

Synthese von (Glyco)Peptiden aus der homophilen
Erkennungsregion des murinen LI-Cadherins mit und
ohne chromophore Markierung

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

Sebastian Heiner

Mainz, Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Zelladhäsionsmoleküle	1
1.2 Cadherine	2
1.2.1 Klassische Cadherine	2
1.2.2 Das LI-Cadherin	4
1.2.3 Das LI-Cadherin der Maus	6
1.3 Fluoreszenzfarbstoffe	8
1.4 Resonanzenergietransfer	10
1.5 Tumorassoziierte Antigene	14
2. Zielsetzung	16
3. Allgemeiner Teil	18
3.1 Synthese der Antigen-Serin Konjugate	18
3.1.1 Darstellung des zentralen <i>N</i> -Acetylgalactosamin-Serin-Bausteins (T _N -Antigen)	18
3.1.2 Synthese des T-Antigen-Bausteins	22
3.1.3 Synthese des (2→6)-Sialyl-T _N -Antigens	25
3.1.4 Synthese des (2→6)-Sialyl-T-Antigen-Bausteins	31
3.1.5 Synthese des (2→3)-Sialyl-T-Antigen-Bausteins	33
3.2 Synthese verschiedener dansylierter Verbindungen	36
3.2.1 Synthese des dansylierten Leucin-Bausteins	37
3.2.2 Synthese eines universell einsetzbaren dansylierten Linkers	37
3.2.3 Darstellung eines mit einem Spacer versehenen dansylierten Leucin-Festphasenbausteins	39
3.3 Synthese eines neuartigen Chromophors	40
3.4 Versuche zu alternativen Syntheserouten zur Darstellung von Verbindung 78	48
3.4.1 Kupplungsversuche mit anderen Carboxylkomponenten	48
3.4.2 Reaktionen und Folgereaktionen mit 3-Aminophenol	55
3.5 Darstellung des 2-Phenyl-2-trimethylsilylethyl-(PTMSEL)-Ankers	58
3.6 Festphasensynthese der (Glyco)Peptide	63

3.6.1 Allgemeines Festphasenprotokoll	63
3.6.2 Synthese des unglycosylierten Pentadecapeptids 123	64
3.6.3 Synthese von Glycopeptiden	67
3.6.4 Synthese von dansylierten Glycopeptiden	75
3.6.5 Synthese von Glycopeptiden unter Verwendung des neuen Cumarin Chromophors 78	81
3.7 NMR-Untersuchung zur räumlichen Struktur des Glycopeptids 127	86
3.8 UV- und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen	90
3.8.1 Darstellung des Dipeptids H ₂ N-Val-Trp-OH	90
3.8.2 Allgemeine Vorgehensweise	90
3.8.3 Spektroskopische Messungen	91
4 Zusammenfassung	96
5 Experimenteller Teil	100
5.1 Allgemeines und Messgeräte	100
5.2 Versuche zu Kapitel 3.1.1	103
5.3 Versuche zu Kapitel 3.1.2	110
5.4 Versuche zu Kapitel 3.1.3	118
5.5 Versuche zu Kapitel 3.1.4	127
5.6 Versuche zu Kapitel 3.1.5	130
5.7 Versuche zu Kapitel 3.2.1	139
5.8 Versuche zu Kapitel 3.2.2	140
5.9 Versuche zu Kapitel 3.3	147
5.10 Versuche zu Kapitel 3.4.1	160
5.11 Versuche zu Kapitel 3.4.2	166
5.12 Versuche zu Kapitel 3.5	171
5.13 (Glyco)Peptidsynthesen	177
5.13.1 Allgemeines Festphasenprotokoll	177
5.13.2 Versuche zu Kapitel 3.6.2	177
5.13.3 Versuche zu Kapitel 3.6.3	178
5.13.4 Versuche zu Kapitel 3.6.4	187
5.13.5 Versuche zu Kapitel 3.6.5	194
5.14 Versuche zu Kapitel 3.7.1	198

6 Literaturverzeichnis	200
7 Spektrenanhang	205
8 Anhang	211

Verwendete Abkürzungen

α	spezifischer Drehwert
Abb.	Abbildung
absol.	Absolut
Ac	Acetyl-
Aca	7-Aminocumarin
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Acetanhydrid
Ala, A	Alanin
Äquiv.	Äquivalente
arom.	Aromatisch
Asp, D	Asparaginsäure
Ausb.	Ausbeute
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> - Butyloxycarbonyl
Bn	Benzyl-
c	Konzentration
cad	Cadherin
CDI	1,1'-Carbonyl-diimidazol
CG	Ethoxycarbonyl-glycyl
Chi	D-Chinasäure
COSY	Correlated Spectroscopy
Cu	Cumarin
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
dd	doppeltes Dublett
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid*HCl
EE	1-Ethoxyethyl; Ethylacetat
ESI	Elektrospray-(Massenspektrometrie)
et al.	et alli
Fa.	Firma
FD	Field Desorption
Fmoc	<i>N</i> -(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat
ges.	gesättigt
Gal	D-Galactose
GalNac	<i>N</i> -Acetyl-galactosamin
Gln, Q	Glutamin
Glu	Gluconsäure
Gly, G	Glycin
h	Stunde(n)
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat

HCTU	2-(6-Chloro-1-H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphate
His, H	Histidin
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMQC-ms	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (phasensensitiv)
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i. Hochvak.	Im Hochvakuum
IIDQ	1,2-Dihydro-2-isobutoxy-1-chinolincarbonsäureisobutylester
Ile, I	Isoleucin
i. Vak.	im Vakuum
J	Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
konz.	Konzentriert
λ	Wellenlänge
Leu, L	Leucin
LI-Cadherin	(Liver and Intestine) Leber- und Darm-Cadherin
Lit.	Literatur
m	Multiplett
M	Molarität
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
mbar	Millibar
Me	Methyl-
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute
MS	Massenspektrum
MW	Molekulargewicht
N-Cadherin	Neuronale-Cadherin
NaOMe	Natriummethanolat
Neu5Nac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	magnetische Kernspinresonanz
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OD	Optical Density
<i>p</i>	para
p. a.	pro analysi
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
PHB	Polyhydroxybenzol
Pmb	<i>para</i> -Methoxybenzyliden
ppm	parts per million
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
präp	präparativ
Pro, P	Prolin
PTMSEL	(2-Phenyl-2-trimethylsilyl)ethyl-Linker
PyBop	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat
<i>p</i> -Tos	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
q	Quartett

quant.	quantitativ
Raumtemp.	Raumtemperatur
ROE	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
RP	Reversed Phase
R _f	Ratio of fronts
R _t	Retentionszeit
s	Singulett
s _b	breites Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
Ser, S	Serin
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
tBu	<i>tert</i> -Butyl-
Tentagel	Polyethylenglycol-Polystyrol-Copolymer
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilyl-
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Trp, W	Tryptophan
Trt	Trityl
UV	Ultraviolett
Val, V	Valin
W	Watt

1 Einleitung

1.1 Zelladhäsionsmoleküle

Die Organisation eines multizellulären Organismus erfordert die selektive Assoziierung embryonaler Zellen in spezifischen Geweben, deren Erhalt im adulten Organismus gewährleistet bleiben muss. Die für diese Vorgänge notwendige Zell-Zell-Erkennung und Zell-Sortierung wird durch verschiedene, auf der Zelloberfläche lokalisierte Klassen von Zelladhäsionsmolekülen vermittelt.

Man unterscheidet vier Klassen von Zelladhäsionsmolekülen:

- die Integrin-Familie
- die Immunoglobulin-Superfamilie
- die Selektin-Familie
- sowie die Cadherine.

Die Cadherine waren und sind Gegenstand intensiver Forschung. Während man bis dato von einigen Mitgliedern dieser Familie nur die Sequenzen bestimmen konnte, wurden andere bereits näher charakterisiert (Sequenz, Struktur, Funktion, etc.) (Tab. 1.1).

Cadherin	Spezies	Gewebe/Zelle
Arc-1, rr-1	Hund	MDCK
B-cad, K-cad	Huhn	Neuronale Zellen
Cad 5-11	Ratte	Gehirn
Cad 4	Ratte	Gehirn
CAM 120/80	Mensch	MCF-7
EP-cad	Frosch	
Fat Protein	Drosophila	Imaginalscheiben
gp 140K, E-cad	Frosch	
K-cad	Ratte	Niere
L-Cad	Huhn	Leber
LI-cad	Ratte	Leber
	Mensch	
	Maus	Dünn-, Dickdarm, Milz
M-cad	Maus	Muskel
N-cad	Mensch	neurodermale und
	Frosch	
	Rind	endothelial
OB-cad	Maus	MC3T3
P-cad	Maus	Placenta
	Mensch	Placenta
R-cad	Huhn	Retina
Cadherin	Spezies	Gewebe/Zelle
T-cad	Huhn	neuronalen Zellen
T-cad-2	Huhn	neuronalen Zellen
U-cad	Frosch	früher Embryo und epithelial
Uvomorulin, E-cad	Maus	früher Embryo und epithelial
V-Cad	Rind	endothelial
XTCAD-1	Frosch	Darm, Magen, Haut, Niere

Tab. 1.1 Liste einiger bisher identifizierter Cadherine aus verschiedenen Zelllinien und Geweben.¹

¹ <http://www.bio.uni-frankfurt.de/humagen/cadherin.htm>.

1.2 Cadherine

1.2.1 Klassische Cadherine

Cadherine sind Transmembranglycoproteine, die in fünf Unterfamilien gegliedert werden können: klassische Cadherine des Typs I und II, desmosomale Cadherine, Protocadherine und Cadherin-verwandte Proteine (Abb. 1.1).

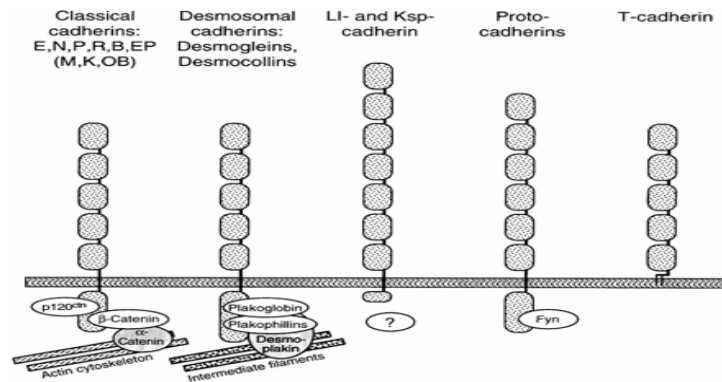


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Cadherinstrukturen

Klassische Cadherine bestehen aus 723 bis 748 Aminosäuren (Molekulargewicht 120-130 kDa) und lassen sich in drei Abschnitte gliedern: in einen extrazellulären Bereich, eine Transmembranregion und eine cytoplasmatische Domäne. Durch Sequenzvergleiche innerhalb der Proteine konnte der extrazelluläre Bereich in fünf Domänen (EC1-EC5) unterteilt werden (Abb. 1.2), die sich, im Fall des E-Cadherins, tandemartig aus jeweils 110 Aminosäuren zusammensetzen.

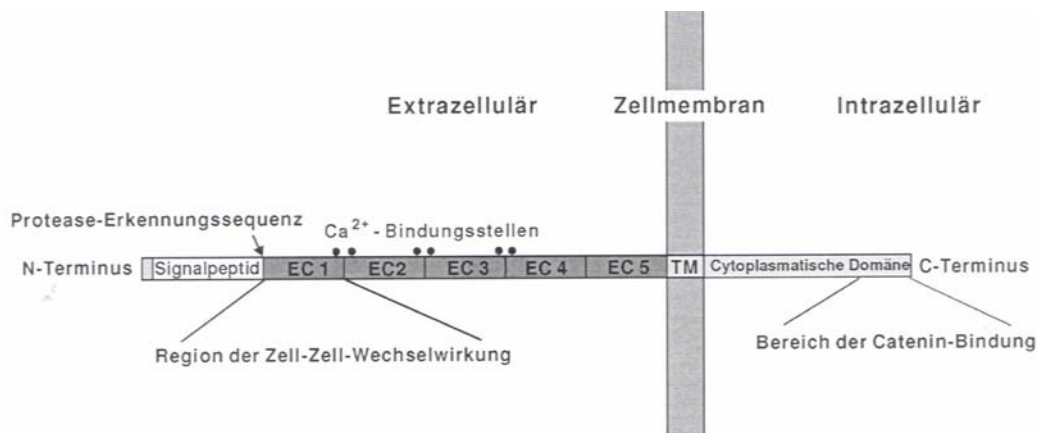


Abb. 1.2 Aufbau eines klassischen Cadherins, inklusive der Wechselwirkungsbereiche, nur einer der beiden tandemartigen Stränge ist dargestellt

Die extrazelluläre Region EC5 ist, obwohl sie bei allen Cadherinen vier konservierte Cysteine aufweist, die am wenigsten, und die EC1 Region die am stärksten konservierte extrazelluläre Domäne. In der EC1-Domäne befindet sich das für die Adhäsionsfunktion wichtige Erkennungs- und Bindungsmotiv, welches bei vielen Cadherinen eine homophile Dimer-Bildung bewirkt und durch ein HAV-Tripeptid charakterisiert ist. E-Cadherin ist als Dimer in die Zelladhäsion eingebunden. Die calciumbindenden Stellen der Cadherine befinden sich in ihrem extrazellulären Teil. Deren Mutation unterbindet die homophile Wechselwirkung und führt somit zur Inaktivierung der Cadherin-Funktion.² Die cytoplasmatische Domäne der klassischen Cadherine, deren bekannteste Vertreter das E-Cadherin und das N-Cadherin sind, interagiert mit intrazellulären Proteinen (Catenin) und stellt über diese eine Verbindung mit den Elementen des Cytoskeletts her. Mutationen in dieser Domäne führen zum Verlust der morphoregulatorischen Funktion und der Fähigkeit zur Adhäsion.² Ausnahmen bezüglich der klassischen Cadherin-Struktur weisen z.B. das T-Cadherin des Huhns³ und die LI-Cadherine auf.

Cadherine spielen bei vielen Prozessen eine Schlüsselrolle. Massgeblich beteiligt sind sie in der Embryogenese,⁴ an der Bildung von „junctional complexes“ und an der Polarisierung von Zellen,⁵ sowie an der Entwicklung von Zell-Zell-Bindungen.⁶ Bei verschiedenen Mitgliedern der Cadherin-Familie konnte ihre Wirkung als Initiator der Tumorsuppression nachgewiesen werden.⁷ Bei anderen Cadherinen wiederum konnte eine Funktion innerhalb des transmembranen Transports nachgewiesen werden.⁸

Während man E-Cadherine in „adherens junctions“ und desmosomale Cadherine in Desmosomen bei Zellkontakten findet, bilden LI-Cadherine eine dritte Ca^{2+} -abhängige Bindungsstelle außerhalb des Bindungsbereichs der klassischen Cadherine. Infolge ihrer Assoziation mit dem Actincytoskelett vermitteln E-Cadherine und desmosomale Cadherine einen mechanisch stabilen Kontakt im oberen Bereich der seitlichen Zelloberfläche. Die LI-Cadherine sind anscheinend für den flexiblen Kontakt der Zellen außerhalb der „junctional complexes“ verantwortlich (Abb. 1.3).⁹

² M. Ozawa, J. Engel, R. Kemler, *Cell* **1990**, 63, 1033-1038.

³ B. Rantsch, M. T. Dours-Zimmermann, *Neuron* **1991**, 7, 391-402.

⁴ M. Takeichi, *Science* **1991**, 251, 1451-1455.

⁵ H. McNeill, M. Ozawa, R. Kemler, W. J. Nelson, *Cell* **1990**, 62, 309-316.

⁶ B. Angres, A. Barth, W. J. Nelson, *J. Cell Biol.* **1996**, 134, 549-557.

⁷ W. Birchmeier, J. Behrens, *Biochem. Biophys. Acta* **1994**, 1198, 11-26.

⁸ a) A. H. Dantzig, J. Danzig, L. B. Tabas, S. Bright, R. L. Shepard, I. L. Jenkins, D. C. Duckworth, J. R. Sportsman, D. Mackensen, P. R. Jr. Rosteck, P. L. Skatrud, *Science* **1994**, 264, 430-433. b) R. B. Thomson, P. Igarashi, D. Biemesderfer, R. Kim, A. Abu-Alfa, M. Soleimani, P. S. Aronson, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 17594-17601.

⁹ R. Gessner, R. Tauber, *Ann NY Acad. Sci.* **2000**, 915, 136-143.

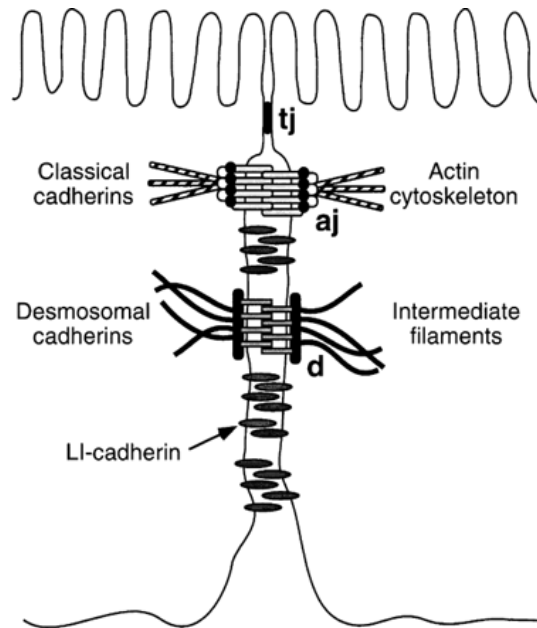


Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Zell-Zell-Kontaktes.

1.2.2 Das LI-Cadherin

Das LI-Cadherin wurde auf der Suche nach einem neuen Zelladhäsionsmolekül im hepatogastrointestinalen Trakt der Ratte gefunden und repräsentiert eine neue Subfamilie der Cadherine.¹⁰ Da es nur in der Leber und im Darm exprimiert wird, erhielt es den Namen „liver-intestine (LI) cadherin“. Interessanterweise wurde das LI-Cadherin der Ratte nur im Dün- und Dickdarm¹⁰ sowie in der Leber, jedoch nicht im Rattenoesophagus (Speiseröhre) oder Rattenmagen gefunden. Sowohl in der Rattenleber als auch im Rattendarm wird das LI-Cadherin nur auf polarisierten Epithelzellen, in Hepatocyten, in Enterocyten oder goblet-Zellen exprimiert. D. Berndorff et al.¹⁰ konnten zeigen, dass der strukturelle Unterschied des LI-Cadherins in Bezug auf die anderen Cadherine sich sowohl im extrazellulären Teil als auch im cytoplasmatischen Teil äußert. Im Gegensatz zu den klassischen und desmosomalen Cadherinen besteht die extrazelluläre Region aus sieben anstatt aus fünf strukturell definierten Wiederholungseinheiten. Weiterhin enthält das LI-Cadherin in der EC1-Domäne des extrazellulären Bereichs anstelle des bei den klassischen Cadherinen konservierten HAV-Motivs ein AAL-Motiv (Abb. 1.4).⁹

¹⁰ D. Berndorff, R. Gessner, B. Kreft, N. Schoy, A. M. Lajous-Petter, N. Loch, W. Reutter, M. Hortsch, R. Tauber, *J. Cell Biol.* **1994**, 125, 1353-1369.

```

LI (r)    LYHTRVLDRETRAVHHQLAALDSQ-GAIVDGVPIIIEVK--DINDNRETFLO
E (m)    LKVTQPLDREBAIAKYIYSHAVSSN-GEAVEDMEIVITVT--DQNDNREBFTQ
N (m)    LSVTKPLDRELIARFHRRAHVDIN-GNQVENIDIVINVI--DMNDNREBFLH
M (m)    YLNATTLDREKTD RFRRAFAALDLDG GSTLEDPTDLEIVVV--DQNDNREBFLQ
DSG-3 (h) INITAIVDREBETPSF-LITCRALNAQGLDVEKELILTVKIL--DINDNREBVSQQ
5 (h)    PAIERRLDRENISEYHRTAVIVDKDTGENLETSSFTIKVH--DVNDNREBVFTH
T (c)    VSVTRPLDREBAIANYEVEVETDLS-GKIIDGVRLDISVI--DQNDNREBMEKE

```

Abb. 1.4 Darstellung der Aminosäuresequenzen der EC1 Domäne von LI(r): LI-cad (Ratte), E(m): E-cad (Maus), N(m): N-cad (Maus), M(m): M-cad (Maus), DSG-3(h): Desmoglein-3 (Human), 5(h): cad 5 (Human), T(c): T-cad (Huhn).

Das LI-Cadherin ähnelt daher mehr dem FAL- und dem RAL-Motiv des M-Cadherins bzw. Desmogleins.

Der zweite große strukturelle Unterschied äussert sich in einer wesentlich kürzeren Aminosäuresequenz in der cytoplasmatischen Domäne. Während bei den klassischen Cadherinen der cytoplasmatische Teil konserviert ist und aus 150-160 Aminosäuren besteht, enthält er im LI-Cadherin nur 20 Aminosäuren und weist keine signifikante Homologie auf. Die Gruppe der Protocadherine kann aufgrund ihrer längeren cytoplasmatischen Kette von den LI-Cadherinen unterschieden werden.¹¹ Mittels Sequenzvergleich zwischen LI-Cadherin des Menschen, der Ratte und der Maus¹² konnte festgestellt werden, dass sie sich strukturell alle auf gleiche Art und Weise von den klassischen Cadherinen unterscheiden und große Sequenzübereinstimmungen aufweisen. Zur Subfamilie der LI-Cadherine kann ein weiteres, 1995 gefundenes Cadherin gezählt werden, dass ebenfalls 7 EC-Domänen enthält. Nach seinem Fundort (in der Niere des Hasen) wird es als Ksp-Cadherin (Kidney-specific) bezeichnet. Gemeinsam bezeichnet man diese Cadherine auch 7D-Cadherine (7 Domain cadherins).

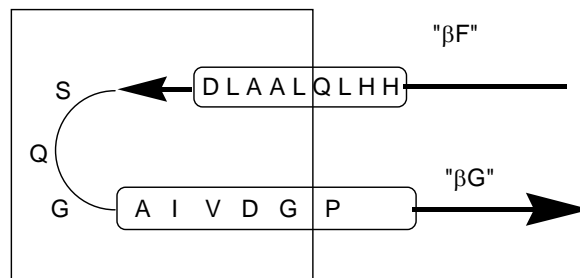
¹¹ K. Sano, H. Tanihara, R. L. Heimark, S. Obata, M. Davidson, T. St. John, S. Taketani, S. Suzuki, *EMBO J.* **1993**, 12, 2249-2256.

¹² B. Angres, L. Kim, R. Jung, R. Gessner, R. Tauber, *Developmental Dynamics* **2001**, 221, 182-193.

1.2.3 Das LI-Cadherin der Maus¹²

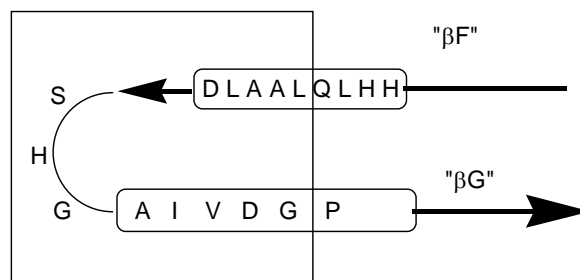
Das LI-Cadherin der Maus zeigt bezüglich seiner Aminosäuresequenz eine 91%ige Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz des LI-Cadherins der Ratte; dementsprechend geht man davon aus, dass alle strukturellen Annahmen für das LI-Cadherin der Ratte auch für das LI-Cadherin der Maus gelten. In Abb. 1.5 ist ein Modell für die „homophile Erkennungsregion“ dargestellt, das aufgrund von Analogieschlüssen auf den bereits charakterisierten Cadherinen, E- und N-Cadherin, beruht. Man ersetzt das HAV-Motiv der klassischen Cadherine durch das AAL-Motiv der LI-Cadherine.

a)



"Homophile
Erkennungsregion"

b)



"Homophile
Erkennungsregion"

Abb. 1.5 Vermutete räumliche Anordnung der „Homophilen Erkennungsregion“ des LI-Cadherins a) der Ratte und b) der Maus.

Die extrazelluläre Domäne des LI-Cadherins der Maus enthält in Analogie zu den anderen Mitgliedern der 7D-Familie 7 EC-Domänen. Genau wie bei den klassischen Cadherinen findet man die üblichen vier Cysteinreste in der EC7-Domäne. Zusätzlich existieren jedoch zwei weitere Cysteine in der EC4-Domäne des LI-Cadherins der Maus. Man fand heraus, dass die calciumbindenden Motive zwischen der zweiten und dritten extrazellulären Domäne fehlen, während man die entsprechenden Motive in allen anderen Domänen nachweisen konnte. Diese fehlende Calciumbindungsstelle könnte eine höhere Flexibilität bei Adhäsionsvorgängen ermöglichen (Abb. 1.6). Jedoch steht man hier noch am Anfang der Untersuchungen, und die Auswirkungen der fehlenden Calciumbindungsstelle müssen noch geklärt werden.

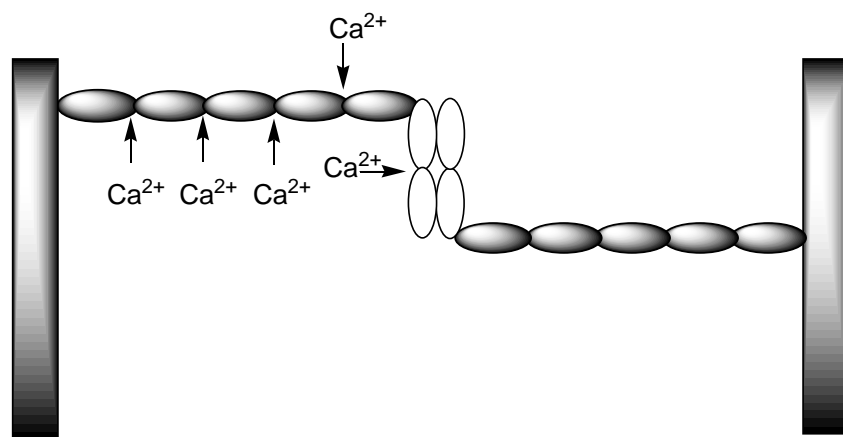


Abb. 1.6 Eventuelle flexible Interaktion der LI-Cadherine.

Die cytoplasmatische Domäne des LI-Cadherins der Maus besteht aus 20 Aminosäuren und ist homolog zu der in der Ratte gefundenen Sequenz. Im Gegensatz zu dem der Ratte konnte das LI-Cadherin der Maus jedoch nur im Dünndarm, Dickdarm und in wesentlich geringerer Konzentration in der Milz nachgewiesen werden. In der Leber trat es nicht auf. Dementsprechend interessant ist die Fragestellung nach der Funktion des LI-Cadherins in der Leber der Ratte, wenn eine so nah verwandte Spezies wie die Maus dieses Molekül in ihrem Lebergewebe nicht aufweist. Gessner und Tauber⁹ konnten zeigen, dass das LI-Cadherin erst spät in der Morphogenese, am 12. Tag, in Darmzellen der Maus exprimiert wird. Erste Hinweise auf eine mögliche biologische Funktion innerhalb der Zelldifferenzierung weisen auf einen Zusammenhang zwischen dem LI-Cadherin und den Transkriptionsfaktoren der sog. Caudal-Familie CDx1 und CDx2, die massgeblich an der Darmentwicklung der Maus beteiligt sind, hin.¹³ CDx2 reguliert unter anderem die

¹³ D. G. Silberg, G. P. Swain, E. R. Suh, P. G. Traber, *Gastroenterology* **2000**, 119, 961-971.

Expression des LI-Cadherins im Darmepithel.¹⁴ Weiterhin wurde beobachtet, dass LI-Cadherin bei der intestinalen Metaplasie (Umwandlung einer differenzierten Zellart in eine andere differenzierte Zellart) des Magens und bei Magenkarzinomen ektopisch (Ansiedlung von Gewebe oder Organen an einer unter physiologischen Bedingungen freien Stelle des Organismus) in den transformierten Zellen des Magenepithels exprimiert wird. Dies liefert einen Hinweis auf eine mögliche Funktion des LI-Cadherins innerhalb der Differenzierungsprozesse.¹⁵ Weiterhin konnte eine Verbindung zwischen dem Anstieg der LI-Cadherin-Expression und dem Differenzierungsgrad von Adenokarzinomen des Pankreas hergestellt werden.¹⁶

1.3 Fluoreszenzfarbstoffe¹⁷

Lumineszenz nennt man die Emission von Licht aus elektronisch angeregten Zuständen.¹⁸ Je nach Art des angeregten Zustands wird die Lumineszenz in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterteilt. Bei der Fluoreszenz findet die Lichtemission aus angeregten Singulettzuständen heraus statt. In einem Singulettzustand ist der Spin des in einem höheren Orbital befindlichen Elektrons dem Spin des im Grundzustandsorbital verbleibenden, zweiten Elektrons entgegengesetzt. Dementsprechend ist die Rückkehr in den Grundzustand quantenmechanisch erlaubt und geht unter Emission eines Photons sehr schnell vonstatten. Die typische Fluoreszenzlebensdauer liegt im Nanosekundenbereich. So können Fluoreszenzfarbstoffe selbst in einem kurzen Beobachtungszeitraum mehrfach zur Emission angeregt werden. Im Gegensatz dazu findet bei der Phosphoreszenz die Lichtemission aus angeregten Triplettzuständen heraus statt. Aufgrund gleicher Spinausrichtung der Elektronen sind in diesem Fall die Übergänge in den Grundzustand verboten und die typische Phosphoreszenzlebensdauer liegt im Bereich von Millisekunden bis Sekunden. Den Zusammenhang zwischen Lichtabsorption und -emission für Fluoreszenz und Phosphoreszenz veranschaulicht das Jablonski-Termschema (Abb. 1.7).

¹⁴ T. Hinoi, P. C. Lucas, R. Kuick, S. Hanash, K. R. Cho, E. R. Fearon, *Gastroenterology* **2002**, 123, 1565-1577.

¹⁵ C. Göttinger, J. Kneifel, D. Patschan, N. Schoy, I. Anagnostopoulos, S. Faiss, R. Tauber, B. Wiedenmann, R. Gessner, *Gut* **2001**, 49, 73-81.

¹⁶ M. Takamura, M. Sakamoto, Y. Ino, T. Shimamura, T. Ichida, S. Hirohashi, *Cancer Sci.* **2003**, 94, 425-430.

¹⁷ M. Elb, *Dissertation*, Tübingen **2004**.

¹⁸ J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2. Aufl., Kuwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**.

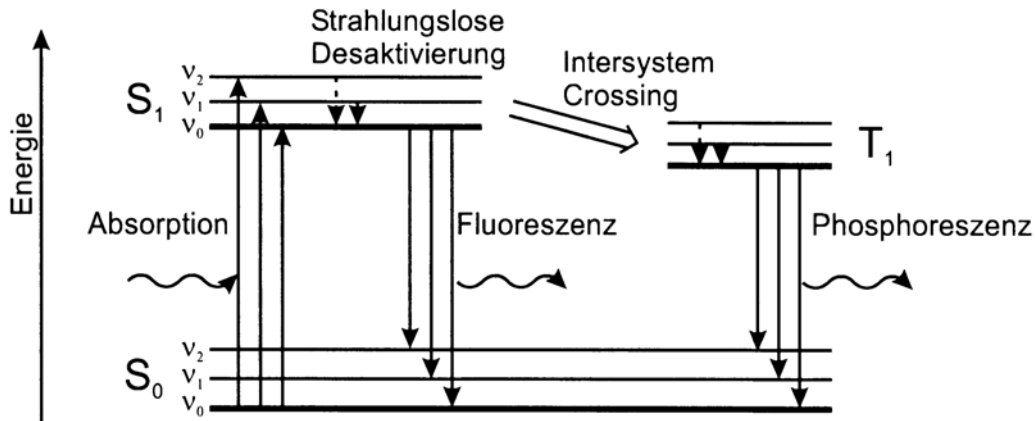


Abb. 1.7 Jablonski-Termschema

Die Lage der Energieniveaus, die für jede Substanz charakteristisch ist, bedingt das charakteristische Absorptionsspektrum der Substanzen. Der grosse Wellenlängenbereich des Absorptionsspektrums gelöster Substanzen resultiert aus den vielen möglichen, unterschiedlichen Energiedifferenzen, die bei der Anregung aus dem elektronischen Grundzustand S_0 in die verschiedenen Schwingungsniveaus v_n des angeregten Zustands S_1 auftreten können. Nach strahlungslosen Deaktivierungsvorgängen erfolgt die Emission in die verschiedenen Schwingungsniveaus v_n des Grundzustandes (S_0) aus v_0 von S_1 (Kasha-Regel), mit sich anschließenden strahlungslosen Desaktivierungsvorgängen. Daher sind die Energiedifferenzen bei der Emission kleiner, so dass im Vergleich zur Absorption Licht geringerer Energie freigesetzt wird (Stokes-Shift). Die vielen, energetisch leicht verschiedenen Schwingungsniveaus von S_0 erklären, warum sich für die Emission ebenfalls ein Spektrum ergibt bzw. das Emissionsspektrum zu grösseren Wellenlängen verschoben ist. Diese Verschiebung zwischen den Wellenlängen der Absorption und denen der Emission wird in der Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie ausgenutzt, um das Anregungslicht auszublenden und selektiv das von der Probe ausgestrahlte Fluoreszenzlicht zu detektieren.

Für die Auswahl von Fluoreszenzfarbstoffen ergibt sich daraus, dass sie mit ihren spektralen Eigenschaften, insbesondere mit der oben erwähnten Wellenlängenverschiebung auf die Bauteile des Fluoreszenzmikroskops abgestimmt sein müssen. Weitere Kriterien für die Auswahl geeigneter Fluorophore sind u.a. die Fluoreszenzlebenszeit, die Quantenausbeute, die Löslichkeit und die Stabilität gegenüber der Bleichung durch das Anregungslicht. Je nach Anwendung müssen neben den spektralen Eigenschaften aber auch andere stoffliche Eigenschaften berücksichtigt werden. Fluoreszenzfarbstoffe sind typischerweise aromatische Verbindungen. Zur Veränderung der spektralen Eigenschaften

enthalten diese elektronenanziehende und –abgebende Substituenten. So stehen über das grosse Spektrum an Substituenten zahlreiche Fluorophore zur Auswahl, die beispielsweise unterschiedliche Löslichkeiten in verschiedenen Lösungsmitteln zeigen, unterschiedliche Ladungen oder eine Abhängigkeit der Wellenlängenverschiebung vom pH-Wert bewirken. Ist eine Verknüpfung mit einem zu markierenden Molekül gewünscht, müssen die Fluorophore zusätzlich funktionelle Gruppen enthalten, die eine kovalente Bindungsbildung ermöglichen.

1.4 Resonanz-Energie-Transfer¹⁹

Resonanz-Energie-Transfer, oft auch als Fluoreszenz-Energie-Transfer oder Förster-Energie-Transfer bezeichnet,²⁰ stellt den strahlungslosen Übergang von Energie aus einem angeregten Zustand eines Donors in einen angeregten Zustand eines Akzeptors dar. Eine wichtige Konsequenz aus dieser Energieübertragung ist, dass im Idealfall keine Lichtemission vom Donor mehr auftritt. Beim Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) werden typischerweise Energien über einen Abstand von 1-10 nm übertragen. Dabei verhält sich die Abstandsabhängigkeit der Energieübertragung umkehrt proportional zur sechsten Potenz ($\sim \frac{1}{R^6}$) der Dipolabstände zueinander.²¹ Da FRET typischerweise über Abstände von 1-10 nm auftritt, wird diese Methode zur chromophoren Markierung biologischer Makromoleküle eingesetzt. FRET ist ein wahrscheinlichkeitstheoretisches Ereignis zwischen zwei Dipolen eines passenden Donor-Akzeptorpaars. Die praktische Beobachtung des Effekts geht mit einem Abfall der Donorfluoreszenz und einem Anstieg der Akzeptorfluoreszenz einher. Besonders herausgestellt werden sollen einige Faktoren die grossen Einfluss auf FRET haben:

- Das spektrale Überlappungsintegral J ist ein Mass für die Überlappung der Emissionsbande des Donors und der Absorptionsbande des Akzeptors (Abb. 1.8).

¹⁹[http://www1.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/4a0f132842ea4d354a25685d0011fa04/6bf1b5bb2f83f4f2c1256ea8002bd91c/\\$FILE/Fluorescence.pdf](http://www1.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/4a0f132842ea4d354a25685d0011fa04/6bf1b5bb2f83f4f2c1256ea8002bd91c/$FILE/Fluorescence.pdf)

²⁰ T. Förster, *Ann. Phys. Leipzig* 2 **1948**, 55-75.

²¹ B. W. Van der Meer et al., *Resonance Energy Transfer. Theory and Data*, Wiley-VCH, Weinheim, **1994**, 133-168.

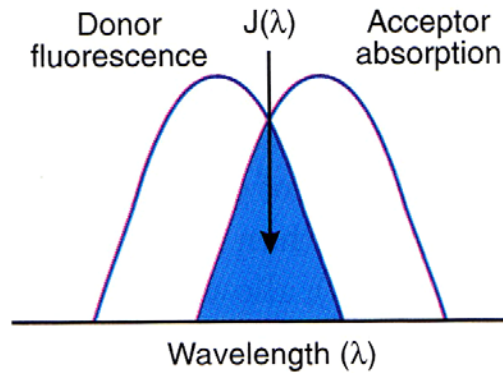


Abb. 1.8 Überlappungsintegral J

Es wird berechnet nach:

$$J(\lambda) = \frac{\int F_D(\lambda) * \epsilon_A(\lambda) * \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda}$$

$F_D(\lambda)$ = Fluoreszenzintensität des Donors

$\epsilon_A(\lambda)$ = Extinktionskoeffizient des Akzeptors bei Wellenlänge λ

$\lambda = \lambda_{\max}$ des fluoreszierenden Übergangs

- Neben der oben beschriebenen Abstandsabhängigkeit ist als weiterer wesentlicher Faktor die Orientierung der beiden Dipole κ zueinander ausschlaggebend. Ein Maximum erreicht die Energieübertragung bei paralleler Ausrichtung. Mathematisch lässt sich der Korrekturfaktor wie folgt beschreiben:

$$\kappa^2 = (\cos \Theta_T - \cos \Theta_D * \cos \Theta_A)^2$$

Θ_T = Winkel zwischen Emissions-Dipol des Donors und dem Absorptions-Dipol des Akzeptors

Θ_D = Winkel zwischen dem Emissions-Dipol des Donors und der gedachten Verbindung zwischen den beiden Fluorophoren

Θ_A = Winkel zwischen dem Absorptions-Dipol des Akzeptors und der gedachten Verbindung zwischen den beiden Fluorophoren

Der Faktor κ^2 kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Das Minimum von 0 wird erreicht, wenn die beiden Dipolmomente senkrecht aufeinander stehen. Bei einer antiparallelen Ausrichtung ergibt sich ein Wert von 1. Im Fall frei rotierender

Fluorophore, kommen alle Winkel statistisch gemittelt vor und κ^2 wird mit $2/3$ angenommen.

- Die Quantenausbeute als Maß für den Quotienten aus eingestrahelter und abgegebener Energie hat selbstverständlich ebenfalls einen fundamentalen Einfluss auf FRET.

Bildlich veranschaulicht werden können diese Prozesse in einem modifizierten Jablonski-Diagramm (Abb. 1.9).

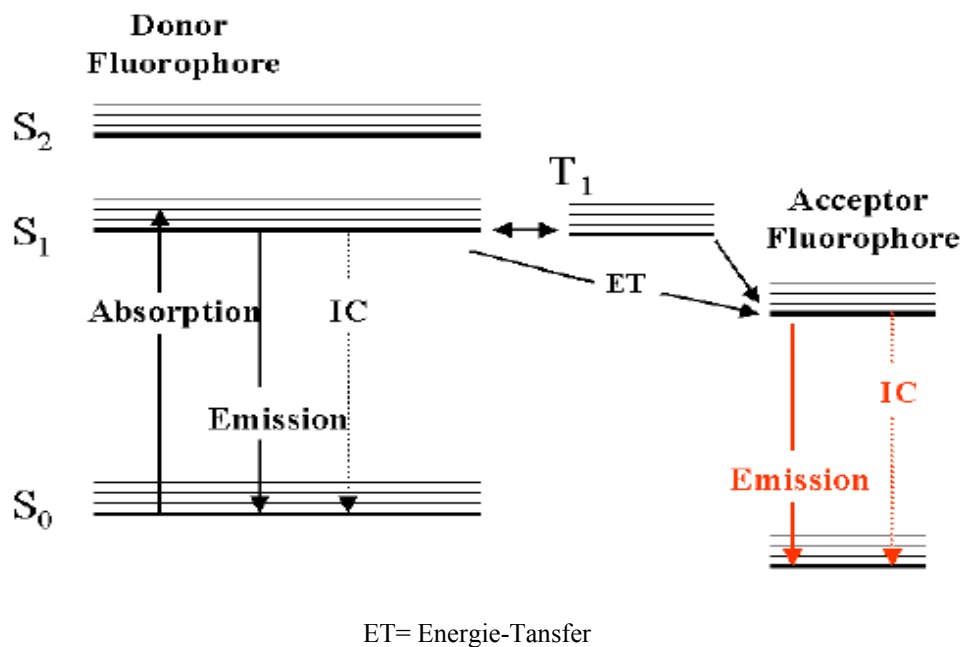


Abb. 1.9 Jablonski-Diagramm des FRET-Prozess

Eine der wichtigsten Kennzahlen jedoch, die den FRET beschreiben, ist die Energie-Transfer-Effizienz. Bestrahlt man den Donor mit elektromagnetischer Strahlung passender Wellenlänge, so emittiert dieser mit einer bestimmten Intensität Fluoreszenzlicht. Befindet sich aber ein Akzeptormolekül in seiner Nachbarschaft, so verringert sich seine Fluoreszenzintensität um den Betrag, um den die Akzeptorfluoreszenz zunimmt, vorausgesetzt der Akzeptor ist zur Fluoreszenz fähig. Die Transfer-Effizienz ergibt sich somit aus dem Verhältnis der Anzahl an Quanten, die pro Sekunde vom angeregten Donorzustand auf den Akzeptor übertragen werden, zur Gesamtzahl der vom Donor pro Sekunde absorbierten Photonen. Die Anzahl der vom Donor emittierten Photonen ist

proportional der Lebensdauer seines angeregten Zustands. Genauso verhält es sich auch mit dem Akzeptor. Man kann daher E_{FRET} schreiben als

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

τ_D = Lebensdauer des angeregten Zustands des Donors

τ_{DA} = Lebensdauer in Anwesenheit des Akzeptors

Ergibt sich für E_{FRET} ein Wert von 1, so wird die gesamte Energie vom Donor auf den Akzeptor übertragen. Dies hat zur Folge, dass der Donor nicht mehr fluoresziert. Gleichzeitig gilt für E_{FRET} auch die oben beschriebene Abstandsabhängigkeit:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{[1 + (\frac{R}{R_0})^6]}$$

R = Abstand zwischen Donor/Akzeptor Paar

R_0 = Förster-Radius

Setzt man nun beide Gleichung in Korrelation so ergibt sich die Gleichung für die Energie-Transfer-Effizienz:

$$\frac{\tau_D}{\tau_{DA}} = 1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6$$

Der Förster-Radius ist der Abstand, bei dem die Effizienz der Energieübertragung 50% beträgt. Die Fluoreszenz scheint teilweise gelöscht zu sein. Der Betrag des Förster-Radius ist abhängig von der Wahl des Fluorophorenpaares.

$$R_0^6 = \frac{8.785 \cdot 10^{-25} \cdot \Phi_D \cdot \kappa^2 \cdot J(\lambda)}{\eta^4}$$

κ = Orientierungsparameter

η = Refraktionsindex, beschreibt den Einfluss des Lösungsmittels zwischen den Fluorophoren (z.B. Wasser 1,33)

$J(\lambda)$ = spektrale Überlappung

1.5 Tumorassoziierte Antigene

Bevor ein Glycoprotein seine biologisch aktive Form erreicht, durchläuft es posttranslatorische Modifikationen. Diese schließen sich mehr oder weniger direkt an die ribosomale Proteinbiosynthese an.²² Neben einer Vielzahl von Modifizierungen wie z.B. Methylierungen oder Phosphorylierungen gehören dazu auch die *N*- und *O*-glycosidischen Verknüpfungen mit Oligosacchariden, die im Fall der *O*-Glycane im Golgi-Apparat stattfinden.²³ Die Anbindung von *N*-Acetylgalactosamin an Serin oder Threonin erfolgt im cis-Golgi, wobei der Saccharidteil bei der Wanderung des Proteins zum trans-Golgi vergrößert wird. Die für die einzelnen Schritte benötigten Glycosyltransferasen sind dementsprechend unterschiedlich über den Golgi-Apparat verteilt. Während sich die β -(1 \rightarrow 3)-Galactosyltransferase, welche die sogenannte Core 1 Struktur erzeugt, im mittleren Bereich des Golgi-Apparats befindet, sitzen die Sialyltransferasen zur terminalen Sialylierung vorwiegend im trans-Golgi (Abb. 1.10).²⁴ Das Glycosylierungsmuster ist sowohl vom Entwicklungsstadium des Organismus als auch vom Zelltyp abhängig. Unter pathologischen Bedingungen kann man insbesondere bei Tumorzellen verstärkte Präsenz einzelner Glycosyltransferasen, insbesondere der Sialyltransferasen, aber auch das Fehlen einiger anderer beobachten. Daraus resultiert die Bildung verkürzter Kohlenhydratstrukturen, der sogenannten tumorassoziierten Antigene.²⁵ Die Expression von T_N- und T- sowie von Sialyl-T-Antigenen konnte z.B. bei Darmkrebs beobachtet werden. Diese sind im gesunden Gewebe nicht nachweisbar.²⁶

²² B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, Wiley-VCH Weinheim **1999**.

²³ I. Brockhausen, H. Schachter, J. F. G. Vliegthart (Hrsg.), *Glycoproteins*, Elsevier, Amsterdam **1995**, 201.

²⁴ J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, 6, 355-364.

²⁵ a) S. Hakomori, *Cancer Res.* **1985**, 45, 2405-2414. b) I. Brockhausen, J. Yang, N. Dickinson, S. Ogata, S. H. Itzkowitz, *Glycoconj. J.* **1998**, 15, 595-603.

²⁶ S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. M. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, 49, 197-204.

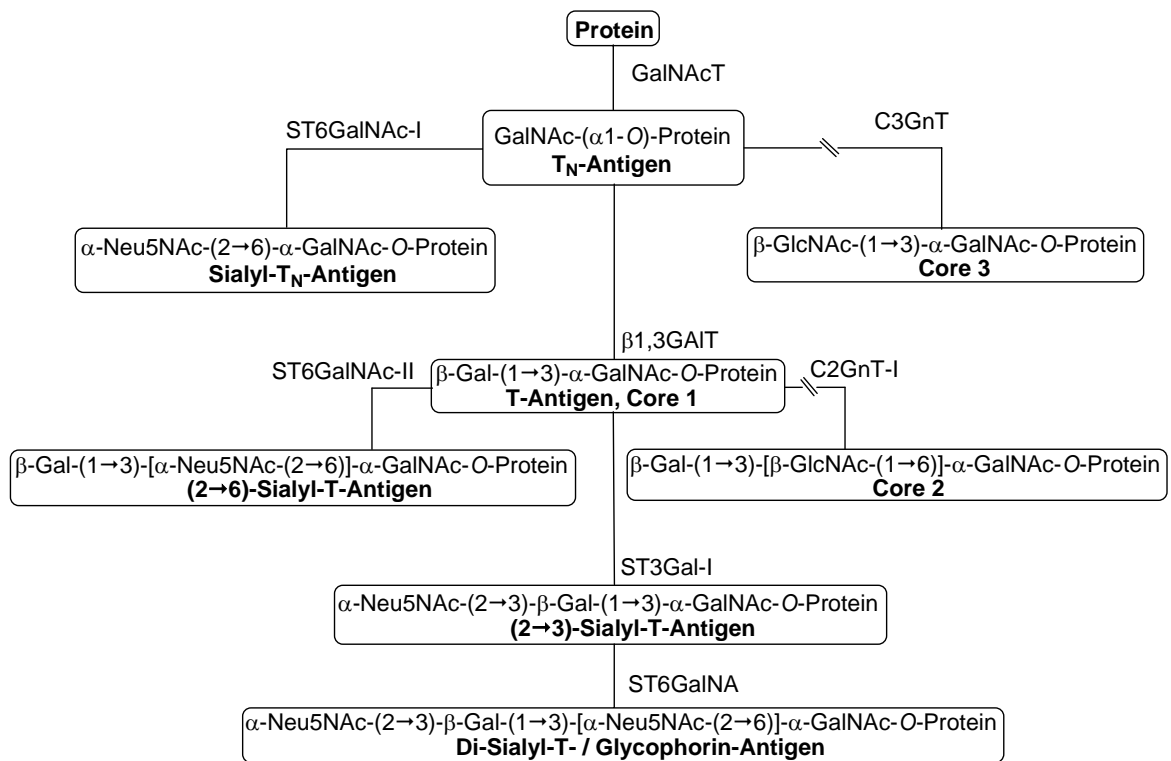


Abb. 1.10 Schema der *O*-Glycan Biosynthese in Tumorzellen

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

ST3Gal-I: CMP-Neu5Nac:Gal β 1,3GalNAc-R α 2,3-Sialyltransferase-I

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

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

C3GnT: Core 3 β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase

ST6GalNAc-I: CMP-Neu5Nac:GalNAc-R α 2,6-Sialyltransferase-I

ST6GalNAc-II: CMP-Neu5Nac:GalNAc-R α 2,6-Sialyltransferase-II

Besonders auffällig ist, dass die Glucosamintransferase C2GnT-I in dem Epitheltumorzellen wenig oder nicht exprimiert wird. Dadurch und wegen der überexprimierten Sialyltransferase werden die tumorassoziierten Sialyl-T_N- und Sialyl-T-Antigene die dominanten Saccharidstrukturen der Mucine auf den Tumorzellen.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Partialsequenzen aus der homophilen Erkennungsregion des LI-Cadherins der Maus synthetisiert werden. Als zu synthetisierender Bereich wurden die Aminosäuren 94-109 ausgewählt. Aufgrund von Analogieschlüssen ist bei der gewählten Sequenz davon auszugehen, dass es sich bei dem AAL-Motiv um die homophile Erkennungsregion handelt. Da fast ausschliesslich hydrophobe Aminosäuren in der zu synthetisierenden Sequenz vorkommen und dies zu Löslichkeitsproblemen führen kann, sollen mit der Aminosäure Serin (Position 100) verschiedene tumorassoziierte Saccharid-Antigene verknüpft werden, die die Löslichkeit der zu synthetisierenden Peptide verbessern sollten (Abb. 2.1).

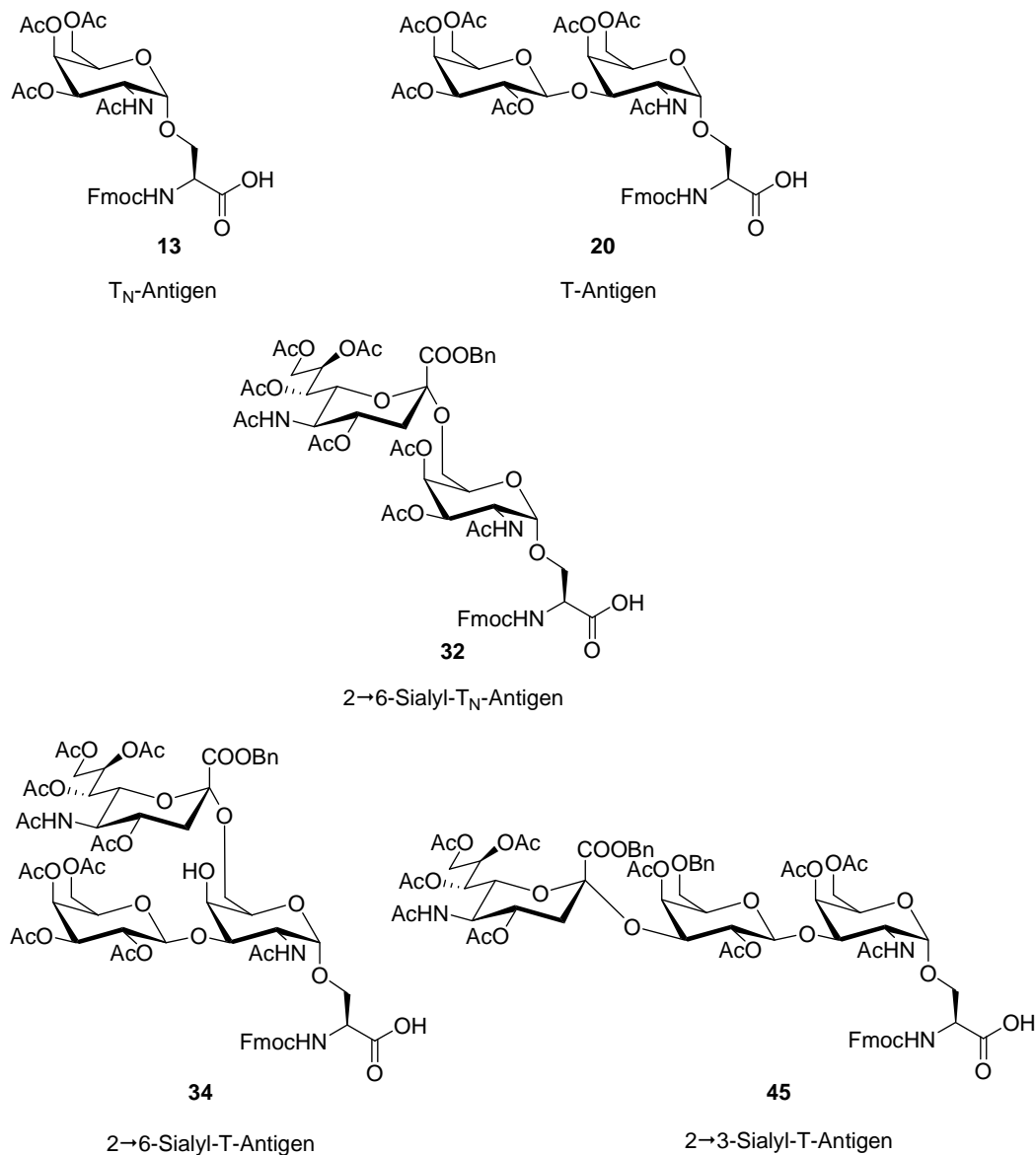


Abb. 2.1 Im Rahmen der Arbeit verwendete tumorassoziierte Antigene

Weiterhin sollen Glycopeptide synthetisiert werden, die mit Chromophorenpaaren versehen die Möglichkeit bieten, ihre Konformation mittels FRET-Spektroskopie zu analysieren. Hierzu soll sowohl ein Chromophorenpaar bestehend aus Dansyl/Tryptophan als auch, ein neuer, die Löslichkeitseigenschaften verbessernder Farbstoff aufbauend auf 7-Aminocumarin in Verbindung mit Tryptophan eingesetzt werden (Abb. 2.2).

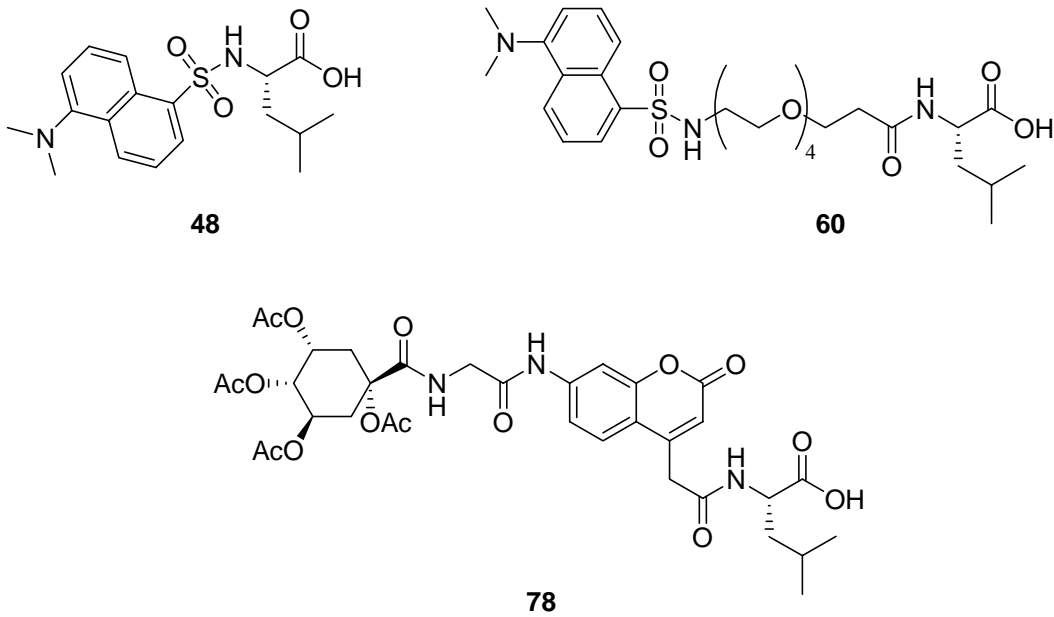


Abb. 2.2 Neben Tryptophan verwendete Chromophore

3 Allgemeiner Teil

3.1 Synthese der Antigen-Serin-Konjugate

3.1.1 Darstellung des zentralen *N*-Acetylgalactosamin-Serin-Bausteins (T_N-Antigen)

Der benötigte zentrale Baustein zur Synthese der angestrebten tumorassoziierten Antigene ist das T_N-Antigen. Dieses wird in Analogie zu einer bekannten Synthese des *N*-Acetylgalactosamin-Threonin-Derivats aufgebaut.²⁷

Die für die Glycosylierung vorgesehene orthogonal geschützte Aminosäure erhält man ausgehend von L-Serin **1** in 2 Stufen. Hierzu wird zuerst die Aminofunktion der Aminosäure durch Umsetzung mit *N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)succinimid-carbonat (Fmoc-ONSu) in einem Aceton-Wasser-(1:1)-Gemisch und Zugabe von NaHCO₃ als Base geschützt.²⁸ Das in einer Ausbeute von 95% erhaltene Fmoc-Ser-OH **2** wird im folgenden durch eine Cu(I)-katalysierte Reaktion unter Zusatz von DCC und *tert*-Butanol als Lösungsmittel selektiv verestert.²⁹ Eine genaue Kontrolle der Reaktion und die Einhaltung der Reaktionsdauer ist sehr wichtig, da es sonst ebenfalls zur Veretherung der β-Hydroxyfunktion kommen kann (Abb. 3.1).

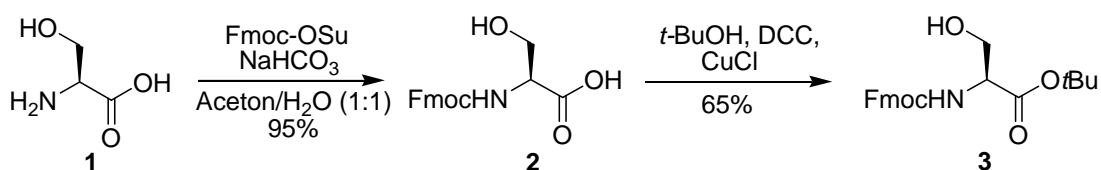


Abb. 3.1 Synthese der orthogonal geschützten Aminosäure **3**

Der für die Glycosylierung benötigte Galactosaminyl-Donor 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-galactosylbromid **10** wird ausgehend von D-Galactose in **4** Stufen hergestellt. Im ersten Reaktionsschritt wird D-Galactose **4** durch Einsatz von Acetanhydrid und katalytischen Mengen Perchlorsäure peracetyliert. Die so erhaltene Peracetylgalactose wird

²⁷ B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 629-631.

²⁸ A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 976-982.

²⁹ H. Kunz in „Preparative Carbohydrate Chemistry“, Hrsg. S. Hanessian, Marcel Dekker Pub., New York **1997**, S. 265-281.

mit Phosphortribromid quantitativ in das Glycosylbromid **5** überführt. Die quantitative Bildung des α -Bromids wird durch den anomeren Effekt begünstigt. Durch Einwirkung von Zink-Pulver in Essigsäure lässt sich Bromid **5** in das gewünschte 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-galactal **6** überführen (Abb. 3.2).³⁰

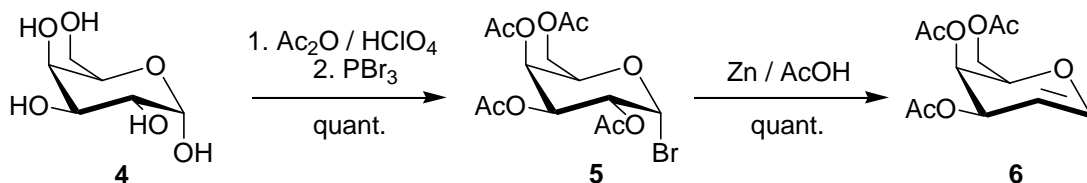


Abb. 3.2 Darstellung des Galactals **6**

Das erhaltene Galactal **6** wird einer Azidonitratierung nach Lemieux unterzogen.³¹ Durch den Einsatz von Cerammoniumnitrat und Natriumazid in Acetonitril kommt es zu einer Addition der Azidfunktion in der 2- sowie der Nitratfunktion in der 1-Position der Galactopyranose. Das 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactosylnitrat **7** wird in einer Ausbeute von 32%, als Anomerengemisch in einem Verhältnis von $\beta/\alpha \approx 2.4/1$ (Abb. 3.3) erhalten.

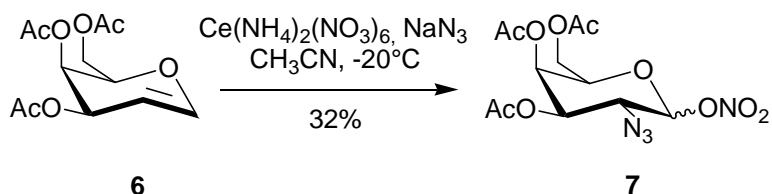


Abb. 3.3 Synthese von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactosylnitrat **7**

Nach dem von Lemieux³¹ vorgeschlagenen Mechanismus geht man davon aus, dass die Addition aufgrund der Abstraktion eines Elektrons aus dem Azidion durch das starke Oxidationsmittel Cer(IV) initiiert wird. Dabei wird es im Sinne einer Redoxreaktion zu Cer(III) reduziert. Das so entstehende Radikal wird zuerst von der Doppelbindung koordiniert, bevor es durch einen weiteren Einelektronentransfer zur selektiven Bindungsknüpfung mit C2 kommt, wobei das anomere Kation **9** gebildet wird.

³⁰ A.P. Kozikowski, J. Lee, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 863-870 ; J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, 13, 129-132.

³¹ a) R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, Deutsche Patentanmeldung **1978**, AZ :P 2816340.8; b) R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244-1257.

Die regioselektive Bindungsknüpfung erfolgt vermutlich durch die Stabilisierung des entstehenden Kations unter Einbezug des Ringsauerstoffs. Denn weder von Lemieux,³¹ noch von M. Liu³² konnten Produkte nachgewiesen werden, in denen sich die Azidofunktion in der 1-Position befindet.

Durch Addition des Nitrations erhält man das anomere Gemisch des 2-Azido-2-desoxy-galactosylnitrats **7** (Abb. 3.4).

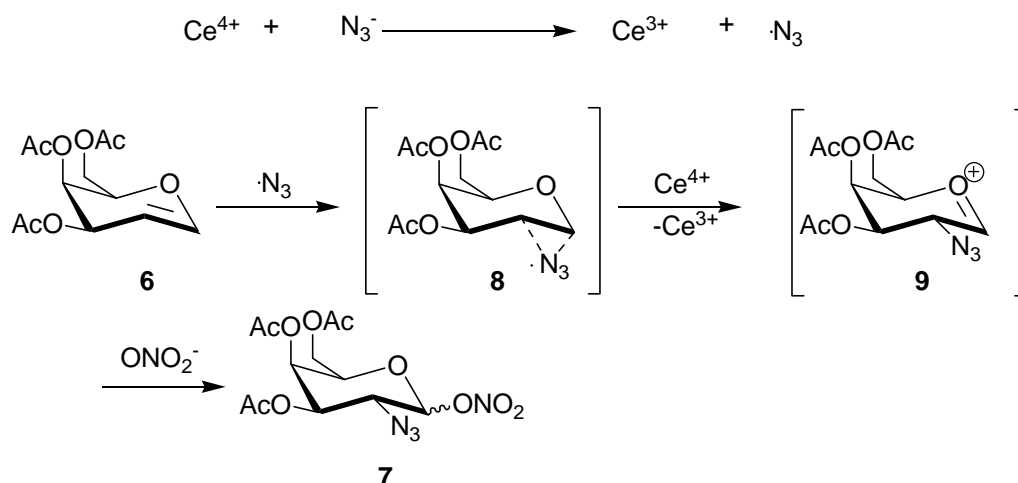


Abb. 3.4 Von Lemieux postulierter Mechanismus der Azidonitratisierung

Der letzte Schritt in der Synthese des Glycosyldonors **10** besteht in der Umsetzung des anomeren Gemisches mit wasserfreiem Lithiumbromid in Acetonitril. Hierbei wird die stereoselektive Bildung des α -Anomers durch den anomeren Effekt begünstigt (Abb. 3.5). Aufgrund der hohen Reinheit des erhaltenen α -Galactosylbromids wird das stabile Produkt³² direkt in der Glycosylierungsreaktion eingesetzt.

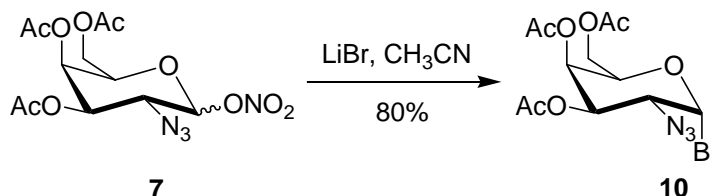


Abb. 3.5 Darstellung des α -Galactosylbromids

Die Glycosylierungsreaktion wird unter Koenigs-Knorr-Bedingungen in Anlehnung an eine von Paulsen *et al.*³³ entwickelte Methode durchgeführt. Die Aktivierung des 2-Azido-

³² M. Liu, V. G. Young Jr., S. Lohani, D. Live, G. Barany, *Carb. Res.* **2005**, 340, 1273-1285.

³³ H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydrat Res.* **1982**, 109, 89.

2-desoxy- α -D-galactosylbromids **10** erfolgt in einer Mischung aus absol. Dichlormethan/Toluol (1:1) durch Zugabe von Silbercarbonat und wasserfreiem Silberperchlorat. Dabei entsteht mit hoher α -Selektivität in 69% Ausbeute die gewünschte glycosylierte Aminosäure **11** (Abb. 3.6).³⁴

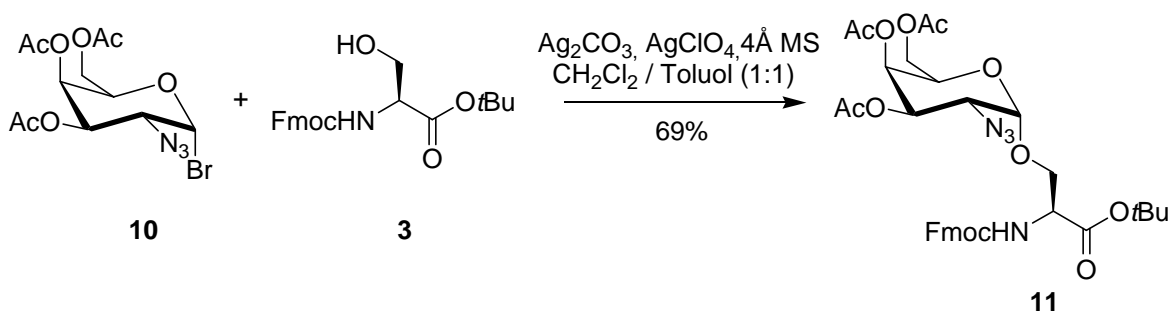


Abb. 3.6 Glycosylierung zum gewünschten Aminosäurederivat **11**

Im Anschluss an die Glycosylierung folgt die Reduktion der Azidofunktion unter gleichzeitiger *N*-Acetylierung durch Einsatz von aktiviertem Zink in einer Mischung aus THF/Ac₂O/AcOH (3:2:1).³⁵ Das Acetamid **12** kann in 77%iger Ausbeute isoliert werden (Abb. 3.7).

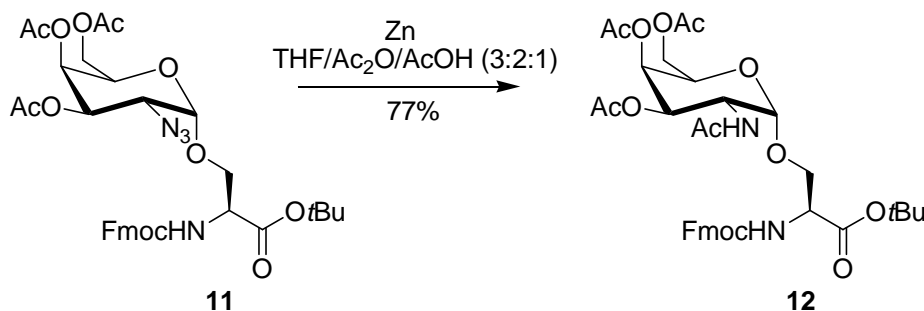


Abb. 3.7 Reduktive *N*-Acetylierung zum Acetamid **12**

In Abhängigkeit von dem weiteren Vorgehen unterscheidet sich die zu wählende Syntheseroute. Möchte man den T_N-Antigen-Baustein für die Festphasensynthese verwenden, so erfolgt die Deblockierung der Carboxylfunktion mittels CH₂Cl₂/TFA (1:1) unter Zusatz von Anisol als Kationenfänger.³⁶ Sollen die Hydroxylfunktionen des

³⁴ a) H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 354-355. b) B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8777-8778. c) B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1473-1482.

³⁵ E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 985-993.

³⁶ In Analogie zu S. Keil, *Dissertation*, Universität Mainz **2000**.

Saccharids zur Synthese der komplexen tumorassoziierten Antigene weiter funktionalisiert werden, so werden sie zuerst unter Zemplén-Bedingungen deblockiert (siehe Kapitel 3.1.2).³⁷

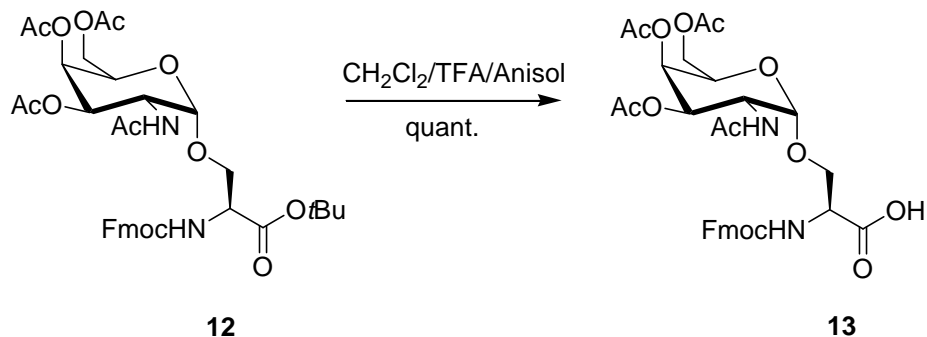


Abb.3.8 Deblockierung zum Festphasensynthese geeigneten T_N-Baustein **13**

Ausgehend von Verbindung **12** erhält man den für die Festphasensynthese geeigneten T_N-Antigen-Baustein durch Einsatz von CH₂Cl₂/TFA/Anisol in quantitativer Ausbeute.

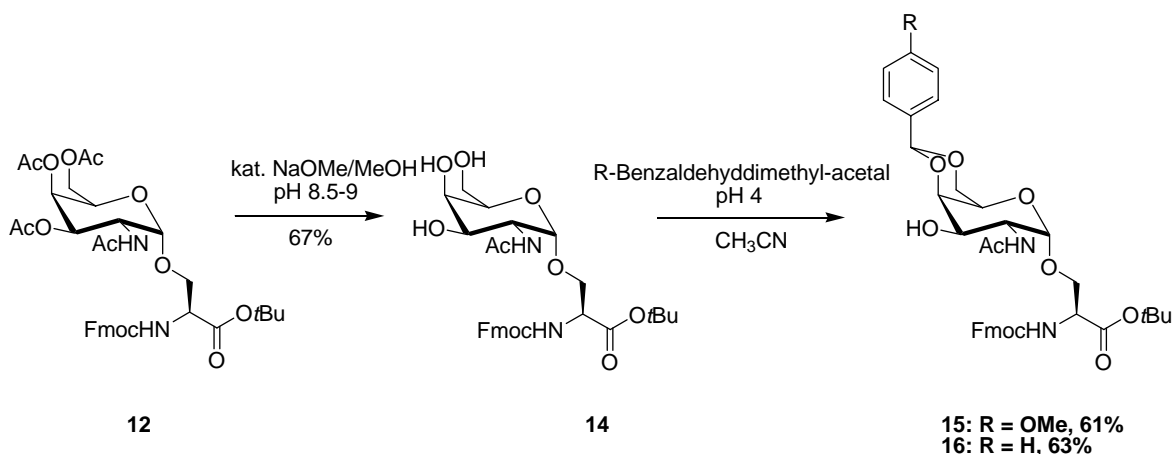
3.1.2 Synthese des T-Antigen-Bausteins

Wie bereits erwähnt, lassen sich sämtliche in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Festphasensaccharidbausteine ausgehend von Verbindung **12** darstellen. Will man das T-Antigenmotiv ausgehend von Verbindung **12** synthetisieren, so muss die 3-Position der Acetylgalactosaminderivate **15/16** einer selektiven β-Glycosylierung unterzogen werden. Zum Schutz der reaktiveren 6-Position und der 4-Position kommen sowohl die Benzylidenacetal- als auch die p-Methoxybenzylidenacetalschutzgruppe zum Einsatz.

Die Umesterung der *O*-Acetylgruppen von Verbindung **12** erfolgt unter Zemplén-Bedingungen.³⁷ Hierbei wird eine katalytische Menge NaOMe in MeOH bei einem pH-Wert von 8.5-9.0 verwendet. Bereits geringfügige Abweichungen von diesem pH-Bereich oder zu lange Reaktionszeiten führen entweder zu keiner Reaktion oder zum gleichzeitigen Verlust der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe (Abb. 3.9).^{34,38}

³⁷ G. Zemplén, A. Kunz, *Chem. Ber.* **1923**, 56, 1705-1710.

³⁸ L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5748-5749.

Abb.3.9 Synthese der Glycosylakzeptoren **15** und **16**

Abhängig davon, ob man die oben gezeigten Glycosylakzeptoren **15**, **16** oder den Akzeptor **14**, der bei der Synthese des 2,6-Sialyl-T_N-Derivats eingesetzt wird, verwenden möchte, wird Verbindung **14** einem Reinigungsschritt unterzogen oder direkt weiter umgesetzt. Den Schutz der 4- und 6-Position erreicht man hierbei durch Verwendung von *p*-Methoxybenzaldehyddimethyl-acetal³⁹ bzw. Benzaldehyddimethyl-acetal⁴⁰ in Acetonitril bei pH 4, durch Zugabe von *p*-Toluolsulfonsäure und erhält so über 2 Stufen in guten Ausbeuten die angestrebten Glycosylakzeptoren **15** bzw. **16**.

Als Glycosyldonor bei der Synthese des Disaccharidbausteins kommt das Tetraacetylgalactosylbromid **5** in einer *Helferich*-Reaktion⁴¹ mit stöchiometrischen Mengen von Hg(CN)₂⁴² zum Einsatz (Abb. 3.10).

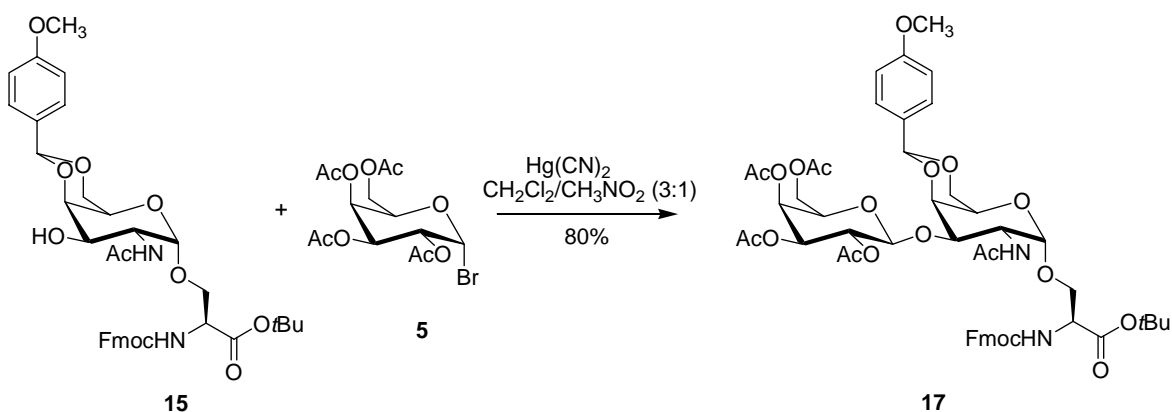


Abb. 3.10 Glycosylierung nach Helferich

³⁹ M. Kloostermann, T. Slaghek, J. P. Hermans, J. H. v. Boom, *J. R. Neth. Chem. Soc.* **1984**, 103, 335.

⁴⁰ S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 880-885.

⁴¹ B. Helferich, F. Wedemeyer, *Liebigs Ann. Chem.* **1949**, 563, 139-145.

⁴² T. Reipen, H. Kunz, *Synthesis* **2003**, 2487-2502.

Die Reaktion liefert nach chromatographischer Reinigung das gewünschte β -Glycosid in 80%iger Ausbeute.

Aufgrund des acetalischen Charakters der Benzylidenschutzgruppe und der damit verbundenen Hydrolyseempfindlichkeit im sauren Reaktionsmedium muss die Benzylidenschutzgruppe gegen Acetylgruppen ausgetauscht werden, bevor man die säurelabile *tert*-Butylschutzgruppe der Carboxylfunktion entfernen kann. Es wurden zwei Alternativen angewandt, um die Schutzgruppe zu entfernen: zum einen die Bindungsspaltung des Acetal in 80%iger Essigsäure bei 80°C⁴³ und zum anderen die oxidative Spaltung durch Einsatz von Cerammoniumnitrat in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (9:1) (Abb. 3.11).⁴⁴

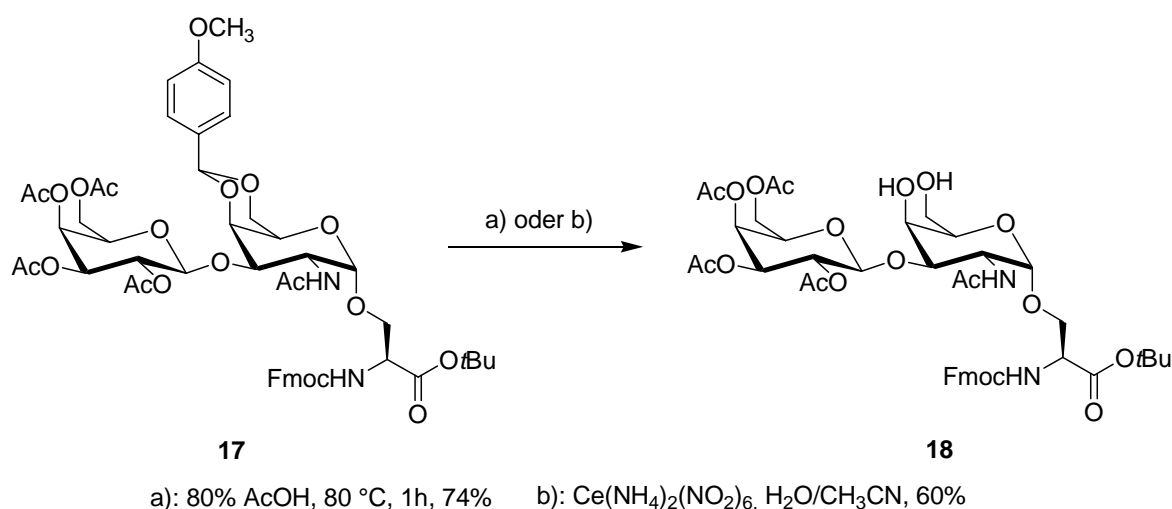


Abb. 3.11 Freisetzung der 4- und 6-Hydroxylgruppen

Die so freigesetzten OH-Funktionen lassen sich durch Einsatz von Acetanhydrid in Pyridin (1:3) bei Raumtemperatur acetylieren. Man erhält das gewünschte Derivat **19** in 87% Ausbeute (Abb. 3.12).

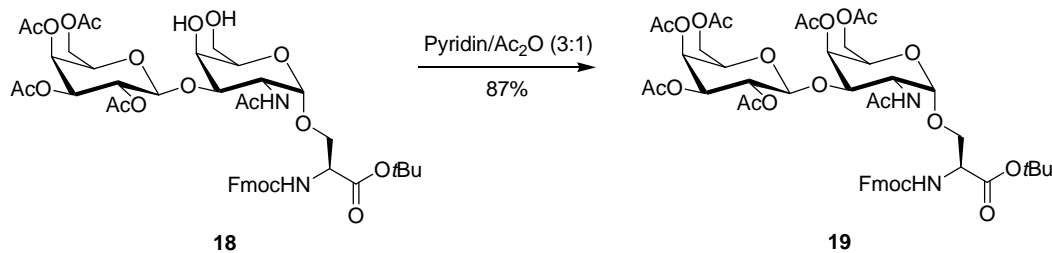


Abb. 3.12 Acetylierung zu Verbindung **19**

⁴³ a) M. Smith, D. H. Rammler, I. H. Goldberg, H.G. Khordua, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 430-440.

⁴⁴ a) N. Bèzay, *Dissertation*, Universität Mainz, **2000**. b) K. Toshima, S. Mukaiyama, T. Yoshida, T. Tamai, K. Tatsuta, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6155-6158.

Um den für die Festphasensynthese geeigneten Serin-T-Antigen-Baustein **20** zu erhalten, wird die Carboxylfunktion mit TFA/Anisol (10:1) bei Raumtemperatur deblockiert. Verbindung **20** kann nach flashchromatographischer Reinigung in 80%iger Ausbeute isoliert werden (Abb. 3.13).

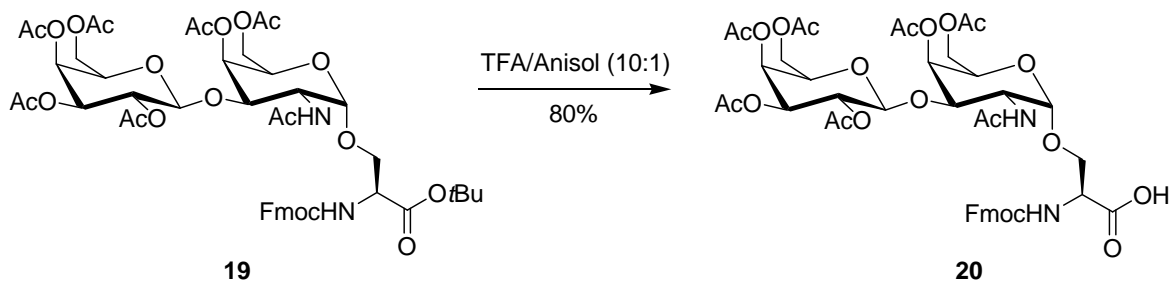


Abb. 3.13 Darstellung des Festphasenbausteins **20**

Ausgehend vom vollgeschützten T_N-Antigen-Derivat **12** lässt sich der T-Antigen-Baustein **20** über 6 Stufen in einer Gesamtausbeute von 14% herstellen.

3.1.3 Synthese des (2→6)-Sialyl-T_N-Antigens

Die Sialinsäure kann in die entsprechende Position eines Akzeptors auf verschiedene Weise eingeführt werden. Als Austrittsgruppen haben sich hauptsächlich Thioglycoside⁴⁵ Phosphite⁴⁶ oder Xanthogenate⁴⁷ bewährt. Die *N*-Acetylneuraminsäure hat keinen Substituenten in 3-Position, der einen Nachbargruppeneffekt bei der Glycosidbildung ausüben könnte. Daher stellen stereoselektive α -Sialylierungen eine synthetische Herausforderung dar. Erschwerend kommt hinzu, dass das anomere Zentrum der Sialinsäure aus einem tertiären Kohlenstoffatom besteht, welches nach erfolgter Aktivierung in ein tertiäres, sterisch gehindertes Oxycarbeniumion übergeht. Dementsprechend ist ein nukleophiler Angriff erschwert. Des Weiteren kommt es aufgrund der Carboxylfunktion am anomeren Zentrum und des damit verbundenen Elektronenzugs leicht zu 2,3-Eliminierungen. Das entstehende Glycal entzieht sich der gewünschten Reaktion. Deshalb müssen Sialinsäuredonoren immer in grossen Überschüssen eingesetzt werden.

⁴⁵ A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1990**, 303-308.

⁴⁶ T. J. Martin, R. Brescello, A. Toepfer, R. R. Schmidt, *Glycoconjugate J.* **1993**, 10, 16-25.

⁴⁷ A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, 187, 35-42.

Durch geeignete Wahl des Lösungsmittels und durch kinetische Kontrolle kann das Fehlen eines Substituenten in 3-Position teilweise kompensiert werden. Verwendet man Acetonitril bei tiefen Temperaturen, so kommt es durch den sogenannten Nitrileffekt zur bevorzugten Ausbildung des α -Produkts.⁴⁸

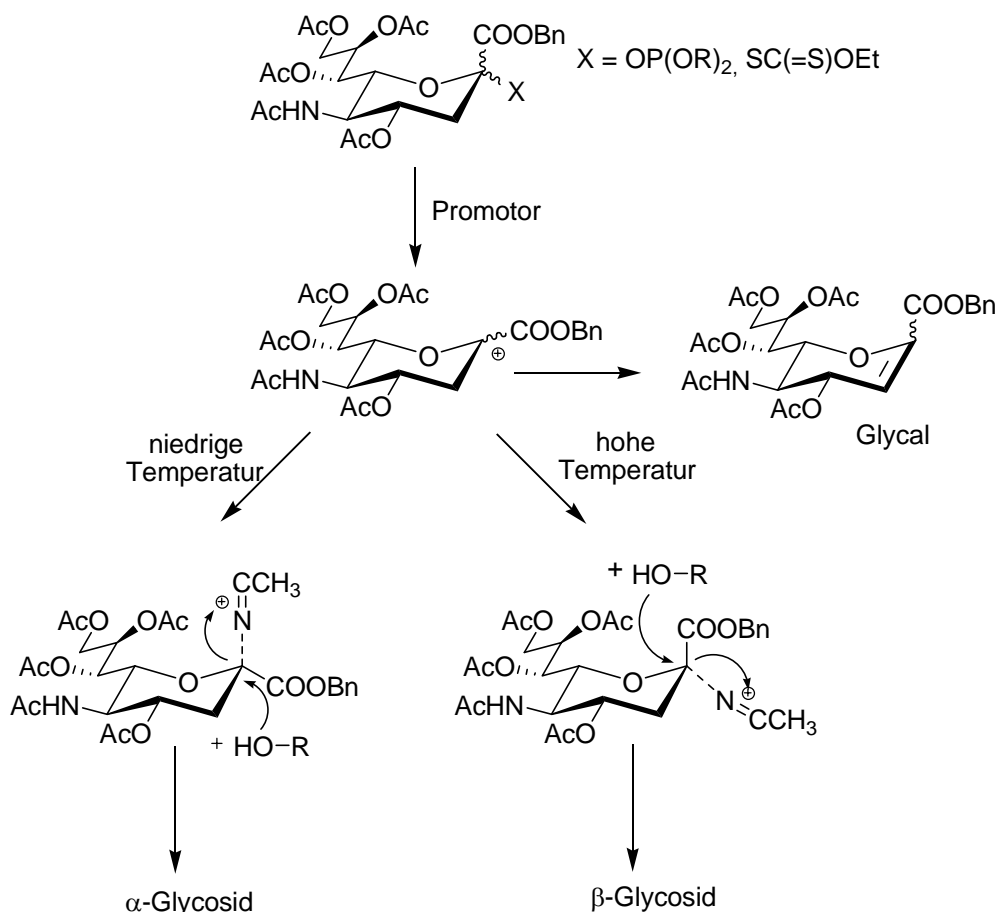


Abb. 3.14 Regioselektivität der Sialylierung in Abhängigkeit von der Temperatur

An das durch den Promotor gebildete Glycosylkation addiert sich Acetonitril bei kinetischer Reaktionskontrolle in axialer Position, während sich bei höherer Temperatur das thermodynamisch stabilere äquatoriale α -Nitrilium-Zwischenprodukt bildet. Wie durch nähere Untersuchungen gezeigt werden konnte, wird nicht nur ein Acetonitrilmolekül koordiniert, sondern es entsteht ein Acetonitriliumion-Acetonitril-Konjugat.⁴⁶ In der darauffolgenden nucleophilen Addition entsteht das jeweilige α - bzw. β -Produkt. Bei der

⁴⁸ a) A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, K. Hotta, H. Ishida, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, 10, 493-498. b) R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, 694-696. c) I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. Hervé du Penhoat, J.-M. Mallet, V. Michon, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1993**, 246, 23-41.

nötigen tiefen Temperatur von höchstens $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, muss ein Gemisch aus Acetonitril und Dichlormethan verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen sowohl ein entsprechendes Phosphit⁴⁹ als auch das Ethylxanthogenat-Derivat⁴⁷ der Sialinsäure dargestellt werden, um einen direkten Vergleich zwischen beiden Aktivierungsmethoden zu ermöglichen.

Als zu synthetisierendes Phosphitderivat wird das von *Danishefsky et al.* verwendete Dibenzylphosphitylderivat **24** gewählt.⁴⁹ Im Gegensatz zur Ethylxanthogenat-Variante muss hierbei die OH-Funktion der anomeren Position frei bleiben, um eine Kupplung mit Phosphorigsäuredibenzylesterdiisopropylamid zu ermöglichen. Hierzu wird ausgehend von *N*-Acetylneuraminsäure unter Einsatz eines sauren Ionenaustauschers (*Dowex*[®]-50W X8) das Methylesterderivat⁵⁰ **22** in guten Ausbeuten nach chromatographischer Reinigung erhalten (Abb. 3.15).

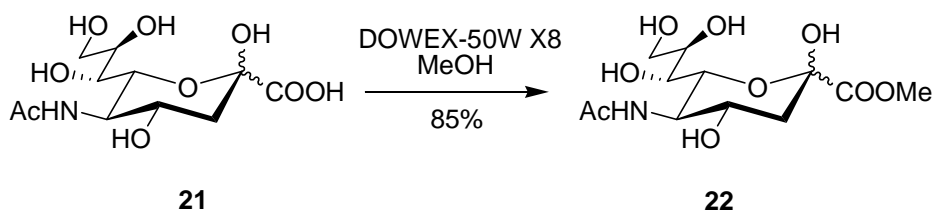


Abb. 3.15 Darstellung des Methylesters **22**

Unter Perchlorsäurekatalyse lassen sich sämtliche OH-Funktionen außer der OH-Funktion am anomeren Zentrum von Verbindung **22** acetylieren.⁵¹ Die Acetylierung muss bei leicht erhöhter Temperatur ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$) durchgeführt werden, da der Methylester **22** unterhalb von $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ nur wenig in Acetanhydrid löslich ist (Abb. 3.16).

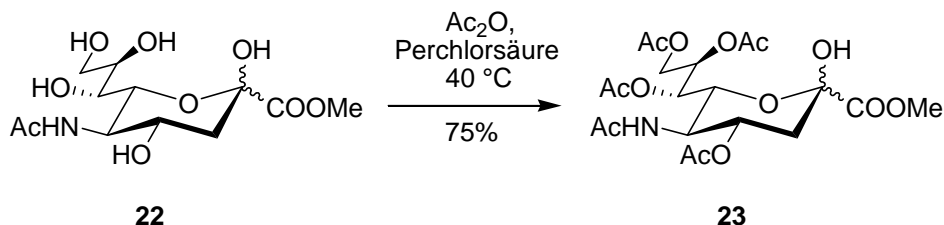


Abb. 3.16 Synthese des Precursors **23**

⁴⁹ S. K. Bhattacharya, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 144-151.

⁵⁰ a) R. Kuhn, P. Lutz, D.L. MacDonald, *Chem. Ber.* **1966**, 99, 611-617. b) R. Martin, K. L. Witte, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1283-1293.

⁵¹ A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, 190, 317-322.

Die anomere Position kann nun selektiv mit Phosphorigsäuredibenzylesterdiisopropylamid unter Einsatz von 1*H*-Tetrazol als Base zum gewünschten Phosphit umgesetzt werden (Abb. 3.17).⁴⁹

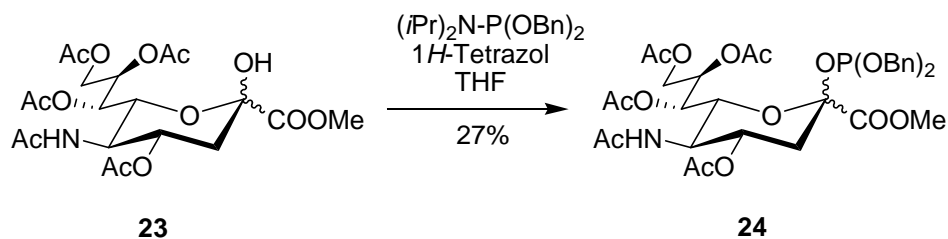


Abb. 3.17 Synthese des Sialinsäurephosphits **24**

Leider gelang die Synthese von Verbindung **24** nur einmal in einem kleinen Ansatz. Bei mehrmals durchgeführten Wiederholungen des Experiments gelang es nicht, das gewünschte Phosphit zu isolieren, was sich mit den im Arbeitskreis gemachten Erfahrungen bezüglich der Phosphitsynthesen deckt. Dementsprechend kann der angestrebte Vergleich der beiden Sialylierungsmethoden nicht durchgeführt werden.

Durch Anwendung von Acetanhydrid/Pyridin (1:1) kann Verbindung **23** in das peracetylierte Derivat **25** überführt werden (Abb. 3.18). Verbindung **25** könnte in das entsprechende Xanthogenat überführt werden.

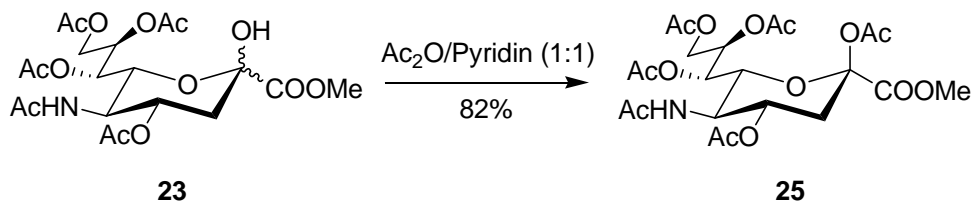


Abb. 3.18 Darstellung peracetylierter *N*-Acetylsialinsäure **25**

Anstelle des Methylesters wird im folgenden der Benzylester **27** verwendet, um die Vorteile einer späteren hydrogenolytischen Esterspaltung nutzen zu können. Zur Gewinnung des Sialinsäurexanthogenats **29** in 5 Stufen (Abb. 3.19) geht man von *N*-Acetylneuraminsäure **21** aus.³⁶ Die Einführung der Benzylschutzgruppe gelingt ausgehend von **26** mit Cs_2CO_3 und Überführung des entstehenden Cäsiumsalzes in den Benzylester **27**.³⁶ Durch Zugabe von Acetylchlorid und einigen Tropfen Wasser lässt sich das Anomerengemisch innerhalb von 4 Tagen selektiv zum β -Chlorid **28** umsetzen. Die Reaktion verläuft dabei über einen $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus, wobei der durchschrittene Übergangszustand durch die Bildung eines Oxoniumions stabilisiert wird. Setzt man das so

erhaltene β -Chlorid **28** mit Kaliumxanthogenat um, so erhält man in moderater Ausbeute den Sialyl-Donor **29**.

