

**Synthese tumorassoziierter
Glycopeptidkonjugate basierend auf den
epithelialen Mucinen MUC1 und MUC4 als
potentielle Antitumorstoffe**

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

Torsten Becker
geboren in Mainz
Mainz, im Mai 2006

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von Oktober 2002 bis April 2006
am Institut für Organische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Horst Kunz angefertigt.

FÜR PETRA

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	IMMUNTHERAPIE GEGEN TUMORE	1
1.2	TUMORASSOZIIERTE ANTIGENE	2
1.3	FESTPHASENSYNTHESE VON (GLYCO-)PEPTIDEN.....	8
2	ZIELSETZUNG	12
3	ALLGEMEINER TEIL.....	15
3.1	SYNTHESE DER GLYCOSYLIERTEN THREONIN-BAUSTEINE FÜR DIE GLYCOPEPTIDSYNTHESE AN DER FESTEN PHASE.....	15
3.1.1	<i>Syntheseüberblick.....</i>	15
3.1.2	<i>Synthese des T_N-Antigen-Bausteins</i>	16
3.1.3	<i>Versuch der Synthese des T_N-Antigen-Bausteins durch Nitrogalactal-Verknüpfung</i>	20
3.1.4	<i>Synthese des (2,6)-ST_N-Antigen-Bausteins</i>	23
3.1.5	<i>Synthese des (2,3)-ST-Antigen-Bausteins.....</i>	29
3.2	KONJUGATION VON GLYCOPEPTIDEN MIT EINEM CARRIERPROTEIN	37
3.2.1	<i>Biologischer Hintergrund</i>	37
3.2.2	<i>Konjugationsstrategie</i>	41
3.2.3	<i>Synthese von geeigneten Linkern für die Glycopeptid-Protein-Konjugation</i>	42
3.2.4	<i>Das Allgemeine Protokoll der Festphasen(glyco)peptidsynthese</i>	46
3.2.5	<i>Synthese von Thiol-funktionalisierten Glycopeptiden</i>	49
3.2.6	<i>Deblockieren der Glycopeptide und Konjugation mit dem modifizierten BSA.....</i>	55
3.3	SYNTHESE VON DENDRIMEREN GLYCOPEPTIDEN	64
3.3.1	<i>Hintergrund.....</i>	64
3.3.2	<i>Synthese von dendrimeren (Glyco-)Peptiden.....</i>	66
3.4	SYNTHESE VON KONJUGATEN BESTEHEND AUS GLYCOPEPTID UND EINEM UNIVERSELLEN T-ZELL- EPITOP	74
3.4.1	<i>Hintergrund.....</i>	74
3.4.2	<i>Synthesestrategie.....</i>	75
3.4.3	<i>Synthese des orthogonal geschützten Lysins</i>	78
3.4.4	<i>Synthese von (Glyco-)Peptid-Heterotopen</i>	81
3.5	SYNTHESE VON GLYCOPEPTID-MITOGEN-KONJUGATEN	97
3.5.1	<i>Hintergrund.....</i>	97
3.5.2	<i>Synthese des Mitogens Pam₃Cys-OH.....</i>	98
3.5.3	<i>Versuche zur direkten Konjugation mit Glycopeptiden über eine Amidbindung.....</i>	99
3.5.4	<i>Anbindung über Thiol-Olefin-Addition</i>	106
4	ZUSAMMENFASSUNG	115

5	EXPERIMENTELLER TEIL	122
5.1	ALLGEMEINES UND MEßGERÄTE.....	122
5.2	SYNTHESE DER GLYCOSYLIERTEN AMINOSÄUREBAUSTEINE.....	126
5.2.1	<i>Synthese des T_N-Antigen-Bausteins</i>	126
5.2.2	<i>Versuchte Synthese des T_N-Antigen-Bausteins über Nitrogalactal-Verknüpfung</i>	133
5.2.3	<i>Synthese des Sialyl-T_N-Antigen-Bausteins</i>	138
5.2.4	<i>Synthese des (2,3)-Sialyl-T-Antigen-Bausteins</i>	149
5.3	SYNTHESE VON GLYCOPEPTID-PROTEIN-KONJUGATEN.....	161
5.3.1	<i>Synthese des Olefin- und des Thiol-Linkers</i>	161
5.3.2	<i>Synthese von Thiol-funktionalisierten Glycopeptiden und Konjugation mit BSA</i>	167
5.4	SYNTHESE DER DENDRIMEREN GLYCOPEPTIDE (MAPS).....	181
5.4.1	<i>Synthese des festphasengebundenen, tetrameren Lysin-Cores</i>	181
5.4.2	<i>Synthese der dendrimeren Glycopeptide</i>	183
5.5	SYNTHESE VON KONJUGATEN AUS GLYCOPEPTID UND T-ZELL-EPITOP.....	191
5.5.1	<i>Synthese von ivDde-Lys(Fmoc)-OH und Anbindung ans Harz</i>	191
5.5.2	<i>Synthese eines Fmoc-geschützten Ethylenglykol-Spacers</i>	194
5.5.3	<i>Synthese der Konjugate aus Glycopeptid und T-Zell-Epitop</i>	196
5.6	SYNTHESE VON PAM ₃ CYS-KONJUGATEN.....	211
5.6.1	<i>Synthese von Pam₃Cys-OH</i>	211
5.6.2	<i>Versuche zur direkten Verknüpfung</i>	216
5.6.3	<i>Mitogen-Konjugate durch Thiol-Olefin-Verknüpfung</i>	229
6	LITERATURVERZEICHNIS	240
7	SPEKTRENANHANG	247

Abkürzungsverzeichnis

α	Spezifischer Drehwert	DMSO	Dimethylsulfoxid
Abb.	Abbildung	dt	Dublett vom Triplett
absol.	absolut	DTT	Dithiothreitol
Ac	Acetyl	EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
AcOH	Essigsäure	EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid	EE	Ethylacetat, Essigsäureethylester
äq	äquatorial	EEDQ	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
ar	aromatisch	ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ax	axial	eq.	Äquivalent(e)
AS	Aminosäure	ESI	Electrospray Ionisation
BB	Breitband (entkoppeltes ¹³ C-Spektrum)	Et	Ethyl
BCR	B-Cell Receptor, B-Zell-Rezeptor	et al.	et alii
ber.	berechnet	Et ₂ O	Diethylether
Bn	Benzyl	Fmoc	9- <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	Gal	D-Galactose
bs	breites Singulett	GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)	gef.	gefunden
Bu	Butyl	gem	geminal
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl	ges.	gesättigt
Bzn	Benzyliden	Glc	D-Glucose
c	Konzentration	GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
COSY	Correlated Spectroscopy	h	Stunde(n)
CH	Cyclohexan	HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
d	Dublett, Tage	HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
Da	Dalton	HCTU	<i>O</i> -(6-Chlor-benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
δ	chemische Verschiebung	HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
DC	Dünnschichtchromatographie	HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
dd	Dublett vom Dublett	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett		
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer		
dest.	destilliert		
dhb	2,5-Dihydroxybenzoesäure		
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin		
DMAP	4-Dimethylaminopyridin		
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid		

HR-ESI	High Resolution Electrospray Ionisation	Pam ₃ Cys	<i>N</i> -Palmitoyl- <i>S</i> -(2,3-bispalmitoyloxy-(2 <i>R</i> , <i>S</i>)-propyl)-(R)-cystein
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	PE	Petrolether
Hz	Hertz	Ph	Phenyl
IIDQ	1-Isobutyloxycarbonyl-2-isobutoxy-1,2-dihydrochinolin	PHB	para-Hydroxy-benzylalkohol
Ig	Immunglobulin	Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
IL	Interleukin	ppm	parts per million
INF	Interferon	q	Quartett; quartär(er Kohlenstoff)
<i>i</i> Pr	Isopropyl	quant.	quantitativ
i. Vak.	im Vakuum	R	Rest
J	Kopplungskonstante	Raumtemp.	Raumtemperatur
kat.	katalytisch	R _f	Retentionsfaktor
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin	R _t	Retentionszeit
konz.	konzentriert	RP	Reversed Phase
λ	Wellenlänge	s	Singulett
Lit.	Literatur(wert)	SG	Schutzgruppe
m	Multipllett	Smp.	Schmelzpunkt
<i>m</i>	meta	Su	Succinimidyl
M	Molarität, Molekulare Masse	t	Triplett
Mal	Maleinimid	TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization	<i>tert</i>	tertiär
Me	Methyl	TsOH	para-Toluolsulfonsäure
MeOH	Methanol	<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
MHC	Major Histocompatibility Complex	TCR	<i>T-Cell-Receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
Min	Minute(n)	Tentagel	Polyethylenglycol-Polystyrol-Copolymer
Ms	Methansulfonyl	TFA	Trifluoressigsäure
MS	Molekularsieb, Massenspektrometrie	THF	Tetrahydrofuran
MSB	Methylsulphenylbromid	TIS	Triisopropylsilan
NeuNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-neuraminsäure	TOF	time of flight
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin	Trt	Trityl
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidin-2-on	<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	u. a.	und andere
<i>o</i>	ortho	UV	Ultraviolett
OAc	Acetat	vgl.	vergleiche
OEG	Oligoethylenglycol	vic.	vicinal
OTf	Trifluormethansulfonat, Triflat		
<i>p</i>	<i>para</i>		
p.a.	pro analysi		

Abkürzungen der verwendeten Aminosäuren:

Ala, A	Alanin
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
Cys, C	Cystein
F	Phenylalanin
Gly, G	Glycin
His, H	Histidin
Ile, I	Isoleucin
Leu, L	Leucin
Pro, P	Prolin
Ser, S	Serin
Thr, T	Threonin
Tyr, Y	Tyrosin
Val, V	Valin

1 Einleitung

1.1 Immuntherapie gegen Tumore¹⁻⁷

Trotz großer Forschungsbemühungen und intensiver Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten stellt Krebs heute immer noch eine der häufigsten Todesursachen dar. Unter Krebs versteht man das Auftreten von bösartigen Tumoren, bei denen Körperzellen unkontrolliert proliferieren und dadurch gesundes Gewebe verdrängen und zerstören.

Die moderne Medizin bedient sich im Kampf gegen Krebs prinzipiell dreier Möglichkeiten: Der chirurgischen Entfernung von Tumoren sowie der Bestrahlungs- und der Chemotherapie. Obwohl vielen Patienten mit einer dieser Methoden oder einer Kombination daraus geholfen werden kann, ist in zahllosen Fällen eine Heilung nicht möglich. So liegt die durchschnittliche Heilungsrate, bezogen auf alle Krebsformen bei ca. 30-40%⁸. Die beiden größten ungelösten Probleme bei den konventionellen Behandlungen sind einerseits die fehlende Selektivität der Maßnahmen (d. h. die Vernichtung von Tumorzellen, ohne gesundes Gewebe zu schädigen) und andererseits die nicht vollständige Zerstörung aller Krebszellen (ohne dass z. B. durch metastasierende Tumorzellen Sekundärtumore entstehen).

Eine alternative, potentiell sehr wirksame Therapiemöglichkeit würde die *Immuntherapie* darstellen. Kernpunkt dieser Strategie ist die Aktivierung des menschlichen Immunsystems mit dem Ziel, Tumorzellen gezielt und effektiv zu bekämpfen. Vor allem als unterstützende Maßnahme, nachdem die Tumorlast durch eine der konventionellen Behandlungsmethoden minimiert wurde, schreibt man ihr ein großes Potential zu⁹. Großer Vorteil hierbei wäre die hohe Selektivität, durch die sich Immunantworten auszeichnen, so dass gesundes Gewebe nicht in Mitleidenschaft gezogen würde und somit die oft erheblichen Nebenwirkungen der herkömmlichen Therapien zu verhindern wären. Weiterhin wäre eine solche Immunantwort nicht lokalisiert, sondern würde auch zur Zerstörung metastasierender Tumorzellen führen.

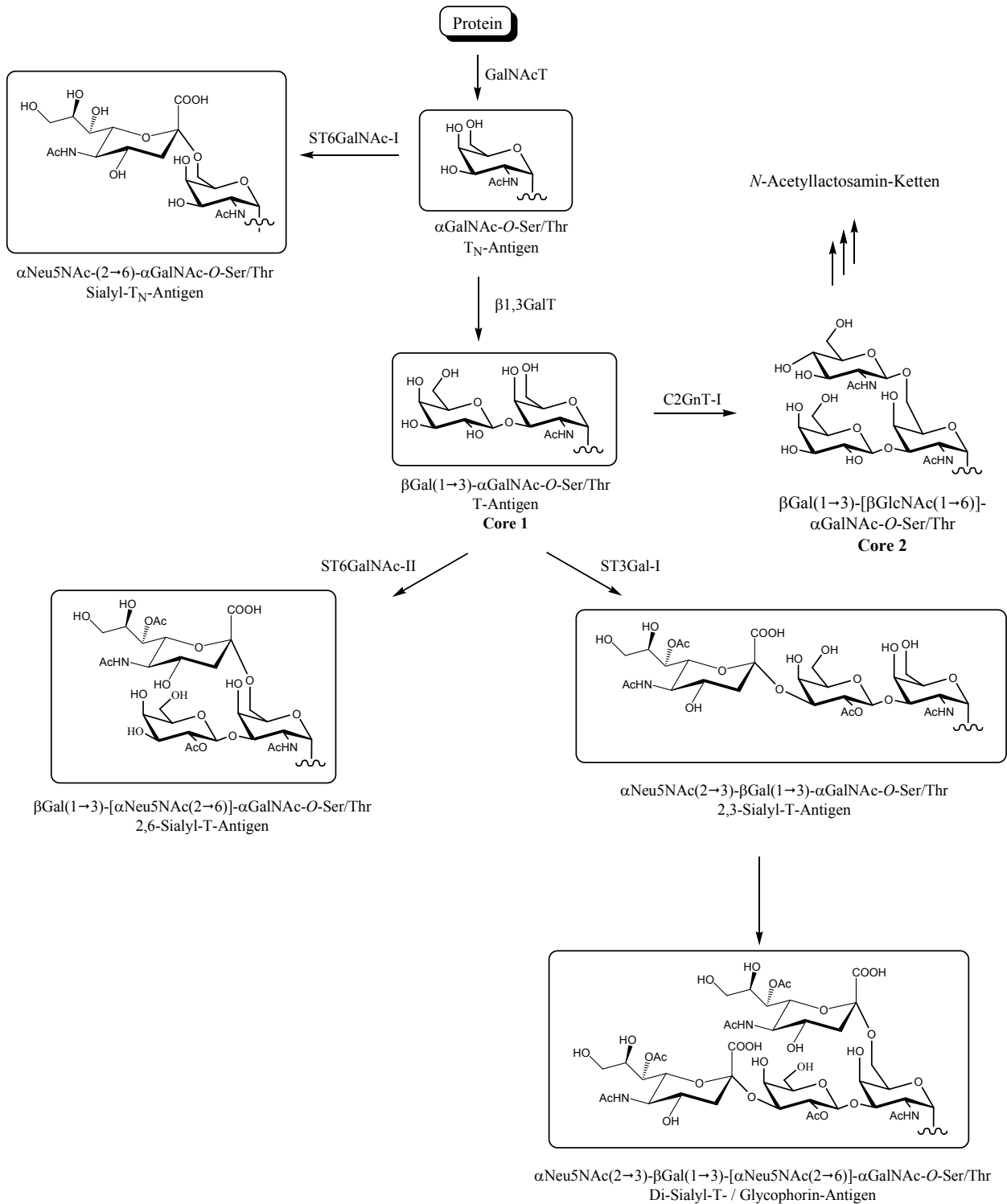
Neben einigen immuntherapeutischen Strategien wie z. B. der Verabreichung monoklonaler Antikörper oder der intratumoralen Injektion von Entzündungsmediatoren ist vor allem eine aktive Immunisierung unter Verwendung von Antitumorvakzinen sehr interessant. Hierdurch sollte eine starke Immunantwort induziert werden, welche spezifisch gegen Tumorzellen gerichtet ist. Durch Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses könnte außerdem ein erneutes Auftreten von gleichen Tumoren verhindert werden.

1.2 Tumorassoziierte Antigene

Zur Aktivierung des Immunsystems gegen Tumorzellen ist eine Vakzinierung mit entsprechenden Antigenen, die für Tumorzellen spezifisch sind, nötig. Problematisch hierbei ist, dass es sich bei Tumorzellen im Gegensatz zu Bakterien, Viren oder sonstigen Pathogenen um körpereigenes Material handelt. Gegenüber körpereigenem Gewebe besitzen die Bestandteile des Immunsystems aber notwendigerweise Toleranz, da sonst schwerwiegende Autoimmunerkrankungen auftreten würden. Es konnte jedoch eine Reihe von Molekülstrukturen auf der Oberfläche von Tumorzellen identifiziert werden, die von malignen verglichen mit gesunden Zellen in stark erhöhter Anzahl exprimiert werden. Da diese Strukturen zwar nicht spezifisch, aber sehr charakteristisch für Tumorzellen sind, spricht man von *Tumor-assoziierten Antigenen*. Eine wichtige Rolle hierbei spielen die Kohlenhydratstrukturen von Oberflächenglycoproteinen. Auf malignen Zellen werden veränderte Glycosylierungsmuster beobachtet^{10,11}, die als tumorassoziierte Epitope für die Krebsimmuntherapie sehr interessant sind¹². Eine Klasse solcher tumorassoziierter Kohlenhydratantigene sind die glycosidischen Strukturen, die auf Tumorzellen durch fehlerhafte Enzymaktivitäten in stark erhöhter Anzahl exprimiert werden.

Die *O*-Glycosylierung von Proteinen findet posttranslatorisch in verschiedenen Kompartimenten des Golgi-Apparates statt¹³. Durch sequentielle Glycosylierungsreaktionen werden komplexe Kohlenhydratseitenketten aufgebaut.

Zunächst wird *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) durch GalNAc-Transferasen auf die Hydroxyaminosäuren Serin oder Threonin übertragen¹⁴. In normalen Zellen schließt sich eine schrittweise Vergrößerung der Saccharidseitenketten unter Ausbildung von acht verschiedenen Kernstrukturen (*Core 1* bis *Core 8*)^{15,16} an. Eine Galactosylierung des *N*-Acetylgalactosamins durch eine β 1,3-Galactosyltransferase führt zur Bildung der *Core 1*-Struktur (β Gal(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)^{17,18}. Durch verschiedene β 1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferasen wird die *Core 1*-Struktur weiter glycosyliert. Beispielsweise führt die Übertragung von *N*-Acetylglucosamin durch C2GnT-I zur *Core 2*-Struktur (β Gal-(1 \rightarrow 3)-[β GlcNAc-(1 \rightarrow 6)] α GalNAc). Diese wird durch verschiedene Glycosyltransferasen in komplexe *N*-Acetylglucosaminseitenketten überführt¹⁹, welche anschließend im *trans*-Golgi durch Anknüpfung von Sialinsäure oder Fucose sowie durch Sulfatierung terminiert werden.



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
 ST6GalNAc-I: CMP-Neu5NAc:GalNAc-R α 2,6-Sialyltransferase-I
 ST6GalNAc-II: CMP-Neu5NAc:GalNAc-R α 2,6-Sialyltransferase-II

Abb. 1.1: Die O-Glycosylierung von Proteinen

In vielen malignen Zellen ist die Aktivität einiger Glycosyltransferasen, speziell der β 1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase C2GnT-I deutlich vermindert, was zu einer

Verringerung der Expression von auf *Core 2* basierenden Oligosaccharidstrukturen führt^{20,21}. Hingegen akkumulieren auf den Tumorzellen die *N*-Acetylgalactosamin- und die *Core 1*-Struktur, welche in ihrer tumorassoziierten Form auch als T_N - bzw. *T-Antigen* bezeichnet werden²². Überdies führt die in Tumorzellen erhöhte Aktivität von Sialyltransferasen zur vorzeitigen Sialylierung der Saccharidstrukturen^{23,24}, wodurch ein weiteres Wachsen der Glycanseitenketten unterbunden wird. Die Sialylierung des T_N -Antigens durch die α 2,6-Sialyltransferase ST6GalNAc-I führt zum tumorassoziierten *Sialyl- T_N -Antigen* (ST_N)²⁵, welches vorwiegend in Ovarial-, Mamma-, Darm- und Magenkarzinomen auftritt^{26,27}. Aus dem T-Antigen werden durch α ST3Gal-I bzw. α ST6GalNAc-II die beiden regioisomeren (2,3)-*Sialyl-T*- bzw. (2,6)-*Sialyl-T-Antigene* gebildet²⁸, die auf Leukozyten von Patienten mit akuter myeloider Leukämie nachgewiesen wurden^{29,30}. Das (2,3)-Sialyl-T-Antigen tritt außerdem auf Dickdarm-³¹ und Brustkrebszelllinien³² auf. In epithelialen Tumorzellen kann ferner die Übertragung einer weiteren Sialinsäure auf das (2,3)-Sialyl-T-Antigen unter Bildung des *Disialyl-T*- bzw. *Glycophorin-Antigens* stattfinden.

Saccharidische tumorassoziierte Antigene wurden zuerst auf *Mucinen*³³⁻³⁵ entdeckt^{10,36,37}. Hierbei handelt es sich um eine Familie hochmolekularer Glycoproteine, die von fast allen Epithelzellen exprimiert werden. Sie zeichnen sich durch einen sehr hohen Kohlenhydratanteil (50-90% der Gesamtmasse) sowie Domänen mit repetitiven Aminosäuresequenzen, den sogenannten *tandem repeats*, aus. Die tandem repeats, die zwischen 8 (MUC5) und 169 (MUC6) Aminosäuren umfassen, werden auch als *PTS-Region* bezeichnet, da sie einen hohen Anteil an Prolin, Threonin und Serin aufweisen. Obwohl die Aminosäurezusammensetzung verschiedener Mucine unterschiedlich ist, gleichen sie sich in ihrem Aufbau: Sie bestehen aus einer variablen Zahl der tandem repeats (*variable number of tandem repeats VNTR*), welche mit auf den oben beschriebenen Kernstrukturen basierenden Kohlenhydratseitenketten *O*-glycosyliert sind. Die bis heute bekannten siebzehn verschiedenen humanen Mucine lassen sich in sekretorische und membranständige Formen einteilen. Die sekretorischen Mucine bilden ein hochviskoses, über intermolekulare Disulfidbrücken verknüpftes oligomeres Sekret (*mucus*), welches den Epithelien des gastrointestinalen, respiratorischen und reproduktiven Traktes zum Schutz dient. Die membrangebundenen Mucine hingegen sind über eine hydrophobe Domäne in der Plasmamembran verankert und sind neben ihrer Schutzfunktion auch an Zelladhäsionsprozessen und der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt.

Das Mucin **MUC1**³⁸⁻⁴⁴ wurde als erstes Mucin durch monoklonale Antikörper aus humaner Milch isoliert. Es weist keine gewebspezifische Verteilung auf, sondern kommt ubiquitär auf Epithelzellen vor. MUC1 wird in Form eines Heterodimers exprimiert, wobei sich die beiden Proteinteile in ihrer Größe stark unterscheiden. Das größere der beiden Fragmente bildet die aus *tandem repeats* aufgebaute extrazelluläre Domäne. Die aus 20 Aminosäuren gebildete Sequenz dieser repetitiven Wiederholungseinheiten beinhaltet fünf potentielle *O*-Glycosylierungsstellen.

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

Abb. 1.2: Wiederholungseinheit des MUC1

Verursacht durch allelischen Polymorphismus variiert die Länge der extrazellulären Domäne sehr stark, sie besteht aus 20 bis 120 Wiederholungen der *tandem repeats*^{45,46}. Durch den hohen Anteil des helixbrechenden Prolins, der Vielzahl komplexer Kohlenhydratseitenketten und der durch die bei physiologischem pH-Wert deprotonierten Sialinsäure verursachten elektrostatischen Abstoßung nimmt MUC1 eine gestreckte Konformation ein⁴⁶, die weit (200-500 nm) in das Lumen hineinragt⁴⁷.

Das Mucin **MUC4**⁴⁸ wurde erstmals 1991 aus tracheobronchialen Gewebe isoliert⁴⁹. Außer in Trachea und Bronchien wird es u. a. in Lunge, Zervix und dem Gastrointestinaltrakt exprimiert. Auch das membranständige MUC4 bildet ein Heterodimer, welches sich aus der Muc4- α -Kette und der membranassoziierten MUC4- β -Kette zusammensetzt. Die *tandem repeat* Wiederholungseinheiten des MUC4 wird von 16 Aminosäuren gebildet und besteht zu fast 50% aus den potentiell *O*-glycosylierten Hydroxyaminosäuren Serin und Threonin.

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

Abb. 1.3: Wiederholungseinheit des MUC4

Bei MUC4 handelt es sich um das größte bisher bekannte Mucin, wobei es bedingt durch die vielen *O*-Glycane ebenfalls eine starre, gestreckte Konformation aufweist. Der extrazelluläre Teil ragt 1120-2120 nm über die Zellmembran hinaus und damit weiter als bei allen anderen bisher bekannten Oberflächenglycoproteinen. Daher wird vermutet, dass das membrangebundene MUC4 eine wichtige Rolle bei Zelladhäsions- und Zell-Zell-Kommunikationsprozessen spielt.

Im Vergleich mit gesunden Zellen ist bei Krebszellen die Expression von Mucinen stark erhöht⁵⁰⁻⁵². Außerdem ist die Expression nicht mehr auf die apicale Seite der Zelle beschränkt, vielmehr werden sie auf der gesamten Zelloberfläche exprimiert. Zusätzlich führt das Auftreten der vorher beschriebenen, verkürzten Kohlenhydratseitenketten²⁶ nicht mehr zu einer Abschirmung des Peptidrückgrates, wodurch neue, auf gesunden Zellen maskierte Peptidepitope für das Immunsystem zugänglich werden⁵⁰.

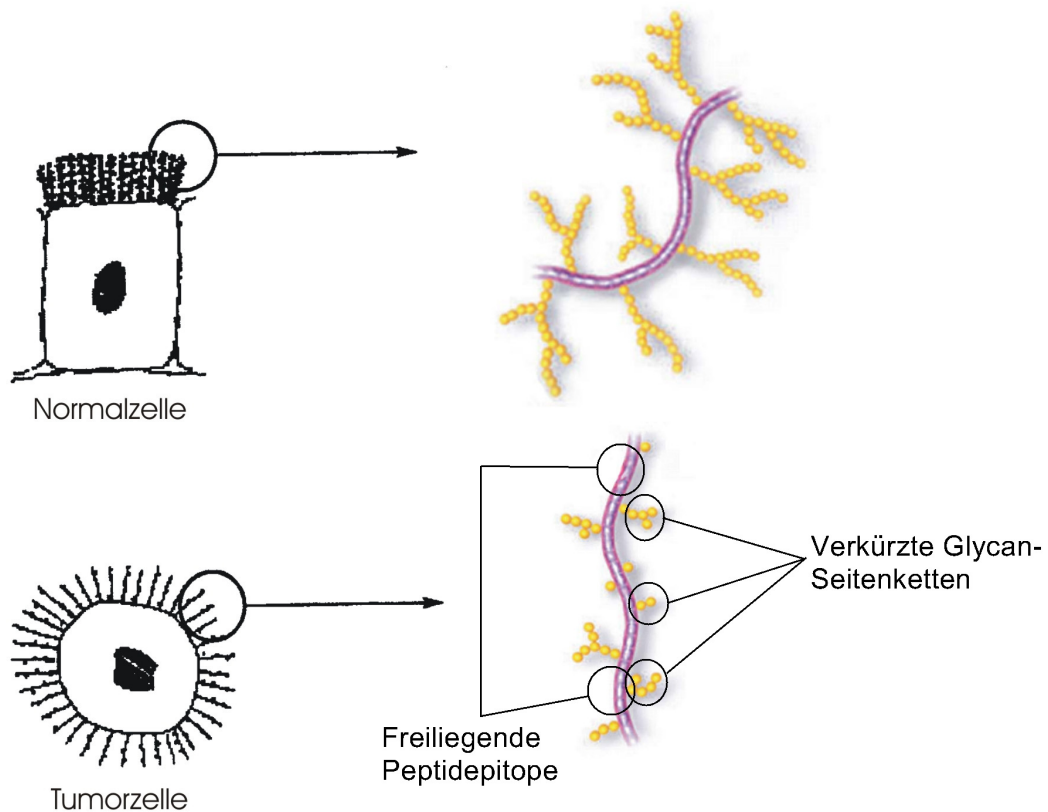


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Mucinstruktur auf gesunden und auf Tumorzellen

Neben den veränderten *O*-Glycanen stellen somit auch diese nun freien Peptidepitope tumorassoziierte Antigene dar.

Fraglich ist, warum trotz der Expression dieser tumorassoziierten Antigene die malignen Zellen nicht direkt vom Immunsystem erkannt und abgetötet werden. Tatsächlich können *in vivo* oft Immunantworten gegen Tumore festgestellt werden. So ist das neoplastische Gewebe oft stark von Lymphocyten infiltriert⁵³⁻⁵⁹. Diese TILs (tumor infiltrating lymphocytes) waren in der Lage, Melanom-Zelllinien *in vitro* zu lysieren. Im Serum von Krebspatienten lassen sich häufig Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene, wie die MUC1 tandem repeat Sequenz, nachweisen⁶⁰⁻⁶⁴. Besonders immunogen hierbei scheint das PDTRPAP-Motiv zu sein^{65,66}, welches eine hoch definierte turn-Struktur bildet, die aus dem gestreckten Peptid-Rückgrat herausragt und somit für die Komponenten des Immunsystems leicht zugänglich ist.

Diese immundominante Domäne wird von verschiedenen, gegen MUC1 gerichteten monoklonalen Antikörpern erkannt. Eine starke Immunantwort gegen MUC1 wird mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit in Zusammenhang gebracht⁶⁷.

Tumorzellen entwickeln jedoch Strategien, um der Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen. So verhindern einige Tumoren die Entwicklung einer Entzündungsreaktion durch Sekretion von Cytokinen wie IL-10 oder dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (*vaskular endothelial growth factor, VEGF*), welche die Aktivierung und Differenzierung von Lymphocyten sowie die Produktion pro-inflammatorischer Lymphokine unterbinden. Auch wenn Krebszellen von Lymphocyten erkannt werden, kann das Fehlen costimulatorischer Signale zur Anergisierung dieser Lymphocyten und damit zur Toleranz führen⁶⁸. Weiterhin zeigen Tumorzellen oft eine verminderte Expression von MHC-Molekülen⁶⁹, wodurch die Präsentation der tumorassoziierten Antigene nur unzureichend möglich ist. MUC1 übt außerdem, vor allem wenn es von Tumorzellen in löslicher Form in das Serum abgegeben wird, eine immunsuppressive Wirkung aus^{70,71}. Eine starke Expression und Sekretion von MUC1 durch Krebszellen kann mit einem hohen Metastasierungspotential und daher einer schlechten Prognose assoziiert werden⁷²⁻⁷⁵.

Somit ist das Immunsystem in der Regel nicht oder nur unzureichend in der Lage, Krebszellen zu erkennen und zu zerstören.

Ziel der Immuntherapie ist es, diese Toleranz des Immunsystems gegenüber den Krebszellen zu brechen und eine starke, selektiv gegen Tumorzellen gerichtete Immunantwort zu induzieren. Durch chemische Synthese hergestellte Vakzine⁷, welche auf den tumorassoziierten tandem repeat Sequenzen der Mucine sowie den beschriebenen entarteten Kohlenhydratstrukturen basierende Glycopeptide enthalten, stellen einen vielversprechenden Ansatz zur Immuntherapie dar. Gerade diese Kombination aus tumorassoziiertes Kohlenhydratseitenkette *und* tumorassoziiertes Peptidsequenz sollte eine selektivere Immunantwort zur Folge haben, als sie jede der beiden Teilstrukturen allein auslösen könnte⁷⁶⁻⁷⁹. Idealerweise findet hierbei sowohl eine Aktivierung von cytotoxischen Zellen als auch eine von T_H-Zellen vermittelte Produktion von spezifischen Antikörpern durch B-Lymphocyten statt. Durch chemische Synthese hergestellte Glycopeptid-Vakzine mit definierter Struktur⁸⁰ sind für Immunisierungsexperimente vorteilhafter als aus natürlichen Quellen aufgereinigte Glycoproteine, da sie deren große Mikroheterogenität, welche Ergebnisse leicht verfälschen kann, nicht aufweisen.

1.3 Festphasensynthese von (Glyco-)Peptiden

Glycopeptide mit chemisch exakt definierten Strukturen sind durch biochemische oder gentechnologische Techniken nur schwer erhältlich, da bei der Biosynthese die Glycosylierung ein posttranslatorischer Prozess ist. Andererseits sind solche Peptide auch nicht durch Gewinnung und Reinigung aus natürlichen Quellen isolierbar, da insbesondere die saccharidischen Strukturen eine Mikroheterogenität aufweisen und somit hochreine Glycopeptidstrukturen auf diese Weise nicht zugänglich sind. Diese sind jedoch für Immunisierungs- und Vakzinierungsexperimente unbedingte Voraussetzung. So bleibt nur die chemische Synthese als Zugang zu solchen exakt definierten Glycopeptiden.

Die Glycopeptidsynthese kann grundsätzlich in Lösung oder an der festen Phase durchgeführt werden, wobei sich gerade zum Aufbau komplizierter Strukturen die Festphasenpeptidsynthese⁸¹ durchgesetzt hat. Sie geht zurück auf die Pionierarbeiten von *R. B. Merrifield*⁸² (Nobelpreis 1983). Kernpunkt dieser Strategie ist, dass die Startaminosäure an eine polymere Matrix gebunden vorliegt. In iterativen Schritten wird eine *N*-geschützte Aminosäure gekuppelt, der *N*-Terminus deblockiert und die nächste Aminosäure angebunden. Durch diese sequentielle Vorgehensweise können auch längere Peptide relativ schnell aufgebaut werden. Großer Vorteil hierbei ist, dass die in Lösung vorliegenden Reagenzien durch einfaches Filtrieren und Waschen von der am unlöslichen Polymer immobilisierten Peptidkette abgetrennt werden können. Hierdurch entfallen aufwendige Reinigungsschritte für die Zwischenstufen. Der Einsatz größerer Reagenzienüberschüsse ist leicht zu realisieren und ermöglicht somit hohe Ausbeuten in den einzelnen Kupplungsschritten. Ein weiterer Vorteil ist die leichte Automatisierbarkeit der gesamten sequentiellen Peptidsynthese.

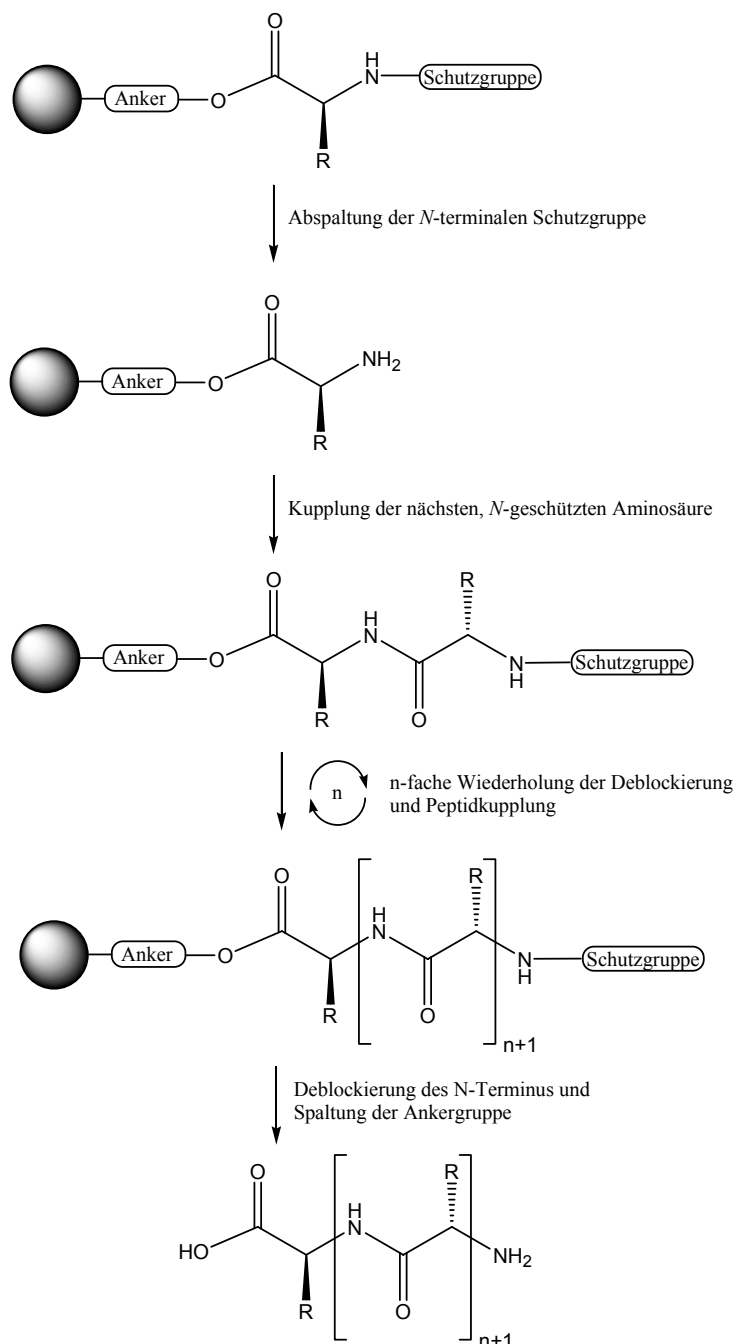


Abb. 1.5: Prinzip der sequentiellen Festphasenpeptidsynthese

In Abhängigkeit von der für die Blockierung des *N*-Terminus verwendeten Schutzgruppe unterscheidet man hauptsächlich zwei Synthesestrategien: Bei der *Boc-Strategie* kommt die säurelabile *tert*-Butyloxycarbonyl-(*Boc*)Gruppe^{83,84} als temporäre Aminoschutzgruppe zum Einsatz. Die Abspaltung erfolgt durch 20-50%ige Trifluoressigsäure. Ein Nachteil dieser Synthesetaktik ist, dass viele glycosidische Bindungen säureempfindlich sind⁸⁵. Auch kann es durch Spaltung der Peptidbindungen während der wiederholten Säurebehandlung zu Ausbeuteverlusten kommen. Diese und weitere Nachteile haben dazu geführt, dass die *Boc-Strategie* heutzutage weniger Anwendung findet. Eine Alternative stellt die

Fmoc-Strategie^{86,87} dar. Hier dient die basenlabile Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-Gruppe⁸⁸⁻⁹⁰ zum temporären Schutz des Aminoterminus. Die Spaltung erfolgt durch sekundäre Basen wie Piperidin⁹¹ oder Morpholin⁹². Da diese Synthesetaktik unter milderen Bedingungen erfolgt, stellt sie die heute am häufigsten genutzte Methodik dar.

Um Nebenreaktionen während der Peptidsynthese zu vermeiden, müssen sämtliche Seitenkettenfunktionalitäten der eingesetzten Aminosäuren durch zur jeweiligen Synthesestrategie orthogonale Schutzgruppen⁹³ blockiert sein. Bei der Fmoc-Strategie werden üblicherweise säurelabile Schutzgruppen wie z.B. *tert*-Butyl- oder Trityl- verwendet. Die Boc-Strategie hingegen wird typischerweise mit hydrogenolytisch abspaltbaren Benzyl-Schutzgruppen durchgeführt. Entsprechende geschützte Aminosäurederivate mit verschiedenen Schutzgruppenmustern sind kommerziell erhältlich.

Um nach erfolgter Synthese das gewünschte Peptid leicht vom polymeren Träger ablösen zu können, erfolgt die Verankerung der Startaminosäure über eine Ankergruppe⁹⁴, die selektiv und unter möglichst milden Bedingungen gespalten werden kann, ohne dass die Amidbindungen des Peptides gefährdet werden. In der Fmoc-Strategie sind säurelabile Ankergruppen, wie der Wang-⁹⁵ (*p*-Hydroxybenzylalkohol, PHB) oder der Trityl-Linker^{96,97} gebräuchlich. Diese lassen sich mit Trifluoressigsäure spalten, wobei sämtliche säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen ebenfalls entfernt werden. Diese simultane Abspaltung und Deblockierung spart weitere Reaktions- und Reinigungsschritte. Falls nötig, kann der Trityl-Anker auch bereits durch verdünnte Trifluoressigsäure gespalten werden, wodurch der Zugang zu Peptiden mit geschützten Seitenkettenfunktionalitäten ermöglicht wird. Darüber hinaus kann heute je nach Verwendungszweck aus einer Vielzahl an Ankergruppen mit unterschiedlichsten Abspaltungsbedingungen gewählt werden.

Zur *in situ*-Aktivierung der Aminosäurebausteine für die Kupplungsreaktion gibt es eine Vielzahl von Kupplungsreagenzien^{98,99}. Vorwiegend eingesetzt werden heute Uroniumsalze wie *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU)¹⁰⁰ oder *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)^{101,102}. Diese sind den früher häufig verwendeten Carbodiimiden wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)¹⁰³, Diisopropylcarbodiimid (DIC) oder *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC)¹⁰⁴ sowohl in der Reaktivität als auch in der Unterdrückung von Racemisierung überlegen. Überdies entsteht bei der Kupplung mit DCC schwerlöslicher Dicyclohexylharnstoff, der sich nur schwer vom polymeren Träger abtrennen lässt.

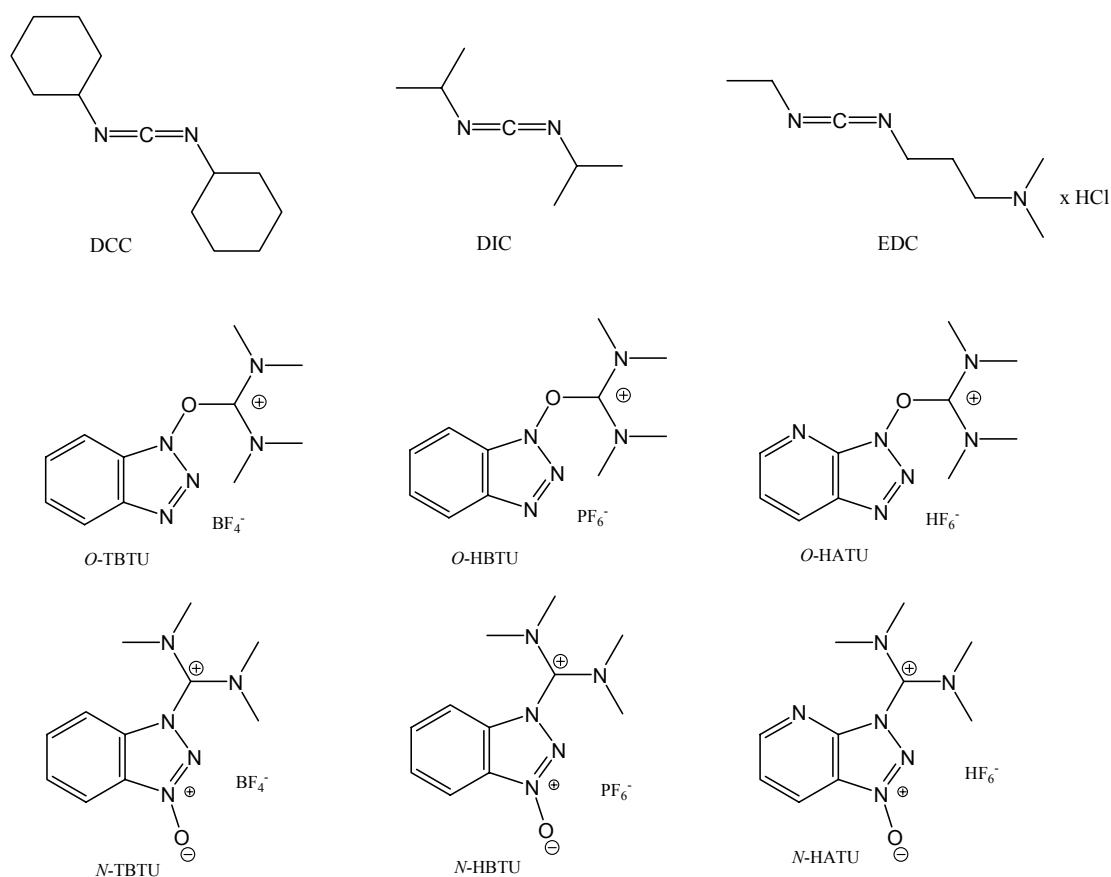


Abb. 1.6: Gängige Kupplungsreagenzien

O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU)^{105,106} stellt das effektivste, aber auch teuerste Uroniumsalz dar. Durch Röntgenstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass HBTU und HATU tatsächlich nicht als Uroniumsalze (*O*-HxTU) sondern als Guanidiniumverbindungen (*N*-HxTU) vorliegen^{107,108}. Zur Beschleunigung der Reaktion werden 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)¹⁰⁹ bzw. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt)¹¹⁰ als Additive zugesetzt. Dies sorgt zudem für eine weitere Herabsetzung der Racemisierungsgefahr.

Die effektivste Strategie für die Synthese von *Glycopeptiden* besteht in der Verwendung von glycosylierten Aminosäurebausteinen¹¹¹ in der normalen Festphasenpeptidsynthese. Die funktionellen Gruppen der saccharidischen Strukturen müssen hierbei durch geeignete, zur Fmoc-Strategie orthogonale Schutzgruppen blockiert werden, um Nebenreaktionen bei der Peptidsynthese auszuschließen. Die gebräuchlichsten Schutzgruppen hierfür sind Acyl- (vor allem Acetyl) und Benzylschutzgruppen. Nach Abspaltung des *Glycopeptids* vom Harz können die Benzylgruppen hydrogenolytisch und die Acetylreste durch basische Verseifung oder Umesterung entfernt werden.

2 Zielsetzung

Glycopeptide, die Partialstrukturen tumorassoziierter Oberflächenglycoproteine darstellen, sind vielversprechende Ausgangssubstanzen für die Krebsimmuntherapie. Durch Vakzinierung mit solchen Glycopeptiden erhofft man sich, eine starke Immunantwort gegen Krebszellen zu bewirken. Jedoch lösen solch relativ kleine Moleküle (sogenannte *Haptene*) meistens keine oder nur eine sehr schwache Immunantwort aus, welche nicht in der Lage ist, die Toleranz des Immunsystems gegenüber Krebszellen zu brechen.

Die Aktivierung von naiven B-Zellen, welche die Proliferation und Differenzierung zu Antikörper-seziernden Plasmazellen zur Folge hat, benötigt neben der Bindung des spezifischen Antigens an den B-Zell-Rezeptor auch die Stimulation durch aktivierte T-Helfer-Zellen¹¹². Die Haptene werden zwar von den für sie spezifischen B-Lymphocyten erkannt, jedoch enthalten sie normalerweise keine T-Zell-Epitope, so dass keine Aktivierung von T_H-Lymphocyten stattfindet.

Es ist daher nötig, diese Haptene durch Modifikationen immunogener zu gestalten, um eine starke Immunantwort zu erzielen. Ziel dieser Arbeit ist die Synthese von Glycopeptiden basierend auf den tumorassozierten tandem repeat-Sequenzen der Mucine MUC1 und MUC4, welche außerdem noch tumorassozierte Kohlenhydratseitenketten tragen.

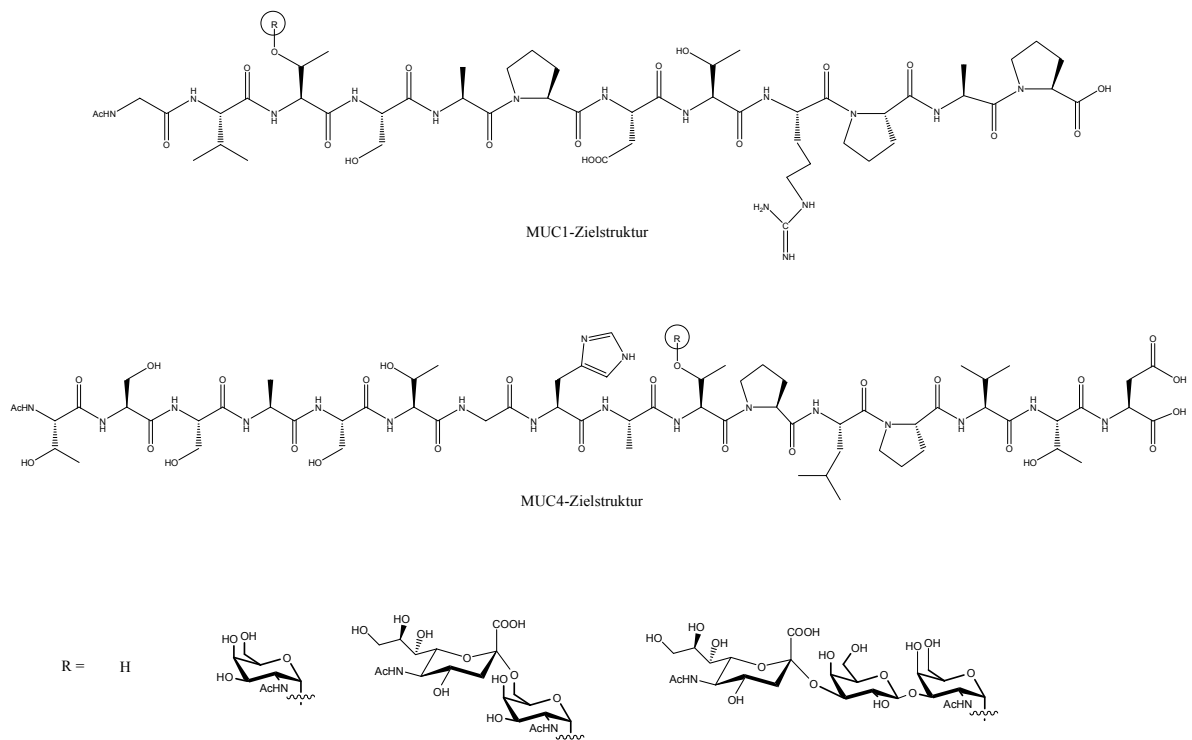


Abb. 2.1: Glycopeptid-Zielstrukturen

Hierzu ist zunächst die Darstellung von glycosylierten Aminosäurebausteinen¹¹¹ notwendig, welche zur Festphasensynthese der Glycopeptide nach der Fmoc-Strategie verwendet werden können.

Die Glyosylierung des MUC1-Peptides soll hierbei am Thr(3) erfolgen, welches die immundominante Domäne PDTRPAP flankiert. Auf diese Weise soll eine Beeinflussung der Konformation dieses Peptidabschnittes durch die Glycanseitenkette verhindert werden. Ein weiterer Grund für die Wahl dieser Glycosylierungsstelle ist die Beobachtung, dass in den tandem repeats der Mucine sehr häufig die Aminosäuresequenz **-Thr^{*}-AS-AS-Pro-** mit einem Prolin in Nachbarschaft zur glycosylierten Aminosäure auftritt⁴⁸. Es wird vermutet, dass die Erkennung dieses Threonins durch die Glycosyltransferase und daher auch die Glycosylierung von dem durch das Prolin induzierten β -Turn der Proteinkette abhängt. Damit auch in den MUC4-Modellverbindungen eine solche Struktur vorliegt, ist die Glycosylierung des MUC4-Peptides am Thr(10) geplant.

Diese Glycopeptide sollen in eine immunogenere Form überführt werden, um sie als mögliche Anti-Tumor-Vakzine zu nutzen.

Die älteste, heute immer noch sehr häufig genutzte Methode hierfür ist die kovalente Bindung der Haptene an *Carrier-Proteine*^{113,114}. Nach der Prozessierung solcher Konjugate durch antigenpräsentierende Zellen werden nicht nur Fragmente des Haptens, sondern auch Peptidfragmente von T-Zell-Epitopen, welche aus dem Trägerprotein stammen, über MHCII-Komplexe präsentiert. Hierdurch wird die Aktivierung von T_H-Zellen möglich, welche wiederum auch die B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung anregen.

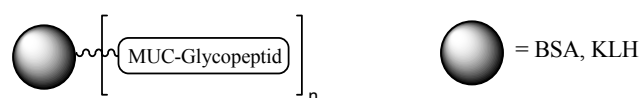


Abb. 2.2: Schematische Darstellung von Carrierprotein-Glycopeptid-Konjugaten

Die dargestellten Glycopeptide sollen daher an Trägerproteine wie Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin, BSA*)¹¹⁵ oder das Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke (*keyhole limpet hemocyanin, KLH*)¹¹⁶ angebunden werden, um eine robuste Immunantwort zu erzielen. Die Konjugation der multifunktionellen Glycopeptide soll durch eine hoch chemoselektive Reaktion erfolgen, um zu definierten Konjugaten zu gelangen.

Darüber hinaus sollen noch weitere Methoden zur Steigerung der Immunogenität der Glycopeptide angewendet werden. Hierzu zählt die Synthese von dendrimeren Glycopeptiden nach der *MAP*-Methodik von Tam¹¹⁷, mit der schon häufig Immunantworten gegen Peptide erzeugt werden konnten.

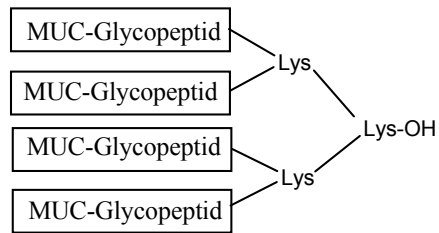


Abb. 2.3: Schema MAPs

Weiterhin sollen durch die Konjugation der Glycopeptide an ein Mitogen oder ein universelles T-Zell-Epitop vollsynthetische, chemisch exakt definierte Vakzinkandidaten für Immunisierungsexperimente dargestellt werden. Die Konjugation soll hierbei über ein nicht immunogenes Spacermolekül erfolgen.

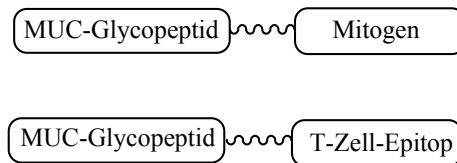


Abb. 2.4: Schema Mitogen- bzw. T Epitop-Komjugate

3 Allgemeiner Teil

3.1 Synthese der glycosylierten Threonin-Bausteine für die Glycopeptid-synthese an der festen Phase

3.1.1 Syntheseüberblick

Die Synthese der mit tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigenen glycosylierten Threonin-Bausteine erfolgt nach einer etablierten Strategie^{48,118}. Hierbei wird ein biomimetischer Ansatz verfolgt, bei dem zunächst ein zentrales *N*-Acetylgalactosamin-Threonin-Konjugat¹¹⁹ dargestellt wird. Dieses lässt sich entweder zum T_N-Antigen-Baustein deblockieren oder durch weitere lineare Synthese schrittweise zum Sialyl-T_N-, T- oder den beiden regioisomeren Sialyl-T-Bausteinen erweitern.

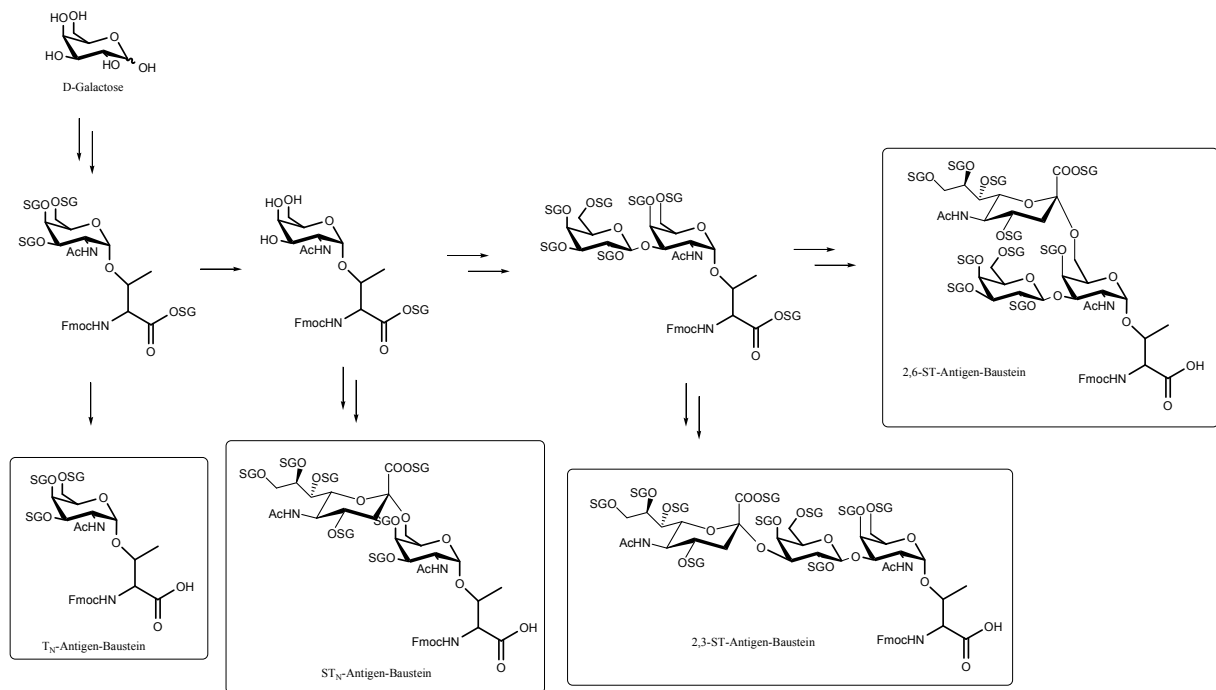


Abb. 3.1: Überblick über die biomimetische Synthese

Durch diesen biomimetischen Ansatz sind alle tumorassoziierten Antigenstrukturen der Glycophorinfamilie aus gemeinsamen Vorstufen unter minimalen Schutzgruppenmanipulationen zugänglich. Ein weiteres positives Merkmal dieser Strategie ist die Einführung der sehr teuren Sialinsäure in jeweils einem der letzten Schritte der Synthesen.

Die Antigen-Bausteine sind hierbei im Saccharidteil mit zur Fmoc-Gruppe orthogonalen Schutzgruppen versehen, so dass sie direkt zur Festphasen-Synthese von Glycopeptiden nach der üblichen Fmoc-Strategie verwendet werden können. Hierfür werden hauptsächlich

Acetylschutzgruppen verwendet, da sie die empfindlichen glycosidischen Bindungen stabilisieren¹²⁰. Erst dadurch wird die Spaltung säurelabiler Seitenkettenschutzgruppen oder Anker durch Trifluoressigsäure möglich. Nach erfolgter Peptidsynthese lassen sich die Acetylschutzgruppen unter sehr milden Bedingungen durch Umesterung nach *Zemplén*¹²¹ entfernen.

Bei den Synthesen von Glycopeptiden in dieser Arbeit werden der T_N-, der ST_N- und der (2,3)-ST-Antigen-Baustein verwendet. Diese beiden sialylierten Antigene weisen die größte Tumorspezifität der beschriebenen Kohlenhydratantigene auf und sind daher von besonderem Interesse für die Entwicklung von Antitumorvakzinen.

3.1.2 Synthese des T_N-Antigen-Bausteins

Zur Synthese des zentralen *N*-Acetylgalactosamin-Bausteins ist zunächst die Darstellung eines geschützten Threonin-Derivates nötig, welches anschließend mit einem geeigneten Glycosyldonor umgesetzt werden kann.

Da die spätere Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie erfolgen wird, empfiehlt es sich, die Fmoc-Schutzgruppe zum Blockieren der Aminofunktion bereits früh einzuführen. Dies gelingt durch Umsetzen von L-Threonin mit *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu)¹²² in fast quantitativer Ausbeute. Die Carboxylfunktion von (1) muss nun mit einer zu Fmoc orthogonalen Schutzgruppe versehen werden. Ein Benzylester¹²³ erfüllt diese Anforderung und lässt sich durch Reaktion mit Benzylbromid in hoher Ausbeute darstellen.

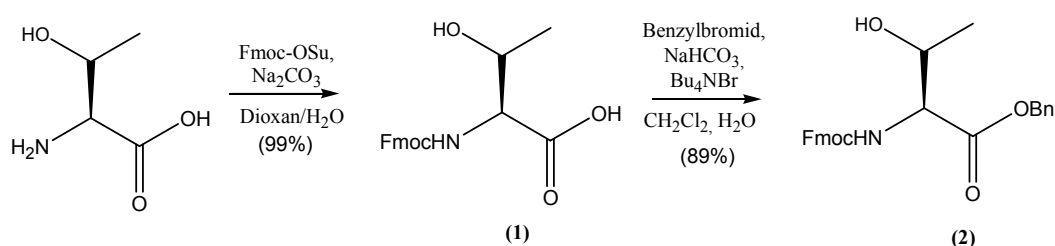


Abb. 3.2: Synthese Fmoc-Thr-OBn

Die Synthese eines für die folgende Glycosylierungsreaktion geeigneten Donors erfolgt in fünf Stufen ausgehend von D-Galactose. Diese wird zunächst mittels Acetanhydrid/Pyridin peracetyliert und anschließend durch aus Acetylbromid und Wasser *in situ* erzeugten Bromwasserstoff in Eisessig in das anomere Bromid überführt. Durch reduktive Eliminierung mit aktiviertem Zinkstaub in Essigsäure lässt sich aus diesem in hoher Ausbeute das 3,4,6-Triacetylgalactal (4) darstellen¹²⁴.

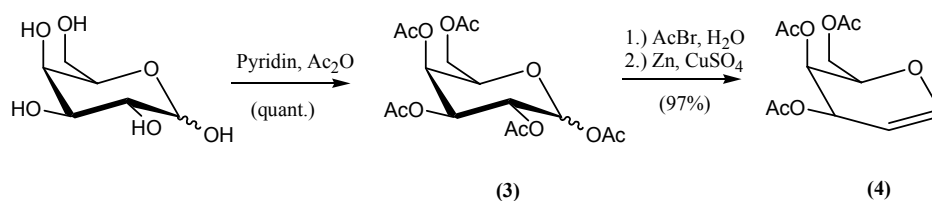


Abb. 3.3: Synthese Galactal

Zum Einführen einer maskierten Aminogruppe in 2-Position wird das Azidonitratisierungs-Verfahren nach *Lemieux*¹²⁵ benutzt: Durch Umsetzen des Galactals (4) mit Cer(IV)ammoniumnitrat und Natriumazid in Acetonitril bei -25°C gelingt das regio- und stereoselektive Einführen einer Azidfunktion, welche später durch Reduktion leicht in die gewünschte Aminogruppe überführt werden kann.

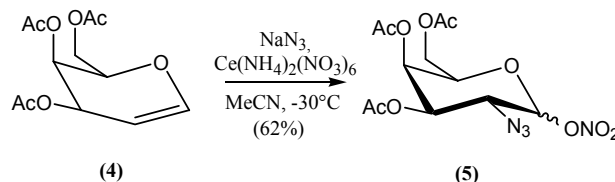


Abb. 3.4: Azidonitratisierung

Nach einem von *Lemieux* vorgeschlagenen Mechanismus¹²⁶ geht man von einem radikalischen Ablauf dieser Reaktion aus: Das Azid-Ion wird zunächst von einem Äquivalent Cer(IV)ammoniumnitrat zum Azidradikal oxidiert. Dieses greift nun elektrophil die elektronenreiche Doppelbindung (es handelt sich hierbei um einen Enolether) des Galactals an, wobei es hierbei die energetisch günstigere äquatoriale Position bevorzugt. Das entstehende anomere Radikal wird von einem weiteren Äquivalent Cer(IV)ammoniumnitrat zum Kation oxidiert. Die Stabilisierung des Kations durch die freien Elektronenpaare des Ringsauerstoffs erklärt die hohe Regioselektivität der Reaktion. Das Kation reagiert anschließend mit einem Nitrat-Anion zum gewünschten Azidonitrat, welches als Anomerengemisch anfällt.

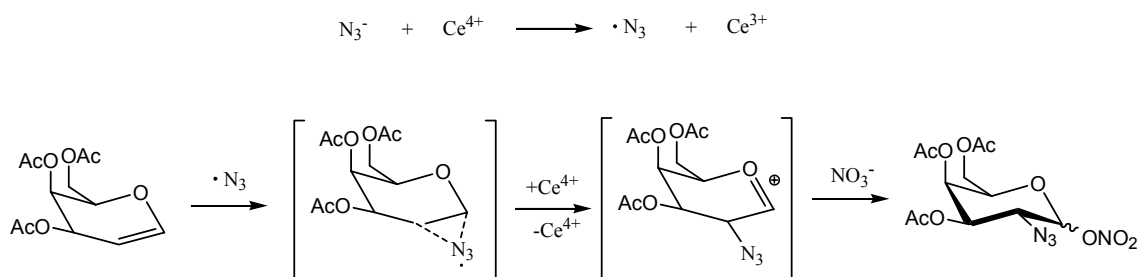


Abb. 3.5: Mechanismus der Azidonitratisierung

Das Azidonitrat (**5**) ist sehr hydrolyseempfindlich, besonders wenn es an Kieselgel adsorbiert vorliegt¹²⁴. Die flashchromatographische Reinigung sollte daher sehr zügig durchgeführt werden. In gereinigtem Zustand lässt sich (**5**) jedoch im Tiefkühlschrank und unter Argon mehrere Wochen lang aufbewahren, ohne dass Zersetzung auftritt.

Die Umwandlung in einen geeigneten Glycosyldonor gelingt durch Reaktion des Anomerengemisches mit wasserfreiem Lithiumbromid in Acetonitril¹²⁷. Diese Substitution verläuft durch den anomeren Effekt stereokonvergent, es wird ausschließlich das α -Anomer (**6**) gebildet.

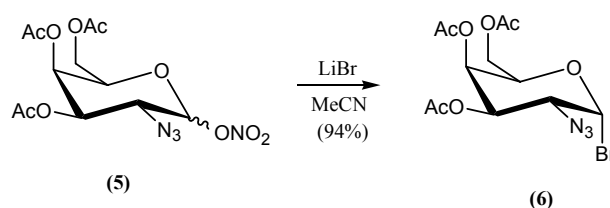


Abb. 3.6: Synthese Galactosylbromid

Obwohl neuere Erkenntnisse zeigen, dass das anomere Bromid (**6**) chromatographisch gereinigt werden kann und in gereinigter Form auch längere Zeit unzersetzt lagerbar ist¹²⁸, wird das Rohprodukt direkt in der folgenden Glycosylierungsreaktion eingesetzt. Diese erfolgt nach einer von *Paulsen* und *Hölck*¹²⁹ eingeführten Variante der *Koenigs-Knorr*-Glycosylierung¹³⁰. Hierbei wird ein Gemisch aus wasserfreiem Silber(I)perchlorat und Silber(I)carbonat zur Aktivierung des Bromids (**6**) verwendet^{131,132}.

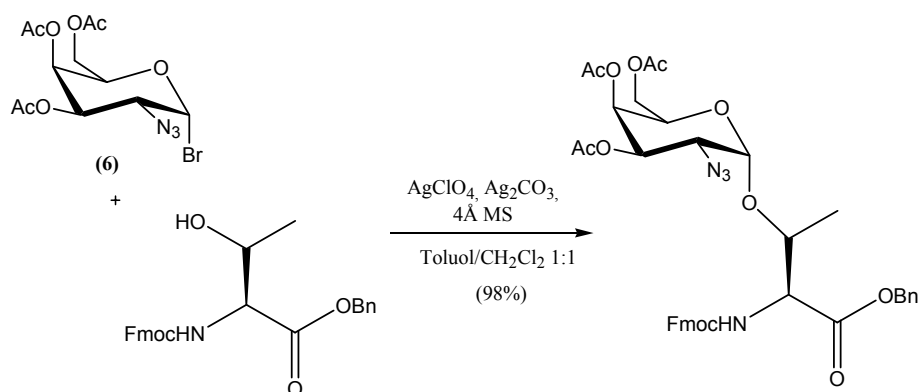


Abb. 3.7: Koenigs-Knorr-Glycosylierung

Da die Azidfunktion nicht nachbargruppenaktiv ist, entsteht aufgrund des anomeren Effektes hauptsächlich das gewünschte α -Anomer (**7**). Nach flashchromatographischer Reinigung kann das Produkt anomerenrein und in hoher Ausbeute isoliert werden.

Durch reduktive Acetylierung mit Zinkstaub in einem THF/Acetanhydrid/Essigsäure-Gemisch lässt sich anschließend die Azidfunktion in eine Acetamidogruppe umwandeln¹³³.

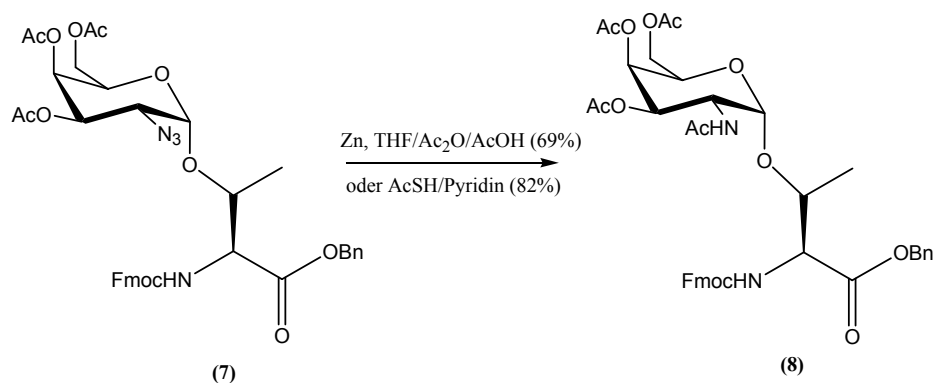


Abb. 3.8: Reduktive Acetylierung

Alternativ lässt sich diese Umsetzung auch mit einem Gemisch aus Pyridin und frisch destillierter Thioessigsäure erzielen¹³⁴. Das gewünschte *N*-Acetylgalactosamin-Threonin-Konjugat (**8**) wird in hoher Ausbeute erhalten.

Der Benzylester wird nun hydrogenolytisch mit Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre gespalten.

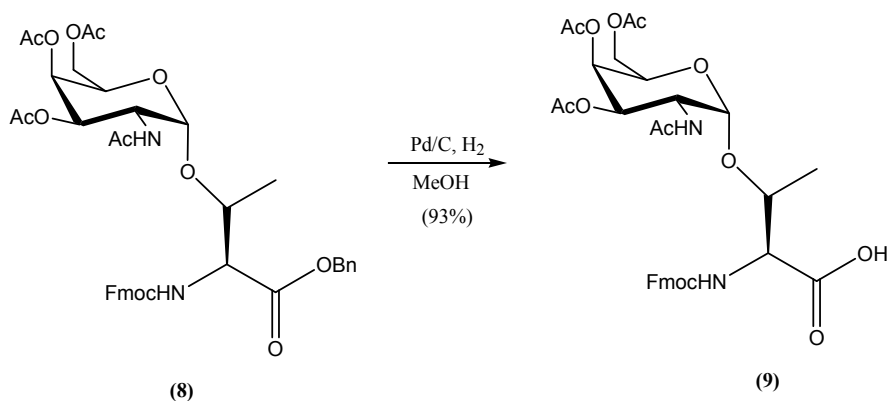


Abb. 3.9: Spaltung des Benzylesters

Es empfiehlt sich, die Reaktion dünn-schichtchromatographisch zu verfolgen und nach Abreagieren des Eduktes sofort abubrechen, da bei längeren Reaktionszeiten auch die Fmoc-Schutzgruppe angegriffen wird. Nach flashchromatographischer Reinigung erhält man das für die Peptidsynthese geeignete T_N -Threonin-Konjugat (**9**).

