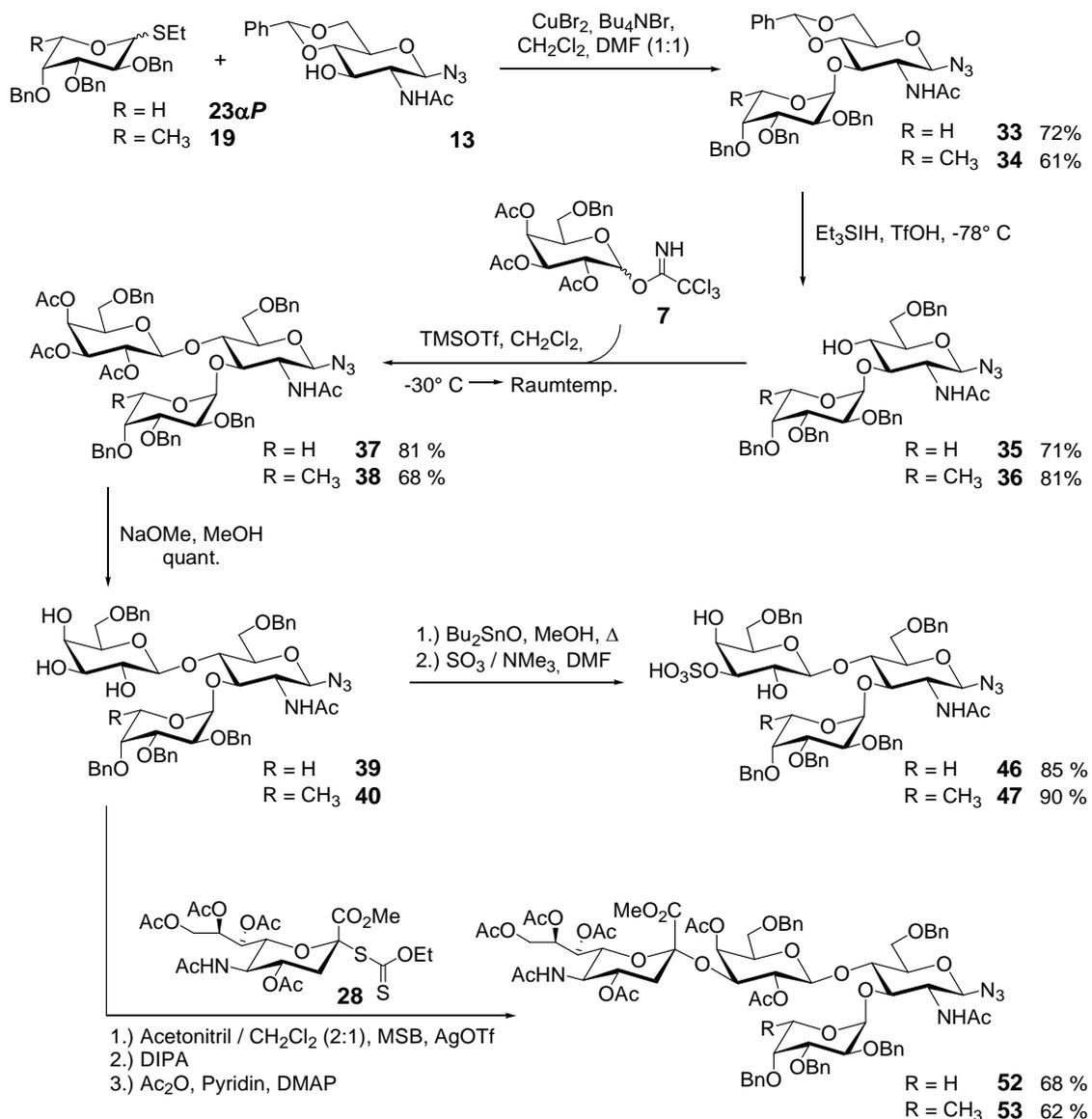


Abb. 4.2: Die Synthesen der Tetrasaccharide und Pseudo-Tetrasaccharide

Zur Synthese der glycosylierten Aminosäure-Bausteine für die Festphasenpeptidsynthese wurden die anomeren Azide zunächst mit neutral gewaschenem Raney-Nickel hydrogenolytisch quantitativ und unter vollständigem Erhalt der Benzylgruppen zu den

anomeren Aminen reduziert und diese direkt im Anschluss unter Verwendung der Kupplungsreagenzien TBTU und HOBt an Fmoc-Asparaginsäureallylester gekuppelt. Die Abspaltung des Allylesters am C-Terminus erfolgt durch Palladium(0)-katalysierten Allyltransfer auf *N*-Methylmorpholin als Abfangnukleophil. Die Glycosyl-aminosäurebausteine **67** und **68** werden in Ausbeuten von 51 bzw. 70% (jeweils über drei Stufen) erhalten.

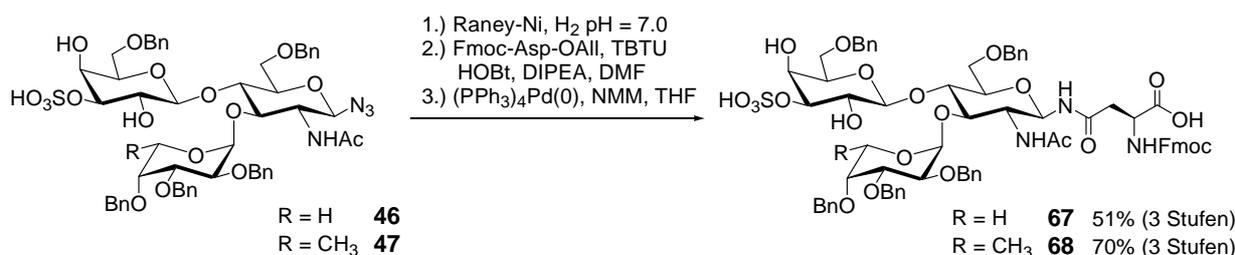


Abb. 4.3: Synthese der mit sulfatiertem Lewis^x glycosylierten Asparagin-Bausteine für die Festphasenglycopeptidsynthese

Die Synthese der sialylierten Glycosylaminosäuren wurde nur bis zur Stufe des vollständig orthogonal geschützten Bausteins durchgeführt.

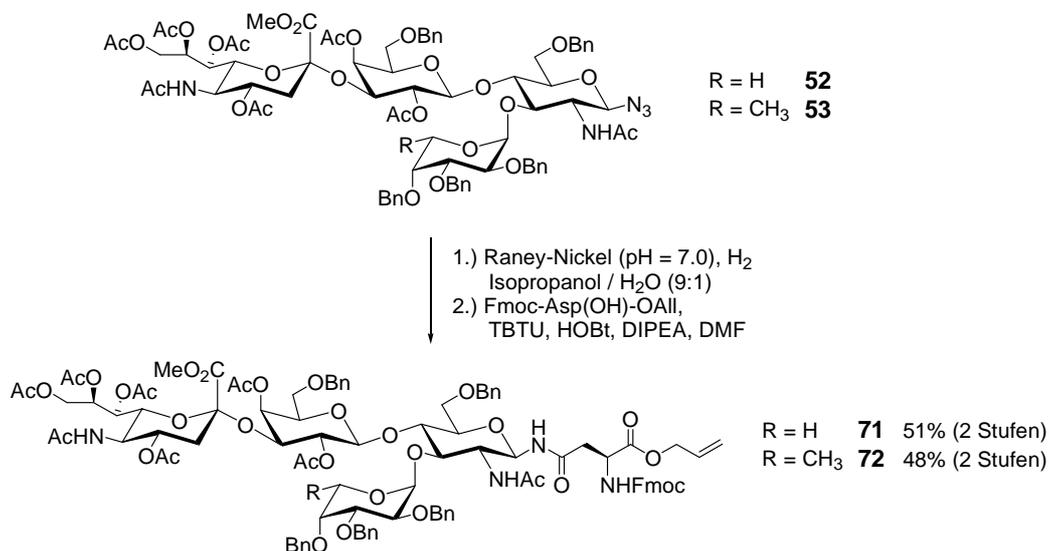


Abb. 4.4: Synthese der vollständig orthogonal geschützten, mit Sialyl-Lewis^x glycosylierten Asparagin-Bausteine **71** und **72**.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte nun eine Synthese von (Glyco-)Peptiden an der festen Phase unter Verwendung des UV-labilen Ankersystems **84** entwickelt werden. Dazu wurde zunächst das nichtglycosylierte Peptid-Rückgrat der Zielstruktur aufgebaut. Dieses

konnte im Anschluss an die automatisierte Festphasensynthese erfolgreich vom polymeren Träger abgespalten werden. Mehrstündiges Bestrahlen des Harzes mit einer starken UV-Lampe in Gegenwart eines geeigneten Abfangnukleophils liefert das noch vollständig mit Benzylgruppen blockierte Peptid **96**. Die verglichen mit Ankergruppen (Wang-Harze, PTMSE-Harze, etc.) geringe Ausbeute von 23% für diese Synthesesequenz begründet sich höchstwahrscheinlich in der geringen Eindringtiefe der UV-Strahlung in die Polymer-Kügelchen, was zur Folge hat, dass im Inneren der Poren befindliche Linkermoleküle nicht oder nur unzureichend intensiv bestrahlt werden. Ein weiterer Punkt ist hierbei, dass sowohl die als Schutzgruppen verwendeten Benzylether und -ester, als auch das Polystyrol selbst ebenfalls UV-Strahlung absorbieren und somit die Intensität weiter reduzieren.

Im Anschluss an die Abspaltung wird das erhaltene Peptid durch katalytische Hydrierung debenzyliert und das vollständig deblockierte Peptid **97** in 83% iger Ausbeute erhalten.

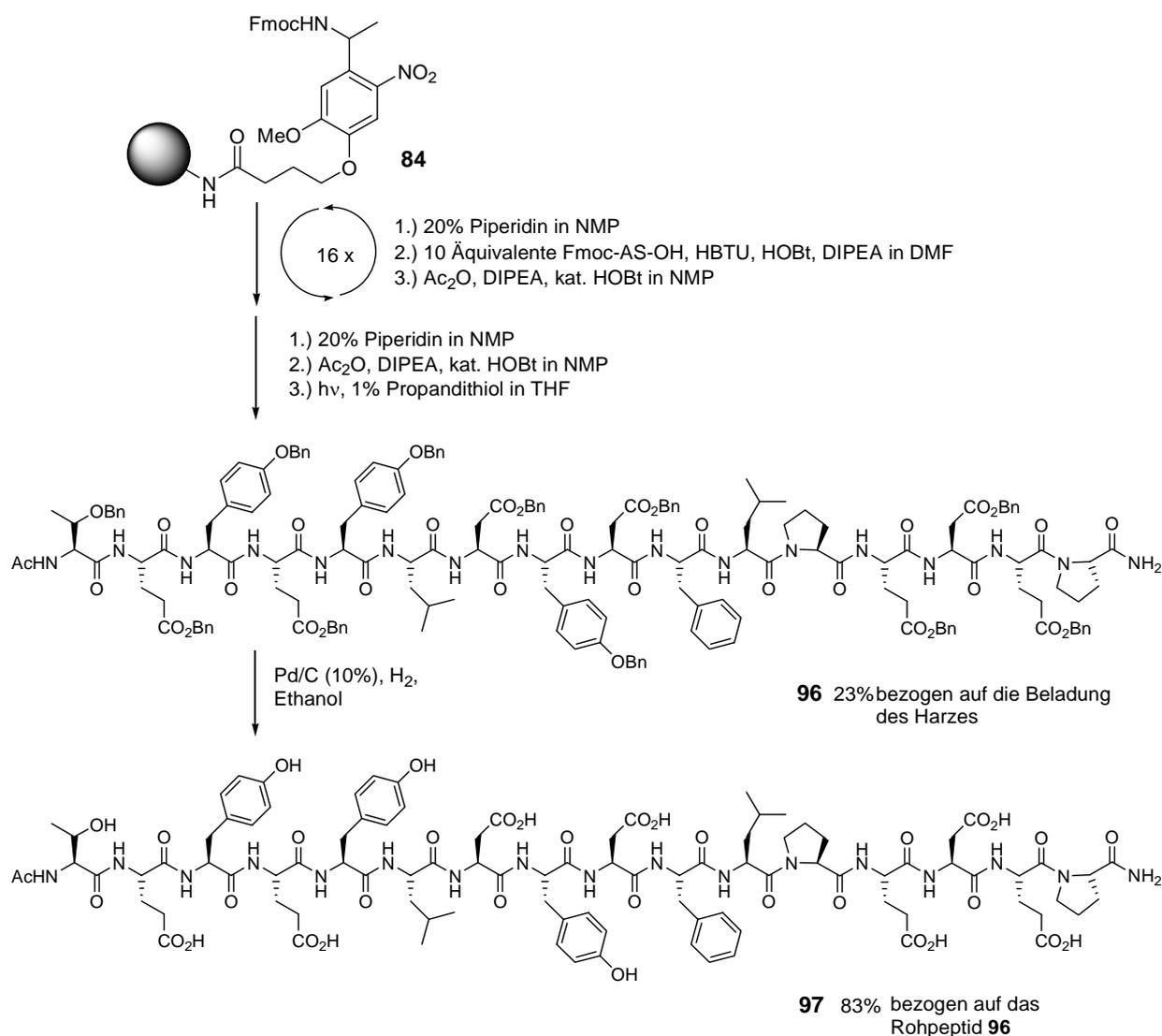


Abb. 4.5: Synthese des Peptids **97** unter Verwendung des neuen UV-labilen Ankersystems.

Die Synthese der mit dem sulfatierten Lewis^x-Derivat glycosylierten Peptids **98** gelang unter analogen Bedingungen und in vergleichbarer Ausbeute. Lediglich zur Kupplung des Glycosylaminosäurebausteins wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU und HOAt eingesetzt und die Reaktionszeit deutlich verlängert. Das vollständig benzylgeschützte Glycopeptid **98** konnte in 26%iger Ausbeute erhalten werden. Die Isolierung des Produkts der hydrogenolytischen Debenzylierung gelang jedoch nicht.

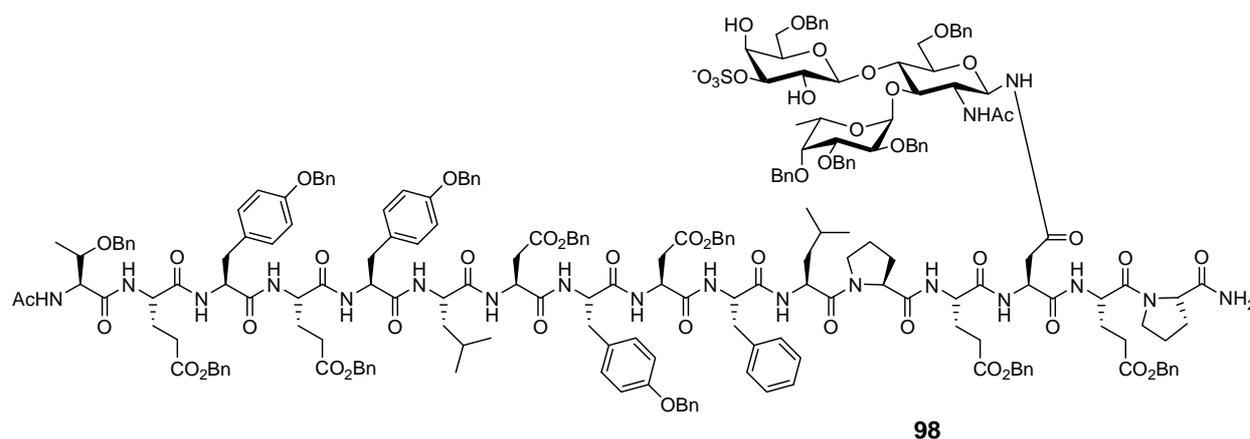


Abb. 4.6: Struktur des benzylgeschützten Glycopeptids **98**.

Zur Synthese des vierfach sulfatierten Glycopeptids **101** wurde nur der erste Teil der Synthese (Pro⁵⁹ - Asp⁵²) am Synthesizer durchgeführt. Wegen der geringen Löslichkeit des verwendeten Mononatriumsalzes des Fmoc-Tyrosin-*O*-sulfats **75** wurde die Tyrosine enthaltende Sequenz des Glycopeptids manuell in einem *Merrieffield*-Reaktor durchgeführt.

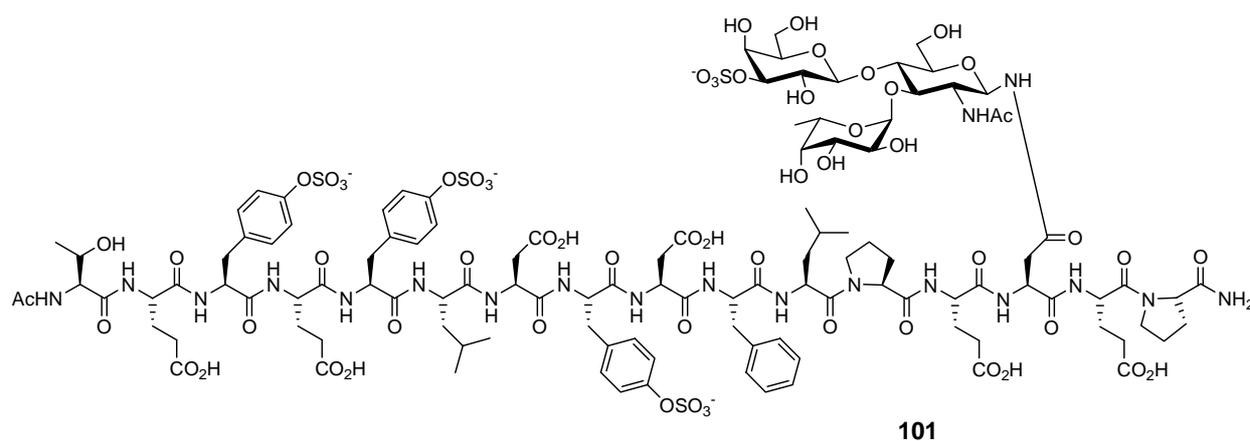


Abb. 4.6: Struktur des vierfach sulfatierten Glycopeptids **101**.

Die Reinigung des erhaltenen Rohprodukts durch semipräparative RP-HPLC gelang nicht, es wurden keine strukturbelegenden NMR-Spektren erhalten, das Produkt konnte jedoch MALDI-ToF-Massenspektrum nachgewiesen werden.

Es konnte im Rahmen der Arbeit ein Verfahren zur Festphasensynthese von komplexen Peptid- und Glycopeptidstrukturen unter Verwendung eines UV-labilen Ankersystems entwickelt werden, das es erlaubt die Abspaltung der dargestellten Produkte vom polymeren Träger unter extrem milden Bedingungen und unter Erhalt sämtlicher Schutzgruppen durchzuführen. Ein großes Problem stellt bei der hier vorgestellten Synthesestrategie der Einsatz der Benzylschutzgruppen dar. Die gleichzeitige Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen auf einer Peptidstruktur führt zu einer drastischen Änderung der Polarität und der Löslichkeitseigenschaften, was wiederum bei einer heterogenen Reaktion zu erheblichen Problemen bei der Isolierung und Charakterisierung der erhaltenen Produkte bzw. Produktgemische führt.

Bei der Wahl eines unter homogenen Bedingungen spaltbaren Schutzgruppenmusters stellt die hier vorgestellte Synthesestrategie einen vielversprechenden Zugang zu säurelabilen sulfatierten Glycopeptidstrukturen da.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

Sofern nicht anders verzeichnet, wurden alle Reaktionen bei Raumtemperatur und unter Rühren durchgeführt. Alle Destillationen mit dem Zusatz i. Vak. bzw. i. Hochvak. fanden, wenn nicht anders vermerkt, bei einer Temperatur von 40 °C am Rotationsverdampfer statt.

Lösungsmittel:

Falls nicht anders vermerkt, wurden Lösungsmittel der Qualität p.a., *pro analysi*, von der Firma *Acros Organics*, Geel (Belgien) verwendet. Absolutes DMF (in Septenflaschen über Molekularsieb) wurde von der Firma *Fluka*, Buchs (Schweiz) bezogen. Alle übrigen Lösungsmittel wurden nach literaturbekannten Verfahren absolutiert^{200, 201, 202} und frisch destilliert eingesetzt. Dichlormethan, 1,2-Dichlorethan sowie Acetonitril wurden mit Calciumhydrid, Methanol mit Magnesium, THF mit Natrium getrocknet. Die Lösungsmittel für die Säulenchromatographie sowie für Flüssig-Flüssig-Extraktionen wurden durch Destillation gereinigt. Die Angabe der Zusammensetzung der Gemische für die Chromatographie versteht sich als Volumenverhältnis.

Optische Drehwerte:

Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem Polarimeter 241 der Firma *Perkin-Elmer*, Wellesley (USA) bei den intensiven Wellenlängen der Quecksilberdampfampe ($\lambda = 546$ nm und $\lambda = 578$ nm) aufgenommen und auf die Natrium-D-Linie ($\lambda = 589$ nm) extrapoliert. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur. Das verwendete Lösungsmittel sowie die Konzentration (in g/100 ml) sind bei den jeweiligen Werten vermerkt. Die Einheit des Drehwertes (deg · ml / g · dm) wird dagegen nicht mit angegeben.

Chromatographie:

Chromatographische Reinigungsoperationen erfolgten nach dem Verfahren der Flashchromatographie.²⁰³ Als stationäre Phase wurde Kieselgel (Partikelgröße 40 - 75 μ m)

²⁰⁰ D.D. Perrin, E. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed., Pergamon Press, Oxford, **1988**.

²⁰¹ J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Praxis der Organischen Chemie*, VCH, Weinheim, **1996**.

²⁰² L. Paquette, *Dictionary of Organic Reagents*, Wiley, **1995**.

²⁰³ W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 2923.

der Firma *Acros Organics*, verwendet. Dünnschichtchromatographie zur Reaktionskontrolle wurde mit kieselgelbeschichteten Aluminiumfertigplatten der Firma *Merck*, Darmstadt (Deutschland) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm sowie den folgenden Anfärbereagenzien:

- Seebach-Reagenz: 1.0 g Cer(IV)-sulfat-Tetrahydrat, 2.5 g Molybdato-phosphorsäure, 4 ml konz. Schwefelsäure, 96 ml Wasser.
- „Zucker-Reagenz“: 1:1-Mischung aus 2N ethanolischer Schwefelsäure und 0.2%iger ethanolischer *p*-Methoxyphenol-Lösung.
- Kaliumpermanganat-Lösung: 2.0 g Kaliumpermanganat, 5.5 g Natriumcarbonat, 250 ml Wasser.
- Ninhydrin-Reagenz: 1.5 g Ninhydrin, 15 ml Essigsäure, 15 ml Methanol

Die DC-Platten wurden dazu in die jeweilige Lösung eingetaucht und unter Wärmeeinwirkung entwickelt.

Bei der analytischen RP-HPLC wurde mit einer Maxi-Star K-1001 Niederdruckgradientenpumpe der Firma *Knauer*, Berlin (Deutschland) einem *Knauer* DAD K2800 Diodenarraydetektor unter Verwendung der Software *ChromGate* gearbeitet. Die Detektion erfolgte im Wellenlängenbereich von 200 bis 500 nm. Es wurden folgende Säulentypen eingesetzt:

- Säule A1: *Phenomenex* Luna 5 μ C₁₈(2), 250 x 4.6 mm, Torrance (USA, in Deutschland: Aschaffenburg)
- Säule A2: *Phenomenex* Jupiter 300A 5 μ C₁₈, 250 x 4.6 mm

Als Laufmittel dienten Gemische aus Wasser und Acetonitril. Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch ca. eine halbe Stunde im Ultraschallbad entgast. Acetonitril „HPLC-Grade“ wurde von der Firma *Fisher Scientific*, Hampton (USA, in Deutschland: Schwerte) bezogen, das Wasser wurde einem Simplicity-185-Wasseraufbereitungssystem der Firma *Millipore*, Billerica (USA) entnommen. Sofern vermerkt wurde den Gemischen 0.1% Trifluoressigsäure zugesetzt. Es wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min und den folgenden Gradienten gearbeitet.

Gradient A1:

Zeit [min]	0	40	60
H ₂ O [%]	95	0	0
CH ₃ CN [%]	5	100	100

Gradient A2: (enthält 0.1% TFA)

Zeit [min]	0	5	20	40	45	60
H ₂ O [%]	80	80	50	20	0	0
CH ₃ CN [%]	20	20	50	80	100	100

Gradient A3:

Zeit [min]	0	40	60	80
H₂O [%]	70	30	0	0
CH₃CN [%]	30	70	100	100

Gradient A4:

Zeit [min]	0	30	50
H₂O [%]	20	0	0
CH₃CN [%]	80	100	100

Gradient A5: (enthält 0.1% TFA)

Zeit [min]	0	30	50
H₂O [%]	50	0	0
CH₃CN [%]	50	100	100

Gradient A6: (enthält 0.1% TFA)

Zeit [min]	0	40	60
H₂O [%]	95	0	0
CH₃CN [%]	5	100	100

Für semipräparative und präparative RP-HPLC-Trennungen wurden zwei MiniStar-K500-Gradientenpumpen zusammen mit einer präparativen Mischkammer und einem variablen Wellenlängendetektor der Firma *Knauer* eingesetzt. Die Detektion erfolgte bei $\lambda = 214$ nm. Die Flussrate betrug 10 bzw. 20 ml/min. Es wurden die folgenden Säulen und Gradienten benutzt:

- Säule S1: *Phenomenex* Jupiter 300A 5m, C₁₈, (250 x 21.2 mm)
- Säule P1: *Phenomenex* Luna 10 μ C₁₈(2) (250 x 50 mm)

Gradient S1:

Zeit [min]	0	60	80
H₂O [%]	95	0	0
CH₃CN [%]	5	100	100

Gradient P1:

Zeit [min]	0	80	100
H₂O [%]	95	0	0
CH₃CN [%]	5	100	100

Schmelzpunkte:

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit einer Apparatur nach Dr. *Tottoli* der Firma *Büchi*, Flawil (Schweiz). Die so ermittelten Werte wurden nicht korrigiert.

NMR-Spektroskopie:

Die Messung der Kernresonanz-Spektren erfolgte an den folgenden Geräten der Firma *Bruker*, Billerica (USA, in Deutschland: Ettlingen):

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

Die durchgeführten Experimente und das verwendete Lösungsmittel sind bei den einzelnen Verbindungen angegeben. Die Werte für die chemische Verschiebung δ beziehen sich auf das

Signal des deuterierten Lösungsmittels bei relativer Kalibrierung zu Tetramethylsilan (TMS) als Standard ($\delta = 0$ ppm). Bei zentrosymmetrischen Signalen wurde der Signalschwerpunkt, bei Multipletts der Resonanzbereich angegeben. Die Kopplungskonstanten J wurden jeweils über alle im jeweiligen Signal auftretenden Werte für die entsprechende Kopplung gemittelt. Die verwendeten deuterierten Lösungsmittel Chloroform- d , Dimethylsulfoxid- d_6 , Methanol- d_4 Acetonitril- d_3 sowie Deuteriumoxid wurden von der Firma *Deutero GmbH*, Kastellaun (Deutschland) bezogen.

Zur Kenntlichmachung der einzelnen Atome bei der Diskussion der Spektren dienen die folgenden Abkürzungen für die Kohlenhydratbausteine:

<i>D-Galactose</i>	Gal	<i>N-Acetyl-D-Glucosamin</i>	GlcNAc
<i>L-Fucose</i>	Fuc	<i>D-Arabinose</i>	Ara
<i>Sialinsäure</i>	Sia		

Die Nummerierung sowie die Benennung der Aminosäure-Bausteine folgt der Empfehlung nach IUPAC von 1963.²⁰⁴

Massenspektrometrie:

FD-Massenspektren wurden mit einem Finnigan-MAT-95-Spektrometer der Firma *ThermoElectron*, Boston (USA) aufgenommen.

Die Aufnahme der MALDI-ToF-Spektren erfolgte an einem Axima CFR-Gerät der Firma *Kratos Analytical*, Manchester (UK). Die jeweils verwendeten Matrices sind bei den Messwerten angegeben.

Zur Messung von ESI-Massenspektren kamen folgende Geräte zum Einsatz:

- *Gerät 1:* Navigator-Instrument der Firma *Thermo Elektron* (heute: *Thermo Fisher Scientific*), Waltham (USA). Die Proben wurden mit einer Konzentration von 0.1 mg/ml in Acetonitril angesetzt und durch einen Membranfilter filtriert. Die Messung wurde bei einer Flussrate von ca. 0.75 ml/min, einem Stickstoffstrom von ca. 300 l/h und einer Cone Voltage von 35 – 70 V durchgeführt. Die Probeninjektion erfolgte mit einem Basic Marathon Autosampler der Firma *Spark*, Emmen (Niederlande).
- *Gerät 2:* Micromass-Q-TOF-Ultima-3-Spektrometer der Firma *Waters*, Milford (USA). Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu oben. Die Flussrate betrug 5 μ l/min, die Cone Voltage 70 – 80 V.

²⁰⁴ International Union of Applied Chemistry and International Union of Applied Biochemistry, *Pure, Appl. Chem.*, **1984**, 56, 595.

Die bei den Summenformeln angegebenen Werte (M) berücksichtigen die natürliche Häufigkeit der beteiligten Isotope. Die bei den Massenspektren angegebenen Molmassen [M] beziehen sich hingegen auf die Massen der reinen Isotope ^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{23}Na , ^{35}Cl , ^{37}Cl , ^{39}K und ^{32}S . Mit +1 gekennzeichnete Massen bezeichnen Moleküle, die ein schwereres Isotop (i. d. R. ^{13}C) enthalten.

Hochaufgelöste ESI-Massenspektren (HR-ESI-MS) wurden an Gerät 2 gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit einer Lösung von 400 mg Natriumiodid und 10 mg Cäsiumiodid in 400 ml eines 1:1-Gemisches aus Wasser und Isopropanol. Die angegebenen berechneten und gemessenen Werte beziehen sich in diesem Falle auf die Neutrale Moleküle, da die Kalibrierung des Gerätes die Masse des Elektrons von 0.000549 u berücksichtigt.

Beladungsbestimmung:

Die Beladungsdichte des manuell beladenen AMPS-Harzes mit dem Photolinker erfolgte durch photometrische Bestimmung der Konzentration des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes nach der Fmoc-Abspaltung.²⁰⁵ Dazu wurden 20 mg des Harzes mit 18.07 g eines Gemisches aus *N,N*-Dimethylformamid und Piperidin (1:1) suspendiert und 50 Minuten geschüttelt. Nach erfolgter Abspaltung wird 1 g der überstehenden Lösung entnommen und mit der DMF-Piperidin-Mischung auf 10 ml aufgefüllt. Die Messung der charakteristischen UV-Absorption der Probe bei $\lambda = 278$ nm erfolgte an einem Lambda-17 UV-Spektrometer der Firma *Perkin-Elmer*. Die Fmoc-Konzentration auf dem Harz berechnet sich gemäß der nachstehenden Formel:

$$c \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{\text{Extinktion} \times 10^4}{10417}$$

Festphasensynthesen:

Die automatisierten Festphasen-Peptidsynthesen wurden mit einem ABI-433A-Peptidensynthesizer der Firma *Applied Biosystems*, Foster City (USA, in Deutschland: Weiterstadt) durchgeführt. Zur Kontrolle der Fmoc-Abspaltung wurde ein Series-200-UV/VIS-Detektor der Firma *Perkin Elmer* eingesetzt. Die verwendeten Fmoc-geschützten Aminosäuren lieferten die Firmen *novabiochem*, Läuelfingen (Schweiz), *Iris Biotech*, Marktdrewitz (Deutschland) und *Orpegen Pharma*, Heidelberg (Deutschland). *N*-Methylpyrrolidin-2-on wurde bei *SDS*, Peypin (Frankreich), *N,N*-Dimethylformamid bei *Roth*, Karlsruhe (Deutschland) erworben. Als polymerer Träger kam mit dem Photolinker

²⁰⁵ *Advanced Chemical Handbook of Combinatorial & Solid Phase Synthesis*, 1998.

beladenes Aminomethylpolystyrol-Harz (1% DVB) der Firma *Fluka* zum Einsatz. Der Photolinker selbst wurde bei *Iris Biotech* bezogen.

UV-Bestrahlung:

Zur Spaltung des photolabilen Ankers wurde mit einer 450W-Mitteldruck-Quecksilberdampf-Lampe (679A36) der Firma *Hanovia*, Slough (UK) bestrahlt. Zur Ausblendung der kurzwelligeren Strahlung ($\lambda < 350$ nm) wurde ein Filter des Typs UB2 verwendet.

pH-Werte:

Zur pH-Kontrolle wurden die nicht blutenden Indikatorstäbchen *Acilit*[®] (pH 0-6.0), *Neutralit*[®] (pH 5.0-10.0) und *Alkalit*[®] (pH 7.5-14.0) sowie Universalindikatorstäbchen (pH 0-14) der Firma *Merck* verwendet. Bei Reaktionen in organischen Medien wurde das Indikatorstäbchen zunächst mit Wasser angefeuchtet und anschließend mit einem Tropfen der Lösung benetzt. Da auf eine Kalibrierung verzichtet wurde, ist die Angabe der pH-Werte nur für wässrige Lösungsmittel genau und dient bei organischen Medien lediglich der Reproduzierbarkeit.

Elementaranalysen:

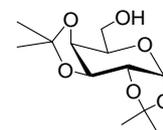
Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Labor des Instituts für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mit einem CHN-Gerät Vario EL der Firma *Elementar Analysensysteme GmbH* (früher: *Heraeus*), Hanau (Deutschland) durchgeführt.

5.2 Synthesen

5.2.1 Synthese des Galactose-Bausteins

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (2)¹⁰³

(α -1,2:3,4-iPrn₂-Gal)



30 g (167 mmol) D-Galactose und 67 g (420 mmol) wasserfreies Kupfersulfat werden in 500 ml Aceton suspendiert und nach Zugabe von 4 ml konz. Schwefelsäure 24 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Abfiltrieren des Kupfersulfats wird mit Calciumhydroxid

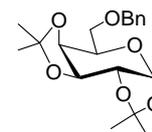
neutralisiert. Erneute Filtration über Hyflo[®] und Entfernen des Acetons i. Vak. liefert das rohe Produkt. Dieses ist ausreichend rein und wird ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Rohausbeute: 43.6 g (quant.) gelbes Öl, Lit.:¹⁰³ 76-92%, $R_f = 0.33$ (PE/EE = 1:1).

$C_{12}H_{20}O_6$ (260.3)

6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**3**)¹⁰⁴

(α -6-Bn-1,2:3,4-iPrn₂-Gal)



43.6 g (167 mmol) 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**2**) werden in 250 ml abs. DMF auf 0 °C gekühlt. Unter Argon gibt man portionsweise 13.2 g (217 mmol) einer 60%igen Dispersion von Natriumhydrid in Mineralöl zu und rührt 1 h bei Raumtemperatur. Es wird erneut auf 0 °C abgekühlt und 38.9 ml (217 mmol) Benzylbromid in 50 ml abs. DMF zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 10 ml Methanol zur Vernichtung von überschüssigem Hydrid wird das DMF i. Hochvak. entfernt. Anschließend nimmt man den Rückstand in 300 ml Dichlormethan auf, wäscht 3x mit je 100 ml Wasser, trocknet über Magnesiumsulfat und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Nach dreimaliger Kodestillation mit je 50 ml Toluol wird das Produkt durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (CH/EE = 5:1).

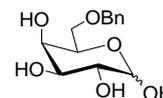
Ausbeute: 51.8 g (89 %) gelbes Öl, Lit.:¹⁰⁴ 84%, $[\alpha]_D = -61.9$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$), Lit.:²⁰⁶ $[\alpha]_D = -65^\circ \pm 0.5$ ($c = 2.679$, $CHCl_3$), $R_f = 0.34$ (CH/EE = 5:1).

¹H-NMR (300 MHz, in $CDCl_3$): δ (ppm) = 1.28 – 1.39 (4s, 12H, CH_3); 3.55 – 3.67 (m, 2H, H-6a, H6b); 3.93 – 3.98 (m, 1H, H-5); 4.20 – 4.47 (m, 2H, H-2, H-4); 4.51 – 4.59 (m, 3H, $\underline{CH_2}$ -Ph, H-3); 5.49 (d, 1H, ³J = 5.2 Hz, H-1); 7.20 – 7.25 (m, 5H, arom.).

¹³C-NMR (75.5 MHz, BB, in $CDCl_3$): δ (ppm) = 24.4, 24.9, 26.0, 26.1 (CH_3); 66.9 (C-6); 66.9 (C-5); 70.6, 70.7 (C-4, C-3); 71.2 (C-2); 73.3 ($\underline{CH_2}$ Ph); 96.4 (C-1); 108.5, 109.2 (C(CH_3)₂); 127.5, 127.7, 128.3 (C_{aromat.}); 138.3 (C_{aromat., ipso}).

$C_{19}H_{26}O_6$ (350.4)

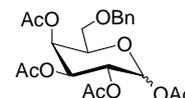
²⁰⁶ J. Stanek, A. Sele, R. Jaques, A. Rossi, *Helv. Chim. Acta*, **1972**, *55*, 434-446.

6-*O*-Benzyl- α,β -D-galactopyranose (4)¹⁰⁴ $(\alpha,\beta$ -6-Bn-Gal)

Man löst 51.8 g (147 mmol) 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranose (**3**) in 1100 ml 60%iger Essigsäure und rührt 4 h bei 70 – 80 °C. Anschließend werden Essigsäure und Wasser i. Vak. entfernt. Es wird so oft mit Toluol kodestilliert, bis kein Essigsäuregeruch mehr wahrnehmbar ist. Das rohe Produkt wird ohne weitere Reinigung und Charakterisierung umgesetzt.

Rohausbeute: 39.7 g (quant.) gelbes Öl, Lit.¹⁰⁴ 87% nach Chromatographie, $R_f = 0.20$ (EE/EtOH = 10:1).

$C_{13}H_{18}O_6$ (270.3)

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α,β -D-galactopyranose (5)¹⁰⁴ $(\alpha,\beta$ -Ac₄-6-Bn-Gal)

Zu einer Lösung von 72 g (266.4 mmol) roher 6-*O*-Benzyl- α,β -D-galactopyranose (**4**) und einer Spatelspitze *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) in 700 ml Pyridin tropft man bei 0 °C 300 ml Acetanhydrid hinzu und rührt den Ansatz weitere 4 h bei Raumtemperatur. Anschließend werden Pyridin und Essigsäureanhydrid i. Vak. entfernt und mehrmals mit Toluol kodestilliert. Die Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH/EE = 2:1).

Gesamtausbeute: 102 g (87%)

davon

α -Anomer: 15 g (13%) gelbes Öl, $[\alpha]_D = +64.0$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$), $R_f = 0.52$ (CH/EE = 2:1).

¹H-NMR (300 MHz, in $CDCl_3$): δ (ppm) = 1.97, 1.99, 2.01, 2.11 (4x s, 12H, CH_3 , Ac), 3.34 – 3.51 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.28 (t, 1H, ³ $J_{5,6} = 7.1$ Hz, H-5), 4.37, 4.51 (2x d, 2H, ² $J = 12.0$ Hz, CH_2Ph), 5.28 – 5.31 (m, 2H, H-2, H-4), 5.55 (s_b, 1H, H-3), 6.37 (d, 1H, ³ $J_{1,2} = 2.3$ Hz, H-1), 7.23 – 7.35 (m, 5H, arom.).

¹³C-NMR (75.5 MHz, BB, in $CDCl_3$): δ (ppm) = 20.4, 20.5, 20.7, 21.0 (CH_3 , Ac), 66.7, 67.3, 67.6, 70.0, 70.1 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), 73.4 (CH_2Ph), 90.0 (C-1), 127.9, 128.0, 128.6 ($C_{aromat.}$), 137.4 ($C_{aromat., ipso}$), 169.1, 169.8, 170.0 (C=O).

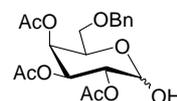
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 461.16 [M+Na]⁺, 477.15 [M+K]⁺, 899.37 [2M+Na]⁺.

α,β -Gemisch: 87 g (74%) gelbes Öl, R_f (β -Anomer) = 0.48 (CH/EE = 2:1).

C₂₁H₂₆O₁₀ (438.4)

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α,β -D-galactopyranose (**6**)

(α,β -Ac3-6-Bn-Gal)



Zu einer Lösung von 9.24 ml (136.8 mmol, 1.2 Äq.) Ethylendiamin in 200 ml THF tropft man langsam und unter externer Kühlung 9.12 ml (159.6 mmol, 1.4 Äq.) Essigsäure zu, wobei sich sofort ein farbloser Niederschlag bildet. Anschließend werden rasch 50 g (114 mmol) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α,β -D-galactopyranose (**5**) in 100 ml THF zugegeben und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 100 ml Wasser wird mit 200 ml Dichlormethan extrahiert, mit je 200 ml 2N Salzsäure, ges. NaHCO₃-Lsg. und Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Die Isolierung des reduzierenden Zuckers erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH/EE = 2:1). Das Produkt wird massenspektrometrisch untersucht und direkt zum Trichloracetimidat umgesetzt.

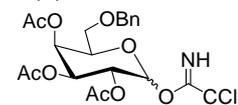
Ausbeute: 30 g (66%) gelbes Öl, R_f = 0.15 (CH/EE = 2:1).

ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 419.16 [M+Na]⁺, 435.15 [M+K]⁺, 815.35 [2M+Na]⁺.

C₁₉H₂₄O₉ (396.4)

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α,β -D-galactopyranosyl-trichloracetimidat (**7**)¹⁰⁷

(α,β -Ac3-6-Bn-Gal-TCI)



30 g (75.7 mmol) des deacetylierten Derivates **6** werden in 150 ml abs. Dichlormethan gelöst und unter Argon mit 37.8 ml Trichloracetonitril und 30 Tropfen 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt. Nach 2.5 h werden das Lösungsmittel und überschüssiges Trichloracetonitril i. Vak. entfernt und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH/EE/NEt₃ = 2:1:0.01) gereinigt.

Gesamtausbeute: 36 g (88%), Lit.:¹⁰⁷ 86%,

davon

α -Anomer: 5 g (12%) farbloser Feststoff, Schmp.: 128 °C, Lit.: 127° C, $[\alpha]_D = +77.4$ (c = 1.0, CHCl₃), Lit.:²⁰⁷ $[\alpha]_D = +75.6$ (c = 1.0, CHCl₃), $R_f = 0.52$ (CH/EE = 2:1).

¹H-NMR (300 MHz, in CDCl₃): δ (ppm) = 1.98, 2.00, 2.03 (3x s, 9H, CH₃, Ac), 3.40 – 3.55 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.34 – 4.40 (m, 2H, H-5, CH₂Ph), 4.51 (d, 1H, ²J = 12.2 Hz, CH₂Ph), 5.31 (dd, 1H, ³J_{2,1} = 3.4 Hz, ³J_{2,3} = 10.5 Hz, H-2), 5.40 (dd, 1H, ³J_{3,2} = 10.6 Hz, ³J_{3,4} = 3.0 Hz, H-3), 5.62 (dd, 1H, ³J_{4,3} = 2.9 Hz, ³J_{4,5} = 1.0 Hz, H-4), 6.55 (d, 1H, ³J_{1,2} = 3.3 Hz, H-1), 7.20 – 7.33 (m, 5H, arom.), 8.61 (s, 1H, C=NH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, BB, in CDCl₃): δ (ppm) = 20.6, 20.7 (CH₃, Ac), 67.1 (C-6), 67.2, 67.8, 67.9, 70.1 (C-2, C-3, C-4, C-5), 73.5 (CH₂Ph), 90.8 (CCl₃), 93.8 (C-1), 127.9, 128.0, 128.5 (C_{aromat.}), 137.5 (C_{aromat., ipso}), 161.1 (C=NH), 170.0, 170.1, 170.2 (C=O).

ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 562.12 [M+Na]⁺ (3x ³⁵Cl), 564.12 [M+Na]⁺ (2x ³⁵Cl + 1x ³⁷Cl), 566.12 [M+Na]⁺ (1x ³⁵Cl + 2x ³⁷Cl), 578.10 [M+K]⁺ (3x ³⁵Cl), 580.09 [M+K]⁺ (2x ³⁵Cl + 1x ³⁷Cl), 582.09 [M+K]⁺ (1x ³⁵Cl + 2x ³⁷Cl), 1103.24 [2M+Na]⁺ (5x ³⁵Cl + 1x ³⁷Cl).

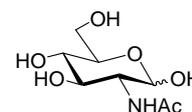
α,β -Gemisch: 31 g (76%) farbloser Feststoff.

C ₂₁ H ₂₄ Cl ₃ NO ₉ (540.8)	ber.:	C 46.64	H 4.47	N 2.59
	gef.:	C 46.63	H 4.55	N 2.50

5.2.2 Synthese des N-Acetylglucosamin-Bausteins

2-Acetamido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranose (9)¹⁰⁹

(α,β -GlcNAc)



Man suspendiert 93.4 g (433 mmol) D-Glucosamin-hydrochlorid in einer Lösung von 9.95 g (433 mmol) Natrium in 500 ml abs. Methanol und schüttelt den Ansatz kräftig für 5 Minuten. Anschließend wird rasch vom ausgefallenen Natriumchlorid abfiltriert, das Filtrat unter starkem Rühren und Kühlung mit Eiswasser mit 54.9 ml (585 mmol) Acetanhydrid versetzt und weitere drei Stunden bei Raumtemp. gerührt. Die Fällung des Produkts wird durch Kühlen auf 5 °C binnen 15 h vervollständigt. Der Niederschlag wird abgetrennt, mit eiskaltem Ethanol und eiskaltem Ether gewaschen und i. Hochvak. getrocknet.

²⁰⁷ G. Hummel, R. R. Schmidt, *Pol. J. Chem.*, **1999**, 73, 941-954.

Ausbeute: 89.8 g (94%) farblose Kristalle, Lit.:¹⁰⁹ quant., Schmp.: 200 °C (Zers.), Lit.:¹⁰⁹ 200-204 °C (208 °C nach Umkristallisation), $[\alpha]_D = +36.8$ (c = 1.0, H₂O), Lit.:¹⁰⁹ $[\alpha]_D = +40.5$ (c = 1.0, H₂O nach 24 h); $R_f = 0.66$ (MeOH).

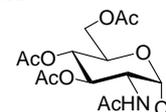
¹H-NMR (300 MHz, in DMSO-d₆): δ (ppm) = 1.82 (s, 3H, CH₃), 3.04 – 3.16 (m_c, 1H, H-5); 3.43 – 3.62 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, H-6a, H-6b), 4.46 (t, ³J = 5.5 Hz, 6-OH), 4.72, 4.92, 4.96, 6.40 (4x d, 4H, ³J = 4.4 Hz, ³J = 3.7 Hz, ³J = 5.3 Hz, ³J = 4.4 Hz, 1-OH, 3-OH, 4-OH, H-1), 7.62 (d, 1H, ³J_{NH,2} = 7.4 Hz, NH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, BB, in DMSO-d₆): δ (ppm) = 22.8 (CH₃), 54.4 (C-2), 61.2 (C-6), 70.6, 71.3, 72.1 (C-3, C-4, C-5), 90.7 (C-1), 169.5 (C=O).

C₈H₁₅NO₆ (221.2)

2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosylchlorid (10)^{110, 111}

(α -Ac₃-GlcNAc-Cl)



Man löst 89.8 g (406 mmol) α,β -GlcNAc (9) unter starkem Rühren in 220 ml Acetylchlorid. Das Reaktionsgemisch beginnt sofort zu sieden und wird nach Abklingen der Reaktion weitere 15 h bei Raumtemp. gerührt. Die Umsetzung zum anomeren Chlorid wird durch Zugabe von 10 ml konz. Salzsäure vervollständigt. Überschüssiges Acetylchlorid wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in 400 ml Dichlormethan aufgenommen und mit einer Mischung aus 500 ml 10%iger NaHCO₃-Lsg. und 500 g Eis hydrolysiert. Bis zu einem pH-Wert von ca. 8 gibt man weiteres festes NaHCO₃ hinzu, trennt die Phasen und extrahiert die wässrige Phase viermal mit je 100 ml Dichlormethan. Nach Trocknen über MgSO₄ wird i. Vak. auf ca. 300 ml eingengt und der Rückstand über eine 4-5 cm dicke Schicht Kieselgel filtriert. Das so erhaltene rotbraune Öl wird durch Zugabe von 400 ml Diethylether kristallisiert, filtriert mit Diethylether gewaschen und i. Hochvak. getrocknet.

Ausbeute: 110.0 g (74%) farblose Kristalle, Lit.:¹¹¹ 67-69%, Schmp.: 125-128 °C (Zers.), Lit.:¹¹¹ 127-128 °C, $[\alpha]_D = +116.9$ (c = 1.0, CHCl₃), Lit.:²⁰⁸ $[\alpha]_D = +117.5$ (c = 1.0, CHCl₃); $R_f = 0.42$ (PE/EE = 1:3).

¹H-NMR (300 MHz, in CDCl₃): δ (ppm) = 1.97, 2.03, 2.04, 2.08 (4x s, 12 H, Ac), 4.02 – 4.25 (m, 3H, H-2, H-5, H-6a), 4.42 – 4.51 (m, 1H, H-6b), 5.14 – 5.29 (m, 2H, H-3, H-4), 6.14 (d, ³J_{1,2} = 3.7 Hz, H-1), 7.24 (s, 1H, NH).

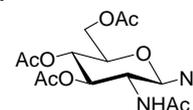
²⁰⁸ Y. Inouye, K. Onodera, S. Kitaoka, H. Ochiai, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 79, 4218-4222.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, BB, in CDCl_3): δ (ppm) = 20.5, 20.7, 20.8, 22.8 (CH_3), 53.2 (C-2), 60.9 (C-6), 67.0, 70.0, 71.1 (C-3, C-4, C-5), 93.8 (C-1), 168.9, 170.2, 170.4, 171.1 (C=O).

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_8\text{Cl}$ (365.8)

2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucoopyranosylazid (11)^{112, 114}

(β -Ac₃-GlcNAc-N₃)



Man löst 22.5 g (61.5 mmol) α -Ac₃-GlcNAc-Cl (**10**) in 60 ml Dichlormethan und gibt 8.0 g (123 mmol) Natriumazid in 30 ml Wasser hinzu. Nach Zugabe von 0.9 g (2.1 mmol) des Phasentransferkatalysators Aliquat[®] 336 (Tricaprylmethylammoniumchlorid) in 3 ml Dichlormethan wird der Ansatz 4 Tage so stark gerührt, dass es zu einer hinreichenden Durchmischung der beiden Phasen kommt. Anschließend trennt man die Phasen, extrahiert die wässrige Phase 2x mit je 50 ml Dichlormethan, wäscht die organischen Extrakte 3x mit je 50 ml NaHCO_3 -Lsg. und 1x mit 50 ml Wasser, trocknet über MgSO_4 und engt i. Vak. ein. Der Rückstand wird durch Zugabe von Diethylether zur Kristallisation gebracht.

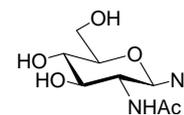
Ausbeute: 17.9 g (78%), farblose Kristalle, Lit.:¹¹² 86%, Schmp.: 168 °C (Zers.), Lit.:¹¹² 166-167 °C, $[\alpha]_{\text{D}} = -42.6$ (c = 1.0, CHCl_3), Lit.:¹¹⁴ $[\alpha]_{\text{D}} = -43$ (c = 1.0, CHCl_3), $R_f = 0.24$ (PE/EE = 1:3).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, in CDCl_3): δ (ppm) = 1.96, 2.03, 2.04, 2.07 (4x s, 12 H, Ac), 3.80 (mc, 1H, H-5), 3.93 (q, 1H, $^3J_{2,1} = ^3J_{2,3} = ^3J_{2,\text{NH}} = 9.5$ Hz, H-2), 4.13 (dd, 1H, $^2J = 12.0$ Hz, $^3J_{6b,5} = 2.4$ Hz, H-6b), 4.27 (dd, 1H, $^2J = 12.0$ Hz, $^3J_{6a,5} = 3.9$ Hz, H-6a), 4.28 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 8.9$ Hz, H-1), 5.04, 5.21 (2x t, 2H, $^3J = 9.1$ Hz, $^3J = 9.7$ Hz, H-3, H-4), 5.89 (sb, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, BB, in CDCl_3): δ (ppm) = 20.5, 20.8, 21.0, 22.9 (CH_3), 53.8 (C-2), 62.1 (C-6), 68.0, 70.9, 72.7 (C-3, C-4, C-5), 87.9 (C-1), 169.2, 170.3, 170.4, 171.8 (C=O).

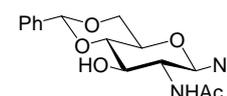
ESI-MS (Gerät 1, pos.): (m/z) = 330.17 $[\text{M-N}_3]^+$, 373.27 $[\text{M+H}]^+$, 395.22 $[\text{M+Na}]^+$, 412.20 $[\text{M+K}]^+$, 453.30 $[\text{M+K+CH}_3\text{CN}]^+$, 767.50 $[2\text{M+Na}]^+$, 784.54 $[2\text{M+K}]^+$.

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_8$ (372.3)

2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid (12)^{112, 114, 209} $(\beta$ -GlcNAc-N₃)

Man versetzt eine Lösung von 17.9 g (48 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl-azid (**11**) in 200 ml abs. Methanol mit einer Spatelspitze Natriummethanolat und rührt den Ansatz 3 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird mit saurem Ionenaustauscher Amberlyst 15 neutralisiert, vom Austauscherharz filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird durch Zugabe eines Gemisches von Methanol und Essigester (1:2) kristallisiert und der Niederschlag mit Essigester gewaschen.

Ausbeute: 11.8 g (quant.) farblose Kristalle, Lit.:¹¹⁴ 69%, Schmp.: 146 °C (Zers.), Lit.:²⁰⁹ 146-148 °C, $[\alpha]_D = -20.1$ (c = 1.0, H₂O), Lit.:¹¹⁴ $[\alpha]_D = -30$ (c = 1.0, H₂O), $R_f = 0.70$ (MeOH).
¹H-NMR (300 MHz, in DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 1.79 (s, 3H, CH₃), 3.01 – 3.52 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6b), 3.74 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, H-6a), 4.36 (d, ³J_{1,2} = 8.8 Hz, H-1), 4.71, 5.14 (2x s_b, 3H, 3-OH, 4-OH, 6-OH), 7.87 (d, 1H, ³J_{NH,2} = 9.1 Hz, NH).
¹³C-NMR (75.5 MHz, BB, in DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 23.1 (CH₃), 55.0 (C-2), 60.7 (C-6), 79.0, 74.0, 70.2 (C-3, C-4, C-5), 88.9 (C-1), 170.1 (C=O).

C₈H₁₄N₄O₅ (246.2)**2-Acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (13)**^{112, 116} $(\beta$ -4,6-Bzn-GlcNAc-N₃)

Man löst 11.8 g (48 mmol) 2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (**12**), 35.9 g (237 mmol) Benzaldehyddimethylacetal und 900 mg *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat in 200 ml abs. DMF und erwärmt bei ca. 20 mbar am Rotationsverdampfer auf 50 °C. Nach 3 h wird durch Zugabe von 0.6 ml Triethylamin neutralisiert, das Lösungsmittel sowie überschüssiges Benzaldehyddimethylacetal i. Hochvak. entfernt und 3x mit je 50 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird mit Methanol auf Kieselgel aufgezogen und durch Flashchromatographie (PE/EE = 1:1) gereinigt oder aus siedendem Methanol umkristallisiert.

²⁰⁹ K. Donsbach, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1996.

Ausbeute: 9.6 g (60%) farblose Kristalle, Lit.:¹¹⁶ 76%, Schmp.: 209 °C (Zers.), Lit.:¹¹⁶ 214-216 °C (Zers.), $[\alpha]_D = -98.1$ (c = 1.0, MeOH), Lit.:¹¹⁶ $[\alpha]_D = -101.3$ (c = 1.0, MeOH), $R_f = 0.22$ (EE).

¹H-NMR (300 MHz, in DMSO-d₆): δ (ppm) = 1.86 (s, 3H, CH₃, Ac), 3.50 – 3.80 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6b), 4.23 (dd, 1H, ²J = 8.6 Hz, ³J_{6a,5} = 4.1 Hz, H-6a), 4.60 (d, 1H, ³J_{1,2} = 8.5 Hz, H-1), 5.45 (d, 1H, ³J_{OH,3} = 4.8 Hz, OH), 5.63 (s, 1H, CH-Ph), 7.37 – 7.45 (m, 5H, arom.), 7.98 (d, 1H, ³J_{NH,2} = 8.1 Hz, NH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, BB, in DMSO-d₆): δ (ppm) = 23.0 (CH₃), 55.5 (C-2), 67.6, 68.2, 70.3 (C-3, C-5, C-6), 80.9 (C-4), 88.9 (C-1), 100.8 (CH-Ph), 126.5, 128.2, 129.0 (C_{aromat.}), 137.7 (C_{aromat., ipso}), 169.7 (C=O).

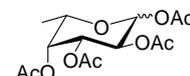
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 357.13 [M+Na]⁺, 691.28 [2M+Na]⁺.

C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₅ (334.3)	ber.:	C 53.89	H 5.43	N 16.76
	gef.:	C 53.88	H 5.53	N 16.73

5.2.3 Synthese des Fucose-Bausteins

1,2,3,4-Tetra-O-acetyl- α,β -L-fucopyranose (15)¹¹⁷

(α,β -Ac₄-Fuc)



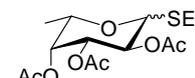
10.0 g (61 mmol) L-Fucose werden in 100 ml Pyridin gelöst und tropfenweise mit 200 ml Acetanhydrid versetzt. Man rührt bei Raumtemperatur 15 h und entfernt anschließend Pyridin und überschüssiges Essigsäureanhydrid im Hochvakuum. Nach mehrmaliger Kodestillation mit Toluol ist das Produkt für die weiteren Reaktionsschritte ausreichend rein.

Rohausbeute: 20.4 g (quant.) gelbes Öl; $R_f = 0.29$ (PE/EE = 2:1).

C₁₄H₂₀O₉ (332.3)

Ethyl-2,3,4-tri-O-acetyl-1-thio- α,β -L-fucopyranosid (16)¹¹⁷

(α,β -Ac₃-Fuc-SEt)



Man rührt 20.4 g (61 mmol) 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl- α,β -L-fucopyranose (15) und 8 g perlenförmiges Molekularsieb 4 Å in 400 ml abs. Dichlormethan 30 min unter Argon, kühlt

auf 0 °C ab und tropft nacheinander 5.6 ml (76 mmol) Ethanthiol und 20.4 ml (158 mmol) Bortrifluorid-Diethyletherat zu. Der Ansatz wird 15 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend das Molekularsieb über Hyflo[®] abfiltriert. Man gießt unter kräftigem Rühren auf eine Mischung aus 250 g Eis und 250 ml ges. NaHCO₃-Lsg. und versetzt so lange mit festem NaHCO₃, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Nach Trennung der Phasen wird die wässrige Phase 2x mit je 250 ml Dichlormethan extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Isolierung des Produktes erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (PE/EE = 5:1).

Gesamtausbeute: 17.7 g (87 % bezogen auf L-Fucose)

davon:

α-β-Gemisch: 15.0 g (74 %) gelbes Öl, R_f (α-Anomer) = 0.49.

β-Anomer: 2.7 g (13 %) farblose Kristalle, Schmp.: 80° C, $[\alpha]_D = +20.1$ (c = 1.0, MeOH), Lit.:¹¹⁷ $[\alpha]_D = +18.8$ (c = 1.0, MeOH), $R_f = 0.39$ (PE/EE = 2:1).

¹H-NMR (300 MHz, in CDCl₃): δ (ppm) = 1.12, (d, 3H, ³J_{6,5} = 6.6 Hz, H-6), 1.27 (t, ³J = 7.7 Hz, SCH₂CH₃), 2.00, 2.05, 2.16 (3s, 3x 3H, CH₃-Ac), 2.67 – 2.79 (m, 2H, SCH₂CH₃), 3.80 (q, 1H, ³J_{5,6} = 6.3 Hz, H-5), 4.44 (d, 1H, ³J_{1,2} = 9.6 Hz, H-1), 5.03 (dd, 1H, ³J_{3,2} = 3.6 Hz, ³J_{3,4} = 3.4 Hz, H-3), 5.26 – 5.27 (m, 1H, H-4), 5.19 (d, ³J_{2,1} = ³J_{2,3} = 9.7 Hz, H-2).

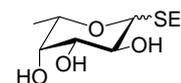
¹³C-NMR (75.5 MHz, BB, in CDCl₃): δ (ppm) = 14.7 (SCH₂CH₃), 16.4 (C-6), 20.6, 20.7, 20.8 (CH₃-Ac), 24.1 (SCH₂CH₃), 67.3 (C-5), 70.4, 72.3, 73.1 (C-2, C-3, C-4), 83.4 (C-1), 169.6, 170.1, 170.8 (C=O).

FD-MS: (m/z) = 334.7 [M]⁺, 273.6 [M-SEt]⁺, 669.6 [2M]⁺.

C ₁₄ H ₂₂ O ₇ S (334.4)	ber.:	C 50.29	H 6.63	S 9.59
	gef.:	C 50.27	H 6.64	S 9.46

Ethyl-1-thio-α,β-L-fucopyranose (17)¹¹⁷

(α,β-Fuc-SEt)



Man löst 17.7 g (52.9 mmol) Ethyl-2,3,4-tri-O-acetyl-1-thio-α,β-L-fucopyranosid (**16**) in 300 ml abs. Methanol, gibt unter Argon zwei Spatelspitzen Natriummethanolat zu, rührt 3 h bei Raumtemp. und neutralisiert anschließend mit saurem Ionenaustauscher Amberlyst 15. Es wird vom Austauscherharz filtriert, gründlich mit Methanol nachgewaschen und das

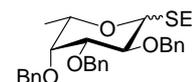
Lösungsmittel i.Vak. abdestilliert. Das rohe Produkt wird ohne weitere Reinigung und Charakterisierung weiter umgesetzt.

Rohausbeute: 11.1 g (quant.) bräunlicher amorpher Feststoff, $R_f = 0.21$ (EE).

$C_8H_{16}O_4S$ (208.3)

Ethyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-thio- α,β -L-fucopyranosid (**18**)¹¹⁷

(α,β -Bn₃-Fuc-SEt)



Man kühlt eine Lösung von 11.1 g (52.9 mmol) Ethyl-1-thio- α,β -L-fucopyranose (**17**) in 250 ml abs. DMF auf 0 °C ab und gibt unter Argon portionsweise 12.8 g (318 mmol) einer 60%igen Dispersion von Natriumhydrid in Mineralöl zu. Die Kühlung wird entfernt und die Reaktionsmischung 1 h bei Raumtemp. gerührt. Nach dem erneuten Abkühlen auf 0 °C tropft man 38 ml (318 mmol) Benzylbromid in 35 ml abs. DMF hinzu und rührt weitere 24 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird überschüssiges Natriumhydrid durch Zugabe von 20 ml Methanol vernichtet, DMF und Benzylbromid i. Hochvak. entfernt und mehrmals mit Toluol kodestilliert. Man nimmt den Rückstand in 400 ml Dichlormethan auf, wäscht 2x mit je 200 ml Wasser, trocknet über $MgSO_4$, entfernt das Lösungsmittel i. Vak. und reinigt das Produkt durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH/EE = 10:1).

Gesamtausbeute: 19.4 g (77%)

davon

α -Anomer: 3.1 g (12 %) farbloser amorpher Feststoff, Schmp.: 52 °C, $[\alpha]_D = -10$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$), $R_f = 0.49$ (CH/EE = 5:1).

1H -NMR (400 MHz, in $CDCl_3$): δ (ppm) = 1.22 (d, 3H, $^3J_{6,5} = 6.6$ Hz, H-6), 1.32 (t, 3H, $^3J = 7.4$ Hz, SCH_2CH_3), 2.69 – 2.85 (m, 1H, SCH_2CH_3), 3.50 (q, 1H, $^3J_{5,6} = 6.2$ Hz, H-5), 3.57 (dd, 1H, $^3J_{3,2} = 8.9$ Hz, $^3J_{3,4} = 2.7$ Hz, H-3), 3.64 (d, 1H, $^3J_{4,3} = 2.7$ Hz, H-4), 3.85 (t, 1H, $^3J_{2,1} = 3J_{2,3} = 9.4$ Hz, H-2), 4.42 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.8$ Hz, H-1), 4.72, 4.83, 4.92, 5.02 (4x d, 4H, $^2J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.78 (d, 2H, $^2J = 3.2$ Hz, CH_2Ph), 7.27 – 7.35 (m, 15H, arom.).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, BB, DEPT, HMQC, in $CDCl_3$): δ (ppm) = 15.0 (SCH_2CH_3), 17.3 (C-6), 24.7 (SCH_2CH_3), 72.8 (CH_2Ph), 74.5 (C-5, CH_2Ph), 75.7 (CH_2Ph), 76.5 (C-4), 78.4 (C-2), 84.5 (C-3), 85.0 (C-1), 127.6, 127.7, 128.2, 128.3, 128.4 ($C_{aromat.}$), 138.4, 138.5, 138.6 ($C_{aromat., ipso}$).

α,β -Gemisch: 16.3 g (65%) gelblicher amorpher Feststoff, R_f (β -Anomer) = 0.38 (CH/EE = 5:1)

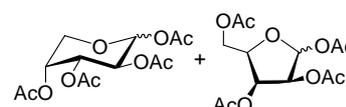
FD-MS: (m/z) = 479.1 [M]⁺, 958.3 [2M]⁺.

C ₂₉ H ₃₄ O ₄ S (478.6)	ber.:	C 72.77	H 7.16	S 6.70
	gef.:	C 72.71	H 7.15	S 6.59

5.2.4 Synthese des Arabinose-Bausteins

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl- α,β -D-arabinside (**20**)

(α,β -Ac₄-Ara)



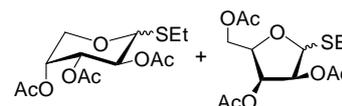
20.0 g (133 mmol) D-Arabinose werden in 300 ml Pyridin gelöst und tropfenweise mit 150 ml Acetanhydrid versetzt. Man rührt bei Raumtemperatur 15 h und entfernt anschließend Pyridin und überschüssiges Essigsäureanhydrid im Hochvakuum. Nach mehrmaliger Kodestillation mit Toluol ist das Produkt für die weiteren Reaktionsschritte ausreichend rein.

Ausbeute: 42 g (quant.) farbloses Öl, R_f = 0.34 (CH/EE = 2:1).

C₁₃H₁₈O₉ (318.3)

Ethyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-thio- α,β -D-arabinside (**21**)

(α,β -Ac₃-Ara-SEt)



Man löst 42 g (133 mmol) des Isomergemisches **20** und 14.7 ml (200 mmol) Ethanthiol in 400 ml abs. Dichlormethan und rührt für 30 min bei Raumtemp. über 8 g pulverförmigem Molekularsieb 4 Å. Nach Abkühlen auf 0 °C wird mit 41 ml (333 mmol) Bortrifluorid-Diethyletherat versetzt und weitere 15 h bei Raumtemp. gerührt. Man filtriert das Molekularsieb ab, gießt auf eine Mischung aus 300 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. und 300 g Eis, gibt bis zum Erliegen der Gasentwicklung weiteres festes NaHCO₃ zu, extrahiert 3x mit je 200 ml Dichlormethan. Nach Trocknen über MgSO₄ wird Dichlormethan i. Vak. entfernt, der Rückstand auf Kieselgel aufgezogen und mit CH/EE = 2:1 chromatographiert.

Gesamtausbeute: 18.4 g (44%)

davon:

α -Anomer: 2.4 g (6%) farbloses Öl, $[\alpha]_D = +4.6$ ($c = 1.0$, CHCl_3), $R_f = 0.44$ CH/EE = 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, in CDCl_3): δ (ppm) = 1.26 (t, 3H, $^3J = 7.4$ Hz, SCH_2CH_3), 2.02, 2.06, 2.11 (3x s, 9H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$), 2.59 – 2.76 (m, 2H, SCH_2CH_3), 3.65 (dd, 1H, $^2J = 12.9$ Hz, $^3J_{5,4} = 1.5$ Hz, H-5a), 4.08 (dd, 1H, $^2J = 12.9$ Hz, $^3J_{5,4} = 3.3$ Hz, H-5b), 4.50 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 8.5$ Hz, H-1), 5.05 (dd, 1H, $^3J_{3,2} = 8.8$ Hz, $^3J_{3,4} = 3.7$ Hz, H-3), 5.19 (t, $^3J_{2,1} \approx ^3J_{2,3} = 8.8$ Hz, H-2), 5.25 – 5.29 (m, 1H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, BB, in CDCl_3): δ (ppm) = 14.8 (SCH_2CH_3), 20.6, 20.8, 20.9 ($\text{CH}_3\text{-Ac}$), 24.5 (SCH_2CH_3), 66.1 (C-5), 67.9, 68.1, 70.8, 73.1 (C-2, C-3, C-4), 83.9 (C-1), 169.5, 170.0, 170.2 (C=O).

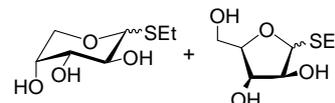
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 343.08 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 359.07 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 663.21 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

α,β -Gemisch: 16.0 g (38%) farbloses Öl, R_f (β -Anomer) = 0.36 CH/EE = 2:1).

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_7\text{S}$ (320.3)

Ethyl-1-thio- α,β -D-arabinoside (22)

(α,β -Ara-SEt)



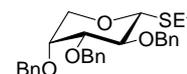
18.3 g (57 mmol) der Ethyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-thio- α,β -D-arabinoside (**21**) werden in 250 ml abs. Methanol gelöst und mit zwei Spatelspitzen Natriummethanolat versetzt. Nach 4 h Rühren bei Raumtemp. wird mit saurem Ionenaustauscher Amberlyst 15 neutralisiert, vom Harz filtriert und das Methanol i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wird ohne weitere Reinigung direkt weiter zum benzylierten Produkt umgesetzt.

Ausbeute: 11.1 g (quant.) farbloses Öl, $R_f = 0.10$ (EE).

$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_4\text{S}$ (194.3)

Ethyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-thio- α -D-arabinopyranosid (23 α P)

(α,β -Bn₃-Ara-SEt)



Eine Lösung von 6.8 g (35 mmol) Ethyl-1-thio- α,β -D-arabinopyranosid (**22**) in 200 ml abs. DMF wird auf 0 °C abgekühlt, portionsweise mit 8.3 g (210 mmol) einer 60%igen Dispersion von Natriumhydrid in Mineralöl versetzt und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Nach erneutem

Abkühlen auf 0 °C tropft man 25 ml (210 mmol) Benzylbromid in 25 ml abs. DMF zu und rührt weitere 15 h bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 15 ml Methanol wird das Lösungsmittel i. Hochvak. entfernt. Nach mehrmaliger Kodestillation mit Toluol wird der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH/EE = 10:1) gereinigt.

Gesamtausbeute: 20.5 g (77%)

davon:

α -Anomer: 11.8 g (45%) gelbes Öl, $[\alpha]_D = +20.6$ (c = 1.0, CHCl₃), $R_f = 0.53$ (CH/EE = 5:1).

¹H-NMR (300 MHz, in CDCl₃): δ (ppm) = 1.30 (t, 3H, ³J = 7.7 Hz, SCH₂CH₃), 2.60 – 2.80 (m_c, 2H, SCH₂CH₃), 3.54 (dd, 1H, ²J = 12.2 Hz, ³J_{5,4} = 2.2 Hz, H-5a), 3.60 (dd, 1H, ³J_{3,2} = 2.9 Hz, ³J_{3,4} = 6.8 Hz, H-3) 3.75 – 3.81 (m, 1H, H-2), 3.83 (d, 1H, ³J_{1,2} = 7.4 Hz, H-1), 4.17 (dd, 1H, ²J = 12.2 Hz, ³J_{5,4} = 4.8 Hz, H-5b), 4.56 – 4.59 (m, 1H, H-4) 4.60 (d, 2H, ²J = 13.2 Hz, CH₂Ph), 4.69 (d, 2H, ²J = 13.2 Hz, CH₂Ph), 4.78 (d, 2H, ²J = 11.0 Hz, CH₂Ph), 7.16 – 7.39 (m, 15H, arom.).

¹³C-NMR (75.5 MHz, BB, in CDCl₃): δ (ppm) = 15.1 (SCH₂CH₃), 25.3 (SCH₂CH₃), 63.9 (C-5), 71.0, 72.2, 73.4 (CH₂Ph), 74.6, 76.6, 77.0 (C-2, C-3, C-4), 84.6 (C-1), 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4 (C_{aromat.}), 137.6, 137.8, 138.1 (C_{aromat., ipso}).

Isomerengemisch (β -Pyranose-, α - und β -Furanose-Formen): 8.7 g (32 %).

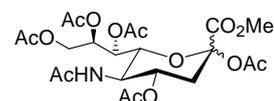
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 487.23 [M+Na]⁺, 503.21 [M+K]⁺, 951.49 [2M+Na]⁺.

C₂₈H₃₂O₄S (464.4)

5.2.5 Synthese des *N*-Acetylneuraminsäure-Bausteins

Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α , β -D-galacto-2-nonulopyranosid (26)^{120, 121, 122}

(α , β -Ac₅-Neu5AcCO₂Me)



Man suspendiert 8.8 g (28.5 mmol) *N*-Acetyl-D-neuraminsäure in 500 ml abs. Methanol, versetzt mit 5 g saurem Ionenaustauscher Dowex[®] 50WX8-200 und schüttelt den Ansatz 15 h bei Raumtemperatur. Nach dieser Zeit ist der quantitativ gebildete Methylester vollständig in Lösung gegangen. Es wird vom Harz filtriert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Den Rückstand löst man in 400 ml Pyridin und tropft langsam 200 ml Acetanhydrid hinzu. Nach 15 h Rühren bei Raumtemp. werden Pyridin und überschüssiges Acetanhydrid i. Hochvak.

entfernt und 3x mit je 100 ml Toluol kodestilliert. Flashchromatographische Reinigung an Kieselgel (CH/EE = 1:2) liefert reines β -Anomer sowie ein Anomerengemisch.

Gesamtausbeute: 14 g (92%), Lit.:¹²² 88%,

davon:

α,β -Gemisch: 12.6 g (83%) farbloser amorpher Feststoff, R_f (α -Anomer) = 0.34 (EE).

β -Anomer: 1.4 g (9%) farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D = -28.8$ (c = 1.0, CHCl₃), Lit.:¹²¹ $[\alpha]_D = -32$ (c = 1.0, CHCl₃), $R_f = 0.30$ (EE).

¹H-NMR (300 MHz, in CDCl₃): δ (ppm) = 1.86, 2.01, 2.03 (3x s, 12H, CH₃, Ac), 2.04 (m_c, 1H, H-3a), 2.10, 2.11 (2x s 6H, CH₃, Ac), 2.50 (dd, 1H, ²J = 13.9 Hz, ³J_{3,4} = 4.9 Hz, H-3b), 3.76 (s, 3H, COOCH₃), 4.05 - 4.11 (m, 3H, H-5, H-6, H-9a), 4.48 (dd, 1H, ²J = 12.2 Hz, ³J_{9,8} = 2.2 Hz, H-9b), 5.03 (m_c, 1H, H-8), 5.20 (m_c, 1H, H-4), 5.35 (d, 1H, ³J = H-7), 5.46 (d, 1H, ³J_{NH,5} = 9.5 Hz, NHAc).

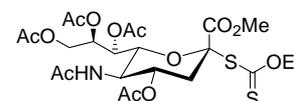
¹³C-NMR (75.5 MHz, BB, DEPT, in CDCl₃): δ (ppm) = 20.7, 20.8, 21.0, 23.2 (6x CH₃, Ac), 36.0 (C-3), 49.3 (C-5), 53.3 (COOCH₃), 62.0 (C-9), 67.7 (C-7), 68.3 (C-4), 71.3 (C-8), 72.8 (C-6), 97.6 (C-2), 166.4 (C-1), 168.2, 170.2, 170.3, 170.7, 171.0 (6x C=O).

ESI-MS (Gerät 1, pos.): (m/z) = 556.19 [M+Na]⁺, 572.10 [M+K]⁺.

C ₂₂ H ₃₁ NO ₁₄ (533.5)	ber.:	C 49.53	H 5.86	N 2.63
	gef.:	C 49.49	H 5.85	N 2.62

O-Ethyl-S-[methyl-(5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]dithiocarbonat (28)¹¹⁹

(α -Ac₄-Neu5AcCO₂Me-Xan)



Zu einer Lösung von 14 g (26.2 mmol) des peracetylierten Methylesters **26** in 100 ml abs. Dichlormethan tropft man bei 0 °C nacheinander 25.5 ml Acetylchlorid und 2.7 ml konz. HCl zu. Der Ansatz wird 2 Tage bei Raumtemp. gerührt, vom Lösungsmittel und überschüssigen Reagenzien befreit, 3x mit je 50 ml Toluol kodestilliert und das quantitativ erhaltene Neuraminsäurechlorid sofort roh weiter umgesetzt. Man löst in 120 ml trockenem Ethanol und gibt 6.4 g (39.3 mmol, 1.5 Äq.) Kaliummethylxanthogenat zu. Der Ansatz wird unter Lichtausschluss 15 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird Ethanol i. Vak. entfernt, der Rückstand in 250 ml Dichlormethan aufgenommen und 3x mit je 150 ml Wasser gewaschen.

Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Die Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}/\text{EE} = 1:2$). Das so gewonnene Produkt ist noch mit seinem Eliminierungsprodukt **30** verunreinigt dieses stört jedoch die nachfolgenden Sialylierungen nicht und daher wird nur ein kleiner Teil für NMR-Spektroskopie und Drehwertbestimmung mittels präparativer RP-HPLC ($R_t = 67$ min, Säule P1, Grad. P1) nochmals gereinigt. Durch Integration charakteristischer Peaks im ^1H -NMR-Spektrum des Gemisches wird das Verhältnis von Xanthogenat zu Eliminierungsprodukt zu 9.4 : 1 bestimmt.

Ausbeute: 10.6 g (68%, berechnet aus der Zusammensetzung des erhaltenen Gemisches) farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D = +84.3$ ($c = 1.0$, CHCl_3), Lit.:¹¹⁹ $[\alpha]_D = +86.7$ ($c = 1.0$, CHCl_3), Lit.:²¹⁰ $[\alpha]_D = +84.7$ ($c = 1.0$, CHCl_3), $R_f = 0.30$ (EE), $R_t = 25.5$ min (Säule A1, Grad. A1), sowie 0.9 g (7%) des Eliminierungsprodukts **30**.

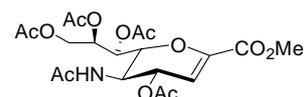
^1H -NMR (400 MHz, ^1H - ^1H -COSY, in CDCl_3): δ (ppm) = 1.36 (t, 3H, $^3J = 7.0$ Hz, CH_2CH_3), 1.88 (s, 3H, CH_3 , Ac), 2.00 (sb, 7H, H-3a, CH_3 , Ac), 2.09, 2.12 (2x s, 6H, CH_3 , Ac), 2.59 (dd, 1H, $^3J_{3,4} = 4.3$ Hz, $^2J = 13.0$ Hz, H-3b)*, 3.79 (s, 3H, COOCH_3), 4.00 (q, 1H, $^3J_{5,4} = ^3J_{5,6} = ^3J_{5,\text{NH}} = 10.0$ Hz, H-5), 4.17 (dd, 1H, $^3J_{9,8} = 5.6$ Hz, $^2J = 12.2$ Hz, H-9a), 4.30 (dd, 1H, $^3J_{9,8} = 2.8$ Hz, $^2J = 12.2$ Hz, H-9b), 4.50 (dq, 1H, $^3J = 7.2$ Hz, $^2J = 10.8$ Hz, CH_2aCH_3), 4.79 (dq, 1H, $^3J = 7.2$ Hz, $^2J = 10.7$ Hz, CH_2bCH_3), 4.86 (dt, 1H, $^3J_{4a,3} = 4.3$ Hz, $^3J_{4b,3} = ^3J_{4,5} = 10.4$ Hz, H-4), 5.24 - 5.31 (m, 2H, H-8 {5.26}, H-7 {5.30}), 5.45 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},5} = 10.0$ Hz, NHAc).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, BB, HMQC, in CDCl_3): δ (ppm) = 13.4 (CH_2CH_3), 20.7, 20.8, 20.9, 21.0, 23.1 (CH_3 , Ac), 37.2 (C-3), 49.2 (C-5), 53.4 (COOCH_3), 62.1 (C-9), 67.8 (C-7), 68.9 (C-4), 70.3 (C-8), 70.6 (CH_2CH_3), 75.2 (C-6), 86.6 (C-2), 168.6 (C-1), 170.0, 170.1, 170.2, 170.5, 170.8 (C=O), 207.3 (C=S).

ESI-MS (Gerät 1, pos.): (m/z) = 474.06 $[\text{M-Xan}]^+$, 618.01 $[\text{M+Na}]^+$, 634.04 $[\text{M+K}]^+$.

$\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{NO}_{13}\text{S}_2$ (595.6)	ber.:	C 46.38	H 5.58	N 2.35
	gef.:	C 46.42	H 5.60	N 2.44

Charakterisierung des Eliminierungsproduktes **30**:



^1H -NMR (300 MHz, in CDCl_3): δ (ppm) = 1.90, 2.01, 2.03, 2.05, 2.10 (5x s, 15H, CH_3 , Ac), 3.79 (s, 3H, COOCH_3), 4.16 (dd, 1H, $^3J_{9,8} = 7.2$ Hz, $^2J = 12.8$ Hz, H-9a), 4.35 – 4.41 (m, 2H,

²¹⁰ F. D. Trooper, F. O. Andersson, S. Cao, R. Roy, *J. Carbohydr. Chem.*, **1992**, *11*, 741-750.

H-5, H-6), 4.57 (dd, 1H, $^3J_{9,8} = 3.2$ Hz, $^2J = 12.7$ Hz, H-9b), 5.32 (m, 1H, H-8), 5.44 – 5.48 (m, 2H, H-4, H-7), 5.66 (sb, 1H, NHAc), 5.96 (d, 1H, $^3J_{3,4} = 3.3$ Hz, H-3)*.

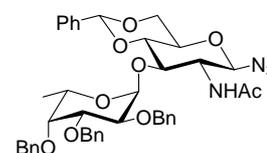
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/Z) = 496.17 [M+Na]⁺, 512.15 [M+K]⁺, 969.37 [2M+Na]⁺.

* Das Verhältnis der beiden Komponenten wurde durch Integration der beiden markierten Signale im ¹H-NMR-Spektrum des Gemisches bestimmt.

5.2.6 Synthese der Disaccharide

2-Acetamido-3-O-(2',3',4'-tri-O-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4,6-O-benzyliden-2-desoxy- β -D-glucopyranoyl-azid (34)

(β -3-(α -Bn₃-Fuc)-4,6-Bzn-GlcNAc-N₃)



10 g (20.85 mmol) des Fucosyl-Donors **18** und 5.4 g (16.02 mmol) des Akzeptors **13** werden in einem Gemisch aus 50 ml abs. DMF und 50 ml abs. Dichlormethan gelöst, 1 h bei Raumtemp. über 6 g pulverförmigem Molekularsieb 3 Å gerührt und anschließend mit 8.8 g (27.3 mmol) Tetrabutylammoniumbromid und 5 g (22.4 mmol) Kupfer(II)-bromid versetzt. Nach 19 h Rühren wird über Hyflo[®] filtriert, mit NaCl-Lsg. und 3x mit NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Man extrahiert die wässrigen Phasen mit Dichlormethan, trocknet die organischen Extrakte über MgSO₄ und engt i. Vak. ein. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH/EE = 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 9.6 g (61%) farblose Kristalle, Schmp.: 116.5 °C, $[\alpha]_D = -107.5$ (c = 1.0, CHCl₃), $R_f = 0.29$ (PE/EE = 2:1).

¹H-NMR (400 MHz, ¹H-¹H-COSY, in CDCl₃): δ (ppm) = 0.90 (d, 3H, $^3J_{6,5} = 6.3$ Hz, Fuc-6), 1.62 (s, 3H, NHAc), 3.52 (td, 1H, $^3J_{2,NH} = 7.4$ Hz, $^3J_{2,1} = ^3J_{2,3} = 9.4$ Hz, GlcNAc-2), 3.50 - 3.60 (m, 2H, GlcNAc-4, GlcNAc-5), 3.65 (d, 1H, $^3J_{4,3} = 2.3$ Hz, Fuc-4), 3.76 (t, 1H, $^2J_{6a,6b} = ^3J_{6a,5} = 9.6$ Hz, GlcNAc-6a), 3.90 (dd, 1H, $^3J_{3,4} = 2.6$ Hz, $^3J_{3,2} = 10.3$ Hz, Fuc-3), 4.06 – 4.12 (m, 2H, Fuc-5, Fuc-2), 4.16 (t, 1H, $^3J_{3,2} = ^3J_{3,4} = 9.4$ Hz, GlcNAc-3), 4.38 (dd, $^2J_{6b,6a} = 10.6$ Hz, $^3J_{6b,5} = 4.4$ Hz, GlcNAc-6b), 4.60 (t, 2H, $^2J = 11.4$ Hz, CH₂Ph), 4.69, 4.74 (2x d, 2H, $^2J = 11.7$ Hz, CH₂Ph), 4.85 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 8.8$ Hz, GlcNAc-1), 4.92, 4.94 (2x d, $^2J = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 5.08 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 3.7$ Hz, Fuc-1), 5.54 (s, 1H, CH-Bzn), 5.76 (d, 1H, $^3J_{NH,2} = 7.3$ Hz, NHAc), 7.25 – 7.35 (m, 20H, arom.).

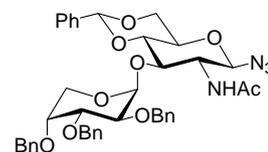
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, HMQC, in CDCl_3): δ (ppm) = 16.5 (Fuc-6), 23.2 (CH_3 , Ac), 57.1 (GlcNAc-2), 67.3 (Fuc-5), 68.5 (GlcNAc-6), 72.7 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 74.6 (CH_2Ph), 75.1 (CH_2Ph), 75.6 (GlcNAc-3), 77.4 (Fuc-2), 77.5 (Fuc-4), 80.0 (Fuc-3), 80.8 (GlcNAc-4), 88.5 (GlcNAc-1), 98.9 (Fuc-1), 101.6 (CH , Bzn), 127.4, 128.2, 128.3, 128.4, 128.6, 128.9, 129.1 ($\text{C}_{\text{aromat.}}$), 137.1, 138.4, 138.5, 138.6 ($\text{C}_{\text{aromat., ipso}}$), 171.1 (C=O).

ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 751.35 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 773.33 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 789.31 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 1524.69 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_9$ (750.8)	ber.:	C 67.19	H 6.18	N 7.46
	gef.:	C 66.98	H 6.09	N 7.32

2-Acetamido-3-*O*-(2',3',4'-tri-*O*-benzyl- β -D-arabinopyranosyl)-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (**33**)

(β -3-(α -Bn₃-Ara)-4,6-Bzn-GlcNAc-N₃)



11.8 g (25.4 mmol) des Arabinosyl-Donors **23aP** und 6.52 g (19.5 mmol) des Akzeptors **13** werden in einem Gemisch aus 60 ml abs. DMF und 60 ml abs. Dichlormethan gelöst, 1 h bei Raumtemp. über 7 g perlenförmigem Molekularsieb 3 Å gerührt und anschließend mit 10.4 g (32.2 mmol) Tetrabutylammoniumbromid und 5.9 g (26.6 mmol) Kupfer(II)-bromid versetzt. Nach 19 h Rühren wird über Hyflo[®] filtriert, mit NaCl-Lsg. und 3x mit NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Man reextrahiert die wässrigen Phasen mit Dichlormethan, trocknet die organischen Extrakte über MgSO₄ und engt i. Vak. ein. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH/EE = 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 10.6 g (72%) farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_{\text{D}} = -124.0$ ($c = 1.0$, CHCl_3), $R_f = 0.54$ (CH/EE = 1:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, in CDCl_3): δ (ppm) = 1.62 (s, 3H, NHAc), 3.52 (td, 1H, $^3J_{2, \text{NH}} = 7.4$ Hz, $^3J_{2, 1} = ^3J_{2, 3} = 9.4$ Hz, GlcNAc-2), 3.50 – 3.58 (m, 1H, GlcNAc-5), 3.59 – 3.63 (m, 1H, GlcNAc-4), 3.67 (dd, 1H, $^3J_{6, 5} = 4.3$ Hz, $^2J = 12.9$ Hz, GlcNAc-6a), 3.76 – 3.79 (m, 2H, Ara-4, Ara-5a), 3.82 – 3.88 (m, 2H, Ara-3, GlcNAc-6b), 4.07 – 4.13 (m, 2H, Ara-2, GlcNAc-3), 4.38 (dd, 1H, $^3J_{5, 4} = 4.7$ Hz, $^2J = 10.6$ Hz, Ara-5b), 4.53, 4.59 (2x d, 4H, $^2J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.66 (d, 1H, $^2J = 9.2$ Hz, CH_2Ph), 4.66 (d, 1H, $^3J_{1, 2} = 8.4$ Hz, GlcNAc-1), 4.95 (d, 1H, $^2J = 10.7$ Hz, CH_2Ph), 5.16 (d, 1H, $^3J_{1, 2} = 3.3$ Hz, Ara-1), 5.54 (s, 1H, CH-Bzn), 5.84 (d, 1H, $^3J_{\text{NH}, 2} = 7.0$ Hz, NHAc), 7.19 – 7.47 (m, 20H, arom.).

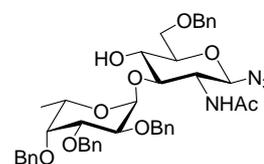
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, HMQC, in CDCl_3): δ (ppm) = 23.0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, Ac), 56.4 (GlcNAc-2), 61.1 (GlcNAc-6), 68.4 (Ara-5), 68.7 (GlcNAc-5), 71.7, 71.8 (2x CH_2Ph), 73.3 (Ara-4), 75.0 (CH_2Ph), 76.4 (GlcNAc-3), 77.7 (Ara-2), 78.1 (Ara-3), 80.8 (GlcNAc-4), 89.1 (GlcNAc-1), 98.9 (Ara-1), 101.0 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, Bzn), 125.9, 127.4, 127.7, 127.9, 128.2, 128.3, 128.4, 128.8, 128.9 ($\text{C}_{\text{aromat.}}$), 137.0, 138.0, 138.3 ($\text{C}_{\text{aromat., ipso}}$), 171.1 ($\text{C}=\text{O}$).

ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 759.41 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 775.39 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 1473.85 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 1495.84 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_9$ (736.8)

2-Acetamido-3-O-(2',3',4'-tri-O-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (36)

(β -3-(α -Bn₃-Fuc)-6-Bn-GlcNAc-N₃)



Man löst 16 g (21.3 mmol) des Disaccharids **34** in 500 ml abs. Dichlormethan und rührt den Ansatz mit 20 g perlenförmigem Molekularsieb 4 Å eine Stunde. Nach Abkühlen auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ tropft man nacheinander 5.16 ml (32 mmol, 1.5 Äq.) Triethylsilan und 2.78 ml (32 mmol, 1.5 Äq.) Trifluormethansulfonsäure zu. Nach 90 min gibt man jeweils 1.5 weitere Äquivalente Säure und Silan zu. Nach weiteren 30 min wird die Reaktion durch Zugabe von 26 ml Triethylamin und 50 ml Methanol abgebrochen und das Molekularsieb über Hyflo[®] abfiltriert. Man verdünnt mit 250 ml Chloroform und wäscht 3x mit je 300 ml NaHCO_3 -Lsg. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 wird i. Vak. eingeeengt und an Kieselgel chromatographiert (CH/EE = 1:1).

Ausbeute: 13.0 g (81%) farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_{\text{D}} = -68.4$ ($c = 1.0$, CHCl_3), $R_f = 0.35$ (CH/EE = 1:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, in CDCl_3): δ (ppm) = 1.17 (d, 3H, $^3J_{6,5} = 6.6$ Hz, Fuc-6), 1.59 (s, 3H, NHAc), 3.47 – 3.59 (m, 3H, GlcNAc-2, GlcNAc-3, GlcNAc-5), 3.61 – 3.67 (m, 2H, GlcNAc-4, Fuc-4), 3.74 (dd, 1H, $^2J_{6a,6b} = 12.0$ Hz, $^3J_{6a,5} = 4.4$ Hz, GlcNAc-6a), 4.38 (dd, $^2J_{6b,6a} = 10.7$ Hz, $^3J_{6b,5} = 1.7$ Hz, GlcNAc-6b), 3.89 (dd, 1H, $^3J_{3,4} = 2.2$ Hz, $^3J_{3,2} = 10.7$ Hz, Fuc-3), 4.05 – 4.15 (m, 2H, Fuc-5, Fuc-2), 4.62, 4.66 (2x d, 4H, $^2J = 9.4$ Hz, CH_2Ph), 4.74 – 4.79 (m, 3H, CH_2Ph), 4.85 (d, 1H, $^2J = 11.4$ Hz, CH_2Ph), 4.96 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 2.2$ Hz, Fuc-1), 4.98 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 5.8$ Hz, GlcNAc-1), 5.55 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},2} = 7.4$ Hz, NHAc), 7.25 – 7.45 (m, 20H, aromat.).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, in CDCl_3): δ (ppm) = 16.7 (Fuc-6), 20.9 (CH_3 , Ac), 55.0 (GlcNAc-2), 68.4 (Fuc-5), 69.0 (GlcNAc-6), 70.2 (GlcNAc-3), 72.9, 73.6, 74.5, 75.0 (CH_2Ph), 76.2 (Fuc-2), 77.2 (Fuc-4), 77.4 (GlcNAc-5), 79.1 (Fuc-3), 84.3 (GlcNAc-4), 88.2 (Fuc-1), 99.8 (GlcNAc-1), 127.5, 127.6, 127.7, 127.8, 128.2, 128.3, 128.5, 128.7 ($\text{C}_{\text{aromat.}}$), 138.1, 138.2 ($\text{C}_{\text{aromat., ipso}}$), 171.3 ($\text{C}=\text{O}$).

ESI-MS (Gerät 2, pos.): $(m/z) = 775.34 [\text{M}+\text{Na}]^+$, $1527.72 [2\text{M}+\text{Na}]^+$.

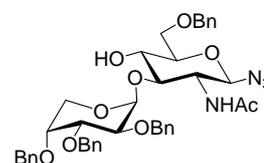
$\text{C}_{42}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_9$ (752.9)

ber.: C 67.01 H 6.43 N 7.44

gef.: C 66.89 H 6.41 N 7.37

2-Acetamido-3-O-(2',3',4'-tri-O-benzyl- β -D-arabinopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (35**)**

(β -3-(β -Bn₃-Ara)-6-Bn-GlcNAc-N₃)



Man löst 14.4 g (19.1 mmol) des Disaccharids **33** in 500 ml abs. Dichlormethan und rührt den Ansatz mit 20 g perlenförmigem Molekularsieb 4 Å eine Stunde. Nach Abkühlen auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ tropft man nacheinander 4.65 ml (28.8 mmol, 1.5 Äq.) Triethylsilan und 2.5 ml (28.8 mmol, 1.5 Äq.) Trifluormethansulfonsäure zu. Nach 90 min wird die Reaktion durch Zugabe von 15 ml Triethylamin und 30 ml Methanol abgebrochen und das Molekularsieb über Hyflo[®] abfiltriert. Man verdünnt mit 300 ml Chloroform und wäscht 3x mit je 250 ml NaHCO_3 -Lsg. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 wird i. Vak. eingengt und an Kieselgel chromatographiert (CH/EE = 1:1).

Ausbeute: 10.0 g (71%) farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_{\text{D}} = -72.8$ ($c = 1.0$, CHCl_3); $R_f = 0.32$ (CH/EE = 1:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, in CDCl_3): δ (ppm) = 1.65 (s, 3H, NHAc), 3.45 – 3.59 (m, 3H, GlcNAc-2 {3.46}, GlcNAc-4 {3.50}, GlcNAc-5 {3.53}), 3.69 – 3.76 (m, 3H, GlcNAc-3 {3.68}, GlcNAc-6a {3.71}, Ara-4 {3.73}), 3.78 – 3.88 (m, 4H, Ara-5a, Ara5b {3.79}, GlcNAc-6b {3.81}, Ara-3 {3.85}), 3.96 (dd, 1H, $^3J_{2,1} = 2.1$ Hz, $^3J_{2,3} = 8.2$ Hz, Ara-2), 4.06 (d, 1H, $^3J_{\text{OH},4} =$ GlcNAc-4-OH), 4.61 – 4.70 (m, 7H, CH_2Ph), 4.79 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.2$ Hz, GlcNAc-1), 4.86 (d, 1H, $^2J = 11.4$ Hz, CH_2Ph), 5.00 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 2.9$ Hz, Ara-1), 5.66 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},2} = 7.4$ Hz, NHAc), 7.21 – 7.29 (m, 20H, aromat.).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, in CDCl_3): δ (ppm) = 22.9 (CH_3 , Ac), 55.1 (GlcNAc-2), 62.0 (Ara-5), 69.2 (GlcNAc-6), 70.2 (GlcNAc-4), 72.0, 72.4 (2x CH_2Ph), 73.3 (Ara-3), 73.6, 74.5

(2x CH₂Ph), 76.3 (Ara-4), 77.5 (GlcNAc-5), 84.0 (GlcNAc-3), 88.1 (GlcNAc-1), 100.2 (Ara-1), 126.0, 127.6, 127.7, 127.8, 128.2, 128.3, 128.4, 128.6 (C_{aromat.}), 138.0, 138.1, 138.2 (C_{aromat., ipso}), 171.2 (C=O).

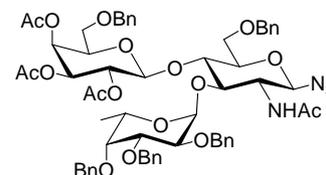
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 761.38 [M+Na]⁺, 777.35 [M+K]⁺, 1499.76 [2M+Na]⁺, 1515.73 [2M+K]⁺.

C ₄₁ H ₄₆ N ₄ O ₉ (738.8)	ber.:	C 66.65	H 6.28	N 7.58
	gef.:	C 66.64	H 6.34	N 7.56

5.2.7 Synthese der Lewis^X-Azide und Deacetylierung

2-Acetamido-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-α-L-fucopyranosyl)-4-O-(6-O-benzyl-2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl-azid (38)

(β-Ac₃-Bn₅-Le^X-N₃)



Man löst 13 g (17.3 mmol) des Akzeptors **36** und 16.8 g (31.1 mmol, 1.8 Äquiv.) des Trichloracetimidats **7** in 500 ml abs. Dichlormethan und rührt 1 h bei Raumtemp. über 13 g perlenförmigem Molekularsieb 4 Å. Nach Abkühlen auf -30 °C tropft man langsam 640 µl TMSOTf (in 20 ml abs. Dichlormethan) zu, erwärmt auf Raumtemp. und rührt den Ansatz weitere 6 h. Anschließend wird mit 0.52 ml Triethylamin neutralisiert, das Molekularsieb über Hyflo[®] abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach Waschen mit NaHCO₃- und NaCl-Lsg. wird über MgSO₄ getrocknet, i. Vak. eingengt und der Rückstand flashchromatographisch (CH/EE = 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 13.3 g (68%) farbloser amorpher Feststoff, [α]_D = -64.7 (c = 1.0, CHCl₃), R_f = 0.18 (CH/EE = 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, ¹H-¹H-COSY, in CDCl₃): δ (ppm) = 1.10 (d, 3H, ³J_{6,5} = 6.6 Hz, Fuc-6), 1.72, 1.85, 1.95, 1.98 (4x s, 12H, CH₃, Ac), 3.35 (t, 1H, ³J_{5,6a} = ³J_{5,6b} = 8.2 Hz, Gal-5), 3.42 – 3.58 (m, 5H, GlcNAc-2, GlcNAc-5, Fuc-4, Gal-6a, Gal-6b), 3.79 (d, 2H, ³J_{6a,5} = ³J_{6b,5} = 3.5 Hz, GlcNAc-6a, GlcNAc-6b), 3.83 (dd, 1H, ³J_{3,2} = 10.2 Hz, ³J_{3,4} = 3.8 Hz, Fuc-3), 3.93 (t, 1H, ³J_{3,4} = ³J_{4,5} = 7.4 Hz, GlcNAc-4), 4.07 – 4.12 (m, 2H, Fuc-2, GlcNAc-3), 4.22 – 4.29 (m, 1H, Fuc-5), 4.29 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.43 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.44 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.53 (d, 1H, ³J_{1,2} = 7.8 Hz, Gal-1), 4.62 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz,

CH₂Ph), 4.63 (d, 1H, ²J = 11.4 Hz, CH₂Ph), 4.65 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.66 (d, 1H, ²J = 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.70 (d, 1H, ²J = 11.8 Hz, CH₂Ph), 4.84 (dd, 1H, ³J_{3,2} = 10.4 Hz, ³J_{3,4} = 3.7 Hz, Gal-3), 4.85 (d, 1H, ²J = 11.8 Hz, CH₂Ph), 4.94 (d, 1H, ²J = 11.7 Hz, CH₂Ph), 4.98 (dd, 1H, ³J_{2,1} = 8.3 Hz, ³J_{2,3} = 10.6 Hz, Gal-2), 5.03 (d, 1H, ³J_{1,2} = 3.5 Hz, Fuc-1), 5.11 (d, 1H, ³J_{1,2} = 7.0 Hz, GlcNAc-1), 5.39 (d, 1H, ³J_{4,3} = 2.7 Hz, ³J_{4,5} << 1 Hz, Gal-4), 5.88 (d, 1H, ³J_{NH,2} = 7.4 Hz, NHAc), 7.15 – 7.38 (m, 25H, arom.).

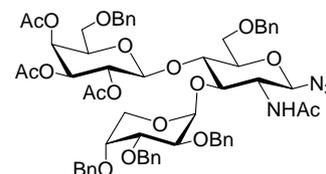
¹³C-NMR (100.6 MHz, BB, HMQC, in CDCl₃): δ (ppm) = 16.7 (Fuc-6), 20.5, 20.6, 20.7, 23.1 (4x CH₃, Ac), 55.1 (GlcNAc-2), 66.6 (Gal-6), 66.7 (Gal-5), 67.2 (Gal-4), 67.9 (GlcNAc-6), 69.0 (Gal-2), 70.8 (Gal-3), 71.7 (GlcNAc-5), 72.8, 73.3 (2x CH₂Ph), 73.4 (GlcNAc-3), 73.5 (CH₂Ph), 73.6 (Fuc-5), 73.8 (GlcNAc-4), 74.4 (CH₂Ph), 76.2 (Fuc-2), 77.1 (Fuc-4), 79.9 (Fuc-3), 87.4 (GlcNAc-1), 97.3 (Fuc-1), 99.5 (Gal-1), 127.6, 127.8, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6 (C_{aromat.}), 137.3, 137.6, 138.5, 138.6 (C_{aromat., ipso}), 169.3, 169.8, 169.9, 170.4 (C=O).

ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1153.45 [M+Na]⁺.

C ₆₁ H ₇₀ N ₄ O ₁₇ (1131.2)	ber.:	C 64.77	H 6.24	N 4.95
	gef.:	C 64.60	H 6.22	N 4.49

2-Acetamido-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-arabinopyranosyl)-4-O-(6-O-benzyl-2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl-azid (37)

(β-Ac₃-Bn₅-Ara-Le^x-N₃)



Es werden 10 g (13.5 mmol) des Akzeptors **35** und 13.2 g (24.3 mmol, 1.8 Äquiv.) des Trichloracetimidats **7** in 500 ml abs. Dichlormethan gelöst und 1 h bei Raumtemp. über 10 g perlenförmigem Molekularsieb 4 Å gerührt. Nach Abkühlen auf -30 °C tropft man langsam 500 µl TMSOTf (in 15 ml abs. Dichlormethan) zu, erwärmt auf Raumtemp. und rührt den Ansatz weitere 15 h. Anschließend wird mit 0.4 ml Triethylamin neutralisiert, das Molekularsieb über Hyflo[®] abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach Waschen mit NaHCO₃- und NaCl-Lsg. wird über MgSO₄ getrocknet, i. Vak. eingeeengt und der Rückstand flashchromatographisch (CH/EE = 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 12.2 g (81%) farbloser amorpher Feststoff, [α]_D = -90.3 (c = 1.0, CHCl₃), R_f = 0.27 (CH/EE = 1:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, in CDCl_3): δ (ppm) = 1.81, 1.90, 1.97, 2.02 (4x s, 12H, CH_3 , Ac), 3.37 (dd, 1H, $^3J_{6,5} = 7.6$ Hz, $^2J = 9.2$ Hz, Gal-6a), 3.49 (dd, 1H, $^3J_{6,5} = 5.8$ Hz, $^2J = 9.2$ Hz, Gal-6b), 3.61 (dd, 1H, $^3J_{5,4} = 3.0$ Hz, $^2J = 12.0$ Hz, Ara-5a), 3.62 – 3.68 (m, 3H, Gal-5 {3.65}, GlcNAc-5 {3.66}, Ara-4 {3.68}), 3.72 (m_c, 1H, GlcNAc-2), 3.76 – 3.80 (m, 3H, Ara-4 {3.79}, GlcNAc-6a {3.79}, GlcNAc-6b {3.79}), 3.83 (d, 1H, $^2J = 12.0$ Hz, Ara-5b), 3.98 – 4.05 (m, 3H, GlcNAc-4 {4.00}, GlcNAc-3 {4.01} Ara-2 {4.04}), 4.33 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.43 (d, 1H, $^2J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.48 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.53 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 8.2$ Hz, Gal-1), 4.55 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.56 (d, 1H, $^2J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.60 (d, 1H, $^2J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.62 (d, 1H, $^2J = 13.9$ Hz, CH_2Ph), 4.67 (d, 1H, $^2J = 12.5$ Hz, CH_2Ph), 4.71 (d, 1H, $^2J = 11.3$ Hz, CH_2Ph), 4.84 (d, 1H, $^2J = 11.4$ Hz, CH_2Ph), 4.89 – 4.95 (m, 2H, $^3J_{1,2} = 9.8$ Hz, GlcNAc-1, Gal-3), 5.06 (dd, 1H, $^3J_{2,1} = 8.0$ Hz, $^3J_{2,3} = 10.2$ Hz, Gal-2), 5.10 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 3.3$ Hz, Ara-1), 5.41 (dd, 1H, $^3J_{4,3} = 3.3$ Hz, $^3J_{4,5} = 0.8$ Hz, Gal-4), 6.18 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},2} = 8.8$ Hz, NHAc), 7.18 – 7.39 (m, 25H, arom.).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, HMQC, in CDCl_3): δ (ppm) = 20.5, 20.6, 20.8, 23.0 (4x CH_3 , Ac), 52.8 (GlcNAc-2), 60.8 (Ara-5), 66.8 (Gal-6), 67.3 (Gal-4), 68.4 (GlcNAc-6), 69.3 (Gal-2), 70.7 (Gal-3), 71.3 (CH_2Ph), 71.9 (Gal-5), 72.2 (CH_2Ph), 73.0 (GlcNAc-3), 73.4, 73.5 (2x CH_2Ph), 73.6 (Ara-4), 74.0 (CH_2Ph), 74.3 (GlcNAc-4), 76.0 (GlcNAc-5), 76.7 (Ara-2), 77.2 (Ara-3), 87.9 (GlcNAc-1), 97.9 (Ara-1), 99.2 (Gal-1), 127.4, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.4, 128.5 ($\text{C}_{\text{aromat.}}$), 137.4, 137.7, 138.3, 138.4, 138.5 ($\text{C}_{\text{aromat., ipso}}$), 169.8, 170.4 (C=O).

ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1117.53 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1139.50 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1155.48 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

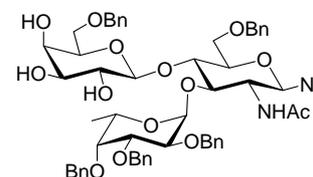
$\text{C}_{60}\text{H}_{68}\text{N}_4\text{O}_{17}$ (1117.2)

ber.: C 64.50 H 6.13 N 5.01

gef.: C 64.50 H 6.12 N 5.00

2-Acetamido-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4-O-(6-O-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (40)

(β -Bn₅-Le^x-N₃)



Man löst 13.3 g (11.8 mmol) des Trisaccharids **38** in 450 ml abs. Methanol, stellt mit einer Lösung von Natriummethanolat in Methanol einen pH-Wert von ca. 11 ein und rührt den Ansatz bei Raumtemperatur. Nach 5 h ist die Deacetylierung vollständig. Es wird mit saurem Ionenaustauscher Amberlyst 15 neutralisiert, vom Harz filtriert und i. Vak. eingengt. Die Reinigung erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (DCM/MeOH = 18:1).

Ausbeute: 11.5 g (97%) farbloser, amorpher Feststoff, $[\alpha]_D = -63.5$ ($c = 1.0$, DCM), $R_f = 0.29$ (DCM/MeOH = 18:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, in $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 1.09 (d, 3H, $^3J_{6,5} = 6.2$ Hz, Fuc-6), 1.89 (s, 3H, CH_3 , Ac), 3.20 – 3.25 (m, 1H, Gal-3), 3.31 – 3.38 (m, 2H, Gal-2 {3.33}, Gal-5 {3.35}), 3.59 – 3.65 (m, 3H, Gal-6a {3.60}, Gal-4 {3.62}, GlcNAc-3 {3.64}), 3.72 (dd, 1H, $^2J_{6b,6a} = 9.8$ Hz, $^3J_{6b,5} = 7.4$ Hz, Gal-6b), 3.77 – 3.90 (m, 6H, GlcNAc-6a {3.79}, Fuc-2 {3.80}, GlcNAc-5 {3.81}, Fuc-4 {3.83}, GlcNAc-2 {3.85}, GlcNAc-4 {3.86}), 3.96 – 4.08 (m, 2H, GlcNAc-6b {4.00}, Fuc-3 {4.02}) 4.30 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 7.4$ Hz, Gal-1), 4.35 (d, 1H, $^2J = 11.4$ Hz, CH_2Ph), 4.43 (d, 2H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.47 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 7.4$ Hz, GlcNAc-1), 4.49 (d, 2H, $^2J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.58 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.61 (d, 1H, $^3J_{\text{OH},4} = 3.5$ Hz, Gal-4-OH), 4.64 (d, 1H, $^2J = 12.5$ Hz, CH_2Ph), 4.71 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.75 (d, 1H, $^2J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.81 (d, 1H, $^2J = 9.8$ Hz, CH_2Ph), 4.82 – 4.85 (m, 2H, Fuc-5, Gal-3-OH), 5.08 (d, 1H, $^3J_{\text{OH},4} = 4.7$ Hz, Gal-2-OH), 5.31 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 3.5$ Hz, Fuc-1), 7.17 – 7.38 (m, 25H, arom.), 8.21 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},2} = 8.8$ Hz, NHAc).

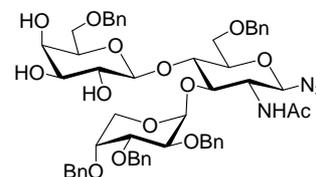
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, HMQC, in $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 16.4 (Fuc-6), 23.1 (CH_3 , Ac), 54.9 (GlcNAc-4), 65.5 (Fuc-5), 67.7 (Gal-4, GlcNAc-6), 68.7 (Gal-6), 70.5 (CH_2Ph), 70.9 (Gal-2), 71.7, 71.9, 72.0 (3x CH_2Ph), 72.8 (Gal-5, GlcNAc-2), 73.4 (Gal-3, GlcNAc-4), 74.5 (CH_2Ph), 75.9 (Fuc-2, GlcNAc-5), 76.7 (GlcNAc-3), 78.0 (Fuc-3), 78.7 (Fuc-4), 88.4 (GlcNAc-1), 95.7 (Fuc-1), 102.2 (Gal-1), 126.7, 127.0, 127.1, 127.2, 127.5, 127.9, 128.1, 128.3 ($\text{C}_{\text{aromat.}}$), 138.4, 138.5, 138.9, 139.2, 139.3 ($\text{C}_{\text{aromat., ipso}}$), 169.5 (C=O).

ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1027.57 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1043.56 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 2033.16 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{55}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_{14}$ (1005.1)

2-Acetamido-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- β -D-arabinopyranosyl)-4-O-(6-O-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (39)

(β -Bn₅-Ara-Le^x-N₃)



Man löst 1 g (892 μmol) des Trisaccharids **37** in 30 ml abs. Methanol, stellt mit einer Lösung von Natriummethanolat in Methanol einen pH-Wert von ca. 11 ein und rührt den Ansatz bei Raumtemperatur. Nach 3 h ist die Deacetylierung vollständig. Es wird mit saurem Ionenaustauscher Amberlyst 15 neutralisiert, vom Harz filtriert und i. Vak. eingengt. Die Reinigung erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (DCM/MeOH = 18:1).

Ausbeute: 837 mg (95%) farbloser amorpher Feststoff, $[\alpha]_D = -91.1$ ($c = 1.0$, CHCl_3), $R_f = 0.25$ (DCM/MeOH = 20:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, in $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 1.88 (s, 3H, CH_3 , Ac), 3.19 – 3.24 (m, 1H, Gal-3), 3.32 – 3.38 (m, 2H, Gal-5 {3.33}, Gal-2 {3.36}), 3.49 (db, 1H, $^2J = 13.3$ Hz, Ara-5a), 3.54 – 3.61 (m, 2H, Gal-6a {3.58}, Gal-4 {3.60}), 3.63 – 3.69 (m, 2H, GlcNAc-3 {3.64}, Gal-6b {3.66}), 3.77 – 3.89 (m, 5H, GlcNAc-6a {3.78}, Ara-2 {3.81}, GlcNAc-5 {3.82}, GlcNAc-4 {3.85}, GlcNAc-2 {3.88}), 3.93 – 3.99 (m, 2H, GlcNAc-6b {3.94}, Ara-4 {3.96}), 4.04 (dd, $^3J_{3,2} = 10.2$ Hz, $^3J_{3,4} = 3.2$ Hz, Ara-3), 4.29 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 7.8$ Hz, Gal-1), 4.32 (d, 1H, $^2J = 12.5$ Hz, CH_2Ph), 4.43 (d, 1H, $^2J = 12.9$ Hz, CH_2Ph), 4.46 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.48 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.50 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 8.6$ Hz, GlcNAc-1), 4.57 (d, 1H, $^2J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.58 (d, 3H, $^2J = 12.5$ Hz, CH_2Ph), 4.58 (m, 2H, Ara-5b, Gal-4-OH), 4.61 (d, 1H, $^2J = 13.7$ Hz, CH_2Ph), 4.64 (d, 1H, $^2J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.83 (d, 1H, $^3J_{\text{OH},3} = 5.9$ Hz, Gal-3-OH), 5.10 (d, 1H, $^3J_{\text{OH},2} = 4.7$ Hz, Gal-2-OH), 5.38 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 3.5$ Hz, Ara-1), 7.16 – 7.31 (m, 25H, arom.), 8.23 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},2} = 8.6$ Hz, NHAc).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, HMQC, in $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 23.1 (CH_3 , Ac), 55.0 (GlcNAc-2), 60.2 (Ara-5), 67.8 (Gal-4), 67.9 (GlcNAc-6), 68.8 (Gal-6), 70.7, 70.8, 71.0, (3x CH_2Ph), 71.3 (Gal-2), 71.9, 72.2 (2x CH_2Ph), 72.5 (GlcNAc-4), 72.8 (Gal-5), 73.2 (Gal-3), 73.4 (GlcNAc-5), 75.2 (Ara-4), 75.8 (Ara-2), 76.2 (Ara-3), 76.7 (GlcNAc-3), 88.4 (GlcNAc-1), 96.2 (Ara-1), 102.2 (Gal-1), 126.9, 127.1, 127.2, 127.4, 127.5, 127.9, 128.1, 128.2, 128.3, ($\text{C}_{\text{aromat.}}$), 138.4, 138.6, 138.9, 139.1, 139.3 ($\text{C}_{\text{aromat., ispo}}$), 169.6 (C=O).

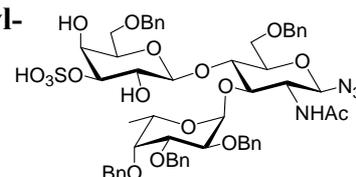
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 991.48 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1013.43 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1029.43 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 2003.92 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{54}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_{14}$ (991.1)

5.2.8 Sulfatierungen

2-Acetamido-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4-O-(6-O-benzyl-4-O-sulfatyl- β -D-galactopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (47)

(β -Bn₅-Sulfo-Le^x-N₃)



Man löst 9 g (8.95 mmol) des Lewis^x-Azids **40** und 2.44 g (9.84 mmol, 1.1 Äquiv.) Dibutylzinnoxid in 400 ml abs. Methanol und erhitzt den Ansatz 4 h zum Sieden.

Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und 3x mit je 50 ml Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 400 ml abs. DMF gelöst, mit 1.36 g (9.84 mmol, 1.1 Äquiv) SO_3/NMe_3 -Komplex versetzt und weitere 15 h bei Raumtemp. gerührt. Das DMF wird i. Hochvak. entfernt und 3x mit je 100 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rückstandes erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (DCM/MeOH = 20:1) und Gefriertrocknung aus Benzol.

Ausbeute: 8.8 g (90%) farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_{\text{D}} = -69.1$ ($c = 1.0$, DMSO), $R_{\text{f}} = 40.4$ min (Säule A1, Grad. A2), $R_{\text{f}} = 0.15$ (DCM/MeOH = 9:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, in DMSO- d_6): δ (ppm) = 1.07 (d, 3H, $^3J_{6,5} = 6.3$ Hz, Fuc-6), 1.89 (s, 3H, CH_3 , Ac), 3.34 – 3.38 (m, 1H, Gal-5), 3.46 – 3.52 (m, 1H, Gal-2), 3.57 – 3.62 (m, 1H, Gal-6a), 3.65 – 3.69 (m, 1H, GlcNAc-3), 3.71 (dd, 1H, $^2J_{6b,6a} = 9.8$ Hz, $^3J_{6b,5} = 7.4$ Hz, Gal-6b), 3.76 – 3.81 (m, 2H, $^3J_{2,1} = 3.5$ Hz, Fuc-2 {3.76}, GlcNAc-6a {3.79}), 3.82 – 3.90 (m, 5H, GlcNAc-5 {3.79}, Gal-4 {3.81}, Fuc-4 {3.84}, GlcNAc-2 {3.86}, GlcNAc-4 {3.88}), 3.91 – 3.94 (m, 1H, Gal-3), 3.98 – 4.05 (m, 2H, GlcNAc-6b {4.00}, Fuc-3 {4.01}), 4.34 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.38 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 7.7$ Hz, Gal-1), 4.42 (d, 2H, $^2J = 13.3$ Hz, CH_2Ph), 4.46 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 8.6$ Hz, GlcNAc-1), 4.47 (d, 1H, $^2J = 11.4$ Hz, CH_2Ph), 4.51 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.58 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.63 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.69 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.73 (d, 1H, $^2J = 13.7$ Hz, CH_2Ph), 4.80 (d, 1H, $^2J = 11.0$ Hz, CH_2Ph), 4.81 – 4.85 (m, 1H, Fuc-5), 5.18 (d, 1H, $^3J_{\text{OH},2} = 3.1$ Hz, Gal-2-OH), 5.31 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 3.9$ Hz, Fuc-1), 7.17 – 7.34 (m, 25H, arom.), 8.22 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},2} = 8.6$ Hz, NHAc).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, HMQC, in DMSO- d_6): δ (ppm) = 16.3 (Fuc-6), 23.1 (CH_3 , Ac), 55.0 (GlcNAc-2), 65.5 (Fuc-5), 66.0 (Gal-4), 67.7 (GlcNAc-6), 68.3 (Gal-6), 69.5 (Gal-2), 70.5, 71.7, 71.9, 72.1 (4x CH_2Ph), 72.6 (Gal-5), 72.9 (GlcNAc-4), 73.3 (Fuc-2), 76.7 (GlcNAc-3), 77.9 (Fuc-3), 78.6 (GlcNAc-5), 79.2 (Gal-3), 88.0 (GlcNAc-1), 95.3 (Fuc-1), 101.7 (Gal-1), 126.8, 127.0, 127.1, 127.2, 127.3, 127.6, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3 ($\text{C}_{\text{aromat.}}$), 138.4, 138.5, 138.9, 139.3 ($\text{C}_{\text{aromat., ispo}}$), 169.5 (C=O).

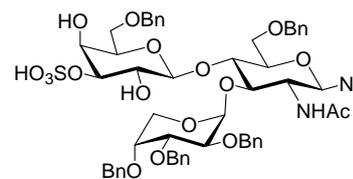
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1107.60 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1129.59 $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$.

HR-ESI-MS (pos.): 1107.3926 (ber.: 1107.3885) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{55}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{S}$ (1085.2)

2-Acetamido-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-arabinopyranosyl)-4-O-(6-O-benzyl-4-O-sulfatyl-β-D-galactopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl-azid (46)

(β-Bn₅-Ara-Sulfo-Le^x-N₃)



Man löst 837 mg (845 μmol) des Lewis^x-Azids **39** und 230 mg (930 μmol) Dibutylzinnoxid in 50 ml abs. Methanol und erhitzt den Ansatz 4 h zum Sieden. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und 3x mit Toluol kdestilliert. Der Rückstand wird in 50 ml abs. DMF gelöst, mit 129 mg (930 μmol) SO₃/NMe₃-Komplex versetzt und weitere 15 h bei Raumtemp. gerührt. Das DMF wird i. Hochvak. entfernt, mit Toluol kdestilliert. Die Reinigung des Rückstandes erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (DCM/MeOH = 20:1) und anschließende Gefriertrocknung aus Benzol.

Ausbeute: 777 mg (85%) farbloses Lyophilisat, [α]_D = -68.1 (c = 1.0, CHCl₃), R_t = 35.3 min (Säule A1, Grad. A2), R_f = 0.19 (DCM/MeOH = 9:1).

¹H-NMR (400 MHz, ¹H-¹H-COSY, in CDCl₃): δ (ppm) = 1.89 (s, 3H, CH₃, Ac), 3.33 – 3.37 (m, 1H, Gal-5), 3.50 – 3.59 (m, 3H, Gal-2 {3.53}, Ara-5a {3.53}, Gal-6a {3.57}), 3.64 – 3.69 (m, 2H, GlcNAc-5 {3.66}, Gal-6b {3.66}), 3.78 – 3.84 (m, 3H, GlcNAc-6a {3.79}, Ara-2 {3.81}, GlcNAc-3 {3.82}), 3.87 – 3.91 (m, 4H, GlcNAc-2 {3.86}, Gal-4 {3.90}, Ara-4 {3.92}, Gal-3 {3.92}), 3.95 (dd, 1H, ³J_{6,5} = 3.2 Hz, ²J = 11.0 Hz, GlcNAc-6b), 4.00 (m, 1H, GlcNAc-4), 4.04 (dd, 1H, ³J_{3,2} = 10.2 Hz, ³J_{3,4} = 3.4 Hz, Ara-3), 4.32 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.38 (d, 1H, ³J_{1,2} = 7.8 Hz, Gal-1), 4.42 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.46 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.48 (d, 1H, ³J_{1,2} = 8.6 Hz, GlcNAc-1), 4.51 (d, 1H, ²J = 12.5 Hz, CH₂Ph), 4.55 (d, 1H, ²J = 14.4 Hz, CH₂Ph), 4.58 (m, 1H, Ara-5b), 4.58 (d, 1H, ²J = 10.6 Hz, CH₂Ph), 4.59 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.60 (d, 2H, ²J = 13.7 Hz, CH₂Ph), 4.63 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.75 (d, 1H, ³J_{OH,4} = 4.3 Hz, Gal-4-OH), 5.20 (d, 1H, ³J_{OH,2} = 2.7 Hz, Gal-2-OH), 5.39 (d, 1H, ³J_{1,2} = 3.5 Hz, Ara-1), 7.16 – 7.36 (m, 25H, arom.), 8.25 (d, 1H, ³J_{NH,2} = 8.6 Hz, NHAc).

¹³C-NMR (100.6 MHz, BB, HMQC, in CDCl₃): δ (ppm) = 23.1 (CH₃, Ac), 55.0 (GlcNAc-2), 60.0 (Ara-5), 66.0 (Gal-4), 67.7 (GlcNAc-6), 68.5 (Gal-6), 69.5 (Gal-2), 70.6, 70.7, 70.9, 71.9, 72.2 (5x CH₂Ph), 73.0 (Ara-4), 73.3 (GlcNAc-3), 75.0 (GlcNAc-4), 75.8 (Ara-2), 76.1 (Ara-3), 76.7 (GlcNAc-5), 79.1 (Gal-3), 88.4 (GlcNAc-1), 96.2 (Ara-1), 102.2 (Gal-1), 126.9, 127.0, 127.1, 127.3, 127.4, 127.5, 127.9, 128.0, 128.1, 128.3 (C_{aromat.}), 138.3, 138.5, 139.0, 139.1, 139.3 (C_{aromat., ispo}), 169.5 (C=O).

ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1093.41 [M+Na]⁺, 1115.41 [M-H+2Na]⁺.

HR-ESI-MS (pos.): (m/z) = 1115.3580 (ber.: 1115.3548) [M-H+2Na]⁺.

C₅₄H₆₄N₄O₁₇S (1071.2)

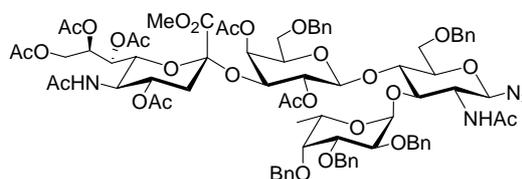
5.2.9 Sialylierungen – Synthese von Sialyl-Lewis^x

Herstellung einer 1.6M Methylsulphenylbromid-Lösung

Unter Argonatmosphäre werden 1.42 ml (16 mmol) Dimethyldisulfid in 20 ml abs. 1,2-Dichlorethan gelöst, mit 818 µl (16 mmol) Brom versetzt und 15 h unter Lichtausschluss gerührt. Die so hergestellte Lösung wird im Anschluss umgehend für die nachfolgenden Sialylierungsreaktionen eingesetzt.

2-Acetamido-4-O-{2,4-di-O-acetyl-6-O-benzyl-3-O-[methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat]-β-D-galactopyranosyl}-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-α-L-fucopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosylazid (52)

(β-Ac₆-Bn₅-(Fuc)-sLe^x-CO₂Me-N₃)



Man löst 2.45 g (2.43 mmol) des Akzeptors **39** und 3.5 g (5.86 mmol, 2.4 Äquiv.) des Xanthogenats **28** in einem Gemisch aus 25 ml abs. Dichlormethan und 39 ml abs. Acetonitril und rührt den Ansatz 1 h über 3.3 g pulverförmigem Molekularsieb 4 Å. Nach Abkühlen auf -50 °C tropft man zunächst 1.52 g (5.9 mmol) Silbertriflat in 11 ml abs. Acetonitril und anschließend 3.7 ml (5.8 mmol) der 1.6M Methylsulphenylbromid-Lösung (binnen 30 min) zu. Nach 2 h Rühren bei dieser Temp. wird mit 1.7 ml Diisopropylamin neutralisiert, mit 50 ml Dichlormethan verdünnt, über Hyflo[®] filtriert und i. Vak. eingengt. Die Reinigung des Rückstandes erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (DCM/MeOH = 60:1). Das so erhaltene (noch verunreinigte) Produkt wird in 50 ml Pyridin gelöst, mit 25 ml Acetanhydrid und 200 mg DMAP versetzt und 15 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend werden Pyridin und überschüssiges Acetanhydrid i. Vak. entfernt, 3x mit je 50 ml Toluol kodestilliert und der Rückstand durch erneute Flashchromatographie (DCM/MeOH = 100:1 → 60:1) gereinigt. Das so erhaltene farblose Öl wird schließlich aus Benzol gefriergetrocknet.

Ausbeute: 2.35 g (62%) farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D = -59.8$ ($c = 1.0$, CHCl_3), $R_t = 42.0$ min (Säule A1, Grad. A3), $R_f = 0.33$ (DCM/MeOH = 20:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, in CDCl_3): δ (ppm) = 1.04 (d, 3H, $^3J_{6,5} = 6.2$ Hz, Fuc-6), 1.73 (t, 1H, $^3J_{3,4} = ^2J = 12.5$ Hz, Sia-3a), 1.83 (s, 6H, CH_3 , Ac), 1.93, 1.94, 1.99, 2.05, 2.09, 2.19 (6x s, 18H, CH_3 , Ac), 2.55 (dd, 1H, $^3J_{3,4} = 4.4$ Hz, $^2J = 12.5$ Hz, Sia-3b), 3.36 (dd, 1H, $^3J_{6,5} = 7.4$ Hz, $^2J = 9.5$ Hz, Gal-6a), 3.45 – 3.50 (m, 2H, Gal-6b {3.46}, Fuc-4 {3.49}), 3.64 (dd, 1H, $^3J_{6,5} = 10.6$ Hz, $^3J_{6,7} = 2.5$ Hz, Sia-6), 3.78 – 3.82 (m, 3H, Gal-5 {3.80}, GlcNAc-2 {3.81}, Fuc-3), 3.83 (s, 3H, COOCH_3), 3.83 – 3.88 (m, 3H, GlcNAc-5, GlcNAc-6a, GlcNAc-6b), 3.97 (dd, 1H, $^3J_{9,8} = 5.9$ Hz, $^2J = 12.3$ Hz, Sia-9a), 3.98 – 4.06 (m, 4H, GlcNAc-4 {3.99}, GlcNAc-3 {4.01}, Fuc-5 {4.02}, Sia-5 {4.05}), 4.09 (dd, 1H, $^3J_{2,1} = 3.5$ Hz, $^3J_{2,3} = 10.3$ Hz, Fuc-2), 4.32 (d, 1H, $^2J = 11.4$ Hz, CH_2Ph), 4.35 (m_c, 1H, Sia-9b), 4.39 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.43 (d, 1H, $^2J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.57 (d, 1H, $^2J = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 4.60 (dd, 1H, $^3J_{3,2} = 10.6$ Hz, $^3J_{3,4} = 4.0$ Hz, Gal-3), 4.63 (1, 1H, $^2J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.64 (d, 1H, $^2J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.74 (d, 1H, $^2J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.75 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 7.8$ Hz, Gal-1), 4.78 (d, 1H, $^2J = 11.4$ Hz, CH_2Ph), 4.87 – 4.96 (m, 3H, Sia-4 {4.90}, CH_2Ph {4.93}, Gal-2 {4.95}), 4.99 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 6.0$ Hz, GlcNAc-1), 5.05 (d, 1H, $^3J_{4,3} = 3.5$ Hz, Gal-4), 5.12 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},5} = 10.3$ Hz, Sia-NHAc), 5.15 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 3.5$ Hz, Fuc-1), 5.34 (dd, 1H, $^3J_{7,6} = 2.6$ Hz, $^3J_{7,8} = 9.2$ Hz, Sia-7), 5.59 (m_c, 1H, Sia-8), 6.16 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},2} = 8.4$ Hz, GlcNAc-NHAc), 7.18 - 7.37 (m, 25H, arom.).