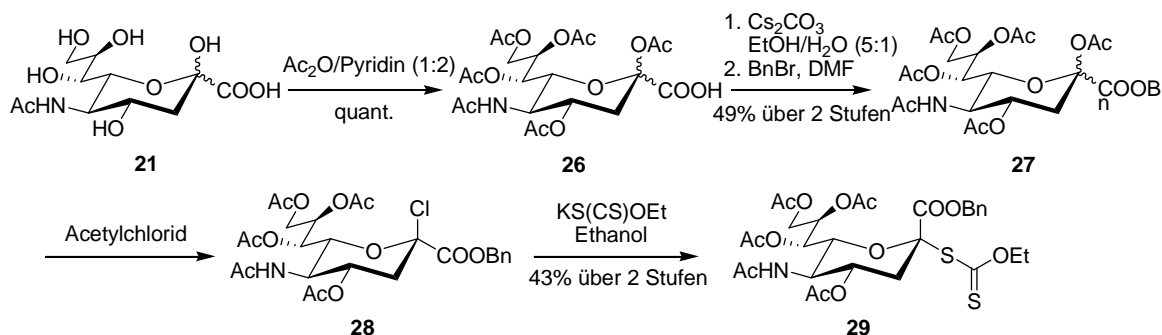


Abb. 3.19 Darstellung des Sialinsäurexanthogenats **29**

Die Glycosylierung erfolgt zwischen dem Donor **29** und dem bereits synthetisierten Akzeptor **14** in einem Gemisch aus absol. $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2:1) bei -65 bis -70 °C (Abb. 3.20).

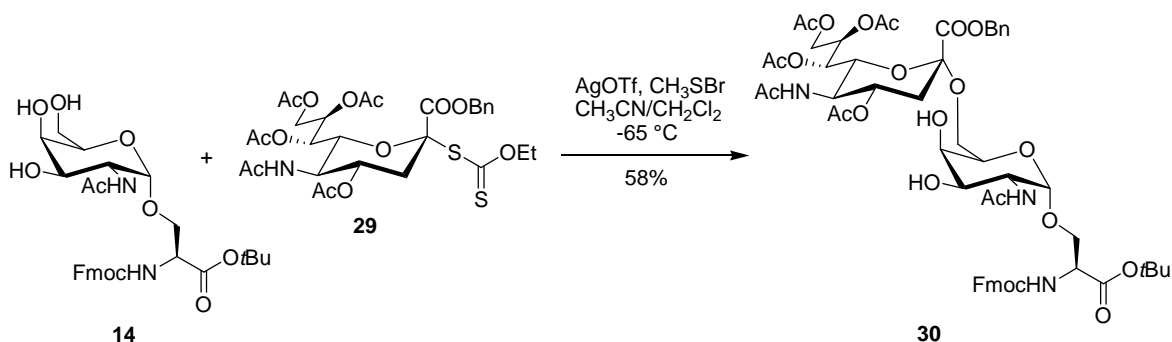


Abb. 3.20 Sialylierung des Galactosamin-Serin-Derivats **14**

Als Aktivierungsreagenz gibt man frisch hergestellte Methylsulfenylbromid-Lösung zu.⁵² Diese wird zuvor unter Licht- und Feuchtigkeitsausschluss aus äquimolaren Mengen Dimethyldisulfid und Brom erzeugt. Den eigentlichen Promotor stellt jedoch Methylsulfenyltriflat dar, das *in situ* aus Methylsulfenylbromid und Silbertriflat entsteht und als thiophiler Promotor den Donor **29** aktiviert.⁵³ Die hohe Regioselektivität der Reaktion resultiert aus der grösseren Reaktivität und geringeren sterischen Abschirmung der primären Hydroxylfunktion in 6-Position des Galactosamin-Derivats **14** verglichen mit den sekundären 3- und 4-OH-Gruppen. Nach mehrmaliger chromatographischer Reinigung kann das α -Derivat in 58%iger Ausbeute isoliert werden.

⁵² F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, 177, C13.

⁵³ P. J. Garegg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1997**, 52, 179-205.

Die Zuweisung der Protonen und darausfolgend die anomere Konfiguration des Produkts erfolgt mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und empirisch aufgestellter Regeln:⁵⁴

$$\delta(\text{ppm}) (\alpha\text{-H}_{3\text{eq}}) > \delta(\text{ppm}) (\beta\text{-H}_{3\text{eq}}) \text{ und } \delta(\text{ppm}) (\alpha\text{-H}_4) < \delta(\text{ppm}) (\beta\text{-H}_4)$$

Weitere Anhaltspunkte bieten die Aufspaltung der H9-Protonen, falls sie nicht von anderen Signalen überlagert sind. In diesem Fall gilt: $\delta(\text{ppm}) (\alpha\text{-|H9a-H9b|}) > \delta(\text{ppm}) (\beta\text{-|H9a-H9b|})$.

Weiterhin gilt in den meisten Fällen: $^3J_{3,4} (\alpha) < ^3J_{3,4} (\beta)$. Der Unterschied zwischen den Kopplungskonstanten kann jedoch sehr klein werden ($< 1\text{Hz}$). Als letzter Anhaltspunkt dient die $^3J_{7,8}$ -Kopplung für welche $^3J_{7,8} (\alpha) > ^3J_{7,8} (\beta)$ gilt.

Bevor man den Baustein in einer Festphasensynthese einsetzen kann, müssen zuerst die 3- und 4-Hydroxylfunktionen der Galactosamineinheit acetyliert werden. Hierzu setzt man Verbindung **30** in einer Mischung aus Acetanhydrid/Pyridin (1:2) um. Man erhält das acetylierte Derivat **31** in moderater Ausbeute (Abb. 3.21).

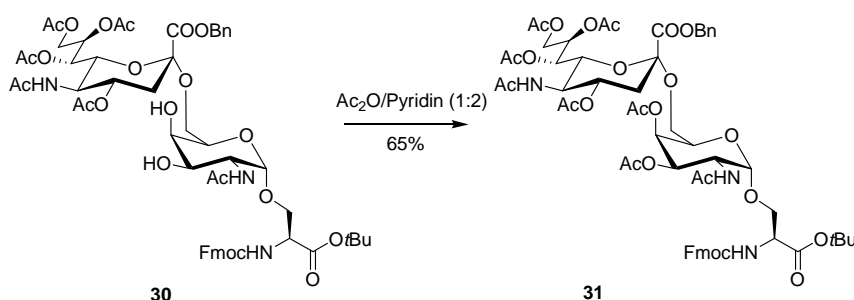
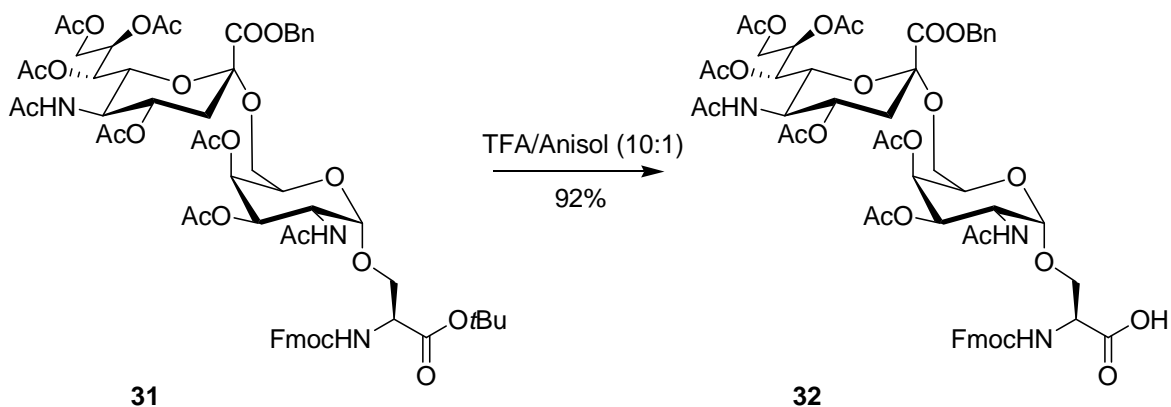


Abb. 3.21 Acetylierung des sialylierten Derivats **30**

Der abschließende Schritt besteht in der Deblockierung der Carboxylfunktion. Man löst **31** in Trifluoressigsäure und setzt Anisol als Kationenfänger zu (Abb. 3.22).

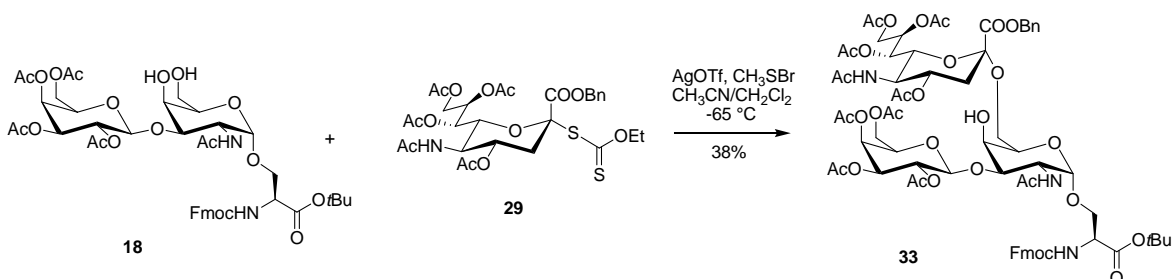
Der Festphasenbaustein Fmoc-Ser(α -NeuAC₄5NacCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α -Ac₂GalNAc)-OH **32** kann somit ausgehend vom Akzeptor **14** in einer Gesamtausbeute von 35% gewonnen werden.

⁵⁴ a) H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, 125, 47-64. b) K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5229&5233.

Abb. 3.22 Synthese des für den Festphasensynthese einsetzbaren Bausteins **32**

3.1.4 Synthese des (2→6)-Sialyl-T-Antigen-Bausteins

Analog der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Synthese (Kap. 3.1.3) besteht der Schlüsselschritt auch bei der Bildung des (2→6)-Sialyl-T-Antigens **34** in einer regio- und stereoselektiven Sialylierung der primären 6-OH-Funktion der Galactosamineinheit. Zusätzlich zur höheren Reaktivität der primären Hydroxylfunktion kommt der sterische Anspruch des Xanthogenats als entscheidender Faktor für die selektive Sialylierung an der 6-Position zum Tragen. Ausgehend von Verbindung **18**, die in diesem Fall als Glycosylakzeptor fungiert, erfolgt die Glycosylierung wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Als Sialinsäuredonor dient ebenfalls das Sialinsäurexanthogenat **29** und als thiophiler Promotor wiederum *in situ* gebildetes Methylsulfonyltriflat. In einem Dichlormethan-Acetonitril-Gemisch (1:2) begünstigt der Nitrileffekt bei einer Temperatur $< -60\text{ }^{\circ}\text{C}$ die Bildung des gewünschten α -Derivats **33** (Abb. 3.23). Das β -Anomer wird in 6%iger Ausbeute isoliert.

Abb. 3.23 Synthese des (2→6)-Sialyl-T-Antigens **33**

Als Baustein für die Festphasensynthese hat sich das an der 4-Position nicht acetylierte Fmoc-Ser(Ac₄Gal-(β1→3)-[NeuAc₄5AcCOOBn-(α2→6)]-α-GalNAc)-OH **34** bewährt,⁴² denn die 4-Position ist sterisch so stark abgeschirmt, dass nicht einmal eine Acetylierung in den Capping-Schritten der automatisierten Peptidsynthese eintritt. Somit kann ausgeschlossen werden, dass durch die freie Hydroxylgruppe während der Peptidsynthese Nebenreaktionen stattfinden. Dementsprechend wird auf eine Acetylierung verzichtet, und es erfolgt sofort die Freisetzung der Carboxylfunktion mittels TFA/Anisol (10:1) (Abb. 3.24).

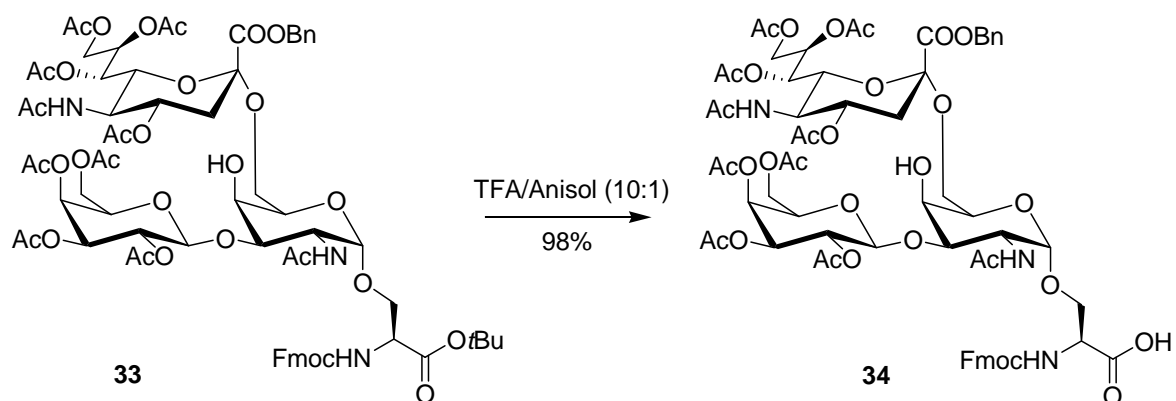


Abb. 3.24 Darstellung des Festphasenbausteins **34**

Ausgehend von Akzeptor **18** konnte Verbindung **34** über 2 Stufen in 37%iger Ausbeute erhalten werden.

3.1.5 Synthese des (2→3)-Sialyl-T-Antigen-Bausteins

Wie sich gezeigt hat, ist die am besten geeignete Schutzgruppe für die 6-Position der β -Galactose des zu glycosylierenden T-Antigenmotivs eine Benzyletherschutzgruppe.⁵⁵ Einer Literaturvorschrift folgend wurde das benötigte Galactose-Derivat **40** über 5 Stufen in 27% Ausbeute hergestellt (Abb. 3.25).⁵⁶ Ausgehend von D-Galactose **35** erhält man die 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose **36** säurekatalysiert in Aceton. Das freiwerdende Reaktionswasser wird durch Zusatz von wasserfreiem Kupfersulfat gebunden. Durch Deprotonierung des Rohprodukts mittels Natriumhydrid und anschließendem Umsatz mit Benzylbromid wird die primäre 6-Hydroxyfunktion selektiv verethert.^{56b} Nach chromatographischer Reinigung erhält man das gewünschte Produkt **37** in 77%iger Ausbeute. Die Isopropylidenschutzgruppen lassen sich durch erwärmen auf 80 °C in wässriger Essigsäure abspalten. Das Rohprodukt **38** wird peracetyliert. Die Acetylierung wird katalysiert durch *N,N*-Dimethylaminopyridin in Acetanhydrid/Pyridin (2:1).⁵⁷ Das vollständig geschützte Galactosederivat **39** fällt nach chromatographischer Reinigung in 71% Ausbeute an. Das α -Galactosylbromid **40** erhält man durch die Behandlung von Verbindung **39** mit 33%iger HBr in Eisessig bei 0 °C.⁵⁸ Durch eine schnelle Flashchromatographie lässt sich 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactosylbromid **40** in 50%iger Ausbeute isolieren.

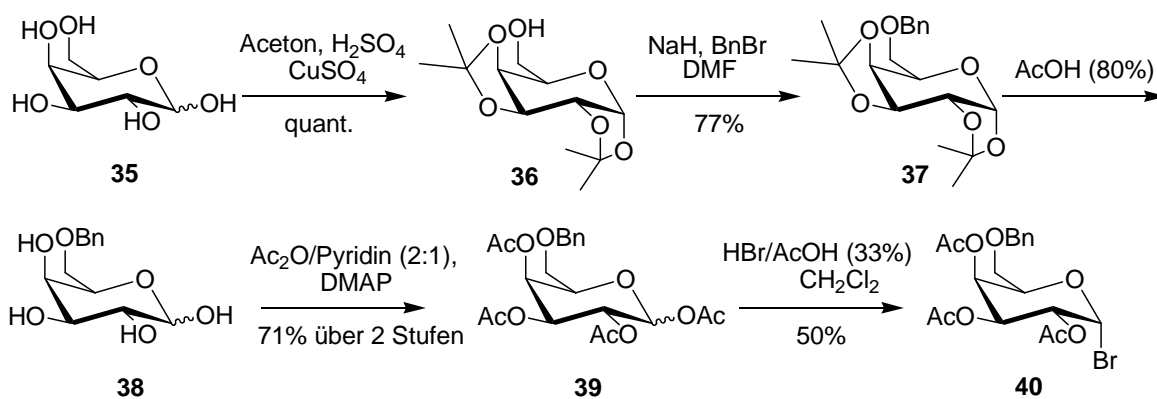


Abb. 3.25 Synthese des α -Galactosylbromids **40**

⁵⁵ C. Brocke, *Dissertation*, Universität Mainz **2002**.

⁵⁶ a) 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. b) X. Pannecouque, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, 50, 6569-6578.

⁵⁷ B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 556-557.

⁵⁸ M. Lergenmüller, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron* **1998**, 1381-1394.

Der auf diesem Weg dargestellte Galactosyldonor **40** wird unter *Helferich*-Bedingungen⁴¹ bei Raumtemperatur mit dem Akzeptor **16** unter Aktivierung mit $\text{Hg}(\text{CN})_2$ in Nitromethan/Dichlormethan ($\sim 3:1$) umgesetzt. Diese Vorgehensweise führt in 63%iger Ausbeute zum gewünschten T-Antigen-Serin-Konjugat **41**. Die sich anschließende Umesterung unter *Zemplén*-Bedingungen³⁷ ergibt das deblockierte Produkt **42** in einer mässigen Ausbeute von 25% (62% Umsatz). Grund dürfte die durch den Benzylether blockierte primäre 6-Hydroxylposition sein, wodurch es zu keiner Acetylgruppen-Wanderung kommen kann. Dies erschwert die Deacetylierung erheblich. Speziell die 4-Position lässt sich nur noch sehr schwer deacetylieren. Weiterhin muss ein im Vergleich zu den sonst verwendeten Reaktionsbedingungen relativ hoher pH-Wert von ca. 9.0-10.0 gewählt werden, was zu merklicher Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe führt. Dementsprechend wird die Reaktion nach 6.75 h abgebrochen (Abb. 3.26).

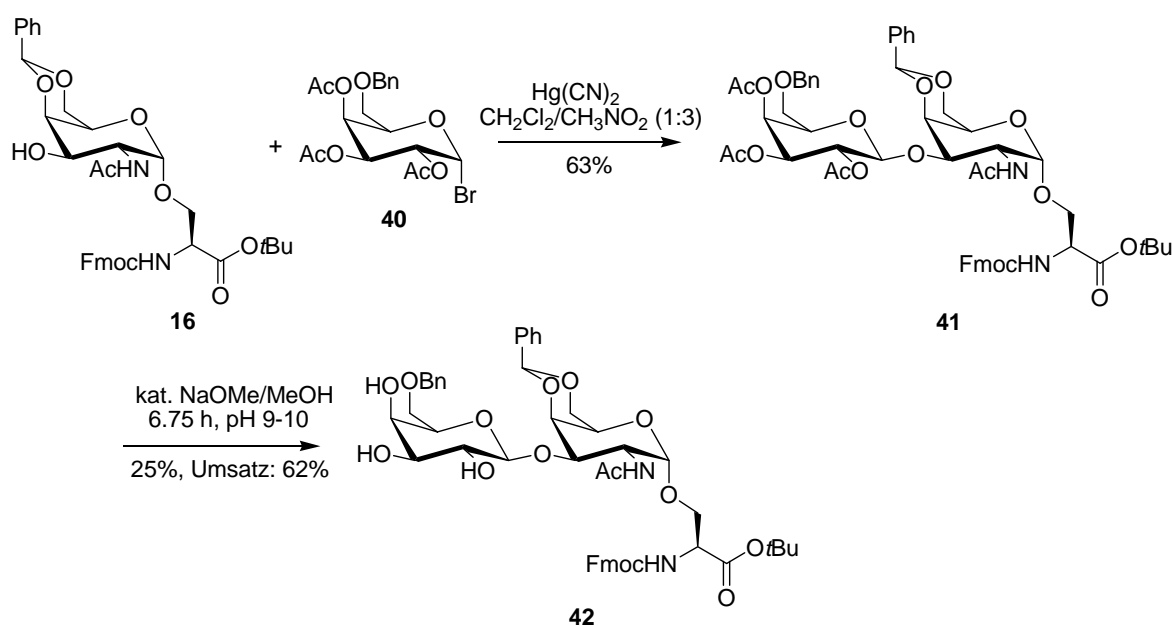
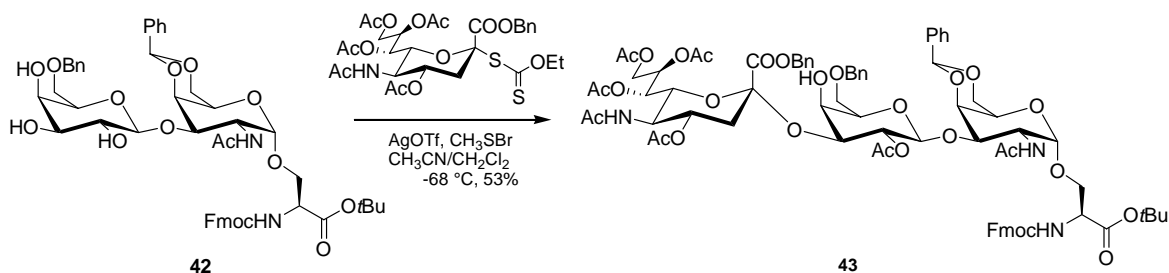
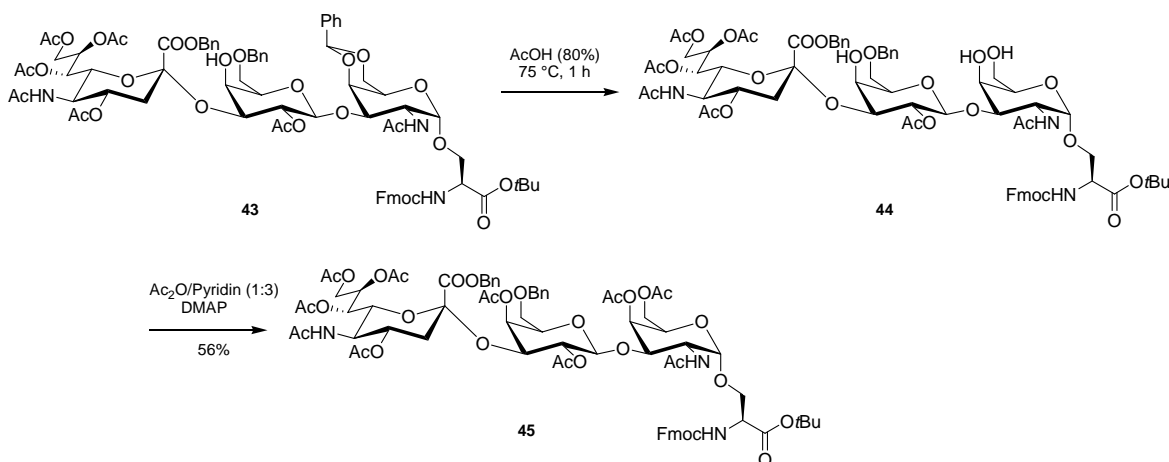


Abb. 3.26 Darstellung des Akzeptors **42**

Die Sialylierung von **42** wird analog der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen durchgeführt. Entsprechend wird das Sialylxanthogenat **29** mit Silbertriflat und Methylsulfenylbromid aktiviert. Die Temperatur beträgt $-68\text{ }^\circ\text{C}$, wodurch der α -Nitrileffekt unterstützt wird. Neben dem gewünschten sialylierten Produkt **43**, das in 53% Ausbeute nach flashchromatographischer Reinigung isoliert werden kann, gewinnt man 29% des Akzeptors **42** zurück (Abb. 3.27).

Abb. 3.27 Sialylierung des Akzeptors **42**

Bevor das (2→3)-Sialyl-T-Antigen-Konjugat **43** in die Festphasensynthese eingebracht werden kann, sind drei weitere Schutzgruppenmanipulationen nötig. Indem man Verbindung **43** eine Stunde lang auf 75°C in 80%iger Essigsäure erhitzt, wird das Benzylidenacetal gespalten. Die so erhaltene deblockierte Verbindung **44** wird ohne weitere Reinigung einer Acetylierung in Acetanhydrid/Pyridin (1:3) unter Katalyse mit *N,N*-Dimethylaminopyridin unterzogen.⁵⁹ Nach säulenchromatographischer Reinigung kann das vollständig geschützte Derivat **45** in 56%iger Ausbeute über zwei Stufen gewonnen werden (Abb. 3.28).

Abb. 3.28 Deblockierung und anschließende Acetylierung zu Verbindung **45**

Die abschließende Acidolyse des *tert*-Butylesters mit Trifluoressigsäure in Gegenwart von Anisol liefert das für die Festphasensynthese geeignete (2→3)-Sialyl-T-Antigen-Konjugat **46** nach säulenchromatographischer Reinigung in 95%iger Ausbeute (Abb. 3.29).

⁵⁹ G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 8, 602-615.

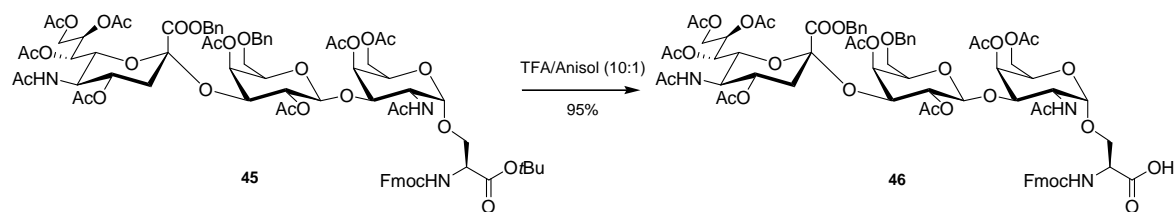


Abb. 3.29 Säurekatalysierte Freisetzung der Carboxylfunktion

Ausgehend von Akzeptor **16** kann Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)- β -6-O-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -Ac₂GalNAc)-OH **46** in 4% Gesamtausbeute dargestellt werden.

3.2 Synthese verschiedener dansylierter Verbindungen

Wie bereits in der Diplomarbeit gezeigt, resultieren aus der grossen Anzahl hydrophober Aminosäurereste innerhalb der zu synthetisierenden Sequenz des murinen LI-Cadherins schlechte Löslichkeitseigenschaften der Peptide.⁶⁰ Die unglycosylierten Sequenzen sind nur in DMF und DMSO löslich. Verwendet man zur Markierung mit Farbstoff das System Dansyl/Tryptophan so könnten sich die Löslichkeitseigenschaften aufgrund des hydrophoben Charakters beider Moleküle, in anderen Lösungsmitteln als DMF oder DMSO eher verschlechtern als verbessern. Um diesem Trend entgegen zu wirken, soll der eine Teil des FRET-Chromophorenpaars Dansyl/Tryptophan an einen Tetraethylglycol-spacer angebunden werden. Durch dessen Hydrophilie sollten sich die Löslichkeitseigenschaften der Peptid-Konjugate verbessern. Weiterhin bietet die Anbindung über einen Tetraethylglycollinker eine grössere Flexibilität innerhalb des Chromophors, was auftretenden konformativen Änderungen innerhalb des Peptids entgegenwirkt. Um untersuchen zu können, ob die oben genannten Effekte auftreten und dementsprechend messbar sind, soll sowohl das entsprechende dansylierte Molekül mit und ohne Spacer synthetisiert werden.

⁶⁰ S. Heiner, *Diplomarbeit*, Universität Mainz 2002.

3.2.1 Synthese des dansylierten Leucin-Bausteins

Ausgehend von L-Leucin **47**, lässt sich der *N*-Dansyl-Baustein in einer Stufe herstellen. Man setzt L-Leucin **47** mit Dansylchlorid **48** in einer Mischung aus 1N NaOH/Aceton (2:1) um und erhält das gewünschte Derivat **49**, welches direkt für Festphasenreaktionen verwendet werden kann (Abb. 3.30).

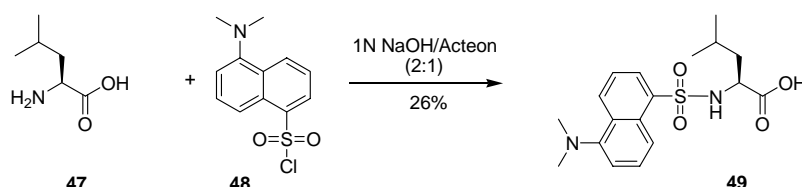


Abb. 3.30 Synthese des dansylierten Leucin-Festphasenbausteins **49**

3.2.2 Synthese eines universell einsetzbaren dansylierten Linkers

Zur Darstellung des für die Festphasensynthese geeigneten dansylierten Tetraethylglycol-Leucin-Derivats **60** überführt man Tetraethylglycol **50** durch Reaktion mit Natrium in das entsprechende Alkoholat und addiert es in einer Michael-Reaktion an Acrylsäure-*tert*-butylester **51** (Abb. 3.31).⁶¹

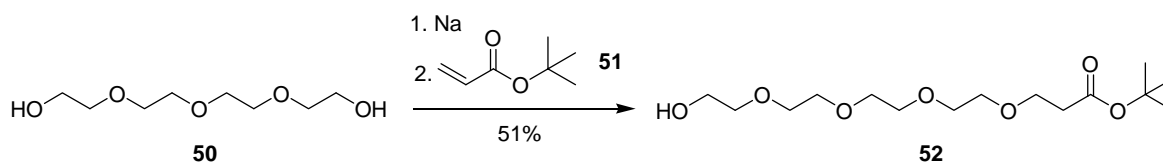
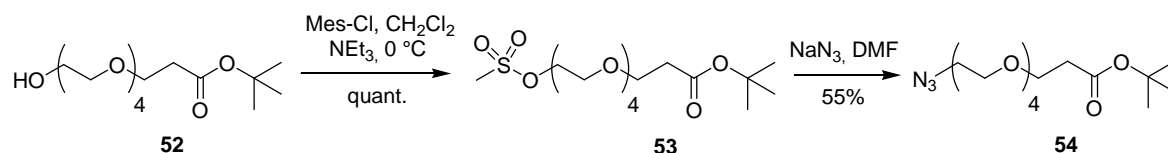


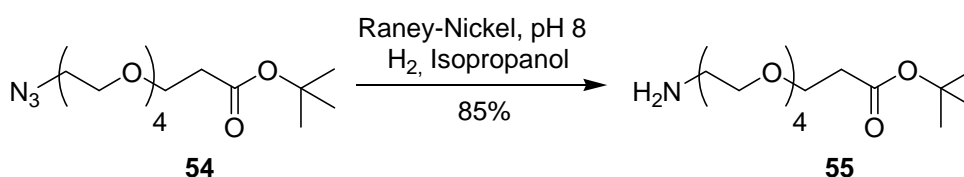
Abb. 3.31 Michael-Addition an Acrylsäure-*tert*-butylester **52**

Die verbleibende Hydroxylgruppe von **52** wird mit Methylsulfonylchlorid in das Mesylat **53** überführt und anschließend in einer nucleophilen Substitution mit NaN₃ in DMF umgesetzt. Nach chromatographischer Reinigung erhält man das gewünschte Azid **54** in 55% Ausbeute.

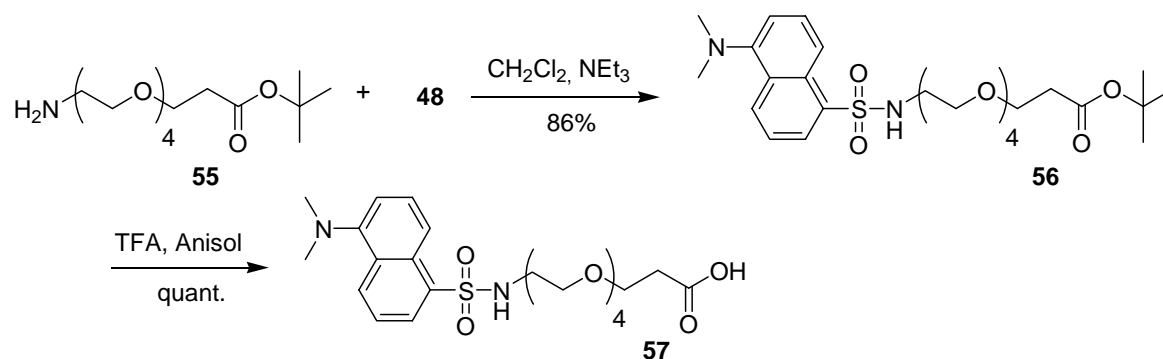
⁶¹a) O. Seitz, *Dissertation*, Universität Mainz 1995. b) H. Herzner, *Dissertation*, Universität Mainz 2001.

Abb. 3.32 Darstellung des Azids **54**

Die Reduktion zum Amin wird mit frisch hergestelltem, neutral gewaschenem Raney-Nickel als Katalysator durchgeführt.⁶² Unter den neutralen Reaktionsbedingungen kann die basenkatalysierte Retro-Michael-Reaktion (E1cB) unter Abspaltung des Glycols vermieden werden (Abb. 3.33).

Abb. 3.33 Reduktion zum Amin **55**

Die Kupplung von Dansylchlorid an das Amin **55** erfolgt analog zur Synthese von **49**. Hierzu setzt man die beiden Edukte **48** und **55** in Dichlormethan mit Triethylamin als Base um. Das nach Reinigung erhaltene Derivat **56** wird in TFA und Anisol zum gewünschten Dansyl-NH-Glycol₄-(CH₂)₂-COOH **57** deblockiert (Abb. 3.34).

Abb. 3.34 Synthese des Festphasenbausteins **57**

Nach dieser Methode wird der universell einsetzbare Festphasenbaustein **57** ausgehend von Tetraethylenglycol **50** über 6 Stufen in einer Gesamtausbeute von 21% gewonnen.

⁶² Organikum 20. Auflage, S. 703.

3.2.3 Darstellung eines mit einem Spacer versehenen dansylierten Leucin-Festphasenbausteins

Es gibt zwei Möglichkeiten, Verbindung **57** in eine Festphasensynthese einzubringen. Einmal kann man sie als terminalen Baustein an der festen Phase kuppeln, während man sie das andere Mal zuvor in Lösung mit der *N*-terminalen Aminosäure verknüpft und so in die Festphasenreaktion einsetzt. Im Rahmen dieser Arbeit soll die zweite Möglichkeit vorgenommen werden. Hierzu wird Verbindung **57** mit $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{N-Leu-O}t\text{Bu}$ **58** und IIDQ (1,2-Dihydro-2-isobutoxy-1-chinolincarbonensäure-isobutylester) als Kupplungsreagenz sowie DIPEA als Base umgesetzt. Man erhält das gewünschte Produkt **59** bei 67% Umsatz in 76%iger Ausbeute. Verwendet man ein Gemisch aus EDC (1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid*HCl)/HOBT⁶³ als Kupplungsreagenzien sowie DIPEA als Base, so kann die Ausbeute auf 87% gesteigert werden (Abb. 3.35).

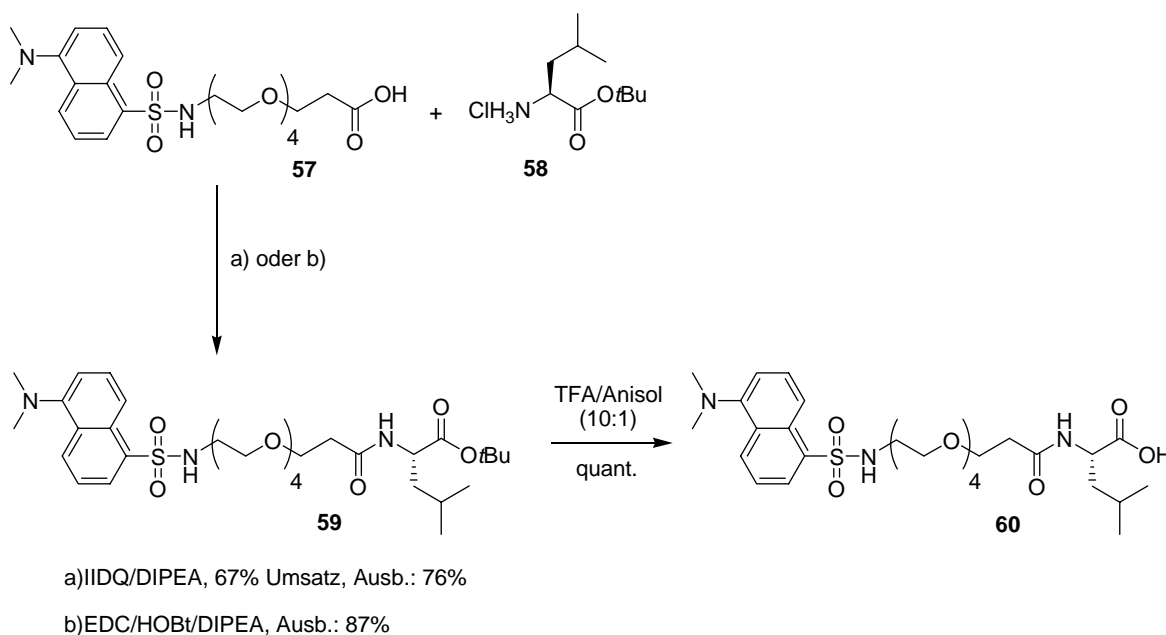


Abb. 3.35 Synthese des geschützten Festphasenbausteins **60**

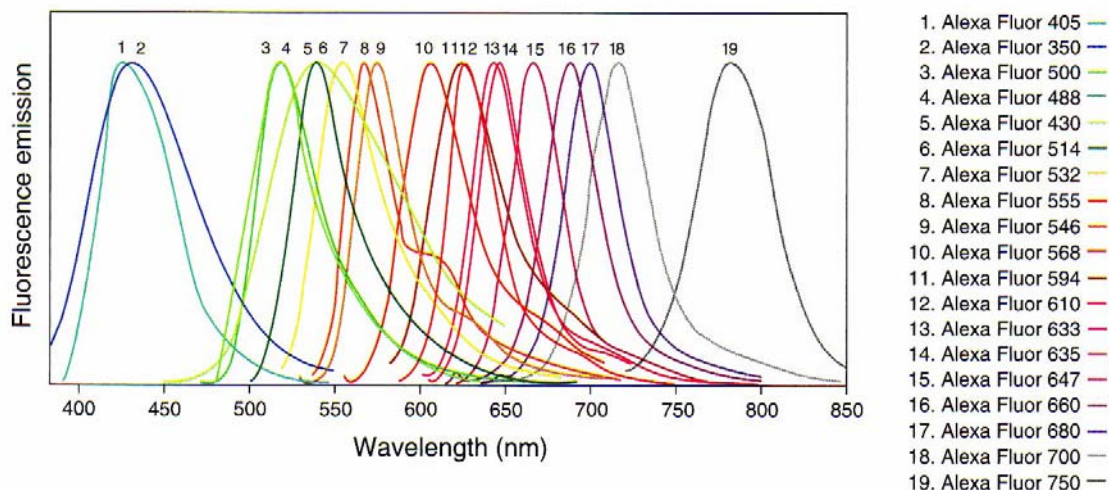
Die Deblockierung der Carboxylfunktion erfolgt mit TFA/Anisol (10:1). Nach säulenchromatographischer Reinigung wird das Produkt **60** in quantitativer Ausbeute isoliert. Ausgehend von Tetraethylenglycol **50** lässt sich der gewünschte Festphasenbaustein über 8 Stufen in einer Gesamtausbeute von 18% synthetisieren.

⁶³ W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798.

3.3 Synthese eines neuartigen Chromophors

Wie in Kapitel 3.5.4 gezeigt werden wird, ist die angestrebte Löslichkeitsverbesserung auch mit dem vorhergehend beschriebenen Spacer-Farbstoff-Molekül **60** nicht zu erreichen. Dementsprechend sollte versucht werden, einen bereits bekannten Fluorophor entsprechend den gewünschten Löslichkeitsanforderungen zu modifizieren.

In Abb. 3.36 sind einige Fluorophore aufgeführt, die häufig in der FRET-Spektroskopie eingesetzt werden.⁶⁴ Eine neue Klasse von Farbstoffen bilden die Alexa Fluor[®]-Farbstoffe, welche sowohl sehr gute spektroskopische Eigenschaften als auch sehr gute Wasserlöslichkeiten aufweisen. Sie sind jedoch teuer (Abb. 3.36). Ein weiterer Vorteil besteht in ihren hohen Fluoreszenzquantenausbeuten, so dass Försterradien von bis zu 84 Å erzielt werden können.



<i>Donor</i>	<i>Akzeptor</i>	R_0 (Å)
Fluorescein	Tetramethylrhodamin	55
IAEDANS	Fluorescein	46
EDANS	Dabcyl	33
Fluorescein	Fluorescein	44

⁶⁴ *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10th Edition, Molecular Probes, S. 26-30.

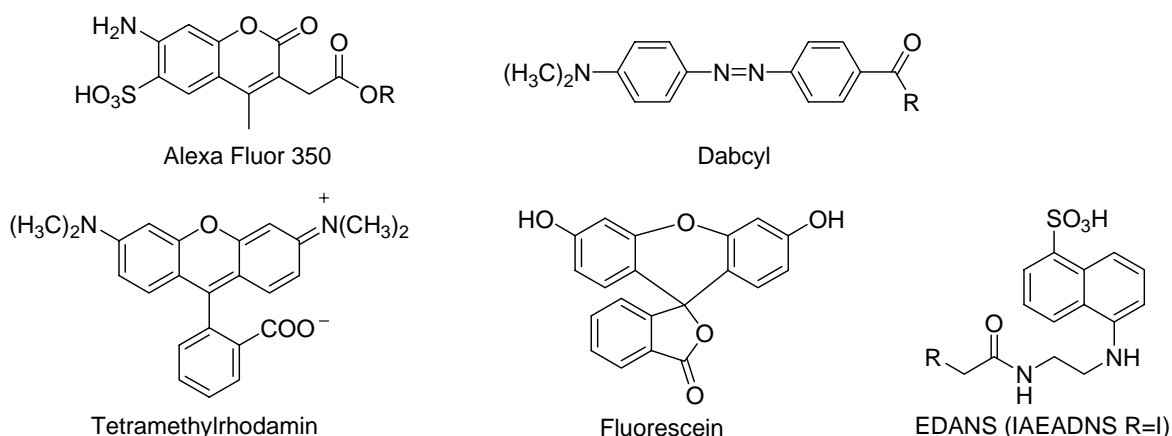


Abb. 3.36 Häufig verwendete Farbstoffe in der FRET-Spektroskopie

Als Grundkörper für die Alexa Fluor[®]-Farbstoffe kommen unterschiedliche aromatische Verbindungen in Frage. Eines der verwendeten aromatischen Systeme ist das Cumarin. Neben breiter Anwendung als Fluoreszenzlabel⁶⁵ zeigen die Cumarine auch interessante biologische Eigenschaften. So wirken sie z.B. antiinflammatorisch⁶⁶ und zeigen sowohl starke inhibitorische Wirkung gegen Monoaminoxidasen (MAO)⁶⁷ als auch gegen HIV-Proteasen.⁶⁸

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein neuer Fluoreszenzmarker aufbauend auf 7-Aminocumarin (Aca) **67** dargestellt werden. Hierzu schützt man die Aminfunktion des 3-Aminophenols **61** mit der Ethoxycarbonylschutzgruppe⁶⁹ und setzt das so erhaltene Derivat **62** in einer Pechmann-Kondensation⁷⁰ mit Acetondicarbonsäure bzw. Acetondicarbonsäurediethylester zum entsprechenden Cumarin um (Abb. 3.37).

⁶⁵ a) E. Amir, E. Haas, *Biochemistry* **1988**, 27, 8889-8893. b) W.-C. Sun, K. R. Gee, R. P. Haugland, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3107-3110. c) W. Kudlicki, O. W. Odom, G. Kramer, B. Hardesty, *Biol. Chem.* **1996**, 271, 31160-31165.

⁶⁶ a) L. Pochet, C. Doucet, M. Schynts, N. Thierry, N. Boggeto, B. Pirotte, K. Y. Liang, B. Masereel, P. Tulio, J. Delarge and M. R. Ravaux, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 2579-2585. b) J. W. Harper and J. C. Powers, *Biochemistry* **1985**, 24, 7200-7213.

⁶⁷ U. Thull and B. Testa, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 2307-2310.

⁶⁸ a) A. Mazumder, S. Wang, N. Neamati, M. Nicklaus, S. Sunder, J. Chen, G. W. Milne, W. G. Rice, T. R. Burke, Y. Pommier, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 2472-2481. b) E. A. Lunney, S. E. Hagen, J. M. Domagala, C. Humblet, J. Kosinski, B. D. Tait, J. S. Warmus, M. Wilson, D. Ferguson, D. Hupe, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2664-2677. c) S. Thaisrivongs, M. N. Janakiraman, K. T. Chong, P. K. Tomich, L. A. Dolak, S. R. Turner, J. W. Strohbach, J. C. Lynn, M. M. Horng, R. R. Hinshaw, K. D. Watenpaugh, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 2400-2410.

⁶⁹ D. J. Maly, F. Leonetti, B. J. Backes, D. S. Daubner, J. L. Harris, C. S. Craik, J. A. Ellmann, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 910-915.

⁷⁰ H. V. Pechmann, C. Duisberg, *Dtsch. Chem. Ber.* **1883**, 16, 2219-2228.

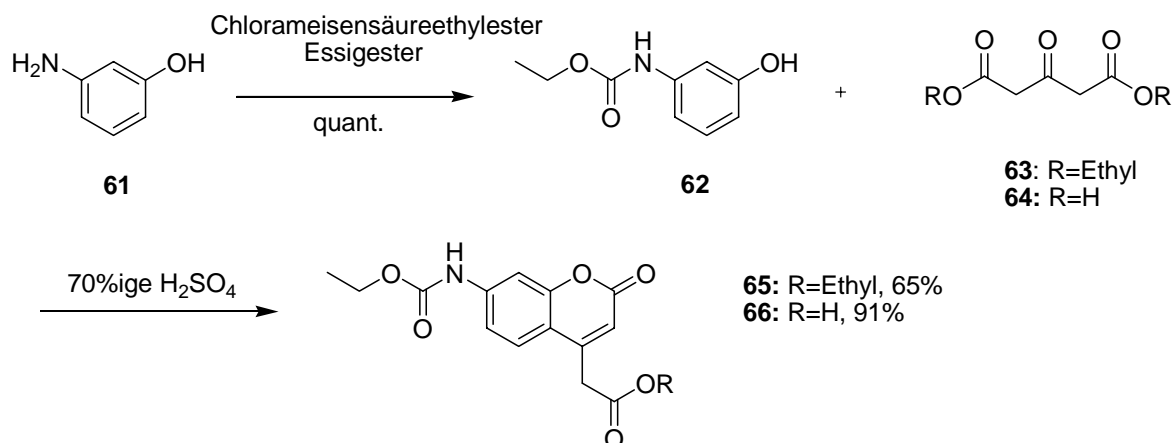
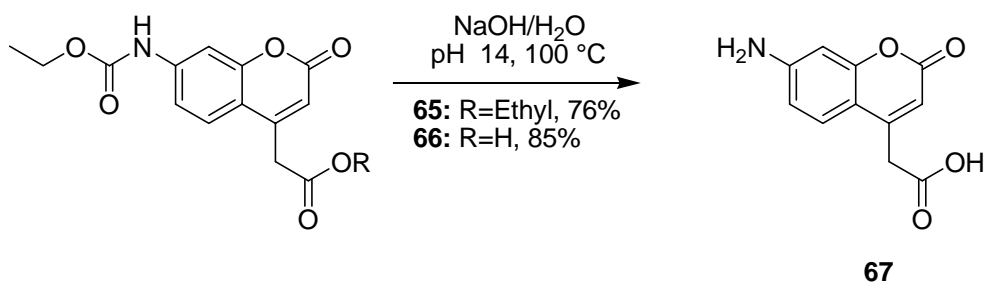


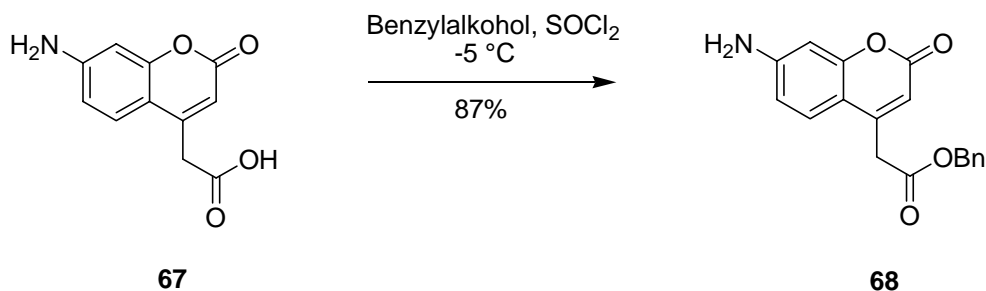
Abb. 3.37 Synthese der Aca Vorläufer

Von den beiden Möglichkeiten, die Pechmann-Kondensation durchzuführen, ist die in der Literatur beschriebene,⁷⁰ unter Verwendung von 1,3-Acetondicarbonsäure **64**, der zweiten Möglichkeit, bei welcher man den 1,3-Acetondicarbonsäurediethylester **63** verwendet, eindeutig vorzuziehen. Die Ausbeute ist im literaturbeschriebenen Fall wesentlich höher und außerdem ist der Ester **63** um den Faktor 1,8 teurer.

Die Entfernung der Aminoschutzgruppe erfolgt in beiden Fällen bei pH = 14 in wässriger NaOH bei 100 °C. Das gewünschte Produkt kann in 76% bzw. 85% Ausbeute isoliert werden (Abb. 3.38).

Abb. 3.38: Deblockierung zu Aca **67**

Da im späteren Verlauf der Synthese durch Acetylgruppen geschützte Hydroxylfunktionen in das Molekül eingeführt werden sollen, kommt für die Carbonsäurefunktion z.B. eine hydrogenolytisch spaltbare Schutzgruppe in Frage. Diesem Ansatz folgend, wird Benzylalkohol mit Thionylchlorid versetzt und durch anschließende Zugabe der Carboxylkomponente der Benzylester **68** gebildet (Abb. 3.39).

Abb. 3.39 Veresterung von **67**

Die Aminofunktion des so erhaltenen Aminocumarinesterkonjugates **68** weist sowohl eine geringe Nucleophilie als auch geringe Basizität auf, was die Kupplung an eine Carboxylkomponente erschwert.

Aus der Vielzahl der geprüften Methoden, das Amid zu bilden, führen nur zwei zum Erfolg. Die erste besteht in der Bildung eines gemischten Anhydrids mit Chlorameisensäure-isobutylester und anschließender nucleophiler Substitution durch das Amin. Nach der zweiten bildet man den entsprechenden Aktivester, indem man HATU⁷¹ (O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluoro-phosphat) als Aktivierungskomponente und 2,4,6-Collidin als Base zusetzt (Abb. 3.40).

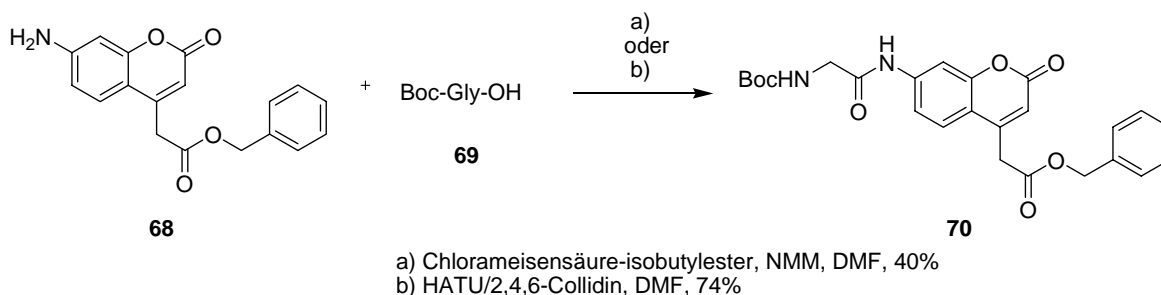


Abb. 3.40 Kupplungsmöglichkeiten

Um die löslichkeitsvermittelnden Eigenschaften in Wasser zu verbessern, soll ein Substituent eingeführt werden, der selbst eine gute Wasserlöslichkeit aufweist. Entsprechend peracetyliert man D-Chinasäure **71** in einem Gemisch aus AcOH/Ac₂O unter HClO₄ (70%) Katalyse⁷² und setzt die so erhaltene peracetylierte cyclische Carbonsäure **72** mit der freigesetzten Aminfunktion der Verbindung **73** um (Abb. 3.41). Die Deblockierung der Aminfunktion wird mit TFA und TIS (Triisopropylsilan) als Kationenfänger durchgeführt und das freigesetzte Amin **73** direkt weiter umgesetzt.

⁷¹ L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201-203.

⁷² C. Grandjean, C. Rommens, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 20, 2967-2976.

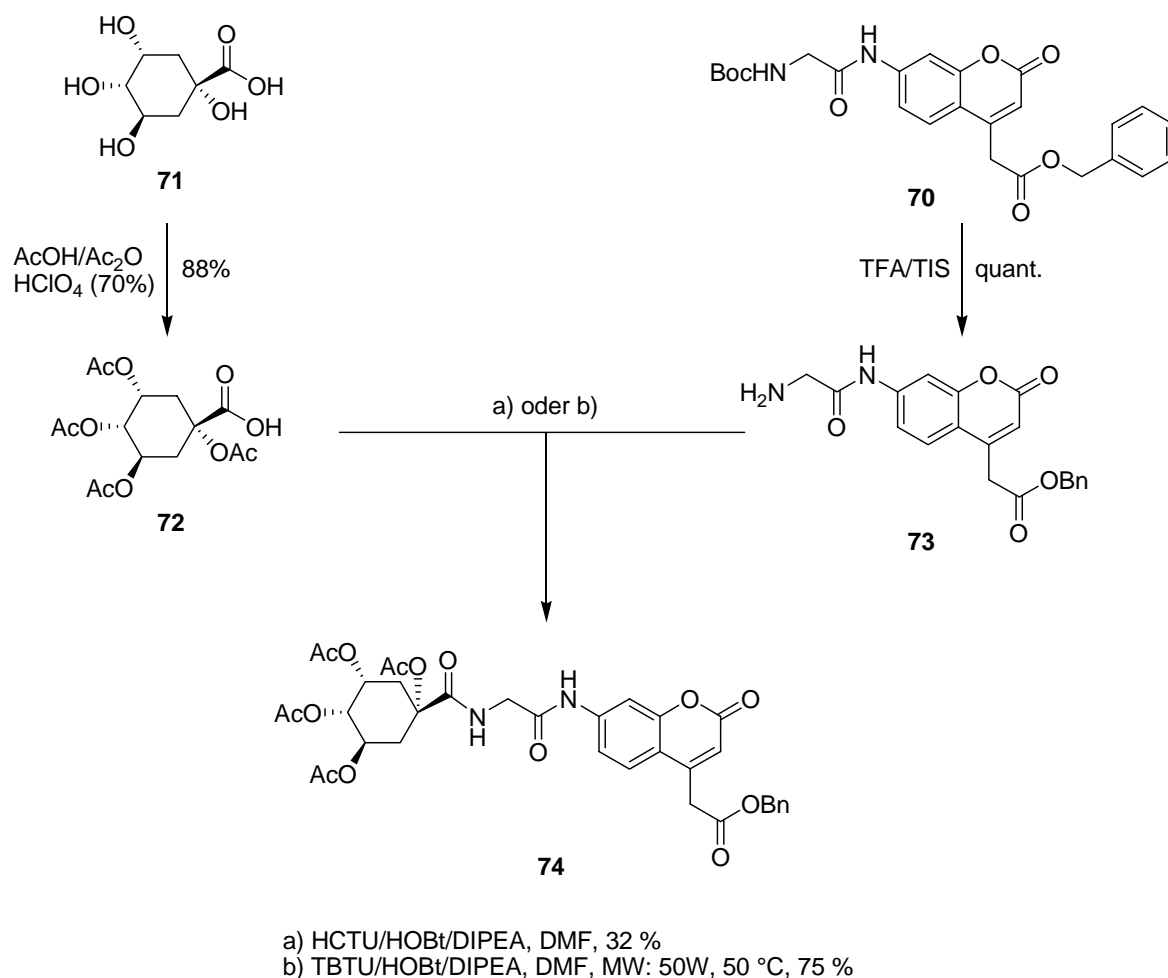


Abb. 3.41 Kupplung der löslichkeitsvermittelnden Komponente **72**

Die Amidbildung kann auf zwei Wegen realisiert werden. Beim ersten erfolgt die Kupplung unter Zugabe von HCTU⁷³ 2-(6-Chloro-1-H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphate/HOBt⁷⁴ bei Raumtemperatur. Das gewünschte Produkt **74** kann jedoch lediglich in 32% Ausbeute isoliert werden. Verwendet man TBTU⁷⁵ (*O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat) anstelle von HCTU und bestrahlt die Lösung der beiden Komponenten bei 50 °C mit 50 W Mikrowellenleistung (unter Luftkühlung), so kann die Reaktionszeit von 20 h auf 20 min verkürzt und die Ausbeute auf 75% erhöht werden.

Bei der hydrogenolytischen Spaltung des Benzylesters ist eine ständige Reaktionskontrolle ausschlaggebend für den Erfolg. Wird der Reaktionsverlauf nicht ständig dünnschichtchromatographisch verfolgt, kann ein Grossteil des gewünschten Produkts **75** durch Hydrierung der Doppelbindung zum gesättigten Lacton verloren gehen. Bei den

⁷³ V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 1269-1272.

⁷⁴ W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798.

⁷⁵ R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927-1930.

verwendeten Katalysatoren ist 5% Pd auf Kohle dem 10%igen vorzuziehen, denn aufgrund seiner geringeren Reaktivität kann die Hydrierung der Doppelbindung fast vollständig vermieden werden (Abb. 3.42).

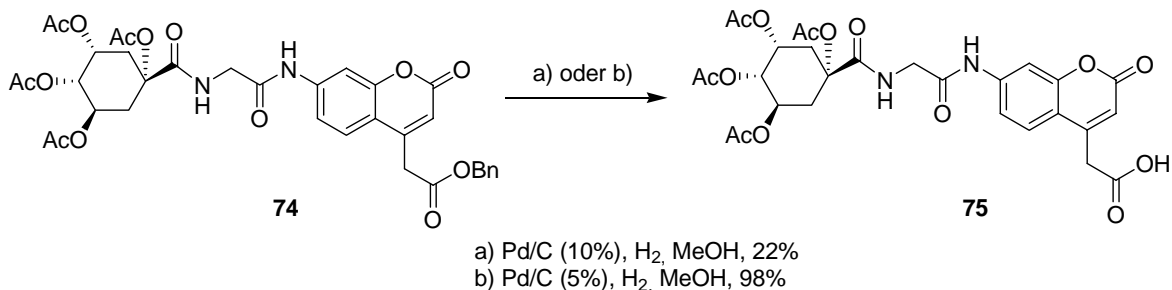


Abb. 3.42 Hydrogenolytische Spaltung des Benzylesters **74**

Verbindung **75** stellt auf den ersten Blick ein universell einsetzbares Chromophor dar. Es sollte dementsprechend direkt in eine Festphasensynthese eingesetzt oder zuerst mit dem *N*-Terminus einer Aminosäure gekuppelt und anschließend in eine Festphasenreaktion eingebracht werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wird die zweite Möglichkeit gewählt, denn zum einen kann der Effekt auf die spektroskopischen Eigenschaften mit und ohne Substituenten am C-Terminus des Moleküls **75** untersucht werden (siehe Kapitel 3.7) und zum anderen gestaltet sich die Verknüpfung der Carboxylfunktion mit einer Aminkomponente zum Amid schwieriger als erwartet. In Abhängigkeit von den verwendeten Kupplungsreagenzien entsteht anstelle des gewünschten Amids **76** durch Decarboxylierung das Methylcumarin **77** bzw. ein nur mittels präparativer HPLC trennbares Gemisch beider Verbindungen (Abb. 3.43, Tabelle 3.1).

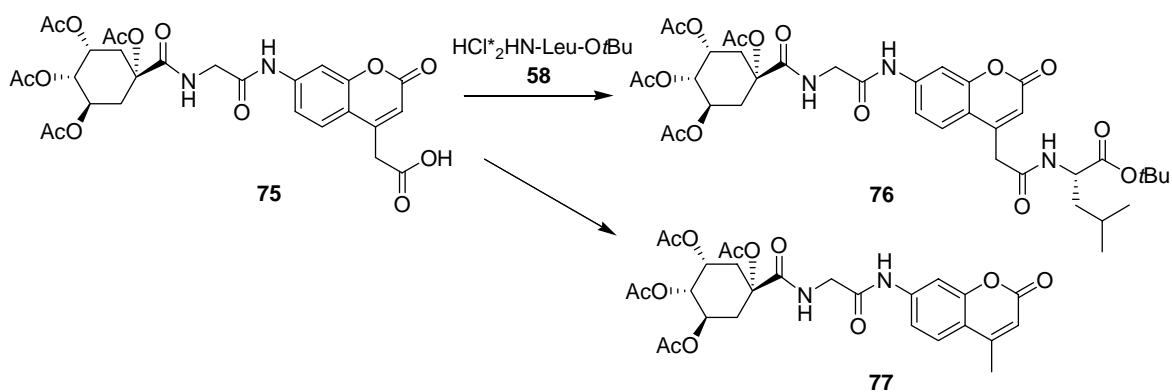


Abb. 3.43 Umsetzung mit HCl·H₂N-Leu-O*t*Bu **58**

<i>Kupplungsreagenzien</i>	<i>Methylderivat 77</i>	<i>Produkt 76</i>
TBTU/HOBt	1	0
PyBop ⁷⁶ /HOBt	2.11	1
EDC/HOBt	1	0
DCC/HOBt	1	2.8
CDI	1	1.6

Tab. 3.1 Umsetzung mit HCl*₂HN-Leu-O^tBu **58**

Tabelle 3.1 kann entnommen werden, dass die Kupplung zum gewünschten Amid **76** sich am besten durch Einsatz von DCC/HOBt durchführen lässt. Ersetzt man DCC durch das wasserlösliche Carbodiimid EDC⁷⁷ und hält die restlichen Reaktionsbedingungen konstant, so entsteht durch Decarboxylierung ausschliesslich das Methylderivat **77** (Abb. 3.44).

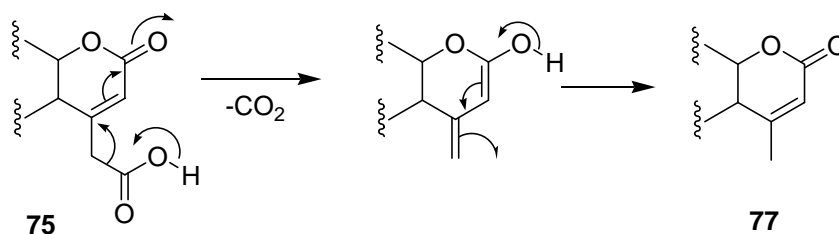
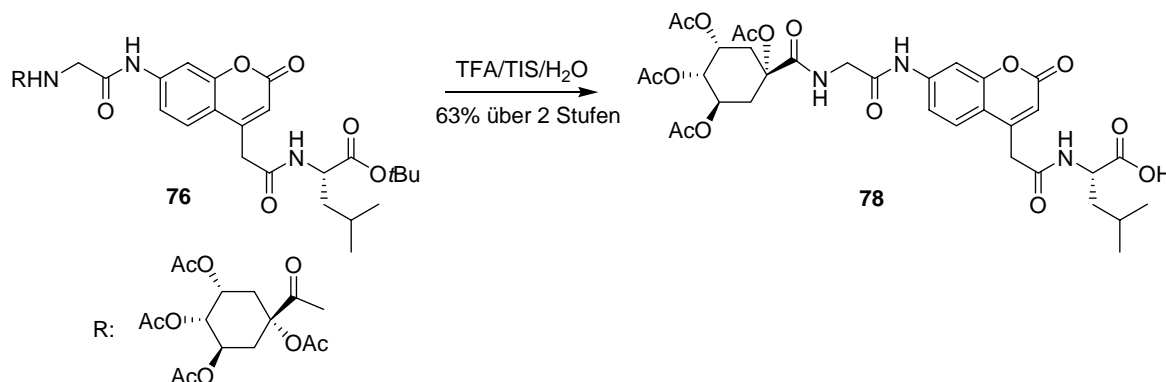


Abb. 3.44 möglicher Mechanismus der Decarboxylierung

Die HPLC-chromatographische Trennung des Produktgemisches wird nur ein einziges Mal zur Charakterisierung der Produkte durchgeführt. Ansonsten kann das Produktgemisch aus **76/77** direkt weiter verwendet werden, denn das Methylderivat lässt sich nach erfolgter Amidbildung und anschließender Spaltung des *tert*-Butylester durch einfache Säulenchromatographie abtrennen (Abb. 3.45).

Abb. 3.45 Deblockierung des Festphasenbausteins **76**

⁷⁶ J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205-208.

⁷⁷ K. D. Kopple, D. E. Nitecki, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 4457-4464.

Der gezeigten Syntheseroute folgend, wird der Festphasenbaustein **78** ausgehend von **61** über insgesamt 11 Stufen in maximal 20% Ausbeute erhalten.

Um die Interpretation von FRET-Spektren zu ermöglichen, müssen sowohl die UV-Absorptionsspektren als auch die Fluoreszenzspektren der verwendeten Chromophore bekannt sein. Zu diesem Zweck werden sowohl Verbindung **75** als auch Verbindung **78** unter Zemplén-Bedingungen bei pH = 10.5 in NaOMe/Methanol deacetyliert (Abb. 3.46).

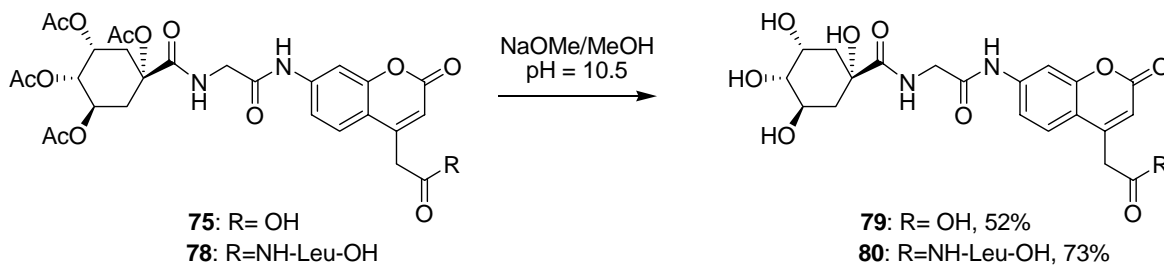


Abb. 3.46 Deacetylierung unter Zemplén Bedingungen

Die gewünschten deacetylierten Produkte lassen sich in guten Ausbeuten isolieren und können in spektroskopischen Messungen untersucht werden (siehe Kapitel 3.7).

3.4 Versuche zu alternativen Syntheserouten zur Darstellung von Verbindung 78

Trotz der schwach ausgeprägten Nucleophilie der Aminfunktion des 7-Aminocumarinesters **68** sollte versucht werden, deren Kupplung mit einer Carboxylkomponente unter anderen als den in Kapitel 3.3 beschriebenen Bedingungen durchzuführen. Antrieb dafür waren die nur moderaten Ausbeuten bei den bisherigen Versuchen.

3.4.1 Kupplungsversuche mit anderen Carboxylkomponenten

In einem ersten Versuch wird Fmoc-Gly-OH **81** mit Chlorameisensäure-isobutylester aktiviert (Abb. 3.47).

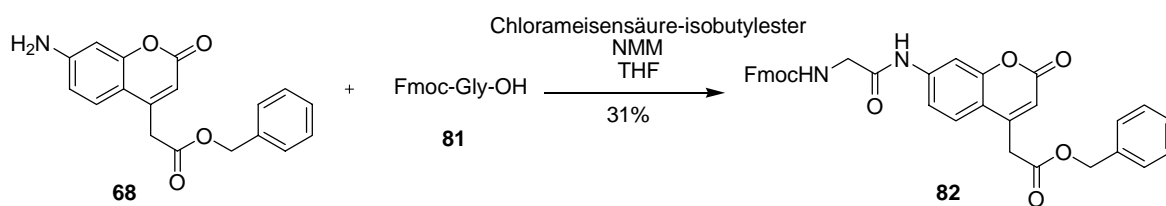
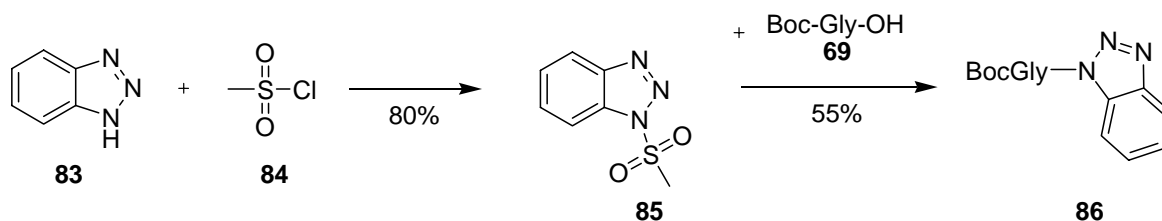


Abb. 3.47 Synthese des Fmoc-Gly-Aca-Derivats **82**

Das gewünschte Amid **82** fällt beim Aufnehmen des Rohprodukts in Methanol in reiner Form aus, jedoch leider nur in 31%iger Ausbeute.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der von *Katritzky et al.* vorgestellten Amidbildung über die Benzotriazolaktivester.⁷⁸ Hierbei wird der Aktivester erzeugt, isoliert und anschließend eingesetzt. Die Darstellung des Aktivesters beginnt mit der Aktivierung von Benzotriazol **83** zum *N*-(1-Methansulfonyl)benzotriazol **85**, welches dann zur gewünschten Verbindung umgesetzt wird (Abb. 3.48).

⁷⁸ a) A. R. Katritzky, H.-Y. He, K. Suzuki, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8210-8213; b) A. R. Katritzky, *ARKIVOC* **2002** (VIII), 134-142.

Abb. 3.48 Synthese des aktivierten Glycinesters **86**

Analog zu den von *Katritzky et al.* beschriebenen Amidbildungen soll versucht werden, die synthetisierte Verbindung **86** mit dem Aca-Derivat **70** zur Reaktion zu bringen. Hierzu werden beide Komponenten in absol. DMF gelöst, mit DIPEA versetzt und 16 h auf 70 °C erhitzt (Abb. 3.49). Es kann jedoch kein Umsatz zum gewünschten Produkt **70** festgestellt werden.

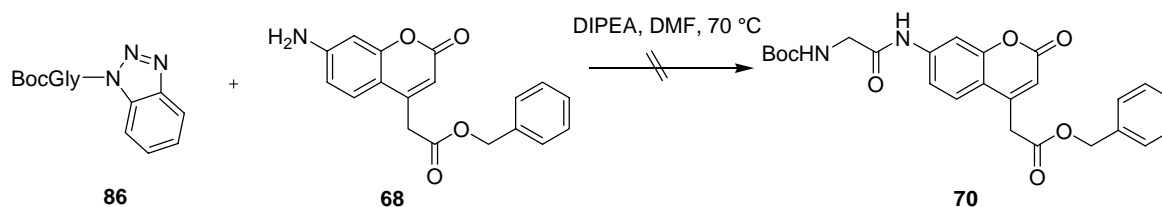
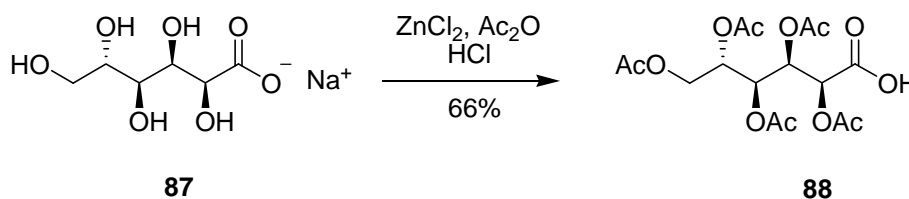


Abb. 3.49 Versuch zur Amidkupplung nach Katritzky

Deshalb soll eine andere Carboxylkomponente in Form von 2,3,4,5,6-Penta-*O*-acetylgluconsäure **88** eingesetzt werden. Die Gluconsäure enthält fünf Hydroxylfunktionen die nach Deblockierung in der Lage sein sollten die Löslichkeit in Wasser zu erhöhen. Die für die Kupplung an die Aminofunktion benötigte 2,3,4,5,6-Penta-*O*-acetylgluconsäure **88** lässt sich nach einer Literaturvorschrift ausgehend von Natrium- α -D-gluconat **87** darstellen (Abb. 3.50).⁷⁹

Abb. 3.50 Synthese der peracetylierten Gluconsäure **88**

Die anschließende Reaktion der Säure **88** mit dem Amin **68** wird unter Einsatz verschiedener Kupplungs- und Aktivierungsreagenzien durchgeführt.

⁷⁹ J. Budka et al., *Tetrahedron* **2000**, 56, 1883-1887.

In Analogie zu einer in der Literatur beschriebenen Synthese,⁶⁹ in der man 7-Aminocumarin **67** durch Umsetzung mit TMS-Cl, DIPEA in absol. CH₂Cl₂ *N*-silyliert und dann mit Fmoc-Cl in das gewünschte Produkt überführt hat, soll in diesem Falle das Säurechlorid eingesetzt werden (Abb. 3.51).

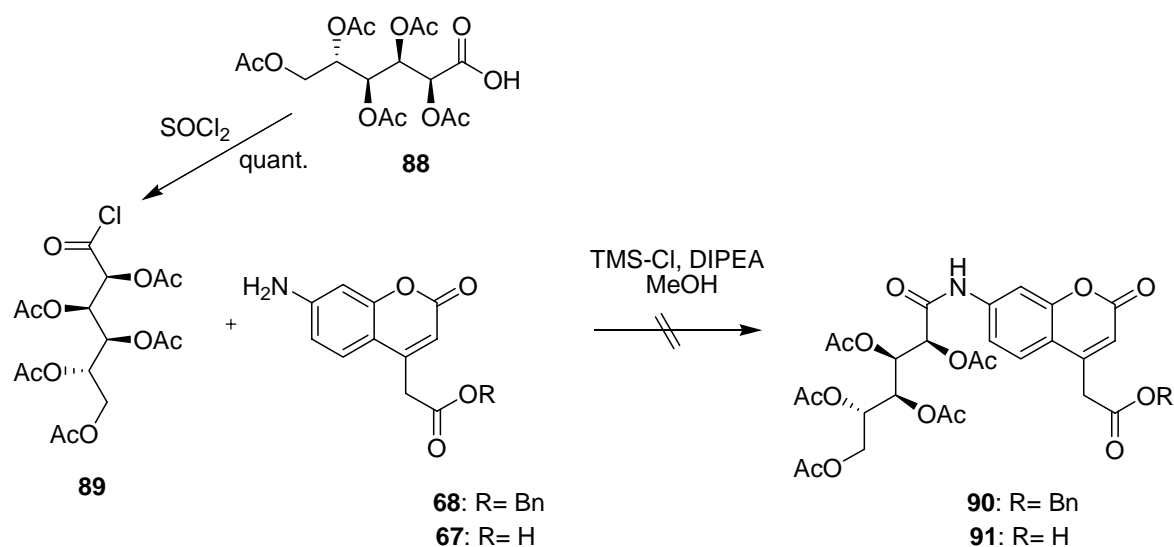


Abb. 3.51 Versuch zur Amidbildung über *N*-Silylverbindungen nach Lit.⁶⁸

Das Säurechlorid **89** wird ausgehend von der peracetylierten Säure **88** durch Erhitzen auf 70 °C in Thionylchlorid erzeugt.⁸⁰ Das *N*-silylierte Aca-Derivat lässt sich durch Erhitzen unter Rückfluss mit frisch destilliertem Trimethylsilylchlorid und DIPEA herstellen. Beide Edukte werden unter Eiskühlung vereinigt und bei Raumtemperatur mehrere Stunden gerührt. Obwohl das Carbonsäurechlorid eine höhere Aktivität im Vergleich zu Fmoc-Cl aufweist, kann das gewünschte Produkt **90** nicht isoliert werden. Auch der Einsatz von Derivat **67** führt nicht zum gewünschten Resultat.

In einem weiteren Versuch wird anstelle des Säurechlorids **89** ein *O*-Acylharnstoff-Derivat in die Reaktion eingesetzt. Doch auch diese Reaktionsführungsvariante führt nicht zum Erfolg (Abb. 3.52).

⁸⁰ F. A. H. Rice, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 3173-3175.

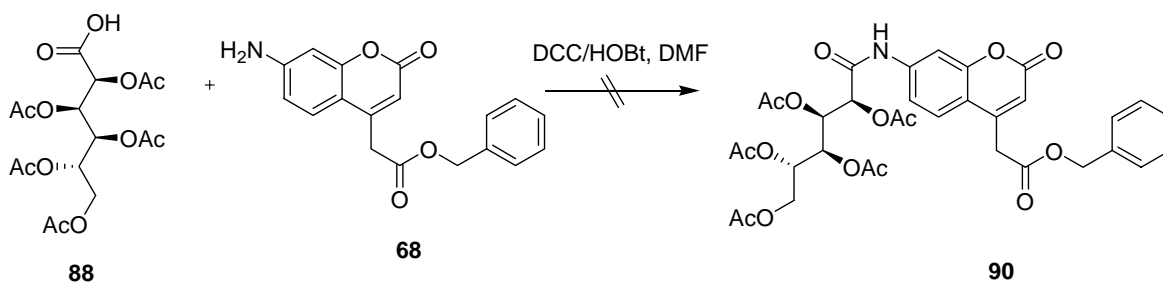
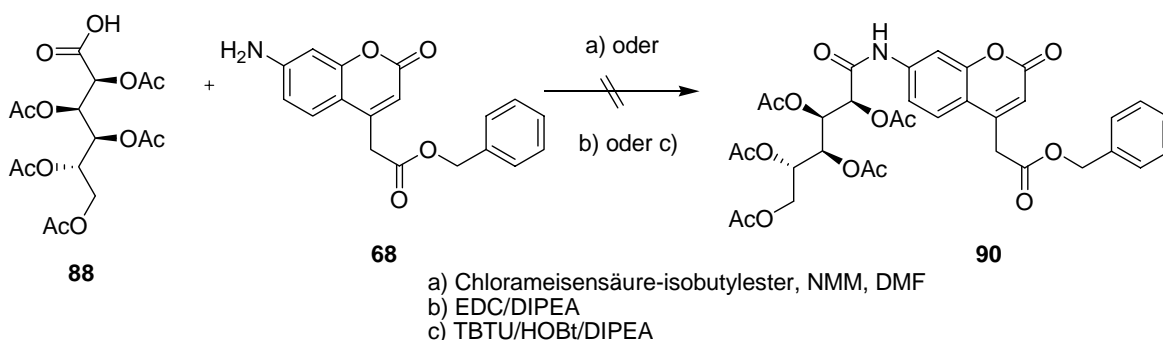


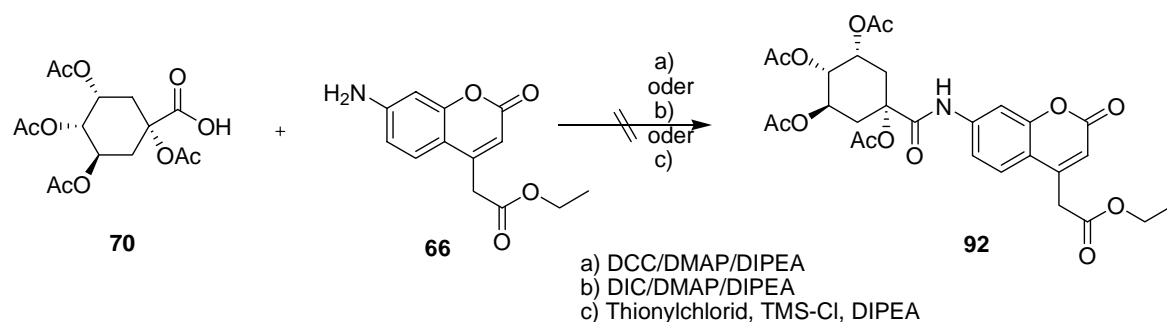
Abb. 3.52 Versuch zur Amidbildung mit DCC/HOBt

In Anlehnung an die erfolgreiche Synthese von Derivat **70** nach der gemischten Anhydridmethode sollte schließlich auch Verbindung **90** so gewonnen werden. Das gemischte Anhydrid wird aus der peracetylierten Säure **88** mit Chlorameisensäure-isobutylester/*N*-Methylmorpholin erzeugt und direkt mit dem Aca-Derivat **68** umgesetzt (Abb. 3.53).

Allerdings kann das gewünschte Produkt **90** wiederum nicht erhalten werden. Ebenso erfolglos blieben die Verwendung von EDC bzw. TBTU/HOBt, wobei jeweils DIPEA als Base verwendet wurde (Abb. 3.53).

Abb. 3.53 Weitere Versuche zur Synthese des Amids **90**

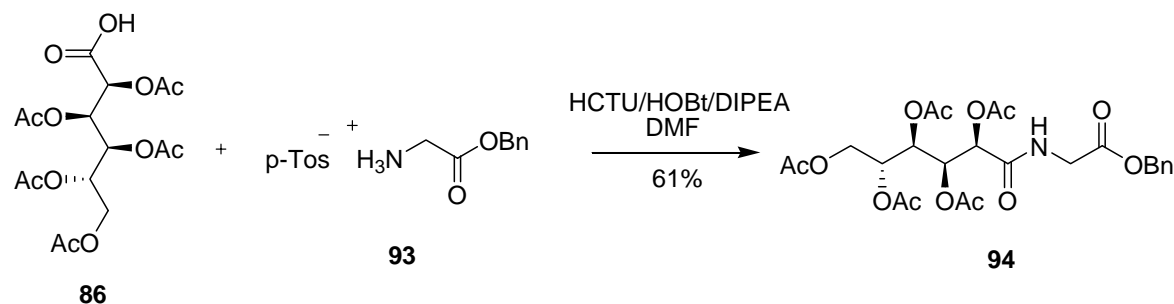
Da die Kupplung der peracetylierten Chinasäure **72** an das mit Glycin funktionalisierte Aca-Derivat **73** gelungen war (Kapitel 3.3), soll die Kupplung von **72** mit der freien Aminofunktion des Aca-Konjugats **68** zum Amid **92** versucht werden. Die Versuche werden mit DCC/DMAP/DIPEA, DIC/DMAP/DIPEA und außerdem über die Reaktion des Säurechlorids mit dem *N*-Trimethylsilyl-amin vorgenommen (Abb. 3.54).

Abb. 3.54 Kupplungsversuche der peracetylierten Chinasäure **70**

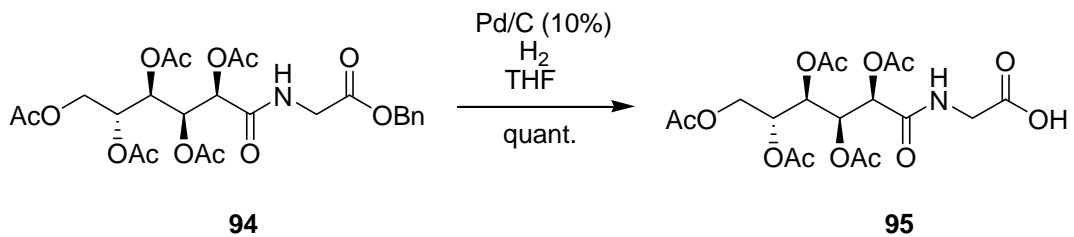
Aber auch diese Varianten führen nicht zum gewünschten Produkt.

Da es aus unverständlichen Gründen nicht möglich zu sein scheint, die untersuchten Carboxylkomponenten und die Aminfunktion des 7-Aminocumarins **66** mit anderen Carboxylkomponenten als Glycin-Derivaten umzusetzen, soll nun versucht werden, die *N*-terminale Funktionalisierung des Glycins vor dessen Einsatz in die Kupplungsreaktion an Aca durchzuführen. Dazu sollen sowohl 2,3,4,5,6-Pentaacetylgluconsäure **88** als auch 1,3,4,5-Tetraacetylchinasäure **72** verwendet werden.

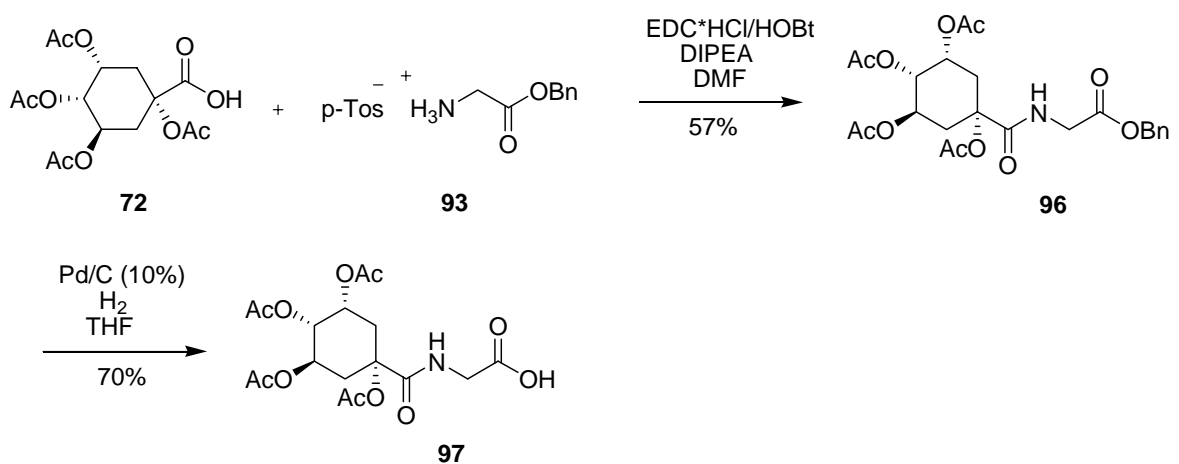
Man löst 2,3,4,5,6-Pentaacetylgluconsäure **88** in DMF und setzt zur Aktivierung HCTU (2-(6-Chloro-1-*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium)/HOBt, sowie DIPEA als Base, zu. Als Aminkomponenten kommt *p*-Tos*H₃N-Gly-OBn **93** zum Einsatz (Abb. 3.55). Das gewünschte Produkt **94** kann in 61%iger Ausbeute isoliert werden.

Abb. 3.55 Darstellung des Gluconoyl-Glycins **94**

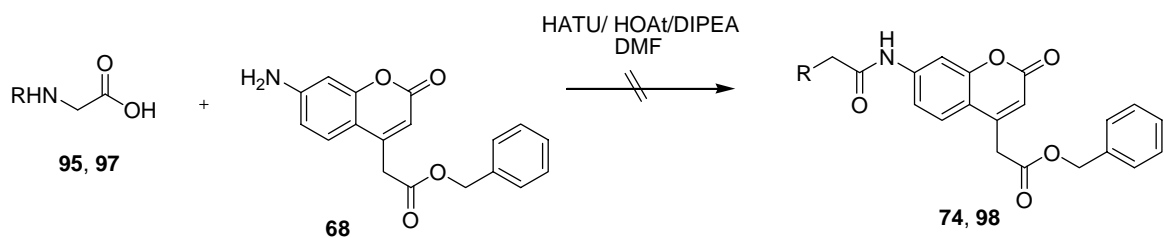
Die für diese Kupplung benötigte freie Carbonsäure erhält man aus dem Benzylester durch Hydrieren mit Pd/C (10%) als Katalysator in quantitativer Ausbeute (Abb. 3.56).

Abb. 3.56 Synthese der Gluconsäure **95**

Die Synthese der freien Carbonsäure **97** mit 1,3,4,5-Tetraacetylchinasäure und p-Tos*H₃N-Gly-OBn **93** verläuft analog (Abb. 3.57).

Abb. 3.57 Synthese des Chinasäure-Glycin-Derivats **97**

Beide Glycin-Konjugate **95** und **97** werden unter Einsatz der sehr reaktionsfähigen Kupplungsreagenzien HATU/HOAt umgesetzt. Die gewünschten Produkte lassen sich jedoch auch in diesem Fall nicht isolieren (Abb. 3.58).



97: R= 1,3,4,5-Tetraacetylchinasäure
95: R= 2,3,4,5,6-Pentaacetylgluconsäure

74: R= 1,3,4,5-Tetraacetylchinasäure
98: R= 2,3,4,5,6-Pentaacetylgluconsäure

Abb. 3.58 Versuche zur Kupplung der funktionalisierten Glycin-Derivate **95**, **97**

Als letzter Versuch dieser Reihe wird eine heteroanaloge Carbonylverbindung mit erhöhter Elektrophilie, 1,3-Propansulton **101**, verwendet. Durch die Reaktion der beiden Komponenten entstände eine freie Sulfonsäurefunktion, die ebenfalls sehr gute

löslichkeitsvermittelnde Eigenschaften für Wasser als Lösungsmittel aufweisen könnte. Doch auch diese Möglichkeit, eine polare Gruppe einzuführen und dadurch eine verbesserte Löslichkeit zu erreichen, scheiterte (Abb. 3.59).

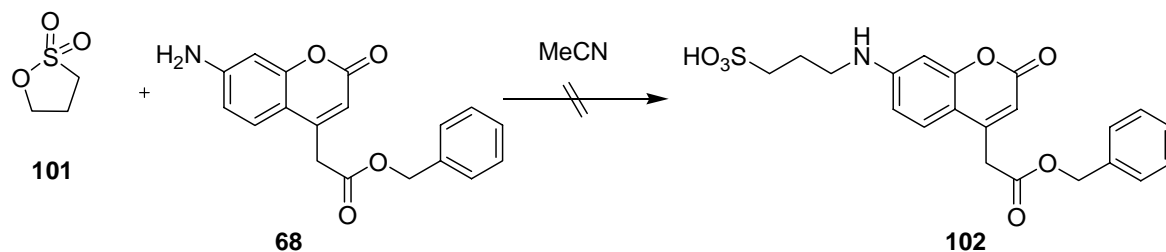


Abb. 3.59 Erfolgreiche Umsetzung mit 1,3-Propansulton **101**

Eine in der Literatur beschriebene Sulfonierung eines Cumarinderivates soll auf das hier verwendete System übertragen werden.⁸¹ Anstelle des gezeigten Derivats **65** wird in der Literatur ein regioisomeres Methylderivat verwendet (Abb. 3.60).

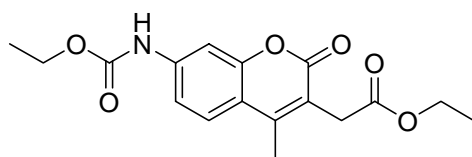


Abb. 3.60 In der Literatur verwendetes Regioisomer

Hierzu wird das Aca-Derivat **65** in 30%igem Oleum gelöst und auf 110 °C erhitzt (Abb. 3.61).

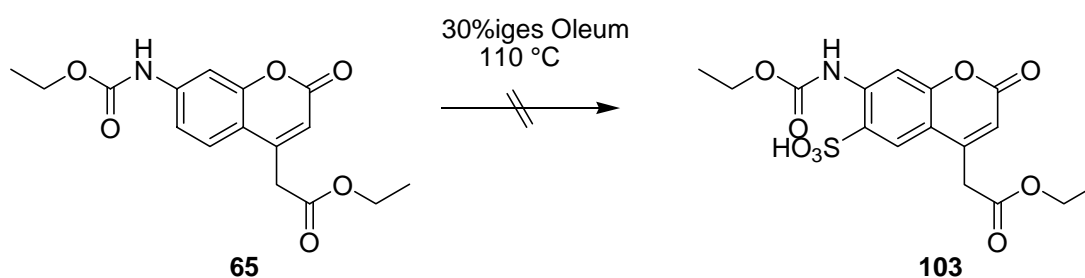


Abb. 3.61 Versuch der Sulfonierung

⁸¹ W.-Y. Leung, P. A. Trobridge, R. P. Haugland, R. P. Haugland, F. Mao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 15, 2229-2232.

Der Vorteil von Verbindung **103** bestünde in der Möglichkeit nach Deblockierung intramolekular ein Salz zu bilden, was die Löslichkeitseigenschaften in Wasser wesentlich verbessern sollte.

Das Produkt **103** kann jedoch nicht aus der Reaktionsmischung isoliert werden.

Da keiner der gezeigten Versuche zum Erfolg führt, soll versucht werden, die geringe Nucleophilie des Amins **68** durch die Bildung des jeweiligen Amids vor dem Ringschluss zum Cumarin zu umgehen.

3.4.2 Reaktionen und Folgereaktionen mit 3-Aminophenol

Aus 3-Aminophenol **61** sollten verschiedene Amide dargestellt werden, die anschließend in einer Pechmann-Kondensation⁷⁰ zur Cumarin-Bildung eingesetzt werden können. Als Kupplungspartner werden sowohl die bereits synthetisierten Verbindungen **72**, **88** als auch einige weitere Verbindungen verwendet.

Verbindung **88** lässt sich mit **61** unter Anwendung des Säurechlorids **89** umsetzen (Abb. 3.62). Dabei fungiert 3-Aminophenol **61** gleichzeitig als angreifendes Agens und HCl abfangende Base. Das Produkt **104** kann in 71% Ausbeute isoliert werden.

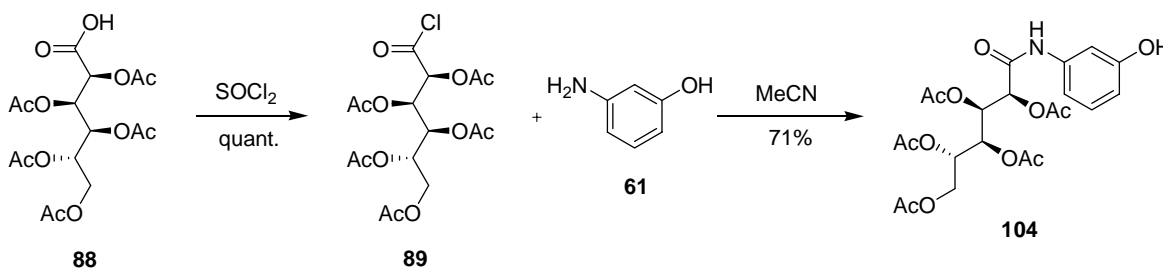


Abb. 3.62 Synthese von Verbindung **104**

Der Versuch, eine analoge Reaktion mit 1,3,4,5-Tetraacetylchinasäurechlorid **72** durchzuführen gelingt nicht (Abb. 3.63).