3.1.3 Versuch der Synthese des T_N-Antigen-Bausteins durch Nitrogalactal-Verknüpfung

Obwohl die vorher dargestellte Synthese des T_N-Bausteins eine funktionierende und oft genutzte Syntheseroute darstellt, beinhaltet sie doch mehrere problematische Schritte. Die Azidonitratisierung verläuft meist nur mit mäßigen Ausbeuten. Die Glycosylierungsreaktion selbst ist nicht sonderlich robust, die Ausbeuten schwanken beträchtlich und oft sind nur mäßige Ausbeuten zu erzielen. Alle zur Glycosylierung benutzten Lösungsmittel und Reagenzien müssen penibel getrocknet werden, was insbesondere beim kristallwasserhaltigen Silber(I)perchlorat aufwendig ist. Auch verläuft die Glycosylierung nicht komplett stereoselektiv, die vollständige chromatographische Abtrennung des unerwünschten Anomeren kann mitunter Probleme bereiten.

Eine interessante Alternative zur vorgestellten Synthese wurde von *Schmidt et al.* publiziert¹³⁵⁻¹³⁸. Kernstück dieser Synthese ist die basenkatalysierte Verknüpfung eines Nitrogalactals als Glycosyldonor mit einer geschützten Aminosäure durch *Michael*-artige Addition. Die Glycosylierung verläuft mit sehr hoher Stereoselektivität und liefert hohe Ausbeuten.

Nachteilig hierbei ist, dass das vorher beschriebene Schutzgruppenmuster bei dieser Reaktion nicht einsetzbar ist: Unter den stark basischen Reaktionsbedingungen der Glycosylierungsreaktion wären sowohl die Fmoc- als auch Acetylenschutzgruppen nicht stabil. Daher müssen andere, basenstabile Schutzgruppen verwendet werden.

Der Glycosyldonor lässt sich aus dem bereits dargestellten Triacetylgalactal (**4**) gewinnen. Durch Umesterung mit katalytischen Mengen Natriummethanolat in Methanol nach *Zemplén* werden die Acetylgruppen entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels Natriumhydrid und Benzylbromid zum 3,4,6-Tribenzylgalactal (**10**) umgesetzt¹²⁴.

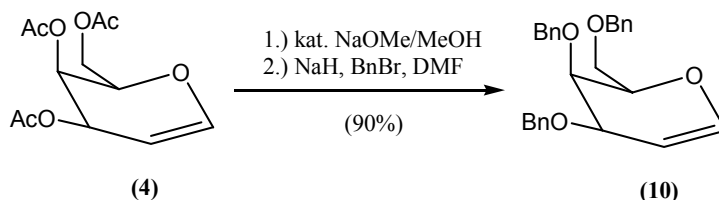


Abb. 3.10: Synthese des 3,4,6-Tribenzylgalactals

Die Benzylether als Schutzgruppen sind auch unter stark basischen Bedingungen stabil. Das Galactal (**10**) wird nun durch Reaktion mit aus Acetanhydrid und Salpetersäure darstellbarem Acetylnitrat in das 1-Acetyl-2-Nitro-derivat überführt, aus dem durch Eliminierung mit Triethylamin der gewünschte Nitrogalactal-donor (**11**) erhältlich ist^{135,136}.

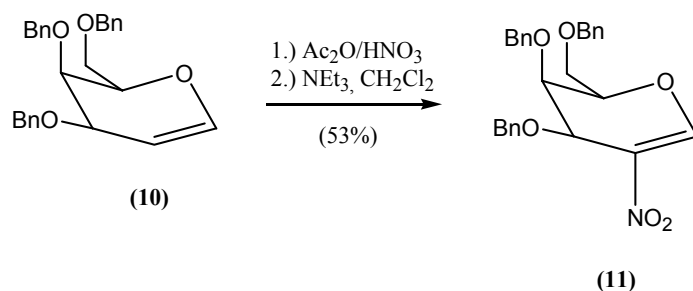


Abb. 3.11: Synthese des Nitrogalactals

Ein geeigneter Akzeptor ist aus kommerziell erhältlichem *N*-tert-Butyloxycarbonyl-(Boc-) und *O*-Benzyl-geschütztem Threonin darstellbar¹³⁶. Zunächst wird mittels aus *tert*-Butanol und Trichloracetonitril zugänglichem *tert*-Butyl-trichloracetimidat¹³⁹ (12) die Carboxylfunktion als *tert*-Butylester geschützt. Nachfolgende hydrogenolytische Spaltung des Benzylethers liefert den gewünschten Aminosäurebaustein (14).

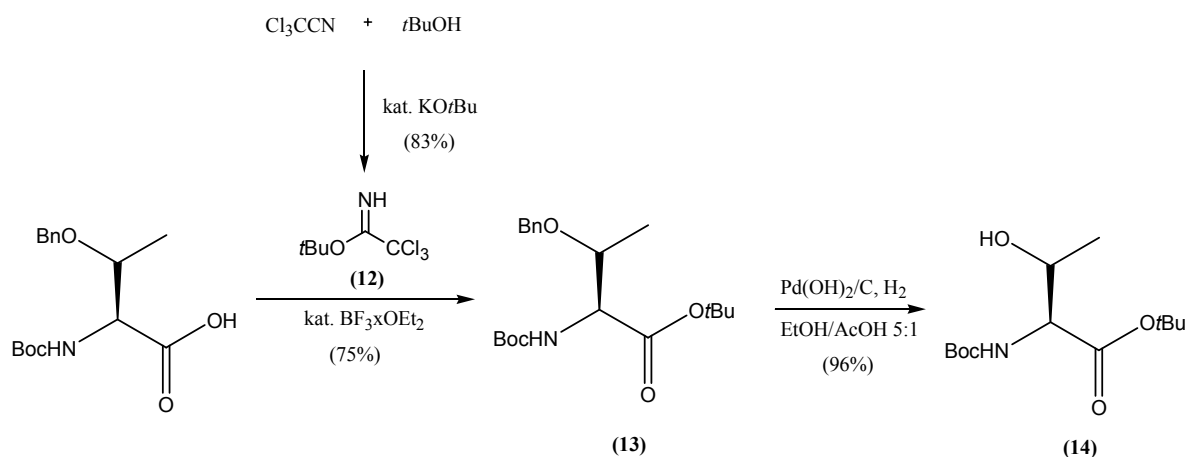


Abb. 3.12: Synthese Boc-Thr(OH)-OtBu

Die folgende, durch Kalium-*tert*-butanolat katalysierte Glycosylierungsreaktion¹³⁶ verläuft vollständig stereoselektiv und liefert das gewünschte α -Anomer (15) in fast quantitativer Ausbeute.

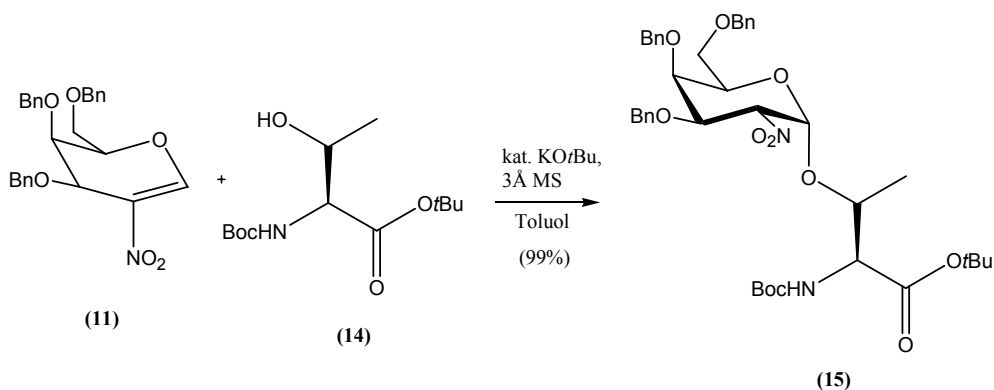


Abb. 3.13: Nitrogalactal-Verknüpfung

Zur Überführung in den gewünschten *N*-Acetylgalactosamin-Baustein ist nun die Umwandlung der Nitrofunktion in eine Acetamidogruppe nötig. Problematisch hierbei ist die selektive Reduktion der Nitrogruppe zum Amin ohne gleichzeitige hydrogenolytische Abspaltung der Benzylether. Nach *Schmidt et al.* lässt sich diese Umwandlung durch Verwendung von platinierterm Raney-Nickel durchführen¹³⁶. Dieser Katalysator lässt aus der für die Gewinnung von normalem Raney-Nickel verwendeten Aluminium-Nickel-Legierung darstellen, indem man zur Kaliumhydroxidlösung Hexachlorplatinssäure zugibt¹⁴⁰.

Die Nitroverbindung (**15**) wird unter Verwendung des so dargestellten platinieren Raney-Nickels unter Wasserstoffatmosphäre hydriert. Tatsächlich konnte jedoch nicht das gewünschte Produkt erhalten werden, sondern es wurde trotz mehrfacher Zugabe von frisch hergestelltem Katalysator nur das Edukt (**15**) zurückisoliert.

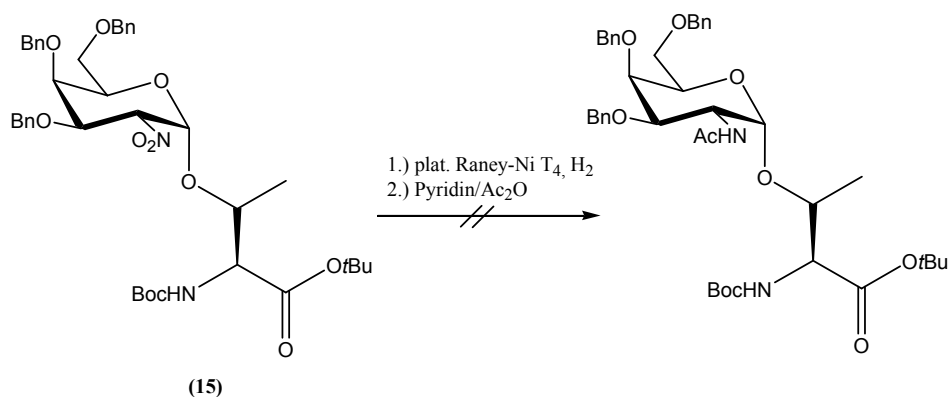


Abb. 3.14: Versuchte Reduktion der Nitrogruppe

Auch eine mehrfache Wiederholung der Reaktion verlief nicht erfolgreich. Woran die Reduktion scheiterte, konnte nicht festgestellt werden. Die Synthese wurde daher an dieser Stelle abgebrochen.

Im Vergleich zu der vorher durchgeführten Synthese des T_N -Antigens beinhaltet die Synthesestrategie nach *Schmidt* außerdem mehrere Nachteile. Zum einen ist die Verwendung des hochexplosiven Acetylnitrats¹⁴¹, auch wenn es nur *in situ* hergestellt und direkt weiter umgesetzt wird, gerade bei größeren Ansätzen problematisch. Die Synthese des Nitrogalactals gelingt nur mit einer ähnlich mäßigen Ausbeute wie die Azidonitratisierung. Die aufgrund der unter stark basischen Bedingungen ablaufenden Glycosylierungsreaktion notwendigen zusätzlichen Schutzgruppenoperationen stellen einen zusätzlichen Syntheseaufwand dar. Ein orthogonaler Schutz von Amino- und Carboxylfunktion des Threonins ist nicht möglich, die Fmoc-Schutzgruppe kann erst nach der Glycosylierungsreaktion eingeführt werden. Aus diesen Gründen wird auch kein weiterer Versuch dieser Synthese unternommen.

3.1.4 Synthese des (2,6)-ST_N-Antigen-Bausteins

Zum Aufbau der komplexeren Sialyl-T_N-, T- und Sialyl-T-Antigene aus dem T_N-Antigen-Baustein ist ein Deblockieren der saccharidischen Hydroxylfunktionen nötig. Dies ist durch Umesterung mit katalytischen Mengen Natriummethanolat in Methanol nach *Zemplén*¹²¹ möglich. Allerdings hat sich gezeigt, dass selbst unter diesen milden Reaktionsbedingungen der Benzylester des Konjugats (**8**) nicht stabil ist, sondern zum Methylester umgeestert wird¹⁴². Um dies zu verhindern, ist eine andere Schutzgruppe für die Carboxylfunktion des Threonins nötig. Bewährt hat sich der *tert*-Butylester, der große Stabilität im alkalischen Bereich zeigt, jedoch einfach unter sauren Bedingungen abgespalten werden kann. Ein entsprechend geschützter Glycosylakzeptor (**16**) lässt sich aus dem bereits beschriebenen Fmoc-geschützten Threonin (**1**) durch Veresterung mit *tert*-Butanol unter Aktivierung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und katalytischen Mengen Kupfer(I)chlorid darstellen^{143,144}. Hierbei ist eine genaue Kontrolle und rechtzeitiger Abbruch der Reaktion wichtig, da sonst

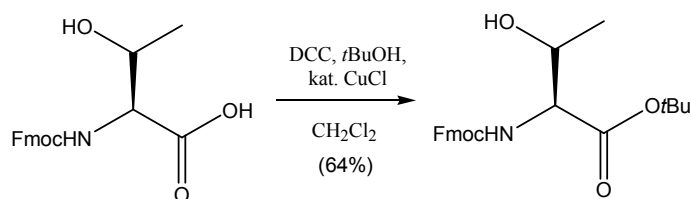
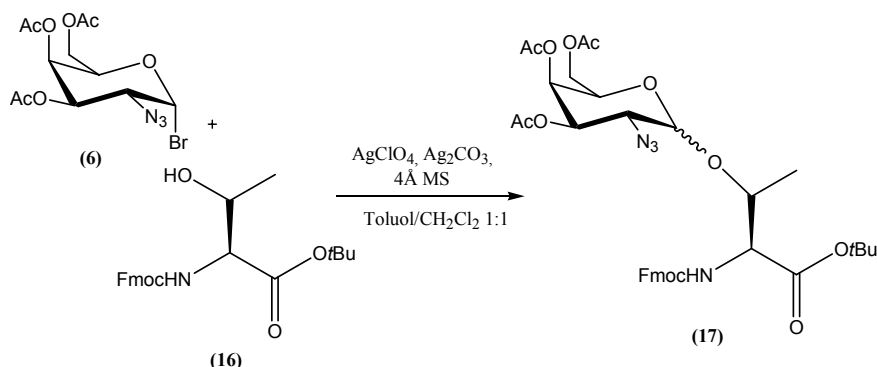


Abb. 3.15: Synthese Fmoc-Thr-OtBu

auch eine unerwünschte Alkylierung der β -Hydroxyfunktion des Threonins stattfindet.

Die Glycosylierung des so dargestellten Akzeptors (**16**) mit dem 2-Azido-2-desoxy- α -D-galactosylbromid (**6**) erfolgt wieder nach der schon vorgestellten Methode von *Paulsen* und *Hölck*^{129,131,132}. Auch hier entsteht durch den anomeren Effekt bevorzugt das α -Anomer.

Abb. 3.16: Synthese Fmoc-Thr(Ac₃GalN₃)-OtBu

Die chromatographische Reinigung gestaltet sich diesmal allerdings schwierig: Das in geringen Mengen gebildete β -Anomer kann nicht vollständig vom Produkt abgetrennt werden, ebenso wie geringe Anteile von nicht glycosyliertem Akzeptor (**16**). Das nach der Chromatographie erhaltene Gemisch wird daher in der folgenden Reaktion eingesetzt. Die Reduktion des Azids (**17**) unter gleichzeitiger Acetylierung erfolgt wieder durch Reaktion mit Zinkstaub in THF/Acetanhydrid/Essigsäure¹³³.

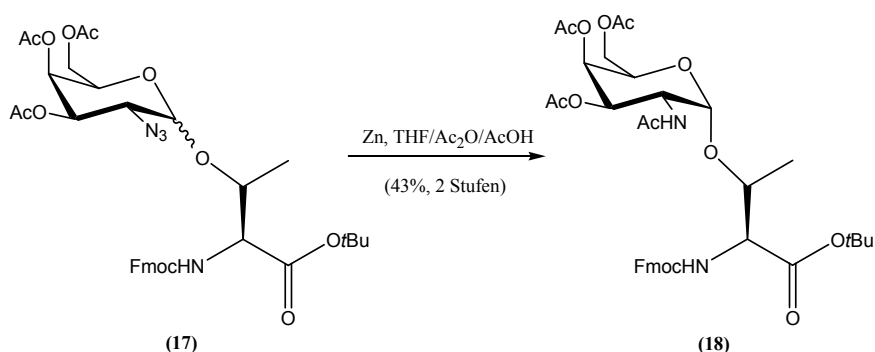


Abb. 3.17: Reduktion zum Acetamid

Aufgrund der geänderten Polarität kann das gebildete Acetamid (**18**) nun flashchromatographisch von allen Verunreinigungen abgetrennt werden.

Die Abspaltung der *O*-Acetylschutzgruppen erfolgt nach *Zemplén*¹²¹ durch Umesterung mit katalytischen Mengen Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 8.5^{131,132}.

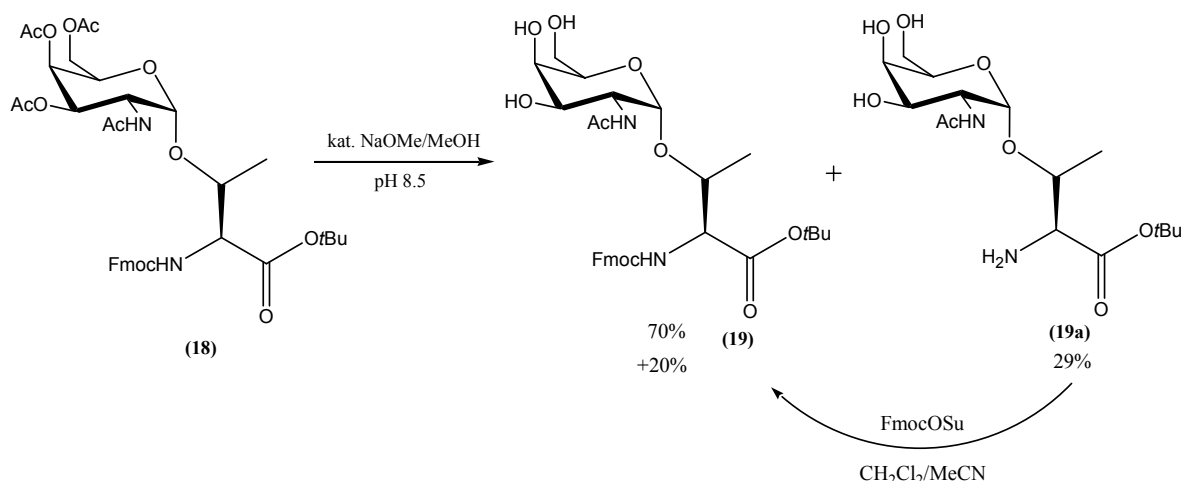


Abb. 3.18: *Zemplén*-Deblockierung des T_N-Bausteins

Genaueres Einstellen und regelmäßiges Nachregulieren des pH-Wertes ist sehr wichtig, da bei zu niedrigem pH-Wert die Reaktion nicht abläuft, andererseits bereits bei geringfügig zu hohem pH-Wert die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe ebenfalls abgespalten wird. Auch bei genauer Kontrolle lässt sich diese Abspaltung jedoch nicht vollständig verhindern, so dass neben 70% des Produkts (**19**) auch das freie Amin (**19a**) gebildet wird. Dieses Nebenprodukt kann allerdings durch Spülen der Chromatographiesäule mit Methanol isoliert und

anschließend durch Reaktion mit Fmoc-OSu in Acetonitril/Dichlormethan selektiv zum gewünschten Produkt (**19**) blockiert werden. Auf diese Weise lässt sich die Ausbeute der Reaktion auf 90% steigern.

Zur Darstellung des Sialyl-T_N-Antigens ist nun das Einführen der Sialinsäure in 6-Position nötig. Bei Sialylierungen handelt es sich prinzipiell um problematische Glycosylierungen¹⁴⁵: Das anomere Zentrum der Sialinsäure stellt ein tertiäres Kohlenstoff-Atom dar, so dass die Annäherung des Akzeptors sterisch behindert ist. Desweiteren destabilisiert die elektronenziehende Carboxylfunktion in unmittelbarer Nachbarschaft zum anomeren Zentrum das nach der Aktivierung entstehende Oxycarbeniumion. Daher kommt es sehr leicht zur 2,3-Eliminierung als Nebenreaktion, das dadurch entstehende Sialinsäureglycal wird bei Sialylierungen oft in erheblichem Maße gebildet. Um dennoch eine hohe Ausbeute an dem gewünschten Sialylierungsprodukt zu erreichen, muss der teure Sialinsäuredonor in erheblichem Überschuss eingesetzt werden. Natürlich ist eine Blockierung der Carboxylfunktion der Sialinsäure nötig, die hierfür verwendete Schutzgruppe muss orthogonal zu der für den Schutz der Threonin-Carboxylgruppe verwendeten Schutzgruppe sein. Weiterhin besitzt die Sialinsäure keinen Substituenten in 3-Position, der den stereochemischen Verlauf der Sialylierung zum gewünschten Anomer beeinflussen könnte. Aus all diesen Gründen stellen Sialylierungen eine große synthetische Herausforderung dar.

Für effektive Sialylierungen verwendete Sialinsäuredonoren verfügen oftmals über eher ungewöhnliche Austrittsgruppen, wie z.B. Phosphite¹⁴⁶ oder Xanthogenate¹⁴⁷. Anomere Halogenide oder Trichloracetimidate, die bei anderen Glycosylierungen die am häufigsten verwendeten Donoren darstellen, spielen hier eine untergeordnete Rolle. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Sialylierungen wird das Ethylxanthogenat der Sialinsäure als Donor verwendet. Die Carboxylfunktion ist hierbei als Benzylester geschützt. Diese Schutzgruppe hat gegenüber dem oft verwendeten Methylester den Vorteil, unter milden, neutralen Bedingungen durch Hydrogenolyse abspaltbar zu sein.

Der benötigte Sialinsäure-Donor lässt sich aus Neuraminsäure in vier Stufen darstellen¹⁴⁷. Die Neuraminsäure wird zunächst mit Acetanhydrid in Pyridin peracetyliert. Das als Anomerengemisch anfallende Rohprodukt (**20**) wird mit Cäsiumcarbonat in das Cäsiumsalz überführt, aus dem mit Benzylbromid der Benzylester (**21**) darstellbar ist¹⁴⁸. Durch Umsetzen mit Acetylchlorid, dem einige Tropfen Wasser zugesetzt wurden, erhält man das anomere Chlorid. Dieses reagiert mit Kaliumethylxanthogenat zum gewünschten Donor (**22**), der stereoselektiv als α -Xanthogenat entsteht.

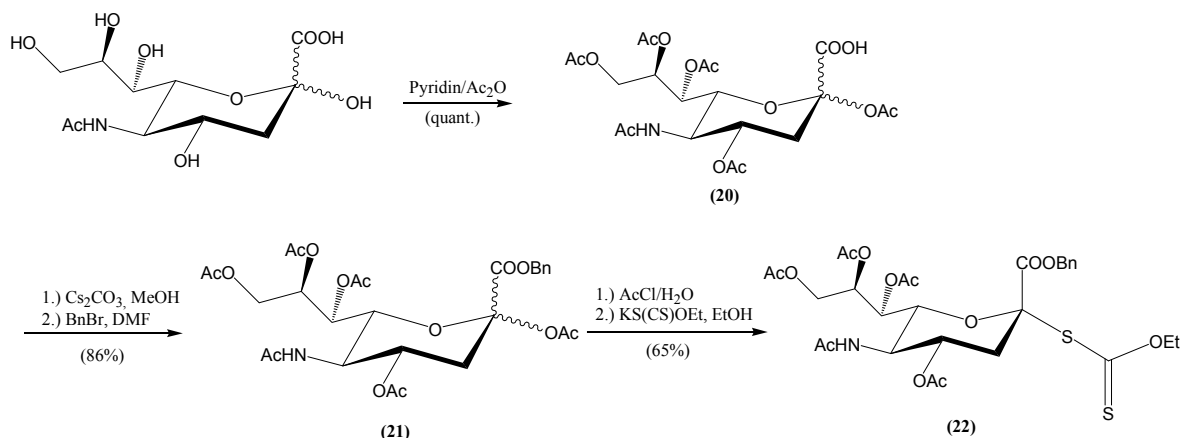


Abb. 3.19: Synthese des Sialinsäure-Donors

Die Aktivierung von Xanthogenaten erfolgt durch den Einsatz von äquimolaren Mengen eines thiophilen Promotors. Gängige Reagenzien hierfür sind Methylsulfonyltriflat (MeSOTf)¹⁴⁹, Phenylsulfonyltriflat (PheSOTf)¹⁵⁰, Dimethyl(methylthio)sulfonium-triflat (DMTST)^{151,152} oder *N*-Iodsuccinimid (NIS)^{153,154}. In dieser Arbeit wird Methylsulfonyltriflat als Promotor verwendet. Es lässt sich *in situ* durch Reaktion von Silber(I)triflat mit Methylsulfonylbromid, welches aus Dimethyldisulfid und Brom erhalten wird, erzeugen. Die Aktivierung des Sialinsäure-Donors wird durch Koordination des Methylsulfonyltriflates an den doppelt gebundenen Schwefel des Xanthogenates eingeleitet. Durch anschließende Abspaltung der Abgangsgruppe wird das intermediäre Oxycarbeniumion gebildet, das mit dem Akzeptor zum Glycosid reagiert.

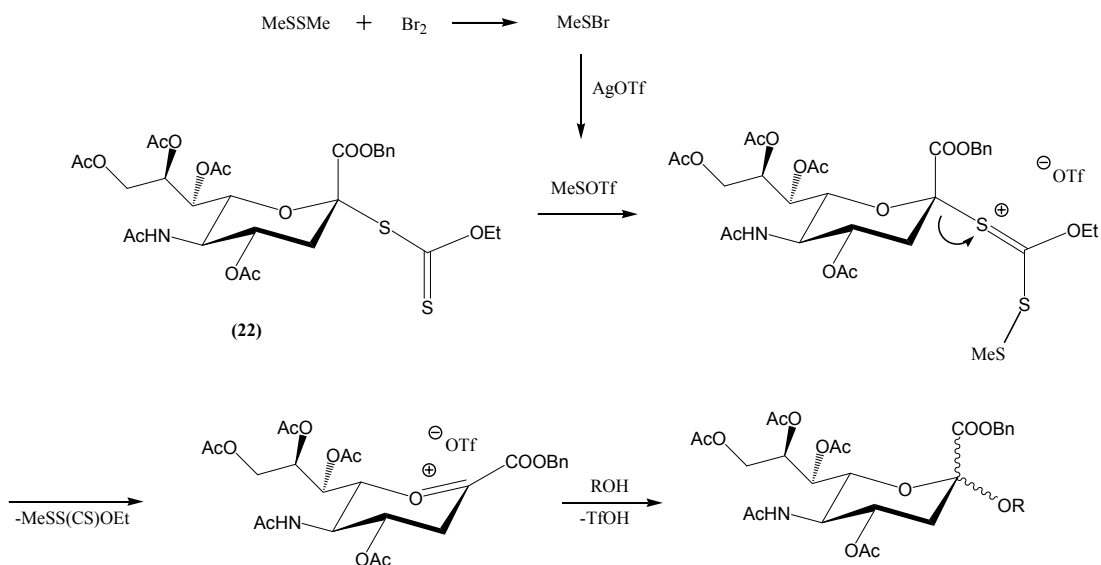


Abb. 3.20: Aktivierung des Sialinsäurexanthogenats

Der stereochemische Verlauf von Sialylierungsreaktionen lässt sich durch Wahl eines geeigneten Lösungsmittels und der Temperatur beeinflussen¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Werden Nitrile als Lösungsmittel verwendet, so kann die Nitrilgruppe an das intermediär gebildete Sialinsäurekation koordinieren. Hierbei kann sowohl das axiale als auch das äquatoriale Nitriliumkation gebildet werden, beide stehen miteinander im Gleichgewicht.

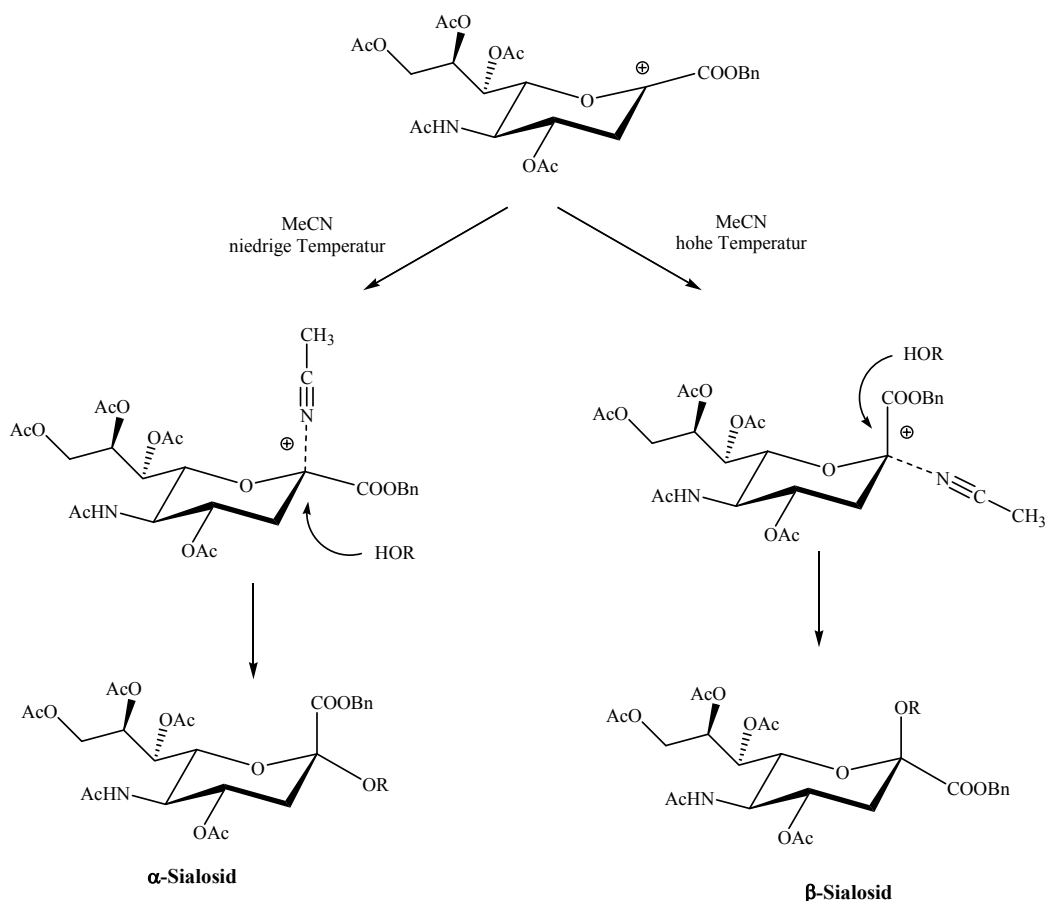


Abb. 3.21: Der Nitrileffekt

Bei tiefen Temperaturen wird durch kinetische Kontrolle das Gleichgewicht zum axialen β -Nitriliumion verschoben, während höhere Reaktionstemperaturen die Bildung des thermodynamisch stabileren, äquatorialen α -Addukts begünstigen. Am β -Nitriliumion kann der Angriff des Akzeptors nur von der α -Seite erfolgen, so dass stereoselektiv das α -Sialosid gebildet wird. Das α -Nitriliumion hingegen führt durch Reaktion mit dem Akzeptor zum β -Produkt (Nitrileffekt). Da in dieser Arbeit ausnahmslos α -Sialoside gewünscht sind, werden die Sialylierungsreaktionen bei tiefer Temperatur in Acetonitril als Lösungsmittel durchgeführt. Das Hinzufügen von Dichlormethan ist hierbei nötig, um ein Einfrieren der Reaktionsmischung zu vermeiden.

Die Synthese des 2,6-Sialyl- T_N -Bausteins erfolgt also durch Sialylierung des Akzeptors (**19**) mit dem Sialinsäurexanthogenat (**22**).

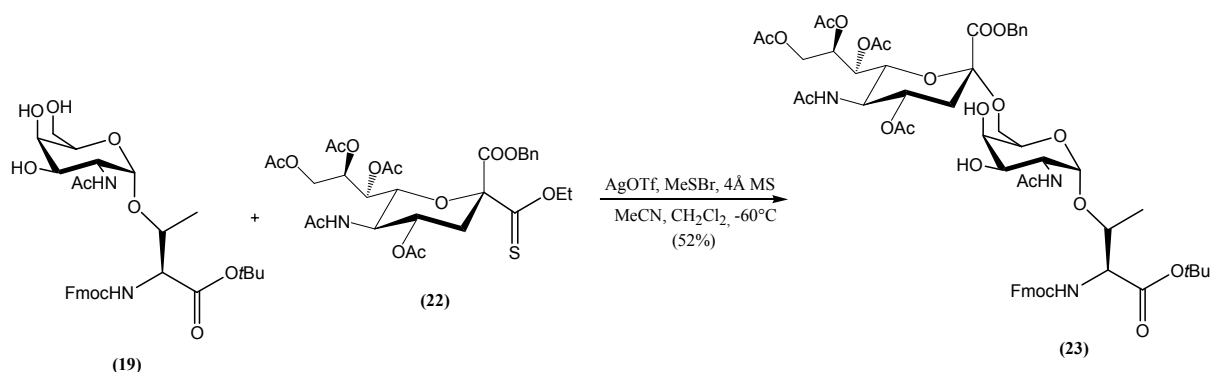


Abb. 3.22: Sialylierung des T_N-Bausteins

Der Donor (**22**) wird hierbei in 2.5-fachem Überschuss eingesetzt. Durch Verwendung eines Gemisches aus Acetonitril und Dichlormethan bei einer Reaktionstemperatur von -60°C entsteht unter Ausnutzung des Nitrileffektes stereoselektiv das α -Sialosid (**23**). Ein Schutz der 3- und 4-Hydroxyfunktionen des Akzeptors ist hierbei nicht nötig, da nur die reaktivere und sterisch weniger gehinderte primäre 6-Hydroxyfunktion reagiert. Die Reaktion verläuft somit nicht nur stereo-, sondern auch vollständig regioselektiv. Da während der Reaktion Trifluormethansulfonäure entsteht, die bei höheren Temperaturen den *tert*-Butylester des Konjugats spalten könnte, wird das Reaktionsgemisch vor dem Erwärmen auf Raumtemperatur durch Zugabe von DIPEA neutralisiert. Das als Nebenprodukt gebildete Sialinsäureglycol kann ebenso wie das in geringen Mengen entstandene β -Sialosid bei der flashchromatographischen Reinigung abgetrennt werden.

Zur Überführung des Sialylierungsproduktes in einen für die Festphasenglycopeptidsynthese geeigneten Sialyl-T_N-Baustein sind noch zwei Schutzgruppenmanipulationen nötig. Zunächst werden die freien Hydroxylgruppen von (**23**) mit Acetanhydrid in Pyridin acetyliert. Anschließend wird der *tert*-Butylester durch Behandlung mit Trifluoressigsäure und Anisol als Kationenscavenger gespalten. Der fertige Sialyl-T_N-Baustein (**25**) wird in 84% Ausbeute erhalten.

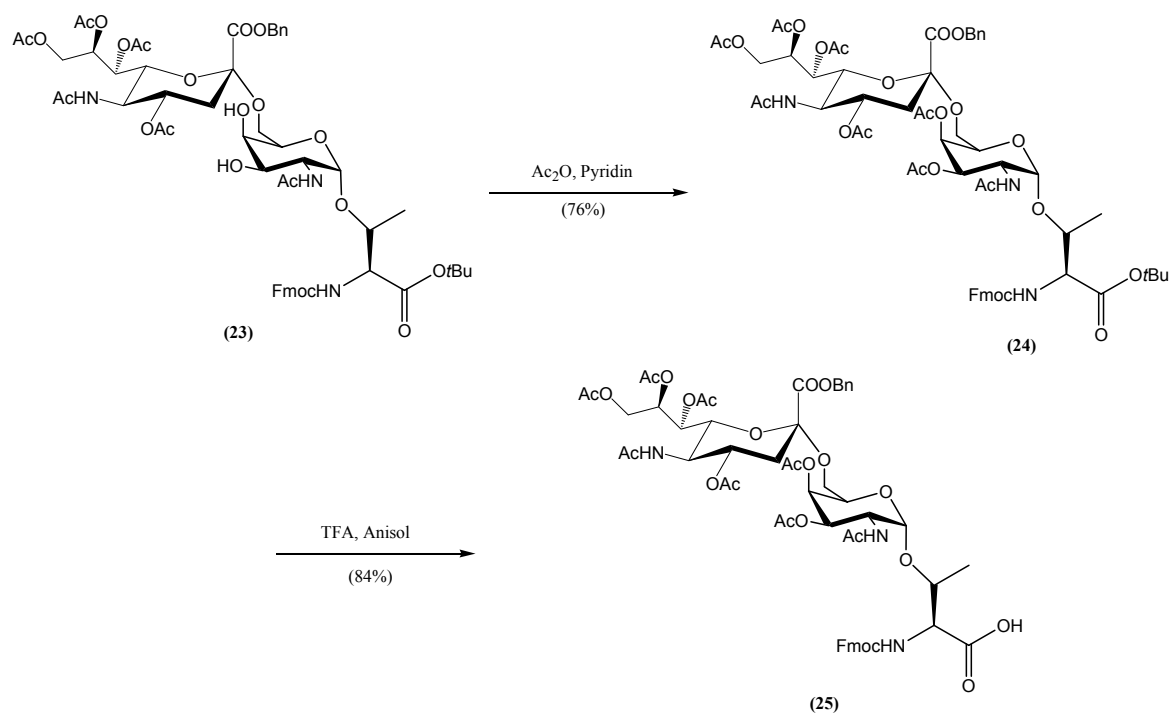


Abb. 3.23: Fertigstellung des ST_N-Bausteins

3.1.5 Synthese des (2,3)-ST-Antigen-Bausteins

Zur Synthese des (2,3)-ST-Antigen-Bausteins ist, der biomimetischen Strategie folgend, zunächst die Synthese des T-Antigen-Konjugates nötig, welches dann anschließend sialyliert wird. Hierzu muss eine Galactose-Einheit an das Galactosamin (**19**) angeknüpft werden. Durch anschließende regioselektive Sialylierung ist entweder der (2,3)- oder der (2,6)-Sialyl-T-Baustein zugänglich.

Um die Galactose regioselektiv an die 3-Hydroxygruppe des Galactosamins (**19**) anzubinden, ist eine Blockierung der 4- und vor allem der primären 6-Hydroxyfunktion nötig. Als Schutzgruppe hierfür wird ein Benzylidenacetal verwendet. Dieses entsteht bevorzugt aus 1,3-Diolen, so dass selektiv 4- und 6-Hydroxyfunktion gleichzeitig blockiert werden können, die 3-Hydroxygruppe jedoch wie gewünscht unangetastet bleibt. Das Einführen der Benzylidengruppe ist durch Umsetzung von (**19**) mit Benzaldehyddimethylacetal bei leicht saurem pH-Wert in hoher Ausbeute möglich¹⁵⁸.

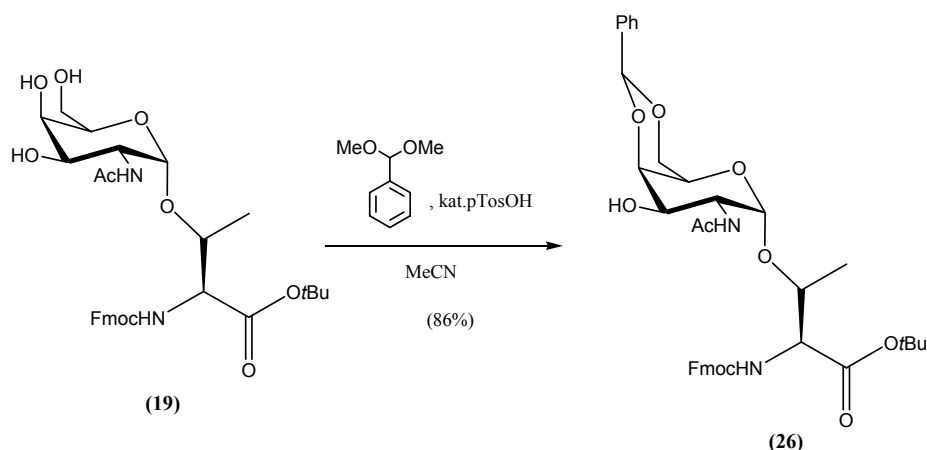


Abb. 3.24: Synthese des geschützten T_N-Akzeptors

Als nächstes ist nun die β -Glycosylierung von (26) mit einem geeigneten Galactosyldonor nötig. Um später eine selektive Sialylierung der Galactose in 3-Position zu erreichen, ist ein Blockieren der reaktiveren 6-Hydroxyfunktion unbedingt erforderlich. Ein entsprechender Galactosyldonor ist ausgehend von D-Galactose in 5 Stufen zugänglich. Die Galactose wird zunächst mit Aceton unter Säurekatalyse in das Diisopropylidenacetal (27) überführt¹⁵⁹. Da Aceton bevorzugt mit 1,2-cis-Diolen Acetale bildet, werden hierbei nur 1- und 2- bzw. 3- und 4-Hydroxylfunktion als Acetal geschützt. Das bei der Acetalisierung entstehende Reaktionswasser wird durch wasserfreies Kupfersulfat gebunden. Die 6-Hydroxygruppe bleibt frei und kann durch nachfolgende Deprotonierung mit Natriumhydrid und Reaktion mit Benzylbromid zum 6-Benzylether (28) umgesetzt werden¹⁶⁰. Die säurelabilen Acetonacetale lassen sich mit verdünnter Essigsäure bei leicht erhöhter Temperatur spalten, die freien Hydroxylgruppen werden anschließend mit Acetanhydrid/Pyridin unter Zusatz des Acylierungskatalysators 4-Dimethylaminopyridin (DMAP)^{161,162} nach *Steglich* acetyliert¹⁶⁰.

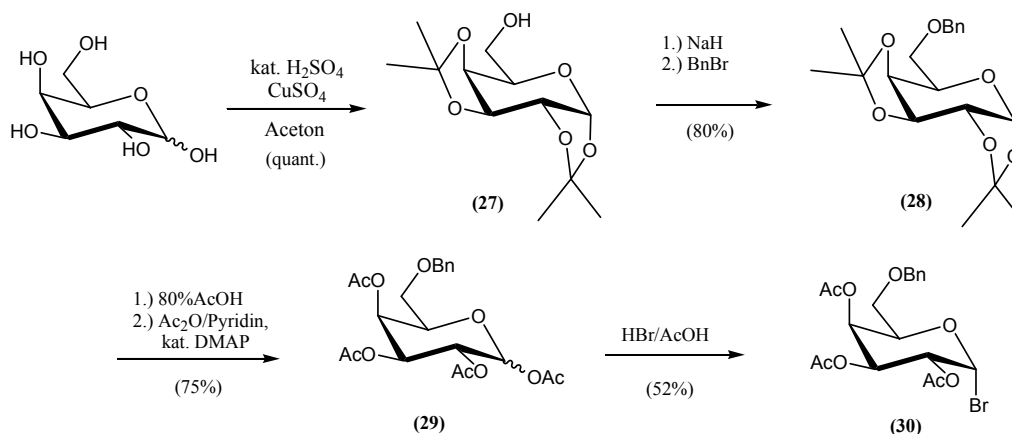


Abb. 3.25: Synthese 6-Bn-Galactosyldonor

In früheren Arbeiten hat sich bereits gezeigt, dass bei der beabsichtigten Glycosylierungsreaktion das anomere Bromid einen vorteilhaften Galactosyldonor darstellt⁴⁸. Im Gegensatz zum Trichloracetimidat, welches hauptsächlich zur Bildung des unerwünschten Orthoesters führte, gelang mit dem Bromid die Synthese des gewünschten Produkts in hohen Ausbeuten und ohne nennenswerte Nebenprodukte. Die besten Ausbeuten wurden durch eine Aktivierung des Donors nach *Helferich* erzielt. Hierbei handelt es sich um eine Variante der *Koenigs-Knorr*-Glycosylierung, bei der Quecksilbersalze zur Aktivierung des anomeren Halogenids eingesetzt werden¹⁶³. Da diese Reaktionsführung bereits erfolgreich eingesetzt wurde, soll sie nun auch im vorliegenden Fall verwendet werden.

Der benötigte Galactosyldonor lässt sich aus dem Peracetat (**29**) durch Behandlung mit Bromwasserstoff in Eisessig in mäßiger Ausbeute darstellen¹⁶⁴. Da er instabil ist, wird er direkt in der folgenden Glycosylierungsreaktion eingesetzt. Hierzu wird der Akzeptor (**26**) mit dem Donor (**30**) unter Aktivierung mit Quecksilber(II)cyanid in Nitromethan/Dichlormethan umgesetzt.

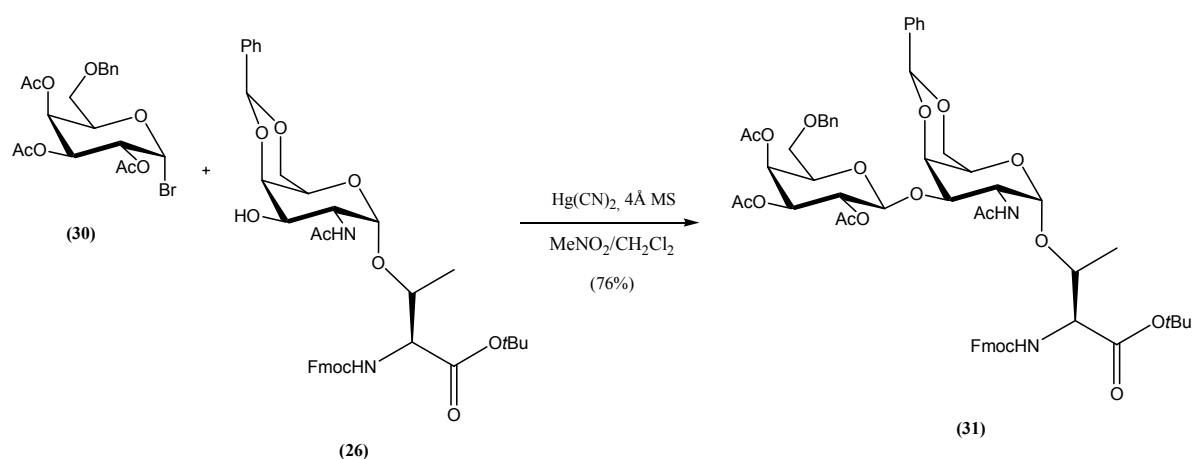


Abb. 3.26: Synthese des T-Konjugats

Durch die nachbargruppenaktive Acetylschutzgruppe in 2-Position des Galactosyldonors entsteht hierbei ausschließlich das β -Anomer. Das gewünschte Produkt (**31**) kann in hoher Ausbeute isoliert werden.

Durch saure Spaltung des Benzylidenacetals, nachfolgende Acetylierung und Spaltung des *tert*-Butylesters wäre ein geeigneter T-Antigen-Baustein für die Festphasenpeptidsynthese zugänglich. Andererseits könnte nach Abspaltung des Benzylidenacetals selektiv die 6-Hydroxyfunktion sialyliert und so das 2,6-Sialyl-T-Antigen erhalten werden. Dies soll hier jedoch nicht durchgeführt werden, stattdessen wird die Synthese zum (2,3)-ST-Antigen weiterverfolgt.

Hierzu ist zunächst ein Abspalten der Acetylschutzgruppen im Konjugat (**31**) durch *Zemplén*-Umesterung nötig. Diese Operation hat sich in der Vergangenheit schon als problematisch erwiesen^{48,118}. Der Grund hierfür ist wohl in der als Benzylether blockierten 6-Hydroxyfunktion der Galactose zu finden. Bei der Deblockierung nach *Zemplén* reagiert normalerweise wahrscheinlich zunächst diese reaktivste, weil primäre 6-Hydroxylgruppe. Anschließend findet eine Wanderung der Acetylschutzgruppen von der 4- bzw. 3- und 2-Hydroxyfunktion auf Position 6 statt und von dort kann dann wieder leicht die Abspaltung erfolgen. Da hier nun die 6-Hydroxyfunktion blockiert vorliegt, ist diese Acetylmigration nicht mehr möglich und die Abspaltung der Acetylschutzgruppen muss direkt von den weniger reaktiven sekundären Hydroxylgruppen erfolgen. Wird die Deacetylierung unter den bereits vorher beim T_N-Baustein (**18**) erfolgreichen Bedingungen bei einem pH-Wert von 8.5 durchgeführt, so verläuft die Reaktion nur äußerst langsam. Durch geringfügiges Erhöhen des pH-Wertes auf 9.0 wird die Reaktion auf ein sinnvolles Maß beschleunigt. Allerdings zeigt sich, dass unter den nur leicht basischeren Bedingungen die unerwünschte Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nun in erheblichem Maße auftritt. Bei der regelmäßigen dünnschichtchromatographischen Kontrolle der Reaktion wird sogar sichtbar, dass Fmoc teilweise bereits vor der vollständigen Deacetylierung abgespalten wird.

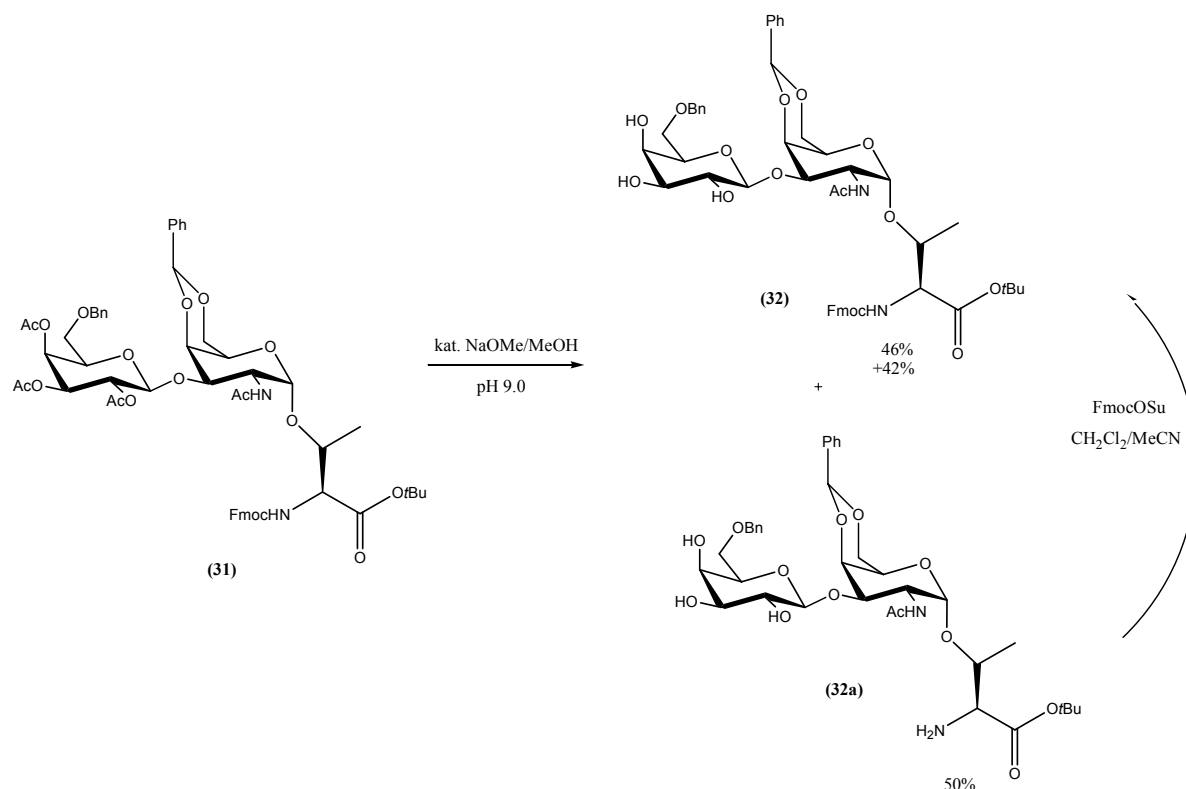


Abb. 3.27: Deblockierung des T-Bausteins

Dementsprechend kann das gewünschte Produkt (**32**) nur in einer mäßigen Ausbeute von 46% isoliert werden. Daneben werden erwartungsgemäß 50% des freien Amins (**32a**) isoliert. Dieses unerwünschte Produkt kann jedoch, wie schon vorher beim T_N-Baustein, durch Umsetzen mit Fmoc-OSu wieder blockiert werden, so dass sich die Gesamtausbeute an (**32**) auf 88% erhöht.

Als nächstes muss nun die Sialylierung des Akzeptors (**32**) an der 3'-Hydroxyfunktion durchgeführt werden. Diese Sialylierung wird in Analogie zu der bereits am T_N-Baustein erfolgreich ausgeführten Reaktion mit dem Sialinsäurexanthogenat (**22**) als Donor und *in situ* erzeugtem Methylsulfenyltriflat als Promotor durchgeführt.

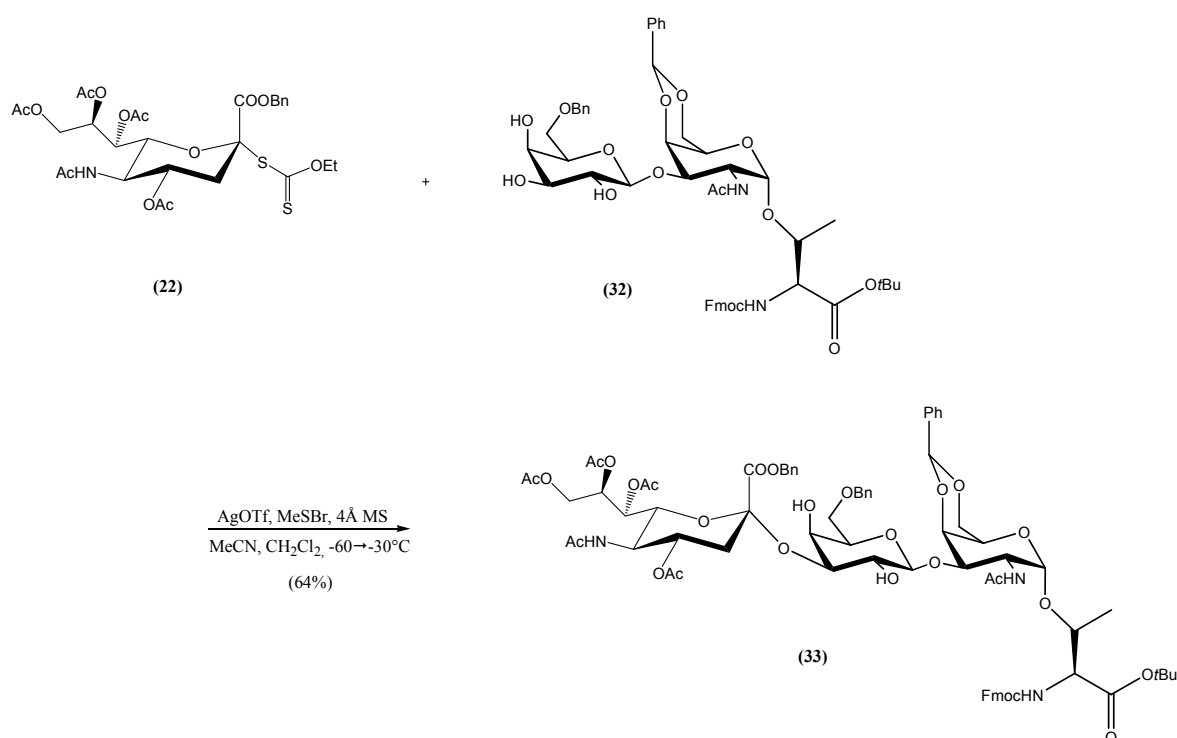


Abb. 3.28: Sialylierung des T-Antigen-Bausteins

Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt^{48,118}, erfolgt die Sialylierung aufgrund der von sterischen und elektronischen Effekten bedingten höchsten Reaktivität der 3'-OH-Funktion vollständig regioselektiv. Außerdem zeigt sich, dass die Sialylierung der im Vergleich zur primären 6-Hydroxygruppe des T_N-Antigens weniger reaktiven, sekundären 3'-OH-Funktion auch mit wesentlich größerer Stereoselektivität erfolgt. So kann hier die Bildung des β -Sialosids überhaupt nicht beobachtet werden. Allerdings muss aufgrund der geringeren Reaktivität für einen vollständigen Umsatz die Reaktionszeit verlängert werden, daher wird die Reaktionsmischung über Nacht bei -30°C gerührt. Diese Erhöhung der Reaktionstemperatur scheint jedoch keinen Einfluss auf die durch den Nitrileffekt bedingten Stereoselektivität der Sialylierung zu haben.

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie lässt sich sicherstellen, dass es sich beim isolierten Produkt **(33)** tatsächlich um das gewünschte α -Sialosid handelt. Normalerweise werden zur Bestimmung der anomeren Konfiguration Methoden verwendet, welche auf Messung der Kopplungskonstanten $^3J_{H_1,H_2}$ und $^1J_{C_1,H_1}$ beruhen. Diese sind jedoch auf Neuraminsäurederivate nicht anwendbar, da es sich bei dem anomeren Zentrum um ein quartäres Kohlenstoffatom handelt. Für solche Verbindungen wurde allerdings eine Reihe von auf Differenzen der chemischen Verschiebungen bzw. Kopplungskonstanten basierenden empirischen Regeln aufgestellt¹⁶⁵⁻¹⁶⁷:

- (1) $\delta(\alpha\text{-H3}_{\text{äq}}'') > \delta(\beta\text{-H3}_{\text{äq}}'')$
- (2) $\delta(\alpha\text{-H4}'') < \delta(\beta\text{-H4}'')$
- (3) $\delta(\alpha\text{-[H9}_a''\text{-H9}_b'']) < \delta(\beta\text{-[H9}_a''\text{-H9}_b''])$
- (4) $J_{\alpha\text{H7}'',\text{H8}''} > J_{\beta\text{H7}'',\text{H8}''}$

Diese Regeln sind zwar nicht allgemeingültig und können gerade bei komplexen Verbindungen versagen, geben aber oft zumindest einen Hinweis auf die anomere Konfiguration. Da außerdem die spektroskopischen Daten sowohl des α - als auch des β -Anomeren von **(33)** bekannt sind⁴⁸, lässt sich durch Vergleich mit dem gemessenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **(33)** leicht das Vorliegen des α -Anomeren beweisen. Regel (4) ist in diesem Fall allerdings nicht anwendbar, da die Kopplungskonstante $J_{\text{H7}'',\text{H8}''}$ wegen Signalüberlagerung nicht eindeutig bestimmbar ist. Während die Anwendung von Regel (3) zu keinem eindeutigen Ergebnis führt, weisen (1) und (2) aber auf das α -Anomer hin:

	(33)	α -Anomer ⁴⁸	β -Anomer ⁴⁸
$\delta(\text{H3}_{\text{äq}}'')$ [ppm]	2.71	2.70	2.55
$\delta(\text{H4}'')$ [ppm]	4.96-4.88	4.92-4.84	5.43
$\delta(\text{[H9}_a''\text{-H9}_b''])$ [ppm]	0.62	0.56	0.64

Insbesondere die chemische Verschiebung des Protons $\text{H4}''$ gibt, wie schon in früheren Arbeiten beobachtet¹⁶⁸, einen deutlichen Hinweis auf die anomere Konfiguration.

Um von dem Trisaccharid (**33**) zu einem geeigneten Festphasenbaustein zu gelangen, sind noch drei weitere Schutzgruppenmanipulationen nötig. Das Benzylidenacetal wird durch Behandlung mit verdünnter Essigsäure bei erhöhter Temperatur gespalten. Der ebenfalls säurelabile *tert*-Butylester ist unter diesen Bedingungen stabil.

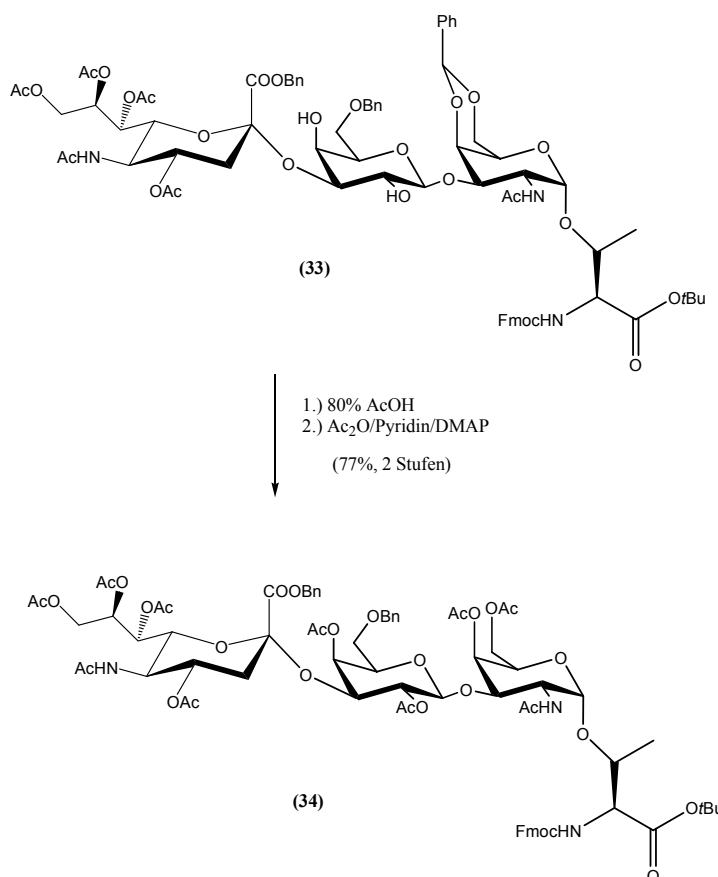


Abb. 3.29: Schutzgruppenmanipulationen zur Synthese des Festphasenbausteins

Das auf diese Weise erhaltene Rohprodukt wird ohne Reinigung mit Acetanhydrid in Pyridin unter DMAP-Katalyse^{161,162} acetyliert. Durch abschließende Spaltung des *tert*-Butylesters von **(34)** mit Trifluoressigsäure in Gegenwart von Anisol als Kationenscavenger wird der fertige (2,3)-Sialyl-T-Antigen-Baustein **(35)** für die Festphasenglycopeptidsynthese erhalten.

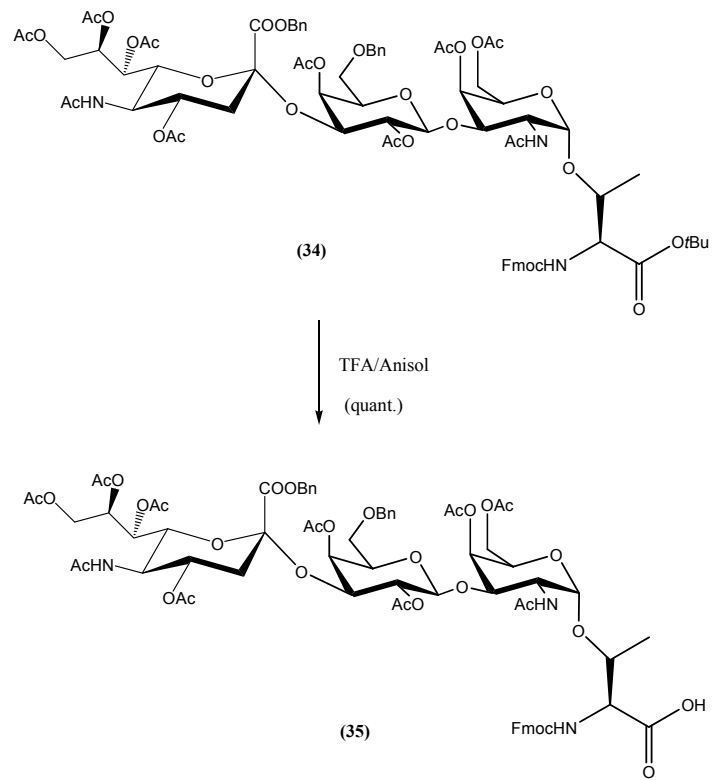


Abb. 3.30: Fertigstellung des (2,3)-ST-Bausteins

3.2 Konjugation von Glycopeptiden mit einem Carrierprotein

3.2.1 Biologischer Hintergrund¹⁶⁹

Die Aktivierung von B-Zellen erfordert neben der Bindung des Antigens an den B-Zell-Rezeptor eine Wechselwirkung der B-Zelle mit antigenspezifischen T-Helferzellen (bei thymusabhängigen Antigenen). Diese gekoppelte Erkennung (*linked recognition*) trägt dazu bei, die Selbst-Toleranz des Immunsystems sicherzustellen.

Das von der B-Zelle durch membranständige Immunglobuline gebundene Antigen wird durch rezeptorvermittelte Endocytose internalisiert und anschließend prozessiert. Bei dieser Proteolyse entstehende Proteinfragmente werden, gebunden an den MHC-II-Komplex, auf der Oberfläche der B-Zelle präsentiert. Antigen-spezifische T_H-Zellen, welche den Peptid-MHC-Komplex erkennen, liefern die kostimulatorischen Signale, welche für eine Aktivierung der B-Zelle nötig sind.

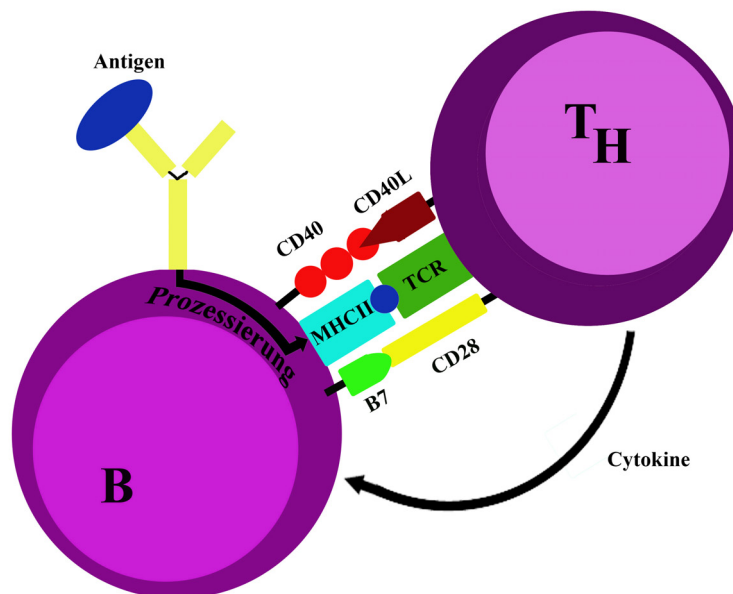


Abb. 3.31: Interaktion zwischen B- und T-Zellen

Dazu gehört die Sekretion von Zytokinen wie IL-2 (Proliferations-Induktion), IL-4 (initiale Aktivierung der B-Zell-Proliferation) und IL-6 (B-Zell-Differenzierung). Darüber hinaus scheinen auch die Tumornekrosefaktoren α und β am Wachstum der B-Zellen beteiligt zu sein. Weiterhin finden neben der zentralen Interaktion des MHC-II-Antigen-Komplexes und dem T-Zell-Rezeptor weitere Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und passenden

Liganden statt. So interagiert unter anderem der B7-Ligand der B-Zelle mit CD28 der T-Zelle, CD40 mit CD40L und CD2 mit LFA3.

Die Summe dieser kostimulatorischen Faktoren bewirkt eine Stimulierung der B-Zelle zur Proliferation und Differenzierung zur Plasma-Zelle, die große Mengen von gegen das B-Zell-Epitop gerichteten Immunglobulinen sezerniert.

Zur Induktion einer Immunantwort gegen kleine, selbst nur schwach oder gar nicht immunogene Moleküle (Haptene) kann die kovalente Anbindung an ein Trägerprotein (Carrier-Protein) genutzt werden^{113,114,170}. B-Zellen mit der passenden Spezifität können an das B-Zell-Epitop binden und dann das gesamte Konjugat durch rezeptorvermittelte Endocytose internalisieren. Nach der anschließenden Antigenprozessierung werden nicht nur Fragmente des B-Zell-Epitopes auf MHC-II-Molekülen an der B-Zell-Oberfläche präsentiert, sondern auch Peptidfragmente des Trägerproteins. Enthält das Protein T-Zell-Epitope, werden also auch diese präsentiert.

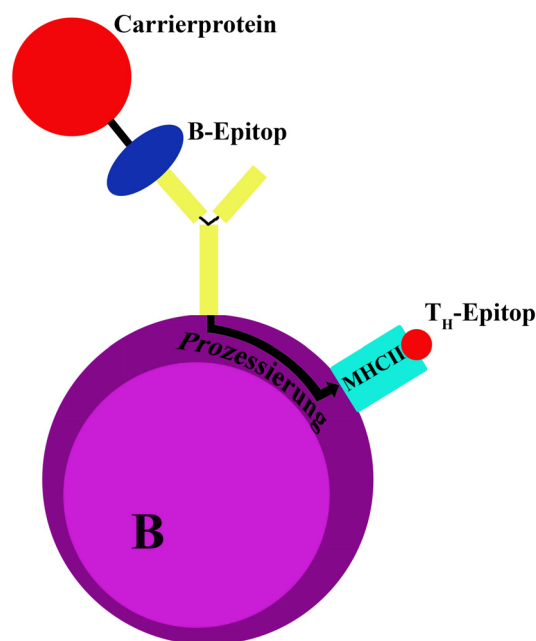


Abb. 3.32: Carrier-Effekt

Hierdurch werden T_H-Zellen, die diese Epitope erkennen, aktiviert und liefern dementsprechend ihrerseits die kostimulatorischen Signale, welche für eine Aktivierung der B-Zellen nötig sind.