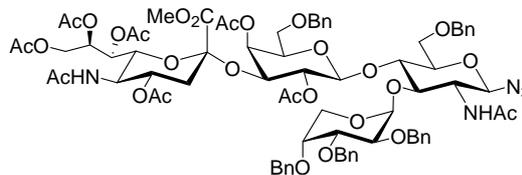
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, HMQC, HMBC, in CDCl_3): δ (ppm) = 16.8 (Fuc-6), 20.8, 20.9, 21.1, 21.5, 23.2, 23.3 (CH_3 , Ac), 37.7 (Sia-3), 49.2 (Sia-5), 52.3 (GlcNAc-2), 53.3 (CCOCH_3), 62.6 (Sia-9), 67.1 (Fuc-5), 67.3 (Sia-7), 67.6 (Gal-6), 67.7 (Sia-8), 68.0 (Gal-4), 69.0 (GlcNAc-6), 69.5 (Sia-4), 70.4 (Gal-2), 71.4 (Gal-3), 71.9 (Gal-5), 72.1 (Sia-6), 72.9, 73.0, 73.1 (GlcNAc-3, GlcNAc-4, CH_2Ph), 73.3 (CH_2Ph), 74.7 (CH_2Ph), 75.7 (GlcNAc-5), 76.6 (Fuc-2), 77.5 (Fuc-4), 79.5 (Fuc-3), 87.8 (GlcNAc-1), 96.8 (Fuc-1), 97.0 (Sia-2), 99.2 (Gal-1), 127.4, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.4, 128.5, 128.6 ($\text{C}_{\text{aromat.}}$), 137.9, 138.4, 138.7, 138.8, 138.9 ($\text{C}_{\text{aromat., ipso}}$), 168.0 (Sia-1), 169.8, 170.0, 170.4, 170.6 ($\text{C}=\text{O}$).

ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1584.67 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1600.66 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

$\text{C}_{79}\text{H}_{95}\text{N}_5\text{O}_{28}$ (1562.6)	ber.:	C 60.72	H 6.13	N 4.48
	gef.:	C 60.58	H 6.11	N 4.46

2-Acetamido-4-O-{2,4-di-O-acetyl-6-O-benzyl-3-O-[methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat]- β -D-galactopyranosyl}-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- β -D-arabinopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid (53**)**

(β -Ac₆-Bn₅-(Ara)-sLe^x-CO₂Me-N₃)



Man löst 3.12 g (3.15 mmol) des Akzeptors **40** und 3.75 g (6.30 mmol, 2.0 Äquiv.) des Xanthogenats **28** in einem Gemisch aus 30 ml abs. Dichlormethan und 55 ml abs. Acetonitril und rührt den Ansatz 1 h über 4 g pulverförmigem Molekularsieb 4 Å. Nach Abkühlen auf -50 °C tropft man zunächst 1.62 g (6.30 mmol) Silbertriflat in 6.5 ml abs. Acetonitril und anschließend 3.95 ml (6.30 mmol) der 1.6M Methylsulfenylbromid-Lösung (binnen 30 min) zu. Nach 3 h Rühren bei dieser Temp. ist dünnschichtchromatographisch kein Akzeptor mehr nachzuweisen. Man neutralisiert mit 1.75 ml Diisopropylamin, verdünnt mit 100 ml Dichlormethan, filtriert über Hyflo[®] und engt i. Vak. ein. Die Reinigung des Rückstandes erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (DCM/MeOH = 60:1 → 20:1). Das so erhaltene Produkt wird in 66 ml Pyridin gelöst, mit 33 ml Acetanhydrid und 350 mg DMAP versetzt und 15 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend werden Pyridin und überschüssiges Acetanhydrid i. Vak. entfernt, 3x mit je 50 ml Toluol kodestilliert und der Rückstand durch erneute Flashchromatographie (DCM/MeOH = 100:1 → 60:1) gereinigt. Das so erhaltene Öl wird schließlich aus Benzol lyophilisiert.

Ausbeute: 3.30 g (68%) farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D = -73.6$ (c = 1.0, CHCl₃), $R_t = 41.4$ min (Säule A1, Grad. A3), $R_f = 0.30$ (DCM / MeOH = 20:1).

¹H-NMR (400 MHz, ¹H-¹H-COSY, in CDCl₃): δ (ppm) = 1.68 (t, 1H, ³J_{3,4} = ²J = 12.3 Hz, Sia-3a), 1.83, 1.86, 1.93, 1.94, 2.00, 2.06, 2.09, 2.19 (8x s, 24H, CH₃, Ac), 2.58 (dd, 1H, ³J_{3,4} = 4.4 Hz, ²J = 12.3 Hz, Sia-3b), 3.33 (dd, 1H, ³J_{6,5} = 7.4 Hz, ²J = 9.9 Hz, Gal-6a), 3.42 (dd, 1H, ³J_{6,5} = 7.5 Hz, ²J = 10.0 Hz, Gal-6b), 3.56 – 3.64 (m, 4H, Ara-4 {3.60}, Sia-6 {3.62}, Ara-5a, Ara-5b), 3.71 (dd, 1H, ³J_{3,2} = 9.0 Hz, ³J_{3,4} = 2.0 Hz, Ara-3), 3.75 – 3.81 (m, 3H, Gal-5 {3.77}, GlcNAc-6a, GlcNAc-6b), 3.83 (s, 3H, COOCH₃), 3.88 – 3.96 (m, 4H, GlcNAc-5 {3.89}, GlcNAc-2 {3.91}, Sia-9a {3.92}, GlcNAc-3 {3.94}), 3.99 (dd, 1H, ³J_{2,1} = 3.0 Hz, ³J_{2,3} = 9.5 Hz, Ara-2), 4.00 – 4.09 (m, 2H, GlcNAc-4 {4.03}, Sia-5 {4.06}), 4.31 (d, 1H, ²J = 11.7 Hz, CH₂Ph), 4.34 – 4.38 (m, 2H, Sia-9b {4.35}, CH₂Ph), 4.44 (d, 1H, ²J = 11.7 Hz, CH₂Ph), 4.49 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.52 (d, 1H, ²J = 12.5 Hz, CH₂Ph), 4.54 –

4.63 (m, 4H, Gal-3 {4.58}, CH₂Ph), 4.71 – 4.77 (m, 3H, CH₂Ph {4.72}, Gal-1 {4.73}, CH₂Ph {4.76}), 4.85 (d, 1H, ³J_{1,2} = 5.4 Hz, GlcNAc-1), 4.88 (m_c, 1H, Sia-4), 4.95 (dd, 1H, ³J_{2,1} = 7.8 Hz, ³J_{2,3} = 9.7 Hz, Gal-2), 5.00 (d, 1H, ³J_{4,3} = 3.5 Hz, Gal-4), 5.14 (d, 1H, ³J_{NH,5} = 12.1 Hz, Sia-NHAc), 5.16 (d, 1H, ³J_{1,2} = 3.0 Hz, Ara-1), 5.35 (dd, 1H, ³J_{7,6} = 2.5 Hz, ³J_{7,8} = 9.1 Hz, Sia-7), 5.60 (m_c, 1H, Sia-8), 6.36 (d, 1H, ³J_{NH,2} = 8.4 Hz, GlcNAc-NHAc), 7.14 – 7.34 (m, 25H, arom.).

¹³C-NMR (100.6 MHz, BB, HMQC, HMBC, in CDCl₃): δ (ppm) = 20.7, 20.8, 20.9, 21.0, 21.1, 21.5, 23.1, 23.3 (CH₃, Ac), 37.6 (Sia-3), 49.2 (Sia-5), 50.8 (GlcNAc-2), 53.3 (COOCH₃), 61.0 (Ara-5), 62.7 (Sia-9), 67.4 (Sia-7), 67.8 (Gal-6, Sia-8), 68.0 (Gal-4), 69.2 (GlcNAc-6), 69.5 (Sia-4), 70.5 (Gal-2), 71.3 (Gal-3), 71.5 (CH₂Ph), 72.0 (Gal-5), 72.1 (Sia-6), 72.4 (CH₂Ph), 72.7 (GlcNAc-4), 73.1, 73.4 (CH₂Ph), 73.7 (Ara-4), 73.8 (CH₂Ph), 74.3 (GlcNAc-3), 75.6 (GlcNAc-5), 88.1 (GlcNAc-1), 97.0 (Sia-2), 97.4 (Ara-1), 98.8 (Gal-1), 127.4, 127.5, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.3, 128.5, 128.6 (C_{aromat.}), 138.4, 138.5, 138.6, 138.7 (C_{aromat., ipso}), 167.9 (Sia-1), 169.9, 170.1, 170.4, 170.6, 170.8, 170.9 (C=O).

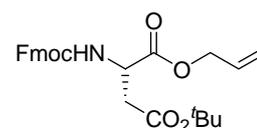
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1570.64 [M+Na]⁺, 1586.63 [M+K]⁺.

C ₇₈ H ₉₃ N ₅ O ₂₈ (1548.6)	ber.:	C 60.50	H 6.05	N 4.52
	gef.:	C 59.36	H 6.25	N 4.48

5.2.10 Synthese des Asparaginsäure-Bausteins

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-asparaginsäure-α-allylester-β-tert.-butylester (55)

(Fmoc-Asp(O^tBu)-OAll)



Man löst 10 g (24.4 mmol) Fmoc-Asp(O^tBu)-OH (**54**) in 400 ml abs. Methanol und gibt 3.96 g (12.2 mmol) Cäsiumcarbonat zu. Nach 90 min Rühren bei Raumtemp. wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird i. Hochvak. getrocknet und in 360 ml abs. DMF gelöst. Nach Abkühlen auf 0 °C tropft man langsam 4.2 ml (48.6 mmol) Allylbromid zu und rührt den Ansatz 30 min bei dieser Temperatur. Man erwärmt auf Raumtemp. und rührt weitere 2 h nach. Anschließend wird DMF i. Hochvak. entfernt, mit Toluol kdestilliert, der Rückstand in 500 ml Dichlormethan aufgenommen und 2x mit 150 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Das so gewonnene

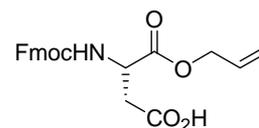
Produkt ist für die folgenden Schritte ausreichend rein und wird ohne weitere Charakterisierung eingesetzt.

Ausbeute: 11 g (quant.) farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.68$ (CH/EE = 2:1).

$C_{26}H_{29}NO_6$ (451.5)

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-asparaginsäure- α -allylester (56)

(Fmoc-Asp(OH)-OAll)



11 g (24.4 mmol) Fmoc-Asp(O^tBu)-OAll (**55**) werden in 100 ml 95%iger wässriger Trifluoressigsäure 2 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend werden TFA und Wasser i. Vak. entfernt und mehrmals mit Toluol kodestilliert. Die Aufreinigung erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH/EE = 2:1, 1% AcOH).

Ausbeute: 7.94 g (82%) farblose Kristalle, Schmp.: 93° C, $[\alpha]_D = +20.1$ (c = 1.0, CHCl₃), $R_f = 10.7$ min (Säule A1, Grad. A5), $R_f = 0.32$ (CH/EE = 2:1, 1% AcOH).

¹H-NMR (300 MHz, in CDCl₃): δ (ppm) = 2.93 (dd, 1H, ²J = 17.6 Hz, ³J _{β,α} = 4.4 Hz, Asp- β a), 3.11 (dd, 1H, ²J = 17.6 Hz, ³J _{β,α} = 4.4 Hz, Asp- β b), 4.21 (t, 1H, ³J_{9,CH₂} = 6.8 Hz, Fmoc-9), 4.32 – 4.45 (m, 2H, CH₂, Fmoc), 4.60 – 4.69 (m, 3H, Asp- α , CH₂-CH=CH₂), 5.23 (d, 1H, ³J_{cis} = 10.3 Hz, CH₂-CH=CH₂, cis), 5.30 (d, 1H, ³J_{trans} = 17.3 Hz, CH₂-CH=CH₂, trans), 5.82 (d, 1H, ³J_{NH, α} = 7.4 Hz, Asp-NH), 5.80 – 5.94 (m_c, 1H, CH₂-CH=CH₂), 7.29 (t, 2H, ³J_{2,1} = ³J_{2,3} = ³J_{7,6} = ³J_{7,8} = 6.6 Hz, Fmoc-2, Fmoc-7), 7.38 (t, 2H, ³J_{3,2} = ³J_{3,4} = ³J_{6,5} = ³J_{6,7} = 7.4 Hz, Fmoc-3, Fmoc-6), 7.57 (d, 2H, ³J_{1,2} = ³J_{8,7} = 7.4 Hz, Fmoc-1, Fmoc-8), 7.74 (d, 2H, ³J_{4,3} = ³J_{5,6} = 7.4 Hz, Fmoc-4, Fmoc-6), 10.46 (s_b, 1H, COOH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, BB, in CDCl₃): δ (ppm) = 36.4 (Asp- β), 47.0 (Fmoc-9), 50.4 (Asp- α), 66.6 (CH₂-CH=CH₂), 67.5 (CH₂, Fmoc), 119.2 (CH₂-CH=CH₂), 120.0, 125.1, 125.4, 127.0, 127.8, 128.2, 128.9 (C_{aromat.}), 131.3 (CH₂-CH=CH₂), 141.3, 143.6, 143.8 (C_{aromat., ipso}), 156.1 (C=O, Fmoc), 170.1, 175.6 (C=O).

ESI-MS (Gerät 1, pos.): (m/z) = 418.22 [M+Na]⁺, 813.44 [2M+Na]⁺, 1208.67 [3M+Na]⁺.

$C_{22}H_{21}NO_6$ (395.4)	ber.:	C 66.83	H 5.35	N 3.54
	gef.:	C 66.85	H 5.27	N 3.32

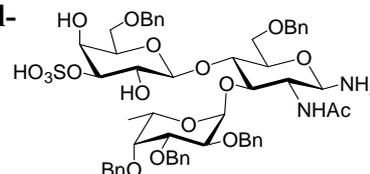
5.2.11 Synthese der glycosylierten Aminosäuren

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Glycosylamine aus den Lewis^x-Aziden

Man löst das zu reduzierende Glycosylazid in einem Isopropanol-Wasser-Gemisches (9:1), kühlt den Ansatz auf 0 °C ab und gibt eine äquimolare Menge gründlich mit Wasser neutral gewaschenes Raney-Nickel (*Fa. Acros Organics*) hinzu. Man evakuiert mehrmals und flutet jeweils mit Wasserstoff. Der Ansatz wird bis zur vollständigen Umsetzung (DC-Kontrolle) unter dem leichten Überdruck der Hydrierblase bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird der Katalysator über Hyflo[®] abfiltriert und gründlich mit Isopropanol und Methanol nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. bei 30 °C eingengt, mit Toluol kdestilliert und i. Hochvak. getrocknet. Das so quantitativ gewonnene Glycosylamin wird sofort zur Kupplung an die Aminosäure eingesetzt.

2-Acetamido-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4-O-(6-O-benzyl-4-O-sulfoxy- β -D-galactopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamin (58)

(β -Bn₅-Sulfo-Le^x-NH₂)



Es wird 1 g (945 μ mol) des Sulfo-Le^x-Azids **47** in 100 ml Isopropanol/Wasser 9:1 über 200 mg Raney-Nickel gemäß der oben genannten Vorschrift umgesetzt. Nach 90 min ist vollständiger Umsatz zu beobachten. Das Amin wird massenspektrometrisch nachgewiesen und roh zur Kupplung eingesetzt.

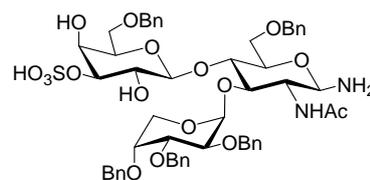
Ausbeute: 975 mg (quant.) farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.17$ (DCM/MeOH = 5:1)

ESI-MS (*Gerät 2, pos.*): (m/z) = 1059.62 [M+H]⁺, 1081.60 [M+Na]⁺, 1103.58 [M-H+2Na]⁺, 1119.57 [M-H+Na+K]⁺, 2163.15 [2M-H+2Na]⁺.

C₅₅H₆₆N₂O₁₇S (1059.2)

2-Acetamido-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-arabinopyranosyl)-4-O-(6-O-benzyl-4-O-sulfoxy-β-D-galactopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl-amin (57)

(β-Bn₅-Ara-Sulfo-Le^x-NH₂)



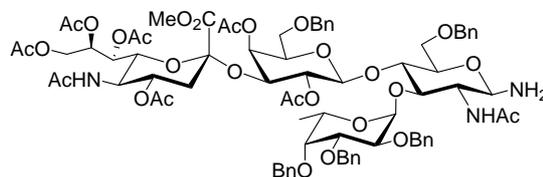
Es werden 647 mg (642 μmol) des Ara-Sulfo-Le^x-Azids **46** in 100 ml Isopropanol/Wasser 9:1 über 100 mg Raney-Nickel gemäß der oben genannten Vorschrift umgesetzt. Nach 3 h ist vollständiger Umsatz zu beobachten. Das Amin wird massenspektrometrisch nachgewiesen und roh zur Kupplung eingesetzt.

Ausbeute: 547 mg (82%) farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.35$ (DCM/MeOH = 5:1)
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1067.55 [M+Na]⁺, 1090.53 [M-H+2Na]⁺.

C₅₄H₆₄N₂O₁₇S (1045.2)

2-Acetamido-4-O-{2,4-di-O-acetyl-6-O-benzyl-3-O-[methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat]-β-D-galactopyranosyl}-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-α-L-fucopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosylamin (70)

(β-Ac₆-Bn₅-(Fuc)-sLe^x-CO₂Me-NH₂)



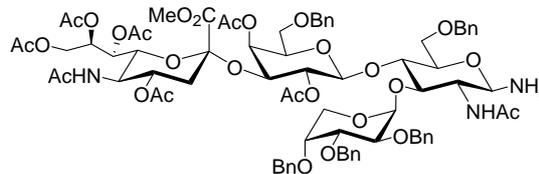
Es werden 400 mg (256 μmol) des sLe^x-Azids **47** in 20 ml Isopropanol/Wasser 9:1 über 100 mg Raney-Nickel gemäß der oben genannten Vorschrift umgesetzt. Nach 2 h ist vollständiger Umsatz zu beobachten. Das Amin wird massenspektrometrisch nachgewiesen und roh zur Kupplung eingesetzt.

Ausbeute: 393 mg (quant.) farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.50$ (DCM/MeOH = 10:1)
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1558.61 [M+Na]⁺, 1574.63 [M+K]⁺, 3095.27 [2M+Na]⁺.

C₇₉H₉₇N₃O₂₈ (1536.6)

2-Acetamido-4-O-{2,4-di-O-acetyl-6-O-benzyl-3-O-[methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat]- β -D-galactopyranosyl}-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- β -D-arabinopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamin (69)

(β -Ac₆-Bn₅-(Ara)-sLe^x-CO₂Me-NH₂)



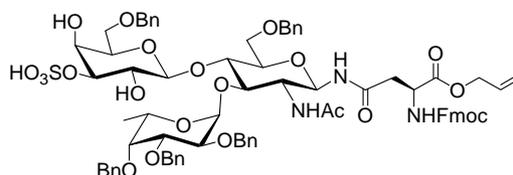
Es werden 1.2 g (775 μ mol) des Ara-sLe^x-Azids **46** in 50 ml Isopropanol/Wasser 9:1 über 250 mg Raney-Nickel gemäß der oben genannten Vorschrift umgesetzt. Nach 2 h ist vollständiger Umsatz zu beobachten. Das Amin wird massenspektrometrisch nachgewiesen und roh zur Kupplung eingesetzt.

Ausbeute: 1.18 g (quant.) farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.47$ (DCM/MeOH = 10:1)
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1522.64 [M+H]⁺, 1544.61 [M+Na]⁺.

C₇₈H₉₅N₃O₂₈ (1522.6)

N ^{α} -Fluorenylmethoxycarbonyl-N⁰-[2-acetamido-3-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4-O-(6-O-benzyl-4-O-sulfoxy- β -D-galactopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-L-asparagin- α -allylester (66)

(Fmoc-Asn-(β -Bn₅-Sulfo-Le^x)-OAll)



Man löst 480 mg (1200 μ mol, 1.5 Äq) Fmoc-Asp-OAll (**56**) zusammen mit 384 mg (1200 μ mol, 1.5 Äq.) TBTU und 184 mg (1200 μ mol, 1.5 Äq.) HOBt-Monohydrat in 30 ml absolutem, aminfreien DMF, versetzt mit 370 μ l (2400 μ mol, 3 Äq.) DIPEA und rührt den Ansatz 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend werden 840 mg (793 μ mol) des frisch hergestellten Sulfo-Lewis^x-Amins **58** gelöst in 10 ml abs. DMF zugesetzt, und es wird weitere 19 h gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Hochvak. wird der Rückstand in 100 ml Dichlormethan aufgenommen und 3x mit je 50 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. gewaschen. Entfernen des Lösungsmittels und Gefriertrocknung aus Benzol liefert die rohe glycosylierte Aminosäure. Diese wird roh in der nächsten Synthesestufe eingesetzt. 100 mg werden zur Bestimmung der spektroskopischen Daten und des Drehwerts mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH = 20:1) gereinigt.

Rohausbeute: 1080 mg (95%) farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D = -20.7$ ($c = 1.0$, DMSO), $R_t = 50.6$ min (Säule A1, Grad. A2), $R_f = 0.68$ (DCM/MeOH = 5:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, in DMSO- d_6): δ (ppm) = 1.08 (d, 3H, $^3J_{5,6} = 6.3$ Hz, Fuc-6), 1.78 (s, 3H, CH₃, Ac), 2.55 – 2.80 (m, 2H, Asn- β a, Asn- β b), 3.33 (m, 1H, Gal-5), 3.40 – 3.46 (m, 1H, GlcNAc-3), 3.47 – 3.53 (m, 1H, Gal-2), 3.55 – 3.62 (m, 2H, GlcNAc-4 {3.59}, Gal-6a {3.61}), 3.67 – 3.73 (m, 2H, Gal-6b {3.70}, GlcNAc-5 {3.72}), 3.76 (q, 1H, $^3J_{2,1} = 3.5$ Hz, $^3J_{2,3} = 10.2$ Hz, Fuc-2), 3.78 – 3.86 (m, 2H, GlcNAc-2 {3.83}, Fuc-4 {3.85}), 3.90 (dd, 1H, $^3J_{3,2} = 9.4$ Hz, $^3J_{3,4} = 3.1$ Hz, Gal-3), 3.92 – 3.96 (m, 1H, Gal-4), 3.96 – 4.05 (m, 3H, Fuc-3 {4.00}, GlcNAc-6a,b {4.03}), 4.19 – 4.24 (m, 1H, Fmoc-9), 4.27 – 4.31 (m, 2H, CH₂, Fmoc), 4.38 (s, 2H, CH₂Ph), 4.40 (d, 1H, $^2J = 11.7$ Hz, CH₂Ph), 4.41 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 7.8$ Hz, Gal-1), 4.46 (m, 1H, Asn- α), 4.47 (d, 1H, $^2J = 11.8$ Hz, CH₂Ph), 4.48 (d, 1H, $^2J = 11.4$ Hz, CH₂Ph), 4.54 (d, 1H, $^2J = 11.3$ Hz, CH₂Ph), 4.53 – 4.60 (m, 2H, CH₂-CH=CH₂), 4.61 (d, 1H, $^2J = 11.7$ Hz, CH₂Ph), 4.70 (s, 2H, CH₂Ph), 4.73 (d, 1H, $^3J_{\text{OH},4} = 4.3$ Hz, Gal-4-OH), 4.80 (d, 1H, $^2J = 11.0$ Hz, CH₂Ph), 4.86 (q, 1H, $^3J_{5,6} = 6.6$ Hz, Fuc-5), 4.93 (t, 1H, $^3J_{1,2} \approx ^3J_{1,\text{NH}} = 9.0$ Hz, GlcNAc-1), 5.15 – 5.20 (m, 2H, Gal-2-OH, CH₂-CH=CH₂, cis), 5.30 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 3.0$ Hz, Fuc-1), 5.28 (d, 1H, $^3J_{\text{trans}} = 17.2$ Hz, CH₂-CH=CH₂, trans), 5.82 – 5.92 (m_c, 1H, CH₂-CH=CH₂), 7.19 – 7.44 (m, 29 H, Bn, Fmoc-2, Fmoc-3, Fmoc-6, Fmoc-7), 7.67 – 7.71 (m, 3H, Fmoc-1, Fmoc-8, NH, Asn- α), 7.86 – 7.91 (t_b, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, Fmoc-4, Fmoc-5), 8.12 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},2} = 8.5$ Hz, NHAc), 8.30 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},1} = 9.6$ Hz, NH, Asn- ω).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, HMQC, in DMSO- d_6): δ (ppm) = 14.0 (Fuc-6), 23.0 (CH₃, Ac), 37.0 (Asn- β), 46.7 (Fmoc-9), 50.6 (Asn- α), 53.5 (GlcNAc-4), 65.1 (CH₂-CH=CH₂), 65.4 (Fuc-5), 65.8 (CH₂, Fmoc), 66.0 (Gal-4), 67.9 (GlcNAc-6), 68.4 (Gal-6), 69.5 (Gal-2), 70.5, 71.7, 71.8, 72.0 (4x CH₂Ph), 72.5 (Gal-5), 73.1 (GlcNAc-2), 74.1 (GlcNAc-5), 74.5 (CH₂Ph), 75.9 (Fuc-2), 76.4 (GlcNAc-3), 78.0 (Fuc-3), 78.7 (Fuc-4), 79.3 (GlcNAc-1, Gal-3), 95.6 (Fuc-1), 102.0 (Gal-1), 117.5 (CH₂-CH=CH₂), 120.1 (Fmoc-4, Fmoc-5), 125.3 (Fmoc-1, Fmoc-8), 126.8, 127.1, 127.2, 127.4, 127.5, 127.6, 127.7, 127.9, 128.1, 128.2, 128.3 (C_{aromat.}, Fmoc-2, Fmoc-3, Fmoc-6, Fmoc-7), 132.4 (CH₂-CH=CH₂), 138.4, 138.5, 138.9, 139.3 (C_{aromat.}, ipso), 140.7 (Fmoc-4a, Fmoc-5a), 143.8 (Fmoc-1a, Fmoc-8a), 155.9 (C=O, Fmoc), 169.1, 169.9, 171.2 (C=O).

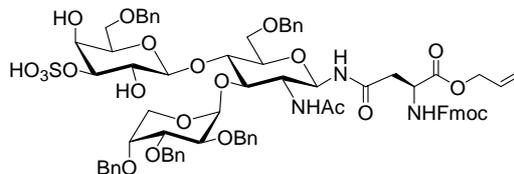
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1458.67 [M+Na]⁺, 1480.65 [M-H+2Na]⁺, 1496.63 [M-H+Na+K]⁺, 1587.82 [M+DIPEA+Na]⁺, 1696.00 [M+2DIPEA+H]⁺.

HR-ESI-MS (pos.): (m/z) = 1480.5052 (ber.: 1480.5068) [M-H+2Na]⁺.

C₇₇H₈₅N₃O₂₂S (1436.6)

***N*^α-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*^ω-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl-β-D-arabinopyranosyl)-4-*O*-(6-*O*-benzyl-4-*O*-sulfoxy-β-D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl]-L-asparagin-α-allylester (65)**

(Fmoc-Asn-(β-Bn₅-Ara-Sulfo-Le^x)-OAll)



Man löst 534 mg (1335 μmol, 1.5 Äq.) Fmoc-Asp-OAll (**56**) zusammen mit 427 mg (1335 μmol, 1.5 Äq.) TBTU und 205 mg (1335 μmol, 1.5 Äq.) HOBt-Monohydrat in 40 ml absolutem, aminfreien DMF, versetzt mit 440 μl (2670 μmol, 3 Äq.) DIPEA und rührt den Ansatz 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend werden 930 mg (890 μmol) des frisch hergestellten *Sulfo*-Lewis^x-Amins **57** gelöst in 10 ml abs. DMF zugesetzt, und es wird weitere 19 h gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Hochvak. wird der Rückstand in 100 ml Dichlormethan aufgenommen und 3x mit je 50 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. gewaschen. Entfernen des Lösungsmittels und Gefriertrocknung aus Benzol liefert die rohe glycosylierte Aminosäure. Diese wird roh in der nächsten Synthesestufe eingesetzt. 100 mg werden zur Bestimmung der spektroskopischen Daten und des Drehwerts mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH = 20:1) gereinigt.

Rohausbeute: 1.13 g (89%) farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D = -27.2$ ($c = 1.0$, DMSO), $R_t = 44.6$ min (Säule A1, Grad. A2), $R_f = 0.64$ (DCM/MeOH = 5:1).

¹H-NMR (400 MHz, ¹H-¹H-COSY, in DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 1.78 (s, 3H, CH₃, Ac), 2.65 – 2.73 (m, 2H, Asn-βa, Asn-βb), 3.29 – 3.35 (m, 1H, Gal-5), 3.42 – 3.48 (m, 1H, GlcNAc-3), 3.50 – 3.62 (m, 3H, Ara-5a {3.52}, Gal-2 {3.56}, Gal-6a {3.59}), 3.64 – 3.73 (m, 2H, Gal-6b {3.68}, GlcNAc-6a {3.72}), 3.77 – 3.94 (m, 5H, GlcNAc-5 {3.80}, GlcNAc-2 {3.85}, Gal-4 {3.91}, Gal-3 {3.92}, Ara-2 {3.95}), 3.98 – 4.03 (m, 3H, Ara-4 {3.99}, GlcNAc-6b {4.00}, Ara-3 {4.01}), 4.18 – 4.25 (m, 2H, Fmoc-9 {4.20}, Asn-α {4.23}), 4.27 – 4.32 (m, 3H, CH₂-Fmoc, CH₂Ph), 4.33 (d, 2H, ²J = 12.5 Hz, CH₂Ph), 4.37 – 4.42 (m, 3H, Gal-1 {4.41}, CH₂Ph), 4.46 (d, 2H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.52 – 4.59 (m, 4H, CH₂-CH=CH₂ {4.56}, CH₂Ph), 4.59 – 4.63 (m, 2H, Ara-5b {4.62}), CH₂Ph), 4.73 (d, ³J_{4, OH} = 4.0 Hz, Gal-4-OH), 4.95 (t, 1H, ³J_{1,2} ≈ ³J_{1, NH} = 9.2 Hz, GlcNAc-1), 5.16 – 5.21 (m, 2H, Gal-2-OH, CH₂-CH=CH₂, cis), 5.29 (d, 1H, ³J_{trans} = 17.6 Hz, CH₂-CH=CH₂, trans), 5.39 (d, 1H, ³J_{1,2} = 3.1 Hz, Ara-1), 5.83 – 5.94 (m_c, 1H, CH₂-CH=CH₂), 7.17 – 7.43 (m, 29H, Bn, Fmoc-2, Fmoc-3, Fmoc-6, Fmoc-7), 7.68 – 7.72 (m, 3H, Fmoc-1, Fmoc-8, NH, Asn-α), 7.88 (d, 2H, ³J = 7.4 Hz,

Fmoc-4, Fmoc-5), 8.14 (d, 1H, $^3J_{\text{NH}, 2} = 8.5$ Hz, NHAc), 8.33 (d, 1H, $^3J_{\text{NH}, 1} = 9.2$ Hz, NH, Asn- ω).

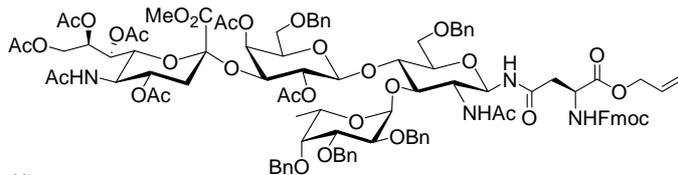
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, HMQC, in DMSO- d_6): δ (ppm) = 23.0 (CH₃, Ac), 36.9 (Asn- β), 46.6 (Fmoc-9), 50.4 (Asn- α), 53.5 (GlcNAc-4), 59.6 (Ara-5), 64.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-C}=\text{CH}_2$), 65.5 (CH₂, Fmoc), 65.8 (Gal-4), 67.7 (GlcNAc-6), 68.2 (Gal-6), 69.1 (Gal-2), 70.2, 70.5, 71.6, 71.7, 71.8 (CH₂Ph), 72.5 (Gal-5, Glc-2), 73.7 (Ara-2), 74.7 (Ara-4), 75.6 (GlcNAc-5), 75.9 (Ara-3), 76.2 (GlcNAc-3), 78.8 (Gal-3), 78.0 (GlcNAc-1), 96.1 (Ara-1), 102.0 (Gal-1), 117.5 (CH₂-CH= $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 120.1 (Fmoc-4, Fmoc-5), 125.2 (Fmoc-1, Fmoc-8), 126.9, 127.1, 127.3, 127.5, 127.6, 127.9, 128.1, 128.2, 128.3 (C_{aromat.}, Fmoc-2, Fmoc-3, Fmoc-6, Fmoc-7), 132.3 (CH₂- $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$), 138.3, 138.5, 139.0, 139.1, 139.3 (C_{aromat.}, ipso), 140.7 (Fmoc-4a, Fmoc-5a), 143.8 (Fmoc-1a, Fmoc-8a), 155.9 (C=O, Fmoc), 169.2, 169.8, 171.1 (C=O).

ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1422.62 [M+H]⁺, 1444.60 [M+Na]⁺, 1466.59 [M-H+2Na]⁺, 1573.76 [M+DIPEA+Na]⁺, 1681.93 [M+2DIPEA+H]⁺.

HR-ESI-MS (pos.): (m/z) = 1444.5073 (ber.: 1444.5092) [M+Na]⁺.

C₇₆H₈₃N₃O₂₂S (1422.5)

***N* ^{α} -Fluorenylmethoxycarbonyl-*N* ^{ω} -{2-acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-3-*O*-(methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat)- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-L-asparagin- α -allylester (72)**



(Fmoc-Asn-(β -Ac₆-Bn₅-sLe^xCO₂Me)-OAll)

Man löst 127 mg (321 μmol , 1.3 Äq) Fmoc-Asp-OAll (**56**) zusammen mit 103 mg (321 μmol , 1.3 Äq.) TBTU, 43 mg (321 μmol , 1.3 Äq.) HOBt-Monohydrat in 10 ml absolutem aminfreien DMF, versetzt mit 105 μl (640 μmol , 2.6 Äquiv.) DIPEA und rührt den Ansatz 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend werden 545 mg (521 μmol) des frisch hergestellten Sialyl-Lewis^x-Amins **70** in 3 ml abs. DMF zugegeben, und es wird weitere 15 h gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Hochvak. wird der Rückstand in 50 ml Dichlormethan aufgenommen, 3x mit je 30 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. gewaschen und über

MgSO₄ getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels i. Vak, Flashchromatographie (EE) und Gefriertrocknung aus Benzol liefern die glycosylierte Aminosäure.

Ausbeute: 223 mg (48%) farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D = -28.9$ ($c = 1.0$, CDCl₃), $R_t = 15.8$ min (Säule A1, Grad. A4), $R_f = 0.27$ (EE).

¹H-NMR (400 MHz, ¹H-¹H-COSY, in CDCl₃): δ (ppm) = 0.83 (d, 3H, ³J_{6,5} = 5.4 Hz, Fuc-6), 1.70 (t, 1H, ³J_{3,4} = ²J = 12.5 Hz, Sia-3a), 1.83, 1.88, 1.99, 2.01, 2.03, 2.05, 2.12, 2.20 (8x s, 24H, CH₃, Ac), 2.49 (dd, 1H, ³J_{3,4} = 4.1 Hz, ²J = 12.5 Hz, Sia-3b), 2.51 – 2.62 (m, 2H, Asn- β a, Asn- β b), 3.34 – 3.43 (m, 3H, Fuc-4 {3.37}, Gal-6a, Gal-6b), 3.63 (dd, 1H, ³J_{6,5} = 10.7 Hz, ³J_{6,7} = 2.7 Hz, Sia-6), 3.62 – 3.67 (m, 2H, Fuc-3 {3.64}, GlcNAc-6a {3.66}), 3.71 (m, 1H, Fuc-5), 3.77 (d, 1H, 3J_{5,6} = 5.1 Hz, Gal-5), 3.86 (s, 3H, COOCH₃), 3.85 – 3.96 (m, 4H, GlcNAc-6b {3.87}, GlcNAc-5, GlcNAc-3 {3.91}, Sia-9a {3.94}), 4.00 – 4.09 (m, 3H, GlcNAc-4 {4.01}, Sia-5 {4.03}, Fuc-2 {4.05}), 4.10 – 4.20 (m, 4H, GlcNAc-2 {4.11}, Fmoc-9 {4.17}, CH₂Ph {4.09}, CH₂a, Fmoc), 4.31 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.35 – 4.44 (m, 4H, Asn- α {4.37}, Sia-9b {4.38}, CH₂Ph {4.41}, CH₂b, Fmoc {4.43}), 4.48 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.56 (d, 1H, ²J = 11.7 Hz, CH₂Ph), 4.65 (dd, 1H, ³J_{3,2} = 10.4 Hz, ³J_{3,4} = 3.7 Hz, Gal-3), 4.67 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.69 (d, 1H, ³J_{1,2} = 8.0 Hz, Gal-1), 4.83 (d, 1H, ²J = 11.3 Hz, CH₂Ph), 4.90 (d, 1H, ²J = 11.5 Hz, CH₂Ph), 4.91 (m_c, 1H, Sia-4), 4.97 (dd, 1H, ³J_{2,1} = 8.0 Hz, ³J_{2,3} = 10.1 Hz, Gal-2), 4.99 (d, 1H, ³J_{1,2} = 3.9 Hz, Fuc-1), 5.07 (d, 1H, ³J_{4,3} = 3.7 Hz, Gal-4), 5.08 (m_c, 1H, GlcNAc-1), 5.11 (d, 1H, ³J_{NH,5} = 10.0 Hz, Sia-NHAc), 5.19 (dd, 1H, ³J_{cis} = 10.6 Hz, CH₂-CH=CH₂, cis), 5.27 (dd, 1H, ³J_{trans} = 17.2 Hz, CH₂-CH=CH₂, trans) 5.39 (dd, 1H, ³J_{7,6} = 2.6 Hz, ³J_{7,8} = 8.4 Hz, Sia-7), 5.52 (m_c, 1H, Sia-8), 5.81 – 5.91 (m_c, 1H, CH₂-CH=CH₂), 6.05 (d, 1H, ³J_{NH, α} = 8.8 Hz, NH, Asn- α), 6.89 (d, 1H, ³J_{NH,2} = 8.6 Hz, GlcNAc-NHAc), 7.12 – 7.40 (m, 29H, Bn, Fmoc-2, Fmoc-3, Fmoc-6, Fmoc-7), 7.58 (d, 2H, ³J = 7.2 Hz, Fmoc-1, Fmoc-8), 7.76 (d, 3H, ³J = ³J_{NH, β} = 7.4 Hz, Fmoc-4, Fmoc-5, NH, Asn- ω).

¹³C-NMR (100.6 MHz, BB, HMQC, in CDCl₃): δ (ppm) = 16.6 (Fuc-6), 20.7, 20.9, 21.0, 21.1, 21.5, 22.9, 23.3 (CH₃, Ac), 37.3 (Sia-3), 37.7 (Asn- β), 47.2 (Fmoc-9, GlcNAc-2), 49.3 (Sia-5), 50.6 (Asn- α), 53.3 (COOCH₃), 62.3 (Sia-9), 66.3 (CH₂-CH=CH₂), 67.4 (CH₂, Fmoc), 67.5 (Fuc-5), 67.7 (Sia-7, Gal-6), 67.9 (Sia-8), 68.2 (Gal-4), 68.4 (Sia-8), 69.4 (Sia-4), 69.8 (GlcNAc-6), 70.3 (Gal-2), 71.2 (Gal-3), 71.4 (Gal-5, GlcNAc-4), 72.0 (Sia-6), 72.3, 82.8, 72.9 (CH₂Ph), 73.4, 73.9 (GlcNAc-3, GlcNAc-5), 74.7, 74.9 (CH₂Ph), 76.3 (Fuc-2), 76.8 (Fuc-4), 77.6 (GlcNAc-1), 79.6 (Fuc-3), 97.0 (Sia-2), 98.1 (Fuc-1), 99.0 (Gal-1), 118.7 (CH₂-CH=CH₂), 120.1 (Fmoc-4, Fmoc-5), 125.3 (Fmoc-1, Fmoc-8), 127.0, 127.2, 127.4,

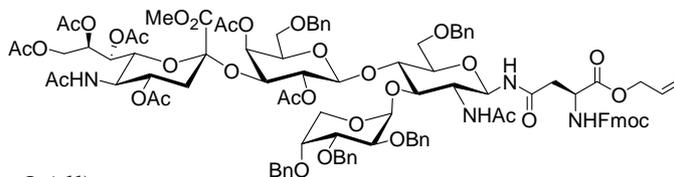
127.6, 127.8, 127.9, 128.3, 128.4, 128.6, 128.7, 128.9, 129.0 ($C_{\text{aromat.}}$, Fmoc-2, Fmoc-3, Fmoc-6, Fmoc-7), 131.8 ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$), 137.2, 137.8, 138.3, 138.4, 138.5 ($C_{\text{aromat.}}$, ipso), 141.3, 141.4 (Fmoc-4a, Fmoc-5a), 143.8, 144.0 (Fmoc-1a, Fmoc-8a), 156.4 ($\text{C}=\text{O}$, Fmoc), 168.0 (Sia-1), 169.8, 170.2, 170.3, 170.4, 170.8, 171.0, 171.1 ($\text{C}=\text{O}$).

ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1935.77 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1936.77 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (1x ^{13}C).

HR-ESI-MS (pos.): (m/z) = 1935.7437 (ber.: 1935.7420) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{101}\text{H}_{116}\text{N}_4\text{O}_{33}$ (1914.0)

***N*^α-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*^ω-{2-acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl-β-D-arabinopyranosyl)-4-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-3-*O*-(methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat)-β-D-galactopyranosyl]-6-*O*-benzyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl]-L-asparagin-α-allylester (71)**



(Fmoc-Asn-(β-Ac₆-Bn₅-Ara-sLe^xCO₂Me)-OAll)

Man löst 396 mg (1 mmol, 1.3 Äq.) Fmoc-Asp-OAll (**56**) zusammen mit 321 mg (1 mmol, 1.3 Äq.) TBTU, 135 mg (1 mmol, 1.3 Äq.) HOBt-Monohydrat in 40 ml absolutem, aminfreien DMF, versetzt mit 330 µl (2 mmol, 2.6 Äq.) DIPEA und rührt den Ansatz 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend werden 1.18 g des frisch hergestellten Sialyl-Lewis^x-Amins **69** (775 µmol), in 10 ml abs. DMF zugegeben, und es wird weitere 15 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Hochvak. wird der Rückstand in 100 ml Dichlormethan aufgenommen 3x mit je 50 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels i. Vak., Flashchromatographie (EE) und Gefriertrocknung aus Benzol liefern die glycosylierte Aminosäure.