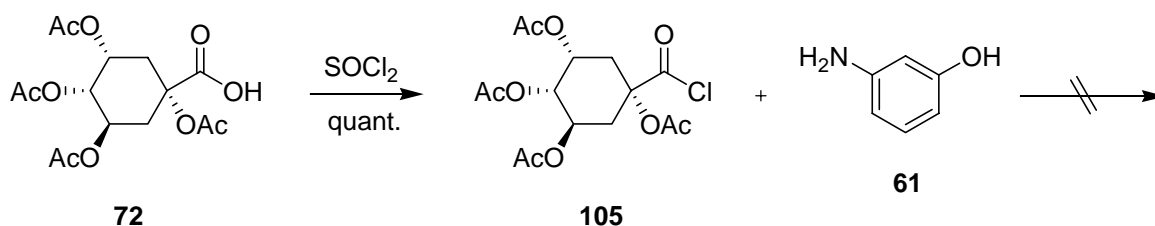


Abb. 3.63 Gescheiterter Kupplungsversuch

lässt sich ausgehend von Glycin **107** in 20%iger Ausbeute in einer Stufe darstellen (Abb. 3.66).⁸²

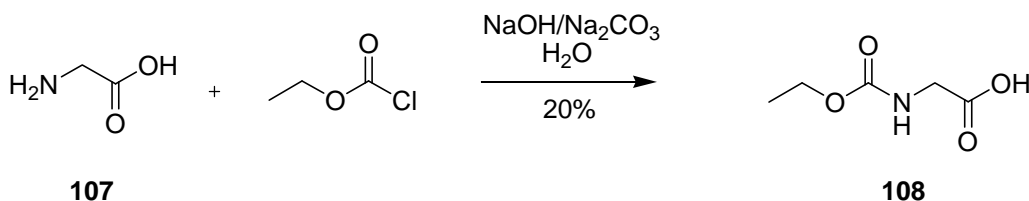


Abb. 3.66 Darstellung von *N*-Ethoxycarbonylglycin **108**

Hierzu wird Glycin **107** in einer NaOH/Na₂CO₃-Lösung gelöst, auf 9 °C gekühlt und langsam mit Chlorameisensäure-ethylester versetzt. Die Temperatur sollte während der Zugabe 10.5 °C nicht übersteigen.

Unter Verwendung von DCC in THF lässt sich ein Äquivalent von Verbindung **108** in 90%iger Ausbeute selektiv mit 3-Aminophenol **61** zum Amid **109** umsetzen (Abb. 3.67).

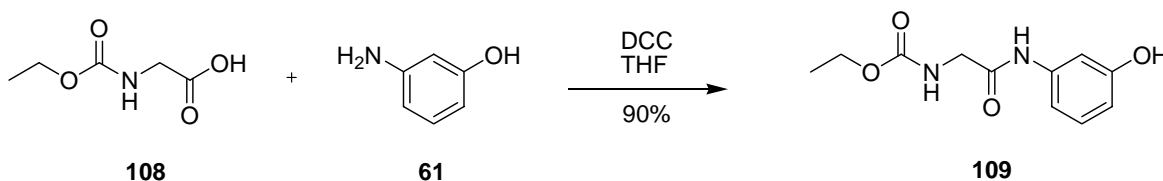


Abb. 3.67 Selektive Amidbildung zu Derivat **109**

Das über 2 Stufen erhaltene Aminophenol-Derivat **109** kann in einer Pechmann-Kondensation⁷⁰, zum Beispiel mit 1,3-Acetondicarbonsäurediethylester **63**, umgesetzt werden. Das angestrebte Aminocumarin **110** kann in 49%iger Ausbeute gewonnen werden (Abb. 3.68).

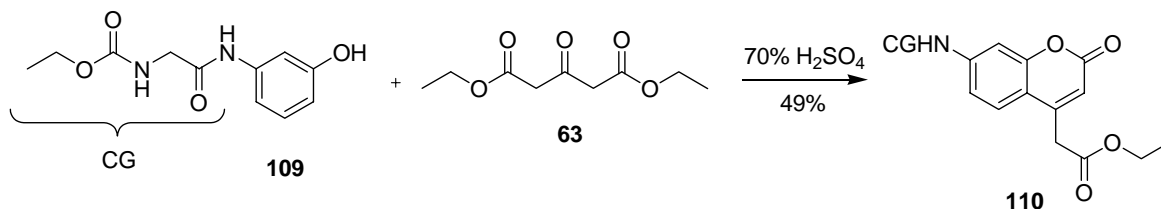


Abb. 3.68 Erfolgreiche Synthese des Aca-Derivats **110**

⁸² a) E. Fischer, E. Otto, *Chem. Ber.* **1903**, 36, 2106-2116. b) M. R. Vernsten, M. B. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 1320-1321.

Bis zu diesem Punkt konnte die Anzahl der benötigten Stufen, um ein geschütztes, mit Glycin funktionalisiertes Aminocumarin-Derivat, darzustellen von fünf auf drei Stufen reduziert werden. Gleichzeitig reduziert sich aber die Ausbeute von 45% (fünf Stufen) auf 9% (drei Stufen).

Der nächste Schritt besteht in der basenkatalysierten Spaltung sowohl der Aminoschutzgruppe als auch des Esters. Hierzu wird Verbindung **110** bei pH = 13 in NaOH für 2 h auf 100 °C erhitzt. Es gelingt jedoch nicht, die deblockierte Verbindung **111** aus der wässrigen Phase zu extrahieren. Auch der Versuch, die wässrige Phase einzudampfen und anschließend die deblockierte Verbindung **111** in org. Lösungsmitteln wie Methanol, Essigester oder Dimethylformamid aufzunehmen, ist erfolglos (Abb. 3.69).

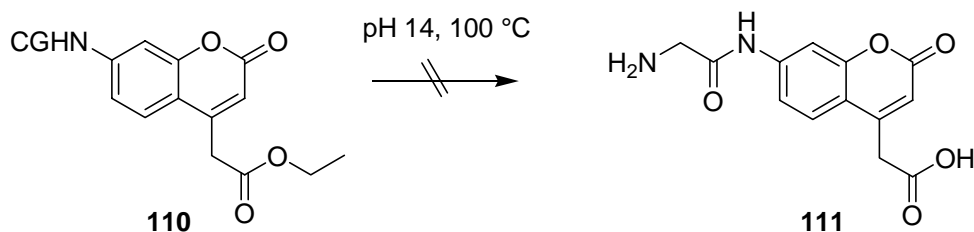


Abb. 3.69 Versuch zur Deblockierung von Verbindung **111**

Sämtliche in Kapitel 3.4 vorgestellten Versuche zur Verbesserung der Synthese des Chromophors **78** verliefen nicht erfolgreich. Dementsprechend muss auf die in Kapitel 3.3 vorgestellte Strategie zurückgegriffen werden.

3.5 Darstellung des 2-Phenyl-2-trimethylsilylethyl-(PTMSEL)-Ankers⁸³

Der bereits in der Diplomarbeit verwendete PTMSEL-Linker (Abb 3.71) ist ein Festphasenanker, an dem wegen seiner milden Spaltung vollgeschützte Peptide und Glycopeptide gewonnen werden können. Im Spaltungsreagenz TBAF*3H₂O in CH₂Cl₂ bleibt die Hydrathülle des F⁻Ions intakt, wodurch dessen Basizität stark herabgesetzt ist. Die so erhaltenen geschützten Peptide oder Glycopeptide können entweder Fragmentkondensationen unterzogen oder selektiv deblockiert werden. Die im Vergleich

⁸³ a) M. Wagner, *Dissertation*, Universität Mainz **2002**. b) M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 315-319.

zu anderen mit Fluorid spaltbaren Silyl-Linkern⁸⁴ auftretende erhöhte Fluoridsensibilität resultiert aus der benzyllischen C-Si-Bindung. Ist diese Bindung nicht vorhanden, erfordert die Spaltung den Einsatz von TBAF in polaren, aprotischen Lösungsmitteln wie DMF oder THF.

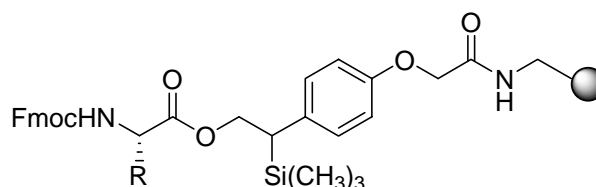


Abb. 3.70 Das PTMSEL-Ankersystem (R = beliebiger Aminosäurerest)

Der PTMSEL-Anker soll neben dem sauer spaltbarem Wang-Linker zur Synthese von Peptiden und Glycopeptiden eingesetzt werden.

Ausgehend von Trimethylvinylsilan **112**, das durch Epoxidierung mit *m*-Chlorperbenzoesäure in Trimethylvinylloxiran **113** (Abb. 3.71) überführt wird,⁸⁵ kann der PTMSEL-Linker in einer Gesamtausbeute von 44% über 6 Stufen dargestellt werden.

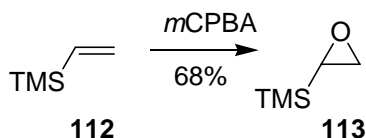


Abb. 3.71 Synthese des Oxirans **113**

Zu dem aus 1-(4-Bromophenoxy)-1-ethoxyethan, *n*-Butyllithium und Kupfer(I)iodid entstandenen Lithium-di(*p*-ethoxyethoxyphenyl)cuprat **114** gibt man das zuvor hergestellte Trimethylsilyloxiran **113** in einem Verhältnis 2.5:1 und erhält in 87% Ausbeute [2-(*p*-Ethoxyethoxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol⁸⁶ **115**. Die dabei auftretende Cuprataddition verläuft hoch regioselektiv. Der einzuführende Rest greift an der silylierten Position an (Abb. 3.72).

⁸⁴ a) D. G. Mullen, G. J. Barany, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 5240-5248. b) R. Ramage, C. A. Barron, S. Bielecki, D. W. Thomas, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 4105-4108. c) H.-G. Chao, M. S. Bernatowicz, P. D. Reiss, C. E. Klimas, G. R. Matsueda, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1746-1752.

⁸⁵ a) M. Bazant, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1959**, 24, 3758. b) Wilt, Kolewe, Kraemer, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 2624-2631.

⁸⁶ F. Hayakawa, S. Watanabe, N. Shimizu, Y. Tsuno, *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1993**, 66, 153-157.

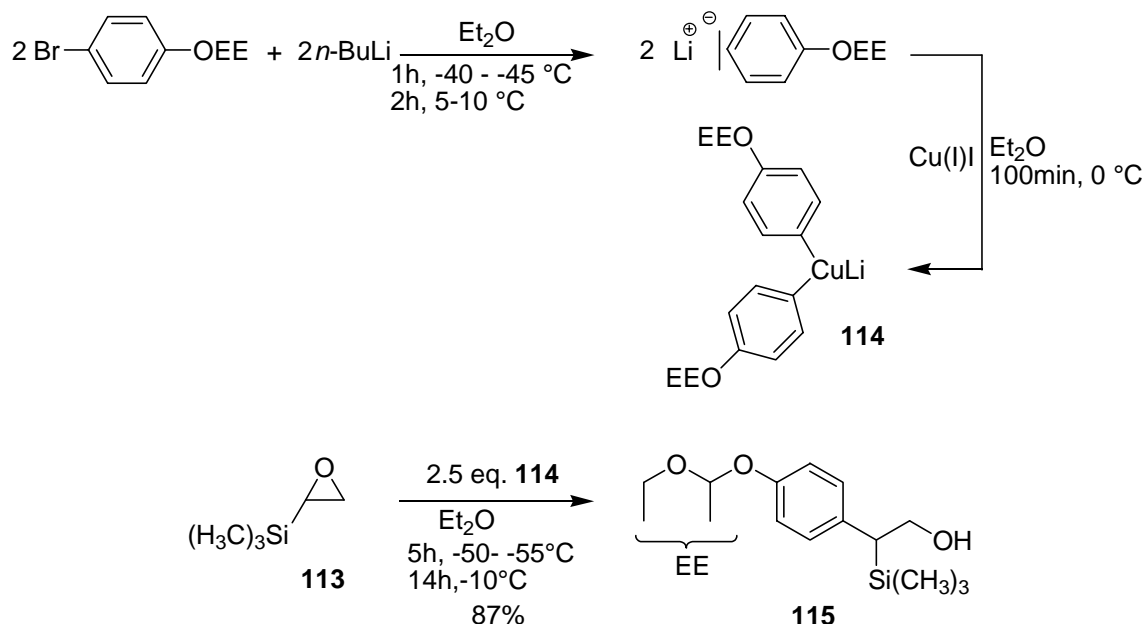


Abb. 3.72 Darstellung von [2-(*p*-Ethoxyethoxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol **115**

Wegen der Säurelabilität der Ethoxyethyl-(EE)-Schutzgruppe muss dem Laufmittelgemisch bei der Chromatographie 1% Triethylamin zugesetzt werden, um die Abspaltung dieser Schutzgruppe durch das Kieselgel zu verhindern.

Die Ethoxyethyl-(EE)-Schutzgruppe lässt sich anschließend selektiv durch den Einsatz katalytischer Mengen PPTS (Pyridinium-*p*-toluolsulfonat) in Methanol entfernen (Abb. 3.73).

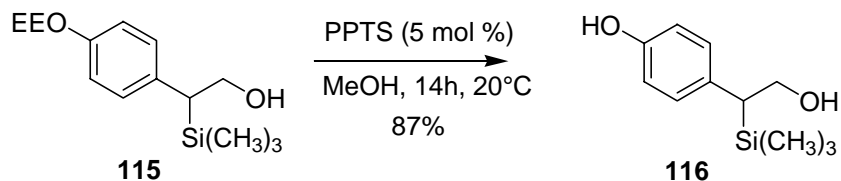


Abb. 3.73 Herstellung von [2-(*p*-Hydroxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol **116**

Durch portionsweise Zugabe von K_2CO_3 , KI und Chloressigsäureallylester wird die Dihydroxy-Verbindung [2-(*p*-Hydroxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol **116** selektiv an der phenolischen OH-Funktion verethert (Abb. 3.74).

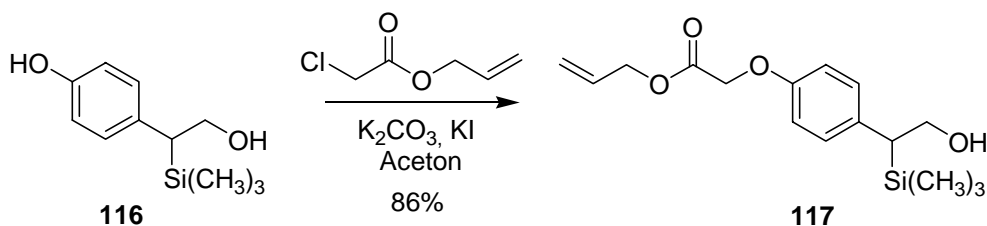


Abb. 3.74 Darstellung von 4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure-allylester **117**

Möglich ist dies aufgrund der unterschiedlichen pKs-Werte der beiden vorhandenen OH-Funktionen. Durch Verwendung von K_2CO_3 als Base wird selektiv die phenolische OH-Funktion, also die Funktion mit dem kleineren pKs-Wert, deprotoniert und anschließend verethert. Dementsprechend empfiehlt es sich, frisches K_2CO_3 zu verwenden, denn der durch KOH-Verunreinigungen steigende pH-Wert kann sowohl zu einer Peterson-Olefinierung als auch zu einer mehrfachen Veretherung führen. Die so eingeführte Carboxylfunktion kann nach entsprechender Deblockierung zur Anbindung an ein aminofunktionalisiertes Harz verwendet werden.

Mit Verbindung **117** wird nun die gewünschte Startamino-säure gekuppelt. Da der PTMSEL-Linker zur Synthese von Peptiden bzw. Glycopeptiden, die in Untersuchungen mittels FRET-Spektroskopie eingesetzt werden sollen, zum Einsatz kommt, wird Fmoc-Trp(Boc)-OH als Startamino-säure gewählt. Die Veresterung von Verbindung **117** mit Fmoc-Trp(Boc)-OH wird unter *Steglich*-Bedingungen (DCC/DMAP) durchgeführt.⁵⁷ Man erhält die gewünschte Verbindung **118** in 95% Ausbeute. Um Racemisierung zu vermeiden, wird die Reaktionstemperatur bei 0°C gehalten (Abb. 3.75).

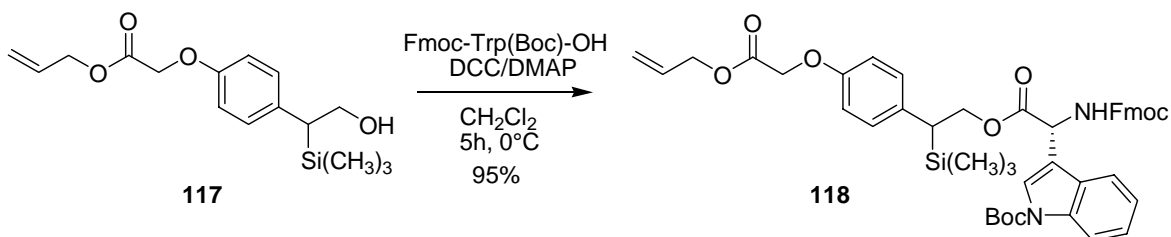
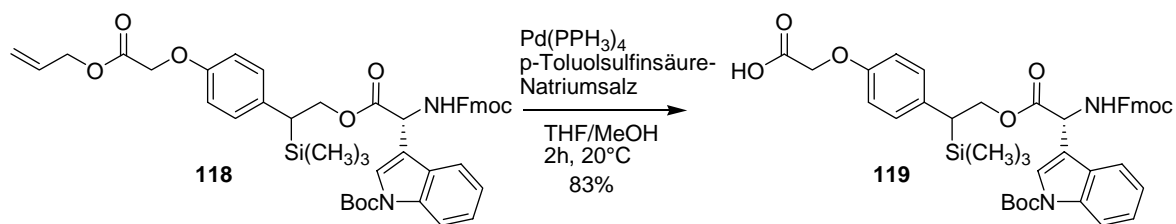


Abb. 3.75 Darstellung von Verbindung **118**

Der Allylester **118** lässt sich mittels $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ und Natrium-*p*-toluolsulfonat⁸⁷ als Allylscavenger spalten. Verbindung **119** kann nach erfolgter Flashchromatographie in 83% Ausbeute isoliert werden (Abb. 3.76).

⁸⁷ M. Honda, H. Morita, I. Nagakura, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 8932-8936.

Abb. 3.76 Synthese von Verbindung **119** ausgehend von **118**

Der mit der Startaminosäure beladene Linker wird an ein aminofunktionalisiertes Tentagel-Harz (*NovaSyn TG amino resin HL*, Novabiochem, 110 μm beads, Beladung: 0.45 mmol/g) gekuppelt (Abb. 3.77).⁸⁸ Als Kupplungsreagenz dient TBTU/HOBt in Gegenwart von *N*-Methylmorpholin. Mit Acetanhydrid/Pyridin (1:3) werden nicht umgesetzte Aminofunktionen am Harz acetyliert (Abb. 3.77).

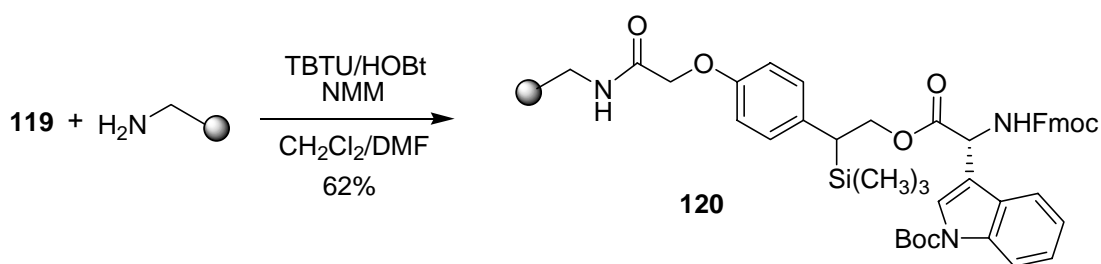


Abb. 3.77 Kupplung des Linkers an das Tentagel-Harz

Durch spektroskopische Beladungsdichtebestimmung wird eine Kupplungsausbeute von 62% ermittelt.⁸⁹

Das beladene Harz ist für den Einsatz in der Festphasensynthese von (Glyco)Peptiden ohne weitere Behandlung verwendbar.

⁸⁸ a) W. Rapp et al. In "*Peptides 1988, Proc. 20st European Peptide Symposium*", G. Jung & E. Bayer (Eds.), Walter de Gruyter, Berlin, **1989**, pp.199. b) E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 113-129.

⁸⁹ *Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Chemistry* **1998**, 330.

3.6 Festphasensynthese der (Glyco)Peptide

Wie in der Zielsetzung (Kapitel 2) beschrieben, sollen sowohl Peptide und Glycopeptide als auch mit Chromophoren markierte Glycopeptide dargestellt werden. Ziel ist es dabei, Strukturen aus der homophilen Erkennungsregion des LI-Cadherins der Maus zu synthetisieren, die in zellbiologischen Test eingesetzt werden können. Weiterhin soll mittels FRET-Spektroskopie und der dafür benötigten chromophoren Donor-Akzeptor-Funktionalisierung versucht werden, eine Konformationsanalyse durchzuführen. Zur Synthese der entsprechenden Verbindungen kommen zwei Ankersysteme zum Einsatz (PTMSEL-Tentagel-Harz und PHB-Tentagel-Harz).

3.6.1 Allgemeines Festphasenprotokoll

Sowohl die Synthese der Peptide als auch die der Glycopeptide erfolgt nach der Fmoc-Strategie in einem Perkin-Elmer ABI 433A-Peptidsynthesizer. Für den Seitenkettenschutz werden orthogonal stabile Schutzgruppen verwendet (Abb. 3.78).

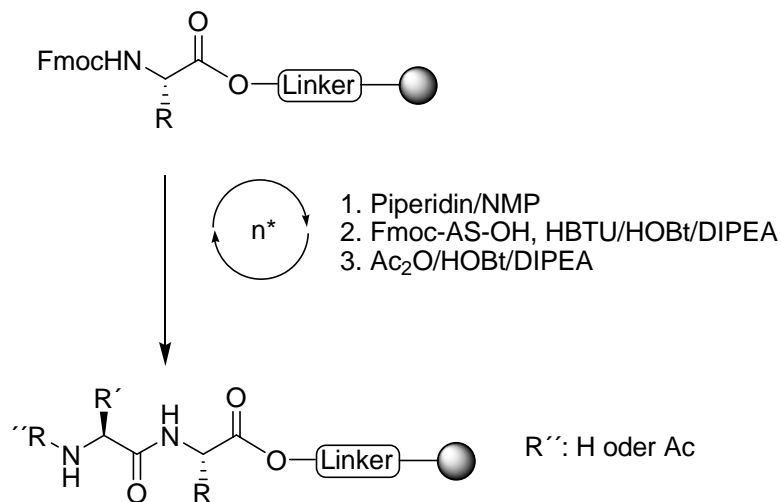


Abb. 3.78 Allgemeines Festphasenprotokoll

Die Seitenkettenfunktionen werden beim unglycosylierten Serin als *tert*-Butylether, bei der Asparaginsäure als *tert*-Butylester, bei Histidin und Glutamin als *N*-Trityl-Derivate und im Falle des Tryptophans als *N-tert*-Butyloxycarbonyl-Derivat geschützt. Diese Schutzgruppen verhindern die Beteiligung der Seitenkettenfunktionen während der

Festphasenpeptidsynthese, lassen sich jedoch nach beendeter Synthese leicht mit Trifluoressigsäure entfernen.

Als polymere Trägersubstanz wird kommerziell erhältliches, aminofunktionalisiertes Tentagel-Harz (*NovaSyn TG amino resin HL*, Novabiochem, 110 μm beads, Beladung: 0.45 mmol/g), beladen mit Fmoc-Trp(*t*Bu)-PTMSEL oder ein mit der benötigten Aminosäure beladenes Wang-Harz eingesetzt.⁹⁰ Vor der Kupplung der ersten Aminosäure muss die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch wiederholte Behandlung der Ausgangssubstanz mit einer 20%igen Piperidin-Lösung entfernt werden.⁹¹ Die Anzahl der nötigen Spaltung richtet sich nach der gemessenen UV-Absorption des Fmoc-Piperidin-Addukts. Der Abspaltvorgang wird solange wiederholt, bis der prozentuale Unterschied zweier aufeinanderfolgender Zyklen $\leq 10\%$ ist. Die Kupplungen der Aminosäuren werden mit HBTU/HOBt und Hünigs-Base durchgeführt. Die Kupplungszeiten betragen 30 min. Nach jedem Kupplungsschritt werden nicht umgesetzte Aminogruppen durch Zugabe von Ac_2O /HOBt/DIPEA acetyliert. Dieser Cappingschritt verhindert die Bildung von Fehlsequenzen, die sich nur durch eine oder mehr Aminosäuren von der Zielsequenz unterscheiden. Werden Glycopeptide synthetisiert, so erfolgt die Kupplung des jeweiligen glycosylierten Bausteins durch Zusatz der reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt und DIPEA als Base. Die Reaktionszeit des manuellen Kupplungsschritts wird in Abhängigkeit von den eingesetzten Äquivalenten gewählt.

3.6.2 Synthese des unglycosylierten Pentadecapeptids 123

Das im Rahmen der Diplomarbeit⁶⁰ hergestellte Undecapeptid **121** soll sowohl C- als auch *N*-terminal verlängert werden (Abb. 3.79).

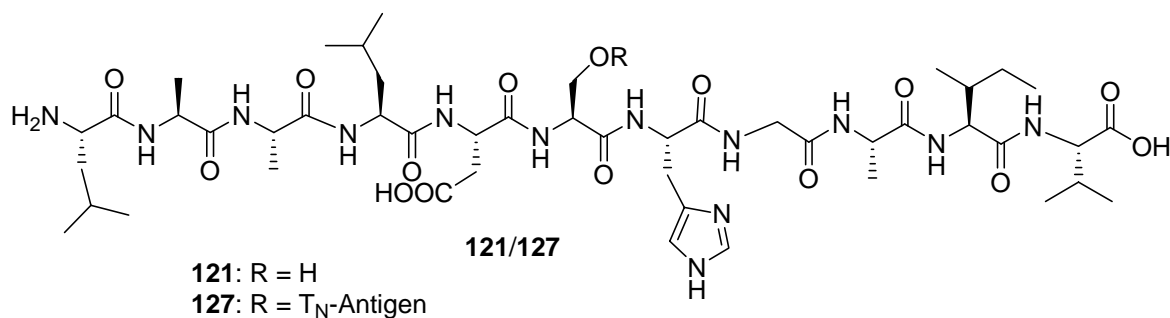


Abb. 3.79 Während der Diplomarbeit synthetisierte (Glyco)Peptide

⁹⁰ S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 1328-1333.

⁹¹ B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* **1985**, 41, 1939-1943.

Durch die Synthese des unglycosylierten Peptids am Wang-Tentagel-Harz nach dem allgemeinen Festphasenprotokoll, das mit der Startaminosäure Fmoc-Val-OH beladen ist, soll geprüft werden, ob sich die zu synthetisierende Sequenz am Synthesizer aufbauen lässt, ohne dass es zu Rückfaltungen oder sonstigen Nebenreaktionen kommt (Abb. 3.80).

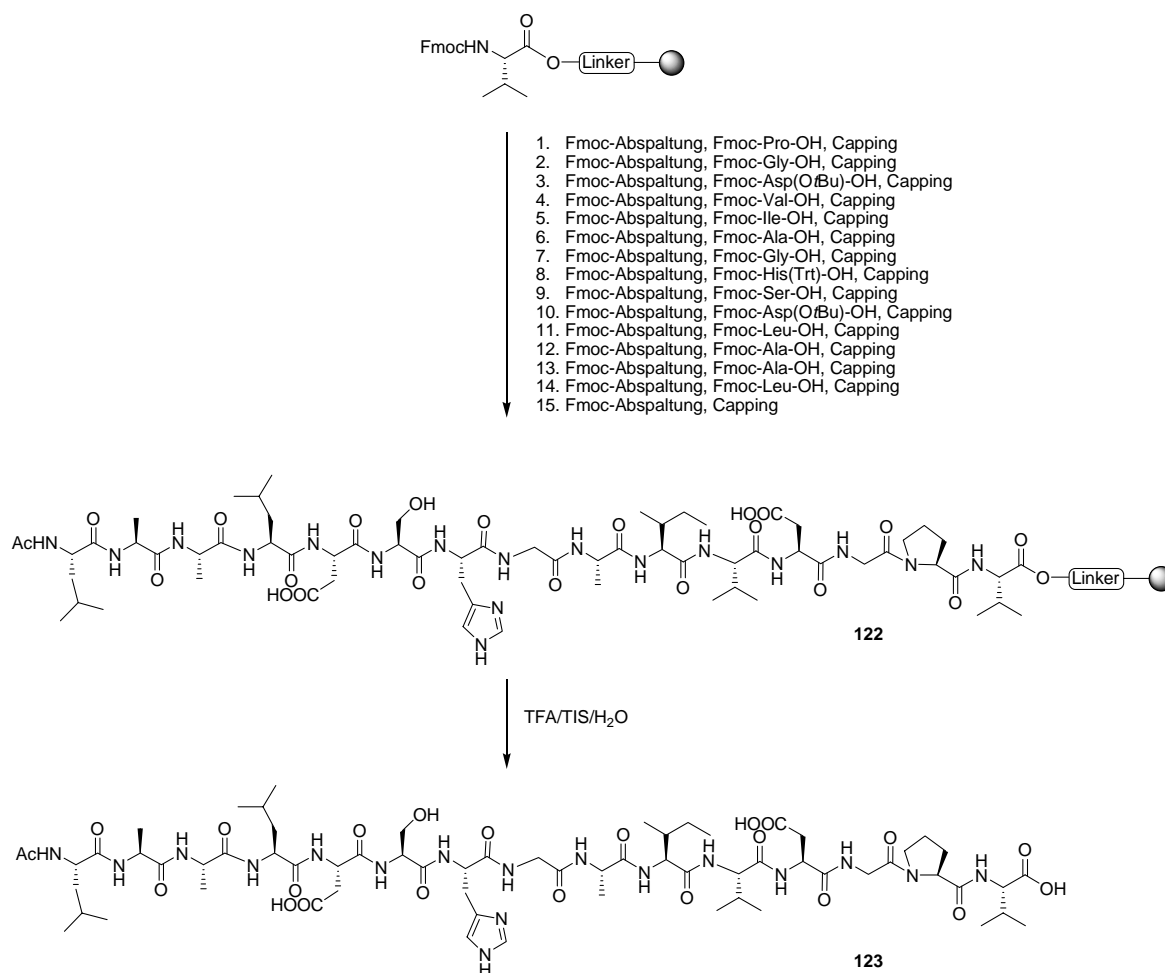


Abb. 3.80 Synthese des Pentadecapeptids **123**

Beim ersten Syntheseversuch des Pentadecapeptids **123** brach die Ausbeute bei den Kupplungen der beiden Aminosäuren Fmoc-Ile-OH und Fmoc-Ala-OH massiv ein. Dies lässt auf eine Rückfaltung der Peptidkette am Harz schließen. Dementsprechend werden im zweiten Syntheseversuch jeweils 10 Äquivalente der beiden Aminosäuren in einer Doppelkupplung ohne zwischenzeitlichen Cappingschritt eingesetzt. Aufgrund der abgeänderten Vorgehensweise kann die jeweilige Kupplung deutlich verbessert werden. Nachdem man das Peptid vom Harz durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten hat, wobei gleichzeitig die Seitenkettenschutzgruppen entfernt werden, fällt es aus Wasser als farbloser Feststoff aus, der in allen Lösungsmitteln außer DMSO und DMF unlöslich

ist. Das erhaltene Produktgemisch kann keiner Reinigung unterzogen werden. Aufgrund der Gestalt des Abspaltungsprotokolls und dem erhaltenen Massenpeak des gewünschten Produkts, kann aber trotzdem davon ausgegangen werden, dass die Kupplung der angestrebten Sequenz wahrscheinlich ohne grössere Komplikationen durchführbar ist.

3.6.3 Synthese von Glycopeptiden

Die Löslichkeit des Peptids **123** sollte besser werden, wenn man anstelle von Serin glycosylierte Serin-Konjugate in Form von Antigen-Derivaten in die Synthese einbringt. Deshalb wird wiederum ausgehend von Fmoc-Val-PHB-Tentagel-Harz das entsprechende Peptid bis zur Kupplung des Histidins nach dem in Kapitel 3.5.1 beschriebenen allgemeinen Festphasenprotokoll aufgebaut. Zur folgenden Kupplung des Serin-T_N-Antigen Derivats **13** versetzt man 2 Äquivalente **13** mit HATU/HOAt in NMP und DIPEA als Base und überführt die so erhaltene Reaktionslösung in den Festphasenreaktor. Nach dreistündiger Reaktionsdauer und Spülen wird acetyliert. Die restlichen Aminosäuren werden nach dem Standardprotokoll gekuppelt (Abb. 3.81).

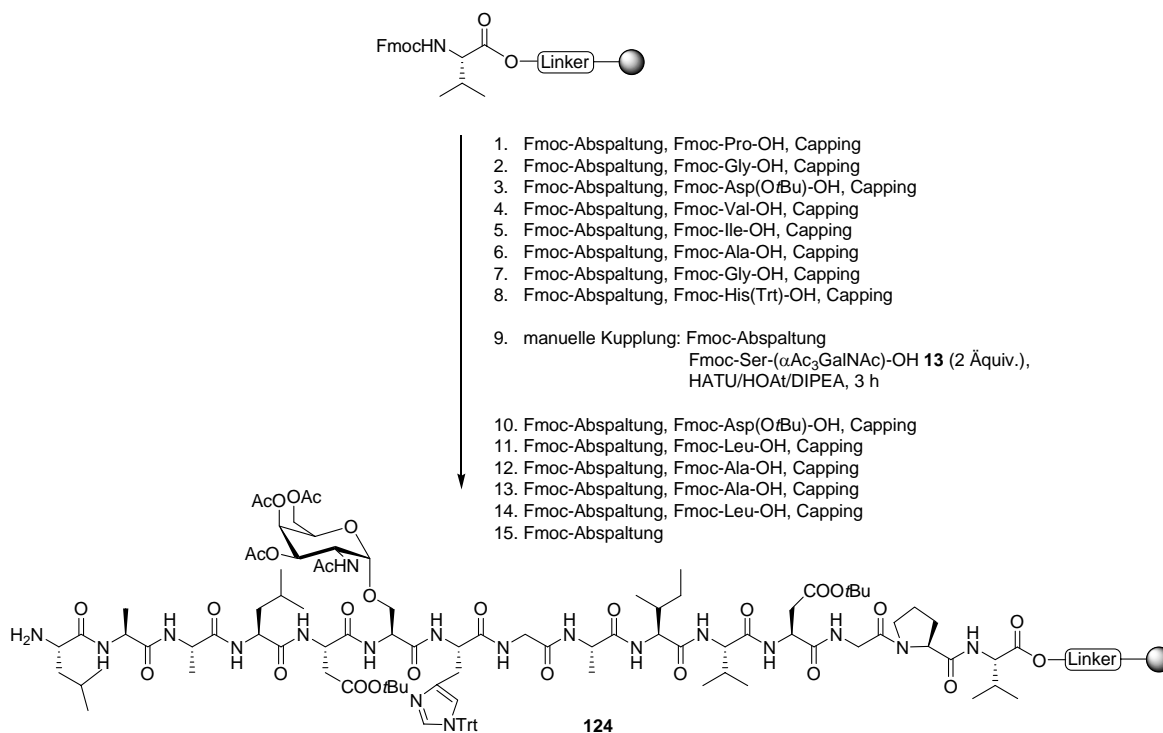


Abb. 3.81 Synthese des immobilisierten Glycopenadecapeptids **124**

Das so erhaltene festphasengebundene Glycopenadecapeptid **124** wird mit Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten, wobei gleichzeitig die Deblockierung der Seitenkettenfunktionen erfolgt. Nachdem die Bildung des gewünschte Produkts massenspektrometrisch bestätigt wurde, erfolgt die Deacetylierung des Kohlenhydrates unter Zemplén Bedingungen³⁷ bei pH 8.5-9.0 (Abb. 3.82). Die Reinigung des Glycopeptids ist auch in diesem Fall nicht möglich, weil auch das T_N-Antigen-Glycopeptid nicht

genügend löslich ist. Zurückgeführt werden kann dies vermutlich auf die grosse Anzahl an hydrophoben Aminosäuren.

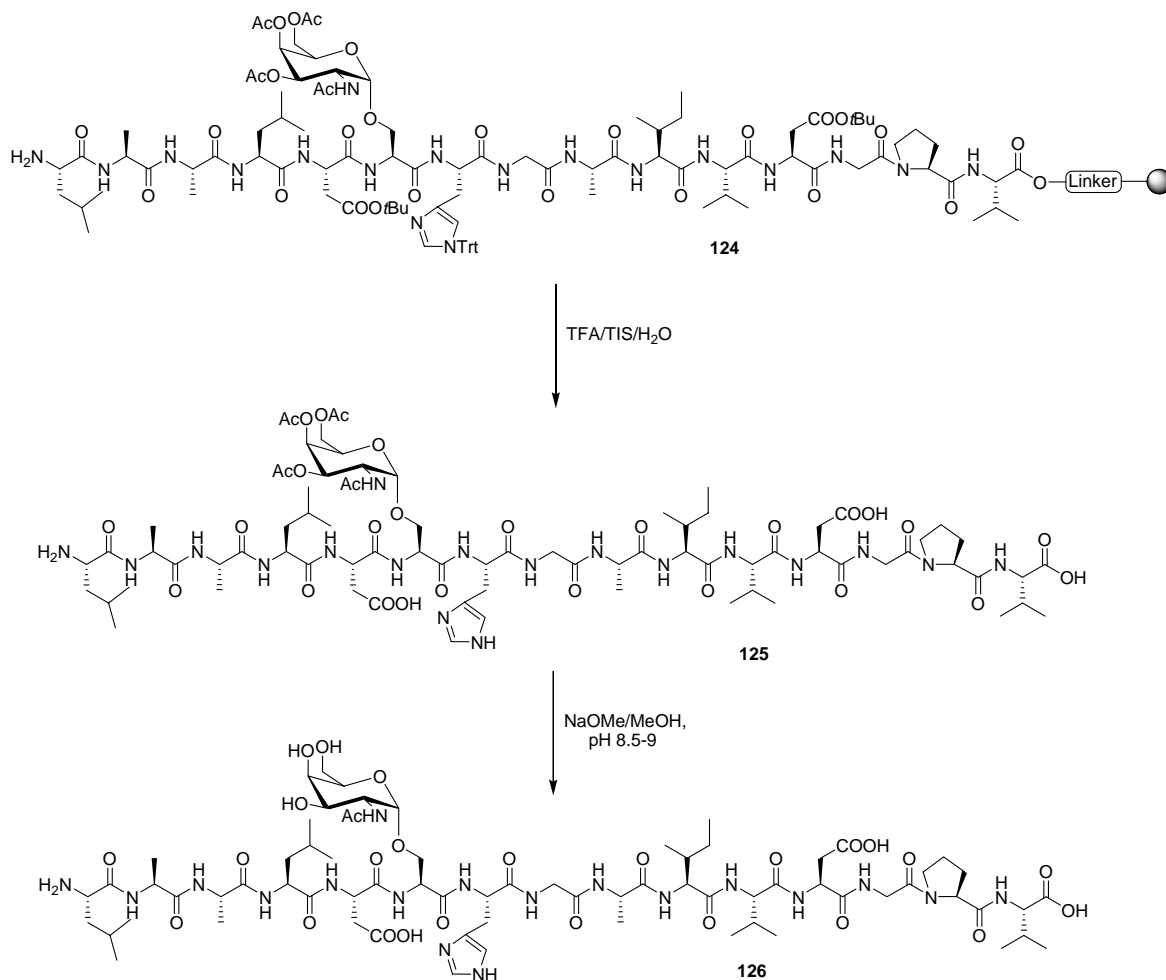


Abb. 3.82 Darstellung des vollständig deblockierten Glycopeptids **126**

Da durch die Einführung eines Monosaccharids nicht die gewünschte Erhöhung der Löslichkeit erreicht werden konnte, soll das folgende Glycopeptid mit dem Disaccharid T-Antigen **20** versehen und außerdem der C-Terminus um vier Aminosäuren zum Glycopeptids **127** verkürzt werden.

Ausgehend von Tentagel-PHB-Val-Harz und 20 Äquivalenten der Aminosäuren wird der unglycosylierte Teil des Peptids nach dem allgemeinen Festphasenprotokoll aufgebaut. Die glycosylierte Komponente Fmoc-Ser(β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α -Ac₂GalNAc)-OH **20** wird in vierfachem Überschuss eingesetzt und durch Zusatz von HATU/HOAt und Hünigs-Base an der entsprechenden Stelle in das Glycopeptid **128** eingebaut (Abb. 3.83).

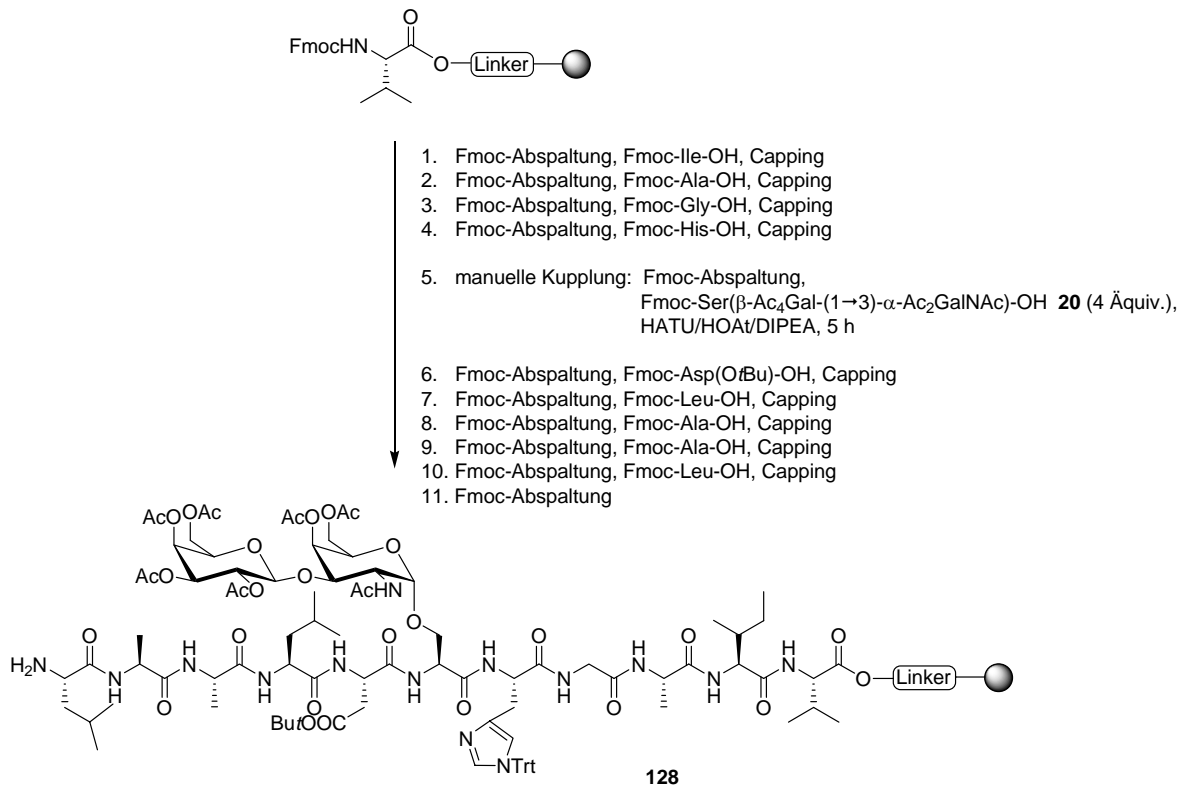
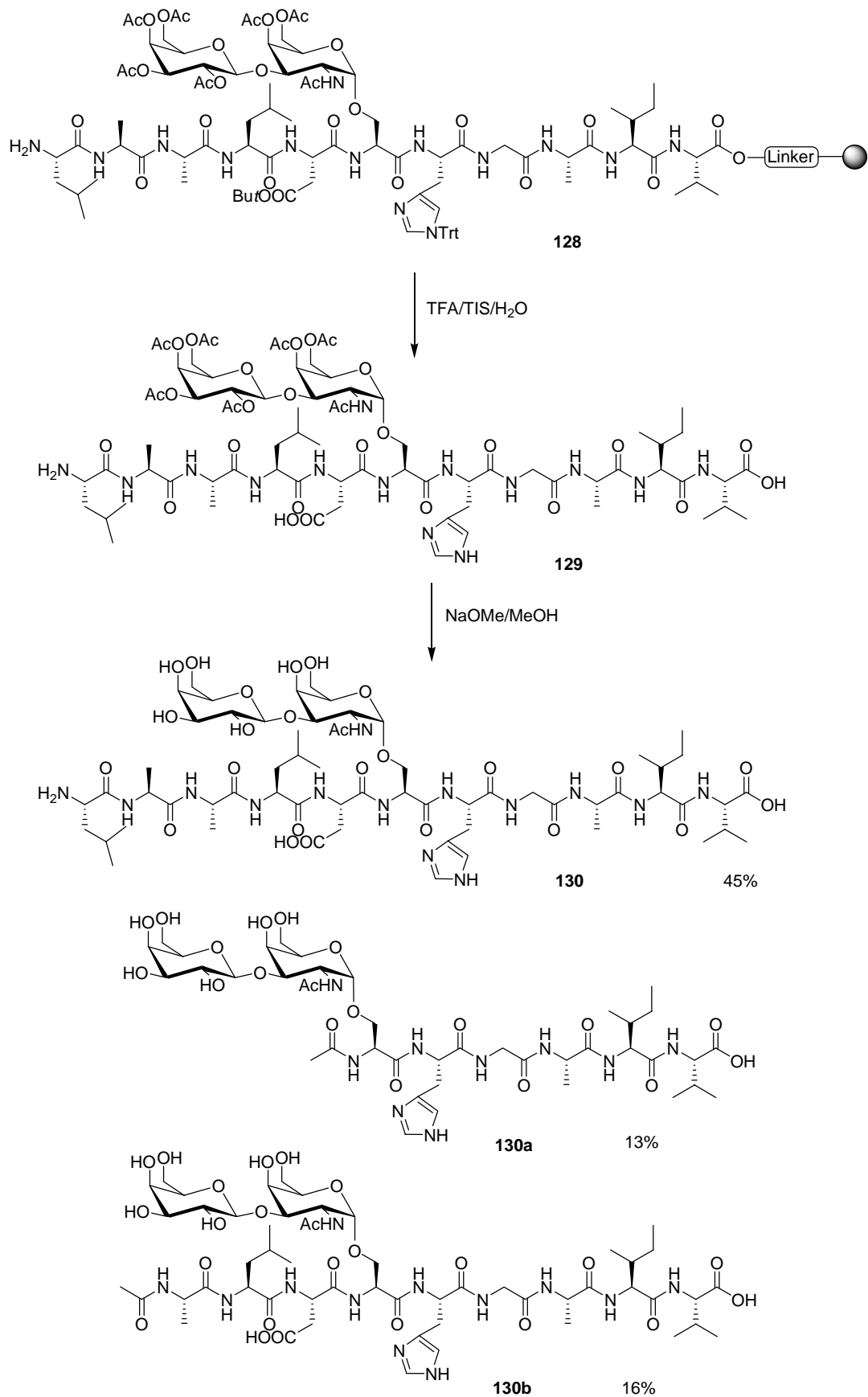


Abb. 3.83 Synthese des festphasengebundenen Glycoundecapeptids **128**

Die Abspaltung des Glycoundecapeptids **128** sowie die Deblockierung der Seitenketten erfolgt durch Behandlung mit TFA und TIS/H₂O. Durch Zugabe von kaltem Diethylether zur Reaktionslösung lässt sich das Glycopeptid **129** ausfällen. Die Acetylschutzgruppen des Saccharidrests werden unter Zemplén-Bedingungen³⁷ bei pH 9.5 entfernt. Das erhaltene Glycopeptid **130** weist eine sehr gute Wasserlöslichkeit auf. Nach der Reinigung durch präparative HPLC lassen sich neben dem Produkt **130** (45%) auch zwei glycosylierte Deletionssequenzen **130a** (13%) und **130b** (16%) isolieren (Abb. 3.84).

Abb. 3.84 Deblockierung zu den Glycopeptiden **130**, **130a**, **130b**

Von diesem positiven Ergebnis angespornt, sollte ein weiteres Glycopeptid synthetisiert werden, welches einen verlängerten C- und N-Terminus aufweist. Es wird versucht, die gute Wasserlöslichkeit durch Einbau des Trisaccharids 2→6-Sialyl-T **34** aufrecht zu erhalten. Dem für die vorhergehende Sequenz ausgearbeiteten Syntheseprotokoll folgend wird das Glycopeptid aufgebaut. Bei der manuellen Kupplung des Fmoc-Ser(β -Ac₄Gal-(1→3)[α -NeuAc₄N5AcCOOBn-(2→6)]- α -GalNAc)-OH-Bausteins **34** werden 2.34 Äquivalente **34** und HATU/HOAt als Kupplungsreagenzien sowie DIPEA als Base eingesetzt. Das immobilisierte Glycopeptid **131** wird durch Behandlung mit Trifluoressigsäure/TIS/H₂O vom Harz abgespalten und gleichzeitig deblockiert (Abb. 3.85).

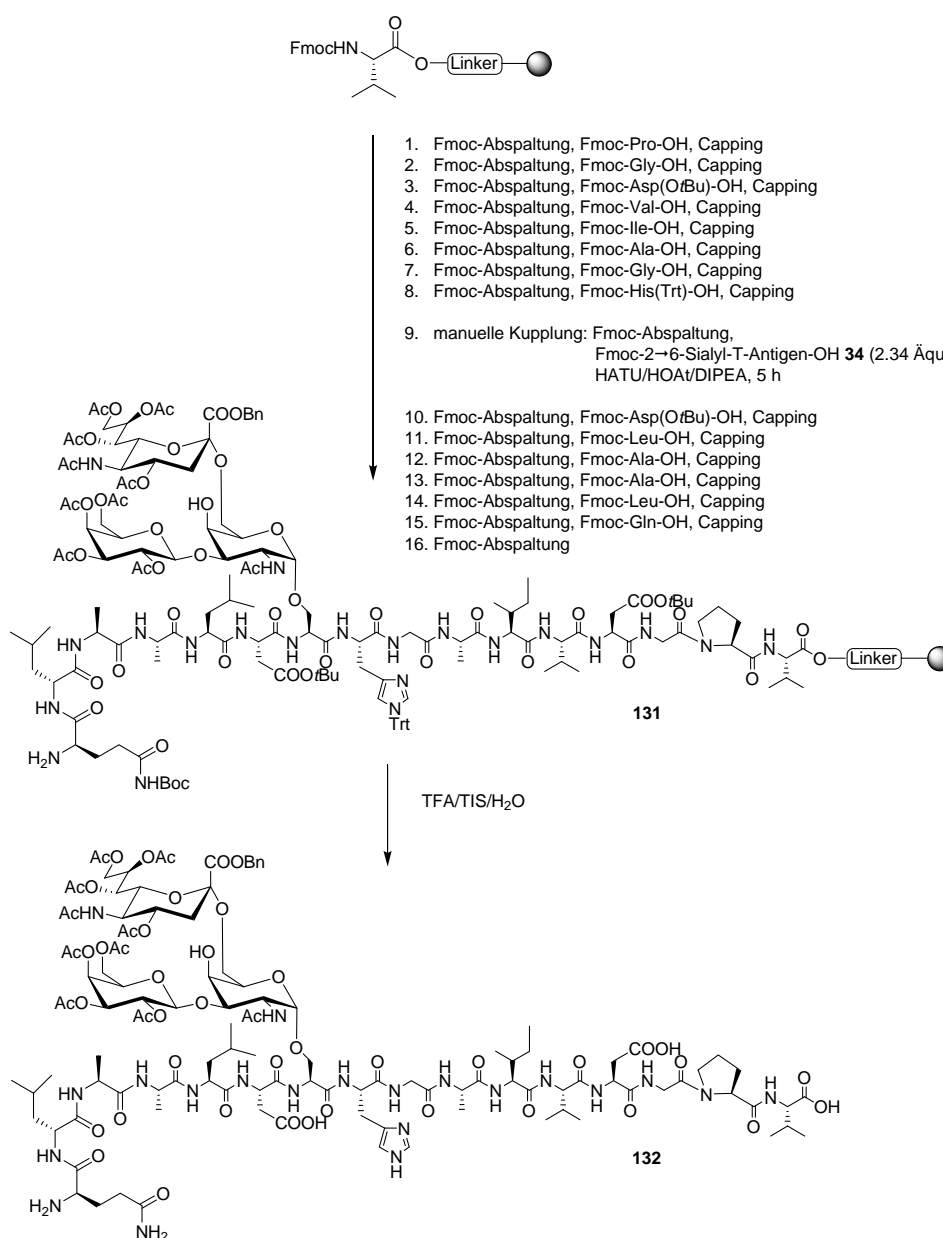


Abb. 3.85 Synthese des Glycohexadecapeptids **132**

Das Rohprodukt wird vor der weiteren Umsetzung mittels präparativer HPLC gereinigt. Anschließend wird das reine Glycohexadecapeptid **132** in Methanol unter Wasserstoffatmosphäre debenzyliert und im Anschluss unter Zemplén-Bedingungen³⁷ deacetyliert (Abb. 3.86). Nach erneuter Reinigung durch präparative HPLC erhält man das gewünschte Glycopeptid **133** in 23%iger Ausbeute.

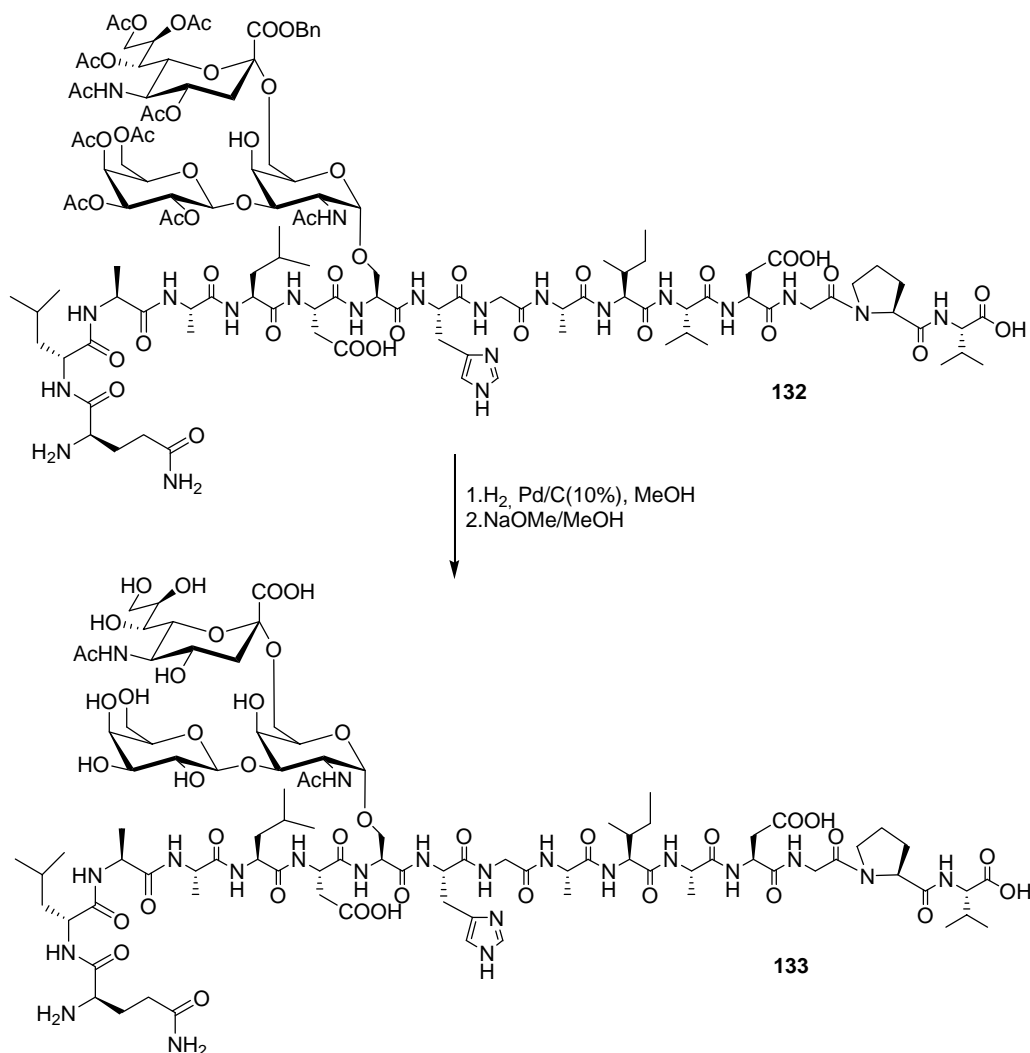


Abb. 3.86 Deblockierung zum gewünschten Glycohexadecapeptid **133**

Durch den Einbau der Trisaccharidseitenkette kann die gewünschte Wasserlöslichkeit trotz der Kettenverlängerung erreicht werden.

Aus der Reihe der synthetisierten tumorassoziierten Antigene soll nun das bedeutende 2→3-Sialyl-T **46** in die ausgewählte Sequenz eingebaut werden. Dementsprechend wird ausgehend von mit Valin beladenem Wang-Harz die Sequenz bis zum Histidin aufgebaut. Die manuelle Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgt unter den bereits bewährten Bedingungen mit HATU/HOAt und DIPEA als Base. Von *O*-Glycosyl-Serin **46** wird 1

Äquivalent in die Synthese eingebracht und 6 h lang geschüttelt (Vortex). Im Anschluss daran soll die Kupplung der restlichen Aminosäuren unter Standardbedingungen erfolgen. Zum ersten Mal während einer Synthese der ausgewählten C-terminal verlängerten Peptidsequenz des LI-Cadherins kommt es bei der Kupplung der glycosylierten Aminosäure zu einer massiven Verminderung der Ausbeute. Der an dieser Stelle erhaltene Wert betrug nur noch 40% des Wertes der vor der Kupplung erhalten wurde. Bei allen vorher synthetisierten Peptiden betrug die Abnahme des Fmoc-Piperidin-Addukts nach der manuellen Kupplung der Glycosylaminosäure nur zwischen 10 und 20%. Trotzdem wird die Synthese bis zum Ende durchgeführt und das erhaltene Produktgemisch durch Einsatz von TFA/TIS/H₂O vom Harz abgespalten. Anschließend wird es mittels analytischer HPLC und massenspektrometrisch untersucht. Es kann keine dem gewünschten Produkt entsprechende Verbindung gefunden werden. Die Hauptkomponente stellt, wie nach dem Abspaltungsprotokoll zu befürchten, die acetylierte Abbruchsequenz **135** dar (Abb. 3.87).

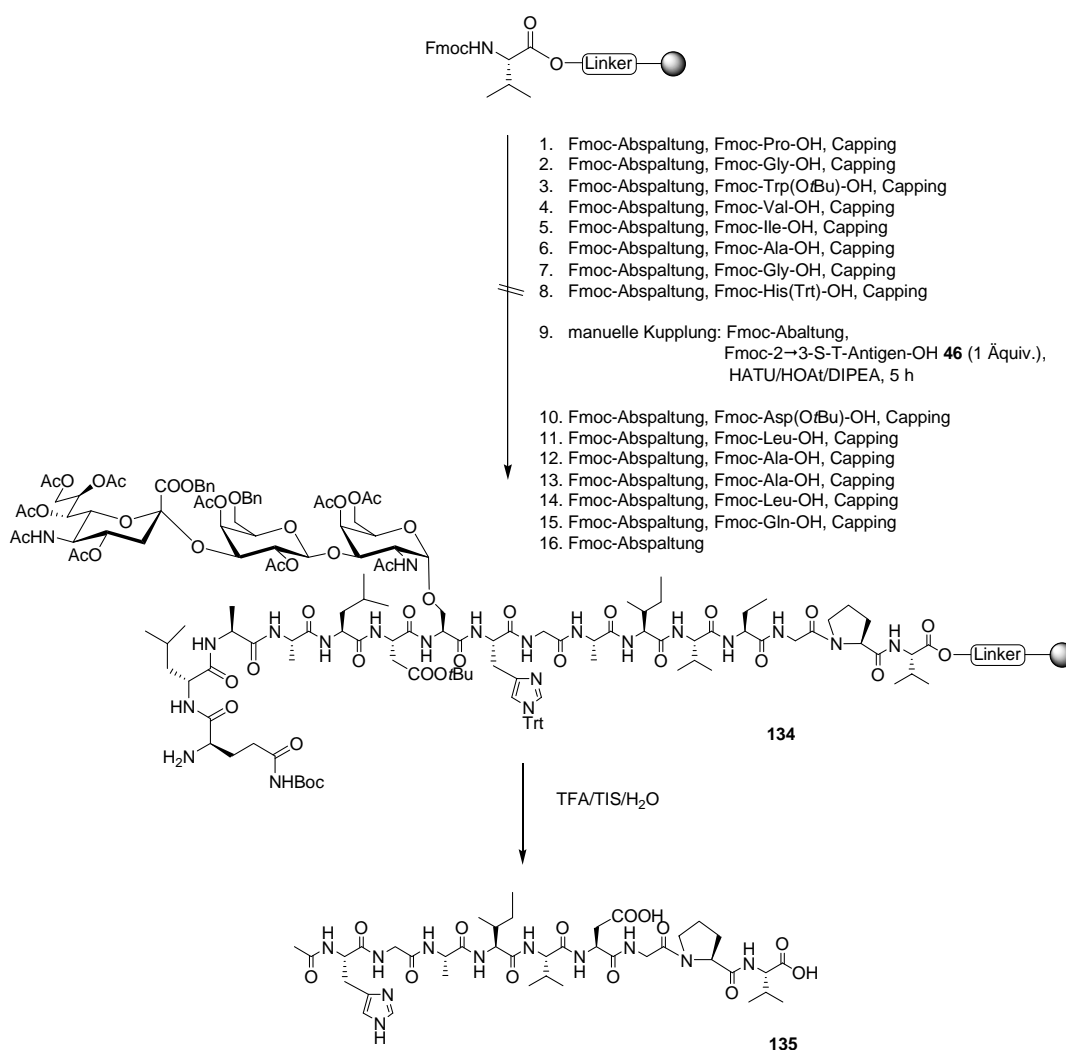


Abb. 3.87 Fehlgeschlagene Synthese des immobilisierten Glycopeptids

Warum die Kupplung des Sialyl-T-Serins **46** fehl schlug kann nicht erklärt werden. Sowohl der sterische Anspruch des Bausteins als auch eine Rückfaltung des Peptids am Harz sollten nicht ausschlaggebend sein, da der verzweigte 2→6-Sialyl-T-Baustein **34** in gleicher Weise bei der erfolgreichen Synthese von Glycopeptid **133** eingesetzt wurde.

3.6.4 Synthese von dansylierten Glycopeptiden

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben sollten, sowohl LI-Cadherin-Peptide als auch LI-Cadherin-Glycopeptide mit chromophoren Gruppen ausgestattet werden. Nach der erfolgreichen Synthese und Reinigung soll versucht werden, durch FRET-Spektroskopie eine Aussage über die jeweilige Konformation zu treffen. Im Idealfall besteht der Vorteil der Methode in einer schnell und einfach zu treffenden Aussage über die vorliegende Konformation. Die aufwendigen NOE-Messungen könnte man so umgehen. Um die Kupplungseffizienz des dargestellten Bausteins **49** im Rahmen der Festphasenpeptidsynthese zu testen, wird eine Testsequenz synthetisiert, die dem *N*-Terminus der Sequenz des ausgewählten Peptidabschnitts entspricht. Ausgehend von dem in Kapitel 3.5 dargestellten Fmoc-Trp(Boc)-PTMSEL-Tentagel-Harz **120** wird nach dem allgemeinen Festphasenprotokoll das geschützte Pentapeptid synthetisiert. In Abwandlung zum allgemeinen Vorgehen kommen von der mit dem Chromophor markierten *N*-terminalen Aminosäure nur 4.1 Äquivalente zum Einsatz. Die Abspaltung des markierten Peptids erfolgt nach den für den PTMSEL-Linker ausgearbeiteten Standardbedingungen (Abb. 3.88).

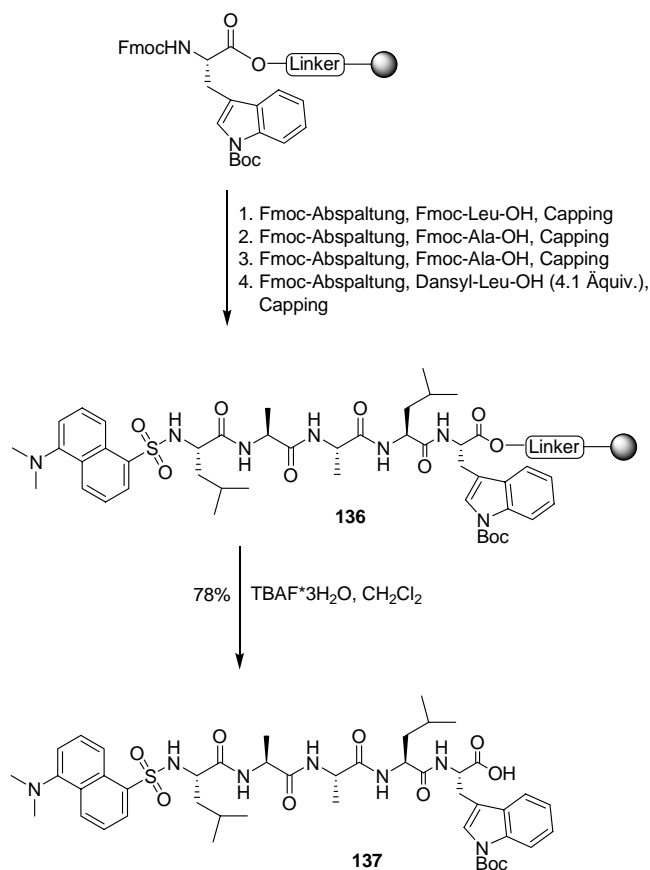


Abb. 3.88 Synthese des mit Chromophoren markierten Pentapeptids **137**

Das gewünschte Pentapeptid wird in leicht durch TBAF verunreinigter Form in 78%iger Ausbeute isoliert. Obwohl sich die Löslichkeit des unmarkierten Peptids **123** schon als problematisch erwiesen hat, soll im nächsten Schritt ein mit dem FRET-Paar Dansyl/Tryptophan markiertes Glycoundecapeptid **141** synthetisiert werden. Als glycosylierte Komponente wird Fmoc-Ser-(α -Ac₃GalNAc)-OH **13** eingesetzt.

Die Synthese wird ausgehend von Fmoc-Trp(Boc)-PTMSEL-Tentagel-Harz **120** bis zur Kupplung des T_N-Antigen-Serins **13** nach dem allgemeinen Festphasenprotokoll durchgeführt. Die Kupplung der glycosylierten Komponente erfolgt unter Verwendung der reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt mit 1.5 Äquivalenten der benötigten Komponente (Abb. 3.89).

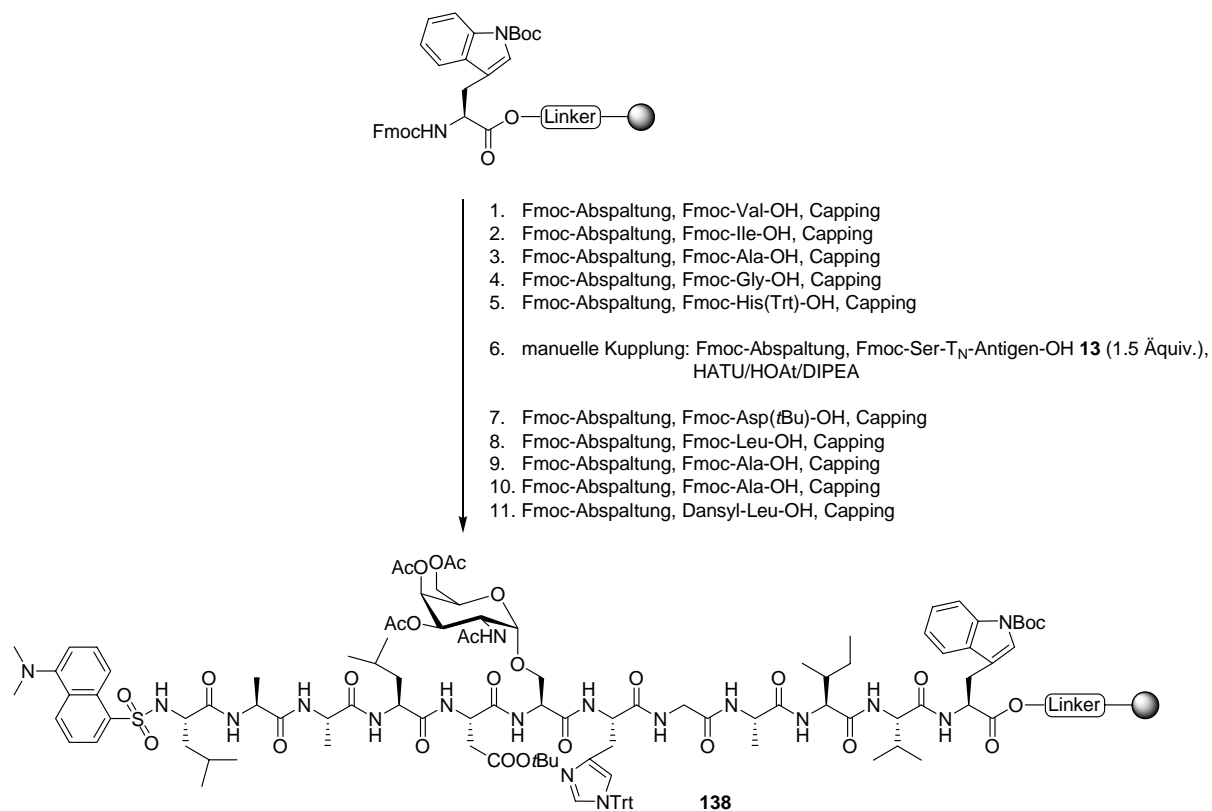


Abb. 3.89 Synthese des immobilisierten Glycopeptids **138**

Die Abspaltung des Peptids **138** vom polymeren Träger erfolgt mit TBAF*3H₂O in CH₂Cl₂ (Abb. 3.90).

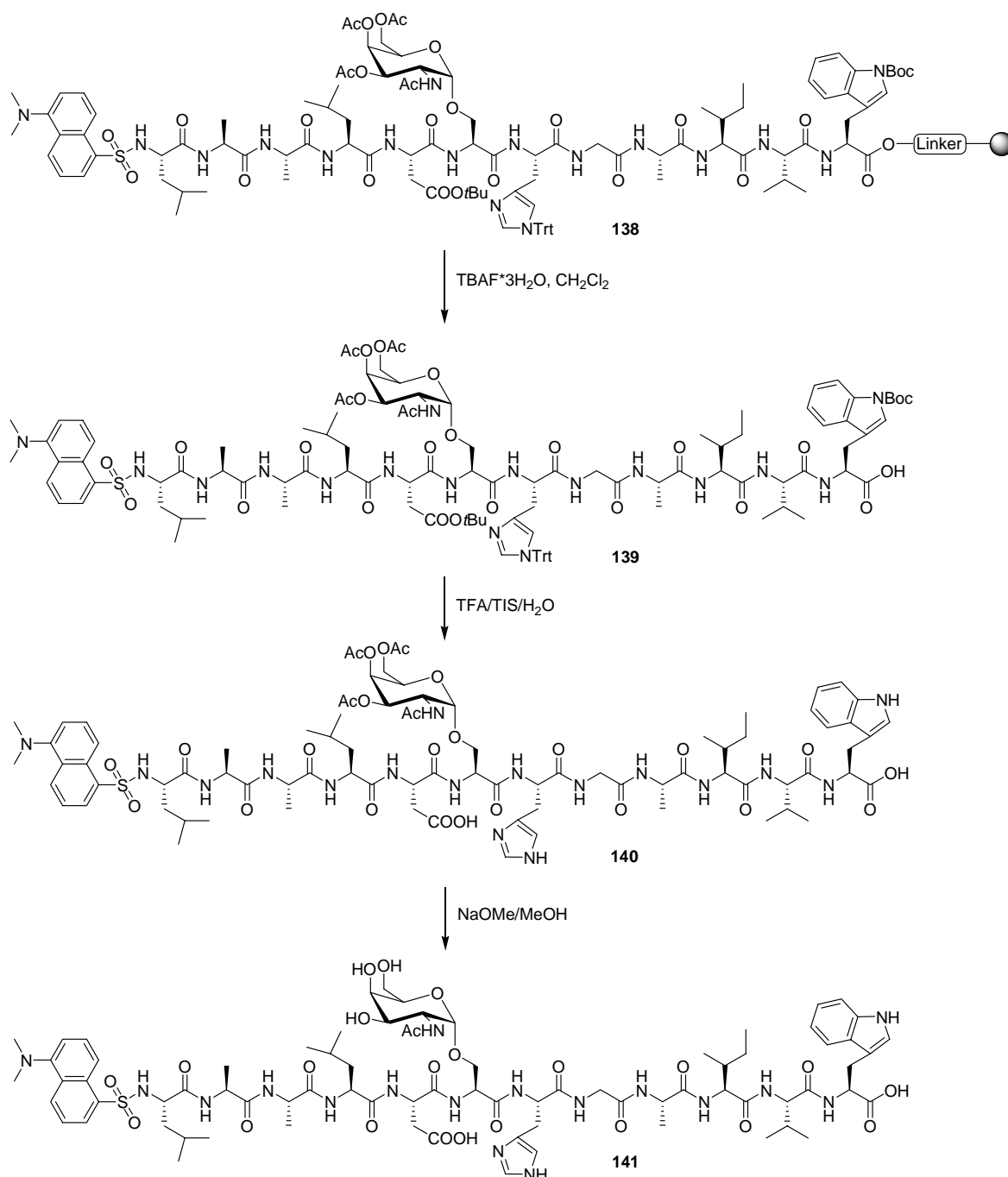


Abb. 3.90 Synthese des farbstoffmarkierten Glycododecapeptids **141**

Die Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen werden in TFA mit H₂O/TIS als Kationenscavenger abgespalten. Anschließend werden die Acetylschutzgruppen mit NaOMe/MeOH unter Zemplén-Bedingungen³⁷ bei pH 9.0 entfernt. Wie vor der Synthese vermutet, ist die Löslichkeit des Produkts auf DMF und DMSO beschränkt, was die Reinigung mittels präparativer HPLC verhindert. Die Charakterisierung kann jedoch auf der jeweiligen Stufe vorgenommen werden, da es sich bei der Hauptverunreinigung um

TBAF handelt. Da sich die vermuteten Löslichkeitseigenschaften des Produkts **141** als richtig erwiesen haben, sollen in der nächsten Synthese die löslichkeitsvermittelnden Eigenschaften der Saccharidseitenkette durch Einbau des Disaccharids T-Antigen **20** erhöht werden. Das mit den FRET-Chromophoren markierte Glycopeptid **144** wird ausgehend von 0.05 mmol Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Harz nach dem allgemeinen Festphasenprotokoll synthetisiert, wobei jeweils 20 Äquivalente der Aminosäure eingesetzt werden. Die Kupplung des Glycosylserins **20** wird mit HATU/HOAt und 4.9 Äquivalenten **20** durchgeführt (Abb. 3.91).

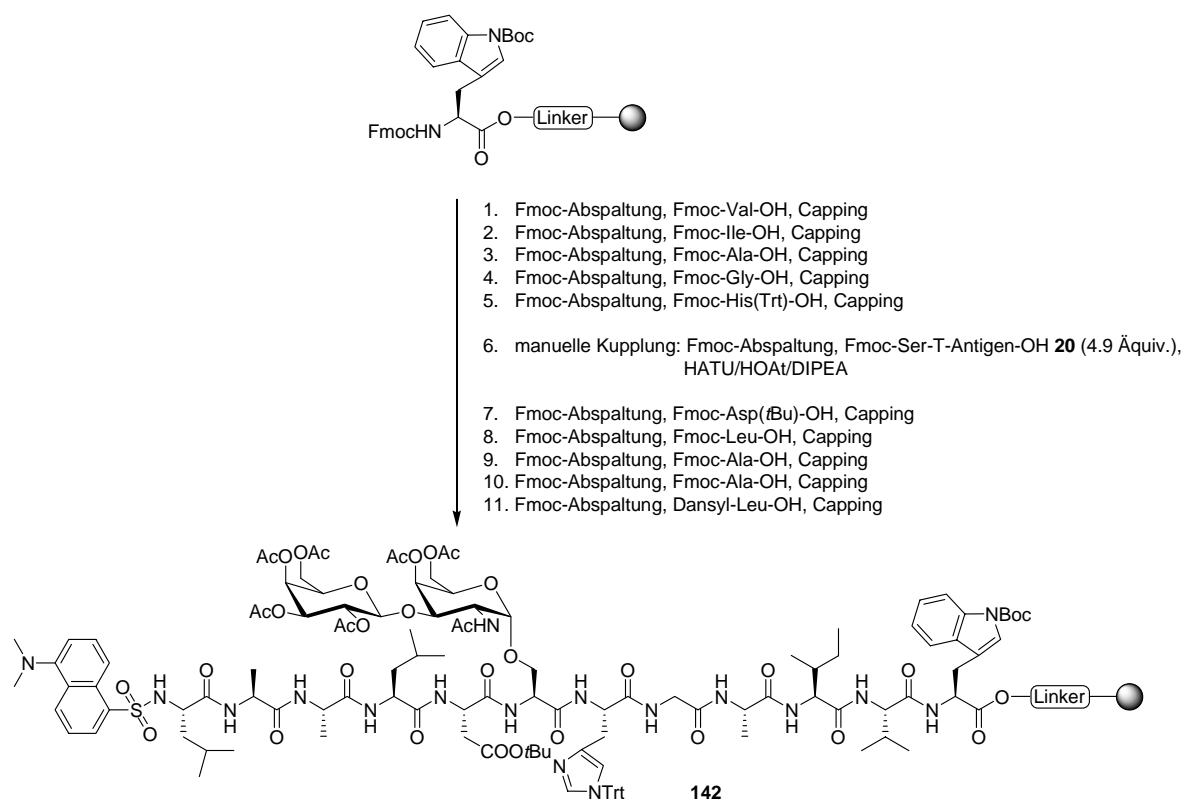
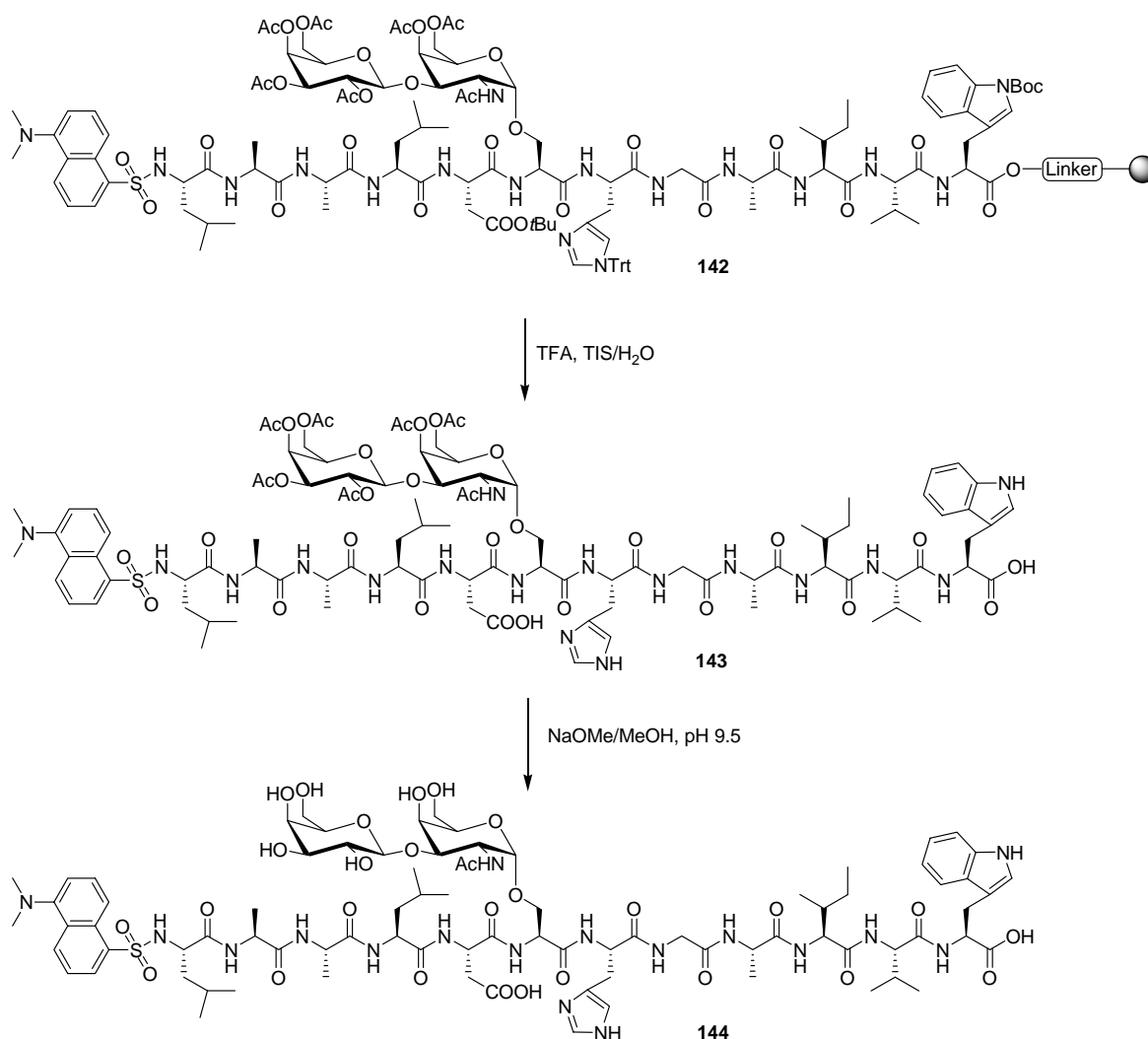


Abb. 3.91 Synthese des immobilisierten Glycopeptids **142**

Anstelle des PTMSEL-Linkers wird nun ein mit dem säurelabilen PHB-Linker funktionalisiertes Wang-Harz verwendet. Dadurch kann vermieden werden, dass es beim Ausschütteln des Peptids mit Wasser zu Löslichkeitsproblemen durch das Reagenz TBAF kommt. Zur Abspaltung dient TFA. In der Regel weisen ungeschützte Peptide bessere Löslichkeitseigenschaften auf als geschützte. Außerdem stellt TFA ein günstigeres Lösungsmittel dar. Die Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Deblockierung erfolgt durch TFA mit TIS/H₂O als Kationenscavenger. Die Umesterung der Acetylenschutzgruppen unter Zemplén-Bedingungen wird bei pH 9.5 durchgeführt (Abb. 3.92).

Abb. 3.92 Synthese des Glycopeptids **144**

Trotz Einbau des Disaccharids Ser-T-Antigen **20** kann die Löslichkeit nicht wesentlich verbessert werden. Damit ist die Reinigung nicht möglich. Die Charakterisierung des Glycopeptids **144** erfolgt massenspektrometrisch. In einem weiteren Versuch soll die nötige Löslichkeit durch einen mit einem Tetraethylglycolspacer versehenen Dansyl-(Glycol)₄-Leu-OH Baustein **60** sowie durch den Einbau des mit Sialinsäure funktionalisierte Disaccharid (2→6)-Sialyl-T_N-Antigen **32** erreicht werden. Dabei sollen neben den Hydroxyfunktionen sowohl die Säuregruppe der Sialinsäure als auch der Tetraethylglycolspacer löslichkeitsvermittelnd wirken. Dementsprechend wird die gleiche Aminosäuresequenz mit dem (2→6)-Sialyl-T_N-Antigen **32** als Seitenkette und Dansyl-(Glycol)₄-Leu-OH **60** als *N*-terminalen Chromophor synthetisiert. Man geht erneut von 0.05 mmol Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Harz, jeweils 20 Äquivalenten Aminosäure, 1.1 Äquivalenten Glycosylaminosäure **32** und 8 Äquivalenten des *N*-terminal markierten Leucin-Derivats **60** aus (Abb. 3.93).

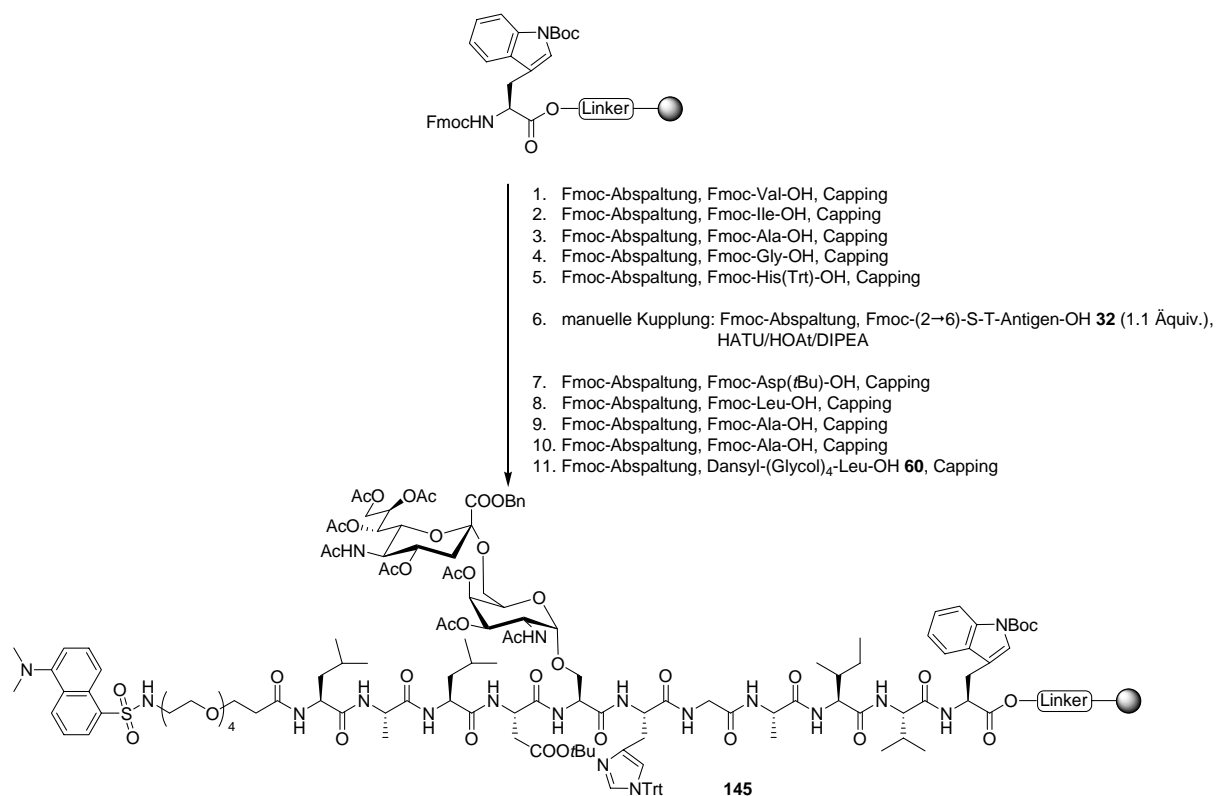


Abb. 3.93 Synthese des glycosylierten Glycopeptids **145**

Aufgrund des geringen Überschuss der Sialyl-T-Serin-Komponente wird die Kupplungsdauer an dieser Stelle auf 6 h ausgedehnt. Die sich anschließenden Kupplungen der weiteren Aminosäuren werden mit jeweils 20 Äquivalenten nach dem allgemeinen Festphasenprotokoll durchgeführt. An die Abspaltung vom Harz durch TFA/TIS/H₂O schließt sich die hydrogenolytische Entfernung des Benzylesters in Methanol, gefolgt von der Umesterung unter Zemplén-Bedingungen bei pH 9.0-9.5 an (Abb. 3.94). Die Löslichkeit des dargestellten Produkts erweist sich als wesentlich besser im Vergleich zu den zuvor synthetisierten Sequenzen. Allerdings ist das Produkt immer noch unlöslich in Wasser. Der Versuch, das Produkt mittels präparativer HPLC zu reinigen, schlägt fehl. Nach der vollständigen Entfernung der Lösungsmittel lässt sich nur ein Bruchteil des synthetisierten Produkts zurückgewinnen, so dass eine Charakterisierung nur massenspektrometrisch vorgenommen werden kann.

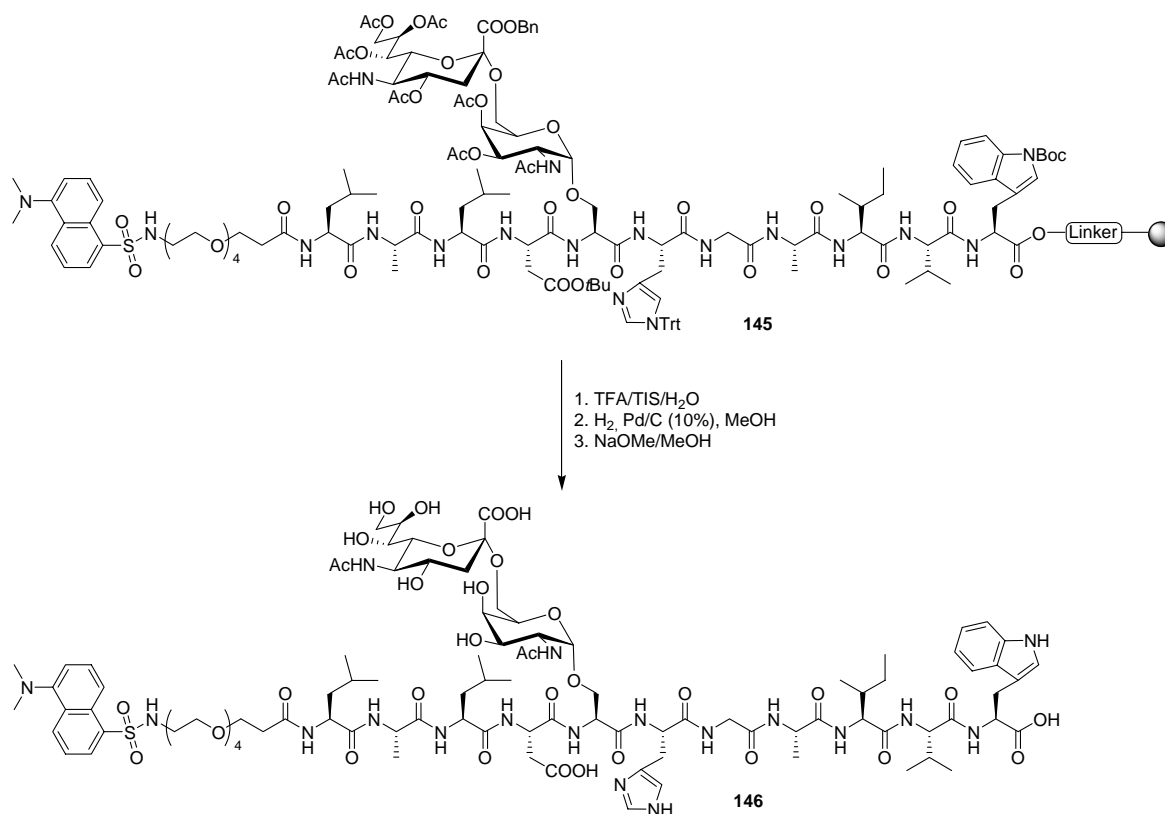


Abb. 3.94 Deblockierung des Glycopeptids **146**

Die Synthesen von Glycopeptiden mit den FRET-Chromophoren Dansyl/Tryptophan wurden an dieser Stelle aufgegeben und stattdessen Synthesen von Glycopeptiden mit dem Cumarin-Derivat **78** und Tryptophan als Chromophore durchgeführt.

3.6.5 Synthese von Glycopeptiden unter Verwendung des Cumarin

Chromophors **78**

Da sich die Löslichkeit als limitierender Faktor bei den in Kapitel 3.5.4 beschriebenen, mit Chromophoren versehenen Glycopeptiden herausgestellt hat, soll das in Kapitel 3.3 beschriebene Aminocumarinderivat **78** zur Konstruktion von Glycopeptiden eingesetzt werden. Es enthält D-Chinasäure als löslichkeitsvermittelndes Strukturelement. Es wird ein Produkt mit der gleichen Sequenz wie im Glycopeptid **145** als Zielsubstanz gewählt. Anstelle des dansylierten Bausteins **60** kommt Baustein **78** und statt des Sialyl-T_N-Serin wird das T-Antigen-Serin in die Zielverbindung eingebaut. Die jeweiligen Aminosäuren werden in 15.47 Äquivalenten, der glycosylierte Baustein in 2.47 Äquivalenten und Ac₄Chi-Gly-Aca-Leu-OH **78** in 2 Äquivalenten eingesetzt. Bei den manuellen Kupplungen

finden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt und DIPEA als Base Anwendung. Als polymeres Trägermaterial kommen 0.065 mmol mit Fmoc-Trp(Boc) beladenes Tentagel zum Einsatz (Abb. 3.95).