Solche Konjugate bieten weiterhin die Möglichkeit, als immobilisierte Antigene in Immunoassays verwendet zu werden. Dies ist mit kurzen Peptiden aufgrund ihrer

unzureichenden Bindung an die Polystyroloberflächen von Mikrotiterplatten nur schlecht möglich¹⁷¹.

BSA (bovine serum albumin)¹¹⁵ und KLH (keyhole limpet hemocyanin)¹¹⁶ werden typischerweise als Trägerproteine genutzt. In dieser Arbeit wird BSA zu diesem Zweck verwendet, da das zwar als stärker immunogen angesehene KLH aufgrund seiner hohen Molekularmasse (ca. 3.000.000-7.000.000 g/mol) und seiner tetrameren Strukturen die geplante massenspektrometrische Analyse der Konjugate erschweren würde. Zur Anbindung des Haptens dienen üblicherweise die ϵ -Aminofunktionen der im BSA enthaltenen Lysinreste. BSA ist aus insgesamt 582 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 66.700 g/mol. Außer der *N*-terminalen Aminogruppe enthält es 59 Lysin-Reste, so dass insgesamt 60 freie Aminogruppen zur Anbindung von Haptenen zur Verfügung stehen. Von diesen befinden sich in der nativen Konformation des BSA aber nur etwa 30-35 gut zugänglich auf der Außenseite des Proteins.

Die kovalente Anbindung der Haptene an Proteine kann durch unspezifische Reagenzien wie Glutaraldehyd oder Diazoniumverbindungen erfolgen. Auf diese Weise werden jedoch keine definierten Konjugate erhalten, da diese Kupplungsreagenzien eine Vielzahl von Nebenreaktionen mit funktionellen Gruppen des Peptids eingehen können.

Auch die oft verwendete Benutzung von wasserlöslichen Carbodiimiden¹⁰⁴, wie z. B. EDC, zur Bildung einer Amidbindung zwischen einer Carboxylgruppe des Haptens und einer Aminfunktion des Proteins¹⁷² führt nicht zu einem definierten Konjugat, falls das Hapten mehrere funktionelle Gruppen beinhaltet, die mit dem Carbodiimid reagieren können. So kann die in den Wiederholungseinheiten sowohl des MUC1 als auch MUC4 enthaltene Asparaginsäure ebenfalls reagieren. Gleiches gilt für die Carbonsäuregruppe der in den sialylierten Kohlenhydraten enthaltenen Neuraminsäure.

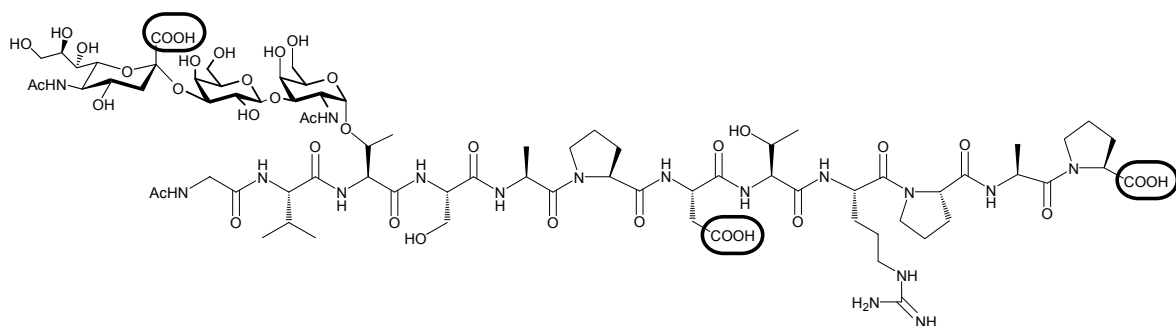


Abb. 3.33: Probleme bei der Konjugation mit Carbodiimiden

Glycopeptide stellen aufgrund der Vielzahl enthaltener funktioneller Gruppen generell ein Problem bei der hochselektiven Verknüpfung dar.

Weit verbreitet zur selektiven Konjugation ist daher die Verwendung von homo- oder heterobifunktionellen Reagenzien¹⁷³.

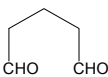
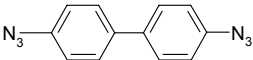
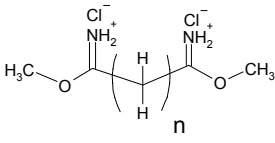
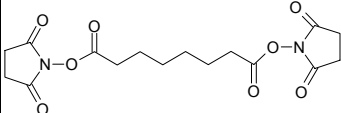
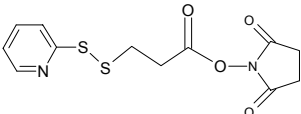
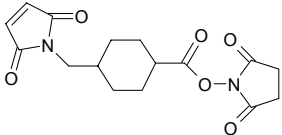
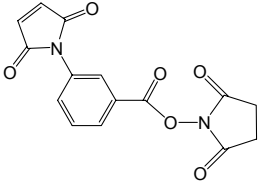
Name	Struktur	Spezifität	Ref.
<i>Glutaraldehyd</i>		unspezifisch	174
<i>4,4'-Diazidobiphenyl (DABP)</i>		unspezifisch	175
<i>Bisimidoester</i>			
<i>Dimethylmalonimidat (DMM)</i>		-NH ₂	176
<i>Dimethylsuccinimidat (DMSC)</i>		-NH ₂	
<i>Dimethyladipimidat (DMA)</i>			
<i>Dimethylpimelimidat (DMP)</i>			
<i>Dimethylsuberimidat (DMS)</i>			
<i>Suberinsäure-N-Hydroxysuccinimidester (NHS-SA)</i>		-NH ₂ -NH ₂	177
<i>N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP)</i>		-NH ₂ -SH	178
<i>N-Succinimidyl-4-(N-maleinimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC)</i>		-NH ₂ -SH	179
<i>m-Maleinimidobenzoessäure-N-hydroxysuccinimidester (MBS)</i>		-NH ₂ -SH	180

Abb. 3.34: Einige bekannte bifunktionelle Kupplungsreagenzien

Zur geplanten Konjugation der Glycopeptide sind diese jedoch wenig geeignet. So erlaubt der oft verwendete *m*-Maleinimidobenzoessäure-N-hydroxysuccinimidester (MBS) zwar die selektive Anbindung eines Haptens über eine Thiofunktion, allerdings ist dieser Linker selbst hoch immunogen. Dies verursacht die unerwünschte Bildung von Antikörpern gegen die Linkerstruktur und kann sogar die Immunantwort gegen das Hapten vollständig

unterdrücken¹⁸¹. Auch andere Konjugationsreagenzien wie N-Succinimidyl-4-(N-maleinimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) oder N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP) enthalten solche artifiziellen, hoch immunogenen Strukturen.

3.2.2 Konjugationsstrategie

Die Anbindung der tumorassoziierten Glycopeptide soll in dieser Arbeit über einen nicht immunogenen Linker erfolgen, der in einer hochselektiven Reaktion zu definierten Konjugaten führt. Die Konjugationsreaktion soll vorzugsweise in Wasser als Lösungsmittel durchgeführt werden können. Um die empfindlichen glycosidischen Bindungen nicht zu gefährden, sollte die Konjugation bei neutralem pH-Wert stattfinden.

Eine zur Konjugation von Haptenen an Proteine möglicherweise gut geeignete Reaktion, welche alle genannten Kriterien erfüllt, ist die radikalische Addition von Thiolen an Olefine¹⁸²⁻¹⁸⁴.

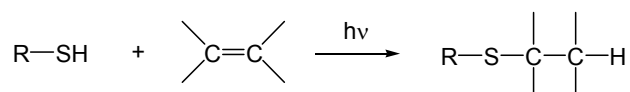


Abb. 3.35: Schema der radikalischen Addition von Thiolen an Olefine

Diese Radikalkettenreaktion kann durch Radikalstarter oder Bestrahlung mit UV-Licht ausgelöst werden und erreicht kinetische Kettenlängen von einigen hundert bis zu mehreren tausend.

Ein großer Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass die Bindung zwischen Hapten und Trägerprotein über einen immunologisch unbedenklichen Thioether erfolgt. Im Gegensatz zu den üblichen Linkerreagenzien (s. S. 40) werden hierbei also keine hoch artifiziellen Strukturen eingeführt, welche zur Bildung von gegen den Linker gerichteten Antikörpern führen.

Die grundsätzliche Eignung dieser radikalischen Additionsreaktion zur Konjugation von Haptenen mit Proteinen wurde bereits in der Diplomarbeit gezeigt¹⁸⁵. Das Trägerprotein wird hierbei mit einem olefinischen Linker durch normale Carbodiimid-vermittelte Kupplung modifiziert. Das Hapten, welches mit einer Thiolgruppe funktionalisiert ist, wird dann durch radikalische Addition mit dem Linker verknüpft.

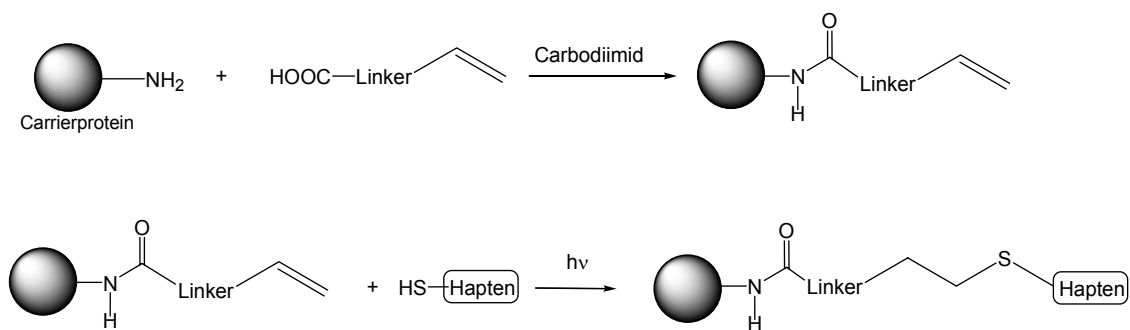


Abb. 3.36: Allgemeines Schema der Konjugationsreaktion

Diese Methodik soll nun auf die Anbindung von auf den tandem repeat-Sequenzen der Mucine basierenden Glycopeptiden, welche außerdem tumorassoziierte Kohlenhydrate tragen, angewendet werden.

3.2.3 Synthese von geeigneten Linkern für die Glycopeptid-Protein-Konjugation

Zur geplanten Konjugation von Glycopeptiden an Proteine durch radikalische Thiol-Olefin-Kupplung ist zunächst die Synthese entsprechender Linkermoleküle nötig.

Als olefinischer Linker wird ein bereits in der Diplomarbeit¹⁸⁵ dargestellter und erprobter Linker verwendet. Dieser enthält einen hydrophilen Oligoethylenglycol-Spacer, um eine konformationelle Beeinflussung des Glycopeptides durch das Protein auszuschließen.

Die Synthese führt in drei Schritten zum gewünschten Produkt: Zunächst erfolgt eine durch Natriumalkoholat katalysierte Hetero-Michael-Addition von Triethylenglycol an Acrylsäure-*tert*-butylester¹⁸⁶. Durch anschließende Veretherung von (36) mit Allylbromid unter Phasentransferkatalyse wird die benötigte olefinische Gruppe eingeführt. Abschließend wird der *tert*-Butylester von (37) acidolytisch gespalten.

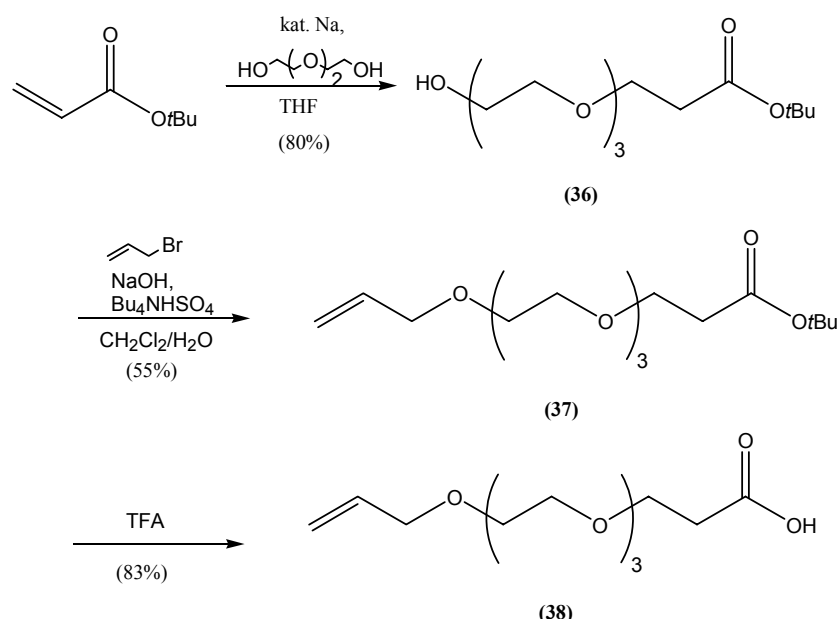


Abb. 3.37: Synthese des Olefin-Linkers

Die Anbindung des Olefin-Linkers (**38**) an BSA erfolgt mit Hilfe von Carbodiimid. Hierbei wird das wasserlösliche Kupplungsreagenz *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) in Verbindung mit *N*-Hydroxysuccinimid (HOSu) als Additiv verwendet. Nicht gekuppelte Linkermoleküle werden durch erschöpfende Dialyse gegen dest. Wasser entfernt. Das modifizierte Protein (**39**) wird durch Gefriertrocknung isoliert.

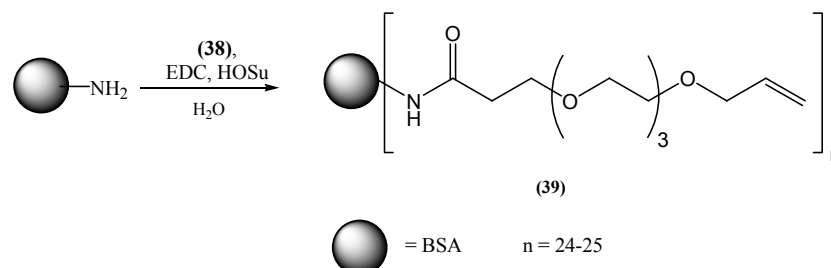


Abb. 3.38: Modifizierung des BSA

Die mittlere Beladung pro BSA-Molekül lässt sich durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie^{187,188} des Konjugats (**39**) zu 24-25 bestimmen. Wie bereits vorher ausgeführt, enthält BSA 30-35 gut zugängliche Aminogruppen für die Anbindung von Haptenen. Die Kupplungsausbeute beträgt somit 69-83%. In der Literatur werden typische Ausbeuten für Carbodiimid-vermittelte Hapten-Konjugationen von 50-70% angegeben¹¹³, die hier erzielte Ausbeute ist somit sehr gut.

Für die Konjugationsversuche in der Diplomarbeit wurde die Thiol-Funktion eines *N*-terminalen Cysteins verwendet. Nachteilig hierbei ist die Freilegung der oxidationsempfindlichen Thiolgruppe bereits bei der Abspaltung des Peptides vom Harz. Überdies ist diese Thiolfunktion relativ starr und sterisch schlecht zugänglich, wodurch die Konjugationsreaktion erschwert wird. Ferner zeigten die dargestellten Konjugate eine geringe Wasserlöslichkeit, weshalb sowohl die massenspektrometrische Analyse als auch immunologische Verwendungen stark eingeschränkt werden.

Es soll daher ein flexiblerer, hydrophiler Linker mit geschützter Thiolgruppe dargestellt werden, der über eine Carboxylfunktion direkt in der Festphasensynthese an den *N*-Terminus eines Glycopeptides angebunden werden kann. Ausgangspunkt hierfür ist das bereits hergestellte Hydroxyderivat (**36**). Zur Umwandlung einer Hydroxylgruppe in eine Thiolfunktion ergibt sich eine Reihe von Möglichkeiten¹⁸⁹. In dieser Arbeit wird dies durch eine nucleophile Substitution mit Cäsiumthioacetat¹⁹⁰ durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Thiolfunktion direkt durch eine Acetylgruppe geschützt eingeführt wird. Hierzu wird die Hydroxyfunktion von (**36**) zunächst durch Reaktion mit Methansulfonsäurechlorid in eine geeignete Abgangsgruppe überführt. Anschließend

Substitution mit aus Thioessigsäure und Cäsiumcarbonat erhältlichem Cäsiumthioacetat liefert den Thioester (41).

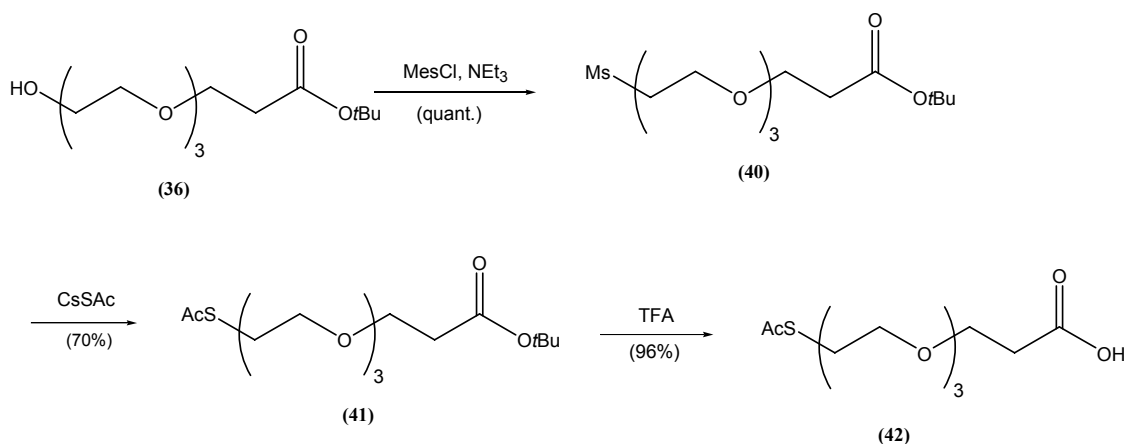


Abb. 3.39: Synthese des geschützten Thiol-Linkers

Die Acetylgruppe als Schutzgruppe für die Thiofunktion ist stabil sowohl gegenüber den bei der Peptidsynthese verwendeten Reagenzien als auch gegen saure oder hydrogenolytische Abspaltungen¹⁹¹. Sie kann jedoch leicht unter schwach basischen Bedingungen entfernt werden¹⁹². Dies ermöglicht die simultane Freilegung der Thiolgruppe während der Deblockierung der saccharidischen Hydroxyfunktionen der Kohlenhydratantigene durch *Zemplén*-Umesterung. Die oxidationsempfindliche Thiofunktion muss also erst im allerletzten Schritt der Synthese freigelegt werden.

Spaltung des *tert*-Butylesters von (41) mit Trifluoressigsäure liefert den fertigen Linker (42), der nun direkt in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden kann.

Um ein breiteres Spektrum an Deblockierungsreaktionen zur Verfügung zu haben, soll noch ein zu (42) analoger Linker mit einer durch eine andere Schutzgruppe versehenen Thiofunktion synthetisiert werden. Dies gelingt durch Deacetylierung von (42) mit Lithiumhydroxid in Methanol und direkter Reaktion des so *in situ* generierten Thiols mit Dipyridyldisulfid¹⁹³. Anschließende saure Spaltung des *tert*-Butylesters von (43) liefert den fertigen Linker.

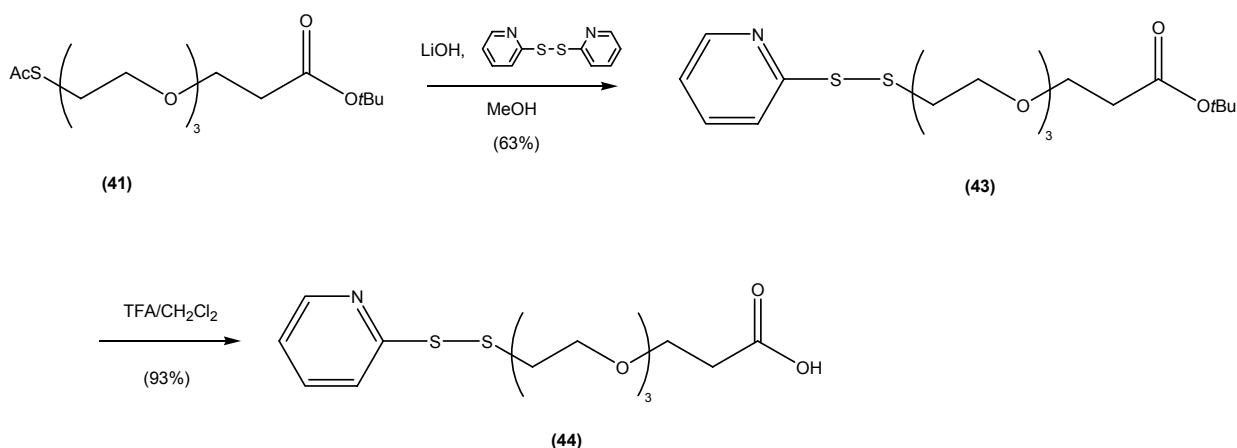


Abb. 3.40: Synthese des Pyridylsulfenyl-geschützten Thiol-Linkers

Auf diese Weise wird (44) mit einer durch die 2-Pyridylsulfenyl-Gruppe geschützten Thiolfunktion erhalten. Diese Schutzgruppe ist stabil gegenüber sauren und basischen Bedingungen, kann aber leicht durch Thiol-Disulfid-Austausch, vorzugsweise mit Dithiolen wie Dithiothreitol (DTT), abgespalten werden. Triebkraft hierbei ist die entropisch günstige Bildung des cyclischen Disulfides sowie des stabilen 2-(1H)Thiopyridons.

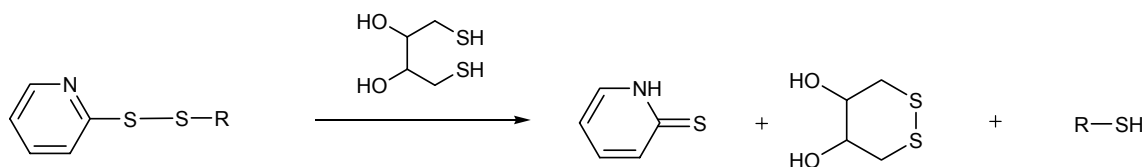


Abb. 3.41: Abspaltung der Pyridylsulfenylschutzgruppe

Bei der basischen Deacetylierung von mit diesem Linker versehenen Glycopeptiden würde also die Thiolfunktion noch geschützt bleiben. Das Glycopeptid könnte gereinigt werden und die Thiolgruppe würde erst in einem anschließenden, letzten Deblockierungsschritt freigesetzt.

3.2.4 Das Allgemeine Protokoll der Festphasen(glyco)peptidsynthese

Alle automatisierten (Glyco-)Peptidsynthesen an der festen Phase wurden an einem *ABI 433A* Peptidsynthesizer der Firma *Perkin Elmer* durchgeführt. Als polymere Träger wurden ausschließlich Tentagel-Harze¹⁹⁴ verwendet. Hierbei handelt es sich um Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymere, wobei sich die zur Peptidsynthese benötigten funktionellen Gruppen am Ende von aufgepfropften Polyethylenglycol-Ketten befinden. Durch die hydrophilen Polyethylenglycol-Spacer besitzen diese Tentagel-Harze eine sehr gute Quellfähigkeit in polaren Lösungsmitteln, wodurch die Peptidsynthese wesentlich erleichtert wird und somit höhere Ausbeuten erzielt werden können.

Zur Anbindung der Startaminosäure dienen die säurelabilen Wang-⁹⁵ und Trityl-^{96,97} Linker. Je nach Problemstellung werden entweder kommerziell erhältliche, beladene Harze verwendet oder die Beladung mit einer geeigneten Startaminosäure selbst durchgeführt.

Die Synthesen erfolgen alle nach der Fmoc-Strategie. Die Aminogruppe der Aminosäurebausteine ist daher mit Fmoc als temporärer Schutzgruppe versehen, während sämtliche Seitenkettenfunktionalitäten säurelabile, permanente Schutzgruppen tragen. Serin, Threonin und Tyrosin werden als *tert*-Butylether geschützt, Asparaginsäure als *tert*-Butylester und die ϵ -Aminofunktion von Lysin mit der Boc-Schutzgruppe. Asparagin und Histidin sind in der Seitenkette durch N-Tritylgruppen geschützt. Die Guanidinfunktion von Arginin wird durch die 2,2,5,7,8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonyl-Gruppe (Pmc)¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ blockiert.

Bei der sequentiellen, automatisierten Festphasensynthese erfolgt der Aufbau des Peptids aus den Aminosäurebausteinen in iterativen Schritten. Jeder Syntheseschritt setzt sich hierbei aus drei Teilschritten zusammen.

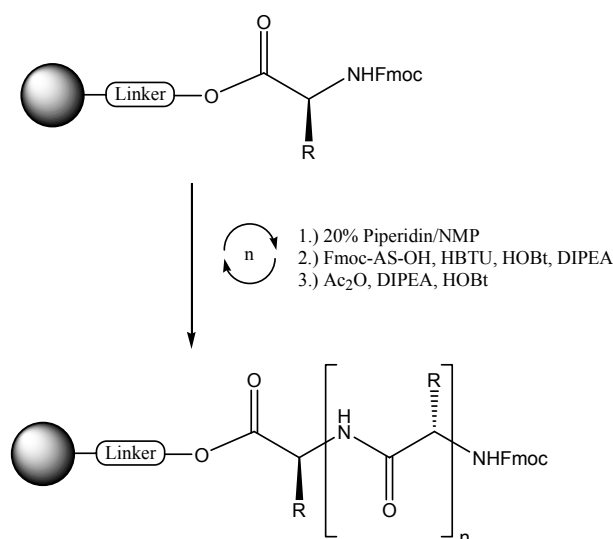


Abb. 3.42: Allgemeines Schema der Festphasenpeptidsynthese

Zunächst wird die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Diese Spaltung erfolgt nach einem E1_{cB}-Mechanismus, bei dem das acide Proton an Position 9 von Fmoc durch Piperidin deprotoniert wird. Das entstehende Dibenzofulven reagiert mit Piperidin zu einem stabilen Addukt (**45**).

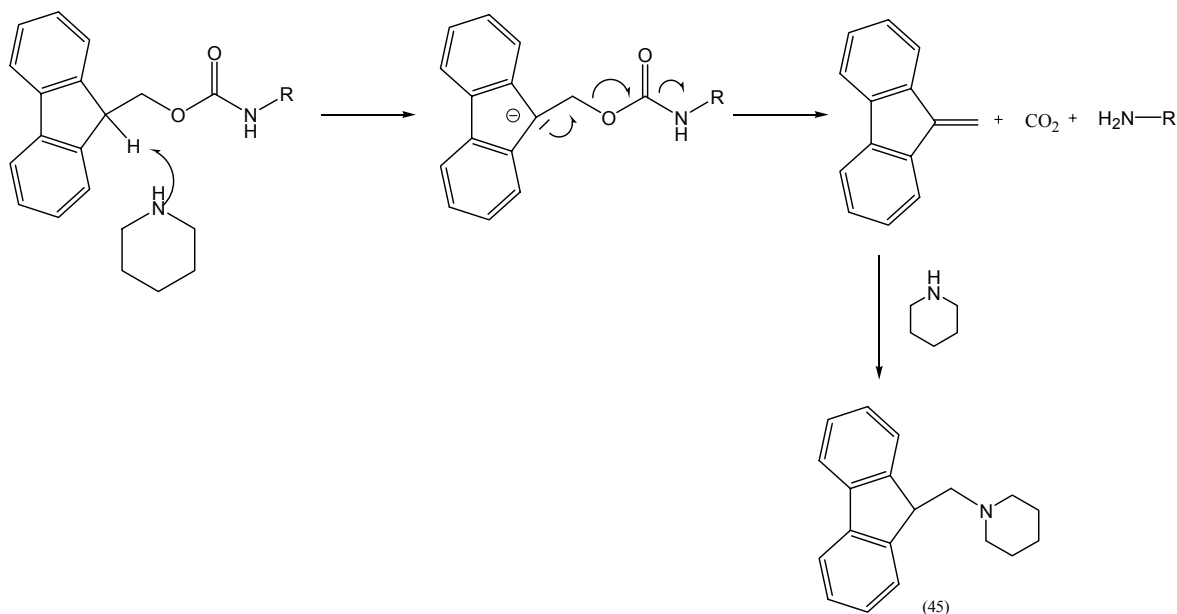


Abb. 3.43: Mechanismus der Fmoc-Abspaltung

Zur Reaktionskontrolle dient die UV-Absorptionsmessung des Adduktes (**45**) in der Abspaltungslösung. Falls nötig, wird die Abspaltung mehrfach wiederholt. Die gemessenen Werte der UV-Absorption sind proportional zur Fmoc-Konzentration und lassen somit Rückschlüsse auf die vorangegangene Kupplung zu. Folglich ist eine Kontrolle des gesamten Syntheseverlaufes durch das Abspaltungsprotokoll möglich.

Nach Freilegung der Aminogruppe erfolgt die Kupplung des nächsten Aminosäurebausteins. Zur Aktivierung wird das Kupplungsreagenz HBTU (*O*-(Benzotriazol-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und Diisopropylethylamin (DIPEA) als Base eingesetzt (s. Abb. 1.6). Durch das HBTU wird die Aminosäure über einen *O*-Acylharnstoff als Intermediat in einen reaktiven HOBT-Aktivester überführt, der anschließend mit den Aminogruppen unter Aminolyse zum Amid reagiert. Die Zugabe von DIPEA (zur Deprotonierung der Carbonsäure und des HOBT) und HOBT beschleunigt die Bildung des Aktivesters und hilft gleichzeitig, eine Racemisierung der Aminosäure zu verhindern.

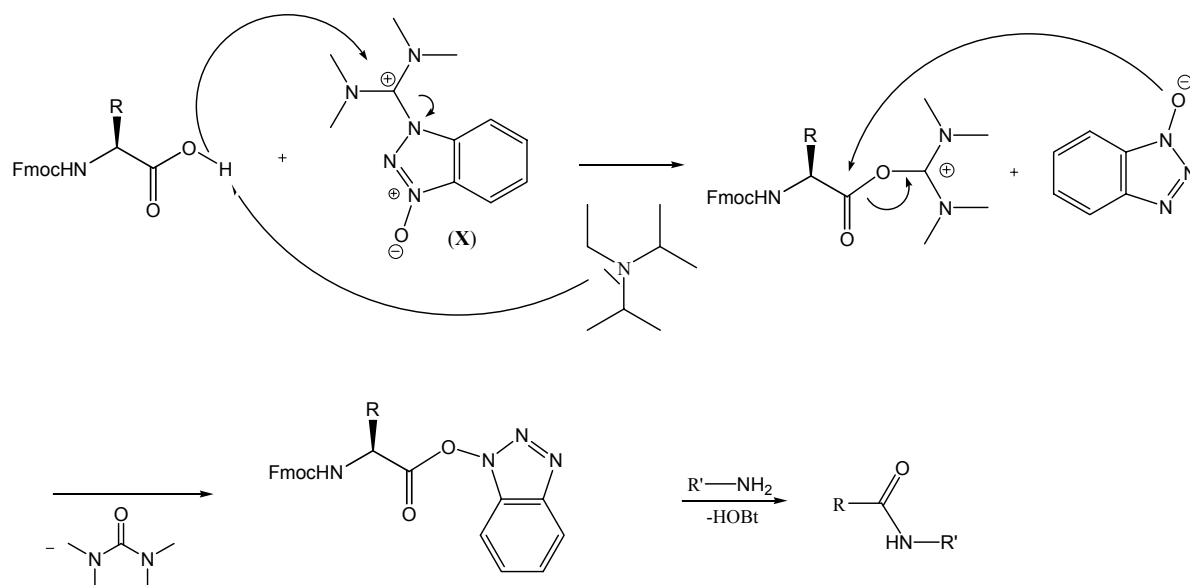


Abb. 3.44: Mechanismus der Carbonsäureaktivierung mit HBTU

Das Harz wird 20-30 Minuten in der Kupplungslösung geschüttelt. Da die glycosylierten Aminosäurebausteine sterisch sehr anspruchsvoll sind und außerdem in einem geringeren Überschuss eingesetzt werden, wird zu deren Kupplung die Reagenzienkombination *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU) und 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) (s. Abb. 1.6) verwendet. Durch den Nachbargruppen-effekt des Pyridinstickstoffes sind die entstehenden HOAt-Ester reaktiver als HOBt-Ester: Das zusätzliche Stickstoffatom koordiniert das angreifende Amin über eine Wasserstoffbrücke und sorgt somit für eine Vororientierung der Edukte. Außerdem ist HOAt eine stärkere Säure als HOBt und somit auch die bessere Abgangsgruppe. HATU in Verbindung mit HOAt ermöglicht so auch bei den glycosylierten Bausteinen normalerweise hohe Kupplungsausbeuten.

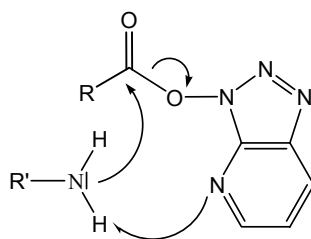


Abb. 3.45: Mechanismus der Kupplung mit HOAt-Estern

Nach jedem Kupplungsschritt erfolgt ein Capping, bei dem nicht umgesetzte Aminogruppen in einer Lösung aus Acetanhydrid, DIPEA und katalytischen Mengen HOBt acetyliert werden. Hiermit wird das Entstehen von Fehlsequenzen, die sich nur durch das Fehlen einer einzigen Aminosäure vom Produkt unterscheiden und somit schwierig abzutrennen sind,

verhindert. Die acetylierten Abbruchsequenzen lassen sich hingegen bei der chromatographischen Reinigung durch HPLC meist leicht entfernen.

Nach jedem Teilschritt wird die Reaktionslösung durch Filtration entfernt und das Harz gründlich gewaschen. Eine gute Durchmischung des Harzes mit den Reagenzien im Reaktor wird durch starkes Schütteln (Vortex) erreicht.

Durch Wiederholung der drei Schritte wird aus den (glycosylierten) Aminosäurebausteinen das (Glyco-)Peptid am Harz aufgebaut. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure, wobei auch sämtliche säurelabilen Seitenketten-schutzgruppen entfernt werden. Der Abspaltungslösung werden dabei Scavenger zugesetzt, welche die entstehenden Kationen abfangen, um eine Alkylierung des Peptids zu verhindern.

3.2.5 Synthese von Thiol-funktionalisierten Glycopeptiden

Es sollen nun durch automatisierte Festphasenpeptidsynthese Glycopeptide hergestellt werden, die mit dem geschützten Thiol-Linker (**42**) funktionalisiert werden. Zuerst wird die tandem repeat-Sequenz des MUC4 (s. Abb. 1.3) als Zielsequenz hergestellt. In das Peptid soll anstelle von Thr(10) der T_N-Antigen-Baustein eingebaut werden. Die Synthese erfolgt entsprechend dem allgemeinen Protokoll (s. 3.2.4). Als feste Phase dient ein Tentagel-Harz, an das die Startaminosäure Asparaginsäure über den Wang-Anker gebunden ist. Die Aminosäurebausteine werden in zehnfachem Überschuss eingesetzt.

Zunächst erfolgt die automatisierte Kupplung bis zu Pro(11). Die anschließende Kupplung des glycosylierten Threonin-Bausteins (**9**) wird mit Hilfe der Reagenzienkombination HATU/HOAt in einer halbautomatischen Kupplung durchgeführt. Hierzu werden der Baustein (**9**) und die Kupplungsreagenzien in eine Aminosäurekartusche des Synthesizers eingewogen, in NMP gelöst und durch Zugabe von *N*-Methylmorpholin (NMM) aktiviert. Die Verwendung von NMM statt DIPEA vermindert das Racemisierungsrisiko bei Verwendung dieser reaktiven Reagenzienkombination und der verlängerten Reaktionszeit. Nach Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird die Kupplungslösung in den Reaktor zum Harz überführt. Die Kupplungszeit wird auf drei Stunden verlängert. Die anschließende Kupplung von Ala(9) bis Thr(1) erfolgt wieder vollautomatisch nach dem Standardprotokoll.

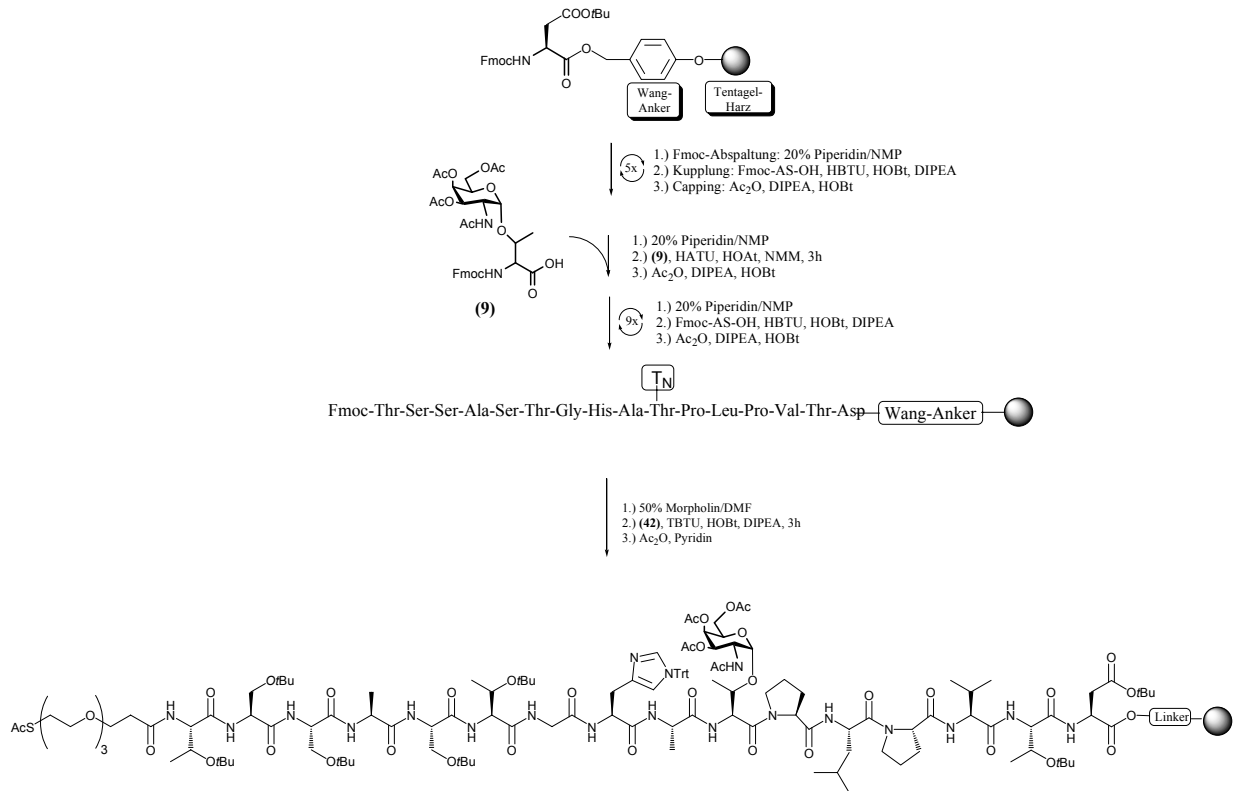


Abb. 3.46: Festphasensynthese des funktionalisierten Glycopeptids

Das UV-Abspaltungsprotokoll zeigt keine Auffälligkeiten während der gesamten Synthese.

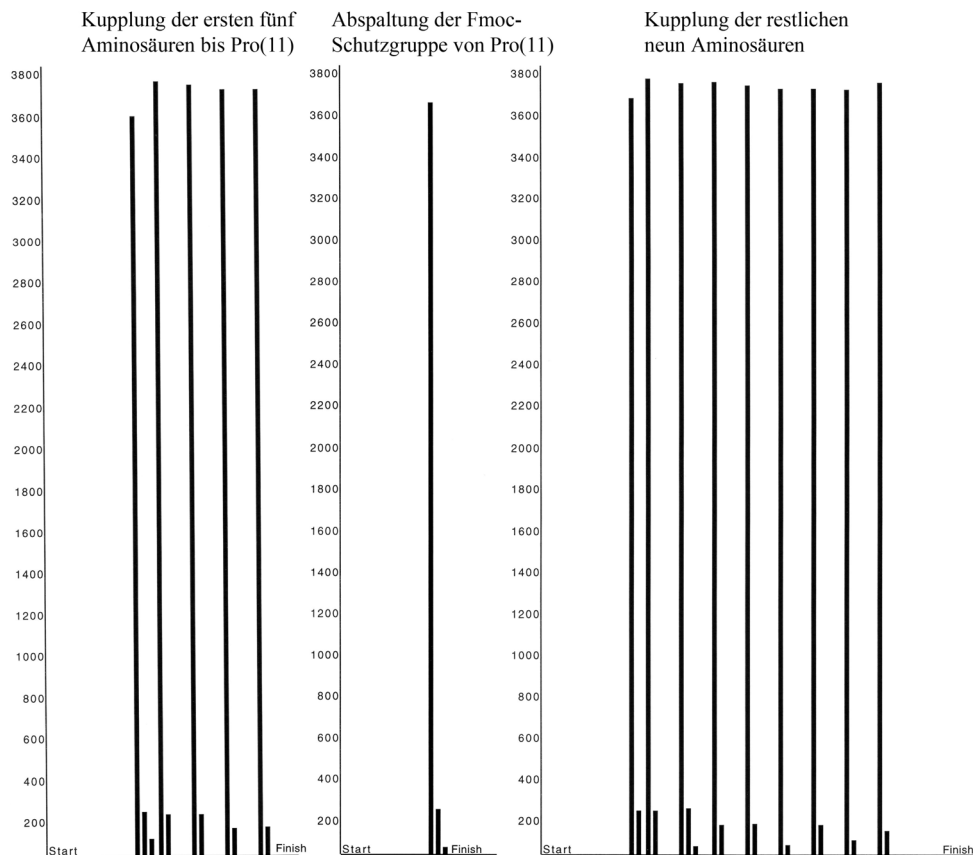


Abb. 3.47: UV-Protokoll der Festphasensynthese

Die anschließende Anbindung des geschützten Thiollinkers (**42**) erfolgt in einer manuellen Kupplung. Hierzu wird das Harz in einen Festphasenreaktor nach Merrifield überführt. Hierbei handelt es sich um einen 250 mL-Glaskolben mit am Boden eingelassener Fritte und Schliffhahn, wodurch ein Abfiltrieren der Reagenzien und Waschen des Harzes ermöglicht wird. Zunächst wird die terminale Fmoc-Schutzgruppe mit Morpholin in DMF abgespalten. Anschließend wird die Kupplung des Linkers (**42**) unter Aktivierung mit TBTU/HOBt und DIPEA durchgeführt. Auch für diese Kupplung wird die Reaktionszeit auf drei Stunden ausgedehnt. Abschließend erfolgt ein Cappingschritt mit Acetanhydrid/Pyridin. Das Glycopeptid wird durch Behandlung mit Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten. Hierbei werden Triisopropylsilan (TIS) und dest. Wasser als Kationenscavenger zugesetzt.

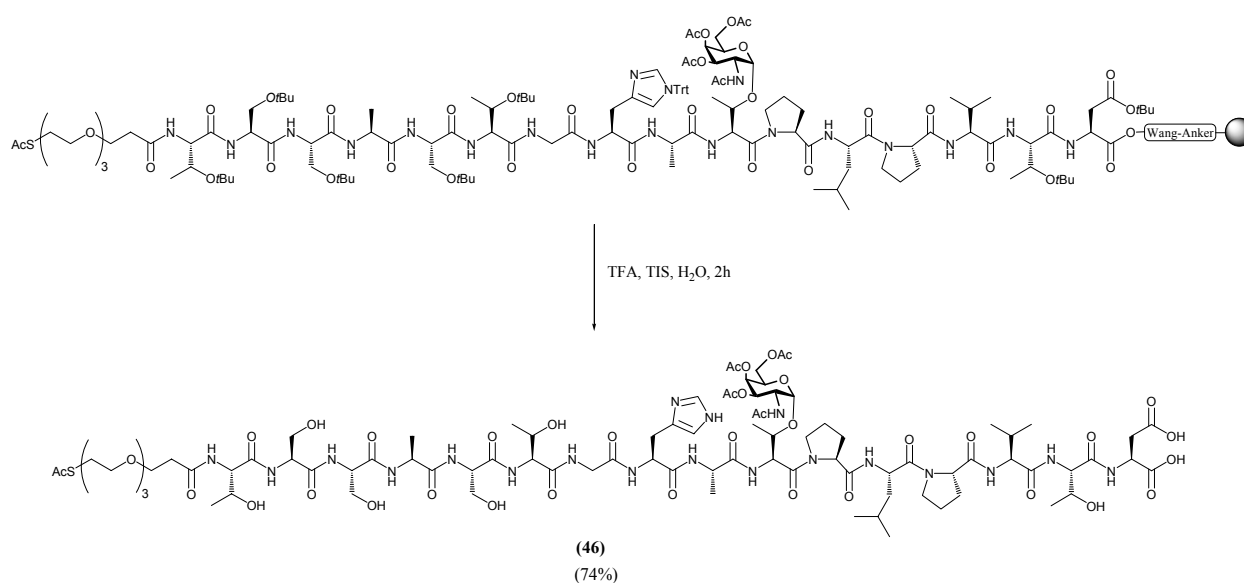


Abb. 3.48: Abspaltung vom Harz

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mittels RP-HPLC. Das Glycopeptid (**46**) kann in einer hohen Ausbeute von 74% erhalten werden. Dies entspricht einer mittleren Ausbeute von über 98% pro Kupplungsschritt.

Die korrekte Struktur des Glycopeptids (**46**) kann durch massenspektrometrische und NMR-Analyse belegt werden. Die Deblockierung des Saccharidteils von (**46**) unter gleichzeitiger Freilegung der Thiolfunktion und die anschließende Anbindung an BSA wird im nächsten Kapitel beschrieben.

Nachdem die Festphasensynthese des MUC4-Glycopeptides erfolgreich durchgeführt werden konnte, soll nun ein entsprechendes Glycopeptid basierend auf der tandem repeat Sequenz von MUC1 synthetisiert werden. Der T_N-Antigen-Baustein (**9**) soll anstelle von Thr(3) eingebaut werden. Die Festphasensynthese wird in Analogie zur Synthese von (**46**) durchgeführt. Als polymere Matrix kommt nun ein mit der Startamino­säure Prolin beladenes

Tryl-Tentagelharz zum Einsatz. Die Synthese wird bis Ser(4) nach dem allgemeinen Protokoll für die automatische Festphasensynthese durchgeführt. Die Kupplung des T_N-Bausteins (**9**) erfolgt halbautomatisch unter Aktivierung mit HATU/HOAt/NMM.

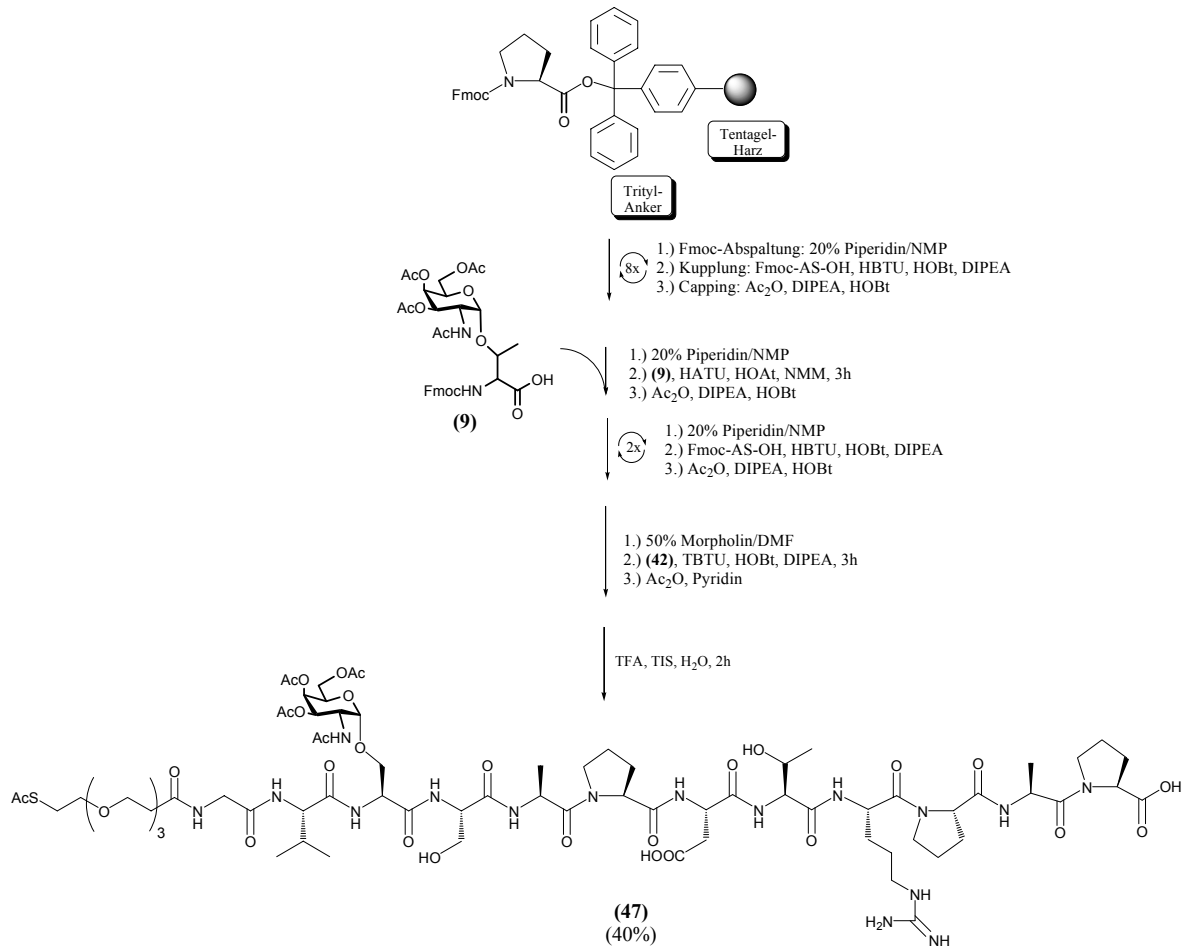


Abb. 3.49: Festphasensynthese von (**47**)

Die Kupplung der letzten beiden Aminosäuren erfolgt wieder vollautomatisch nach dem Standardprotokoll, die Kupplung des Thiollinkers manuell im Merrifieldreaktor. Nach saurer Abspaltung vom Harz und Reinigung durch RP-HPLC kann das Glycopeptid (**47**) in 40%iger Ausbeute isoliert werden.

Der (2,6)-Sialyl-T_N- und der (2,3)-Sialyl-T-Baustein sollen nun ebenfalls in vom MUC1 abgeleitete Glycopeptide eingebaut werden.

Die Synthese des mit dem ST_N-Antigen glycosylierten MUC1-Peptides wird analog zur vorhergehenden Synthese durchgeführt. Es wird mit Fmoc-Prolin beladenes Tryl-Tentagel als feste Phase verwendet.

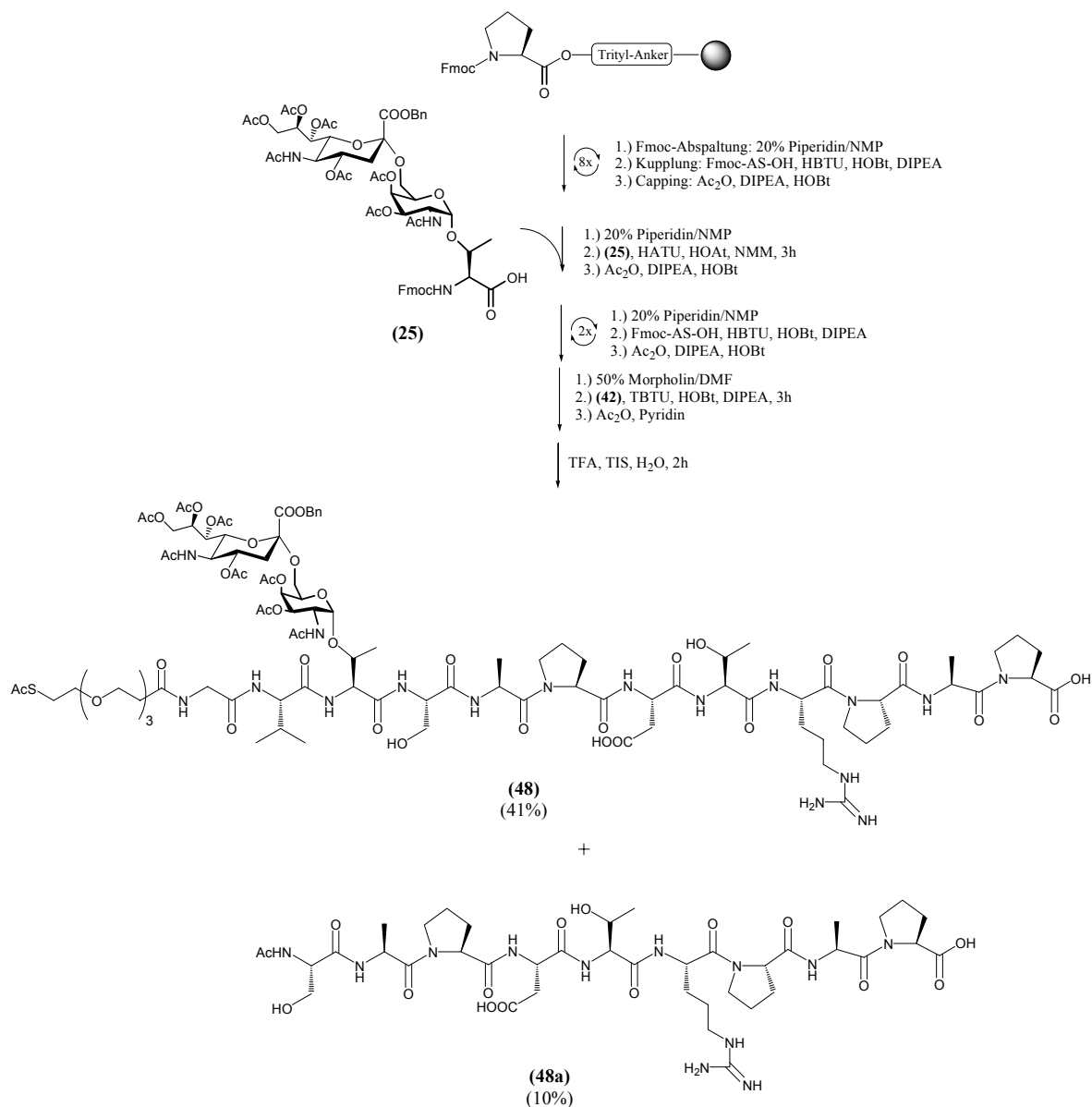


Abb. 3.50: Festphasensynthese von (48)

Bei dieser Synthese kann im UV-Abspaltungsprotokoll nach der Kupplung des ST_N-Bausteins (25) ein deutlich sichtbarer Abfall der UV-Absorption beobachtet werden, was auf eine unvollständige Kupplung der glycosylierten Aminosäure hindeutet. Der Thiollinker (42) wird dieses Mal nicht manuell, sondern vollautomatisch im Synthesizer gekuppelt. Der Übergang zu dieser Arbeitsweise stellt eine zusätzliche Erleichterung der Synthese dar. Wie schon aus dem UV-Reaktionsprotokoll zu erwarten war, wird nach Abspaltung und Reinigung des Rohproduktes neben dem gewünschten Produkt (48) auch eine geringe Menge der Abbruchsequenz (48a) isoliert. Die vollautomatische Kupplung des Thiollinkers am Synthesizer hingegen verursachte keine Schwierigkeiten bei der Synthese, der Linker (42) ist also mit der üblichen Standard-Festphasensynthese voll kompatibel.

Die Synthese des mit dem (2,3)-Sialyl-T-Baustein glycosylierten MUC1-Glycopeptides erfolgt in völlig analoger Weise.

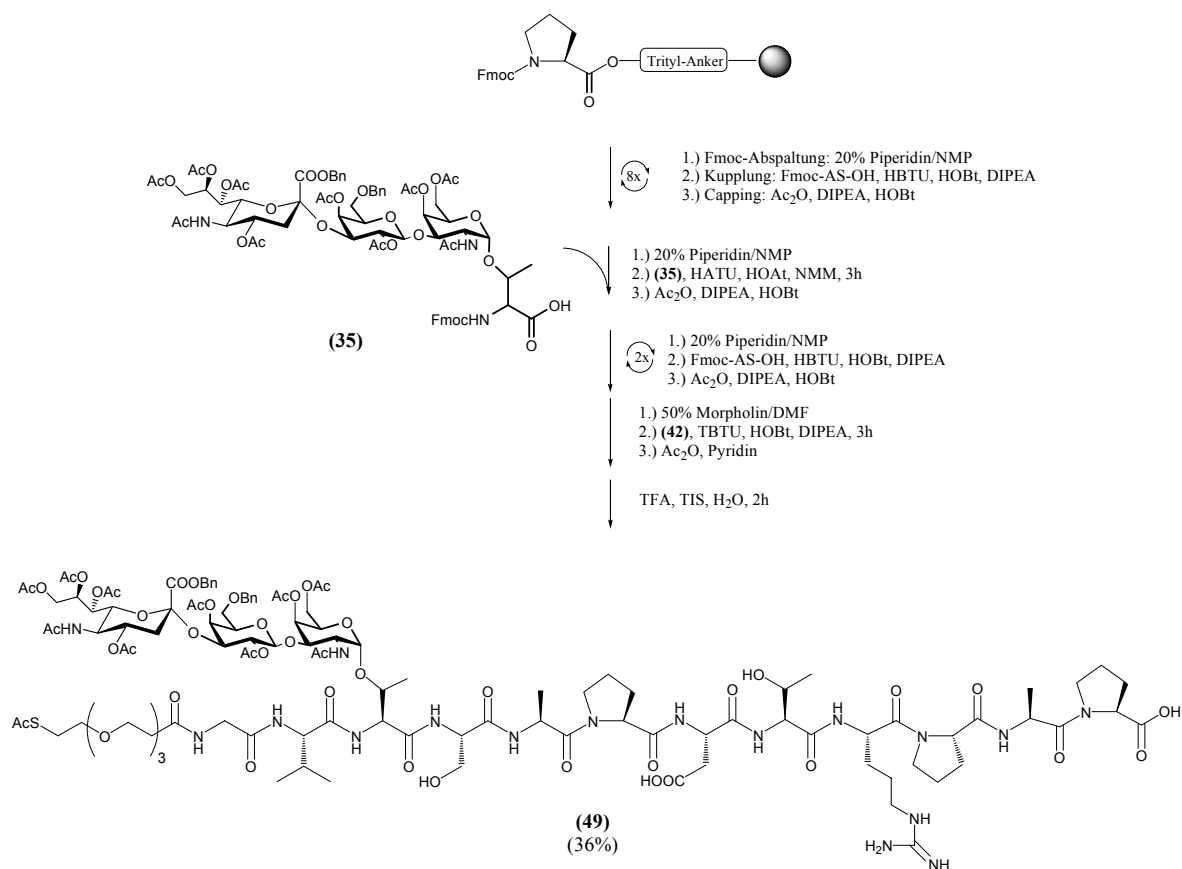


Abb. 3.51: Synthese von (49)

Hierbei sind im UV-Protokoll der Synthese trotz des Einsatzes von nur 1.3 Äquivalenten des glycosylierten Aminosäurebausteins (35) keine Probleme sichtbar. Auch dieses Mal erfolgt die Kupplung des Thiollinkers vollautomatisch im Synthesizer. Nach Abspaltung vom Harz und Reinigung durch RP-HPLC kann das Glycopeptid (49) in 36% Ausbeute isoliert werden. Interessanterweise treten bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung des Glycopeptids (49) unerwartete Probleme auf: Sowohl im Protonen- als auch im Kohlenstoff-NMR-spektrum zeigen sich starke Verbreiterungen bei fast allen Resonanzsignalen der Kohlenhydratseitenkette. Wegen der damit einhergehenden Verminderung der Intensität der Resonanzsignale sind sowohl im zweidimensionalen ¹H,¹H-COSY- als auch im HSQC-Spektrum die meisten Signale des Trisaccharides nur sehr schwach oder sogar überhaupt nicht zu erkennen. Die Signale des Peptidrückgrats hingegen sind größtenteils klar sichtbar. Verursacht werden diese Signalverbereiterungen wahrscheinlich von der großen Dynamik des Moleküls, was in diesem Ausmaß nicht vorherzusehen war. Ein Wechsel des Lösungsmittels von D₂O zu deuteriertem Methanol brachte keine Verbesserung. Durch eine Verlängerung der

Messzeit auf zehn Stunden konnte aber schließlich ein vollständiges HSQC-Spektrum erhalten werden, mit dem die Überprüfung der Struktur von (49) möglich war.

Die Deblockierung der dargestellten funktionalisierten Glycopeptide und die anschließende Anbindung an BSA werden im nächsten Kapitel beschrieben.

3.2.6 Deblockieren der Glycopeptide und Konjugation mit dem modifizierten BSA

Das Deblockieren des funktionalisierten Glycopeptides (46) erfolgt durch *Zemplén*¹²¹-Umesterung mit katalytischen Mengen Natriummethanolat in Methanol.

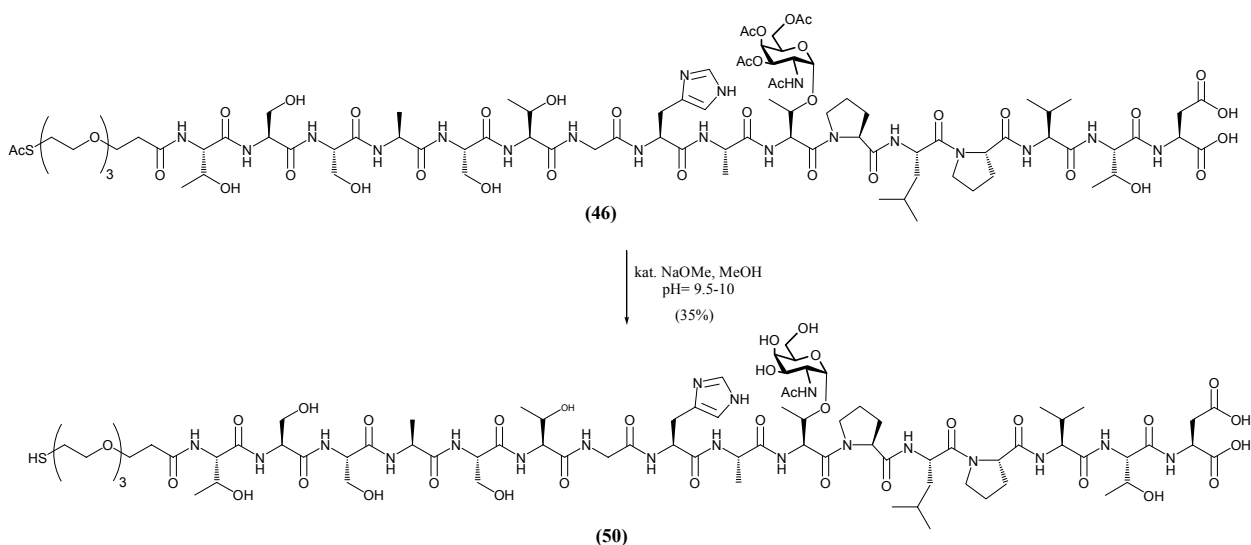


Abb. 3.52: Vollständiges Deblockieren von (46)

Neben der Abspaltung der saccharidischen Acetylschutzgruppen wird hierbei gleichzeitig die Thiofunktion deblockiert. Um die Gefahr einer oxidativen Dimerisierung zu minimieren, wird das verwendete Methanol vorher vom Sauerstoff befreit und die Reaktion unter Argon durchgeführt. Nach Reinigung über semipräparative HPLC kann das vollständig deblockierte, thiofunktionalisierte MUC4(T_N)-Glycopeptid (50) in 35% Ausbeute erhalten werden.

Die Charakterisierung des oxidationsempfindlichen Glycopeptides erfolgt nur durch ESI-Massenspektrometrie. Es wird sofort der Konjugation mit dem modifizierten BSA unterworfen. Hierzu werden das modifizierte Protein und das thiofunktionalisierte Glycopeptid in entgastem Phosphat-Puffer (pH 7) gelöst und mehrere Stunden mit UV-Licht bestrahlt. Die Reinigung des Konjugats (51) erfolgt durch erschöpfende Dialyse gegen dest. Wasser. Hierbei wird nicht gebundenes Glycopeptid sowie das als Nebenprodukt gebildete Dimerisierungsprodukt aufgrund ihres wesentlich geringeren Molekulargewichts abgetrennt. Nach Lyophilisation wird das Konjugat (51) erhalten.

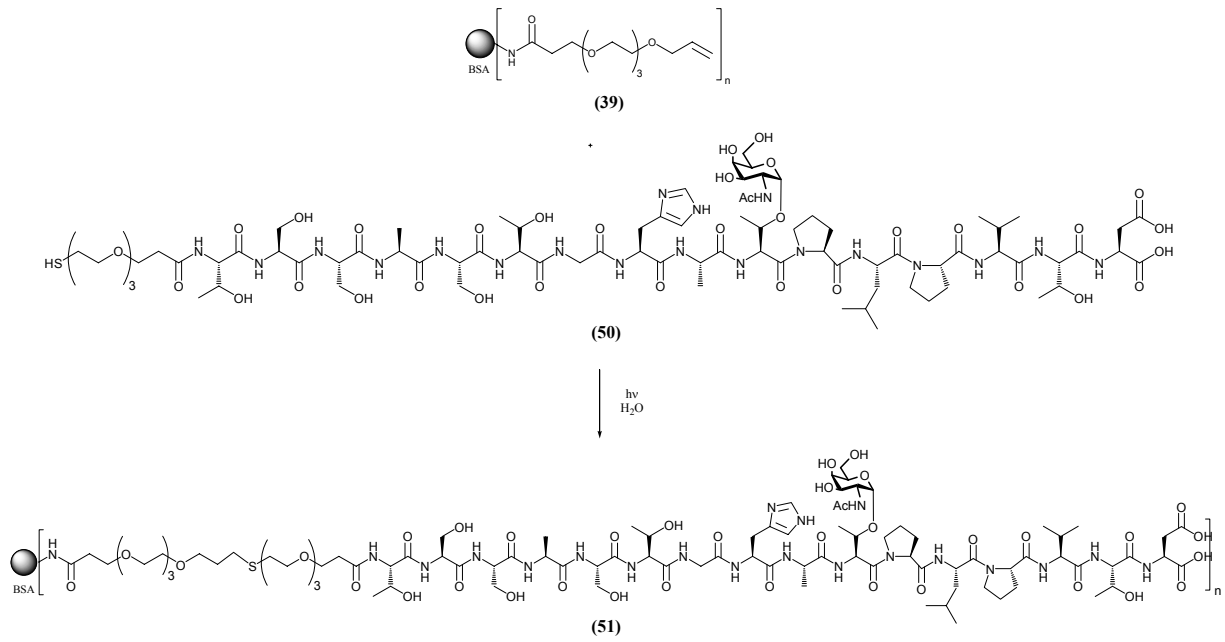


Abb. 3.53: Konjugation von (50) mit BSA

Die durch MALDI-TOF bestimmte Massenzunahme zeigt, dass die Anbindung des Glycopeptides (50) an BSA tatsächlich erfolgreich war.

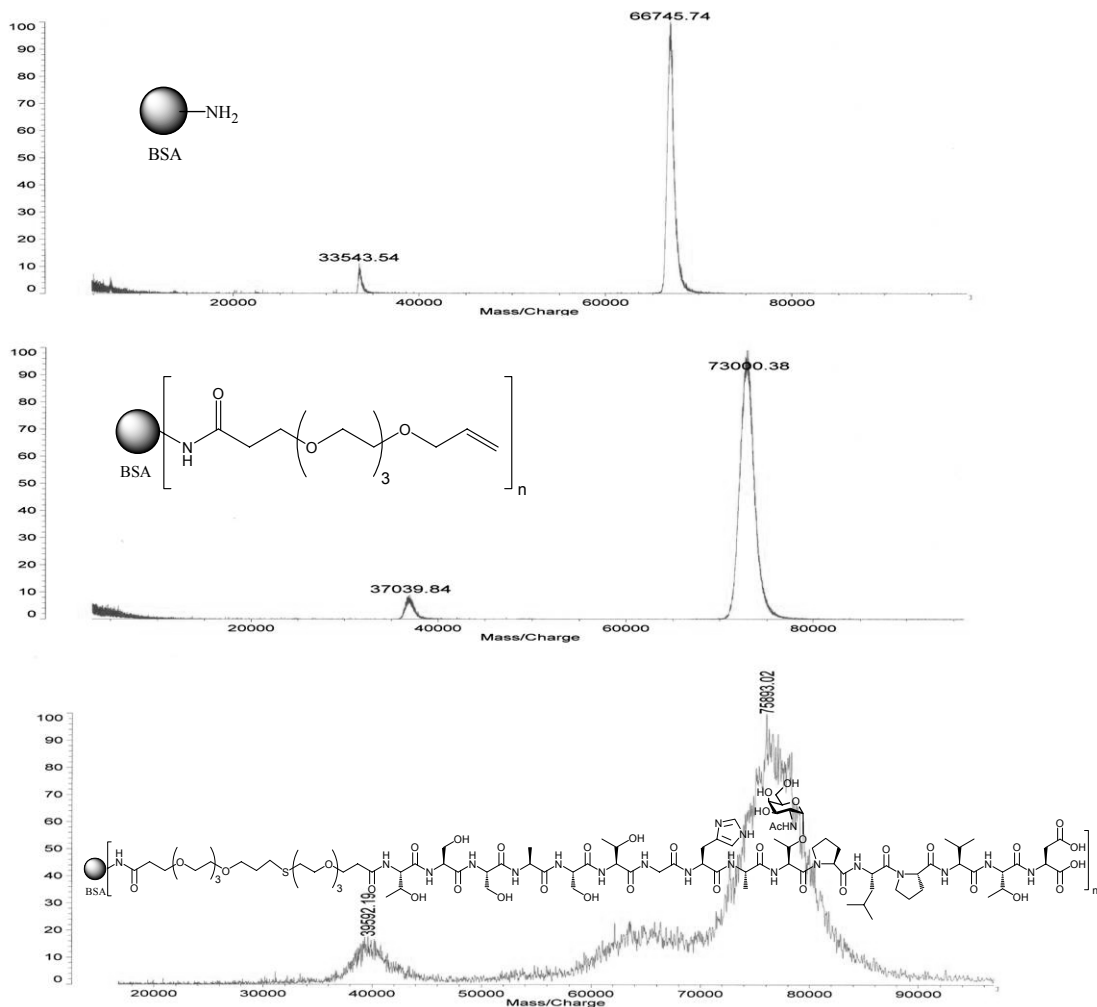


Abb. 3.54: MALDI-TOF-Spektren von BSA, (39) und (51)

Allerdings beträgt die Beladung nur ca. zwei Moleküle des Glycopeptids pro BSA-Molekül, die Ausbeute der Kupplungsreaktion ist also relativ niedrig.