Ausbeute: 750 mg (51%) farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_{\text{D}} = -39.3$ ($c = 1.0$, CDCl_3), $R_t = 17.7$ min (Säule A1, Grad. A4), $R_f = 0.25$ (EE).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, in CDCl_3): δ (ppm) = 1.73 (t, 1H, $^3J_{3,4} = ^2J = 12.3$ Hz, Sia-3a), 1.83, 1.86, 1.93, 2.01, 2.02, 2.08, 2.09, 2.23 (8x s, 24H, CH₃, Ac), 2.49 (dd, 1H, $^3J_{\beta,\alpha} = 4.1$ Hz, $^2J = 16.6$ Hz, Asn-βa), 2.54 – 2.64 (m, 2H, Asn-βb, Sia-3b), 3.40 – 3.49 (m, 4H, Ara-5a, Ara-5b, Gal-6a, Gal-6b), 3.57 (s_b, 1H, Ara-4), 3.61 – 3.68 (m, 3H, Sia-6 {3.63}),

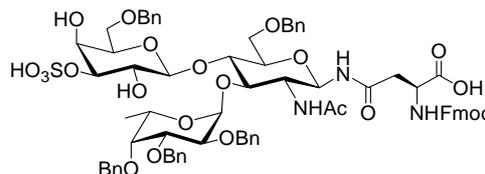
Ara-3 {3.65}, GlcNAc-6a {3.66}), 3.76 – 3.86 (m, 4H, GlcNAc-5 {3.76}, Gal-5 {3.79}, GlcNAc-3 {3.82}, GlcNAc-6b {3.85}), 3.85 (s, 3H, COOCH₃), 3.97 – 4.09 (m, 5H, Sia-9a {4.00}, GlcNAc-2 {4.04}, Sia-5 {4.05}, Ara-2 {4.07}, GlcNAc-4 {4.09}), 4.19 – 4.25 (m, 2H, Fmoc-9 {4.22}, CH₂a, Fmoc {4.22}), 4.29 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.34 – 4.38 (m, 2H, Sia-9b {4.36}, CH₂Ph), 4.42 – 4.5 (m, 3H, Sia-7 {4.45}, CH₂b, Fmoc {4.46}, CH₂Ph), 4.53 – 4.63 (m, 8H, Asn-α {4.55}, Gal-3 {4.60}, CH₂-CH=CH₂ {4.62}, CH₂Ph), 4.69 (d, 1H, ³J_{1,2} = 8.2 Hz, Gal-1), 4.83 (d, 1H, ²J = 11.1 Hz, CH₂Ph), 4.87 (d, 1H, ²J = 11.3 Hz, CH₂Ph), 4.91 (m_c, 1H, Sia-4), 4.94 – 4.97 (m, 1H, GlcNAc-1), 5.01 (dd, 1H, ³J_{2,1} = 8.0 Hz, ³J_{2,3} = 10.2 Hz, Gal-2), 5.03 (d, 1H, ³J_{4,3} = 3.7 Hz, Gal-4), 5.08 (d, 1H, ³J_{1,2} = 3.1 Hz, Ara-1), 5.14 (d, 1H, ³J_{NH,5} = 10.2 Hz, Sia-NHAc), 5.19 (dd, 1H, ²J = 1.4 Hz, ³J_{cis} = 10.4 Hz, CH₂-CH=CH₂, cis), 5.28 (dd, 1H, ²J = 1.4 Hz, ³J_{trans} = 17.2 Hz, CH₂-CH=CH₂, trans) 5.38 (dd, 1H, ³J_{7,6} = 2.5 Hz, ³J_{7,8} = 8.8 Hz, Sia-7), 5.55 (m_c, 1H, Sia-8), 5.81 – 5.91 (m_c, 1H, CH₂-CH=CH₂), 6.07 (d, 1H, ³J_{NH,α} = 9.2 Hz, NH, Asn-α), 7.07 (d, 1H, ³J_{NH,2} = 7.4 Hz, GlcNAc-NHAc), 7.15 – 7.40 (m, 29H, Bn, Fmoc-2, Fmoc-3, Fmoc-6, Fmoc-7), 7.59 (d, 2H, ³J = 7.4 Hz, Fmoc-1, Fmoc-8), 7.75 (d, 3H, ³J_{4,5} = ³J_{NH,β} = 7.2 Hz, Fmoc-4, Fmoc-5, NH, Asn-ω).

¹³C-NMR (100.6 MHz, BB, HMQC, in CDCl₃): δ (ppm) = 20.7, 20.9, 21.2, 21.5, 22.7, 23.3 (CH₃, Ac), 37.3 (Sia-3), 37.7 (Asn-β), 47.2 (Fmoc-9, GlcNAc-2), 49.3 (Sia-5), 50.6 (Asn-α), 53.3 (COOCH₃), 61.0 (Ara-5), 62.3 (Sia-9), 66.2 (CH₂-CH=CH₂), 67.3 (CH₂, Fmoc), 67.4 (Sia-7), 68.0 (Sia-8), 68.1 (Gal-6), 69.5 (Sia-4, GlcNAc-6), 70.6 (Gal-2), 71.4 (Gal-3), 71.6, 72.0 (CH₂Ph), 72.1 (Sia-6), 72.2 (GlcNAc-4), 72.4, 72.9 (CH₂Ph), 73.3 (Ara-4), 73.4 (GlcNAc-5), 75.1 (CH₂Ph), 77.0 (GlcNAc-3), 77.8 (Ara-3), 78.8 (GlcNAc-1), 97.0 (Sia-2), 98.8 (Ara-1), 99.4 (Gal-1), 118.6 (CH₂-CH=CH₂), 120.1 (Fmoc-4, Fmoc-5), 125.4 (Fmoc-1, Fmoc-8), 127.2, 127.5, 127.7, 127.8, 127.9, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 128.9, 129.0 (C_{aromat.}, Fmoc-2, Fmoc-3, Fmoc-6, Fmoc-7), 131.8 (CH₂-CH=CH₂), 137.3, 138.0, 138.2, 138.3, 138.4, 138.5 (C_{aromat.}, ipso), 141.3, 141.4 (Fmoc-4a, Fmoc-5a), 143.9, 144.1 (Fmoc-1a, Fmoc-8a), 156.4 (C=O, Fmoc), 168.0 (Sia-1), 169.8, 170.3, 170.6, 170.8, 171.0, 171.1 (C=O).
ESI-MS (Gerät 2, pos.): (m/z) = 1921.73 [M+Na]⁺, 1922.73 [M+Na]⁺ (1x ¹³C), 1937.72 [M+K]⁺, 1938.74 [M+K]⁺ (1x ¹³C).

HR-ESI-MS (pos.): (m/z) = 1921.7280 (ber.: 1921.7263) [M+Na]⁺.

C₁₀₀H₁₁₄N₄O₃₃ (1900.0)

***N*^α-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*^ω-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4-*O*-(6-*O*-benzyl-4-*O*-sulfoxy- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-L-asparagin (68)**
(Fmoc-Asn-(β -Bn₅-Sulfo-Le^x)-OH)



Man löst 1.2 g (793 μ mol) des rohen Allylesters **66** in 20 ml absolutem, sauerstofffreien THF, versetzt unter Argon mit 0.2 ml *N*-Methylanilin und zwei Spatelspitzen *Tetrakis*(triphenylphosphin)-palladium(0) und rührt den Ansatz unter Licht- und Sauerstoffausschluss bis zum vollständigen Umsatz (72h). Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt. Dazu werden zunächst die unpolaren Komponenten (Tol/EtOH = 10:1) und anschließend das reine Produkt (Tol/EtOH = 1:1) eluiert. Einengen i. Vak. und Gefriertrocknung aus Benzol liefern den fertigen Glycosylaminosäurebaustein in für die Peptidsynthese ausreichender Reinheit als farblosen Feststoff. Zur Aufnahme der korrelierten NMR-Spektren werden 30 mg mittels präparativer RP-DC (CHCl₃/MeOH = 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 776 mg (70%, bezogen auf das Le^x-Azid **47**) farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D = -35.9$ (c = 1.0, DMSO), $R_t = 39.8$ min (Säule A1, Grad. A2), $R_f = 0.80$ (RP-C₁₈, CH₃CN/H₂O = 2:1) ¹H-NMR (400 MHz, ¹H-¹H-COSY, in DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 1.06 (d, 3H, ³J_{6,5} = 6.1 Hz, Fuc-6), 1.22 (s, 3H, CH₃, Ac), 2.42 – 2.48 (m, 1H, Asn- β a), 2.66 (dd, 1H, ³J _{β , α} = 6.2 Hz, ²J = 17.0 Hz, Asn- β b), 3.33 (m, 1H, Gal-5), 3.43 (m, 1H, GlcNAc-3), 3.48 – 3.53 (m, 1H, Gal-2), 3.56 – 3.64 (m, 2H, Gal-6a {3.58}, GlcNAc-4 {3.60}), 3.66 – 3.84 (m, 4H, Gal-6b {3.69}, Fuc-2 {3.75}, GlcNAc-2 {3.80}, Fuc-4 {3.82}), 3.86 – 4.06 (m, 6H, Gal-3 {3.88}, Gal-4 {3.91}, GlcNAc-5 {3.91}, Fuc-3 {3.98}, GlcNAc-6a,b {4.01}), 4.18 – 4.28 (m, 3H, Fmoc-9 {4.20}, CH₂, Fmoc {4.25}), 4.31 – 4.42 (m, 5H, Asn- α {4.34}, Gal-1 {4.39}, 3x CH₂Ph), 4.44 (d, 1H, ²J = 10.8 Hz, CH₂Ph), 4.46 (d, 1H, ²J = 10.8 Hz, CH₂Ph), 4.53 (d, 1H, ²J = 11.9 Hz, CH₂Ph), 4.60 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.68 (s, 2H, CH₂Ph), 4.72 (d, 1H, ³J_{OH,4} = 4.1 Hz, Gal-4-OH), 4.78 (d, 1H, ²J = 11.2 Hz, CH₂Ph), 4.83 (q, 1H, ³J_{5,6} = 6.8 Hz, Fuc-5), 4.93 (t, 1H, ³J_{1,2} \approx ³J_{1,NH} = 8.0 Hz, GlcNAc-1), 5.16 (d, 1H, ³J_{OH,2} = 2.8 Hz, Gal-2-OH), 5.28 (d, 1H, ³J_{1,2} = 2.9 Hz, Fuc-1), 7.18 – 7.34 (m, 28 H, NH, Asn- α {7.22}, Fmoc-2, Fmoc-7, 25x Bn), 7.40 (dd, 2H, ³J = 7.2 Hz, Fmoc-3, Fmoc-6), 7.67 – 7.72 (m, 2H, Fmoc-1, Fmoc-8), 7.88 (t_b, 2H, ³J = 7.0 Hz, Fmoc-4, Fmoc-5), 8.12 (d, 1H, ³J_{NH,2} = 7.8 Hz, NH, Ac), 8.23 (d, 1H, ³J_{NH,1} = 9.6 Hz, NH, Asn- ω), 12.68 (s_b, 1H, COOH).}}}}}}

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, HSQC, in DMSO- d_6): δ (ppm) = 16.7 (Fuc-6), 23.4 (CH₃, Ac), 37.4 (Asn- β), 47.1 (Fmoc-9), 50.6 (Asn- α), 52.2 (GlcNAc-4), 65.6 (Fuc-5), 66.1 (CH₂, Fmoc), 66.4 (Gal-4), 68.2 (GlcNAc-6), 68.7 (Gal-6), 69.7 (Gal-2), 70.8, 72.2, 72.3, 72.4 (4x, CH₂Ph), 72.7 (Gal-5), 73.7 (GlcNAc-2), 74.9 (CH₂Ph), 74.4 (GlcNAc-5), 76.3 (Fuc-2), 76.8 (GlcNAc-3), 78.2 (Fuc-3), 78.9 (Fuc-4), 79.4 (GlcNAc-1), 79.7 (Gal-3), 96.0 (Fuc-1), 102.4 (Gal-1), 120.6 (Fmoc-4, Fmoc-5), 125.8 (Fmoc-1, Fmoc-8), 126.8, 127.1, 127.2, 127.4, 127.5, 127.6, 127.7, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4 (C_{aromat.}, Fmoc-2, Fmoc-3, Fmoc-6, Fmoc-7), 138.4, 138.9, 139.3, 139.4 (C_{aromat.}, ipso), 140.7 (Fmoc-4a, Fmoc-5a), 143.8 (Fmoc-1a, Fmoc-8a), 155.9 (C=O, Fmoc).

ESI-MS (neg., Gerät 1): (m/z) = 1394.55 [M-H]⁻.

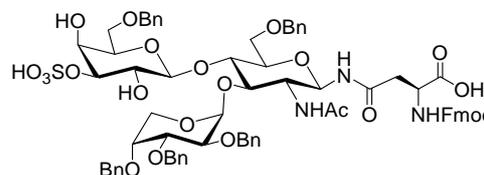
ESI-MS (pos., Gerät 2): (m/z) = 1396.63 [M+H]⁺.

HR-ESI-MS (pos.): (m/z) = 1396.5076 (ber.: 1396.5111) [M+H]⁺.

C₇₄H₈₁N₃O₂₂S (1396.5)

***N*^α-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*^ω-[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- β -D-arabinopyranosyl)-4-*O*-(6-*O*-benzyl-4-*O*-sulfoxy- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-L-asparagin (67)**

(Fmoc-Asn-(β -Bn₅-Ara-Sulfo-Le^x)-OH)



Man löst 1.13 g (795 μmol) des rohen Allylesters **65** in 60 ml absolutem, sauerstofffreien THF, versetzt mit 0.2 ml *N*-Methylanilin und 2 Spatelspitzen *Tetrakis*(triphenylphosphin)-palladium(0) und rührt den Ansatz unter Licht- und Sauerstoffausschluss bis zum vollständigen Umsatz. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel (Tol/EtOH 10:1 \rightarrow 1:1) gereinigt. Einengen i. Vak. und Gefriertrocknung aus Benzol liefern den fertigen Glycosylaminosäurebaustein in für die Peptidsynthese ausreichender Reinheit als farblosen Feststoff. Zur Aufnahme der korrelierten NMR-Spektren werden 30 mg mittels präparativer RP-DC (CHCl₃/MeOH = 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 556 mg (51%, bezogen auf das Le^x-Azid **46**) farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_{\text{D}} = -34.1$ (c = 1.0, DMSO), $R_t = 40.0$ min (Säule A1, Grad. A2), $R_f = 0.82$ (RP-C₁₈, CH₃CN/H₂O = 2:1) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, in DMSO- d_6): δ (ppm) = 1.23 (s, 3H, CH₃, Ac), 2.41 – 2.48 (m, 1H, Asn- β a), 2.65 (dd, 1H, $^3J_{\beta, \alpha} = 5.8$ Hz, $^2J = 16.0$ Hz, Asn- β b), 3.31 (m, 1H, Gal-5),

3.42 – 3.58 (m, 4H, GlcNAc-3 {3.44}, Ara-5a {3.49}, Gal-2 {3.53}, Gal-6a {3.55}), 3.62 – 3.73 (m, 2H, Gal-6b {3.64}, GlcNAc-6a {3.69}), 3.76 – 3.89 (m, 4H, GlcNAc-5 {3.78}, GlcNAc-2 {3.82}, Gal-4 {3.87}, Gal-3 {3.88}), 3.90 – 4.01 (m, 4H, Ara-2 {3.92}, GlcNAc-6b {3.96}, Ara-4 {3.96}, Ara-3 {3.99}), 4.08 (m, 1H, GlcNAc-4), 4.18 – 4.30 (m, 3H, Fmoc-9 {4.20}, CH₂, Fmoc {4.24}), 4.32 – 4.42 (m, 2H, Asn- α {4.35}, Gal-1 {4.38}), 4.31 (d, 1H, ²J = 10.4 Hz, CH₂Ph), 4.37 (d, 1H, ²J = 10.8 Hz, CH₂Ph), 4.41 (d, 1H, ²J = 10.4 Hz, CH₂Ph), 4.44 – 4.52 (m, 2H, CH₂Ph), 4.54 (s, 2H, CH₂Ph), 4.57 – 4.63 (m, 3H, Ara-5b {4.62}, 2x, CH₂Ph), 4.71 (d, 1H, ³J_{OH, 4} = 3.9 Hz, Gal-4-OH), 4.81 (t, 1H, ³J_{1, 2} \approx ³J_{1, NH} = 9.4 Hz, GlcNAc-1), 5.18 (d, 1H, ³J_{OH, 2} = 2.8 Hz, Gal-2-OH), 5.37 (d, 1H, ³J_{1, 2} = 3.3 Hz, Ara-1), 7.11 – 7.37 (m, 28 H, NH, Asn- α , Fmoc-2, Fmoc-7, 25x Bn), 7.40 (dd, 2H, ³J = 7.2 Hz, ³J = 13.7 Hz, Fmoc-3, Fmoc-6), 7.70 (m, 2H, Fmoc-1, Fmoc-8), 7.88 (t, 2H, ³J = 6.8 Hz, Fmoc-4, Fmoc-5), 8.14 (d, 1H, ³J_{NH, 2} = 8.4 Hz, NH, Ac) 8.25 (d, 1H, ³J_{NH, 1} = 9.4 Hz, NH, Asn- ω).

¹³C-NMR (100.6 MHz, BB, HSQC, in DMSO-d₆): δ (ppm) = 23.4 (CH₃, Ac), 37.3 (Asn- β), 47.0 (Fmoc-9), 50.5 (Asn- α), 53.0 (GlcNAc-4), 60.4 (Ara-5), 66.1 (CH₂, Fmoc), 66.6 (Gal-4), 68.3 (GlcNAc-6), 68.8 (Gal-6), 69.8 (Gal-2), 70.9, 71.1, 72.2, 72.4, 72.5 (5x CH₂Ph), 73.2 (Gal-5), 73.4 (GlcNAc-2), 74.3 (Ara-2), 75.4 (Ara-4), 76.2 (GlcNAc-5), 76.6 (Ara-3), 76.8 (GlcNAc-3), 79.6 (GlcNAc-1), 79.7 (Gal-3), 96.5 (Ara-1), 102.3 (Gal-1), 120.6 (Fmoc-4, Fmoc-5), 125.6 (Fmoc-1, Fmoc-8), 127.3, 127.5, 127.6, 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.3, 128.5, 218.6, 128.7 (C_{aromat.}, Fmoc-2, Fmoc-3, Fmoc-6, Fmoc-7), 138.8, 138.9, 139.4, 139.5, 139.6, 139.7 (C_{aromat., ipso}), 141.2 (Fmoc-4a, Fmoc-5a), 144.3 (Fmoc-1a, Fmoc-8a), 156.2, 156.3 (C=O).

ESI-MS (neg., Gerät 1): (m/z) = 1380.49 [M-H]⁻.

ESI-MS (pos., Gerät 2): (m/z) = 1382.58 [M+H]⁺, 1404.52 [M+Na]⁺, 1426.68 [M-H+2Na]⁺.

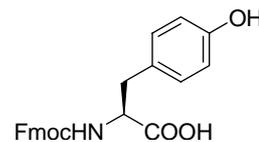
HR-ESI-MS (pos.): (m/z) = 1404.4761 (ber.: 1404.4774) [M+Na]⁺.

C₇₃H₇₉N₃O₂₂S (1382.5)

5.2.12 Synthese des sulfatierten Tyrosinbausteins

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-tyrosin (74)

(Fmoc-Tyr(OH)-OH)



Man suspendiert 10 g (58 mmol) L-Tyrosin in 60 ml Wasser, versetzt mit 10 ml (58 mmol) Triethylamin und einer Lösung von 17.6 g (51 mmol) Fmoc-OSu in 60 ml Acetonitril. Durch tropfenweise Zugabe von Triethylamin wird der pH-Wert bei 8.5 – 9 gehalten. Nach ca. 45 min bleibt der pH-Wert des Ansatzes konstant. Es wird filtriert, das Acetonitril i. Vak. entfernt und der wässrige Rückstand mit 1N HCl auf pH = 3 eingestellt. Man extrahiert 3x mit je 100 ml Essigester, trocknet über MgSO₄ und engt i. Vak. ein. Der Rückstand wird mit Diethylether zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 12.4 g (60%) farblose Kristalle, Schmp.: 183-186 °C (Zers.), $[\alpha]_D = -14.6$ (c = 1.0, DMF), $R_f = 0.43$ (EE + 1% AcOH).

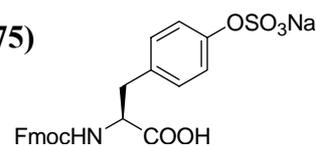
¹H-NMR (300 MHz, in CD₃CN / D₂O = 1:1): δ (ppm) = 2.88 (dd, 1H, ³J _{β, α} = 8.8 Hz, ²J = 14.0 Hz, Tyr- β a), 3.13 (dd, 1H, ³J _{β, α} = 3.3 Hz, ²J = 12.8 Hz, Tyr- β b), 4.29 – 4.40 (m, 4H, Tyr- α , Fmoc-9, CH₂, Fmoc), 6.80 (d, 2H, ³J = 7.9 Hz, arom.), 7.11 (d, 2H, ³J = 8.1 Hz, arom.), 7.36 – 7.41 (m, 3H, Fmoc-2, Fmoc-7, NH), 7.47 (t, 2H, ³J = 7.4 Hz, Fmoc-3, Fmoc-6), 7.64 (d, 2H, ³J = 7.4 Hz, Fmoc-1, Fmoc-8), 7.86 (d, 2H, ³J = 7.4 Hz, Fmoc-4, Fmoc-5).

¹³C-NMR (75.5 MHz, BB, in CD₃CN / D₂O = 1:1): δ (ppm) = 37.1 (Tyr- β), 47.8 (Fmoc-9), 56.4 (Tyr- α), 67.4 (CH₂, Fmoc), 116.1, 120.9, 126.1, 128.2, 128.8, 131.3 (C_{aromat.}), 142.0 (Fmoc-4a, Fmoc-5a), 144.7, 144.9 (Fmoc-1a, Fmoc-8a), 156.4, 157.5 (Tyr-1, Tyr-4), 157.5 (C=O, Fmoc), 175.0 (C=O).

ESI-MS (Gerät 1, pos.): (m/z) = 426.15 [M+Na]⁺, 448.14 [M-H+2Na]⁺, 829.32 [2M+Na]⁺, 873.29 [2M-2H+3Na]⁺.

ESI-MS (Gerät 1, neg.): (m/z) = 402.17 [M-H]⁻, 805.48 [2M-H]⁻, 827.50 [2M-2H+Na]⁻.

C₂₄H₂₁NO₅ (403.4)

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-O-sulfatyl-L-tyrosin-Natriumsalz (75)(Fmoc-Tyr(OSO₃Na)-OH)

Man löst 20 g (49.6 mmol) Fmoc-Tyr(OH)-OH (**74**) in einem Gemisch aus 128 ml DMF, 32 ml Pyridin und 16 ml Dioxan und gibt mit einem Mal 22.8 g (148.8 mmol, 3 Äquiv.) Schwefeltrioxid-DMF-Komplex zu. Es wird 15 h bei Raumtemp. gerührt, die Lösungsmittel werden i. Hochvak. entfernt und der Rückstand anschließend mit 250 ml Eiswasser versetzt. Man stellt binnen einer Stunde durch Zugabe von festem Na₂CO₃ einen pH-Wert von 6.5 ein. Die Lösung wird gefriergetrocknet und das Lyophilisat in DMF aufgenommen. Unlösliche Bestandteile werden durch Filtration über Hyflo[®] entfernt. DMF wird i. Hochvak. abdestilliert und der Rückstand durch Zugabe von Ethanol kristallisiert. Die Mutterlauge wird eingeeengt, in Methanol aufgenommen und durch Zugabe von Diethylether wird weiteres Produkt ausgefällt.

Ausbeute: 16.0 g (64%) farblose Kristalle, Schmp.: 224 °C (Zers.), $[\alpha]_D = +24.5$ (c = 1.0, MeOH), $R_f = 0.34$ (CHCl₃/MeOH/AcOH = 9:3:0.5).

¹H-NMR (400 MHz, ¹H-¹H-COSY, in DMSO-d₆): δ (ppm) = 2.88 (dd, 1H, ³J_{β,α} = 7.0 Hz, ²J = 13.8 Hz, Tyr-βa), 3.04 (dd, 1H, ³J_{β,α} = 4.5 Hz, ²J = 13.5 Hz, Tyr-βb), 3.94 (dd, 1H, ³J_{α,β} = 11.8 Hz, ³J_{α,NH} = 6.9 Hz, Tyr-α), 4.13 (dd, 1H, ³J_{CH₂,9} = 7.2 Hz, ²J = 9.9 Hz, CH₂a, Fmoc), 4.21 (t, 1H, ³J_{9,CH₂} = 6.9 Hz, Fmoc-9), 4.34 (dd, 1H, ³J_{CH₂,9} = 6.6 Hz, ²J = 9.9 Hz, CH₂b, Fmoc), 6.65 (d, 1H, ³J_{NH,α} = 7.2 Hz), 7.02 (d, 2H, ³J_{3,2} = 8.8 Hz, Tyr-3), 7.05 (d, 2H, ³J_{3,2} = 8.6 Hz, Tyr-2), 7.30 – 7.35 (m, 2H, Fmoc-2, Fmoc-7), 7.41 (t, 2H, ³J = 7.4 Hz, Fmoc-3, Fmoc-6), 7.66 (t, 2H, ³J = 6.8 Hz, Fmoc-1, Fmoc-8), 7.88 (d, 2H, ³J = 7.4 Hz, Fmoc-4, Fmoc-5).

¹³C-NMR (100.6 MHz, BB, HSQC, in DMSO-d₆): δ (ppm) = 37.1 (Tyr-β), 47.2 (Fmoc-9), 57.4 (Tyr-α), 67.8 (CH₂, Fmoc), 120.4 (Tyr-3), 120.5 (Fmoc-4, Fmoc-5), 125.6 (Fmoc-1, Fmoc-8), 127.6 (Fmoc-2, Fmoc-7), 128.1 (Fmoc-3, Fmoc-6), 130.2 (Tyr-2), 141.1 (Fmoc-4a, Fmoc-5a), 144.4 (Fmoc-1a, Fmoc-8a), 152.0 (Tyr-1), 155.8 (Tyr-4), 155.8 (C=O, Fmoc), 174.8 (C=O).

FT-IR (KBr): ν = 1054.8 cm⁻¹ (S=O), 1258.8 cm⁻¹ (S-O).

ESI-MS (neg., Gerät 1): (m/z) = 482.01 [M-Na]⁻, 504.08 [M-H]⁻.

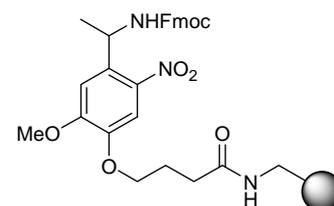
ESI-MS (pos., Gerät 2): (m/z) = 528.08 [M+Na]⁺, 550.06 [M-H+2Na]⁺.

HR-ESI-MS (pos.): (m/z) = 528.0720 (ber.: 528.0705) [M+Na]⁺.

C₂₄H₂₀NO₈SNa (505.5)

5.2.13 Synthese der Peptide und Glycopeptide

Beladung von Aminomethylpolystyrol-Harz mit 4-{4-[1-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl-amino)ethyl]-2-methoxy-5-nitrophenoxy}buttersäure (84**)**
(Fmoc-Photolinker-AMPS-Harz)



Man überführt 1 g AMPS-Harz (Fa. *Fluka*, 100 – 200 mesh, Beladung: 1.1 mmol/g, 1.1 mmol), in einen Festphasenreaktor nach Merrifield und quillt 1h mit 20 ml Dichlormethan vor. Anschließend wird das Harz 2x mit je 20 ml DMF gewaschen. 1.14 g (2.2 mmol, 2 Äq.) des Photolinkers (**89**) werden zusammen mit 749 mg (2.2 mmol, 2 Äquiv.) TBTU und 359 mg (2.2 mmol, 2 Äquiv.) HOBt-Monohydrat in 30 ml absolutem, aminfreien DMF gelöst, mit 481 μ l (4.4 mmol, 4 Äquiv) *N*-Methylmorpholin versetzt und 10 min unter Lichtausschluss gerührt. Die so voraktivierte Kupplungslösung wird in den Festphasenreaktor mit dem Harz überführt und der Ansatz 15 h unter Lichtausschluss geschüttelt. Man filtriert die Reagenzien ab und wäscht 3 x mit je 20 ml DMF und 3 x mit je 20 ml Dichlormethan nach. Zum Capping von nicht umgesetzten Aminofunktionen wird das Harz mit 30 ml eines Gemisches von Pyridin und Acetanhydrid (3:1) versetzt und 1 h geschüttelt. Im Anschluss werden die Polymerkügelchen insgesamt 6x wechselweise mit je 20 ml Methanol und 20 ml Dichlormethan gewaschen und i. Hochvak. getrocknet. Man erhält 1.56 g gelbes beladenes Harz. Zur photometrischen Bestimmung der Beladung werden 20 mg des Harzes mit 18.07 g Piperidin/DMF (1:1) behandelt. Die Messung der charakteristischen UV-Absorption ($\lambda = 278$ nm) der Abspaltung liefert eine Fmoc-Konzentration von $c = 0.768$ mmol/g. Dies entspricht einer Kupplungsausbeute von 70%.

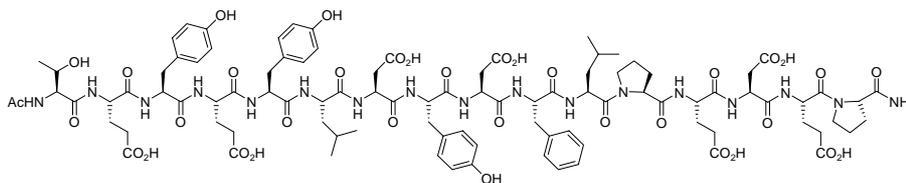
Die Synthesen der Peptide und Glycopeptide werden an einem Peptidsynthesizer ABI 433A der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt. Als polymerer Träger wird das mit dem photolabilen Anker funktionalisierte AMPS-Harz **84** verwendet.

Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppen wird das Harz bis zur vollständigen Umetzung jeweils 2.5 min mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in NMP behandelt. Die Reaktionskontrolle erfolgt dabei mittels Messung der charakteristischen UV-Absorption des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes. Die Kupplungen der jeweiligen Aminosäurebausteine erfolgen unter Standardbedingungen (1 mmol Aminosäure, 1 mmol HBTU, 1 mmol HOBt, 2 mmol DIPEA). Dazu wird die Aminosäure mit den Kupplungsreagenzien vermischt und anschließend in den

Reaktor überführt. Während des Kupplungsvorganges (20 min) wird der Ansatz durch starkes Schütteln (Vortex) durchmischt.

Im Anschluss an jeden Kupplungsschritt werden nicht umgesetzte Aminogruppen durch Umsetzung mit einem Capping-Reagenz (0.5M Ac₂O, 0.125M DIPEA, 0.015M HOBt in NMP) acetyliert. Nach jedem Reaktionsschritt wird die Reaktionslösung vom Polymer durch Filtration entfernt, das Harz mit NMP gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

***N*-Acetyl-L-threonyl-L-glutamyl-L-tyrosyl-L-glutamyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-tyrosyl-L-aspartyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-L-prolyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-prolylamid (97)**



(AcHN-Thr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Leu-Asp-Tyr-Asp-Phe-Leu-Pro-Glu-Asp-Glu-Pro-NH₂)

Synthese des benzylgeschützten Peptids (97):

Zur Synthese der Peptidsequenz werden 130 mg (0.1 mmol) des mit dem Photolinker beladenen AMPS-Harzes **84** (Beladung: 0.78 mmol/g) eingesetzt. Die funktionalisierten Aminosäurebausteine werden im 10fachen Überschuß (1 mmol) nach dem Standardverfahren am Synthesizer gekuppelt. Im Anschluss an die Synthese der Sequenz wird die terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und das freie Amin acetyliert.

Zur Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger wird das Harz aus dem Synthesizer-Reaktor in einen Festphasenreaktor nach *Merrifield* überführt und in 10 ml THF gequollen. Nach Zugabe von 50 µl Propandithiol wird 3 h unter Bestrahlung mit einer 450W-Quecksilberdampf-Lampe geschüttelt. Die Abspalllösung wird filtriert und das Harz 5x mit je 10 ml THF gewaschen. Dieser Prozess wird 5x wiederholt und die Filtrate werden vereinigt. Nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. wird der Rückstand mit Wasser versetzt und gefriergetrocknet.

Rohausbeute: 68 mg (23% bezogen auf die Beladung des Harzes) leicht gelbliches Lyophilisat, $[\alpha]_D = -28.2$ ($c = 1.0$, CHCl₃), $R_t = 33.6$ min (Säule A2, Grad. A5).

¹H-NMR (400 MHz, ¹H-¹H-COSY, in DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 0.83 (m, 18H, 4x Leu- δ {0.76}, 1x Thr- γ {0.83}, CH₃, Ac), 1.54 – 2.03 (m, 22H, 2x Leu- γ {1.59}, 4x Glu- β a {1.75}, 2x Pro- γ a {1.75}, 2x Pro- β a {1.77}, 2x Leu- β a {1.78}, 4x Glu- β b {1.82}, 2x Pro- γ b {1.85}, 2x

Leu- β b {1.99}, 2x Pro- β b {2.00}), 2.25 – 2.32 (m, 8H, 4x Glu- γ a {2.27}, 4x Glu- γ b {2.30}), 2.49 – 2.98 (m, 14H, 3x Asp- β a {2.50}, 1x Phe- β a {2.51}, 3x Tyr- β a {2.60}, 1x Phe- β b {2.63}, 3x Asp- β b {2.71}, 3x Tyr- β b {2.95}), 3.35 (m, 2H, 2x Pro- δ a), 3.49 (m, 2H, 2x Pro- δ b, unter H₂O), 3.85 (m, 1H, Thr- β , unter H₂O), 4.14 – 4.52 (m, 16H, 2x Pro- α {4.18}, 2x Leu- α {4.26}, 1x Thr- α {4.32}, 4x Glu- α {4.34}, 1x Phe- α {4.42}, 3x Tyr- α {4.49}, 3x Asp- α {4.50}), 4.48 - 5.09 (m, 22H, CH₂Ph), 6.78 – 6.91 (m, 6H, 3x Tyr- γ), 7.08 – 7.24 (m, 11H, 3x Tyr- δ , Phe-CH), 7.27 – 7.51 (m, 55H, arom., Bn), 7.60 – 8.42 (m, 18H, 1x Phe-NH {7.97}, 3x Asp-NH {7.98}, 1x Thr-NH {7.99}, 4x Glu-NH, {7.99}, 3x Tyr-NH {8.08}, 2x Leu-NH {8.14}, 1x Pro-CONH₂ {8.25}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, BB, HSQC, in DMSO-d₆): δ (ppm) = 21.4 (Leu- δ), 22.9 (Thr- γ), 23.6 (CH₃, Ac), 23.9 (Leu- γ), 24.1 (Pro- γ), 24.3 (Glu- β), 28.9 (Leu- β), 29.1 (Pro- β), 29.7 (Glu- γ), 36.2 (Tyr- β), 37.1 (Phe- β), 37.2 (Asp- β), 46.5 (Pro- δ), 50.2 (Asp- α), 52.0 (Leu- α), 53.8 (Phe- α), 54.1 (Tyr- α), 57.6 (Glu- α), 59.7 (Thr- α), 59.8 (Pro- α), 60.0, 60.1, 60.3, 60.4, 60.8 (CH₂Ph), 74.3 (Thr- β), 114.0 (Tyr-3, Tyr-5), 126.0 (Phe-2, Phe-3, Phe-5, Phe-6), 127.9, 128.0, 128.2, 218.3, 128.4, 128.5, 128.8 (C_{aromat.}, Bn), 129.9 (Phe-4), 129.6, 130.2, 130.6, 130.7 (C_{aromat.}, ipso., Bn), 130.0 (Tyr-2, Tyr-6), 136.6 (Tyr-1), 137.6 (Phe-1), 157.4 (Tyr-4), 165.4, 169.5, 189.9, 170.3, 171.2, 172.3, 174.4 (C=O).

C₁₇₃H₁₉₃N₁₇O₃₅ (3070.5)

Abspaltung der Benzylgruppen (97):

Man suspendiert 1 Spatelspitze Palladium (10% auf Aktivkohle) in 10 ml abs. Ethanol, evakuiert mehrfach und flutet mit Wasserstoff. Der Katalysator wird 2 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wird die Lösung des rohen benzylgeschützten Peptids **96** über eine Kanüle zugegeben. Nach 4 d (Reaktionskontrolle mittels analytischer RP-HPLC) wird der Katalysator durch Zentrifugieren entfernt und mehrmals gründlich mit Methanol gewaschen (Suspendieren, Ultraschall, Zentrifugieren). Die methanolische Lösung wird i. Vak. eingeeengt, mit Wasser versetzt und lyophilisiert. Zur Entfernung unpolarer Verunreinigungen wird der so erhaltene Rückstand mehrfach mit je 20 ml H₂O extrahiert und dieser wässrige Auszug gefriergetrocknet. Man erhält das deblockierte Peptid als farblosen Feststoff.

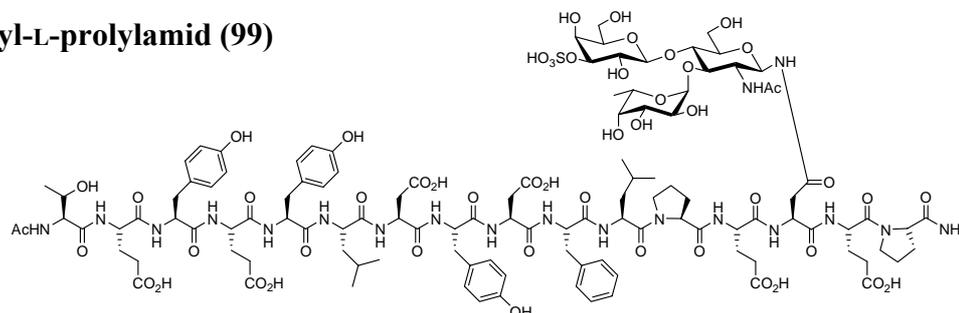
Ausbeute: 38 mg (83% bezogen auf das Rohpeptid, 19% bezogen auf die Beladung des Harzes) farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_D = -25.7$ ($c = 1.0$, H₂O), $R_t = 10.3$ min (Säule A1, Grad. A6).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, in DMSO- d_6): δ (ppm) = 0.77 – 0.89 (m, 18H, 4x Leu- δ {0.82}, 1x Thr- γ {0.84}, CH₃, Ac), 1.56 – 2.02 (m, 22H, 2x Leu- β_a {1.57}, 2x Leu- γ {1.58}, 2x Leu- β_b {1.62}, 4x Glu- β_a {1.67}, 2x Pro- β_a {1.75}, 2x Pro- γ_a {1.81}, 2x Pro- γ_b {1.85}, 4x Glu- β_b {1.86}, 2x Pro- β_b {2.00}), 2.11 – 2.29 (m, 8H, 4x Glu- γ_a {2.16}, 4x Glu- γ_b {2.25}), 2.49 – 3.02 (m, 16H, 1x Phe- β_a {2.51}, 1x Phe- β_b {2.61}, 3x Asp- β_a {2.64}, 3x Tyr- β_a {2.71}, 3x Asp- β_b {2.86}, 2x Pro- δ_a {2.90}, 3x Tyr- β_b {2.99}), 3.56 (m, 2H, 2x Pro- δ_b , unter H₂O), 3.95 (m, 1H, Thr- β , unter H₂O), 4.15 – 4.50 (m, 16H, 2x Leu- α {4.17}, 2x Pro- α {4.19}, 4x Glu- α {4.31}, 1x Thr- α {4.32}, 3x Tyr- α {4.37}, 3x Asp- α {4.47}, 1x Phe- α {4.48}), 6.58 – 6.64 (m, 6H, 3x Tyr- γ), 6.99 (d, 6H, $^3J = 7.0$ Hz, 3x Tyr- δ), 7.12 – 7.26 (m, 5H, Phe-CH), 7.60 – 8.42 (m, 18H, 1x Phe-NH {7.96}, 3x Asp-NH {7.98}, 1x Thr-NH {8.00}, 4x Glu-NH, {8.01}, 3x Tyr-NH {8.06}, 2x Leu-NH {8.12}, 1x Pro-CONH₂ {8.24}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, BB, HSQC, HMBC, in DMSO- d_6): δ (ppm) = 22.0 (Leu- δ), 23.4 (Thr- γ), 24.4 (Leu- γ), 24.7 (Pro- γ), 26.7 (CH₃, Ac), 27.6 (Glu- β), 29.0 (Leu- β), 29.6 (Pro- β), 30.6 (Glu- γ), 36.6 (Asp- β), 37.6 (Phe- β), 37.9 (Tyr- β), 47.1 (Pro- δ), 50.2 (Asp- α), 52.5 (Leu- α), 54.0 (Phe- α), 54.6 (Tyr- α), 54.9 (Glu- α), 59.7 (Pro- α), 59.8 (Thr- α), 67.0 (Thr- β), 115.3 (Tyr-3, Tyr-5), 126.5, 128.1, 128.2 (Phe-2, Phe-3, Phe-5, Phe-6), 129.4 (Phe-4), 130.4 (Tyr-2, Tyr-6), 135.4 (Tyr-1), 137.3 (Phe-1), 155.8 (Tyr-4), 161.3, 169.4, 170.4, 170.5, 172.0, 172.5, 174.5 (C=O).

C₉₆H₁₂₇N₁₇O₃₅ (2077.9)

***N*-Acetyl-L-threonyl-L-glutamyl-L-tyrosyl-L-glutamyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-tyrosyl-L-aspartyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-L-prolyl-L-glutamyl-(2-acetamido-3-*O*-L-fucopyranosyl-4-*O*-[3-sulfatyl- β -D-galactopyranosyl]-2-desoxy- β -D-glucopyranyl)-L-aspartyl-L-glutamyl-L-prolylamid (**99**)**



(AcHN-Thr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Leu-Asp-Tyr-Asp-Phe-Leu-Pro-Glu-Asp(β -Sulfo-Le^x)-Glu-Pro-NH₂)

Synthese des benzylgeschützten Glycopeptids (98):

Zur Synthese der Peptidsequenz werden 130 mg (0.1 mmol) des mit dem Photolinker beladenen AMPS-Harzes **84** (Beladung: 0.78 mmol/g) eingesetzt. Die funktionalisierten Aminosäurebausteine werden im 10fachen Überschuß (1 mmol) nach dem Standardverfahren am Synthesizer gekuppelt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure (2 Äquiv.) erfolgt unter manueller Aktivierung mit HATU/HOAt und *N*-Methylmorpholin in NMP. Außerdem wird die Reaktionszeit für diesen Schritt auf 5 h ausgedehnt. Im Anschluss an die Synthese der Sequenz wird die terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und das freie Amin acetyliert.

Zur Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger wird das Harz aus dem Synthesizer-Reaktor in einen Festphasenreaktor nach *Merrifield* überführt und in 10 ml THF gequollen. Nach Zugabe von 50 μ l Propandithiol wird 3 h unter Bestrahlung mit einer 450W-Quecksilberdampf-Lampe geschüttelt. Die Abspalllösung wird filtriert und das Harz noch 5x mit je 10 ml THF gewaschen. Nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. wird der Rückstand mit Wasser versetzt und gefriergetrocknet.

Rohausbeute: 105 mg (26%, bezogen auf die Beladung des Harzes) leicht gelbliches Lyophilisat, $[\alpha]_D = -25.8$ ($c = 1.0$, CHCl₃), $R_t = 33.8$ min (Säule A2, Grad. A5).