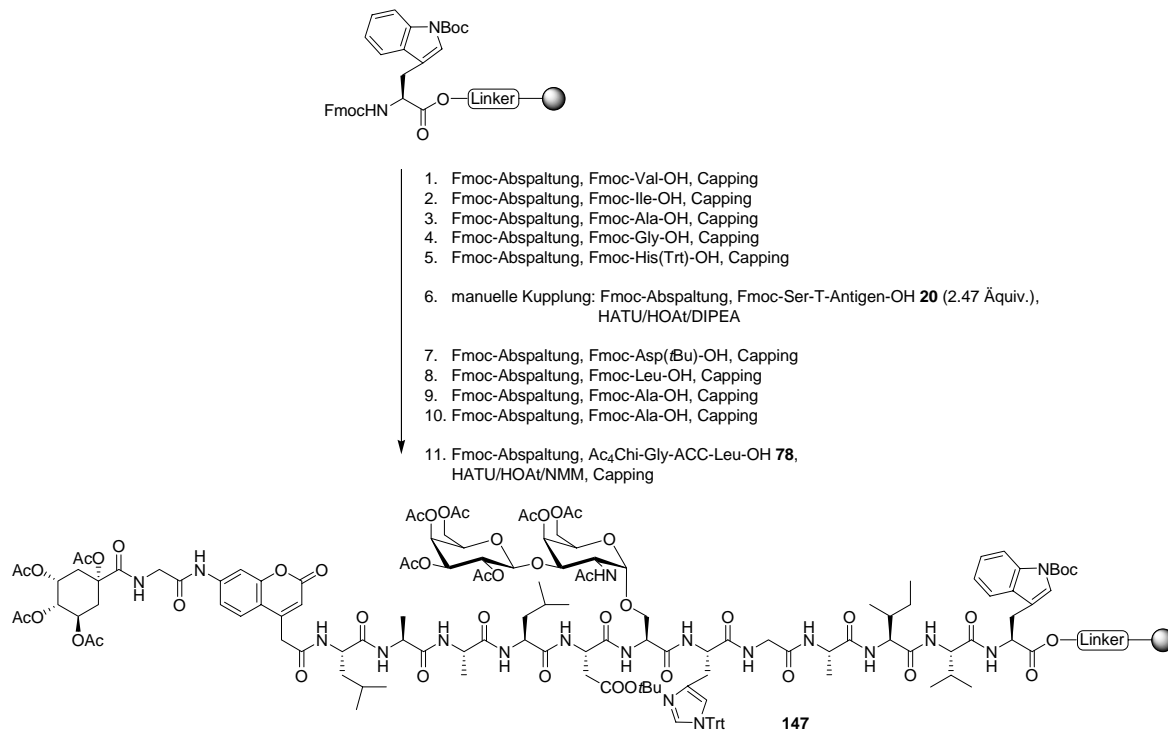


Abb. 3.95 Darstellung des immobilisierten Glycopeptids **147**

Die Abspaltung des Produkts vom Harz unter gleichzeitiger Deblockierung der Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren erfolgt mit TFA/TIS/H₂O. Anschließend fällt man das Peptid durch Zugabe von Diethylether aus, löst es in Methanol auf und deacetyliert unter Zemplén-Bedingungen³⁷ bei pH 9.5 (Abb. 3.96). Obwohl der Baustein **78** wasserlöslich ist, scheint seine löslichkeitsvermittelnde Wirkung zu gering zu sein, um das Glycopeptid **148** wasserlöslich bzw. löslich in anderen Lösungsmitteln als DMF und DMSO werden zulassen. Ein Grund dafür könnte die Konformation des Peptids sein. Es wäre z.B. denkbar, dass sich ein Grossteil der Hydroxylfunktionen des Kohlenhydrats im Inneren eines Turns befindet, was die löslichkeitsvermittelnden Eigenschaften stark mindern würde. Dementsprechend ist das Produkt einer Reinigung nicht zugänglich und kann nur massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

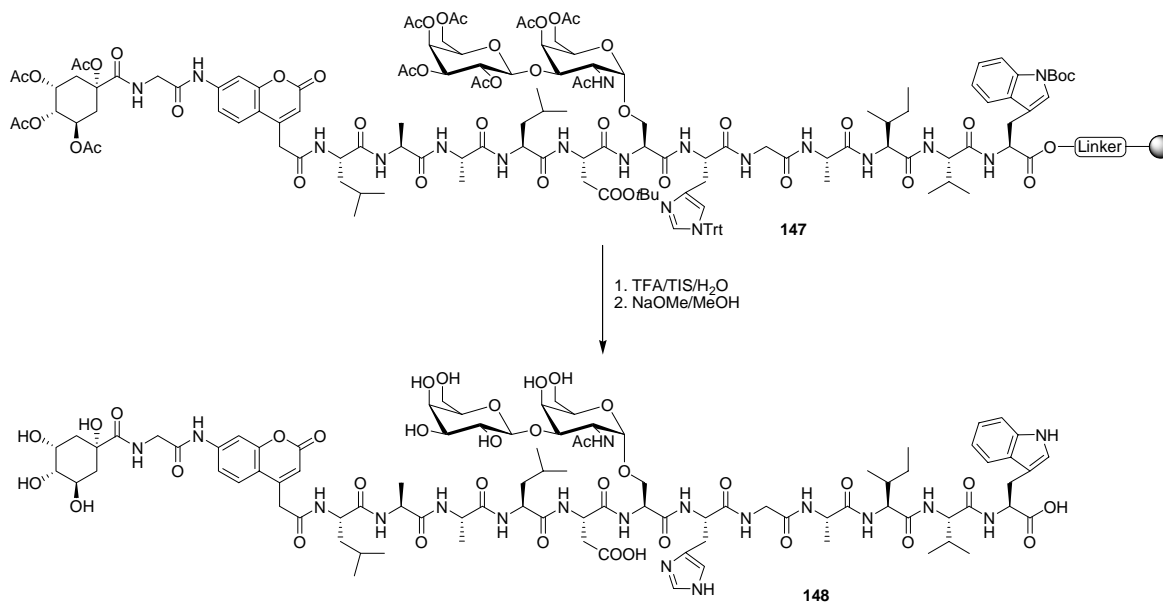
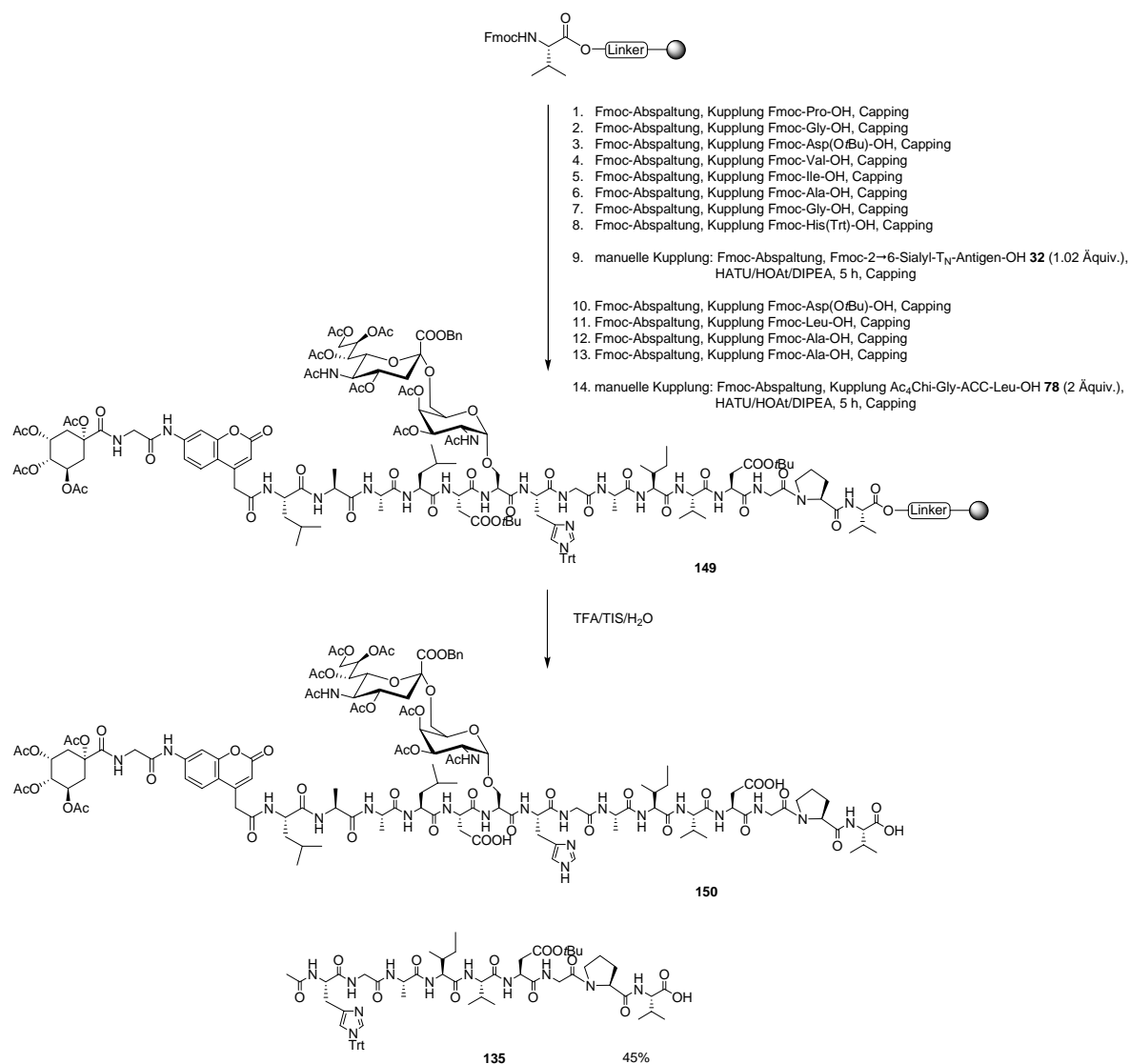
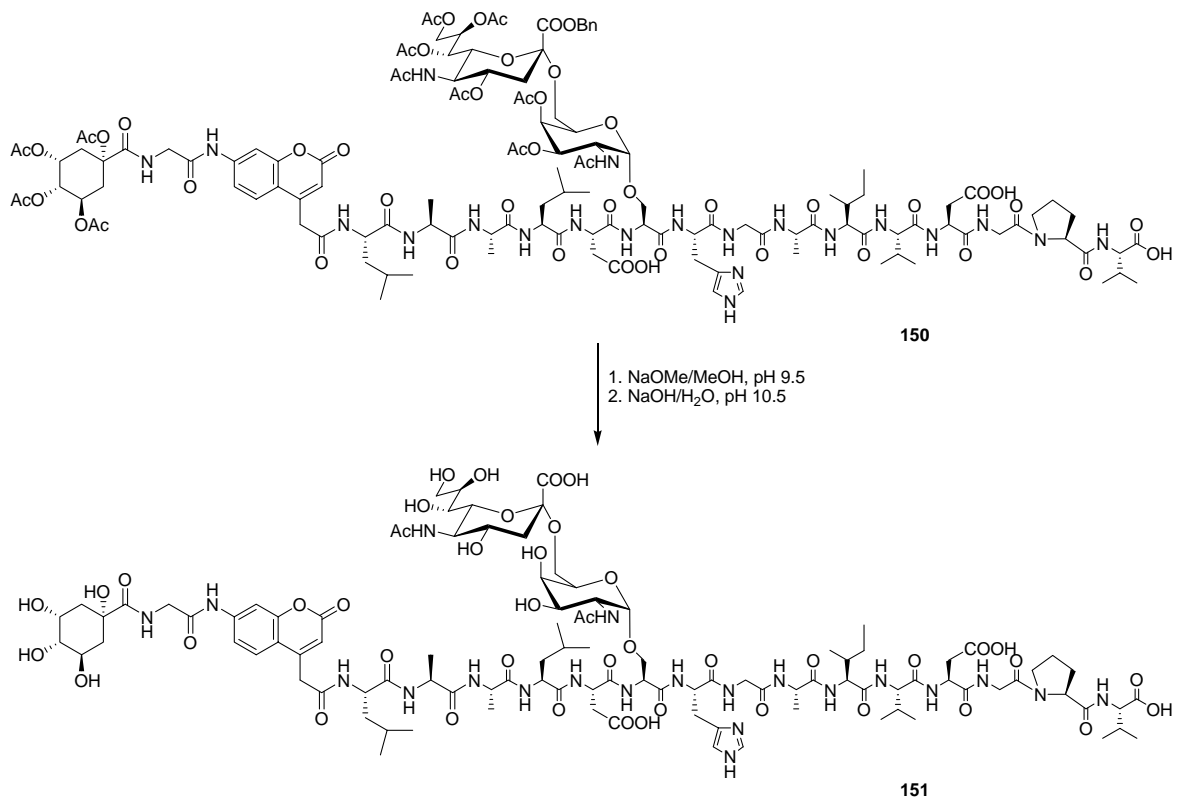


Abb. 3.96 Darstellung des freien Glycopeptids **148**

Da es nicht gelungen ist, ein Glycopeptid darzustellen, das Tryptophan als einen der FRET-Chromophoren trägt und eine gute Wasserlöslichkeit zeigt, soll nun ein Glycopeptid synthetisiert werden, das zwar das Aminocumarin-Konjugat **78**, jedoch keinen FRET-Partner enthält. Der Vorteil eines solchen Moleküls besteht in der Möglichkeit, dass es unter einem Mikroskop durch Fluoreszenz sichtbar zu machen ist. Daher könnte es in einem entsprechend angelegten Essay möglich sein, einen direkten Zusammenhang zwischen zugesetztem Modell-Glycopeptid und erzielter Wirkung zu erhalten. Man wäre so in der Lage, Moleküle, die mit dem zugesetzten Molekül wechselwirken, von solchen, die nicht in Wechselwirkung getreten sind, sehr leicht zu unterscheiden. Als Zielverbindung wird ein Teil der homophilen Erkennungsregion des murinen LI-Cadherins gewählt. Bei der in die Synthese eingesetzten glycosylierten Aminosäure handelt es sich um Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α -Ac₂GalNAc)-OH **32** (1.02 Äquivalente). Sowohl diese als auch die manuelle Kupplung des Ac₄Chi-Gly-Aca-Leu-OH-Derivats **78** (2 Äquivalente) wird mit HATU/HOAt als Kupplungsreagenzien und DIPEA als Base durchgeführt. Als polymerer Träger werden 0.05 mmol Fmoc-Val-Tentagel-PHB-Harz verwendet. Genau wie bei früheren Synthesen, werden 20 Äquivalente der jeweiligen Aminosäuren eingesetzt. Die Abspaltung des Glycopeptids erfolgt durch Zugabe von TFA/TIS/H₂O. Das erhaltene Produktgemisch wird durch präparative HPLC gereinigt. Die isolierten Produkte werden teilweise weiterverarbeitet (Abb. 3.97).

Abb. 3.97 Synthese der Glycopeptide **150**

Da sowohl die Kupplung der Glycosylaminosäure als auch der Chromophor-Carbonsäure jeweils nur mit mäßigen Ausbeuten verlaufen, wird das geschützte Glycopeptid nur in 10%iger Ausbeute isoliert. Die hydrogenolytische Spaltung des Esters kommt nicht in Frage, da dann ebenfalls die Doppelbindung des *N*-terminalen Chromophors hydriert werden würde (Abb. 3.98). Glycopeptid **150** wird zuerst mit NaOMe in Methanol unter Zemplén-Bedingungen deacetyliert, bevor man es in Wasser suspendiert und die Suspension mit 0.1N NaOH auf pH 10.5 einstellt. Basischer darf die Lösung nicht werden, da oberhalb eines pH-Wertes von 11.5 nicht nur der Benzylester, sondern auch die *O*-Glycosyl-Serin-Bindung durch β -Eliminierung gespalten wird.

Abb. 3.98 Deblockierung zum Glycopeptid **151**

Das mit einem Chromophor markierten Glycopeptid **151** kann in einer Ausbeute von 4% nach präparativer HPLC isoliert werden.

3.7 NMR-Untersuchung zur räumlichen Struktur des Glycopeptids 127

Aufgrund der großen Anzahl an Freiheitsgraden kann das peptidische Rückgrat nahezu unendliche viele Konformationen ausbilden. Häufig stellt man bei der Untersuchung von Proteinen jedoch fest, dass sich ein Grossteil der Peptidsequenzen in einer energetisch begünstigten Vorzugskonformation anordnet und verweilt. Es gibt drei hauptsächlich anzutreffende Strukturelemente: β -Faltblätter, β -turn-Strukturen und α -Helices (Abb. 3.99). Von einem β -Faltblatt spricht man im Fall der parallelen oder antiparallelen Anordnung der Peptidseitenketten ober- und unterhalb eines Faltblatts. β -Turn-Strukturen werden durch eine Richtungsänderung um 180° innerhalb von vier aufeinanderfolgenden Aminosäuren charakterisiert. Stabilisiert wird eine β -turn-Struktur häufig durch eine Wasserstoffbrücke zwischen der ersten und vierten Aminosäure. Begünstigt wird die Ausbildung eines β -Turns häufig durch Glycin- und Prolinreste (cis-Form), da diese innerhalb der Wendung die Ausbildung enger Kehren begünstigt. Bilden 13 Atome durch intramolekulare Wasserstoffbrücken einen Ring, wobei die Seitenketten des helicalen Rückgrats nach außen weisen, dann bezeichnet man diesen Konformationstyp als α -Helix. Aminosäuren, die keine Seitenketten tragen oder cyclisch sind (Glycin, Prolin, Hydroxyprolin), wirken als Helixbrecher.

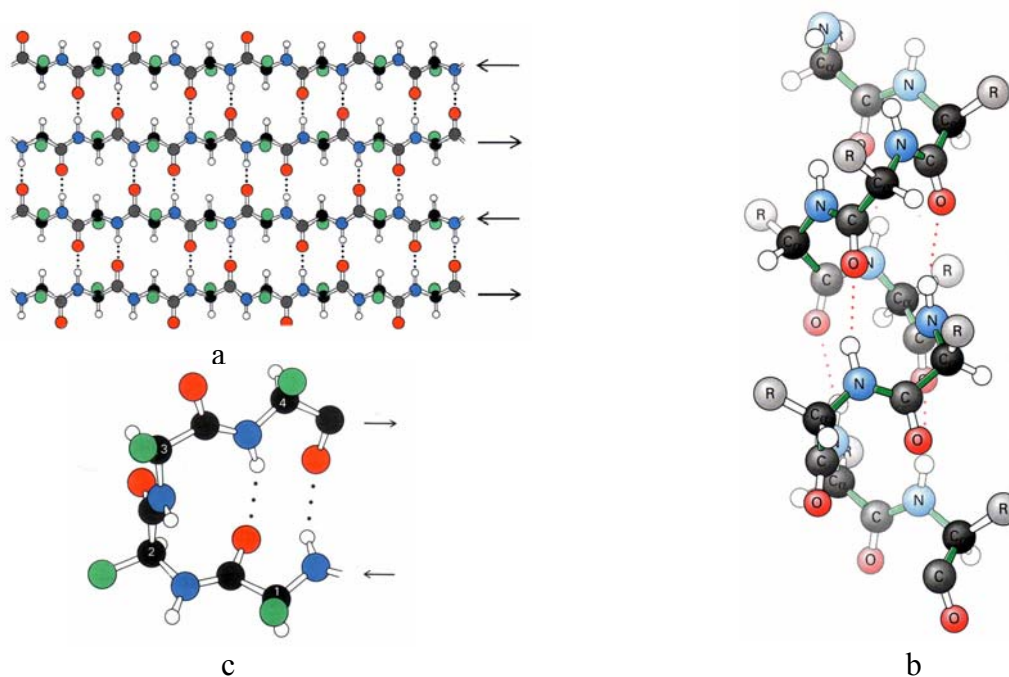


Abb. 3.99 a: antiparalleles β -Faltblatt, b: α -Helix, c: β -turn

Die verschiedenen Sekundärstrukturelemente der Peptide lassen sich durch charakteristische Eigenschaften, die mittels hochaufgelöster NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden, unterscheiden.⁹² Zur Aufklärung der räumlichen Struktur werden vornehmlich zwei Experimente eingesetzt:

- NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)
- ROESY (Rotating Frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)

In beiden Experimenten kommt es durch spezielle Pulsfolgen während der Relaxationszeit zu einem Austausch von Magnetisierung zwischen räumlich benachbarten Protonen. Dieser Austausch wird als Cross-Relaxation bezeichnet. Dementsprechend treten im zweidimensionalen Spektrum neben den Diagonalpeaks Crosspeaks auf, die auf räumlich Nähe zwischen den „kuppelnden“ Protonen schließen lassen. In einer ersten Näherung hängt die Intensität wie folgt vom Abstand ab:

$$A_{\text{NOE}} \text{ bzw. } A_{\text{ROE}} \sim (r_{ij})^{-6}$$

Der durch Crosspeaks noch sichtbare Abstand liegt in kleineren Peptiden und Glycopeptiden bei 3.5 bis 4 Å. Beide Experimente haben Vor- und Nachteile, auf die an dieser Stelle jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

Axel Kuhn⁹³ hat als Erster die räumliche Struktur von synthetisch hergestellten Peptiden und Glycopeptiden aus der „homophilen Erkennungsregion“ des LI-Cadherins der Ratte NMR-Spektroskopisch untersucht. Dabei kam er zu dem Ergebnis, dass sich die synthetisierten Strukturen zwar teilweise nicht eindeutig dem β -Turn-Motiv zuweisen lassen, aber alle zumindest eine gewisse turnartige Konformation aufweisen. Beeinflusst werden diese durch die Wahl des an Serin gebundenen Saccharids.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll das bereits in der Diplomarbeit⁶⁰ synthetisierte Glycoundecapeptid **127** NMR-Spektroskopisch untersucht werden.

Eine Voraussetzung für die Identifizierung von Sekundärstrukturelementen ist die eindeutige Interpretation der Protonen- und Kohlenstoffspektren der zu untersuchenden Verbindung. Als Lösungsmittel kommt DMSO zum Einsatz, da es nicht mit den Amidprotonen austauscht.

⁹² a) K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**. b) H. Kessler, S. Seip, in *Two-Dimensional NMR-Spectroscopy*, 2nd ed. (Eds.: W. R. Croasmun, R. M. Carlson), VCH, Weinheim. c) J. Rizzo, M. D. Bruch, in *NMR-Spectroscopy Techniques*, 2nd ed. (Ed.: M. D. Bruch)

⁹³ Axel Kuhn, *Dissertation*, Universität Mainz, **2005**.

Bei der Analyse können einige NH-NH-Wechselwirkungen benachbarter Aminosäuren beobachtet werden (Abb. 3.100). Den interessantesten Kontakt im amidischen Bereich stellt aber sicher der des amidischen Protons der vorletzten Aminosäure Alanin mit dem amidischen Proton des Histidins dar, denn dieser Kontakt ergibt sich trotz vier dazwischenliegender Aminosäuren. Weiterhin können einige Kontakte zwischen den Amidprotonen und α - bzw. β -Protonen einzelner Aminosäuren detektiert werden (Abb. 3.100). Besonders hervorzuheben sind dabei die Kontakte des Amidprotons des Valins mit dem α -CH des Alanins (drittletzte Aminosäure) sowie der Kontakt zwischen der β -CH₃-Funktion des C-terminalen Alanins und dem amidischen Proton des Leucins (viertletzte Aminosäure). Schließlich können einige Kontakte zwischen verschiedenen Gruppen im aliphatischen Bereich ermittelt werden (Abb. 3.100), wobei an dieser Stelle nur der Kontakt der β -CH₂-Gruppe des Leucins (viertletzte Aminosäure) mit H4 bzw. H6 des T_N-Antigens hervorgehoben sei.

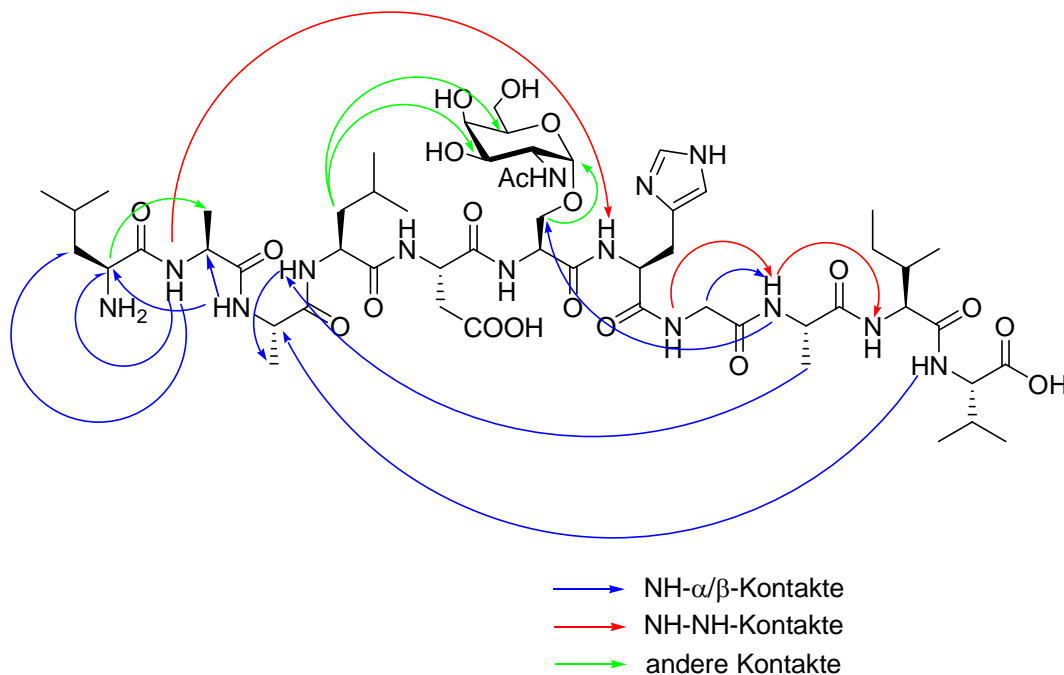


Abb. 3.100 Ermittelte Kontakte des Glycoundecapeptids **127**

In Zusammenarbeit mit Axel Kuhn konnte aus den analysierten Kontakten durch Energieminimierung (unter Verwendung des MM2-Kraftfelds) eine räumliche Struktur des Glycopeptids **127** ermittelt werden (Abb. 3.101).

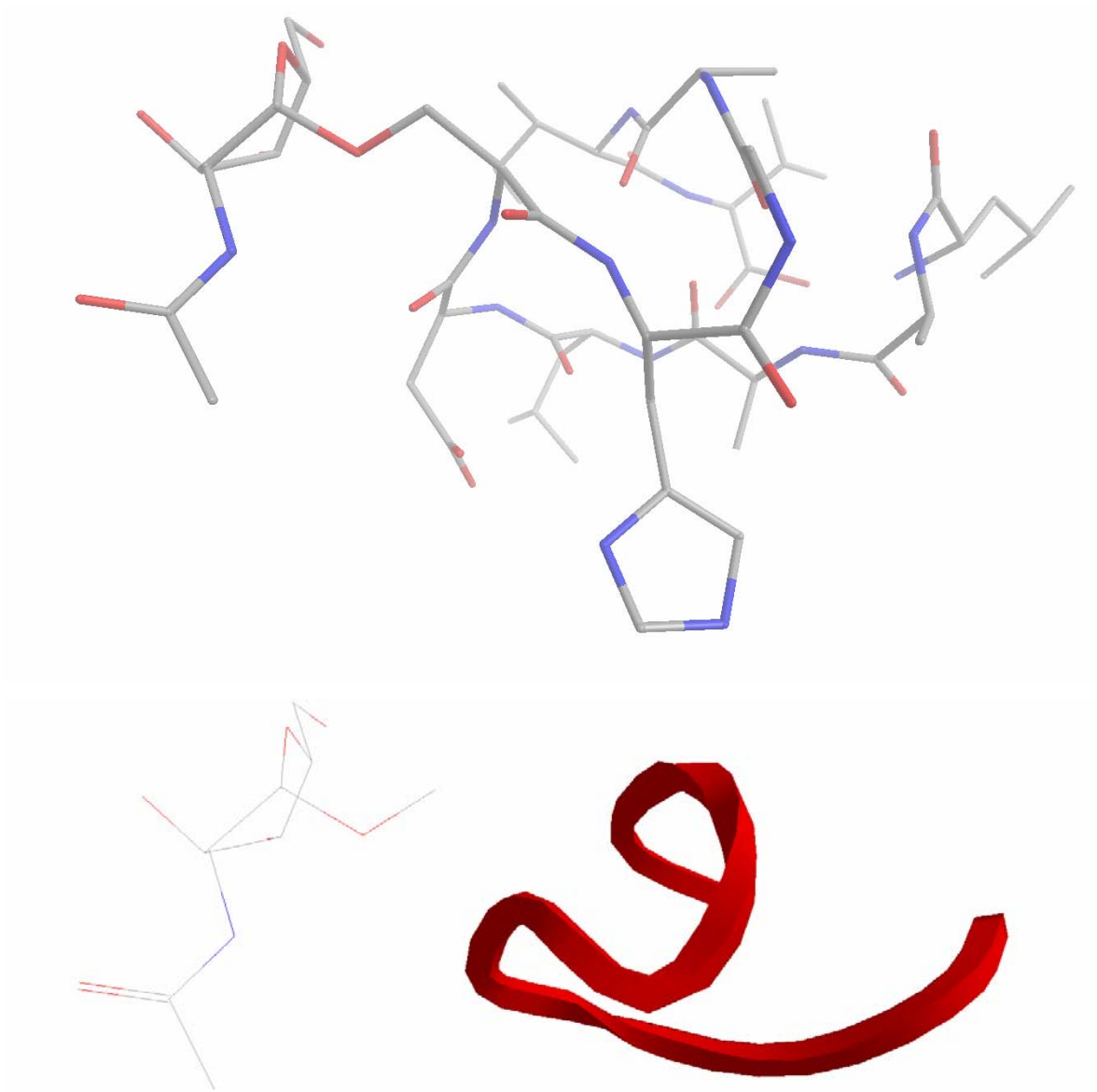


Abb. 101 Konformation von **127**

In Analogie zu den von Axel Kuhn⁹³ erhaltenen Ergebnissen scheint auch das Glycopeptid **127** eine Vorzugskonformation einzunehmen, die eine turnartige Struktur aufweist. Die Ausbildung einer Schleife ist eindeutig erkennbar.

3.8 UV- und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Wie in Kapitel 1.4 erläutert, ist es für die Interpretation von FRET-Spektren ausschlaggebend, sowohl die Absorptions- als auch die Emissionsspektren der beteiligten Chromophoren zu kennen. Um spätere Fehlinterpretationen der zu untersuchenden Verbindungen durch Anknüpfung des Chromophors an die Peptidsequenz und einer daraus eventuell auftretender Verschiebung seines Absorptions- oder Emissionsspektrums ausschließen zu können, sollen jeweils Ausgangsverbindungen untersucht werden, die der Struktur des Chromophors innerhalb der zu untersuchenden Sequenz sehr nahe kommen.

3.8.1 Darstellung des Dipeptids H₂N-Val-Trp-OH

Das gewünschte Dipeptid lässt sich in 2 Stufen nach einer literaturbekannten Synthese in einer Gesamtausbeute von 83% aus Z-Val-OH **152** und H₂N-Trp-OBn **153** darstellen.⁹⁴ Der erste Schritt besteht dabei in der Kupplung der beiden Aminosäuren und der zweite in deren Deblockierung (Abb. 3.102). Als Kupplungsreagenz kommt PyBop⁹⁵ und zur hydrogenolytischen Spaltung der Schutzgruppen H₂, Pd/C (10%) zum Einsatz.

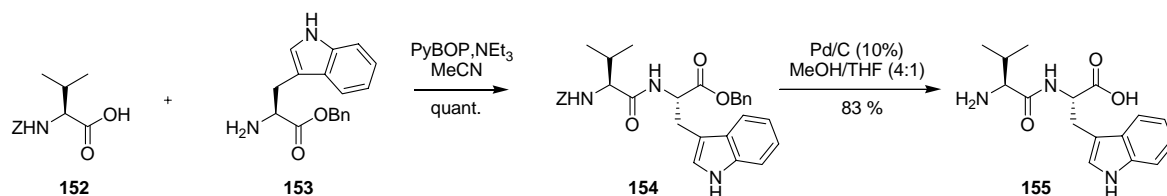


Abb. 3.102 Synthese des Dipeptids **155**

3.8.2 Allgemeine Vorgehensweise

Es wird jeweils eine 10⁻⁴ molare Lösung des jeweiligen Chromophors angesetzt. Als Lösungsmittel dient dabei Wasser. Ist die zu untersuchende Verbindung wasserunlöslich, so wird sie in DMSO aufgenommen und mit Wasser bis zum gewünschten

⁹⁴ E. M. Stocking et al., *Tetrahedron* **2001**, 57, 5303-5320.

⁹⁵ J. Martinez et al., *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1874-1879.

Konzentrationsbereich verdünnt. In Abhängigkeit von den erhaltenen Signalintensitäten werden die Lösungen weiter verdünnt, bis gut messbare Intensitäten erhalten werden. Dies ist speziell bei der sehr empfindlichen Fluoreszenzmessung nötig. Die Anregungswellenlänge für die Fluoreszenzspektren beträgt 330 nm.

3.8.3 Spektroskopische Messungen

Zuerst wird sowohl von dem synthetisierten Dipeptid **155** als auch von $\text{H}_2\text{N-Trp-OH}$ jeweils ein UV-Absorptionsspektrum gemessen. Dadurch kann festgestellt werden, ob die Kupplung von Valin mit der Aminofunktion des Tryptophans einen Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften ausübt. Es stellt sich heraus, dass es keinen Unterschied zwischen beiden gemessenen Spektren gibt. Dementsprechend ist es ausreichend das Spektrum des Tryptophans zur Ermittlung der optimalen Anregungsfrequenz heranzuziehen. Das gemessene Spektrum von Verbindung **155** ist in Abb. 3.103 abgebildet.

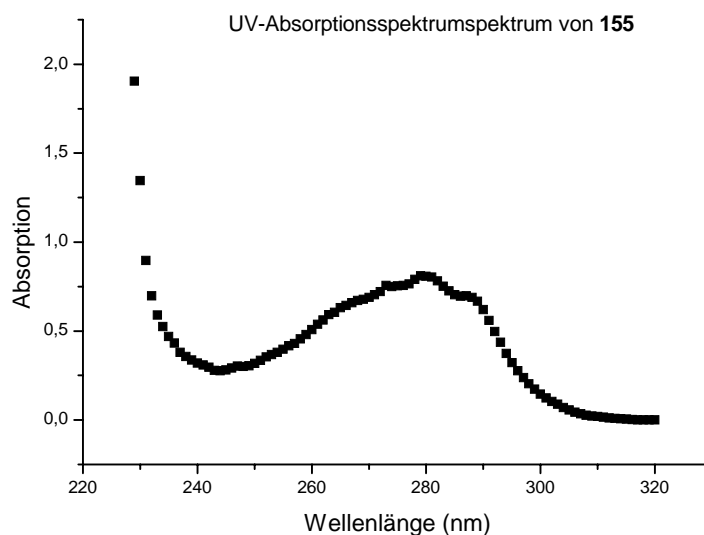


Abb. 3.103 UV-Absorptionsspektrum Verbindung **155**

Der nächste Schritt besteht in der Messung des UV-Absorptionsspektrums von Verbindung **67** (Abb. 3.104). Diese fand vor der später vorgenommenen Amidbildung (Kapitel 3.3) statt. Ziel war es, die selektive Anregung des Tryptophans bei gleichzeitigem Vorliegen des zweiten Chromophors zu prüfen. Nur wenn es zu keinen zu großen Überlagerungen der

Spektren kommt, ist eine selektive Anregung des Donors möglich. Sind beide Spektren zu stark überlagert, ist keine selektive Anregung möglich und Verbindung **67** fluoresziert nicht aufgrund eines Energietransfers, sondern aufgrund von angeregter Eigenfluoreszenz.

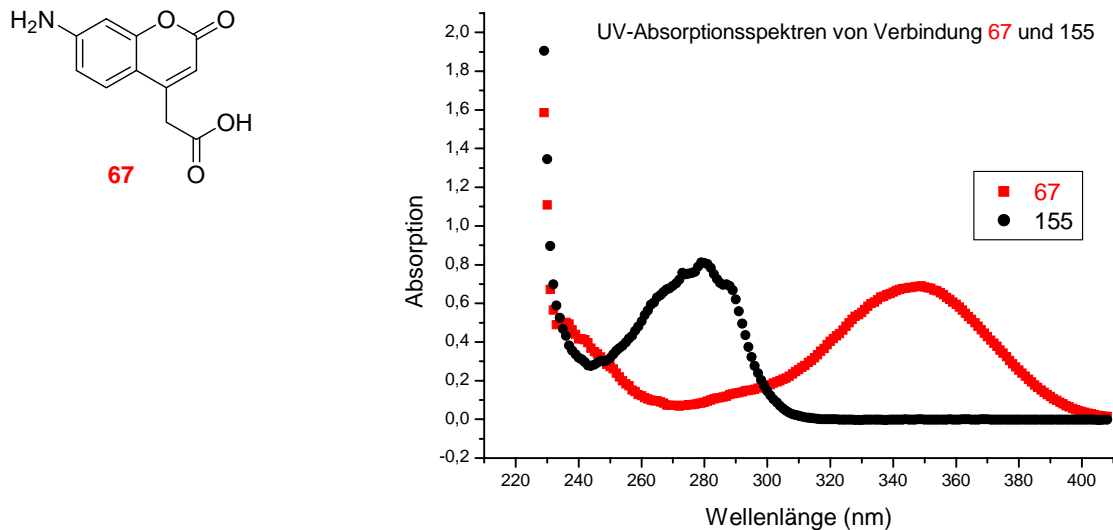


Abb. 3.104 UV-Absorptionsspektren von **67** und **155**

Wie man anhand der beiden abgebildeten UV-Spektren sehen kann, ist es möglich, das Dipeptid $\text{H}_2\text{N-Val-Trp-OH}$ **155** selektiv anzuregen (im Bereich von 263-280 nm), ohne dass Verbindung **67** angeregt werden würde. Eine weitere Bedingungen um erfolgreich FRET-Spektroskopie durchführen zu können besteht in einer genügend großen Überlappung des Emissionspektrums des Donors **155** (in Form seine Fluoreszenzspektrums) mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors **67** (Abb. 3.105).

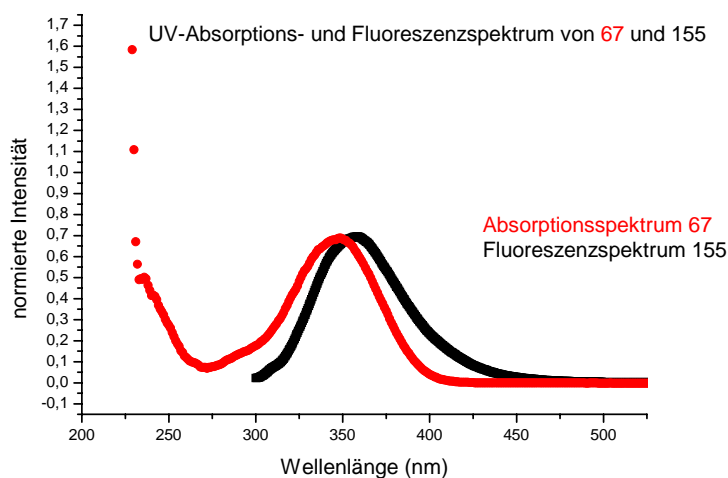


Abb. 3.105 Überlapp von **67** und **155**

In Abb. 3.105 kann man sehen, dass eine grosse Überlappung zwischen dem Absorptionsspektrum von **67** und dem Emissionsspektrum des Dipeptids **155** vorliegt. Dementsprechend sollte es möglich sein, falls die Energie-Transfer-Effizienz groß genug ist und die Dipolübergangsmomente nicht orthogonal zueinander stehen, einen Förster-Energie-Transfer herbei zuführen und ein FRET-Spektrum zu erhalten. Theoretisch sollte man für Verbindung **79** und **80** eine hypsochrome Verschiebung, durch die Amidbildung, erwarten. Das in Verbindung **67** enthaltene Push-Pull-System wird durch die Amidbindung geschwächt und somit kommt es zur Hypsochromie. Neben der Abnahme des Überlappungsintegrals J , könnte es bei zu großer Verschiebung in den kürzerwelligen Bereich zu Problemen bei der selektiven Anregung von Tryptophan kommen. Ob dieser Fall eintritt kann nur durch die entsprechenden spektroskopischen Untersuchungen geklärt werden (Abb. 3.106).

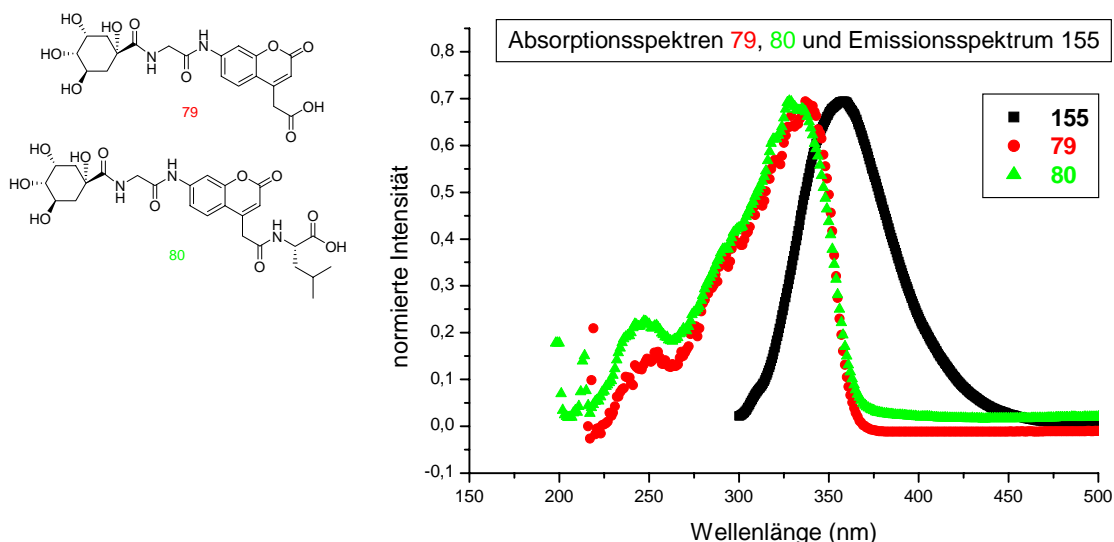


Abb. 3.106 Überlappungsintegral für Verbindung **79** und **80**

Es kommt nicht nur zur Hypsochromie und dadurch bedingt zu einer Verkleinerung des Überlappungsintegrals, sondern die Überlappung mit dem UV-Absorptionsspektrum des Dipeptids **155** ist nun erheblich (Abb. 3.107). Dementsprechend ist es nicht möglich, Tryptophan selektiv anzuregen. Es ergibt sich automatisch ein Fluoreszenzbeitrag durch die ebenfalls auftretende Anregung des Akzeptors. Wären nicht die Reinigungsprobleme bei den mit diesen FRET-Chromophoren verknüpften Glycopeptiden aufgetreten, dann wären die FRET-Untersuchungen bezüglich einer Turnstruktur wesentlich aufwendiger geworden als zu Beginn angenommen. Neben den separaten Messungen der beiden

Chromophore hätte man sie auch gemeinsam in einer Lösung untersuchen müssen. Den Beitrag des Akzeptors durch Eigenfluoreszenz zur Gesamtfluoreszenz wäre nur über eine Konzentrationsreihe und einer daraus erstellten Eichkurve zu ermitteln gewesen.

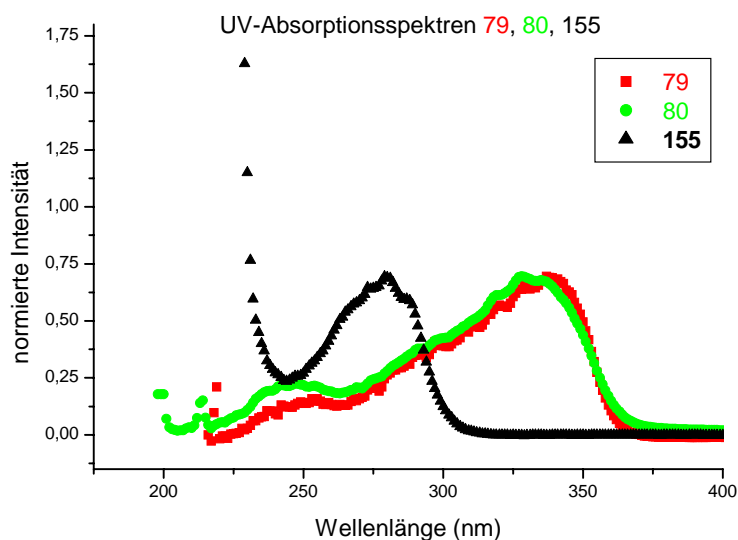


Abb. 3.107 Absorptionsspektren von 79,80 und 155

Im direkten Vergleich wird die Veränderung des Absorptionsverhalten von Verbindung 67 zu 79 und 80 deutlich (Abb. 3.108).

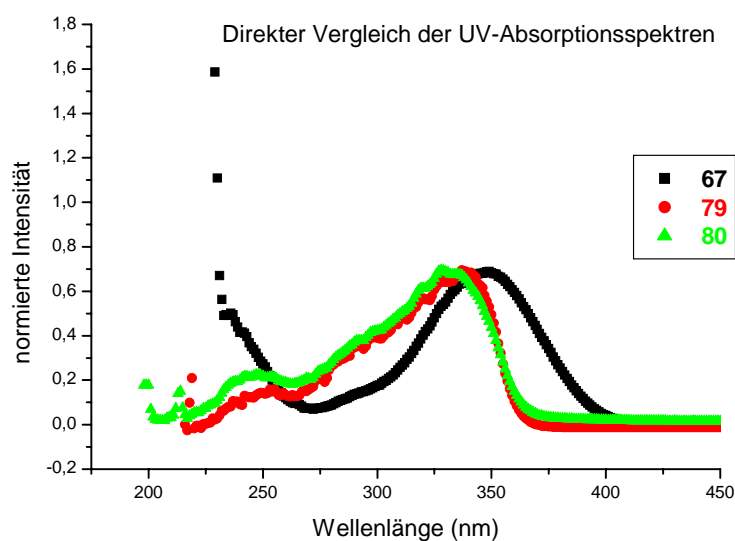


Abb. 3.108 Direkter Vergleich von 67, 79 und 80

Die oben beschriebenen Problemen der selektiven Anregung eines der Chromophoren verursacht weniger die hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um 12 nm (im Fall von **79**) bzw. 14 nm (im Fall von **80**), sondern vielmehr die Flankenbildung auf der kurzwelligen Seite.

Wesentlich gravierender macht sich die Hypsochromie im Fall des Fluoreszenzspektrums beider Verbindungen bemerkbar. Dort tritt eine Verschiebung von 51 nm (im Fall von **79**) bzw. 42.5 nm (im Fall von **80**) auf (Abb. 3.109).

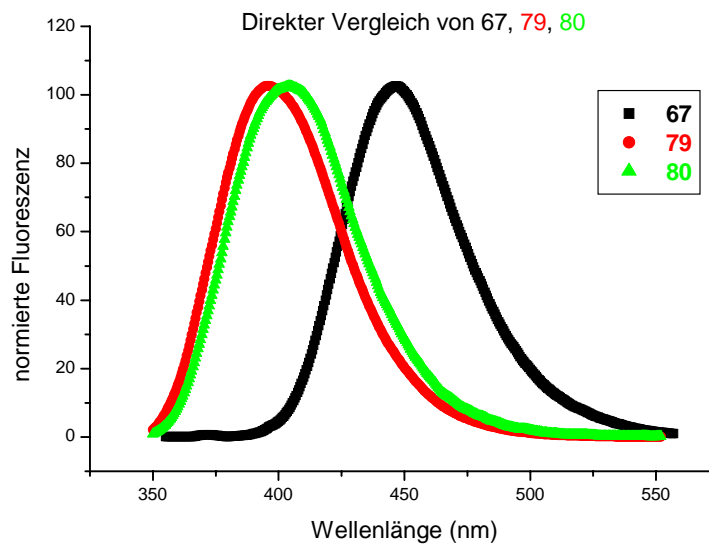


Abb. 3.109 Vergleich der Fluoreszenzspektren von **67**, **79** und **80**

Dabei ist es sehr interessant, dass es im Fall der Cumarinderivate im Gegensatz zum Dipeptid **158** sehr wohl einen Unterschied macht, ob der C-Terminus frei (in Form der Carbonsäure **79**) oder gebunden (in Form des Amids, **80**) vorliegt. Zwischen beiden Molekülen kommt es zu einer bathochromen Verschiebung (8.5 nm) bezogen auf die freie, ungebundene Säure **79**. Im Fall des Dipeptids **155**, im Vergleich zu H₂N-Trp-OH, ist wie weiter oben bereits erwähnt kein Unterschied messbar.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Partialstrukturen aus der homophilen Erkennungsregion des murinen LI-Cadherins synthetisiert. Größtenteils wurden die Teilstrukturen als Glycopeptide mit tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigenstrukturen als Seitenketten aufgebaut. Als Kohlenhydrate wurden das T_N-Antigen **13**, das T-Antigen **20**, das Sialyl-T_N-Antigen **32**, das (2→6)-Sialyl-T-Antigen **34** und das (2→3)-Sialyl-T-Antigen **45** eingebaut (Abb. 4.1).

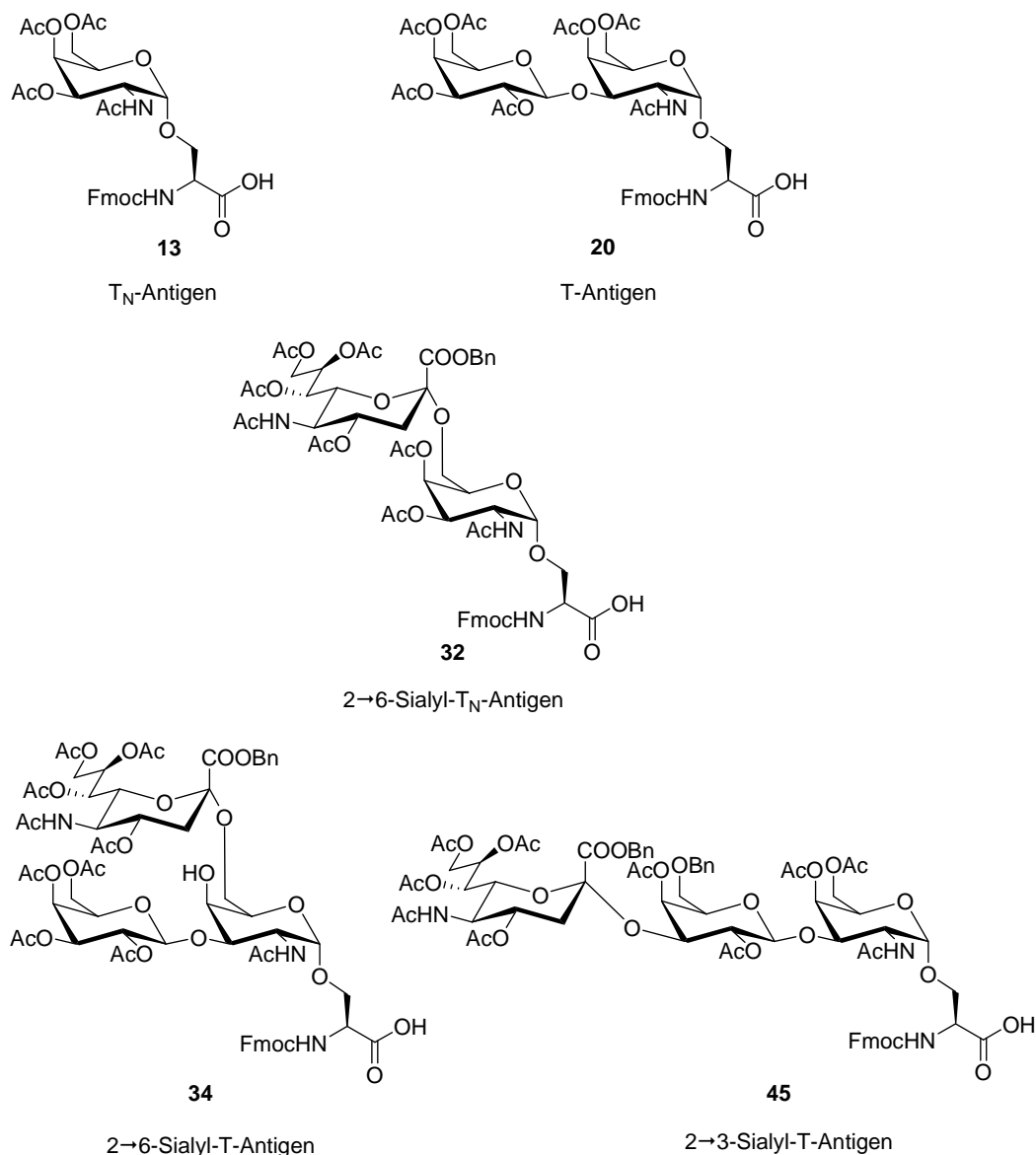


Abb. 4.1 Übersicht über die glycosylierten Aminosäurederivate

Neben der Synthese reiner Glycopeptide wurden auch mit Chromophorenpaaren versehene Glycopeptide dargestellt, um sie durch FRET-Spektroskopie konformationell zu

untersuchen. Als FRET-Donor wurde jeweils Tryptophan C-terminal eingebaut. Eine Aufstellung der verwendeten Akzeptoren findet sich in Abb. 4.2.

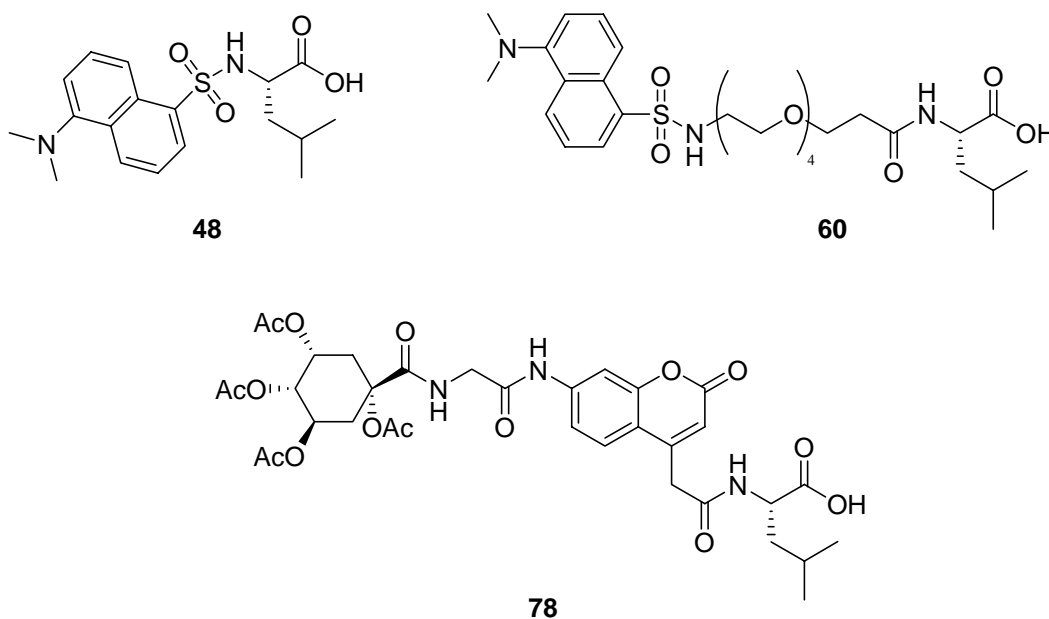


Abb. 4.2 Verwendete Akzeptoren

Untersuchungen der hergestellten Peptide und Glycopeptide durch FRET-Spektroskopie konnte leider wegen der zu geringen Löslichkeit (sowie der erschwerten Reinigung) der mit Chromophoren funktionalisierten Glycopeptiden nicht ausgeführt werden.

Die Festphasensynthesen wurden mit Hilfe eines Peptidsynthesizers durchgeführt. Teilweise wurde für die Synthesen der mit FRET-Chromophoren funktionalisierten Glycopeptide der PTMSEL-Linker verwendet. Dieser wurde ausgehend von Trimethylvinylsilan **112** hergestellt, mit Fmoc-Trp(Boc)-OH als Startaminosäure umgesetzt und an aminofunktionalisiertes Tentagel gekuppelt (Abb. 4.3).

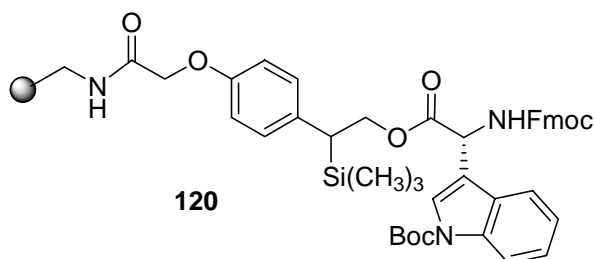


Abb. 4.3 Verwendeter PTMSEL-Anker

Die übrigen Synthesen wurden unter Einsatz von Wang-Harz durchgeführt. Die automatisierte sequentielle Glycopeptidsynthese wurde jeweils vor der Glycosylierungs-

stelle unterbrochen. Die Kupplung der Glycosyl-Serinderivate mußte manuell vorgenommen werden. Wenn das Aminocumarinderivat **78** als *N*-terminaler Akzeptor an ein Glycopeptid gekuppelt wurde, kamen in Analogie zu den Kupplungsreaktionen der Saccharidbausteine die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt zum Einsatz. In Abb. 4.4 und Abb. 4.5 findet sich eine Aufstellung über die synthetisierten (Glyco)Peptide.

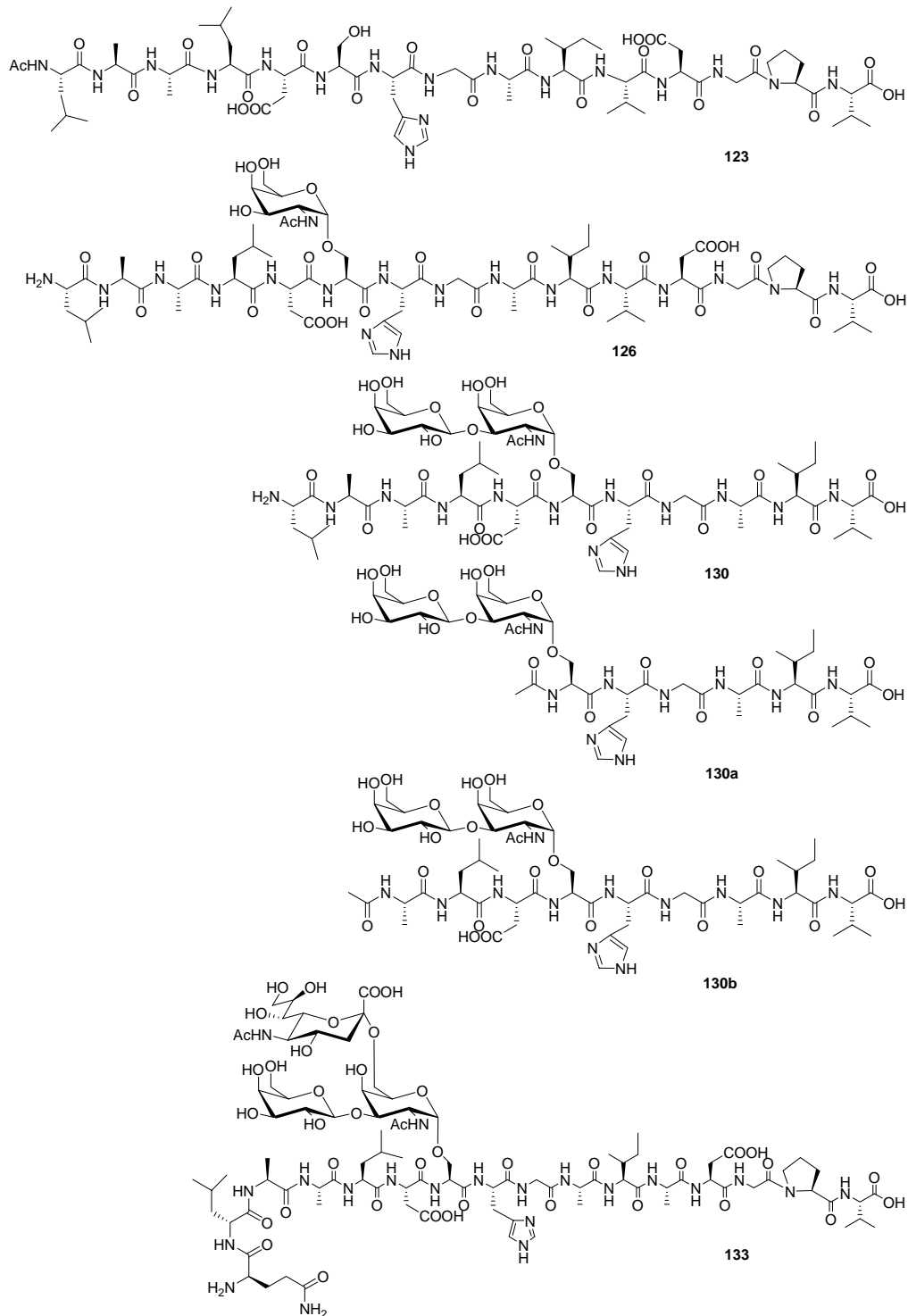


Abb. 4.4 Synthetische Peptide und Glycopeptide aus dem LI-Cadherin

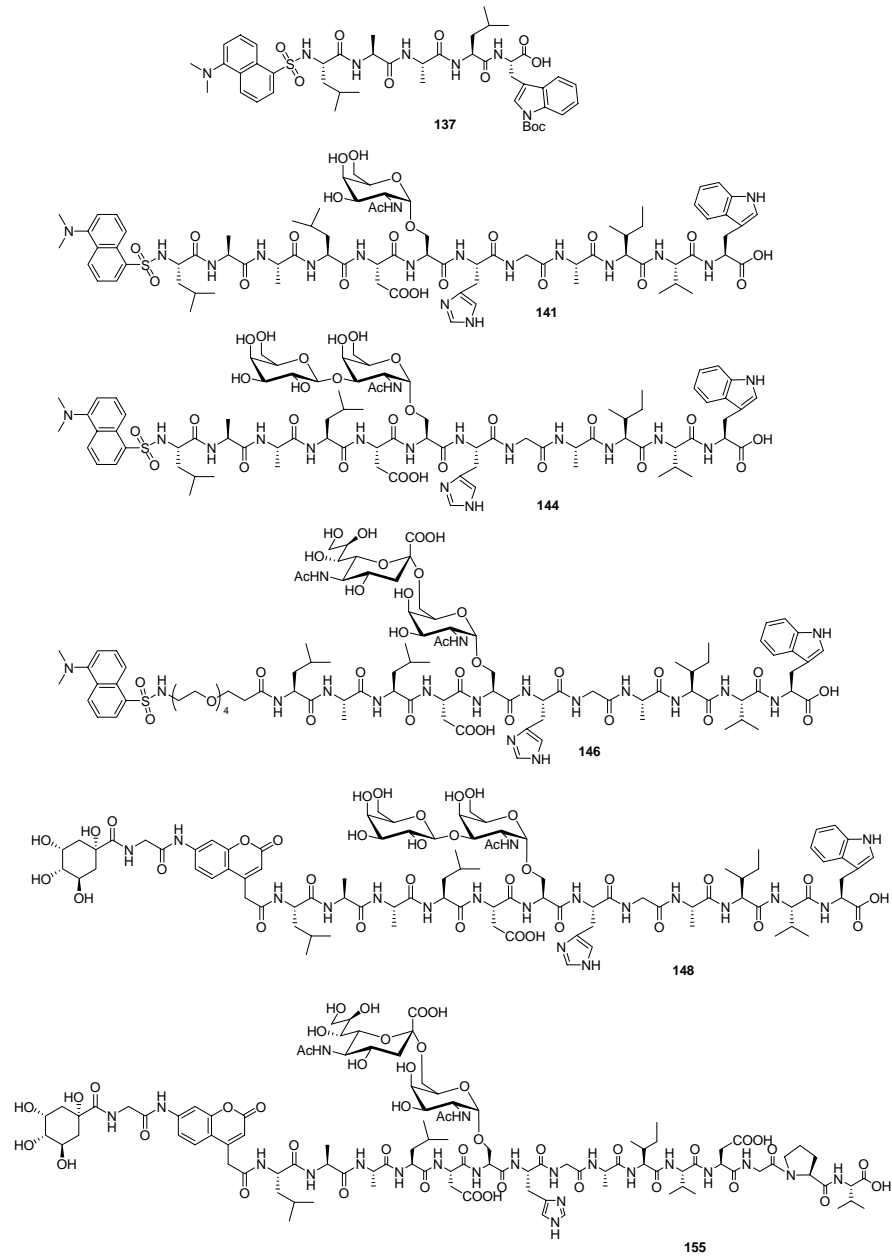


Abb. 4.5 Mit Chromophoren markierte für die FRET-Spektroskopie hergestellte Glycopeptide

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

Dünnschichtchromatographie: Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumfertigplatten der Firma Merck verwendet. Zur Detektion bediente man sich folgender Methoden:

- UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254 \text{ nm}$;
- Kaliumpermanganat-Reagenz: 1 g KMnO_4 , 5 g Na_2CO_3 in 250 ml H_2O (Entwicklung durch Wärmeeinwirkung);
- Eine Lösung aus 1.5 g Ninhydrin in einer Mischung aus 15 ml Essigsäure und 530 ml Methanol (Entwicklung durch Wärmeeinwirkung);
- Seebach-Reagenz: 1 g Cer(IV)-sulfat-tetrahydrat und 2.5 g Molybdätophosphorsäure in einer Mischung aus 94 ml dest. Wasser und 6 ml konz. Schwefelsäure (Entwicklung durch Wärmeeinwirkung);
- Zucker-Reagenz: 1:1-Mischung aus 0.2%iger ethanolischer 3-Methoxyphenollösung und 2N ethanolischer Schwefelsäure.

Chromatographie: Für die Flashchromatographie wurde Kieselgel der Partikelgröße 0.040-0.063 nm der Firma Baker verwendet. Die Laufmittelgemische wurden in der Regel durch Redestillation der Eluate anderer Chromatographien erhalten. Um einen angestrebten R_f -Wert von 0.1-0.2 zu erreichen, wurde in Abhängigkeit von der Polarität der Substanz entweder mehr polare oder unpolare Komponente zugesetzt.

Massenspektrometrie:

- MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Tofspec E-Gerät der Firma Micromass gemessen. Als Matrices kamen sowohl 2,5-Dihydroxybenzoesäure (dihb) als auch 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure (cca) zum Einsatz.
- ESI-Massenspektren wurden mit einem Micromass LCT-Spektrometer aufgezeichnet.
- FD-Massenspektren wurden an einem MAT-95-Spektrometer gemessen.

- Hochauflösende-Massenspektren wurden an einem Micromass Q-ToF Ultima API gemessen.

Drehwerte: Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem Perkin-Elmer-Polarimeter 241 bestimmt und anschließend auf die Natrium-D-Linie (589.5 nm) extrapoliert. Das Lösungsmittel, die Konzentration und die Temperatur sind jeweils angegeben.

NMR-Spektroskopie: Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten gemessen:

- Bruker AC-200: 200 MHz ^1H -NMR und 50.3 MHz ^{13}C -NMR
- Bruker AC-300: 300 MHz ^1H -NMR und 75.5 MHz ^{13}C -NMR
- Bruker AM-400: 400 MHz ^1H -NMR, ^1H - ^1H -COSY, TOCSY, NOESY, HMQC-ms, 100.6 MHz ^{13}C -NMR
- Bruker DRX-600: 600 MHz ^1H -NMR, ^1H - ^1H -COSY, TOCSY, HMQC-ms, 150.9 MHz ^{13}C -NMR

Das jeweilige Lösungsmittel wurde als Standard verwendet.

RP-HPLC: Analytische HPLC wurde mit einer Knauer Maxi Star K 1000-Gradientenpumpe, einem Knauer 4-Kanal-Entgaser sowie einem Knauer Diodenarraydetektor DAD 2062 durchgeführt. Die Detektion der Produkte erfolgte in Abhängigkeit vom Absorptionsmaximum der betreffenden Verbindung. Es wurde folgende RP-Säule verwendet:

- Phenomenex LUNA 5 μ C-18 (2), 250 x 4.60 mm

Die verwendeten Laufmittelgemische bestanden aus Acetonitril/Wasser oder Methanol/Wasser in anteiligen Verhältnissen bei einer Flussrate von 1 ml/min.

Für die präparative HPLC wurden zwei Knauer Ministar K500-Pumpen und ein variabler Wellenlängenmonitor verwendet. Die Detektion der Produkte erfolgte in Abhängigkeit von ihrem Absorptionsmaximum. Es wurde folgende Säule verwendet:

- Phenomenex LUNA 10 μ C-18 (2), 60 x 21.20 mm, Flussrate : 20 ml/min

Als Eluentien wurden Acetonitril/Wasser- oder Methanol/Wasser-Gemische verwendet.

Festphasenpeptidsynthese: Die Festphasenpeptidsynthesen wurden mit einem Perkin-Elmer ABI 433A-Peptidsynthesizer der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Harze wurden von der Firma Calbiochem-Novabiochem AG, Läuflingen, Schweiz oder der Firma Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland erworben. Die eingesetzten Aminosäurebausteine wurden ebenfalls von der Firma Calbiochem-Novabiochem AG, Läuflingen, Schweiz bezogen.

Beladungsbestimmungen⁸⁹ wurden photometrisch vorgenommen. Dabei wird die UV-Absorption des Fmoc-Piperidin-Addukts genutzt. Man ging wie folgt vor: 20 mg des getrockneten, mit der Fmoc-Aminosäure beladenen Harzes wurden in 18.07 g DMF/Piperidin (1:1 w/w) suspendiert und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde 1 ml der überstehenden Lösung in einen 10 ml Messkolben dekantiert. Dieser wurde dann auf 10 ml mit DMF/Piperidin aufgefüllt. Es wurde die Absorption bei $\lambda = 278$ nm gemessen und mittels der Eichgeraden $[c \text{ (mmol/g)} = \text{OD (optische Dichte)} \times 10^4 / 10.417$ (Extinktionskoeffizient)] die Beladung berechnet.

UV-Spektroskopie: UV-Absorptionsspektren wurden an einem Zeiss MCS 320/340 Diodenarray-Spektrometer gemessen.

Fluoreszenzspektroskopie: Fluoreszenzspektren wurden an einem Perkin-Elmer LS 50B-Spektrometer gemessen.

Molmassen sind in Form ihres exakten Molekulargewichts angegeben.

Die Nomenklatur der ¹H- und ¹³C-Signale wurde wie folgt vorgenommen:

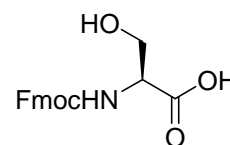
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin	ohne Apostroph
(1→3)-β-Galactose	'
<i>N</i> -Acetyl-D-neuraminsäure	''

5.2 Versuche zu Kapitel 3.1.1

N-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-serin **2**

[Fmoc-Ser-OH]

Zu einer Lösung von 9.20 g (87.53 mmol) L-Serin **1** und 7.36 g NaHCO₃ in 440 ml Aceton/Wasser (1:1) werden unter Rühren 29.47 g (87.51 mmol) *N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)succinimidyl-carbonat (Fmoc-ONSu) gegeben. Man rührt 72 h bei Raumtemperatur. Anschließend säuert man die Reaktionslösung mit konz. HCl auf pH = 2 an und entfernt überschüssiges Aceton im Vakuum. Das Produkt wird mit 440 ml CH₂Cl₂ aus der sauren, wässrigen Phase extrahiert. Die organische Phase wird zweimal mit jeweils 200 ml 1N HCl und 200 ml dest. Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Anschließend kdestilliert man den Rückstand dreimal mit je 10 ml Toluol.



Ausb.: 26.47 g (92%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.65$ (CH₂Cl₂/EE 11:2).

C₁₈H₁₇NO₅ [327.11]

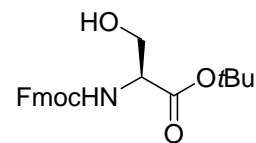
ESI-MS (positiv), m/z: 328.1 ([M+H]⁺, ber.: 328.1); 350.0 ([M+Na]⁺, ber.: 350.1); 365.2 ([M(+K-H)]⁺, ber.: 365.2).

200 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 7.83 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 6.83$ Hz); 7.72 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 6.84$ Hz); 7.43-7.26 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 6.62 (d, 1H, NH, $J_{NH,S\alpha} = 8.30$ Hz); 4.41-4.19 (m, 4H, S^α, CH₂-Fmoc, H9-Fmoc); 4.04-3.83 (m, 2H, S^β).

50.3 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 172.25 (1C, COOH); 157.04 (1C, CO-Urethan); 145.02 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 142.02 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 128.74 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.90 (2C, C2-, C7-Fmoc); 126.14, 126.11 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.73 (2C, C4-, C5-Fmoc); 67.35 (1C, CH₂-Fmoc); 62.99 (1C, S^β); 57.17 (1C, S^α); 47.91 (1C, C9-Fmoc).

N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-serin-*tert*-butylester 3*[Fmoc-Ser-*Ot*Bu]**

Eine Mischung aus 36.72 g (177.96 mmol) DCC, 17.17 g (214.54 mmol) *tert*-Butanol und 0.40 g (4.04 mmol) wasserfreiem Kupfer(I)chlorid wird unter Lichtausschluß und Argonatmosphäre



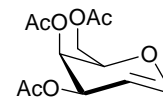
6 d bei Raumtemp. gerührt. Man verdünnt mit 100 ml absol. CH₂Cl₂ und tropft 17.56 g (53.64 mmol) Fmoc-Ser-OH **2**, gelöst in 150 ml CH₂Cl₂/*tert*-Butanol (3:1), über einen Zeitraum von 30 min zu. Es wird weitere 60 min gerührt. Der während der Reaktion ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert und der Filtrückstand mehrmals mit eisgekühltem CH₂Cl₂ gewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. grösstenteils eingeeengt und der dabei ausfallende Harnstoff erneut abfiltriert. Die anfallende Lösung wird dreimal mit jeweils 100 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wird i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand in wenig Ethylacetat aufgenommen. Unter Kühlung fällt weiterer Harnstoff aus, der abfiltriert wird. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: PE/EE 2:1) und anschließender Umkristallisation aus Diethylether/Petrolether.

Ausb.: 14 g (65%); Schmp.: 120 °C; R_f = 0.46 (Tol/EtOH 10:1); $[\alpha]_D^{22} = 3.6$ (c = 1, CH₂Cl₂).

C₂₂H₂₅NO₅ [383.44]

3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal 6

Zu einer gekühlten Mischung aus 180 ml Acetanhydrid und 1.4 ml Perchlorsäure (60%) gibt man unter Eiskühlung in mehreren Portionen 50 g Galactose **4** (0.27 mmol), so dass sich die Temperatur der Mischung



zwischen 10 und 15 °C bewegt. Nach beendeter Zugabe rührt man ca. 15 h bei Raumtemperatur. Anschließend kühlt man auf 10 °C und tropft 40.75 ml (0.49 mmol) Phosphortribromid innerhalb von 35 min zu. Man versetzt mit 18.5 ml Wasser bei 8-10 °C und rührt 4.5 h bei Raumtemperatur. Eine Lösung von 180 g Natriumacetat in 300 ml Wasser und 180 ml Essigsäure wird in einem 2l-Becherglas auf -20 °C gekühlt und mit 100 g Zinkstaub sowie 10 g Kupfersulfat-Pentahydrat in 40 ml Wasser versetzt. Bei -15 bis -20 °C wird die Lösung des Galactopyranosylbromids **5** zugetropft. Nach beendeter

Zugabe lässt man auf 0 °C erwärmen und rührt 3 h bei dieser Temperatur. Anschließend wird über *Hyflo*® in eine Saugflasche auf ca. 250 g zerstoßenes Eis filtriert. Den Filtrerrückstand wäscht man zweimal mit je 200 ml kalter 50%iger Essigsäure und einmal mit 100 ml Chloroform. Das Filtrat wird fünfmal mit insgesamt 2 l Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je 200 ml ges. NaHCO₃-Lsg. und 200 ml Wasser gewaschen. Es wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der so erhaltene zähflüssige Rückstand wird ohne weitere Reinigung (nach DC-Kontrolle und NMR-Spektroskopie) weiter umgesetzt.

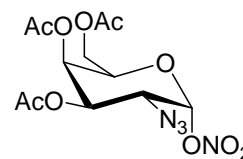
Ausb.: 25.50 g (35%); zähflüssiges, gelbes Öl; R_f = 0.77 (PE/EE 3:1); (Lit.:²⁸ Ausb.: 59%; Sdp. (0.2 mbar): 129-130°C).

C₁₂H₁₆O₇ [272.13]

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

[α/β -Ac₃GalN₃-ONO₂]

Zu einer Lösung von 25.50 g (93.66 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal **6** in 450 ml absol. Acetonitril gibt man bei -20 °C unter Argon 154.08 g (281.05 mmol) trockenes Cerammoniumnitrat und 9.13 g (140.48 mmol) trockenes NaN₃. Es wird 20 h bei



-20 °C gerührt. Man verdünnt die intensiv gelbe Reaktionsmischung mit 550 ml eisgekühltem Diethylether und schüttelt mit 550 ml eisgekühltem Wasser. Die organische Phase wird dreimal mit je 270 ml kaltem Wasser gewaschen. Anschließend trocknet man über MgSO₄ und engt die Lösung i. Vak. ein. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 330 g Kieselgel (Laufmittel: PE/EE 5:1) gereinigt. Neben reinen Fraktionen werden auch Mischfraktionen erhalten, welche durch erneute Säulenchromatographie an 180 g Kieselgel (Laufmittel: PE/EE 5:1) gereinigt werden.

Ausb.: 11.41 g (32%); farbloser amorpher Feststoff; R_f = 0.69 (PE/EE 5:1).

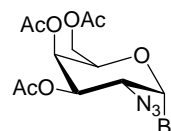
C₁₂H₁₆N₄O₁₀ [376.28]

200 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ /(ppm): 6.31 (d, 1H, H1(α), J_{H1,H2} = 4.39 Hz); 5.57-5.52 (d, 1H, H1(β), J_{H1,H2} = 8.79 Hz); 5.47 (m, 1H, H4(α)); 5.36 (d, 1H, H4(β), J_{H3,H4} = 3.42 Hz); 5.26-5.18 (dd, 1H, H3(α), J_{H3,H4} = 2.45 Hz, J_{H2,H3} = 10.75 Hz); 4.91 (dd, 1H, H3(β), J_{H3,H4} = 3.42 Hz, J_{H2,H3} = 10.74 Hz); 4.37-4.31 (t, 1H, H2(α), J_{H2,H3} = J_{H2,H4} = 5.86 Hz); 4.17-3.98

(m, 3H, CH₂-OAc, CH-CH₂-OAc); 3.84-3.75 (m, 1H, H₂(β)); 2.05, 2.02, 2.01 (3*s, 9H, CH₃-Ac).

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid **10** [α -Ac₃GalN₃-Br]

Zu einer gut gerührten Suspension von 18.44 g (212.33 mmol) trockenem Lithiumbromid in 170 ml absol. Acetonitril werden 11.40 g (30.30 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α / β -D-galactopyranosylnitrat (α / β -Ac₃GalN₃-ONO₂) **7** in 60 ml absol. Acetonitril



gegeben. Man rührt das Reaktionsgemisch 18 h bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre, verdünnt mit 350 ml CH₂Cl₂ und filtriert den Überschuss an LiBr ab. Anschließend wird zweimal mit jeweils 200 ml Wasser und einmal mit 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Man trocknet die orangefarbene organische Phase über MgSO₄ und engt die Lösung i. Vak. ein. Es wird ein braunes Öl erhalten, das ohne weitere Reinigung umgesetzt wird.

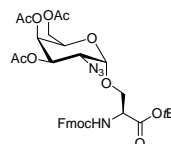
Ausb.: 9.55 g (80%); braunes Öl; R_f = 0.55 (PE/EE 2:1).

C₁₂H₁₆BrN₃O₇ [394.17]

N-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α / β -D-galactopyranosyl)-*L*-serin-*tert*-butylester **11**

[Fmoc-Ser(α / β -Ac₃GalN₃)-OtBu]

Eine Lösung von 12.30 g (30.72 mmol) Fmoc-Ser-OtBu **3** in 200 ml absol. CH₂Cl₂/absol. Toluol (3:2) wird mit 30 g gepulvertem Molsieb (4Å) unter Feuchtigkeits- und Lichtausschluß 1 h bei Raumtemp. gerührt. Nach dem Abkühlen auf 0 °C werden 10.10 g (36.56 mmol)



Silbercarbonat hinzugefügt. Man setzt 1.27 g (6.09 mmol) wasserfreies Silberperchlorat in 50 ml absol. Toluol zu (Silberperchlorat-Monohydrat wurde mehrmals mit absol. Toluol kodestilliert). Es wird 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend innerhalb von 30 min eine Lösung aus 13.78 g (36.58 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-galactopyranosylbromid **10** in 300 ml absol. CH₂Cl₂/absol. Toluol (1:1) zugegeben. Die Mischung wird 19 h unter Lichtausschluß bei Raumtemp. gerührt, mit 250 ml CH₂Cl₂

verdünnt und über *Hyflo*[®] filtriert. Das Filtrat wird zweimal mit jeweils 200 ml einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 8:1).

Ausb.: α : 11.70 g (69%); $R_f = 0.38$ (CH/EE 1:2); $[\alpha]_D^{21} = 122.2$ ($c = 1$, CHCl₃); (Lit.:⁹⁶ $[\alpha]_D^{23} = 124.1$ ($c = 1$, CHCl₃)).

C₃₄H₄₀N₄O₁₂ [696.26]

ESI-MS (positiv), m/z : 663.2 ([M+H+Na-*t*Bu]⁺, ber.: 663.1); 679.2 ([M+H+K-*t*Bu]⁺, ber.: 679.1); 696.2 (M⁺, ber.: 696.3); 719.3 ([M+Na]⁺, ber.: 719.3).

300 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ /ppm: 7.73 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.35$ Hz); 7.61 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.35$ Hz); 7.41-7.26 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 5.86 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{NH,S\alpha} = 7.74$ Hz); 5.41 (d, 1H, H4, $J_{H3,H4} = 2.58$ Hz); 5.27 (dd, 1H, H3, $J_{H3,H4} = 2.94$ Hz, $J_{H2,H3} = 11.04$ Hz); 4.92 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.30$ Hz); 4.43-4.36 (m, 3H, CH₂-Fmoc, S ^{α}); 4.25-3.92 (m, 6H, H9-Fmoc, H5, H6, S ^{β}); 3.64 (dd, 1H, H2, $J_{H1,H2} = 3.33$ Hz, $J_{H2,H3} = 11.04$ Hz); 2.18, 2.05, 1.96 (3*s, 9H, CH₃-Ac); 1.48 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

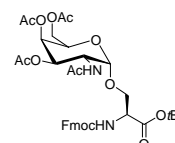
75.5 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃), δ /ppm: 170.38, 169.93, 169.69, 169.30 (4C, CO); 155.83 (1C, CO-Urethan); 143.82, 143.78 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.27 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 127.73, 127.69, 127.08 (6C, C1-, C2-, C3-, C6-, C7-, C8-Fmoc); 119.95 (2C, C4-, C5-Fmoc); 99.21 (1C, C1); 83.11 (1C, C_q-*t*Bu); 69.99 (1C, S ^{β}); 67.99 (1C, C3); 67.22 (1C, CH₂-Fmoc); 67.48, 65.62 (2C, C4, C5); 61.66 (1C, C6); 57.50 (1C, C2); 54.90 (1C, S ^{α}); 47.06 (1C, C9-Fmoc); 27.98 (1C, CH₃-*t*Bu); 20.62, 20.58, 20.46 (3C, CH₃-Ac).

***N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester **12**
[Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-*Ot*Bu]**

Der folgende Ansatz wird dreimal parallel nebeneinander durchgeführt:

In 100 ml einer Mischung aus THF, Acetanhydrid und AcOH (3:2:1) löst man 3.90 g (5.60 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalN₃)-*Ot*Bu **11**. Es

werden 4.27 g (68.20 mmol) aktivierter Zinkstaub zugegeben und 16 h bei Raumtemp.



⁹⁶ H. Paulsen, W. Rauwald, U. Weichert, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 75-86.

gerührt (die Aktivierung des Zinks erfolgt durch Aufschlännen in 110 ml 2%iger CuSO₄-Lösung, Waschen mit Wasser und Trocknen mit Diethylether). Man verdünnt mit 150 ml THF, filtriert über *Hyflo*[®] und engt i. Vak. ein. Der Rückstand wird in 150 ml CH₂Cl₂ aufgenommen, zweimal mit jeweils 150 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. und 150 ml einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 1:1 → 1:3) gereinigt.

Ausb.: 9.20 g (77%); R_f = 0.18 (CH/EE 2:3); $[\alpha]_D^{23} = 65.9$ (c = 1, CH₂Cl₂); (Lit.:⁹⁶ $[\alpha]_D^{23} = 59.5$ (c = 1, CH₂Cl₂)).

C₃₆H₄₄N₂O₁₃ [712.28]

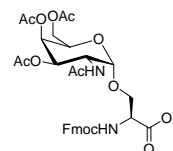
ESI-MS (positiv), m/z: 735.4 ([M+Na]⁺, ber.: 735.3).

300 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.35 Hz); 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.35 Hz); 7.41-7.26 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 5.71 (d, 1H, NH-Fmoc, J_{NH,Sα} = 7.35 Hz); 5.63 (d, 1H, NHAc, J_{NH,H2} = 9.57 Hz); 5.35 (d, 1H, H4, J_{H3,H4} = 3.33 Hz); 5.09 (dd, 1H, H3, J_{H3,H4} = 3.33 Hz, J_{H2,H3} = 11.01 Hz); 4.81 (s_b, 1H, H1); 4.58 (ddd, 1H, H2, J_{H1,H2} = 3.66 Hz, J_{H2,NHAc} = 9.93 Hz, J_{H2,H3} = 11.01 Hz); 4.42-4.37 (m, 3H, CH₂-Fmoc, S^α); 4.22 (m, 1H, H9-Fmoc); 4.13-3.80 (m, 5H, H5, H6, S^β); 2.14 (s, 3H, CH₃-NHAc); 1.98, 1.97, 1.91 (3*s, 9H, CH₃-Ac); 1.47 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

75.5 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 170.84, 170.35, 170.23, 169.96, 168.89 (5C, CO); 155.77 (1C, CO-Urethan); 143.73, 143.71 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.29 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 127.77 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.08 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.00 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.02 (2C, C4-, C5-Fmoc); 98.83 (1C, C1); 83.09 (1C, C_q-*t*Bu); 69.36, 68.41 (3C, C3, C4, C5); 67.28 (1C, S^β); 67.23 (1C, CH₂-Fmoc); 61.87 (1C, C6); 54.80 (1C, S^α); 47.55 (1C, C2); 47.07 (1C, C9-Fmoc); 28.01 (1C, CH₃-*t*Bu); 20.70, 20.58 (3C, CH₃-Ac).

***N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serin **13**
[Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OH]**

In 30 ml TFA werden 1.02 g (1.40 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-*O**t*Bu **12** gelöst und mit 3 ml Anisol versetzt. Man rührt die



Reaktionsmischung 2 h bei Raumtemperatur. Überschüssiges TFA/Anisol-Gemisch wird i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit je 30 ml Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird an 80 g Kieselgel (Laufmittel: EE/AcOH 100:1) gereinigt. Man erhält einen farblosen Feststoff.

Ausb.: 650 mg (71%); farbloser Feststoff; Schmp.: 107-109°C; $[\alpha]_D^{23} = 80.4$ (c = 1, CHCl₃); $R_f = 0.58$ (EE/AcOH 100:1).

C₃₂H₃₆N₂O₁₃ [656.64]

ESI-MS (positiv), m/z: 657.4 ([M+H]⁺, ber.: 657.6); 679.5 ([M+Na]⁺, ber.: 679.6); 681.1 ([M+Na+H]⁺, ber.: 680.6); 695.7 ([M+K]⁺, ber.: 695.7); 701.4 ([M+2Na-H]⁺, ber.: 701.6).

400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 7.71 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.44 Hz); 7.56 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.43 Hz); 7.35 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.44 Hz); 7.22-7.38 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc); 6.24 (d, 1H, NH-Fmoc, J_{NH,Sα} = 7.82 Hz); 6.12 (d, 1H, NHAc, J_{NH,H2} = 9.00 Hz); 5.34 (s_b, 1H, H4); 5.16 (dd, 1H, H3, J_{H3,H4} = 2.74 Hz, J_{H2,H3} = 11.35 Hz); 4.94 (d, 1H, H1, J_{H1,H2} = 3.13 Hz); 4.52-4.40 (m, 3H, H2, CH₂-Fmoc, S^α); 4.31 (t, 1H, H9-Fmoc, J_{CH2,H9} = 7.05 Hz); 4.20-3.97 (m, 5H, H5, H6, S^β); 2.14, 2.01, 1.97, 1.94 (4*s, 12H, CH₃-Ac).

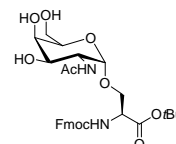
100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 173.01 (1C, COOH); 169.80, 170.15, 170.48, 171.71 (4C, CO); 155.93 (1C, CO-Urethan); 143.67 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.27 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 127.82 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.11 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.29, 124.92 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.07 (2C, C4-, C5-Fmoc); 98.61 (1C, C1); 69.45 (1C, S^β); 67.25, 67.37, 67.74, 68.11 (4C, CH₂-Fmoc, C3, C4, C5); 61.91 (1C, C6); 54.45 (1C, S^α); 47.12 (1C, C9-Fmoc); 22.71 (1C, CH₃-NHAc); 20.56, 20.63, 21.45 (3C, CH₃-Ac).

5.3 Versuche zu Kapitel 3.1.2

N-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester **14**

[Fmoc-Ser(α -GalNAc)-*O**t*Bu]

In 15 ml absol. MeOH werden 500 mg (0.70 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-*O**t*Bu **13** gelöst und tropfenweise mit frisch hergestellter methanolischer Natriummethanollösung versetzt, bis ein pH-Wert zwischen 8.5 und 9.0 erreicht ist. Nach 3 h wird die Reaktion durch



Zugabe von saurem Ionenaustauscher *Amberlite*[®] *IR-120* (H-Form) abgebrochen. Nach anschließender Filtration und Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. erfolgt die Reinigung des Rohprodukts durch Flashchromatographie an 30 g Kieselgel (Laufmittel: EE→ EtOH). Ausb.: 275 mg (67%); $R_f = 0.16$ (Tol/EtOH 5:1).

$C_{31}H_{40}N_2O_9$ [586.25]

ESI-MS (positiv), m/z : 609.2 ($[M+Na]^+$, ber.: 609.2).

300 MHz ¹H-NMR (CD₃OD), δ /ppm: 7.81 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.71$ Hz); 7.69 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 6.63$ Hz); 7.44-7.31 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 4.83 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.69$ Hz); 4.48-4.22 (m, 5H, CH₂-Fmoc, S ^{β} _a, H2, H9-Fmoc); 3.92-3.76 (m, 7H, S ^{β} _b, S ^{α} , H3, H4, H5, H6); 1.99 (s, 3H, CH₃-NHAc); 1.49 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

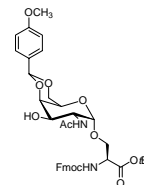
75.5MHz ¹³C-NMR (CD₃OD), δ /ppm: 173.79, 171.06 (2C, CO); 158.59 (1C, CO-Urethan); 145.24 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 142.63 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 128.86 (2C, C3-, C6-Fmoc); 128.23 (2C, C2-, C7-Fmoc); 126.16 (2C, C1-, C8-Fmoc); 121.00 (2C, C4-, C5-Fmoc); 100.03 (1C, C1); 83.43 (1C, C_q-*t*Bu); 72.92 (1C, S ^{β}); 70.28, 69.73, 68.90 (3C, C3, C4, C5); 67.99 (1C, CH₂-Fmoc); 62.79 (1C, C6); 56.63 (1C, S ^{α}); 51.20 (1C, C2); 47.25 (1C, C9-Fmoc); 28.36 (1C, CH₃-*t*Bu); 23.03 (1C, CH₃-Ac).

N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-*p*-methoxybenzyliden- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester **15*

[Fmoc-Ser(α -4,6-*O*-Pmb-GalNAc)-*Ot*Bu]**

Der folgende Ansatz wird zweimal parallel nebeneinander durchgeführt:

Eine Lösung von 4.60 g (6.46 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-*O**t*Bu **13** in 100 ml absol. MeOH wird mit NaOMe/MeOH-Lösung langsam versetzt, bis der pH-Wert 8.5-9.0 beträgt. Der pH-Wert wird regelmässig



kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert. Nach 24 h wird die Lösung durch Zugabe von Amberlite® IR 120 (H-Form) neutralisiert. Nach Filtration wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand 1.5 h i. Hochvak. getrocknet. Man nimmt das Rohprodukt in 150 ml DMF auf, gibt 2.21 ml (12.92 mmol) Anisaldehyd-dimethylacetal und eine Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure (pH = 4) zu und bringt das Gemisch bei 50 °C und 15 mbar am Rotationsverdampfer zur Reaktion. Wenn nötig, wird erneut DMF zugegeben. Nach 4 h wird die Lösung durch Zugabe von DIPEA neutralisiert, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und zweimal mit Toluol i. Vak. kodestilliert. Der Rückstand wird in 150 ml Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit jeweils 100 ml ges. NaHCO₃-Lsg. sowie mit 100 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und anschließend i. Vak. eingengt. Der erhaltene Rückstand wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 1:2) gereinigt.

Ausb.: 4.17 g (61%); $R_f = 0.20$ (CH/EE 1:3); $[\alpha]_D^{23} = 58.2$ ($c = 1$, CH₂Cl₂); (Lit.:⁴² Ausb.: 52%; $[\alpha]_D^{23} = 60.1$ ($c = 1$, CH₂Cl₂)).

C₃₈H₄₄N₂O₁₁ [704.76]

ESI-MS (positiv), m/z : 671.0 ([M-*t*Bu+H+Na]⁺, ber.: 671.3); 705.3 ([M+H]⁺, ber.: 705.3); 727.0 ([M+Na]⁺, ber.: 727.3).

400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ /ppm: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.40$ Hz); 7.57 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.42-7.25 (m, 6H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{meta}-Pmb); 6.86 (d, 2H, H_{ortho}-Pmb, $J_{Hortho,Hmeta} = 8.96$ Hz); 5.97 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{NH,CH2} = 8.60$ Hz); 5.74 (d, 1H, NHAc, $J_{NH,H2} = 8.24$ Hz); 5.46 (s, 1H, CH-Pmb), 4.89 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 2.07$ Hz); 4.47-4.32 (m, 4H, H2, S ^{α} , CH₂-Fmoc); 4.22-4.06 (m, 3H, H6, H9-Fmoc); 3.98-3.89 (m, 4H, H3, H5, S ^{β}); 3.78 (s, 3H, OCH₃-Pmb); 1.98 (s, 3H, CH₃-NHAc); 1.48 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

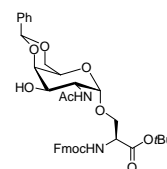
100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃), δ /ppm: 171.51, 169.33 (2C, CO); 160.15 (1C, C_{para}-Pmb); 155.90 (1C, CO-Urethan); 143.68, 143.56 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.27 (2C, C4a-, C5a-

Fmoc); 129.94 (1C, C_{ipso}-Pmb); 127.80, 127.62, 127.07 (6C, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc, 2*C_{arom.}-Pmb); 124.95, 124.88 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.05 (2C, C4-, C5-Fmoc); 113.55 (2C, C_{arom.}-Pmb); 101.11, 99.51 (2C, CH-Pmb, C1); 83.13 (1C, C_q-*t*Bu); 75.26 (1C, C3); 69.07 (2C, C4, S^β); 67.19 (1C, CH₂-Fmoc); 63.38 (1C, C5); 60.36 (1C, C6); 55.27 (1C, OCH₃-Pmb); 54.87 (1C, S^α); 50.17 (1C, C2); 47.03 (1C, C9-Fmoc); 28.00 (3C, CH₃-*t*Bu); 23.19 (1C, CH₃-NHAc).

N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester **16*

[Fmoc-Ser(α -4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu]

Man löst 5 g (7.02 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-*Ot*Bu **13** in 100 ml absol. MeOH. Der pH-Wert wird durch tropfenweise Zugabe von frisch hergestellter Natriummethanolat-Lösung auf 8.5-9.0 eingestellt. Man verfolgt den Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie und



bricht die Reaktion nach 4 h durch Zugabe von stark saurem Ionenaustauscher *Amberlite*[®] *IR-120* (H-Form) ab. Nach Filtration wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wird i. Vak. getrocknet und ohne weitere Reinigung in den nächsten Schritt eingesetzt.

Man löst das getrocknete Rohprodukt in 300 ml absol. Acetonitril und versetzt mit 2.10 ml (13.90 mmol) Benzaldehyd-dimethylacetal. Durch Zugabe von *p*-Toluolsulfonsäure wird der pH-Wert der Lösung auf 4 eingestellt und man rührt 18 h bei Raumtemperatur. Man neutralisiert das Reaktionsgemisch durch Zugabe einiger Tropfen Triethylamin und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Mittels Flashchromatographie an 600 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 1:2) erfolgt die Reinigung des Rohprodukts.

Ausb.: 3 g (63%; zwei Stufen); farbloser amorpher Feststoff; R_f = 0.09 (CH/EE 1:2);

$[\alpha]_D^{23} = 2.0$ (c = 2.5, CHCl₃).

C₃₇H₄₂N₂O₁₀ [674.28]

ESI-MS (positiv), m/z: 641.53 ([M-*t*Bu+Na+H]⁺, ber.: 641.16); 697.53 ([M+Na]⁺, ber.: 697.27); 713.52 ([M+K]⁺, ber.: 713.39).

400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) (¹H, COSY), δ /ppm: 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.41 Hz); 7.63 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.52-7.47 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc); 7.40-7.29 (m, 7H, H2-, H7-Fmoc, H_{arom.}-Bzn); 6.20 (d, 1H, NHAc, J_{NH,H2} = 8.16 Hz); 5.94 (d,

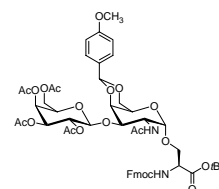
1H, NH-Fmoc, $J_{\text{NH},\text{S}\alpha} = 8.20$ Hz); 5.48 (s, 1H, CH-Bzn); 4.88 (d, 1H, H1, $J_{\text{H1},\text{H2}} = 2.72$ Hz); 4.48-4.30 (m, 4H, H2, S $^{\alpha}$, CH₂-Fmoc); 4.21-4.16 (m, 2H, H9-Fmoc, H6a); 4.12-4.06 (m, 1H, H3); 3.93-3.90 (m, 2H, H6b, S $^{\beta}$ a); 3.86-3.80 (m, 2H, S $^{\beta}$ b, H4); 3.60 (s, 1H, H5); 2.01 (s, 3H, CH₃-NHAc); 1.44 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃) (¹³C, HMQC), δ/ppm : 173.00, 171.00 (2C, CO); 156.53 (1C, CO-Urethan); 143.72 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.28 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 136.98 (1C, C_{ipso}-Bzn); 128.95, 128.00, 126.31 (5C, C_{arom.}-Bzn); 127.80 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.12 (2C, C1-, C8-Fmoc); 119.87 (2C, C4-, C5-Fmoc); 101.27 (1C, CH-Bzn); 99.59 (1C, C1); 84.00 (1C, C_q-*t*Bu); 75.40 (1C, C3); 69.31 (1C, S $^{\beta}$); 69.22 (1C, C6); 68.50 (1C, C4); 67.29 (1C, CH₂-Fmoc); 63.51 (1C, C5); 55.11 (1C, S $^{\alpha}$); 50.42 (1C, C2); 47.11 (1C, H9-Fmoc); 28.00 (3C, CH₃-*t*Bu); 23.23 (1C, CH₃-NHAc).