Trotzdem sollen nun auch die anderen Glycopeptide deblockiert und mit BSA konjugiert werden. Die Deblockierung des Glycopeptids (47) erfolgt wieder unter *Zemplén*-Bedingungen.

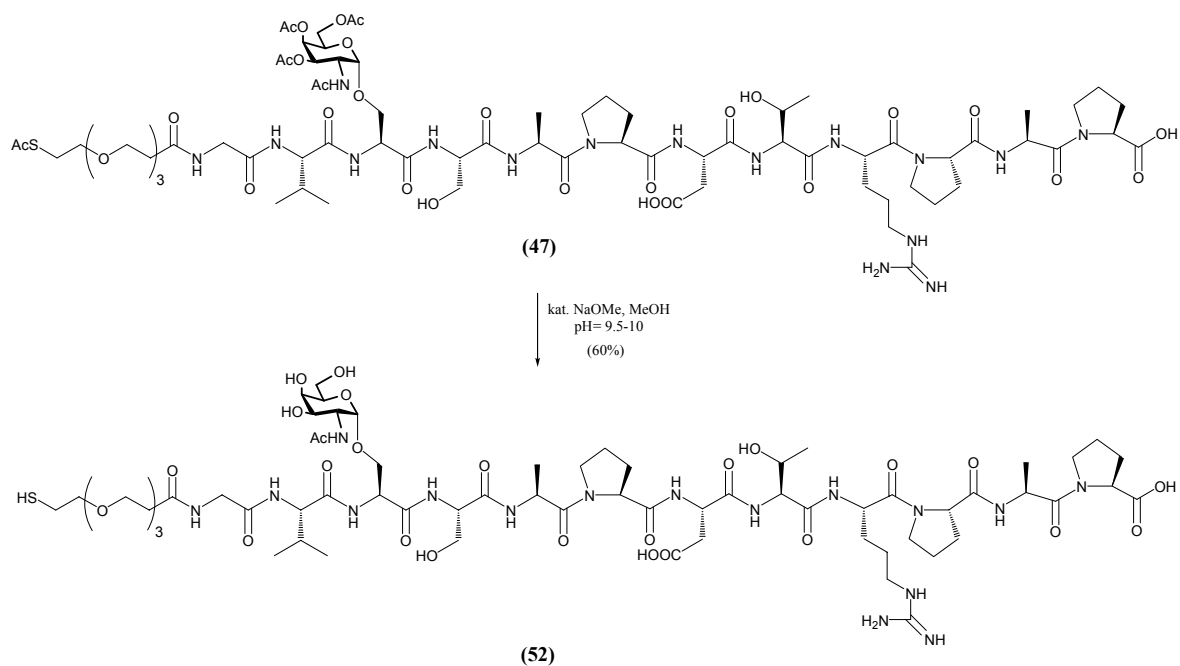


Abb. 3.55: Deblockieren von (47)

Das vollständig deblockierte Glycopeptid (52) wird nach Reinigung durch semipräparative HPLC in 60% Ausbeute erhalten. Die Konjugation mit dem modifizierten BSA (39) erfolgt unter den vorher beschriebenen Bedingungen.

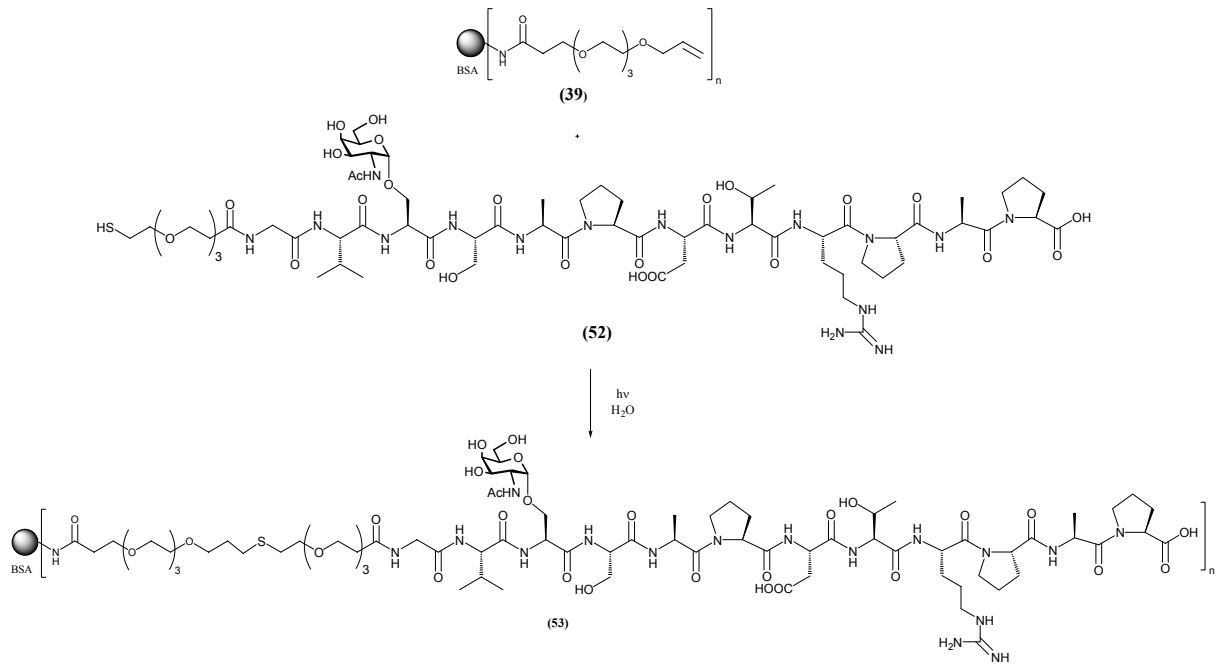


Abb. 3.56: Konjugation von (52) mit BSA

In diesem Fall kann durch massenspektrometrische Bestimmung der Massenzunahme im Konjugat (53) eine Beladung von 7-8 Molekülen des Glycopeptides pro BSA-Molekül festgestellt werden. Die Ausbeute der Kupplungsreaktion ist also wesentlich höher.

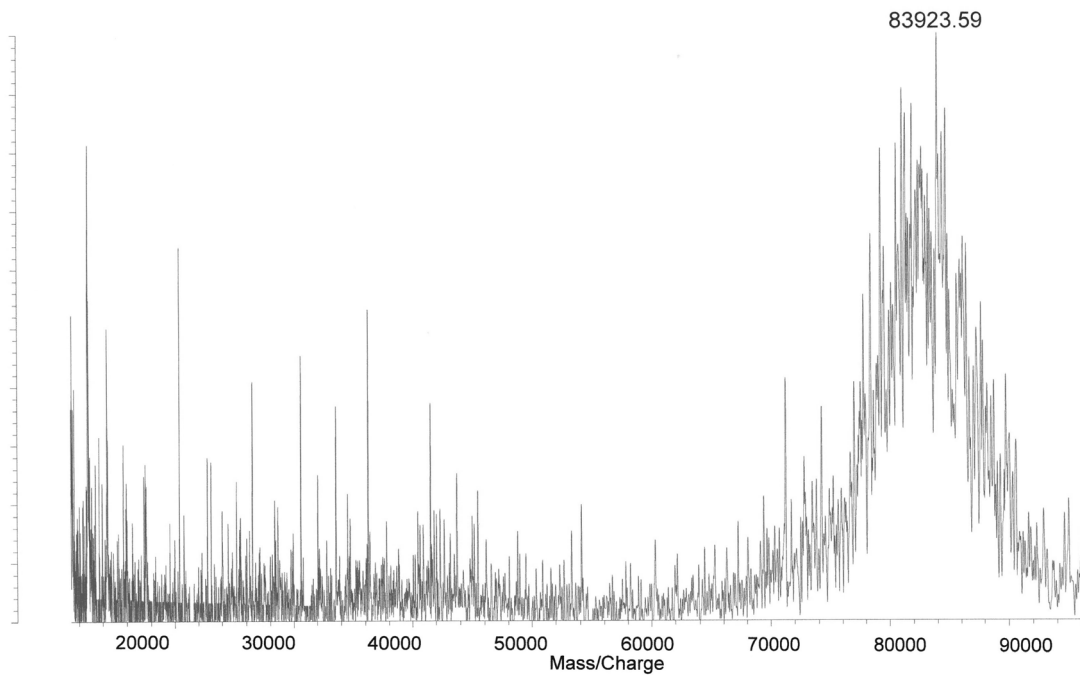


Abb. 3.57: MALDI-TOF-Spektrum von (53)

Die Signale des Konjugats (**53**) im Massenspektrum sind klar erkennbar, allerdings wesentlich schwächer als die des reinen BSA oder des linkermodifizierten BSA (**39**). Woran diese Intensitätsabnahme liegt, konnte nicht geklärt werden.

Um eine optimale Immunantwort zu erzielen, wird i. A. eine Beladung von 10-20 Molekülen des Haptens pro BSA-Molekül empfohlen^{113,170}. Um die Haptendichte im Konjugat (**53**) noch zu erhöhen, wird eine erneute Kupplung von frisch dargestelltem Glycopeptid an das Konjugat (**53**) vorgenommen. Die vorher nicht umgesetzten olefinischen Gruppen des Linkers sollten nach wie vor vorhanden sein und nun eventuell eine erneute Beladung mit dem Glycopeptid-Hapten erlauben.

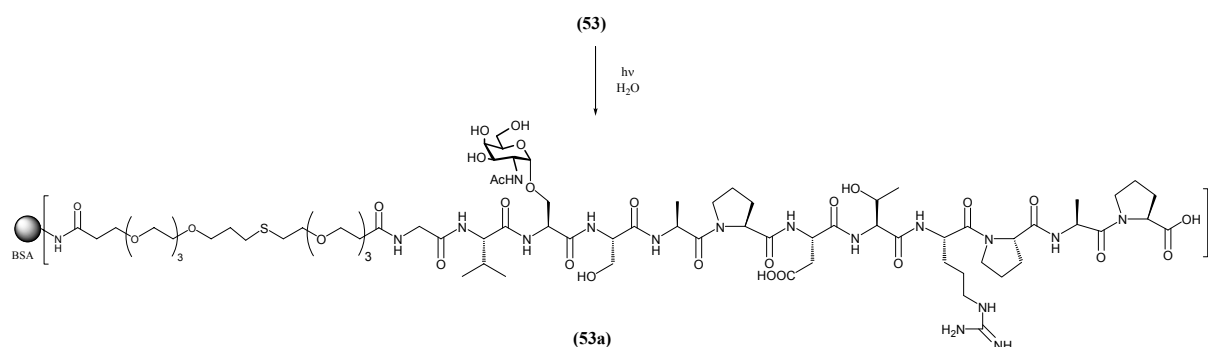


Abb. 3.58: Nachkupplung

Durch Analyse mittels MALDI-Massenspektrometrie wurde erneut die Hapten-Dichte im Konjugat (**53a**) ermittelt werden. Dies verursachte jedoch überraschenderweise große Probleme: Im Massenspektrum waren keinerlei Signale des Konjugats sichtbar. Trotz mehrfacher Versuche mit unterschiedlichen Arten der Probenvorbereitung und verschiedene Probenzusätze konnte kein Massenspektrum erhalten werden. Da auch das Edukt (**53**) nicht mehr sichtbar war, scheint tatsächlich eine Reaktion stattgefunden zu haben, deren Produkt allerdings offensichtlich nicht mehr so einfach zu ionisieren ist. Dies erscheint umso rätselhafter, weil ja das bereits mit Glycopeptid beladene BSA (**53**) ohne Probleme deutliche Signale im Massenspektrum ergab und an den Reaktionsbedingungen und auch bei der Aufarbeitung (Dialyse, Gefriertrocknung) keinerlei Veränderungen vorgenommen wurden. Denkbar wäre eine Denaturierung des Proteins, durch die das BSA seine globuläre Struktur verliert und in dieser Form im Massenspektrometer nicht mehr zu ionisieren ist. Fraglich ist dann allerdings, warum eine solche Denaturierung nicht bereits bei den vorangegangenen Reaktionen stattgefunden hat. Trotz intensiver Versuche konnte dieses Problem nicht gelöst werden.

Trotz dieses Rückschlags sollen nun auch die mit sialylierten Kohlenhydratantigenen versehenen Glycopeptide an BSA angebunden werden.

Zur Deblockierung des mit dem ST_N-Antigen glycosylierten Peptids (**48**) ist zunächst die hydrogenolytische Spaltung des Benzylesters nötig. Die Reaktion wird durch analytische HPLC und ESI-Massenspektrometrie verfolgt.

Nach vollständigem Abreagieren des Eduktes wird das Rohprodukt ohne weitere Reinigung der Deacetylierung unterworfen. Nach Reinigung über semipräparative HPLC wird das vollständig deblockierte MUC1(ST_N) Glycopeptid (**54**) in 42% Ausbeute erhalten.

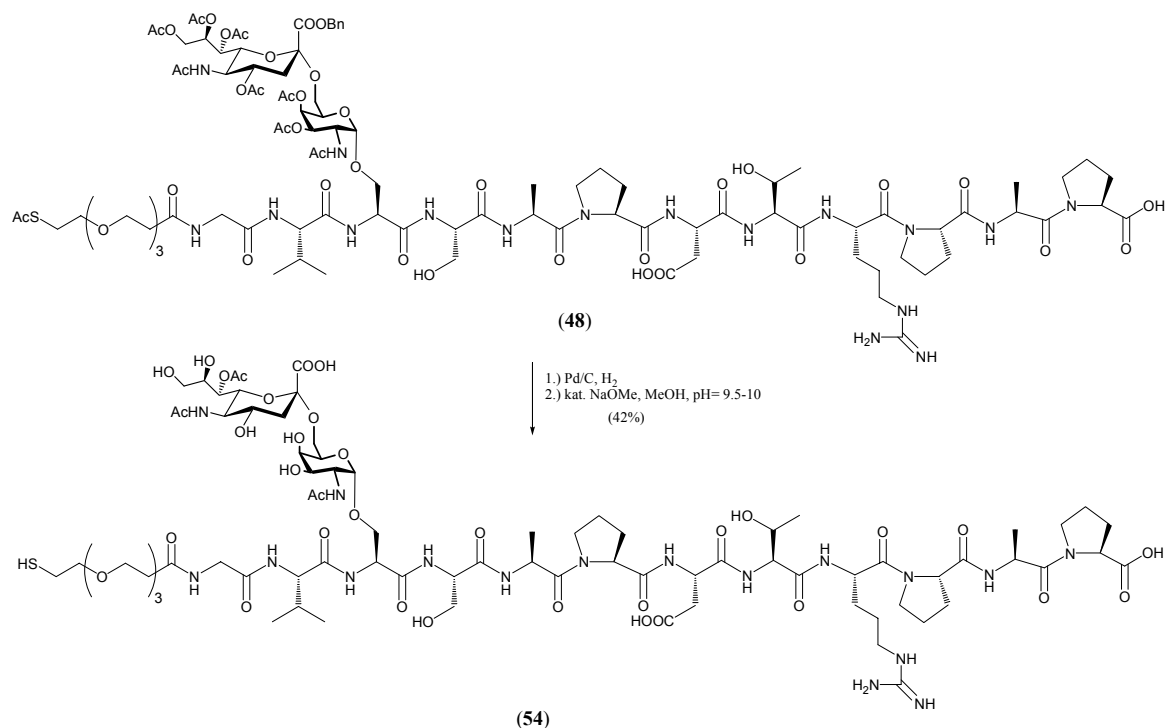


Abb. 3.59: Deblockierung von (**48**)

Die Konjugation mit BSA erfolgt wieder unter Bestrahlung mit UV-Licht.

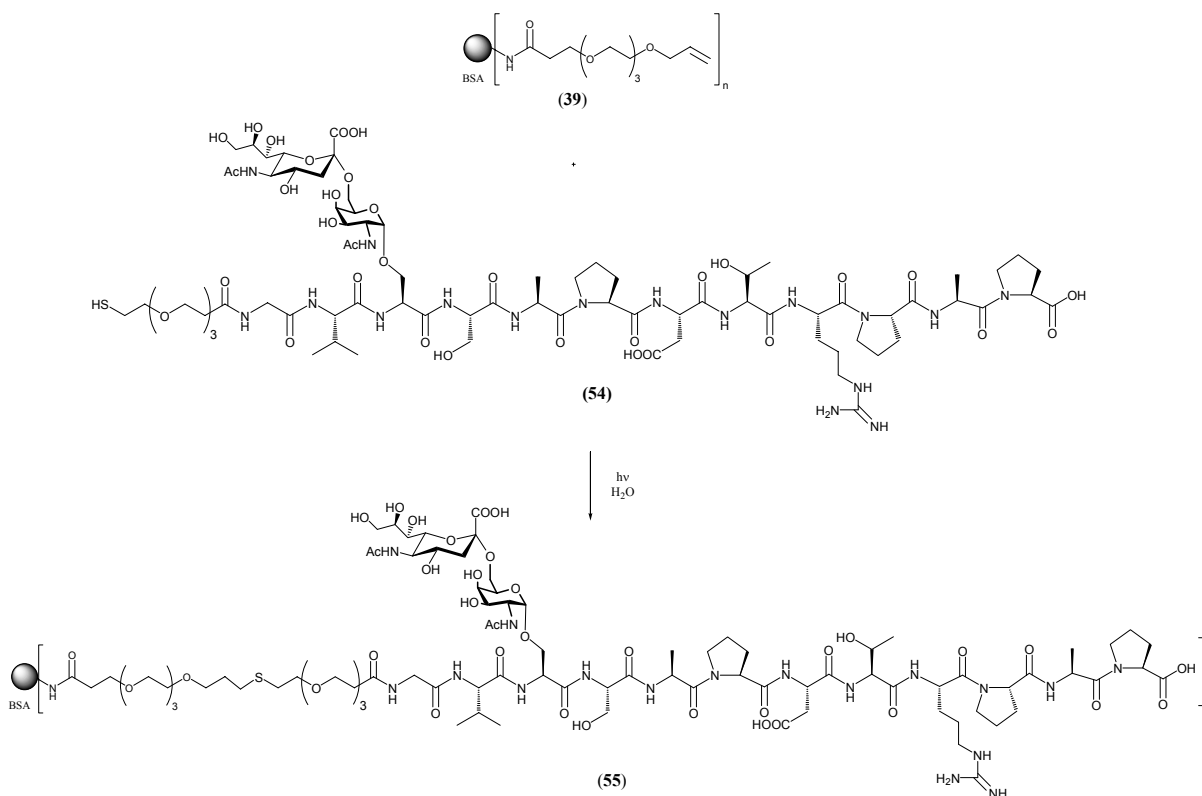


Abb. 3.60: Konjugation von (54) mit BSA

Auch bei der massenspektrometrischen Untersuchung dieses Konjugats (55) konnten keine Signale erhalten werden. Offensichtlich tritt hier das gleiche Problem auf, das schon beim Konjugat (53a) eine Analyse der Haptendichte durch MALDI-TOF verhinderte. Mehrfache Versuche, ein Massenspektrum des Konjugats (55) zu erhalten, führten nicht zum Erfolg.

Abschließend wurde ebenfalls die globale Deblockierung und Konjugation des mit dem (2,3)-Sialyl-T-Antigen glycosylierten MUC1-Glycopeptides (49) durchgeführt. Die reduktive Abspaltung sowohl des Benzylesters als auch des Benzylethers in der Kohlenhydratseitenkette erfolgt durch Hydrogenolyse unter Einsatz von Palladium auf Aktivkohle als Katalysator. Die Reaktion wird durch analytische HPLC verfolgt und ist nach 48 Stunden beendet. Die anschließende Abspaltung der Acetylschutzgruppen hat sich im Falle des (2,3)-Sialyl-T-Antigens in anderen Arbeiten schon als problematisch erwiesen. Unter *Zemplén*-Bedingungen war besonders die Freilegung der sterisch abgeschirmten 4-Positionen des Galactosamins und der Galactose auch bei langen Reaktionsdauern nicht möglich. Im vorliegenden Fall hätte eine ausgedehnte Reaktionszeit außerdem eine erhöhte Gefahr der unerwünschten oxidativen Dimerisierung des Thiols zur Folge. Die globale Deacetylierung des Rohproduktes erfolgt daher durch Behandlung mit verdünnter wässriger Natronlauge bei einem pH-Wert von 11-11.5. Die Deblockierung wird durch analytische HPLC verfolgt und

nach 48 Stunden abgebrochen. Die Reinigung des Glycopeptides erfolgt wieder durch semipräparative HPLC. Das gewünschte thiofunktionalisierte MUC1(2,3-ST)-Glycopeptid (**56**) wird in einer Ausbeute von 36% über beide Deblockierungsschritte isoliert.

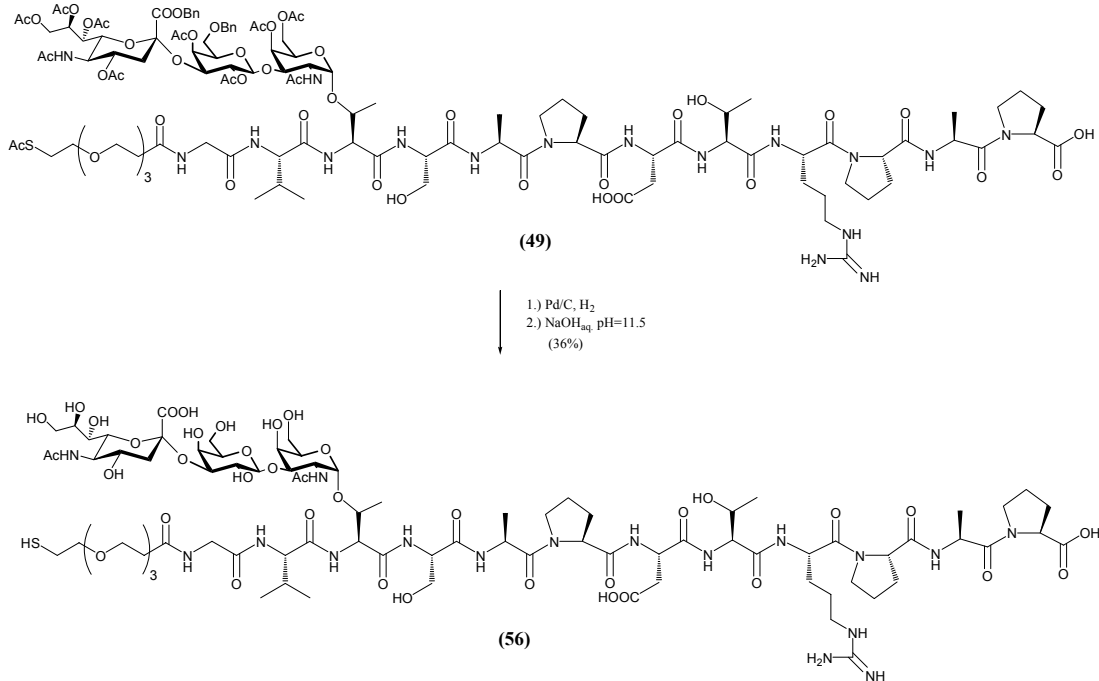


Abb. 3.61: Deblockierung von (49)

Die Konjugation mit dem modifizierten Carrier-Protein erfolgt unter den vorher beschriebenen Bedingungen.

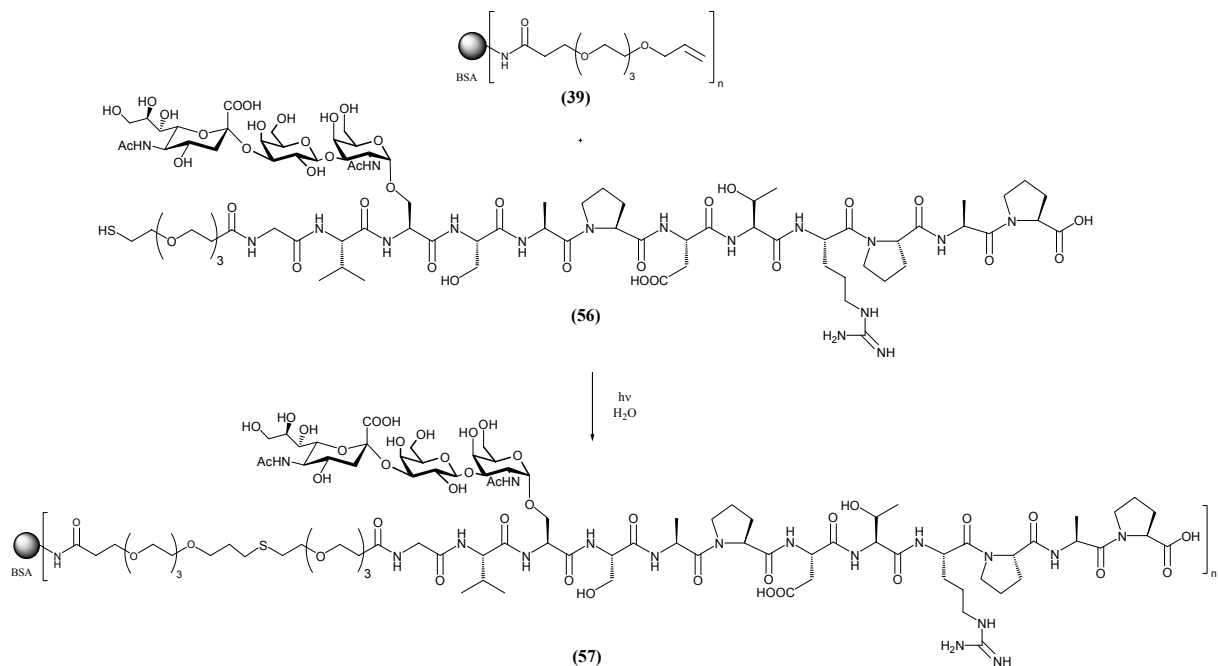


Abb. 3.62: Konjugation von (56) mit BSA

Auch bei Analyse dieses Konjugats durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnten keinerlei Signale erhalten werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Konjugation einer Reihe von tumorassoziierten Glycopeptiden mit BSA erfolgreich durchgeführt werden konnte. Allerdings war nur in zwei Fällen, nämlich bei den beiden mit dem T_N-Antigen versehenen Glycopeptiden eine Bestimmung der Haptendichte durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie möglich. Bei allen anderen Konjugaten wurden, eventuell aufgrund einer Denaturierung des Proteins, keine aussagekräftigen Massenspektren erhalten. Es wurde gezeigt, dass die benutzte Methode der radikalischen Addition von Thiolen an Olefine prinzipiell zur chemoselektiven Konjugation von Glycopeptiden an Carrierproteine geeignet ist, wenn auch die erzielten Beladungsdichten für eine effektive Immunisierung noch etwas höher sein könnten. Dass von mehreren Konjugaten keine massenspektrometrische Analyse möglich war, ist allerdings äußerst unbefriedigend.

Die dargestellten Konjugate sollten prinzipiell für die Verwendung in Immunisierungsexperimenten geeignet sein. Eine eventuell eingetretene Denaturierung des Trägerproteins sollte auf die immunologischen Eigenschaften keine besonderen Auswirkungen haben. Darüber hinaus ist ihre Anwendung zur Beschichtung von Mikrotiter-Platten für immunologische Nachweisexperimente wie ELISA möglich.

3.3 Synthese von dendrimeren Glycopeptiden^{198,199}

3.3.1 Hintergrund

Die Konjugation von Haptene an Carrier-Proteine führen zwar bei der Immunisierung aufgrund der stark immunogenen Proteine meist zu ausgeprägten Immunantworten, jedoch zieht die Verwendung solcher Konjugate eine Reihe von Nachteilen nach sich:

- Die Masse des konjugierten Haptens ist im Vergleich zur Masse des Carrier-Proteins sehr klein.
- Die Hauptmenge der produzierten Antikörper ist normalerweise gegen Epitope des Carrier-Proteins gerichtet. Nur ein relativ kleiner Teil stellt die gewünschten, gegen das Hapten gerichtete Antikörper dar („Immundominanz“ des Carriers).
- Durch eine starke, gegen das Protein gerichtete Immunantwort kann die Antwort gegen das Hapten sogar vollständig unterdrückt werden („Carrier induced suppression“).
- Die Protein-Hapten-Konjugate sind chemisch nicht exakt definiert und der normalen chemischen Analytik (z. B. NMR) nicht zugänglich (Ausnahme: Massenspektrometrie).

Eine Alternative zur Verwendung eines Carrier-Proteins, welche diese Nachteile vermeidet, wurde von *J. P. Tam* eingeführt: Die Synthese von dendrimeren Peptiden aufbauend auf einem immunologisch inerten Oligo-Lysin-Core. Tam bezeichnet solche Konjugate, die er ausgehend von tetra- oder octa-funktionellen Lysin-Cores synthetisierte, als *MAPS* (multiple antigenic peptides)^{117,200}.

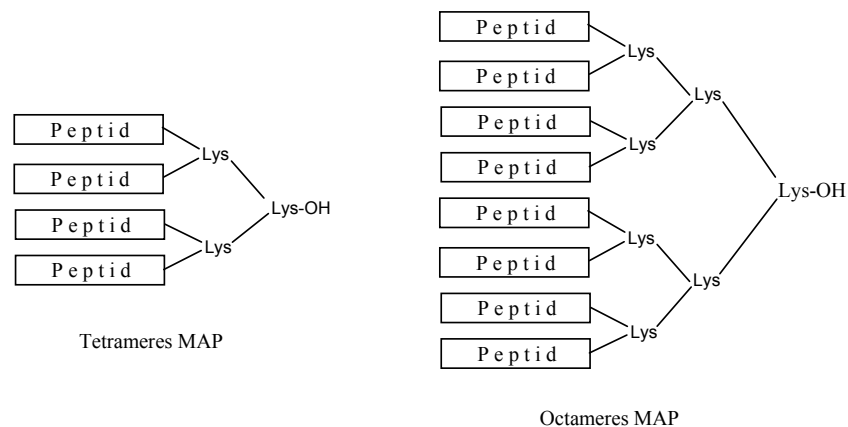


Abb. 3.63: Schematische Darstellung der MAPs

Solche MAPs zeichnen sich durch mehrere Vorteile gegenüber den Carrier-Protein-Konjugaten aus.

- Das Lysin-Core ist nicht immunogen.
- Die Peptid-Haptene machen die Hauptmasse des MAPs aus, das Lysin-Core nur einen verschwindend geringen Teil.
- Zum Aufbau ist die normale Festphasenpeptidsynthese geeignet.
- Die MAPs sind chemisch einheitlich da vollsynthetisch, besitzen eine exakt definierte Struktur und sind z. B. durch NMR analysierbar.
- In Immunoassays können durch die multivalenten MAPs größere Empfindlichkeiten erzielt werden. Außerdem ist, gerade bei sehr hydrophilen Peptiden, die unspezifische Bindung der MAPs an Titerplatten oft stärker.

Die Immunogenität solcher dendrimeren Peptide beruht auf mehreren Faktoren: Durch die Multivalenz dieser Strukturen ist eine festere Bindung an entsprechende Rezeptoren möglich (vgl. „Clustereffekt“ bei multivalenten Sacchariden). Weiterhin ist eine Quervernetzung der Oberflächenrezeptoren von Immunzellen möglich, was unter Umständen zu einem stärkeren Aktivierungssignal führt. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass es Unterschiede in der Antigenprozessierung und -präsentation von MAPs gegenüber monomeren Peptiden auftreten. So wurde beobachtet, dass von MAPs stammende Peptidfragmente auf MHC-I-Komplexen präsentiert werden, nicht auf MHC-II, wie man es für exogene Antigene eigentlich erwarten würde (sog. „cross-presentation“²⁰¹⁻²⁰⁴). Offensichtlich treten die durch rezeptorvermittelte Endocytose in Zellen aufgenommene Antigene aus den endosomalen Kompartimenten in das Cytosol aus und werden anschließend wie endogene Proteine prozessiert, was zur MHC-I-Präsentation führt. Die Wahrscheinlichkeit für ein solches „Leck“ scheint abhängig von der Größe des endocytierten Antigens zu sein, so dass dies bei den großen MAPs sehr viel leichter auftritt als bei monomeren Peptiden. Diese Deutung erklärt auch, warum bei Immunisierungen mit MAPs oft eine ungewöhnlich starke Aktivierung von cytotoxischen T-Lymphocyten beobachtet werden kann.

Die MAP-Methodik wurde schon häufig benutzt, um aus peptidischen Antigenen geeignete Vakzine zu erzeugen. So wurden beispielsweise experimentelle Vakzine gegen HIV^{205,206} und Hepatitis²⁰⁷ beschrieben. Auch ein MAP-Peptid, welches ein tumorassoziertes Kohlenhydratantigen beinhaltet^{208,209}, wurde schon dargestellt.

3.3.2 Synthese von dendrimeren (Glyco-)Peptiden

Es sollen nun dendrimere Peptide bzw. Glycopeptide gemäß der MAP-Methodik dargestellt werden. Die Synthese der MAP-Glycopeptide soll dabei nach der standardmäßigen Fmoc-Festphasensynthese durchgeführt werden. Hierzu wird zunächst ein tetrafunktionelles, festphasengebundenes Lysin-Core aufgebaut. Das hierfür benötigte zweifach Fmoc-geschützte Lysin (**58**) erhält man durch Reaktion von Lysin-Monohydrochlorid mit Fmoc-OSu und Natriumhydrogencarbonat in einem Aceton/Wasser-Gemisch.

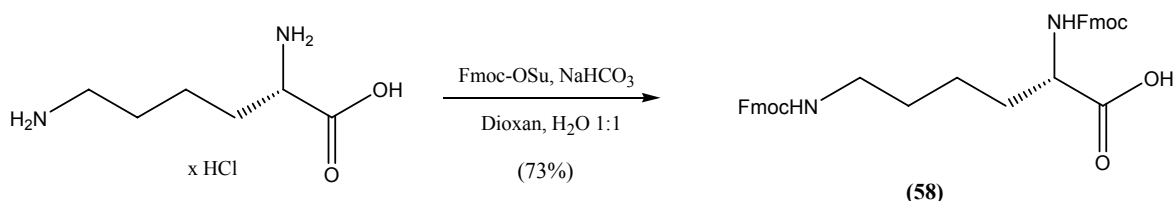


Abb. 3.64: Synthese Fmoc-Lys(Fmoc)-OH

Das zweifach blockierte Lysin (**58**) wird nun durch Diisopropylcarbodiimid (DIC) in das symmetrische Anhydrid überführt und anschließend durch Veresterung unter *Steglich*-Bedingungen an Tentagelharz gebunden. Durch eine Doppelkupplung wird eine hohe Kupplungsausbeute erreicht. Die Kupplungsreaktion wird, wie alle in dieser Arbeit manuell durchgeführten Synthesen an der festen Phase, in einem Reaktor nach Merrifield durchgeführt.

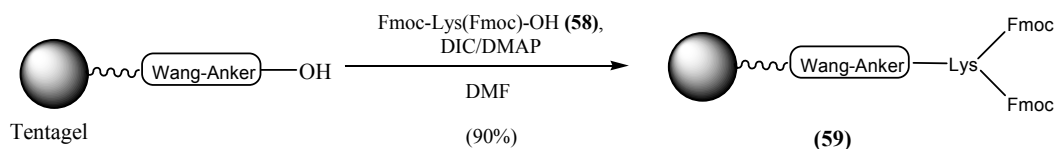


Abb. 3.65: Anbindung von Fmoc-Lys(Fmoc)-OH an die feste Phase

Das Tentagelharz ist mit einem säurelabilen *p*-Hydroxybenzyl-Linker (Wang-Linker) versehen, so dass das dendrimere Peptid nach vollendeter Synthese unter relativ milden Bedingungen mittels Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten werden kann.

Nicht umgesetzte Hydroxylfunktionen werden nach der Kupplung durch Capping mit Acetanhydrid in Pyridin acetyliert. Nach Abspaltung der beiden Fmoc-Schutzgruppen mit 50%igem Morpholin in DMF wird die zweite Lage Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (**58**) gekuppelt.

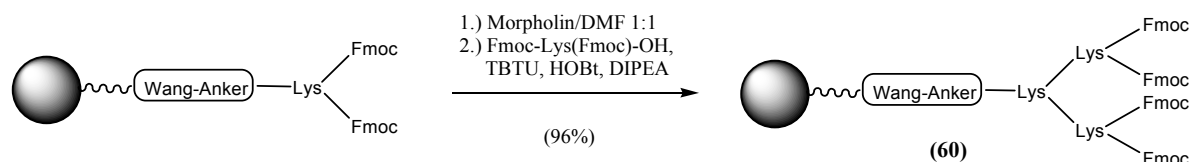


Abb. 3.66: Synthese des festphasengebundenen Lysin-Cores

Als Kupplungsreagenz dient TBTU unter Zusatz von HOBt und DIPEA als Base. Auch nach dieser Kupplung erfolgt ein Cappingschritt, um unumgesetzte Aminofunktionen zu blockieren. Zur Bestimmung der bei den Kupplungen erzielten Beladungsdichten wird jeweils eine Probe des Harzes mit Piperidin behandelt und die Konzentration des dabei entstehende Fmoc-Piperidin-Adduktes spektrometrisch bestimmt (s. S. 125).

Das auf diese Weise erhaltene tetrafunktionelle, festphasengebundene Lysin-Core (**60**) wird im Folgenden für die Synthesen der dendrimeren (Glyco-)Peptide benutzt.

Bei diesen Synthesen ist nicht auszuschließen, dass es zu Wechselwirkungen der vier Peptidketten untereinander kommt. Gerade bei den ersten Aminosäuren besteht die Gefahr, dass die Kupplungen der sterisch relativ anspruchsvollen Fmoc-Aminosäurebausteine nicht vollständig verläuft. Eine unvollständige Kupplung führt im folgenden Cappingschritt zum Abbrechen der Peptidsynthese an dieser Kette. Es entstehen hierbei also keine tetrameren Peptide, sondern Dendrimere, die Abbruchsequenzen enthalten. Solche Nebenprodukte wären chromatographisch nur schwer von den gewünschten tetrameren Peptiden abzutrennen, da sie sich in ihren Eigenschaften nur wenig von diesen unterscheiden. Es soll daher zunächst untersucht werden, ob die Kupplung an allen vier funktionellen Gruppen des festphasengebundenen Lysin-Cores (**60**) erfolgreich durchgeführt werden kann. Hierzu wird in einer manuellen Festphasensynthese die Kupplung von zwei Aminosäurebausteinen an (**60**) durchgeführt. Als Aminosäuren werden Asparaginsäure und Threonin eingeführt, da diese beiden den C-Terminus der tandem repeat-Sequenz des Mucins MUC4 darstellen. Asparaginsäure wird in Form des sperrigen *tert*-Butylesters verwendet, als Threoninderivat wird der glycosylierte Baustein (**9**) eingesetzt. Sollte die Kupplung dieser beiden sterisch sehr anspruchsvollen Bausteine erfolgreich verlaufen, so kann davon ausgegangen werden, dass die Kupplung „normaler“ Aminosäurebausteine ebenfalls gut durchführbar ist. Als Kupplungsreagenz in dieser manuellen Synthese werden *O*-(6-Chlor-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HCTU)²¹⁰⁻²¹² für die Kupplung der Asparaginsäure und HATU für das glycosylierte Threonin verwendet. HCTU ist durch den elektronenziehenden Effekt des Chloratoms etwas reaktiver im Vergleich zum unsubstituierten HBTU bzw. TBTU, aber nicht so reaktiv wie HATU.

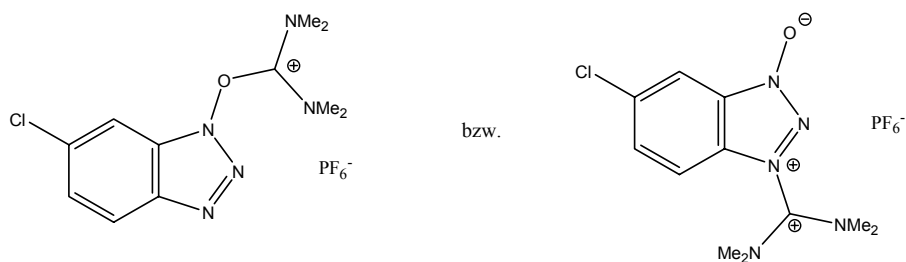


Abb. 3.67: HCTU

Die Synthese wird mit 10 Äquivalenten des Asparaginsäure- bzw. 4 Äquivalenten des glycosylierten Aminosäurebausteins durchgeführt. Nach den Kupplungen folgt jeweils ein Cappingschritt mit Acetanhydrid in Pyridin, um nicht umgesetzte Aminofunktionen zu verschließen. Abschließend wird die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und der Aminoterminus acetyliert. Das Peptid wird mit Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten.

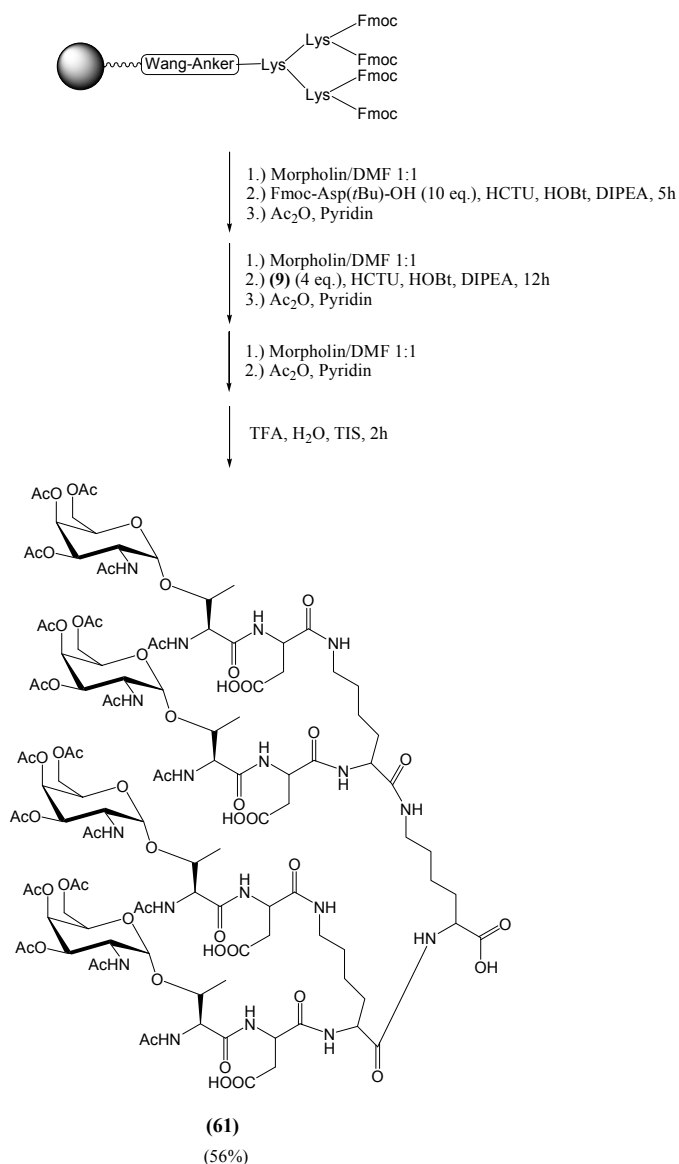


Abb. 3.68: Synthese des Test-MAPs

Im Massenspektrum des rohen Peptids sind Abbruchsequenzen nicht nachweisbar. Die Reinigung des Peptids erfolgt durch präparative RP-HPLC. Das gewünschte dendrimere Glycopeptid (**61**) wird in 56%iger Ausbeute isoliert. Anschließend erfolgt die Abspaltung der Acetylschutzgruppen in der Glycanseitenkette durch Behandlung mit katalytischen Mengen Natriummethanolat in Methanol nach *Zemplén*. Das gewünschte, vollständig deblockierte Peptid (**62**) wird nach chromatographischer Reinigung in quantitativer Ausbeute erhalten.

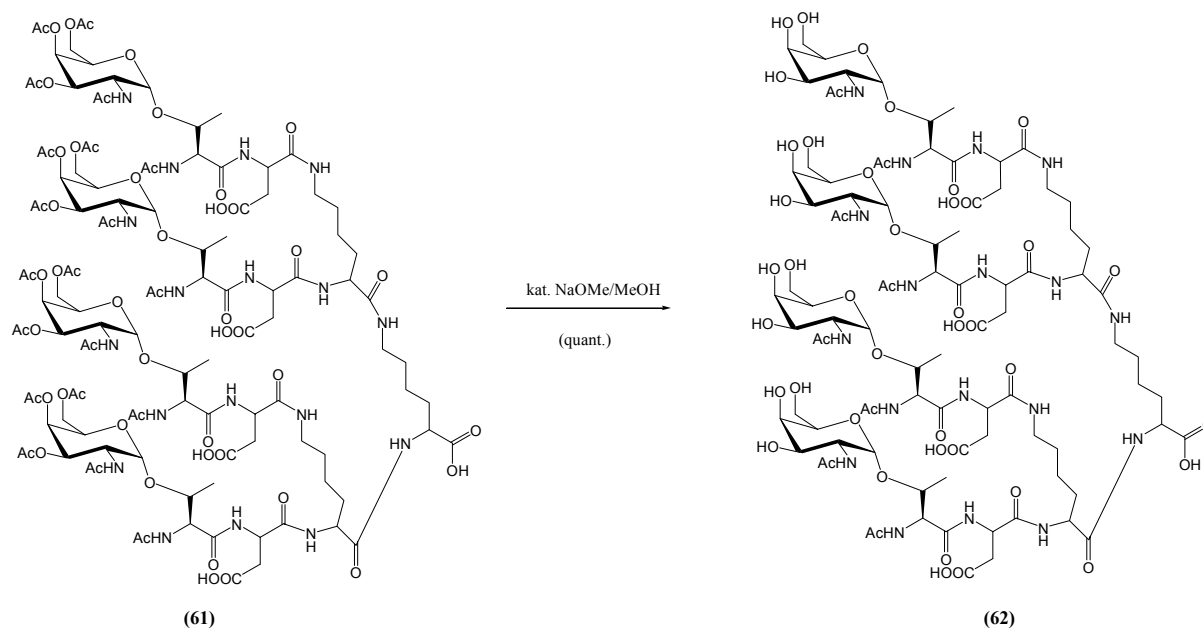


Abb. 3.69: Abspaltung der Acetylschutzgruppen

Interessanterweise zeigen sich im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produktes (**62**) jeweils doppelte Signale für das anomere Proton des Galactosamins und die α -CH-Gruppe der Asparaginsäure. Offensichtlich bewirken die unterschiedlichen Anbindungen an das Lysin-Core (α - oder ϵ -Aminogruppe des Lysins) eine ungleiche Umgebung, welche zu verschiedenen chemischen Verschiebungen für diese Protonen führt. Bei allen anderen Protonen treten jedoch keinerlei Verdopplungen auf. Ebenso sind im breitbandentkoppelten ^{13}C -Spektrum nur einzelne Singulets zu sehen.

Da in dieser Testsynthese ein Auftreten von Abbruchsequenzen in dem dendrimeren Peptid nicht nachweisbar war, scheint der Aufbau aller vier Peptidketten ungestört voneinander möglich zu sein.

Im Folgenden soll nun die Synthese von dendrimeren (Glyco-)Peptiden basierend auf den Wiederholungssequenzen der Mucine durchgeführt werden. Es wurde hierfür die 16 Aminosäuren umfassende tandem repeat Sequenz des Mucins MUC4 ausgewählt (s. Abb. 1.3). Zunächst wird ein unglycosyliertes MAP dargestellt. Die Synthese erfolgt ausgehend von dem mit dem tetrafunktionellen Lysin-Core beladenen Tentagel-Wang-Harz (**60**) durch

automatisierte Festphasenpeptidsynthese mit dem Synthesizer nach dem bereits geschilderten, allgemeinen Protokoll (s. 3.2.4).

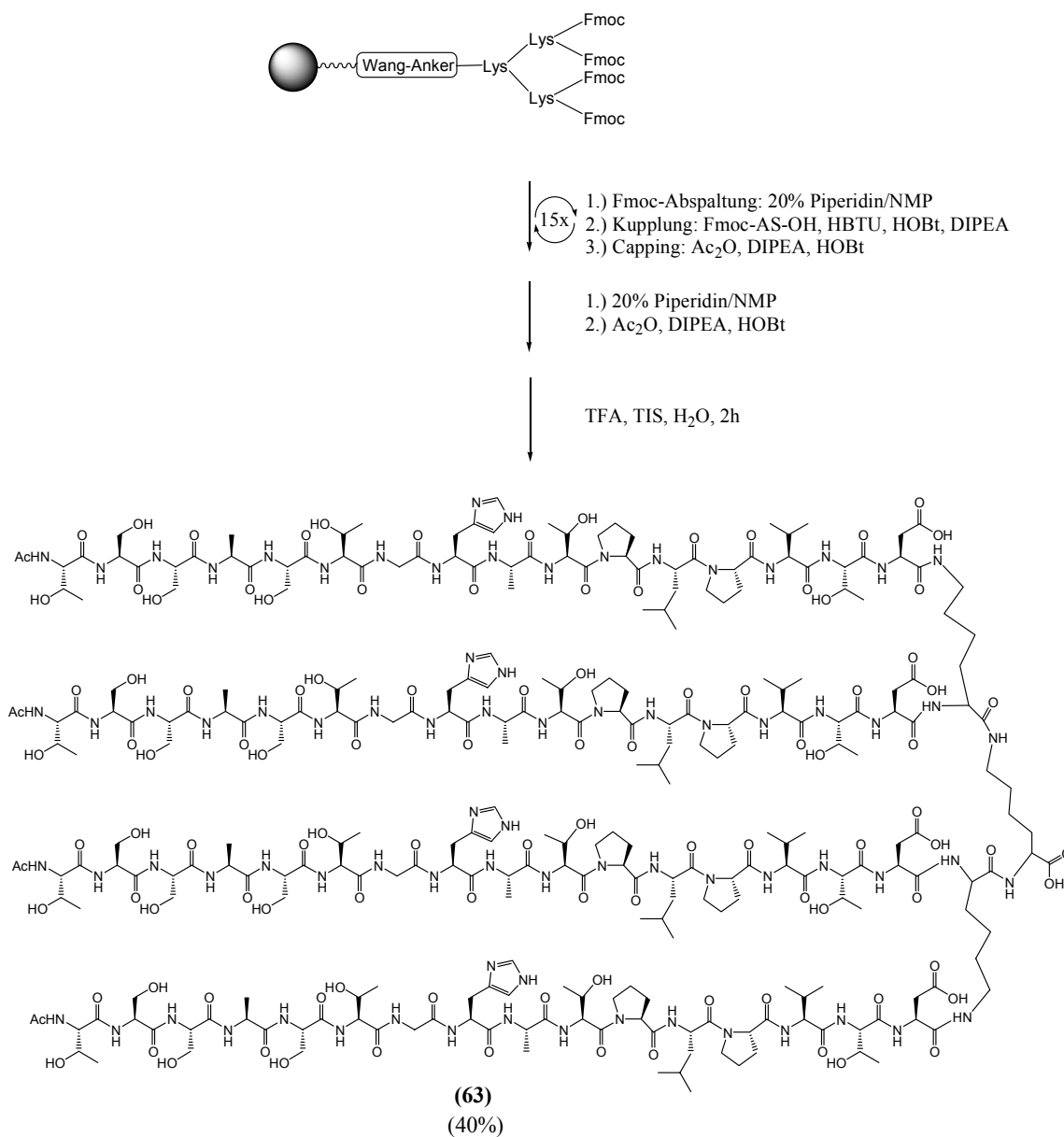


Abb. 3.70: Synthese des MUC4-MAPs

Die UV-spektroskopische Kontrolle des Syntheseverlaufs zeigt keine Auffälligkeiten. Das dendrimere Peptid wird durch Behandlung mit Trifluoressigsäure, der Triisopropylsilan und Wasser als Kationenscavenger zugesetzt sind, vom Harz abgespalten. Im Massenspektrum des rohen Peptids sind wiederum keine Abbruchsequenzen sichtbar. Nach Reinigung durch RP-HPLC wird das reine MAP **(63)** in 40% Ausbeute erhalten.

Es fällt auf, dass Produkt **(63)** sowohl in der analytischen HPLC als auch bei der Reinigung durch präparative HPLC ein sehr breites Elutionsprofil zeigt. Diese Erscheinung ist

literaturbekannt²¹³ und wird wahrscheinlich durch die Vielzahl an verschiedenen Konformeren des sehr flexiblen dendrimeren Peptids bzw. Aggregation verursacht.

Die NMR-spektroskopische Analyse des dendrimeren Peptids zeigt eine große Übereinstimmung mit den bereits bekannten Spektren⁴⁸ des entsprechenden monomeren Peptids. Bei manchen Signalen zeigt sich nur eine leichte Verbreiterung, Signalverdopplungen sind nicht sichtbar. Nur die drei unterschiedlichen Lysin- α CH-Gruppen geben im ^1H , ^1H -COSY- und im HMQC-Spektrum drei deutlich unterscheidbare Signale.

Nach dieser erfolgreichen Synthese des reinen Peptid-MAPs (**63**) soll nun durch Einbau einer glycosylierten Aminosäure ein entsprechendes glycosyliertes MAP dargestellt werden. Die Synthese erfolgt analog zu der von (**63**) ausgehend von dem festphasengebundenen Lysin-Core (**60**). Die Kupplung der Aminosäurebausteine bis zu Pro(11) wird vollautomatisch nach dem allgemeinen Protokoll durchgeführt. Anschließend werden vier Äquivalente des T_N -Bausteins (**9**) in einer halbautomatischen Kupplung unter Aktivierung mit HATU/HOAt/NMM angeknüpft. Die Kupplung der restlichen neun Aminosäuren erfolgt wieder vollautomatisch.

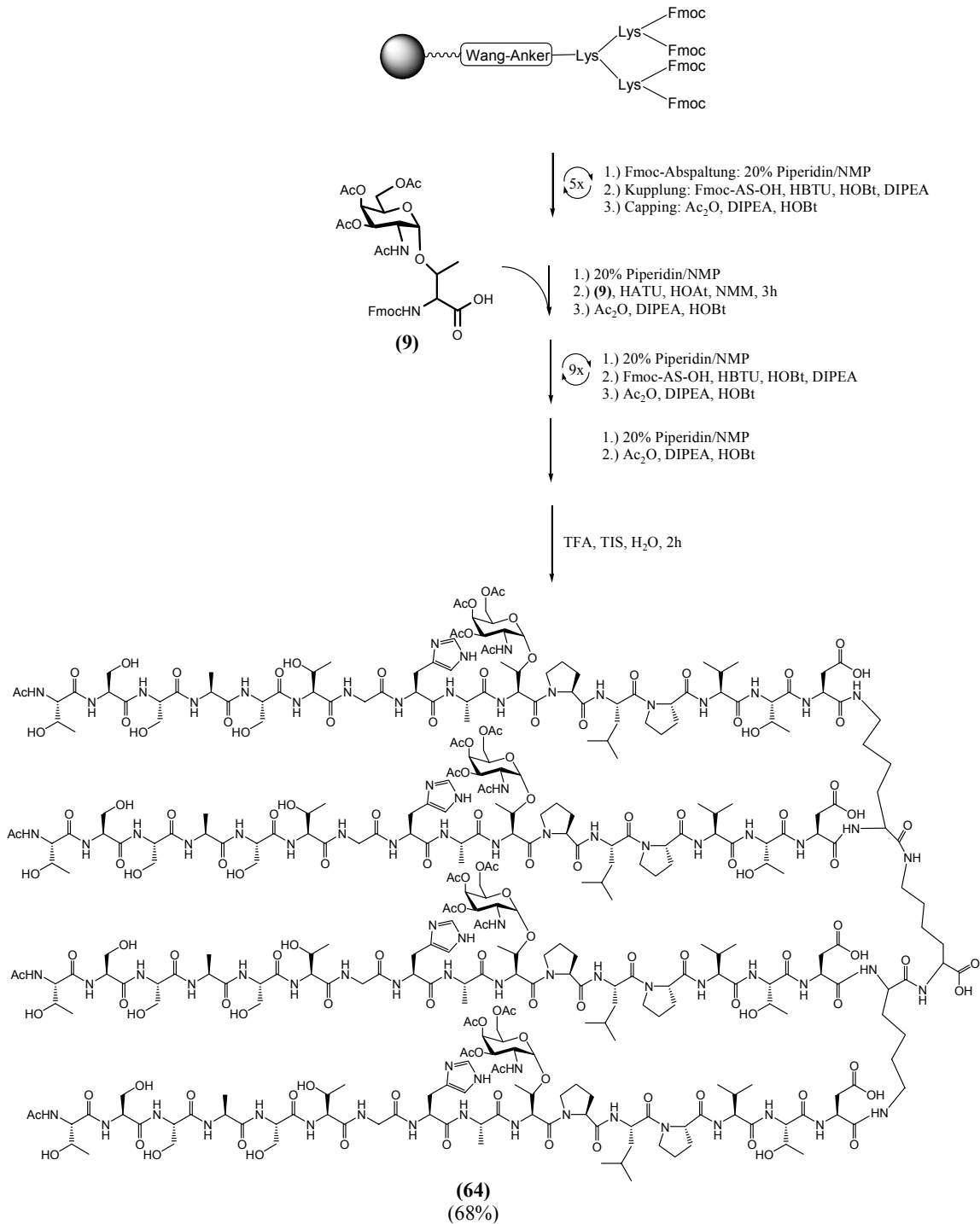


Abb. 3.71: Synthese des MUC4(T_N)-MAPs

Das tetramere Peptid wird acidolytisch vom Harz abgespalten und durch präparative RP-HPLC gereinigt. Auch in diesem Falle weist das Produkt erneut ein sehr breites Elutionsprofil auf. Eine massenspektrometrische Analyse des MAPs zeigt abermals keinerlei Abbruchsequenzen. Die NMR-Spektren sind, bis auf einige Signalverbreiterungen, mit den Spektren des monomeren Glycopeptides identisch.

Durch *Zemplén*-Umesterung werden die Acetylenschutzgruppen von **(64)** abgespalten. Nach Reinigung über RP-HPLC kann das vollständig deblockierte Glycopeptid-MAP **(65)** in hoher Ausbeute isoliert werden.

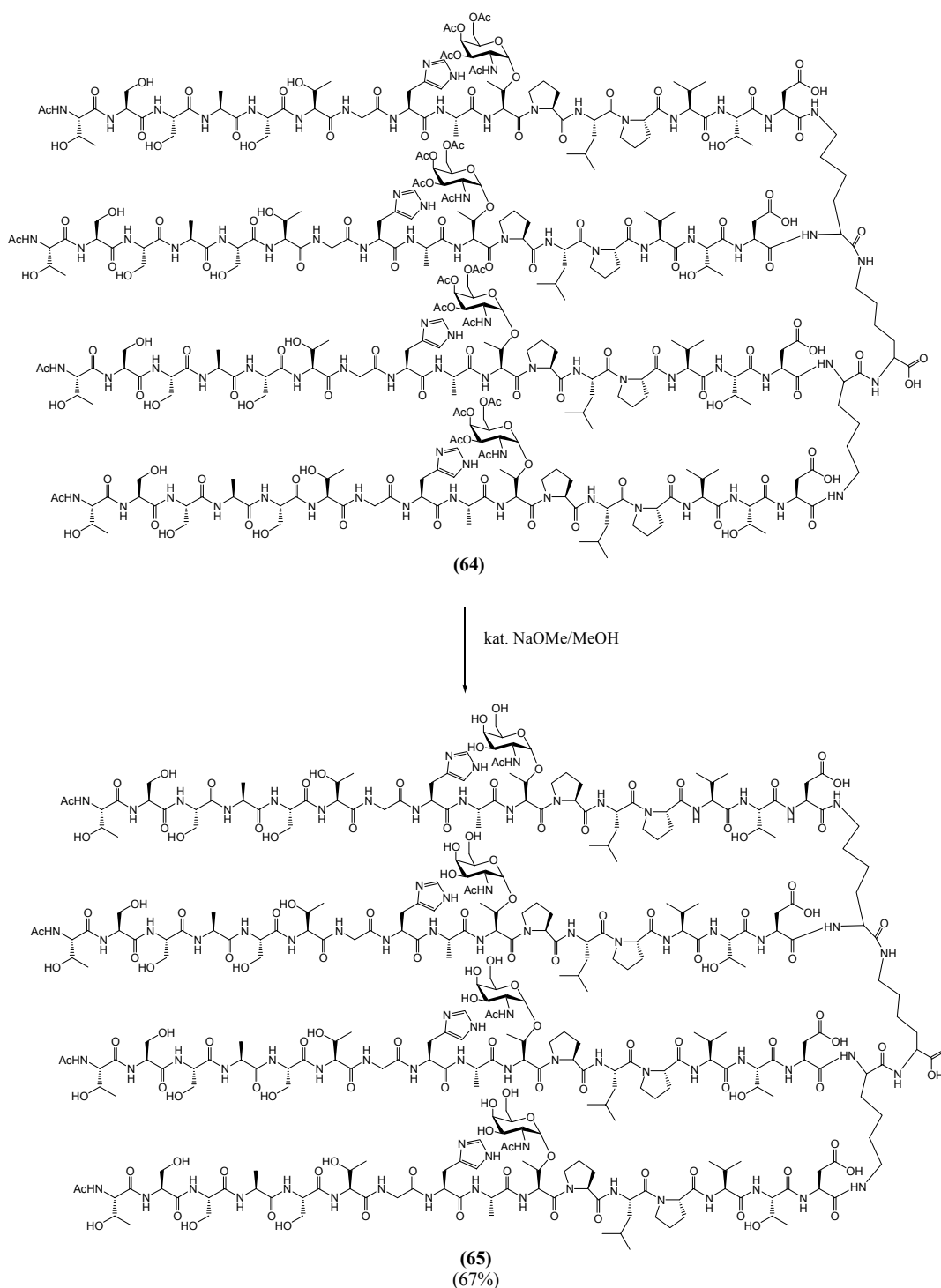


Abb. 3.72: Deblockierung des Glycopeptid-MAPs

Auch die Struktur dieses Zielmoleküls kann durch massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Analysen gesichert werden.

3.4 Synthese von Konjugaten bestehend aus Glycopeptid und einem universellen T-Zell-Epitop

3.4.1 Hintergrund

Eine weitere Methode, um Immunantworten gegen nicht oder nur schwach immunogene Strukturen zu erzeugen, ist die Konjugation des B-Zell-Epitops an ein bekanntes T_H-Zell-Epitop²¹⁴. Solche Konjugate nennt man auch *Heterotope*.

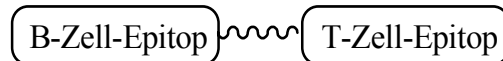


Abb. 3.73: Prinzip der Heterotop-Konjugation

Genau wie Hapten-Carrierprotein-Konjugate können diese Heterotope von für das B-Zell-Epitop spezifischen B-Zellen erkannt, internalisiert und anschließend prozessiert werden. Neben Fragmenten des B-Zell-Epitops werden auch hier solche des T_H-Zell-Epitops, gebunden an den MHC-II-Komplex, auf der Oberfläche der B-Zelle präsentiert (vgl. S. 37). Dies ermöglicht die Erkennung dieses Epitops durch spezifische T_H-Zellen, wodurch die gewünschte Stimulierung der B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen ausgelöst wird.

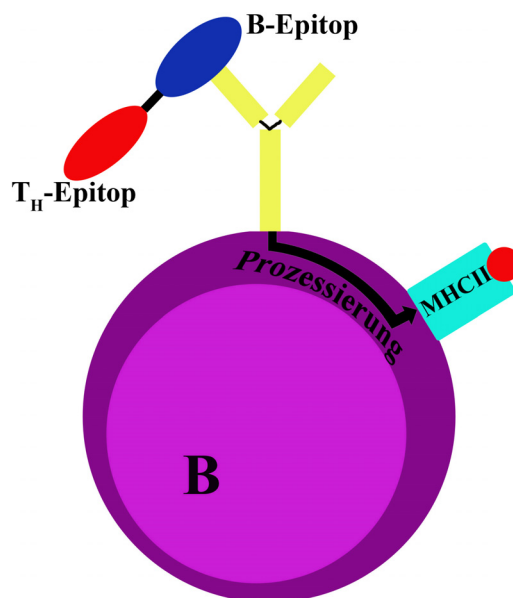


Abb. 3.74: B- und T-Zellaktivierung durch ein Heterotop

Gegenüber Proteinkonjugaten haben solche Heterotope den großen Vorteil, dass es sich hierbei um vollsynthetische, relativ niedermolekulare Moleküle handelt, die durch Verfahren der organischen Chemie, wie z.B. HPLC, gereinigt werden können. Auch ist die

Strukturaufklärung solcher Moleküle durch NMR und Massenspektrometrie möglich. Weiterhin besitzen solche Heterotope nicht den Nachteil von Proteinkonjugaten, dass bei der Immunisierung hauptsächlich Antikörper gegen das Trägerprotein gebildet werden.

3.4.2 Synthesestrategie

Im Folgenden sollen nun solche Heterotop-Konjugate dargestellt werden. Als B-Zell-Epitop werden auf den MUC1- bzw. MUC4-tandem repeat-Sequenzen basierende Glycopeptide mit tumorassoziierten Kohlenhydratseitenketten eingesetzt. Durch Konjugation an ein entsprechendes T_H-Zell-Epitop soll eine Vakzine erhalten werden, welche robuste Immunantworten gegen das Glycopeptid induziert. Die Bindung der beiden Teilstrukturen soll über einen flexiblen, nicht immunogenen Spacer erfolgen, um eine gegenseitige konformationelle Beeinflussung der beiden Epitope auszuschließen.

Als T_H-Zell-Epitop wird eine Partialsequenz aus dem Tetanus-Toxin gewählt. Diese Sequenz stellt ein „universelles“ T-Zell-Epitop dar, welches als Epitop für viele menschliche T-Zellen, unabhängig vom jeweiligen HLA-Phenotyp, geeignet ist^{215,216}.

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

Abb. 3.75: Sequenz des universellen T Zell-Epitops aus Tetanus Toxin

Von den 20 Aminosäuren stellt die hydrophobe Partialsequenz YSYFPSV das eigentliche Epitop dar. Diese sieben Aminosäuren sind also unbedingt notwendig, um eine Bindung an den Rezeptor von T-Zellen zu ermöglichen. Durch Konjugation mit einem B-Zell-Epitop sollte eine starke Immunantwort gegen das B-Zell-Epitop induzierbar sein.

Der Einsatz eines Epitops aus dem Tetanus-Toxin hat außerdem den Vorteil, dass bei einer eventuellen Anwendung am Menschen aufgrund der normalerweise vorhandenen Tetanus-Schutzimpfung bereits gegenüber dem Epitop präaktivierte T-Zellen vorhanden sind und keine vorhergehende Immunisierung gegen das T-Zell-Epitop nötig wäre.

Basierend auf der aus sieben Aminosäuren bestehenden Mindestsequenz YSYFPSV wurden bereits Konjugate mit einem Glycopeptid als B-Zell-Epitop dargestellt²¹⁷.

Beim Aufbau solch langer Peptidstrukturen, wie sie die Heterotop-Konjugate darstellen, stößt die normale sequentielle Peptidsynthese an der festen Phase oft an ihre Grenzen: Je länger die festphasengebundene Peptidkette wird, desto größer ist die Gefahr, dass es zu intramolekularen Wechselwirkungen und Rückfaltung der Kette kommt. Die hierdurch bedingte ungenügende Erreichbarkeit des N-Terminus macht sich in plötzlichen Einbrüchen

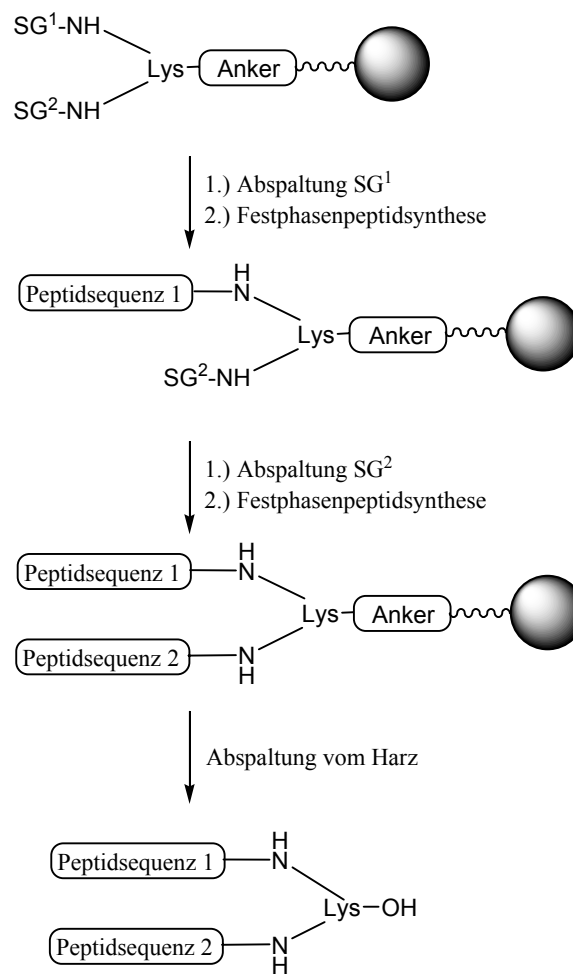
der Kupplungsausbeuten bemerkbar, was schließlich zu niedrigen Gesamtausbeuten oder sogar dem Misslingen der gesamten Peptidsynthese führt.

Die Synthese langer Peptide wird daher normalerweise durch *Fragmentkondensation* an der festen Phase durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird zunächst ein Teil der gewünschten Struktur in Form eines vollständig blockierten Peptidfragmentes, bei dem lediglich der Carboxyterminus ungeschützt ist, an der festen Phase synthetisiert. Für diese Synthese müssen entsprechende Ankersysteme, die ein Abspalten des Peptides vom Harz ohne gleichzeitige Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erlauben, verwendet werden (z. B. PTMSEL^{218,219}, HYCRON^{186,220}, Trityl^{96,97}, 2-Chlortrityl²²¹⁻²²⁵, SASRIN²²⁶⁻²²⁸). Das zweite Fragment wird ebenfalls an der festen Phase aufgebaut und dann mit dem vorher dargestellten, vollständig blockierten Peptidteilstück in einer Kondensationsreaktion verknüpft. Abspaltung vom Harz liefert das gewünschte Produkt.