¹H-NMR (400 MHz, ¹H-¹H-COSY, in DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 0.82 (m_c, 21H, 4x Leu- δ , {0.77}, 1x Thr- γ {0.81} 2x, CH₃, Ac), 1.01 (d, 3H, ³J_{6,5} = 6.1 Hz, Fuc-6), 1.54 – 2.08 (m, 22H, 2x Leu- γ {1.56}, 4x Glu- γ a {1.74}, 2x Pro- γ a {1.75}, 2x Pro- β a {1.76}, 2x Leu- β a {1.77}, 4x Glu- β b {1.84}, 2x Pro- γ b {1.86}, 2x Pro- β b {1.99}, 2x Leu- β b {2.01}), 2.24 – 2.52 (m, 12H, 4x Glu- γ a {2.27}, 4x Glu- γ b {2.31}, 1x Phe- β a {2.50}, 3x Asp- β a {2.51}), 2.58 – 2.88 (m,

10H, 3x Tyr-βa {2.60}, 1x Phe-βb {2.62}, 3x Asp-βb {2.69}, 3x Tyr-βb {2.95}), 3.32 – 3.61 (m, 9H, Gal-5 {3.30}, 2x Pro-δa {3.34}, GlcNAc-3 {3.41}, Gal-2 {3.46}, 2x Pro-δb {3.50}, Gal-6a {3.58}, GlcNAc-4 {3.60}), 3.66 – 4.02 (m, 11H, Gal-6b {3.68}, Fuc-2 {3.75}, GlcNAc-2 {3.80}, Fuc-4 {3.81}, GlcNAc-5 {3.86}, Gal-3 {3.87}, Thr-γ {3.88}, Gal-4 {3.92}, Fuc-3 {3.97}, GlcNAc-6a {4.00}, GlcNAc-6b {4.00}), 4.16 – 4.80 (m, 38H, 2x Pro-α {4.18}, 2x Leu-α {4.26}, 1x Thr-α {4.31}, 4x Glu-α {4.33}, Gal-1 {4.38}, 1x Phe-α {4.43}, 3x Tyr-α {4.48}, 3x Asp-α {4.52}, Gal-2-OH {4.68}, 10x CH₂Ph), 4.82 – 5.18 (m, 15H, Fuc-5 {4.84}, GlcNAc-1 {4.90}, Gal-4-OH {5.15}, 6x CH₂Ph), 5.23 (d, 1H, ³J_{1,2} = 3.1 Hz, Fuc-1), 6.76 – 6.89 (m, 6H, 3x Tyr-γCH), 7.08 – 7.24 (m, 1H, 3x Tyr-δCH, Phe-CH), 7.25 – 7.41 (m, 80H, arom., Bn), 7.68 – 8.28 (m, 20H, 1x Phe-NH {7.95}, 4x Glu-NH {7.96}, 1x Thr-NH {8.03}, 2x Leu-NH {8.11}, 3x Asp-NH {8.12}, GlcNAc-NHAc {8.12}, 1x Pro-CONH₂ {8.20}, 1x Asn-^oNH {8.23}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, BB, HSQC, in DMSO-d₆): δ (ppm) = 16.7 (Fuc-6), 18.7 (CH₃, Ac), 22.0 (Leu-δ), 23.3 (Thr-γ), 24.2 (Leu-γ), 24.3 (CH₃, Ac), 25.0 (Glu-β), 25.1 (Pro-γ), 29.3 (Leu-β), 29.5 (Pro-β), 30.2 (Glu-γ), 36.6 (Tyr-β), 37.4 (Phe-β), 39.3 (Asp-β), 46.6 (Pro-δ), 49.8 (Asp-α), 52.0 (Leu-α), 52.3 (GlcNAc-4), 54.1 (Tyr-α), 54.3 (Phe-α), 57.5 (Glu-α), 59.5 (Thr-α), 59.7 (Pro-α), 65.8 (Fuc-5), 65.9 (CH₂Ph), 66.2 (Gal-4), 68.1 (GlcNAc-6), 68.7 (Gal-6), 69.5 (CH₂Ph), 69.9 (Gal-2), 70.7, 70.9, 72.0, 72.2, 72.3 (CH₂Ph), 72.8 (Gal-5), 73.4 (GlcNAc-2), 73.6, 74.9 (CH₂Ph), 75.0 (Thr-β), 75.3 (GlcNAc-5), 76.2 (Fuc-2), 76.8 (GlcNAc-3), 78.4 (Fuc-3), 78.9 (Fuc-4), 79.4 GlcNAc-1), 79.5 (Gal-3), 96.1 (Fuc-1), 102.3 (Gal-1), 114.6 (Tyr-3, Tyr-5), 125.9 (Phe-2, Phe-3, Phe-4, Phe-5, Phe-6), 126.7, 127.1, 128.2, 127.4, 127.5, 127.6, 127.8, 128.0, 128.1, 218.3, 128.4, 128.5, 128.7, 128.8 (C_{aromat.}, Bn), 129.7 (Phe-4), 129.5, 130.1, 130.5, 130.6 (C_{aromat.}, ipso., Bn), 130.5 (Tyr-2, Tyr-6), 136.6 (Tyr-1), 137.6 (Phe-1), 157.2 (Tyr-4), 165.3, 169.6, 189.9, 170.2, 171.1, 172.3, 174.3 (C=O).

C₂₂₁H₂₅₁N₁₉O₅₁S (4021.5)

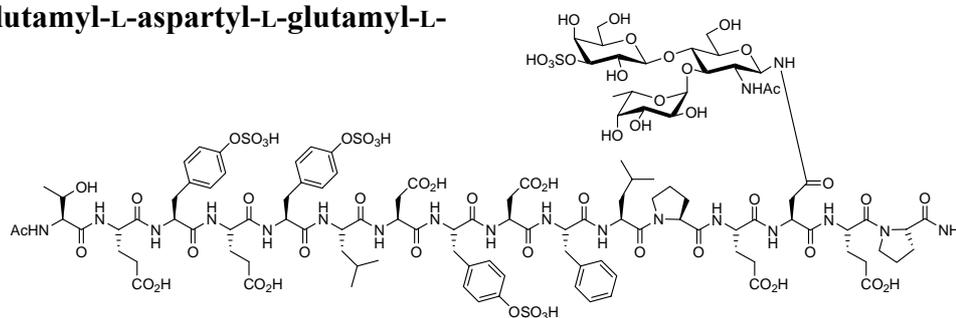
Abspaltung der Benzylgruppen (99):

Man suspendiert 1 Spatelspitze Palladium (10% auf Aktivkohle) in 10 ml abs. Ethanol, evakuiert mehrfach und flutet mit Wasserstoff. Der Katalysator wird 2 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt und anschließend die Lösung des rohen benzylgeschützten Peptids **98** über eine Kanüle zugegeben. Nach 4 d (Reaktionskontrolle mittels analytischer RP-HPLC) wird der Katalysator durch Zentrifugieren entfernt und mehrmals gründlich mit Methanol

gewaschen (Suspendieren, Ultraschall, Zentrifugieren). Die methanolische Lösung wird i. Vak. eingengt, mit Wasser versetzt und lyophilisiert. Man erhält 78 mg eines leicht gelblichen Lyophilisats ($R_t = 6.9$ min, Säule A1, Grad. A6). Isolierung des gewünschten Produkts mittels semipräparativer RP-HPLC gelingt nicht.

$C_{116}H_{161}N_{19}O_{51}S$ (2669.7)

***N*-Acetyl-L-threonyl-L-glutamyl-(*O*-sulfatyl-L-tyrosyl)-L-glutamyl-(*O*-sulfatyl-L-tyrosyl)-L-leucyl-(2-acetamido-3-*O*-L-fucopyranosyl-4-*O*-[3-sulfatyl- β -D-galactopyranosyl]-2-desoxy- β -D-glucopyranyl)-L-aspartyl-(*O*-sulfatyl-L-tyrosyl)-L-aspartyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-L-prolyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-prolinylamid (101)**



(AcHN-Thr-Glu-Tyr(OSO₃H)-Glu-Tyr(OSO₃H)-Leu-Asp-Tyr(OSO₃H)-Asp-Phe-Leu-Pro-Glu-Asp(β -Sulfo-Le^x)-Glu-Pro-NH₂)

Synthese des benzylgeschützten Glycopeptids (100):

Zur Synthese der Peptidsequenz werden 130 mg (0.1 mmol) des mit dem Photolinker beladenen AMPS-Harzes **84** (Beladung: 0.78 mmol/g) eingesetzt. Die Kupplung der ersten acht Aminosäuren (Pro⁵⁹ – Asp⁵²) erfolgt nach dem Standardprotokoll am Synthesizer. Die Kupplung der Glycosylaminosäure (2 Äquiv.) erfolgt unter manueller Aktivierung mit HATU/HOAt und *N*-Methylmorpholin in NMP. Außerdem wird die Reaktionszeit für diesen Schritt auf 6 h ausgedehnt. Nach den ersten acht Kupplungsschritten wird das Harz in einen Festphasenreaktor nach Merrifield überführt und die verbleibenden acht Aminosäuren manuell nach dem nachstehenden Protokoll gekuppelt.

Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgt durch 90minütige Behandlung mit einer 50%igen Lösung von Morpholin in DMF. Zur Kupplung wird die Carbonsäure im zehnfachen Überschuss eingesetzt, mit TBTU, HOBT und NMM aktiviert und 20 h gekuppelt. Das anschließende Capping erfolgt durch 20minütiges Schütteln mit einer 25%igen Lösung von

Acetanhydrid in Pyridin. Zwischen den jeweiligen Syntheseschritten wird das Harz sechsmal mit je 10 ml DMF gewaschen.

Im Anschluss an die Synthese der Sequenz wird die terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und das freie Amin acetyliert.

Zur Abspaltung des Peptids vom Polymeren Träger wird das Harz in 10 ml THF gequollen, mit 50 μ l Propandithiol versetzt und 3 h unter Bestrahlung mit einer 450W-Quecksilberdampf-Lampe geschüttelt. Die Abspatlösung wird filtriert und das Harz 5x mit je 10 ml THF gewaschen. Nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. wird der Rückstand mit Wasser versetzt und gefriergetrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wird per analytischer RP-HPLC auf Einheitlichkeit geprüft und ohne weitere Charakterisierung in die Folgestufe eingesetzt.

Rohausbeute: 312 mg (78% bezogen auf die Beladung des Harzes), $R_t = 25.8$ min (Säule A2, Grad. A5).

$C_{200}H_{233}N_{19}O_{60}S_4$ (3991.3)

Abspaltung der Benzylgruppen:

Man suspendiert 2 Spatelspitzen Palladium(II)-acetat in 15 ml Ethanol p.a. und rührt 90 min unter Wasserstoffatmosphäre. Nach Zugabe des rohen Glycopeptids **100** (200 mg gelöst in 5 ml Ethanol) zur schwarzen Katalysatorsuspension wird der Ansatz weitere 3 Tage bis zum vollständigen Umsatz hydriert. Die Reaktionskontrolle erfolgt dabei mittels analytischer RP-HPLC. Filtration und Einengen i. Vak. liefern das Rohprodukt als gelbes Öl. Die Reinigung erfolgt durch semipräparative RP-HPLC ($R_t = 23.8$ min, Säule S1, Grad. S1).

Rohausbeute: 82 mg (36%) gelbes Öl, $R_t = 11.2$ min (Säule A2, Grad. A6).

MALDI-ToF-MS (pos., *dhb*): (m/z) = 1497.53 $[M-2H+4Na]^{2+}$, 1529.48 $[M-4H+5Na+K]^{2+}$, 2909.87 $[M+1+H]^+$.

$C_{116}H_{161}N_{19}O_{60}S_4$ (2907.9)

6 Literaturverzeichnis

- ¹ E. Fischer, *Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine I und II*, J. Springer Verlag, Berlin, **1925**.
- ² A. Gottschalk, *Glycoproteins*, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, **1970**.
- ³ R. C. Hughes, *Membrane Glycoproteins*, Butterworth, London, **1976**.
- ⁴ R. Kannagi, *Glycoconjugate J.*, **1997**, *14*, 577-584.
- ⁵ H. Kunz, *Angew. Chem.*, **1987**, *99*, 297-311.
- ⁶ J. Sprent, *Cell*, **1994**, *76*, 315.
- ⁷ K. Vleminckx, R. Kemler, *BioEssays*, **1999**, *21*, 211-220.
- ⁸ S. Shattil, M. H. Ginsberg, *J. Clin. Invest.*, **1997**, *100*, 1.
- ⁹ G. M. Edelman, K. L. Crossin, *Annu. Rev. Biochem.*, **1991**, *60*, 155.
- ¹⁰ E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C.-H. Wong, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 833.
- ¹¹ F. M. Unger, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **2001**, *57*, 207.
- ¹² C. Ehrhardt, C. Kneuer, U. Bakowsky, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2004**, *56*, 527.
- ¹³ N. Sharon, H. Lis, *Spektrum der Wissenschaft*, **1993**(3), 66.
- ¹⁴ H. Kobayashi, K. C. Boelte, P. C. Lin, *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*, 377-386.
- ¹⁵ M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S. I. Hakomori, J. C. Paulson, *Science*, **1990**, *250*, 1130.
- ¹⁶ M. P. Bevilacqua, S. Stengelin, M. A. Gimbrone jr., B. Seed, *Science*, **1989**, *243*, 1160.
- ¹⁷ C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *Immunologie*, 5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **2002**.
- ¹⁸ O. Dwir, A. Solomon, S. Mangan, G. S. Kansas, U. S. Schwarz, R. Alon, *J. Cell Biol.*, **2003**, *163*, 649.
- ¹⁹ S. B. Forlow, K. Ley, *Am. J. Heart Circ. Physiol.*, **2001**, *280*, 634.
- ²⁰ T. N. Mayadas, R. C. Johnson, H. Rayburn, R. O. Hynes, D. D. Wagner, *Cell*, **1993**, *74*, 541-554.
- ²¹ M. L. Arbones, D. C. Ord, K. Ley, H. Ratech, C. Maynard-Curry, D. J. Capon, T. F. Tedder, *Immunity*, **1994**, *1*, 247-260.
- ²² W. M. Gallatin, I. L. Weissman, E. C. Butcher, *Nature*, **1983**, *305*, 30.
- ²³ S. Hsu-Lin, C. L. Berman, B. C. Furie, D. August, B. Furie, *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 9121-9126.
- ²⁴ M. P. Bevilacqua, J. S. Prober, D. L. Mendrick, R. S. Cotran, M. A. Gimbrone jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, *84*, 9238-9242.
- ²⁵ H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 637-674
- ²⁶ K.-S. Huang, B. J. Graces, B. A. Wolitzki, in *Functional Analysis of Selectin Structure*, Vol. 3, (Ed.: D. Vestweber), Harwood, Amsterdam, **1997**, S. 1.
- ²⁷ M. L. Phillips, B. R. Schwartz, A. Etzioni, R. Bayer, H. D. Ochs, J. C. Paulson, J. M. Harlan, *J. Clin. Invest.*, **1995**, *96*, 2898.
- ²⁸ A. Karsan, C. J. Cornejo, R. K. Winn, B. R. Schwartz, W. Way, N. Lannir, R. Gershoni-Baruch, A. Etzioni, H. D. Ochs, J. M. Harlan, *J. Clin. Invest.*, **1998**, *101*, 2438.
- ²⁹ K. Lühn, T. Marquardt, E. Harms, D. Vestweber, *Blood*, **2001**, *97*, 330-332.

- ³⁰ G. S. Kansas, K. B. Saunders, K. Ley, A. Zakrzewics, R. M. Gibson, B. Furie, B. C. Furie, T. F. Tedder, *J. Cell. Biol.*, **1994**, *124*, 609.
- ³¹ A. Giannis, *Angew. Chem.*, **1994**, *106*, 188.
- ³² S. Hemmerich, H. Leffler, S. D. Rosen, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 12035-12047.
- ³³ S. Baumhueter, M. S. Singer, W. Henzel, S. Hemmerich, M. Renz, S. D. Rosen, L. A. Lasky, *Science*, **1993**, *262*, 436-438.
- ³⁴ S. Hemmerich, E. C. Butcher, S. D. Rosen, *J. Exp. Med.*, **1994**, *180*, 2219-2226.
- ³⁵ D. Crommie, S. D. Rosen, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 22614-22624.
- ³⁶ E. L. Berg, L. M. McEvoy, C. Berlin, R. F. Bargatze, E. C. Butcher, *Nature*, **1993**, *366*, 695-698.
- ³⁷ C. Berlin, E. L. Berg, M. J. Briskin, D. P. Andrew, P. J. Kilshaw, B. Holzmann, I. L. Weissman, A. Hamann, E. C. Butcher, *Cell*, **1993**, *74*, 185-195..
- ³⁸ B. Walchek, K. L. Moore, R. P. McEver, T. K. Kishimoto, *J. Clin. Invest.*, **1996**, *98*, 1081.
- ³⁹ R. P. McEver, J. H. Beckstead, K. L. Moore, L. Marshal-Carlson, D. F. Bainton, *J. Clin. Invest.*, **1989**, *84*, 92-99.
- ⁴⁰ T. F. Tedder, D. A. Steeber, A. Chen, P. Engel, *FASEB J.*, **1995**, *9*, 866-873.
- ⁴¹ C. J. Fleming, G. Berger, J. Guichard, E. M. Cramer, D. D. Wagner, *Eur. J. Cell. Biol.*, **1998**, *75*, 331.
- ⁴² K. L. Moore, N. L. Stults, S. Diaz, D. L. Smith, R. D. Cummings, A. Varki, R. P. McEver, *J. Cell. Biol.*, **1992**, *118*, 445.
- ⁴³ D. Sako, K. M. Commess, K. M. Barone, R. T. Camphausen, D. A. Cumming, G. D. Shaw, *Cell*, **1995**, *83*, 323.
- ⁴⁴ T. Pouyani, B. Seed, *Cell*, **1995**, *83*, 333.
- ⁴⁵ V. Rmachandran, M. U. Nollert, H. Qiu, W.-J. Liu, R. D. Cummings, C. Zhu, R. P. McEver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 13771.
- ⁴⁶ P. Mehta, K. D. Patel, T. M. Laue, H. P. Erickson, R. P. McEver, *Blood*, **1997**, *90*, 2381.
- ⁴⁷ W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen, *Cell*, **2000**, *103*, 467.
- ⁴⁸ W. S. Somers, R. T. Camphausen, *RCSB Protein Data Bank*, **2001**.
- ⁴⁹ G. S. Kansas, *Blood*, **1996**, *88*, 3259.
- ⁵⁰ A. Levinovitz, J. Mühlhoff, S. Isenmann, D. Vestweber, *J. Cell. Biol.*, **1993**, *121*, 449.
- ⁵¹ M. Steegmaier, A. Levinovitz, S. Isenmann, E. Borges, M. Lenter, H. P. Kocher, B. Kleuser, D. Vestweber, *Nature*, **1995**, *373*, 615.
- ⁵² M. Lenter, A. Levinovitz, S. Isenmann, D. Vestweber, *J. Cell. Biol.*, **1994**, *125*, 471.
- ⁵³ D. Vestweber, J. E. Blanks, *Physiological Reviews*, **1999**, *79*, 181.
- ⁵⁴ W. Sluiter, A. Pietersma, J. M. J. Lamers, J. F. Koster, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1993**, *22*, 37-44.
- ⁵⁵ T. Ochi, S. hokomori, M. Fujimoto, M. Okamura, H. Owaki, S. Wakitani, Y. Shimaoka, K. Hayashida, T. Tomita, S. Kawamura, K. Ono, *J. Rheumatol.*, **1993**, 2038-2045.
- ⁵⁶ M. Buerke, A. S. Weyrich, Z. Zheng, F. C. A. Gaeta, M. J. Forrest, A. M. Lefer, *J. Clin. Invest.*, **1994**, *93*, 1140-1148.
- ⁵⁷ M. S. Mulligan, J. C. Paulson, S. DeFrees, Z.-L. Zheng, J. B. Lowe, P. A. Ward, *Nature*, **1993**, *364*, 149-151.
- ⁵⁸ T. Nakashio, T. Narita, M. Sato, S. Akiyama, Y. Kasai, M. Fujiwara, K. Ito, H. Takagi, R. Kannagi, *Anticancer Res.*, **1997**, *17*, 293-299.

- ⁵⁹ R. Renkonen, P. Mattila, M.-L. Majuri, J. Rabinä, S. Toppila, J. Renkonen, L. Hirvas, J. Niitymäki, J. P. Turunen, O. Renkunen, T. Paavonen, *Glycoconjugate J.*, **1997**, *14*, 593-600.
- ⁶⁰ R. Kanagi, *Glycoconjugate J.*, **1997**, *14*, 577-584.
- ⁶¹ L. Borsig, *News Physiol. Sci.*, **2004**, *19*, 16-21.
- ⁶² J. Y. Ramphal, Z.-L. Zheng, C. Perez, L. E. Walker, S. A. DeFrees, F. C. A. Gaeta, *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 3459-3463.
- ⁶³ B. K. Bradley, M. Kiso, S. Abbas, P. Nikrad, O. Srivasatava, C. Foxall, Y. Oda, A. Hasegawa, *Glycobiology*, **1993**, *3*, 633-641.
- ⁶⁴ W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **1994**, *106*, 2186-2188.
- ⁶⁵ R. Banteli, B. Ernst, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 459-462.
- ⁶⁶ D. Tyrell, P. James, N. Rao, C. Foxall, S. Abbas, F. Dasgupta, M. Nashed, A. Hasegawa, M. Kiso, D. Asa, J. Kidd, B. K. Bradley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, 10372-10376.
- ⁶⁷ M. J. Bamford, M. Bird, P. M. Gore, D. S. Holmes, R. Priest, J. C. Prodger, V. Saez, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 239-244.
- ⁶⁸ T. B. Kogan, B. M. Revelle, S. Tapp, D. Scott, P. J. Beck, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 14047.
- ⁶⁹ H. Ohmoto, K. Nakamura, T. Inoue, N. Kondo, Y. Inoue, K. Yoshino, H. Kondo, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 1339.
- ⁷⁰ H. C. Kolb, B. Ernst, *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 1571-1578.
- ⁷¹ G. Thoma, W. Kinzy, C. Brums, J. T. Patton, J. L. Magnani, R. Banteli, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4909-4913.
- ⁷² S. A. DeFrees, F. C. A. Gaeta, Y.-C. Lin, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 7549-7550.
- ⁷³ G. Thoma, J. L. Magnani, J. T. Patton, B. Ernst, W. Jahnke, *Angew. Chem.*, **2001**, *113*, 1995-1999.
- ⁷⁴ R. Banteli, B. Ernst, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 4059.
- ⁷⁵ T. P. Kogan, B. Dupré, K. M. Keller, I. L. Scott, H. Bui, R. V. Market, P. J. Beck, J. A. Voytus, B. M. Revelle, D. Scott, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 4976-4984.
- ⁷⁶ N. Kaila, L. Chen, B. E. Thomas IV, D. Tsao, S. Tam, P. W. Bedard, R. T. Camphausen, J. C. Alvarez, G. Ullas, *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 1563.
- ⁷⁷ M. Rösch, H. Herzner, W. Dippold, M. Wild, D. Vestweber, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **1997**, *5*, 238.
- ⁷⁸ M. W. Cappi, W. J. Moree, L. Qiao, T. G. Marron, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*, 283.
- ⁷⁹ G. Baisch, R. Öhrlein, A. Katopodis, M. Streiff, F. Kolbinger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 2447.
- ⁸⁰ C. L. Martens, S. E. Cwirla, R. Y.-W. Lee, E. Whitehorn, E. Y.-F. Chen, A. Bakker, E. L. Martin, C. Wagstrom, P. Gopalan, C. W. Smith, E. Tate, K. J. Koller, P. J. Schatz, W. J. Dower, R. W. Barrett, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 21129.
- ⁸¹ C.-H. Wong, F. Moris-Varas, S.-C. Hung, T. G. Marron, C.-C. Lin, K. W. Gong, G. Weitz-Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 8152-8158.
- ⁸² M. Hayashi, M. Tanaka, M. Itoh, H. Myauchi, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 2938-2945.
- ⁸³ J. P. Turunen, M.-L. Majuri, A. Seppo, S. Tiisala, T. Paavonen, M. Miyasaka, K. Lemström, L. Pentillä, O. Renkonen, R. Renkonen, *J. Exp. Med.*, **1995**, *182*, 1133-1142.
- ⁸⁴ V. H. Thomas, Y. Yang, K. G. Rice, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 19035-19040.
- ⁸⁵ U. Sprengard, G. Kretzschmar, E. Bartnik, C. Hüls, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **1995**, *107*, 1104.
- ⁸⁶ U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 359-362.

- ⁸⁷ C. Filser, D. Kowalczyk, C. Jones, M. Wild, D. Vestweber, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **2007**, *119*, 2155-2159.
- ⁸⁸ M. Hahne, U. Jäger, S. Isenmann, R. Hallmann, D. Vestweber, *J. Cell. Biol.*, **1993**, *121*, 655.
- ⁸⁹ K. Baumann, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, *47*, 3445-3449.
- ⁹⁰ N. Kaila, B. E. Thomas IV, *Med. Res. Rev.*, **2002**, *6*, 566-601.
- ⁹¹ B. Neubacher, D. Schmidt, P. Ziegelmüller, J. Thiem, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 1551-1556.
- ⁹² O. Blixt, J. C. Paulson, *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, *345*, 687-690.
- ⁹³ C. Unverzagt, *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 2507-2510.
- ⁹⁴ A. Kameyama, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.*, **1991**, *209*, c1-c4.
- ⁹⁵ A. Kameyama, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.*, **1990**, *200*, 269-285.
- ⁹⁶ K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, N. J. Bockovich, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 870-872.
- ⁹⁷ Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron*, **1990**, *46*, 89-102.
- ⁹⁸ S. J. Danishefsky, J. Gervay, J. M. Peterson, F. E. McDonald, K. Koseki, D. A. Griffith, T. Oriyama, S. P. Marsden, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 1940-1953.
- ⁹⁹ G. Dekany, K. Wright, I. Toth, *J. Carbohydr. Chem.*, **1997**, *16*, 983-999.
- ¹⁰⁰ G. Kretschmar, W. Stahl, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 6341-6358.
- ¹⁰¹ H. Kondo, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 8748-8750.
- ¹⁰² G. J. McGarvey, C.-H. Wong, *Liebigs Ann. Recl.*, **1997**, 1059-1074.
- ¹⁰³ O. T. Schmidt in: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. II, (Hrsg.: R. L. Whistler, M. L. Wolfrom, J. N. BeMiller), Academic Press Inc., New York, London, **1963**, 318-325.
- ¹⁰⁴ X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 6569-6578.
- ¹⁰⁵ J. Zhang, P. Kováč, *J. Carbohydr. Chem.*, **1999**, *18*, 461.
- ¹⁰⁶ H. Herzner, J. Eberling, M. Schultz, J. Zimmer, H. Kunz, *J. Carbohydr. Chem.*, **1999**, *17*, 759-776.
- ¹⁰⁷ E. Eichler, H. J. Jennings, M. Gilbert, D. M. Whitfield, *Carbohydr. Res.*, **1999**, *319*, 1-16.
- ¹⁰⁸ R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.*, **1980**, *92*, 763-764.
- ¹⁰⁹ Y. Inouye, K. Onodera, S. Kitaoka, S. Hirano, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, *78*, 4722-4726.
- ¹¹⁰ F. Micheel, F.-P. van de Kamp, H. Petersen, *Chem. Ber.*, **1957**, *90*, 521-526.
- ¹¹¹ D. Horton, *Org. Synth.*, **1966**, *46*, 1-5.
- ¹¹² K. von dem Bruch, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1993**.
- ¹¹³ C. Unverzagt, H. Kunz, *J. Prakt. Chem.*, **1992**, *334*, 570-578.
- ¹¹⁴ F. Micheel, H. Wulff, *Chem. Ber.*, **1956**, *89*, 1521-1530.
- ¹¹⁵ G. Zemplén, A. Kunz, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1923**, *56*, 1705-1710.
- ¹¹⁶ M. A. E.-M. Shaban, R. W. Jeanloz, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1981**, *54*, 3570-3576.
- ¹¹⁷ H. Lönn, *Carbohydr. Res.*, **1985**, *139*, 105-113.
- ¹¹⁸ B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinaÿ (Hrsg.), *Carbohydrates in Chemistry und Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- ¹¹⁹ A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.*, **1989**, *187*, 35-42.
- ¹²⁰ R. Kuhn, P. Lutz, D. L. MacDonald, *Chem. Ber.*, **1966**, *99*, 611-617.
- ¹²¹ A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.*, **1989**, *190*, 317-322.
- ¹²² J. Xue, Y. Pan, Z. Guo, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 1599-1602.
- ¹²³ S. Sato, M. Mori, Y. Ito, T. Ogawa, *Carhydr. Res.*, **1986**, *155*, C6.

- ¹²⁴ R. U. Lemieux, K. B. Hendriks, R. V. Stick, K. James, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 4056.
- ¹²⁵ P. J. Garegg, H. Hultberg, S. Wallin, *Carbohydr. Res.*, **1982**, *108*, 97.
- ¹²⁶ M. P. DeNinno, J. B. Etienne, K. C. Duplantier, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 669.
- ¹²⁷ M. Sakagami, H. Hamana, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 5547.
- ¹²⁸ S. S. Bhattacharjee, P. A. J. Gorin, *Can. J. Chem.*, **1969**, *47*, 1195.
- ¹²⁹ R. R. Schmidt, *Angew. Chem.*, **1986**, *98*, 213.
- ¹³⁰ H. Paulsen, *Angew. Chem.*, **1982**, *94*, 184.
- ¹³¹ J. R. Turvey, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **1965**, *20*, 183-218.
- ¹³² R. K. Jain, R. Vig, R. D. Lock, A. Mohamad, K. L. Matta, *J. Chem. Comm.*, **1996**, 65-67.
- ¹³³ W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretzschmar, D. W. Schmidt, H. Kunz, *J. Prakt. Chem.*, **1995**, *337*, 441-445.
- ¹³⁴ O. Knöll, *Dissertation*, **2004**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- ¹³⁵ D. Wagner, J. P. H. Verheyden, J. G. Moffat, *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 24-30.
- ¹³⁶ C. Augé, S. David, A. Veyrières, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1976**, 375-376.
- ¹³⁷ R. M. Munavu, H. H. Szmant, *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 1832-1836.
- ¹³⁸ M. A. Nashed, L. Anderson, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 3503-3506.
- ¹³⁹ M. A. Nashed, L. Anderson, *Carbohydr. Res.*, **1977**, *56*, 325-329.
- ¹⁴⁰ B. Guilbert, N. J. Davis, S. L. Flitsch, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 6563-6566.
- ¹⁴¹ A. Lubineau, R. Lemoine, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 8795-8796.
- ¹⁴² A. Rösch, *Dissertation*, **2005**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- ¹⁴³ S. J. Blunden, P. A. Cusack, P. J. Smith, *J. Organomet. Chem.*, **1987**, *325*, 141-152.
- ¹⁴⁴ S. David, S. Hanessian, *Tetrahedron*, **1985**, *41*, 643-663.
- ¹⁴⁵ G. J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 4539-4565.
- ¹⁴⁶ A. J. Ratliffe, B. Fraser-Reid, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1990**, 747-750.
- ¹⁴⁷ R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett*, **1990**, 694-696.
- ¹⁴⁸ A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, K. Hotta, H. Ishida, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.*, **1991**, *10*, 493-498.
- ¹⁴⁹ I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. Hervé du Penhoat, J.-M. Mallet, V. Michon, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.*, **1993**, *246*, 13-22.
- ¹⁵⁰ W. Birberg, H. Lönn, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 7457-7458.
- ¹⁵¹ H. Hori, T. Nakajima, Y. Nishida, H. Ohri, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 6317-6320.
- ¹⁵² U. Dabrowski, H. Friebolin, R. Brossmer, M. Supp, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 4637.
- ¹⁵³ D. J. M. van der Vleugel, W. A. R. van Heeswijk, J. F. G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.*, **1982**, *102*, 121.
- ¹⁵⁴ H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.*, **1984**, *125*, 47.
- ¹⁵⁵ K. Okamoto, H. Kondo, T. Goto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1987**, *60*, 637.
- ¹⁵⁶ H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem.*, **1985**, *97*, 885.
- ¹⁵⁷ H. Kunz, H. Waldmann, J. März, *Liebigs Ann. Chem.*, **1989**, 45-49.
- ¹⁵⁸ S. A. Kales, S. B. Daniels, F. Alberico, *Anal. Biochem.*, **1993**, *212*, 208.
- ¹⁵⁹ A. Trezeciak, W. Bannwarth, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 4557-4560.
- ¹⁶⁰ R. Knorr, A. Trezeciak, W. Bannwarth, D. Gillesen, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 1927-1930.
- ¹⁶¹ V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *19*, 1269-1272.
- ¹⁶² L. A. Carpino, A. El-Faham, C. Minor, F. Alberico, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, 201-203.
- ¹⁶³ J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 1067-1068.

- ¹⁶⁴ J. C. Sheehan, P. A. Cruikshank, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 2492-2493.
- ¹⁶⁵ B. Belleau, G. Malek, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 1651-1652.
- ¹⁶⁶ Y. Kiso, H. Yajima, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1972**, 942-943.
- ¹⁶⁷ U. Sprengard, *Dissertation*, **1996**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- ¹⁶⁸ L. Abdelmoty, F. Alberico, L. A. Carpino, B. M. Foxman, S. A. Kates, *Lett. Pept. Sci.*, **1994**, 57.
- ¹⁶⁹ L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.*, **2002**, 114, 458-461.
- ¹⁷⁰ H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 4495-4537.
- ¹⁷¹ W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **1970**, 103, 788-798.
- ¹⁷² L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 4397-4398.
- ¹⁷³ M. Ciommer, H. Kunz, *Synlett.*, **1991**, 593-595.
- ¹⁷⁴ B. M. Trost, *Pure and Appl. Chem.*, **1981**, 53, 2357-2370.
- ¹⁷⁵ H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **1984**, 96, 49-50.
- ¹⁷⁶ H. X. Zhang, F. Guibé, G. Balavoine, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 619-622.
- ¹⁷⁷ T. Yagami, S. Shiwa, S. Futaki, K. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, 41(2), 376.
- ¹⁷⁸ R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154.
- ¹⁷⁹ E. Atherton, R. C. Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **1989**.
- ¹⁸⁰ L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 5748-5749.
- ¹⁸¹ S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 1328.
- ¹⁸² M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 4005.
- ¹⁸³ H. Rink, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 1145.
- ¹⁸⁴ K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1991**, 37, 513.
- ¹⁸⁵ D. G. Mullen, G. Barany, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 5240.
- ¹⁸⁶ R. Ramage, C. A. Barron, S. Bielecki, D. W. Thomas, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 4105.
- ¹⁸⁷ H.-G. Chao, M. S. Bernatowicz, P. D. Reiss, C. E. Klimas, G. R. Matsueda, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 1746.
- ¹⁸⁸ M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **2002**, 114, 315.
- ¹⁸⁹ H. Kunz, B. Dombo, *Angew. Chem.*, **1988**, 100, 732.
- ¹⁹⁰ B. Blankenmeyer-Menge, R. Frank, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 5871.
- ¹⁹¹ F. Guibe, O. Dangles, G. Balavoine, A. Loffet, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 2641.
- ¹⁹² O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **1995**, 107, 901.
- ¹⁹³ R. Warras, G. Jung (Hrsg.), *Combinatorial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- ¹⁹⁴ D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1973**, 610.
- ¹⁹⁵ F. S. Tjoeng, G. A. Heavner, *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 355.
- ¹⁹⁶ C. P. Holmes, D. G. Jones, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 2318.
- ¹⁹⁷ A. R. Mitchell, S. B. H. Kent, M. Engelhard, R. B. Merrifield, *J. Org. Chem.*, **1978**, 30, 2845.
- ¹⁹⁸ R. G. W. Norrish, *Trans. Faraday Soc.*, **1937**, 33, 1521.
- ¹⁹⁹ P. J. Wagner, *Acc. Chem. Res.*, **1971**, 4, 168.
- ²⁰⁰ D.D. Perrin, E. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed., Pergamon Press, Oxford, **1988**.

-
- ²⁰¹ J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Praxis der Organischen Chemie*, VCH, Weinheim, **1996**.
- ²⁰² L. Paquette, *Dictionary of Organic Reagents*, Wiley, **1995**.
- ²⁰³ W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 2923.
- ²⁰⁴ International Union of Applied Chemistry and International Union of Applied Biochemistry, *Pure, Appl. Chem.*, **1984**, *56*, 595.
- ²⁰⁵ *Advanced Chemical Handbook of Combinatorial & Solid Phase Synthesis*, **1998**.
- ²⁰⁶ J. Stanek, A. Sele, R. Jaques, A. Rossi, *Helv. Chim. Acta*, **1972**, *55*, 434-446.
- ²⁰⁷ G. Hummel, R. R. Schmidt, *Pol. J. Chem.*, **1999**, *73*, 941-954.
- ²⁰⁸ Y. Inouye, K. Onodera, S. Kitaoka, H. Ochiai, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *79*, 4218-4222.
- ²⁰⁹ K. Donsbach, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1996**.
- ²¹⁰ F. D. Trooper, F. O. Andersson, S. Cao, R. Roy, *J. Carbohydr. Chem.*, **1992**, *11*, 741-750.

7 Spektrenanhang

7.1 Übersicht über den Spektrenanhang

7.1.1 Spektren des Galactose-Bausteins

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyl-trichloracetimidat (**7 α**)

7.1.2 Spektren des *N*-Acetylglucosamin-Bausteins

2-Acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (**13**)

7.1.3 Spektren des Fucose-Bausteins

Ethyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-thio- α -L-fucopyranosid (**18 α**)

7.1.4 Spektren des Arabinose-Bausteins

Ethyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-thio- α -D-arabinopyranosid (**23 α P**)

7.1.5 Spektren des *N*-Acetylneuraminsäure-Bausteins

O-Ethyl-*S*-[methyl-(5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]dithiocarbonat (**28**)

7.1.6 Spektren des Asparaginsäure-Bausteins

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-asparaginsäure- α -allylester (**56**)

7.1.7 Spektren der Disaccharide

2-Acetamido-3-*O*-(2',3',4'-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (**34**)

2-Acetamido-3-*O*-(2',3',4'-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (**36**)

7.1.8 Spektren der Trisaccharide

2-Acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4-*O*-(6-*O*-benzyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (**38**)

2-Acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4-*O*-(6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (**40**)

2-Acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4-*O*-(6-*O*-benzyl-4-*O*-sulfatyl- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-azid (**47**)

7.1.9 Spektren der Tetrasaccharide

2-Acetamido-4-*O*-{2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-3-*O*-[methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat]- β -D-galacto-pyranosyl}-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid (**52**)

7.1.10 Spektren der glycosylierten Aminosäuren

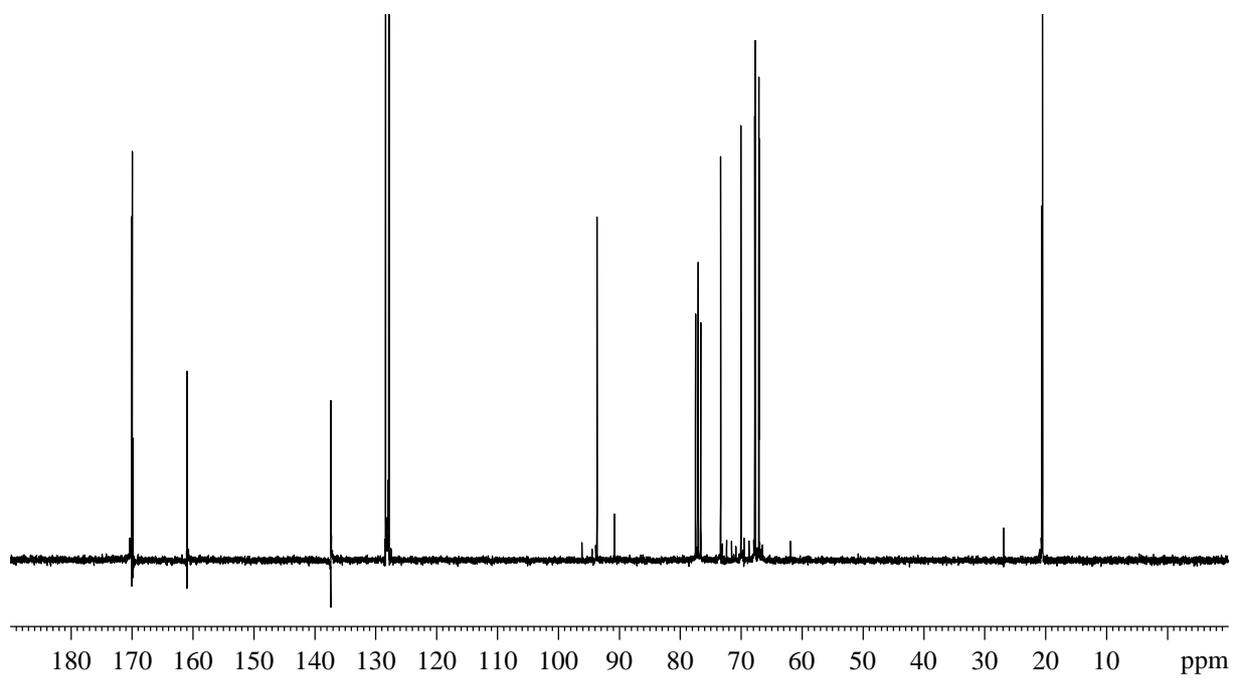
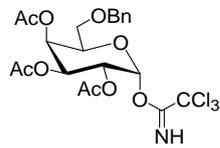
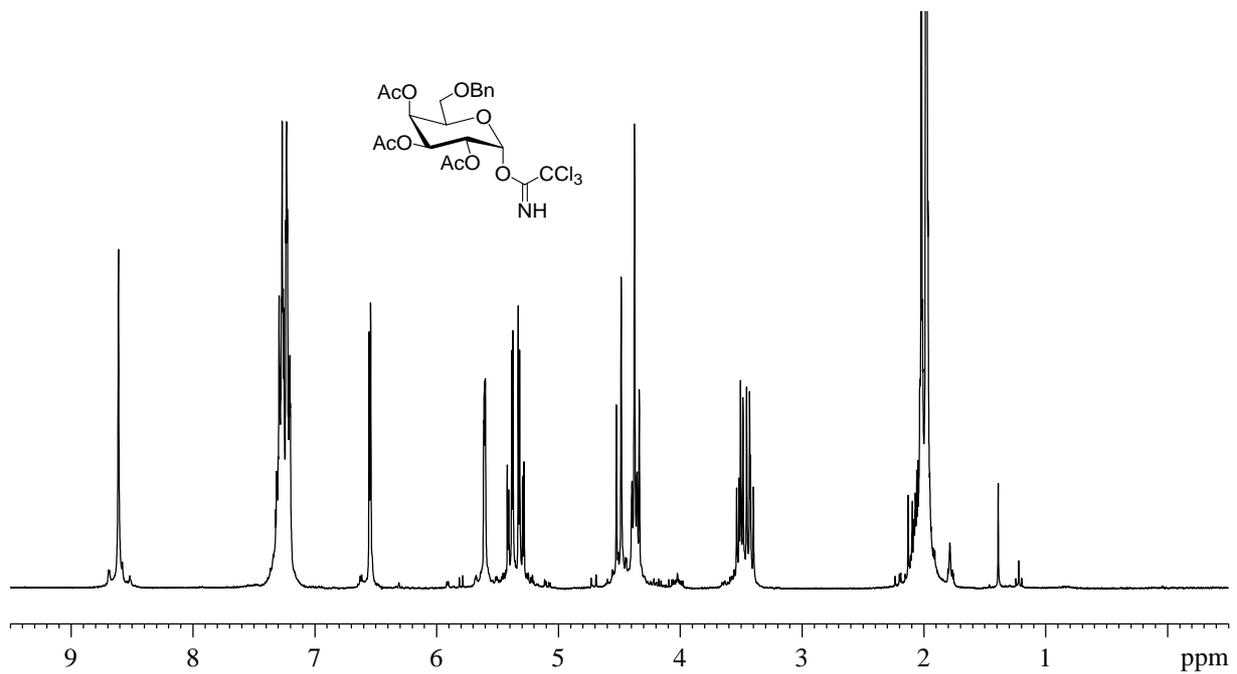
N^{α} -Fluorenylmethoxycarbonyl- N^0 -[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4-*O*-(6-*O*-benzyl-4-*O*-sulfoxy- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-L-asparagin- α -allylester (**66**)

N^{α} -Fluorenylmethoxycarbonyl- N^0 -[2-acetamido-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-4-*O*-(6-*O*-benzyl-4-*O*-sulfoxy- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-L-asparagin (**68**)