***N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-*p*-methoxybenzyliden-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester 17**

[Fmoc-Ser(β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-*O*-Pmb-GalNAc)-*Ot*Bu]**

Eine Mischung aus 750 mg (1.10 mmol) Fmoc-Ser(α -4,6-*O*-Pmb-GalNAc)-*O**t*Bu **15** und 1.50 g Molekularsieb (4Å) in 20 ml absol. CH₂Cl₂/CH₃NO₂ (3:1) wird mit 555 mg (2.20 mmol) Hg(CN)₂ versetzt und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Die Mischung wird auf 0 °C gekühlt und mit 924 mg (2.24 mmol) α -Ac₄GalBr **5**, gelöst in 12 ml absol. CH₂Cl₂/CH₃NO₂ (3:1), langsam versetzt. Nach 5 h werden weitere 555 mg (2.20 mmol) Hg(CN)₂ zugegeben. Es wird 21 h gerührt, mit 20 ml CH₂Cl₂ verdünnt und über Hyflo[®] in eine ges. NaHCO₃-Lsg. filtriert. Die organische Phase wird dreimal mit 30 ml einer ges. NaHCO₃-Lösung, 30 ml einer ges. NaI-Lsg. und 30 ml einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Es wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Die Reinigung erfolgt durch Flashchromatographie an 80 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 1:2).



Ausb.: 884 mg (80%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.39$ (PE/EE 1:4); $[\alpha]_D^{23} = 51.0$ (c = 1, CH₂Cl₂); (Lit.:⁴² $[\alpha]_D^{23} = 53.4$ (c = 1, CH₂Cl₂)).

C₅₂H₆₂N₂O₂₀ [1035.0]

MALDI-TOF-MS (positiv, DHB), m/z : 1000.9 ($[M+Na-tBu]^+$, ber.: 1000.9); 1056.9 ($[M+Na-H]^+$, ber.: 1057.0); 1057.9 ($[M+Na]^+$, ber.: 1058.0); 1073.9 ($[M+K]^+$, ber.: 1074.1).

300 MHz 1H -NMR ($CDCl_3$) (1H , COSY), δ/ppm : 7.78 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.44$ Hz); 7.59 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.47-7.28 (m, 6H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{meta} -Pmb); 6.86 (2*d, 2H, H_{ortho} -Pmb, $J_{Hortho,Hmeta} = 8.78$ Hz); 5.78 (d, 1H, NHAc, $J_{NH,H2} = 7.85$ Hz); 5.68 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{NH,S\alpha} = 8.60$ Hz); 5.48 (s, 1H, CH-Pmb); 5.34 (d, 1H, H4', $J_{H3',H4'} = 2.76$ Hz); 5.13 (dd, 1H, H2', $J_{H1',H2'} = 7.80$ Hz, $J_{H2',H3'} = 10.14$ Hz); 4.98-4.92 (m, 2H, H1, H3'); 4.51-4.46 (m, 2H, H1', H2); 4.45-4.30 (m, 3H, S^α , CH_2 -Fmoc); 4.25-3.83 (m, 9H, H5, H5', H6, H6', S^β , H9-Fmoc); 3.78, 3.77 (2*s, 3H, OCH_3 -Pmb); 3.72-3.55 (m, 2H, H3, H4); 2.13 (s, 3H, CH_3 -NHAc); 2.01, 1.99, 1.94, 1.92 (4*s, 12H, CH_3 -Ac); 1.47 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu).

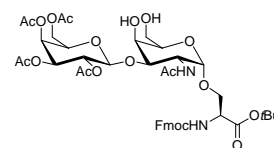
75.5 MHz ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) (^{13}C , HMQC), δ/ppm : 170.26, 170.12, 169.54, 169.45 (6C, CO); 159.99 (1C, C_{para} -Pmb); 155.85 (1C, CO-Urethan); 143.63 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.31 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 130.14 (1C, C_{ipso} -Pmb); 127.86, 127.49, 127.33, 127.11, 124.85, 120.13 (10C, C1-, C2-, C3-, C4-, C5-, C6-, C7-, C8-Fmoc, $C_{arom.}$ -Pmb); 113.51 (2C, $C_{arom.}$ -Pmb); 100.96, 100.63 (2C, CH-Pmb, C1'); 99.39 (1C, C1); 83.02 (1C, C_q -*t*Bu); 77.81 (1C, C3); 75.35, 74.00, 70.99, 70.81, 69.80, 68.82 (5C, C2', C3', C4, C5, C5'); 69.03 (1C, S^β); 67.16 (1C, CH_2 -Fmoc); 66.95 (1C, C4'); 64.44, 61.38 (2C, C6, C6'); 55.28, 54.98 (1C, OCH_3 -Pmb); 28.01 (3C, CH_3 -*t*Bu); 23.34 (1C, CH_3 -NHAc); 20.70, 20.66, 20.54 (4C, CH_3 -Ac).

Signalverdopplung ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Konformere zurückzuführen.

***N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester 18**
[Fmoc-Ser(β -Ac₄Gal-(1→3)- α -GalNAc)-*Ot*Bu]**

a)

Zu 870 mg (0.85 mmol) Fmoc-Ser(β -Ac₄Gal-(1→3)- α -4,6-*O*-Pmb-GalNAc)-*O**t*Bu **17** in 30 ml Acetonitril/Wasser (9:1), gibt man 670 mg (1.24 mmol) $Ce(NH_4)_2(NO_2)_6$ und rührt bei Raumtemp. 45 min. Anschließend wird mit 30 ml Wasser verdünnt und mit ges. $NaHCO_3$ -Lsg. neutralisiert. Nach Entfernen des Acetonitrils i. Vak.



wird die wässrige Phase dreimal mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit jeweils 30 ml einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie (Laufmittel: EE) gereinigt.

Ausb.: 460 mg (60%); R_f = 0.12 (EE); (Lit.:⁴² Ausb.: 76%).

b)

Zu 4.70 g (4.54 mmol) Fmoc-Ser(β-Ac₄Gal-(1→3)-α-4,6-O-Pmb-GalNAc)-OtBu **17** gibt man 50 ml 80%ige Essigsäure und rührt 1 h bei Raumtemperatur. Es werden 20 ml Toluol zugesetzt, bevor i. Vak. eingengt wird. Das Rohprodukt wird an 200 g Kieselgel mittels Flashchromatographie gereinigt (Laufmittel: EE).

Ausb.: 3.09 g (74%); $[\alpha]_D^{23} = 51.7$ (c = 1, CH₂Cl₂); (Lit.:⁴² $[\alpha]_D^{23} = 50.6$ (c = 1, CH₂Cl₂)).

C₄₄H₅₆N₂O₁₉ [916.35]

MALDI-TOF-MS (positiv, DHB), m/z: 940.0 ([M+Na]⁺, ber.: 939.9); 956.0 ([M+K]⁺, ber.: 956.0); 962.8 ([M+2Na]⁺, ber.: 962.9).

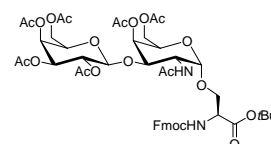
400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) (¹H, COSY), δ/ppm: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.80 Hz); 7.56 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.00 Hz); 7.33-7.25 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 5.93 (d, 1H, NHAc, J_{NH,H2} = 9.95 Hz); 5.85 (d, 1H, NH-Fmoc, J_{NH,Sα} = 8.60 Hz); 5.31 (d, 1H, H4', J_{H3',H4'} = 2.72 Hz); 5.10 (t, 1H, H2', J_{H2',H3'} = J_{H1',H2'} = 10.12 Hz); 4.92 (dd, 1H, H3', J_{H3',H4'} = 3.09 Hz, J_{H2',H3'} = 10.12 Hz); 4.82 (s_b, 1H, H1); 4.49-4.46 (m, 2H, H1', H2); 4.44-4.36 (m, 3H, S^α, CH₂-Fmoc); 4.16 (t, 1H, H9-Fmoc, J_{H9,CH2} = 6.60 Hz); 4.10-3.98 (m, 4H, H4, H6a, S^β); 3.94-3.90 (m, 1H, H6b); 3.88-3.71 (m, 4H, H5, H5', H6'); 3.67 (dd, 1H, H3, J_{H3,H4} = 2.70 Hz, J_{H2,H3} = 10.56 Hz); 2.76 (s_b, 2H, OH); 2.10, 2.01, 1.96, 1.93, 1.88 (5*s, 15H, CH₃-Ac); 1.44 (s, 9H, CH₃-tBu).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 170.34, 170.16, 170.07, 169.30 (5C, CO); 155.90 (1C, CO-Urethan); 143.62 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.24 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 127.82 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.07 (2C, C2-, C7-Fmoc); 124.92 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.08 (2C, C4-, C5-Fmoc); 101.43 (1C, C1'); 99.09 (1C, C1); 83.06 (1C, C_q-tBu); 78.03 (1C, C3); 70.90, 70.57, 69.98 (4C, C3', C4, C5, C5'); 68.98 (1C, S^β); 68.50 (1C, C2'); 67.02, 66.83 (2C, CH₂-Fmoc, C4'); 62.68 (1C, C6); 61.33 (1C, C6'); 55.00 (1C, S^α); 47.62 (1C, C2); 47.08 (1C, C9-Fmoc); 27.97 (3C, CH₃-tBu); 23.15 (1C, CH₃-NHAc); 20.66, 20.60, 20.58, 20.52 (4C, CH₃-Ac).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester 19**

[Fmoc-Ser(β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α -Ac₂GalNAc)-OtBu]

Eine Lösung von 625 mg (0.68 mmol) Fmoc-Ser(β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-OtBu **18** in 27 ml Pyridin/Acetanhydrid (3:1)



wird 17 h bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird auf Eis

gegossen und die wässrige Phase dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Man wäscht die vereinigten organischen Phasen zweimal mit jeweils 20 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. und einer ges. NaCl-Lösung. Es wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird an 50 g Kieselgel mittels Flashchromatographie (Laufmittel: EE) gereinigt.

Ausb.: 592 mg (87%); R_f = 0.58 (EE); $[\alpha]_D^{23} = 51.7$ (c = 1, CH₂Cl₂); (Lit.:⁴² Ausb.: 88%; $[\alpha]_D^{23} = 53.0$ (c = 1, CH₂Cl₂)).

C₄₈H₆₀N₂O₂₁ [1000.37]

MALDI-TOF-MS (positiv, DHB), m/z: 1024.5 ([M+Na]⁺, ber.: 1024.0); 1040.6 ([M+K]⁺, ber.: 1040.1).

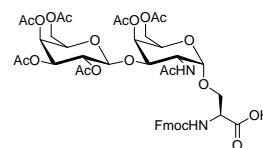
400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) (¹H, COSY), δ /ppm: 7.78 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.80 Hz); 7.65 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.00 Hz); 7.48-7.35 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 5.81 (m, 2H, NHAc, NH-Fmoc); 5.42 (m, 2H, H4, H4'); 5.20 (dd, 1H, H2', J_{H1',H2'} = 8.25 Hz, J_{H2',H3'} = 10.56 Hz); 5.03 (dd, 1H, H3', J_{H3',H4'} = 3.21 Hz, J_{H2',H3'} = 10.45 Hz); 5.00 (sb, 1H, H1); 4.65-4.45 (m, 5H, H1', H2, CH₂-Fmoc, S^α); 4.31 (t, 1H, H9-Fmoc, J_{H9,CH2} = 6.60 Hz); 4.20-4.14 (m, 3H, H6, H6a'); 4.13-4.10 (m, 1H, H6b'); 4.04-3.98 (m, 2H, S^β); 3.93-3.90 (m, 2H, H5-, H5'); 3.80 (dd, 1H, H3, J_{H3,H4} = 2.72 Hz, J_{H2,H3} = 10.45 Hz); 2.20 (s, 3H, CH₃-NHAc); 2.17, 2.10, 2.06, 2.04, 2.02 (6*s, 18H, CH₃-Ac); 1.55 (s, 9H, CH₃-tBu).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃) (¹³C, HMQC), δ /ppm: 170.45, 170.34, 169.66, 168.93 (8C, CO); 155.83 (1C, CO-Urethan); 143.62 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.30 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 127.84 (2C, C2-, C7-Fmoc); 124.83 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.09 (2C, C4-, C5-Fmoc); 100.49 (1C, C1'); 98.58 (1C, C1); 83.08 (1C, C_q-tBu); 73.10, 70.86, 70.68 (4C, C3', C4, C5, C5'); 68.62 (1C, C2'); 67.78 (1C, S^β); 67.11 (1C, CH₂-Fmoc); 66.69 (1C, C4');

62.61 (1C, C6); 61.02 (1C, C6'); 54.80 (1C, S^α); 48.61 (1C, C2); 47.05 (1C, C9-Fmoc); 27.98 (3C, CH₃-*t*Bu); 23.22 (1C, CH₃-NHAc); 20.67, 20.51 (6C, CH₃-Ac).

***N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-serin 20**
[Fmoc-Ser(β-Ac₄Gal-(1→3)-α-Ac₂GalNAc)-OH]

Man gibt 15 ml TFA und 1.50 ml Anisol zu 530 mg (0.53 mmol) Fmoc-Ser(β-Ac₄Gal-(1→3)-α-Ac₂GalNAc)-*O**t*Bu **19** und rührt 1 h bei Raumtemperatur. Die TFA wird destillativ entfernt, und es wird dreimal mit jeweils 30 ml Toluol kodestilliert. Das



Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 160 g Kieselgel (Laufmittel: EE/EtOH/AcOH 10:1:0.1) gereinigt, wodurch man einen farblosen, amorphen Feststoff erhält.

Ausb.: 399 mg (80%); R_F = 0.14 (EE/EtOH/AcOH 10:1:0.1); $[\alpha]_D^{23} = 100.1$ (c = 1, CH₂Cl₂); (Lit.:⁴² Ausb.: 84%, $[\alpha]_D^{23} = 102.9$ (c = 1, CH₂Cl₂)).

C₄₄H₅₂N₂O₂₁ [944.31]

ESI-MS (positiv), m/z: 883.3 ([M-*t*Bu+H+Na]⁺, ber.: 883.3); 916.5 ([M+H]⁺, ber.: 917.4); 939.2 ([M+Na]⁺, ber.: 939.3).

400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) (¹H, COSY), δ/ppm: 7.78 (m, 2H, H4-, H5-Fmoc); 7.65-7.52 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.43-7.35 (m, 2H, H3-, H8-Fmoc); 7.33-7.25 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc); 6.15 (m, 1H, NHAc); 5.87 (m, 1H, NH-Fmoc); 5.38 (s_b, 1H, H4); 5.31, 5.15 (2*m, 1H, H4'); 5.04 (dd, 1H, H2', J_{H1',H2'} = 7.70 Hz, J_{H2',H3'} = 9.83 Hz); 5.00 (d, 1H, H1, J_{H1,H2} = 2.73 Hz); 5.02, 4.93 (2*dd, 1H, H3', J_{H3',H4'} = 3.14 Hz, J_{H2',H3'} = 9.83 Hz); 4.84, 4.64 (2*d, 1H, H1', J_{H1',H2'} = 7.77 Hz); [4.50-4.33 (m, 3H), 4.25-3.70 (m, 11H)] (H2, H3, H5, H5', H6, H6', H9-Fmoc, CH₂-Fmoc, S^α, S^β); 2.10, 2.08, 2.06, 2.05, 2.02, 1.99, 1.97 (7*s, 21H, CH₃-Ac, CH₃-NHAc).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 170.47, 170.24, 170.00, 169.81 (8C, CO); 155.90 (1C, CO-Urethan); 143.80, 143.55 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.27, 141.15 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 127.91, 127.79, 127.08 (4C, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc); 125.30 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.03 (2C, C4-, C5-Fmoc); 100.70 (1C, C1'); 97.80 (1C, C1); 77.58 (1C, C3); 72.70, 70.76, 70.70, 70.40 (4C, C3', C4, C5, C5'); 69.00 (1C, S^β); 68.91, 68.58, 68.25,

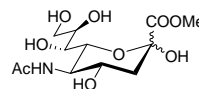
67.00 (2C, CH₂-Fmoc, C2'); 66.70 (1C, C4'); 62.95 (1C, C6); 61.10 (1C, C6'); 54.00 (1C, S^α); 49.30 (1C, C2); 47.24, 47.03 (1C, C9-Fmoc); 23.49, 22.85 (1C, CH₃-NHAc); 20.73, 20.70, 20.45, 20.43, 20.37 (6C, CH₃-Ac).

Signalverdopplung ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Konformere zurückzuführen.

5.4 Versuche zu Kapitel 3.1.3

Methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonat **22** [α,β -Neu5NAcCOOMe]

Zu einer Suspension von 9 g (29.10 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure **21** in 500 ml MeOH gibt man 4.50 g i. Vak. getrockneten



Inonenaustauscher *Dowex*[®] 50 X8-200. Es wird 3 h bei Raumtemp. gerührt, über *Hyflo*[®] filtriert und mit 100 ml MeOH gewaschen. Die Lösung wird i. Vak. eingengt und das Rohprodukt durch Flashchromatographie an 100 g Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 2:1) gereinigt.

Ausb.: 7.85 g (84%); farbloser amorpher Feststoff; R_f = 0.34 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1).

C₁₂H₂₁NO₉ [323.30]

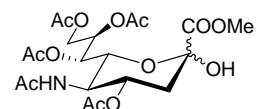
ESI-MS (positiv), m/z: 346.2 ([M+Na]⁺, ber.:346.3); 669.5 ([2M+Na]⁺, ber.: 669.6); 685.5 ([2M+K]⁺, ber.: 685.7).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 175.11, 171.89 (2C, CO); 96.70 (1C, C2''); 72.12, 71.69, 70.20, 67.85 (4C, C4'', C6'', C7'', C8''); 64.83 (1C, C9''); 54.31, 53.17 (2C, α,β -OCH₃); 40.75 (1C, C5''); 22.66 (1C, C3'').

Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α/β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonat **23**

[α,β -NeuAc₄5NAcCOOMe]

Man legt in einem 50 ml-Zweihalskolben ein Gemisch aus 15 ml Ac₂O und 70 μ l Perchlorsäure (60%) vor, erwärmt auf 40 °C und gibt portionsweise 3 g (9.27 mmol) α,β -Neu5NAcCOOMe **22** zu.



Binnen 5 min werden erneut erst 10, dann 5 μ l Perchlorsäure (60%) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 3.5 h auf 40 °C erhitzt.

Das überschüssige Ac₂O wird i. Vak. entfernt und das Rohprodukt durch Flashchromatographie an 230 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 1:2) gereinigt.

Ausb.: 3.54 g (77%); farbloser amorpher Feststoff; R_f = 0.15 (CH₂Cl₂/MeOH 10:0.5).

C₂₀H₂₉NO₁₃ [491.16]

ESI-MS (positiv), m/z: 492.3 ([M+H]⁺, ber.: 492.2); 514.4 ([M+Na]⁺, ber.: 514.2).

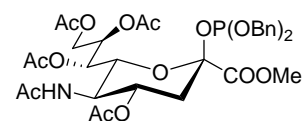
300 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ /ppm: 6.08 (d, 1H, NH'', J_{NH'',H5''} = 9.57 Hz); 5.36-5.34 (m, 1H, H7''); 5.22-5.09 (m, 2H, H8'', H4''); 4.90 (s_b, 1H, OH); 4.54 (dd, 1H, H9a'', J_{H8'',H9a''} = 2.22 Hz, J_{H9a'',H9b''} = 12.51 Hz); 4.23-3.95 (m, 3H, H5'', H6'', H9b''); 3.80 (s, 3H, OCH₃); 2.17 (d, 1H, H3'', J_{H3'',H4''} = 7.74 Hz); 2.10, 2.06, 1.98, 1.97, 1.85 (5*s, 15H, CH₃-Ac).

75.5 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃), δ /ppm: 171.32, 171.05, 170.83, 170.31, 168.98 (5C, CO); 94.88 (1C, C2''); 71.88, 71.31, 69.20, 68.28 (4C, C4'', C6'', C7'', C8''); 62.59 (1C, C9''); 53.32 (1C, OCH₃); 49.23 (1C, C5''); 36.14 (1C, C3''); 23.05 (1C, CH₃-NHAc); 21.00, 20.84, 20.75 (3C, CH₃-Ac).

Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-(dibenzylphosphityl)-3,5-dideoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonat **24**

[α/β -NeuAc₄5NAcP(OBn)₂COOMe]

Es werden 80 mg (0.16 mmol) α,β -NeuAc₄5NAcCOOMe **23** in 3 ml absol. THF gelöst, mit 48 mg (0.68 mmol) 1*H*-Tetrazol versetzt und 0.13 ml (0.38 mmol) Phosphorigsäure-



ribenzylesterdiisopropylamid langsam zutropft. Noch während des Zutropfens wird die Reaktionslösung milchig. Es wird weitere 30 min gerührt, mit 4 ml CH₂Cl₂ und 2 ml 0.3N HCl versetzt und die Phasen separiert. Die organische Phase wird mit 5 ml ges. NaHCO₃-

Lsg. und 5 ml Eiswasser gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. erfolgt die Reinigung des Rohprodukts durch Flashchromatographie an 40 g Kieselgel (Laufmittel: EE/CH 2:1). Die beiden Anomere α und β entstehen im Verhältnis von ca. 1:5.

Ausb.: 32 mg (13%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.45$ (EE/CH 2.5:1).

$\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{NO}_{15}\text{P}$ [735.23]

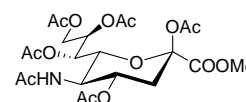
FD-MS, m/z : 736.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 736.2).

300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ/ppm : 7.43-7.23 (m, 10H, $\text{H}_{\text{arom.}-\text{Bn}}$); 5.29-4.80 (m, 3H, $\text{H}4''$, $\text{H}7''$, $\text{H}8''$); 4.55 (d, 1H, $\text{H}9\text{a}''$, $J_{\text{H}9\text{a}'',\text{H}9\text{b}''} = 12.48$ Hz); 4.35 (d, 1H, $\text{H}9\text{b}''$, $J_{\text{H}9\text{a}'',\text{H}9\text{b}''} = 12.48$ Hz); 4.12-3.93 (m, 2H, $\text{H}5''$, $\text{H}6''$); 3.70 (s, 3H, OCH_3); 2.55 (dd, 1H, $\text{H}3''_{\text{eq.}}$ (α), $J_{\text{H}3''_{\text{eq.}},\text{H}4''} = 4.80$ Hz, $J_{\text{H}3''_{\text{eq.}},\text{H}3''_{\text{ax.}}} = 13.62$ Hz); 2.37 (dd, 1H, $\text{H}3''_{\text{eq.}}$ (β), $J_{\text{H}3''_{\text{eq.}},\text{H}4''} = 4.80$ Hz, $J_{\text{H}3''_{\text{eq.}},\text{H}3''_{\text{ax.}}} = 12.87$ Hz); 2.01, 2.00, 1.98, 1.96 (4*s, 13H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$, $\text{H}3''_{\text{ax.}}$); 1.76 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-NHAc}$).

Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonat 25

[β -NeuAc₅NAcCOOMe]

Man löst 2.14 g (4.35 mmol) α,β -NeuAc₄5NAcCOOMe **23** in 27 ml Pyridin, kühlt die Reaktionslösung auf 0 °C und tropft unter Argon 32 ml Ac_2O zu. Nach beendeter Zugabe erwärmt man die



Reaktionslösung auf Raumtemp. und rührt 21 h. Überschüssiges Ac_2O und Pyridin werden i. Vak. entfernt, und der Rückstand dreimal mit jeweils 15 ml Toluol koevaporiert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt mittels Flashchromatographie an 50 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 1:2).

Ausb.: 1.90 g (82%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.35$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:0.5).

$\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{NO}_{14}$ [533.17]

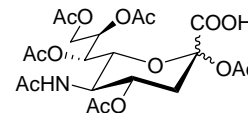
ESI-MS (positiv), m/z : 534.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 534.2).

300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ/ppm : 5.41-5.32 (m, 2H, $\text{H}7''$, $\text{H}8''$); 5.24-5.16 (m, 1H, $\text{H}4''$); 5.06-4.98 (m, 1H, $\text{H}6''$); 4.66 (dd, 1H, $\text{H}9\text{a}''$, $J_{\text{H}8'',\text{H}9\text{a}''} = 2.55$ Hz, $J_{\text{H}9\text{a}'',\text{H}9\text{b}''} = 12.48$ Hz); 4.12- 3.99 (m, 2H, $\text{H}5''$, $\text{H}9\text{b}''$); 3.75 (s, 3H, OCH_3); 2.51 (dd, 1H, $\text{H}3''_{\text{eq.}}$, $J_{\text{H}3''_{\text{eq.}},\text{H}4''} = 4.77$ Hz, $J_{\text{H}3''_{\text{eq.}},\text{H}3''_{\text{ax.}}} = 13.23$ Hz); 2.11, 2.09, 2.02, 2.01, 2.00, 1.86 (6*s, $\text{CH}_3\text{-Ac}$); 1.91 (m, 1H, $\text{H}3''_{\text{ax.}}$).

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonat **26**

[α,β -NeuAc₅5NAcCOOH]

In 150 ml Pyridin werden 12 g (38.80 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure **21** gelöst. Unter Eiskühlung tropft man 80 ml Ac₂O zu. Im folgenden wird 1 h bei 0 °C und 23 h bei Raumtemp. gerührt.



Überschüssiges Pyridin und Ac₂O werden abdestilliert, und der Rückstand wird dreimal mit jeweils 30 ml Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird i. Hochvak. getrocknet und ohne weitere Charakterisierung weiter verwendet.

Ausb.: 20.15 g (quant.); hellgelber Feststoff.

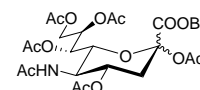
C₂₁H₂₉NO₁₄ [519.44]

ESI-MS (positiv), m/z: 520.5 ([M+H]⁺, ber.: 520.4); 542.4 ([M+Na]⁺, ber.: 542.4).

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosat **27**

[α,β -NeuAc₅5NAcCOOBn]

Zu einer Lösung von 20.15 g (38.80 mmol) α,β -NeuAc₅5NAcCOOH **26** in 150 ml EtOH gibt man portionsweise 23.35 g (71.68 mmol) Cs₂CO₃, gelöst in 32 ml H₂O. Nach abgeschlossener Gasentwicklung



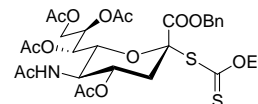
wird 30 min bei Raumtemp. gerührt, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit jeweils 30 ml Toluol kodestilliert. Man nimmt den Rückstand in 100 ml DMF auf und gibt innerhalb von 1 h 56 ml (664 mmol, 17.1 Äquiv.) Benzylbromid zu. Das Reaktionsgemisch wird 20 h bei Raumtemp. gerührt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird in 300 ml Ethylacetat suspendiert, filtriert, mit 200 ml Ethylacetat gewaschen, und die vereinigten Filtrate werden erneut eingengt. Die Reinigung erfolgt durch Flashchromatographie an 800 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 4:1 → EE). Der erhaltene gelbe Feststoff wird ohne weitere Charakterisierung eingesetzt.

Ausb.: 11.57 g (49%); hellgelber Feststoff; R_f(α) = 0.34; R_f(β) = 0.25 (EE).

O*-Ethyl-*S*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]dithiocarbonat **29*

[α -NeuAc₄5NAcCOOBnXan]

Ein Gemisch aus 11.56 g (18.98 mmol) α,β -NeuAc₅NAcCOOBn **27**, 25 ml Acetylchlorid und 5 Tropfen Wasser wird 4 d unter Lichtausschluß und Argonatmosphäre bei Raumtemp. gerührt.



Man engt das Reaktionsgemisch i. Vak. ein, kodestilliert dreimal mit je 25 ml Toluol und trocknet das Rohprodukt **28** im Vakuum. Rohprodukt **28** wird in 200 ml EtOH aufgenommen, mit 5.46 g (34.06 mmol) Kaliummethylxanthogenat versetzt und 16 h bei Raumtemp. unter Argon und Lichtausschluß gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 350 ml CH₂Cl₂ verdünnt und zweimal gegen jeweils 150 ml H₂O geschüttelt. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit.

Um einen vollständigen Umsatz zu erreichen, wird diese Vorschrift ein weiteres Mal mit dem erhaltenen Produktgemisch durchgeführt.

Die Reinigung erfolgt durch Flashchromatographie an 600 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 2:1 → EE).

Ausb.: 5.50 g (43%); hellgelber, amorpher Feststoff; $R_f = 0.30$ (EE); $[\alpha]_D^{22} = 33.1$ ($c = 1$, CHCl₃).

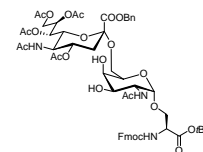
C₂₉H₃₇NO₁₃S₂ [671.17]

ESI-MS (positiv), m/z : 694.3 ([M+Na]⁺, ber.: 694.2).

300 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ /ppm: 7.42-7.33 (m, 5H, H_{arom.}-Bn); 5.33-5.15 (m, 3H, H7'', H8'', NH''); 5.23 (m, 2H, OCH₂-Bn); 4.77 (dt, 1H, H4'', J_{H3''eq.,H4''} = 4.38 Hz, J_{H4'',H5''} = 11.11 Hz); 4.59 (dd, 1H, H6'', J_{H6'',H7''} = 1.55 Hz, J_{H5'',H6''} = 10.54 Hz); 4.50-3.96 (m, 5H, H9'', OCH₂CH₃, H5''); 2.60 (dd, 1H, H3''eq., J_{H3''eq.,H4''} = 4.54 Hz, J_{H3''eq.,H3''ax.} = 12.22 Hz); 2.12, 2.08, 2.07, 2.01, 2.00, 1.86 (6*s, 19H, CH₃-Ac, H3''ax.).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester **30**
[Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)- α -GalNAc)-*O*tBu]**

Man kodestilliert 259 mg (0.44 mmol) Fmoc-Ser(α -GalNAc)-*O*tBu **14** und 773 mg (1.15 mmol) α -NeuAc₄5NAcCOOBnXan **29** mit je 20 ml absol. Toluol und trocknet im Vakuum. Man löst die Edukte in 15 ml



CH₃CN/CH₂Cl₂ (2:1), gibt 1 g gepulvertes Molekularsieb (4Å) zu und rührt die Mischung 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Lösung auf –65 °C gekühlt und unter Licht- und Feuchtigkeitsausschluß nacheinander mit 299 mg (1.17 mmol) Silbertriflat, sowie 719 µl gekühlter 1.6 M MSB-Lösung (in 1,2-Dichlorethan) tropfenweise versetzt.

(Darstellung der MSB-Lösung: Man gibt nacheinander 355 µl Dimethyldisulfid und 205 µl Brom zu 5 ml absol. 1,2-Dichlorethan und rührt die Reaktionslösung 20 h unter Licht- und Sauerstoffausschluß.)

Die Reaktionsmischung wird 4.5 h bei –65 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.39 ml *N*-Ethyldiisopropylamin wird weitere 15 min bei der angegebenen Temperatur gerührt, bevor man das Gemisch auf Raumtemp. erwärmen lässt. Es wird mit 20 ml CH₂Cl₂ verdünnt und über Hyflo[®] filtriert. Nachdem man die Lösungsmittel i. Vak. entfernt hat, erfolgt die Reinigung des Rohprodukts durch Flashchromatographie an 20 g Kieselgel (Laufmittel: EE→ EE/EtOH 50:1→ EE/EtOH 40:1).

Ausb.: 290 mg (58%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.15$ (CH₂Cl₂/MeOH 10:0.5); $[\alpha]_D^{22} = 4.0$ (c = 1, CH₂Cl₂).

C₅₆H₆₉N₃O₂₂ [1135.44]

ESI-MS (positiv), m/z: 1158.6 ([M+Na]⁺, ber.: 1158.4); 1174.6 ([M+K]⁺, ber.: 1174.5).

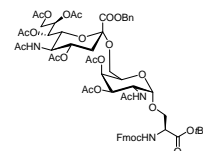
400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) (¹H, COSY), δ /ppm: 7.72 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.44$ Hz); 7.56 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.04$ Hz); 7.40-7.28 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{arom.}-Bn); 6.51 (d, 1H, NHAc, $J_{NH,H2} = 7.35$ Hz); 5.83 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{NH,S\alpha} = 9.45$ Hz); 5.32-5.25 (m, 2H, H7'' (5.31), H8'' (5.28)); 5.22-5.14 (m, 2H, CH₂-Bn); 4.83-4.72 (m, 2H, H4'' (4.80), H1 (4.73)); 4.41-4.20 (m, 6H, S ^{α} (4.38), CH₂-Fmoc (4.34), H9a'' (4.31), H2 (4.23), H9-Fmoc (4.21)); 4.07-4.00 (m, 3H, H5'' (4.05), H6'' (4.04), H9b'' (4.02)); 3.92-3.50 (m, 7H, S ^{β a} (3.89), H6a (3.84), S ^{β b} (3.73), H4 (3.76), H5 (3.69), H3 (3.68), H6b (3.51)); 2.58 (dd, 1H, H3''_{eq.}, $J_{H3''eq.,H4''} = 4.72$ Hz, $J_{H3''eq.,H3''ax.} =$

12.92 Hz); 2.11, 2.03, 2.01, 1.98 (4*s, 18H, CH₃-Ac); 1.91 (m, 1H, H_{3''}_{ax.}); 1.44 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 173.39, 170.95, 170.71, 170.25, 170.07, 169.59 (7C, CO); 167.41 (1C, C1''); 155.90 (1C, CO-Urethan); 143.63 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.23 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 134.76 (1C, C_{ipso}-Bn); 128.72, 128.56, 128.42, 127.74, 127.06 (9C, C3-, C6-, C2-, C7-Fmoc, C_{arom.}-Bn (5C)); 124.97 (2C, C1-, C8-Fmoc); 119.98 (2C, C4-, C5-Fmoc); 98.90 (1C, C1); 98.84 (1C, C2''); 82.98 (1C, C_q-*t*Bu); 72.83 (1C, C6''); 70.50 (1C, C3); 69.30 (2C, C5, C7''); 68.90 (1C, C4''); 68.81 (1C, S^β); 68.25 (1C, C4); 67.87 (1C, CH₂-Bn); 67.44 (1C, C8''); 67.32 (1C, CH₂-Fmoc); 63.80 (1C, C6); 62.65 (1C, C9''); 54.90 (1C, S^α); 50.64 (1C, C2); 49.16 (1C, C5''); 47.21 (1C, C9-Fmoc); 37.50 (1C, C3''); 27.96 (3C, CH₃-*t*Bu); 23.08, 22.85, 21.03, 20.75 (6C, CH₃-Ac, CH₃-NHAc).

***N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester **31**
[Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)- α -Ac₂GalNAc)-*O**t*Bu]**

Man löst 290 mg (0.26 mmol) Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)- α -GalNAc)-*O**t*Bu **30** bei 0 °C in 3.5 ml Pyridin und tropft 2 ml Ac₂O zu. Die Reaktionslösung wird 19 h bei Raumtemp. gerührt, mit 30 ml CH₂Cl₂ verdünnt, mit Eis versetzt und die wässrige Phase dreimal mit jeweils 30 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg. sowie mit 30 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an 30 g Kieselgel (Laufmittel: EE).



Ausb.: 203 mg (65%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = 23.2$ (c = 1, CHCl₃); α : R_f = 0.15 (EE); β : R_f = 0.23 (EE).

C₆₂H₇₇N₃O₂₃ [1231.49]

ESI-MS (positiv), m/z: 1254.7 ([M+Na]⁺, ber.: 1254.5).

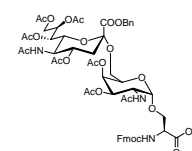
400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) (¹H, COSY), δ/ppm: 7.73 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.44 Hz); 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.04 Hz); 7.39-7.27 (m, 9H,

H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{arom.}-Bn); 5.79, 5.65 (2*d, 2H, NH-Fmoc, NHAc, J_{NH,Sα} = 9.76 Hz, J_{NH,H2} = 8.24 Hz); 5.33-5.24 (m, 2H, H7'' (5.30), H8'' (5.26)); 5.18-5.11 (m, 3H, H4 (5.16), CH₂-Bn (5.12)); 5.00 (dd, 1H, H3, J_{H3,H4} = 2.58 Hz, J_{H2,H3} = 11.40 Hz); 4.80-4.72 (m, 2H, H1 (4.78), H4'' (4.77)); 4.59-4.49 (m, 1H, H2); 4.45-4.32 (m, 3H, CH₂a-Fmoc (4.41), S^α (4.38), CH₂b-Fmoc (4.35)); 4.25-4.20 (m, 2H, H9a'' (4.23), H9-Fmoc (4.22)); 4.05-3.87 (m, 5H, H5'' (4.03), H9b'' (4.03), H6'' (4.01), S^βa, H5 (3.90)); 3.82-3.74 (m, 2H, S^βb (3.80), H6a (3.77)); 3.12 (dd, 1H, H6b, J_{H5,H6b} = 5.48 Hz, J_{H6a,b} = 10.56 Hz); 2.55 (dd, 1H, H3''_{eq.}, J_{H3''eq.,H4''} = 4.68 Hz, J_{H3''eq.,H3''ax.} = 12.88 Hz); 2.06, 2.01, 1.98, 1.96, 1.91 (5*s, 24H, CH₃-Ac); 1.88 (m, 1H, H3''_{ax.}); 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 170.90, 170.82, 170.65, 170.30, 170.12, 169.89, 169.70, 169.59 (9C, CO); 167.30 (1C, C1''); 155.60 (1C, CO-Urethan); 143.71 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.15 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 134.56 (1C, C_{ipso}-Bn); 128.62, 128.42, 128.40, 127.84, 127.12 (9C, C3-, C6-, C2-, C7-Fmoc, C_{arom.}-Bn (5C)); 125.07 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.00 (2C, C4-, C5-Fmoc); 98.88 (1C, C1); 98.58 (1C, C2''); 82.87 (1C, C_q-*t*Bu); 72.70 (1C, C6''); 69.30 (1C, C5); 68.10 (1C, C7''); 68.87 (1C, S^β); 68.85 (1C, C4''); 68.70 (1C, C3); 68.00 (1C, CH₂-Bn); 67.35 (1C, CH₂-Fmoc); 67.31 (1C, C4); 67.10 (1C, C8''); 63.52 (1C, C6); 62.43 (1C, C9''); 54.82 (1C, S^α); 49.12 (1C, C5''); 47.31 (1C, C2); 47.16 (1C, C9-Fmoc); 37.60 (1C, C3''); 27.98 (3C, CH₃-*t*Bu); 23.20, 23.14, 20.99, 20.75, 20.67, 20.62 (8C, CH₃-Ac, CH₃-NHAc).

***N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin **32**
[Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)- α -Ac₂GalNAc)-OH]**

Zu einer Mischung aus 5 ml CH₂Cl₂, 3 ml TFA und 0.5 ml Anisol gibt man 135 mg (0.11 mmol) Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)- α -Ac₂GalNAc)-*O**t*Bu **31**. Die Reaktionsmischung wird 6 h bei



Raumtemp. gerührt, i. Vak. von den flüchtigen Komponenten befreit und anschließend dreimal mit je 30 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt mittels Flashchromatographie an 20 g Kieselgel (Laufmittel: EE → EE/MeOH 2:1).

Ausb.: 119 mg (92%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.28$ (EE/MeOH 2:1); $[\alpha]_D^{22} = 24.2$ ($c = 1$, CHCl_3).

$\text{C}_{56}\text{H}_{65}\text{N}_3\text{O}_{24}$ [1163.40]

ESI-MS (positiv), m/z : 1168.7 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1186.4); 1202.9 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 1202.4).

400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) (^1H , COSY), δ/ppm : 8.11 (s_b , 1H, NH); 7.78 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H}3,\text{H}4} = J_{\text{H}5,\text{H}6} = 7.43$ Hz); 7.75 (d, 1H, NHAc, $J_{\text{H}2,\text{NH}} = 9.78$ Hz); 7.60 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H}1,\text{H}2} = J_{\text{H}7,\text{H}8} = 7.40$ Hz); 7.39-7.27 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, $\text{H}_{\text{arom.}}\text{-Bn}$); 5.30-5.11 (m, 5H, H4, H7'', H8'', $\text{CH}_2\text{-Bn}$); 4.98 (dd, 1H, H3, $J_{\text{H}3,\text{H}4} = 2.65$ Hz, $J_{\text{H}2,\text{H}3} = 11.51$ Hz); 4.85 (d, 1H, H1, $J_{\text{H}1,\text{H}2} = 2.45$ Hz); 4.68 (dt, 1H, H4'', $J_{\text{H}3''_{\text{eq.}},\text{H}4''} = 2.60$ Hz, $J_{\text{H}3''_{\text{ax.}},\text{H}4''} = 11.58$ Hz); 4.33 (d, 2H, S^β , $J_{S\alpha,S\beta} = 6.50$ Hz); 4.28-3.65 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, H9-Fmoc, H9'', S^α); 4.20-4.15 (m, 1H, H2); 4.05-3.96 (m, 2H, H5, H6''); 3.90-3.82 (m, 1H, H5''); 3.82-3.68 (m, 1H, H6a); 3.10 (dd, 1H, H6b, $J_{\text{H}5,\text{H}6b} = 5.52$ Hz, $J_{\text{H}6a,b} = 8.70$ Hz); 2.53 (dd, 1H, H3''_{eq.}, $J_{\text{H}3''_{\text{eq.}},\text{H}4''} = 4.20$ Hz, $J_{\text{H}3''_{\text{eq.}},\text{H}3''_{\text{ax.}}} = 12.30$ Hz); 2.04, 2.01, 1.98, 1.95, 1.91, 1.84, 1.80 (7*s, 25H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$, H3''_{ax.}).

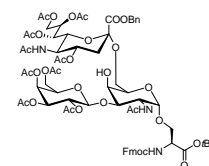
100.6 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) (^{13}C , HMQC), δ/ppm : 170.20, 169.79, 169.53, 169.00 (10C, CO, C1''); 158.85 (1C, CO-Urethan); 143.80 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.00 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 134.87 (1C, $\text{C}_{\text{ipso}}\text{-Bn}$); 129.02, 128.63, 128.20, 127.53, 127.10 (9C, C3-, C6-, C2-, C7-Fmoc, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-Bn}$ (5C)); 125.89, 125.07 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.10 (2C, C4-, C5-Fmoc); 98.57 (1C, C1); 98.09 (1C, C2''); 72.53 (1C, C6''); 69.35 (1C, C5); 68.00 (1C, C7''); 68.89 (1C, S^β); 68.76 (1C, C4''); 68.52 (1C, C3); 68.10 (1C, $\text{CH}_2\text{-Bn}$); 67.40 (1C, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$); 67.20 (1C, C4); 66.95 (1C, C8''); 63.00 (1C, C6); 62.10 (1C, C9''); 58.54 (1C, S^α); 49.00 (1C, C5''); 47.21 (1C, C2); 47.10 (1C, C9-Fmoc); 38.40 (1C, C3''); 23.20, 23.14, 20.99, 20.75, 20.67, 20.62 (8C, $\text{CH}_3\text{-Ac}$, $\text{CH}_3\text{-NHAc}$).

5.5 Versuche zu Kapitel 3.1.4

***N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-di-desoxy- α/β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-tert-butylester 33**

[Fmoc-Ser(β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)-[α/β -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -GalNAc)-OtBu]

Zu 20 ml einer Mischung aus CH₃CN/CH₂Cl₂ (2:1) gibt man 0.60 g (0.66 mmol) Fmoc-Ser(β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-OtBu **18**, 1.10 g (1.64 mmol) α -NeuAc₄5NAcCOOBnXan **29** und 1.50 g gepulvertes



Molekularsieb (4Å). Nach einstündigem Rühren unter Argon bei Raumtemp. werden 0.42 g (1.64 mmol) Silbertriflat 2 ml absol. CH₃CN zugegeben (Lichtausschluß) und die Reaktionsmischung wird auf -65 °C abgekühlt. Über einen Zeitraum von 15 min tropft man 1.02 ml einer auf 0 °C vorgekühlten 1.6 M Methylsulfenylbromidlösung in 1,2-Dichlorethan zu und rührt anschließend die Reaktionsmischung bei -65 °C weitere 4½ h (Darstellung der MSB-Lösung siehe Kapitel 5.4).

Nach Zugabe von 0.30 ml Diisopropylamin rührt man weitere 30 min bei -65 °C. Man lässt die Reaktionsmischung auf Raumtemp. erwärmen, verdünnt mit 50 ml CH₂Cl₂ und saugt über Hyflo[®] ab. Die resultierende Lösung wird i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Mittels Flashchromatographie an 180 g Kieselgel (Laufmittel: EE) wird das Glycal entfernt. Die Auftrennung des nicht umgesetzten Edukts sowie des α/β -Gemisches erfolgt mittels präp. HPLC (Luna C-18, Gradient (%CH₃CN): 55(0-15 min)-70(20-60 min)-80(100 min)).

α -Anomer:

Ausb.: 360 mg (38%); $R_f = 0.13$ (EE); $R_t = 24.13$ min (Luna C-18, Gradient (%CH₃CN): 55(0-10 min)-70(60 min)-100(80 min)); $[\alpha]_D^{22} = 22.1$ ($c = 1$, CH₂Cl₂); (Lit.⁴²: $[\alpha]_D^{23} = 24.6$ ($c = 1$, CH₂Cl₂)).

C₇₂H₉₁N₃O₂₉ [1461.57]

ESI-MS (positiv), m/z : 1489.4 ($[M+Na]^+$, ber.: 1489.4); 1505.3 ($[M+K]^+$, ber.: 1505.5).

400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) (¹H, COSY), δ /ppm: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.44$ Hz); 7.57 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.04$ Hz); 7.40-7.28 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{arom.}-Bn); 5.98, 5.80 (2*s_b, 2H, NH-Fmoc, NHAc); 5.36-5.30

(m, 3H, H4' (5.33), H7'', H8''); 5.28 (d, 1H, NH'', $J_{\text{NH}'',\text{H5}''} = 7.44$ Hz); 5.21-5.10 (m, 3H, H2' (5.11), CH₂-Bn (5.16)); 4.92 (dd, 1H, H3', $J_{\text{H3}',\text{H4}'} = 2.72$ Hz, $J_{\text{H2}',\text{H3}'} = 10.16$ Hz); 4.85-4.75 (m, 1H, H4''); 4.70 (sb, 1H, H1); 4.52-4.32 (m, 5H, H1' (4.50), H2 (4.46), S^α (4.34), CH₂-Fmoc (4.35)); 4.27 (dd, 1H, H9''a, $J_{\text{H8}'',\text{H9}''\text{a}} = 2.32$ Hz, $J_{\text{H9}''\text{a},\text{H9}''\text{b}} = 12.12$ Hz); 4.19 (t, 1H, H9-Fmoc, $J_{\text{H9},\text{CH2}} = 7.04$ Hz); 4.12-3.95 (m, 5H, H6' (4.09, 3.99), H5'' (4.04), H6'' (4.04), H9''b (4.04)); 3.90-3.52 (m, 8H, S^βa (3.90), H3 (3.63), H4, H5, H6 (3.85, 3.53), H5', S^βb (3.69)); 2.62 (dd, 1H, H3''_{eq.}, $J_{\text{H3}''\text{eq.},\text{H4}''} = 3.50$ Hz, $J_{\text{H3}''\text{eq.},\text{H3}''\text{ax.}} = 12.12$ Hz); 2.12, 2.08, 2.06, 2.01, 1.98, 1.97, 1.95, 1.93, 1.84 (9*s, 30H, CH₃-Ac, CH₃-NHAc); 1.91 (m, 1H, H3''_{ax.}); 1.44 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 170.75, 170.71, 170.22, 170.19, 170.15, 170.05, 169.55, 169.45 (11C, CO); 167.22 (1C, C1''); 156.02 (1C, CO-Urethan); 143.65 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.29 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 135.00 (1C, C_{ipso}-Bn); 128.70, 128.62, 128.28, 127.80, 127.12 (9C, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc, C_{arom.}-Bn (5C)); 124.88 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.08 (2C, C4-, C5-Fmoc); 101.49 (1C, C1'); 98.90, 98.84 (2C, C1, C2''); 83.00 (1C, C_q-*t*Bu); 77.39 (1C, C3); 72.80, 70.54, 69.10, 68.80, 67.68 (6C, C4, C5, C5', C6'', C7'', C8''); 70.82 (1C, C3'); 68.95 (1C, C4''); 68.57 (1C, C2'); 68.50 (1C, S^β); 67.87 (1C, CH₂-Bn); 67.25 (1C, CH₂-Fmoc); 66.82 (1C, C4'); 63.35 (1C, C6); 62.59 (1C, C9''); 60.89 (1C, C6'); 55.06 (1C, S^α); 49.32 (1C, C5''); 47.94, 47.20 (2C, C2, C9-Fmoc); 37.76 (1C, C3''); 27.97 (3C, CH₃-*t*Bu); 23.17, 23.11, 20.99, 20.82, 20.73, 20.62, 20.55, 20.48 (10C, CH₃-Ac, CH₃-NHAc).

β-Anomer:

Ausb.: 56 mg (6%); R_f = 0.13 (EE); $[\alpha]_D^{22} = 27.5$ (c = 1, CH₂Cl₂); (Lit.⁴²: $[\alpha]_D^{23} = 29.3$ (c = 1, CH₂Cl₂)).

ESI-MS (positiv), m/z: 1489.4 ([M+Na]⁺, ber.: 1489.4); 1505.3 ([M+K]⁺, ber.: 1505.5).

400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) (¹H, COSY), δ/ppm: 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H3},\text{H4}} = J_{\text{H5},\text{H6}} = 7.44$ Hz); 7.58 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H1},\text{H2}} = J_{\text{H7},\text{H8}} = 7.04$ Hz); 7.40-7.27 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{arom.}-Bn); 6.58 (d, 1H, NH'', $J_{\text{NH}'',\text{H5}''} = 9.54$ Hz); 6.15 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{\text{NH},\text{S}\alpha} = 7.44$ Hz); 5.38-5.31 (m, 3H, H4', H4'', H7''); 5.27-5.09 (m, 4H, CH₂-Bn, H2', H8''); 4.94 (d, 1H, H3', $J_{\text{H2}',\text{H3}'} = 9.50$ Hz); 4.84-4.72 (m, 2H, H1, H9''a); 4.58-4.40 (m, 3H, H1', H2, S^α); 4.38-4.34 (m, 2H, CH₂-Fmoc); 4.22 (t, 1H, H9-Fmoc, $J_{\text{H9},\text{CH2}} = 7.44$ Hz); 4.14-3.94 (m, 7H, H4, H5', H6', H5'', H6'', H9''b); 3.91-3.86 (m, 1H, S^βa); 3.79-3.75 (m, 2H, H5, H6a); 3.70-3.60 (m, 3H, S^βb, H3, H6b); 2.55 (dd, 1H, H3''_{eq.}, $J_{\text{H3}''\text{eq.},\text{H4}''} =$

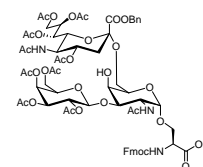
3.85 Hz, $J_{H3''_{eq},H3''_{ax}} = 12.31$ Hz); 2.13, 2.07, 2.06, 2.00, 1.98, 1.97, 1.96 (9*s, 30H, CH₃-Ac, CH₃-NHAc); 1.91 (m, 1H, H3''_{ax}); 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 170.81, 170.68, 170.24, 170.14, 170.10, 170.08, 169.32, 169.20 (11C, CO); 167.00 (1C, C1''); 156.02 (1C, CO-Urethan); 143.64 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.30 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 135.10 (1C, C_{ipso}-Bn); 128.70, 128.61, 128.35, 127.90, 127.20 (9C, C3-, C6-, C2-, C7-Fmoc, C_{arom.}-Bn (5C)); 124.88 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.15 (2C, C4-, C5-Fmoc); 101.38 (1C, C1'); 98.75, 98.50 (2C, C1, C2''); 83.31 (1C, C_q-*t*Bu); 77.29 (1C, C3); 72.85, 70.70, 69.19, 68.60, 67.87 (8C, C4, C5, C2', C5', C4'', C6'', C7'', C8''); 70.68 (1C, C3'); 68.61 (1C, S^β); 67.65 (1C, CH₂-Bn); 67.30 (1C, CH₂-Fmoc); 66.90 (1C, C4'); 63.15 (1C, C6); 62.40 (1C, C9''); 60.65 (1C, C6'); 54.80 (1C, S^α); 49.00 (1C, C5''); 47.75, 47.11 (2C, C2, C9-Fmoc); 37.54 (1C, C3''); 28.00 (3C, CH₃-*t*Bu); 23.00, 22.19, 20.90, 20.75, 20.68, 20.60, 20.56, 20.40 (10C, CH₃-Ac, CH₃-NHAc).

N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-di-desoxy-α/β-*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-serin **34*

[Fmoc-Ser(β-Ac₄Gal-(1→3)-[α-NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)]-α-GalNAc)-OH]

Man rührt eine Lösung von 360 mg (0.25 mmol) Fmoc-Ser(β-Ac₄Gal-(1→3)-[α/β-NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)]-α-GalNAc)-*O**t*Bu **33** in 6 ml TFA und 0.8 ml Anisol 4 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit jeweils 10 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an 30 g Kieselgel (Laufmittel: EE/EtOH/AcOH 10:1:0.1).



Ausb.: 338 mg (98%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.07$ (EE/EtOH/AcOH 10:1:0.1); $[\alpha]_D^{22} = 37.0$ (c = 1, CH₂Cl₂); (Lit.⁴²: $[\alpha]_D^{23} = 38.2$, c = 1, CH₂Cl₂).

C₆₈H₈₃N₃O₂₉ [1405.51]

ESI-MS (positiv), m/z: 1433.2 ([M+Na]⁺, ber.: 1433.3); 1449.3 ([M+K]⁺, ber.: 1449.4); 1455.3 ([M+2Na-H]⁺, ber.: 1455.3).

400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ/ppm : 7.72 (m, 2H, H4-, H5-Fmoc); 7.57 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.37-7.21 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, $\text{H}_{\text{arom.}}\text{-Bn}$); 7.15 (m, 1H, NH-Fmoc); 5.38-5.10 (m, 6H, H8'' (5.36), H7'' (5.27), H4' (5.24), $\text{CH}_2\text{-Bn}$ (5.16), H2' (5.11)); 4.93-4.84 (m, 2H, H1 (4.92), H3' (4.89)); 4.81-4.75 (m, 2H, H4'' (4.78), S^α (4.68)); 4.39-4.28 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ (4.37), H9''a (4.31), H1' (4.29)); 4.11-3.97 (m, 6H, H9-Fmoc (4.09), S^β (4.08), H5'' (4.07), H9''b (4.03), H6'' (4.01)); 3.90-3.69 (m, 6H, H6a (3.89), H6' (3.84), H4 (3.84), H2 (3.83), H5 (3.71)); 3.66-3.62 (m, 1H, H3); 3.47-3.42 (m 2H, H5' (3.46), H6b (3.44)); 2.59 (dd, 1H, H3''_{eq.}, $J_{\text{H3''eq.,H4''}} = 4.32 \text{ Hz}$, $J_{\text{H3''eq.,H3''ax.}} = 12.52 \text{ Hz}$); 2.10, 2.08, 2.07, 2.03, 1.99, 1.98, 1.95, 1.94 (8*s, 30H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$, $\text{CH}_3\text{-NHAc}$); 1.91 (m, 1H, H3''_{ax.}).

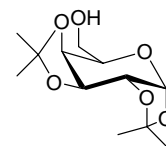
100.6 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ/ppm : 170.10, 170.00, 169.98 (11C, CO); 167.35 (1C, C1''); 155.94 (1C, CO-Urethan); 143.85 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.17 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 134.86 (1C, $\text{C}_{\text{ipso}}\text{-Bn}$); 128.99, 128.71, 128.26, 128.18, 127.87, 127.21 (9C, C3-, C6-, C2-, C7-Fmoc, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-Bn}$ (5C)); 125.24 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.04 (2C, C4-, C5-Fmoc); 102.10 (1C, C1'); 98.71, 98.61 (2C, C1, C2''); 80.30 (1C, C3); 72.80, 69.18, 69.11, 68.90, 68.85, 68.70, 67.50, 67.47, 66.50 (9C, C4, C4', C5, C2', C5', C4'', C6'', C7'', C8''); 70.51 (1C, C3'); 67.61 (1C, $\text{CH}_2\text{-Bn}$); 67.00 (1C, S^β); 66.96 (1C, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$); 63.40 (1C, C6); 62.41 (1C, C9''); 60.72 (1C, C6'); 54.32 (S^α); 52.11 (1C, C2); 48.92 (1C, C5''); 47.10 (1C, C9-Fmoc); 37.50 (1C, C3''); 23.11, 21.00, 20.90, 20.80, 20.71, 20.49, 20.35 (10C, $\text{CH}_3\text{-Ac}$, $\text{CH}_3\text{-NHAc}$).

Signalverdopplungen sind vermutlich unterschiedlichen Konformeren zuzuschreiben.

5.6 Versuche zu Kapitel 3.1.5

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose 36

Eine Suspension von 30 g (0.17 mol) D-Galactose **35** und 67 g (0.42 mol) wasserfreiem Kupfersulfat in 500 ml Aceton wird mit 4 ml konz. H_2SO_4 versetzt und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Mittels Filtration



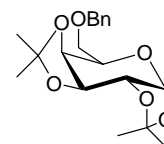
wird das Kupfersulfat entfernt. Durch Zugabe von Calciumhydroxid wird die Lösung neutralisiert. Es wird über *Hyflo*[®] filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausb.: 43.40 g (quant.); gelbes Öl; $R_f = 0.40$ (CH/EE 1:1); (Lit.:⁵⁵ 76-92% nach Destillation).

$C_{12}H_{20}O_6$ [260.13]

6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose 37

Man kühlt eine Lösung von roher 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose **36** in 300 ml DMF auf 0 °C und setzt portionsweise 13.60 g (0.34 mol) einer 60%igen Natriumhydriddispersion in Mineralöl zu. Die Kühlung wird entfernt und die Reaktionslösung 1 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird erneut auf 0 °C gekühlt und mit 36.20 ml (0.36 mol, 1.1 Äquiv.) BnBr in 100 ml DMF versetzt. Die Reaktionslösung wird 20 h bei Raumtemp. gerührt. Bevor DMF destillativ entfernt wird, gibt man 20 ml MeOH zu. Der so erhaltene Rückstand wird in 250 ml CH_2Cl_2 aufgenommen, dreimal mit je 100 ml H_2O gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Man kodestilliert dreimal mit je 20 ml Toluol, und anschließend reinigt man das Rohprodukt mittels Flashchromatographie an 650 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 4:1).



Ausb.: 45 g (77%); gelbes Öl; $[\alpha]_D^{22} = -63.0$ ($c = 1$, $CHCl_3$); $R_f = 0.45$ (CH/EE 4:1); (Lit.:⁵⁵ $[\alpha]_D^{20} = -65 \pm 0.5$ ($c = 2.7$, $CHCl_3$)).

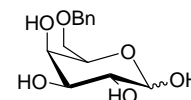
$C_{19}H_{26}O_6$ [350.17]

ESI-MS (positiv), m/z : 351.3 ($[M+H]^+$, ber.: 351.2).

6-*O*-Benzyl- α,β -D-galactopyranose 38

$[\alpha,\beta$ -6-*O*-Bn-Gal]

Eine Lösung von 45 g (0.13 mol) 6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose **37** in 800 ml 60%iger Essigsäure wird 3 h bei 80 °C gerührt. Man entfernt das Lösungsmittel i. Vak. und kodestilliert den Rückstand viermal mit 50 ml Toluol. Das Rohprodukt wird ohne Reinigung verwendet.

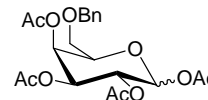


Ausb.: 39 g (124%); gelbes Öl.

$C_{13}H_{18}O_6$ [270.11]

1,2:3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α,β -D-galactopyranose 39**[α,β -Ac₄-6-*O*-Bn-Gal]**

In 200 ml Pyridin wird rohes α,β -6-*O*-Bn-Gal **38** gelöst und auf 0 °C gekühlt. Man versetzt mit einer Spatelspitze *N,N*-Dimethylaminopyridin und tropft langsam unter Rühren 400 ml



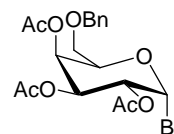
Ac₂O zu. Die Kühlung wird entfernt und 21 h bei Raumtemp. gerührt. Überschüssiges Ac₂O und Pyridin werden i. Vak. entfernt, und es wird fünfmal mit je 40 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgt durch Flashchromatographie an 600 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 3:1). Da sich beide Anomere zum gewünschten α -Bromid umsetzen, muss keine Trennung der Anomere vorgenommen werden.

Ausb.: 40 g (71%); gelbes Öl; (Lit.:⁵⁵ Ausb.: 79%).

C₂₁H₂₆O₁₀ [438.15]

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosylbromid 40**[6-*O*-Bn-Ac₃Gal-Br]**

In 20 ml absol. Dichlormethan löst man 950 mg (2.17 mmol) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-benzyl- α,β -D-galactopyranose **39** unter Argonatmosphäre auf und tropft über einen Zeitraum von 30 min bei 0 °C



6 ml Bromwasserstoffsäure (33% in Eisessig) zu. Im Anschluss hydrolysiert man die Reaktionslösung durch Zugabe von 25 ml Eiswasser und verdünnt die so erhaltene Lösung mit 50 ml CH₂Cl₂. Die organische Phase wird abgetrennt, zweimal mit jeweils 50 ml ges. NaHCO₃-Lsg. und zweimal mit je 50 ml ges. Na₂S₂O₃-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Gereinigt wird das Rohprodukt durch Filtration über eine kurze Kieselgelsäule (Laufmittel: EE/CH 1:1).

Ausb.: 500 mg (50%); farbloser, feinkristalliner Feststoff; R_f = 0.42 (CH/EE 1:1); [α]_D²² = 145.4 (c = 1, CH₂Cl₂); Schmp.: 81 °C (Lit.:⁵⁸ Schmp.: 82-83 °C).

C₁₉H₂₃BrO₈ [458.06]

ESI-MS (positiv), m/z: 481.1 ([M+Na]⁺, ber.: 481.1).

300 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ /ppm: 7.39-7.23 (m, 5H, H_{arom.}-Bn); 6.70 (d, 1H, H₁, J_{H₁,H₂} = 4.05 Hz); 5.55 (d, 1H, H₄, J_{H₃,H₄} = 2.88 Hz); 5.30 (dd, 1H, H₃, J_{H₃,H₄} = 3.00 Hz, J_{H₂,H₃} = 10.15 Hz); 4.99 (dd, 1H, H₂, J_{H₁,H₂} = 4.05 Hz, J_{H₂,H₃} = 10.15 Hz); 4.50 (d, 1H, CH_{2a}-Bn,

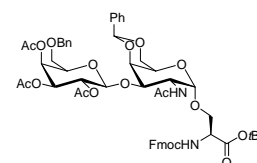
$J_{\text{CH2a,CH2b}} = 12.32 \text{ Hz}$); 4.42 (dd, 1H, H5, $J_{\text{H5,H6a}} = 5.33 \text{ Hz}$, $J_{\text{H5,H6b}} = 6.85 \text{ Hz}$); 4.37 (d, 1H, CH_{2b}-Bn, $J_{\text{CH2a,b}} = 12.32 \text{ Hz}$); 3.51 (d, 2H, H6, $J_{\text{H5,H6a}} = 5.33 \text{ Hz}$, $J_{\text{H5,H6b}} = 6.85 \text{ Hz}$); 2.10, 2.04, 1.98 (3*s, 9H, CH₃-Ac).

75.5 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃), δ/ppm : 170.52, 169.78, 169.60 (3C, CO); 138.00 (1C, C_{ipso}-Bn); 128.60, 127.82 (5C, C_{arom.}-Bn); 89.02 (1C, C1); 73.52 (1C, CH₂-Bn); 71.97, 68.31, 68.14, 67.52 (4C, C2, C3, C4, C5); 66.95 (1C, C6); 21.00, 20.86, 20.23 (3C, 3*CH₃-Ac).

N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl]-L-serin-*tert*-butylester **41*

[Fmoc-Ser(β -6-*O*-Bn-Ac₃Gal-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O*tBu]

Man löst 2.40 g (3.56 mmol) Fmoc-Ser(α -4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O*tBu **16** unter Argonatmosphäre in 55 ml absol. CH₃NO₂/absol. CH₂Cl₂ (10:1), versetzt mit ca. 3 g Molekularsieb (4Å), 1.76 g (6.96 mmol) Hg(CN)₂ und rührt 30 min bei Raumtemperatur.



Anschließend tropft man 3.27 g (7.12 mmol) 6-Bn-Ac₃Gal-Br **40**, gelöst in 10 ml absol. CH₂Cl₂, bei 0 °C zu. Die Reaktionsmischung wird im Laufe mehrerer Stunden auf Raumtemp. erwärmt und im Anschluß weitere 80 h gerührt. Durch Zugabe von 250 ml CH₂Cl₂ wird die Lösung verdünnt und anschließend über Hyflo[®] filtriert. Das Filtrat wird dreimal mit je 200 ml ges. NaHCO₃-Lösung, zweimal mit je 150 ml ges. NaI-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittelgemisch i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an 800 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 2:3).

Ausb.: 2.36 g (63%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.31$ (CH/EE 1:2); $[\alpha]_D^{23} = 55.1$ ($c = 3$, CHCl₃); $R_t = 9.92 \text{ min}$ (Luna C-18, Gradient (CH₃CN+0.1%TFA): 80% isokratisch).

C₅₆H₆₄N₂O₁₈ [1052.42]

ESI-MS (positiv), m/z : 1075.6 ([M+Na]⁺, ber.: 1075.4); 1091.6 ([M+K]⁺, ber.: 1091.5).

400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) (¹H, COSY), δ/ppm : 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H3,H4}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.84 \text{ Hz}$); 7.57 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H7,H8}} = 7.04 \text{ Hz}$); 7.52-7.49 (m, 2H, H_{arom.}-Bzn); 7.42-7.20 (m, 12H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{arom.}-Bzn (3H), H_{arom.}-Bn (5H)); 5.83 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{\text{NH,S}\alpha} = 7.44 \text{ Hz}$); 5.72 (d, 1H, NHAc, $J_{\text{NH,H2}} = 7.84 \text{ Hz}$);

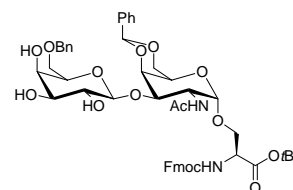
5.46 (s, 1H, CH-Bzn); 5.39 (m, 1H, H4'); 5.18 (dd, 1H, H2', $J_{H1',H2'} = 2.36$ Hz, $J_{H2',H3'} = 8.20$ Hz); 4.97-4.93 (m, 2H, H1, H3'); 4.69-4.59 (m, 2H, H1', H2); 4.52-4.34 (m, 5H, CH₂-Bn, CH₂-Fmoc, S^a); 4.25-4.15 (m, 4H, H9-Fmoc, S^b, H6a); 3.94-3.88 (m, 1H, H3); 3.84-3.79 (m, 2H, H6b, H5'); 3.55-3.50 (m, 2H, H6a', H5); 3.45-3.42 (m, 1H, H6b'); 2.05, 2.01, 1.95, 1.85 (4*s, 12H, CH₃-Ac); 1.46 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 170.53, 170.25, 170.00, 169.61, 169.25 (5C, CO); 156.52 (1C, CO-Urethan); 144.10 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.43 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 138.01, 137.82 (2C, C_{ipso}.-Bzn, C_{ipso}.-Bn); 128.61, 128.13, 126.24 (5C, C_{arom}.-Bzn); 128.41, 127.92 (5C, C_{arom}.-Bn); 127.73 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.00 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.01 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.21 (2C, C4-, C5-Fmoc); 101.28 (1C, C1'); 100.70 (1C, CH-Bzn); 99.53 (1C, C1); 83.10 (1C, C_q-*t*Bu); 75.38 (1C, C4); 74.05 (1C, C3); 73.66 (1C, CH₂-Bn); 72.45 (1C, C5'); 71.32 (1C, C3'); 69.17 (1C, S^b); 69.13 (1C, C6); 69.12 (1C, C2'); 68.00 (1C, C6'); 67.69 (1C, C4'); 67.29 (1C, CH₂-Fmoc); 63.70 (1C, C5); 55.10 (1C, S^a); 48.27 (1C, C2); 47.19 (1C, C9-Fmoc); 28.22 (3C, CH₃-*t*Bu); 20.89, 23.44 (4C, 4*CH₃-Ac).

***N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[6-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester **42**
[Fmoc-Ser(β-6-*O*-Bn-Gal-(1→3)-α-4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu]**

Der folgende Ansatz wird zweimal nebeneinander parallel durchgeführt und vor dem Entfernen des Lösungsmittels vereinigt.

In 20 ml absol. MeOH werden 1.30 g (1.24 mmol) Fmoc-Ser(β-6-*O*-Bn-Ac₃Gal-(1→3)-α-4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu **41**



gelöst und tropfenweise mit frisch hergestellter Natriummethanolat-Lösung versetzt, bis der pH-Wert der Lösung zwischen 8.5-9.0 liegt. Es wird für 6.75 h bei Raumtemp. gerührt und der pH-Wert unter ständiger Kontrolle nachreguliert. Durch Zugabe von saurem Ionenaustauscher *Amberlite*[®] *IR-120* (H-Form) wird die Reaktion abgebrochen und nach zehnmütigem Rühren filtriert. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und das so erhaltene Rohprodukt durch Flashchromatographie an 180 g Kieselgel (Laufmittel: EE → EE/EtOH) gereinigt. Man gewinnt 500 mg des eingesetzten Edukts zurück.

Ausb.: 527 mg (25 %, Umsatz: 62 %); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.50$ (EE/EtOH 5:1); $[\alpha]_D^{23} = 102.0$ ($c = 1$, CHCl_3).

$\text{C}_{50}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_{15}$ [926.38]

ESI-MS (positiv), m/z : 949.5 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 949.4).

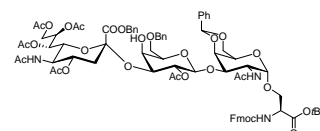
400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (^1H , COSY), δ/ppm : 7.73 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H}3,\text{H}4} = J_{\text{H}5,\text{H}6} = 7.44$ Hz); 7.58 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H}1,\text{H}2} = J_{\text{H}7,\text{H}8} = 6.80$ Hz); 7.45 (d, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}\text{-Bzn}$, $J = 7.04$ Hz); 7.36 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $J_{\text{H}3,\text{H}4} = J_{\text{H}5,\text{H}6} = 7.44$ Hz); 7.31-7.23 (m, 10H, H2-, H7-Fmoc, $\text{H}_{\text{arom.}}\text{-Bzn}$ (3H), $\text{H}_{\text{arom.}}\text{-Bn}$ (5H)); 6.49 (sb, 1H, NH-Fmoc); 6.03 (sb, 1H, NHAc); 5.40 (s, 1H, CH-Bzn); 4.91 (s, 1H, H1); 4.61 (m, 1H, H2); 4.51-4.40 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, S^α , $\text{CH}_2\text{-Bn}$, $\text{CH}_2\text{a-Bzn}$); 4.34-4.25 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{b-Bzn}$, H4, H1'); 4.19 (1H, H9-Fmoc, $J_{\text{CH}_2,\text{H}9} = 6.64$ Hz); 4.09 (d, 1H, H6a, $J_{\text{H}6\text{a},\text{b}} = 12.12$ Hz); 3.92-3.53 (m, 10H, S^β , H3, H5, H6b, H2', H4', H5', H6'); 3.38-3.33 (m, 1H, H3') 1.97 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-NHAc}$); 1.44 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-tBu}$).

100.6 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) (^{13}C , HMQC), δ/ppm : 170.53, 169.61 (2C, CO); 156.45 (1C, CO-Urethan); 144.15 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.35 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 138.05, 137.51 (2C, $\text{C}_{\text{ipso.}}\text{-Bzn}$, $\text{C}_{\text{ipso.}}\text{-Bn}$); 128.63, 128.04, 126.35 (5C, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-Bzn}$); 128.49, 128.00 (5C, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-Bn}$); 127.87 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.00 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.19 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.19 (2C, C4-, C5-Fmoc); 105.49 (1C, C1'); 101.00 (1C, CH-Bzn); 99.71 (1C, C1); 77.11 (1C, C3); 75.71 (1C, C4); 73.66 (1C, $\text{CH}_2\text{-Bn}$); 73.65 (1C, C5'); 73.55 (1C, C3'); 70.95 (1C, C2'); 69.86 (1C, S^β); 69.84 (1C, C6'); 69.08 (1C, C4'); 69.00 (1C, C6); 67.29 (1C, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$); 63.64 (1C, C5); 55.18 (1C, S^α); 48.27 (1C, C2); 47.20 (1C, C9-Fmoc); 28.22 (3C, $\text{CH}_3\text{-tBu}$); 23.17 (1C, $\text{CH}_3\text{-NHAc}$).

***N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[6-*O*-benzyl-3-*O*-{benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester 43**

[Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→3)- β -6-*O*-Bn-Gal-(1→3)- α -4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu]

Es werden 200 mg (0.22 mmol) Fmoc-Ser(β -6-*O*-Bn-Gal-(1→3)- α -4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu **42** und 363 mg



(0.54 mmol, 2.5 Äquiv.) α -NeuAc₄5NAcCOOBnXan **29** in einem Gemisch aus 7 ml absol. CH₃CN und 3 ml absol. CH₂Cl₂ gelöst, mit 600 mg pulverförmigem Molekularsieb (3Å) versetzt und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend gibt man unter Lichtausschluß 139 mg (0.54 mmol) Silbertriflat zu und tropft bei -68 °C 0.34 ml einer Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M in absol. ClCH₂CH₂Cl, s. Kapitel 5.4) langsam zu. Die Reaktionslösung wird 4 h bei -65 °C bis -70 °C unter Licht- und Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Durch Zugabe von 115 µl DIPEA wird neutralisiert, und man lässt auf Raumtemp. erwärmen. Die Reaktionsmischung wird mit 100 ml CH₂Cl₂ verdünnt, über *Hyflo*[®] filtriert und das Lösungsmittelgemisch i. Vak. entfernt. Das so erhaltene braune Öl wird durch Flashchromatographie an 50 g Kieselgel (Laufmittel: EE) gereinigt.

Ausb.: 168 mg (53%, zurückgewonnener Akzeptor: 59 mg (29%); Sialinsäureglycal: 216 mg (73%), bezogen auf den Sialinsäuredonor); farbloser amorpher Feststoff; R_f = 0.33 (EE/EtOH 10:1); R_t = 9.90 min (Luna C-18, Gradient (%CH₃CN): 80% isokratisch); [α]_D²³ = 44.0 (c = 1, CHCl₃).

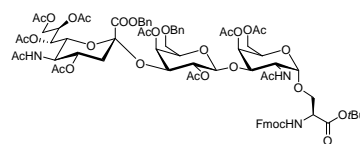
C₇₆H₈₉N₃O₂₇ [1475.57]

ESI-MS (positiv), m/z: 1499.0 ([M+Na]⁺, ber.: 1498.6).

NMR: Die NMR-Spektren sind so gering aufgelöst, dass man keine Zuordnung der Signale treffen kann.

***N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-3-*O*-{benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-di-desoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester **45**
[Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→3)- β -6-*O*-Bn-Ac₂Gal-(1→3)- α -Ac₂GalNAc)-*O**t*Bu]**

In 10 ml Essigsäure (80%) werden 168 mg (0.11 mmol) Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→3)- β -6-*O*-Bn-Gal-(1→3)- α -4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu **43** 1 h auf



75 °C erhitzt. Man kühlt die Reaktionslösung auf Raumtemp. ab, verdünnt mit 20 ml Toluol und entfernt die Lösungsmittel im Vakuum. Um die verbliebene Essigsäure zu entfernen, wird fünfmal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird

1 h i. Vak. getrocknet, ohne weitere Reinigung in 5 ml Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 2 ml Ac₂O sowie einer Spatelspitze *N,N*-Dimethylaminopyridin versetzt. Anschließend rührt man die Reaktionslösung 20 h bei Raumtemperatur. Die überschüssigen Reagenzien werden i. Vak. entfernt, und das erhaltene Rohprodukt fünfmal mit jeweils 10 ml Toluol koevaporiert. Die Reinigung erfolgt an 30 g Kieselgel (Laufmittel: EE).

Ausb.: 100 mg (56% (2 Stufen)); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.15$ (EE/EtOH 10:1); $[\alpha]_D^{23} = 42.0$ ($c = 1$, CHCl₃).

C₈₀H₉₃N₃O₂₉ [1555.58]

ESI-MS (positiv), m/z : 1578.5 ([M+Na]⁺, ber.: 1578.6).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1556.5813 ([M+H]⁺, ber.: 1556.5872).

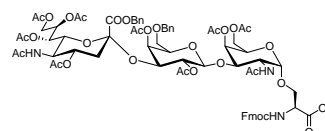
400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) (¹H, COSY), δ /ppm: 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.52$ Hz); 7.57 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.42-7.20 (m, 14H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{arom.}-Bn (5H), H_{arom.}-COOBn (5H)); 6.42 (m, 1H, NHAc); 5.91 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{NH,S\alpha} = 8.36$ Hz); 5.56 (m, 1H, H8''); 5.44 (m, 2H, H4, CH₂a-Bn); 5.26 (dd, 1H, H7'', $J_{H6'',H7''} = 2.48$ Hz, $J_{H7'',H8''} = 8.28$ Hz); 5.13-4.94 (m, 4H, H1, H2', H4', CH₂b-Bn); 4.85 (ddd, 1H, H4'', $J_{H3''eq,H4''} = 4.60$ Hz, $J_{H4'',H5''} = 10.52$ Hz, $J_{H3''ax,H4''} = 11.84$ Hz); 4.63 (d, 1H, H1', $J_{H1',H2'} = 7.84$ Hz); 4.55-4.30 (m, 6H, H3' (4.52), CH₂-Bn (4.52, 4.44), S^α (4.44), H2 (4.42), H9'' (4.35)); 4.25-4.00 (m, 5H, CH₂-Fmoc (4.25), C9-Fmoc (4.22), H3 (4.05), H5'' (4.03)); 3.95-3.80 (m, 3H, S^β (3.91, 3.84), H9b'' (3.84)); 3.56-3.45 (m, 2H, H6a' (3.54), H6'' (3.52)); 3.40 (dd, 1H, H6b', $J_{H5',H6'b} = 6.80$ Hz, $J_{H6'a,b} = 9.60$ Hz); 2.62 (dd, 1H, H3''_{eq}, $J_{H3''eq,H4''} = 4.64$ Hz, $J_{H3''eq,H3''ax} = 12.64$ Hz); 2.31, 2.11, 2.10, 2.09, 2.05, 1.98, 1.83 (7*s, 30H, CH₃-Ac); 1.66 (t, 1H, H3''_{ax}, $J_{H3''ax,H3''eq} = 12.40$ Hz).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃) (¹³C, HMQC), δ /ppm: 170.81, 170.40, 170.35, 169.98, 169.65, 169.50, 169.12, 168.83, 168.52, 168.12, 167.41 (12C, CO); 156.43 (1C, CO-Urethan); 143.71 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 141.40 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 127.85 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.19 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.20 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.09 (2C, C4-, C5-Fmoc); 100.32 (1C, C1'); 98.21 (1C, C1); 98.05 (1C, C2''); 83.20 (1C, C_q-*t*Bu); 73.44 (1C, CH₂-Bn); 73.13 (1C, C5); 72.41 (1C, C6''); 72.22 (1C, C5'); 71.66 (1C, C3'); 69.86 (1C, C2'); 69.20 (1C, C4''); 68.91 (1C, S^β); 68.62 (1C, CH₂-Bn); 68.42 (1C, C4); 68.02 (1C, C8''); 67.95 (1C, C6'); 67.84 (1C, C4'); 67.78 (1C, C3); 67.70 (1C, C7''); 67.50 (1C, CH₂-Fmoc); 63.03 (1C, C9''); 62.98 (1C, C6); 54.75 (1C, S^α); 49.41 (1C, C2); 49.02 (1C, C5''); 47.11 (1C, C9-Fmoc); 37.53 (1C, C3''); 28.11 (3C, CH₃-*t*Bu); 23.36, 22.98, 22.50, 22.23, 22.18, 22.01, 21.87, 21.58, 21.35 (10C, CH₃-Ac).

N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-3-*O*-{benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin **46*

[Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→3)- β -6-*O*-Bn-Ac₂Gal-(1→3)- α -Ac₂GalNAc)-OH]

Man löst 176 mg (0.11 mmol) Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→3)- β -6-*O*-Bn-Ac₂Gal-(1→3)- α -Ac₂GalNAc)-*O**t*Bu **44** in 5 ml CH₂Cl₂ und versetzt mit 5 ml



TFA und 0.5 ml Anisol. Es wird 4 h bei Raumtemp. gerührt, mit 10 ml Toluol verdünnt, und die Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt. Anschließend wird viermal mit jeweils 10 ml Toluol koevaporiert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an 20 g Kieselgel (Laufmittel: EE/EtOH 2:1).

Ausb.: 161 mg (95%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.20$ (EE/EtOH 1:1); $[\alpha]_D^{23} = 55.0$ ($c = 1.5$, CHCl₃).

C₇₃H₈₅N₃O₃₁ [1499.52]

MALDI-TOF-MS (positiv, dhb), m/z : 1523.7 ([M+H+Na]⁺, ber.: 1523.5); 1539.7 ([M+H+K]⁺, ber.: 1539.6); 1545.9 ([M+2Na]⁺, ber.: 1545.5).

400 MHz ¹H-NMR (CD₃OD) (¹H, COSY), δ /ppm: 7.82-7.73 (m, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.44$ Hz); 7.68 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.04$ Hz); 7.49 (d, 2H, H_{arom.}-Bn, $J = 7.04$ Hz); 7.38- 7.24 (m, 10H, H2-, H7-Fmoc, H_{arom.}-Bn (2*Bn, 8H)); 5.59-5.56 (m, 1H, H8''); 5.44-5.40 (m, 2H, H4, H7''); 5.39 (s, 1H, CH_{2a}-Bn); 5.24 (d, 1H, H4', $J_{H3',H4'} = 3.12$ Hz); 5.15 (d, 1H, CH_{2b}-Bn, $J_{CH2a,b} = 12.52$ Hz); 4.96 (dd, 1H, H4'', $J_{H3''eq.,H4''} = 4.68$ Hz, $J_{H3''ax.,H4''} = 11.24$ Hz); 4.90-4.82 (m, 3H, H2' (4.88), H1 (4.84), H1' (4.83)); 4.68 (dd, 1H, H3', $J_{H3',H4'} = 3.52$ Hz, $J_{H2',H3'} = 10.16$ Hz); 4.55 (d, 1H, CH_{2a}-Bn, $J_{CH2a,b} = 11.76$ Hz); 4.46 (d, 1H, CH_{2b}-Bn, $J_{CH2a,b} = 11.72$ Hz); 4.42-4.37 (m, 3H, H2 (4.41), CH₂-Fmoc (4.38)); 4.28-4.15 (m, 5H, H9''a (4.27), S ^{α} (4.26); C9-Fmoc (4.22); H3 (4.19), H5 (4.16)); 4.06-3.84 (m, 7H, H9''b (4.01), H5'' (3.95), H6 (3.93); H5' (3.92), S ^{β} (4.01, 3.87)); 3.78 (d, 1H, H6'', $J_{H5'',H6''} = 2.32$ Hz); 3.62-3.59 (m, 1H, H6'a); 3.46-3.41 (m, 1H, H6'b); 2.64 (dd, 1H, H3''_{eq.}, $J_{H3''eq.,H4''} = 4.68$ Hz, $J_{H3''eq.,H3''ax.} = 12.52$ Hz); 2.29, 2.17, 2.11, 2.08, 2.05, 2.04, 2.03, 2.01, 1.98, 1.84 (10*s, 30H, CH₃-Ac); 1.55 (t, 1H, H3''_{ax.}, $J_{H3''eq.,H3''ax.} = 12.52$ Hz).

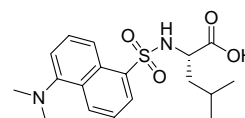
100.6 MHz ^{13}C -NMR (CD_3OD) (^{13}C , HMQC), δ/ppm : 173.41, 172.40, 172.23, 172.15, 171.92, 171.71, 171.60, 171.39, 170.88, 168.56 (12C, CO); 156.72 (1C, CO-Urethan); 145.20 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 142.47 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 139.27 (2C, C_{ipso}-Bn, C_{ipso}-Bn); 128.75-127.01 (14C, C_{arom.}-Bn, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc); 125.12, 124.84 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.92 (2C, C4-, C5-Fmoc); 102.47 (1C, C1'); 99.47 (1C, C1); 98.00 (1C, C2''); 74.57 (1C, C3); 74.21 (1C, CH₂-Bn); 72.81 (1C, C5'); 72.69 (1C, C3'); 71.39 (1C, C2'); 71.26 (1C, C7''); 70.81 (1C, C4''); 69.86 (1C, S ^{β}); 69.58 (1C, CH₂-Bn); 69.03 (1C, C4'); 68.74 (1C, C8''); 68.73 (1C, C6'); 68.47 (1C, C5); 68.31 (1C, C4); 67.83 (1C, CH₂-Fmoc); 63.78 (1C, C9''); 63.22 (1C, C6); 57.34 (1C, S ^{α}); 50.32 (1C, C2); 49.81 (1C, C5''); 48.22 (1C, C9-Fmoc); 38.63 (1C, C3''); 23.21 (1C, CH₃-NHAc''); 22.61 (1C, CH₃-NHAc); 21.63, 21.60, 20.89, 20.77, 20.69, 20.58, 20.52, 20.48 (8C, CH₃-Ac).

5.7 Versuche zu Kapitel 3.2.1

2-(5-Dimethylamino-naphthyl-1-sulfonylamino)-4-methyl-pentansäure **49**

[Dansyl-Leu-OH]

Es werden 1.50 g (11.43 mmol) L-Leucin **47** in 20 ml 1N NaOH-Lösung vorgelegt und mit 4.52 g (17.15 mmol) Dansylchlorid **48** in 20 ml Aceton versetzt. Nach 5.5 h Rühren bei Raumtemp. gibt



man erneut 20 ml 1N NaOH zu und rührt eine weitere Stunde. Es wird filtriert und mit 1N HCl etwa auf pH = 2.5 angesäuert. Der ausgefallene gelbe Feststoff wird abfiltriert und mit H₂O gewaschen. Die wässrige Phase wird entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels Flashchromatographie an 50 g Kieselgel (Laufmittelgemisch CHCl₃/MeOH 30:1) und anschließender präp. HPLC (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 15-80 (80 min)) gereinigt.

Ausb.: 1.07 g (26%); gelblicher amorpher Feststoff; $R_f = 0.30$ (CHCl₃/MeOH 30:1); $R_t = 19.04$ min (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 15-80 (40 min)); $[\alpha]_D^{23} = -13.8$ (c = 1, DMSO).

C₁₈H₂₄N₂O₄S [364.15]

FD-MS (positiv), m/z: 365.1 ([M+H]⁺, ber.: 364.2).

ESI-MS (negativ), m/z : 363.1 ($[M-H]^-$, ber.: 363.2).

400 MHz 1H -NMR (DMSO- d_6) (1H , COSY), δ/ppm : 8.47-8.43 (m, 2H, H2-Dan, NH); 8.34 (d, 1H, H8-Dan, $J_{H7,H8} = 8.60$ Hz); 8.12 (dd, 1H, H4-Dan, $J_{H2,H4} = 1.10$ Hz, $J_{H3,H4} = 7.35$ Hz); 7.62-7.56 (m, 2H, H3-, H7-Dan); 7.30 (d, 1H, H6-Dan, $J_{H6,H7} = 7.44$ Hz); 3.54-3.49 (m, 1H, L^α); 2.85 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 1.36-1.21 (m, 3H, L^β , L^γ); 0.61, 0.27 (2*d, 6H, L^δ , $J_{L^\gamma,L^\delta} = 6.27$ Hz).

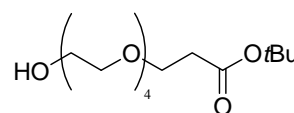
100.6 MHz ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) (^{13}C , HMQC), δ/ppm : 173.55 (1C, COOH); 150.26 (1C, C5-Dan); 136.20 (1C, C1-Dan); 129.28 (1C, C10-Dan); 129.14 (1C, C9-Dan); 128.73 (1C, C2-Dan); 128.56 (1C, C4-Dan); 127.60 (1C, C7-Dan); 123.58 (1C, C3-Dan); 120.11 (1C, C8-Dan); 115.33 (1C, C6-Dan); 53.85 (1C, L^α); 45.20 (2C, $N(CH_3)_2$); 42.62 (1C, L^β); 23.60 (1C, L^γ); 22.61, 20.31 (2C, L^δ).

5.8 Versuche zu Kapitel 3.2.2

15-Hydroxy-4,7,10,13-tetraoxapentadecansäure-*tert*-butylester **52**

[Glycol $_4$ -(CH $_2$) $_2$ -COO*t*Bu]

Man legt 34.70 ml (0.20 mol) wasserfreies Tetraethylenglycol **50** vor, gibt 100 ml absol. THF zu und versetzt die Lösung mit 0.10 g (4.35 mmol) Natrium. Nach 16 h gibt man zu der



entstandenen gelben Lösung 10.08 ml (0.07 mol) Acrylsäure-*tert*-butylester **51** und rührt unter Feuchtigkeitsausschluß weitere 24 h. Die Lösung wird mit 1N HCl neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Man nimmt den Rückstand in 65 ml ges. NaCl-Lsg. auf, extrahiert dreimal mit jeweils 40 ml Ethylacetat, wäscht die vereinigten organischen Phasen mit 20 ml H $_2$ O, trocknet über MgSO $_4$ und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Produkt wird i. Vak. getrocknet.

Ausb.: 11.52 g (51%); klares, blassgelbes Öl; (Lit.:⁶¹ Ausb.: 78%).

C $_{15}$ H $_{30}$ O $_7$ [322.20]

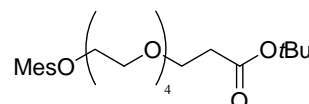
300 MHz 1H -NMR (CDCl $_3$), δ/ppm : 3.68-3.54 (m, 18H, CH $_2$ -O); 2.86 (sb, 1H, OH); 2.45 (t, 2H, CH $_2$ -COO*t*Bu, $J_{CH_2,CH_2} = 6.61$ Hz); 1.39 (s, 9H, CH $_3$ -*t*Bu).

75.5 MHz ^{13}C -NMR (CDCl_3), δ/ppm : 170.80 (1C, $\text{COO}t\text{Bu}$); 80.42 (1C, $\text{C}_q\text{-}t\text{Bu}$); 72.48 (1C, $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$); 70.53, 70.43, 70.27 (6C, $\text{CH}_2\text{-O-}$); 66.81 (1C, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}t\text{Bu}$); 61.62 (1C, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 36.25 (1C, $\text{CH}_2\text{-COO}t\text{Bu}$); 28.00 (3C, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$).

4,7,10,13-Tetraoxapentadecansäure-*tert*-butylester-15-methylsulfonat 53

[MesO-Glycol₄-(CH₂)₂-COO*t*Bu]

Man kühlt eine Lösung bestehend aus 11 g (34.10 mmol) Glycol₄-(CH₂)₂-COO*t*Bu **52**, 15.84 ml (82.50 mmol) NEt_3 und 100 ml absol. CH_2Cl_2 auf 0 °C ab. Innerhalb von 15 min



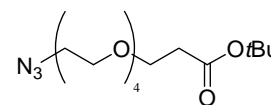
werden 5.58 ml (71.50 mmol) Methansulfonylchlorid zugegeben. Die anfänglich klare Lösung verfärbt sich bräunlich und wird nach beendeter Zugabe 17 h bei 0 °C gerührt. Das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid wird abzentrifugiert. Die Dichlormethanlösung wird mit 100 ml H_2O sowie 100 ml ges. NaCl -Lsg. gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Das erhaltene Produkt wird ohne weitere Reinigung und Charakterisierung direkt umgesetzt.

$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_9\text{S}$ [400.18]

15-Azido-4,7,10,13-tetraoxapentadecansäure-*tert*-butylester 54

[N₃-Glycol₄-(CH₂)₂-COO*t*Bu]

Zu einer Lösung von 13.66 g (34.10 mmol) MesO-Glycol₄-(CH₂)₂-COO*t*Bu **53** in 100 ml DMF gibt man 4.50 g (69.01 mmol) NaN_3 . Diese Lösung wird unter Feuchtigkeits-



ausschluß 69 h bei Raumtemp. gerührt, das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand in 150 ml Diethylether aufgenommen. Man wäscht die Etherphase mit 150 ml ges. NaHCO_3 -Lösung, wobei die bräunliche Färbung der Etherphase grösstenteils in die wässrige Phase übergeht. Die wässrige Phase wird dreimal mit jeweils 80 ml Ether reextrahiert. Man trocknet die vereinigten organische Phasen über MgSO_4 , entfernt das Lösungsmittel i. Vak. und reinigt das Produkt mittels Flashchromatographie an 500 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 1:2).

Ausb.: 6.50 g (55% über 2 Stufen); blassgelbes, dünnflüssiges Öl; (Lit.:⁶¹ Ausb.: 66%).

$C_{15}H_{29}N_3O_6$ [347.21]

FT-IR: 2871 cm^{-1} , s (CH-Valenzschwingung); 2107 cm^{-1} , vs (N_3 -Valenzschwingung); 1727 cm^{-1} , vs (CO-Valenzschwingung).

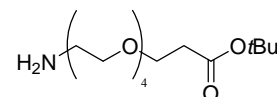
300 MHz 1H -NMR ($CDCl_3$), δ/ppm : 3.68-3.55 (m, 16H, CH_2 -O, CH_2); 3.34 (t, 2H, CH_2 - N_3 , $J_{CH_2,CH_2} = 4.97$ Hz); 2.45 (t, 2H, CH_2 -COO*t*Bu, $J_{CH_2,CH_2} = 6.61$ Hz); 1.40 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu).

75.5 MHz ^{13}C -NMR ($CDCl_3$), δ/ppm : 170.82 (1C, COO*t*Bu); 80.40 (1C, C_q -*t*Bu); 70.59, 70.44, 70.35, 69.99 (7C, CH_2 -O); 66.83 (1C, CH_2 - CH_2 -COO*t*Bu); 50.64 (1C, CH_2 - N_3); 36.23 (1C, CH_2 -COO*t*Bu); 28.00 (3C, CH_3 -*t*Bu).

15-Amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecansäure-*tert*-butylester 55

[H_2N -Glycol $_4$ -(CH_2) $_2$ -COO*t*Bu]

Eine Lösung von 6.53 g (18.80 mmol) N_3 -Glycol $_4$ -(CH_2) $_2$ -COO*t*Bu **54** in 80 ml Isopropanol wird mit 4.57 g frisch



hergestelltem Raney-Nickel (pH = 9), nach Vorschrift im Organikum⁶², versetzt. Man evakuiert und flutet den Kolben mehrfach, zuerst mit Argon, anschließend mit Wasserstoff. Es wird 20 h hydriert. Trotz mehrmaligen Filtrierens über *Hyflo*[®] und Spritzenfilter gelingt es nicht, den Katalysator vollständig zu entfernen. Nach beendeter Charakterisierung wird das Amin weiter umgesetzt.