Solche Fragmentkondensationen besitzen prinzipbedingt jedoch einige Nachteile. Die zunächst erforderliche Synthese und Reinigung eines geschützten Peptidfragmentes stellt einen erheblichen Syntheseaufwand dar. Weiterhin sind relativ große Mengen dieses blockierten Teilstückes erforderlich, um eine befriedigende Ausbeute im Kondensationsschritt der beiden Fragmente zu erzielen.

Zum Aufbau der Heterotope soll in dieser Arbeit daher eine andere Strategie genutzt werden. Die Synthese erfolgt ausgehend von einem orthogonal geschützten, festphasengebundenen Lysin-Derivat.

Durch Abspaltung der einen Schutzgruppe kann in einer normalen Peptidsynthese das erste Epitop aufgebaut werden. Anschließend wird die zweite Schutzgruppe gespalten und an der nun freien Aminfunktion das zweite Epitop durch erneute Festphasenpeptidsynthese angeknüpft. Durch diese Vorgehensweise ist die Gefahr einer Rückfaltung der Peptidkette wesentlich geringer. Eine eventuelle gegenseitige Beeinflussung der beiden Peptidstränge kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Vorteil dieser Strategie ist, dass die gesamte Peptidsynthese mit den standardmäßigen Aminosäurebausteinen durchgeführt werden kann, die aufwendige Synthese und Reinigung eines Teilstückes ist nicht erforderlich.



SG: Schutzgruppen

Abb. 3.76: Schematische Darstellung der geplanten Heterotop-Synthese

Voraussetzung ist jedoch ein entsprechendes, orthogonales Schutzgruppenmuster. Da die Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie erfolgt, kann als eine der beiden Schutzgruppen direkt Fmoc eingesetzt werden. Es wird nun noch eine zweite Schutzgruppe benötigt, die zu Fmoc orthogonal stabil und unter den Bedingungen der Peptidsynthese stabil ist. Jedoch muss sie leicht selektiv abspaltbar sein, ohne die Peptidbindungen oder den Festphasenanker zu gefährden. Eine Aminschutzgruppe, welche diese Eigenschaften besitzt, ist die 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-3-methylbutyl- (ivDde)-Schutzgruppe²²⁹, eine Weiterentwicklung der 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl- (Dde)-Gruppe^{230,231}.

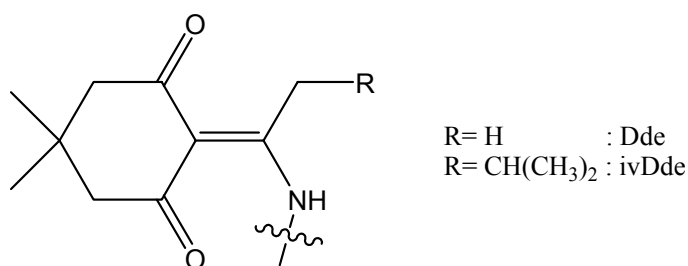


Abb. 3.77: Die Dde und ivDde-Schutzgruppen

Sie zeichnet sich durch ihre große Stabilität gegenüber Piperidin oder Morpholin, welche zur Abspaltung von Fmoc verwendet werden, aus. ivDde kann jedoch durch Behandlung mit verdünnter Hydrazinlösung innerhalb weniger Minuten quantitativ abgespalten werden. Unter diesen Bedingungen sind sowohl Peptidbindungen als auch die üblichen säurelabilen Ankersysteme stabil.

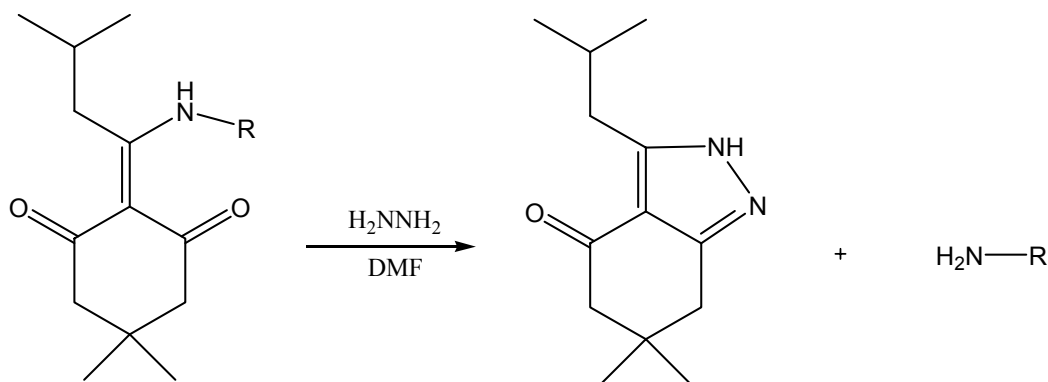


Abb. 3.78: Abspaltung von ivDde

Die Abspaltung kann außerdem, ähnlich wie bei der Fmoc-Gruppe, durch die starke Absorption des Produktes (**66**) UV-spektrometrisch verfolgt werden.

3.4.3 Synthese des orthogonal geschützten Lysins

Es wird nun zunächst ein entsprechendes, mit Fmoc und ivDde orthogonal geschütztes Lysin-Derivat dargestellt, welches nach Anbindung an die feste Phase als Ausgangspunkt für die Synthese der Heterotope dienen soll.

Die Synthese des orthogonal geschützten Lysin-Bausteins erfolgt ausgehend von L-Lysin-Monohydrochlorid. Um eine Differenzierung der beiden Aminfunktionen zu ermöglichen, wird dieses zuerst mit Kupfersulfat in den Kupferkomplex überführt²³².

Hierbei werden die Carboxylfunktion und die α -Aminogruppe durch ein Kupfer-Ion komplexiert, so dass die ϵ -Aminogruppe nun selektiv blockiert werden kann. Dies geschieht durch Reaktion mit Fmoc-Chlorid in einem Dioxan-Wasser-Gemisch. Anschließend wird der Kupfer-Komplex mittels des starken Komplexbildners Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA) aufgebrochen, wonach das selektiv ϵ -blockierte Lysin-Derivat (**67**) erhalten wird.

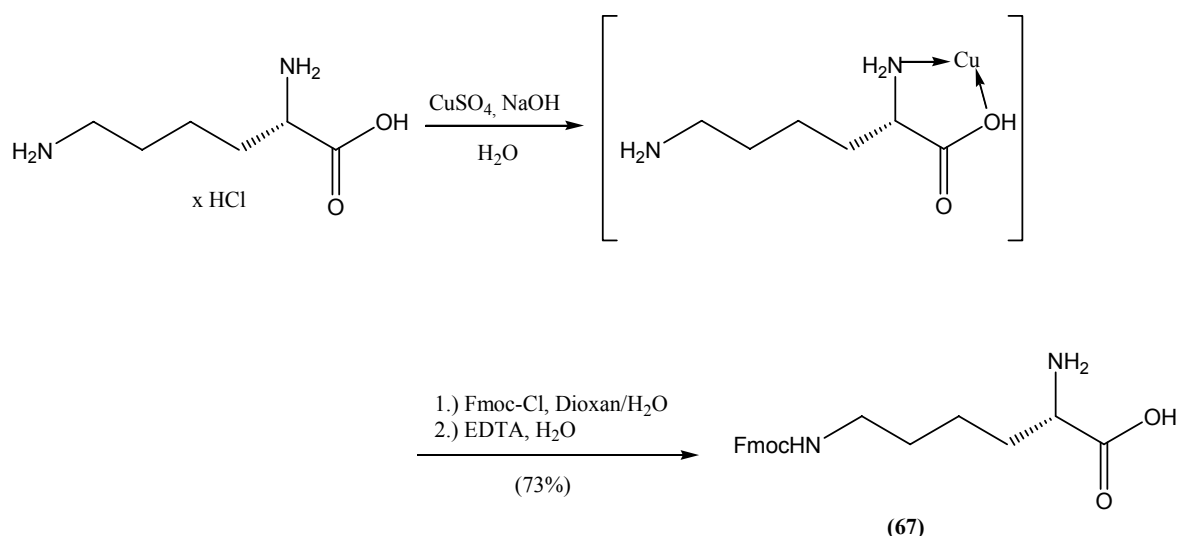


Abb. 3.79: Synthese H-Lys(Fmoc)-OH

Zum Einführen der ivDde-Schutzgruppe wird nach einer bekannten Literaturvorschrift von Dimedon ausgegangen. Dieses wird mit Isovaleriansäure unter Aktivierung mit EDC und DMAP^{161,162} acyliert²³³.

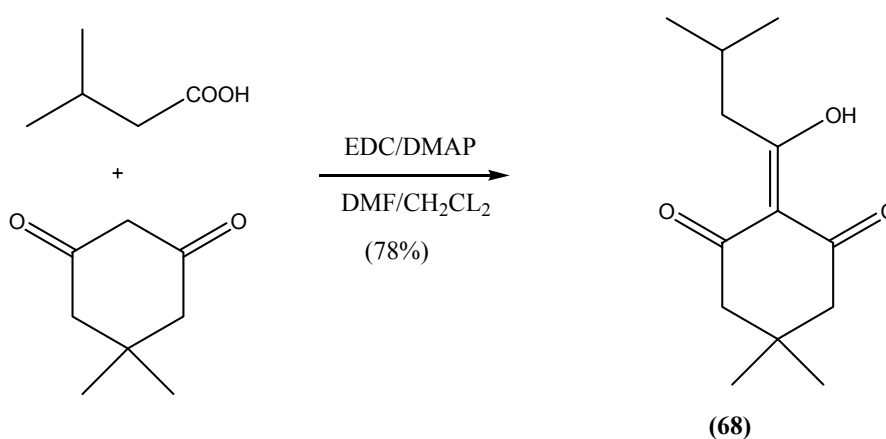


Abb. 3.80: Synthese ivDde-OH

Durch säurekatalysierte Reaktion²²⁹ des so dargestellten ivDde-OH (68) mit dem monoblockierten Lysin-Derivat (67) wird der orthogonal geschützte Lysin-Baustein (69) erhalten.

Die mäßige Ausbeute dieser Reaktion ist wahrscheinlich auf die geringere Nucleophilie und stärkere sterische Abschirmung der α - im Vergleich zur ϵ -Aminofunktion des Lysins zurückzuführen. Sie lässt sich auch nicht durch Verlängerung der ohnehin schon langen Reaktionszeit steigern.

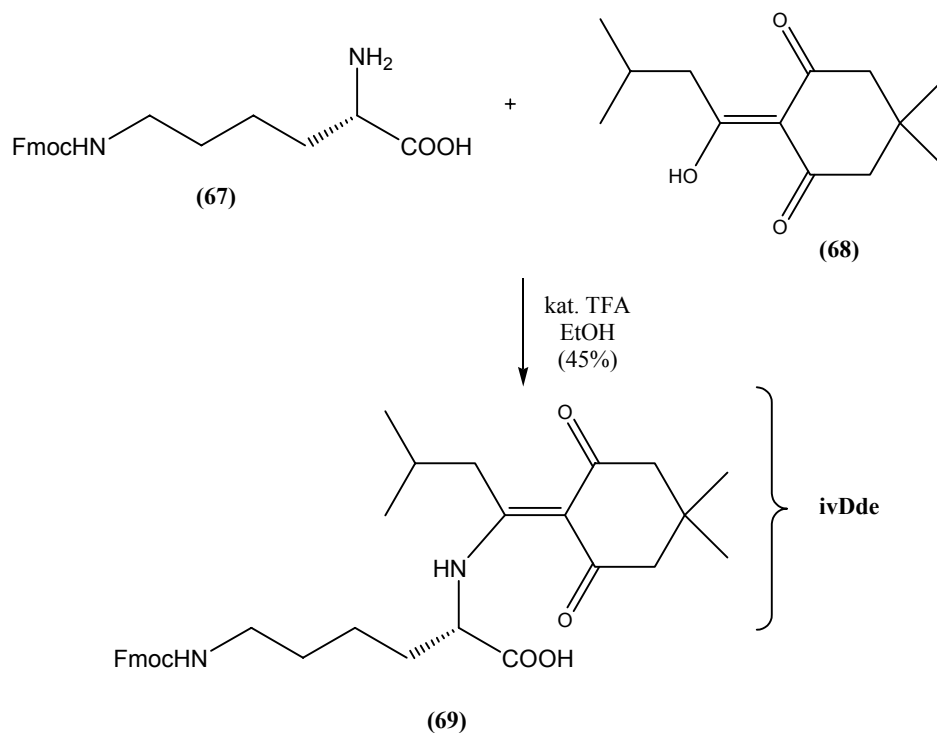


Abb. 3.81: Synthese von ivDde-Lys(Fmoc)-OH

Die anschließende Anbindung von (69) an die feste Phase erfolgt erneut durch DIC-vermittelte Überführung in das symmetrische Anhydrid und anschließende DMAP-katalysierte^{161,162} Veresterung.

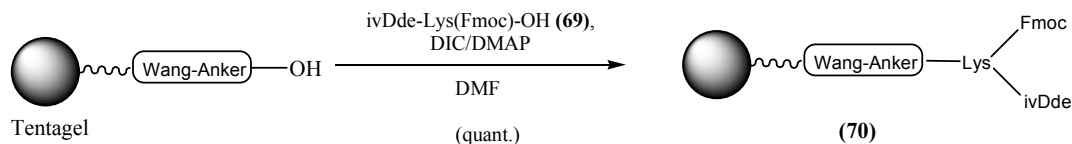


Abb. 3.82: Anbindung an die feste Phase

Als Festphasen-Harz wird ein spezielles, besonders für die Synthese längerer Peptide und schwieriger Sequenzen vorgesehenes Tentagel (*Tentagel R*) mit erhöhter Quellfähigkeit eingesetzt. Das Harz ist wieder mit dem säurelabilen Wang-Anker versehen. Die Anbindung von (69) gelingt in quantitativer Ausbeute.

Wie bereits beschrieben, soll durch den Einbau eines nicht-immunogenen Oligoethylenglykospacers eine gegenseitige Beeinflussung der Konformationen von B- und T-Zell-Epitop ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck soll ein direkt in der Fmoc-Peptidsynthese einsetzbares Spacermolekül dargestellt werden. Ausgangspunkt dieser Synthese ist das bereits dargestellte Triethylenglykolderivat (40). Durch eine nucleophile Substitutionsreaktion des Mesylats mit Natriumazid gelingt die Umwandlung in das Azid (71), welches mit Raney-Nickel zum Aminoderivat (72) reduziert wird²³⁴.

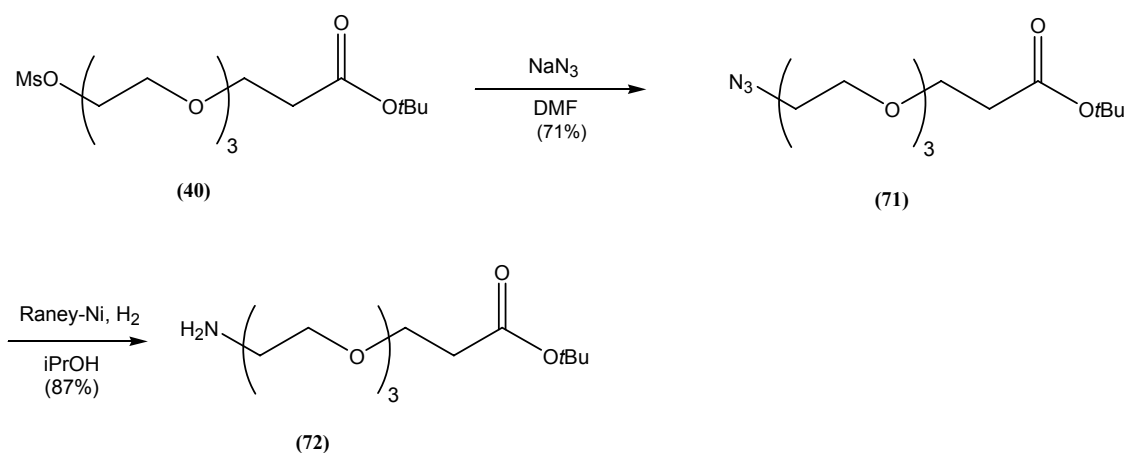


Abb. 3.83: Synthese des Aminoethylglycospacers

Die Blockierung der Aminfunktion mit der Fmoc-Schutzgruppe gelingt durch Reaktion mit Fmoc-OSu in einem Aceton/Wasser-Gemisch in hoher Ausbeute¹¹⁸.

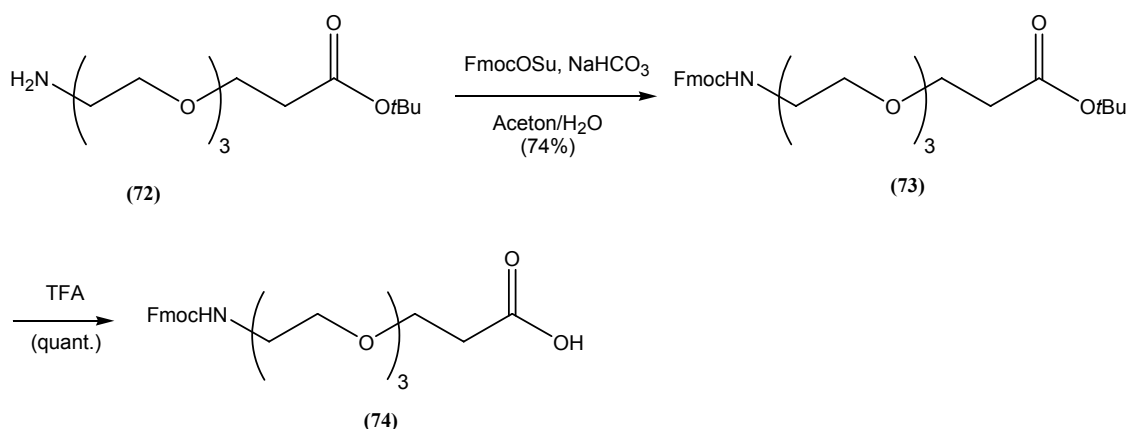


Abb. 3.84: Synthese des Fmoc-geschützten Oligoethylglykospacers

Die anschließende acidolytische Spaltung des *tert*-Butylesters von (73) liefert den fertigen Festphasenbaustein (74) in quantitativer Ausbeute.

3.4.4 Synthese von (Glyco-)Peptid-Heterotopen

Ausgehend von dem festphasengebundenen, orthogonal geschützten Lysin (70) sollen nun Heterotop-Konjugate synthetisiert werden. Für einen ersten Versuch wird die unglycosylierte tandem repeat-Sequenz des MUC4 als B-Zell-Epitop ausgewählt. Als T-Zell-Epitop kommt die sieben Aminosäuren umfassende Minimalsequenz, welche für die Immunogenität erforderlich ist, des universellen Epitopes aus Tetanus-Toxin (Abb. 3.75) zum Einsatz.

Bei der Synthese des Heterotops wird zunächst das T-Zell-Epitop dargestellt und nach anschließender Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe das B-Zell-Epitop, da bei den geplanten Synthesen von glycosylierten Heterotopen sonst das zur Abspaltung nötige Hydrazin die saccharidischen Acetylschutzgruppen des B-Zell-Epitops angreifen könnte.

Die Synthese des T-Zell-Epitops aus dem Tetanus-Toxin erfolgt vollautomatisch nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll. Die anschließende Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe und die Kupplung des Linkers (**74**) wurden in einem Merrifield-Reaktor manuell durchgeführt.

Die Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe erfolgt durch mehrfaches, fünfminütiges Schütteln des Harzes in 2%iger Hydrazinhydrat-Lösung. Mittels UV-spektrometrischer Kontrolle der Abspaltungslösung lässt sich eine vollständige Spaltung durch das Verschwinden der Absorption des Abspaltungsprodukts (**66**) sicherstellen. Anschließend erfolgt eine manuelle Kupplung des Linkers (**74**) an die nun freie α -Aminogruppe des harzgebundenen Lysins. Da diese Aminfunktion sterisch recht stark abgeschirmt sein dürfte, wird diese Kupplung mit der reaktiveren Reagenzienkombination HATU/HOAt durchgeführt. Außerdem wird die Reaktionszeit für diese Kupplung auf acht Stunden verlängert. Die anschließende Synthese der Mucin-Sequenz erfolgt wieder vollautomatisch am Synthesizer. Nach Abspaltung vom Harz und Reinigung des Rohpeptides durch präparative HPLC kann das Produkt (**75**) in 46% Ausbeute isoliert werden.

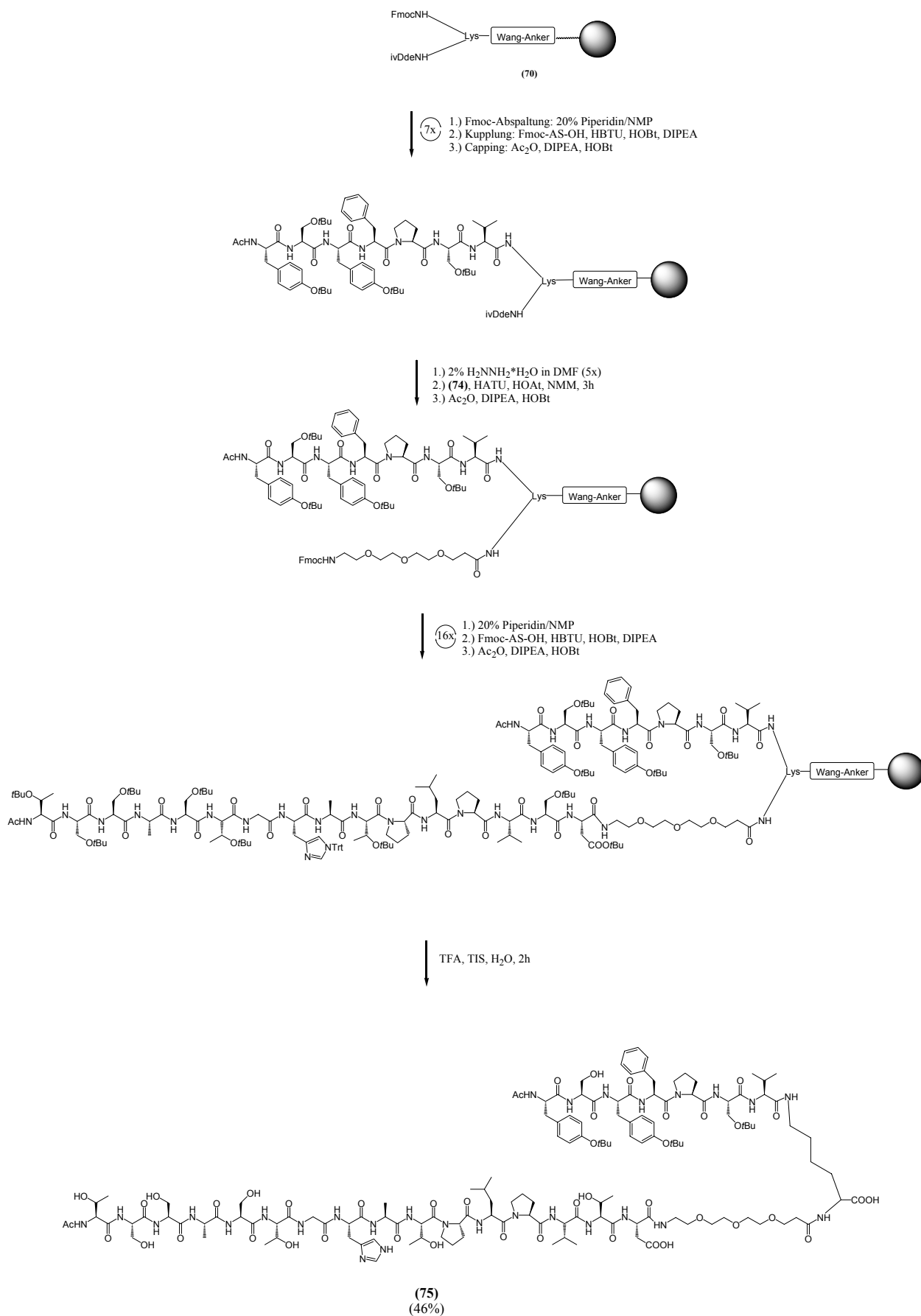


Abb. 3.85: Synthese des Heterotops (75)

Nachdem die Darstellung des Konjugats (**75**) ausgehend vom orthogonal blockierten, festphasengebundenen Lysin erfolgreich durchgeführt wurde und sich diese Strategie zur Synthese von Heterotopen als prinzipiell geeignet erwiesen hat, soll sie nun auf Konjugate mit der tandem repeat-Sequenz des MUC1 ausgeweitet werden. Gleichzeitig ist eine Verlängerung des T-Zell-Epitopes geplant, da die von MHC-II-Molekülen präsentierten Peptidfragmente üblicherweise eine Länge von 10-34 Aminosäuren aufweisen¹⁶⁹. Die bisher eingesetzte Sequenz von sieben Aminosäuren wird daher sowohl am *N*- als auch am *C*-Terminus um jeweils zwei Aminosäuren aus der Ursprungssequenz des Tetanus-Toxins (Abb. 3.75) auf insgesamt elf verlängert. Als B-Zell-Epitop kommt wiederum die schon benutzte, 12 Aminosäuren umfassende tandem repeat-Sequenz des MUC1 zum Einsatz. Die Synthese wird analog zu der Darstellung von (**75**) durchgeführt.

Ausgehend vom festphasengebundenen Lysin werden zunächst die elf Aminosäuren des T-Zell-Epitopes vollautomatisch am Synthesizer gekuppelt. Die anschließende Abspaltung der *ivDde*-Schutzgruppe erfolgt wieder manuell durch mehrfache Behandlung mit 2%iger Hydrazinlösung. Auch die Kupplung des Spacermoleküls (**74**) mit HATU/HOAt wird manuell durchgeführt. Der Aufbau der MUC1-Sequenz wird vollautomatisch am Synthesizer durchgeführt. Nach Acetylierung des *N*-Terminus erfolgt die Abspaltung vom Harz durch Behandlung mit Trifluoressigsäure. Leider zeigt sich, dass das Rohpeptid sowohl in Wasser als auch in Methanol oder Acetonitril weitgehend unlöslich ist. Auch durch geringe Zusätze von DMF oder DMSO gelang es nicht, das Rohprodukt in Lösung zu bringen. Eine Reinigung durch präparative HPLC kann daher nicht durchgeführt werden. Zur Anfertigung eines Massenspektrums ist die Löslichkeit aber groß genug. Die Identität des gewünschten Produktes (**76**) konnte hier nachgewiesen werden. In der analytischen HPLC zeigt sich, dass das Peptid-Konjugat in hoher Reinheit ohne größere Anteile an Abbruchsequenzen entstanden ist.

Die mangelnde Löslichkeit kann wahrscheinlich durch die relativ hydrophobe Aminosäuresequenz des Tetanus-Toxin-Epitops erklärt werden. Verglichen mit dem löslichen Konjugat (**75**) enthält (**76**) zusätzlich zweimal das sehr hydrophobe Isoleucin. Hinzu kommt noch der Wechsel von der MUC4-tandem repeat-Sequenz zur etwas weniger hydrophileren des MUC1.

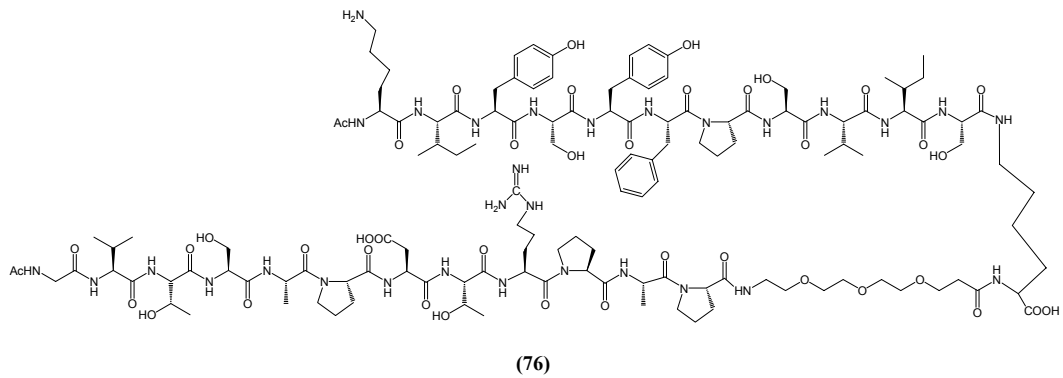
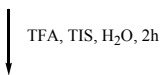
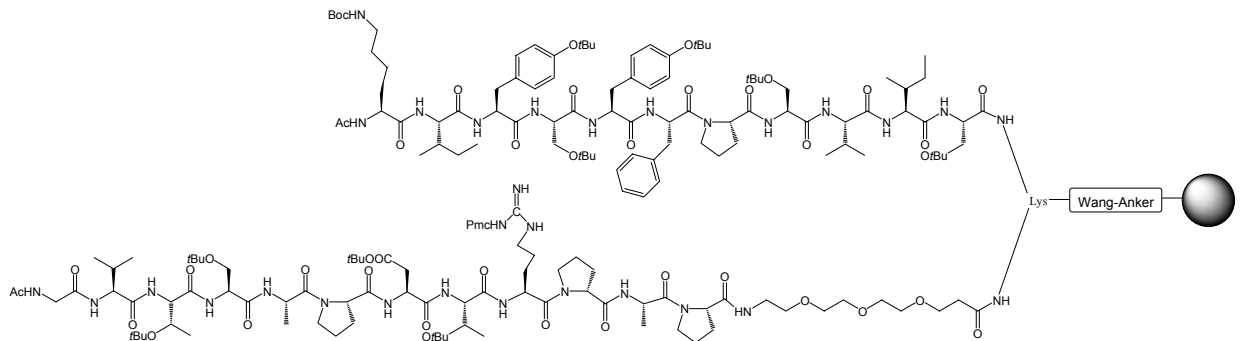
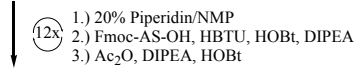
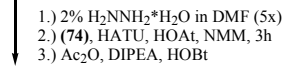
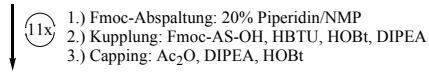
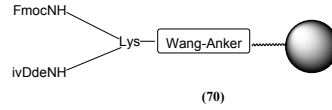


Abb. 3.86: Synthese des Heterotops (76)

Um dennoch zu möglicherweise besser löslichen Konjugaten zu gelangen, wird die Sequenz für das T-Zell-Epitop modifiziert. Zusätzlich zu den sieben grundsätzlich benötigten Aminosäuren (Abb. 3.75) werden nun *N*-terminal fünf weitere angeknüpft. Auf diese Weise werden außer dem hydrophoben Isoleucin die hydrophilen Aminosäuren Lysin, Serin und Asparagin eingebaut, wodurch die Löslichkeit wesentlich verbessert werden sollte. Außerdem wird jetzt ein glycosyliertes B-Zell-Epitop aufgebaut, indem der T_N-Antigen-Baustein (**9**) anstelle von Thr(9) in die Synthese eingebracht wird. Die hydrophile Kohlenhydratseitenkette sollte ebenfalls die Löslichkeit verbessern.

Die Synthese dieses Konjugates erfolgt wieder ausgehend vom festphasengebundenen, orthogonal blockierten Lysin-Derivat (**70**).

Zunächst wird nach dem Standardprotokoll im Synthesizer die zwölf Aminosäuren umfassende Sequenz aus dem Tetanus-Toxin dargestellt. Die anschließende Abspaltung der *ivDde*-Schutzgruppe mit verdünnter Hydrazinlösung sowie die Anbindung des Spacermoleküls (**74**) erfolgt wieder in manuell durchgeführten Reaktionen in einem Merrifield-Festphasenreaktor. Die nun folgende Synthese des B-Zell-Epitopes aus MUC1 erfolgt bis Ser(4) wieder vollautomatisch im Synthesizer. Der glycosylierte Aminosäurebaustein (**9**) wird dann in einer halbautomatischen Kupplung unter Aktivierung mit HATU/HOAt/NMM angebunden. Die Kupplung der restlichen beiden Aminosäuren erfolgt wieder vollautomatisch. Der *N*-Terminus wird abschließend deblockiert, mit Cappingreagenz acetyliert und das Glycopeptid-Konjugat (**77**) mit Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten.

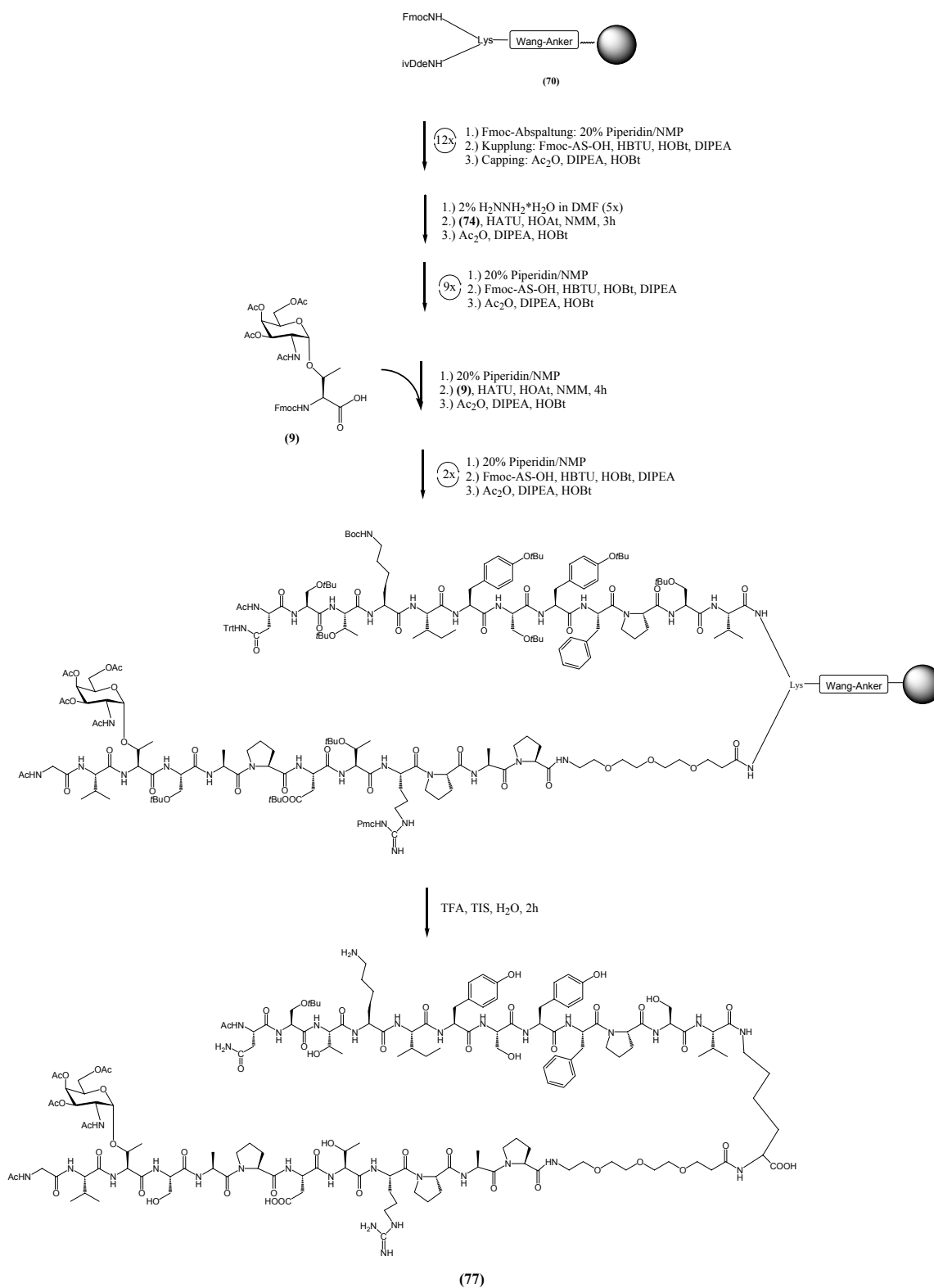


Abb. 3.87: Synthese des Heterotops (77)

Das Konjugat (77) zeigt im Vergleich zum vorher dargestellten (76) bereits eine deutlich erhöhte Wasserlöslichkeit. Jedoch ist sie für eine Reinigung durch präparative HPLC immer noch zu gering. Da in einer Analyse durch analytische HPLC aber keine größeren Mengen an Verunreinigungen zu beobachten sind, wird das Rohprodukt direkt der Deacetylierung nach *Zemplén* unterworfen.

Die hierbei freiwerdenden saccharidischen Hydroxylfunktionen sollten die Hydrophilie und damit auch die Wasserlöslichkeit des Konjugates nochmals deutlich steigern. Da nach Aufarbeitung des Rohproduktes noch schwerlösliche Bestandteile vorhanden sind, wird das Konjugat (78) zunächst einer Reinigung durch präparative Gelpermeationschromatographie an einer Sephadex-Phase unterzogen. Durch anschließende semipräparative HPLC lassen sich letzte Verunreinigungen beseitigen und das Konjugat (78) wird in reiner Form erhalten. Die Struktur des Produktes kann durch massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Analysen gesichert werden.

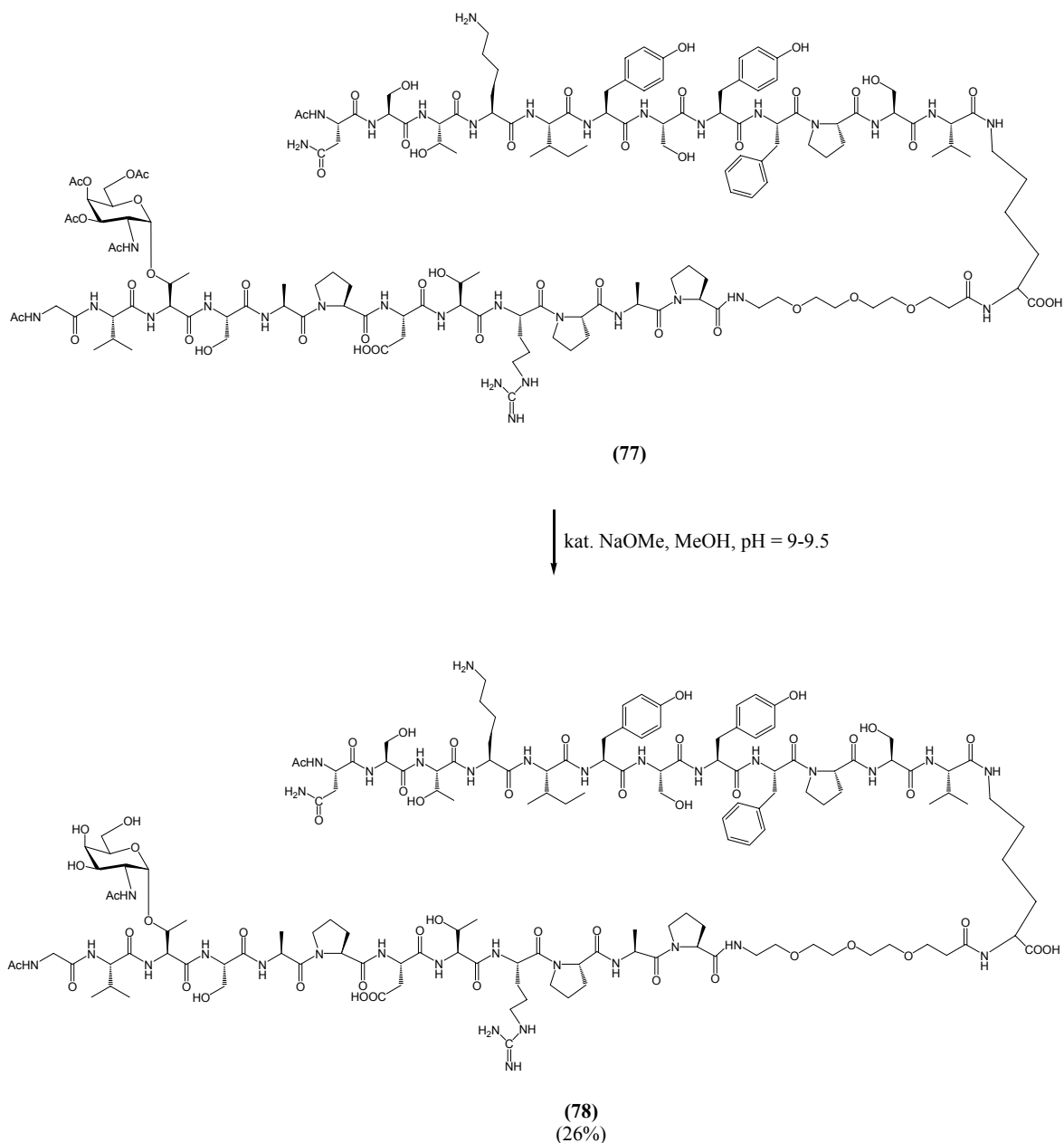
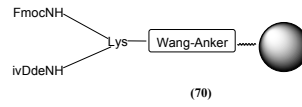


Abb. 3.88: Deacetylierung von (77)

Wie bereits erwähnt, sind das Sialyl-T_N- und das (2,3)-Sialyl-T-Antigen aufgrund ihrer vergleichsweise großen Tumorspezifität von besonderem Interesse für die Entwicklung von Tumorstoffen. Daher sollen nun auch Konjugate bestehend aus dem T-Zell-Epitop aus Tetanus-Toxin und der Wiederholungseinheit von MUC1, welche mit diesen beiden tumorassoziierten Kohlenhydraten glycosyliert ist, dargestellt werden.

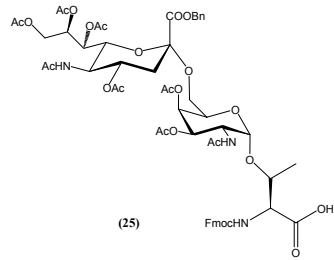
Die Synthesen erfolgen abermals ausgehend vom orthogonal geschützten Lysinderivat an der festen Phase (70) auf dem bereits durchgeführten Syntheseweg.



- 1.) Fmoc-Abspaltung: 20% Piperidin/NMP
 2.) Kupplung: Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBT, DIPEA
 3.) Capping: Ac₂O, DIPEA, HOBT

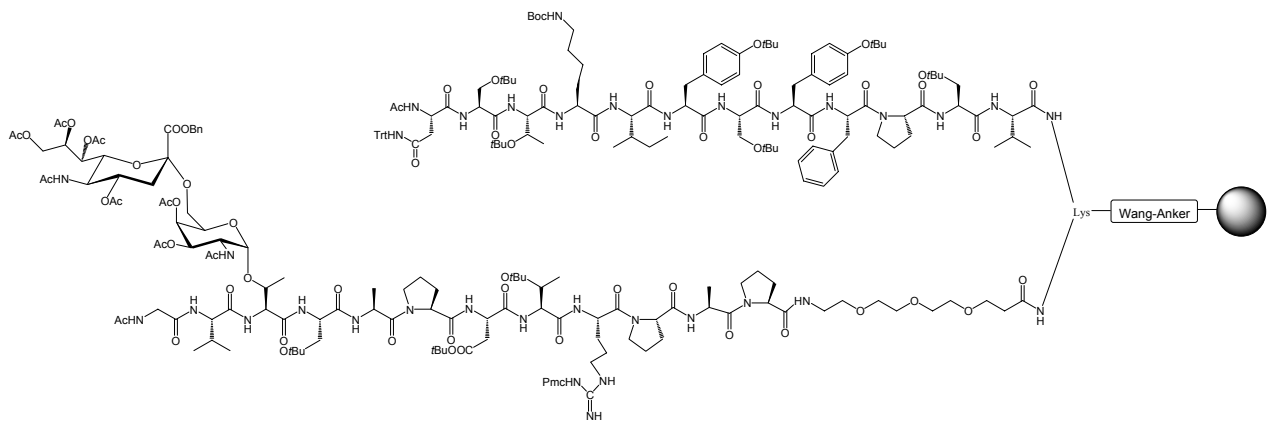
- 1.) 2% H₂NNH₂*H₂O in DMF (5x)
 2.) (74), HATU, HOAt, NMM, 3h
 3.) Ac₂O, DIPEA, HOBT

- 1.) 20% Piperidin/NMP
 2.) Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBT, DIPEA
 3.) Ac₂O, DIPEA, HOBT



- 1.) 20% Piperidin/NMP
 2.) (25), HATU, HOAt, NMM, 4h
 3.) Ac₂O, DIPEA, HOBT

- 1.) 20% Piperidin/NMP
 2.) Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBT, DIPEA
 3.) Ac₂O, DIPEA, HOBT



TFA, TIS, H₂O, 2h

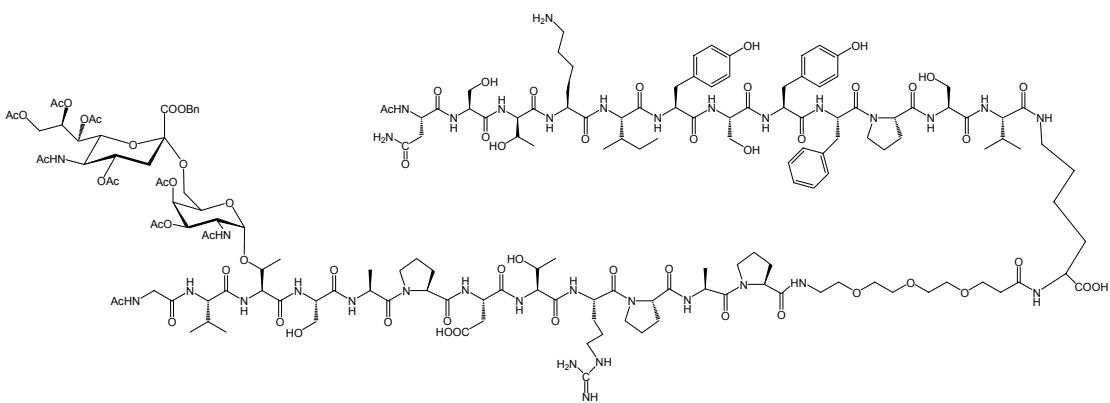


Abb. 3.89: Synthese des Heterotops (79)

Zur Synthese des Sialyl-T_N-enthaltenden Glycopeptidkonjugates wird zunächst vollautomatisch die Aminosäuresequenz des T-Zell-Epitopes gekuppelt. Die anschließende Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe und die darauf folgende Kupplung des Oligoethylenglycolspacers (**74**) werden erneut manuell im Merrifield-Festphasenreaktor durchgeführt. Das Harz wird dann wieder in den Peptidsynthesizer überführt und die MUC1-Sequenz bis Ser(4) vollautomatisch gekuppelt. Nach Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird der Sialyl-T_N-Baustein (**25**) in einer halbautomatischen Kupplung unter Aktivierung mit HATU/HOAt/NMM angebunden. Es werden 2.5 Äquivalente der wertvollen glycosylierten Aminosäure eingesetzt, wobei die Kupplungszeit auf 6 Stunden verlängert wird. Bei der nachfolgenden Kupplung der verbleibenden zwei Aminosäuren ist im UV-Abspaltungsprotokoll kein nennenswerter Rückgang der Intensität sichtbar.

Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz erfolgt mit dem bereits bewährten Gemisch aus Trifluoressigsäure, Triisopropylsilan und Wasser. Das rohe Peptid zeigt eine mäßige Löslichkeit in Wasser und Methanol, die allerdings für eine Reinigung durch präparative HPLC noch nicht ausreicht. Die Identität des Produktes kann durch ESI-massenspektrometrische Untersuchung gesichert werden. In einer Analyse des Rohproduktes durch analytische HPLC ist kein großer Gehalt an Abbruchsequenzen zu beobachten. Daher wird das rohe Peptid wieder direkt der Deblockierung unterworfen. Dazu ist zunächst die Spaltung des Benzylesters der Sialinsäure durch Hydrogenolyse nötig. Die Reaktion wird durch analytische HPLC und massenspektrometrisch verfolgt und ist nach 24 Stunden beendet. Das Rohprodukt wird ohne Reinigung im nun folgenden Deacetylierungsschritt eingesetzt. Unter *Zemplén*-Bedingungen bei einem pH-Wert von 9-9.5 ist auch nach mehreren Tagen in der HPLC-Analyse kein einheitliches Produkt sichtbar. Auch ein leichtes Erhöhen des pH-Wertes auf ca. 10 zeigt keine Veränderung an. Ein MALDI-TOF-Massenspektrum der Reaktionsmischung zeigt neben dem gewünschten, voll deblockierten Produkt (**80**) Anteile an Intermediaten, die noch eine, zwei oder sogar drei Acetylgruppen tragen. Eine offensichtlich erschwerte Abspaltung dieser Acetylschutzgruppen im ST_N-Saccharid wird in diesem Zusammenhang zum ersten Mal festgestellt. Bei bekannten Synthesen von Glycopeptiden, welche das ST_N-Antigen tragen, bereitete die Deblockierung unter *Zemplén*-Bedingungen keinerlei Probleme. Um eine vollständige Abspaltung dieser Schutzgruppen zu erreichen, wird das Produktgemisch daher in wässriger Natriumhydroxid-Lösung bei einem pH-Wert von 10.5-11 gelöst. Nach 20 Stunden zeigt die Analyse durch HPLC nun die Bildung eines einheitlichen Produktes. Das rohe Glycopeptid besitzt eine für die Reinigung durch

semipräparative HPLC ausreichende Wasserlöslichkeit. Das reine Konjugat (**80**) kann in einer Ausbeute von 12% (bezogen auf die Anfangsbeladung des Harzes) erhalten werden.

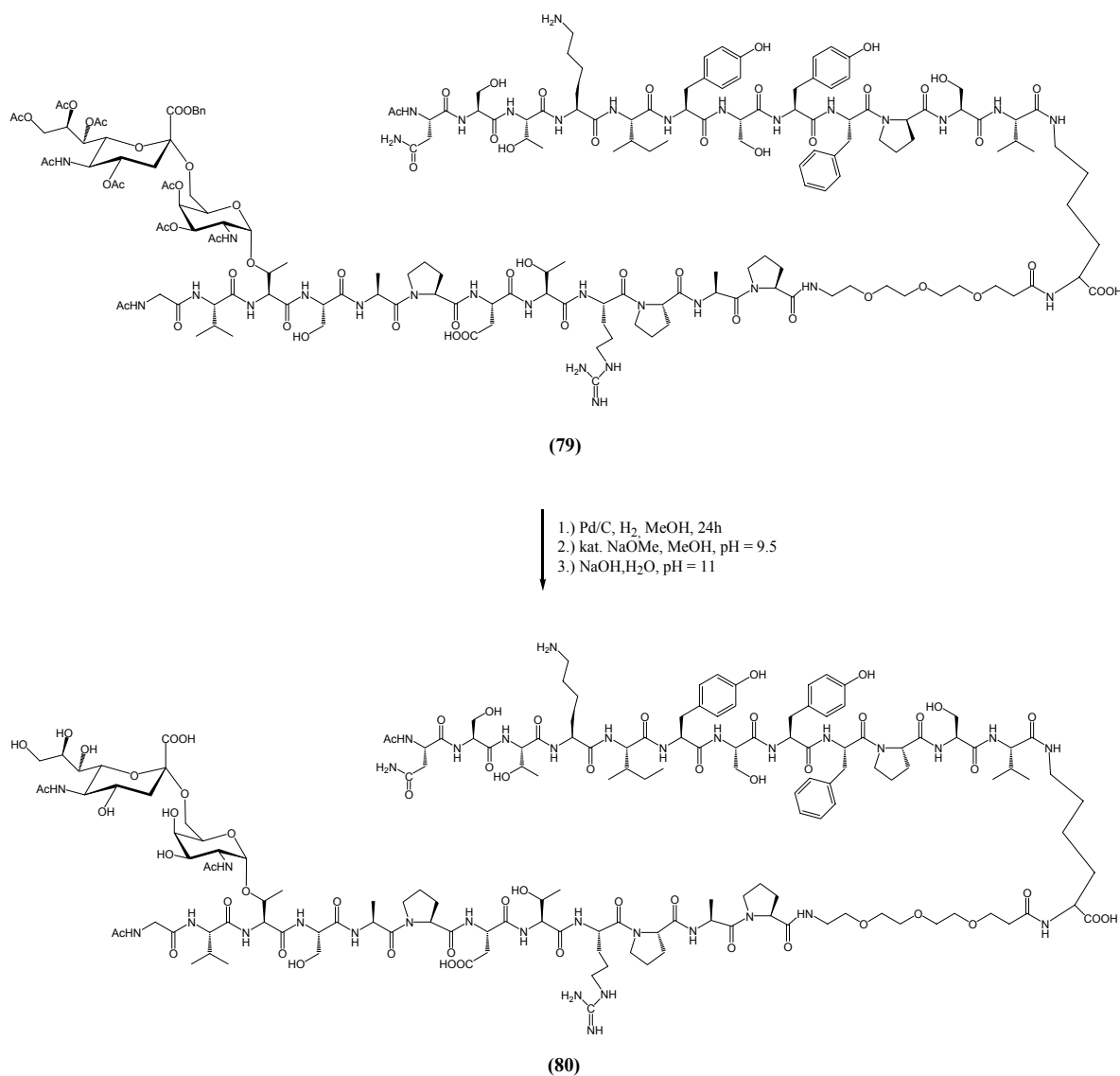


Abb. 3.90: Deblockierung von (79)

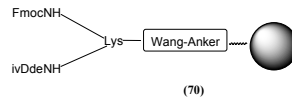
Im MALDI-TOF-Spektrum des gereinigten Konjugats sind außer der berechneten Masse des Produktes (**80**) nun keine der noch Acetylgruppen tragenden Spezies mehr sichtbar.

Die Struktur von (**80**) wird durch ein- und zweidimensionale NMR-Experimente bestätigt. Hierzu sind ausgedehnte Messzeiten nötig, um im ¹³C- und im HSQC-Spektrum alle Signale zu erhalten. Die beim Glycopeptid (**49**) beobachtete Verbreiterung vieler Signale wird jedoch nicht beobachtet. Trotz der geringen Substanzmenge (7.5 mg) werden klare Spektren erhalten, in denen alle Signale zugeordnet werden können. Eine Differenzierung von im Konjugat mehrfach vorhandenen Aminosäuren, wie z.B. dem viermal vorkommenden Serin, ist nicht in jedem Fall möglich, jedoch auch nicht unbedingt nötig. Zusammen mit dem korrekten

Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse kann die Struktur von **(80)** als gesichert angesehen werden.

Die Synthese des analogen, mit dem (2,3)-Sialyl-T-Antigen glycosylierten Glycopeptid-Konjugats erfolgt ebenfalls nach dem etablierten Schema.

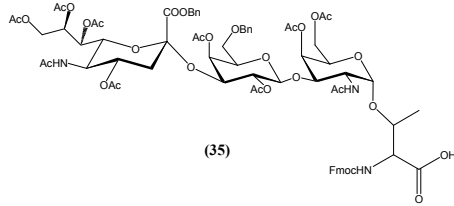
Am festphasengebundenen Lysin-Derivat **(70)** werden zunächst vollautomatisch die 12 Aminosäuren des T-Zell-Epitopes gekuppelt. Nach der Deblockierung und Acetylierung des *N*-Terminus wird das Harz in einem Merrifield-Festphasenreaktor überführt. Es folgt die manuelle Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe mit verdünnter Hydrazinlösung sowie die Kupplung des Spacermoleküls **(74)** unter Aktivierung mit HATU/HOAt und NMM. Daran schließt sich die vollautomatische Kupplung der MUC1-Sequenz bis Ser(4) im Synthesizer an. Die Anbindung der glycosylierten Aminosäure **(35)** wird wieder halbautomatisch unter Aktivierung mit HATU/HOAt/NMM durchgeführt. Die Kupplungszeit für den (2,3)-Sialyl-T-Antigen-Baustein wird erneut auf 6 Stunden ausgedehnt. Im UV-Protokoll ist anschließend nur eine geringfügige Abnahme der Intensität zu beobachten. Die Kupplung der restlichen beiden Aminosäuren sowie die Deblockierung und Acetylierung des *N*-Terminus erfolgen vollautomatisch. Die Abspaltung des Konjugats von der festen Phase erfolgt wiederum mit einem Gemisch aus Trifluoressigsäure und Scavengern. Das nach Lyophilisieren erhaltene Rohprodukt ist nur mäßig in Methanol und Wasser löslich, eine Reinigung durch präparative HPLC ist daher wieder nicht durchführbar. Die HPLC-Analyse des rohen Glycopeptides zeigt geringe Anteile an Abbruchsequenzen. Die Hauptkomponente kann durch massenspektrometrische Analyse jedoch als das gewünschte Produkt **(81)** identifiziert werden.



1.) Fmoc-Abspaltung: 20% Piperidin/NMP
 2.) Kupplung: Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBT, DIPEA
 3.) Capping: Ac₂O, DIPEA, HOBT

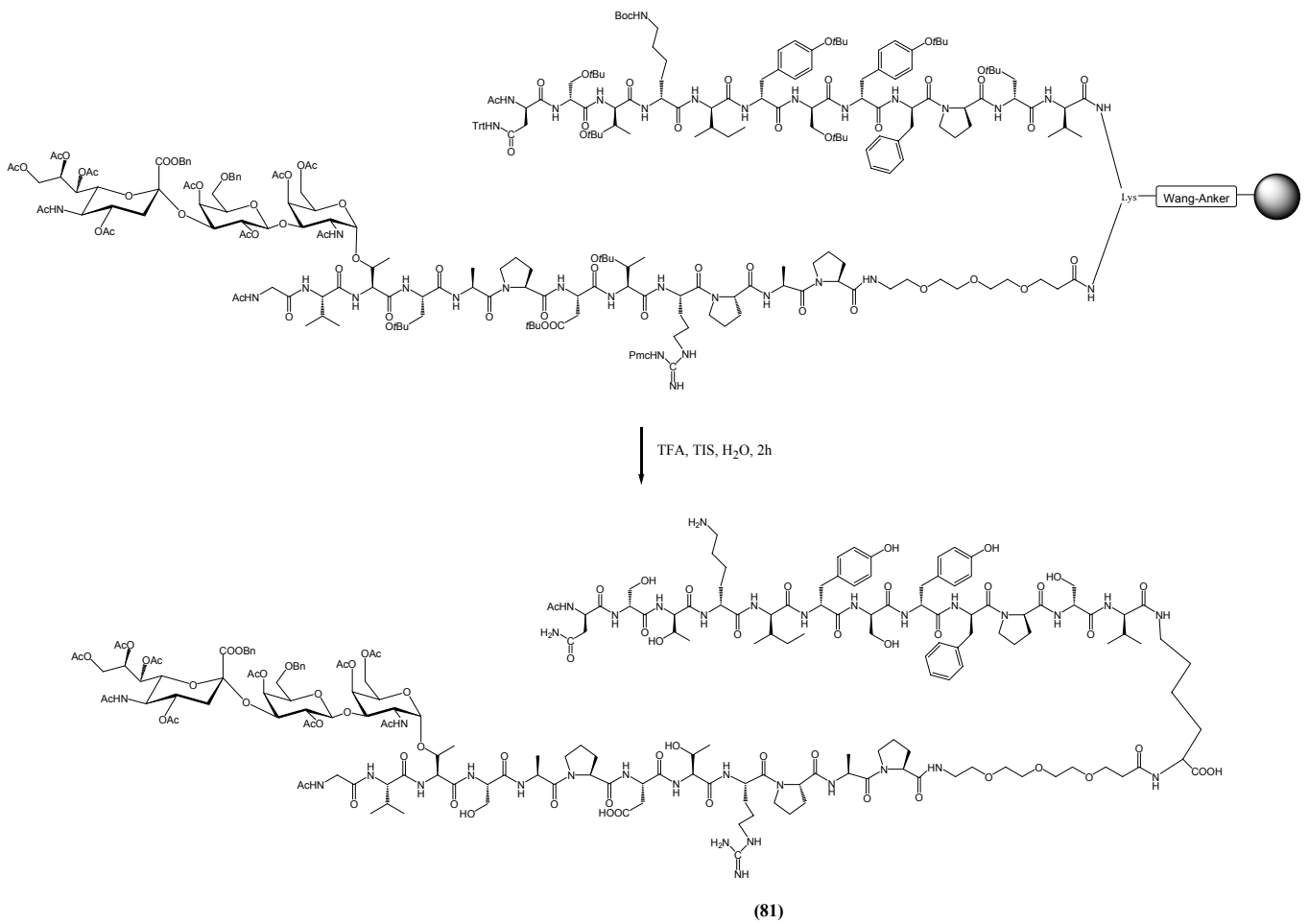
1.) 2% H₂NNH₂*H₂O in DMF (5x)
 2.) (74), HATU, HOAt, NMM, 3h
 3.) Ac₂O, DIPEA, HOBT

1.) 20% Piperidin/NMP
 2.) Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBT, DIPEA
 3.) Ac₂O, DIPEA, HOBT



1.) 20% Piperidin/NMP
 2.) (35), HATU, HOAt, NMM, 6h
 3.) Ac₂O, DIPEA, HOBT

1.) 20% Piperidin/NMP
 2.) Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBT, DIPEA
 3.) Ac₂O, DIPEA, HOBT



TFA, TIS, H₂O, 2h

Abb. 3.91: Synthese des Heterotops (81)

Das Konjugat (**81**) wird wiederum ohne Aufreinigung deblockiert.

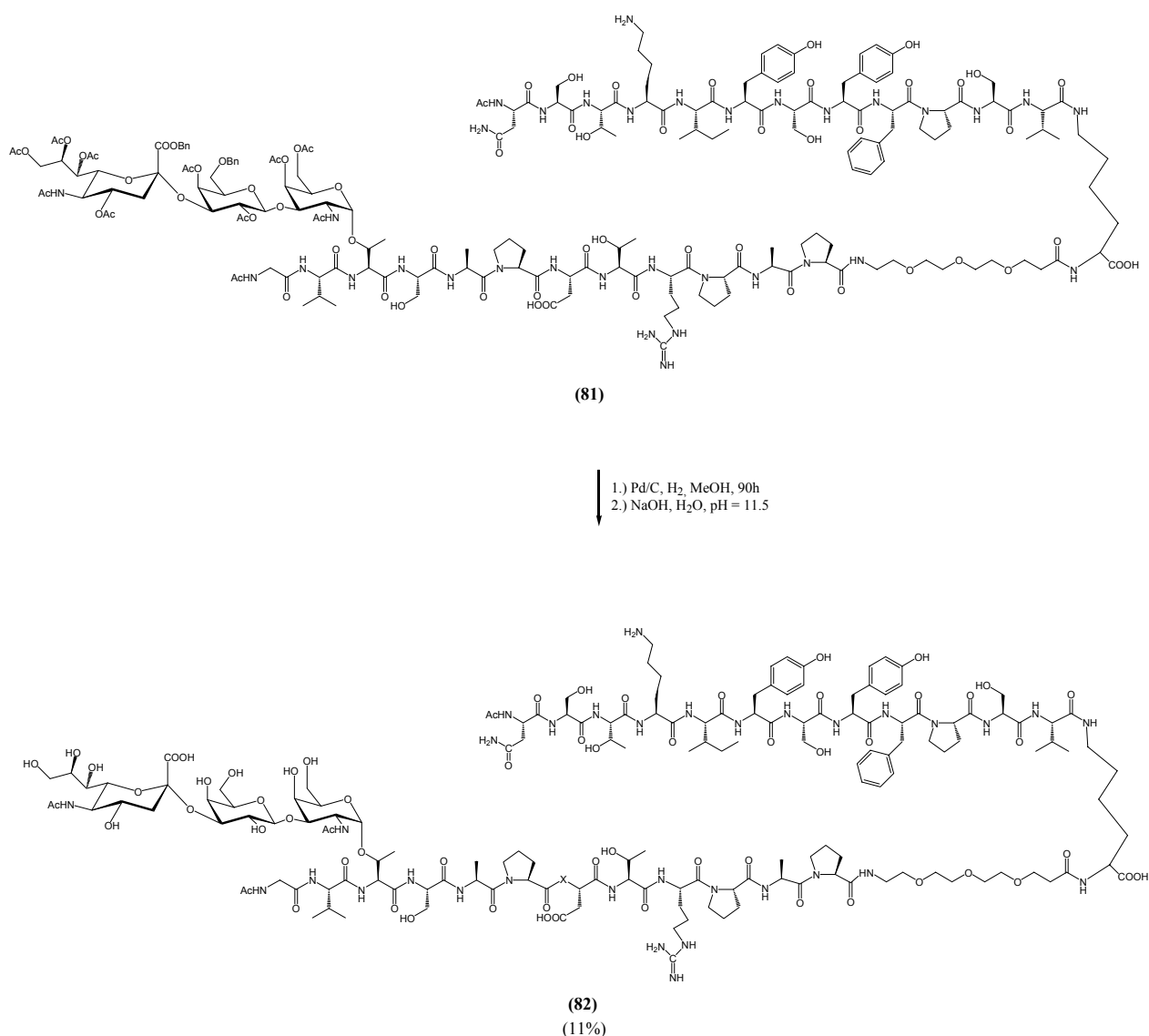


Abb. 3.92: Deblockierung von (81)

Zur gleichzeitigen hydrogenolytischen Spaltung des Benzylesters der Neuraminsäure sowie des Benzylethers der Galactose wird das Rohprodukt in Methanol gelöst, mit einer katalytischen Menge Palladium auf Aktivkohle versetzt und unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgt durch analytische HPLC. Die Abspaltung beider Benzylschutzgruppen erfolgt nur sehr langsam. Auch durch Durchleiten von Wasserstoff durch die Suspension lässt sich die Hydrogenolyse nicht beschleunigen. Erst nach 90 Stunden Reaktionszeit hat sich das Edukt vollständig umgesetzt. Die korrekte Struktur des Rohproduktes wird durch massenspektrometrische Analyse nachgewiesen. Anschließend erfolgt direkt die globale Deacetylierung, welche aufgrund der bekannten problematischen Deblockierung des (2,3)-Sialyl-T-Antigens^{48,118} direkt durch wässrige Natriumhydroxid-Lösung bei einem pH-Wert von 11.5 durchgeführt wird. Das Fortschreiten

der Reaktion wird regelmäßig durch analytische HPLC kontrolliert. Eine Spaltung der glycosidischen Bindung, welche unter den relativ stark basischen Bedingungen auftreten kann, wird nicht beobachtet. Nach 50 Stunden Reaktionszeit ist die Deacetylierung abgeschlossen.

Das Rohprodukt wird in Wasser aufgenommen und alle unlöslichen Bestandteile werden durch Zentrifugieren entfernt. Die anschließende Reinigung durch präparative HPLC gestaltet sich kompliziert: Zwar verfügt das rohe Konjugat nun über eine ausreichende Wasserlöslichkeit, jedoch ist die Abtrennung sämtlicher Verunreinigungen schwierig. Bei einer zweiten präparativen HPLC-Reinigung zeigt das Produkt ein breites, strukturiertes Elutionsprofil, welches auf die gleichzeitige Elution von Verunreinigungen hinzuweisen scheint.

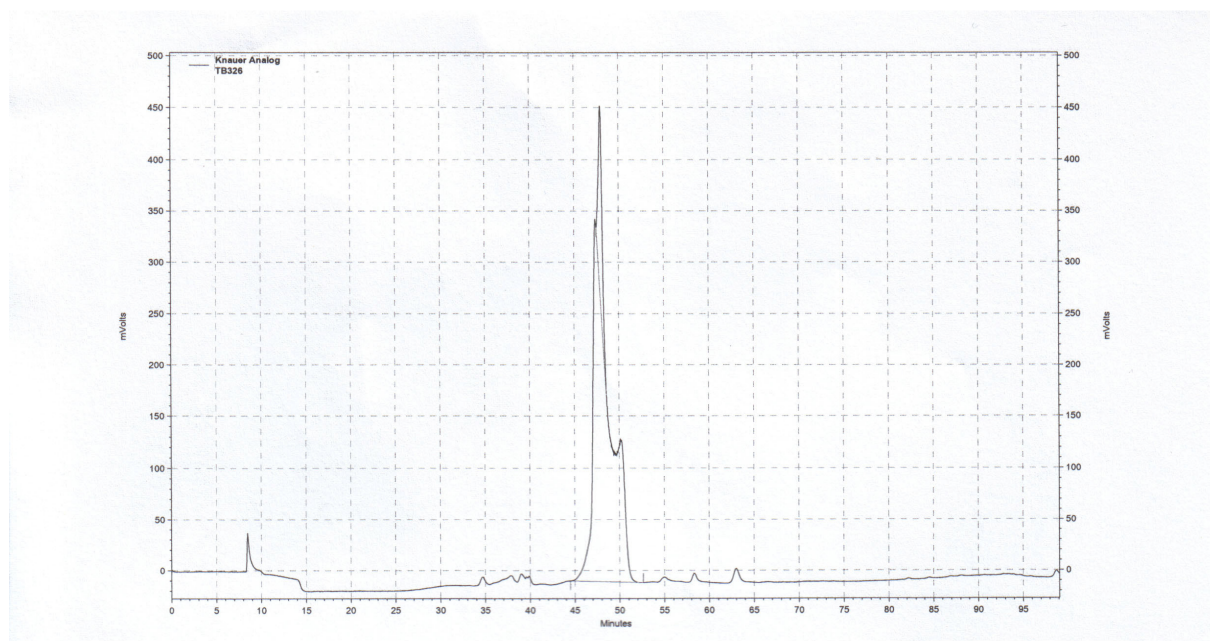


Abb. 3.93: Elutionsprofil von (82)

Allerdings sind bei der massenspektrometrischen Analyse des isolierten Produkts keinerlei auf Verunreinigungen hindeutende Signale zu sehen, insbesondere keine von noch teilweise acetylierten Intermediaten. Das Konjugat wird trotzdem einer weiteren Reinigung durch semipräparative HPLC unterzogen. Hierbei tritt wieder ein breites Elutionsprofil auf, welches auf noch enthaltene Verunreinigungen hindeuten könnte. In der NMR-spektroskopischen Untersuchung werden jedoch keine Signale sichtbar, welche durch Verunreinigungen verursacht werden könnten. Das Konjugat (**82**) scheint also tatsächlich eine hohe Reinheit aufzuweisen. Das in der HPLC auftretende, breite Elutionsprofil wird daher vermutlich durch unterschiedliche Konformere des Produktes (**82**) oder Aggregationserscheinungen verursacht.

3.5 Synthese von Glycopeptid-Mitogen-Konjugaten

3.5.1 Hintergrund

Eine weitere Möglichkeit, die Immunogenität von Strukturen zu verstärken, besteht in der kovalenten Bindung an ein *Mitogen*. Als *Mitogen* bezeichnet man eine Substanz, welche in der Lage ist, B- und/oder T-Zellen in einer nicht antigenspezifischen Weise zu aktivieren. So kann z.B. durch Concanavalin A (Con A, aus Rhizinusbohnen) die Mehrzahl aller T-Zellen, unabhängig von ihrer Spezifität, stimuliert werden. Hierbei wird die Aktivierung durch Bindung des Mitogens an Oberflächenrezeptoren der T-Zelle, wie z.B. den T-Zell-Rezeptor (TCR) oder das von allen T-Zellen exprimierte CD2 (LFA-3-Rezeptor), ausgelöst.