7.1.11 Spektren der Peptide und Glycopeptide

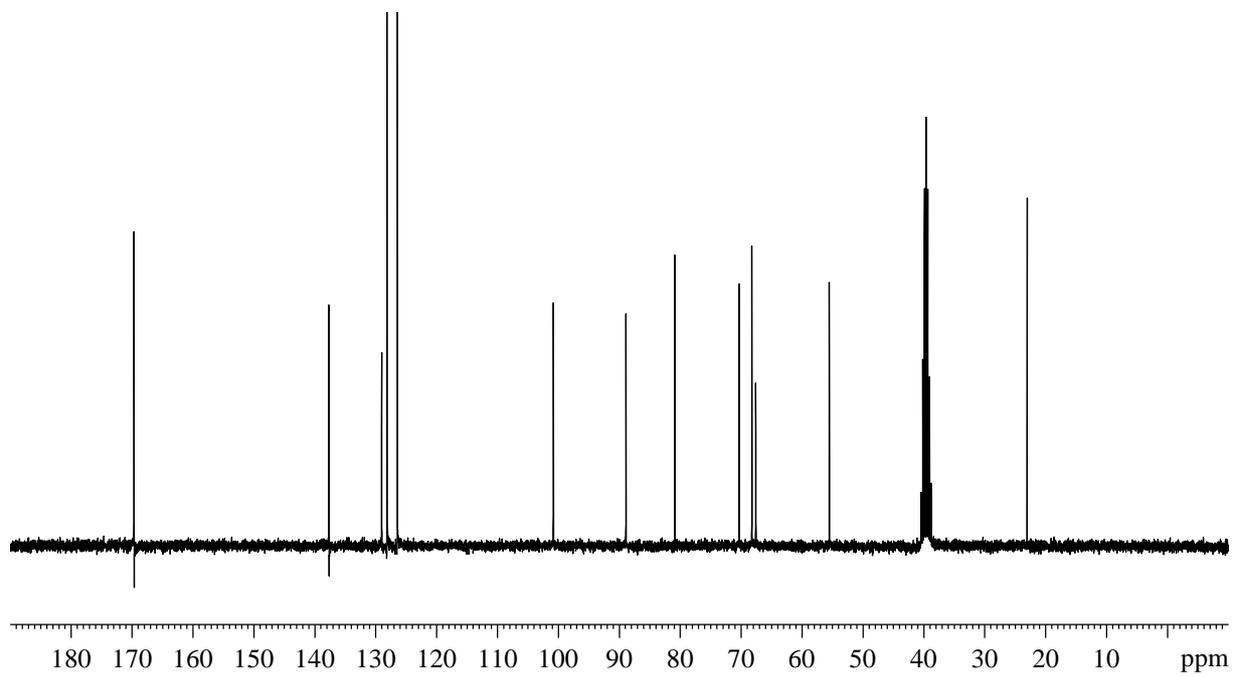
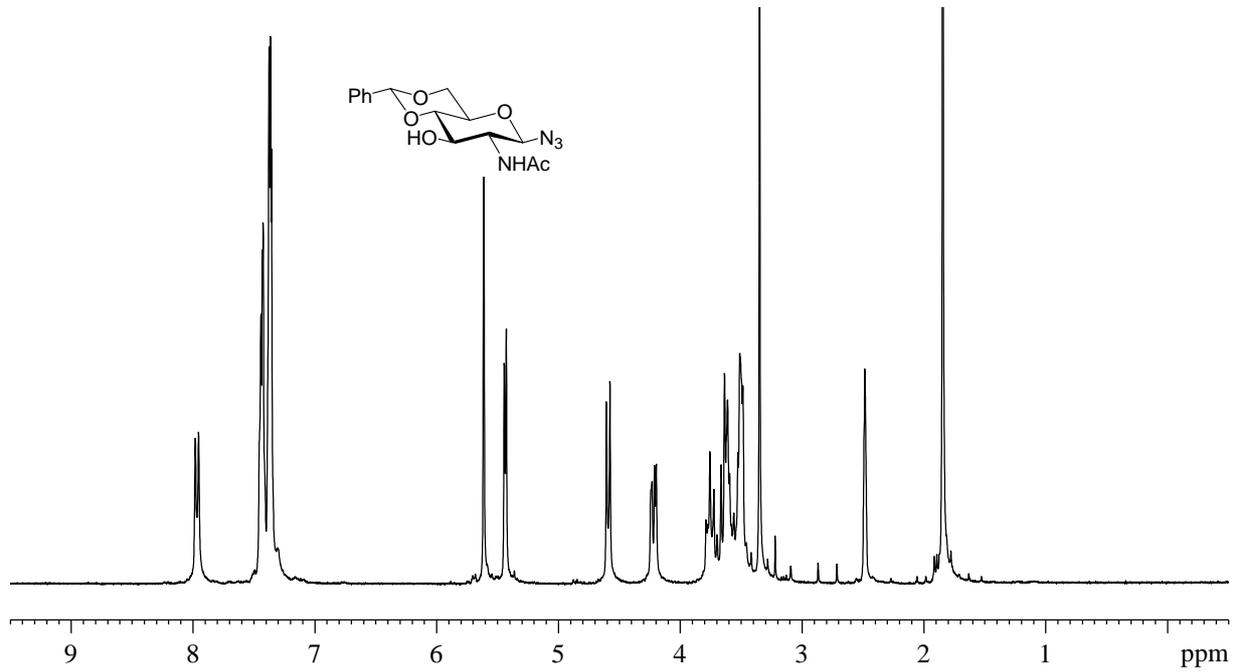
AcHN-Thr(OBn)-Glu(OBn)-Tyr(OBn)-Glu(OBn)-Tyr(OBn)-Leu-Asp(OBn)-Tyr(OBn)-Asp(OBn)-Phe-Leu-Pro-Glu(OBn)-Asp(OBn)-Glu(OBn)-Pro-NH₂ (**97**)

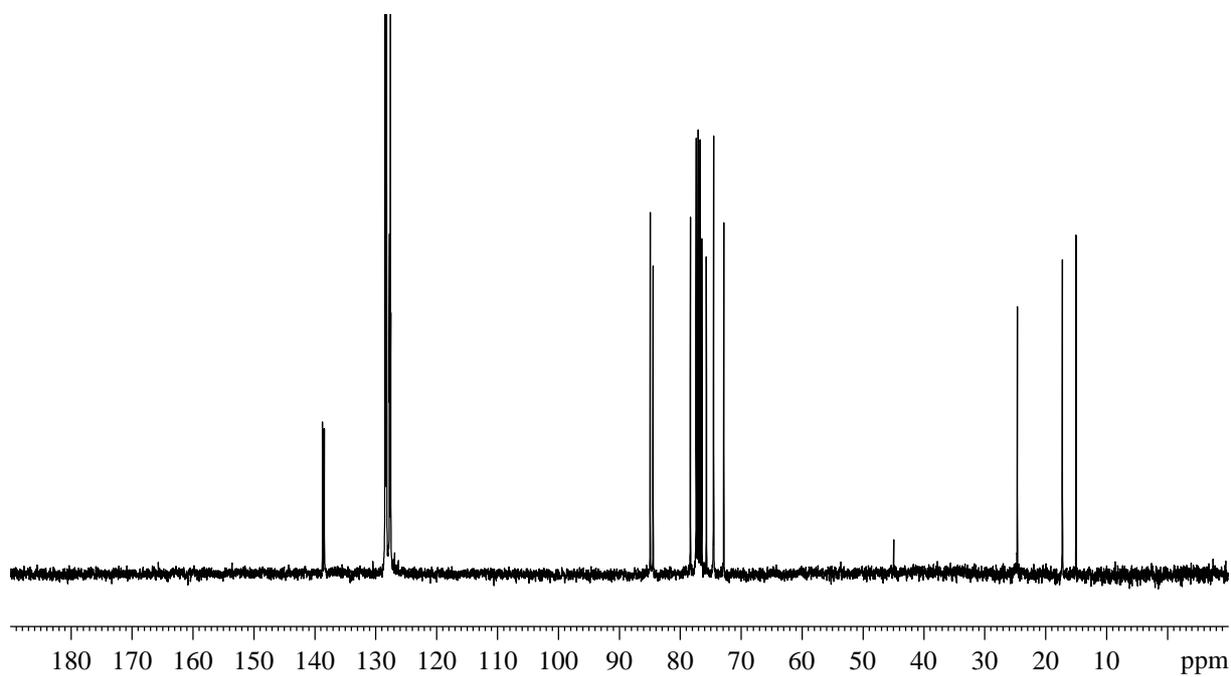
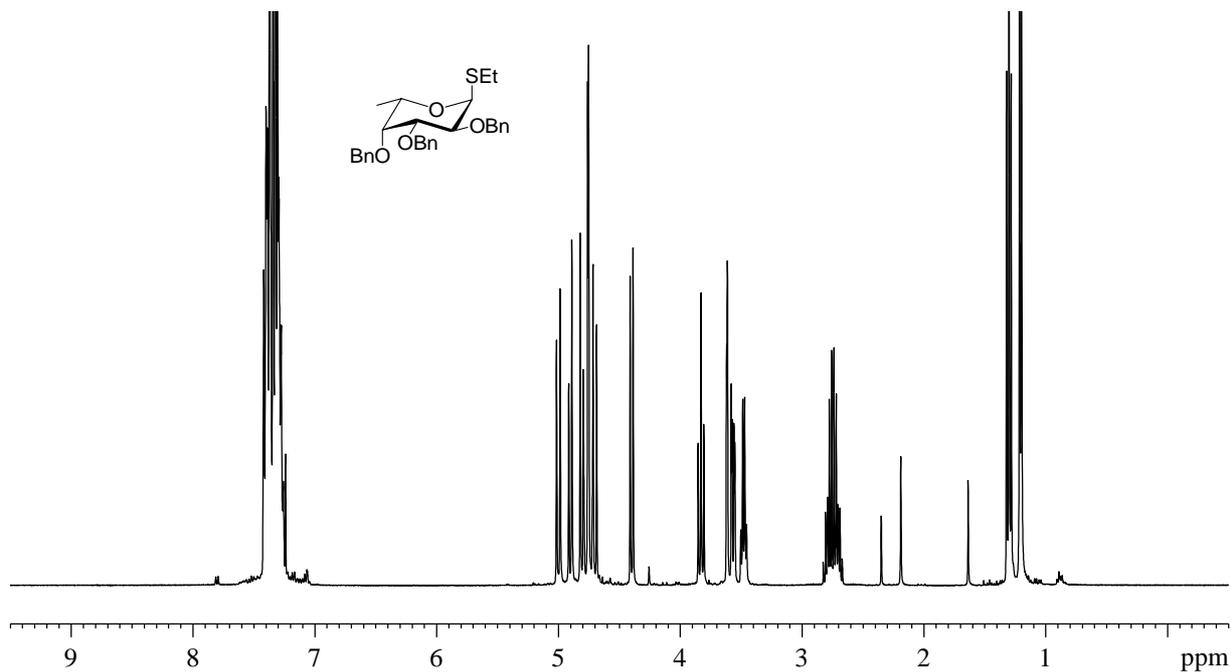
AcHN-Thr(OBn)-Glu(OBn)-Tyr(OBn)-Glu(OBn)-Tyr(OBn)-Leu-Asp(OBn)-Tyr(OBn)-Asp(OBn)-Phe-Leu-Pro-Glu(OBn)-Asn(β -Sulfo-Le^x(OBn)₅)-Glu(OBn)-Pro-NH₂ (**99**)

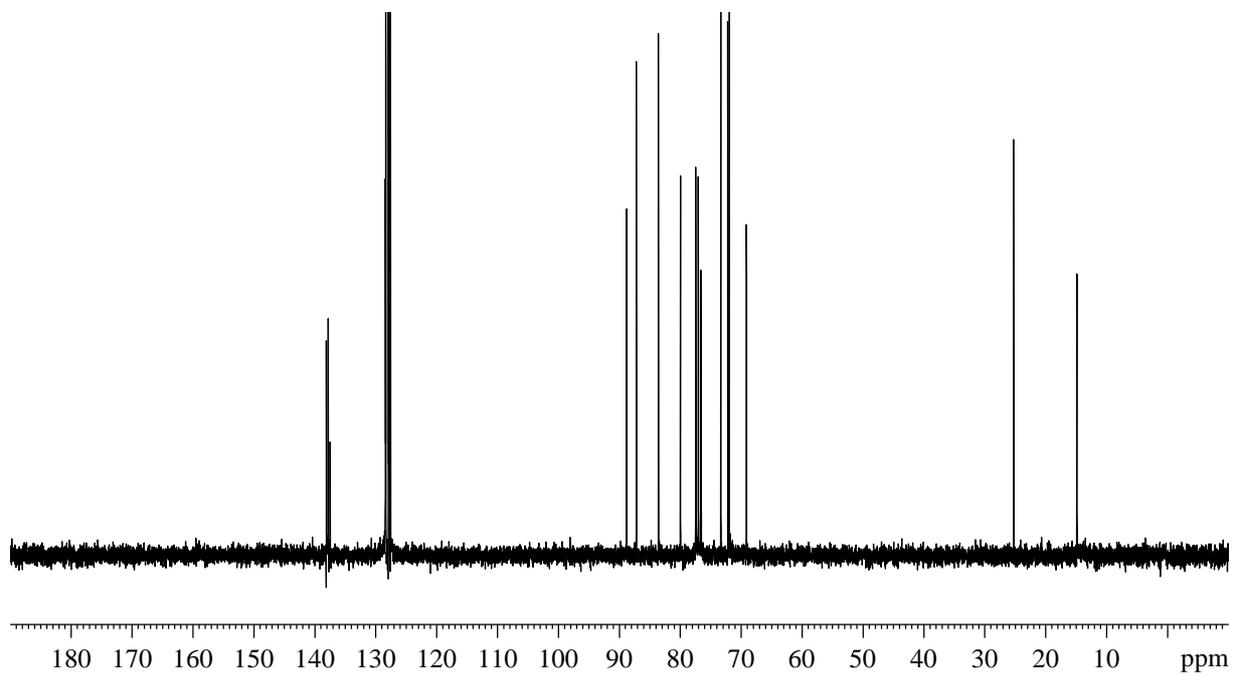
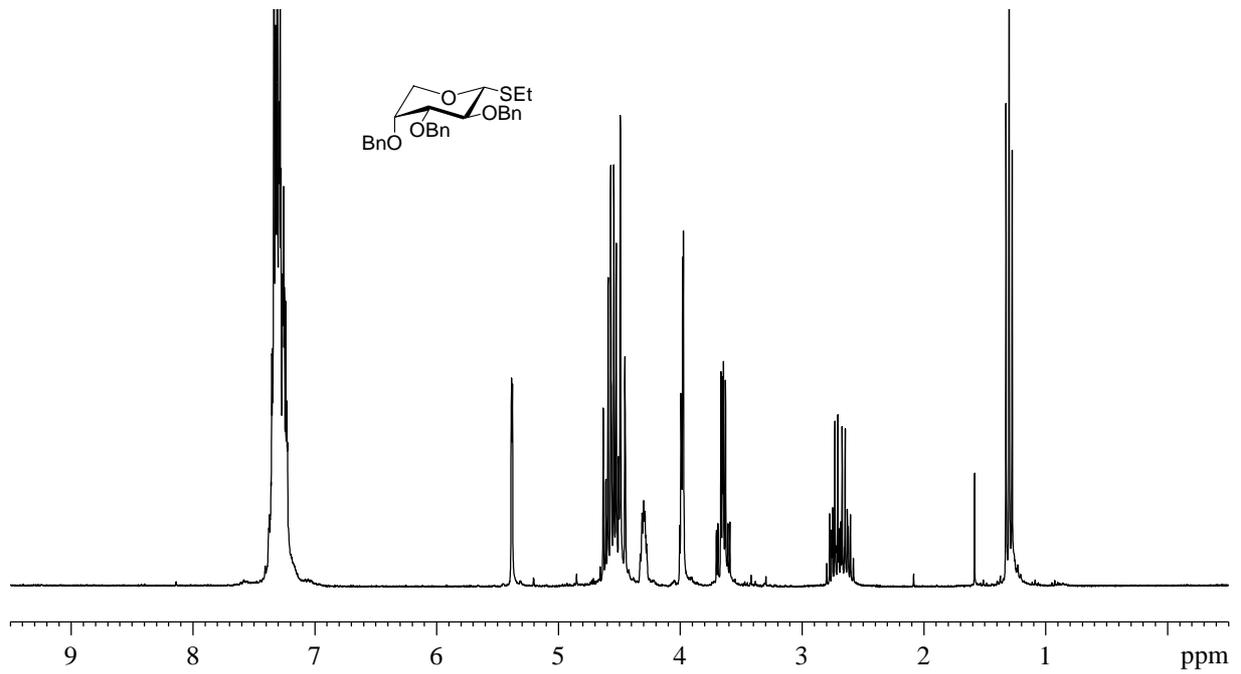
α -Ac₃BnGal-TCl(7 α)

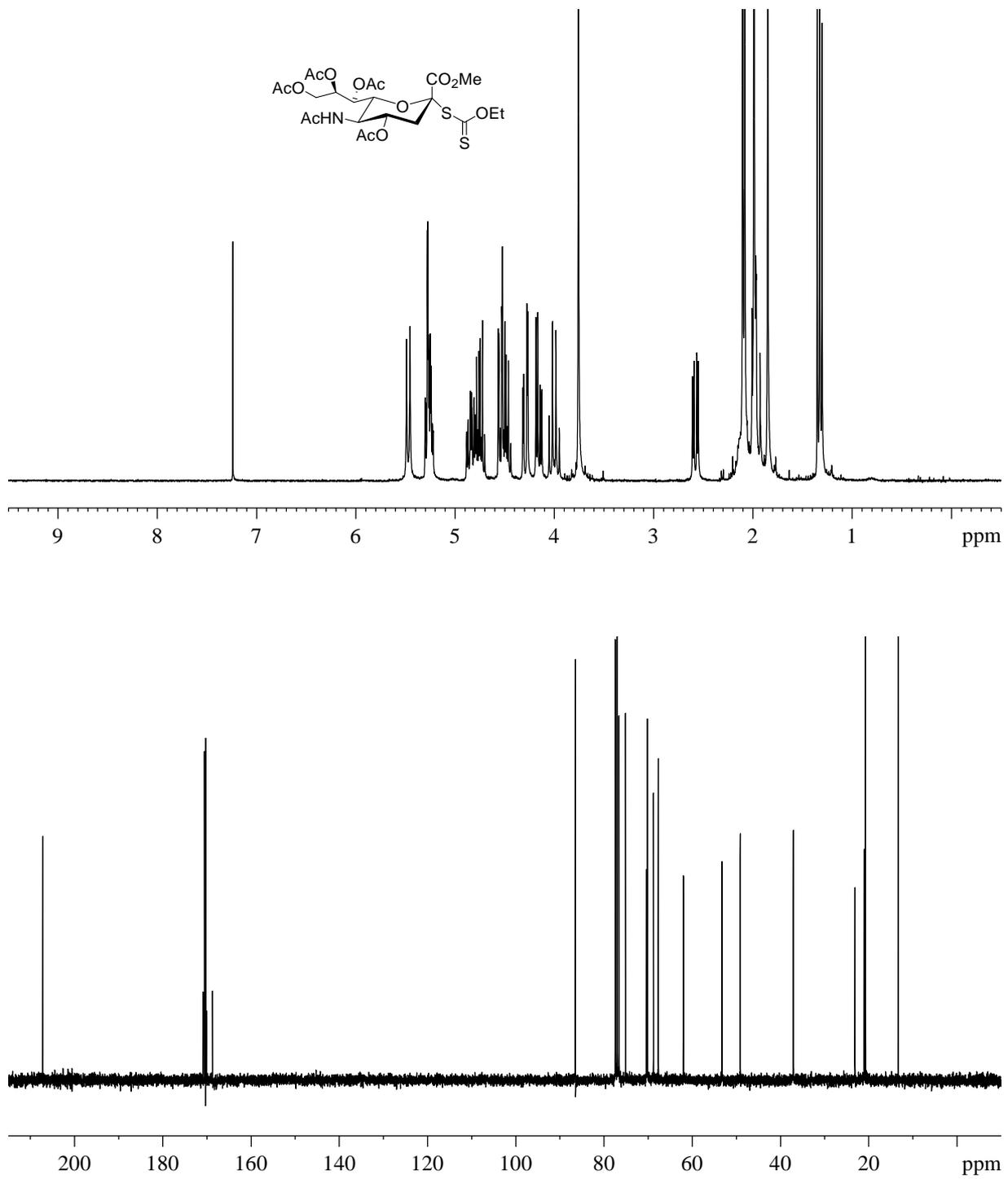
β -Bzn-GlcNAc-N₃

(13)

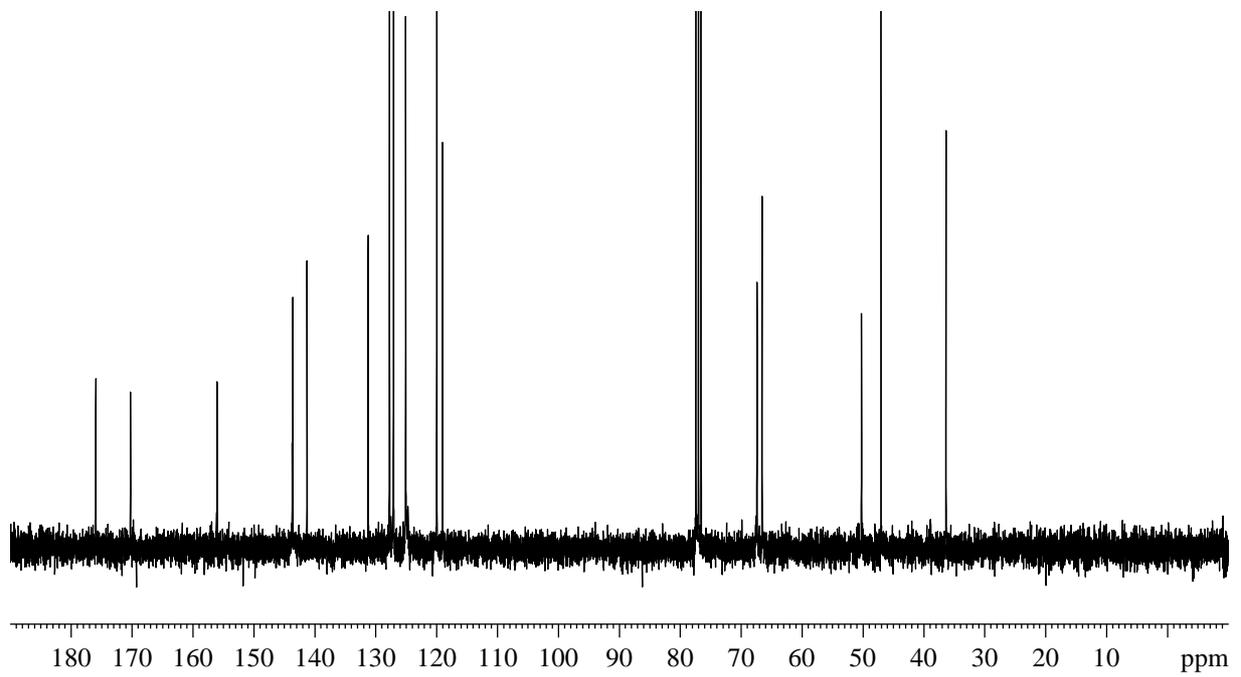
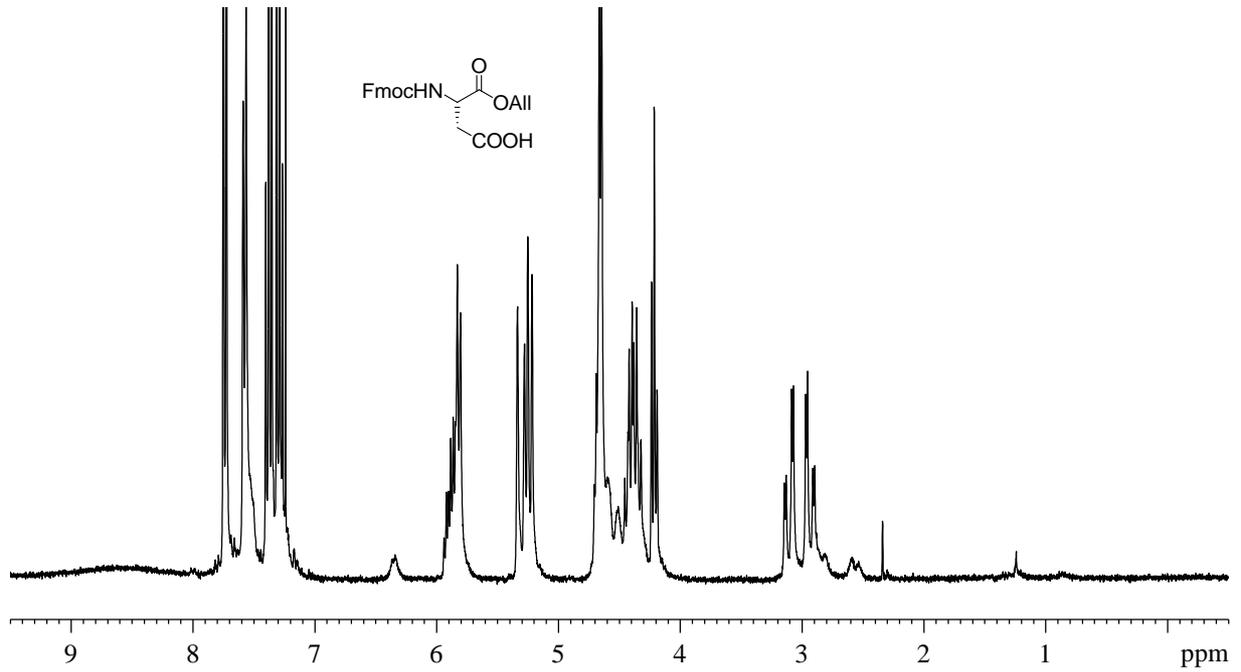


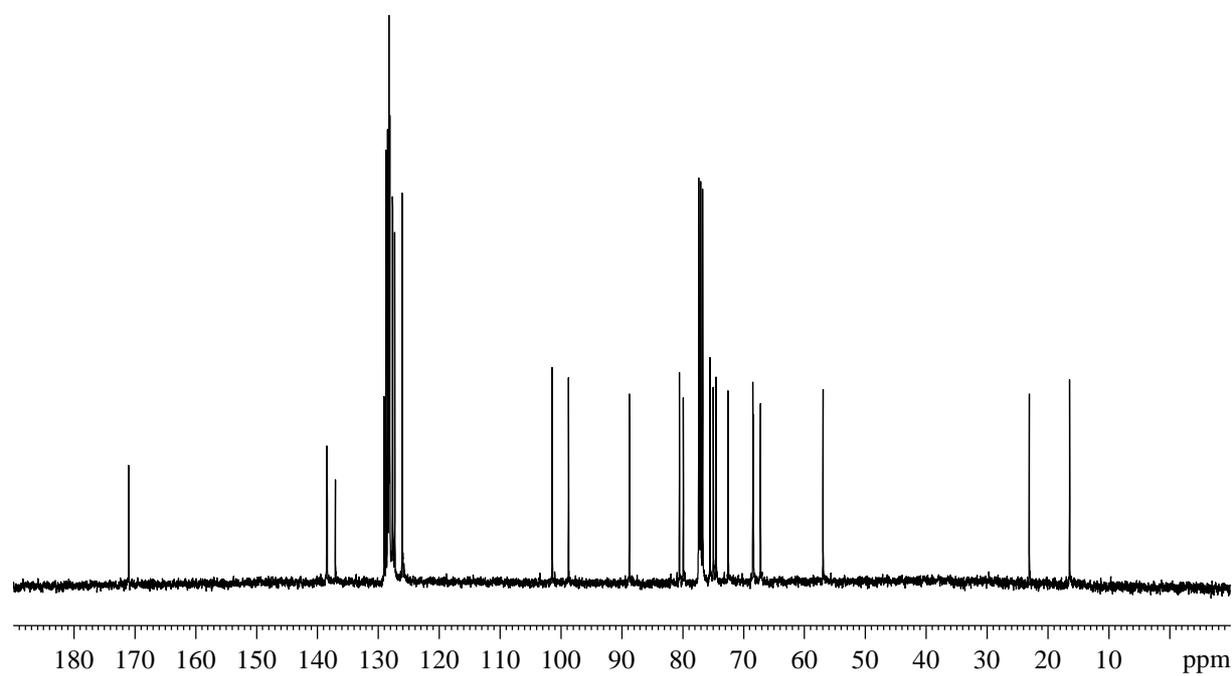
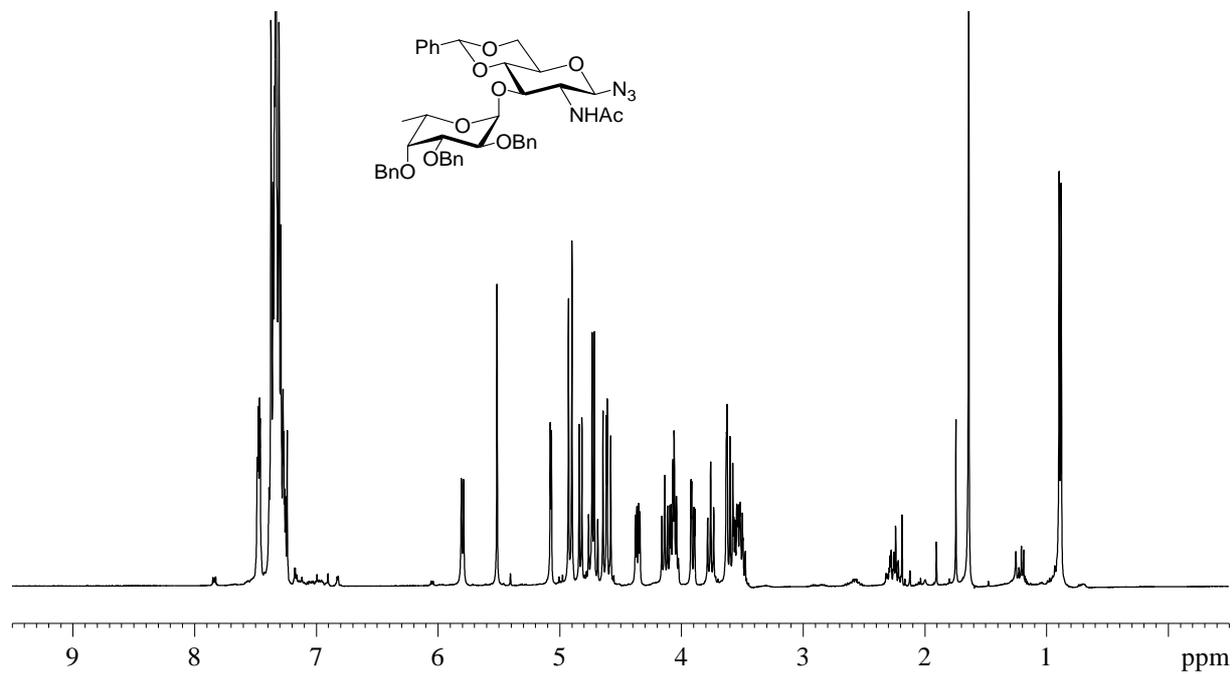
α -Bn₃-Fuc-SEt(18 α)

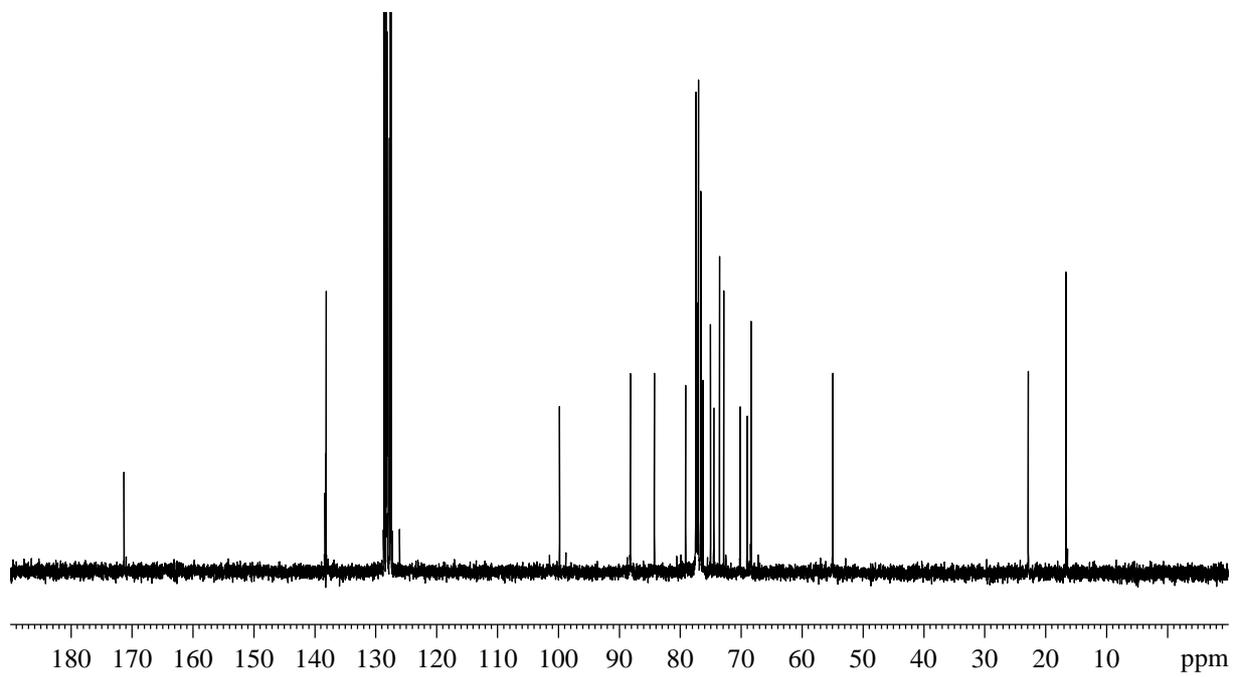
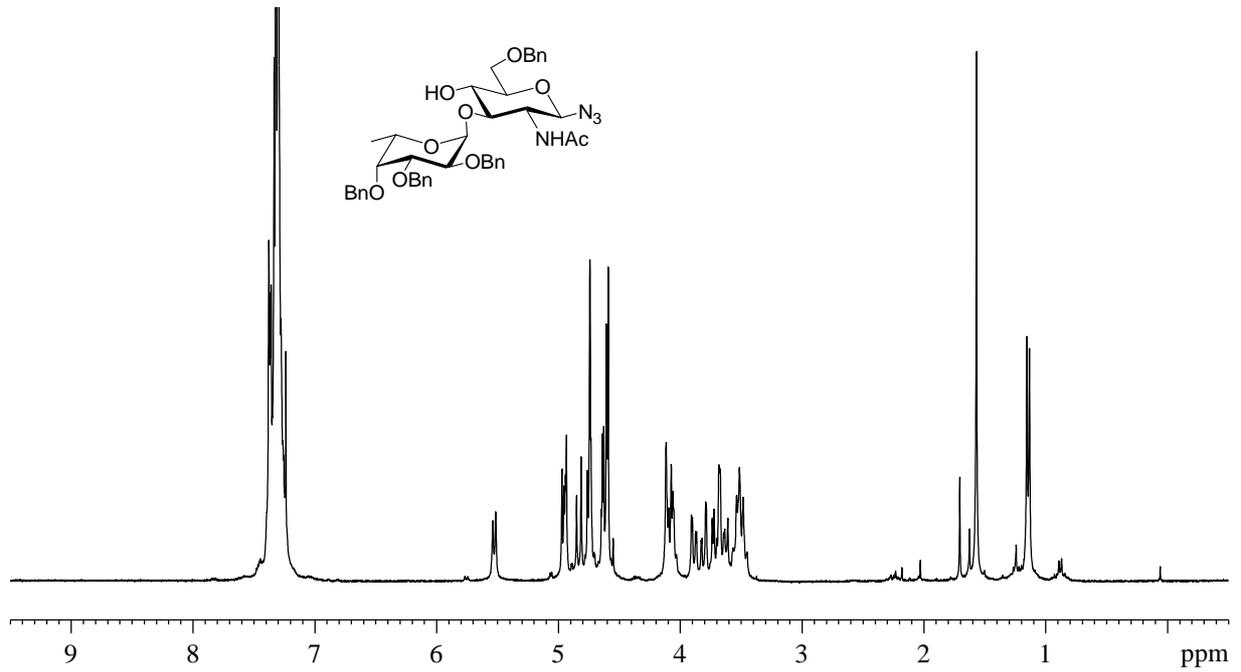
β -Bn₃-Ara-SEt(23 α P)

Ac₅-Neu5Ac-OMe-Xan (28)

Fmoc-Asp(OH)-OAll (56)

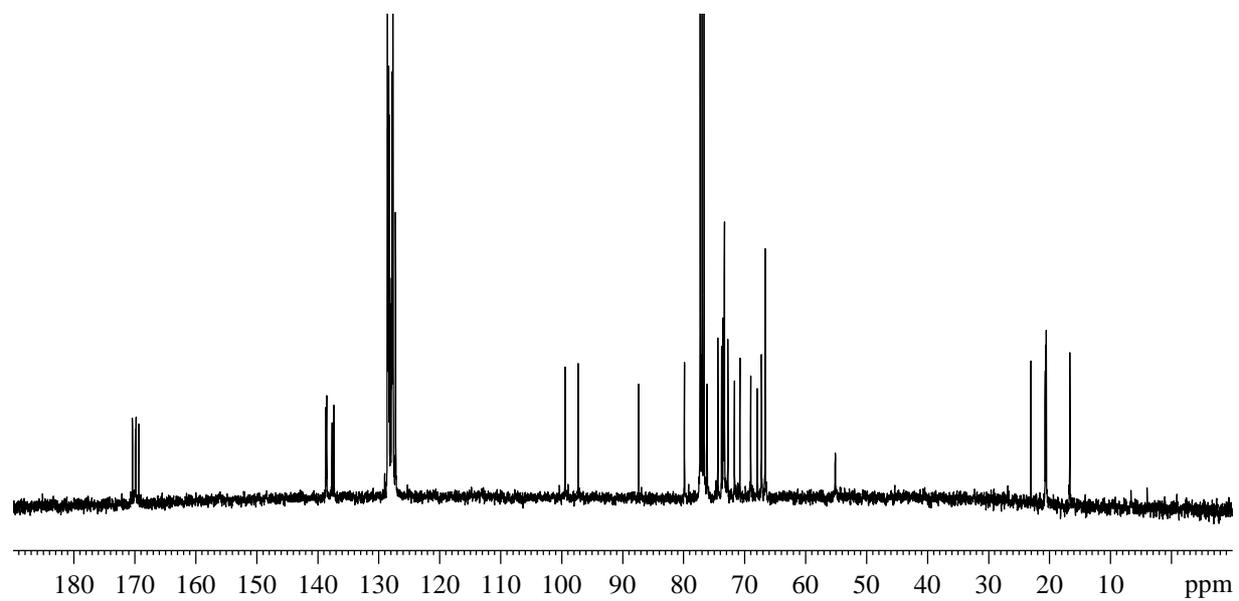
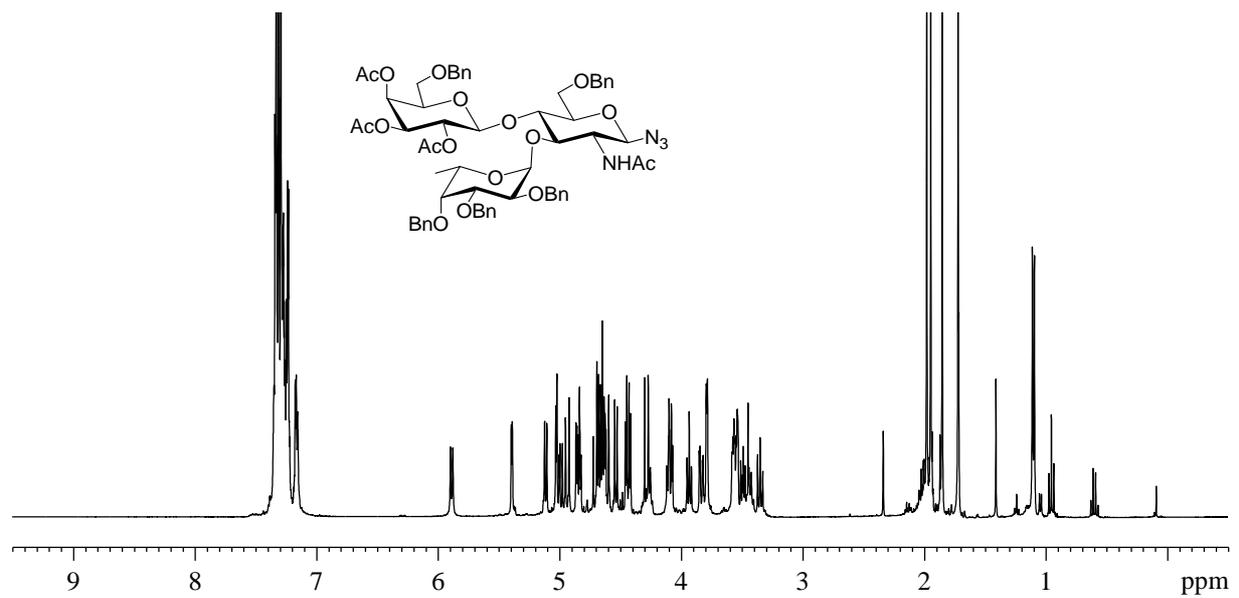
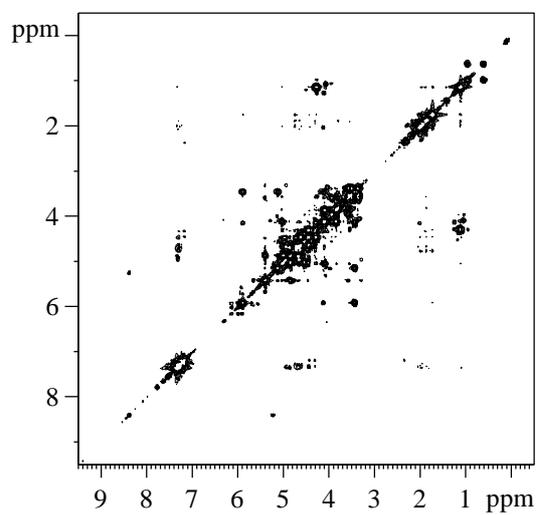
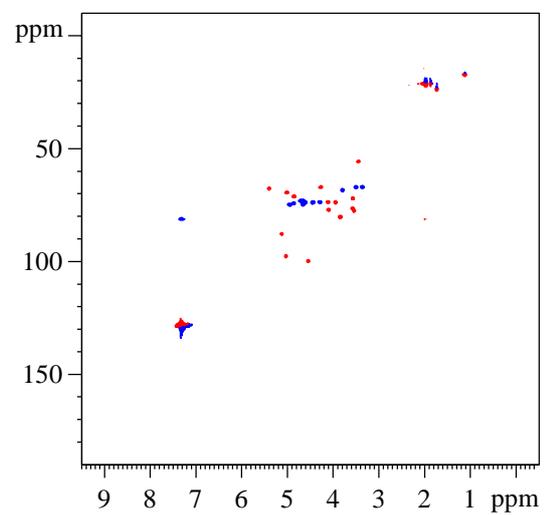


β -(α -Bn₃-Fuc)-Bzn-GlcNAc-N₃ (34)

β -(α -Bn₃-Ara)-Bzn-GlcNAc-N₃ (36)