Ausb.: 5.15 g (85%); grünliche Flüssigkeit.

$C_{15}H_{31}NO_6$ [321.22]

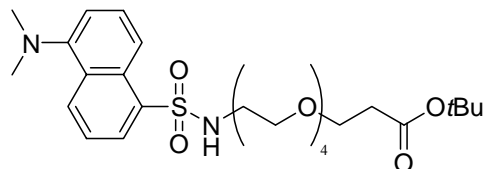
300 MHz 1H -NMR (DMSO- d_6), δ/ppm : 3.68-3.46 (m, 16H, CH_2 -O, CH_2); 2.83 (m, 2H, CH_2 - NH_2); 2.45 (t, 2H, CH_2 -COO*t*Bu, $J_{CH_2,CH_2} = 6.63$ Hz); 1.90 (s_b, 2H, NH_2); 1.40 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu).

75.5 MHz ^{13}C -NMR (DMSO- d_6), δ/ppm : 170.91 (1C, COO*t*Bu); 80.47 (1C, C_q -*t*Bu); 73.54 (1C, CH_2 - CH_2 - NH_2); 70.63, 70.58, 70.49, 70.36, 70.31 (6C, CH_2 -O); 66.91 (1C, CH_2 - CH_2 -COO*t*Bu); 41.80 (1C, CH_2 - NH_2); 36.29 (1C, CH_2 -COO*t*Bu); 28.05 (3C, CH_3 -*t*Bu).

15-(5-Dimethylamino-naphthalin-1-sulfonylamino)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoyl-*tert*-butylester 56

[Dansyl-NH-Glycol₄-(CH₂)₂-COO*t*Bu]

Zu einer Lösung von 1.95 g (6.06 mmol) H₂N-Glycol₄-(CH₂)₂-COO*t*Bu **55** in 20 ml CH₂Cl₂ gibt man 0.94 ml (6.67 mmol) NEt₃. Nach 15 min Rühren wird mit 1.80 g (6.67 mmol)



Dansylchlorid **48** versetzt und bei Raumtemp. 24 h gerührt. Die organische Phase wird mit 10 ml H₂O und 10 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flaschchromatographie an 70 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 2:1).

Ausb.: 2.88 g (86%); dünnflüssiges, gelblich fluoreszierendes Öl; R_f = 0.18 (CH/EE 2:1).

C₂₇H₄₂N₂O₈S [554.27]

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 554.2725 ([M]⁺, ber.: 554.2662); 555.2748 ([M+H]⁺, ber.: 555.2740).

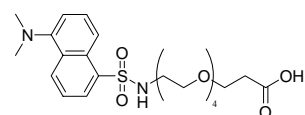
300 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 8.55 (m, 1H, H_{arom.}-Dan); 8.33 (d, 1H, H_{arom.}-Dan, J = 9.18 Hz); 8.22 (m, 1H, H_{arom.}-Dan); 7.58-7.48 (m, 2H, H_{arom.}-Dan); 7.20 (m, 1H, H_{arom.}-Dan); 5.53 (s_b, 1H, NH); 3.67 (t, 2H, CH₂, J_{CH₂,CH₂} = 6.63 Hz); 3.63- 3.56 (m, 8H, 4*CH₂); 3.45-3.39 (m, 2H, CH₂); 3.35 (m, 4H, 2*CH₂); 3.11-3.05 (m, 2H, NH-CH₂); 2.97 (s_b, 6H, N(CH₃)₂); 2.46 (t, 2H, CH₂-COO*t*Bu, J_{CH₂,CH₂} = 6.63 Hz); 1.41 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

75.5 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 170.89 (1C, COO*t*Bu); 130.03, 129.69, 129.40, 128.13 (8C, C1-, C2-, C3-, C4-, C5-, C7-, C9-, C10-Dan); 123.58 (1C, C8-Dan); 115.52 (1C, C6-Dan); 80.49 (1C, C_q-*t*Bu); 70.55, 70.46, 70.33, 70.25, 69.19 (6C, CH₂); 66.86 (1C, CH₂); 45.49 (2C, N(CH₃)₂); 43.08 (1C, CH₂-NH); 36.23 (1C, CH₂-COO*t*Bu); 28.07 (3C, CH₃-*t*Bu).

15-(5-Dimethylamino-naphthalin-1-sulfonylamino)-4,7,10,13-tetraoxapentadecan-säure 57

[Dansyl-NH-Glycol₄-(CH₂)₂-COOH]

Man gibt 2 ml Anisol sowie 15 ml TFA zu 3.28 g (5.91 mmol) Dansyl-NH-Glycol₄-(CH₂)₂-COO*t*Bu **56** und rührt das



Reaktionsgemisch 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend entfernt man das Lösungsmittel destillativ, kodestilliert dreimal mit jeweils 15 ml Toluol und trocknet das Produkt im Vakuum. Aufgrund der erhaltenen Reinheit ist keine weitere Reinigung notwendig.

Ausb.: 3.61 g (quant.); gelb-grünes, zähflüssiges Öl; $R_f = 0.45$ (EE/EtOH/AcOH 10:1:0.1).

$C_{23}H_{34}N_2O_8S$ [498.20]

FD-MS (m/z): 499.2 ($[M+H]^+$, ber.: 499.2); 522.1 ($[M+H+Na]^+$, ber.: 522.2).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 499.2124 ($[M+H]^+$, ber.: 499.2114).

300 MHz 1H -NMR ($CDCl_3$), δ/ppm : 8.53 (d, 1H, $H_{arom.}$ -Dan, $J = 8.82$ Hz); 8.32 (d, 1H, $H_{arom.}$ -Dan, $J = 8.82$ Hz); 8.21 (dd, 1H, $H_{arom.}$ -Dan, $J = 1.08$ Hz, $J = 7.35$ Hz); 7.58-7.48 (m, 2H, $H_{arom.}$ -Dan); 7.17 (d, 1H, $H_{arom.}$ -Dan, $J = 7.71$ Hz); 5.53 (m, 1H, NH); 3.74 (t, 2H, CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 6.27$ Hz); 3.63- 3.58 (m, 8H, CH_2); 3.51-3.48 (m, 2H, CH_2); 3.41-3.38 (m, 4H, CH_2); 3.11-3.05 (m, 2H, NH- CH_2); 2.87 (sb, 6H, $N(CH_3)_2$); 2.59 (t, 2H, CH_2 -COOH, $J_{CH_2,CH_2} = 6.24$ Hz).

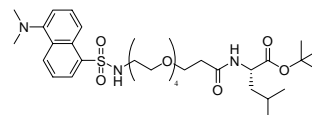
75.5 MHz ^{13}C -NMR ($CDCl_3$), δ/ppm : 174.18 (1C, COOH); 135.36, 130.10, 129.67, 129.67, 129.17, 128.18 (8C, C1-, C2-, C3-, C4-, C5-, C7-, C9-, C10-Dan); 123.32 (1C, C8-Dan); 115.31 (1C, C6-Dan); 70.53, 70.46, 70.17, 69.57 (6C, CH_2); 66.49 (1C, CH_2); 45.49 (2C, $N(CH_3)_2$); 42.91 (1C, CH_2 -NH); 34.89 (1C, CH_2 -COOH).

15-(5-Dimethylamino-naphthalin-1-sulfonylamino)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoyl-L-leucin-*tert*-butylester 59

[Dansyl-NH-Glycol₄-(CH₂)₂-Leu-*Ot*Bu]

a)

Man legt 2.50 g (5.01 mmol) Dansyl-NH-Glycol₄-(CH₂)₂-COOH*TFA **57** in 30 ml absol. CH_2Cl_2 vor und versetzt die Lösung mit 2.17 ml (2.28 g, 7.50 mmol) IIDQ in 5 ml absol.



CH_2Cl_2 . Es wird 15 min bei Raumtemp. gerührt. Man gibt 1 g (4.50 mmol) $HCl \cdot H_2N$ -Leu-*Ot*Bu **58** in 5 ml absol. CH_2Cl_2 , zu. Nach 19 h Rühren bei Raumtemp. verdünnt man mit 100 ml CH_2Cl_2 , wäscht die organische Phase mit je 50 ml H_2O und 50 ml 5%iger Citronensäure, trocknet über $MgSO_4$ und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Die Reinigung erfolgt mittels Flashchromatographie (Laufmittel: $CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1).

Ausb.: 1.70 g (76%, Umsatz: 67%); grünes, zähes Öl.

b)

In 10 ml CH_2Cl_2 werden nacheinander 1 g (2.00 mmol) Dansyl-NH-Glycol₄-(CH_2)₂-COOH*TFA **57**, 306 mg (2.00 mmol) HOBt, 0.34 ml DIPEA (1.91 mmol) und 385 mg (2.00 mmol) EDC gelöst und 15 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend setzt man 426 mg (1.91 mmol) $\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{N-Leu-O}t\text{Bu}$ **58** zu. Es wird 16 h bei Raumtemp. gerührt. Man verdünnt mit 10 ml CH_2Cl_2 , wäscht die organische Phase einmal mit 15 ml H_2O und einmal mit 15 ml ges. NaCl -Lösung, trocknet über MgSO_4 und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Nach Flashchromatographie an 35 g Kieselgel (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 15:1) erhält man das reine Produkt.

Ausb.: 1.10 g (87%); grünes, zähes Öl; $R_f = 0.50$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 15:1); $[\alpha]_D^{23} = -3.7$ ($c = 1$, CHCl_3).

$\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$ [667.35]

ESI-MS (positiv), m/z : 612.5 ($[\text{M}-t\text{Bu}+2\text{H}]^+$, ber.: 612.3); 690.6 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 690.3); 706.5 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 706.3).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 690.3401 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 690.3401).

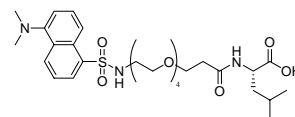
400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (^1H , COSY), δ/ppm : 8.53 (s_b , 1H, $\text{H}_{\text{arom.}-\text{Dan}}$); 8.34 (s_b , 1H, $\text{H}_{\text{arom.}-\text{Dan}}$); 8.21 (d, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}-\text{Dan}}$, $J = 7.04$ Hz); 7.57-7.51 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}-\text{Dan}}$); 7.18 (s_b , 1H, $\text{H}_{\text{arom.}-\text{Dan}}$); 6.63 (d, 1H, NH, $J = 7.80$ Hz); 5.90 (s_b , 1H, NH); 4.45-4.40 (m, 1H, L^α); 3.74-3.71 (m, 2H, CH_2); 3.61-3.57 (m, 8H, CH_2); 3.48-3.46 (m, 2H, CH_2); 3.38-3.34 (m, 4H, CH_2); 3.07 (q, 2H, NH- CH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 5.08$ Hz); 2.89 (s_b , 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 2.49 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.28$ Hz); 1.65-1.43 (m, 3H, L^β , L^γ); 1.41 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$); 0.86 (d, 6H, L^δ , $J_{L^\gamma,L^\delta} = 6.24$ Hz).

100.6 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) (^{13}C , HMQC), δ/ppm : 172.17, 170.96 (2C, COOH); 135.32, 130.09, 129.69, 129.34, 128.13 (8C, C1-, C2-, C3-, C4-, C5-, C7-, C9-, C10-Dan); 123.41 (1C, C8-Dan); 115.37 (1C, C6-Dan); 81.44 (1C, $\text{C}_q\text{-}t\text{Bu}$); 70.58, 70.49, 70.41, 70.35, 70.20, 69.29 (6C, CH_2); 67.25 (1C, CH_2); 51.25 (1C, L^α); 45.56 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 43.06 (1C, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 41.70 (1C, L^β); 36.82 (1C, $\text{CH}_2\text{-CONH}$); 27.99 (3C, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$); 24.88 (1C, L^γ); 22.78, 22.11 (2C, L^δ).

15-(5-Dimethylamino-naphthalin-1-sulfonylamino)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoyl-L-leucin 60

[Dansyl-NH-Glycol₄-(CH₂)₂-Leu-OH]

Zu 1 g (1.50 mmol) Dansyl-NH-Glycol₄-(CH₂)₂-Leu-OtBu **59** gibt man 10 ml TFA sowie 1 ml Anisol und rührt 4 h bei Raumtemperatur. Das überschüssige Lösungsmittel wird i. Vak.



entfernt und der Rückstand dreimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Gereinigt wird das Rohprodukt mittels Flashchromatographie an 30 g Kieselgel (Laufmittel: EE/EtOH/AcOH 10:1:0.1). Nach der Reinigung wird erneut dreimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert.

Ausb.: 916 mg (quant.); grünes, zähflüssiges Öl; $R_f = 0.30$ (EE/EtOH/AcOH 10:1:0.1); $[\alpha]_D^{23} = -10.3$ ($c = 1$, CHCl₃).

C₂₉H₄₅N₃O₉S [611.29]

ESI-MS (positiv), m/z : 634.6 ([M+Na]⁺, ber.: 634.2); 650.6 ([M+K]⁺, ber.: 650.3); 656.6 ([M+2Na-H]⁺, ber.: 656.2); 672.5 ([M+K+Na-H]⁺, ber.: 672.3).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 612.2952 ([M+H]⁺, ber.: 612.2956).

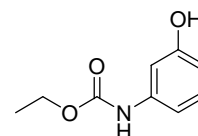
400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃) (¹H, COSY), δ /ppm: 8.70 (s_b, 1H, COOH); 8.57 (d, 1H, H_{arom.}-Dan, $J = 8.82$ Hz); 8.46 (d, 1H, H_{arom.}-Dan, $J = 8.82$ Hz); 8.25 (d, 1H, H_{arom.}-Dan, $J = 6.63$ Hz); 7.63-7.55 (m, 2H, H_{arom.}-Dan); 7.34 (d, 1H, H_{arom.}-Dan, $J = 7.71$ Hz); 6.43 (s_b, 1H, NH); 4.47-4.43 (m, 1H, L ^{α}); 3.73-3.69 (m, 2H, CH₂); 3.60 (s_b, 8H, CH₂); 3.52-3.48 (m, 2H, CH₂); 3.42-3.38 (m, 4H, CH₂); 3.12-3.08 (m, 2H, NH-CH₂); 3.01 (s_b, 6H, N(CH₃)₂); 2.55-2.50 (m, 2H, CH₂-COOH); 1.67-1.43 (m, 3H, L ^{β} , L ^{γ}); 0.87 (d, 6H, L ^{δ} , $J_{L^{\gamma},L^{\delta}} = 4.77$ Hz).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃) (¹³C, HMQC), δ /ppm: 174.32, 172.75 (2C, COOH); 135.66, 129.46, 129.29, 128.02 (8C, C1-, C2-, C3-, C4-, C5-, C7-, C9-, C10-Dan); 124.25 (1C, C8-Dan); 116.18 (1C, C6-Dan); 70.60, 70.41, 70.28, 70.23, 70.03, 69.39 (6C, CH₂); 67.15 (1C, CH₂); 51.34 (1C, L ^{α}); 45.83 (2C, N(CH₃)₂); 42.91 (1C, CH₂-NH); 40.49 (1C, L ^{β}); 36.38 (1C, CH₂-CONH); 24.76 (1C, L ^{γ}); 22.83, 21.71 (2C, L ^{δ}).

5.9 Versuche zu Kapitel 3.3

3-(*N*-Ethoxycarbonyl)aminophenol **62**⁶⁸

Es werden 40 g (0.37 mol) 3-Aminophenol **61** und 125 ml Ethylacetat für 30 min unter Rückfluss erhitzt. Anschließend werden 17.52 ml (0.18 mol) Chlorameisensäureethylester unter Erhitzen über 45 min zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird das Gemisch eine weitere Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nachdem die Lösung abgekühlt ist, wird der entstandene Niederschlag abfiltriert, der Filtrerrückstand wird dreimal mit je 100 ml Ethylacetat und dreimal mit je 100 ml Diethylether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit und man erhält einen farblosen Feststoff.



Ausb.: 33 g (quant.); farbloser Feststoff.

$C_9H_{11}NO_3$ [181.07]

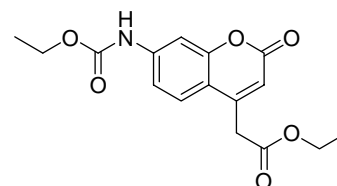
ESI-MS (positiv), m/z: 182.2 ($[M+H]^+$, ber.: 182.1).

300 MHz 1H -NMR (DMSO- d_6), δ /ppm: 9.46, 9.30 (2*s, 2H, NH, OH); 7.03-6.98 (m, 2H, H_{2arom.}, H_{4arom.}); 6.83 (d, 1H, H_{5arom.}, $J_{H4,H5} = J_{H5,H6} = 8.11$ Hz); 6.38-6.34 (m, 1H, H_{6arom.}); 4.08 (q, 2H, CH₂, $J_{CH_2,CH_3} = 6.99$ Hz); 1.21 (t, 3H, CH₃, $J_{CH_2,CH_3} = 6.99$ Hz).

75.5 MHz ^{13}C -NMR (DMSO- d_6), δ /ppm: 157.74 (1C, C_{1arom.}); 153.58 (1C, CO); 140.35 (1C, C_{3arom.}); 129.44 (1C, C_{5arom.}); 109.59, 109.20 (2C, C_{4arom.}, C_{6arom.}); 105.50 (1C, C_{2arom.}); 60.13 (1C, CH₂); 14.56 (1C, CH₃).

2-(7-(*N*-Ethoxycarbonyl)-aminocumarin-4-yl)-essigsäureethylester **65**⁶⁸

Man legt 15 g (83 mmol) 3-(*N*-Ethoxycarbonyl)aminophenol **62** suspendiert in 410 ml 70%iger H₂SO₄ vor und gibt portionsweise 18.4 g (91 mmol, 1.1 äquiv.) 1,3-Acetondicarbonsäurediethylester **63** unter Eiskühlung zu. Es wird weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend rührt man 18 h bei Raumtemperatur. Die so erhaltene gelbe, stark fluoreszierende Lösung wird auf 600 g Eis gegossen und der ausgefallene Niederschlag abfiltriert. Man wäscht den



Rückstand zweimal mit jeweils 100 ml H₂O sowie einmal mit 300 ml Diethylether und kristallisiert aus 100 ml Acetonitril um. Es wird ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausb.: 17.20 g (65%); farbloser Feststoff.

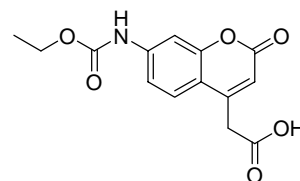
C₁₆H₁₇NO₆ [319.11]

ESI-MS (positiv), m/z: 342.2 ([M+Na]⁺, ber.: 342.1).

300 MHz ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ/ppm: 10.14 (1H, NH); 7.58-7.54 (m, 2H, H5-, H8-Cu); 7.36 (d, 1H, H6-Cu, J_{H5,H6} = 8.82 Hz); 6.31 (s, 1H, H3-Cu); 4.18-4.08 (m, 4H, CH₂); 3.93 (s, 2H, CH₂-Cu); 1.23 (t, 3H, CH₃, J_{CH₂,CH₃} = 6.99 Hz); 1.16 (t, 3H, CH₃, J_{CH₂,CH₃} = 6.99 Hz).

2-(7-(*N*-Ethoxycarbonyl)-aminocumarin-4-yl)-essigsäure **66**

In 400 ml 70%iger H₂SO₄ werden 16.60 g (92 mmol) 3-(*N*-Ethoxycarbonyl)aminophenol **62** suspendiert und unter Eiskühlung portionsweise 29.45 g (200 mmol) 1,3-



Acetondicarbonsäure **64** zugegeben. Man rührt weitere 30 min bei 0 °C, bringt auf Raumtemperatur, rührt 20 h und gießt auf 600 g Eis. Der erhaltene Feststoff wird je zweimal mit 200 ml H₂O und 300 ml Diethylether gewaschen, in 80 ml Acetonitril aufgeköcht, und nach dem Abkühlen als farbloser Feststoff isoliert.

Ausb.: 24.20 g (91%); farbloser Feststoff; (Lit.:⁶⁹ 63%).

C₁₄H₁₃NO₆ [291.07]

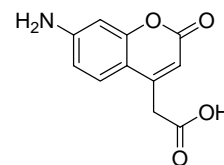
ESI-MS (positiv), m/z: 314.2 ([M+Na]⁺, ber.: 314.1).

300 MHz ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ/ppm: 10.15 (s, 1H, NH); 7.62-7.55 (m, 2H, H5-, H8-Cu); 7.36 (dd, 1H, H6-Cu, J_{H6,H8} = 1.83 Hz, J_{H5,H6} = 8.82 Hz); 6.31 (s, 1H, H3-Cu); 4.16 (q, 2H, CH₂-CH₃, J_{CH₂,CH₃} = 6.99 Hz); 3.84 (s, 2H, CH₂-Cu); 1.24 (t, 3H, CH₃, J_{CH₂,CH₃} = 6.99 Hz).

7-Aminocumarin-4-yl-essigsäure (Aca) 67

a)

Man suspendiert 10 g (31 mmol) 2-(7-(*N*-Ethoxycarbonyl)-aminocumarin-4-yl)-essigsäureethylester **65** in 100 ml 1.5N NaOH-Lsg. und erhitzt 2 h auf 100 °C. Es wird auf Raumtemp. abkühlen gelassen und mit konz. HCl auf pH = 2-3 eingestellt. Innerhalb von 18 h kristallisiert ein gelber Feststoff bei 4 °C aus. Er wird abgesaugt und getrocknet.



Ausb.: 6.03 g (76%); gelber Feststoff.

b)

Es werden 24.20 g (83 mmol) 2-(7-(*N*-Ethoxycarbonyl)-aminocumarin-4-yl)-essigsäure **66** in 100 ml 1.5N NaOH-Lsg. suspendiert und 2 h auf 100 °C erhitzt. Man lässt auf Raumtemp. abkühlen und stellt einen pH-Wert von 2–3 durch Zugabe von konz. HCl ein. Während des Ansäuerns fällt im neutralen Bereich ein bräunlicher Feststoff an. Dieser wird durch Filtration entfernt. Bei 4 °C kristallisiert innerhalb von 18 h ein gelber Feststoff aus. Er wird abgesaugt und getrocknet.

Ausb.: 19.50 g (85%); gelber Feststoff.

$C_{11}H_{10}NO_4Cl$ [255.03]

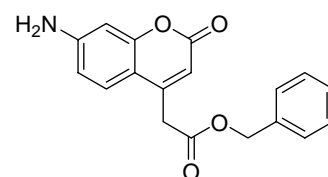
ESI-MS (positiv), m/z: 278.1 ($[M+Na]^+$, ber.: 278.0).

300 MHz 1H -NMR (DMSO- d_6), δ /ppm: 12.71 (sb, 1H, COOH); 7.31 (d, 1H, H5-Cu, $J_{H_5,H_6} = 8.82$ Hz); 6.53 (dd, 1H, H6-Cu, $J_{H_6,H_8} = 2.22$ Hz, $J_{H_5,H_6} = 8.82$ Hz); 6.41 (d, 1H, H8-Cu, $J_{H_6,H_8} = 2.22$ Hz); 3.71 (s, 2H, CH₂-Cu); 3.50 (sb, 2H, NH₂).

75.5 MHz ^{13}C -NMR (DMSO- d_6), δ /ppm: 170.89 (1C, COOH); 160.81 (1C, C2-Cu); 155.79 (1C, C9-Cu); 153.20 (1C, C4-Cu); 150.48 (1C, C7-Cu); 126.38 (1C, C5-Cu); 111.40 (1C, C6-Cu); 109.08 (1C, C3-Cu); 108.32 (1C, C10-Cu); 98.70 (1C, C8-Cu); 37.38 (1C, CH₂-Cu).

2-(7-Aminocumarin-4-yl)-essigsäurebenzylester 68

Es werden 10 ml Benzylalkohol auf –5 °C gekühlt und anschließend 0.36 ml (5.02 mmol) Thionylchlorid zugetropft. Nach erfolgter Zugabe von 1 g (4.56 mmol) Aca **67** wird weitere 15 min bei –5 °C gerührt, bevor man 1 h auf 55 °C



erhitzt. Beim Abkühlen fällt ein gelber Feststoff aus. Dieser wird abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Das Produkt kann ohne weitere Reinigung eingesetzt werden.

Ausb.: 1.36 g (87%); beige, amorpher Feststoff; $R_F = 0.61$ (EE/CH 2:1); Schmp.: 170 °C (EtOH).

$C_{18}H_{15}NO_4$ [309.10]

FD-MS, m/z: 309.5 ($[M]^+$, ber.: 309.1); 619.3 ($[2^*M+H]^+$, ber.: 619.1).

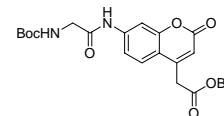
300 MHz 1H -NMR (DMSO- d_6), δ /ppm: 7.41 (d, 1H, H5-Cu, $J_{H4,H5} = 8.82$ Hz); 7.31 (sb, 5H, $H_{arom.-Bn}$); 6.74-6.68 (m, 2H, H6-, H8-Cu); 6.13 (s, 1H, H3-Cu); 5.12 (s, 2H, CH_2-Bn); 3.93 (s, 2H, CH_2-Cu).

75.5 MHz ^{13}C -NMR (DMSO- d_6), δ /ppm: 169.27, 160.38 (2C, CO); 155.20 (1C, C4-Cu); 149.59 (1C, C9-Cu); 149.30 (1C, C7-Cu); 135.88 (1C, $C_{ipso-Bn}$); 128.51, 128.22, 128.01 (5C, $C_{arom.-Bn}$); 126.54 (1C, C5-Cu); 113.35 (1C, C6-Cu); 110.92 (1C, C3-Cu); 110.44 (1C, C10-Cu); 101.73 (1C, C8-Cu); 66.37 (1C, CH_2-Bn); 36.88 (1C, CH_2-Cu).

2-(7-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-glycyl)-aminocumarin-4-yl)-essigsäurebenzylester 70

a)

Man löst 8.36 g (48 mmol, 3.2 Äquiv.) Boc-Gly-OH **69** in 50 ml absol. DMF, kühlt die Lösung auf -19 °C ab, versetzt mit 5.61 ml (50 mmol) NMM und tropft anschließend langsam 6.26 ml



(48 mmol) Chlorameisensäure-isobutylester zu. Es wird 15 min bei -19 °C gerührt. In 150 ml absol. DMF werden 4.64 g (15 mmol) 2-(7-Aminocumarin-4-yl)-essigsäurebenzylester **68** suspendiert. Man gibt 3.32 ml (36 mmol) NMM zu und tropft die erhaltene Suspension langsam bei -19 °C zu. Es wird 30 min bei -19 °C, 1 h bei 0 °C und weitere 20 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und anschließend Wasser zugesetzt, das gleich im Anschluss an die Hydrolyse i. Vak. entfernt wird. Man kodestilliert mit Toluol und reinigt mittels Flashchromatographie an 600 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 1:1 \rightarrow CH/EE 1:2). Das Laufmittel wird größtenteils entfernt und die erhaltene Lösung mit MeOH versetzt. Hierbei fällt ein Teil des Produkts aus.

Ausb.: 2.76 g (40%, es werden 2.26 g (48%) Edukt zurückgewonnen); farbloser amorpher Feststoff; $R_F = 0.50$ (EE/CH 2:1).

b)

In 1.50 ml absol. DMF werden 57 mg (0.32 mmol, 2 Äquiv.) Boc-Gly-OH sowie 123 mg (0.32 mmol, 2 äquiv.) HATU gelöst. Die 5-minütige Voraktivierung wird durch Zugabe von 43.1 µl 2,4,6-Collidin initiiert. Anschließend gibt man 50 mg (0.16 mmol) 2-(7-Aminocumarin-4-yl)-essigsäurebenzylester **68** zu und rührt 42 h bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in 20 ml Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit je 10 ml 1N HCl-Lösung, einmal mit 10 ml ges. NaHCO₃-Lösung, sowie einmal mit 10 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt an 10 g Kieselgel (Laufmittel: EE/CH 2:1).

Ausb.: 56 mg (74%); farbloser amorpher Feststoff.

C₂₅H₂₆N₂O₇ [466.17]

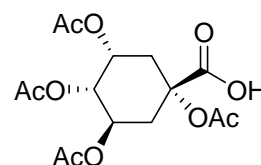
ESI-MS (positiv), m/z: 499.3 ([M+Na]⁺, ber.: 499.2).

300 MHz ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ/ppm: 10.40 (s, 1H, NH); 7.75 (d, 1H, H8-Cu, J_{H6,H8} = 1.83 Hz); 7.61 (d, 1H, H5-Cu, J_{H5,H6} = 8.82 Hz); 7.43-7.38 (m, 6H, H6-Cu, H_{arom.-Bn}); 7.12 (t, 1H, NH^G, J_{NH,Gα} = 5.88 Hz); 6.39 (s, 1H, H3-Cu); 5.14 (s, 2H, CH₂-O); 4.04 (s, 2H, CH₂-Cu); 3.27 (d, 2H, G^α, J_{Gα,NH} = 5.88 Hz); 1.39 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

75.5 MHz ¹³C-NMR (DMSO-d₆), δ/ppm: 170.56, 169.26 (2C, CO); 159.96 (1C, C2-Cu); 156.08 (1C, CO-Urethan); 153.97 (1C, C9-Cu); 149.21 (1C, C4-Cu); 142.45 (1C, C7-Cu); 135.85 (1C, C_{ipso}-Bn); 128.52, 128.25, 128.08 (5C, C_{arom.-Bn}); 126.26 (1C, C5-Cu); 115.24 (1C, C6-Cu); 114.35 (1C, C10-Cu); 114.22 (1C, C3-Cu); 105.73 (1C, C8-Cu); 78.27 (1C, C_q-*t*Bu); 66.45 (1C, CH₂-Bn); 44.04 (1C, G^α); 36.71 (1C, CH₂-Cu); 28.31 (3C, CH₃-*t*Bu).

(1*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-1,3,4,5-Tetraacetoxycyclohexancarbonsäure **72**

Man suspendiert 10 g (52 mmol) D-Chinasäure **71** in 75 ml AcOH/Ac₂O (2:1) und gibt 2 Tropfen 70%ige HClO₄ zu. Die Suspension löst sich auf, und die resultierende Lösung wird 16 h bei 45 °C gerührt. Anschließend gibt man 150 ml CHCl₃, 10 ml ges.



NaHCO₃-Lsg. und 5 ml Wasser zu. Man trennt die wässrige Phase ab und extrahiert diese mit 30 ml CHCl₃. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen, gegen 30 ml ges. NaCl-Lsg. geschüttelt und über MgSO₄ getrocknet.

Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. erhält man einen farblosen amorphen Feststoff. Dieser wird i. Hochvak. getrocknet.

Ausb.: 16.60 g (88%); farbloser amorpher Feststoff.

$C_{15}H_{20}O_{10}$ [360.11]

ESI-MS (negativ), m/z: 238.8 ($[M-3Ac+2H+Li]^-$, ber.: 238.8); 275.1 ($[M-2Ac+2H]^-$, ber.: 275.1); 316.8 ($[M-CO_2]^-$, ber.: 316.1); 358.8 ($[M-H]^-$, ber.: 359.1).

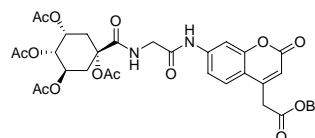
300 MHz 1H -NMR ($CDCl_3$) (1H , COSY), δ/ppm : 9.59 (sb, 1H, COOH); 5.52 (q, 1H, H3-Chi, $J_{H3,H4} = 3.66$ Hz); 5.39 (m, 1H, H5-Chi); 4.99 (dd, 1H, H4-Chi, $J_{H3,H4} = 3.66$ Hz, $J_{H4,H5} = 9.93$ Hz); 2.67-2.51 (m, 2H, H2a-, H6a-Chi); 2.33 (dd, 1H, H2b-Chi, $J_{H2b,H3} = 3.69$ Hz, $J_{H2a,b} = 15.81$ Hz); 2.10, 2.03, 2.00, 1.96 (4*s, 12H, CH_3 -Ac); 1.96-1.86 (m, 1H, H6b-Chi).

75.5 MHz ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) (^{13}C , HMQC), δ/ppm : 175.32 (1C, COOH); 170.13, 169.95, 169.86, 169.81 (4C, CO); 78.26 (1C, C1-Chi); 71.37 (1C, C4-Chi); 67.51 (1C, C3-Chi); 66.34 (1C, C5-Chi); 36.60 (1C, C2-Chi); 31.58 (1C, C6-Chi); 20.92, 20.88, 20.67, 20.62 (4C, CH_3 -Ac).

2-(7-{N-[1S,3R,4S,5R]-1,3,4,5-Tetraacetyloxycyclohexanoyl-glycyl}-aminocumarin-4-yl)-essigsäurebenzylester **74**

a)

Man versetzt 308 mg (0.86 mmol) 2-(7-(*N*-tert-butylloxycarbonyl-glycyl)-aminocumarin-4-yl)-essigsäurebenzylester **70** mit 5 ml TFA und 0.9 ml TIS. Es wird 1.5 h bei Raumtemp. gerührt, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt



und dreimal mit jeweils 15 ml Toluol kdestilliert. Das resultierende Öl **73** wird 2 h i. Hochvak. getrocknet. Man gibt 868 mg (2.41 mmol, 2.5 Äquiv.) (1S,3R,4S,5R)-1,3,4,5-Tetraacetyloxycyclohexancarbonsäure **72**, 5 ml absol. DMF, 998 mg (2.41 mmol) HCTU, 369 mg (2.41 mmol) HOBt und 0.85 ml DIPEA zusammen und lässt die Mischung 15 min reagieren. Die Lösung gibt man zu dem i. Hochvak. getrockneten Öl und versetzt mit weiteren 0.85 ml DIPEA. Es wird 20 h bei Raumtemp. gerührt, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der resultierende Rückstand in 10 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird zweimal mit je 10 ml 5%iger Citronensäure, einmal mit 10 ml ges. $NaHCO_3$ -Lsg. und einmal mit 10 ml ges. $NaCl$ -Lsg. gewaschen. Man trocknet über $MgSO_4$

und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 15 g Kieselgel (Laufmittel: EE/CH 4:1) gereinigt.

Ausb.: 111 mg (32%); farbloser amorpher Feststoff.

b)

Eine Lösung aus 990 mg (2.12 mmol) 2-(7-(*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-glycyl)-aminocumarin-4-yl)-essigsäurebenzylester **70**, 2 ml TFA und 0.2 ml H₂O, wird 1 h bei Raumtemp. gerührt. Die flüchtigen Komponenten werden i. Vak. entfernt und der Rückstand zweimal mit je 10 ml Toluol kodestilliert. Das nach der Trocknung i. Hochvak. erhaltene Produkt **73** wird ohne Reinigung weiter verwendet.

In 10 ml absol. DMF werden 1.53 g (4.24 mmol, 2 Äquiv.) (1*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-1,3,4,5-Tetraacetoxy-cyclohexancarbonsäure **72**, 1.36 g (4.24 mmol) TBTU, 649 mg (4.24 mmol) HOBt sowie 741 µl DIPEA gelöst und 15 min bei Raumtemp. gerührt. Die so erhaltene Lösung wird mit weiteren 525 µl (1.5 Äquiv.) DIPEA versetzt und mit dem vorher hergestellten TFA-Salz vereinigt. Die Reaktionslösung wird 20 min unter Luftkühlung in der Mikrowelle gerührt (Temperatur: 50 °C, Leistung: 50 W). Man entfernt überschüssiges DMF im Vakuum, nimmt den Rückstand in 100 ml Ethylacetat auf und wäscht die resultierende Lösung zweimal mit je 10 ml 5%iger Citronensäure, einmal mit 10 ml ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 10 ml ges. NaCl-Lösung. Es wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an 300 g Kieselgel (Laufmittel: EE/CH 4:1).

Ausb.: 984 mg (75%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.20$ (EE/CH 4:1); $[\alpha]_D^{22} = -10.0$ (c = 1, DMSO).

C₃₅H₃₆N₂O₁₄ [708.22]

ESI-MS (positiv), m/z: 731.3 ([M+Na]⁺, ber.: 731.2); 1439.5 ([2M+Na]⁺, ber.: 1439.4).

400 MHz ¹H-NMR (CD₃OD) (¹H, COSY), δ/ppm: 7.79 (d, 1H, H8-Cu, J_{H6,H8} = 1.96 Hz); 7.53-7.51 (m, 1H, H5-Cu); 7.41 (dd, 1H, H6-Cu, J_{H6,H8} = 2.36 Hz, J_{H5,H6} = 9.00 Hz); 7.33 (s, 5H, H_{arom.}-Bn); 6.33 (s, 1H, H3-Cu); 5.61 (m, 1H, H3-Chi); 5.50 (m, 1H, H5-Chi); 5.18 (s, 2H, CH₂-Bn); 5.12 (dd, 1H, H4-Chi, J_{H3,H4} = 3.92 Hz, J_{H4,H5} = 10.56 Hz); 4.02 (s, 2H, CH₂-Cu); 3.93 (d, 2H, G^α, J_{NH,Gα} = 7.04 Hz); 2.76 (m, H2a-Chi); 2.68-2.64 (m, 1H, H6a-Chi); 2.55 (1H, H2b-Chi, J_{H2a,H3} = 3.52 Hz, J_{H2a,b} = 16.04 Hz); 2.29, 2.15, 2.07, 2.02 (4*s, 12H, CH₃-Ac); 2.07-2.04 (m, 1H, H6b-Chi).

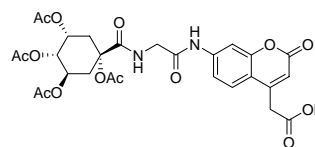
100.6 MHz ¹³C-NMR (CD₃OD) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 173.31, 172.67, 171.83, 171.70, 171.62, 170.47, 169.72 (7C, CO); 162.65 (1C, C2-Cu); 155.48 (1C, C9-Cu); 150.63 (1C, C4-Cu); 143.10 (1C, C7-Cu); 137.04 (1C, C_{ipso}-Bn); 129.55, 129.36 (5C, C_{arom.}-Bn);

126.82 (1C, C5-Cu); 116.79 (1C, C6-Cu); 116.15 (1C, C10-Cu); 115.68 (1C, C3-Cu); 107.75 (1C, C8-Cu); 82.27 (1C, C1-Chi); 73.27 (1C, C4-Chi); 69.46 (1C, CH₂-Bn); 68.20 (1C, C3-Chi); 67.78 (1C, C5-Chi); 44.39 (1C, G^a); 38.57, 38.32 (2C, C2-Chi, CH₂-Cu); 31.97 (1C, C6-Chi); 21.77, 20.82, 20.64, 20.58 (4C, CH₃-Ac).

2-(7-{N-[1S,3R,4S,5R]-1,3,4,5-Tetraacetyloxycyclohexanoyl-glycyl}-aminocumarin-4-yl)-essigsäure 75

a)

In einem Dreihalskolben werden 584 mg (0.82 mmol) **74** in 10 ml MeOH gelöst. Es wird mehrmals evakuiert und mit Argon geflutet, bevor man eine Spatelspitze Pd/C (10%)



zugibt. Der Kolben wird erneut zweimal mit Argon gespült. Anschließend ersetzt man das Argon durch Wasserstoff (Ballon mit H₂-Gas). Es wird 50 min bei Raumtemp. hydriert, über *Hyflo*[®] filtriert und nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgt die Reinigung des Rohprodukts durch Flashchromatographie an 80 g Kieselgel (Laufmittel: EE/EtOH/AcOH 6:1:0.1).

Ausb.: 110 mg (22%); farbloser amorpher Feststoff.

b)

Man löst 778 mg (1.11 mmol) **74** in 15 ml MeOH in einem Dreihalskolben. Es wird mehrmals evakuiert und mit Argon geflutet, bevor man eine Spatelspitze Pd/C (5%) zugibt. Der Kolben wird erneut zweimal mit Argon gespült. Anschließend ersetzt man die Argonatmosphäre durch Wasserstoff (Ballon mit H₂-Gas). Es wird 45 min bei Raumtemp. hydriert, über *Hyflo*[®] filtriert und nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgt die Reinigung des Rohprodukts durch Flashchromatographie an 100 g Kieselgel (Laufmittel: EE/EtOH/AcOH 6:1:0.1).

Ausb.: 667 mg (98%); farbloser amorpher Feststoff; R_f = 0.30 (EE/EtOH/AcOH 6:1:0.1); $[\alpha]_D^{22} = -21.7$ (c = 1, DMSO).

C₂₈H₃₀N₂O₁₄ [618.17]

ESI-MS (positiv), m/z: 641.2 ([M+Na]⁺, ber.: 641.2); 1259.4 ([2M+Na]⁺, ber.: 1259.3); 1900.6 ([3M+2Na]⁺, ber.: 1900.5).

300 MHz ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ/ppm: 10.21 (s, 1H, NH); 8.44 (t, 1H, NH^G, J_{NH,Gα} = 5.52 Hz); 7.74 (m, 2H, H5-, H8-Cu); 7.44-7.39 (m, 1H, H6-Cu); 6.34 (s, 1H, H3-Cu); 5.40-5.28

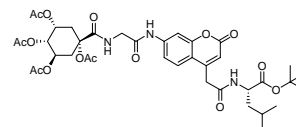
(m, 2H, H3-, H5-Chi); 5.05 (dd, 1H, H4-Chi, $J_{H3,H4} = 3.66$ Hz, $J_{H4,H5} = 10.29$ Hz); 3.92 (dd, 1H, G^{α} , $J_{NH,G^{\alpha}} = 5.52$ Hz, $J_{G^{\alpha},b} = 16.53$ Hz); 3.83 (s, 2H, CH_2-Cu); 3.75 (dd, 1H, G^{α} , $J_{NH,G^{\alpha}} = 5.52$ Hz, $J_{G^{\alpha},b} = 16.53$ Hz); 2.63-2.58 (m, 1H, H2a-Chi); 2.49-2.38 (m, 3H, H2b-, H6-Chi); 2.05, 2.01, 1.93, 1.90 (4*s, 12H, CH_3-Ac).

75.5 MHz ^{13}C -NMR (DMSO- d_6), δ /ppm: 172.25, 170.43, 169.93, 179.87, 169.84, 169.66, 168.29 (7C, CO); 160.09 (1C, C2-Cu); 153.77 (1C, C9-Cu); 153.20 (1C, C4-Cu); 142.11 (1C, C7-Cu); 126.17 (1C, C5-Cu); 115.19 (1C, C6-Cu); 115.08 (1C, C10-Cu); 112.44 (1C, C3-Cu); 105.56 (1C, C8-Cu); 80.50 (1C, C1-Chi); 71.36 (1C, C4-Chi); 68.05 (1C, C3-Chi); 66.52 (1C, C5-Chi); 44.39 (1C, G^{α}); 39.12 (1C, CH_2-Cu); 37.37 (1C, C2-Chi); 30.32 (1C, C6-Chi); 21.76, 20.82, 20.58, 18.08 (4C, CH_3-Ac).

2-(7-{*N*-[1*S*,3*R*,4*S*,5*R*]-1,3,4,5-Tetraacetoxycyclohexanoyl-glycyl}-aminocumarin-4-yl)-essigsäureamid-L-leucin-*tert*-butylester **76**

a)

Man löst 30 mg (0.049 mmol) **75** in 2 ml absol. DMF und versetzt mit 8 mg (0.049 mmol) HOBt und 25 mg (0.16 mmol) PyBop. Die Lösung wird 48 h bei Raumtemp. gerührt. Es



werden 12 mg (0.054 mmol, 1.1 Äquiv.) $HCl \cdot H_2N-LeuOtBu$ **58** sowie 7.5 μ l (0.057 mmol) NEt_3 gelöst in 1.5 ml absol. DMF zugesetzt, und weitere 14 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und das Verhältnis des Nebenprodukts **77** zum gewünschten Produkt **76** durch analytische HPLC (LUNA C-18, Gradient (% CH_3CN): 30-80 (40 min)) als 2.1:1 bestimmt.

b)

In 1 ml absol. DMF werden 30 mg (0.049 mmol) **75** bei 0 °C gelöst und mit 8 mg (0.049 mmol) CDI versetzt, bevor man 11 mg (0.049 mmol) $HCl \cdot H_2N-LeuOtBu$ **58** zusetzt und die Lösung 20 min bei 0 °C rührt. Nach 18 h Rühren bei Raumtemp. wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Verhältnis des Nebenprodukts **77** zum gewünschten Produkt **76** mittels analytischer HPLC (LUNA C-18, Gradient (% CH_3CN): 30-80 (40 min)) als 1.0:1.6 bestimmt. Die Reinigung erfolgt mittels semipräp. HPLC (LUNA C-18, Gradient (% CH_3CN): 30-80 (120 min)).

Ausb.: 11 mg (29%); $R_t = 27.12$ min (LUNA C-18, Gradient (% CH_3CN): 30-80 (40 min)); $[\alpha]_D^{22} = -18.0$ (c = 0.5, DMSO); 13 mg (45%) Nebenprodukt.

c)

Bei 0 °C werden 541 mg (0.88 mmol) **75** in 5 ml absol. DMF gelöst und mit 181 mg (0.88 mmol) DCC sowie 134 mg (0.88 mmol) HOBt versetzt. Man lässt die Reaktionsmischung 15 min bei 0 °C vorreagieren und gibt anschließend 196 mg (0.88 mmol) HCl·H₂N-LeuOtBu **58** und 123 µl (0.88 mmol) NEt₃ bei der angegebenen Temperatur zu. Nach 1.5 h lässt man die Reaktionslösung auf Raumtemp. erwärmen und rührt weitere 17 h. Der ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nachdem man dreimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert hat, wird der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und der anfallende Harnstoff erneut abgetrennt. Die resultierende organische Phase wird nacheinander mit 10 ml 1N HCl, 10 ml ges. NaHCO₃-Lsg. sowie 10 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Verhältnis des Nebenprodukts **77** zum gewünschten Produkt **76** wird mittels analytischer HPLC (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN): 30-80 (40 min)) als 1.0:2.8 bestimmt. Das Reaktionsgemisch wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

C₃₈H₄₉N₃O₁₅ [787.32]

ESI-MS (positiv), m/z: 810.4 ([M+Na]⁺, ber.: 810.3).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 810.3078 ([M+Na]⁺, ber.: 810.3061).

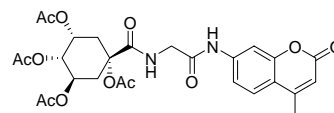
400 MHz ¹H-NMR (DMSO-d₆) (¹H, COSY), δ/ppm: 10.19 (s, 1H, NH); 8.59 (d, 1H, NH^L, J_{NH,Lα} = 7.71 Hz); 8.43 (t, 1H, NH^G, J_{NH,Gα} = 5.88 Hz); 7.74 (d, 1H, H8-Cu, J_{H6,H8} = 1.83 Hz); 7.71 (d, 1H, H5-Cu, J_{H5,H6} = 8.82 Hz); 7.40 (dd, 1H, H6-Cu, J_{H6,H8} = 1.83 Hz, J_{H5,H6} = 8.82 Hz); 6.31 (s, 1H, H3-Cu); 5.39-5.27 (m, 2H, H3-, H5-Chi); 5.05 (dd, 1H, H4-Chi, J_{H3,H4} = 3.66 Hz, J_{H4,H5} = 10.29 Hz); 4.14-4.09 (m, 1H, L^α); 3.93 (dd, 1H, G^αa, J_{NH,Gαa} = 5.97 Hz, J_{Gαa,b} = 16.65 Hz); 3.80-3.73 (m, 3H, G^αb, CH₂-Cu); 2.62-2.57 (m, 1H, H2a-Chi); 2.52-2.46 (m, 2H, H2b-, H6a-Chi); 2.12, 2.04, 2.01, 1.94 (4*s, 13H, CH₃-Ac, H6b-Chi); 1.70-1.41 (m, 3H, L^β, L^γ); 1.35 (s, 9H, CH₃-tBu); 0.89 (d, 3H, L^δ, J_{Lγ,Lδ} = 6.24 Hz); 0.80 (d, 3H, L^δ, J_{Lγ,Lδ} = 6.60 Hz).

100.6 MHz ¹³C-NMR (DMSO-d₆) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 171.64, 170.41, 169.93, 169.86, 169.81, 169.63, 168.32, 167.85 (8C, CO); 159.99 (1C, C2-Cu); 153.92 (1C, C9-Cu); 150.82 (1C, C4-Cu); 142.09 (1C, C7-Cu); 126.14 (1C, C5-Cu); 114.92 (1C, C6-Cu); 114.58 (1C, C10-Cu); 113.84 (1C, C3-Cu); 105.68 (1C, C8-Cu); 80.71 (1C, C_q-tBu); 80.52 (1C, C1-Chi); 71.36 (1C, C4-Chi); 68.09 (1C, C3-Chi); 66.53 (1C, C5-Chi); 51.34 (1C, L^α); 43.02 (1C, G^α); 40.61 (1C, L^β); 38.45 (1C, CH₂-Cu); 37.36 (1C, C6-Chi); 30.38 (1C,

C2-Chi); 27.66 (3C, CH₃-*t*Bu); 24.46 (1C, L^γ); 21.78, 21.37, 20.87, 20.82, 20.58 (6C, CH₃-CO, L^δ).

7-{*N*-(1*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-1,3,4,5-Tetraacetoxy-cyclohexanoyl-glycyl}-4-methyl-aminocumarin 77

farbloser Feststoff; R_t = 17.0 min (Luna C-18, Gradient (%CH₃CN): 30-80 (40 min)); $[\alpha]_D^{22} = -16.7$ (c = 1, MeOH).



C₂₇H₃₀N₂O₁₂ [574.18]

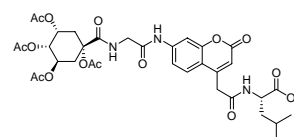
ESI-MS (positiv), m/z: 597.2 ([M+Na]⁺, ber.: 597.2), 1171.5 ([2*M+Na]⁺, ber.: 1171.4).

300 MHz ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ/ppm: 10.18 (s, 1H, NH); 8.43 (t, 1H, NH^G, J_{NH,Gα} = 5.52 Hz); 7.72-7.69 (m, 2H, H5-, H8-Cu); 7.40 (m, 1H, H6-Cu); 6.26 (s, 1H, H3-Cu); 5.40-5.27 (m, 2H, H3-, H5-Chi); 5.05 (dd, 1H, H4-Chi, J_{H3,H4} = 3.66 Hz, J_{H4,H5} = 10.29 Hz); 4.14-4.09 (m, 1H, L^α); 3.93 (dd, 1H, G^αa, J_{NH,Gα} = 5.97 Hz, J_{Gαa,b} = 16.65 Hz); 3.76 (dd, 1H, G^αb, J_{NH,Gα} = 5.97 Hz, J_{Gαa,b} = 16.65 Hz); 2.62-2.57 (m, 1H, H2a-Chi); 2.52-2.46 (m, 2H, H2b-, H6a-Chi); 2.38 (s, 3H, CH₃-Cu); 2.13, 2.05, 2.02, 1.94 (4*s, 13H, CH₃-Ac, H6b-Chi).

100.6 MHz ¹³C-NMR (DMSO-d₆) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 170.42, 169.93, 169.87, 169.83, 169.65, 168.27 (6C, CO); 160.09 (1C, C2-Cu); 153.79 (1C, C9-Cu); 153.19 (1C, C4-Cu); 142.09 (1C, C7-Cu); 126.17 (1C, C5-Cu); 115.21 (1C, C6-Cu); 115.10 (1C, C10-Cu); 112.44 (1C, C3-Cu); 105.58 (1C, C8-Cu); 80.51 (1C, C1-Chi); 71.37 (1C, C4-Chi); 68.09 (1C, C3-Chi); 66.53 (1C, C5-Chi); 43.00 (1C, G^α); 37.37 (1C, C6-Chi); 30.36 (1C, C2-Chi); 21.76, 20.87, 20.82, 20.58 (4C, CH₃-CO); 18.08 (1C, CH₃-Cu).

2-(7-{*N*-(1*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-1,3,4,5-Tetraacetoxy-cyclohexanoyl-glycyl}-aminocumarin-4-yl)-essigsäureamid-L-leucin 78

Das Rohprodukt der Vorstufe **76** wird in 7 ml TFA, 0.5 ml TIS und 0.5 ml H₂O gelöst und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Die flüchtigen Komponenten werden i. Vak. entfernt, und der



Rückstand wird dreimal mit je 30 ml Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgt durch Flashchromatographie an 40 g Kieselgel (Laufmittel: EE/EtOH/AcOH 6:1:0.1).

Ausb.: 400 mg (63% über 2 Stufen); farbloser Feststoff; $R_f = 0.28$ (EE/EtOH/AcOH 6:1:0.1); $[\alpha]_D^{22} = -16.5$ ($c = 0.5$, DMSO); $R_t = 14.56$ min (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 5-100 (40 min)).

C₃₄H₄₁N₃O₁₅ [731.26]

ESI-MS (positiv), m/z: 732.3 ([M+H]⁺, ber.: 732.3); 1485.6 ([2M+Na]⁺, ber.: 1485.5).

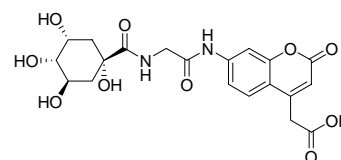
HR-ESI-MS (positiv), m/z: 732.2633 ([M+H]⁺, ber.: 732.2616).

300 MHz ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ/ppm: 12.44 (s_b, 1H, COOH); 10.23 (s, 1H, NH); 8.61 (d, 1H, NH^L, $J_{\text{NH,L}\alpha} = 7.71$ Hz); 8.44 (t, 1H, NH^G, $J_{\text{NH,G}\alpha} = 5.49$ Hz); 7.73-7.70 (m, 2H, H5-Cu, H8-Cu); 7.40 (d, 1H, H6-Cu, $J_{\text{H5,H6}} = 8.82$ Hz); 6.32 (s, 1H, H3-Cu); 5.39-5.27 (m, 2H, H3-, H5-Chi); 5.05 (dd, 1H, H4-Chi, $J_{\text{H3,H4}} = 3.69$ Hz, $J_{\text{H4,H5}} = 10.29$ Hz); 4.14-4.09 (m, 1H, L^α); 3.93 (dd, 1H, G^αa, $J_{\text{NH,G}\alpha} = 5.88$ Hz, $J_{\text{G}\alpha,\text{b}} = 16.53$ Hz); 3.80-3.73 (m, 3H, G^αb, CH₂-Cu); 2.62-2.57 (m, 1H, H2a-Chi); 2.52-2.46 (m, 2H, H2b-, H6a-Chi); 2.12, 2.04, 2.01, 1.94 (4*s, 13H, CH₃-Ac, H6b-Chi); 1.70-1.41 (m, 3H, L^β, L^γ); 0.88, 0.80 (2*d, 6H, L^δ, $J_{\text{L}\gamma,\text{L}\delta} = 6.24$ Hz).

75.5 MHz ¹³C-NMR (DMSO-d₆), δ/ppm: 174.00, 170.41, 169.91, 169.83, 169.63, 168.32, 167.93 (8C, CO); 160.02 (1C, C2-Cu); 153.89 (1C, C9-Cu); 150.91 (1C, C4-Cu); 142.11 (1C, C7-Cu); 126.17 (1C, C5-Cu); 114.92 (1C, C6-Cu); 114.58 (1C, C10-Cu); 113.90 (1C, C3-Cu); 105.65 (1C, C8-Cu); 80.52 (1C, C1-Chi); 71.37 (1C, C4-Chi); 68.09 (1C, C3-Chi); 66.53 (1C, C5-Chi); 50.58 (1C, L^α); 43.02 (1C, G^α); 40.61 (1C, L^β); 38.50 (1C, CH₂-Cu); 37.36 (1C, C2-Chi); 30.39 (1C, C6-Chi); 24.48 (1C, L^γ); 21.77, 21.23, 21.17, 20.85, 20.82, 20.58 (6C, CH₃-Ac, L^δ).

2-(7-{N-[1S,3R,4S,5R]-1,3,4,5-Tetrahydrocyclohexanoyl-glycyl}-aminocumarin-4-yl)-essigsäure 79

In 2 ml MeOH werden 30 mg (0.049 mmol) **75** mit frisch angesetzter NaOMe/MeOH-Lsg. auf pH = 10.5 eingestellt. Man rührt 2 h bei Raumtemp. und neutralisiert durch die Zugabe von AcOH. Das Lösungsmittel wird entfernt, und die Reinigung erfolgt mittels semipräp. HPLC



(LUNA C-18, Gradient

(%CH₃CN+0.1%TFA): 3-25 (120 min)).

Ausb.: 11 mg (52%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -16.6$ ($c = 0.7$, DMSO); $R_t = 13.84$ min (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 3-60 (40 min)).

C₂₀H₂₂N₂O₁₀ [450.13]

ESI-MS (positiv), m/z: 451.2 ([M+H]⁺, ber.: 451.1); 473.2 ([M+Na]⁺, ber.: 473.1); 1373.5 ([3M+Na]⁺, ber.: 1373.4).

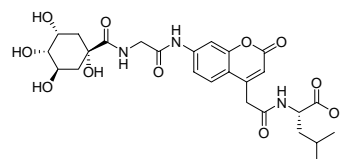
HR-ESI-MS (positiv), m/z: 473.1187 ([M+Na]⁺, ber.: 473.1172).

400 MHz ¹H-NMR (DMSO-d₆) (¹H, COSY), δ/ppm: 10.46 (s, 1H, NH); 8.04 (t, 1H, NH^G, J_{NH,Gα} = 5.48 Hz); 7.73 (d, 1H, H8-Cu, J_{H6,H8} = 1.96 Hz); 7.64 (d, 1H, H5-Cu, J_{H5,H6} = 8.64 Hz); 7.42 (dd, 1H, H6-Cu, J_{H6,H8} = 1.96 Hz, J_{H5,H6} = 8.64 Hz); 7.08 (t, NH₄CF₃COO, J = 50.84 Hz); 6.35 (s, 1H, H3-Cu); 5.57 (s_b, 1H, OH); 3.98-3.96 (m, 1H, H3-Chi); 3.93 (d, 2H, G^α, J_{NH,Gα} = 5.88 Hz); 3.92 (s, 2H, CH₂-Cu); 3.80-3.75 (m, 1H, H5-Chi); 3.21 (dd, 1H, H4-Chi, J_{H3,H4} = 2.76 Hz, J_{H4,H5} = 8.60 Hz); 1.85-1.67 (m, 4H, H2-, H6-Chi).

100.6 MHz ¹³C-NMR (DMSO-d₆) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 175.23, 170.61, 168.27 (3C, CO); 159.96 (1C, C2-Cu); 153.89 (1C, C9-Cu); 149.80 (1C, C4-Cu); 142.16 (1C, C7-Cu); 126.19 (1C, C5-Cu); 115.18 (1C, C6-Cu); 114.42 (1C, C10-Cu); 114.12 (1C, C3-Cu); 105.65 (1C, C8-Cu); 76.29 (1C, C4-Chi); 75.19 (1C, C1-Chi); 70.04 (1C, C3-Chi); 66.42 (1C, C5-Chi); 42.65 (1C, G^α); 41.46 (1C, C2-Chi); 37.88 (1C, C6-Chi); 37.04 (1C, CH₂-Cu).

2-(7-{N-[1S,3R,4S,5R]-1,3,4,5-Tetrahydrocyclohexanoyl-glycyl}-aminocumarin-4-yl)-essigsäureamid-L-leucin 80

In 2 ml MeOH werden 20 mg (0.027 mmol) **78** gelöst und mit frisch hergestellter NaOMe/MeOH-Lsg. wird der pH-Wert der Lösung auf 10.5 eingestellt. Nach 19 h Rühren bei Raumtemp. wird durch Zugabe von AcOH neutralisiert



und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung erfolgt durch semipräp. HPLC (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 5-100 (60 min)).

Ausb.: 11 mg (73%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -16.7$ ($c = 1$, MeOH); $R_t = 14.80$ min (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 5-100 (40 min)).

C₂₆H₃₃N₃O₁₁ [563.21]

ESI-MS (positiv), m/z: 564.3 ([M+H]⁺, ber.: 564.2); 1149.6 ([2M+Na]⁺, ber.: 1149.4).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 586.2040 ([M+Na]⁺, ber.: 586.2013).

300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD), δ/ppm : 7.81-7.75 (m, 2H, H5-Cu-, H8-Cu); 7.48 (d, 1H, H6-Cu, $J_{\text{H5,H6}} = 8.43$ Hz); 6.40 (s, 1H, H3-Cu); 4.51-4.48 (m, 1H, L^α); 4.20-4.03 (m, 4H, H3-Chi, G^α , H5-Chi); 3.85 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Cu}$); 3.48-3.43 (m, 1H, H4-Chi); 2.10-1.97 (m, 4H, H2-, H6-Chi); 1.73-1.65 (m, 3H, L^β , L^γ); 1.00 (d, 3H, L^δ , $J_{\text{L}^\gamma, \text{L}^\delta} = 5.52$ Hz); 0.95 (d, 3H, L^δ , $J_{\text{L}^\gamma, \text{L}^\delta} = 5.61$ Hz).

75.5 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD), δ/ppm : 178.05, 170.91, 169.71 (4C, CO); 162.90 (1C, C2-Cu); 155.62 (1C, C9-Cu); 151.92 (1C, C4-Cu); 143.47 (1C, C7-Cu); 126.94 (1C, C5-Cu); 116.86 (1C, C6-Cu); 116.38 (1C, C10-Cu); 115.50 (1C, C3-Cu); 107.87 (1C, C8-Cu); 78.07 (1C, C4-Chi); 77.03 (1C, C1-Chi); 72.21 (1C, C3-Chi); 68.19 (1C, C5-Chi); 42.44 (1C, G^α); 43.89 (1C, L^β) 41.47 (1C, C2-Chi); 39.74 (1C, C6-Chi); 38.83 (1C, $\text{CH}_2\text{-Cu}$); 26.16 (1C, L^γ); 23.42 (1C, L^δ); 21.67 (1C, L^δ).

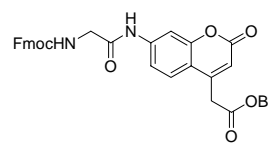
Das L^α -Signal konnte im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum nicht eindeutig zugewiesen werden.

5.10 Versuche zu Kapitel 3.4.1

2-(7-{*N*-[9H-Fluoren-9-yl]-methoxycarbonyl-glycyl}-aminocumarin-4-yl)-essigsäurebenzylester **82**

(Fmoc-Gly-Aca-COOBn)

In 1.50 ml absol. THF werden 100 mg (0.15 mmol) Fmoc-Gly-OH **81** und 32 μl (0.29 mmol, 2 Äquiv.) NMM gelöst. Bei -19°C werden langsam 19 μl (0.15 mmol, 1 Äquiv.)



Chlorameisensäure-isobutylester zugetropft. Man rührt 5 min bei -19°C und gibt anschließend 50 mg (0.15 mmol, 1 Äquiv.) Aca-OBn **68**, gelöst in 3 ml absol. THF, zu. Es wird 1 h bei -19°C und 15 h bei Raumtemp. gerührt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird in 2 ml MeOH aufgenommen und 24 h bei -20°C gelagert. Das ausgefallene, reine Produkt kann abfiltriert werden.

Ausb.: 25 mg (31%); farbloser amorpher Feststoff.

$\text{C}_{35}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7$ [588.19]

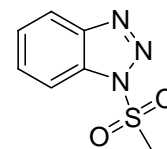
ESI-MS (positiv), m/z : 589.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 589.2); 611.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 611.2).

400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) (^1H , COSY), δ/ppm : 10.48 (s, 1H, NH); 7.90 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H3,H4}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.40$ Hz); 7.77 (d, 1H, H8-Cu, $J_{\text{H6,H8}} = 1.96$ Hz); 7.75-7.71 (m, 3H, H1-, H8-Fmoc, NH^{G}); 7.63 (d, 1H, H5-Cu, $J_{\text{H5,H6}} = 9.00$ Hz); 7.44-7.41 (m, 3H, H3-, H6-Fmoc, H6-Cu); 7.36-7.32 (m, 7H, $\text{H}_{\text{arom.}}\text{-Bn}$, H2-, H7-Fmoc); 6.40 (s, 1H, H3-Cu); 5.15 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$); 4.32 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, $J_{\text{CH}_2,\text{H}9} = 7.04$ Hz); 4.27-4.23 (m, 1H, H9-Fmoc); 4.07 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Cu}$); 3.86 (d, 2H, G^{α} , $J_{\text{G}^{\alpha},\text{NH}} = 6.24$ Hz).

100.6 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) (^{13}C , HMQC), δ/ppm : 169.04, 168.89 (2C, CO); 159.87 (1C, C2-Cu); 156.65 (1C, CO-Urethan); 153.89 (1C, C9-Cu); 149.13 (1C, C4-Cu); 143.87 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 142.30 (1C, C7-Cu); 140.76 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 135.75 (1C, $\text{C}_{\text{ipso}}\text{-Bn}$); 128.43, 128.17, 128.00 (5C, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-Bn}$); 127.67 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.11 (2C, C2-, C7-Fmoc); 126.18 (1C, C5-Cu); 125.27 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.15 (2C, C4-, C5-Fmoc); 115.14 (1C, C6-Cu); 114.31 (1C, C3-Cu); 114.17 (1C, C10-Cu); 105.65 (1C, C8-Cu); 66.35 (1C, $\text{CH}_2\text{-Bn}$); 65.79 (1C, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$); 46.64 (1C, C9-Fmoc); 44.18 (1C, G^{α}); 36.61 (1C, $\text{CH}_2\text{-Cu}$).

1-Methansulfonyl-1H-benzotriazol 85

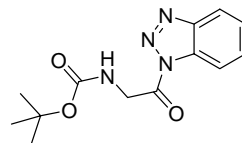
Zu einer Lösung aus 150 ml absol. Toluol, 12.37 ml Pyridin und 11.90 g (0.10 mol) 1H-Benzotriazol **83** tropft man bei 0 °C langsam 9.3 ml (0.10 mol) Methylsulfonylchlorid in 20 ml absol. Toluol zu. Es wird 18 h bei Raumtemp. gerührt, mit 150 ml Ethylacetat verdünnt und mit 100 ml H_2O versetzt. Nachdem man die Phasen separiert hat, wird die organische Phase zweimal gegen je 50 ml 50%ige Citronensäure-Lösung, einmal gegen 100 ml H_2O und einmal gegen 100 ml ges. NaCl-Lsg. geschüttelt, über MgSO_4 getrocknet und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Das Rohprodukt wird aus Benzol umkristallisiert und ohne weitere Charakterisierung in der nächste Stufe eingesetzt.



Ausb.: 15.73 g (80%); farbloser Feststoff.

1-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl)-glycin-benzotriazolid 86

Man löst 1 g (5.70 mmol) Boc-Gly-OH **67** und 1.22 g (6.28 mmol, 1.1 Äquiv.) 1-Methansulfonyl-1*H*-benzotriazol **85** in 20 ml absol. THF, versetzt mit 0.88 ml (6.28 mmol, 1.1 Äquiv.) NEt_3 und



erhitzt 16 h auf 65 °C. Nachdem man das THF i. Vak. entfernt hat, wird der Rückstand in 20 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit je 20 ml 50%iger Citronensäure-Lösung, einmal mit 20 ml ges. NaHCO_3 -Lsg. sowie einmal mit 20 ml ges. NaCl -Lsg. gewaschen. Man trocknet die organische Phase über MgSO_4 , entfernt das Lösungsmittel i. Vak. und kristallisiert das Rohprodukt aus EE/Hexan (1:1) um.

Ausb.: 0.87 g (55%); farbloser Feststoff.

$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$ [276.12]

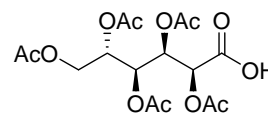
FD-MS (positiv), m/z : 277.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 276.1).

300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ/ppm : 8.22 (d, 1H, $\text{H}_{2\text{arom.}}$, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 8.46$ Hz); 8.09 (d, 1H, $\text{H}_{5\text{arom.}}$, $J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 8.10$ Hz); 7.64 (m, 1H, $\text{H}_{3\text{arom.}}$); 7.49 (m, 1H, $\text{H}_{4\text{arom.}}$); 5.30 (sb, 1H, NH); 4.99 (d, 2H, G^α , $J_{\text{G}^\alpha,\text{NH}} = 5.88$ Hz).

75.5 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ/ppm : 168.84 (1C, CO); 156.80 (1C, CO-Urethan); 130.72, 126.47, 120.33, 114.08 (6C, $\text{C}_{\text{arom.}}$); 80.50 (1C, $\text{C}_q\text{-}t\text{Bu}$); 44.45 (1C, G^α).

2,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-D-gluconsäure 88

In einem Kolben werden 2 g (14.70 mmol) frisch getrocknetes ZnCl_2 vorgelegt und mit 25 ml Ac_2O versetzt. Man kühlt die



resultierende Suspension auf -5 °C und gibt 6.40 g (29.61 mmol) Natrium- α -D-gluconat **87** zu. Über einen Zeitraum von 30 min wird HCl -Gas so durch die Apparatur geleitet, dass die Temperatur nicht über 5 °C steigt. Anschließend wird die milchige Lösung 19 h bei Raumtemp. gerührt. Man kühlt auf 0 °C, gibt 30 g Eis zu und rührt im Anschluß 1 h bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 100 ml H_2O extrahiert man die wässrige Phase dreimal mit je 50 ml CHCl_3 . Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausb.: 7.64 g (66%); gelblicher, amorpher Feststoff; (Lit.:⁷⁸ Ausb.: 74%).

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ [406.11]

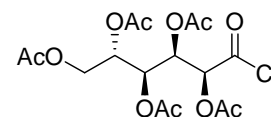
FD-MS (positiv), m/z : 407.7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 407.1); 814.5 ($[\text{2M}+\text{2H}]^+$, ber.: 814.1).

300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ/ppm : 8.58 (s, 1H, COOH); 5.59 (m, 1H, H3-Glu); 5.47 (m, 1H, H4-Glu); 5.27 (d, 1H, H2-Glu, $J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = 3.66 \text{ Hz}$); 5.04 (m, 1H, H5-Glu); 4.27 (dd, 1H, H6a-Glu, $J_{\text{H}_5, \text{H}_6\text{a}} = 4.05 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_6\text{a}, \text{H}_6\text{b}} = 12.12 \text{ Hz}$); 4.09 (m, 1H, H6b-Glu); 2.15, 2.05, 2.02 (s, 15H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$).

75.5MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ/ppm : 170.65 (1C, COOH); 169.99, 169.93, 169.82, 169.74, 166.24 (5C, CO-Ac); 75.74 (1C, C2-Glu); 70.28 (1C, C5-Glu); 69.27 (1C, C4-Glu); 68.53 (1C, C3-Glu); 61.45 (1C, C6-Glu); 20.67, 20.61, 20.52, 20.34, 20.29 (5C, $\text{CH}_3\text{-Ac}$).

2,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-D-gluconsäurechlorid **89**

In einem Kolben werden 100 mg (0.25 mmol) 2,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-D-gluconsäure **88** vorgelegt und mit 2 ml (27.40 mmol) Thionylchlorid versetzt. Das Gemisch wird 30 min auf 65 °C

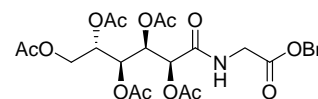


erhitzt. Anschließend wird überschüssiges Thionylchlorid destillativ entfernt und das Rohprodukt i. Hochvak. getrocknet. Es wird ohne weitere Charakterisierung verwendet.

$\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_{11}\text{Cl}$ [424.08]

N-(2,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-D-gluconoyl)glycinbenzylester **94**

In 12 ml absol. DMF werden 2.37 g (5.83 mmol) 2,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-D-gluconsäure **88** vorgelegt, mit 2.41 g



(5.83 mmol) HCTU, 0.89 g (5.83 mmol) HOBt sowie 2.04 ml (11.66 mmol, 2 Äquiv.) DIPEA versetzt und 15 min bei Raumtemp. gerührt. Man gibt 1.97 g (5.83 mmol) *p*-Tos* $\text{H}_2\text{N-Gly-OBn}$ **93** zu und rührt weitere 17 h bei Raumtemperatur. Das überschüssige Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in 50 ml Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase mit 50 ml 1N HCl, 50 ml ges. $\text{NaHCO}_3\text{-Lsg.}$ und 50 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 entfernt man das Lösungsmittel i. Vak. und reinigt das Rohprodukt mittels Flashchromatographie an 50 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 1:1).

Ausb.: 1.97 g (61%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.65$ (CH/EE 1:2).

$C_{35}H_{31}NO_{31}$ [553.18]

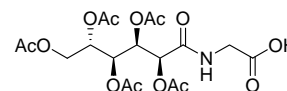
ESI-MS (positiv), m/z: 576.2 ($[M+Na]^+$, ber.: 576.2).

300 MHz 1H -NMR ($CDCl_3$), δ/ppm : 7.31 (d, 5H, $H_{arom.-Bn}$, $J = 1.47$ Hz); 6.66 (t, 1H, NH, $J_{NH,G\alpha} = 5.16$ Hz); 5.66-5.62 (m, 1H, H3-Glu); 5.46-5.42 (m, 1H, H4-Glu); 5.35 (d, 1H, H2-Glu, $J_{H2,H3} = 4.77$ Hz); 5.13 (s, 2H, CH_2-Bn); 5.03-4.98 (m, 1H, H5-Glu); 4.30-4.24 (m, 1H, H6a-Glu); 4.14-4.03 (m, 2H, G^α); 3.97-3.90 (m, 1H, H6b-Glu); 2.16, 2.06, 2.02, 2.00 (4*s, 12H, CH_3-Ac).

75.5 MHz ^{13}C -NMR ($CDCl_3$), δ/ppm : 170.56, 169.83, 169.57, 169.34, 169.09, 166.50 (7C, CO); 134.95 (1C, $C_{ipso-Bn}$); 128.63, 128.58 (5C, $C_{arom.-Bn}$); 79.41 (1C, C5-Glu); 71.56 (1C, C2-Glu); 68.88 (1C, C4-Glu); 68.69 (1C, C3-Glu); 67.35 (1C, CH_2-Bn); 61.41 (1C, C6-Glu); 41.12 (1C, G^α); 20.68, 20.61, 20.55, 20.43, 20.37 (5C, CH_3-Ac).

***N*-(2,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-D-gluconoyl)glycin 95**

Man löst 1 g (1.80 mmol) *N*-(2,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-D-gluconoyl)-glycinbenzylester **94** in 15 ml THF, be- und entgast



mehrfach mit Argon, bevor eine Spatelspitze Pd/C (10%) zugegeben wird und man wieder mehrfach mit Argon be- und entgast. Argon wird durch Wasserstoff ersetzt, und man hydriert 20 h bei Raumtemperatur. Es wird über *Hyflo*[®] abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt mittels Flashchromatographie an 50 g Kieselgel (Laufmittel: EE/MeOH 2:1).

Ausb.: 0.83 g (quant.); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.20$ (EE/MeOH 2:1); $[\alpha]_D^{23} = 16.8$ ($c = 1$, $CHCl_3$).

$C_{18}H_{25}NO_{13}$ [463.13]

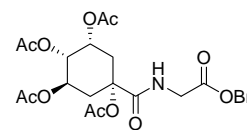
FD-MS (positiv), m/z: 464.3 ($[M+H]^+$, ber.: 464.1).

300 MHz 1H -NMR ($DMSO-d_6$), δ/ppm : 8.31 (t, 1H, NH, $J_{NH,G\alpha} = 5.13$ Hz); 5.55-5.52 (m, 1H, H3-Glu); 5.35-5.31 (m, 1H, H4-Glu); 5.22 (d, 1H, H2-Glu, $J_{H2,H3} = 3.33$ Hz); 4.96-4.91 (m, 1H, H5-Glu); 4.33-4.28 (m, 1H, H6a-Glu); 4.13-3.97 (m, 1H, G^α); 3.78-3.70 (m, 1H, G^α); 3.52-3.44 (m, 1H, H6b-Glu); 2.12, 2.03, 2.00, 1.96 (4*s, 12H, CH_3-Ac).

75.5 MHz ^{13}C -NMR ($DMSO-d_6$), δ/ppm : 170.98, 170.17, 169.64, 169.57, 169.09, 165.92 (7C, CO); 71.70 (1C, C5-Glu); 69.33 (1C, C2-Glu); 68.63 (2C, C3-, C4-Glu); 61.11 (1C, C6-Glu); 41.46 (1C, G^α); 20.63, 20.54, 20.42 (5C, CH_3-Ac).

N*-({1*S*,3*R*,4*S*,5*R*}-1,3,4,5-Tetraacetoxy-cyclohexanoyl)-glycinbenzylester **96*

Eine Lösung von 2 g (5.56 mmol) (1*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-1,3,4,5-Tetraacetoxy-cyclohexancarbonsäure **72**, 1.06 g (5.56 mmol) EDC*HCl und 0.85 g (5.56 mmol) HOBt in 7 ml absol. DMF wird 10 min bei



0 °C gerührt. Anschließend versetzt man bei 0 °C mit 1.87 g (5.56 mmol) *p*-Tos*H₂N-Gly-OBn **93** und 2.91 ml (16.7 mmol, 3 Äquiv.) DIPEA, gelöst in 7 ml absol. DMF. Es wird auf Raumtemp. erwärmt und 18 h gerührt. Man entfernt das Lösungsmittel i. Vak. und nimmt den Rückstand in 70 ml Ethylacetat auf. Die organische Phase wird mit 20 ml H₂O, 20 ml 1N HCl und 20 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt mittels Flashchromatographie an 30 g Kieselgel (Laufmittel: EE/CH 2:1).

Ausb.: 1.60 g (57%); farbloser amorpher Feststoff; R_f = 0.45 (EE/CH 2:1).

C₂₄H₂₉NO₁₁ [507.17]

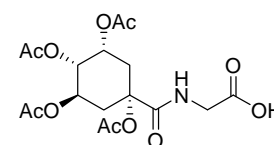
ESI-MS (positiv), m/z: 530.2 ([M+Na]⁺, ber.: 530.2).

300 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 7.35-7.32 (m, 5H, H_{arom.}-Bn); 6.71 (t, 1H, NH, J_{NH,Gα} = 5.16 Hz); 5.56 (m, 1H, H₃-Chi); 5.40 (m, 1H, H₅-Chi); 5.15 (s, 2H, CH₂-Bn); 4.95 (dd, 1H, H₄-Chi, J_{H₃,H₄} = 3.66 Hz, J_{H₄,H₅} = 10.29 Hz); 4.11-4.00 (m, 2H, G^α); 2.87-2.79 (m, 1H, H_{2a}-Chi); 2.54-2.47 (m, 1H, H_{6a}-Chi); 2.39 (dd, 1H, H_{2b}-Chi, J_{H_{2b},H₃} = 3.66 Hz, J_{H_{2a},b} = 16.53 Hz); 2.14, 2.04, 2.00, 1.97 (4*s, 12H, CH₃-Ac); 1.90-1.82 (m, 1H, H_{6b}-Chi).

75.5 MHz ¹³C-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 170.20, 170.07, 169.96, 169.63, 169.48, 169.39 (6C, CO); 134.87 (1C, C_{ipso}-Bn); 128.66, 128.45 (5C, C_{arom.}-Bn); 81.04 (1C, C₁-Chi); 71.80 (1C, C₄-Chi); 67.86 (1C, C₃-Chi); 67.44 (1C, CH₂-Bn); 66.41 (1C, C₅-Chi); 41.39 (1C, G^α); 38.08 (1C, C₂-Chi); 30.59 (1C, C₆-Chi); 21.57, 20.96, 20.91, 20.63 (4C, CH₃-Ac).

N*-({1*S*,3*R*,4*S*,5*R*}-1,3,4,5-Tetraacetoxy-cyclohexanoyl)-glycin **97*

Man löst 1.50 g (2.96 mmol) *N*-({1*S*,3*R*,4*S*,5*R*}-1,3,4,5-Tetraacetoxy-cyclohexanoyl)-glycinbenzylester **96** in 15 ml absol. THF, be- und entgast mehrfach mit Argon, gibt eine



Spatelspitze Pd/C (10%) zu und be- und entgast erneut mit Argon, um anschließend das Argon gegen Wasserstoff auszutauschen. Es wird 18 h bei Raumtemp. gerührt, über Hyflo[®]

filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an 40 g Kieselgel (Laufmittel: EE/MeOH 2:1).

Ausb.: 0.86 g (70%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.30$ (EE/MeOH 2:1).

$C_{17}H_{23}NO_{11}$ [417.13]

ESI-MS (positiv), m/z: 440.1 ($[M+Na]^+$, ber.: 440.1).

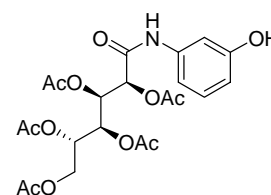
300 MHz 1H -NMR ($CDCl_3$), δ/ppm : 6.71 (m, 1H, NH); 5.56 (q, 1H, H3-Chi, $J_{H3,H4} = 3.66$ Hz); 5.39 (m, 1H, H5-Chi); 4.98 (dd, 1H, H4-Chi, $J_{H3,H4} = 3.66$ Hz, $J_{H4,H5} = 10.29$ Hz); 4.04 (d, 2H, G^α , $J_{NH,G^\alpha} = 4.80$ Hz); 2.84-2.77 (m, 1H, H2a-Chi); 2.64-2.56 (m, 1H, H6a-Chi); 2.40 (dd, 1H, H2b-Chi, $J_{H2b,H3} = 3.30$ Hz, $J_{H2a,b} = 16.17$ Hz); 2.12, 2.05, 2.03, 1.98 (4*s, 12H, CH_3 -Ac); 1.88-1.80 (m, 1H, H6b-Chi).

75.5 MHz 1H -NMR ($CDCl_3$), δ/ppm : 171.51, 170.00, 169.89, 169.70, 169.40, 169.35 (6C, CO); 81.00 (1C, C1-Chi); 72.00 (1C, C4-Chi); 67.82 (1C, C3-Chi); 66.31 (1C, C5-Chi); 41.20 (1C, G^α); 38.00 (1C, C2-Chi); 30.71 (1C, C6-Chi); 21.57, 20.90, 20.81, 20.60 (4C, CH_3 -Ac).

5.11 Versuche zu Kapitel 3.4.2

3-*N*-(2,3,4,5,6-Penta-*O*-acetyl- α -D-gluconoyl)-aminophenol 104

Es werden 132 mg (2.28 mmol) 3-Aminophenol **61** in 3 ml absol. CH_3CN gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 485 mg des rohen Säurechlorids **89** versetzt. Nach 5 min fällt ein gelber Feststoff aus. Dieser wird in Ethylacetat gelöst, und man wäscht



die organische Phase mit 20 ml ges. NH_4Cl -Lösung, trocknet über $MgSO_4$ und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Die Reinigung erfolgt durch Flashchromatographie an 100 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 2:1).

Ausb.: 400 mg (71%); gelber Feststoff; $R_f = 0.25$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 20:1); $[\alpha]_D^{22} = 44.2$ ($c = 1$, $CHCl_3$); $R_t = 16.9$ min (LUNA C-18, Gradient (% CH_3CN): 30-50 (40 min)).

$C_{22}H_{27}NO_{12}$ [497.15]

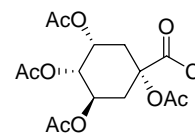
ESI-MS (positiv), m/z: 520.2 ($[M+Na]^+$, ber.: 520.1); 1017.4 ($[2M+Na]^+$, ber.: 1017.3).

300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ/ppm : 8.17 (s, 1H, OH); 7.35 (s, 1H, $\text{H}_{2\text{arom.}}$); 7.11 (t, 1H, $\text{H}_{5\text{arom.}}$, $J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 8.10$ Hz); 6.78 (d, 1H, $\text{H}_{4\text{arom.}}$, $J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 7.80$ Hz); 6.61 (dd, 1H, $\text{H}_{6\text{arom.}}$, $J_{\text{H}_4,\text{H}_6} = 2.10$ Hz, $J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 8.10$ Hz); 5.68 (t, 1H, $\text{H}_3\text{-Glu}$, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 4.78$ Hz); 5.46 (m, 1H, $\text{H}_4\text{-Glu}$); 5.32 (d, 1H, $\text{H}_2\text{-Glu}$, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 5.10$ Hz); 5.04 (m, 1H, $\text{H}_5\text{-Glu}$); 4.32 (dd, 1H, $\text{H}_{6a}\text{-Glu}$, $J_{\text{H}_5,\text{H}_{6a}} = 3.30$ Hz, $J_{\text{H}_{6a},\text{b}} = 12.60$ Hz); 4.09 (m, 1H, $\text{H}_{6b}\text{-Glu}$); 2.20, 2.06, 2.04, 2.03, 2.02 (5*s, 15H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$).

75.5 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ/ppm : 170.99, 170.31, 170.00, 169.93, 169.63, 164.66 (6C, CO); 157.04 (1C, $\text{C}_{1\text{arom.}}$); 137.60 (1C, $\text{C}_{3\text{arom.}}$); 129.93 (1C, $\text{C}_{5\text{arom.}}$); 112.45 (1C, $\text{C}_{4\text{arom.}}$); 111.51 (1C, $\text{C}_{6\text{arom.}}$); 107.37 (1C, $\text{C}_{2\text{arom.}}$), 71.76 (1C, $\text{C}_2\text{-Glu}$); 69.14 (1C, $\text{C}_5\text{-Glu}$); 68.97 (1C, $\text{C}_4\text{-Glu}$); 68.85 (1C, $\text{C}_3\text{-Glu}$); 61.72 (1C, $\text{C}_6\text{-Glu}$); 20.70, 20.66, 20.58, 20.39 (5C, $\text{CH}_3\text{-Ac}$).

(1*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-1,3,4,5-Tetraacetyloxycyclohexancarbonsäurechlorid 105

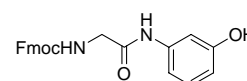
In 8 ml Thionylchlorid werden 3.62 g (10.05 mmol) (1*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-1,3,4,5-Tetraacetyloxycyclohexancarbonsäure **72** gelöst und 1 h auf 65 °C erhitzt. Anschließend wird überschüssiges Thionylchlorid i.



Vak. abdestilliert und das Rohprodukt i. Hochvak. getrocknet. Es wird ohne weitere Charakterisierung und Reinigung in die Folgestufe eingesetzt.

3-*N*-({9*H*-Fluoren-9-yl}methoxycarbonyl-glycyl)-aminophenol 106

Zu einer Lösung von 1.64 g (15.03 mmol) 3-Aminophenol **61** und 2.62 ml (15.03 mmol) DIPEA in 10 ml absol. CH_2Cl_2 gibt man bei



0 °C 1.92 ml (15.03 mmol) frisch destilliertes TMS-Cl. Es wird 30 min bei Raumtemp. gerührt, bevor man mit einer 10 min lang voraktivierten Lösung von 3 g (10.09 mmol) Fmoc-Gly-OH **81**, 1.92 g (10.09 mmol) EDC*HCl und 155 mg (10.09 mmol) HOBt in 15 ml absol. CH_2Cl_2 versetzt. Nach 16 h Rühren bei Raumtemp. werden zur Spaltung des Silylethers 4.74 g (15.03 mmol) TBAF*3 H_2O zugegeben. Nach 30 min wird mit 50 ml CH_2Cl_2 verdünnt, die organische Phase mit 20 ml 1N HCl und 20 ml H_2O gewaschen und der anfallende Feststoff abfiltriert. Die wässrige Phase wird mit insgesamt 300 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über MgSO_4 entfernt man das

Lösungsmittel im Vakuum. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt mittels Flashchromatographie an 50 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 1:2). Der abfiltrierte Feststoff wird mit dem durch Flashchromatographie gereinigten Produkt vereinigt.

Ausb.: 1.06 g (27%); farbloser Feststoff; $R_f = 0.40$ (CH/EE 1:2).

$C_{23}H_{20}N_2O_4$ [388.14]

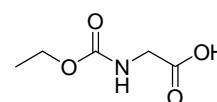
ESI-MS (positiv), m/z: 411.2 ($[M+Na]^+$, ber.: 411.1).

300 MHz 1H -NMR (DMSO- d_6), δ /ppm: 9.84 (s, 1H, NH); 9.40 (s, 1H, NH); 7.87 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.35$ Hz); 7.71 (1H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.35$ Hz); 7.59 (m, 1H, H4_{arom.}); 7.40 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc); 7.31 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $J_{H2,H3} = J_{H6,H7} = 7.35$ Hz); 7.14 (s, 1H, OH); 7.04 (t, 1H, H3_{arom.}, $J_{H3,H4} = 8.07$ Hz); 6.93 (d, 1H, H6_{arom.}, $J_{H5,H6} = 7.71$ Hz); 4.27 (m, 3H, CH₂-, H9-Fmoc); 3.76 (d, 1H, G $^\alpha$, $J_{NH,G\alpha} = 5.88$ Hz).

75.5 MHz ^{13}C -NMR (DMSO- d_6), δ /ppm: 167.91 (1C, CO-Amid); 157.71 (1C, C1_{arom.}); 156.74 (1C, CO-Urethan); 143.93 (2C, C1a, C8a-Fmoc); 140.82 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 140.02 (1C, C3_{arom.}); 129.04 (1C, C5_{arom.}); 127.76 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.20 (2C, C2-, C7-Fmoc); 120.21, 120.12 (2C, C4-, C5-Fmoc); 110.61 (1C, C4_{arom.}); 109.98 (1C, C6_{arom.}); 106.40 (1C, C2_{arom.}); 65.84 (1C, CH₂-Fmoc); 46.73 (1C, G $^\alpha$); 44.11 (1C, C9-Fmoc).

***N*-Ethoxycarbonylglycin 108**

Zu 16 g (0.40 mol) NaOH und 42.40 g (0.40 mol) Na₂CO₃ in 250 ml Wasser gibt man unter Kühlung mit Eis-Kochsalz bei 20 °C 30 g (0.40 mol) Glycin **107**, kühlt man Lösung auf 9 °C und tropft



38.25 ml (0.40 mol) Chlorameisensäure-ethylester **65** so zu, dass die Temperatur unter 10.5 °C bleibt. Es wird 2 h unter Kühlung und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Man säuert mit konz. HCl auf pH = 3 an und lyophilisiert. Es wird mit 300 ml Diethylether und 300 ml CH₂Cl₂ extrahiert, über MgSO₄ getrocknet, und die Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in Diethylether aufgenommen und mit der gleichen Menge (v:v) Petrolether versetzt. Das farblose Öl kristallisiert über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank.

Ausb.: 11.60 g (20%); farbloser kristalliner Feststoff; Schmp.: 71 °C; (Lit.:⁸² 66%; Schmp.: 73-74 °C).

$C_5H_9NO_4$ [147.05]

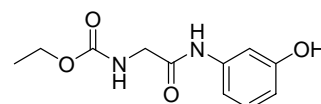
FD-MS (positiv), m/z: 148.2 ($[M+H]^+$, ber.: 148.1).

300 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 9.59 (s_b, 1H, COOH); 6.91 (s_b, 1H, NH); 4.11 (q, 2H, CH₂, J_{CH₂,CH₃} = 6.99 Hz); 3.98 (d, 2H, G^α, J_{NH,G^α} = 5.49 Hz); 1.28 (t, 3H, CH₃, J_{CH₂,CH₃} = 6.99 Hz).

3-*N*-(*N*-Ethoxycarbonylglycyl)-3-aminophenol **109**

a)

Lösung 1: Zu 10 ml absol. CH₂Cl₂ gibt man 2 g (13.60 mmol) *N*-Ethoxycarbonylglycin **108** sowie 2.37 ml (13.60 mmol)



DIPEA und kühlt die Lösung auf 0 °C. Innerhalb von 5 min tropft man 1.78 ml (13.68 mmol) Chlorameisensäure-isobutylester zu und rührt weitere 15 min 0 °C.

Lösung 2: 1.78 g (16.30 mmol) 3-Aminophenol **61** werden in 20 ml absol. CH₂Cl₂ mit 2.85 ml (16.30 mmol) DIPEA versetzt. Unter Eiskühlung gibt man 2.08 ml (16.30 mmol) TMS-Cl zu und rührt die resultierende Lösung 30 min bei 0 °C.

Beide Lösungen werden bei 0 °C vereinigt, 30 min bei 0 °C und 13 h bei Raumtemp. gerührt. Zur Spaltung des Silylethers gibt man 5.14 g (16.30 mmol) TBAF*3H₂O zu. Nach 30 min wird mit 50 ml CH₂Cl₂ verdünnt und die organische Phase dreimal mit je 75 ml 1N HCl und einmal mit 20 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgt durch Flashchromatographie an 100 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 1:2).

Ausb.: 1.12 g (35%); leicht gelblicher Feststoff; R_f = 0.35 (CH/EE 1:2).

b)

In 30 ml absol. THF werden 2 g (13.60 mmol) *N*-Ethoxycarbonylglycin **108**, 1.48 g (13.56 mmol) 3-Aminophenol **61** bei 0 °C mit 3.65 g (17.69 mmol, 1.3 Äquiv.) DCC versetzt. Man rührt 10 min bei 0 °C und anschließend 15 h bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in 200 ml Ethylacetat aufgenommen und der unlösliche Feststoff abfiltriert. Die organische Phase wird zweimal mit je 40 ml 1N HCl und einmal mit 20 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt ist genügend rein, so dass keine Reinigung nötig ist.

Ausb.: 3.17 g (95%); leicht gelblicher Feststoff; R_f = 0.35 (CH/EE 1:2).

C₁₁H₁₄N₂O₄ [238.10]

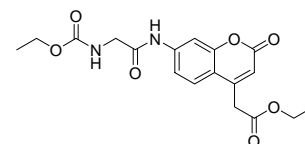
ESI-MS (positiv), m/z: 239.2 ([M+H]⁺, ber.: 239.1); 261.1 ([M+Na]⁺, ber.: 261.1).

400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) (^1H , COSY), δ/ppm : 9.78 (s, 1H, NH); 9.36 (sb, 1H, OH); 7.29 (t, 1H, NH^G , $J_{\text{NH},G\alpha} = 6.24$ Hz); 7.13 (s, 1H, H2-Cu); 7.04 (t, 1H, H5-Cu, $J_{\text{H4},\text{H5}} = J_{\text{H5},\text{H6}} = 8.10$ Hz); 6.91 (d, 1H, H6-Cu, $J_{\text{H5},\text{H6}} = 8.10$ Hz); 6.41 (dd, 1H, H4-Cu, $J_{\text{H4},\text{H6}} = 2.19$ Hz, $J_{\text{H4},\text{H5}} = 8.10$ Hz); 3.99 (q, 2H, CH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.35$ Hz); 3.72 (d, 2H, G^a , $J_{G^a,\text{NH}} = 6.24$ Hz); 1.15 (t, 3H, CH_3 , $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.35$ Hz).

100.6 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) (^{13}C , HMQC), δ/ppm : 167.98 (1C, CO); 157.70 (1C, C1); 156.81 (1C, CO-Urethan); 140.02 (1C, C3); 129.47 (1C, C5); 110.43 (1C, C4); 109.95 (1C, C6); 106.37 (1C, C2); 60.00 (1C, OCH_2); 44.09 (1C, G^a); 14.73 (1C, CH_3).

2-(7-{*N*-Ethoxycarbonylglycyl}-aminocumarin-4-yl)-essigsäureethylester 110

Es werden 3.25 g (13.65 mmol) 3-*N*-(*N*-Ethoxycarbonylglycyl)-3-aminophenol **109** in 100 ml 70%iger H_2SO_4 vorgelegt und bei 0 °C 3.23 ml (17.76 mmol, 1.3 Äquiv.) 1,3-Acetondicarbonsäure-diethylester zugetropft. Man rührt 20 min



bei 0 °C und 18 h bei Raumtemperatur. Die Lösung wird auf 50 g Eis gegossen und durch Zugabe von 5 ml 4N NaOH das Produkt ausgefällt. Nach Absaugen und Trocknen erhält man einen farblosen Feststoff.