Ein weiteres Mitogen, das für Immunisierungen eingesetzt wird, ist *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3-bis-palmitoyloxy-(2 *R,S*)-propyl)-(*R*)-cystein (*Pam*₃*Cys*)^{235,236}.

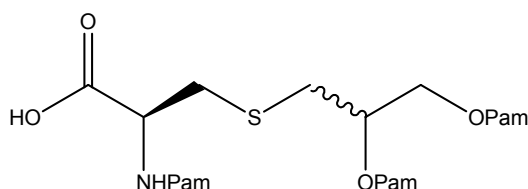


Abb. 3.94: Struktur von Pam₃Cys

Pam₃Cys ist ein synthetisches Analogon zum *N*-Terminus eines Lipoproteins aus der äußeren Membran des *Escherichia coli*-Bakteriums. Genauso wie das native Protein ist Pam₃Cys ein potenter B-Zellen-, Monocyten- und Neutrophilen-Aktivator²³⁵.

Pam₃Cys kann zum einen als Adjuvans bei Immunisierungen verwendet werden und so z. B. das *komplette Freund'sche Adjuvans* (CFA) ersetzen. Andererseits besteht über die freie Carboxylfunktion von Pam₃Cys die Möglichkeit, ein B-Zell-Epitop kovalent anzuknüpfen und auf diese Weise zu einer Vakzine mit „integriertem“ Adjuvans zu gelangen. Auf diese Weise wurden schon experimentell vollsynthetische Vakzine z. B. gegen die Maul-und-Klauenseuche²³⁷ oder das HIV-Virus²⁰⁶ dargestellt.

Man war anfangs der Ansicht, dass Pam₃Cys hauptsächlich als Membrananker wirkt: Durch die hydrophoben Palmitinsäureketten findet eine Verankerung in der Lipiddoppelschicht der Zellen statt, wodurch eine Akkumulierung und Präsentation der Antigene auf der Zelloberfläche möglich wird. Dies wiederum induziert eine Stimulation der Lymphocyten gegenüber den Antigenen. Es ist schon lange bekannt, dass Lipopeptide oft eine stärkere Immunogenität aufweisen als reine Peptide. Diese Vorstellung erklärt jedoch nicht die ungewöhnlich starke Immunogenität des Pam₃Cys. Weiterhin scheint dessen genaue Struktur wichtig zu sein. So hat ein Austausch der Palmitinsäureketten gegen kürzere Fettsäuren

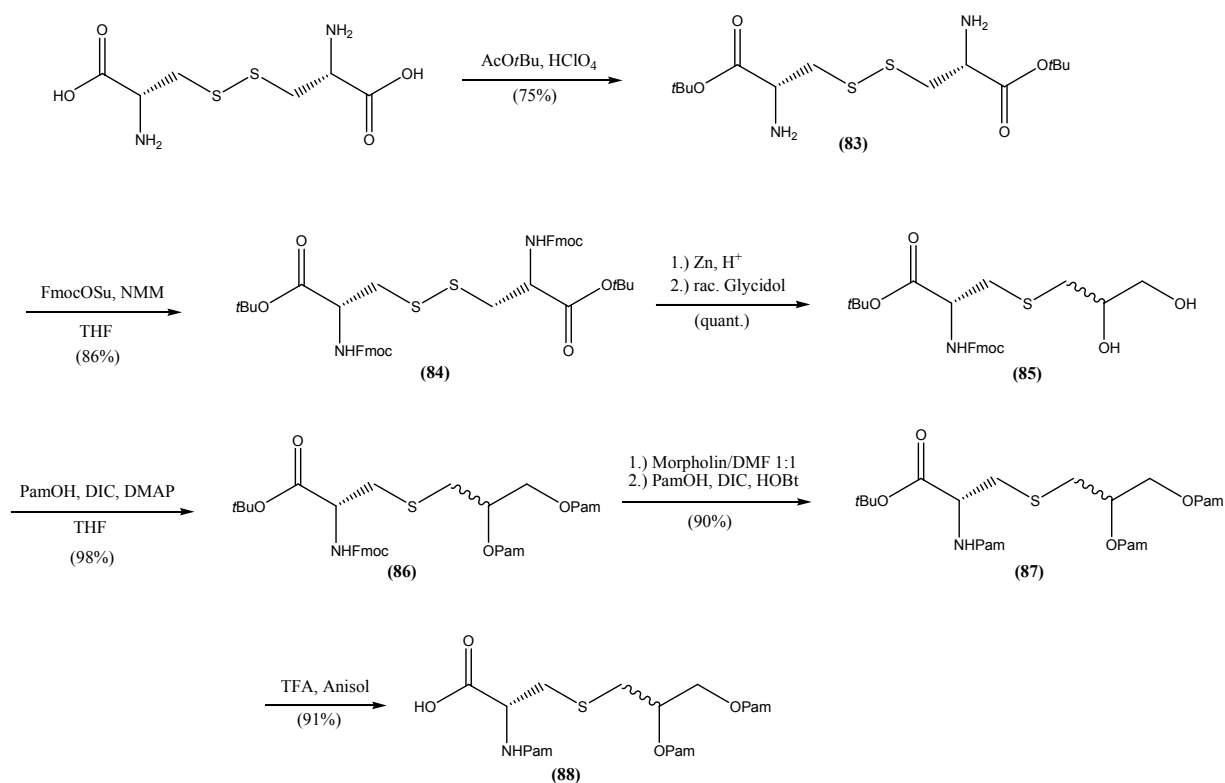
oder eine Substitution des Thioethers gegen eine Methylenbrücke²³⁸ einen Aktivitätsverlust zur Folge.

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass es tatsächlich Rezeptoren auf Leukozyten gibt, welche Pam₃Cys erkennen^{239,240}. Diese Rezeptoren gehören zur Gruppe der *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs). Diese zum angeborenen Immunsystem gezählten Rezeptoren erkennen eine Vielzahl von eingedrungenen Mikroorganismen anhand konservierter Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Im Gegensatz zu B- oder T-Zell-Rezeptoren, die hochspezifisch an ein Antigen binden, erkennen die TLRs also eher bestimmte; für pathogene Mikroorganismen charakteristische strukturelle „Muster“ wie z. B. Lipopolysaccharide. Heute sind zehn verschiedene TLRs bekannt, von denen der TLR2 die größte Anzahl an unterschiedlichen Strukturen, wie Peptidoglycane, bakterielle Lipopetide und -proteine sowie verschiedene Lipopolysaccharide erkennt. TLR2 formt Heterodimere entweder mit TLR1 und TLR6, wobei Pam₃Cys-Derivate hauptsächlich durch die TLR2/TLR1-Form erkannt werden. Durch Bindung von Pam₃Cys wird die Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen sowie die Aktivierung der adaptiven Immunantwort ausgelöst, wodurch sich die mitogenen Eigenschaften erklären.

Es sollen nun Konjugate aus einem B-Zell-Epitop und Pam₃Cys hergestellt werden. Als B-Zell-Epitop sollen Glycopeptide mit auf den tandem repeat-Sequenzen der Mucine basierenden Strukturen mit tumorassoziierten O-Glycanen zum Einsatz kommen. Die Anbindung an Pam₃Cys soll hierbei über einen flexiblen Spacer erfolgen, um eine Beeinflussung der Konformation des Glycopeptides durch das Mitogen auszuschließen. Um eine Immunsuppression zu vermeiden, sollte dieser Spacer nicht-immunogen sein. Es bietet sich daher wieder ein auf Oligoethylenglycol basierendes Spacermolekül an.

3.5.2 Synthese des Mitogens Pam₃Cys-OH

Zunächst ist die Darstellung des Pam₃Cys-OH selbst nötig. Diese Synthese erfolgt in sechs Stufen in Anlehnung an eine literaturbekannte Vorgehensweise²⁴¹⁻²⁴⁴ ausgehend von L-Cystin.

Abb. 3.95: Synthese Pam₃Cys-OH

Dieses wird zunächst durch säurekatalysierte Reaktion mit *tert*-Butylacetat in den Bis-*tert*-butylester (**83**) überführt²⁴⁵. Anschließend erfolgt die Blockierung der beiden Aminfunktionen durch Umsetzen mit Fmoc-OSu in THF mit *N*-Methylmorpholin (NMM) als Base. Die Disulfid-Bindung von (**84**) wird nun reduktiv mittels Zinkpulver unter sauren Bedingungen gespalten. Durch Zugabe von Glycidol wird das entstandene Thiol in den Thioether (**85**) überführt. Da racemisches Glycidol eingesetzt wird, entsteht das Produkt als Diastereomergemisch. Es wird jedoch nicht getrennt, sondern als Gemisch in den weiteren Synthesen eingesetzt, da beide Diastereomere als Mitogene geeignet sind. Durch Veresterung unter *Steglich*-Bedingungen werden die beiden freien Hydroxylfunktionen mit Palmitoylresten funktionalisiert. Nach Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe von (**86**) mit 50%iger Morpholinlösung wird die nun freie Aminfunktion ebenfalls mit Palmitinsäure unter TBTU/HOBT-Aktivierung acyliert. Nach acidolytischer Spaltung des *tert*-Butylesters von (**87**) wird das gewünschte Pam₃Cys-OH (**88**) erhalten. Die gesamte sechsstufige Synthese verläuft völlig ohne chromatographische Reinigungsschritte.

3.5.3 Versuche zur direkten Konjugation mit Glycopeptiden über eine Amidbindung

Es sollen nun vollsynthetische Konjugate aus tumorassoziierten Glycopeptiden und Pam₃Cys als Mitogen dargestellt werden. Um eine konformationelle Beeinflussung des Glycopeptids

durch das Pam₃Cys zu vermeiden, soll die Konjugation über einen nicht immunogenen Spacer stattfinden. Da eine polare Aminosäure wie Lysin, Asparaginsäure oder besonders Serin in direkter Nachbarschaft die Immunogenität des Pam₃Cys stark erhöht²⁴², soll zusätzlich Serin an die Carboxylgruppe von Pam₃Cys gebunden werden. Idealerweise sollte die Anbindung des Mitogens über eine freie Carboxylfunktion möglich sein, da die Konjugation dann als letzter Schritt der Festphasenpeptidsynthese durchgeführt werden kann.

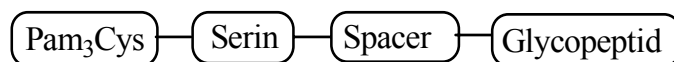


Abb. 3.96: Schema geplante Pam₃Cys-Konjugate

Als Spacer kommt das bereits dargestellte Oligoethylenglycol-Derivat (**72**) zum Einsatz. Über die Aminfunktion des Spacers soll die Anbindung des Mitogens erfolgen, während die Konjugation an das Glycopeptid durch die Carboxylgruppe erfolgt.

Als erster Schritt wird nun, wie oben dargestellt, Serin mit dem Spacer verknüpft. Die Kupplungsreaktion mit dem *N*-Fmoc und *O*-Benzyl-geschützten Serin gelingt unter Aktivierung mit EDC/HOBt in hoher Ausbeute.

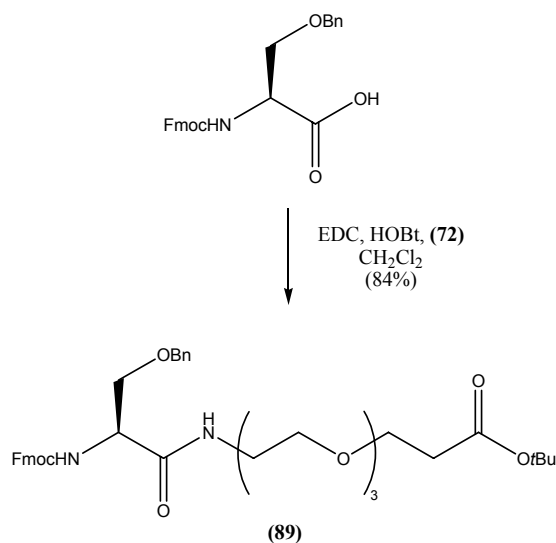
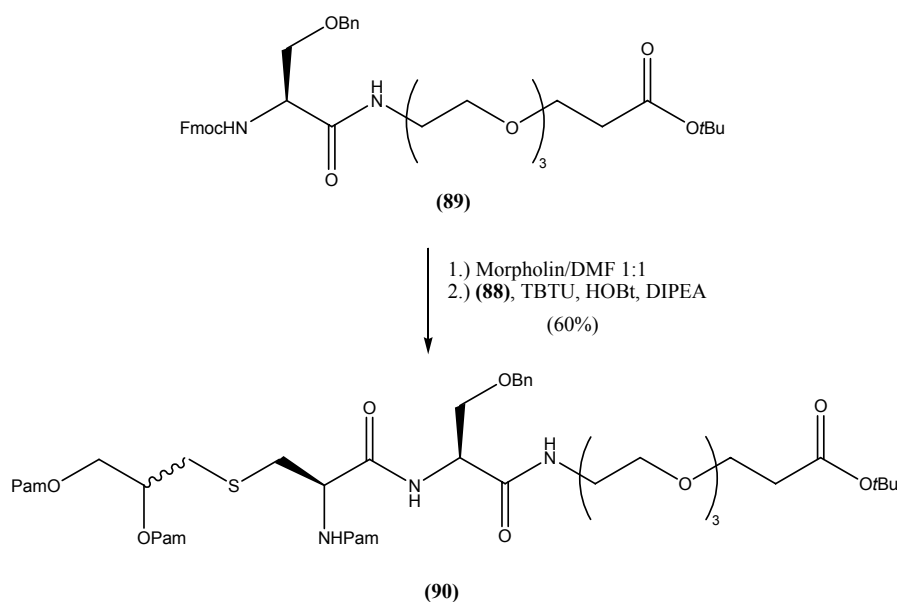


Abb. 3.97: Kupplung des geschützten Serins

Die Fmoc-Gruppe von (**89**) wird mit 50%igem Morpholin abgespalten und das Pam₃Cys mit dem so erhaltenen, freien Amin durch Einsatz der Reagenzienkombination TBTU/HOBt/DIPEA gekuppelt.

Abb. 3.98: Kupplung von Pam₃Cys

Nach Spaltung des *tert*-Butylesters von (90) wird der Mitogen-Baustein (91) erhalten, über dessen freie Carboxylfunktion die Konjugation an den *N*-Terminus eines Glycopeptides möglich ist.

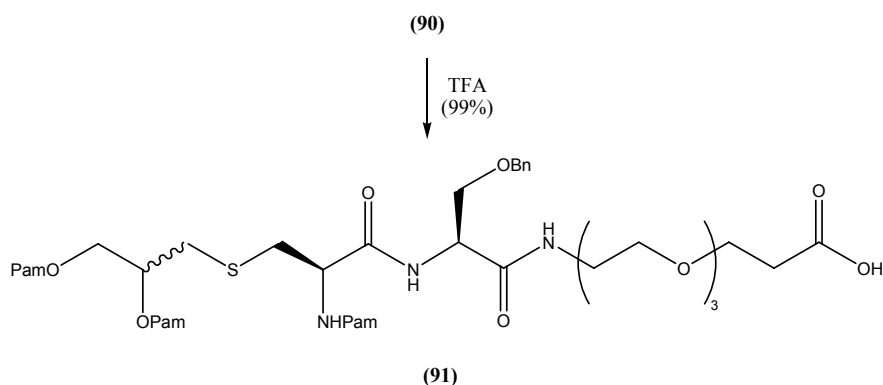


Abb. 3.99: Deblockierung der Carboxylfunktion von (90)

Um ein größeres Repertoire an Konjugationsmöglichkeiten zur Verfügung zu haben, soll noch ein zum Mitogenbaustein (91) analoges Derivat dargestellt werden, welches eine freie Aminfunktion zur Kupplung mit dem *C*-Terminus von Peptiden enthält. Die Synthese beginnt ausgehend von Aminoethoxyethoxyethylamin. Durch Reaktion mit Di-*tert*-butyl-dicarbonat (Boc₂O) gelingt das selektive Blockieren einer Aminfunktion durch eine säurelabile Boc-Schutzgruppe. Anschließend erfolgt die Kupplung von (92) mit *N*-Fmoc- und *O*-Benzyl-geschütztem Serin.

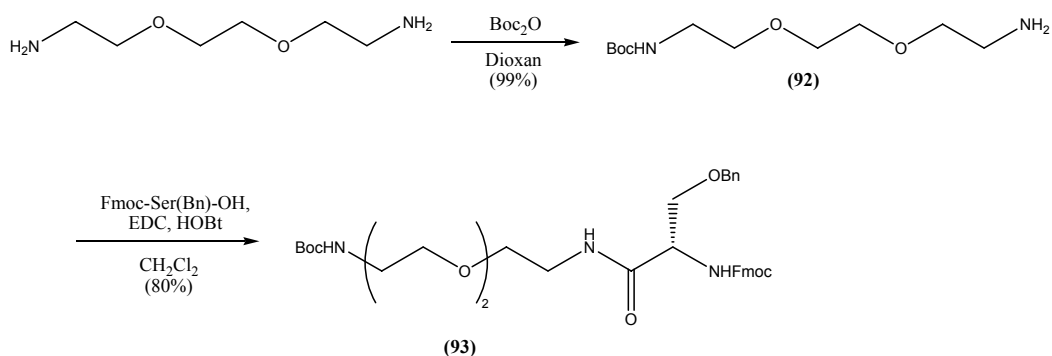


Abb. 3.100: Synthese des Aminspacers

Durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe von (93) und nachfolgende Anbindung von Pam₃Cys durch TBTU/HOBt/DIPEA wird das Mitogenkonjugat (94) erhalten. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit verdünnter Trifluoressigsäure gelangt man zum aminfunktionalisierten Mitogenbaustein (95).

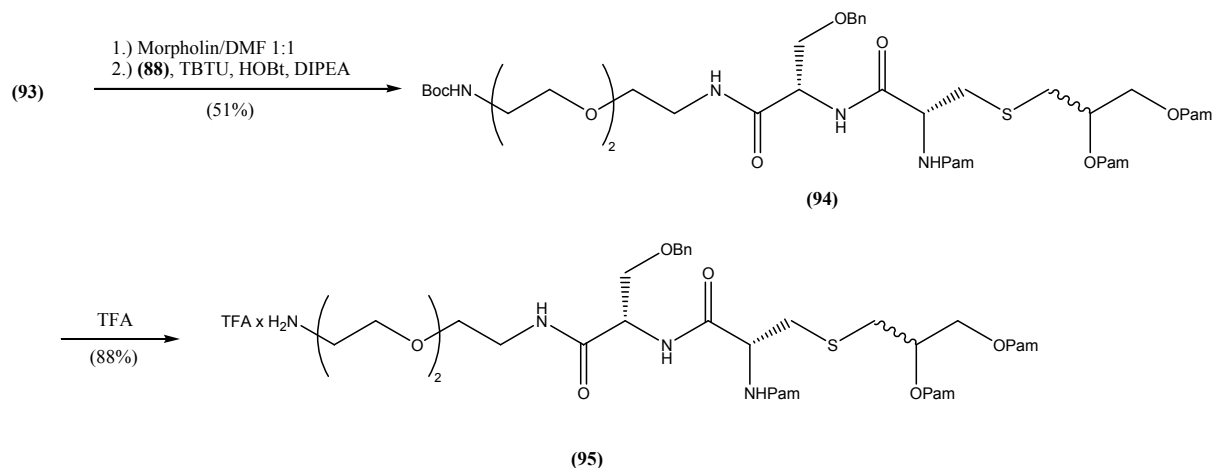


Abb. 3.101: Synthese des aminfunktionalisierten Mitogenbausteins

Bevor die beiden dargestellten Mitogenbausteine zur Konjugation mit Glycopeptiden eingesetzt werden, soll zunächst die Verknüpfung mit einem glycosylierten Threonin als Vorversuch durchgeführt werden. Dazu wird die Fmoc-Gruppe des T_N-Threonin-Bausteins (8) mit Morpholin abgespalten.

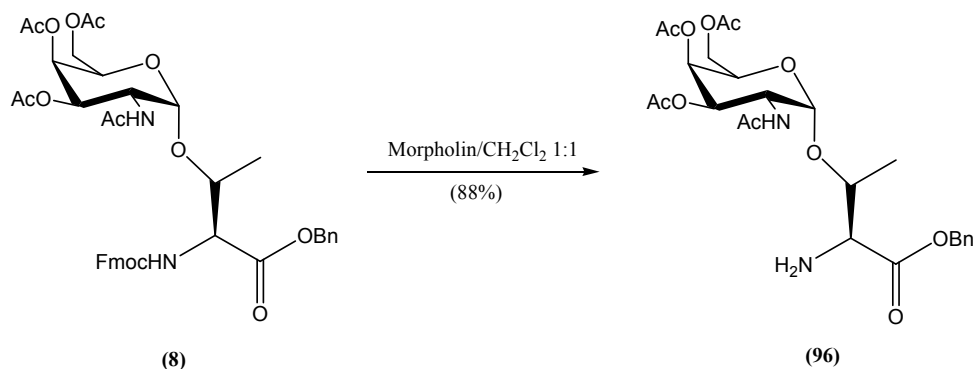


Abb. 3.102: Fmoc-Abspaltung von (8)

Das Produkt **(96)** mit freier Aminfunktion wird quantitativ erhalten. Die folgende Konjugation mit dem Mitogenbaustein **(91)** erfolgt unter Aktivierung mit TBTU/HOBt/DIPEA.

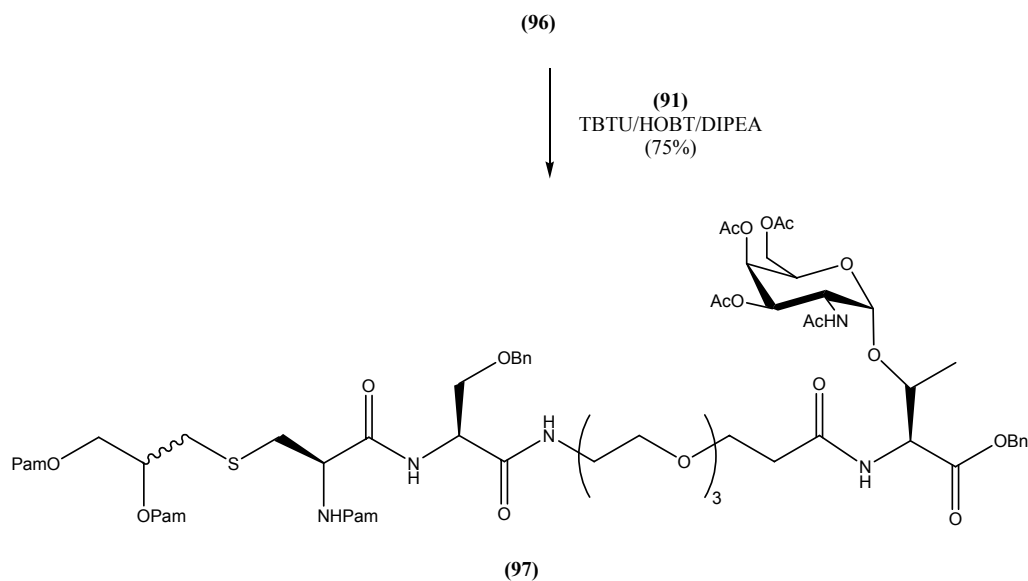


Abb. 3.103: Synthese des Pam₃Cys-Thr(T_N)-Konjugates

Das Produkt **(97)** lässt sich einfach durch Ausfällen mit Methanol reinigen und wird in hoher Ausbeute erhalten. Die korrekte Struktur von **(91)** kann durch 2D-NMR-Experimente überprüft werden.

Eine Konjugation des aminfunktionalisierten Pam₃Cys-Bausteins **(95)** wird testweise mit dem T_N-Antigen-Baustein **(9)** durchgeführt.

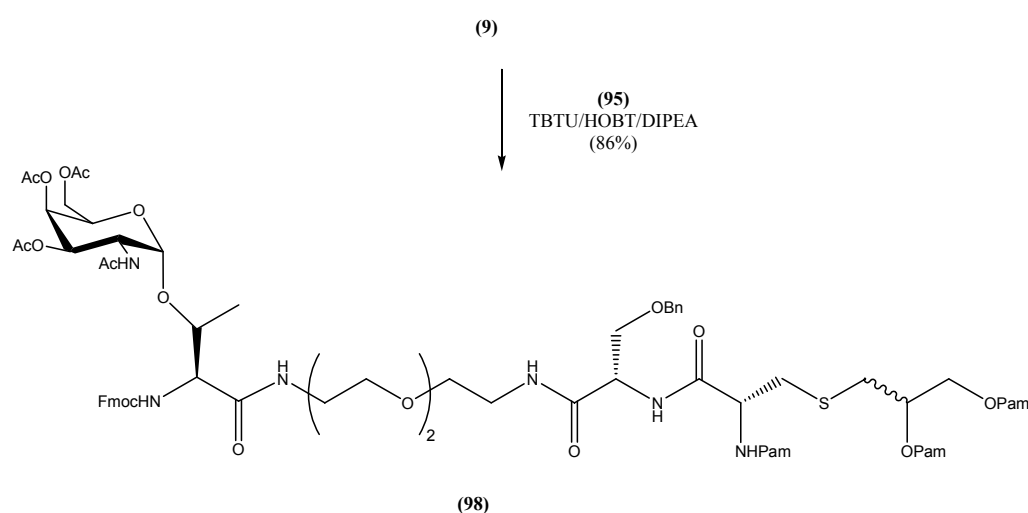


Abb. 3.104: Synthese von (98)

Die Aktivierung der Carboxylgruppe von **(9)** erfolgt mit der Reagenzienkombination TBTU/HOBt/DIPEA. Das Konjugat **(98)** wird nach flashchromatographischer Reinigung in hoher Ausbeute isoliert.

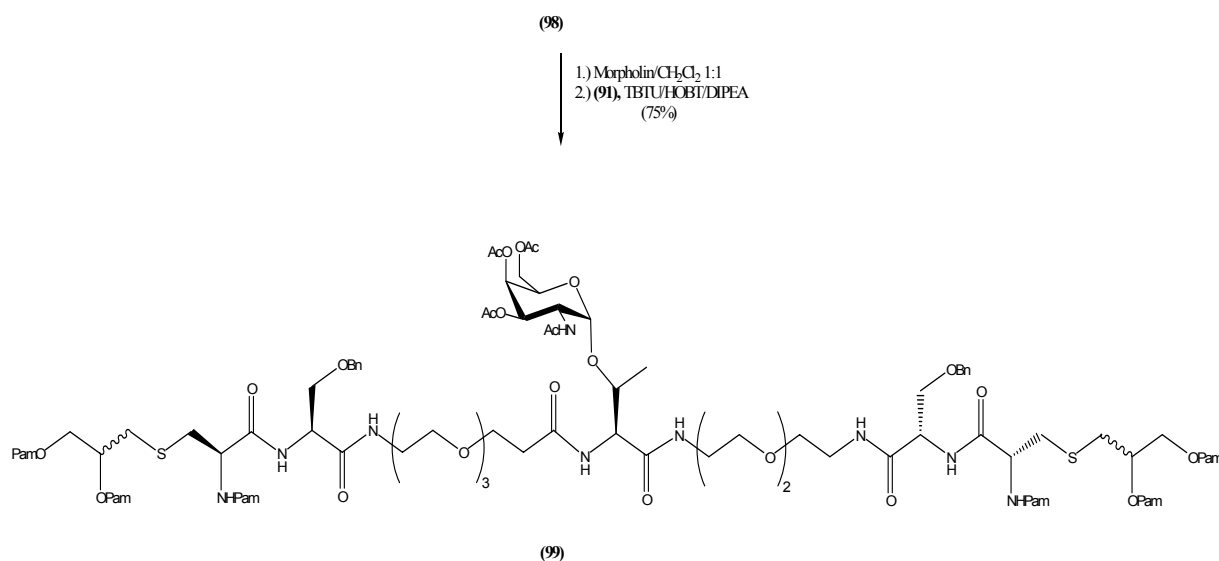


Abb. 3.105: Synthese des Konjugats (99)

Die Aminfunktion des an der Carboxylgruppe funktionalisierten Pam₃Cys-Konjugats **(98)** lässt sich mit Morpholin deblockieren. Anschließend kann eine weitere Kupplung mit dem Mitogenbaustein **(91)** durchgeführt werden.

Nach flashchromatographischer Reinigung wird das zweifach mit Pam₃Cys versehene T_N-Konjugat **(99)** erhalten.

Zur Vervollständigung der Synthese müssen die dargestellten Mitogen-Konjugate nun noch deblockiert werden. Zunächst werden die beiden Benzylschutzgruppen von **(97)** durch Hydrogenolyse mit Palladium auf Aktivkohle entfernt.

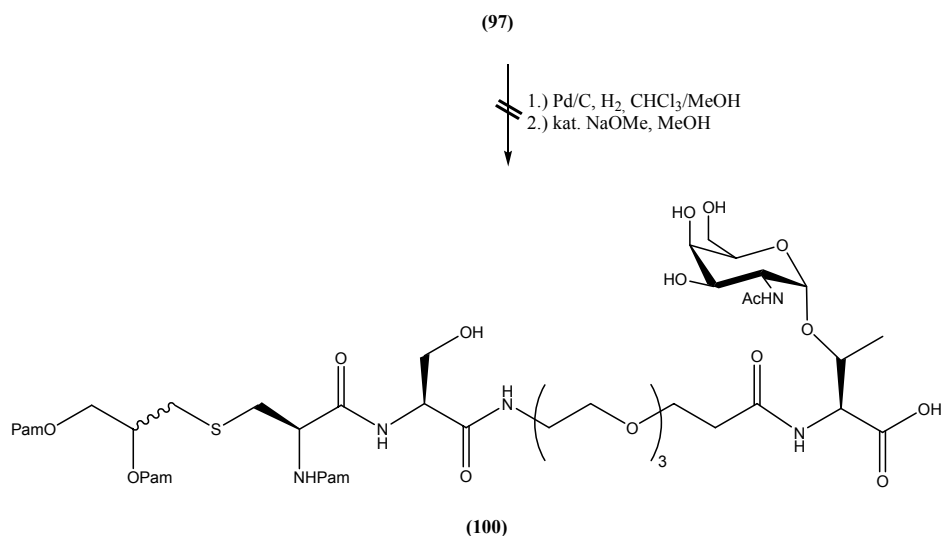


Abb. 3.106: Versuchte Deblockierung von (97)

Bei der anschließenden Deblockierung der saccharidischen Hydroxylfunktionen traten allerdings gravierende Probleme auf: Bei der Umesterung mit katalytischen Mengen Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 9.5-10 sind schon nach kurzer Zeit durch dünn-schichtchromatographische Reaktionskontrolle mehrere Produkte sichtbar. Ein Massenspektrum der Reaktionsmischung zeigt, dass außer den Acetylgruppen auch die Palmitinsäureester des Pam₃Cys teilweise gespalten wurden. Das gewünschte Produkt (**100**) konnte überhaupt nicht nachgewiesen werden. Der Versuch einer Deacetylierung des Konjugates (**99**) bei einem niedrigeren pH-Wert von 8.5 führte ebenfalls nicht zum Erfolg. Durch massenspektrometrische Analyse konnte festgestellt werden, dass die Palmitinsäureester teilweise schon vor den Essigsäureestern gespalten werden.

Es war anzunehmen, dass die Palmitinsäureester im basischen Medium labil sein werden. Allerdings zeigte die Erfahrung mit Lipopeptiden aus früheren Arbeiten²⁴⁶, dass Ester langkettiger Säuren langsamer gespalten werden sollten als die kurzkettigen Essigsäureester. Dies kann durch das hier vorliegende Ergebnis nicht bestätigt werden.

Es wurden daher alternative Reaktionsbedingungen zur Deblockierung gesucht. Eine Deblockierung von (**100**) durch Verseifung mit verdünnter Natronlauge im Zweiphasengemisch mit Toluol ist jedoch ebenfalls nicht erfolgreich.

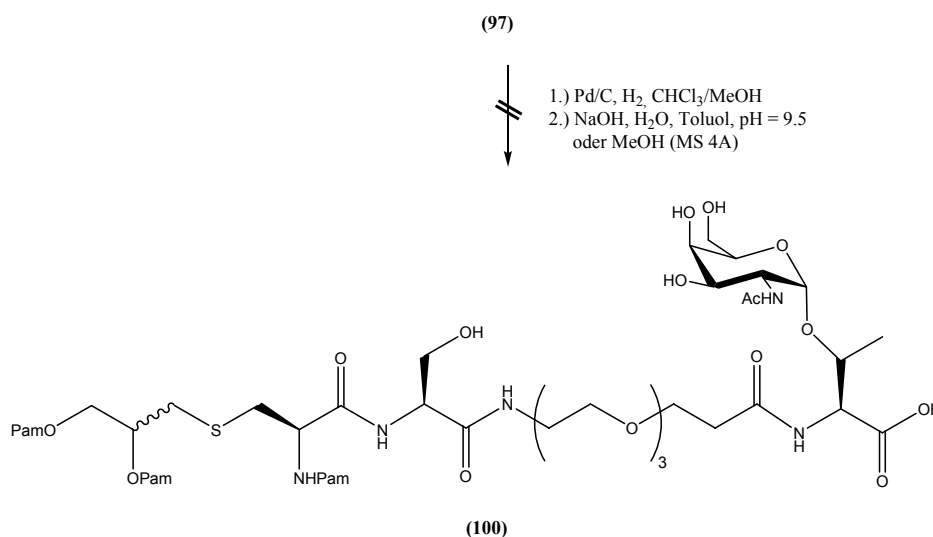


Abb. 3.107: Alternative Deacetylierungsversuche

Idee hierbei war, dass durch Solvatation der lipophilen Palmitinsäureester durch das hydrophobe Toluol der unerwünschte Angriff des Hydroxids auf die Palmitinsäureester erschwert wird. Auch durch diese Strategie kann jedoch die schnelle Spaltung dieser Ester nicht verhindert werden.

Eine weitere Alternative stellt die Verwendung von Methanol dar, welches mehrere Wochen über aktiviertem Molsieb aufbewahrt wurde²⁴⁷. Hierbei bilden sich geringe Mengen an Natriummethanolat, welche eine besonders schonende Deacetylierung bewirken sollen. Auf die Deacetylierung von (97) angewendet kann mit dieser Methodik allerdings keinerlei Reaktion festgestellt werden.

Es ist denkbar, dass eine Deacetylierung der Mitogen-Konjugate (97), (98) und (99) unter nochmals anderen Reaktionsbedingungen erfolgreich durchgeführt werden könnte. Allerdings soll im Rahmen dieser Arbeit ein allgemein anwendbares Konjugationsverfahren gefunden werden. Von den sialylierten Kohlenhydrat-Antigenen, speziell dem (2,3)-Sialyl-T-Antigen, ist aber bekannt, dass die vollständige Deacetylierung nur unter relativ stark basischen Bedingungen möglich ist (s. 3.2.6). Es ist daher ziemlich unwahrscheinlich, dass Reaktionsbedingungen gefunden werden, welche eine vollständige Deacetylierung von Glycopeptid-Pam₃Cys-Konjugaten, welche das (2,3)-Sialyl-T-Antigen enthalten, erlauben, ohne dass gleichzeitig die unerwünschte Spaltung der Palmitinsäureester auftritt. Aus diesem Grund wird der bisher verfolgte Ansatz zur Synthese von Glycopeptid-Pam₃Cys-Konjugaten durch direkte Anknüpfung des Mitogens über eine Amidbindung nicht weiter verfolgt.

3.5.4 Anbindung über Thiol-Olefin-Addition

Da die Konjugation von Glycopeptiden mit BSA über Thiol-Olefin-Verknüpfung bereits erfolgreich durchgeführt werden konnte (s. 3.2.6), soll nun diese Verknüpfungsstrategie auch für die Synthese von Glycopeptid-Pam₃Cys-Konjugaten angewendet werden. Ein großer Vorteil hierbei ist, dass mit den in Kap. 3.2.6 dargestellten, funktionalisierten Glycopeptiden schon die entsprechenden Edukte zur Verfügung stehen. Es wird nun noch ein Mitogenbaustein mit einer Olefinfunktion zur Anbindung benötigt. Auch hierbei soll ein Oligoethylglycospacer eine gegenseitige konformationelle Beeinflussung von Glycopeptid und Pam₃Cys verhindern.

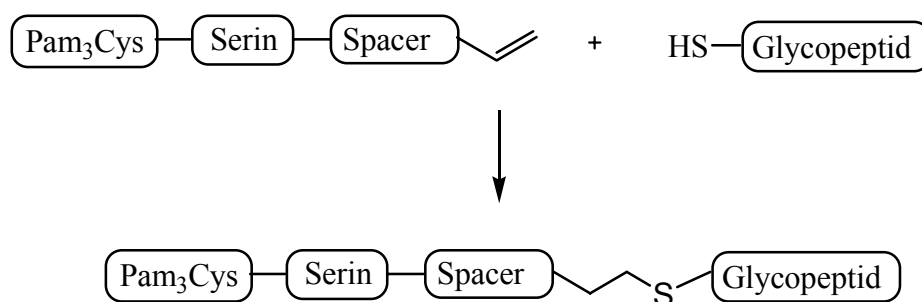


Abb. 3.108: Schematische Synthese von Glycopeptid-Mitogen-Konjugaten durch Thiol-Olefin-Addition

Ein entsprechender Spacer ist ausgehend von 2-(2-Aminoethoxy)ethanol zugänglich. Zunächst wird durch Reaktion mit Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc_2O) die Aminfunktion blockiert.

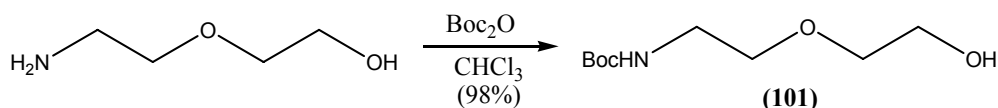


Abb. 3.110: Synthese des Spacers (101)

Das monogeschützte Derivat (101) wird in fast quantitativer Ausbeute erhalten. Die Anbindung des thiofunktionalisierten Antigens soll über eine Maleinimidgruppe stattfinden. Diese zeigt eine hohe Reaktivität gegenüber Thiolen als Nucleophilen^{248,249}.

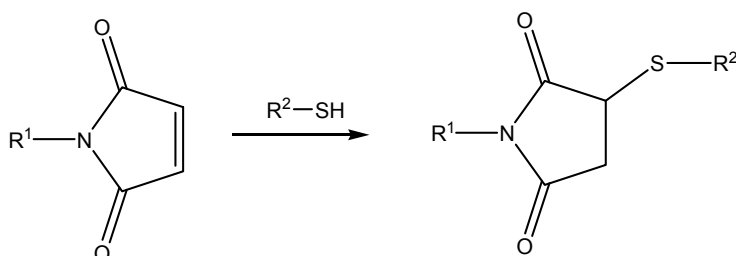


Abb. 3.109: Schema Addition von Thiolen an Maleinimid

Hierbei handelt es sich nicht um eine radikalische Addition, sondern um eine heteroanaloge Michael-Addition. Zwar kann hierbei auch eine unerwünschte Reaktion mit Aminen oder Alkoholen eintreten, jedoch ist die Addition von Thiolen aufgrund deren höherer Nucleophilie etwa um den Faktor 10^4 schneller. Die Addition von Thiolen wird zwar oft im leicht basischen oder leicht sauren Medium durchgeführt, jedoch läuft sie auch unter neutralen Bedingungen ausreichend schnell ab. Diese Additionsreaktion stellt somit eine ausgezeichnete, hoch chemoselektive Verknüpfungsreaktion dar, weshalb sie häufig für die Synthese von Konjugaten eingesetzt wird (s. auch S. 40).

Die Maleinimidgruppe wird durch eine modifizierte Mitsunobu-Reaktion in das Spacermolekül eingeführt. Durch Reaktion mit Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) und Triphenylphosphin wird die Hydroxylgruppe von (101) in eine gute Abgangsgruppe umgewandelt. Anschließende nucleophile Substitution mit Maleinimid liefert das Spacermolekül (102).

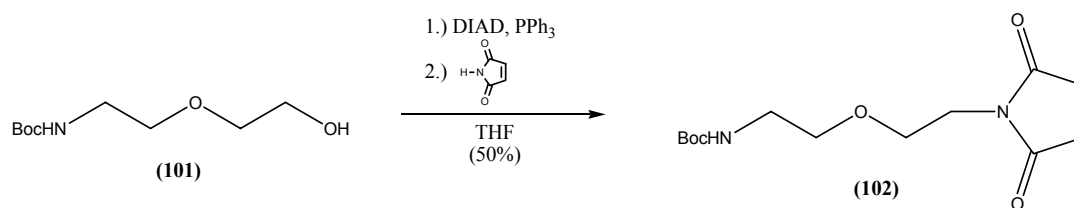


Abb. 3.111: Synthese des alkylierten Maleinimids (102)

Da das Pam₃Cys im Mitogenbaustein wieder benachbart zu Serin vorliegen soll, wird nun durch EDC-vermittelte Kupplung von Pam₃Cys-OH (88) und *O*-*tert*-Butyl-Serin-*tert*-butylester (H-Ser(*O*tBu)-*O*tBu) zunächst ein entsprechendes Dipeptid hergestellt.

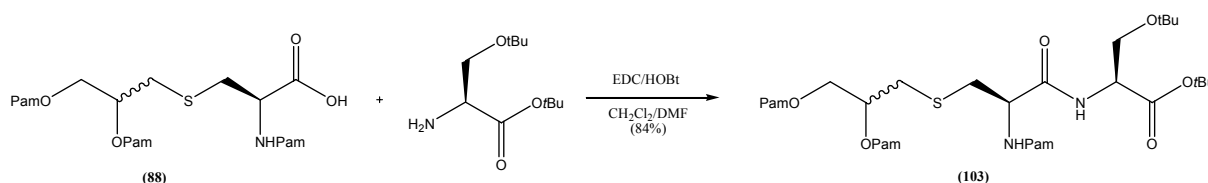


Abb. 3.112: Synthese Pam₃Cys-Ser(*t*Bu)-*O*tBu

Durch anschließende Deblockierung mit Trifluoressigsäure wird das C-terminal freie Dipeptid (104) erhalten.

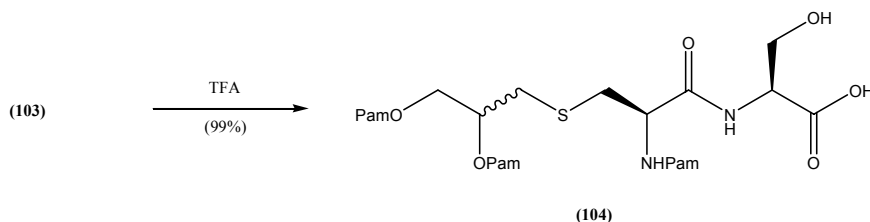


Abb. 3.113: Deblockierung von (103)

Die Boc-Schutzgruppe des Spacermoleküls (102) wird mit verdünnter Trifluoressigsäure ebenfalls abgespalten und das freie Amin ohne Reinigung mit dem Dipeptid (104) gekuppelt.

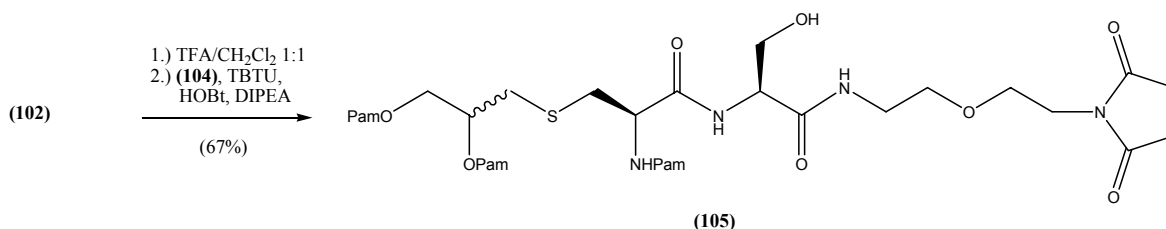


Abb. 3.114: Synthese des Maleinimid-Mitogenbausteins (105)

Durch die Verwendung der Reagenzienkombination TBTU/HOBt/DIPEA findet ausschließlich die Amidbildung statt, die freie Hydroxylfunktion des Serins reagiert nicht. Der Mitogenbaustein (105) kann nach flashchromatographischer Reinigung in hoher Ausbeute isoliert werden.

Ein großer Nachteil des Maleinimids ist seine hohe Immunogenität, wodurch die gewünschte Immunantwort gegen das Antigen vollständig unterdrückt werden kann. Aus diesem Grund soll noch ein alternativer Mitogenbaustein synthetisiert werden, der über eine einfache Olefinfunktion für eine radikalische Thioladdition verfügt. Ausgehend vom monogeschützten Spacermolekül (**101**) wird durch Veretherung mit Allylbromid ein entsprechendes Olefin in mäßiger Ausbeute erhalten.

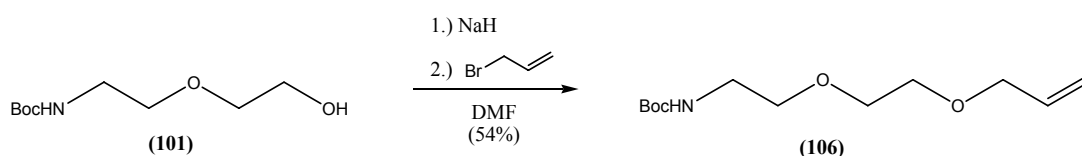


Abb. 3.115: Synthese des Olefinspacers (**106**)

Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoessigsäure erfolgt analog zur vorherigen Synthese von (**105**) die Kupplung mit dem Dipeptid (**104**).

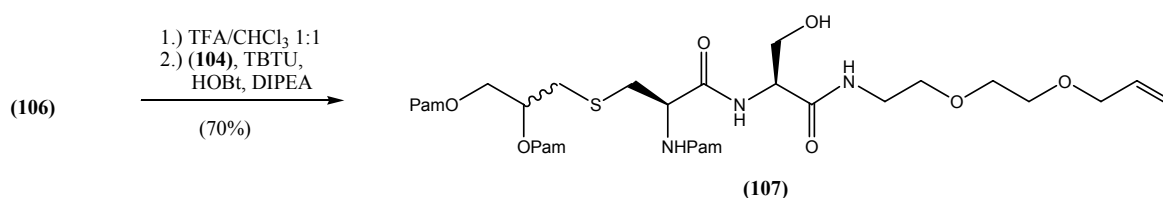


Abb. 3.116: Synthese des Mitogenbausteins (**107**)

Der Mitogenbaustein (**107**) wird nach flashchromatographischer Reinigung in hoher Ausbeute erhalten.

Es soll nun zunächst in Testreaktionen die Eignung der dargestellten Mitogen-Bausteine zur Synthese der gewünschten Konjugate erprobt werden. Dafür dient der mit dem T_N-Antigen glycosylierte Threonin-Baustein erneut als Modellverbindung. Zunächst ist eine Funktionalisierung dieses Aminosäurebausteins mit einer Thiofunktion nötig. Es soll hierzu auch der Pyridylsulfenyl-geschützte Linker (**44**) zum Einsatz kommen.

Durch Kupplung des *N*-deblockierten T_N-Derivats (**96**) mit dem Linker wird ein entsprechend funktionalisiertes Produkt in hoher Ausbeute erhalten.

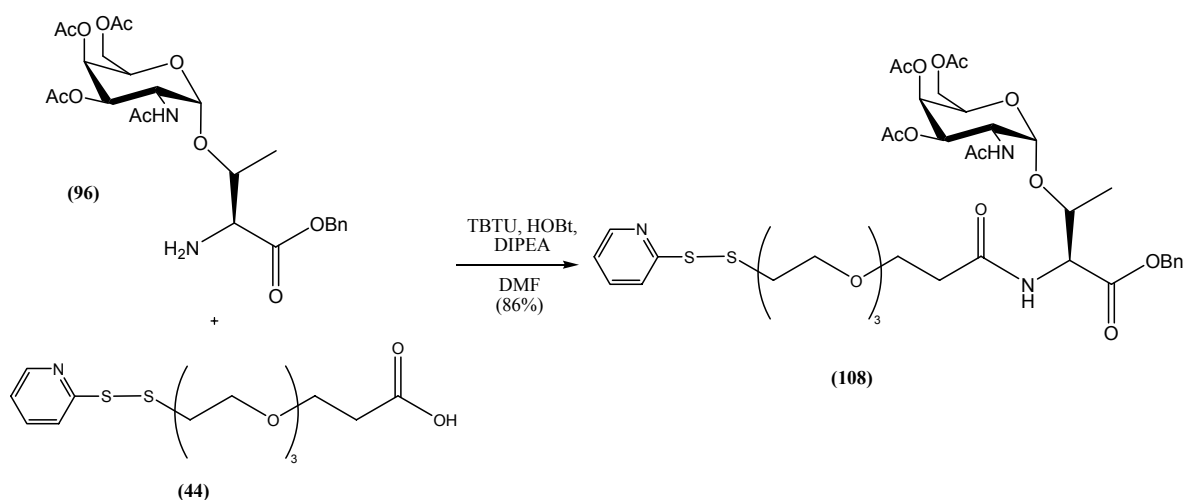


Abb. 3.117: Kupplung des Pyridyl-Linkers mit der glycosylierten Aminosäure

Die Anbindung des Linkers an die Aminfunktion der glycosylierten Aminosäure kann ohne Reinigung und Isolierung des freien Amins durchgeführt werden, wie im Folgenden anhand der Kupplung des Acetyl-geschützten Linkers (42) gezeigt wird: Durch Behandlung mit verdünntem Morpholin wird die Fmoc-Schutzgruppe des glycosylierten Aminosäurebausteins (18) abgespalten. Nach Abdestillieren des Morpholins wird ohne weitere Reinigung mittels TBTU/HOBT/DIPEA der Linker (42) an die freie Aminfunktion gekuppelt.

Der funktionalisierte Glycosylaminosäurebaustein (109) wird in 73% Ausbeute isoliert.

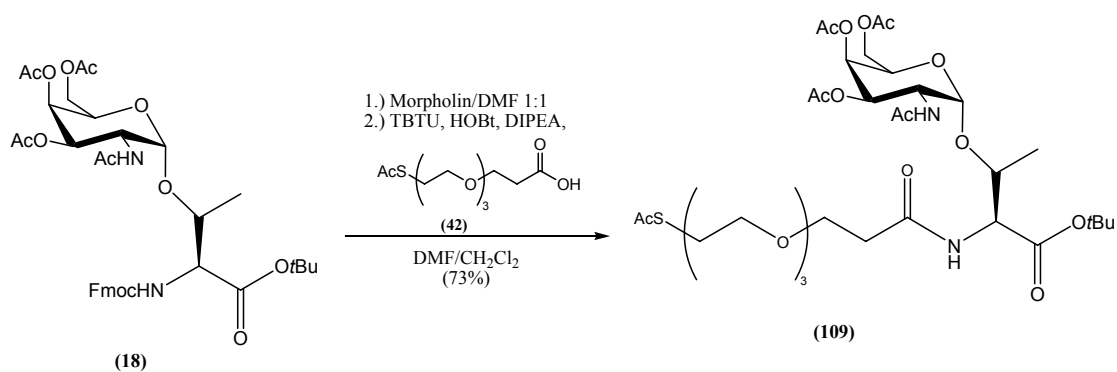


Abb. 3.118: Kupplung des Acetyl-Linkers mit der glycosylierten Aminosäure

Die beiden Konjugate (108) und (109) sollen nun zunächst vollständig deblockiert werden, bevor sie zur Reaktion mit einem der beiden Mitogenbausteine (105) oder (107) eingesetzt werden. Bei der hydrogenolytischen Spaltung des Benzylesters von (108) zeigt sich allerdings durch die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle, dass die Pyridylsulfenylschutzgruppe unter diesen Bedingungen nicht stabil ist.

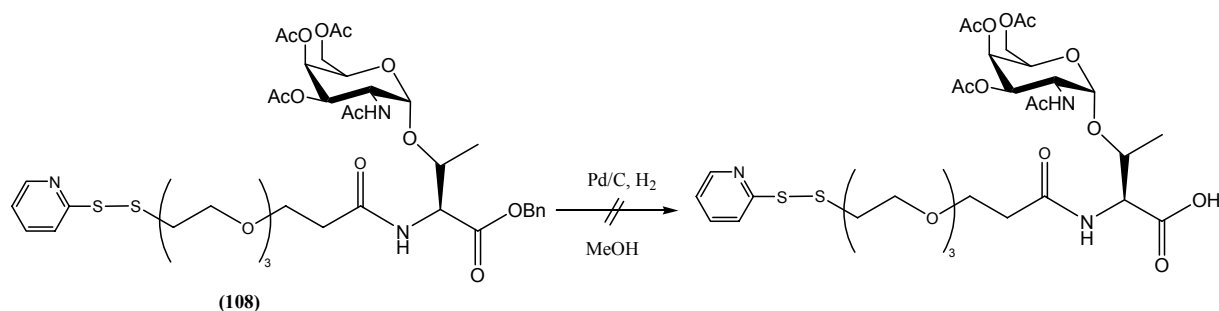


Abb. 3.119: Versuchte Deblockierung von (108)

In der massenspektrometrischen Analyse wird sichtbar, dass die Pyridylsulfenylgruppe teilweise bereits vor dem Benzylester abgespalten wird. Durch die freiwerdende Thiofunktion wird der Palladiumkatalysator vergiftet, wodurch die Reaktion sehr schnell zum Erliegen kommt.

Dieser Befund spricht gegen eine Verwendung des Linkers (44) für die geplanten Konjugationsreaktionen. Da die sialylierten Glycosylaminosäurebausteine (25) und (35) beide Benzylschutzgruppen enthalten, wäre eine hydrogenolytische Debenzylierung bei entsprechenden, diese Bausteine enthaltenden Glycopeptiden in beiden Fällen nötig. Im Folgenden wird daher nur der Acetyl-geschützte Linker (42) verwendet, da dieser unter hydrogenolytischen Bedingungen stabil ist (s. 3.2.6).

Eine Deblockierung der Carboxylgruppe von (109) gelingt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure.

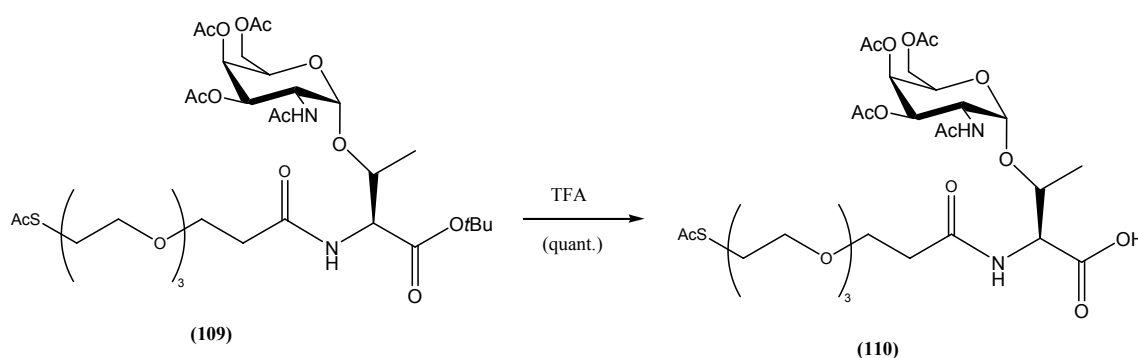


Abb. 3.120: Spaltung des *tert*-Butylesters von (109)

Das Produkt (110) wird nach flashchromatographischer Reinigung in quantitativer Ausbeute erhalten. Eine Deblockierung der saccharidischen Hydroxylgruppen von (110) unter gleichzeitiger Freisetzung der Thiofunktion ist durch Zemplén-Umesterung in entgastem Methanol möglich. Das vollständig deblockierte Rohprodukt wird anschließend direkt mit dem Maleinimid-funktionalisierten Mitogenbaustein (105) umgesetzt.

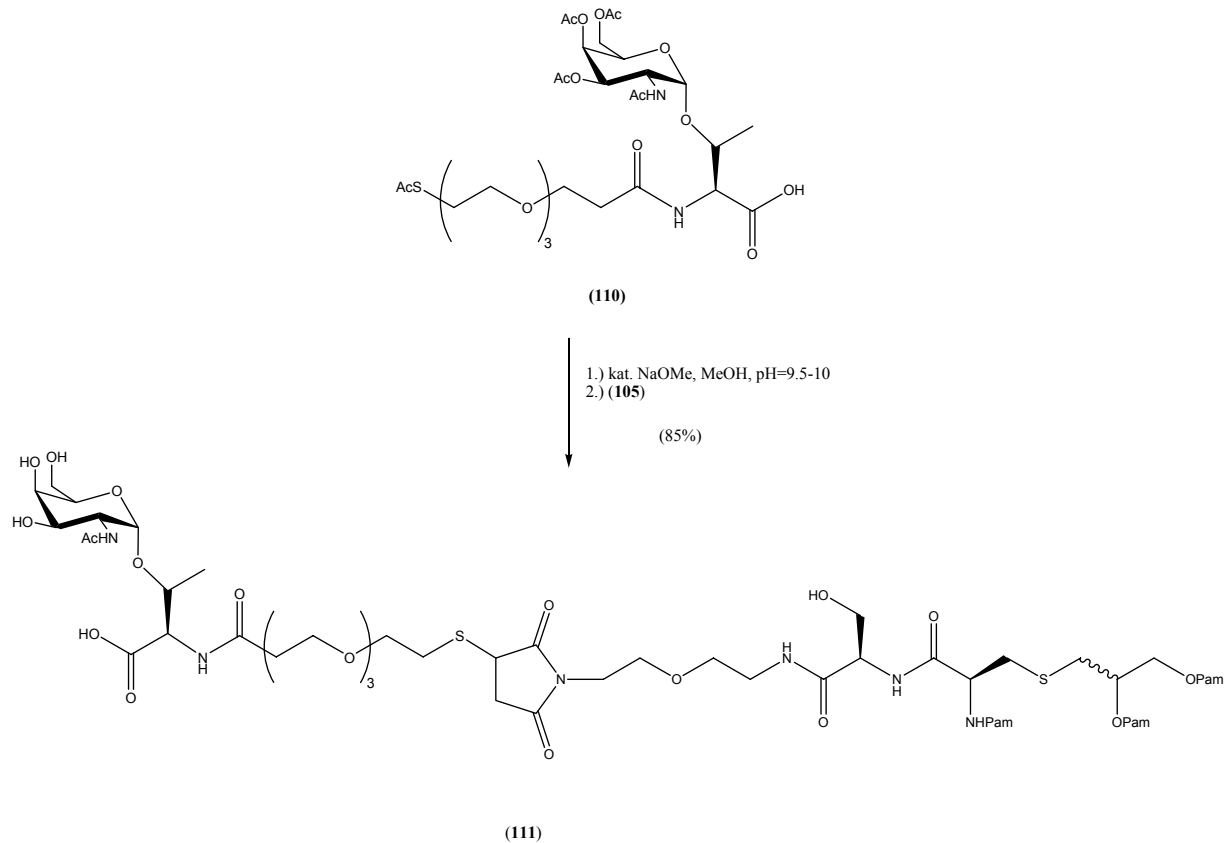


Abb. 3.121: Deblockieren von (109) und Konjugation mit (105)

Die Konjugation gelingt durch einfaches Rühren der beiden Edukte in einem Chloroform/Methanol-Gemisch binnen 24 Stunden. Das Produkt (111) wird nach flashchromatographischer Reinigung in hoher Ausbeute erhalten.

Nachdem also die prinzipielle Eignung des Maleinimid-funktionalisierten Mitogenbausteins (105) für Konjugationen feststeht, sollen nun auch Mitogen-Konjugate eines Glycopeptids dargestellt werden. Hierfür wird das bereits dargestellte, thiofunktionalisierte Glycopeptid (50) eingesetzt. Die Konjugation erfolgt durch 40-stündiges Rühren der beiden Edukte in einem entgastem Chloroform/Methanol-Gemisch.

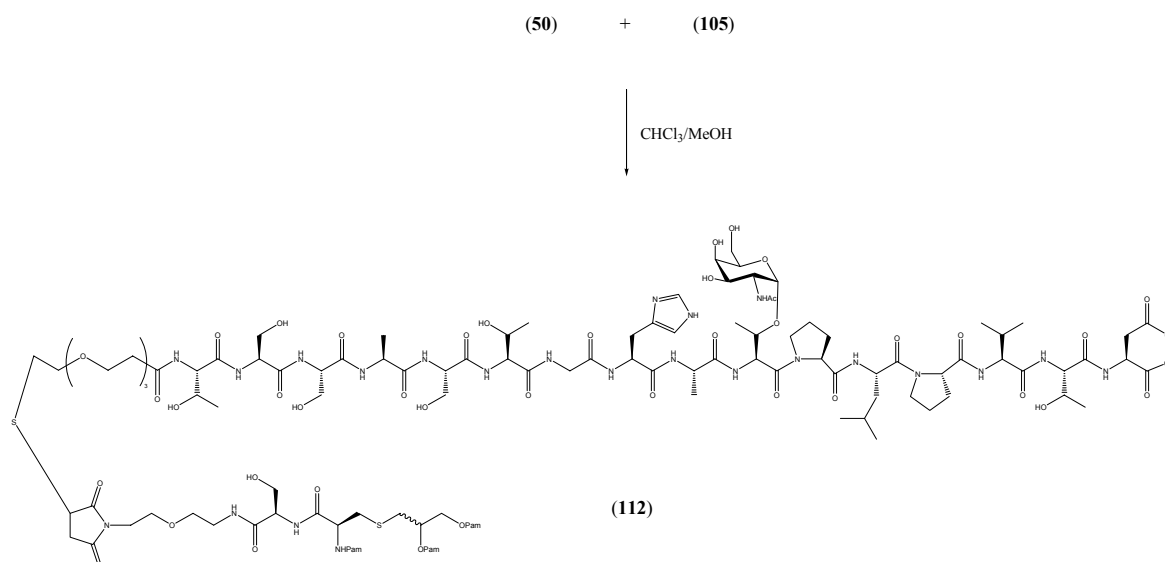


Abb. 3.122: Konjugation des Glycopeptids (50) mit (105)

Reste des Glycopeptids lassen sich durch Waschen des Rohproduktes mit Wasser größtenteils entfernen. Eine vollständige Reinigung ist so jedoch nicht möglich, auch eine Abtrennung von Spuren an nicht umgesetztem Mitogenbaustein (105) lassen sich nicht entfernen. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften des Produkts (112) ist eine Reinigung weder durch Flashchromatographie noch durch HPLC möglich. Eine Abtrennung der störenden Verunreinigungen vom Konjugat (112) wäre wahrscheinlich durch Größenausschlusschromatographie mit einem Chloroform/Methanol-Gemisch möglich. Aufgrund der geringen Substanzmenge des Rohproduktes wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch darauf verzichtet. Die Identität von (105) kann durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie gesichert werden. Im Weiteren soll nun auch die Konjugation des Glycopeptids (50) mit dem olefinischen Mitogenbaustein (107) durch radikalische Addition erprobt werden. Hierzu werden die beiden Edukte in einem Chloroform/Methanol-Gemisch gelöst und unter Rühren mit UV-Licht bestrahlt.

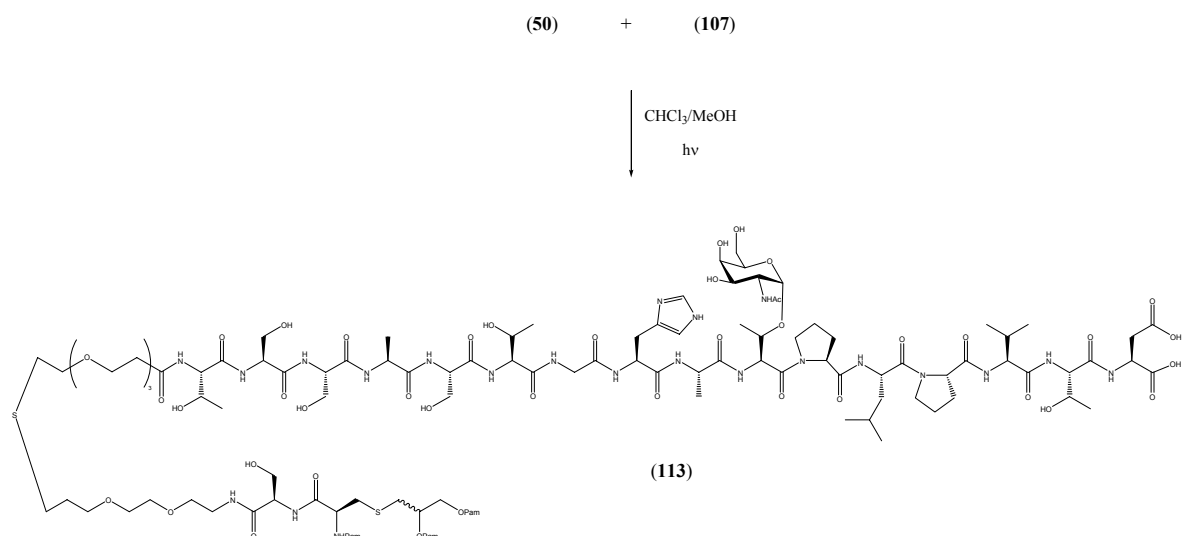


Abb. 3.123: Konjugation des Glycopeptids (50) mit (105)

Die Bildung des gewünschten Konjugats (113) lässt sich erneut durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie belegen. Eine vollständige Abtrennung von nicht umgesetztem Glycopeptid (50) bzw. des Mitogenbausteins (107) ist allerdings wieder nicht möglich, da aufgrund der geringen Menge an Rohprodukt auf eine Reinigung durch Größenausschlusschromatographie verzichtet werden musste.

4 Zusammenfassung

Die Verwendung von Tumorimpfstoffen im Rahmen einer Krebsimmuntherapie stellt eine wünschenswerte Alternative bzw. Ergänzung zu den etablierten Behandlungsmethoden von Krebserkrankungen dar. Auf malignen Zellen kommt es durch fehlerhafte Expression verschiedener Glycosyltransferasen zur Expressierung von Mucin-Glycoproteinen mit verkürzten, hochgradig sialylierten Glycanseitenketten. Diese Saccharidepitope stellen nicht nur selbst tumorassoziierte Antigene dar, sondern bewirken auch eine Freilegung von normalerweise maskierten Peptidepitopen des Proteinrückgrats. Glycopeptide, welche sowohl tumorassoziierte Peptid- als auch Saccharidstrukturen beinhalten und somit Partialstrukturen solcher krebsassoziiierter Oberflächenglycoproteine darstellen, sind daher von großem Interesse für die Entwicklung von Antitumorvakzinen.

Um eine starke Immunantwort gegen diese tumorassoziierten Strukturen zu erzeugen, ist es jedoch nötig, die Immunogenität der nur schwach immunogenen Glycopeptide durch Konjugation zu erhöhen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten teil- und vollsynthetische Konjugate, bestehend aus tumorassoziierten Glycopeptiden und immunogenen Trägern zur möglichen Verwendung als Antitumorvakzine synthetisiert werden.

In einer linearen, biomimetischen Synthese wurden dazu zunächst die tumorassoziierten Saccharidantigene T_N , (2→6)-Sialyl- T_N und (2→3)-Sialyl-T in Form von glycosylierten Aminosäurebausteinen, welche zur Synthese von Glycopeptiden nach der etablierten Fmoc-Strategie verwendet werden können, hergestellt.

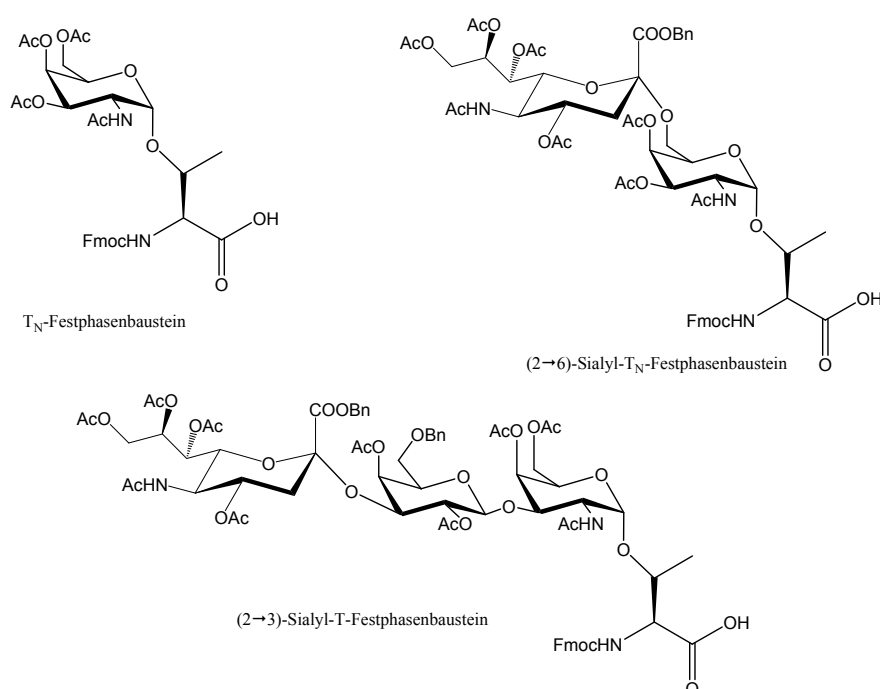


Abb. 4.1: Glycosylierte Festphasenbausteine

Zur Konjugation von Glycopeptiden mit immunogenen Trägerproteinen ist ein hoch selektives Kupplungsverfahren nötig, um zu definierten Konjugaten zu gelangen. Es wurde eine neue Methode eingeführt, bei der die Konjugation durch eine radikalische Additionsreaktion von Thiol-funktionalisierten Glycopeptiden an mit einem olefinischen Linker modifizierten Rinderserumalbumin erfolgt. Die hierzu benötigten Linkermoleküle wurden aus einem gemeinsamen Vorläufer erhalten.