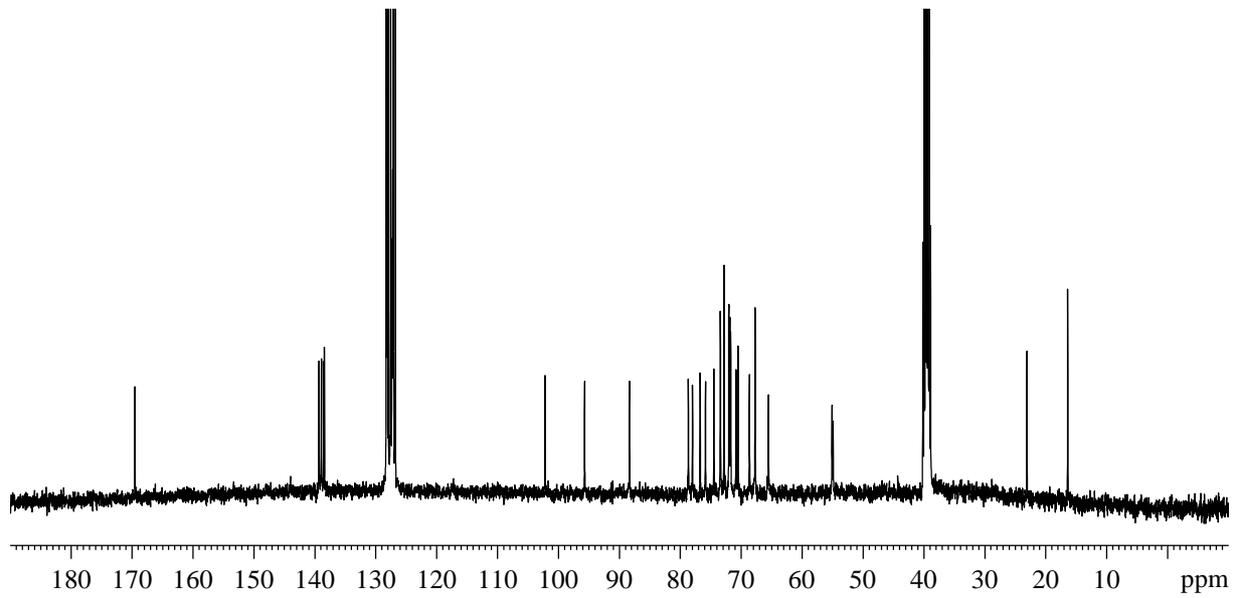
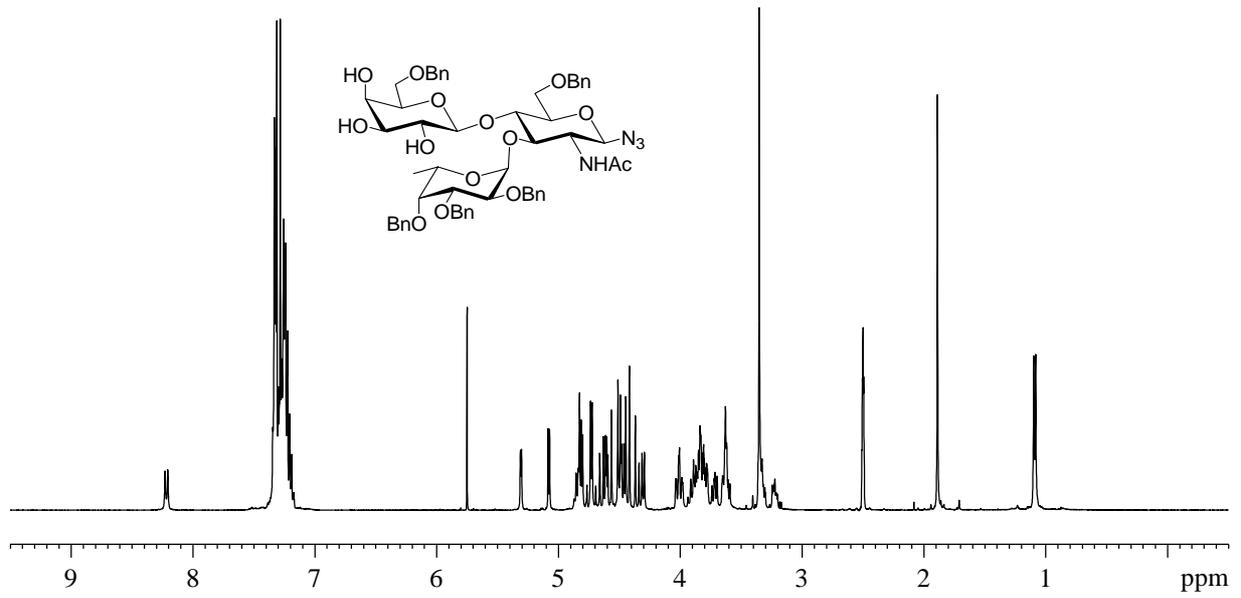
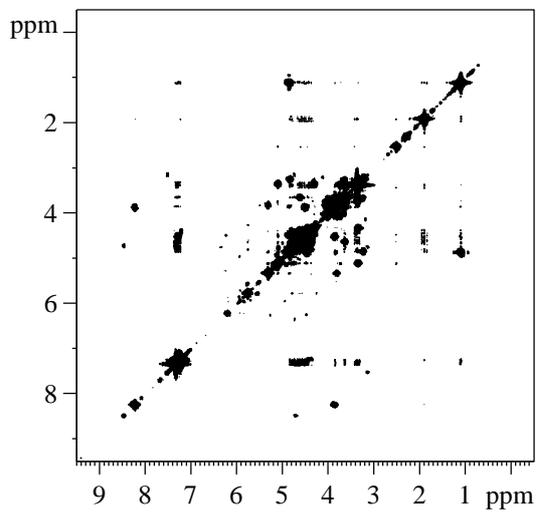
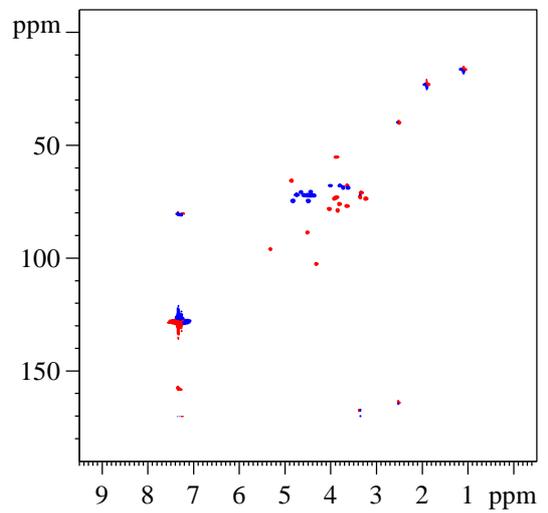
β -Ac₃-Bn₅-Le^x-N₃

(38)

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

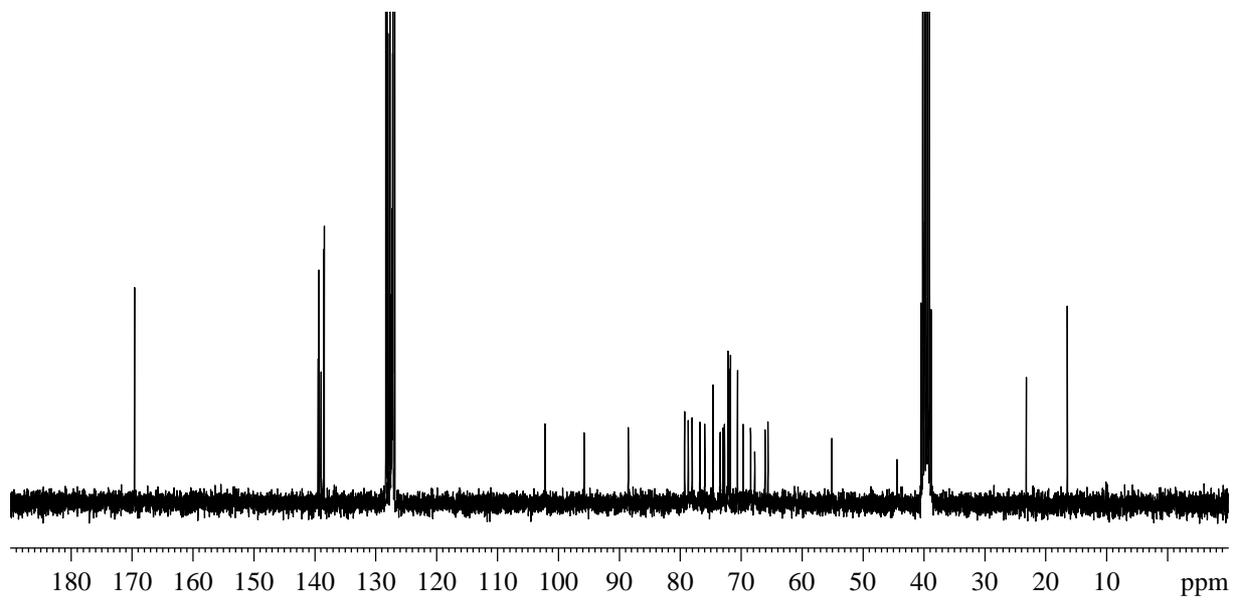
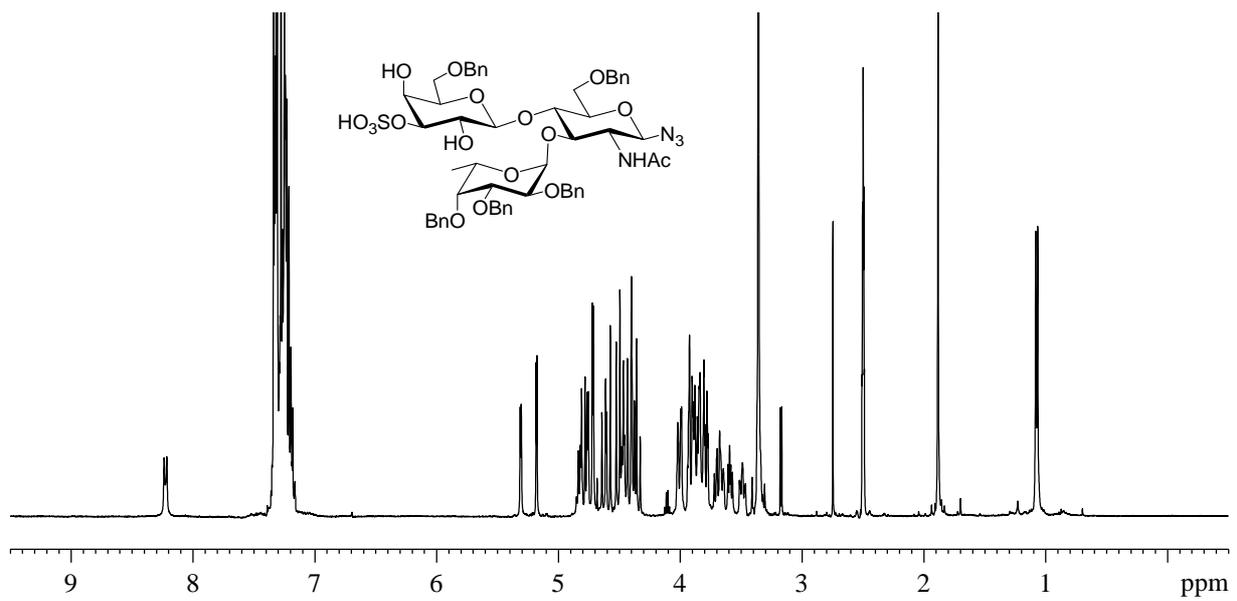
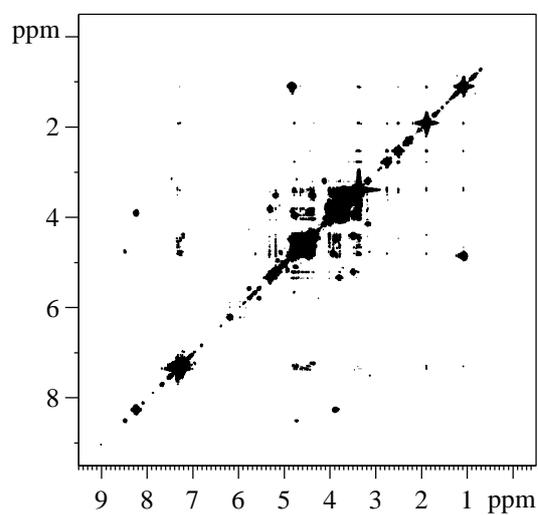
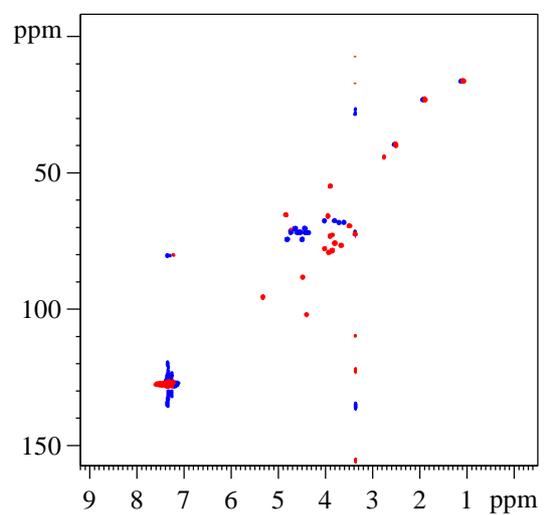
β -Bn₅-Le^x-N₃

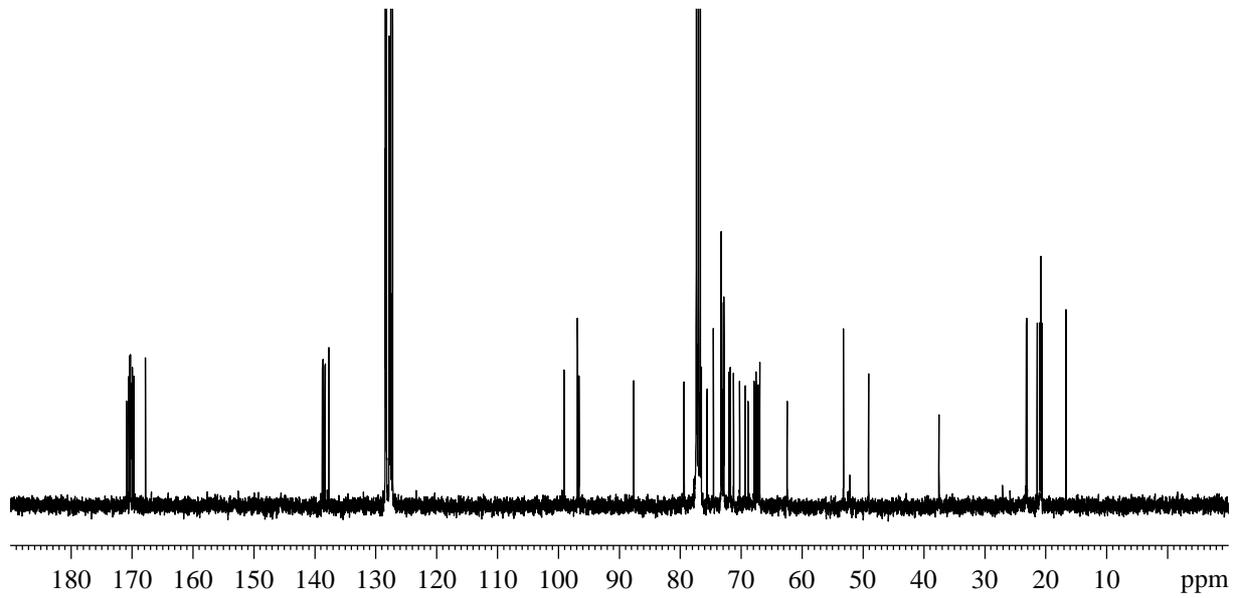
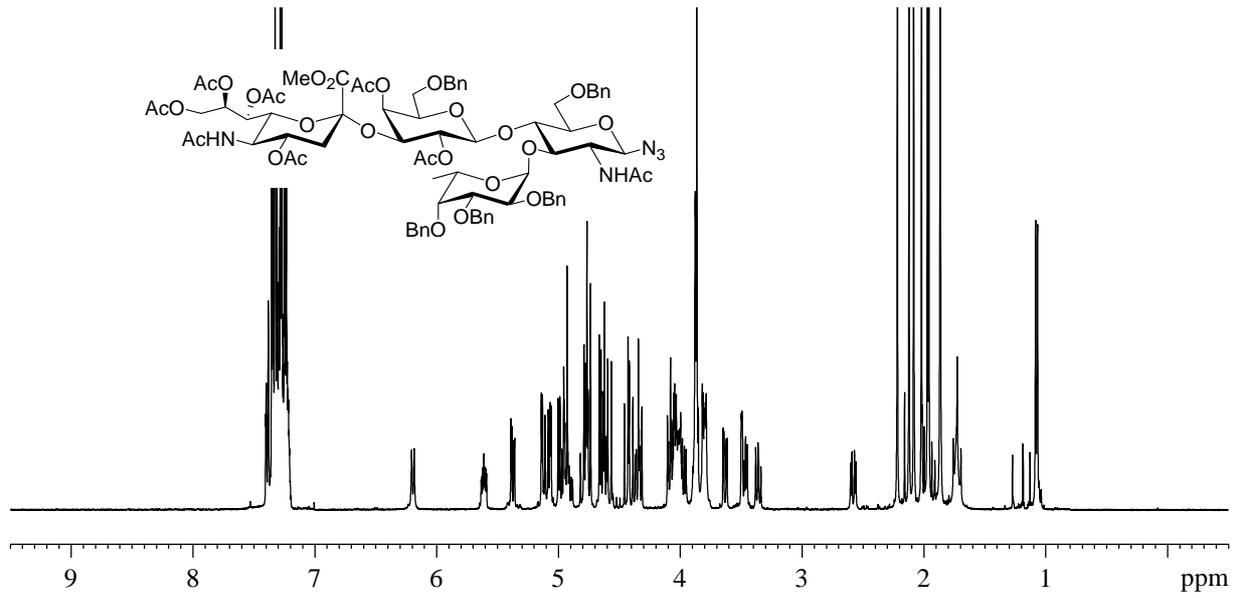
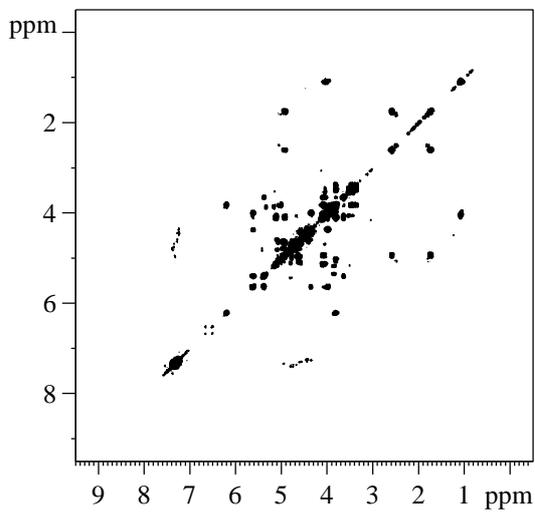
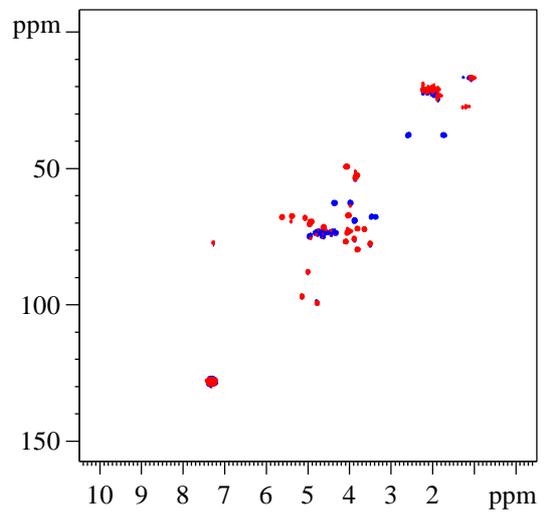
(40)

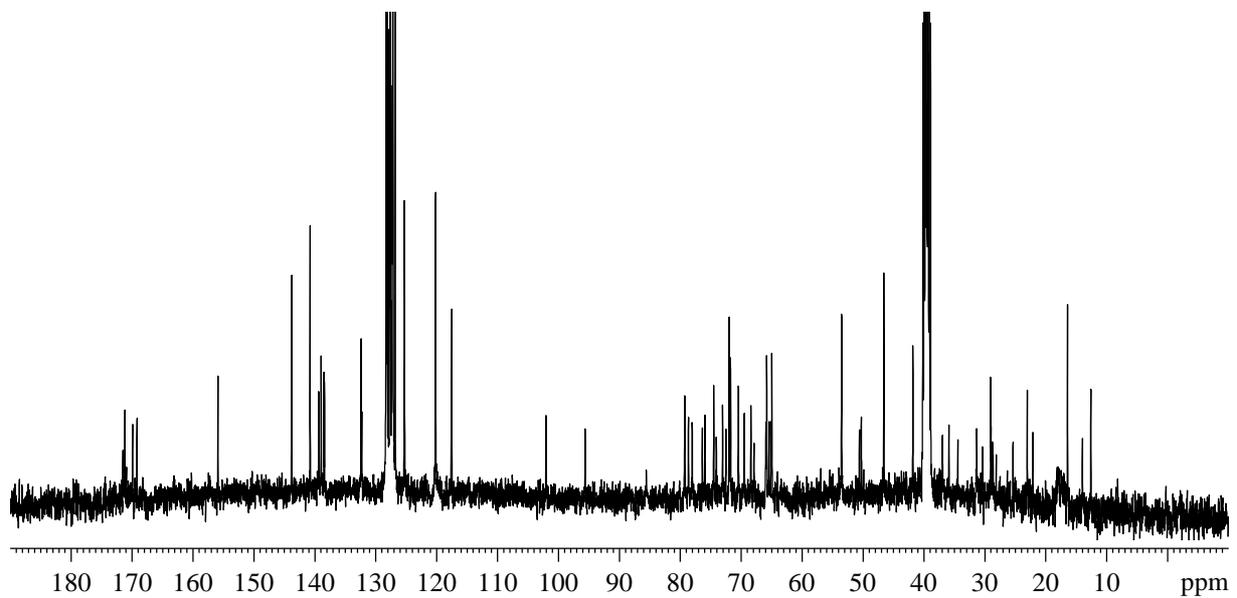
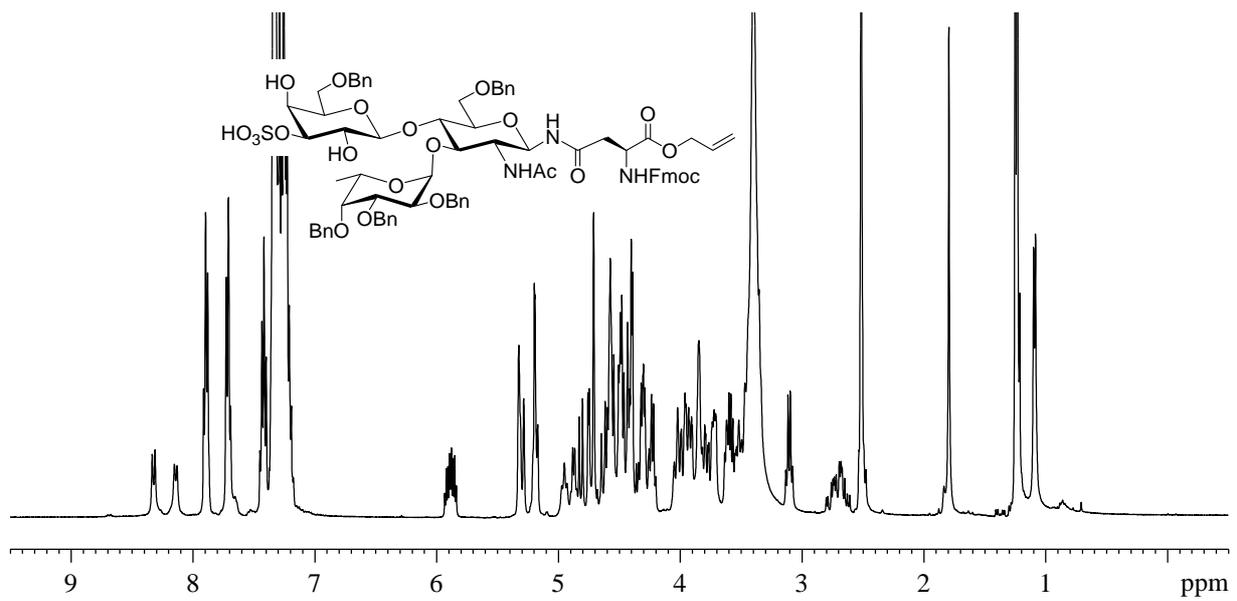
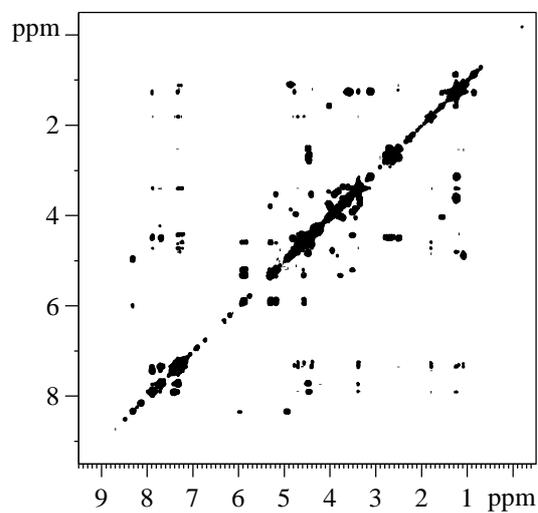
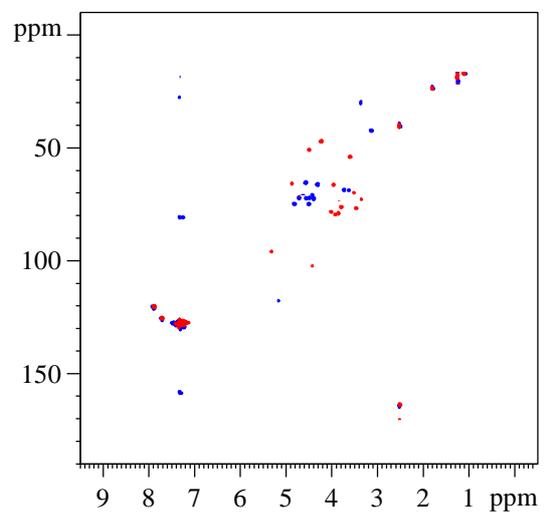
¹H-¹H-COSY¹H-¹³C-HMQC

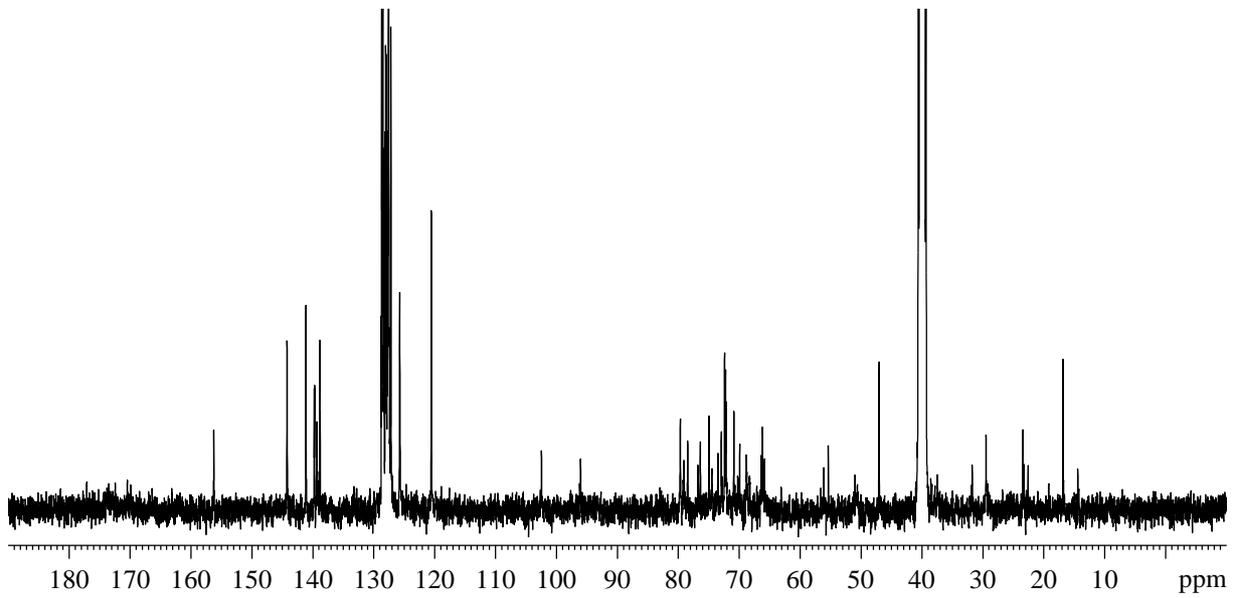
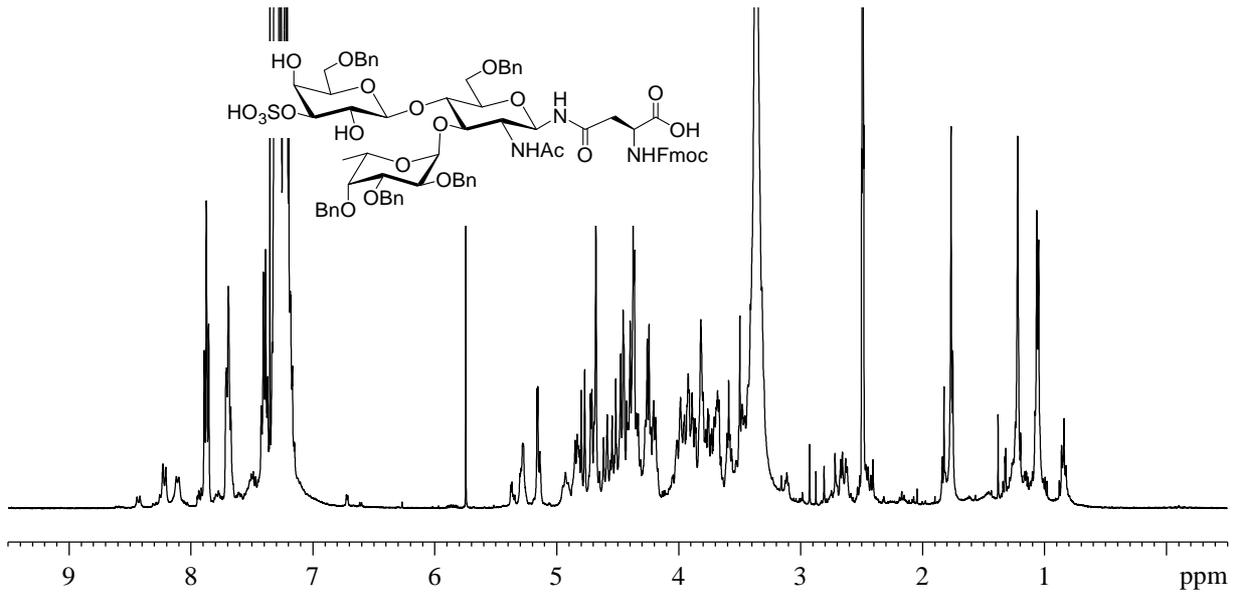
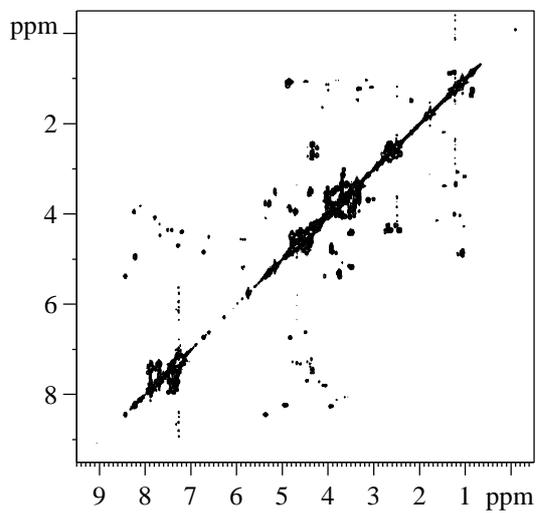
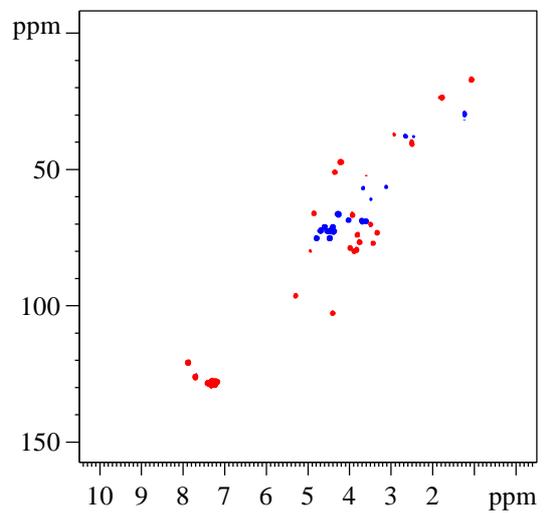
β -Bn₅-Sulfo-Le^x-N₃

(47)

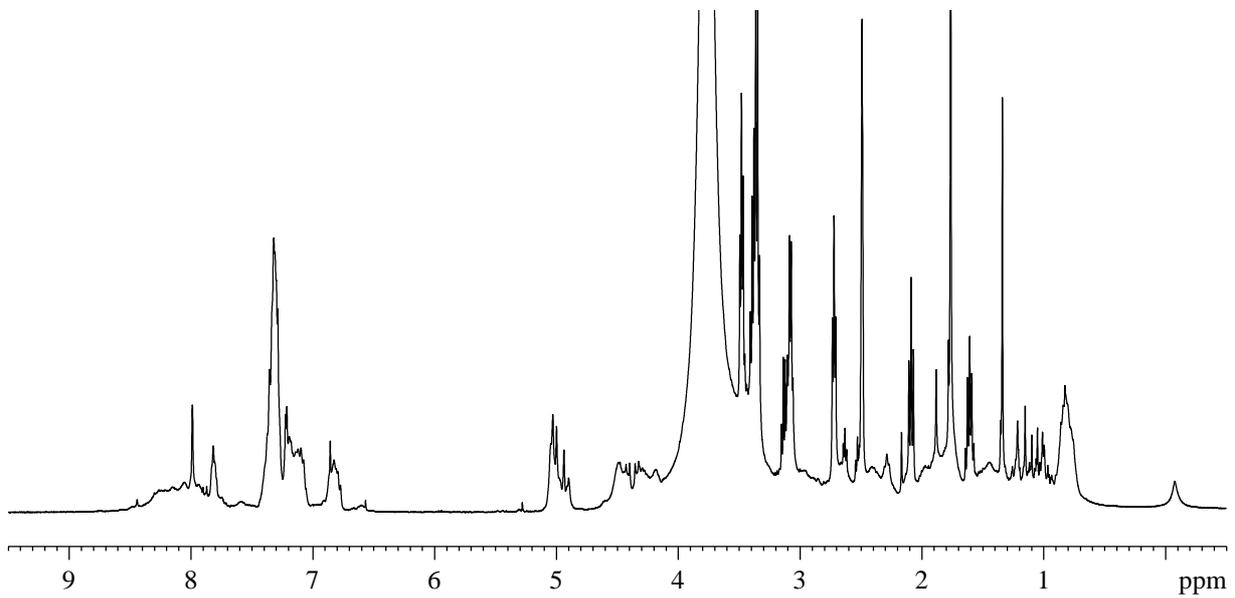
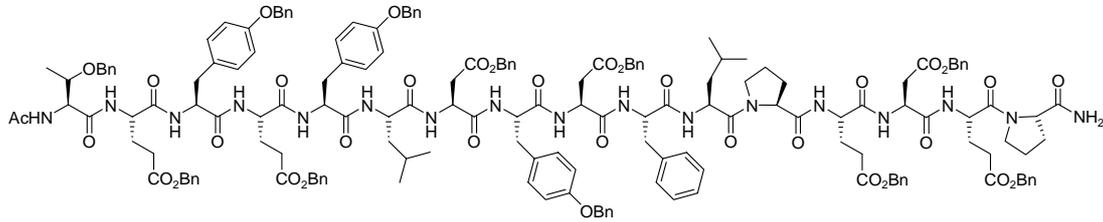
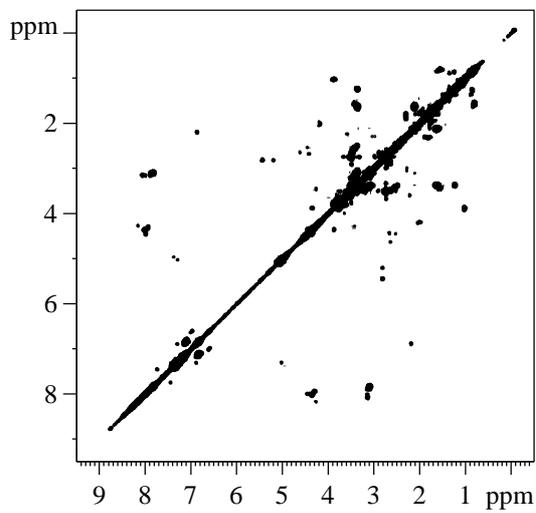
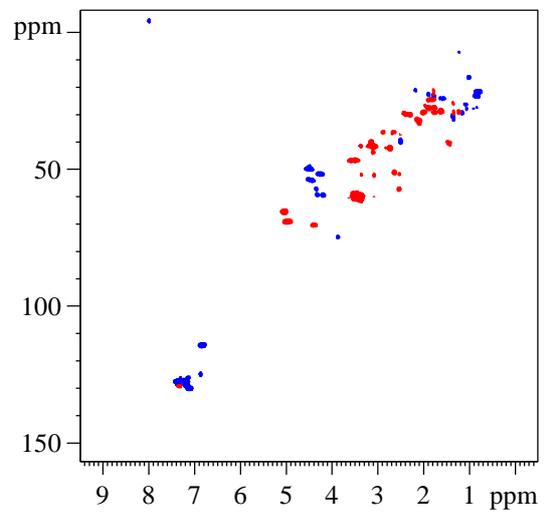
¹H-¹H-COSY¹H-¹³C-HMQC

β -Bn₅-Ac₆-sLe^x-OMe-N₃ (52)¹H-¹H-COSY¹H-¹³C-HMQC

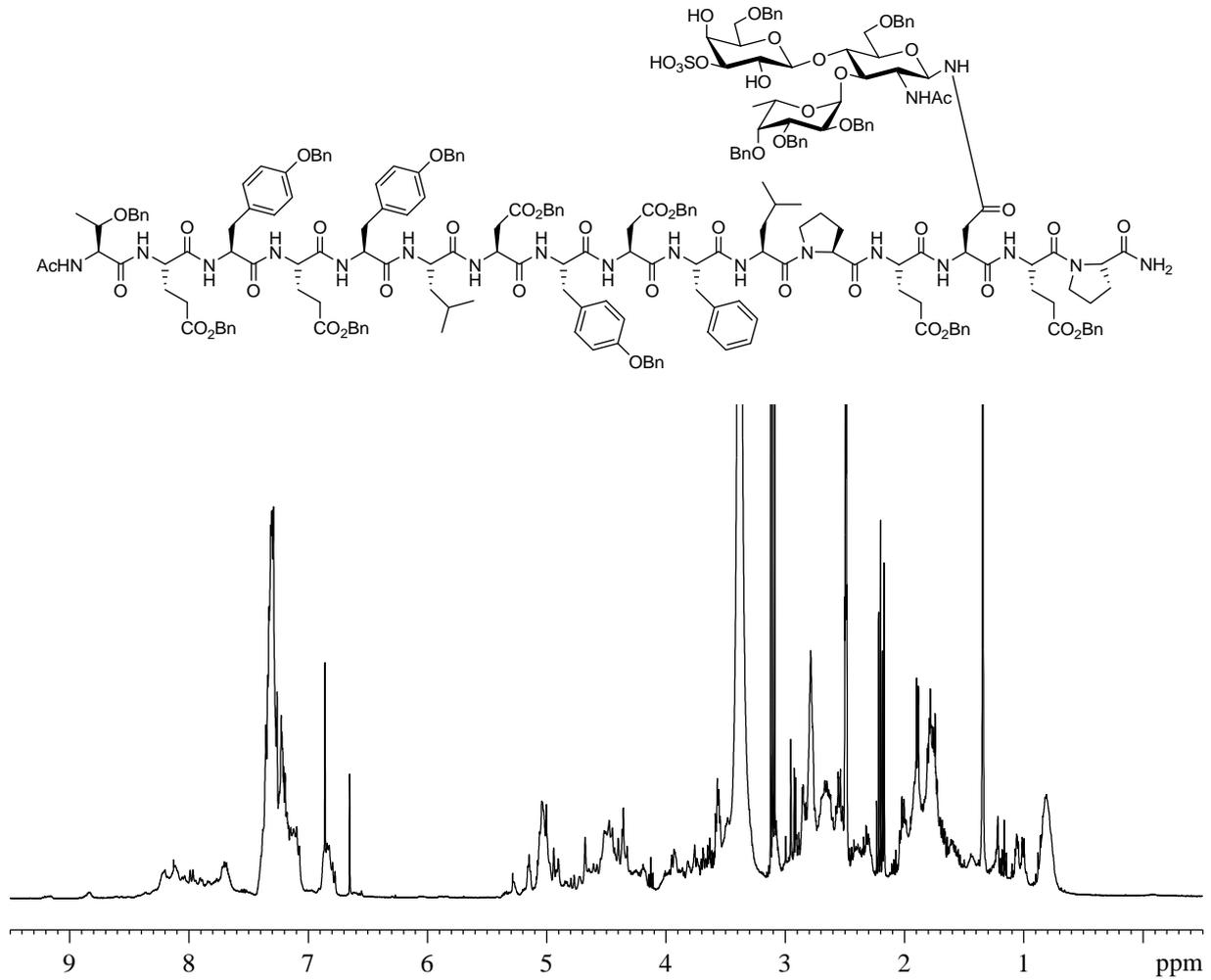
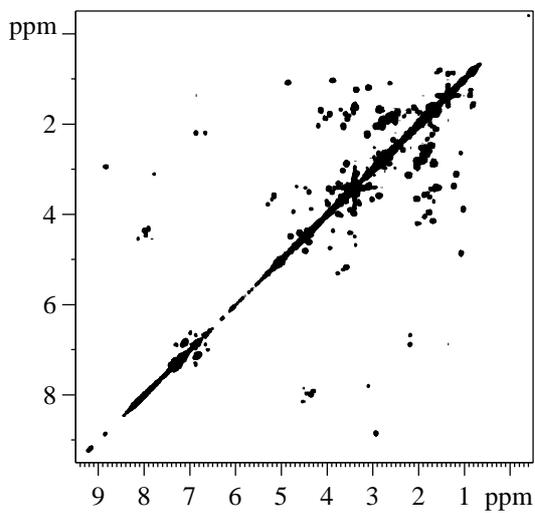
Fmoc-Asn-(β -Bn₅-Sulfo-Le^x)-OAll (66)¹H-¹H-COSY¹H-¹³C-HMQC

Fmoc-Asn-(β -Bn₅-Sulfo-Le^x)-OH (68) ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HSQC

AcHN-Thr(OBn)-Glu(OBn)-Tyr(OBn)-Glu(OBn)-Tyr(OBn)-Leu-Asp(OBn)-Tyr(OBn)-
Asp(OBn)-Phe-Leu-Pro-Glu(OBn)-Asp(OBn)-Glu(OBn)-Pro-NH₂ (97)

¹H-¹H-COSY¹H-¹³C-HSQC

AcHN-Thr(OBn)-Glu(OBn)-Tyr(OBn)-Glu(OBn)-Tyr(OBn)-Leu-Asp(OBn)-Tyr(OBn)-
Asp(OBn)-Phe-Leu-Pro-Glu(OBn)-Asn(β -Sulfo-Le^x(OBn)₅)-Glu(OBn)-Pro-NH₂ (**99**)

¹H-¹H-COSY¹H-¹³C-HSQC