Ausb.: 2.52 (49%); farbloser Feststoff.

$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7$ [376.13]

FD-MS (positiv), m/z : 376.9 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 376.1).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 399.1196 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 399.1198).

300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), δ/ppm : 10.42 (s, 1H, NH); 7.75 (s, 1H, NH); 7.65-7.60 (m, 1H, H8-Cu); 7.46-7.39 (m, 2H, H5-, H6-Cu); 6.35 (s, 1H, H3-Cu); 4.03-3.96 (m, 2H, G^a); 3.90-3.80 (m, 6H, 2* CH_2 , CH_2 -Cu); 1.16 (t, 6H, 2* CH_3 , $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 6.96$ Hz).

75.5 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6), δ/ppm : 170.70, 169.18 (2C, CO); 160.06 (1C, C2-Cu); 156.86 (1C, CO-Urethan); 153.97 (1C, C9-Cu); 149.88 (1C, C4-Cu); 142.38 (1C, C7-Cu); 126.23 (1C, C5-Cu); 115.30 (1C, C6-Cu); 114.29 (1C, C10-Cu); 114.19 (1C, C3-Cu); 105.77 (1C, C8-Cu); 61.02, 60.09 (2C, CH_2); 44.25 (1C, G^a); 37.13 (1C, CH_2 -Cu); 14.73, 14.08 (2C, CH_3).

5.12 Versuche zu Kapitel 3.5

2-Trimethylsilyloxiran 113

Man löst 24.51 g (0.10 mol) *m*-Chlorperbenzoesäure bei 0 °C in 235 ml CHCl₃ und tropft langsam 15.50 ml (0.10 mol) Trimethylvinylsilan **112**, gelöst in 50 ml CHCl₃, zu. Es wird 65 h bei Raumtemp. gerührt. Man filtriert den farblosen Niederschlag ab und wäscht das Filtrat nacheinander mit 200 ml ges. NaHCO₃-Lösung, 200 ml ges. NaHSO₃-Lsg. und nochmals mit 200 ml ges. NaHCO₃-Lösung. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Produkt destillativ gereinigt (370 mbar).

Ausb.: 8 g (68%); farblose Flüssigkeit; Sdp._{370mbar}: 73-80 °C; $n_D^{24} = 1.414$; (Lit.:⁸⁵ Sdp.: 109-110 °C; $n_D^{25} = 1.414$).

C₅H₁₂OSi [116.23]

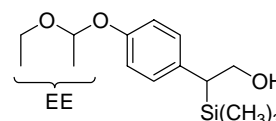
200 MHz ¹H-NMR (CDCl₃), δ/ppm: 2.90 (t, 1H, CH^β, J_{CH^α,CH^β} = 5.65 Hz); 2.55-2.48 (m, 1H, CH^β); 2.20 (t, 1H, CH^α, J_{CH^α,CH^β} = 4.78 Hz); 0.02 (s, 9H, Si(CH₃)₃).



(2-{Ethoxyethoxyphenyl}-2-trimethylsilyl)ethanol 115

1. Lithiierung :

Eine Lösung von 33.09 g (135 mmol) 1-(4-Bromphenoxy)-1-ethoxyethan in 150 ml absol. Diethylether wird unter Argon gerührt. Bei -45 °C bis -50 °C (Bad: Aceton/Trockeneis ≈ -



45 °C) werden 84.37 ml (135 mmol) einer *n*-Butyllithium-Lsg. (1.6 M in Hexan) in einem Zeitraum von 30 min zugegeben. Man rührt ca. 20 min bei -40 °C. Anschließend lässt man die Mischung innerhalb von 45 min auf 5 °C – 10 °C erwärmen und rührt bei dieser Temperatur 90 min.

2. Cupratbildung und Cuprataddition:

In einem 500 ml-Dreihalskolben werden 12.29 g (65.5 mmol) Cu(I)I in 40 ml absol. Diethylether suspendiert. Mittels einer Edelstahl-doppelkanüle wird die lithiierte Lösung in einen mit Argon gefüllten 250 ml-Tropftrichter überführt und anschließend bei 0 °C innerhalb von 60 min zugetropft. Nach vollständiger Zugabe rührt man erst 30 min und kühlt dann auf -50 °C ab. Bei dieser Temperatur werden 2.70 g (23.20 mmol) 2-

Trimethylsilyloxiran **113** mit einer Spritze zugetropft. Man rührt 4.5 h bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, tauscht die Aceton/Trockeneis-Kühlung gegen eine Kühlung mit Eis-Kochsalz (Verhältnis 3:1 $\rightarrow -19\text{ }^{\circ}\text{C}$) aus und rührt 16 h. Die Lösung wird mit 200 ml einer ges. NH_4Cl -Lsg. versetzt und 10 min bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, in einen Scheidetrichter überführt, mit 300 ml Ethylacetat sowie weiteren 200 ml einer ges. NH_4Cl -Lsg. versetzt und kräftig geschüttelt. Die organische Phase wird zweimal mit je 250 ml einer ges. NH_4Cl -Lsg. gewaschen und die wässrigen Phasen werden mit 300 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie an 650 g Kieselgel (Laufmittel: PE/EE 8:1 (unter Zusatz von 0.1% Triethylamin)) gereinigt. Die Produktfraktionen werden zweimal mit jeweils 15 ml Toluol kodestilliert, um letzte Reste des Triethylamins zu entfernen.

Ausb.: 5.24 g (80%); braunes Öl; $R_f = 0.24$ (PE/EE 6:1).

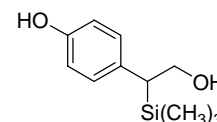
$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Si}$ [282.45]

200 MHz $^1\text{H-NMR}$ (Aceton- d_6), δ/ppm : 7.03 (d, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}-\text{Bn}}$, $J = 8.79\text{ Hz}$); 6.89 (d, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}-\text{Bn}}$, $J = 8.78\text{ Hz}$); 5.36 (m, 1H, O-CH-O); 4.10-3.87 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 3.82-3.61 (m, 1H, OH); 3.60-3.30 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$); 2.32 (dd, 1H, TMSCH, $J_{\text{CH},\text{CH}_2} = 3.90\text{ Hz}$, $J_{\text{CH},\text{CH}_3} = 5.37\text{ Hz}$); 1.41 (d, 3H, CH-CH_3 , $J_{\text{CH},\text{CH}_3} = 4.89\text{ Hz}$); 1.12 (t, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.32\text{ Hz}$); -0.05 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

50.3 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (Aceton- d_6), δ/ppm : 155.40 (1C, $\text{C}_{\text{ipso}-\text{Bn}-\text{O}}$); 136.45 (1C, $\text{C}_{\text{ipso}-\text{Bn}}$); 129.48 (2C, $\text{C}_{\text{arom.}-\text{Bn}}$); 118.07 (2C, $\text{C}_{\text{arom.}-\text{Bn}}$); 100.28 (1C, O-CH-O); 63.55 (1C, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 61.84 (1C, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$); 40.98 (1C, TMS-CH); 20.71 (1C, CH_3); 15.53 (1C, CH_3); -2.16 (3C, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

(2-*p*-Hydroxyphenyl)-2-trimethylsilyl)ethanol **116**

Man löst 5.20 g (18.37 mmol) [2-(Ethoxyethoxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol **115** in 80 ml Methanol (p.a.) und rührt unter Argon. Eine Lösung von 137.8 mg (0.55 mmol, 0.03 Äquiv.) PPTS



in 6 ml Methanol (p.a.) wird zugegeben und die Mischung 15 h bei Raumtemp. gerührt. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der so erhaltene Rückstand wird durch Flashchromatographie an 400 g Kieselgel (Laufmittel: PE/EE 5:1 \rightarrow 3:1) gereinigt.

Ausb.: 3.39 g (87%); leicht gelber, kristalliner Feststoff; $R_f = 0.29$ (PE/EE 5:1).

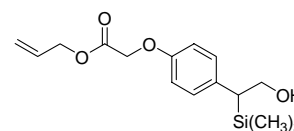
$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{Si}$ [210.34]

200 MHz $^1\text{H-NMR}$ (Aceton- d_6), δ/ppm : 7.97 (sb, 1H, OH-Phenol); 6.97 (d, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}-\text{Bn}}$, $J = 8.30$ Hz); 6.72 (d, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}-\text{Bn}}$, $J = 8.31$ Hz); 4.00-3.92 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 3.43 (t, 1H, OH, $J_{\text{OH,CH}_2} = 5.25$ Hz); 2.29 (dd, 1H, TMS-CH, $J_{\text{CH,CH}_2} = 5.37$ Hz, $J_{\text{CH,CH}_2} = 9.27$ Hz); -0.05 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

50.3 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (Aceton- d_6), δ/ppm : 155.47 (1C, $\text{C}_{\text{ipso}-\text{Bn}-\text{O}}$); 133.56 (1C, $\text{C}_{\text{ipso}-\text{Bn}}$); 129.55 (2C, $\text{C}_{\text{arom.}-\text{Bn}}$); 115.79 (2C, $\text{C}_{\text{arom.}-\text{Bn}}$); 63.78 (1C, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 40.86 (1C, TMS-CH); -2.13 (3C, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

4-(2-Hydroxy-1-{trimethylsilyl}-ethyl)-phenoxyessigsäureallylester 117

Es werden 2.00 g (9.51 mmol) (2-{*p*-Hydroxyphenyl}-2-trimethylsilyl)ethanol **116** in 55 ml Aceton (p.a.) gelöst. In der angegebenen Reihenfolge gibt man nacheinander 1.72 g



(12.40 mmol) K_2CO_3 , 206.4 mg (1.24 mmol) KI und 1.33 ml (11.42 mmol) Chloressigsäureallylester zu. Man rührt 15 h bei Raumtemperatur. Da der Umsatz nach dieser Zeit nur ca. 50% beträgt (DC-Kontrolle: PE/EE 12:1), gibt man noch einmal 1.03 g (7.40 mmol) K_2CO_3 , 123.8 mg (0.75 mmol) KI und 0.80 ml (6.86 mmol) Chloressigsäureallylester zu. Es wird weitere 20 h bei Raumtemp. gerührt. Die Mischung wird über *Hyflo*[®] filtriert und mit 200 ml Aceton gewaschen. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Der braune, ölige Rückstand wird durch Flashchromatographie an 200 g Kieselgel (Laufmittel: PE/EE 12:1 \rightarrow 8:1) gereinigt. Das so erhaltene farblose Öl kristallisiert nach Trocknen i. Hochvak. und Lagern bei -20 °C.

Ausb.: 2.52 g (86%); farbloser, kristalliner Feststoff; $R_f = 0.12$ (PE/EE 12:1); (Lit.:⁸³ Ausb.: 78%).

$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{Si}$ [308.45]

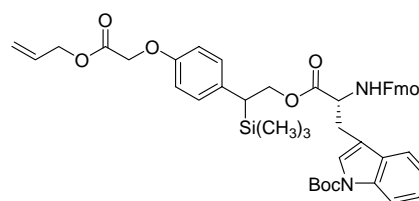
ESI-MS (positiv), m/z : 331.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 331.4).

200 MHz $^1\text{H-NMR}$ (Aceton- d_6), δ/ppm : 7.06 (d, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$, $J = 8.79$ Hz); 6.83 (d, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$, $J = 8.79$ Hz); 6.04-5.84 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.32 (dd, 1H, $\text{CH}=\text{CHaHb}$, $J_{\text{CH,CHa}} = 8.93$ Hz, $J_{\text{CHa,CHb}} = 14.16$ Hz); 5.22 (dd, 1H, $\text{CH}=\text{CHaCHb}$, $J_{\text{CH,CHb}} = 8.93$ Hz, $J_{\text{CHa,b}} = 14.16$ Hz); 4.70 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 3.42$ Hz); 4.62 (s, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-CO}$); 4.05-3.94 (m, 2H, $\text{CH-CH}_2\text{-OH}$); 3.50 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{-OH}$, $J_{\text{CH}_2,\text{OH}} = 4.89$ Hz); 2.35 (dd, 1H, TMS-CH, $J_{\text{CH,CH}_2} = 5.37$ Hz, $J_{\text{CH,CH}_2} = 9.28$ Hz); -0.03 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

50.3 MHz ^{13}C -NMR (Aceton- d_6), δ (ppm): 168.78 (1C, CO); 155.70 (1C, $\text{C}_{\text{ipso-Bn-O}}$); 133.54 (1C, $\text{C}_{\text{ipso-Bn}}$); 131.50 (1C, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 128.75 (2C, $\text{C}_{\text{arom.-Bn}}$); 118.95 (1C, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 115.10 (2C, $\text{C}_{\text{arom.-Bn}}$); 65.65, 65.50 (2C, $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{-O}$, $\text{O}=\text{C-CH}_2\text{-O}$); 63.20 (1C, $\text{CH-CH}_2\text{-O}$); 40.77 (1C, TMS-CH); -2.13 (3C, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

4-(2-{N-[9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-[N-tert-butyloxycarbonyl]-oxy}-1-{trimethylsilyl}-ethyl)-phenoxyessigsäureallylester 118

Zu 0.42 g (1.36 mmol) 4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäureallylester



117 gibt man 0.79 g (1.50 mmol) Fmoc-Trp(Boc)-OH in 10 ml absol. CH_2Cl_2 . Unter Argon wird die

Mischung auf 0 °C gekühlt und nacheinander mit 10.2 mg (0.08 mmol) DMAP und 0.34 g (1.65 mmol) DCC versetzt. Es wird 4.5 h bei 0 °C gerührt, bevor man über *Hyflo*[®] filtriert und mit 80 ml CH_2Cl_2 wäscht. Das Filtrat wird zweimal mit je 100 ml einer 5%igen NaHCO_3 -Lösung, mit 100 ml H_2O und mit 100 ml einer ges. NaCl -Lsg. gewaschen. Die wässrigen Phasen werden einmal mit 80 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Man trocknet die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird chromatographisch an 80 g Kieselgel (Laufmittel: PE/EE 10:1) gereinigt.

Ausb.: 1.04 g (95%); gelbliches Öl; $R_f = 0.35$ (PE/EE 8:1).

$\text{C}_{47}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_9\text{Si}$ [816.34]

ESI-MS (positiv), m/z : 840.4 ($[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$, ber.: 840.3); 855.3 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 855.4).

300 MHz ^1H -NMR (Aceton- d_6), δ /ppm: 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H}3,\text{H}4} = J_{\text{H}5,\text{H}6} = 7.43$ Hz); 7.57 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H}1,\text{H}2} = J_{\text{H}7,\text{H}8} = 7.43$ Hz); 7.39-7.27 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 6.93 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.-PTMSEL}}$); 6.78 (d, 2H, $\text{H}_{\text{arom.-PTMSEL}}$, $J = 7.82$ Hz); 5.98-5.80 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.14-5.33 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 4.70-4.40 (m, 7H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$, W^α , $\text{O-CH}_2\text{-CO}$, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$); 4.25-4.10 (m, 3H, H9-Fmoc, TMS-CH- CH_2); 3.15-2.86 (m, 2H, W^β); 2.52-2.48 (m, 1H, TMS-CH); 1.65 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$); -0.02 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

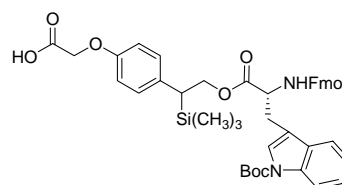
75.5 MHz ^{13}C -NMR (Aceton- d_6), δ /ppm: 168.78 (1C, CO); 156.76 (1C, $\text{C}_{\text{ipso-Bn-O}}$); 144.95 (2C, C1a-, C8a-Fmoc); 142.03 (2C, C4a-, C5a-Fmoc); 134.42 (1C, W^δ); 133.17 (1C, $\text{C}_{\text{ipso-Bn}}$); 129.42 (1C, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 129.35, 128.50, 127.90 (6C, $\text{C}_{\text{arom.-Bn}}$, C2-, C3-,

C6-, C7-Fmoc); 126.12 (1C, W⁹); 125.90 (1C, W²); 125.22, 125.18 (2C, C1-, C8-Fmoc); 123.40 (1C, W⁵); 119.70 (2C, W⁴, W⁶); 120.77 (2C, C4-, C5-Fmoc); 118.32 (1C, CH=CH₂); 115.98 (1C, W⁷); 115.30 (2C, C_{arom.}-Bn); 84.24 (1C, C_q-*t*Bu); 67.25 (1C, CH₂-Fmoc); 67.04, 66.92 (2C, TMS-CH-CH₂-O, O=C-CH₂-O); 55.21 (1C, W^α); 47.89 (1C, C9-Fmoc); 36.92 (1C, TMS-CH); 28.25 (1C, W^β); -2.49 (3C, Si(CH₃)₃).

Teilweise tritt Signalverdopplung auf, da Diastereomere vorliegen.

4-(2-{*N*-[9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-[*N*-*tert*-butyloxycarbonyl]-oxy}-1-{trimethylsilyl}-ethyl)-phenoxyessigsäure **119**

Es werden 800 mg (0.98 mmol) 4-(2-{*N*-[9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-[*tert*-butyloxycarbonyl]-oxy}-1-{trimethylsilyl}-ethyl)-phenoxyessigsäureallylester **118** in 10 ml absol. THF unter Argon



gelöst. Dazu gibt man 68 mg (0.04 mmol) Pd(PPh₃)₄ und eine Lösung von 290 mg (1.08 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Natrium-Salz in 8 ml absol. MeOH. Es wird 140 min bei Raumtemp. gerührt. Man entfernt die Lösungsmittel i. Vak. und chromatographiert den Rückstand an 90 g Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 90:1).

Ausb.: 631 mg (83%); gelbliches Öl; R_f = 0.40 (CH₂Cl₂/MeOH 40:1).

C₄₄H₄₈N₂O₉Si [776.31]

ESI-MS (positiv), m/z: 799.4 ([M+Na]⁺, ber.: 799.3); 815.4 ([M+K]⁺, ber.: 815.4); 821.4 ([M+2Na-H]⁺, ber.: 821.3).

Die NMR-Spektren sind so schlecht aufgelöst, dass keine Signalzuordnung vorgenommen werden kann.

Beladung von Novasyn TG Aminoharz HL mit 4-(2-{*N*-[9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl]-L-tryptophyl-[*N*-*tert*-butyloxycarbonyl]-oxy}-1-{trimethylsilyl}-ethyl)-phenoxyessigsäure **120**

In einem Reaktor für die Festphasensynthese (250 ml Kolben mit Fritte und Schlifffhahn am Boden) werden 2.22 g *Novasyn TG amino resin HL* (110 μm beads; Beladung: 0.45 mmol/g) eingewogen und 30 min in 24 ml CH₂Cl₂ vorgequollen. Zu einer Lösung von

638 mg (0.82 mmol) 4-(2-{*N*-[9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl]-*L*-tryptophyl-[*N*-*tert*-butyloxycarbonyl]-oxy}-1-{trimethylsilyl}-ethyl)-phenoxyessigsäure **119** in 35 ml CH₂Cl₂ und 5 ml DMF gibt man nacheinander 126 mg (0.82 mmol) HOBt, 0.18 ml (1.64 mmol) *N*-Methylmorpholin und 263 mg (0.82 mmol) TBTU. Man lässt 20 min bei Raumtemp. reagieren und überführt die Reaktionslösung in den Festphasenreaktor. Es wird 18 h bei Raumtemp. geschüttelt ('Orbitalshaking') und anschließend filtriert. Das Harz wird dreimal mit je 25 ml DMF und dreimal mit je 25 ml CH₂Cl₂ gewaschen. Nun gibt man 25 ml Pyridin/Acetanhydrid (3:1) zu und schüttelt 20 min. Danach wird viermal mit je 25 ml DMF und abwechselnd dreimal mit je 25 ml MeOH und CH₂Cl₂ gewaschen. Zum Abschluss wäscht man sechsmal mit je 25 ml Diethylether und trocknet das Harz im Hochvakuum. Es werden 2.63 g beladenes Harz erhalten. Die Beladungsbestimmung erfolgt photometrisch anhand der UV-Absorption des Fluorenyl-Piperidin-Adduktes, welches durch Versetzen von 20 mg des mit der Fmoc-Aminosäure beladenen Harzes mit Piperidin entsteht.⁸⁹ Es ergibt sich eine Beladungsdichte von: $c = 0.235 \text{ mmol/g}$ (Kupplungsausbeute: 75%).

5.13 Versuche zu Kapitel 3.6

5.13.1 Allgemeines Protokoll der Festphasenpeptidsynthese

Die Festphasenpeptidsynthesen werden mit einem Perkin-Elmer ABI 433A -Peptidsynthesizer durchgeführt. Es werden 0.1 mmol des mit der Startaminosäure beladenen Harzes verwendet. Die Fmoc-Abspaltungen werden mit 30% Piperidin in NMP innerhalb von 4-Minuten-Zyklen in Abhängigkeit von der gemessenen UV-Absorption des Piperidiny-Fmoc-Komplexes so lange wiederholt, bis zwei aufeinanderfolgende Werte eine Differenz $\leq 10\%$ aufweisen. In der Regel werden die Abspaltungen ein bis zweimal wiederholt. Die sich jeweils anschließenden Kupplungen der Fmoc-geschützten Aminosäuren (1 mmol \equiv 10 Äquiv.) erfolgen mit einer Lösung von 1 mmol HBTU, 1 mmol HOBt und 2 mmol DIPEA in NMP/DMF, wobei stark geschüttelt (Vortex) wird. Die Kupplungszeit beträgt jeweils 15-17 min. Nach jedem Kupplungsschritt werden die nicht umgesetzten Aminogruppen mittels einer Lösung von Ac₂O (0.5 M), DIPEA (0.125 M) und HOBt (0.015 M) in NMP acetyliert. Diese Schritte werden bis zum Abschluss der Synthese wiederholt. Am Ende wird das Harz mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen.

5.13.2 Versuche zu Kapitel 3.6.2

N*-Acetyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-aspartyl-L-glycyl-L-prolyl-L-valin **123*

(Ac-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser-His-Gly-Ala-Ile-Val-Asp-Gly-Pro-Val-OH)

In den Festphasenreaktor werden 455 mg (0.1 mmol) Fmoc-Val-Tentagel-PHB-Harz eingewogen. Die Kupplungen der Aminosäuren erfolgen nach dem allgemeinen Protokoll (s. Kapitel 5.13.1). Aufgrund der gemachten Erfahrungen beim ersten Syntheseversuch des Peptids **123** wird bei den beiden aufeinanderfolgenden Aminosäuren (Fmoc-Ile-OH und Fmoc-Ala-OH) jeweils eine Doppelkupplung mit 10 Äquiv. ohne zwischenzeitlichen Cappingschritt vorgenommen.

Die Abspaltung des Peptids erfolgt nach der Überführung des Harzes in einen Merrifield-Festphasenreaktor durch Zugabe von 15 ml TFA, 0.9 ml H₂O und 0.9 ml TIS. Es wird 2 h geschüttelt (Orbitalshaking), filtriert und anschließend dreimal mit je 10 ml TFA nachgewaschen. Man engt den grössten Teil der überschüssigen Reagenzien ein, versetzt mit 30 ml kaltem Diethylether und trennt das Solvens nach Zentrifugieren ab. Der zurückbleibende Feststoff wird in einen Kolben überführt und lyophilisiert.

Man erhält 152 mg farblosen Feststoff der sich weder in MeOH, MeCN oder Wasser noch in einer Mischung der angegebenen Solventien löst.

C₆₅H₁₀₅N₁₇O₂₂ [1475.76] (1476.63)

ESI-MS (positiv), m/z: 1476.8 ([M+H]⁺, ber.: 1476.8).

5.13.3 Versuche zu Kapitel 3.6.3

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-aspartyl-L-glycyl-L-prolyl-L-valin 126

(H-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser(α -GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-Asp-Gly-Pro-Val-OH)

In den Festphasenreaktor werden 435 mg (0.1 mmol) Fmoc-Val-Tentagel-PHB-Harz eingewogen. Die Kupplungen der ersten vier Aminosäuren erfolgen nach dem Standardfestphasenprotokoll (s. Kapitel 5.13.1). Aufgrund der gemachten Erfahrungen beim ersten Syntheseversuch des Peptids **123** wird bei den beiden folgenden Aminosäuren (Fmoc-Ile-OH und Fmoc-Ala-OH) jeweils eine Doppelkupplung mit je 10 Äquiv. ohne zwischenzeitlichen Cappingschritt vorgenommen. Die Kupplungen der beiden folgenden Aminosäuren (Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His-OH) erfolgen nach dem allgemeinen Protokoll. Zur Kupplung des Serin-Konjugats wird die automatisierte Festphasensynthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung an Histidin unterbrochen und das Harz mit einer frischen Lösung von 131 mg (0.20 mmol, 2 äquiv.) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OH **13**, 30 mg (0.20 mmol) HOAt, 81 mg (0.21 mmol) HATU und 47.12 μ l (0.29 mmol) DIPEA in NMP versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 3 h geschüttelt, filtriert, das Harz mit NMP nachgewaschen und einem Capping unterzogen. Die Kupplungen der restlichen Aminosäuren erfolgen nach dem

Standardkupplungsverfahren. Bei der *N*-terminalen Aminosäure wird nach der Fmoc-Abspaltung und dem Waschschrift kein Cappingschritt mehr vorgenommen.

Die Abspaltung des Peptids erfolgt in einem Merrifield-Festphasenreaktor durch Zugabe von 15 ml TFA, 0.9 ml H₂O und 0.9 ml TIS. Es wird 2 h geschüttelt (Orbitalshaking), filtriert und anschließend dreimal mit je 10 ml TFA nachgewaschen. Man engt den grössten Teil des überschüssigen Lösungsmittels ein, versetzt mit 30 ml kaltem Diethylether und trennt das Solvens nach Zentrifugieren ab. Der zurückbleibende Feststoff wird in einen Kolben überführt und lyophilisiert.

Man erhält 182 mg farblosen, amorphen Feststoff.

C₇₇H₁₂₂N₁₈O₂₉ [1762.86] (1763.89)

ESI-MS (positiv), m/z: 1787.0 ([M+Na]⁺, ber.: 1786.9).

Nach der massenspektrometrischen Vermessung des Rohprodukts löst man Glycopeptid **125** in 20 ml MeOH und versetzt so lange mit frisch hergestellter NaOMe-Lösung, bis ein pH-Bereich von 8.5-9.0 erreicht ist. Die Lösung wird im angegebenen pH-Bereich bei Raumtemp. 16 h gerührt. Die Neutralisation erfolgt durch Zugabe von *Amberlite*[®] *IR-120* (H-Form). Bevor der saure Ionentauscher abfiltriert wird, rührt man ihn 5 min im zu neutralisierenden Gemisch. Das Lösungsmittel wird destillativ entfernt und man erhält 154 mg farblosen, amorphen Feststoff, der weder in CH₃CN, MeOH oder Essigsäure noch in Mischungen dieser Lösungsmittel löslich ist.

C₇₁H₁₁₆N₁₈O₂₆ [1636.83] (1637.79)

ESI-MS (positiv), m/z: 1637.9 ([M+H]⁺, ber.: 1637.8).

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin 130

(H-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser(β-Gal-(1→3)-α-GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-OH)

In den Festphasenreaktor werden 263 mg (0.05 mmol) Fmoc-Val-Tentagel-PHB-Harz eingewogen. Die Kupplungen der ersten fünf Aminosäuren erfolgen in Abwandlung zum Standardprotokoll mit je 20 Äquiv. der jeweiligen Aminosäure (s. Kapitel 5.13.1). Zur Kupplung des Serin-Konjugats wird die automatisierte Festphasensynthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung an Histidin unterbrochen und das Harz mit einer frischen Lösung von 95 mg (0.20 mmol, 4 Äquiv.) Fmoc-Ser(β-Ac₄Gal-(1→3)-α-Ac₂GalNAc)-OH **20**, 30 mg

HOAt (0.19 mmol), 82 mg HATU (0.21 mmol) und 48 μ l (0.29 mmol) DIPEA in NMP versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 5 h geschüttelt, filtriert und das Harz mit NMP nachgewaschen und einem Capping unterzogen. Die Kupplungen der restlichen Aminosäuren erfolgen nach dem Standardverfahren, jedoch mit je 20 Äquiv. der benötigten Aminosäuren. Bei der *N*-terminalen Aminosäure wird nach der Fmoc-Abspaltung und dem Waschschrift kein Capping mehr vorgenommen.

Die Abspaltung des Peptids erfolgt in einem Merrifield-Festphasenreaktor mit 15 ml TFA, 0.9 ml H₂O und 0.9 ml TIS. Es wird 2 h geschüttelt (Orbitalshaking), filtriert und anschließend dreimal mit je 10 ml TFA nachgewaschen. Man engt den grössten Teil der überschüssigen Reagenzien ein, versetzt mit 30 ml kaltem Diethylether und trennt das Solvens durch Zentrifugieren ab. Der zurückbleibende Feststoff wird in einen Kolben überführt und lyophilisiert.

Man erhält 81 mg farblosen, amorphen Feststoff.

C₇₃H₁₁₄N₁₄O₃₁ [1682.78] (1683.76)

ESI-MS (positiv), m/z: 1707.0 ([M+Na]⁺, ber.: 1706.7).

Nach der massenspektrometrischen Vermessung des Rohprodukts **129** löst man dieses in 20 ml MeOH und versetzt so lange mit frisch hergestellter NaOMe-Lösung, bis ein pH-Wert von ca. 9.5 erreicht ist. Die Lösung wird bei diesem pH-Wert bei Raumtemp. 68 h gerührt. Die Neutralisation erfolgt durch Zugabe einer geringen Menge AcOH. Das Lösungsmittel wird destillativ entfernt, und man erhält 92 mg farblosen, amorphen Feststoff. Die Reinigung erfolgt mittels präp. HPLC (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 3-20(75 min)-20(140 min)).

Ausb.: 32 mg (45%); farbloser amorpher Feststoff; R_t = 38.55 min (LUNA C-18, Gradient %CH₃CN+0.1%TFA): 3-21(40 min)-21(60 min)); [α]_D²² = -32.4 (c = 1.4, H₂O).

C₆₁H₁₀₂N₁₄O₂₅ [1430.71] (1431.54)

ESI-MS (positiv), m/z: 1432.2 ([M+H]⁺, ber.: 1432.5); 1454.5 ([M+Na]⁺, ber.: 1454.5); 1470.3 ([M+K]⁺, ber.: 1470.6); 1492.5 ([M+Na+K-H]⁺, ber.: 1492.6).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1431.7188 ([M+H]⁺, ber.: 1431.7219).

400 MHz ¹H-NMR (D₂O) (¹H, COSY), δ /ppm: 8.61 (s, 1H, H ^{ϵ 1}); 7.31 (s, 1H, H ^{δ 2}); 4.85-4.64 (m, 3H, H1 (4.83), D ^{α} (4.72), H ^{α} (4.71), unter H₂O-Signal); 4.54 (t, 1H, S ^{α} , J_{S α ,S β} = 5.28 Hz); 4.44 (d, 1H, H1', J_{H1',H2'} = 7.44 Hz); 4.37-4.16 (m, 8H, 3*A ^{α} (4.36-4.26), H2 (4.31), L ^{α} (4.29), V ^{α} (4.22), I ^{α} (4.19), H4 (4.19)); 4.00-3.82 (m, 7H, H3 (3.98), G ^{α} (3.99, 3.90), L ^{α} (3.96), S ^{β a} (3.93), H5 (3.89), H4' (3.85)); 3.80-3.66 (m, 5H, S ^{β b} (3.78), C6 (3.75-3.66), C6' (3.75-3.66)); 3.64-3.57 (m, 2H, H5' (3.62), H3' (3.58)); 3.51-3.47 (m, 1H, H2'); 3.31-3.28

(m, 1H, H^{βa}); 3.22-3.15 (m, 1H, H^{βb}); 2.96-2.78 (m, 2H, D^β); 2.17-2.10 (m, 1H, V^β); 1.99 (2*s, 6H, CH₃-Ac); 1.87-1.80 (m, 1H, I^β); 1.66-1.40 (m, 7H, 2*L^γ (1.71-1.58), 2*L^β (1.75-1.55), I^{γa} (1.51)); 1.36 (m, 9H, A^β); 1.23-1.13 (m, 1H, I^{γb}); 0.92-0.80 (m, 18H, 4*L^δ (0.94, 0.85), I^γ (0.89), V^γ (0.90), I^δ (0.83)).

100.6 MHz ¹³C-NMR (D₂O) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 104.98 (1C, C1^γ); 98.27 (1C, C1); 77.40 (1C, C3); 75.11 (1C, C5^γ); 72.71 (1C, C3^γ); 71.21 (1C, C4^γ); 70.80 (1C, C2^γ); 68.81 (1C, C4); 68.80 (1C, C5); 67.27 (1C, S^β); 61.41 (2C, C6, C6^γ); 58.60 (1C, V^α); 58.42 (1C, I^α); 53.80 (1C, S^α); 52.74 (1C, H^α); 51.90 (1C, L^α); 50.09 (1C, D^α); 49.81 (2C, A^α); 49.70 (1C, L^α); 48.51 (1C, C2); 42.31 (1C, G^α); 39.85 (2C, L^β); 36.12 (1C, I^β); 35.60 (1C, D^β); 30.11 (1C, V^β); 26.78 (1C, H^β); 24.23 (2C, L^γ); 22.39 (2C, CH₃-Ac); 21.67, 21.03 (4C, L^δ); 18.37 (2C, V^γ); 16.78 (3C, A^β); 14.80 (1C, I^γ); 10.11 (1C, I^δ).

***N*-Acetyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin 130a**

(Ac-Ser(β-Gal-(1→3)-α-GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-OH)

Ausb.: 7 mg (13%, bezogen 0.05 mmol Harz).

C₄₁H₆₇N₉O₁₉ [989.46] (990.02)

MALDI-TOF-MS (positiv, dnb), m/z: 1013.7 ([M+Na]⁺, ber.: 1013.0).

400 MHz ¹H-NMR (D₂O) (¹H, COSY), δ/ppm: 8.60 (s, 1H, H^{ε1}); 7.31 (s, 1H, H^{δ2}); 4.86-4.70 (m, 2H, H1 (4.84), H^α (4.75), unter H₂O-Signal); 4.53 (t, 1H, S^α, J_{Sα,Sβ} = 6.28 Hz); 4.43 (d, 1H, H1^γ, J_{H1^γ,H2^γ} = 7.40 Hz); 4.33-4.25 (m, 2H, A^α, H2); 4.23-4.17 (m, 3H, V^α, I^α, H4); 3.97-3.82 (m, 5H, H3, H5, H4^γ, G^α, S^{βa}); 3.78-3.65 (m, 5H, C6, C6^γ, S^{βb}); 3.64-3.57 (m, 2H, H3^γ, H5^γ); 3.32-3.28 (m, 1H, H^{βa}); 3.22-3.15 (m, 1H, H^{βb}); 2.18-2.10 (m, 1H, V^β); 2.02, 1.98 (2*s, 6H, CH₃-Ac); 1.88-1.80 (m, 1H, I^β); 1.53-1.45 (m, 1H, I^{γa}); 1.36 (d, 3H, A^β, J_{Aβ,Aα} = 7.44 Hz); 1.22-1.14 (m, 1H, I^{γb}); 0.92 (d, 6H, V^γ, J_{Vγ,Vβ} = 7.04 Hz); 0.83 (t, 3H, I^γ, J_{Iγ,Iβ} = 7.44 Hz).

100.6 MHz ¹³C-NMR (D₂O) (¹³C, HMQC), δ/ppm: 104.94 (1C, C1^γ); 98.41 (1C, C1); 77.33 (1C, C3); 75.22 (1C, C5^γ); 72.81 (1C, C3^γ); 71.23 (1C, C4^γ); 70.83 (1C, C2^γ); 68.77 (2C, C4, C5); 67.20 (1C, S^β); 61.22 (2C, C6, C6^γ); 58.71 (1C, V^α); 54.13 (1C, S^α); 52.62 (1C, H^α); 49.90 (1C, A^α); 48.51 (1C, C2); 42.38 (1C, G^α); 36.20 (1C, I^β); 30.24 (1C, V^β); 26.75 (1C, H^β); 24.60 (1C, I^γ); 22.40, 21.95 (2C, CH₃-Ac); 18.10 (2C, V^γ); 16.72 (1C, A^β); 14.80 (1C, I^γ); 10.15 (1C, I^δ).

***N*-Acetyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin
130b**

(Ac-Ala-Leu-Asp-Ser(β -Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-OH)

Ausb.: 10 mg (16%, bezogen auf 0.05 mmol Harz).

C₅₄H₈₈N₁₂O₂₄ [1288.60] (1289.34)

MALDI-TOF (positiv, dnb), m/z: 1289.7 ([M+H]⁺, ber.: 1289.6); 1312.0 ([M+Na]⁺, ber.: 1311.6); 1334.0 ([M+2Na-H]⁺, ber.: 1333.6).

400 MHz ¹H-NMR (D₂O) (¹H, COSY), δ /ppm: 8.60 (s, 1H, H ^{ϵ 1}); 7.30 (s, 1H, H ^{δ 2}); 4.85-4.64 (m, 3H, H1 (4.83), H ^{α} (4.71), D ^{α} (4.67), unter H₂O-Signal); 4.54 (t, 1H, S ^{α} , J_{S α ,S β} = 5.28 Hz); 4.44 (d, 1H, H1', J_{H1',H2'} = 7.84 Hz); 4.37-4.26 (m, 3H, A ^{α} (4.31), L ^{α} (4.31), H2 (4.29)); 4.22-4.15 (m, 4H, A ^{α} (4.19), H4 (4.19), V ^{α} (4.18), I ^{α} (4.17)); 3.97-3.82 (m, 6H, H3 (3.98), G ^{α} (3.98, 3.90), S ^{β a} (3.93), H5 (3.89), H4' (3.86)); 3.80-3.67 (m, 5H, S ^{β b} (3.79), C6 (3.71-3.67), C6' (3.71-3.67)); 3.64-3.57 (m, 2H, H5' (3.62), H3' (3.57)); 3.52-3.48 (m, 1H, H2'); 3.31-3.28 (m, 1H, H ^{β a}); 3.22-3.15 (m, 1H, H ^{β b}); 2.91-2.78 (m, 2H, D ^{β}); 2.15-2.10 (m, 1H, V ^{β}); 1.98 (2*s, 6H, CH₃-Ac); 1.87-1.80 (m, 1H, I ^{β}); 1.66-1.43 (m, 4H, L ^{γ} (1.63), L ^{β} (1.58), I ^{γ a} (1.48)); 1.33 (m, 6H, A ^{β}); 1.20-1.15 (m, 1H, I ^{γ b}); 0.92-0.80 (m, 18H, 2*L ^{δ} (0.92, 0.85), I ^{γ} (0.90), V ^{γ} (0.90), I ^{δ} (0.84)).

100.6 MHz ¹³C-NMR (D₂O) (¹³C, HMQC), δ /ppm: 104.94 (1C, C1'); 98.31 (1C, C1); 77.50 (1C, C3); 75.24 (1C, C5'); 72.80 (1C, C3'); 71.25 (1C, C4'); 70.84 (1C, C2'); 68.80 (1C, C5); 68.75 (1C, C4); 67.20 (1C, S ^{β}); 61.20 (2C, C6, C6'); 58.80 (1C, V ^{α}); 58.71 (1C, I ^{α}); 53.94 (1C, S ^{α}); 52.81 (1C, H ^{α}); 50.27 (1C, D ^{α}); 49.90 (2C, A ^{α}); 49.81 (1C, L ^{α}); 48.50 (1C, C2); 42.29 (1C, G ^{α}); 39.71 (1C, L ^{β}); 36.10 (1C, I ^{β}); 35.90 (1C, D ^{β}); 30.06 (1C, V ^{β}); 26.81 (1C, H ^{β}); 24.41 (1C, L ^{γ}); 22.41, 20.90 (2C, L ^{δ}); 21.80 (2C, CH₃-Ac); 18.49 (2C, V ^{γ}); 16.78 (2C, A ^{β}); 14.90 (1C, I ^{γ}); 10.21 (1C, I ^{δ}).

Folgende Signale konnten nicht eindeutig zugewiesen werden: γ -CH₂-Ile und H2-, H4-His.

L-Glutamyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-aspartyl-L-glycyl-L-prolyl-L-valin 132

H-Gln-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser(β-Ac₄Gal-(1→3)-[α-NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)]-α-GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-Asp-Gly-Pro-Val-OH

In den Festphasenreaktor werden 227 mg (0.05 mmol) Fmoc-Val-Tentagel-PHB-Harz eingewogen. Die Kupplungen der ersten vier Aminosäuren erfolgen nach dem Standardprotokoll (s. Kapitel 5.13.1). Aufgrund der gemachten Erfahrungen beim ersten Syntheseversuch des Peptids **123** wird bei den beiden folgenden Aminosäuren (Fmoc-Ile-OH und Fmoc-Ala-OH) jeweils eine Doppelkupplung mit je 10 Äquiv. ohne zwischenzeitlichen Cappingschritt vorgenommen. Die Kupplungen der beiden folgenden Aminosäuren (Fmoc-Gly-OH und Fmoc-His-OH) erfolgen nach dem allgemeinen Festphasenprotokoll (mit je 20 Äquiv.). Zur Kupplung des Serin-Konjugats wird die automatisierte Festphasensynthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung an Histidin unterbrochen und das Harz mit frischer Lösung von 165 mg (0.12 mmol, 2.34 Äquiv.) Fmoc-Ser(β-Ac₄Gal-(1→3)-[α-NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)]-α-GalNAc)-OH **34**, 18 mg (0.12 mmol) HOAt, 47 mg HATU (0.12 mmol) und 25 µl (0.15 mmol) DIPEA in NMP versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 5 h geschüttelt, filtriert, das Harz mit NMP gewaschen und einem Cappingschritt unterzogen. Die Kupplungen der restlichen Aminosäuren erfolgen nach dem Standardverfahren (mit je 20 Äquiv.). Bei der N-terminalen Aminosäure wurde nach der Fmoc-Abspaltung kein Capping vorgenommen.

Die Abspaltung des Peptids erfolgt in einem Merrifield-Festphasenreaktor durch Zugabe von 10 ml TFA, 0.9 ml H₂O und 0.9 ml TIS. Es wird 2 h geschüttelt (Orbitalshaking), filtriert und anschließend dreimal mit je 10 ml TFA nachgewaschen. Man engt den grössten Teil der überschüssigen Reagenzien ein, versetzt mit 30 ml kaltem Diethylether und trennt das Solvens nach Zentrifugieren ab. Der zurückbleibende Feststoff wird in einen Kolben überführt und lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt durch präp. HPLC (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 25-100 (120 min)).

Ausb.: 55 mg (42%); farbloser Feststoff; R_t = 20.20 min (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 3-100 (40 min)).

C₁₁₆H₁₇₃N₂₁O₄₉ [2644.16] (2645.73)

ESI-MS (positiv), m/z: 1323.7 ([M+2H]⁺⁺/2, ber.: 2647.8).

400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) (^1H , COSY), δ/ppm : 8.86 (s, 1H, $\text{H}^{\text{e}1}$); 7.52-7.40 (m, 6H, $\text{H}_{\text{arom.}}-\text{Bn}$, $\text{H}^{\delta 2}$); 5.46-5.33 (m, 2H, $\text{H}4'$ (5.35), $\text{H}8''$ (5.34)); 5.30-5.10 (m, 4H, CH_2-Bn (5.21), $\text{H}7''$ (5.14), $\text{H}2'$ (5.12)); 4.87-4.71 (m, 3H, $\text{H}1'$ (4.85), $\text{H}3'$ (4.83), $\text{H}1$ (4.74)); 4.68-4.45 (m, 7H, D^α (4.66), H^α (4.66), P^α (4.57), S^α (4.53), A^α (4.48), A^α (4.46), L^α (4.46)); 4.44-3.80 (m, 24H, $\text{H}2$ (4.43), A^α (4.34), A^α (4.33), L^α (4.33), CH_2-Fmoc (4.30), V^α (4.29), I^α (4.29), $\text{H}9''$ (4.27, 4.09), V^α (4.24), G^α (4.19, 4.14), $\text{H}6''$ (4.12), $\text{H}5'$ (4.11), Q^α (4.00), $\text{H}4$ (4.00), G^α (3.99, 3.90), $\text{H}9-\text{Fmoc}$ (3.98), $\text{H}5$ (3.87), $\text{H}6\text{a}$ (3.84), $\text{H}3$ (3.83)); 3.70-3.40 (m, 4H, P^β (3.62, 3.58), $\text{C}6\text{b}$ (3.53), H^βa (3.41)); 3.30-3.20 (m, 1H, H^βb (3.21)); 3.05-2.75 (m, 2H, D^β (2.93)); 2.57-2.50 (m, 1H, $\text{H}3''_{\text{eq}}$); 2.30-1.98 (m, 34H, P^β (2.19, 2.02), V^β (2.18), $\text{H}3''_{\text{ax}}$ (2.14), Q^β (2.13), V^β (2.08), P^γ (2.02), CH_3-Ac); 1.90 (s, 3H, CH_3-Ac); 1.84-1.58 (m, 7H, I^β (1.84), $2*\text{L}^\gamma$ (1.73), $2*\text{L}^\beta$ (1.63)); 1.58-1.38 (m, 10H, I^γa (1.57), $3*\text{A}^\beta$); 1.30-1.15 (m, 1H, I^γb); 1.10-0.88 (m, 30H, $4*\text{V}^\gamma$ (0.99, 0.91), $4*\text{L}^\delta$ (0.95, 0.91, 0.97), I^γ (0.90), I^δ (0.87)).

100.6 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) (^{13}C , HMQC), δ/ppm : 102.68 (1C, $\text{C}1'$); 99.21 (1C, $\text{C}1$); 78.19 (1C, $\text{C}3$); 73.12 (1C, $\text{C}6''$); 72.00 (1C, $\text{C}2'$); 71.52 (1C, $\text{C}5'$); 70.22 (1C, $\text{C}3'$); 70.11 (2C, $\text{C}7''$, $\text{C}5$); 69.59 (1C, $\text{C}8''$); 68.91 (1C, $\text{C}4$); 68.52 (1C, CH_2-Bn); 68.18 (1C, $\text{C}4'$); 64.05 (1C, $\text{C}6$); 63.03 (1C, $\text{C}9''$); 63.00 (1C, CH_2-Fmoc); 60.93 (1C, P^α); 59.59 (1C, V^α); 59.05 (1C, V^α); 59.00 (1C, I^α); 53.82 (2C, $2*\text{L}^\alpha$); 53.51 (1C, D^α); 53.42 (1C, Q^α); 51.51 (1C, H^α); 50.96, 50.29, 49.04 (4C, A^α); 50.35 (1C, $\text{C}2$); 49.80 (1C, $\text{C}9-\text{Fmoc}$); 47.42 (1C, P^δ); 43.00, 42.67 (1C, G^α); 41.41 (2C, $2*\text{L}^\beta$); 37.44 (1C, I^β); 36.12 (1C, D^β); 31.89, 31.46 (2C, $2*\text{V}^\beta$); 31.31 (1C, $\text{C}3''$); 30.25 (1C, P^β); 27.73 (1C, Q^β); 27.52 (1C, H^β); 25.79 (1C, I^γ); 25.52 (2C, $2*\text{L}^\gamma$); 25.31 (1C, P^γ); 22.92-20.71 (9C, CH_3-Ac); 23.09, 21.97, 21.69 (4C, L^γ); 19.50, 18.30 (2C, $2*\text{V}^\gamma$); 17.65 (3C, A^β); 15.68 (1C, I^γ); 10.90 (1C, I^δ).

Die folgenden Signale konnten nicht eindeutig zugewiesen werden: Q^γ , $\text{C}4''$, $\text{C}5''$, $\text{C}6'$, CH_2-Bn .

L-Glutamyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-O-{2-acetamido-2-desoxy-3-O-[-β-D-galactopyranosyl]-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl}-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-aspartyl-L-glycyl-L-prolyl-L-valin 133

H-Gln-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser(β-Gal-(1→3)-[α-Neu5NAc-(2→6)]-α-GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-Asp-Gly-Pro-Val-OH

Man löst das Glycopeptid **132** in 15 ml MeOH, evakuiert und begast mehrmals mit Argon, bevor man eine Spatelspitze Pd/C (10%) zugibt. Der Kolben wird erneut zweimal mit Argon gespült. Anschließend ersetzt man das Argon durch Wasserstoff (Ballon mit H₂-Gas). Man hydriert 18 h, filtriert über einen Kartuschenfilter, versetzt so lange mit frisch hergestellter NaOMe-Lösung, bis ein pH-Bereich von 9.0-9.5 erreicht ist, und deacetyliert 72 h. Durch Zugabe eines Tropfens AcOH neutralisiert man die Mischung und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt mittels präp. HPLC (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 20-30(120 min)).

Ausb.: 26 mg (23%); farbloser Feststoff; R_t = 19.50 ((%CH₃CN+0.1%TFA): 10-50 (40 min)); $[\alpha]_D^{22} = -19.3$ (c = 1, H₂O).

C₉₃H₁₅₁N₂₁O₄₁ [2218.04] (2219.31)

ESI-MS (positiv), m/z: 2218.2 ([M]⁺, ber.: 2218.0).

charakteristische Signale (es werden dort die Integrale angegeben, wo alle Signale innerhalb des betrachteten Bereichs zugewiesen werden konnten):

600 MHz ¹H-NMR (D₂O) (¹H, COSY), δ/ppm: 8.52 (d, 1H, H^{ε1}, J_{Hε1,Hδ2} = 7.04 Hz); 7.22 (d, 1H, H^{δ2}, J_{Hε1,Hδ2} = 7.04 Hz); 4.69-4.58 (m, 2*D^α, H1); 4.47-4.42 (m, H1', H^α); 4.41-4.31 (m, 3*A^α, P^α, 2*L^α); 4.28-4.11 (m, G^α, I^α); 4.10-4.00 (m, G^α, Q^α); 3.98-3.70 (m, H4' (3.88), H6' (3.73)); 3.68-3.54 (m, H5', H3', P^δ); 3.53-3.38 (m, H2'); 3.35-3.11 (m, H^β); 3.11 (m, H^β); 2.91-2.69 (m, 2*D^β); 2.22-2.13 (m, V^β, Q^β, P^β); 2.11-2.00 (m, V^β, P^γ); 1.98-1.82 (m, NH-Ac, P^β); 1.78-1.69 (m, 1H, I^β); 1.60-1.45 (m, 3H, L^β, L^γ); 1.42-1.35 (m, 1H, I^γ); 1.30-1.22 (m, 9H, A^β); 1.17-1.12 (m, 1H, I^γ); 0.88-0.70 (m, 30H, 4*V^γ, I^γ, I^δ, 4*L^δ).

150.9 MHz ¹³C-NMR (D₂O) (HMQC), δ/ppm: 104.58 (1C, C1'); 74.81 (1C, C5'); 72.43 (1C, C3'); 71.14 (1C, C4'); 70.40 (1C, C2'); 60.73 (1C, C6'); 60.11 (1C, P^α); 59.05 (1C, I^α); 53.71 (1C, H^α); 52.50 (2C, D^α); 52.37 (2C, L^α); 52.02 (1C, Q^α); 49.62, 49.58, 48.06 (3C, A^α); 46.81 (1C, P^δ); 41.96, 41.68 (2C, G^α); 39.48 (2C, L^β); 35.66 (1C, I^β); 35.18 (2C, D^β); 29.96, 29.71 (2C, V^β); 29.18 (1C, P^β); 26.38 (1C, Q^β); 26.32 (1C, H^β); 24.47 (1C, I^γ); 24.23 (1C, P^γ); 24.11

(2C, L^γ); 21.48 (1C, CH₃-NHAc); 20.57, 21.94 (4C, L^δ); 18.26, 17.83, 17.11 (4C, V^γ); 16.34 (3C, A^β); 14.51 (1C, I^γ); 9.74 (1C, I^δ).

***N*-Acetyl-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-aspartyl-L-glycyl-L-prolyl-L-valin 135**

Ac-His-Gly-Ala-Ile-Val-Asp-Gly-Pro-Val-OH

Ausb.: 22 mg (50%, bezogen auf 0.05 mmol Harz); farbloser Feststoff; R_t = 14.5 min (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA) 10-100 (40 min)).

C₄₀H₆₃N₁₁O₁₃ [905.46] (905.99)

ESI-MS (positiv), m/z: 906.8 ([M+H]⁺, ber.: 906.5); 928.7 ([M+Na]⁺, ber.: 928.4); 944.7 ([M+K]⁺, ber.: 944.1).

400 MHz ¹H-NMR (CD₃OD) (¹H, COSY), δ/ppm: 8.84 (d, 1H, H^{ε1}, J_{Hε1,Hδ2} = 1.20 Hz); 7.39 (s, 1H, H^{δ2}); 4.77 (dd, 1H, D^α, J_{Hα,Hβα} = 5.84 Hz, J_{Hα,Hββ} = 7.44 Hz); 4.69 (t, 1H, H^α, J_{Hα,Hβ} = 6.64 Hz); 4.55 (dd, 1H, P^α, J_{Hα,Hβa} = 3.12 Hz, J_{Hα,Hβb} = 8.20 Hz); 4.41 (q, 1H, A^α, J_{Hα,Hβ} = 7.04 Hz); 4.24-4.11 (m, 5H, G^α, 2*V^α, I^α); 4.00-3.89 (m, 2H, G^α); 3.65-3.55 (m, 2H, P^δ); 3.30-3.25 (m, 1H, H^{βa}); 3.18-3.12 (m, 1H, H^{βb}); 2.91-2.86 (m, 1H, D^{βa}); 2.78-2.70 (m, 1H, D^{βb}); 2.22-2.12 (m, 2H, V^β, P^{βa}); 2.08-1.98 (m, 6H, V^β, P^{βb}, CH₃-Ac); 1.90-1.80 (m, 1H, I^β); 1.59-1.50 (m, 1H, I^γ); 1.36 (d, 3H, A^β, J_{Hα,Hβ} = 7.44 Hz); 1.22-1.10 (m, 1H, I^γ); 1.02-0.87 (m, 18H, V^γ (0.98, 0.93), I^γ (0.91), I^δ (0.88)).

100.6 MHz ¹³C-NMR (CD₃OD) (HMQC), δ/ppm: 60.94 (1C, P^α); 59.11 (1C, I^α); 59.10, 58.82 (2C, V^α); 53.36 (1C, H^α); 50.94 (1C, D^α); 50.31 (1C, A^α); 47.42 (1C, P^δ); 42.71 (2C, G^α); 37.53 (1C, I^β); 36.32 (1C, D^β); 31.58, 31.30 (2C, V^β); 30.24 (1C, P^β); 27.62 (1C, H^β); 25.81 (1C, I^γ); 25.24 (1C, P^γ); 22.47 (1C, CH₃-Ac); 19.47, 18.42 (4C, V^γ); 17.79 (1C, A^β); 15.63 (1C, I^γ); 10.91 (1C, I^δ).

5.13.4 Versuche zu Kapitel 3.6.4

***N*-Dansyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-L-tryptophan 137 (Dansyl-Leu-Ala-Ala-Leu-Trp(Boc)-OH)**

In den Festphasenreaktor werden 425 mg (0.10 mmol) Fmoc-Trp(Boc)-PTMSEL-Tentagel-Harz **120** eingewogen. Die Kupplungen der Aminosäuren erfolgen nach dem Standardprotokoll (s. Kapitel 5.13.1). Die Kupplung des Dansyl-Leucin-Derivats **49** erfolgt unter Standardbedingungen mit 150 mg (0.41 mmol, 4.1 Äquiv.) des benötigten Bausteins. Nach dem abschließenden Cappingschritt wird mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen.

Die Abspaltung des Peptids erfolgt in einem Merrifield-Festphasenreaktor. Hierzu wird das Harz durch erneutes Waschen mit 10 ml CH₂Cl₂, 10 ml DMF und 10 ml CH₂Cl₂ vorgequollen. Eine Lösung von 63.1 mg TBAF*3H₂O in 10 ml CH₂Cl₂ wird zugegeben und das Gemisch 1 h bei Raumtemp. geschüttelt. Man filtriert, wäscht das Harz dreimal mit je 10 ml CH₂Cl₂ und schüttelt die vereinigten organischen Phasen dreimal gegen je 20 ml H₂O. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der zurückbleibende Feststoff in einen Kolben überführt und anschließend lyophilisiert.

Man erhält 83 mg farblosen, amorphen, leicht mit TBAF verunreinigten Feststoff. Aufgrund der hohen Reinheit des Rohprodukts ist eine weitere Reinigung nicht nötig.

Ausb.: 70 mg (78%); farbloser amorpher Feststoff.

C₄₆H₆₃N₇O₁₀S [905.44] (906.10)

MALDI-TOF-MS (positiv, dhb), m/z: 928.8 ([M+Na]⁺, ber.: 928.4); 944.8 ([M+K]⁺, ber.: 944.5).

400 MHz ¹H-NMR (DMSO-d₆) (¹H, COSY), δ/ppm: 8.41 (d, 1H, H_{arom.}, J = 8.60 Hz); 8.35 (d, 1H, NH^L, J_{NH,Lα} = 7.84 Hz); 8.28 (d, 1H, H_{arom.}, J = 8.60 Hz); 8.11-8.09 (m, 2H, NH^A, H_{arom.}); 7.98-7.95 (m, 2H, NH^A, H_{arom.}); 7.80-7.76 (m, 2H, NH^L, NH^W); 7.61-7.50 (m, 3H, H_{arom.}); 7.38 (s, 1H, W^δ); 7.28-7.15 (m, 3H, H_{arom.}); 4.30-4.21 (m, 1H, W^α); 4.19-4.11 (m, 2H, L^α, A^α); 3.91-3.84 (m, 1H, A^α); 3.67-3.60 (m, 1H, L^α); 3.16-3.12 (m, 1H, W^{βa}); 3.03-2.99 (m, 1H, W^{βb}); 1.58 (s, 9H, CH₃-*t*Bu); 1.45-1.24 (5H, m, L^β, L^γ); 1.23-1.10 (d, 4H, A^β, J_{Aα,Aβ} = 7.04 Hz, L^{βa}); 0.95-0.88 (m, 3H, A^β); 0.79 (d, 3H, L^δ, J_{Lγ,Lδ} = 6.28 Hz); 0.74 (d, 3H, L^δ, J_{Lγ,Lδ} = 6.28 Hz); 0.62 (d, 3H, L^δ, J_{Lγ,Lδ} = 4.98 Hz); 0.34 (d, 3H, L^δ, J_{Lγ,Lδ} = 6.28 Hz).

100.6 MHz ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) (HMQC), δ /ppm: 123.70 (1C, W^δ); 54.40 (1C, L^a); 52.08 (1C, W^a); 51.19 (1C, L^a); 48.02, 47.86 (1C, A^a); 41.25, 40.94 (2C, L^b); 26.75 (1C, W^b); 24.11, 23.65 (2C, $2*L^c$); 23.06, 22.93, 21.31, 20.69 (4C, L^δ); 18.02, 17.82 (1C, A^b).

***N*-Dansyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-*tert*-butyl-L-aspartyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*N*-trityl-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-iso-leucyl-L-valyl-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-L-tryptophan 139**
Dansyl-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp(*Ot*Bu)-Ser(α -Ac₃GalNAc)-His(*Trt*)-Gly-Ala-Ile-Val-Trp(*Boc*)-OH**

In den Festphasenreaktor werden 425 mg (0.10 mmol) Fmoc-Trp(*Boc*)-PTMSEL-Tentagel-Harz **120** eingewogen. Die Kupplungen der ersten fünf Aminosäuren erfolgen nach dem Standardprotokoll (s. Kapitel 5.13.1). Zur Kupplung des Serin-Konjugats wird die automatisierte Festphasensynthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung an Histidin unterbrochen und das Harz mit einer kurz vorher angesetzten Lösung von 99 mg (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) Fmoc-Ser-(α -Ac₃GalNAc)-OH **13**, 25 mg HOAt (0.16 mmol), 61 mg (0.16 mmol) HATU und 36 μl (0.22 mmol) DIPEA in NMP versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 2 h geschüttelt, filtriert, mit NMP nachgewaschen und einem Cappingschritt unterzogen. Die Kupplungen der nächsten vier Aminosäuren erfolgen nach dem Standardverfahren. Das *N*-terminale Dansyl-Leucin-Derivat **49** wird unter Standardbedingungen mit 150 mg (0.41 mmol, 4.1 Äquiv.) des benötigten Bausteins angeknüpft. Nach dem finalen Cappingschritt wird mit NMP und CH_2Cl_2 gewaschen.

In einem Merrifield-Festphasenreaktor erfolgt die Abspaltung des Peptids vom Harz, das Harz durch dreimal mit je 10 ml CH_2Cl_2 vorgequollen und dann mit 63 mg TBAF*3H₂O in 10 ml CH_2Cl_2 versetzt wird. Es wird 1 h bei Raumtemp. geschüttelt. Man filtriert, wäscht das Harz dreimal mit je 10 ml CH_2Cl_2 und schüttelt die vereinigten organischen Phasen dreimal gegen je 20 ml H₂O. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der zurückbleibende Feststoff in einen Kolben überführt und anschließend lyophilisiert.

Man erhält 150 mg farblosen, amorphen Feststoff.

Ausb.: 150 mg (68%); farbloser amorpher Feststoff.

$\text{C}_{112}\text{H}_{149}\text{N}_{17}\text{O}_{28}\text{S}$ [2212.05] (2213.54)

MALDI-TOF-MS (positiv, dhb), m/z : 2180.0 ($[\text{M}-t\text{Bu}+\text{Na}]^+$, ber.: 2179.4).

charakteristische Signale (es werden dort die Integrale angegeben, wo alle Signale innerhalb des betrachteten Bereichs zugewiesen werden konnten):

400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) (^1H , COSY), δ/ppm : 8.40-7.70 (m, NH^{G} , NH^{W}); 7.69-7.50 (m, NH^{V}); 6.67 (sb, 1H, $\text{H}^{\delta 2}$); 5.28 (sb, 1H, H^4); 5.04-4.95 (m, 1H, H^3); 4.83-4.76 (m, 1H, H^1); 4.50-3.88 (m, W^{α} (4.41), D^{α} (4.38), H^{α} (4.37), A^{α} (4.30), H^2 (4.23), I^{α} (4.22), A^{α} (4.21), H^5 (4.19), A^{α} (4.16), L^{α} (4.15), V^{α} (4.12)); 3.75-3.07 (m, L^{α} (3.67), G^{α} (3.63), $\text{D}^{\beta\text{a}}$ (3.11), $\text{W}^{\beta\text{a}}$ (3.10)); 3.04-2.81 (m, $\text{W}^{\beta\text{b}}$ (2.98), $\text{D}^{\beta\text{b}}$ (2.97), $\text{H}^{\beta\text{a}}$ (2.87)); 2.80 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 2.70-2.63 (m, 1H, $\text{H}^{\beta\text{b}}$); 2.10 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$); 1.98-1.88 (sb, 4H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$, V^{β}); 1.85 (sb, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$); 1.80-1.70 (m, I^{β} , L^{γ}); 1.60-1.50 (s, 18H, $2^*\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$); 1.42-1.09 (m, L^{β} (1.39, 1.15), $\text{I}^{\gamma\text{a}}$ (1.37), A^{β} (1.17, 1.12, 1.09)); 1.00-0.65 (m, $\text{I}^{\gamma\text{b}}$ (0.96), L^{δ} (0.80, 0.75, 0.63), V^{γ} (0.74, 0.72), I^{δ} (0.71), I^{γ} (0.69)).

100.6 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) (HMQC), δ/ppm : 119.26 (1C, $\text{H}^{\delta 2}$); 97.69 (1C, C^1); 67.54 (1C, C^3); 67.03 (1C, C^4); 66.31 (1C, I^{α}); 66.12 (1C, C^5); 57.32 (1C, V^{α}); 54.28 (1C, L^{α}); 52.54 (1C, H^{α}); 52.51 (1C, D^{α}); 51.06 (1C, L^{α}); 47.93 (1C, C^2); 44.80 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 42.07 (1C, G^{α}); 41.31, 40.63 (2C, L^{β}); 35.86 (1C, I^{β}); 30.60 (1C, V^{β}); 30.49 (1C, H^{β}); 27.61 (6C, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$); 26.89 (1C, D^{β}); 26.79 (1C, W^{β}); 24.40 (1C, I^{γ}); 22.92, 22.84, 21.34 (4C, L^{δ}); 20.50 (4C, $\text{CH}_3\text{-Ac}$); 19.18, 17.84 (2C, V^{γ}); 18.17, 18.11, 17.62 (3C, A^{β}); 15.20 (1C, I^{γ}); 10.79 (1C, I^{δ}).

Die Substanz ist mit TBAF verunreinigt.

***N*-Dansyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-tryptophan 140**

Dansyl-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser(α -Ac₃GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-Trp-OH

Eine Mischung von 150 mg Dansyl-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp(*O**t*Bu)-S(T_N)-His(*Trt*)-Gly-Ala-Ile-Val-Trp(*Boc*)-OH **139**, 10 ml TFA, 0.25 ml H_2O und 0.25 ml TIS wird 4.5 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 10 ml Toluol versetzt, und die Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt. Man kodestilliert zweimal mit je 20 ml Toluol, nimmt den Rückstand in 3 ml MeOH auf und fällt das gewünschte Peptid durch Zugabe von 20 ml kaltem Diethylether aus. Man trennt die Lösungsmittel durch Zentrifugieren ab und wäscht mit 15 ml Diethylether, die

ebenfalls mittels Zentrifugieren entfernt werden. Nach dem Lyophilisieren erhält man 94 mg farblosen Feststoff.

Ausb.: 94 mg (52%); farbloser amorpher Feststoff.

$C_{84}H_{119}N_{17}O_{26}S$ [1813.82] (1815.01)

MALDI-TOF-MS (positiv, dhb), m/z: 1815.4 ($[M+H]^+$, ber.: 1814.8); 1837.3 ($[M+Na]^+$, ber.: 1836.8); 1853.4 ($[M+K+H]^+$, ber.: 1853.9); 1859.4 ($[M+2Na]^+$, ber.: 1859.8).

charakteristische Signale (es werden dort die Integrale angegeben, wo alle Signale innerhalb des betrachteten Bereichs zugewiesen werden konnten):

400 MHz 1H -NMR (DMSO- d_6) (1H , COSY), δ /ppm: 8.89 (m, $H^{\epsilon 1}$); 8.42 (d, 1H, $H_{arom.}$, $J = 8.60$ Hz); 8.35-7.90 (m, NH^G (8.28), NH^A (8.20, 8.05); NH^H (8.18); NH^W (8.16), NH^D (8.06), NH^S (8.03)); 7.85-7.71 (m, NH^A (7.83), NH^V (7.82), NH^I (7.77)); 7.38-7.29 (m, $H^{\delta 2}$); 7.05 (t, 1H, $H_{arom.}$, $J = 7.40$ Hz); 6.95 (t, 1H, $H_{arom.}$, $J = 7.40$ Hz); 5.27 (s_b , 1H, H_4); 4.94 (dd, 1H, H_3 , $J_{H_3,H_4} = 2.32$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 11.76$ Hz); 4.82 (d, 1H, H_1 , $J_{H_1,H_2} = 3.12$ Hz); 4.58-4.42 (m, W^α (4.56), D^α (4.52), H^α (4.49), S^α (4.46)); 4.40-4.30 (m, L^α (4.37), 2^*A^α (4.36)); 4.28-4.10 (m, L^α (4.23), I^α (4.22), H_2 (4.22), V^α (4.21), A^α (4.19), H_5 (4.16)); 4.08-4.00 (m, 1H, H_{6a}); 3.99-3.85 (m, 1H, H_{6b}); 3.79-3.30 (m, G^α (3.83, 3.68), S^β (3.73, 3.58), H^β (3.09, 3.03), W^β (3.08, 3.02)); 3.20-2.90 (m, 2H, D^β); 2.80 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 2.07 (s, 3H, CH_3 -Ac); 1.96 (s_b , 4H, CH_3 -Ac, V^β); 1.87, 1.81, 1.80 (3^*s , CH_3 -Ac); 1.75-1.67 (m, 1H, I^β); 1.59-1.50 (m, L^γ); 1.47-1.35 (m, 3H, L^β , $I^\beta a$); 1.31-1.23 (m, 2H, L^β); 1.20-1.10 (m, 9H, A^β); 1.05-0.99 (m, 1H, $I^\beta b$); 0.88-0.70 (m, 24H, V^γ , I^γ , I^δ , L^δ).

100.6 MHz ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) (HMQC), δ /ppm: 130.24 (1C, $H^{\epsilon 1}$); 117.24 (1C, $H^{\delta 2}$); 97.58 (1C, C1); 67.71 (1C, C3); 67.12 (1C, S^β); 67.06 (1C, C4); 66.19 (1C, C5); 61.55 (1C, C6); 57.16 (1C, V^α); 57.15 (1C, I^α); 54.30 (1C, L^α); 52.83 (1C, H^α); 52.67 (1C, S^α); 51.64 (1C, W^α); 50.89 (1C, L^α); 49.41 (1C, D^α); 48.04, 47.95, 46.87 (3C, A^α); 46.79 (1C, C2); 45.11 (2C, $N(CH_3)_2$); 41.81 (1C, G^α); 41.39 (1C, L^β); 40.63 (1C, L^β); 36.10 (1C, I^β); 35.86 (1C, D^β); 30.97 (1C, V^β); 27.17 (1C, W^β); 27.16 (1C, H^β); 24.42 (1C, I^γ); 24.01 (2C, L^γ); 21.49 (1C, I^γ); 21.39, 19.09 (2C, V^γ); 21.52, 21.38 (4C, L^δ); 18.44, 17.82 (3C, A^β); 10.93 (1C, I^δ).

Das Produkt ist mit TBAF verunreinigt.

***N*-Dansyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-tryptophan 141**

Dansyl-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser(α -GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-Trp-OH

In 15 ml MeOH werden 90 mg Dansyl-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser(α -Ac₃GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-Trp-OH **140** so lange mit frisch hergestellter NaOMe-Lsg. versetzt, bis ein pH Bereich von 8.5-9.0 erreicht ist. Der pH-Wert wird mehrfach kontrolliert und das Gemisch 14 h bei Raumtemp. gerührt. Durch Zugabe von *Amberlite*[®] *IR-120* (H-Form) und anschließendem fünfminütigen Rühren wird die Lösung neutralisiert. Man filtriert, entfernt das Lösungsmittel i. Vak. und erhält 63 mg farblosen Feststoff. Das Glycopeptid ist unlöslich in MeCN, H₂O und MeOH, kann jedoch aufgrund der geringen Menge an Deletionssequenzen analysiert werden.

Ausb.: 63 mg (38%); farbloser amorpher Feststoff.

C₇₈H₁₁₃N₁₇O₂₃S [1687.79] (1688.90)

MALDI-TOF-MS (positiv, dhb), m/z: 1689.1 ([M+H]⁺, ber.: 1688.8); 1711.3 ([M+Na]⁺, ber.: 1710.8); 1727.4 ([M+K]⁺, ber.: 1726.9).

400 MHz ¹H-NMR (DMSO-d₆) (¹H, COSY), δ /ppm: 8.46 (d, 1H, H_{arom.}, J = 8.60 Hz); 8.38-7.90 (m, 7H, H_{arom.} (8.33), NH^G (8.32), NH^W (8.20), NH^A (8.18, 8.07), NH^H (8.18), NH^S (8.00)); 7.85-7.71 (m, 3H, NH^A (7.84), NH^V (7.82), NH^I (7.79)); 7.58 (q, 1H, H_{arom.}, J = 8.20 Hz); 7.50 (d, 1H, H_{arom.}, J = 7.80 Hz); 7.34-7.22 (m, 1H, H_{arom.}); 7.12 (s, 1H, H_{arom.}); 7.04 (t, 1H, H_{arom.}, J = 7.40 Hz); 6.94 (t, 1H, H_{arom.}, J = 7.40 Hz); 4.62-3.35 (m, 20H, H1 (4.62), W ^{α} (4.56), H ^{α} (4.48), S ^{α} (4.42), A ^{α} (4.36, 4.22, 4.16), L ^{α} (4.26), I ^{α} (4.24), V ^{α} (4.20), H2 (4.04), G ^{α} (3.72), H4 (3.72), S ^{β} (3.65, 3.51), H5 (3.56), H3 (3.55), H6 (3.51, 3.43)); 3.20-2.90 (m, 4H, W ^{β} , D ^{β}); 2.83 (s, 6H, N(CH₃)₂); 1.94 (m, 1H, V ^{β}); 1.76-1.65 (m, 1H, I ^{β}); 1.59-1.49 (m, 6H, 2*L ^{γ}); 1.46-1.35 (m, 3H, L ^{β} , I ^{β} _a); 1.31-1.23 (m, 2H, L ^{β}); 1.19-1.09 (m, 9H, A ^{β}); 1.05-0.99 (m, 1H, I ^{γ} _b); 0.88-0.70 (m, 24H, V ^{γ} , I ^{γ} , I ^{δ} , L ^{δ}).

100.6 MHz ¹³C-NMR (DMSO-d₆) (HMQC), δ /ppm: 129.04, 128.61, 127.32, 123.27, 123.19, 120.61, 118.11, 117.76, 115.01, 111.14 (11C, C_{arom.}); 97.40 (1C, C1); 71.22 (1C, C5); 67.90 (1C, C4); 67.70 (1C, C3); 66.35 (1C, S ^{β}); 60.13 (1C, C6); 57.12 (1C, I ^{α}); 57.00 (1C, V ^{α}); 52.60 (1C, S ^{α}); 52.57 (1C, H ^{α}); 51.60 (1C, W ^{α}); 50.53 (2C, L ^{α}); 50.61 (1C, A ^{α}); 49.31 (1C, C2); 49.28, 47.70 (2C, A ^{α}); 45.20 (2C, N(CH₃)₂); 41.60 (1C, G ^{α}); 40.61 (2C, L ^{β}); 35.98 (1C,

I^{β}); 30.67 (1C, V^{β}); 26.84 (1C, W^{β}); 26.80 (1C, H^{β}); 24.21 (1C, I^{γ}); 23.91 (2C, L^{γ}); 22.81, 21.25 (4C, L^{δ}); 21.39 (1C, V^{γ}); 21.32 (1C, I^{γ}); 19.09 (1C, V^{γ}); 17.95 (3C, A^{β}); 10.78 (1C, I^{δ}).

Das Produkt ist leicht mit TBAF verunreinigt.

Dansyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-tryptophan 144

Dansyl-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser(β -Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-Trp-OH

In den Festphasenreaktor werden 227 mg (0.05 mmol) Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Harz eingewogen. Die Kupplungen der ersten fünf Aminosäuren erfolgen in Abwandlung des Standardprotokolls mit je 20 Äquiv. der jeweiligen Aminosäure (s. Kapitel 5.13.1). Zur Kupplung des Serin-Konjugats wird die automatisierte Festphasensynthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung an Histidin unterbrochen und das Harz mit einer frischen Lösung von 117 mg (0.25 mmol, 4.9 Äquiv.) Fmoc-Ser(β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α -Ac₂GalNAc)-OH **20**, 38 mg (0.25 mmol) HOAt, 100 mg (0.26 mmol) HATU und 45 μ l (0.27 mmol) DIPEA in NMP versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 5 h geschüttelt, filtriert, mit NMP nachgewaschen und einem Cappingsschritt unterzogen. Die Kupplungen der restlichen Aminosäuren erfolgen nach dem Standardverfahren, jedoch mit je 20 Äquiv. der benötigten Aminosäuren. Zur Kupplung des *N*-terminalen Dansyl-Leu-OH-Bausteins **49** werden 150 mg (0.41 mmol, 8 Äquiv.) eingesetzt. Nach Abschluss der Kupplung wird acetyliert und das Harz sowohl mit NMP als auch mit CH₂Cl₂ gewaschen.

Die Abspaltung des Peptids erfolgt in einem Merrifield-Festphasenreaktor durch Zugabe von 10 ml TFA, 0.9 ml H₂O und 0.9 ml TIS. Es wird 2 h geschüttelt (Orbitalshaking), filtriert und anschließend dreimal mit je 10 ml TFA nachgewaschen. Man engt den grössten Teil der überschüssigen Reagenzien ein, versetzt mit 30 ml kaltem Diethylether und trennt das Solvens durch Zentrifugieren ab. Der zurückbleibende Feststoff wird in einen Kolben überführt und lyophilisiert.

Man erhält 65 mg farblosen Feststoff.

C₉₆H₁₃₅N₁₇O₃₄S [2101.91] (2103.26)

MALDI-TOF-MS (positiv, dhb), m/z: 2104.2 ([M+H]⁺, ber.: 2104.2); 2125.5 ([M-H+Na]⁺, ber.: 2125.2); 2141.5 ([M-H+K]⁺, ber.: 2141.4); 2147.6 ([M-2H+2Na]⁺, ber.: 2147.2); 2163.6 ([M-2H+Na+K]⁺, ber.: 2163.3).

Nach der massenspektrometrischen Vermessung löst man das Glycopeptid **143** in 20 ml MeOH und versetzt so lange mit frisch hergestellter NaOMe-Lösung, bis ein pH-Wert von ca. 9.5 erreicht ist. Die Lösung wird bei diesem pH-Wert bei Raumtemp. 48 h gerührt. Die Neutralisierung erfolgt durch Zugabe einer geringen Menge AcOH. Das Lösungsmittel wird destillativ entfernt, und man erhält 58 mg farblosen Feststoff. Die Reinigung mittels präparativer HPLC ist aufgrund der nicht vorhandenen Löslichkeit in Lösungsmitteln ausser DMF und DMSO nicht möglich. Es konnte leider kein Massenspektrum erhalten werden.

$C_{84}H_{113}N_{17}O_{28}S$

[1849.84] (1851.04)

15-(5-Dimethylamino-naphthalin-1-sulfonylamino)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl) onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-tryptophan **146
Dansyl-Glycol₄-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser(α -Neu5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α -GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-Trp-OH**

In den Festphasenreaktor werden 227 mg (0.05 mmol) Fmoc-Trp(Boc)-Wang-Harz eingewogen. Die Kupplungen der ersten fünf Aminosäuren erfolgen in Abwandlung zum Standardprotokoll mit je 20 Äquiv. der jeweiligen Aminosäure (s. Kapitel 5.13.1). Zur Kupplung des Serin-Konjugats wird die automatisierte Festphasensynthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung an Histidin unterbrochen und das Harz mit einer frischen Lösung von 64 mg (0.06 mmol, 1.1 äquiv.) Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α -Ac₂GalNAc)-OH **32**, 10 mg (0.06 mmol) HOAt, 24 mg (0.06 mmol) HATU und 13 μ l (0.08 mmol) DIPEA in NMP versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 8 h geschüttelt, mit NMP nachgewaschen und einem Capping unterzogen. Die Kupplungen der restlichen Aminosäuren erfolgen nach dem Standardverfahren, jedoch mit je 20 Äquiv. der benötigten Aminosäure-Bausteine. Zur Kupplung des N-terminalen Dansyl-(Glycol)₄-Leu-OH-Bausteins **60** werden 245 mg (0.44 mmol, 8 Äquiv.) eingesetzt. Nach Abschluss der Kupplung wird acetyliert, filtriert und das Harz sowohl mit NMP als auch CH₂Cl₂ gewaschen.

Die Abspaltung des Peptids erfolgt in einem Merrifield-Festphasenreaktor durch Zugabe von 10 ml TFA, 0.9 ml H₂O und 0.9 ml TIS. Es wird 2 h geschüttelt (Orbitalshaking) und anschließend dreimal mit je 10 ml TFA nachgewaschen. Man engt den grössten Teil der überschüssigen Reagenzien ein, versetzt mit 30 ml kaltem Diethylether und trennt das

Solvens durch Zentrifugieren ab. Der zurückbleibende Feststoff wird in einen Kolben überführt und lyophilisiert.

Man erhält 63 mg farblosen Feststoff.

$C_{112}H_{165}N_{19}O_{42}S$ [2480.11] (2481.68)

Das Glycopeptid wird in 10 ml MeOH gelöst und die Lösung mehrmals evakuiert und mit Argon begast, bevor man eine Spatelspitze Pd/C (10%) zugibt. Der Kolben wird erneut zweimal mit Argon gespült. Anschließend ersetzt man die Argonatmosphäre durch Wasserstoff (Ballon mit H₂-Gas). Man hydriert 48 h, filtriert über einen Kartuschenfilter und versetzt so lange mit frisch hergestellter NaOMe-Lösung, bis ein pH-Bereich von 9.0-9.5 erreicht ist. Es wird 96 h deacetyliert. Man neutralisiert durch die Zugabe von wenig AcOH, entfernt das Lösungsmittel i. Vak. und lyophilisiert. Es werden 52 mg farbloser Feststoff erhalten. Der Versuch, das Produktgemisch mittels semipräp. HPLC (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 25-37(80 min)-37(100 min)) zu trennen, scheiterte. Trotz Einengens sämtlicher Fraktionen konnten nur 7 mg Peptid zurückgewonnen werden.

$C_{100}H_{153}N_{19}O_{36}S$ [2228.04] (2229.46)

MALDI-TOF-MS (negativ, dhb), m/z: 2226.9 ([M-H]⁻, ber.: 2227.0).

5.13.5 Versuche zu Kapitel 3.6.5

2-(7-{N-[1S,3R,4S,5R]-1,3,4,5-Tetrahydroxycyclohexanoyl-glycyl}-aminocumarin-4-yl)-essigsäureamid-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-tryptophan 148

Chi-Gly-Aca-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser(β-Gal-(1→3)-α-GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-Trp-OH

In den Festphasenreaktor werden 295 mg (0.07 mmol) Fmoc-Trp(Boc)-Tentagel-PHB-Harz eingewogen. Die Kupplungen der ersten fünf Aminosäuren erfolgen in Abwandlung zum Standardprotokoll mit je 15.4 Äquiv. der jeweiligen Aminosäure (1 mmol) (s. Kapitel 5.13.1). Zur Kupplung des Serin-Konjugats **20** wird die automatisierte Festphasensynthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung an Histidin unterbrochen und das Harz mit einer kurz vorher angesetzten Lösung von 151 mg (0.16 mmol, 2.5 äquiv.) Fmoc-Ser(β-Ac₄Gal-(1→3)-α-

Ac₂GalNAc)-OH **20**, 25 mg (0.16 mmol) HOAt, 61 mg (0.16 mmol) HATU und 18 µl NMM in NMP versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 5 h geschüttelt, filtriert, mit NMP nachgewaschen und einem Capping unterzogen. Die Kupplungen der restlichen Aminosäuren erfolgen nach dem Standardverfahren, jedoch mit je 20 Äquiv. der benötigten Aminosäuren. Zur Kupplung des *N*-terminalen Ac₄Chi-Gly-Aca-Leu-OH-Bausteins **78** werden 95 mg (0.13 mmol, 2 Äquiv.) Ac₄Chi-Gly-Aca-Leu-OH **78**, 20 mg (0.13 mmol) HOAt, 50 mg (0.13 mmol) HATU und 14 µl NMM, gelöst in 2 ml NMP, zugegeben, und es wurde 5 h geschüttelt. Nach Abschluss der Kupplung wird acetyliert, filtriert und das Harz sowohl mit NMP als auch mit CH₂Cl₂ gewaschen.

Die Abspaltung des Peptids erfolgt in einem Merrifield-Festphasenreaktor durch Zugabe von 10 ml TFA, 0.9 ml H₂O und 0.9 ml TIS. Es wird 2 h geschüttelt (Orbitalshaking), filtriert und anschließend dreimal mit je 10 ml TFA nachgewaschen. Man engt den grössten Teil der überschüssigen Reagenzien ein, versetzt mit 30 ml kaltem Diethylether und trennt das Solvens durch Zentrifugieren ab. Der zurückbleibende Feststoff wird in einen Kolben überführt und lyophilisiert.

Man erhält 80 mg farblosen Feststoff.

Ausb.: 80 mg (32%); farbloser amorpher Feststoff.

C₁₁₂H₁₅₂N₁₈O₄₅ [2469.02] (2470.50) +TFA: [2584.01] (2585.52)

ESI-MS (positiv), m/z: 2584.4 ([M+TFA]⁺, ber.: 2584.0).

Nach der massenspektrometrischen Vermessung löst man das Glycopeptid in 20 ml MeOH und versetzt so lange mit frisch hergestellter NaOMe-Lösung, bis ein pH-Wert von 9.0-9.5 erreicht ist. Es wird 24 h deacetyliert. Man neutralisiert durch Zugabe von wenig AcOH und entfernt das überschüssige Lösungsmittel im Vakuum. Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit schlug der Reinigungsversuch mittels präp. HPLC (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 25-70 (120 min)) fehl.

Ausb.: 60 mg; farbloser amorpher Feststoff.

C₉₂H₁₃₂N₁₈O₃₅ [2048.91] (2050.13)

ESI-MS (positiv), m/z: 2050.0 ([M+H]⁺, ber.: 2049.9).

2-(7-{*N*-[1*S*,3*R*,4*S*,5*R*]-1,3,4,5-Tetraacetoxy-cyclohexanoyl-glycyl}-aminocumarin-4-yl)-essigsäureamid-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-aspartyl-L-glycyl-L-prolyl-L-valin 150
Chi-Gly-Aca-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)- α -Ac₂GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-Asp-Gly-Pro-Val-OH

In den Festphasenreaktor werden 227 mg (0.05 mmol) Fmoc-Val-Tentagel-PHB-Harz eingewogen. Die Kupplungen der ersten acht Aminosäuren erfolgen in Abwandlung zum Standardprotokoll mit je 20 Äquiv. der jeweiligen Aminosäure (1 mmol) (s. Kapitel 5.13.1). Zur Kupplung des Serin-Konjugats **32** wird die automatisierte Festphasensynthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung an Histidin unterbrochen und das Harz mit einer frischen Lösung von 60 mg (0.05 mmol, 1.02 äquiv.) Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)- α -Ac₂GalNAc)-OH **32**, 8 mg (0.05 mmol) HOAt, 20 mg HATU (0.05 mmol) und 10.7 μ l DIPEA in NMP versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 6 h geschüttelt, filtriert, mit NMP nachgewaschen und einem Cappingschritt unterzogen. Die Kupplungen der restlichen Aminosäuren erfolgen nach dem Standardverfahren, jedoch mit je 20 Äquiv. der benötigten Aminosäuren. Zur Kupplung des *N*-terminalen Bausteins werden 73 mg (0.10 mmol, 2 Äquiv.) Ac₄Chi-Gly-Aca-Leu-OH **78**, 15 mg HOAt (0.10 mmol), 38 mg (0.10 mmol) HATU und 21 μ l DIPEA, gelöst in 2 ml NMP, zugegeben, und das Gemisch 6 h geschüttelt. Nach Abschluss der Kupplung wird acetyliert, filtriert und das Harz sowohl mit NMP als auch mit CH₂Cl₂ gewaschen.

Die Abspaltung des Peptids erfolgt in einem Merrifield-Festphasenreaktor durch Zugabe von 10 ml TFA, 0.9 ml H₂O und 0.9 ml TIS. Es wird 2 h geschüttelt (Orbitalshaking), filtriert und dreimal mit je 10 ml TFA nachgewaschen. Man engt den grössten Teil der überschüssigen Reagenzien ein, versetzt mit 30 ml kaltem Diethylether und trennt das Solvens nach Zentrifugieren ab. Der zurückbleibende Feststoff wird in einen Kolben überführt und lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt mittels präp. HPLC (LUNA C-18, Gradient (%MeOH+0.1TFA): 40-90(90 min)).

Ausb.: 15 mg (10%); farbloser amorpher Feststoff; R_t = 22.0 min (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA) 10-100 (40 min)).

C₁₂₉H₁₇₉N₂₁O₅₃ [2870.20] (2871.91)

ESI-MS (positiv), m/z: 1447.8 ([M+Na+H]⁺⁺/2, ber.: 1448.0).

charakteristische Signale (es werden dort die Integrale angegeben, wo alle Signale innerhalb des betrachteten Bereichs zugewiesen werden konnten):

400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) (^1H , COSY), δ/ppm : 8.83 (m, 1H, $\text{H}^{\epsilon 1}$); 7.89-7.78 (m, 1H, H8-Cu); 7.77-7.74 (m, 1H, H5-Cu); 7.63-7.58 (m, 1H, H6-Cu); 7.50-7.38 (m, 6H, $\text{H}^{\delta 2}$, $\text{H}_{\text{arom.}}-\text{Bn}$); 6.40 (s, 1H, H3-Cu); 5.63-5.61 (m, 1H, H3-Chi); 5.53-5.48 (m, 1H, H5-Chi); 5.44-5.35 (m, 2H, $\text{H}7''$ (5.41), $\text{H}8''$ (5.37)); 5.33-5.27 (m, H4 (5.31), $\text{H}9''\text{a}$ (5.28)); 5.26-5.22 (m, 1H, $\text{H}9''\text{b}$); 5.18-5.09 (m, 2H, H3 (5.15), H4-Chi (5.11)); 4.90-4.80 (m, $\text{H}4''$ (4.83), D^α (4.82)); 4.72-4.60 (m, D^α (4.65), H^α (4.64), P^α (4.58)); 4.47-3.92 (m, A^α (4.42, 4.24, 4.18), V^α (4.31, 4.22), G^α (4.17, 4.01, 3.97)); 3.70-3.60 (m, P^δ); 3.50-3.40 (m, H^βa); 3.31-3.20 (m, H^βb); 3.10-2.88 (m, D^βa (2.99, 2.90, 2.80)); 2.84-2.75 (m, 2H, D^βb , H2a-Chi); 2.59-2.55 (m, 1H, H2b-Chi); 2.29 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$); 2.24-1.58 (m, $\text{CH}_3\text{-Ac}$, P^β (2.22, 2.06), V^β (2.20, 2.12), P^γ (2.02), I^β (1.90), I^γa (1.61)); 1.45-1.38 (m, 9H, A^β); 1.36-1.14 (m, L^γ (1.30, 1.22, 1.16), I^γb (1.22)); 1.08-0.90 (m, 30H, L^δ (1.04, 1.00, 0.94, 0.94), V^γ (1.01, 0.97, 0.95), I^γ (0.94), I^δ (0.90)).

100.6 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) (HMQC), δ/ppm : 73.33 (1C, C4-Chi); 70.81 (1C, C4''); 69.73 (1C, C3); 69.48 (1C, C3-Chi); 69.43 (1C, C7''); 69.12 (1C, C9''); 68.66 (1C, C4); 68.41 (1C, C8''); 67.91 (1C, C5-Chi); 61.42 (1C, P^α); 60.38, 59.09 (2C, V^α); 54.95, 54.83, 50.82 (3C, A^α); 59.73, 52.66 (3C, L^α); 59.41 (1C, I^α); 52.63 (1C, H^α); 52.58, 51.33 (2C, D^α); 47.71 (1C, P^δ); 44.41, 43.02 (2C, G^α); 40.84 (3C, L^β); 37.75 (1C, I^β); 36.71 (1C, D^β); 36.69 (1C, C2-Chi); 36.22 (1C, D^β); 31.96 (1C, C6-Chi); 31.87, 31.67 (2C, V^β); 30.63 (1C, P^β); 27.71 (1C, H^β); 27.46 (3C, L^γ); 26.23 (1C, I^γ); 25.61 (1C, P^γ); 23.37, 23.17, 22.30, 22.02 (4C, L^δ); 19.91, 19.64, 18.81, 18.56 (4C, V^γ); 18.26-17.04 (3C, A^β); 16.01 (1C, I^γ); 11.31 (1C, I^δ).

2-(7-{*N*-[1*S*,3*R*,4*S*,5*R*]-1,3,4,5-Tetraacetyloxycyclohexanoyl-glycyl}-aminocumarin-4-yl)-essigsäureamid-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-aspartyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-histidyl-L-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-aspartyl-L-glycyl-L-prolyl-L-valin 151

Chi-Gly-Aca-Leu-Ala-Ala-Leu-Asp-Ser(α -Neu5NAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α -GalNAc)-His-Gly-Ala-Ile-Val-Asp-Gly-Pro-Val-OH

In 15 ml absol. MeOH werden 15 mg ($5.23 \cdot 10^{-6}$ mol) **150** so lange mit frisch hergestellter NaOMe-Lsg. versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5 erreicht ist. Man rührt 48 h bei

Raumtemperatur, neutralisiert durch Zugabe eines Tropfens AcOH und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Rohprodukt wird i. Hochvak. getrocknet. Anschließend nimmt man in Wasser auf und versetzt mit 0.1N NaOH-Lösung, bis ein pH-Wert von 10.0 erreicht ist, und rührt 24 h bei Raumtemperatur. Nach vollständiger Deacetylierung und Debenzylierung wird durch Zugabe von AcOH neutralisiert und lyophilisiert.

Die Verbindung wird mittels präp. HPLC gereinigt ((%CH₃CN+0.1%TFA) 10-50 (120 min)).
Ausb.: 5 mg (4 %); R_t = 11.20 min (LUNA C-18, ((%CH₃CN+0.1%TFA) 10-50 (40 min));
[α]_D²² = -12.1 (c = 0.3, H₂O).

C₁₀₂H₁₅₃N₂₁O₄₃ [2360.04] (2361.42)

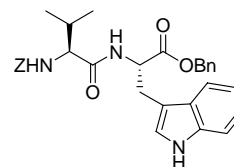
MALDI-TOF-MS (positiv), m/z: 2363.6 ([M]⁺, ber.: 2360.0); 2385.5 ([M+Na]⁺, ber.: 2383.0).

5.14 Versuche zu Kapitel 3.7.1

N-Benzyloxycarbonyl-L-valyl-L-tryptophanbenzylester **154**

Z-Val-Trp-OBn

In 100 ml MeCN werden 1.10 g (4.38 mmol) *Z*-Val-OH **152** und 0.97 g (3.29 mmol) H₂N-Trp-OBn **153** gelöst, mit 0.72 ml (5.10 mmol, 1.16 Äquiv.) NEt₃ sowie 1.77 g (3.33 mmol, 1.01 äquiv) PyBop versetzt und 3 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels Flashchromatographie an 80 g Kieselgel (Laufmittel: CH/EE 2:1) gereinigt.



Ausb.: 1.73 g (quant.); farbloser amorpher Feststoff.

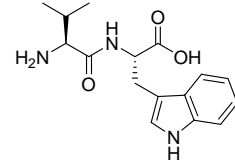
C₃₁H₃₃N₃O₅ [527.24]

ESI-MS (positiv), m/z: 550.3 ([M+Na]⁺, ber.: 550.2).

300 MHz ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ /ppm: 10.88 (s, 1H, NH^{e1}); 8.43 (d, 1H, NH^w, J = 6.96 Hz); 7.47 (d, 1H, NH^v); 7.35-6.94 (m, 15H, 2*H_{arom.}-Bn, H_{arom.}-W); 5.03-4.94 (m, 4H, 2*CH₂-Bn); 4.59-4.52 (m, 1H, W ^{α}); 3.93 (m, 1H, V ^{α}); 3.20-3.04 (m, 2H, W ^{β}); 1.92-1.87 (m, 1H, V ^{β}); 0.78 (t, 6H, V ^{γ} , J = 14.70 Hz).

L-Valyl-L-tryptophan 155

Man löst 1.71 g (3.29 mmol) Z-Val-Trp-OBn **154** in 30 ml MeOH/THF (4:1), ent- und begast mehrfach mit Argon, gibt 160 mg Pd/C (10%) zu, ent- und begast erneut mit Argon und ersetzt die Argonatmosphäre durch eine H₂-Atmosphäre. Es wird 3.5 h bei Raumtemp. gerührt, über *Hyflo*[®] filtriert, die Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt und das Rohprodukt lyophilisiert.



Ausb.: 833 mg (83%); farbloser amorpher Feststoff; R_t = 14.0 min (LUNA C-18, Gradient (%CH₃CN+0.1%TFA): 5-100 (60 min)); $[\alpha]_D^{22} = -18.0$ (c = 1, H₂O).

C₁₆H₂₁N₃O₃ [303.16]

ESI-MS (positiv), m/z: 304.2 ([M+H]⁺, ber.: 304.2); 326.1 ([M+Na]⁺, ber.: 326.1).