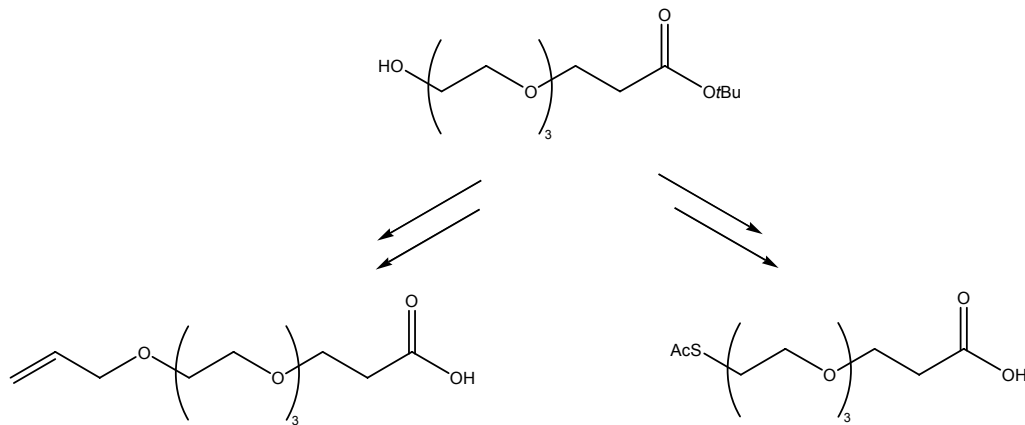


Abb. 4.2: Linker für die Thiol-Olefin-Konjugation

Durch Verwendung des geschützten Thiollinkers und der glycosylierten Aminosäurebausteine in der Festphasenpeptidsynthese wurde eine Reihe von funktionalisierten Glycopeptiden basierend auf den *tandem repeat* Sequenzen der Mucine MUC1 und MUC4 dargestellt.

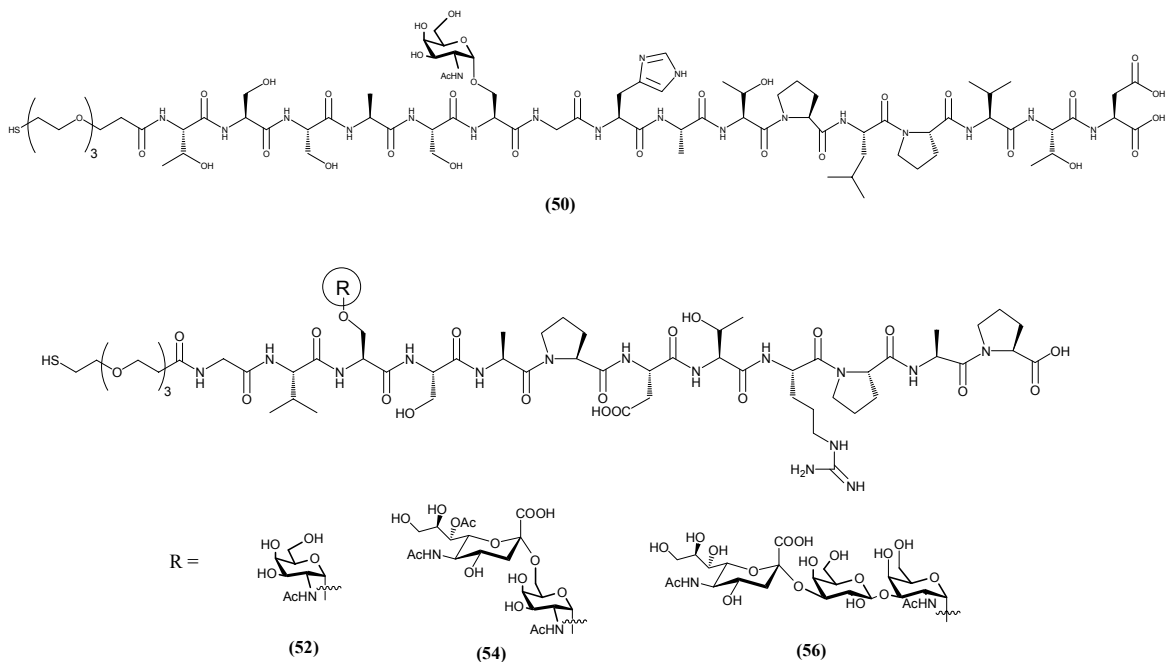


Abb. 4.3: Synthetisierte, Thiol-funktionalisierte Glycopeptide

Das Trägerprotein Rinderserumalbumin (BSA) wurde mit dem Olefin-Linker modifiziert. Anschließend wurden die Glycopeptide unter UV-Bestrahlung mit dem BSA konjugiert.

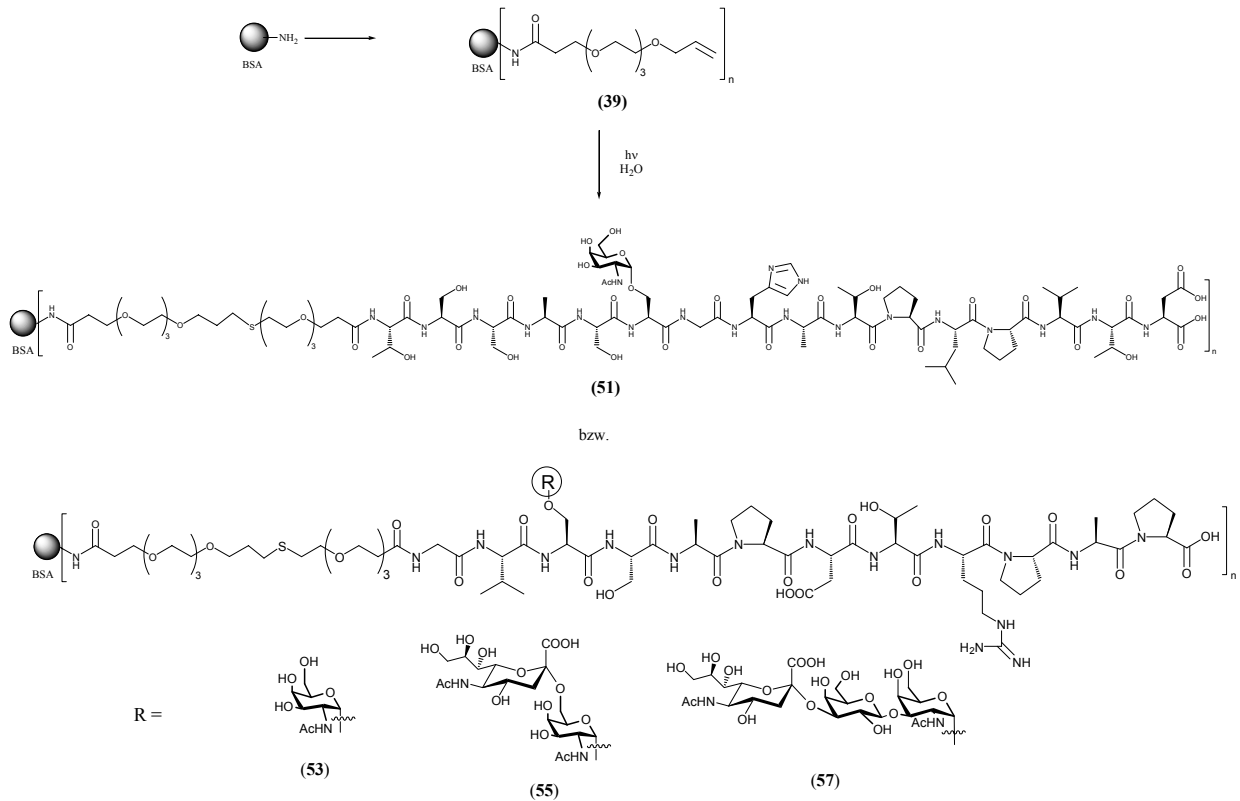


Abb. 4.4: Darstellung der BSA-Konjugate

Durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnte bei einigen Konjugaten die Beladungsdichte der Konjugate direkt ermittelt werden. Dies war jedoch nicht in allen Fällen möglich, eventuell verursacht durch eine während der Reaktion oder der Reinigung auftretende Denaturierung des Proteins.

Als Alternative zu den Proteinkonjugaten können oft auch dendrimere Peptide, sogenannte *multiple antigenic peptides* (MAPs), für Immunisierungen verwendet werden. Zur Synthese solcher MAPs wurde zunächst ausgehend von Lysin ein festphasengebundenes, tetrameres Lysin-Core dargestellt.

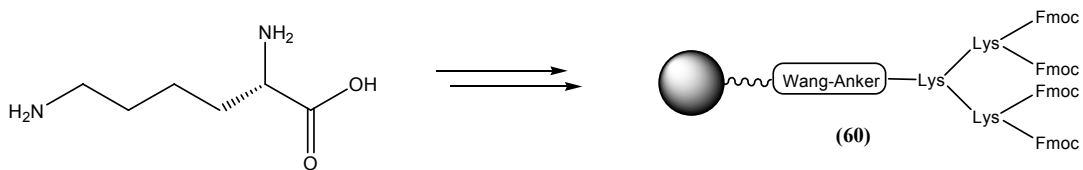


Abb. 4.5: Synthese des tetrameren MAP-Cores

Das tetramere MAP-Core wurde anschließend zur Synthese von (Glyco-)Peptiden durch Fmoc-Festphasensynthese verwendet.

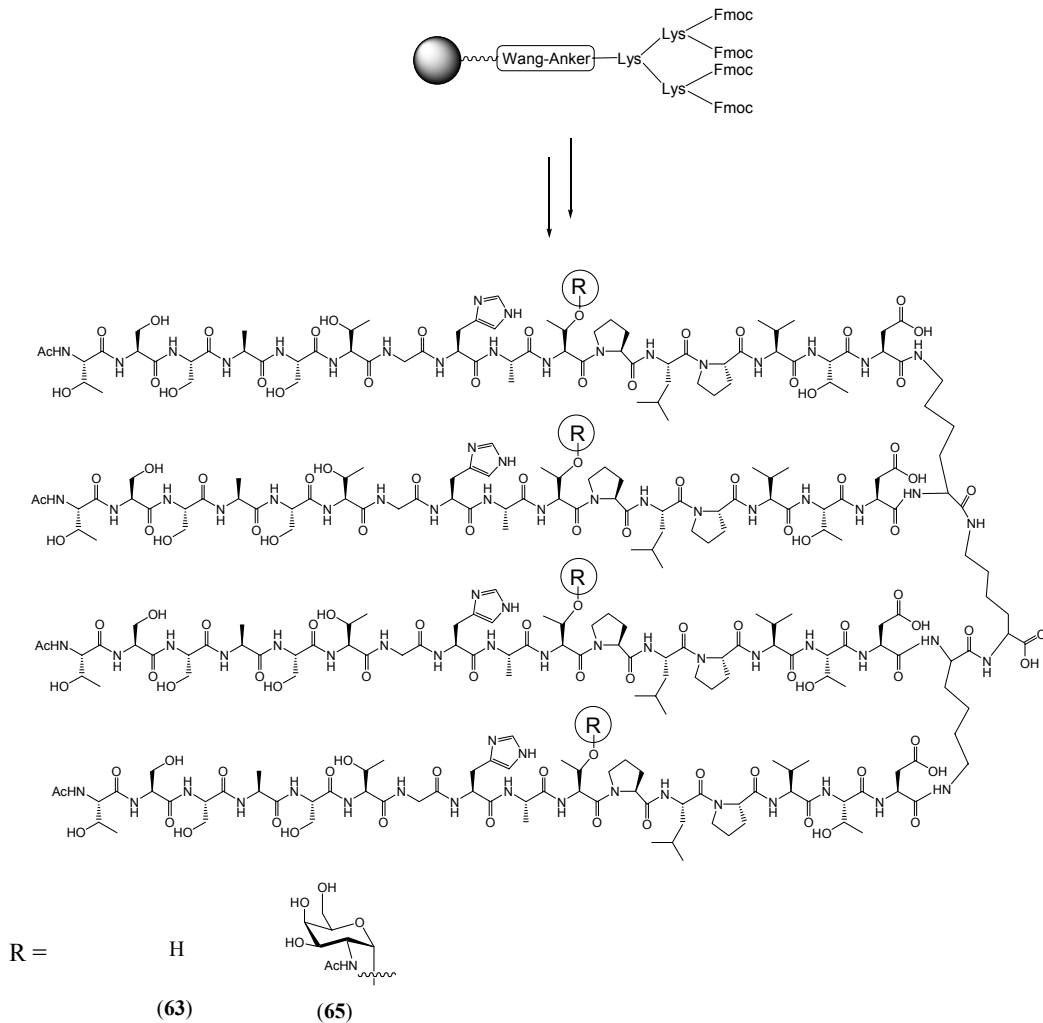


Abb. 4.6: Synthese der MAPs

Die Produkte wurden in hoher Reinheit erhalten und durch NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Synthese immunogener Konjugate besteht in der Anbindung des Glycopeptids an ein universelles T_H-Zell-Epitop. Auf diese Weise gelangt man zu relativ niedermolekularen, vollsynthetischen Konjugaten, die darüber hinaus durch die üblichen Analysetechniken der organischen Chemie (NMR, MS, HPLC) charakterisierbar sind. Es sollten daher Konjugate bestehend aus einem tumorassoziierten Glycopeptid und einem T-Zell-Epitop des Tetanus-Toxins dargestellt werden. Der übliche Zugang zu solch langkettigen Peptiden ist die Fragmentkondensation an der festen Phase. Statt dieser präparativ sehr aufwendigen Methode wurde in dieser Arbeit die schrittweise Synthese der

Konjugate an einem mit Fmoc und ivDde orthogonal geschützten, festphasengebundenen Lysin durchgeführt.

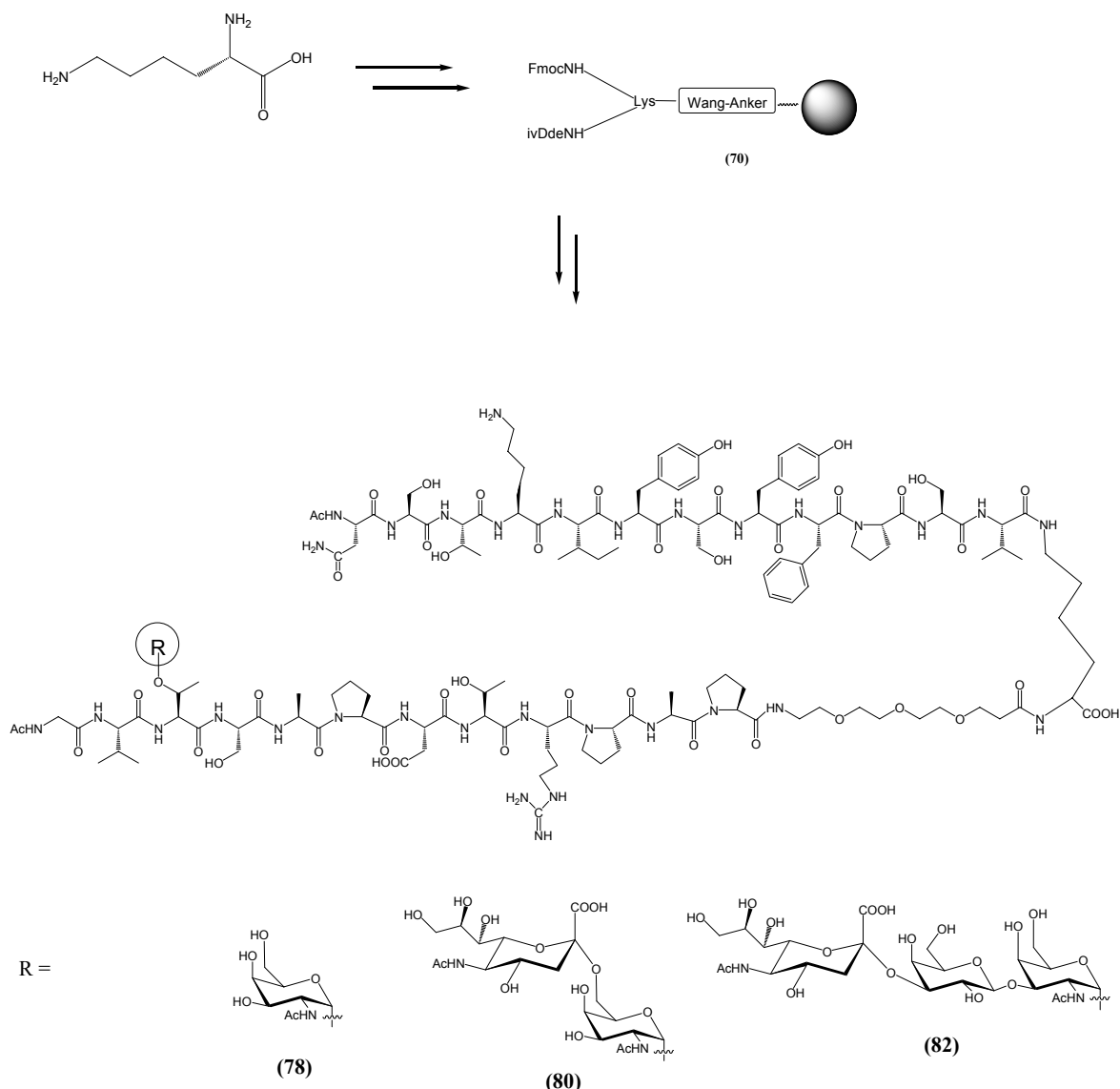
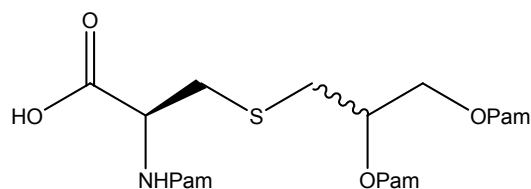


Abb. 4.7: Synthese der Glycopeptid-Konjugate am orthogonal geschützten Lysin

Die dargestellten Konjugate wurden durch präparative HPLC gereinigt und mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert. Das angewendete Verfahren sollte auch zur Synthese von anderweitig modifizierten Glycopeptiden einsetzbar sein.

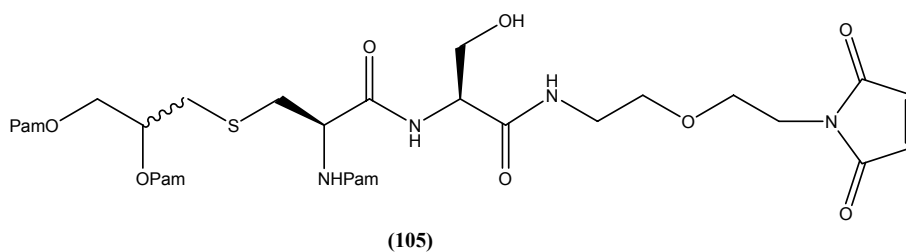
Abschließend wurde die Konjugation von Glycopeptiden mit Mitogenen, welche eine polyklonale Aktivierung von B-Zellen auszulösen vermögen, untersucht. Als Mitogen wurde das Peptidderivat *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3-bispalmitoyloxy-(2 *R,S*)-propyl)-(R)-cystein (*Pam*₃*Cys*) verwendet, welches in einer sechsstufigen Synthese ausgehend von L-Cystin dargestellt wurde.

Abb. 4.8: Pam₃Cys

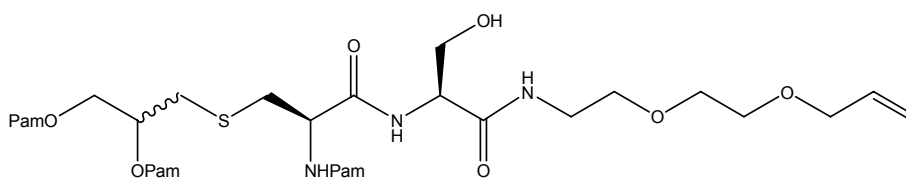
Über einen Spacer sollten tumorassoziierte Glycopeptide kovalent an die Carboxylgruppe des Pam₃Cys gebunden werden, um zu vollsynthetischen Konjugaten zu gelangen.

In Vorversuchen stellte sich heraus, dass die beiden Palmitinsäureester des Mitogens gegenüber den basischen Deblockierungsbedingungen der saccharidischen Hydroxylschutzgruppen (Natriummethanolat in Methanol) nicht beständig waren. Mehrere alternative Deblockierungsversuche führten nicht zum Erfolg.

Daher mussten die Glycopeptide vor der Anbindung an Pam₃Cys vollständig deblockiert werden. Die anschließende selektive Kupplungsreaktion sollte durch Addition eines Thiole-funktionalisierten Glycopeptids an das Olefin-funktionalisierte Mitogen erfolgen. Zu diesem Zweck wurden die beiden Mitogen-Bausteine (105) und (107) synthetisiert, an die Thiole durch Hetero-Michael-Addition bzw. radikalisch addiert werden können.



(105)



(107)

Abb. 4.9: Olefin-modifizierte Mitogen-Bausteine

Die Addition eines MUC4-Glycopeptids an die beiden Mitogenbausteine konnte erfolgreich durchgeführt werden, allerdings war eine Reinigung der beiden Konjugate **(112)** und **(113)** aufgrund der geringen Substanzmengen nicht möglich.

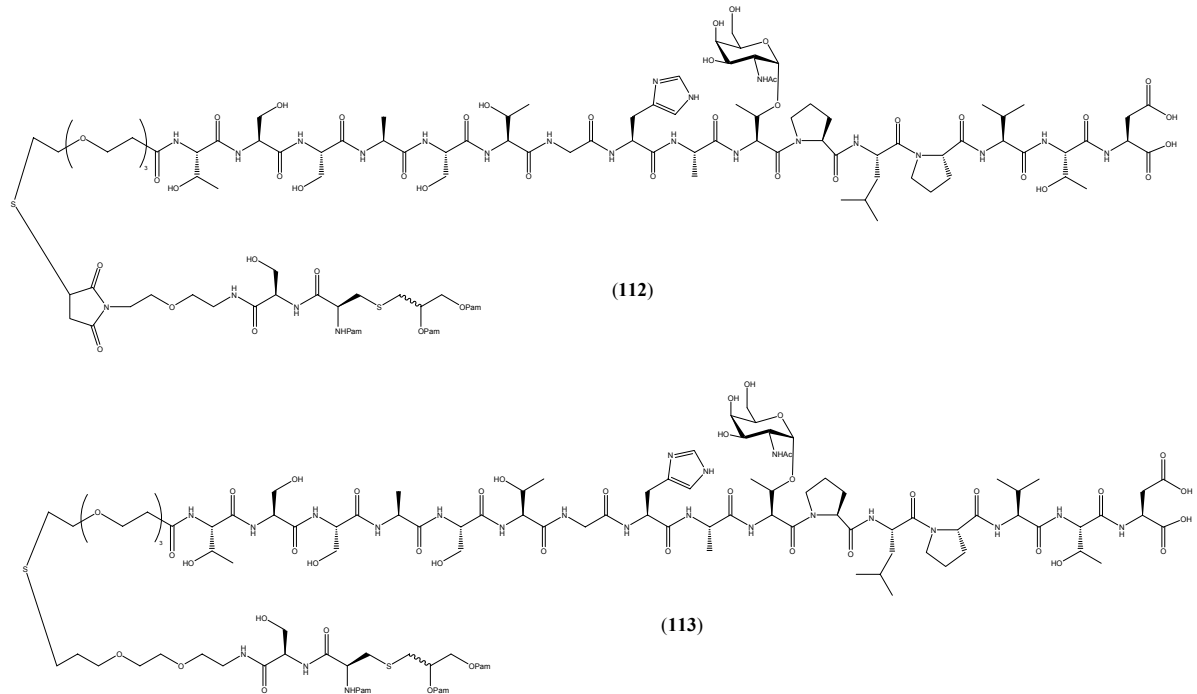


Abb. 4.10: Mitogen-Konjugate

Es konnten in dieser Arbeit verschiedene Verfahren zur Synthese von immunologisch interessanten Glycopeptidkonjugaten erarbeitet werden. Genauere Untersuchungen zu den Möglichkeiten und Optimierungen dieser Verfahren sind teilweise noch nötig.

Die immunologische Evaluierung der dargestellten Konjugate als mögliche Antitumorvakzine ist geplant.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Meßgeräte

Alle Reaktionen wurden, falls keine anderen Bedingungen angegeben sind, bei Raumtemperatur unter Argon durchgeführt. Alle Destillationen, die mit „i. Vak.“ bezeichnet sind, wurden bei 35 °C durchgeführt.

Lösungsmittel wurden nach Standardverfahren getrocknet und vor Gebrauch destilliert. Bei der Darstellung oder Umsetzung von Thiolen verwendete Lösungsmittel wurden durch ca. einstündiges Stehen im Ultraschallbad unter gleichzeitigem Durchleiten von Argon von Sauerstoff befreit.

Molekulare Massen in runden Klammern beziehen sich auf die natürliche Isotopenverteilung, Molmassen in eckigen Klammern hingegen auf die exakten Massen der Isotope ^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O und ^{32}S .

Zur Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumfertigplatten der Firma *Merck*, Darmstadt, verwendet. Die Detektion erfolgte entweder mittels UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254 \text{ nm}$ oder durch eines der folgenden Tauchreagenzien:

- „Seebach-Reagenz“ (1.0 g Cer(IV)-sulfat-tetrahydrat und 2.5 g Molybdätophosphorsäure in 94 ml Wasser und 6 ml konz. Schwefelsäure)
- Kaliumpermanganat-Lösung (0.5 % KMnO_4 in Wasser)
- Ninhydrin-Reagenz (1.5 g Ninhydrin in 15 ml Essigsäure und 500 ml Methanol)
- „Zucker-Reagenz“ (1:1-Mischung aus 0.2%-iger ethanolischer *m*-Methoxyphenol-Lösung und 2N ethanolischer Schwefelsäure).

Die Entwicklung erfolgte jeweils durch Wärmeeinwirkung.

Säulenchromatographische Reinigungen wurden nach dem Verfahren der Flash-Chromatographie an Kieselgel 60 (0.032-0.063 mm) der Firma *MP Biomedicals*, Eschwege, durchgeführt. Als Laufmittel wurden, falls nicht anders angegeben, Petrolether/Ethylacetat- oder Cyclohexan/Ethylacetat-Gemische benutzt, die durch Redestillation der Eluate früherer Chromatographien gewonnen wurden. Durch Zusatz der polaren oder unpolaren Komponente

wurde das Laufmittelgemisch so eingestellt, daß sich für die zu isolierende Substanz ein R_f -Wert von 0.1-0.3 ergab.

Analytische HPLC wurde mit einer MaxiStar K1000-Gradienten-Pumpe der Firma *Knauer*, Berlin, einem *Knauer* Vierkanal-Entgaser, einer analytischen Mischkammer sowie einem *Knauer* Diodenarraydetektor DAD2800 durchgeführt. Als Säule wurde eine *Phenomenex* Luna (5 μ C18, 250 \times 4.6 mm) benutzt. Es wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min gearbeitet. Semipräparative und präparative HPLC wurden mit Hilfe von zwei *Knauer* MiniStar K500-Gradientenpumpen und einem variablen Wellenlängendetektor, ebenfalls von der Firma *Knauer*, durchgeführt. Als Säule für die semipräparative HPLC wurde eine *Phenomenex* Luna (10 μ C18, 250 \times 21.2 mm) bei einer Flussrate von 10 ml/min benutzt. Präparative HPLC wurde mittels einer *Phenomenex* Luna (10 μ C18, 260 \times 50.0 mm) bei einer Flußrate von 20 ml/min durchgeführt.

Als Eluens für analytische und präparative HPLC dienten Gemische aus Wasser mit 0.1 % TFA (A) / Acetonitril mit 0.1 % TFA (B) / Methanol mit 0.1% TFA (C). Die Gradienten sowie die Wellenlänge, bei der die Detektion erfolgte, sind bei den entsprechenden Verbindungen angegeben. Acetonitril und Methanol (beide HPLC-grade) wurden bei der Fa. *Fisher-Scientific*, Schwerte, erworben. Das HPLC-Wasser wurde einer Simplicity185-Anlage der Firma *Millipore*, Billerica (USA) entnommen.

Gelpermeationschromatographie (GPC) wurde an Sephadex G-25 oder Sephadex LH-20 der Firma *Pharmacia*, Uppsala, durchgeführt. Als Elutionsmittel diente eine 1:1-Mischung aus Methanol (HPLC-grade) und Millipore-Wasser.

Die NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten gemessen:

- *Bruker* WT-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, HMQC, HSQC und 100.6 MHz- ^{13}C -NMR

Die angegebenen Werte für die chemische Verschiebung δ beziehen sich auf das Signal des jeweiligen Lösungsmittels als Standard.

Die Kennzeichnung der ^1H - und ^{13}C -Signale in der Interpretation der NMR-Spektren erfolgt nach folgendem Schema:

N-Acetyl-D-galactosamin: ohne Apostroph

(1→3)-β-Galactose: ein Apostroph (')
N-Acetyl-D-neuraminsäure: zwei Apostrophe ('')

FD-Massenspektren wurden mit einem *Finnigan* MAT-95 der Firma *ThermoElectron*, Boston gemessen.

ESI-Massenspektren wurden mit einem *Micromass* LCT-Spektrometer der Firma *Micromass*, Eschborn, gemessen.

Die Messung von hochaufgelösten ESI-TOF-Spektren erfolgte auf einem *Micromass* Q-TOF Ultima Spektrometer.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem *Micromass* Tofspec E bzw. einem *Bruker* Time-of-flight REFLEX-Spektrometer gemessen. Als Matrices wurden 2,5-Dihydroxybenzoesäure oder Sinapinsäure (15 mg/ml in Wasser/Acetonitril 1:1 unter Zusatz von 0.1% TFA) verwendet.

Elementaranalysen wurden durch das Mikroanalytische Labor des Institutes für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem *Perkin-Elmer*-Polarimeter-241 bei $\lambda = 578$ nm und $\lambda = 546$ nm (Quecksilberdampfampe) gemessen und auf die Natrium-D-Linie (589.5 nm) extrapoliert. Die Konzentrationen in g/100 ml und die verwendeten Lösungsmittel sind bei den jeweiligen Verbindungen angegeben.

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

Die Peptidsynthese an fester Phase wurde mit einem ABI 433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems*, Weiterstadt, durchgeführt. Der Syntheseverlauf wurde mittels eines Series-200-UV/VIS-Detektors der Firma *PerkinElmer*, Wellesley (USA), verfolgt.

Die Aminosäurebausteine Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH, Fmoc-Asp(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH und Fmoc-Val-OH wurden von den Firmen *NovaBiochem*, Läuelfingen (Schweiz) und *Iris Biotech*, Marktredwitz bezogen.

Als Harze für die Festphasenpeptidsynthese wurden Tentagel S PHB-Asp(*t*Bu)-Fmoc (SA 1305), Tentagel S Trt-Pro-Fmoc (SA1222), Tentagel S PHB (S30013) und Tentagel R PHB (R28013) von der Firma *Rapp Polymere*, Tübingen eingesetzt.

N-Methylpyrrolidin-2-on und Dichlormethan (beide *Peptide Grade*) wurden von der Firma *SDS*, Peypin (Frankreich) und *N,N*-Dimethylformamid von der Firma *Roth*, Karlsruhe erworben. Die Kupplungsreagenzien HBTU, TBTU und HOBt stammen von *Novabiochem* und *Iris Biotech*, das Kupplungsreagenz HATU von der Firma *Fluka*, Buchs (Schweiz). HOAt wurde nach einer literaturbekannten Synthese²⁵⁰ selbst hergestellt.

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

Der Phosphatpuffer pH=7 nach Sørensen wurde durch Auffüllen von 61.2 ml einer Lösung von 11.876 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat in 1000 ml dest. Wasser mit einer Lösung von 9.078 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1000 ml dest. Wasser auf 1000 ml hergestellt²⁵¹.

Zur Dialyse wurden *Spectra/Por*[®] *FloatAlyzer* (schwimmfähige Dialysiermembranen aus regenerierter Cellulose, mittlere Ausschlussgrenze MWCO = 25.000 g/mol, Probenvolumen 10 ml) der Firma *Roth* verwendet. Es wurde gegen dest. Wasser dialysiert, das während der Dialyse vier- bis fünfmal gewechselt wurde.

Die Beladungsdichten der selbst beladenen Harze wurden durch photometrische Auswertung der Fmoc-Abspaltung ermittelt²⁵². Hierzu wurden 20 ± 0.1 mg des Harzes eingewogen, in 18.07 ± 0.01 g DMF / Piperidin (Massenverhältnis 1:1) suspendiert und 50 Minuten geschüttelt. Nach Absinken unlöslicher Bestandteile wurde 1.00 ± 0.02 g der Lösung entnommen und mit der DMF / Piperidin-Lösung auf 10 ml aufgefüllt (Meßkolben). Die Extinktion der Probe bei $\lambda = 278$ nm wurde mittels eines Perkin-Elmer Lambda-17 UV-Spektrometer gemessen. Die Konzentration an Fmoc in der Probe berechnete sich dann nach:

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

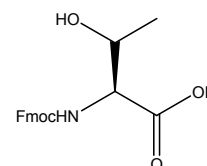
UV-Reaktionen wurden in einem Quarzreagenzglas unter Bestrahlung mit einer UV-Quarzlampe der Quarzlampen GmbH Hanau durchgeführt.

5.2 Synthese der glycosylierten AminosäureBausteine

5.2.1 Synthese des T_N-Antigen-Bausteins

N-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-threonin (1)¹²²

(Fmoc-Thr-OH)



In einer Mischung aus 170 ml Wasser und 170 ml 1,4-Dioxan werden 15.0 g (125.9 mmol) L-Threonin und 15.0 g (141.5 mmol) Natriumcarbonat gelöst. Unter Rühren wird langsam eine Suspension von 42.5 g (126.0 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) in 80 ml Dioxan zugegeben. Die Suspension wird 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit konz. HCl auf einen pH-Wert von 2 angesäuert und das Dioxan i. Vak. abdestilliert. Das Produkt wird viermal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird zweimal mit je 100 ml 1M HCl gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird zweimal mit Toluol kodestilliert und i. Hochvak. getrocknet. Das Rohprodukt ist ausreichend rein für die weitere Umsetzung.

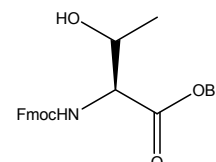
Ausb.: 42.4 g (99%); farbloser, kristalliner Feststoff.

C₁₉H₁₉NO₅ (M = 341.36 g/mol) [341.13].

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.72 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, J_{H₄,H₃} = J_{H₅,H₆} = 7.4 Hz), 7.57-7.55 (m, 2H, H₁-, H₈-Fmoc), 7.36 (t, 2H, H₃-, H₆-Fmoc, J_{H₃,H₂/H₄} = J_{H₆,H₅/H₇} = 7.4 Hz), 7.29-7.24 (m, 2H, H₂-, H₇-Fmoc), 5.86 (bs, 1H, NH), 4.44-4.32 (m, 4H, CH₂ (Fmoc), T^α, T^β), 4.18 (t, 1H, CH (Fmoc), J_{CH,CH₂} = 6.7 Hz), 1.23 (d, 3H, T^γ, J_{T^γ,T^β} = 5.9 Hz), 1.05 (bs, 1H, OH).

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

(Fmoc-Thr-OBn)



Eine Lösung von 10.0 g (29.3 mmol) Fmoc-Thr-OH (1) und 9.4 g (29.3 mmol) Tetra-*n*-butylammoniumbromid in 100 ml Dichlormethan wird mit 75 ml ges. NaHCO₃-Lsg. versetzt. Man gibt 3.6 ml (29.8 mmol) Benzylbromid zu und rührt kräftig über 72 Stunden. Die org. Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase einmal mit 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden zweimal mit je 100 ml 1M HCl und 100 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das

Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (CH/EE) gereinigt.

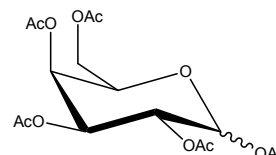
Ausb.: 11.26 g (89%); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.60$ (EE/PE 3:1).

$C_{26}H_{25}NO_5$ ($M = 431.48$ g/mol) [431.17].

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz), 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz), 7.38-7.28 (m, 9H, H3-, H6-, H2-, H7-Fmoc, H_{ar} (Bn)), 5.60 (d, 1H, NH, $J_{NH,T\alpha} = 7.9$ Hz), 5.24-5.19 (m, 2H, CH_2 (Bn)), 4.41-4.34 (m, 4H, CH_2 (Fmoc), T^α , T^β), 4.21 (t, 1H, CH (Fmoc), $J_{CH,CH_2} = 7.1$ Hz), 1.78 (s, 1H, OH), 1.22 (d, 3H, T^γ , $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz).

1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- α/β -D-galactopyranose (3)

(α/β -Ac₅Gal)

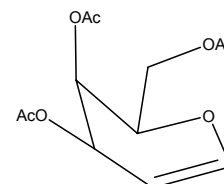


Eine Mischung von 150 ml Acetanhydrid und 150 ml Pyridin wird auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren werden 30.0 g (166 mmol) D-Galactose portionsweise so hinzugegeben, dass die Temperatur der Reaktionsmischung unter 5 °C bleibt. Nach vollendeter Zugabe wird noch eine Stunde bei 0 °C und anschließend 16 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Unter Eiskühlung werden vorsichtig 300 ml Wasser zugegeben und das Produkt anschließend viermal mit je 100 ml Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird mit 50 ml ges. $NaHCO_3$ -Lsg. gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand viermal i. Vak. mit Toluol kodestilliert und i. Hochvak. getrocknet. Das Produkt ist ausreichend rein für die weitere Umsetzung.

Ausb.: 68.4 g (quant.); viskoses, gelbliches Öl.

$C_{16}H_{22}O_{11}$ ($M = 390.34$ g/mol) [390.12].

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-galactal (4)¹²⁴



Zu einer Lösung von 150 g (384 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- α/β -D-galactopyranose (3) in 450 ml Chloroform werden unter Kühlung mit Eis/Kochsalz 150 ml (2.02 mol) Acetylbromid zugetropft, wobei die Innentemperatur unter 0 °C bleibt. Anschließend werden 25 ml Wasser so zugetropft, dass die Temperatur 5 °C nicht übersteigt.

Man rührt 30 Minuten im Kältebad und anschließend 90 Minuten bei Raumtemp. nach. Überschüssiges Acetylbromid und Essigsäure werden i. Vak. abdestilliert und der Rückstand dreimal i. Vak. mit Toluol kdestilliert. Das so erhaltene bräunliche Öl (anomerer Bromid) wird in einer Mischung aus 500 ml Essigsäure und 300 ml Wasser gelöst und im Eisbad gekühlt. Man gibt 200 g Zinkstaub und 15 g Kupfersulfat-Pentahydrat hinzu und lässt 14 Stunden kräftig rühren. Es wird über *Hyflo* abfiltriert und mit jeweils 200 ml Essigsäure und Toluol nachgewaschen. Die wässrige Phase wird zehnmal mit je 200 ml Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 200 ml ges. NaHCO₃-Lösung und zweimal mit je 200 ml Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert und das Produkt i. Hochvak. getrocknet (Spuren von Toluol lassen sich auch durch längeres Trocknen nicht vollständig entfernen).

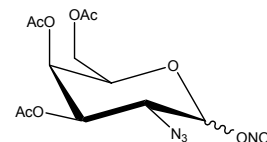
Ausb.: 101.0 g (97%); farbloses, hochviskoses Öl; R_f = 0.56 (EE/PE 3:1).

C₁₂H₁₆O₇ (M = 272.25 g/mol) [272.09].

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 6.42 (dd, 1H, H1, J_{H1,H2} = 6.3 Hz, J_{H1,H3} = 1.7 Hz), 5.53-5.49 (m, 1H, H3), 5.40-5.36 (m, 1H, H4), 4.68 (ddd, 1H, H2, J_{H2,H1} = 6.3 Hz, J_{H2,H3} = 2.5 Hz, J_{H2,H4} = 1.5 Hz), 4.28 (t, 1H, H5, J_{H5,H6} = 5.8 Hz), 4.22-4.17 (m, 2H, H6_{a,b}), 2.08, 2.04, 1.98 (3×s, 3×3H, 3×CH₃ (Ac)).

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat (5)¹²⁵

(α/β Ac₃GalN₃-ONO₂)



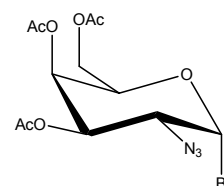
Zu einer auf -30 °C gekühlten Lösung von 35.0 g (128.6 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (4) in 600 ml absol. Acetonitril werden im Argongegenstrom 13.2 g (203 mmol) trockenes Natriumazid und 220.0 g (401 mmol) trockenes Cer(IV)ammoniumnitrat gegeben. Es wird 18 Stunden bei dieser Temperatur (im Tiefkühlschrank) kräftig gerührt. Die intensiv gelbe Reaktionsmischung wird durch Zugabe von 600 ml eisgekühltem Diethylether verdünnt und mit 300 ml Eiswasser versetzt. Die Phasen werden getrennt und die Etherphase wird zweimal mit je 200 ml Eiswasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das resultierende gelbe Öl wird durch zügige Flashchromatographie (EE/CH 2:1) gereinigt und i. Hochvak. getrocknet. Es wird ein Gemisch aus α - und β -Anomer erhalten, welches für die folgende Umsetzung nicht aufgetrennt werden muss.

Ausb.: 30.1 (62 %); gelblicher, amorpher Feststoff; $R_f = 0.51$ (PE/EE 2:1).

$C_{12}H_{16}N_4O_{10}$ ($M = 376.28$ g/mol) [376.09].

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 6.31 (d, 1H, H1 α , $J_{H1\alpha, H2\alpha} = 4.2$ Hz), 5.55 (d, 1H, H1 β , $J_{H1\beta, H2\beta} = 8.8$ Hz), 5.47 (d, 1H, H4 α , $J_{H4\alpha, H3\alpha} = 2.0$ Hz), 5.36 (d, 1H, H4 β , $J_{H4\beta, H3\beta} = 2.4$ Hz), 5.22 (dd, 1H, H3 α , $J_{H3\alpha, H4\alpha} = 3.2$ Hz, $J_{H3\alpha, H2\alpha} = 11.3$ Hz), 4.93 (dd, 1H, H3 β , $J_{H3\beta, H4\beta} = 3.3$ Hz, $J_{H3\beta, H2\beta} = 10.6$ Hz), 4.34 (t, 1H, H5 α , $J_{H5\alpha, H6a, b\alpha} = 5.9$ Hz), 4.17-4.02 (m, 6H, H2 α , H5 β , H6 $_{a, b\alpha}$, H6 $_{a, b\beta}$), 3.80 (dd, 1H, H2 β , $J_{H2\beta, H1\beta} = 8.8$ Hz, $J_{H2\beta, H3\beta} = 10.6$ Hz), 2.14, 2.04, 2.01 (3 \times s, 6 \times 3H, 6 \times CH $_3$ (Ac)).

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (**6**)¹²⁵ (α Ac $_3$ GalN $_3$ -Br)



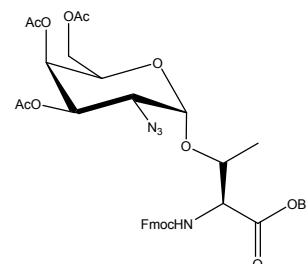
Zu einer gut gerührten Suspension von 20.0 g (230.3 mmol) trockenem Lithiumbromid in 150 ml absol. Acetonitril werden 15.2 g (40.4 mmol)

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat (**5**), gelöst in 60 ml absol. Acetonitril, gegeben. Das Reaktionsgemisch wird vier Stunden bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre gerührt und anschließend mit 200 ml Dichlormethan verdünnt. Es wird zweimal mit jeweils 50 ml Wasser gewaschen und die organische Phase anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert. Das so erhaltene gelbe Öl wird i. Hochvak. getrocknet und roh weiter umgesetzt.

Ausb.: 14.9 g (94 %); gelbes Öl; $R_f = 0.67$ (PE/EE 3:1).

$C_{12}H_{16}BrN_3O_7$ ($M = 394.18$ g/mol) [393.02].

N-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-benzylester (**7**) (Fmoc-Thr(α Ac $_3$ GalN $_3$)-OBn)



Eine Lösung von 11.0 g (25.5 mmol) Fmoc-Thr-OBn (**2**) in 300 ml einer 1:1-Mischung aus absol. Toluol und absol. Dichlormethan

wird mit 20.0 g Molekularsieb (4Å, Pulver) versetzt und eine Stunde unter Argon gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf 0 °C abgekühlt und mit 8.0 g (29.0 mmol) Silbercarbonat und

750 mg (3.6 mmol) wasserfreiem Silberperchlorat (Silberperchlorat-Monohydrat wurde sechsmal mit absol. Toluol kodestiliert, um das Kristallwasser zu entfernen.) versetzt. Es wird 30 Minuten unter Feuchtigkeits- und Lichtauschluß bei 0-5 °C gerührt. Eine Lösung von 14.9 g (37.8 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactosylbromid (**6**) in 100 ml absol. Toluol / absol. Dichlormethan (1:1) wird langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 14 Stunden unter langsamem Aufwärmen auf Raumtemp. gerührt. Da dünnschichtchromatographisch kein vollständiger Umsatz sichtbar war, wurden zusätzlich 3.0 g Silbercarbonat und 500 mg Silberperchlorat zugeben und weitere sechs Stunden bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionsmischung wird anschließend mit 300 ml Dichlormethan verdünnt und über *Hyflo* filtriert. Das Filtrat wird je zweimal mit 200 ml ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (CH/EE 4:1) gereinigt.

Ausb.: 18.6 g (98%); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.22$ (PE/EE 3:1).

C₃₈H₄₀N₄O₁₂ (M = 744.74 g/mol) [744.26].

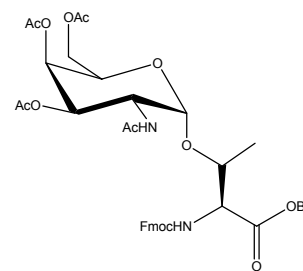
FD-MS, m/z : 745.1 ([M+H]⁺, ber.: 745.3), 717.1 ([M-N₂+H]⁺, ber.: 717.3).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.75 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz), 7.60 (d, 2H, H₁-, H₈-Fmoc, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz), 7.40-7.28 (m, 9H, H₂-, H₃-, H₆-, H₇-Fmoc, H_{ar} (Bn)), 5.66 (d, 1H, NH, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz), 5.43-5.40 (m, 1H, H₄), 5.29-5.25 (m, 1H, H₃), 5.24-5.17 (m, 2H, CH₂ (Bn)), 4.88 (d, 1H, H₁, $J_{H_1,H_2} = 3.8$ Hz), 4.50-4.00 (m, 8H, T ^{α} , CH₂ (Fmoc), CH (Fmoc), H₅, H₆_{a,b}, T ^{β}), 3.56 (dd, 1H, H₂, $J_{H_2,H_1} = 3.7$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 11.2$ Hz), 2.13, 2.05, 1.98 (3 \times s, 3 \times 3H, 3 \times CH₃ (Ac)), 1.32 (d, 3H, T ^{γ} , $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB, DEPT), δ [ppm]: 170.3 (1C, COOBn), 170.0, 169.8 (3C, 3 \times C=O (Ac)), 156.8 (1C, C=O (Urethan)), 143.7 (2C, C_{1a}-, C_{8a}-Fmoc), 141.3 (2C, C_{4a}-, C_{5a}-Fmoc), 135.1 (1C, C_q (Bn)), 128.7, 128.6, 128.5, 128.3 (5C, C_{ar} (Bn)), 127.7 (2C, C₃-, C₆-Fmoc), 127.1 (2C, C₂-, C₇-Fmoc), 125.2 (2C, C₁-, C₈-Fmoc), 119.9 (2C, C₄-, C₅-Fmoc), 99.2 (1C, C₁), 70.5 (1C, T ^{β}), 68.2, 67.7, 67.6, 67.4, 67.0 (5C, CH₂ (Fmoc), CH₂ (Bn), C₃, C₄, C₅), 61.7 (1C, C₆), 58.8 (1C, C₂), 57.7 (1C, T ^{α}), 47.1 (1C, CH (Fmoc)), 20.6 (3C, 3 \times CH₃ (Ac)), 18.5 (1C, T ^{γ}).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-benzylester (8)**

(Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OBn)



Variante A: In 30 ml frisch destillierter Thioessigsäure werden 3.0 g (4.0 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OBn (7) gelöst, mit 30 ml Pyridin versetzt und 15 Stunden bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 100 ml Toluol verdünnt und die Lösungsmittel werden i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wird dreimal mit je 100 ml Toluol kdestilliert. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (CH/EE 2:1) gereinigt.

Ausb.: 2.5 g (82%).

Variante B: Zu einer Lösung von 5.0 g (6.4 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OBn (7) in 120 ml THF/Acetanhydrid/Essigsäure (3:2:1) werden 5.0 g (76.5 mmol) Zink-Staub gegeben, der zuvor durch Suspensieren in 100 ml einer 2%-igen CuSO₄-Lsg. aktiviert, mit Wasser und THF gewaschen und mit Diethylether getrocknet wurde. Es wird 15 Stunden bei Raumtemp. kräftig gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung über *Hyflo* filtriert, wobei mit 200 ml THF nachgewaschen wird. Die Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt und der Rückstand viermal i. Vak. mit Toluol kdestilliert. Das Rohprodukt wird in 300 ml Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit jeweils 100 ml ges. NaHCO₃-Lsg. und zweimal mit je 100 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Die weitere Reinigung erfolgt durch Flashchromatographie (CH/EE 2:1)).

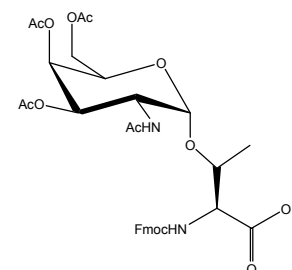
Ausb.: 3.4 g (69%); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.78$ (EE/AcOH 20:1); $R_f = 0.33$ (EE/MeOH 2:1).

C₄₀H₄₄N₂O₁₃ (M = 760.78 g/mol) [760.28].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.77 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H3,H4} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.62 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz), 7.42-7.27 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{ar} (Bn)), 5.71 (d, 1H, NH (Urethan), $J_{NH,T\alpha} = 9.7$ Hz), 5.71 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{NH,H2} = 9.7$ Hz), 5.36 (d, 1H, H4, $J_{H4,H3} = 9.2$ Hz), 5.19 (d, 1H, H3, $J_{H3,H2} = 12.1$ Hz), 5.09-5.04 (m, 2H, CH₂ (Bn)), 4.79 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz), 4.56-4.46 (m, 1H, H2), 4.46-4.40 (m, 2H, CH₂ (Fmoc)), 4.28-4.02 (m, 6H, T ^{α} , T ^{β} , CH (Fmoc), H5, H_{6a,b}), 2.15, 2.03, 1.99, 1.96 (4 \times s, 4 \times 3H, 4 \times CH₃ (Ac)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , BB, DEPT): δ [ppm]: 170.3 (1C, COOBn), 170.2, 170.1, 169.9 (4C, $4\times\text{C}=\text{O}$ (Ac)), 156.5 (1C, $\text{C}=\text{O}$ (Urethan)), 143.6 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 134.7 (1C, C_q (Bn)), 128.8, 128.6 (5C, C_{ar} (Bn)), 127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-,C7-Fmoc), 125.1 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.9 (1C, C1), 68.4, 67.8, 67.4, 67.3 (6C, CH_2 (Fmoc), CH_2 (Bn), C3, C4, C5, T^β), 62.1 (1C, C6), 58.5 (1C, T^α), 47.5 (1C, C2), 47.2 (1C, CH (Fmoc)), 23.2 (1C, CH_3 (NHAc)), 22.6, 20.7, 20.6 (3C, $3\times\text{CH}_3$ (OAc)), 18.1 (1C, T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (**9**)
(Fmoc-Thr($\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$)-OH)**



500 mg (0.66 mmol) Fmoc-Thr($\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$)-OBn (**8**) werden in 15 ml Methanol gelöst (Falls die vorhergehende reduktive Acetylierung mit Thioessigsäure durchgeführt wurde, müssen sämtliche schwefelhaltigen Verunreinigungen sorgfältig entfernt worden sein). Nach mehrmaligem Evakuieren und Begasen mit Argon werden zwei Spatelspitzen Pd/C (5%) zugegeben. Nach erneutem Evakuieren und Begasen mit Argon wird die Argon-Atmosphäre durch Wasserstoff ersetzt (H_2 -Ballon). Man läßt vier Stunden bei Raumtemp. rühren. Anschließend wird über *Hyflo* filtriert und das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (EE/AcOH 50:1) gereinigt. Die verbleibenden Reste an Essigsäure werden durch mehrfache Kodestillation mit Toluol entfernt.

Ausb.: 460 mg (93%); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.43$ (EE/AcOH 20:1; $[\alpha]_D^{23} = 90.3^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:⁴⁸ $[\alpha]_D^{23} = 78.7^\circ$ ($c = 1.00$, CH_2Cl_2).

$\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{13}$ (M = 670.66 g/mol) [670.24].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.72-7.69 (m, 2H, H4-, H5-Fmoc), 7.58 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.2$ Hz), 7.38-7.23 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.95, 6.84 (2xd, 1H, NH (GalNAc), $J_{\text{NH,H2}} = 8.7$ Hz)*, 5.96, 5.85 (2xd, 1H, NH (Urethan), $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.5$ Hz)*, 5.35, 5.26 (2xs, 1H, H4, $J_{\text{H4,H3}} = 2.9$ Hz)*, 5.11 (dd, 1H, H3, $J_{\text{H3,H4}} = 2.8$ Hz, $J_{\text{H3,H2}} = 11.1$ Hz), 5.01, 4.95 (2xd, 1H, H1, $J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz)*, 4.63-4.00 (m, 8H, H2, CH_2 (Fmoc), H5,

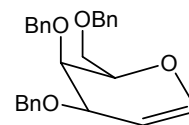
H_{6a,b}, CH (Fmoc), T^α, T^β), 2.14, 2.02, 2.00, 1.95, 1.92, 1.83 (6×s, 4×3H, 4×CH₃ (Ac))^{*}, 1.26, 0.96 (2×d, 3H, T^γ, J_{Tβ,Tγ} = 6.1 Hz)^{*}.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB, DEPT), δ [ppm]: 173.2, 170.8, 170.3, 170.2 (4C, 4×C=O), 156.6 (1C, C=O (Urethan)), 143.6 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.2, 124.9 (2C, C1-, C8-Fmoc)^{*}, 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.5, 98.8 (1C, C1)^{*}, 77.2 (1C, T^β), 75.8 (1C, C3), 68.1, 67.4, 67.3, 67.1 (3C, C4, C5, CH₂ (Fmoc))^{*}, 62.2, 62.0 (1C, C6), 58.7, 58.5 (1C, T^α)^{*}, 47.9, 47.2, 47.0 (2C, C2, CH (Fmoc))^{*}, 22.9, 22.3 (1C, CH₃ (NHAc))^{*}, 20.7, 20.6 (3C, 3×CH₃ (Ac)), 18.5, 18.2 (1C, T^γ)^{*}.

Es tritt teilweise (*) Signalverdopplungen aufgrund von unterschiedlichen Konformeren auf.

5.2.2 Versuchte Synthese des T_N-Antigen-Bausteins über Nitrogalactal-Verknüpfung

3,4,6-Tri-*O*-benzyl-D-galactal (10)



Eine Lösung von 8.04 g (29.5 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal (4) in 150 ml Methanol (HPLC-grade) wird tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen Lösung von Natriummethanolat in Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5-10.0 erreicht ist. Die Lösung wird 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit einigen Tropfen Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert und das rohe Galactal (R_f = 0.1, EE/PE 3:1) i. Vak. getrocknet. Der so erhaltene gelbliche Feststoff wird in 75 ml DMF gelöst und bei 0 °C portionweise mit 4.60 g (115.0 mmol) NaH (60%ige Dispersion in Mineralöl) versetzt. Nach zehnmütigem Rühren tropft man 15.0 ml (126.3 mmol) Benzylbromid zu und rührt unter langsamem Aufwärmen 16 Stunden. Man gibt 200 ml Toluol und 100 ml Wasser zu der Reaktionsmischung und trennt die Phasen. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 100 ml Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (CH/EE 3:1) gereinigt.

Ausb.: 11.07 g (90%); gelbliches Öl; R_f = 0.69 (EE/PE 3:1).

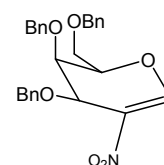
C₂₇H₂₈O₄ (M = 416.51 g/mol) [416.20].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.40-7.26 (m, 15H, H_{ar} (3×Bn)), 6.38 (dd, 1H, H1,

$J_{H1,H2} = 6.2$ Hz, $J_{H1,H3} = 1.5$ Hz), 4.89 (d, 1H, CH_{2a}(Bn1), $J_{Ha,Hb} = 11.9$ Hz), 4.86 (ddd, 1H, H2, $J_{H2,H1} = 6.0$ Hz, $J_{H2,H3} = 2.9$ Hz $J_{H2,H4} = 1.3$ Hz), 4.61 (d, 1H, CH_{2b} (Bn1), $J_{Hb,Ha} = 12.0$ Hz), 4.57 (s, 2H, CH_{2a,b} (Bn2)), 4.51 (d, 1H, CH_{2a} (Bn3), $J_{Ha,Hb} = 11.9$ Hz), 4.43 (d, 1H, CH_{2b} (Bn3), $J_{Hb,Ha} = 11.9$ Hz), 4.23-4.15 (m, 2H, H3, H5), 3.98-3.93 (m, 1H, H4), 3.79 (dd, 1H, H6_a, $J_{H6a,H6b} = 10.1$ Hz, $J_{H6a,H5} = 7.2$ Hz), 3.66 (dd, 1H, H6_b, $J_{H6b,H6a} = 10.1$ Hz, $J_{H6b,H5} = 5.2$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB, DEPT), δ [ppm]: 144.2 (1C, C1), 138.5, 138.4, 138.0 (3C, C_q (3×Bn)), 128.4, 128.3, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6 127.4 (15C, C_{ar} (3×Bn)), 100.0 (1C, C2), 75.7, 73.4, 73.3, 71.3, 70.9, 70.8 (6C, 3×CH₂ (3×Bn), C3, C4, C5), 68.4 (1C, C6).

3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-nitro-D-galactal (**11**)^{135,136}



Zu 100 ml auf 0 °C gekühltem Acetanhydrid werden langsam 120 ml konz. Salpetersäure (65%) so hinzugegossen, dass die Temperatur 15 °C nicht übersteigt. Anschließend wird die Mischung auf -50 °C abgekühlt, wobei ab ca -25 °C ein farbloser Feststoff (Acetylnitrat) ausfällt. Eine Lösung von 11.07 g (26.6 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-D-galactal (**10**) in 60 ml Acetanhydrid wird über einen Zeitraum von 15 Minuten zugegeben. Die Reaktionsmischung wird weitere 30 Minuten bei -50 °C gerührt und anschließend langsam auf Raumtemp. erwärmt. Die Lösung wird auf eine Mischung aus 200 g Eis und 125 ml ges. NaCl-Lösung gegossen. Man extrahiert dreimal mit je 150 ml Diethylether, trocknet die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat und entfernt das Lösungsmittel unter vermindertem Druck. Der Rückstand wird dreimal i. Vak. mit Toluol kodestilliert. Der so erhaltene gelbe Feststoff (rohe 1-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-nitro-D-galactopyranose, 15.0 g) wird in 40 ml Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung langsam zu einer Lösung von 12 ml Triethylamin in 25 ml Dichlormethan getropft. Man rührt 30 Minuten bei 0 °C und lässt anschließend auf Raumtemp. erwärmen. Die Reaktionsmischung wird mit 20 ml 1M HCl gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (CH/EE 3:1) gereinigt.

Ausb.: 6.50 g (53%); gelbes Öl; $R_f = 0.21$ (Tol/EE 9:1).

C₂₇H₂₇NO₆ (M = 461.51 g/mol) [461.18].

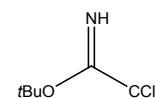
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 8.07 (s, 1H, H1), 7.37-7.21 (m, 15H, H_{ar} (3×Bn)), 4.89 (dd, 1H, H3, $J_{H3,H4} = 3.7$ Hz, $J_{H3,H5} = 1.3$ Hz), 4.85 (d, 1H, CH_{2a} (Bn1), $J_{Ha,Hb} = 10.8$ Hz), 4.78 (d, 1H, CH_{2b} (Bn1), $J_{Hb,Ha} = 10.8$ Hz), 4.70 (d, 1H, CH_{2a} (Bn2), $J_{Ha,Hb} = 11.9$ Hz), 4.69-4.64

(m, 1H, H5), 4.60 (d, 1H, CH_{2b} (Bn2), $J_{\text{Hb,Ha}} = 11.9$ Hz), 4.55 (d, 1H, CH_{2a} (Bn3), $J_{\text{Ha,Hb}} = 11.9$ Hz), 4.45 (d, 1H, CH_{2b} (Bn4), $J_{\text{Hb,Ha}} = 11.8$ Hz), 3.96-3.88 (m, 3H, H4, H6_{a,b}).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB, DEPT), δ [ppm]: 154.5 (1C, C1), 138.1, 137.7, 136.9 (3C, C_q (3×Bn)), 128.7, 128.4, 128.3, 127.9, 127.7 (15C, C_{ar} (3×Bn)), 125.3 (1C, C2), 78.0, 74.9, 73.5, 73.1, 72.2, 67.6 (7C, 3×CH₂ (3×Bn), C3, C4, C5, C6).

***tert*-Butyl-trichloracetimidat (12)**

(TBTA)¹³⁹



Eine Lösung von 21.60 g (150 mmol) Trichloroacetonitril in 30 ml absol. Diethylether wird auf 0 °C abgekühlt. In einem Zeitraum von 15 Minuten tropft man eine Lösung von 1.68 g (15 mmol) Kalium-*tert*-butanolat in 60 ml *tert*-Butanol/Diethylether (1:1) zu. Das Reaktionsgemisch wird weitere 30 Minuten unter Eiskühlung und anschließend 18 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Man kocht noch 30 Minuten unter Rückfluß und destilliert anschließend den Ether ab. Der Rückstand wird in 40 ml Pentan aufgenommen, filtriert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird durch Vakuumdestillation gereinigt.

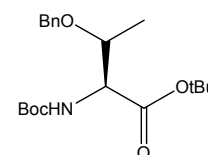
Ausb.: 27.10 g (83%); farblose Flüssigkeit, die im Kühlschrank auskristallisiert; Sdp. 68 °C (18 mbar), Lit.:¹³⁹ &-%-&) °C (12 mm).

C₆H₁₀Cl₃NO (M = 218.51 g/mol) [216.98].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 8.20 (s, 1H, NH), 1.55 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

***N*-(*tert*-Butyl-oxycarbonyl)-*O*-benzyl-L-threonin-*tert*-butylester (13)¹³⁶**

(Boc-Thr(Bn)-OtBu)



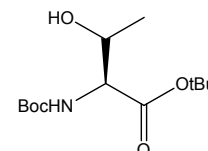
Eine Lösung von 5.00 g (16.2 mmol) *N*-(*tert*-Butyl-oxycarbonyl)-*O*-benzyl-L-Threonin in 40 ml absol. Dichlormethan wird mit 7.10 g (32.52 mmol) TBTA (12) in 40 ml Cyclohexan versetzt. Man gibt 340 μ L (2.7 mmol) Bortrifluorid-Etherat (48%) hinzu und rührt die Lösung bei Raumtemp. über 18 Stunden. Die Reaktionsmischung wird mit 400 ml Dichlormethan verdünnt und zweimal mit je 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert, und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (CH/EE 6:1) gereinigt, wobei das entstandene Trichloracetamid abgetrennt werden kann.

Ausb.: 4.40 g (75%); gelbe Flüssigkeit; $R_f = 0.49$ (CH/EE 4:1).

$C_{20}H_{31}NO_5$ ($M = 365.46$ g/mol) [365.22].

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 7.33 (s, 5H, H_{ar} (Bn)), 5.23 (d, 1H, NH, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz), 4.54 (d, 1H, CH_{2a} (Bn), $J_{a,b} = 11.5$ Hz), 4.40 (d, 1H, CH_{2b} (Bn), $J_{b,a} = 11.5$ Hz), 4.21-4.07 (m, 2H, T^α , T^β), 1.43 (s, 18H, CH_3 ($2 \times tBu$)), 1.24 (d, 3H, T^γ , $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz).

***N*-(*tert*-Butyl-oxycarbonyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**14**)¹³⁶
(Boc-Thr-*O**t*Bu)**



In 50 ml Ethanol/Essigsäure 5:1 werden 4.40 g (12.04 mmol) *N*-(*tert*-Butyl-oxycarbonyl)-*O*-benzyl-*L*-threonin-*tert*-butylester (**13**) gelöst. Nach mehrmaligem Evakuieren und Begasen mit Argon werden 500 mg $Pd(OH)_2/C$ (15-20% Pd; ~50% H_2O) zugegeben. Nach erneutem Evakuieren und Begasen mit Argon wird die Argon-Atmosphäre durch Wasserstoff ersetzt (H_2 -Ballon). Man rührt 44 Stunden bei Raumtemp. (DC-Kontrolle). Anschließend wird über *Hyflo* filtriert und das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird mehrmals i. Vak. mit Toluol kodestilliert, um Reste an Essigsäure zu entfernen. Das Rohprodukt ist rein genug für die weitere Umsetzung.

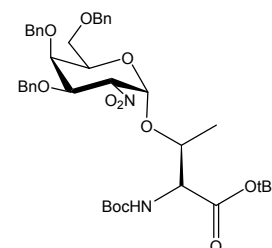
Ausb.: 3.19 g (96%); orange-farbiger Feststoff; $R_f = 0.37$ (EtOH/Tol 4:1).

$C_{13}H_{25}NO_5$ ($M = 275.34$ g/mol) [275.17].

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 5.22 (bs, 1H, NH), 4.26-4.15 (m, 1H, T^β), 4.15-4.05 (m, 1H, T^α), 1.88 (s, 1H, OH), 1.47, 1.43 ($2 \times s$, 18H, CH_3 ($2 \times tBu$)), 1.21 (d, 3H, T^γ , $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$, BB), δ [ppm]: 170.5 (2C, $2 \times C=O$), 82.4 (2C, $2 \times C_q$ (*t*Bu)), 68.5 (1C, T^β), 59.1, (1C, T^α), 28.3, 28.0 (6C, CH_3 ($2 \times tBu$)), 19.9 (1C, T^γ).

***N*-(*tert*-Butyl-oxycarbonyl)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-nitro- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**15**)¹³⁶
(Boc-Thr(α Bn₃GalNO₂)-*O**t*Bu)**



In 100 ml absol. Toluol werden 6.30 g (13.7 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-nitro-*D*-galactal (**11**) und 3.19 g (11.6 mmol) *N*-(*tert*-Butyl-oxycarbonyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**14**) gelöst, mit

8.0 g frisch ausgeheiztem Molekularsieb (3Å, Pulver) versetzt und eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Dann werden 155 mg (1.38 mmol) Kalium-*tert*-butanolat zugegeben und weitere 2.5 Stunden gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit einigen Tropfen Essigsäure neutralisiert und über *Hyflo* filtriert. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und das Produkt durch Flashchromatographie (CH/EE 4:1) gereinigt.

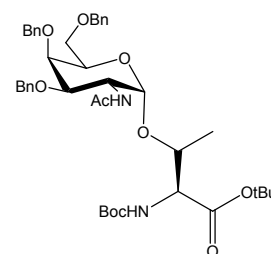
Ausb.: 8.52 g (99%); leicht gelblicher, amorpher Feststoff; $R_f = 0.38$ (Tol/EE 9:1); $[\alpha]_D^{23} = 65.0^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:¹³⁶ $[\alpha]_D^{23} = 71.2^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{11}$ ($M = 736.85$ g/mol) [736.36].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 5.37 (d, 1H, H1, $J_{\text{H1,H2}}=4.0$ Hz), 5.00 (d, 1H, NH, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 10.0$ Hz), 4.95 (dd, 1H, H2, $J_{\text{H2,H3}} = 10.8$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 4.1$ Hz), 4.81 (d, 1H, CH_{2a} (Bn1), $J_{\text{Ha,Hb}} = 11.0$ Hz), 4.70 (s, 2H, CH_2 (Bn2)), 4.51-4.35 (m, 1H, H3), 4.48 (d, 1H, CH_{2a} (Bn3), $J_{\text{Ha,Hb}} = 11.7$ Hz), 4.40 (d, 1H, CH_{2b} (Bn3), $J_{\text{Hb,Ha}} = 11.8$ Hz), 4.31 (d, 1H, T^β , $J_{\text{T}\beta,\text{T}\gamma} = 6.5$ Hz), 4.08 (d, 1H, T^α , $J_{\text{T}\alpha,\text{NH}} = 9.6$ Hz), 4.05-3.85 (m, 2H, H4, H5), 3.53 (d, 2H, $\text{H}_{6a,b}$, $J_{\text{H6,H5}} = 5.1$ Hz), 1.46 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)), 1.45 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)), 1.27 (d, 3H, T^γ , $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.4$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , BB, DEPT), δ [ppm]: 169.2 (1C, C=O (Ester)), 156.2 (1C, C=O (Urethan)), 137.9, 137.7, 137.3, (3C, C_q (3×Bn)), 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.8, 127.7 (15C, C_{ar} (3×Bn)), 96.4 (1C, C1), 84.3 (1C, C2), 82.7 (1C, C_q (*t*Bu-Ester)), 79.9 ((1C, C_q (*t*Bu-Boc)), 75.7 (1C, T^β), 75.2 (1C, CH_2 (Bn)), 75.0 (1C, C3), 73.6 (1C, CH_2 (Bn)), 73.1 (1C, CH_2 (Bn)), 73.0 (1C, C4), 70.0 (1C, C5), 68.2 (1C, C6), 58.6 (1C, T^α), 28.3 (3C, CH_3 (Boc)), 27.9 (3C, CH_3 (*t*Bu-Ester)), 18.7 (1C, T^γ).

***N*-(*tert*-Butyl-oxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester
(Boc-Thr(α Bn₃GalNAc)-*O*tBu)**



Herstellung des platinieren Raney-Nickels T4¹⁴⁰: 2.0g Ni/Al-Legierung (50% Ni) werden in 10 ml Wasser suspendiert und im

Wasserbad auf 50 °C erwärmt. Man gibt eine Lösung von 50 mg Hexachlorplatin(IV)säurehydrat ($\text{H}_2\text{Pt}_6\text{Cl}_6 \times \text{H}_2\text{O}$) und 80 mg NaOH in 500 μL Wasser hinzu und rührt 90 Minuten bei 50 °C. Es werden weitere 2.40 g NaOH in 6 ml Wasser zugegeben und 60 Minuten gerührt.

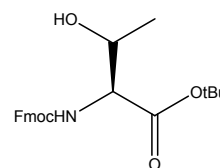
Die wässrige Lösung wird abdekantiert und der Niederschlag dreimal mit je 15 ml Wasser und anschließend dreimal mit Ethanol gewaschen.