300 MHz ¹H-NMR (D₂O), δ/ppm: 7.66 (d, 1H, W^{ε3}, J = 8.10 Hz); 7.43 (d, 1H, W^{ξ2}, J = 8.07 Hz); 7.21-7.08 (m, 3H, W^{δ1}, W^{ξ3}, W^{η2}); 4.56-4.51 (m, 1H, V^α); 3.34-3.27 (m, 1H, W^{βa}); 3.17-3.09 (m, 1H, W^{βb}); 2.12-2.05 (m, 1H, V^β); 0.90-0.87 (m, 6H, V^γ).

75.5 MHz ¹³C-NMR (D₂O), δ/ppm: 177.69 (1C, CO^W); 168.33 (1C, CO^V); 135.86 (1C, W⁸); 126.81 (1C, W⁹); 124.09 (1C, W²); 121.61, 118.97, 118.36 (3C, W⁴, W⁵, W⁶); 111.62 (1C, W⁷); 110.07 (1C, W³); 58.41 (1C, V^α); 56.00 (1C, W^α); 29.71 (1C, V^β); 27.18 (1C, W^β); 17.42, 16.31 (2C, V^γ).

6 Literaturverzeichnis

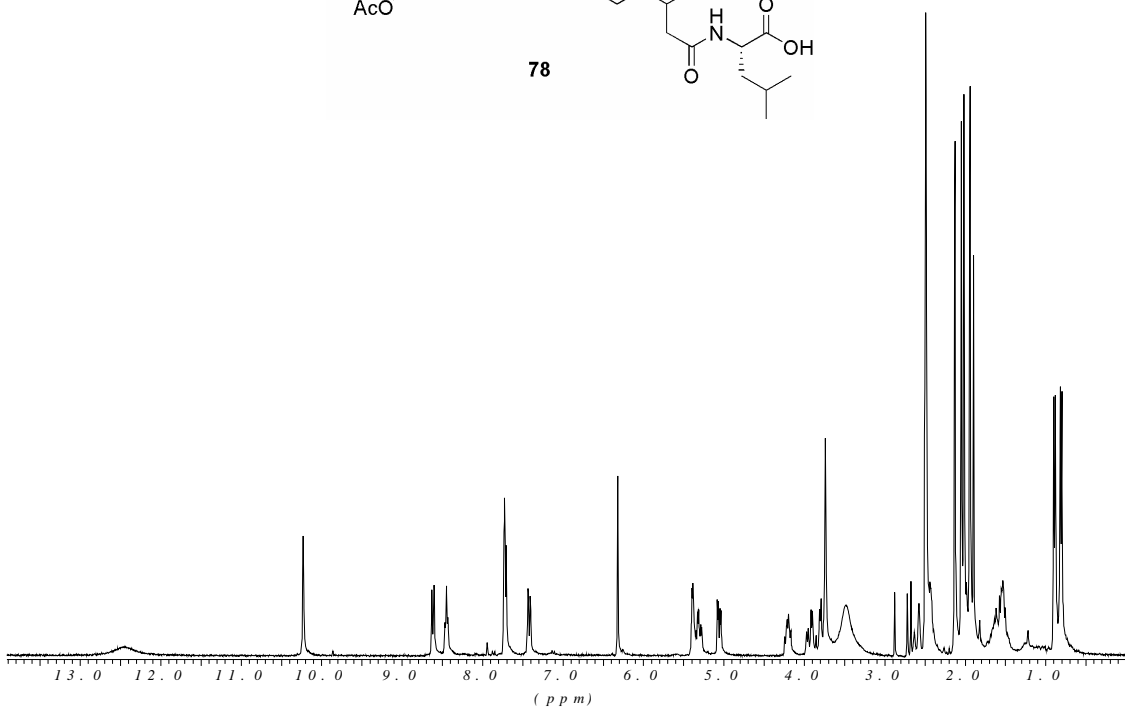
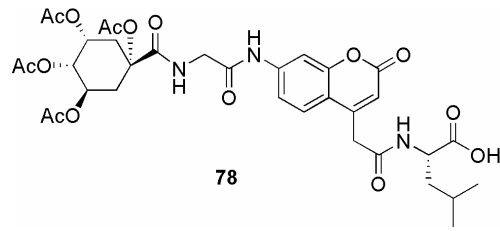
- ¹ <http://www.bio.uni-frankfurt.de/humagen/cadherin.htm>.
- ² M. Ozawa, J. Engel, R. Kemler, *Cell* **1990**, 63, 1033-1038.
- ³ B. Rantsch, M. T. Dours-Zimmermann, *Neuron* **1991**, 7, 391-402.
- ⁴ M. Takeichi, *Science* **1991**, 251, 1451-1455.
- ⁵ H. McNeill, M. Ozawa, R. Kemler, W. J. Nelson, *Cell* **1990**, 62, 309-316.
- ⁶ B. Angres, A. Barth, W. J. Nelson, *J. Cell Biol.* **1996**, 134, 549-557.
- ⁷ W. Birchmeier, J. Behrens, *Biochem. Biophys. Acta* **1994**, 1198, 11-26.
- ⁸ a) A. H. Dantzig, J. Danzig, L. B. Tabas, S. Bright, R. L. Shepard, I. L. Jenkins, D. C. Duckworth, J. R. Sportsman, D. Mackensen, P. R. Jr. Rosteck, P. L. Skatrud, *Science* **1994**, 264, 430-433. b) R. B. Thomson, P. Igarashi, D. Biemesderfer, R. Kim, A. Abu-Alfa, M. Soleimani, P. S. Aronson, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 17594-17601.
- ⁹ R. Gessner, R. Tauber, *Ann NY Acad. Sci.* **2000**, 915, 136-143.
- ¹⁰ D. Berndorff, R. Gessner, B. Kreft N. Schoy, A. M. Lajous-Petter, N. Loch, W. Reutter, M. Hortsch, R. Tauber, *J. Cell Biol.* **1994**, 125, 1353-1369.
- ¹¹ K. Sano, H. Tanihara, R. L. Heimark, S. Obata, M. Davidson, T. St. John, S. Taketani, S. Suzuki, *EMBO J.* **1993**, 12, 2249-2256.
- ¹² B. Angres, L. Kim, R. Jung, R. Gessner, R. Tauber, *Developmental Dynamics* **2001**, 221, 182-193.
- ¹³ D. G. Silberg, G. P. Swain, E. R. Suh, P. G. Traber, *Gastroenterology* **2000**, 119, 961-971.
- ¹⁴ T. Hinoi, P. C. Lucas, R. Kuick, S. Hanash, K. R. Cho, E. R. Fearon, *Gastroenterology* **2002**, 123, 1565-1577.
- ¹⁵ C. Götzinger, J. Kneifel, D. Patschan, N. Schoy, I. Anagnostopoulos, S. Faiss, R. Tauber, B. Wiedenmann, R. Geßner, *Gut* **2001**, 49, 73-81.
- ¹⁶ M. Takamura, M. Sakamoto, Y. Ino, T. Shimamura, T. Ichida, S. Hirohashi, *Cancer Sci.* **2003**, 94, 425-430.
- ¹⁷ M. Elb, *Dissertation*, Tübingen 2004.
- ¹⁸ J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2. Aufl., Kuwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**.
- ¹⁹ [http://www1.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/4a0f132842ea4d354a25685d0011fa04/6bf1b5bb2f83f4f2c1256ea8002bd91c/\\$FILE/Fluorescence.pdf](http://www1.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/4a0f132842ea4d354a25685d0011fa04/6bf1b5bb2f83f4f2c1256ea8002bd91c/$FILE/Fluorescence.pdf)
- ²⁰ T. Förster, *Ann. Phys. Leipzig* **2** **1948**, 55-75.
- ²¹ B. W. Van der Meer, et al., *Resonance Energy Transfer. Theory and Data*, Wiley-VCH,

- Weinheim, **1994**, 133-168.
- ²² B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, Wiley-VCH Weinheim **1999**.
- ²³ I. Brockhausen, H. Schachter, J. F. G. Vliegthart (Hrsg.), *Glycoproteins*, Elsevier, Amsterdam **1995**, 201.
- ²⁴ J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, 6, 355-364.
- ²⁵ a) S. Hakomori, *Cancer Res.* **1985**, 45, 2405-2414. b) I. Brockhausen, J. Yang, N. Dickinson, S. Ogata, S. H. Itzkowitz, *Glycoconj. J.* **1998**, 15, 595-603.
- ²⁶ S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. M. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigee, Y. S. Kirn, *Cancer Res.* **1989**, 49, 197-204.
- ²⁷ B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 629-631.
- ²⁸ A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 976-982.
- ²⁹ H. Kunz in „Preparative Carbohydrate Chemistry“, Hrsg. S. Hanessian, Marcel Dekker Pub., New York **1997**, S. 265-281.
- ³⁰ A.P. Kozikowski, J. Lee, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 863-870 ; J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, 13, 129-132.
- ³¹ a) R. U. Limieux, R. M. Ratcliffe, Deutsche Patentanmeldung **1978**, AZ :P 2816340.8; b) R. U. Limieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244-1257.
- ³² M. Liu, V. G. Young Jr., S. Lohani, D. Live, G. Barany, *Carb. Res.* **2005**, 340, 1273-1285.
- ³³ H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydrat Res.* **1982**, 109, 89.
- ³⁴ a) H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 354-355. b) B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8777-8778. c) B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1473-1482.
- ³⁵ E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 985-993.
- ³⁶ In Analogie zu S. Keil, *Dissertation*, Universität Mainz **2000**.
- ³⁷ G. Zemplén, A. Kunz, *Chem. Ber.* **1923**, 56, 1705-1710.
- ³⁸ L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5748-5749.
- ³⁹ M. Kloostermann, T. Slaghek, J. P. Hermans, J. H. v. Boom, J. R. Neth, *Chem Soc.* **1984**, 103, 335.
- ⁴⁰ S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 880-885.
- ⁴¹ B. Helferich, F. Wedemeyer, *Liebigs Ann. Chem.* **1949**, 563, 139-145.

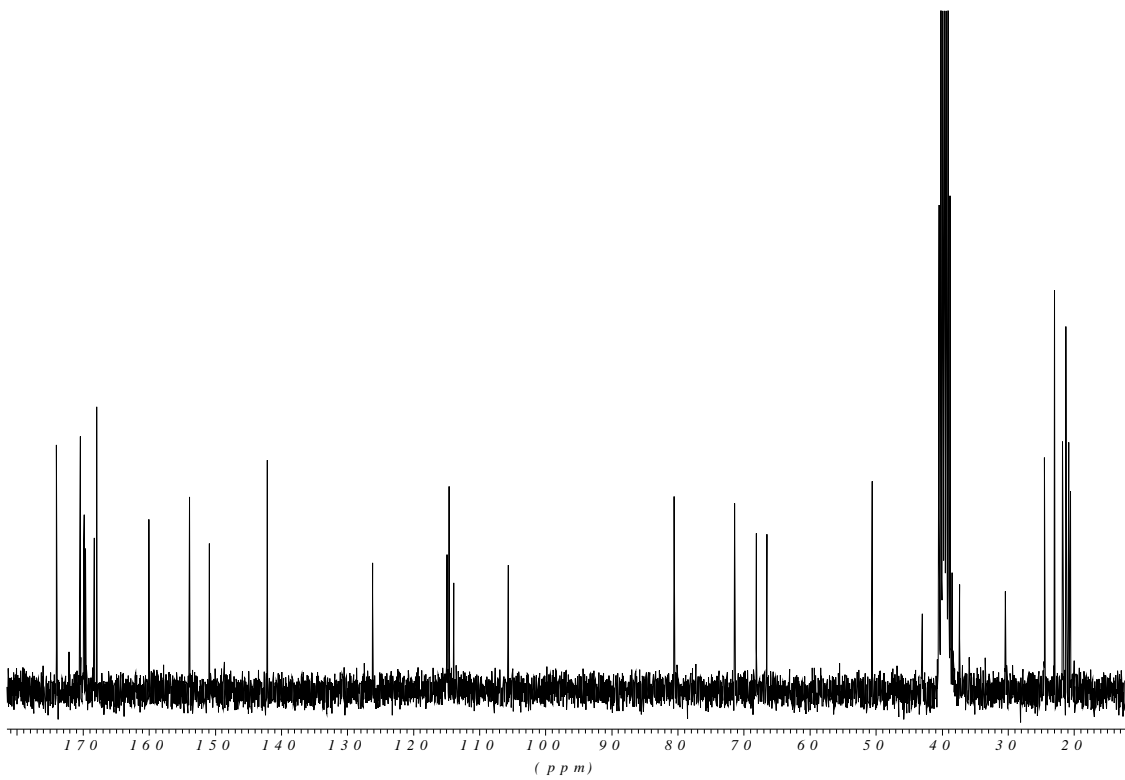
- ⁴² T. Reipen, H. Kunz, *Synthesis* **2003**, 2487-2502.
- ⁴³ M. Smith, D. H. Rammler, I. H. Goldberg, H.G. Khordua, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 430-440.
- ⁴⁴ a) N. Bèzay, *Dissertation*, Universität Mainz, **2000**. b) K. Toshima, S. Murkaiyama, T. Yoshida, T. Tamai, K. Tatsuta, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6155-6158.
- ⁴⁵ A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1990**, 303-308.
- ⁴⁶ T. J. Martin, R. Brescello, A. Toepfer, R. R. Schmidt, *Glycoconjugate J.* **1993**, 10, 16-25.
- ⁴⁷ A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, 187, 35-42.
- ⁴⁸ a) A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, K. Hotta, H. Ishida, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, 10, 493-498. b) R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, 694-696. c) Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. Hervé du Penhoat, J.-M. Mallet, V. Michon, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1993**, 246, 23-41.
- ⁴⁹ S. K. Bhattacharya, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 144-151.
- ⁵⁰ a) R. Kuhn, P. Lutz, D.L. MacDonald, *Chem. Ber.* **1966**, 99, 611-617. b) R. Martin, K. L. Witte, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1283-1293.
- ⁵¹ A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, 190, 317-322.
- ⁵² F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, 177, C13.
- ⁵³ P. J. Garegg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1997**, 52, 179-205.
- ⁵⁴ a) H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, 125, 47-64. b) K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5229 & 5233.
- ⁵⁵ C. Brocke, *Dissertation*, Universität Mainz **2002**.
- ⁵⁶ a) O. T. Schmidt in *Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol II* (Hrsg.: R. L. Whister, M. L. Wolfrom, J. N. BeMiller), Academic Press Inc., New York, London, **1963**, 318. b) X. Pannecouke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, 50, 6569-6578.
- ⁵⁷ B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 556-557.
- ⁵⁸ M. Lergenmüller, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron* **1998**, 1381-1394.
- ⁵⁹ G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 8, 602-615.
- ⁶⁰ S. Heiner, *Diplomarbeit*, Universität Mainz **2002**.
- ⁶¹ O. Seitz, *Dissertation*, Universität Mainz **1995**.
- ⁶² Organikum 20. Auflage, S. 703.
- ⁶³ W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798.
- ⁶⁴ *The Handbook A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10th Edition, Molecular Probes, S. 26-30.
- ⁶⁵ a) E. Amir, E. Haas, *Biochemistry* **1988**, 27, 8889-8893. b) W.-C. Sun, K. R. Gee, R. P.

- Haugland, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3107-3110. c) W. Kudlicki, O. W. Odom, G. Kramer, B. Hardesty, *Biol. Chem.* **1996**, 271, 31160-31165.
- ⁶⁶ a) L. Pochet, C. Doucet, M. Schynts, N. Thierry, N. Boggeto, B. Pirotte, K. Y. Liang, B. Masereel, P. Tulio, J. Delarge and M. R. Ravaux, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 2579-2585. b) J. W. Harper and J. C. Powers, *Biochemistry* **1985**, 24, 7200-7213.
- ⁶⁷ U. Thull and B. Testa, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 2307-2310.
- ⁶⁸ a) A. Mazumder, S. Wang, N. Neamati, M. Nicklaus, S. Sunder, J. Chen, G. W. Milne, W. G. Rice, T. R. Burke, Y. Pommier, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 2472-2481. b) E. A. Lunney, S. E. Hagen, J. M. Domagala, C. Humblet, J. Kosinski, B. D. Tait, J. S. Warmus, M. Wilson, D. Ferguson, D. Hupe, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2664-2677. c) S. Thaisrivongs, M. N. Janakiraman, K. T. Chong, P. K. Tomich, L. A. Dolak, S. R. Turner, J. W. Strobbach, J. C. Lynn, M. M. Horng, R. R. Hinshaw, K. D. Watenpaugh, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 2400-2410.
- ⁶⁹ D. J. Maly, F. Leonetti, B. J. Backes, D. S. Daubner, J. L. Harris, C. S. Craik, J. A. Ellmann, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 910-915.
- ⁷⁰ H. V. Pechmann, C. Duisberg, *Dtsch. Chem. Ber.*, 1883, 16, 2219-2228.
- ⁷¹ L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201-203.
- ⁷² C. Grandjean, C. Rommens, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1999**, 20, 2967-2976.
- ⁷³ V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 1269-1272.
- ⁷⁴ W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798.
- ⁷⁵ R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927-1930.
- ⁷⁶ J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205-208.
- ⁷⁷ K. D. Kopple, D. E. Nitecki, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 4457-4464.
- ⁷⁸ a) A. R. Katritzky, H.-Y. He, K. Suzuki, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8210-8213; b) A. R. Katritzky, *ARKIVOC* **2002** (VIII), 134-142.
- ⁷⁹ J. Budka et al., *Tetrahedron* **2000**, 56, 1883-1887.
- ⁸⁰ F. A. H. Rice, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 3173-3175.
- ⁸¹ W.-Y. Leung, P. A. Trobridge, R. P. Haugland, R. P. Haugland, F. Mao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 15, 2229-2232.
- ⁸² a) E. Fischer, E. Otto, *Chem. Ber.* **1903**, 36, 2106-2116. b) M. R. Vernsten, M. B. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 1320-1321.

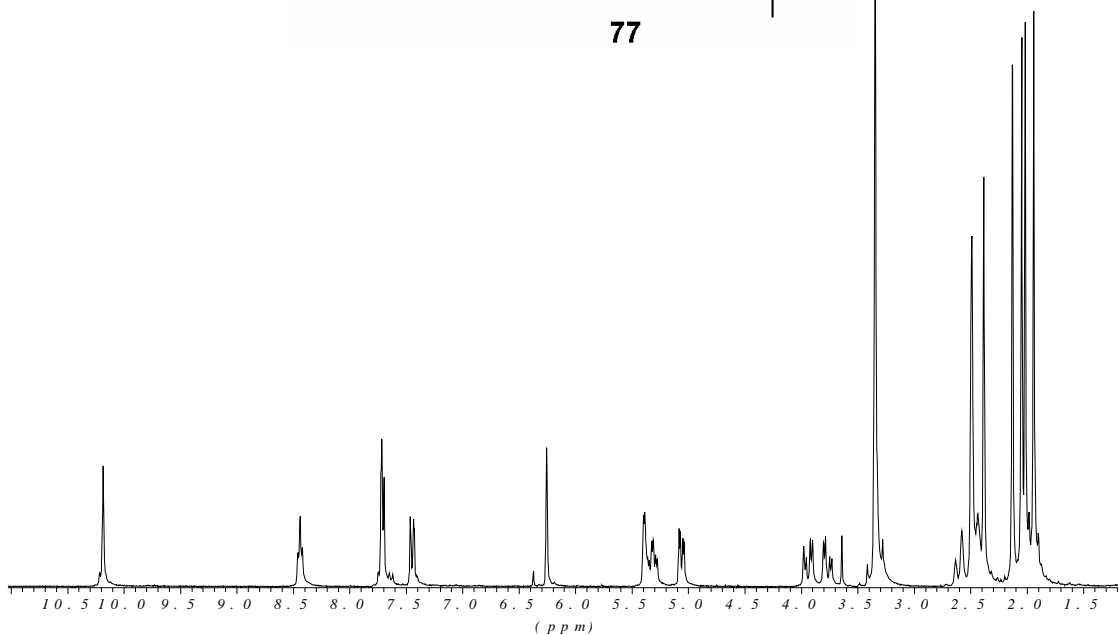
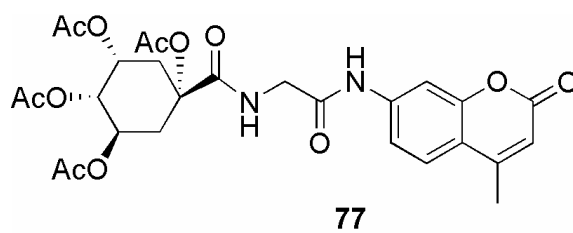
- ⁸³ a) M. Wagner, *Dissertation*, Universität Mainz **2002**. b) M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 315-319.
- ⁸⁴ a) D. G. Mullen, G. J. Barany, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 5240-5248. b) R. Ramage, C. A. Barron, S. Bielecki, D. W. Thomas, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 4105-4108. c) H.-G. Chao, M. S. Bernatowicz, P. D. Reiss, C. E. Klimas, G. R. Matsueda, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1746-1752.
- ⁸⁵ a) M. Bazant, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1959**, 24, 3758. b) Wilt, Kolewe, Kraemer, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 2624-2631.
- ⁸⁶ F. Hayakawa, S. Watanabe, N. Shimizu, Y. Tsuno, *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1993**, 66, 153-157.
- ⁸⁷ M. Honda, H. Morita, I. Nagakura, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 8932-8936.
- ⁸⁸ a) W. Rapp et al. In "Peptides 1988, Proc. 20st European Peptide Symposium", G. Jung & E. Bayer (Eds.), Walter de Gruyter, Berlin, **1989**, pp.199. b) E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 113-129.
- ⁸⁹ *Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Chemistry* **1998**, 330.
- ⁹⁰ S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 1328-1333.
- ⁹¹ B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* **1985**, 41, 1939-1943.
- ⁹² a) K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**. b) H. Kessler, S. Seip, in *Two-Dimensional NMR-Spectroscopy*, 2nd ed. (Eds.: W. R. Croasmun, R. M. Carlson), VCH, Weinheim. c) J. Rizzo, M. D. Bruch, in *NMR-Spectroscopy Techniques*, 2nd ed. (Ed.: M. D. Bruch).
- ⁹³ Axel Kuhn, *Dissertation*, Universität Mainz, **2005**.
- ⁹⁴ E. M. Stocking et al., *Tetrahedron* **2001**, 57, 5303-5320.
- ⁹⁵ J. Martinez et al., *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1874-1879.
- ⁹⁶ H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 751-769.
- ⁹⁷ H. Paulsen, W. Rauwald, U. Weichert, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 75-86.



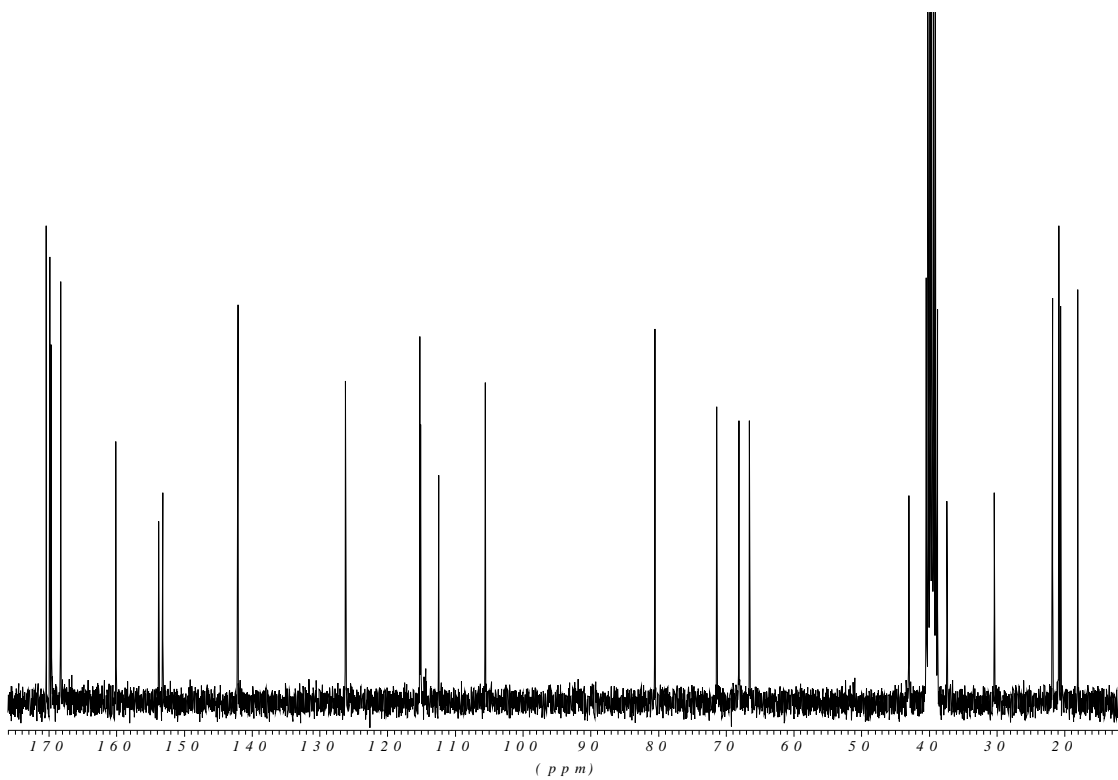
^1H (300 MHz,)



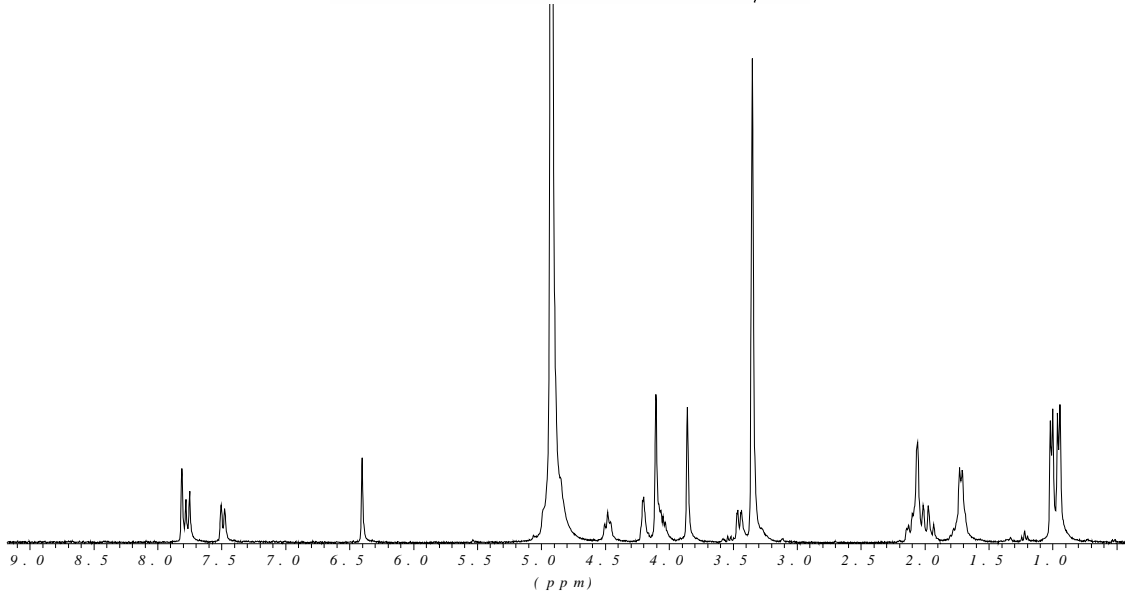
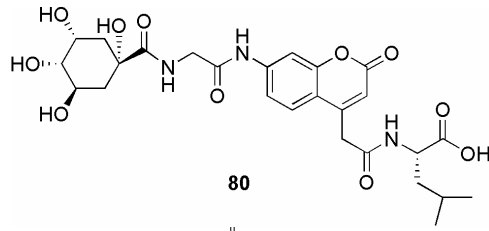
^{13}C (300 MHz,)



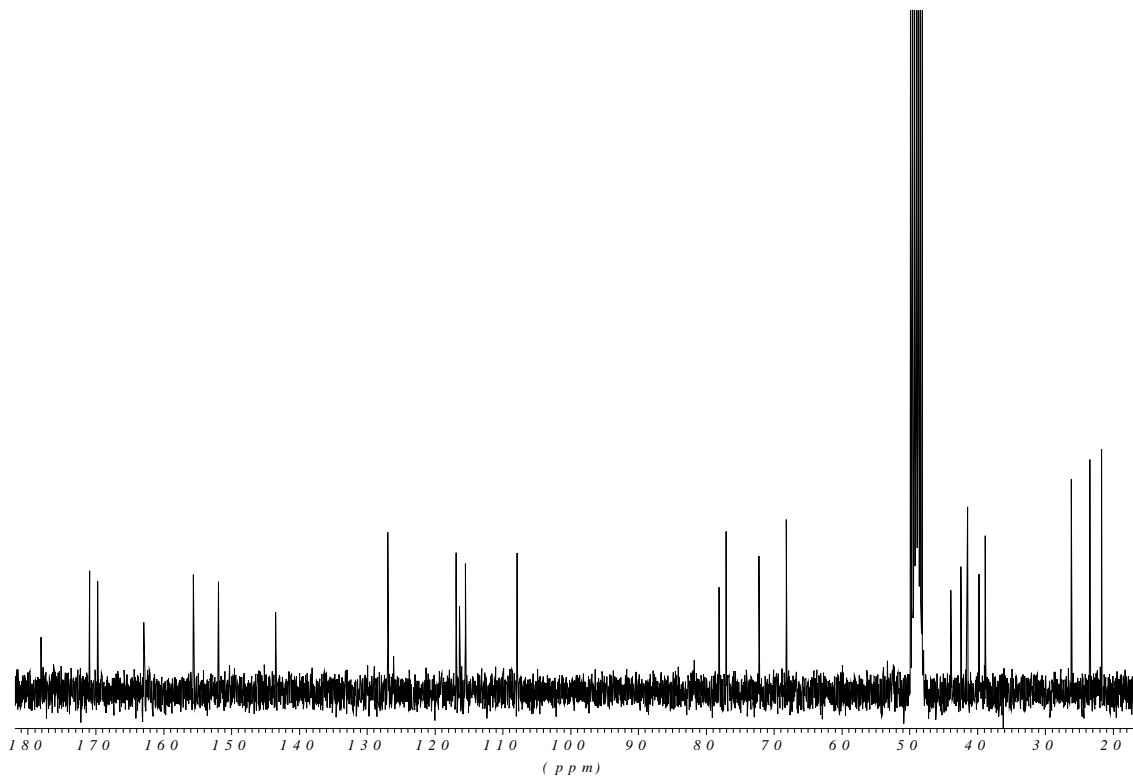
^1H (300 MHz,)



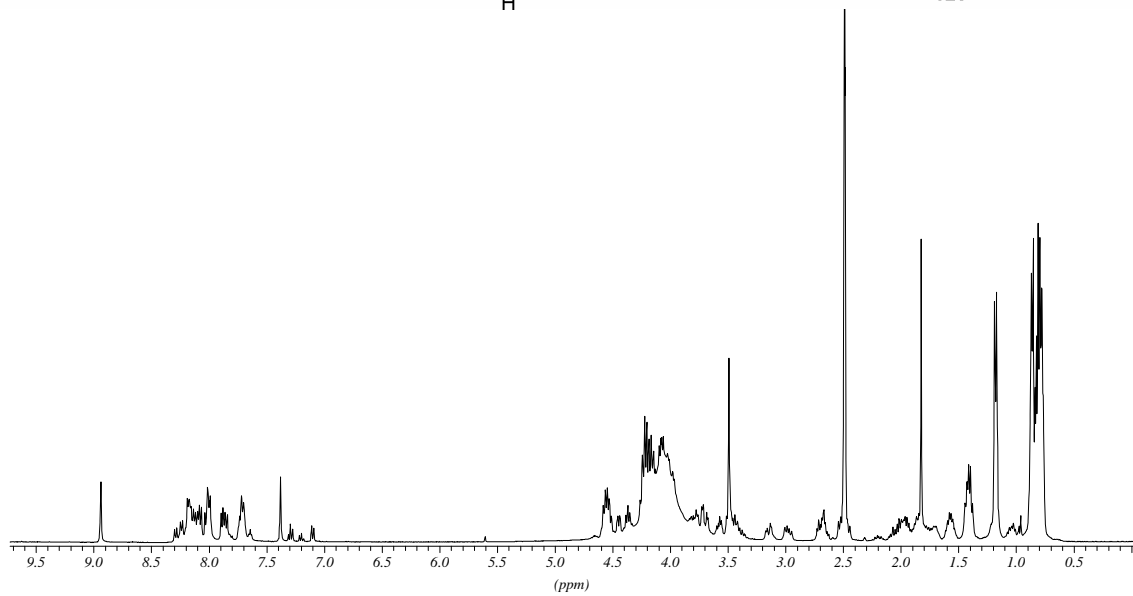
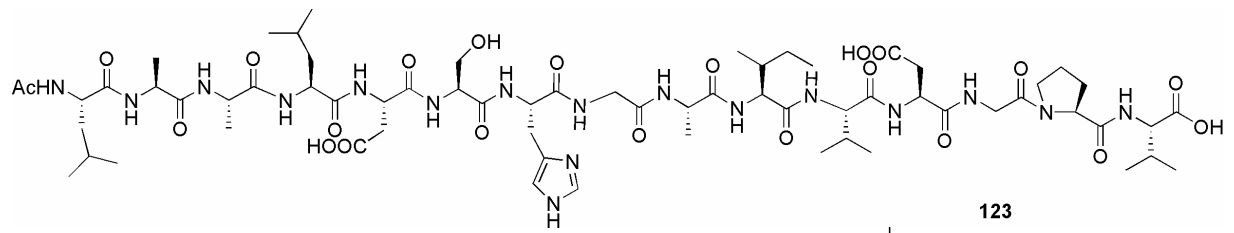
^{13}C (75.5 MHz,)



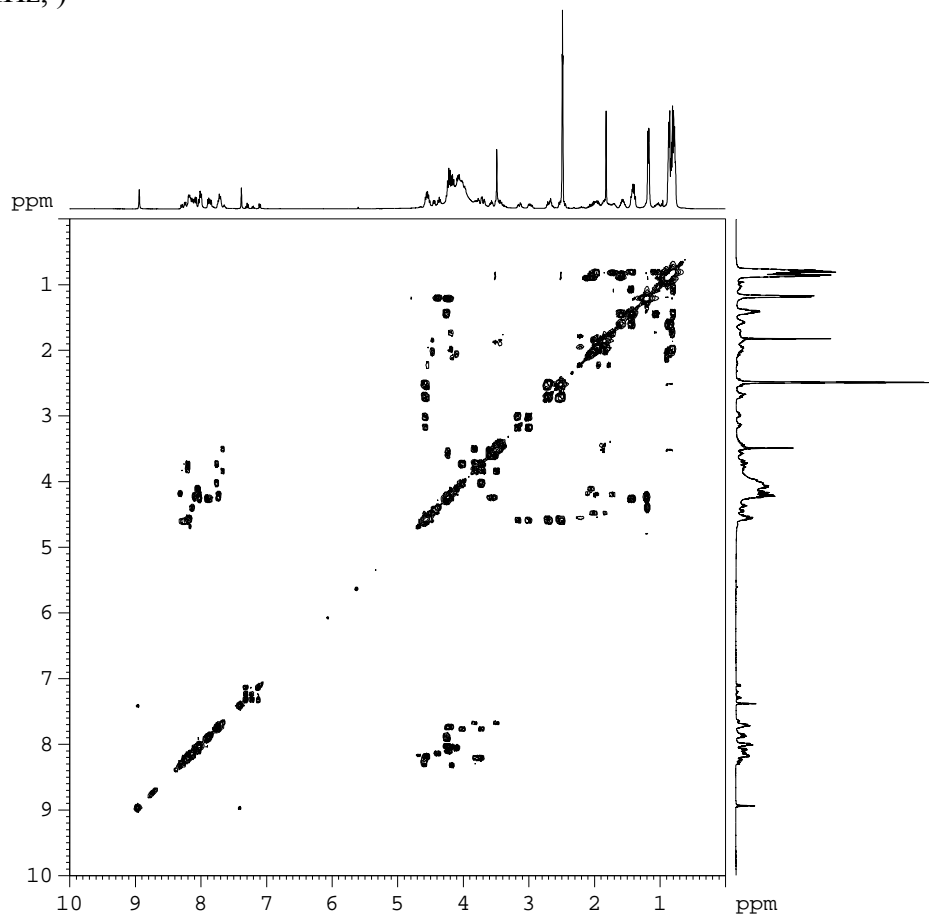
^1H (300 MHz,)



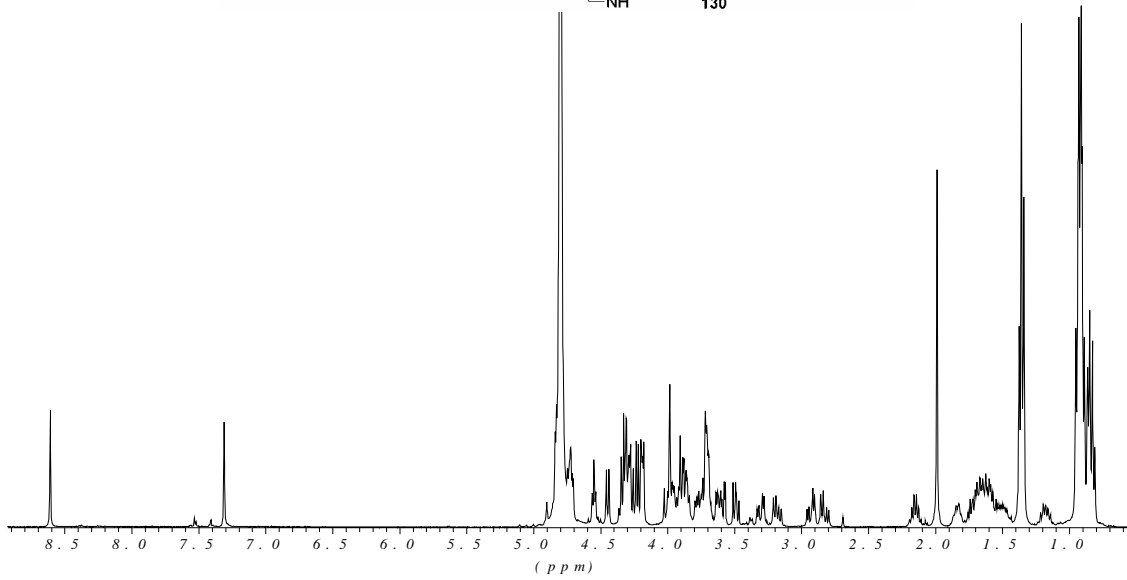
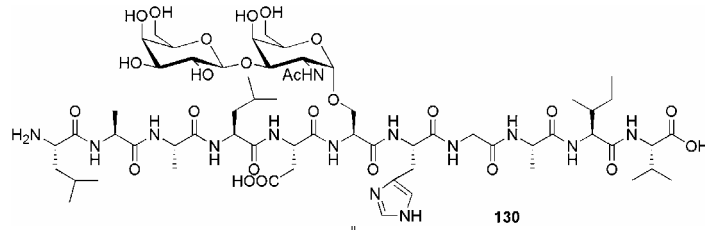
^{13}C (75.5 MHz,)



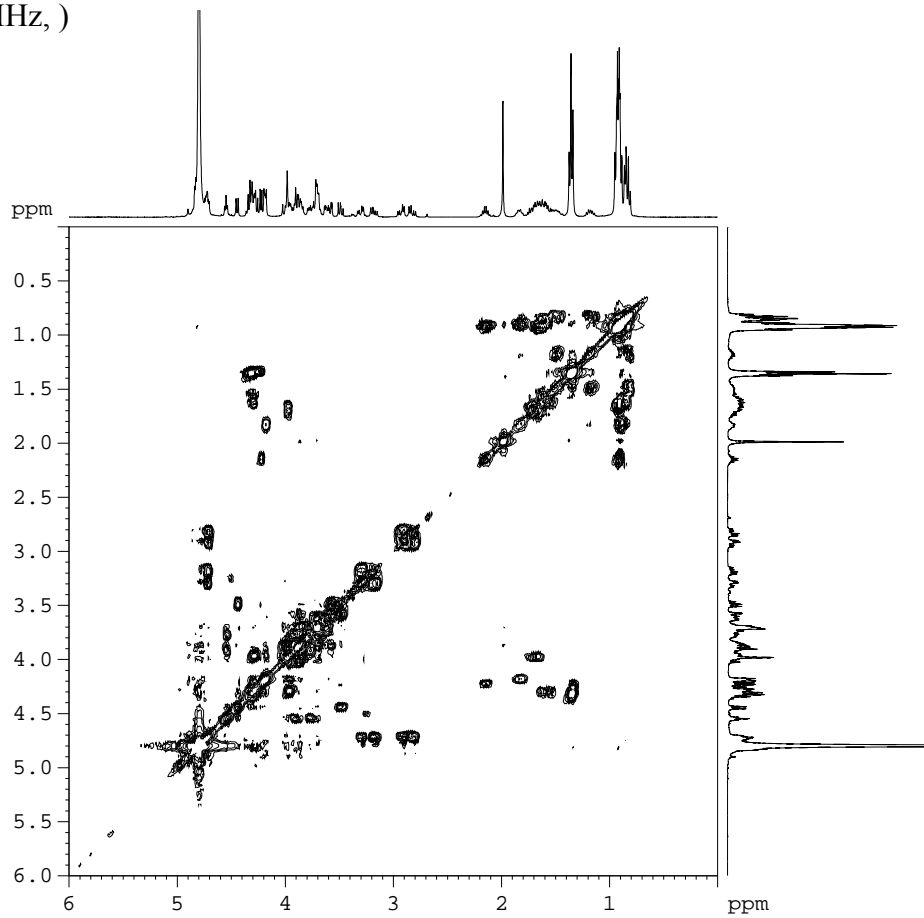
^1H (400 MHz,)



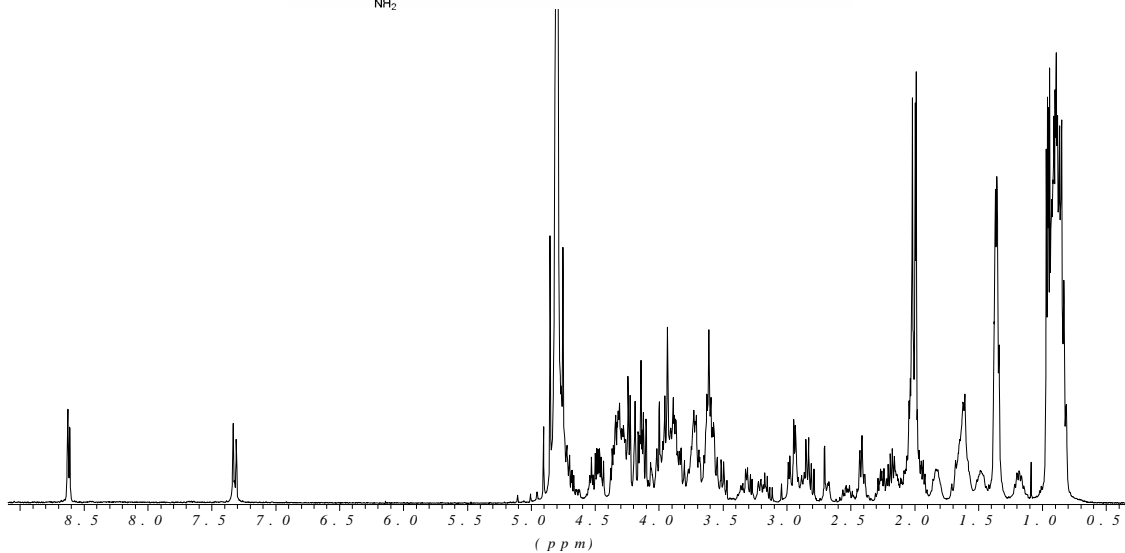
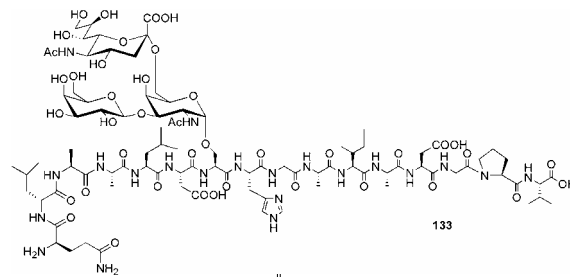
^1H - ^1H (400 MHz,)



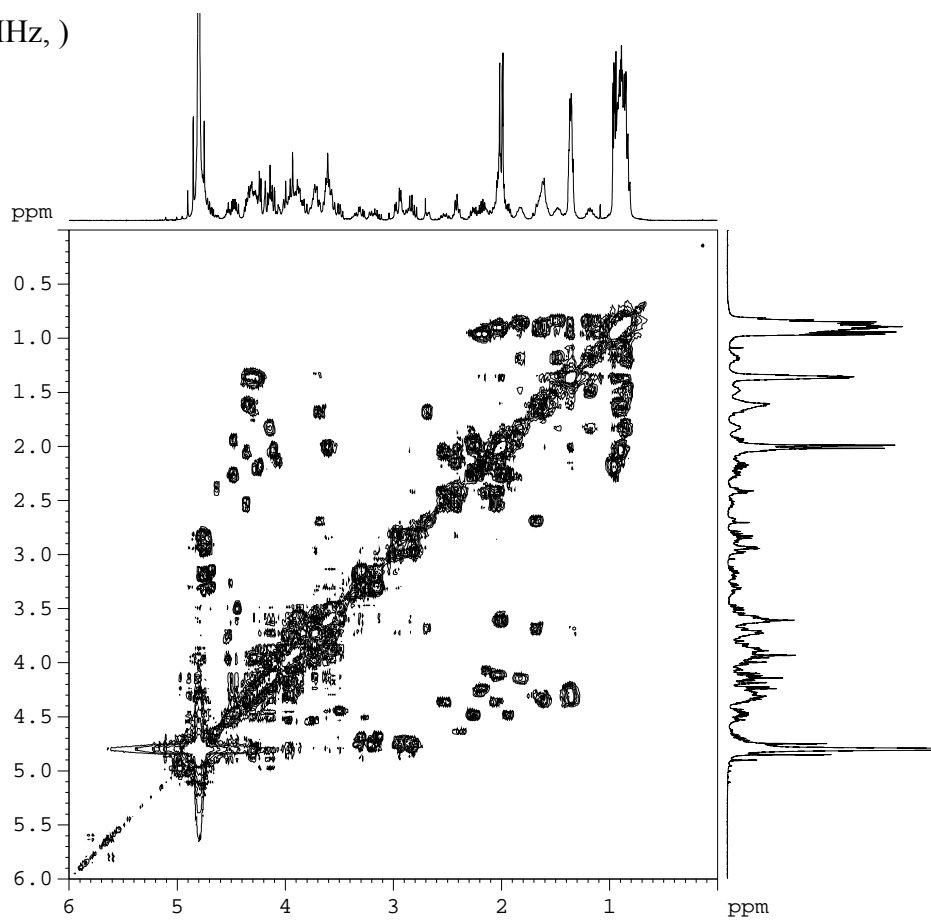
¹H (400 MHz,)



¹H-¹H (400 MHz,)



^1H (600 MHz,)



^1H - ^1H (600 MHz,)

8 Anhang**Messdaten der spektroskopischen Untersuchungen der Farbstoffe**UV-Absorptionsspektrum Verbindung 67:

Spektrometer-Nr. : 148012

Spektrometer-Typ : 320/340

Datum Messung : 12/05/04

Bearbeitung : 13/05/04

Integrationszeit : 10.0 ms

Anzahl Mittelungen: 200

Referenz-Faktor : 1.000

Komment1 : -----

Wellenlänge	Absorption	Wellenlänge	Absorption	Wellenlänge	Absorption
220.0	9.990	274.0	0.073	326.0	0.500
221.0	9.990	275.0	0.077	327.0	0.518
222.0	9.990	276.0	0.077	328.0	0.532
223.0	9.990	277.0	0.079	329.0	0.541
224.0	9.990	278.0	0.083	330.0	0.552
225.0	9.990	279.0	0.085	331.0	0.569
226.0	9.990	280.0	0.088	332.0	0.585
227.0	9.990	281.0	0.093	333.0	0.598
228.0	9.990	282.0	0.099	334.0	0.607
229.0	1.585	283.0	0.106	335.0	0.619
230.0	1.109	284.0	0.110	336.0	0.632
231.0	0.671	285.0	0.112	337.0	0.636
232.0	0.564	286.0	0.116	338.0	0.645
233.0	0.490	287.0	0.120	339.0	0.651
234.0	0.494	288.0	0.127	340.0	0.658
235.0	0.491	289.0	0.131	341.0	0.665
236.0	0.502	290.0	0.136	342.0	0.671
237.0	0.494	291.0	0.138	343.0	0.675
238.0	0.464	292.0	0.142	344.0	0.678
239.0	0.439	293.0	0.147	345.0	0.681
240.0	0.415	294.0	0.149	346.0	0.681
241.0	0.416	295.0	0.152	347.0	0.685
242.0	0.411	296.0	0.156	348.0	0.688
243.0	0.395	297.0	0.161	349.0	0.689
244.0	0.368	298.0	0.166	350.0	0.683
245.0	0.351	299.0	0.171	351.0	0.679
246.0	0.338	300.0	0.176	352.0	0.677
247.0	0.322	301.0	0.179	353.0	0.667
248.0	0.302	302.0	0.187	354.0	0.664
249.0	0.285	303.0	0.194	355.0	0.655
250.0	0.273	304.0	0.199	356.0	0.645
251.0	0.260	305.0	0.207	357.0	0.631
252.0	0.239	306.0	0.214	358.0	0.621
253.0	0.219	307.0	0.224	359.0	0.607
254.0	0.200	308.0	0.234	360.0	0.594
255.0	0.184	309.0	0.246	361.0	0.580
256.0	0.173	310.0	0.257	362.0	0.565
257.0	0.152	311.0	0.268	363.0	0.548
258.0	0.143	312.0	0.279	364.0	0.531
259.0	0.128	313.0	0.294	365.0	0.517
260.0	0.121	314.0	0.305	366.0	0.500
261.0	0.112	315.0	0.319	367.0	0.481
262.0	0.105	316.0	0.334	368.0	0.464
263.0	0.099	317.0	0.352	369.0	0.446
264.0	0.096	318.0	0.367	370.0	0.428
265.0	0.095	319.0	0.386	371.0	0.409
266.0	0.090	320.0	0.403	372.0	0.393
267.0	0.084	321.0	0.418	373.0	0.377
268.0	0.075	322.0	0.431	374.0	0.359
269.0	0.073	323.0	0.444	375.0	0.343
270.0	0.073	324.0	0.461	376.0	0.325
271.0	0.073	325.0	0.481	377.0	0.304
272.0	0.069	326.0	0.500	378.0	0.287
273.0	0.073				

Wellenlänge	Absorption
379.0	0.270
380.0	0.254
381.0	0.238
382.0	0.223
383.0	0.207
384.0	0.193
385.0	0.178
386.0	0.166
387.0	0.152
388.0	0.140
389.0	0.128
390.0	0.117
391.0	0.106
392.0	0.097
393.0	0.088
394.0	0.080
395.0	0.071
396.0	0.064
397.0	0.057
398.0	0.051
399.0	0.045
400.0	0.041
401.0	0.036
402.0	0.032
403.0	0.028
404.0	0.025
405.0	0.021
406.0	0.018
407.0	0.016
408.0	0.014
409.0	0.012
410.0	0.011
411.0	0.009
412.0	0.008
413.0	0.007
414.0	0.006
415.0	0.005
416.0	0.004
417.0	0.003
418.0	0.002
419.0	0.002
420.0	0.002
421.0	0.002
422.0	0.002
423.0	0.001
424.0	0.001
425.0	0.001
426.0	0.000
427.0	0.000
428.0	0.000

Fluoreszenzspektrum Verbindung 67:

Wellenlänge	Intensität
383.000000	2.350000
383.500000	2.561666
384.000000	2.834666
384.500000	3.175333
385.000000	3.550000
385.500000	3.911666
386.000000	4.227666
386.500000	4.500000
387.000000	4.765000
387.500000	5.088333
388.000000	5.541666
388.500000	6.165666
389.000000	6.943000
389.500000	7.800333
390.000000	8.654332
390.500000	9.464333
391.000000	10.257333
391.500000	11.107666
392.000000	12.084333
392.500000	13.208000
393.000000	14.455000
393.500000	15.817666
394.000000	17.358333
394.500000	19.180000
395.000000	21.318000
395.500000	23.651333
396.000000	25.942000
396.500000	27.975000
397.000000	29.693000
397.500000	31.222333
398.000000	32.788333
398.500000	34.599333
399.000000	36.766666
399.500000	39.286333
400.000000	42.070666
400.500000	45.024000
401.000000	48.118666
401.500000	51.425666
402.000000	55.059000
402.500000	59.085000
403.000000	63.482000
403.500000	68.191333
404.000000	73.197000
404.500000	78.533000
405.000000	84.227666
405.500000	90.249000
406.000000	96.542333
406.500000	103.113666
407.000000	110.054333
407.500000	117.453000
408.000000	125.283000
408.500000	133.398000
409.000000	141.658666
409.500000	150.066333
410.000000	158.751000
410.500000	167.840666
411.000000	177.363000
411.500000	187.261333
412.000000	197.492333
412.500000	208.085333
413.000000	219.132333
413.500000	230.731333
414.000000	242.912666
414.500000	255.577000
415.000000	268.516666
415.500000	281.516666
416.000000	294.470333
416.500000	307.416000
417.000000	320.492000

Wellenlänge	Intensität
417.500000	333.857666
418.000000	347.607333
418.500000	361.711333
419.000000	376.026333
419.500000	390.370333
420.000000	404.614333
420.500000	418.739666
421.000000	432.817666
421.500000	446.920666
422.000000	461.056000
422.500000	475.208000
423.000000	489.415333
423.500000	503.749333
424.000000	518.193000
424.500000	532.627666
425.000000	546.979666
425.500000	561.362333
426.000000	575.982666
426.500000	590.913333
427.000000	605.985000
427.500000	620.913666
428.000000	635.472333
428.500000	649.534000
429.000000	663.041666
429.500000	676.013000
430.000000	688.583000
430.500000	700.963666
431.000000	713.320666
431.500000	725.688666
432.000000	738.015000
432.500000	750.254333
433.000000	762.383333
433.500000	774.333333
434.000000	785.956333
434.500000	797.083998
435.000000	807.635332
435.500000	817.675000
436.000000	827.351000
436.500000	836.775333
437.000000	845.952666
437.500000	854.794666
438.000000	863.160666
438.500000	870.879333
439.000000	877.789333
439.500000	883.814666
440.000000	889.034000
440.500000	893.665999
441.000000	897.978000
441.500000	902.167666
442.000000	906.283666
442.500000	910.238333
443.000000	913.905000
443.500000	917.207666
444.000000	920.116666
444.500000	922.608333
445.000000	924.671666
445.500000	926.335000
446.000000	927.621000
446.500000	928.438332
447.000000	928.541000
447.500000	927.658666
448.000000	925.720333
448.500000	922.975333
449.000000	919.853333
449.500000	916.643333
450.000000	913.282665
450.500000	909.464666
451.000000	904.984665
451.500000	899.961333

Wellenlänge	Intensität
452.000000	894.721333
452.500000	889.483666
453.000000	884.162333
453.500000	878.452666
454.000000	872.103333
454.500000	865.119000
455.000000	857.720333
455.500000	850.076333
456.000000	842.082666
456.500000	833.477666
457.000000	824.198666
457.500000	814.576666
458.000000	805.112998
458.500000	796.091333
459.000000	787.429000
459.500000	778.842000
460.000000	770.098000
460.500000	761.115666
461.000000	751.915000
461.500000	742.525000
462.000000	732.948333
462.500000	723.204000
463.000000	713.367333
463.500000	703.537333
464.000000	693.749333
464.500000	683.972000
465.000000	674.198000
465.500000	664.502666
466.000000	654.961666
466.500000	645.530000
467.000000	636.063332
467.500000	626.455666
468.000000	616.744666
468.500000	607.061665
469.000000	597.507999
469.500000	588.101000
470.000000	578.821333
470.500000	569.693000
471.000000	560.799333
471.500000	552.189666
472.000000	543.773000
472.500000	535.342666
473.000000	526.762666
473.500000	518.113666
474.000000	509.599333
474.500000	501.291333
475.000000	493.014333
475.500000	484.513333
476.000000	476.000000
476.500000	466.815000
477.000000	458.089666
477.500000	449.745000
478.000000	441.844666
478.500000	434.368000
479.000000	427.251000
479.500000	420.353000
480.000000	413.436333
480.500000	406.249333
481.000000	398.679000
481.500000	390.816000
482.000000	382.862000
482.500000	374.978666
483.000000	367.239666
483.500000	359.692666
484.000000	352.397666
484.500000	345.578000
485.000000	338.549333
485.500000	331.750333
486.000000	324.874000

Wellenlänge	Intensität
486.500000	317.971333
487.000000	311.211666
487.500000	304.724000
488.000000	298.486333
488.500000	292.366666
489.000000	286.250333
489.500000	280.102333
490.000000	273.947000
490.500000	267.854333
491.000000	261.970666
491.500000	256.500000
492.000000	251.589666
492.500000	247.183333
493.000000	242.995000
493.500000	238.651666
494.000000	233.901333
494.500000	228.729000
495.000000	223.308000
495.500000	217.851666
496.000000	212.521333
496.500000	207.442000
497.000000	202.750666
497.500000	198.547333
498.000000	194.766333
498.500000	191.140000
499.000000	187.356666
499.500000	183.305000
500.000000	179.147000
500.500000	175.131333
501.000000	171.339333
501.500000	167.623000
502.000000	163.774666
502.500000	159.733000
503.000000	155.626333
503.500000	151.649000
504.000000	147.917333
504.500000	144.430666
505.000000	141.129333
505.500000	137.969000
506.000000	134.936666
506.500000	132.022000
507.000000	129.192666
507.500000	126.398000
508.000000	123.592666
508.500000	120.768333
509.000000	117.977666
509.500000	115.319000
510.000000	112.870333
510.500000	110.619666
511.000000	108.464666
511.500000	106.291333
512.000000	104.045000
512.500000	101.744666
513.000000	99.437665
513.500000	97.170333
514.000000	94.975666
514.500000	92.861333
515.000000	90.787000
515.500000	88.680333
516.000000	86.504333
516.500000	84.313000
517.000000	82.242333
517.500000	80.432333
518.000000	78.936666
518.500000	77.681333
519.000000	76.503000
519.500000	75.247998
520.000000	73.859333
520.500000	72.379000
521.000000	70.873000
521.500000	69.352000
522.000000	67.770000
522.500000	66.090000

Wellenlänge	Intensität
523.000000	64.339333
523.500000	62.593333
524.000000	60.915000
524.500000	59.315666
525.000000	57.771666
525.500000	56.272333
526.000000	54.839333
526.500000	53.503666
527.000000	52.267333
527.500000	51.099000
528.000000	49.967000
528.500000	48.865333
529.000000	47.806000
529.500000	46.790333
530.000000	45.794666
530.500000	44.778000
531.000000	43.706000
531.500000	42.558333
532.000000	41.334333
532.500000	40.066000
533.000000	38.829333
533.500000	37.718000
534.000000	36.778000
534.500000	35.953000
535.000000	35.115000
535.500000	34.157333
536.000000	33.073666
536.500000	31.949000
537.000000	30.887000
537.500000	29.944666
538.000000	29.114000
538.500000	28.349333
539.000000	27.600666
539.500000	26.837666
540.000000	26.048000
540.500000	25.236000
541.000000	24.411333
541.500000	23.590000
542.000000	22.798000
542.500000	22.062666
543.000000	21.396333
543.500000	20.786000
544.000000	20.203666
544.500000	19.623333
545.000000	19.036666
545.500000	18.456666
546.000000	17.919000
546.500000	17.456666
547.000000	17.062000
547.500000	16.674333
548.000000	16.213000
548.500000	15.632666
549.000000	14.960333
549.500000	14.287000
550.000000	13.714333
550.500000	13.294333
551.000000	13.001666
551.500000	12.754000
552.000000	12.469000
552.500000	12.105333
553.000000	11.675666
553.500000	11.224333
554.000000	10.789000
554.500000	10.388666
555.000000	10.035666
555.500000	9.748666
556.000000	9.541000
556.500000	9.385666
557.000000	9.216666
557.500000	8.970000
558.000000	8.641999
558.500000	8.279332
559.000000	7.927333

UV-Absorptionsspektrum Verbindung 79:

pektrometer-Nr. : 148012

Spektrometer-Typ : 320/340

Datum Messung : 12/07/05

Bearbeitung : -----

Integrationszeit : 10.0 ms

Anzahl Mittelungen: 200

Referenz-Faktor : 1.000

Komment1 : -----

Wellenlänge	Absorption	Wellenlänge	Absorption	Wellenlänge	Absorption
209.0	0.235	268.0	0.217	327.0	0.872
210.0	0.690	269.0	0.205	328.0	0.872
211.0	-0.008	270.0	0.215	329.0	0.905
212.0	9.990	271.0	0.224	330.0	0.876
213.0	0.438	272.0	0.233	331.0	0.874
214.0	-0.007	273.0	0.269	332.0	0.882
215.0	0.590	274.0	0.278	333.0	0.881
216.0	-0.000	275.0	0.290	334.0	0.897
217.0	-0.036	276.0	0.291	335.0	0.916
218.0	0.134	277.0	0.262	336.0	0.923
219.0	0.286	278.0	0.286	337.0	0.948
220.0	-0.023	279.0	0.335	338.0	0.943
221.0	-0.007	280.0	0.358	339.0	0.939
222.0	-0.006	281.0	0.369	340.0	0.914
223.0	-0.021	282.0	0.389	341.0	0.934
224.0	0.004	283.0	0.388	342.0	0.917
225.0	0.006	284.0	0.402	343.0	0.905
226.0	0.009	285.0	0.403	344.0	0.866
227.0	0.013	286.0	0.411	345.0	0.855
228.0	0.039	287.0	0.443	346.0	0.839
229.0	0.030	288.0	0.422	347.0	0.792
230.0	0.039	289.0	0.465	348.0	0.758
231.0	0.058	290.0	0.476	349.0	0.722
232.0	0.086	291.0	0.479	350.0	0.675
233.0	0.086	292.0	0.484	351.0	0.623
234.0	0.100	293.0	0.502	352.0	0.569
235.0	0.108	294.0	0.465	353.0	0.498
236.0	0.111	295.0	0.481	354.0	0.438
237.0	0.145	296.0	0.517	355.0	0.374
238.0	0.142	297.0	0.555	356.0	0.314
239.0	0.142	298.0	0.536	357.0	0.267
240.0	0.126	299.0	0.536	358.0	0.220
241.0	0.120	300.0	0.534	359.0	0.179
242.0	0.178	301.0	0.529	360.0	0.144
243.0	0.173	302.0	0.529	361.0	0.115
244.0	0.168	303.0	0.544	362.0	0.091
245.0	0.167	304.0	0.562	363.0	0.069
246.0	0.166	305.0	0.567	364.0	0.053
247.0	0.179	306.0	0.581	365.0	0.039
248.0	0.189	307.0	0.620	366.0	0.028
249.0	0.197	308.0	0.637	367.0	0.016
250.0	0.194	309.0	0.616	368.0	0.011
251.0	0.188	310.0	0.646	369.0	0.004
252.0	0.193	311.0	0.650	370.0	0.001
253.0	0.215	312.0	0.662		
254.0	0.203	313.0	0.643		
255.0	0.217	314.0	0.658		
256.0	0.201	315.0	0.686		
257.0	0.183	316.0	0.722		
258.0	0.182	317.0	0.721		
259.0	0.193	318.0	0.750		
260.0	0.182	319.0	0.770		
261.0	0.175	320.0	0.777		
262.0	0.173	321.0	0.769		
263.0	0.181	322.0	0.769		
264.0	0.176	323.0	0.764		
265.0	0.176	324.0	0.788		
266.0	0.180	325.0	0.827		
267.0	0.200	326.0	0.848		

Fluoreszenzspektrum Verbindung 79.

Wellenlänge	Intensität
350.00000	6.487333
350.50000	7.418166
351.00000	8.589000
351.50000	9.931832
352.00000	11.383166
352.50000	12.914166
353.00000	14.526833
353.50000	16.231000
354.00000	18.031500
354.50000	19.925000
355.00000	21.908500
355.50000	23.984333
356.00000	26.155666
356.50000	28.421666
357.00000	30.781666
357.50000	33.237000
358.00000	35.808833
358.50000	38.523500
359.00000	41.405666
359.50000	44.454000
360.00000	47.651500
360.50000	50.984666
361.00000	54.455666
361.50000	58.082166
362.00000	61.880500
362.50000	65.860833
363.00000	70.027333
363.50000	74.389833
364.00000	78.952333
364.50000	83.700333
365.00000	88.590498
365.50000	93.556166
366.00000	98.540999
366.50000	103.530333
367.00000	108.553500
367.50000	113.652166
368.00000	118.840833
368.50000	124.089000
369.00000	129.337000
369.50000	134.529166
370.00000	139.649833
370.50000	144.737000
371.00000	149.853333
371.50000	155.028666
372.00000	160.227333
372.50000	165.372666
373.00000	170.418166
373.50000	175.386000
374.00000	180.345000
374.50000	185.361166
375.00000	190.464833
375.50000	195.655666
376.00000	200.910833
376.50000	206.203666
377.00000	211.518333
377.50000	216.848000
378.00000	222.173833
378.50000	227.424333
379.00000	232.485500
379.50000	237.254166
380.00000	241.715333
380.50000	245.971000
381.00000	250.170666
381.50000	254.422833
382.00000	258.738833
382.50000	263.057000
383.00000	267.301000
383.50000	271.414500
384.00000	275.367000

Wellenlänge	Intensität
384.50000	279.141333
385.00000	282.728666
385.50000	286.122333
386.00000	289.321666
386.50000	292.344833
387.00000	295.222666
387.50000	297.987833
388.00000	300.663000
388.50000	303.243333
389.00000	305.692000
389.50000	307.951666
390.00000	309.963333
390.50000	311.706333
391.00000	313.218333
391.50000	314.580833
392.00000	315.871333
392.50000	317.107999
393.00000	318.246333
393.50000	319.211500
394.00000	319.954000
394.50000	320.475666
395.00000	320.809333
395.50000	320.980666
396.00000	320.996166
396.50000	320.853833
397.00000	320.563333
397.50000	320.160833
398.00000	319.696000
398.50000	319.202000
399.00000	318.667500
399.50000	318.045833
400.00000	317.288333
400.50000	316.389500
401.00000	315.377499
401.50000	314.293500
402.00000	313.162333
402.50000	311.992000
403.00000	310.783333
403.50000	309.531500
404.00000	308.218833
404.50000	306.818500
405.00000	305.178666
405.50000	303.557000
406.00000	301.818666
406.50000	299.968000
407.00000	298.021000
407.50000	295.990333
408.00000	293.883666
408.50000	291.701333
409.00000	289.445333
409.50000	287.117666
410.00000	284.705333
410.50000	282.179000
411.00000	279.527000
411.50000	276.773333
412.00000	273.968666
412.50000	271.143000
413.00000	268.282000
413.50000	265.346333
414.00000	262.307333
414.50000	259.171666
415.00000	255.974333
415.50000	252.753666
416.00000	249.531333
416.50000	246.298000
417.00000	243.018333
417.50000	239.662333
418.00000	236.232000
418.50000	232.775666

Wellenlänge	Intensität
419.00000	229.351000
419.50000	225.977000
420.00000	222.612666
420.50000	219.204666
421.00000	215.731000
421.50000	212.224000
422.00000	208.740000
422.50000	205.320666
423.00000	201.967000
423.50000	198.637666
424.00000	195.275666
424.50000	191.833333
425.00000	188.288333
425.50000	184.661000
426.00000	181.005000
426.50000	177.377333
427.00000	173.818333
427.50000	170.340000
428.00000	166.939000
428.50000	163.615333
429.00000	160.370000
429.50000	157.201666
430.00000	154.096333
430.50000	151.031333
431.00000	147.990333
431.50000	144.971000
432.00000	141.997000
432.50000	139.084333
433.00000	136.227333
433.50000	133.405666
434.00000	130.602000
434.50000	127.825000
435.00000	125.096000
435.50000	122.434333
436.00000	119.845000
436.50000	117.315000
437.00000	114.826000
437.50000	112.360666
438.00000	109.915000
438.50000	107.494333
439.00000	105.111666
439.50000	102.770333
440.00000	100.457666
440.50000	98.161333
441.00000	95.886666
441.50000	93.659998
442.00000	91.503000
442.50000	89.453999
443.00000	87.515000
443.50000	85.669999
444.00000	83.884000
444.50000	82.118666
445.00000	80.348000
445.50000	78.566000
446.00000	76.793666
446.50000	75.061666
447.00000	73.380666
447.50000	71.737666
448.00000	70.105999
448.50000	68.469333
449.00000	66.831666
449.50000	65.211333
450.00000	63.624333
450.50000	62.087000
451.00000	60.605000
451.50000	59.175333
452.00000	57.786000
452.50000	56.419000
453.00000	55.056333

Wellenlänge	Intensität
453.500000	53.699333
454.000000	52.359333
454.500000	51.049000
455.000000	49.770000
455.500000	48.506333
456.000000	47.237999
456.500000	45.962666
457.000000	44.695000
457.500000	43.450666
458.000000	42.239666
458.500000	41.062333
459.000000	39.928000
459.500000	38.847666
460.000000	37.828000
460.500000	36.859000
461.000000	35.913666
461.500000	34.966000
462.000000	34.002000
462.500000	33.028666
463.000000	32.063333
463.500000	31.123000
464.000000	30.221666
464.500000	29.369333
465.000000	28.565333
465.500000	27.793666
466.000000	27.038333
466.500000	26.293666
467.000000	25.578666
467.500000	24.910666
468.000000	24.292000
468.500000	23.703333
469.000000	23.119000
469.500000	22.517333
470.000000	21.888333
470.500000	21.239333
471.000000	20.593333
471.500000	19.981666
472.000000	19.417333
472.500000	18.901333
473.000000	18.419000
473.500000	17.958333
474.000000	17.515333
474.500000	17.093333
475.000000	16.690000
475.500000	16.290333
476.000000	15.875666
476.500000	15.438333
477.000000	14.986000
477.500000	14.537666
478.000000	14.107000
478.500000	13.695000
479.000000	13.297666
479.500000	12.914333
480.000000	12.552333
480.500000	12.221000
481.000000	11.910333
481.500000	11.599666
482.000000	11.270000
482.500000	10.920000
483.000000	10.569666
483.500000	10.243000
484.000000	9.949666
484.500000	9.687666
485.000000	9.445665
485.500000	9.212332
486.000000	8.972333
486.500000	8.715000
487.000000	8.439000
487.500000	8.151999
488.000000	7.865666
488.500000	7.593000
489.000000	7.337000
489.500000	7.094333

Wellenlänge	Intensität
490.500000	6.641666
491.000000	6.430000
491.500000	6.232333
492.000000	6.043333
492.500000	5.862000
493.000000	5.681666
493.500000	5.504666
494.000000	5.335000
494.500000	5.183333
495.000000	5.060666
495.500000	4.963333
496.000000	4.876000
496.500000	4.779999
497.000000	4.667333
497.500000	4.537000
498.000000	4.395333
498.500000	4.244333
499.000000	4.084666
499.500000	3.921000
500.000000	3.761333
500.500000	3.615333
501.000000	3.486666
501.500000	3.376333
502.000000	3.277333
502.500000	3.183000
503.000000	3.088333
503.500000	2.984666
504.000000	2.869666
504.500000	2.748000
505.000000	2.629666
505.500000	2.528333
506.000000	2.450333
506.500000	2.392333
507.000000	2.348333
507.500000	2.309666
508.000000	2.272333
508.500000	2.235000
509.000000	2.190000
509.500000	2.133666
510.000000	2.056333
510.500000	1.960333
511.000000	1.858000
511.500000	1.769000
512.000000	1.705000
512.500000	1.666333
513.000000	1.638333
513.500000	1.606333
514.000000	1.566000
514.500000	1.526000
515.000000	1.498666
515.500000	1.484333
516.000000	1.474333
516.500000	1.458666
517.000000	1.433666
517.500000	1.405333
518.000000	1.372333
518.500000	1.333000
519.000000	1.283333
519.500000	1.229666
520.000000	1.181333
520.500000	1.147000
521.000000	1.124000
521.500000	1.105333
522.000000	1.079333
522.500000	1.039666
523.000000	0.991000
523.500000	0.946333
524.000000	0.918000
524.500000	0.905000
525.000000	0.895333
525.500000	0.873666
526.000000	0.834000
526.500000	0.785000

UV-Absorptionsspektrum Verbindung 80:

Spektrometer-Nr. : 148012

Spektrometer-Typ : 320/340

Datum Messung : 12/07/05

Bearbeitung : 12/07/05

Integrationszeit : 10.0 ms

Anzahl Mittelungen: 200

Referenz-Faktor : 1.000

Komment1 : -----

Wellenlänge	Absorption	Wellenlänge	Absorption	Wellenlänge	Absorption
208.0	0.034	267.0	0.231	326.0	0.792
209.0	0.039	268.0	0.233	327.0	0.809
210.0	0.036	269.0	0.244	328.0	0.812
211.0	0.050	270.0	0.242	329.0	0.810
212.0	0.086	271.0	0.239	330.0	0.804
213.0	0.163	272.0	0.249	331.0	0.799
214.0	0.177	273.0	0.264	332.0	0.792
215.0	0.089	274.0	0.279	333.0	0.789
216.0	0.052	275.0	0.285	334.0	0.789
217.0	0.033	276.0	0.289	335.0	0.793
218.0	0.047	277.0	0.295	336.0	0.790
219.0	0.055	278.0	0.299	337.0	0.786
220.0	0.062	279.0	0.315	338.0	0.774
221.0	0.065	280.0	0.327	339.0	0.761
222.0	0.063	281.0	0.343	340.0	0.745
223.0	0.074	282.0	0.355	341.0	0.728
224.0	0.085	283.0	0.363	342.0	0.707
225.0	0.088	284.0	0.372	343.0	0.693
226.0	0.100	285.0	0.381	344.0	0.675
227.0	0.104	286.0	0.390	345.0	0.652
228.0	0.109	287.0	0.402	346.0	0.626
229.0	0.114	288.0	0.414	347.0	0.597
230.0	0.128	289.0	0.420	348.0	0.570
231.0	0.144	290.0	0.434	349.0	0.543
232.0	0.166	291.0	0.442	350.0	0.511
233.0	0.184	292.0	0.443	351.0	0.479
234.0	0.196	293.0	0.443	352.0	0.442
235.0	0.209	294.0	0.443	353.0	0.405
236.0	0.219	295.0	0.459	354.0	0.367
237.0	0.224	296.0	0.471	355.0	0.329
238.0	0.226	297.0	0.484	356.0	0.293
239.0	0.226	298.0	0.488	357.0	0.259
240.0	0.234	299.0	0.493	358.0	0.228
241.0	0.247	300.0	0.496	359.0	0.200
242.0	0.255	301.0	0.497	360.0	0.176
243.0	0.253	302.0	0.500	361.0	0.154
244.0	0.249	303.0	0.513	362.0	0.136
245.0	0.250	304.0	0.524	363.0	0.119
246.0	0.256	305.0	0.533	364.0	0.104
247.0	0.263	306.0	0.542	365.0	0.091
248.0	0.262	307.0	0.554	366.0	0.081
249.0	0.258	308.0	0.561	367.0	0.073
250.0	0.255	309.0	0.575	368.0	0.065
251.0	0.247	310.0	0.584	369.0	0.058
252.0	0.246	311.0	0.593	370.0	0.053
253.0	0.250	312.0	0.601	371.0	0.049
254.0	0.252	313.0	0.612	372.0	0.046
255.0	0.248	314.0	0.623	373.0	0.043
256.0	0.242	315.0	0.638	374.0	0.041
257.0	0.233	316.0	0.664	375.0	0.039
258.0	0.229	317.0	0.686	376.0	0.037
259.0	0.224	318.0	0.707	377.0	0.036
260.0	0.223	319.0	0.717	378.0	0.035
261.0	0.216	320.0	0.717	379.0	0.034
262.0	0.214	321.0	0.718	380.0	0.033
263.0	0.213	322.0	0.727	381.0	0.032
264.0	0.217	323.0	0.737	382.0	0.032
265.0	0.218	324.0	0.748	383.0	0.031
266.0	0.222	325.0	0.770	384.0	0.030

Fluoreszenzspektrum Verbindung 80:

Wellenlänge	Intensität	Wellenlänge	Intensität	Wellenlänge	Intensität
358.000000	6.274499	392.500000	94.840499	427.000000	69.517499
358.500000	6.865833	393.000000	95.637000	427.500000	68.329500
359.000000	7.511666	393.500000	96.336500	428.000000	67.108499
359.500000	8.200333	394.000000	96.949000	428.500000	65.885500
360.000000	8.915833	394.500000	97.501000	429.000000	64.691500
360.500000	9.651333	395.000000	98.012499	429.500000	63.538000
361.000000	10.408666	395.500000	98.486000	430.000000	62.420500
361.500000	11.200500	396.000000	98.919000	430.500000	61.340000
362.000000	12.042500	396.500000	99.324000	431.000000	60.304999
362.500000	12.944833	397.000000	99.727000	431.500000	59.313500
363.000000	13.906666	397.500000	100.145500	432.000000	58.356999
363.500000	14.922166	398.000000	100.565500	432.500000	57.411500
364.000000	15.978333	398.500000	100.946000	433.000000	56.456500
364.500000	17.066666	399.000000	101.249000	433.500000	55.484500
365.000000	18.184166	399.500000	101.464500	434.000000	54.493500
365.500000	19.338833	400.000000	101.605000	434.500000	53.493500
366.000000	20.540666	400.500000	101.702500	435.000000	52.496500
366.500000	21.795666	401.000000	101.788500	435.500000	51.521999
367.000000	23.094166	401.500000	101.894000	436.000000	50.593499
367.500000	24.420500	402.000000	102.032500	436.500000	49.720000
368.000000	25.767166	402.500000	102.198500	437.000000	48.889000
368.500000	27.137666	403.000000	102.367000	437.500000	48.059000
369.000000	28.540000	403.500000	102.507500	438.000000	47.181000
369.500000	29.966500	404.000000	102.594500	438.500000	46.224999
370.000000	31.417499	404.500000	102.613500	439.000000	45.204500
370.500000	32.798500	405.000000	102.432000	439.500000	44.175000
371.000000	34.148499	405.500000	102.331500	440.000000	43.195000
371.500000	35.504000	406.000000	102.198500	440.500000	42.304500
372.000000	36.915499	406.500000	102.046500	441.000000	41.509000
372.500000	38.402000	407.000000	101.882000	441.500000	40.787000
373.000000	39.934999	407.500000	101.706500	442.000000	40.108000
373.500000	41.467500	408.000000	101.528500	442.500000	39.440500
374.000000	42.974499	408.500000	101.352000	443.000000	38.760000
374.500000	44.459000	409.000000	101.164500	443.500000	38.054500
375.000000	45.935499	409.500000	100.931000	444.000000	37.320500
375.500000	47.415499	410.000000	100.619000	444.500000	36.566500
376.000000	48.915000	410.500000	100.219000	445.000000	35.809000
376.500000	50.469500	411.000000	99.752000	445.500000	35.066500
377.000000	52.127000	411.500000	99.250000	446.000000	34.352000
377.500000	53.915500	412.000000	98.736000	446.500000	33.664000
378.000000	55.819999	412.500000	98.217500	447.000000	32.983500
378.500000	57.771999	413.000000	97.688500	447.500000	32.296500
379.000000	59.671500	413.500000	97.136000	448.000000	31.601500
379.500000	61.423500	414.000000	96.538500	448.500000	30.908500
380.000000	62.986999	414.500000	95.887000	449.000000	30.225500
380.500000	64.405500	415.000000	95.185000	449.500000	29.551500
381.000000	65.781000	415.500000	94.452000	450.000000	28.885000
381.500000	67.219500	416.000000	93.694500	450.500000	28.230000
382.000000	68.767500	416.500000	92.893000	451.000000	27.589000
382.500000	70.398500	417.000000	92.007499	451.500000	26.955500
383.000000	72.042000	417.500000	91.020500	452.000000	26.324500
383.500000	73.621000	418.000000	89.958000	452.500000	25.689000
384.000000	75.089000	418.500000	88.876499	453.000000	25.053999
384.500000	76.444499	419.000000	87.824500	453.500000	24.435500
385.000000	77.724499	419.500000	86.806999	454.000000	23.849000
385.500000	78.989000	420.000000	85.780500	454.500000	23.301000
386.000000	80.293499	420.500000	84.703000	455.000000	22.790500
386.500000	81.667499	421.000000	83.566000	455.500000	22.303000
387.000000	83.098999	421.500000	82.403499	456.000000	21.814500
387.500000	84.531000	422.000000	81.254499	456.500000	21.305000
388.000000	85.892000	422.500000	80.128000	457.000000	20.765000
388.500000	87.130000	423.000000	79.002500	457.500000	20.201000
389.000000	88.241000	423.500000	77.843500	458.000000	19.638000
389.500000	89.258000	424.000000	76.639999	458.500000	19.096500
390.000000	90.225500	424.500000	75.407500	459.000000	18.595000
390.500000	91.170500	425.000000	74.175500	459.500000	18.137000
391.000000	92.108999	425.500000	72.974500	460.000000	17.715000
391.500000	93.044500	426.000000	71.811500	460.500000	17.312000
392.000000	93.965999	426.500000	70.670000	461.000000	16.903500

Wellenlänge	Intensität
461.500000	16.469500
462.000000	16.001000
462.500000	15.502500
463.000000	14.989000
463.500000	14.476000
464.000000	13.985500
464.500000	13.542500
465.000000	13.160000
465.500000	12.832000
466.000000	12.541500
466.500000	12.271000
467.000000	12.018500
467.500000	11.782500
468.000000	11.555500
468.500000	11.319500
469.000000	11.062000
469.500000	10.779000
470.000000	10.476500
470.500000	10.163000
471.000000	9.849500
471.500000	9.547500
472.000000	9.259499
472.500000	8.986499
473.000000	8.730499
473.500000	8.496499
474.000000	8.295000
474.500000	8.132999
475.000000	8.000499
475.500000	7.867500
476.000000	7.708000
476.500000	7.515500
477.000000	7.303000
477.500000	7.087000
478.000000	6.876500
478.500000	6.676000
479.000000	6.492500
479.500000	6.333000
480.000000	6.204999
480.500000	6.103000
481.000000	6.001500
481.500000	5.869000
482.000000	5.685500
482.500000	5.461000
483.000000	5.230499
483.500000	5.029999
484.000000	4.875500
484.500000	4.760999
485.000000	4.671500
485.500000	4.595000
486.000000	4.516500
486.500000	4.420500
487.000000	4.299500
487.500000	4.153000
488.000000	3.990500
488.500000	3.826500
489.000000	3.670500
489.500000	3.526000
490.000000	3.396000
490.500000	3.275000
491.000000	3.161500
491.500000	3.054500
492.000000	2.953500
492.500000	2.862500
493.000000	2.780500
493.500000	2.702000
494.000000	2.620000
494.500000	2.530500
495.000000	2.443500
495.500000	2.373000
496.000000	2.330500
496.500000	2.315500
497.000000	2.318500
497.500000	2.321000

UV-Absorptionsspektrum Verbindung 155:

Spektrometer-Nr. : 148012

Spektrometer-Typ : 320/340

Datum Messung : 12/05/04

Bearbeitung : 13/05/04

Integrationszeit : 10.0 ms

Anzahl Mittelungen: 200

Referenz-Faktor : 1.000

Komment1 : -----

Wellenlänge	Absorption
229.0	1.905
230.0	1.345
231.0	0.897
232.0	0.697
233.0	0.589
234.0	0.525
235.0	0.468
236.0	0.432
237.0	0.381
238.0	0.357
239.0	0.337
240.0	0.319
241.0	0.310
242.0	0.296
243.0	0.279
244.0	0.276
245.0	0.282
246.0	0.292
247.0	0.302
248.0	0.301
249.0	0.305
250.0	0.317
251.0	0.336
252.0	0.354
253.0	0.368
254.0	0.380
255.0	0.397
256.0	0.417
257.0	0.431
258.0	0.457
259.0	0.480
260.0	0.508
261.0	0.538
262.0	0.562
263.0	0.592
264.0	0.605
265.0	0.631
266.0	0.643
267.0	0.658
268.0	0.672
269.0	0.678
270.0	0.689
271.0	0.704
272.0	0.721
273.0	0.757
274.0	0.749
275.0	0.753
276.0	0.757
277.0	0.764
278.0	0.790
279.0	0.811
280.0	0.808
281.0	0.803
282.0	0.783
283.0	0.752
284.0	0.726
285.0	0.705
286.0	0.696
287.0	0.697

Wellenlänge	Absorption
288.0	0.690
289.0	0.667
290.0	0.620
291.0	0.559
292.0	0.496
293.0	0.436
294.0	0.375
295.0	0.322
296.0	0.276
297.0	0.238
298.0	0.204
299.0	0.173
300.0	0.146
301.0	0.123
302.0	0.103
303.0	0.088
304.0	0.070
305.0	0.056
306.0	0.044
307.0	0.035
308.0	0.027
309.0	0.022
310.0	0.019
311.0	0.015
312.0	0.011
313.0	0.009
314.0	0.006
315.0	0.005
316.0	0.003
317.0	0.001
318.0	-0.000
319.0	-0.000
320.0	-0.000
321.0	0.000

Fluoreszenzspektrum Verbindung 155:

Wellenlänge	Intensität	Wellenlänge	Intensität	Wellenlänge	Intensität
300.000000	26.082333	335.000000	546.931666	370.000000	714.351666
300.500000	26.786000	335.500000	559.569000	370.500000	706.879666
301.000000	27.817666	336.000000	571.780000	371.000000	699.083000
301.500000	29.186000	336.500000	583.577333	371.500000	690.917666
302.000000	30.875333	337.000000	595.038333	372.000000	682.521999
302.500000	32.866666	337.500000	606.303333	372.500000	674.157000
303.000000	35.152000	338.000000	617.558332	373.000000	666.061999
303.500000	37.738000	338.500000	628.944333	373.500000	658.343666
304.000000	40.641333	339.000000	640.437000	374.000000	650.972666
304.500000	43.885000	339.500000	651.817333	374.500000	643.830000
305.000000	47.482666	340.000000	662.771000	375.000000	636.736000
305.500000	51.408666	340.500000	673.049333	375.500000	629.465000
306.000000	55.576333	341.000000	682.570999	376.000000	621.810666
306.500000	59.861666	341.500000	691.415666	376.500000	613.692666
307.000000	64.154332	342.000000	699.732333	377.000000	605.236666
307.500000	68.387666	342.500000	707.643000	377.500000	596.710333
308.000000	72.517666	343.000000	715.207332	378.000000	588.350000
308.500000	76.498000	343.500000	722.441333	378.500000	580.218999
309.000000	80.281333	344.000000	729.342666	379.000000	572.232999
309.500000	83.838333	344.500000	735.877666	379.500000	564.307000
310.000000	87.167333	345.000000	741.976333	380.000000	556.439666
310.500000	90.295000	345.500000	747.598000	380.500000	548.679333
311.000000	93.278333	346.000000	752.826666	381.000000	541.032000
311.500000	96.205665	346.500000	757.887333	381.500000	533.410999
312.000000	99.179000	347.000000	763.012333	382.000000	525.661333
312.500000	102.295333	347.500000	768.268333	382.500000	517.647666
313.000000	105.648000	348.000000	773.496333	383.000000	509.357000
313.500000	109.333333	348.500000	778.446333	383.500000	500.946666
314.000000	113.449000	349.000000	782.986000	384.000000	492.671666
314.500000	118.065666	349.500000	787.195999	384.500000	484.725333
315.000000	123.202000	350.000000	791.256333	385.000000	477.124666
315.500000	128.829333	350.500000	795.227666	385.500000	469.717333
316.000000	134.912000	351.000000	798.952666	386.000000	462.291666
316.500000	141.444666	351.500000	802.175333	386.500000	454.691000
317.000000	148.456333	352.000000	804.752333	387.000000	446.890333
317.500000	155.972666	352.500000	806.766666	387.500000	439.006333
318.000000	163.965666	353.000000	808.468000	388.000000	431.236000
318.500000	172.341666	353.500000	810.127333	388.500000	423.745333
319.000000	180.975333	354.000000	811.922000	389.000000	416.550666
319.500000	189.768333	354.500000	813.896333	389.500000	409.505333
320.000000	198.700333	355.000000	815.962666	390.000000	402.422000
320.500000	207.834000	355.500000	817.920333	390.500000	395.232000
321.000000	217.278333	356.000000	819.529333	391.000000	388.021333
321.500000	227.122666	356.500000	820.636333	391.500000	380.923333
322.000000	237.395666	357.000000	821.278666	392.000000	373.997000
322.500000	248.060333	357.500000	821.654000	392.500000	367.219333
323.000000	259.035000	358.000000	821.956333	393.000000	360.570666
323.500000	270.212666	358.500000	822.189333	393.500000	354.090000
324.000000	281.473000	359.000000	822.110000	394.000000	347.822000
324.500000	292.709000	359.500000	821.352666	394.500000	341.727333
325.000000	303.859000	360.000000	819.642666	395.000000	335.668333
325.500000	314.923666	360.500000	816.951666	395.500000	329.506000
326.000000	325.953000	361.000000	813.496333	396.000000	323.214333
326.500000	337.021000	361.500000	809.616666	396.500000	316.894000
327.000000	348.201000	362.000000	805.633665	397.000000	310.685333
327.500000	359.547333	362.500000	801.763999	397.500000	304.686333
328.000000	371.089000	363.000000	798.089333	398.000000	298.921666
328.500000	382.830666	363.500000	794.529000	398.500000	293.353666
329.000000	394.768666	364.000000	790.820000	399.000000	287.900666
329.500000	406.898333	364.500000	786.590000	399.500000	282.480333
330.000000	419.208000	365.000000	781.557000	400.000000	277.066333
330.500000	431.672666	365.500000	775.732666	400.500000	271.713666
331.000000	444.242000	366.000000	769.413000	401.000000	266.532000
331.500000	456.850333	366.500000	762.946999	401.500000	261.621666
332.000000	469.451333	367.000000	756.482000	402.000000	257.029000
332.500000	482.068333	367.500000	749.930333	402.500000	252.736000
333.000000	494.789666	368.000000	743.146666	403.000000	248.666666
333.500000	507.702666	368.500000	736.102333	403.500000	244.700666
334.000000	520.801333	369.000000	728.900333	404.000000	240.696000
334.500000	533.948666	369.500000	721.650333	404.500000	236.539666

Wellenlänge	Intensität
405.000000	232.188666
405.500000	227.680000
406.000000	223.120666
406.500000	218.662000
407.000000	214.450000
407.500000	210.547000
408.000000	206.891666
408.500000	203.327666
409.000000	199.692333
409.500000	195.890666
410.000000	191.923000
410.500000	187.865333
411.000000	183.836333
411.500000	179.957333
412.000000	176.300666
412.500000	172.851000
413.000000	169.531000
413.500000	166.265000
414.000000	163.012000
414.500000	159.743000
415.000000	156.428333
415.500000	153.060666
416.000000	149.688000
416.500000	146.398666
417.000000	143.254333
417.500000	140.255666
418.000000	137.353666
418.500000	134.488000
419.000000	131.612000
419.500000	128.698666
420.000000	125.751666
420.500000	122.798666
421.000000	119.877666
421.500000	117.012666
422.000000	114.210333
422.500000	111.468666
423.000000	108.794666
423.500000	106.204333
424.000000	103.709333
424.500000	101.321666
425.000000	99.057999
425.500000	96.926999
426.000000	94.896666
426.500000	92.887000
427.000000	90.814333
427.500000	88.655000
428.000000	86.468333
428.500000	84.358333
429.000000	82.405333
429.500000	80.621666
430.000000	78.958333
430.500000	77.345665
431.000000	75.726333
431.500000	74.066999
432.000000	72.360665
432.500000	70.628998
433.000000	68.907666
433.500000	67.224999
434.000000	65.587666
434.500000	63.991666
435.000000	62.436333
435.500000	60.922000
436.000000	59.438000
436.500000	57.968999
437.000000	56.522000
437.500000	55.128666
438.000000	53.822333
438.500000	52.606333
439.000000	51.449000
439.500000	50.304333
440.000000	49.137666
440.500000	47.941000
441.000000	46.743333
441.500000	45.598333
442.000000	44.547333

Wellenlänge	Intensität
442.500000	43.583333
443.000000	42.657333
443.500000	41.732000
444.000000	40.825666
444.500000	39.987000
445.000000	39.233666
445.500000	38.525666
446.000000	37.804666
446.500000	37.051666
447.000000	36.284666
447.500000	35.519666
448.000000	34.743000
448.500000	33.929333
449.000000	33.073666
449.500000	32.199666
450.000000	31.352333
450.500000	30.580666
451.000000	29.920333
451.500000	29.374333
452.000000	28.900666
452.500000	28.425666
453.000000	27.876666
453.500000	27.225000
454.000000	26.505333
454.500000	25.787666
455.000000	25.133000
455.500000	24.557000
456.000000	24.034666
456.500000	23.531000
457.000000	23.024666
457.500000	22.515666
458.000000	22.012666
458.500000	21.525333
459.000000	21.057000
459.500000	20.598666
460.000000	20.132000
460.500000	19.632000
461.000000	19.091000
461.500000	18.537333
462.000000	18.024000
462.500000	17.597000
463.000000	17.261000
463.500000	16.971666
464.000000	16.666333
464.500000	16.306000
465.000000	15.896000
465.500000	15.474333
466.000000	15.080333
466.500000	14.730000
467.000000	14.414666
467.500000	14.115666
468.000000	13.823000
468.500000	13.543000
469.000000	13.286666
469.500000	13.048000
470.000000	12.795666
470.500000	12.495333
471.000000	12.143333
471.500000	11.774666
472.000000	11.436666
472.500000	11.151333
473.000000	10.911333
473.500000	10.692333
474.000000	10.472666
474.500000	10.242000
475.000000	10.000333
475.500000	9.760999
476.000000	9.542332
476.500000	9.359332
477.000000	9.212332
477.500000	9.089665
478.000000	8.973666
478.500000	8.843000
479.000000	8.677000
479.500000	8.463666

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. _____ bedanken, der mit Anregungen, Diskussionen und vielfältiger Unterstützung entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Außerdem möchte ich ihm herzlichst für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Freiheit, die er mir bei der Bearbeitung meiner Dissertation gewährte, danken. Darüberhinaus ermöglichte er mir sowohl die Teilnahme an einem postgradual Studium als auch an nationalen Symposien.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises und im speziellen bei den Kollegen die im Labor Süd angesiedelt waren und denen die am Mittagstisch teilgenommen haben bedanken. Sie haben durch ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau _____ und Frau _____ danke ich für die Durchführung der automatisierten Festphasensynthesen. Frau _____ und Herrn _____ sei für die Durchführung zahlreicher NMR-spektroskopischer Experimente gedankt. Ohne den Einsatz von Herrn _____ wären einige Strukturanalysen nicht möglich gewesen. Bei Frau _____ möchte ich mich für ihre präparative Unterstützung bedanken.

Bei meinen Kollegen _____, _____, _____ und _____ sowie bei Herrn _____ möchte ich für die massenspektrometrischen Messungen danken.

Herrn _____ danke ich sowohl für zahlreiche Diskussionen und Anregungen als auch für die spektroskopischen Untersuchungen der synthetisierten Farbstoffe.

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich Frau _____ und Herrn _____ für die sorgfältige Durchsicht meines Manuskripts.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken die mich während meiner kompletten Studienzeit unterstützt haben. Außerdem bin ich _____ für ihr Verständnis, ihre Zuneigung und ihre Unterstützung dankbar.