Hydrierung: Der frisch hergestellte Katalysator, suspendiert in 15 ml Ethanol, wird zu einer Lösung von 7.72 g (10.5 mmol) *N*-(*tert*-Butyl-oxycarbonyl)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-nitro- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**15**) in 80 ml Ethanol gegeben. Nach mehrmaligem Evakuieren und Begasen mit Argon wird die Argon-Atmosphäre durch Wasserstoff ersetzt (H_2 -Ballon). Es wird 48 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Da durch DC-Kontrolle keine Reaktion erkennbar ist, wird erneut frisch hergestellter Katalysator zugegeben und 48 Stunden unter Wasserstoff gerührt. Obwohl nun dünnschichtchromatographisch immer noch keine Veränderung sichtbar ist, wird der Ansatz aufgearbeitet. Es wird über *Hyflo* filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der zähflüssige Rückstand wird in 30 ml Pyridin aufgenommen und mit 10 ml Acetanhydrid versetzt. Nachdem die Mischung drei Stunden gerührt wurde, wird i. Vak. eingengt und der Rückstand i. Vak. zweimal mit Toluol kodestilliert. Anschließend erfolgt flashchromatographische Reinigung (EE/CH 2:1). Der isolierte gelbliche Feststoff konnte durch NMR als Edukt identifiziert werden.

Auch zweimalige Wiederholungen der Reaktion verliefen erfolglos.

5.2.3 Synthese des Sialyl- T_N -Antigen-Bausteins

N-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**16**)¹⁴³ (Fmoc-Thr-*Ot*Bu)



Eine Mischung aus 25.0 g (121.2 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, 11.3 g (152.5 mmol) *tert*-Butanol und 0.4 g (4.0 mmol) wasserfreiem Kupfer(I)-chlorid wird unter Argonatmosphäre und Lichtausschluß gerührt. Nach sechs Tagen wird die dunkelgrüne Reaktionsmischung mit 30 ml absol. Dichlormethan verdünnt. Anschließend wird eine Lösung von 11.7 g (34.4 mmol) Fmoc-Thr-OH (**1**) in 70 ml absol. Dichlormethan / *tert*-Butanol 3:1 innerhalb von 30 Minuten unter Kühlung im Wasserbad zugetropft. Man rührt noch weitere 80 Minuten, filtriert den ausgefallenen Harnstoff ab und wäscht mit eiskaltem Dichlormethan nach. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt, wobei weiterer Harnstoff ausfällt und abfiltriert werden kann. Anschließend wird die Lösung dreimal mit jeweils 30 ml einer ges. $NaHCO_3$ -Lsg. gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in

wenig Ethylacetat aufgenommen und einige Stunden bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Hierbei fällt weiterer Harnstoff aus, der abfiltriert wird. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (CH/EE 2:1) und anschließende Umkristallisation aus Diethylether/Petrolether 1:1.

Ausb.: 8.74 g (64%); farbloser, kristalliner Feststoff; $R_f = 0.50$ (Toluol/EtOH 5:1); $R_f = 0.47$ (Toluol/Aceton 4:1); Schmp.: $75\text{ }^{\circ}\text{C}$, Lit.:¹¹⁸ $72\text{-}74\text{ }^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{23} = -11.2^{\circ}$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:¹¹⁸ $[\alpha]_D^{23} = -11.4^{\circ}$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

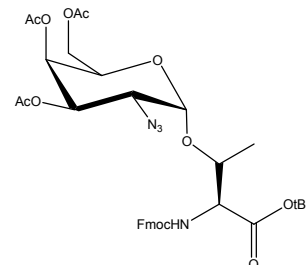
$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ ($M = 397.46\text{ g/mol}$) [397.19].

FD-MS (positiv), m/z : 397.7 (M^+ , ber.: 397.2).

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.3\text{ Hz}$), 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3\text{ Hz}$), 7.38 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4\text{ Hz}$), 7.29 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.4\text{ Hz}$), 5.54 (d, 1H, NH, $J_{\text{NH},T\alpha} = 8.4\text{ Hz}$), 4.39 (d, 2H, CH_2 (Fmoc), $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 7.1\text{ Hz}$), 4.31-4.25 (m, 2H, T^α , T^β), 4.22 (t, 1H, CH (Fmoc), $J_{\text{CH},\text{CH}_2} = 6.9\text{ Hz}$), 2.15 (bs, 1H, OH), 1.47 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)), 1.23 (d, 3H, T^γ , $J_{T\beta,T\gamma} = 6.2\text{ Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (50.3MHz, CDCl_3 , BB), δ [ppm]: 170.2 (1C, C=O (Ester)), 156.3 (1C, C=O (Urethan)), 143.7 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.1 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 82.7 (1C, C_q (*t*Bu)), 68.3 (1C, T^β), 67.2 (1C, CH_2 (Fmoc)), 59.5 (1C, T^α), 47.2 (1C, CH (Fmoc)), 28.0 (3C, CH_3 (*t*Bu)), 19.9 (1C, T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (17)^{48,132}
(Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-*Ot*Bu)**



Zu einer Lösung von 17.0 g (42.8 mmol) Fmoc-Thr-*Ot*Bu (**16**) in 600 ml absol. Dichlormethan/absol. Toluol (1:1) werden 24 g

Molekularsieb (4 Å, Pulver) gegeben. Die Lösung wird eine Stunde unter Argonatmosphäre gerührt und anschließend auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Die Reaktionsmischung wird mit 18.0 g Silbercarbonat und 1.50 g wasserfreiem Silberperchlorat (s. S. 130) versetzt und weitere 30 Minuten gerührt. Man tropft langsam eine Lösung von 28.0 g (71.0 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (**6**) in 200 ml absol. Dichlor-

methan/absol. Toluol (1:1) zu und rührt die Reaktionsmischung unter langsamem Erwärmen auf Raumtemp. noch weitere 20 Stunden. Die gelbe Mischung wird mit 500 ml Dichlormethan/Toluol (1:1) verdünnt und über *Hyflo* filtriert. Anschließend wird mit je 2×300 ml ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Bei der flashchromatographischen Reinigung (CH/EE 3:1) des Rückstandes war eine vollständige Abtrennung des in geringen Mengen gebildeten β-Anomeren sowie von unglycosyliertem Akzeptor (**16**) nicht möglich. Daher wurde das Gemisch ohne weitere Trennung in der folgenden Reaktion eingesetzt (Für die Analytik wurde ein kleiner Teil durch semipräparative HPLC gereinigt).

Ausb.: 26.0 g (Gemisch); farblos, amorpher Feststoff; R_f = 0.66 (Tol/EtOH 5:1).

C₃₅H₄₂N₄O₁₂ (M = 710.73 g/mol) [710.28].

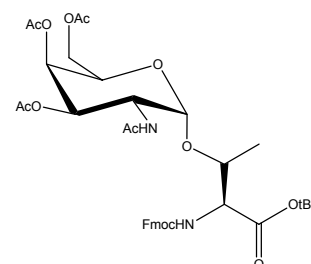
ESI-MS (positiv), m/z: 733.5 ([M+Na]⁺, ber.: 733.3); 677.4 ([M-*t*Bu+H+Na]⁺; ber.: 677.2).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4 Hz), 7.60 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4 Hz), 7.38-7.27 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.64 (d, 1H, NH (Urethan), J_{NH,Tα} = 9.5 Hz), 5.44 (d, 1H, H4, J_{H4,H5} = 2.4 Hz), 5.32 (dd, 1H, H3, J_{H3,H2} = 8.1 Hz, J_{H3,H4} = 3.3 Hz), 5.09 (d, 1H, H1, J_{H1,H2} = 3.7 Hz), 4.43-4.24 (m, 6H, H5-, H6_{a,b}, CH (Fmoc), T^α, T^β), 4.12-4.04 (m, 2H, CH₂ (Fmoc)), 3.62 (dd, 1H, H2, J_{H2,H3} = 7.4 Hz, J_{H2,H1} = 3.7 Hz), 2.13, 2.06, 2.03 (3×s, 3×3H, 3×CH₃ (Ac)), 1.48 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)), 1.33 (d, 3H, T^γ, J_{Tβ,Tγ} = 6.3 Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 170.3, 169.9, 169.8, 169.2 (4C, 4× C=O), 156.8 (1C, C=O (Urethan)), 143.8 (2C, C1a-, C8a (Fmoc)), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.3 (2C, C1-, C8-Fmoc), 119.9 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.2 (1C, C1), 82.9 (1C, C_q (*t*Bu)),), 77.6 (1C, T^β), 68.0, 67.5, 67.0 (4C, C3, C4, C5, CH₂ (Fmoc)), 61.8 (1C, C6), 59.2 (1C, T^α), 57.7 (1C, C2), 47.1 (1C, CH (Fmoc)), 27.9 (3C, CH₃ (*t*Bu)), 20.6 (3C, 3×CH₃ (Ac)), 18.9 (1C, T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**18**)^{48,118}**

(Fmoc-Thr(αAc₃GalNAc)-OtBu)



Zu einer Lösung von 26.0 g (Gemisch, max 36.6 mmol) Fmoc-

Thr(α -Ac₃GalN₃)-OtBu (**17**) in 660 ml THF/Acetanhydrid/Essigsäure (3:2:1) werden 28.0 g (428 mmol) Zink-Staub gegeben, der durch Aufschlännen in 500 ml einer 2%-igen CuSO₄-Lsg. aktiviert, mit Wasser und Ethanol gewaschen und mit Diethylether getrocknet wurde. Die Reaktionsmischung wird 17 Stunden bei Raumtemp. kräftig gerührt. Anschließend wird mit 500 ml THF verdünnt und über *Hyflo* filtriert. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand fünfmal i. Vak. mit Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird in 700 ml Dichlormethan aufgenommen und mit je 2×150 ml ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Produkts erfolgt durch Flashchromatographie (EE/CH 1:3→1:1). Hierbei werden 6.8 g unglycosylierte Aminosäure (**16**) zurückgewonnen.

Ausb.: 8.0 g (43%, 2 Stufen, bezogen auf umgesetzten Akzeptor); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.35 (EE/PE 3:1).

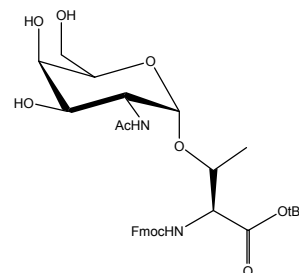
C₃₇H₄₆N₂O₁₃ (M = 726.77 g/mol) [726.30].

ESI-MS (positiv), m/z: 1475.7 (2M+Na)⁺, ber.: 1475.6), 749.3 ([M+Na]⁺, ber.: 749.3).

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5 Hz), 7.62 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5 Hz), 7.39 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4 Hz), 7.31 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.2 Hz), 5.92 (d, 1H, NH (Urethan), J_{NH,T α} = 9.5 Hz), 5.45 (d, 1H, NH (GalNAc), J_{NH,H2} = 9.5 Hz), 5.38 (d, 1H, H4, J_{H4,H5} = 2.2 Hz), 5.07 (dd, 1H, H3, J_{H3,H4} = 3.0 Hz, J_{H3,H2} = 11.6 Hz), 4.87 (d, 1H, H1, J_{H1,H2} = 3.0 Hz), 4.60 (dt, 1H, H2, J_{H2,H1} = 3.4 Hz, J_{H2,H3} = 10.7 Hz), 4.47-4.41 (m, 2H, CH₂ (Fmoc)), 4.29-4.01 (m, 6H, CH (Fmoc), H5, H6_{a,b}, T ^{α} , T ^{β}), 2.15, 2.02, 1.99 (3×s, 12H, 4×CH₃ (Ac)), 1.44 (s, 9H, CH₃ (tBu)), 1.31 (d, 3H, T ^{γ} , J_{TB,T γ} = 6.7 Hz).

¹³C-NMR (50.3 MHz, CDCl₃, BB, DEPT), δ [ppm]: 170.9, 170.3, 170.0 (5C, 4×C=O (Ac), C=O (Ester)), 156.4 (1C, C=O-Urethan), 143.7 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.1 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 100.0 (1C, C1), 83.2 (1C, C_q (tBu)), 77.2 (1C, T ^{β}), 68.7, 67.4 (4C, C3, C4, C5, CH₂ (Fmoc)), 62.1 (1C, C6), 58.9 (1C, T ^{α}), 47.3, 47.2 (2C, C2, CH (Fmoc)), 28.1 (3C, CH₃ (tBu)), 23.2 (1C, CH₃ (NAc)), 20.7, 20.6 (3C, 3×CH₃ (OAc)), 18.5 (1C, T ^{γ}).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**19**)^{48,132}
(Fmoc-Thr(α GalNAc)-OtBu)**



In 50 mL Methanol (HPLC-grade) werden 3.40 g (4.68 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OtBu (**18**) gelöst und tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen Lösung von Natriummethanolat in Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht ist. Es wird sechs Stunden bei Raumtemp. gerührt, wobei der pH-Wert jede halbe Stunde kontrolliert und gegebenenfalls durch erneute Zugabe von Methanolat-Lösung nachreguliert wird. Nach Abreagieren des Edukts (DC-Kontrolle) wird durch Zugabe von Kationenaustauscher (Amberlyst 15, stark sauer) neutralisiert. Der Austauscher wird abfiltriert, mit Methanol nachgewaschen und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgt durch Flashchromatographie (EE→EE/EtOH 20:1). Man erhält so 1.98 g (70%) des gewünschten Produkts. Durch anschließendes Spülen der Chromatographiesäule mit Methanol werden außerdem 505 mg (max. 1.33 mmol, 29%) des freien Amins (**19a**) in roher Form erhalten. Zur Blockierung wird das Amin in 30 mL Dichlormethan/Acetonitril 1:1 gelöst, mit 580 mg (1.72 mmol) Fmoc-OSu und 300 μ l (1.72 mmol) DIPEA versetzt und 14 Stunden gerührt. Die Lösung wird durch Zugabe von Kationenaustauscher (Amberlyst 15, stark sauer) neutralisiert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und nacheinander mit je 30 ml Wasser, ges. NaHCO₃-, 5%iger Citronensäure- und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der org Phase über Magnesiumsulfat wird das Ethylacetat i. Vak. abedestilliert. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (EE/EtOH 20:1→10:1) gereinigt. Dadurch werden weitere 552 mg (20%) des gewünschten Produkts erhalten.

Gesamtausb.: 2.53 g (90%), farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.16$ (EE/MeOH 20:1).

$C_{31}H_{40}N_2O_{10}$ (M = 600.66 g/mol) [600.27].

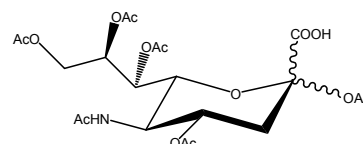
ESI-MS (positiv), m/z: 1201.6 ($[2M+H]^+$, ber.: 1201.5), 601.3 ($[M+H]^+$, ber.: 601.3).

1H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.73 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.5$ Hz), 7.59 (d, 2H, H₁-, H₈-Fmoc, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.2$ Hz), 7.37 (t, 2H, H₃-, H₆-Fmoc, $J_{H_3,H_2/H_4} = J_{H_6,H_5/H_7} = 7.3$ Hz), 7.29-7.25 (m, 2H, H₂-, H₇-Fmoc), 7.03 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{NH,H_2} = 6.3$ Hz), 5.94 (bs, 1H, NH (Urethan)), 4.85 (d, 1H, H₁, $J_{H_1,H_2} = 3.3$ Hz), 4.70 (bs, 1H, OH), 4.49-4.19 (m, 6H, CH₂ (Fmoc), CH (Fmoc), H₂, OH, T ^{β}), 4.16-4.11 (m, 1H, T ^{α}), 4.07 (s, 1H,

H4), 3.94-3.75 (m, 4H, H3, H5, H6_{a,b}), 3.45 (s, 1H, OH), 2.11 (s, 3H, CH₃ (NHAc)), 1.41 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)), 1.27 (d, 3H, T^γ, J_{T^γ,T^β} = 6.1 Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 173.9, 170.8 (2C, 2×C=O), 156.6 (1C, C=O (Urethan)), 143.7 (2C, (C1a- C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 124.7 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.5 (1C, C1), 83.1 (1C, C_q (*t*Bu)), 76.3 (1C, T^β), 70.6, 70.2, 69.3 (3C, C3, C4, C5), 67.2 (1C, CH₂ (Fmoc)), 62.3 (1C, C6), 59.0 (1C, T^α), 50.8, 47.2 (2C, C2, CH (Fmoc)), 28.0 (3C, CH₃ (*t*Bu)), 22.8 (1C, CH₃ (NHAc)), 18.9 (1C, T^γ).

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (20**)²³⁴**
(α,β Ac₅NeuNAcCOOH)

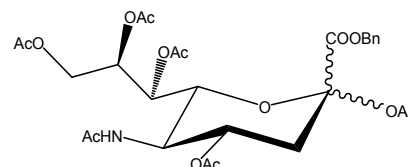


Zu einer Lösung von 10.00 g (32.3 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure in 140 ml Pyridin werden unter Eiskühlung 70 ml Acetanhydrid getropft. Es wird 6 Stunden bei Raumtemp. gerührt, und danach werden die Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird viermal mit Toluol und anschließend zweimal mit Dichlormethan i. Vak. kdestilliert. Das Rohprodukt wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

Ausb.: 16.80 g (quant.); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.40 (CH₂Cl₂/EE 5:1).

C₂₁H₂₉NO₁₄ (M = 519.45 g/mol) [519.16].

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (21**)²³⁴**
(α,β Ac₅NeuNAcCOOBn)



Eine Lösung von 16.80 g (32.3 mmol) α,β Ac₅NeuNAcCOOH (**20**) in 50 ml Ethanol wird mit 5.30 g (16.27 mmol) Cäsiumcarbonat in 10 ml Wasser versetzt. Nach Abklingen der Gasentwicklung wird noch 30 Minuten bei Raumtemp. nachgerührt. Das Ethanol wird i. Vak. entfernt, der Rückstand dreimal i. Vak. mit Toluol kdestilliert und anschließend in 90 ml DMF gelöst. 35 ml (292.62 mmol) Benzylbromid werden langsam zugetropft und die Lösung 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand in 50 ml Ethylacetat aufgenommen. Es wird von ausgefallenem Cäsiumbromid

abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (CH/EE 1:1→EE).

Man erhält 11.20 g einer Anomerenmischfraktion (α/β) und 5.70 g reines β -Anomer. Für die folgende Umsetzung können beide Anomeren eingesetzt werden.

Gesamtausb.: 16.90 g (86%); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f(\alpha) = 0.27$ (EE/CH 1:1); $R_f(\beta) = 0.18$ (EE/CH 1:1).

$C_{28}H_{35}NO_{14}$ (M = 609.58 g/mol) [609.21].

α/β :

Ausb.: 11.20 g (57%); farbloser, amorpher Feststoff.

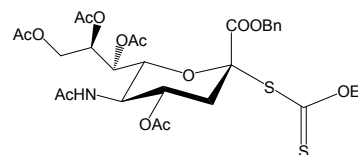
β -Anomer:

Ausb.: 5.70 g (29%); farbloser, amorpher Feststoff.

ESI-MS (positiv), m/z: 1241.6 ($[2M+Na]^+$, ber.: 1241.4), 632.3 ($[M+Na]^+$, ber.: 632.2).

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 7.32 (bs, 5H, H_{ar} (Bn)), 5.41-5.02 (m, 6H, $H_{4''}$, $H_{6''}$, $H_{7''}$, $H_{8''}$, CH_2 (Bn)), 4.42 (dd, 1H, $H_{9a''}$, $J_{H_{9a''},H_{9b''}} = 12.4$ Hz, $J_{H_{9a''},H_{8''}} = 2.6$ Hz), 4.15-4.04 (m, 3H, $H_{5''}$, $H_{9b''}$), 2.52 (dd, 1H, $H_{3_{äq}''}$, $J_{H_{3_{äq}''},H_{3_{ax}''}} = 13.4$ Hz, $J_{H_{3_{äq}''},H_{4''}} = 4.9$ Hz), 2.09, 2.08, 2.01, 1.99, 1.86 (5×s, 19H, 6× CH_3 (Ac), $H_{3_{ax}''}$).

***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 (**22**)²³⁴
(α Ac₄NeuNAcCOOBnXan)**



Unter Eiskühlung werden 4.92 g (8.07 mmol) α,β Ac₅NeuNAcCOOBn (**21**) in 30 ml Acetylchlorid gelöst. Die Lösung wird mit drei Tropfen dest. Wasser versetzt und drei Tage bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Anschließend wird das überschüssige Acetylchlorid i. Vak. abdestilliert und der Rückstand viermal mit je 20 ml Toluol i. Vak. kodestilliert. Das als Rohprodukt quantitativ erhaltene anomere Chlorid (4.73 g, farbloser Feststoff, $R_f = 0.54$ (EE)) wird in 100 ml absol. Ethanol gelöst und mit 2.30 g (14.35 mmol) Kaliummethylxanthogenat versetzt. Die Mischung wird 20 Stunden unter Argon und Lichtausschluß bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird mit 200 ml Dichlormethan verdünnt und mit je 100 ml Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (EE/CH 3:1→6:1) gereinigt.

Ausb. 3.50 g (65%, 2 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.26$ (EE); $[\alpha]_D^{23} = 46.9^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:¹¹⁸ $[\alpha]_D^{23} = 41.1^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_{13}\text{S}$ ($M = 671.74$ g/mol) [671.17].

ESI-MS (positiv), m/z : 1365.4 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1365.3), 694.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 694.2), 618.2 ($[\text{M}-\text{CS}_2+\text{Na}]^+$, ber.: 618.1).

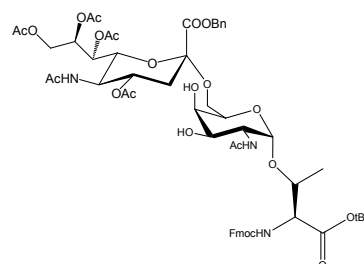
¹*H-NMR* (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.37-7.29 (m, 5H, H_{ar} (Bn)), 5.35-5.13 (m, 5H, NH, $\text{H7}''$, $\text{H8}''$, CH_2 (Bn)), 4.83 (td, 1H, $\text{H4}''$, $J_{\text{H4}'',\text{H5}''} = 11.4$ Hz, $J_{\text{H4}'',3\text{äq}''} = 4.7$ Hz), 4.54 (dd, 1H, $\text{H6}''$, $J_{\text{H6}'',\text{H5}''} = 10.7$ Hz, $J_{\text{H6}'',\text{H7}''} = 1.7$ Hz), 4.46-4.35 (m, 2H, CH_2 (Et)), 4.31 (dd, 1H, $\text{H9}_a''$, $J_{\text{H9}_a'',\text{H9}_b''} = 12.6$ Hz, $J_{\text{H9}_a'',\text{H8}''} = 2.3$ Hz), 4.18 (dd, 1H, $\text{H9}_b''$, $J_{\text{H9}_b'',\text{H9}_a''} = 12.4$ Hz, $J_{\text{H9}_b'',\text{H8}''} = 5.8$ Hz), 4.10-4.05 (m, 1H, $\text{H5}''$), 2.64 (dd, 1H, $\text{H3}_{\text{äq}''}$, $J_{\text{H3}_{\text{äq}'',\text{H3}_{\text{ax}''}} = 13.0$ Hz, $J_{\text{H3}_{\text{äq}'',\text{H4}''} = 4.6$ Hz), 2.11, 2.10, 1.99, 1.86 (4xs, 15H, $5\times\text{CH}_3$ (Ac)), 2.04-2.01 (m, 1H, $\text{H3}_{\text{ax}''}$), 1.19 (t, 3H, CH_3 (Et), $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7.1$ Hz).

¹³*C-NMR* (75.5 MHz, CDCl_3 , BB, DEPT), δ [ppm]: 207.0 (1C, C=S), 170.7, 170.5, 170.3, 170.1 (5C, $5\times\text{C}=\text{O}$), 167.8 (1C, $\text{C1}''$), 134.9 (1C, C_q (Bn)), 128.7, 128.6, 127.9 (5C, C_{ar} (Bn)), 86.5 (1C, $\text{C2}''$), 75.2, 70.4, 68.7, 67.8 (4C, $\text{C4}''$, $\text{C6}''$, $\text{C7}''$, $\text{C8}''$), 70.5, 67.9 (2C, CH_2 (Bn), CH_2 (Et)), 62.0 (1C, $\text{C9}''$), 49.1 (1C, $\text{C5}''$), 37.1 (1C, $\text{C3}''$), 23.1 (1C, CH_3 (NHAc)), 21.0, 20.8, 20.7 (4C, $4\times\text{CH}_3$ (OAc)), 13.0 (1C, CH_3 (Et)).

Herstellung einer Methylsulphenylbromid-Lösung (1.6 M in Dichlorethan):¹⁴⁹

709 μl (7.99 mmol) Dimethyldisulfid werden unter Argonatmosphäre in 10 ml absol. Dichlorethan gelöst und mit 410 ml (7.99 mmol) Brom versetzt. Die Lösung wird unter Lichtausschluß bei Raumtemp. 20 Stunden gerührt. Für die Sialylierungsreaktionen wird jeweils eine maximal zwei Tage alte Lösung verwendet.

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonin-*tert*-butylester (23)^{48,132}
(Fmoc-Thr($\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn}$ -(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-*O*tBu)**



Eine Lösung von 1.20 g (2.00 mmol) Fmoc-Thr(α GalNAc)-*O**t*Bu (**19**) und 3.36 g (5.00 mmol) Ac₄NeuNAcCOOBn-Xan (**22**) in 60 ml absol. Acetonitril/absol. Dichlormethan (2:1) wird mit 5 g Molekularsieb (4 Å, Pulver) versetzt und 2 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Anschließend kühlt man die Mischung auf –65 °C ab und gibt unter Lichtausschluß 1.30 g (5.06 mmol) Silbertriflat hinzu. Über einen Zeitraum von 45 Minuten werden 3.20 ml (5.12 mmol) einer auf –4 °C vorgekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M in absol. Dichlorethan, s. o.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 3.5 Stunden bei –65 °C unter Lichtausschluß gerührt. Anschließend wird durch Zugabe von 870 µl DIPEA neutralisiert, noch weitere 15 Minuten bei –65 °C gerührt und dann auf Raumtemp. erwärmt. Die Mischung wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt, über *Hyflo* filtriert und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (EE→EE/EtOH 40:1) gereinigt.

Ausb.: 1.20 g (52%); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.30$ (EE/EtOH 10:1).

C₅₇H₇₁N₃O₂₂ (M = 1150.18 g/mol) [1149.45].

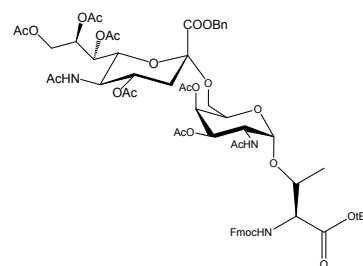
ESI-MS (positiv), m/z : 1172.6 ([M+Na]⁺, ber. 1172.4).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.74 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz), 7.60 (d, 2H, H₁-, H₈-Fmoc, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.3$ Hz), 7.41-7.25 (m, 9H, H₃-, H₆-, H₂-, H₇-Fmoc, H_{ar} (Bn)), 6.65 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{NH,H_2} = 7.0$ Hz), 5.55 (d, 1H, NH (Urethan), $J_{NH,T\alpha} = 9.1$ Hz), 5.37-5.25 (m, 2H, H₇'', H₈''), 5.28 (d, 1H, CH_{2a} (Bn), $J_{a,b} = 12.3$ Hz), 5.20 (d, 1H, CH_{2b} (Bn), $J_{b,a} = 12.5$ Hz), 4.88-4.76 (m, 1H, H₄''), 4.79 (d, 1H, H₁, $J_{H_1,H_2} = 3.2$ Hz), 4.44 (d, 2H, CH₂ (Fmoc), $J_{CH_2,CH} = 6.9$ Hz), 4.34 (dd, 1H, H_{9a}'', $J_{H_9a'',H_9b''} = 12.5$ Hz, $J_{H_9a'',H_8''} = 2.2$ Hz), 4.27-4.15 (m, 3H, CH (Fmoc), H₂, T ^{α}), 4.11-3.98 (m, 4H, T ^{β} , H₅'', H₆'', H_{9b}''), 3.90 (dd, 1H, H_{6a}, $J_{H_6a,H_6b} = 10.4$ Hz, $J_{H_6a,H_5} = 7.5$ Hz), 3.73-3.65 (m, 3H, H₅, H₄, H₃), 3.48 (dd, 1H, H_{6b}, $J_{H_6b,H_6a} = 10.3$ Hz, $J_{H_6b,H_5} = 3.8$ Hz), 2.59 (dd, 1H, H_{3äq}'', $J_{H_3äq'',H_3ax''} = 12.8$ Hz, $J_{H_3äq'',H_4''} = 4.5$ Hz), 2.10, 2.09, 2.05, 2.02, 2.00, 1.85 (6×s, 6×3H, 6×CH₃ (Ac)), 1.94-1.91- (m, 1H, H_{3ax}''), 1.44 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)), 1.25 (d, 3H, T ^{γ} , $J_{T\gamma,T\beta} = 7.1$ Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 171.9, 171.6, 171.0, 170.8, 170.4, 170.1 (7C, 7×C=O), 167.5 (1C, C₁''), 156.4 (1C, C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (2C, C_{1a}-, C_{8a}-Fmoc), 141.3 (2C, C_{4a}-, C_{5a}-Fmoc), 134.8 (1C, C_q (Bn)), 128.9, 128.7, 128.8, 128.6 (5C, C_{ar} (Bn)), 127.7 (2C, C₃-, C₆-Fmoc), 127.1 (2C, C₂-, C₇-Fmoc), 125.0 (2C, C₁-, C₈-Fmoc), 120.0 (2C, C₄-, C₅-Fmoc), 99.4 (1C, C₁), 98.7 (1C, C₂''), 83.2 (1C, C_q (*t*Bu)), 76.8 (1C, T ^{β}), 72.8 (1C,

C6''), 70.4 (1C, C3), 69.4, 69.2 (2C, C5, C7''), 68.9 (1C, C4''), 68.5 (1C, C4), 67.9 (1C, CH₂ (Bn)), 67.5 (1C, C8''), 67.2 (1C, CH₂ (Fmoc)), 64.5 (1C, C6), 62.5 (1C, C9''), 59.1 (1C, T^α), 51.3 (1C, C2), 49.3 (1C, C5''), 47.2 (1C, CH (Fmoc)), 37.4 (1C, C3''), 28.0 (3C, CH₃ (*t*Bu)), 23.1, 22.4 (2C, 2×CH₃ (NHAc)), 21.1, 21.0 (4C, 4×CH₃ (OAc)), 18.7 (1C, T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonin-*tert*-butylester (**24**)²³⁴
(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-*O**t*Bu)**



Eine Lösung von 550 mg (0.48 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α GalNAc)-*O**t*Bu (**23**) in 8 ml Pyridin wird auf 0 °C abgekühlt und langsam mit 4 ml Acetanhydrid versetzt. Es wird 30 Minuten im Eisbad und anschließend 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird mit 30 ml Dichlormethan verdünnt und überschüssiges Acetanhydrid durch Zugabe von Eis hydrolysiert. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit je 30 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden zweimal mit je 30 ml ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit 30 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und dann über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und das Rohprodukt durch Flashchromatographie (100% EE) gereinigt.

Ausb.: 450 mg (76%); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.23 (EE).

C₆₁H₇₅N₃O₂₄ (M = 1234.25 g/mol) [1233.47].

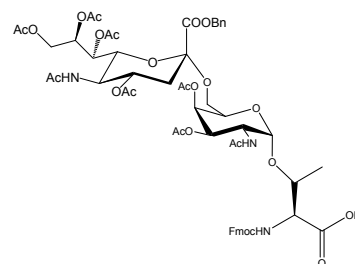
ESI-MS (positiv), m/z: 2490.9 ([2M+Na]⁺, ber. 2490.9), 1256.5 ([M+Na]⁺, ber. 1256.5).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4 Hz), 7.63 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.3 Hz), 7.41-7.21 (m, 9H, H3-, H6-, H2-, H7-Fmoc, H_{ar} (Bn)), 5.93 (d, 1H, NH (GalNAc), J_{NH,H2} = 9.9 Hz), 5.56 (d, 1H, NH (Urethan), J_{NH,T α} = 9.3 Hz), 5.33-5.05 (m, 5H, H7'', H8'', CH₂ (Bn), H4), 4.96 (dd, H3, J_{H3,H2} = 11.2 Hz, J_{H3,H4} = 3.0 Hz), 4.84-4.73 (m, 2H, H1, H4''), 4.53 (dd, 1H, H2, J_{H2,H3} = 11.3 Hz, J_{H2,H1} = 3.6 Hz), 4.45 (d, 2H, CH₂ (Fmoc), J_{CH₂,CH} = 6.9 Hz), 4.30-4.11 (m, 4H, CH (Fmoc), H9_a'', T^α, T^β), 4.08-3.98 (m, 3H, H6'', H5'', H9_b''), 3.96-3.88 (m, 1H, H5), 3.82-3.74 (m, 1H, H6_a),

3.10 (dd, 1H, H_{6b}, J_{H_{6b},H_{6a}} = 10.3 Hz, J_{H_{6b},H₅} = 4.3 Hz), 2.54 (dd, 1H, H_{3_{äq}''}, J_{H_{3_{äq}''},H_{3_{ax}''}} = 12.7 Hz, J_{H_{3_{äq}''},H₄''} = 4.6 Hz), 2.10, 2.07, 2.03, 2.02, 2.00, 1.99, 1.98 (7xs, 22H, 7×CH₃ (Ac), H_{3_{ax}''}), 1.84 (s, 3H, CH₃ (Ac)), 1.43 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)), 1.28 (d, 3H, T^γ, J_{T^γ,T^β} = 6.3 Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 170.9, 170.8, 170.5, 170.4, 170.2, 170.1, 169.6, (9C, 9×C=O), 167.3 (1C, C1''), 156.5 (1C, C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 134.7 (1C, C_q (Bn)), 129.0, 128.8, 128.7 (5C, C_{ar} (Bn)), 127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.1 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 100.0 (1C, C1), 98.6 (1C, C2''), 83.1 (1C, C_q (*t*Bu)), 77.2 (1C, T^β), 72.6 (1C, C6''), 68.9 (2C, C3, C4''), 68.5 (1C, C5), 68.0 (1C, C7''), 67.9 (1C, CH₂ (Bn)), 67.6 (1C, C4), 67.3 (1C, CH₂ (Fmoc)), 67.1 (1C, C8''), 63.9 (1C, C6), 62.4 (1C, C9''), 59.1 (1C, T^α), 49.2 (1C, C5''), 47.3, 47.2 (2C, C2, CH (Fmoc)), 37.6 (1C, C3''), 28.1 (3C, CH₃ (*t*Bu)), 23.2, 23.1 (2C, 2×CH₃ (NHAc)), 21.0, 20.8, 20.7, 20.6 (6C, 6×CH₃ (OAc)), 18.6 (1C, T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonin (25)²³⁴
(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-OH)**



Eine Lösung von 350 mg (0.28 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-*O**t*Bu (**24**) in 5 ml Dichlormethan wird nacheinander mit 500 μ l Anisol und 5 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wird 2.5 Stunden bei Raumtemp. geschüttelt und dann mit 20 ml Toluol verdünnt. Die Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt und der Rückstand noch viermal mit je 20 ml Toluol und anschließend zweimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (EE/MeOH 3:1) gereinigt.

Ausb.: 280 mg (84%); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.26 (EE/MeOH 2:1); [α]_D²³ = 36.2° (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:²³⁴ [α]_D²³ = 29.1° (c = 1.00, CHCl₃).

C₅₇H₆₇N₃O₂₄ (M = 1178.15 g/mol) [1177.41].

ESI-MS (positiv), m/z: 1200.4 (M+Na⁺, ber. 1200.4).

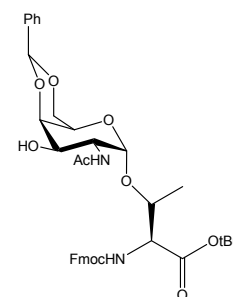
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.72 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.4$ Hz), 7.56 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.2$ Hz), 7.39-7.22 (m, 9H, H3-, H6-, H2-, H7-Fmoc, H_{ar} (Bn)), 6.76 (bs, 1H, NH (NeuNAc)), 6.04 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{\text{NH,H2}} = 9.6$ Hz), 5.81 (bs, 1H, NH (Urethan)), 5.38-4.70 (m, 8H, H1, H4'', H7'', H8'', CH_2 (Bn), CH_2 (Fmoc)), 4.58-3.72 (m, 11H, H2, H3, H5, H6_a, H5'', H6'', H9_{a,b}'', T^α , T^β , CH (Fmoc)), 3.18-3.06 (m, 1H, H6_b), 2.54 (dd, 1H, H3_{äq}'', $J_{\text{H3äq}'',\text{H3ax}''} = 12.8$ Hz, $J_{\text{H3äq}'',\text{H4}''} = 4.5$ Hz), 2.08, 2.07, 2.06, 2.00, 1.99, 1.98, 1.93, 1.84 (8 \times s, 25H, 8 \times CH₃ (Ac), H3_{ax}''), 1.24 (d, 3H, T^γ , $J_{\text{T}^\gamma,\text{T}^\beta} = 6.2$ Hz)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , BB), δ [ppm]: 172.9, 172.1, 170.6, 170.5, 170.4, 170.1, 169.7, 169.6 (8C, 8 \times C=O), 167.3 (1C, C1''), 156.6 (1C, C=O (Urethan)), 143.8, 143.6 (2C, C1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 134.7 (1C, C_q (Bn)), 129.0, 128.8, 128.6 (5C, C_{ar} (Bn)), 127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.2 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 99.6 (1C, C1), 98.6 (1C, C2''), 77.2 (1C, T^β), 72.5, 68.9, 68.4, 68.2, 68.1, 67.9, 67.6, 67.1 (9C, C3, C4, C5, C4'', C6'', C7'', C8'', CH_2 (Bn), CH_2 (Fmoc)), 63.8, 62.4 (2C, C6, C9''), 58.6 (1C, T^α), 49.2 (1C, C5''), 47.8, 47.2 (2C, C2, CH (Fmoc)), 37.6 (1C, C3''), 23.1, 22.9 (2C, 2 \times CH₃ (NHAc)), 21.0, 20.8, 20.7, 20.6 (6C, 6 \times CH₃ (OAc)), 18.2 (1C, T^γ).

5.2.4 Synthese des (2,3)-Sialyl-T-Antigen-Bausteins

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (26)¹¹⁸**

(Fmoc-Thr(α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu)**



Eine Lösung von 2.45 g (4.08 mmol) Fmoc-Thr(α GalNAc)-*O**t*Bu (**19**) in 100 ml Acetonitril (HPLC-grade) wird mit 2.50 ml Benzaldehyddimethylacetal (16.6 mmol) versetzt. Durch Zugabe von zwei Spatelspitzen *p*-Toluolsulfonsäure wird der pH-Wert der Lösung auf ~ 4 eingestellt, und es wird 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionsmischung wird durch Zugabe von fünf Tropfen Triethylamin neutralisiert und das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (CH/EE 1:1) gereinigt.

Ausb.: 2.42 g (86%); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.55$ (Tol/EtOH 4:1); $R_f = 0.38$ (EE/PE 3:1); $R_f = 0.27$ (PE/EE 3:1).

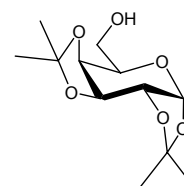
$C_{34}H_{35}N_2O_9$ (M = 615.65 g/mol) [615.23].

ESI-MS (positiv), m/z: 1415.9 ($[2M+K]^+$, ber. 1415.6), 1399.9 ($[2M+Na]^+$, ber. 1400.5), 727.4 ($[M+K]^+$, ber. 727.4), 711.5 ($[M+Na]^+$, ber. 711.3), 689.5 ($[M+H]^+$, ber. 689.3).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 7.76 (d, 2H, H-4, H-5 (Fmoc), $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.3$ Hz), 7.61 (d, 2H, H1-, H-8 (Fmoc), $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.3$ Hz), 7.52-7.48 (m, 2H, H2-, H3- (Fmoc)), 7.41-7.28 (m, 7H, H6-, H7- (Fmoc), H_{ar} (Bzn)), 6.51 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{NH,H2} = 8.4$ Hz), 5.55 (s, 1H, CH (Bzn)), 5.51 (d, 1H, NH (Urethan), $J_{NH,T\alpha} = 9.7$ Hz), 4.94 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz), 4.51-4.39 (m, 3H, H2, CH_2 (Fmoc)), 4.28-4.02 (m, 6H, H5, $H_{6a,b}$, CH (Fmoc), T^α , T^β), 3.85 (dd, 1H, H3, $J_{H3,H2} = 10.8$ Hz, $J_{H3,H4} = 2.9$ Hz), 3.69 (s, 1H, H4), 2.77 (bs, 1H, OH), 2.08 (s, 3H, CH_3 (Ac)), 1.45 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)), 1.27 (d, 3H, T^γ , $J_{T^\gamma,T^\beta} = 6.9$ Hz).

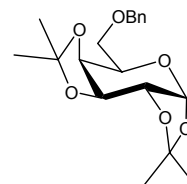
^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$, BB), δ [ppm]: 172.6, 170.8 (2C, C=O), 156.4 (1C, C=O (Urethan)), 143.7 (2C, C1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 137.5 (1C, C_q (Bzn)), 129.1, 128.2, 126.3 (5C, C_{ar} (Bzn)), 127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.0 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 101.2 (1C, CH (Bzn)), 100.4 (1C, C1), 83.4 (1C, C_q (*t*Bu)), 76.7 (1C, T^β), 75.5 (1C, C3), 69.7 (1C, C4), 69.2 (1C, CH_2 (Fmoc)), 67.2 (1C, C6), 63.7 (1C, C5), 58.9 (1C, T^α), 50.5 (1C, C2), 47.2 (1C, CH (Fmoc)), 28.1 (3C, CH_3 (*t*Bu)), 23.0 (1C, CH_3 (NHAc)), 19.0 (1C, T^γ).

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (27)^{118,159}



In einer Lösung von 6.0 g (34.0 mmol) D-Galactose in 100 ml Aceton werden 14.0 g (87.7 mmol) wasserfreies Kupfersulfat suspendiert. Die Mischung wird mit 1 ml konz. Schwefelsäure versetzt und 24 Stunden bei Raumtemp. kräftig gerührt. Es wird mit Calciumhydroxid neutralisiert und über *Hyflo* filtriert. Das Aceton wird i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wird nach Trocknung i. Hochvak. ohne sonstige Reinigung weiter umgesetzt.
Ausb.: 9.0 g (quant.); gelbes Öl; $R_f = 0.34$ (PE/EE 1:1).

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

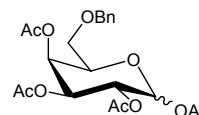
6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (28)^{118,159,160}

Eine Lösung von 9.0 g (max. 34.0 mmol) roher 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**27**) in 70 ml DMF wird auf 0 °C abgekühlt und unter Argon portionsweise mit 2.3 g (57.5 mmol) Natriumhydrid (60%ige Dispersion in Mineralöl) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 30 Minuten bei 0 °C und anschließend 30 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Nach erneutem Abkühlen auf 0 °C werden 6.2 ml (51.0 mmol) Benzylbromid in 10 ml DMF zugetropft. Anschließend wird 16 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 10 ml Methanol wird das DMF destillativ i. Vak. entfernt und noch dreimal i. Vak. mit Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 300 ml Dichlormethan aufgenommen. Es wird dreimal mit je 100 ml Wasser und einmal mit 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH/EE 7:1) gereinigt.

Ausb.: 9.5 g (80%, bezogen auf D-Galactose); gelb-oranges Öl; $R_f = 0.29$ (PE/EE 5:1).

$C_{19}H_{26}O_6$ (M = 350.41 g/mol) [350.17].

ESI-MS (positiv), m/z: 723.4 ($[2M+Na]^+$, ber.: 723.3), 373.2 ($[M+Na]^+$, ber.: 373.2).

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α,β -D-galactopyranose (29)¹¹⁸
(α,β Ac₄-6-Bn-Gal)

Eine Lösung von 9.50 g (27.1 mmol) 6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**28**) in 200 ml 75%-iger Essigsäure wird 4 Stunden bei 85 °C gerührt. Das Essigsäure-Wasser-Gemisch wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand viermal i. Vak. mit Toluol kodestilliert. Das so erhaltene gelbe Öl (rohe 6-*O*-Benzyl- α,β -D-galactopyranose) wird in 70 ml Pyridin gelöst, auf 0 °C abgekühlt und unter Rühren langsam mit 35 ml Acetanhydrid versetzt. Die Lösung wird unter langsamem Erwärmen auf Raumtemp. 36 Stunden gerührt. Pyridin und überschüssiges Acetanhydrid werden i. Vak. abdestilliert und der Rückstand i. Vak. fünfmal mit Toluol kodestilliert. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (CH/EE 3:1) gereinigt. Man erhält ein Gemisch aus α - und β -Anomer, welches ohne Trennung in der nächsten Reaktion eingesetzt wird.

Ausb.: 8.92 g (75%, 2 Stufen); gelbliches, hochviskoses Öl; $R_f = 0.38$ (CH/EE 1:1).

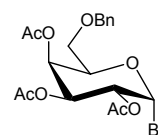
$C_{21}H_{26}O_{10}$ (M = 438.43 g/mol) [438.15].

ESI-MS (positiv), m/z : 477.2 ($[M+K]^+$, ber.: 477.2), 461.3 ($[M+Na]^+$, ber.: 461.1).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 7.36-7.26 (m, 10H, H_{ar} (Bn)), 6.34 (d, 1H, $H1\alpha'$, $J_{H1\alpha',H2\alpha'} = 2.8$ Hz), 5.67 (d, 1H, $H1\beta'$, $J_{H1\beta',H2\beta'} = 8.3$ Hz), 5.55 (bs, 1H, $H4\alpha'$), 5.49 (d, 1H, $H4\beta'$, $J_{H4\beta',H3\beta'} = 3.4$ Hz, $J_{H4\beta',H5\beta'} = 1.0$ Hz), 5.32-5.26 (m, 3H, $H2\alpha'$, $H2\beta'$, $H3\alpha'$), 5.05 (dd, 1H, $H3\beta'$, $J_{H3\beta',H2\beta'} = 10.4$ Hz, $J_{H3\beta',H4\beta'} = 3.4$ Hz), 4.53, 4.37 (2×d, 4H, 2× CH_2 (Bn), $J_{a,b} = 12.0$ Hz), 4.28 (t, 1H, $H5\alpha'$, $J_{H5\alpha',H6\alpha'} = 6.7$ Hz), 4.00 (t, 1H, $H5\beta'$, $J_{H5\beta',H6\beta'} = 6.6$ Hz), 3.56-3.32 (m, 4H, $H6_{a,b\alpha,\beta'}$), 2.12, 2.08, 2.03, 2.01, 1.99, 1.97 (7×s, 24H, 8× CH_3 (Ac)).

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosylbromid (**30**)⁴⁸

(α Ac₃-6-Bn-GalBr)



Zu einer auf 0 °C abgekühlten Lösung von 4.60 g (10.49 mmol) α,β Ac₄-6-Bn-Gal (**29**) in 70 ml absol. Dichlormethan werden unter Argon 30 ml HBr in Eisessig (33%) innerhalb von 20 Minuten getropft. Es wird noch 10 Minuten unter Eiskühlung gerührt, bevor die Reaktionsmischung zur Hydrolyse in 60 ml Eiswasser gegossen wird. Man verdünnt mit 150 ml Dichlormethan, trennt die org. Phase ab und wäscht sie nacheinander mit je 2×200 ml ges. $NaHCO_3$ - und 10%iger $Na_2S_2O_3$ -Lösung. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene gelbe Öl wird durch zügige Flashchromatographie (kurze, breite Säule; EE/CH 4:1) gereinigt.

Ausb.: 2.50 g (52%); gelbliches Öl; $R_f = 0.35$ (PE/EE 3:1).

$C_{19}H_{23}BrO_8$ ($M = 459.29$ g/mol) [458.08].

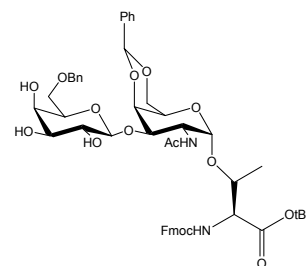
1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 7.36-7.20 (m, 5H, H_{ar} (Bn)), 6.69 (d, 1H, $H1'$, $J_{H1',H2'} = 4.0$ Hz), 5.56 (dd, 1H, $H4'$, $J_{H4',H3'} = 3.2$ Hz), 5.39 (dd, 1H, $H3'$, $J_{H3',H2'} = 10.6$ Hz, $J_{H3',H4'} = 3.3$ Hz), 5.01 (dd, 1H, $H2'$, $J_{H2',H1'} = 3.9$ Hz, $J_{H2',H3'} = 10.6$ Hz), 4.54 (d, 1H, CH_{2a} (Bn), $J_{a,b} = 12.0$ Hz), 4.44 (t, 1H, $H5'$, $J_{H5',H6a,b'} = 6.3$ Hz), 4.40 (d, 1H, CH_{2b} (Bn), $J_{a,b} = 12.0$ Hz), 3.50 (dd, 2H, $H6_{a,b'}$, $J_{H6a',H5'} = 9.1$ Hz, $J_{H6b',H5'} = 6.4$ Hz), 2.09, 2.02, 1.99 (3×s, 9H, 3× CH_3 (Ac)).

^{13}C -NMR (50.3 MHz, $CDCl_3$, BB), δ [ppm]: 170.1, 169.8, 169.7 (3C, 3×C=O), 137.3 (1C, C_q (Bn)), 129.0, 128.5, 127.9 (5C, C_{ar} (Bn)), 88.6 (1C, $C1'$), 73.5 (1C, CH_2 (Bn)), 72.1, 68.2, 68.0, 67.4 (4C, $C2'$, $C3'$, $C4'$, $C5'$), 66.7 (1C, $C6'$), 20.7, 20.6, 20.5 (3C, 3× CH_3 (Ac)).

C8-Fmoc), 120.1 (2C, C4-, C5-Fmoc), 101.7 (1C, C1'), 100.6 (1C, CH (Bzn)), 100.3 (1C, C1), 83.2 (1C, C_q (*t*Bu)), 76.1 (1C, T^β), 75.5 (1C, C4), 74.9 (1C, C3), 73.5 (1C, CH₂ (Bn)), 72.2 (1C, C5'), 71.2 (1C, C3'), 69.0 (1C, C6), 68.9 (1C, C2'), 68.0 (1C, C6'), 67.6 (1C, C4'), 66.9 (1C, CH₂ (Fmoc)), 63.7 (1C, C5), 59.0 (1C, T^α), 47.9 (1C, C2), 47.2 (1C, CH (Fmoc)), 28.1 (3C, CH₃ (*t*Bu)), 23.5 (1C, CH₃ (NHAc)), 20.8, 20.7, 20.6 (3C, 3×CH₃ (OAc)), 18.9 (1C, T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[6-*O*-benzyl-β-*D*-galacto-pyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butyl-ester (32)^{48,118}**

(Fmoc-Thr(β6-Bn-Gal-(1→3)-α4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu)**



Eine Lösung von 1.91 g (1.79 mmol) Fmoc-Thr(βAc₃-6-Bn-Gal-

(1→3)-α4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu (31) in 25 ml Methanol (HPLC-grade) wird unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes langsam mit einer 1%-igen Lösung von Natriummethanolat in Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 9.0 erreicht ist. Es wird 7 Stunden gerührt, wobei im Abstand von 30 Minuten der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert wird. Nachdem dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr nachweisbar ist, wird mit Kationenaustauscher (Amberlyst 15, stark sauer) neutralisiert. Der Austauscher wird abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (EE→EE/MeOH 25:1) gereinigt, wobei 780 mg (46%) des Produkts erhalten werden. Durch anschließendes Spülen der Chromatographiesäule mit MeOH werden außerdem 644 mg (max. 50%, 0.90 mmol, M = 718.79 g/mol) des als Nebenprodukt gebildeten freien Amins in roher Form isoliert. Zum Blockieren des Amins wird es in 20 ml Dichlormethan/Acetonitril 1:1 gelöst und mit 363 mg (1.08 mmol) Fmoc-OSu versetzt. Nach Zugabe von 184 μl (1.07 mmol) DIPEA wird die Reaktionsmischung 19 Stunden gerührt. Die Lösung wird i. Vak eingeeengt und der Rückstand in 50 ml Ethylacetat aufgenommen. Die org. Phase wird zweimal mit je 15 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Durch flashchromatographische Reinigung (EE→EE/MeOH 30:1) des Rückstands erhält man weitere 710 mg (42%) des gewünschten Produkts.

Gesamtausbeute: 1.49 g (88%); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.48 (EE/EtOH 20:1); R_f = 0.44 (Toluol/Ethanol 4:1).

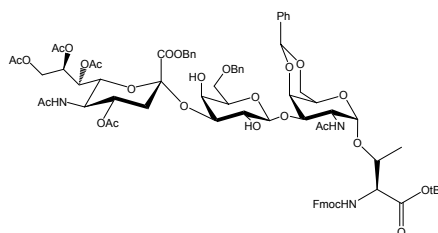
$C_{51}H_{60}N_2O_{15}$ ($M = 941.03$ g/mol) [940.40].

ESI-MS (positiv), m/z : 979.3 ($[M+K]^+$, ber.: 979.4), 963.3 ($[M+Na]^+$, ber.: 963.3), 941.2 ($[M+H]^+$, ber.: 941.4), 689.2 ($[M-Gal+H]^+$, ber.: 689.3).

^1H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.0$ Hz), 7.62 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz), 7.49 (d, 2H, H_{ar} (Bzn), $J_{a,b} = 6.8$ Hz), 7.41-7.21 (m, 12H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, $3 \times H_{ar}$ (Bzn), $5 \times H_{ar}$ (Bn)), 6.37 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{NH,H2} = 8.7$ Hz), 5.75 (d, 1H, NH (Urethan), $J_{NH,T\alpha} = 9.9$ Hz), 5.42 (s, 1H, CH (Bzn)), 4.94 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.1$ Hz), 4.67-4.42 (m, 5H, H2, CH_2 (Fmoc), CH (Bn)), 4.33-4.02 (m, 6H, H4, H6_a, H1', CH (Fmoc), T ^{α} , T ^{β}), 3.92-3.52 (m, 8H, H3, H5, H6_b, H3', H4', H5', H6_{a,b}'), 3.51-3.39 (m, 1H, H2'), 3.35, 2.80, 2.33 ($3 \times s$, $3 \times 1H$, $3 \times OH$), 2.03 (s, 3H, CH_3 (Ac)), 1.42 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)), 1.26-1.21 (m, 3H, T ^{γ}).

$^{13}C-NMR$ (75.5 MHz, $CDCl_3$, BB, DEPT), δ [ppm]: 172.2, 170.7, 170.3 (5C, $5 \times C=O$), 156.6 (1C, C=O (Urethan)), 143.7 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 138.3, 137.7 (2C, C_q (Bzn), C_q (Bn)), 129.0, 128.8, 128.4, 128.2, 127.8, 126.7, 126.0 (10C, C_{ar} (Bzn), C_{ar} (Bn)), 127.7 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1, (2C, C2-, C7-Fmoc) 125.3, 125.1 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 101.1 (1C, C1'), 100.5 (1C, CH (Bzn)), 100.3 (1C, C1), 83.2 (1C, C_q (*t*Bu)), 76.5 (1C, T ^{β}), 75.7 (1C, C4), 75.0 (1C, C3), 73.8 (1C, CH_2 (Bn)), 73.5 (1C, C5'), 70.8 (1C, C3'), 69.3 (1C, C6), 69.0 (1C, C2'), 68.6 (1C, C6'), 67.6 (1C, C4'), 67.1 (1C, CH_2 (Fmoc), 63.6 (1C, C5), 59.1 (1C, T ^{α}), 48.2 (1C, C2), 47.2 (1C, CH (Fmoc)), 28.1 (3C, CH_3 (*t*Bu)), 23.5 (1C, CH_3 (NHAc)), 21.5, 21.3 (3C, $3 \times CH_3$ (OAc)), 19.0 (1C, T ^{γ}).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-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-threonin-*tert*-butylester (33)^{48,118}**
(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)- β 6-Bn-Gal-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu)



Eine Lösung von 550 mg (0.58 mmol) Fmoc-Thr(β 6-Bn-Gal-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu (32) und 982 mg (1.46 mmol, 2.5 eq.) α Ac₄NeuNAcCOOBn-Xan (22) in 20 ml absol.

Dichlormethan/absol. Acetonitril 1:1 wird mit 1.2 g Molekularsieb (4Å, Kugeln) versetzt und eine Stunde bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Man kühlt die Reaktionsmischung auf -65°C ab gibt unter Lichtausschluss 380 mg (1.48 mmol) AgOTf, gelöst in 10 ml absol. Acetonitril zu. Anschließend werden 920 µl (1.47 mmol) einer MeSBr-Lösung (1.6 M in absol. Dichlorethan, s. S. 145) über einen Zeitraum von 30 Minuten langsam zugetropft. Die Reaktion wird unter Lichtausschluss fünf Stunden bei -50 bis -60°C und anschließend 12 Stunden bei -30 °C gerührt. Dann wird durch Zugabe von 300 µl (1.74 mmol) DIPEA neutralisiert und auf Raumtemp. erwärmt. Die Reaktionsmischung wird mit 50 ml Dichlormethan verdünnt, über *Hyflo* filtriert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (EE→EE/EtOH 50:1) gereinigt.

Ausb.: 560 mg (64%); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.46$ (Toluol/EtOH 4:1); $R_f = 0.37$ (EE/EtOH 10:1).

$C_{77}H_{91}N_3O_{27}$ (M = 1490.55 g/mol) [1489.58].

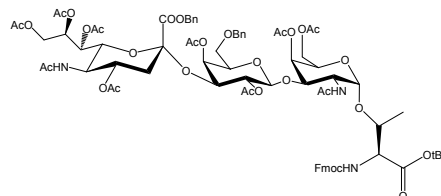
ESI-MS (positiv), m/z: 1512.6 ($[M+Na]^+$, ber.: 1512.6).

1H -NMR (400 MHz, COSY, $CDCl_3$, δ (ppm): 7.77 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz), 7.59 (dd, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$ Hz), 7.51 (d, 2H, H_{ar} (Bzn), $J_{a,b} = 6.8$ Hz), 7.43-7.38 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc), 7.375-7.28 (m, 15H, H3-, H6-Fmoc, H_{ar} (Bzn, 3H), H_{ar} (2×Bn, 10H)), 6.55 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{NH,H2} = 9.2$ Hz), 6.40 (d, 1H, NH (Urethan), $J_{NH,T\alpha} = 10.2$ Hz), 5.46 (s, 1H, CH (Bzn)), 5.44-5.38 (m, 1H, H8''), $J_{H9'',H8''} = 6.7$ Hz), 5.34-5.13 (m, 2H, NH (NeuNAc), H7''), 5.17 (s, 2H, CH_2 (Bn)), 5.00 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz), 4.96-4.88 (m, 1H, H4''), 4.74-4.64 (m, 1H, H2), 4.56 (s, 2H, CH_2 (Bn)), 4.53-4.00 (m, 11H, H9''_a {4.51}, CH_2 (Fmoc) {4.40}, T ^{β} {4.39}, H4 {4.29}, T ^{α} {4.24}, CH (Fmoc) {4.21}, H1' {4.16}, H6_a {4.16}, H6'_a {4.16}, H5'' {4.10}), 3.93-3.80 (m, 4H, H6_b {3.89}, H9''_b {3.89}, H6'' {3.85}, H3' {3.83}), 3.71-3.40 (m, 6H, H3 {3.68}, H5' {3.62}, H6'_b {3.62}, H2' {3.60}, H5 {3.60}, H4' {3.48}), 2.92 (bs, 1H, OH), 2.71 (dd, 1H, H3''_{äq}, $J_{H3''\text{äq},H3''\text{ax}} = 12.7$ Hz, $J_{H3''\text{äq},H4''} = 4.4$ Hz), 2.43 (s, 1H, OH), 2.09 (s, 6H, 2× CH_3 (Ac)), 2.03 (s, 3H, CH_3 (Ac)), 2.01-1.98 (m, 1H, H3''_{ax}), 1.99 (s, 3H, CH_3 (Ac)), 1.97 (s, 3H, CH_3 (Ac)), 1.86, 1.84 (2×s, 2×3H, 2× CH_3 (NAc)), 1.44 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)), 1.29-1.24 (m, 3H, T ^{γ}).

^{13}C -NMR (100 MHz, BB, $CDCl_3$), δ (ppm): 171.9, 171.3, 171.0, 170.7, 170.6, 170.3, 170.1, 169.8 (7C, 7×C=O), 167.9 (1C, C2''), 156.8 (1C, C=O (Urethan)), 143.7 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.2 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 138.1, 137.4 (2C, C_q (Bn), C_q (Bzn)), 134.3 (1C, C_q (Bn)), 128.9, 128.7, 128.6, 127.8 (10C, C_{ar} (Bn), 128.8, 128.2, 126.5 (5C, C_{ar} (Bzn)), 127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1, 127.0 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.2, 125.0 (2C, C1-, C8-Fmoc),

120.1 (2C, C4-, C5-Fmoc), 106.4 (1C, C1'), 101.0 (1C, CH (Bzn)), 100.4 (1C, C1), 97.7 (1C, C2''), 83.2 (1C, C_q (*t*Bu)), 78.3 (1C, C3), 77.3 (1C, T^β), 75.9, 75.0 (2C, C4, C3'), 73.7 (1C, CH₂ (Bn)), 73.5 (1C, C5'), 73.5 (2C, C6'', C5'), 69.6 (2C, C8'', C6'), 69.1 (1C, C6), 68.5 (1C, C4''), 68.2, 68.1 (4C, C2', C4', C7'', CH₂ (Bn)), 67.3 (1C, CH₂ (Fmoc)), 63.8 (1C, C9''), 63.4 (1C, C5), 59.2 (1C, T^α), 49.1 (1C, C5''), 47.7 (1C, C2), 47.2 (1C, CH (Fmoc)), 37.0 (1C, C3''), 28.1 (3C, CH₃ (*t*Bu)), 23.3, 23.1 (2C, 2×CH₃ (NHAc)), 21.3, 21.0, 20.8, 20.7 (4C, 4×CH₃ (OAc)), 19.5 (1C, T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*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-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (34)^{48,118}**



(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→3)- β 6-Bn-Gal-(1→3)- α GalNAc)-*Ot*Bu)

Eine Lösung von 540 mg (0.36 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→3)- β 6-Bn-Gal-(1→3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu (**33**) in 25 ml 80%iger Essigsäure wird eine Stunde bei 75 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit 50 ml Toluol verdünnt und auf Raumtemp. abgekühlt. Die Lösung wird i. Vak. eingeeengt und der Rückstand wird noch fünfmal i. Vak. mit Toluol kodestilliert. Das so erhaltene Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→3)- β 6-Bn-Gal-(1→3)- α GalNAc)-*Ot*Bu wird ohne weitere Reinigung acetyliert.

Hierzu wird das Rohprodukt in 10 ml Pyridin gelöst und bei 0 °C mit einem Körnchen DMAP versetzt. Anschließend werden 4 ml Acetanhydrid zugetropft. Die Reaktionslösung wird 16 Stunden unter langsamem Aufwärmen auf Raumtemp. unter Argon gerührt. Dann wird mit 50 ml Toluol verdünnt, i. Vak. eingeeengt und der Rückstand noch mehrmals i. Vak. mit Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (100% EE).

Ausb.: 436 mg (77%); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.50 (EE/EtOH 5:1); R_f = 0.07 (EE).

C₇₈H₉₅N₃O₃₁ (M = 1570.59 g/mol) [1569.60].

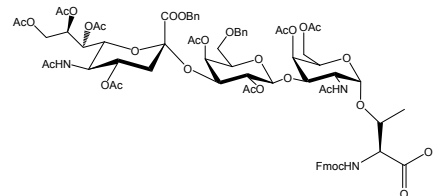
ESI-MS (positiv), m/z: 1592.2 ([M+Na]⁺, ber.: 1592.6), 1570.1 ([M+H]⁺, ber.: 1570.6).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ [ppm]: 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5 Hz), 7.57 (t, 2H, H1-, H8-Fmoc, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.0 Hz), 7.42-7.18 (m, 14H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{ar} (2×Bn)), 6.33 (d, 1H, NH (GalNAc), J_{NH,H2} = 9.3 Hz), 5.83 (d, 1H, NH (Urethan), J_{NH,Tα} = 9.7 Hz), 5.51-5.43 (m, 1H, H8''), 5.39 (d, 1H, CH_{2a} (Bn), J_{a,b} = 12.0 Hz), 5.39-5.33 (m, 1H, H4), 5.24-5.18 (m, 1H, H7''), 5.10-5.06 (m, 1H, H4'), 5.05 (d, 1H, CH_{2b} (Bn), J_{a,b} = 12.1 Hz), 4.98-4.91 (m, 2H, H2', NH (NeuNAc)), 4.88 (d, 1H, H1', J_{H1',H2'} = 3.8 Hz), 4.84-4.75 (m, 1H, H4''), 4.57-4.32 (m, 8H, CH₂ (Bn), CH₂ (Fmoc), H2, H1', H3', H9''_a), 4.27-4.05 (m, 5H, T^α, T^β, CH (Fmoc), H5, H6_a), 4.00 (d, 1H, H5'', J_{H5'',H4''} = J_{H5'',H6''} = 10.9 Hz), 3.97-3.76 (m, 3H, H3, H6_b, H9''_b), 3.72 (t, 1H, H5', J_{H5',H6'} = 6.3 Hz), 3.53 (dd, 1H, H6'_a, J_{H6'a,H6'b} = 10.0 Hz, J_{H6'a,H5'} = 6.2 Hz), 3.47 (dd, 1H, H6'', J_{H6'',H5''} = 10.8 Hz, J_{H6'',H7''} = 2.6 Hz), 3.40 (dd, 1H, H6'_b, J_{H6'b,H6'a} = 9.5 Hz, J_{H6'b,H5'} = 6.0 Hz), 2.59 (dd, 1H, H3''_{äq}, J_{H3''äq,H3''ax} = 12.6 Hz, J_{H3''äq,H4''} = 4.7 Hz), 2.25 (s, 3H, CH₃ (Ac)), 2.11 (s, 3H, CH₃ (Ac)), 2.09 (s, 3H, CH₃ (Ac)), 2.02 (s, 6H, 2×CH₃ (Ac)), 2.01 (s, 12H, 4×CH₃ (Ac)), 1.95 (s, 3H, CH₃ (Ac)), 1.79 (s, 3H, CH₃ (Ac)), 1.63 (t, 1H, H3''_{ax}, J_{H3''ax,H3''äq} = J_{H3''ax,H4''} = 12.6 Hz), 1.43 (s, 9H, CH₃ (tBu)), 1.30 (d, 3H, T^γ, J_{T^γ,T^β} = 6.3 Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, BB, CDCl₃, δ [ppm]: 170.6, 170.4, 170.3, 170.2, 170.0, 169.8, 169.7, (11C, 11×C=O) 167.2 (1C, C1''), 156.7 (1C, C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.2 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 138.0, 134.7 (2C, 2×C_q (Bn)), 128.9, 128.6, 128.3, 127.7, 127.6 (10C, C_{ar} (Bn)), 127.8 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.0 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 101.7 (1C, C1'), 99.8 (1C, C1), 96.9 (1C, C2''), 83.0 (1C, C_q (tBu)), 77.2 (1C, C3), 76.1 (1C, T^β), 74.1 (1C, C3), 73.5 (1C, CH₂ (Bn)), 72.6 (1C, C6''), 72.2 (1C, C5'), 71.7 (1C, C3'), 69.5 (1C, C4), 69.2 (1C, C2'), 69.1 (1C, C4''), 68.5 (3C, C8'', CH₂ (2×Bn)), 68.1 (1C, C5), 68.0 (1C, C6'), 67.8 (1C, C4'), 67.7 (1C, C7''), 67.4 (1C, CH₂ (Fmoc)), 63.3 (1C, C6), 63.1 (1C, C9''), 59.2 (1C, T^α), 48.9 (1C, C5''), 48.5 (1C, C2), 47.1 (1C, CH (Fmoc)), 37.4 (1C, C3''), 28.1 (3C, CH₃ (tBu)), 23.3, 23.1, 23.0 (2C, 2×CH₃ (NHAc)), 21.2, 21.0, 20.9, 20.8, 20.7 (8C, 8×CH₃ (OAc)), 19.1 (1C, T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*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-threonin (35)^{48,118}**

(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)- β 6-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OH)



Eine Lösung von 436 mg (0.28 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)- β -6-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OtBu (34) in 2 ml Dichlormethan wird nacheinander mit 0.5 ml Anisol und 10 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wird 2.5 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird mit 30 ml Toluol verdünnt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird noch fünfmal mit Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie (EE \rightarrow EE/EtOH 2:1).

Ausb.: 420 mg (quant.); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.23$ (EE/EtOH 1:1); $[\alpha]_D^{23} = 45.9^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:¹¹⁸ $[\alpha]_D^{23} = 24.8^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₇₄H₈₇N₃O₃₁ (M = 1514.48 g/mol) [1513.53].

ESI-MS (positiv), m/z : 1558.6 ([M-H+2Na]⁺, ber.:1558.5), 1552.6 ([M+K]⁺, ber.: 1552.5), 1536.6 ([M+Na]⁺, ber.: 1536.5), 1514.6 ([M+H]⁺, ber.: 1514.5).

¹H-NMR (400 MHz, COSY, CDCl₃) δ [ppm]: 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz), 7.60-7.55 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.44-7.21 (m, 14H, H3-, H6-Fmoc {7.38}, H2-, H7-Fmoc {7.28}, H_{ar} (2 \times Bn, 10H)), 6.86 (bs, 1H, NH (GalNAc)), 6.50 (d, 1H, NH (NeuNAc), $J_{NH,H5''} = 10.7$ Hz), 5.62-5.46 (m, 1H, H8''), 5.46-5.35 (m, 3H, H4 {5.44}, CH_{2a} (Bn) {5.42, d, $J_{a,b} = 12.2$ Hz}), 5.29-5.15 (m, 2H, H7'' {5.19}, H1 {5.18}), 5.12-4.96 (m, 3H, CH_{2b} (Bn) {5.06}, H4' {5.06}, H2' {5.00}), 4.91-4.77 (m, 1H, H4''), 4.59-4.51 (m, 2H, CH_{2a} (Bn) {4.56, d, $J_{a,b} = 11.6$ Hz }, H1' {4.55}), 4.51-4.29 (m, 8H, }, T ^{β} {4.49}, H3' {4.46}, CH_{2b} (Bn) {4.44, d, $J_{a,b} = 11.6$ Hz }, H9''_a {4.44}, CH₂ (Fmoc) {4.41}), T ^{α} {4.37}, H2 {4.31}), 4.21 (t, 1H, CH (Fmoc), $J_{CH,CH_2} = 6.7$ Hz), 4.17-4.07 (m, 2H, H6_a {4.12}, H5 {4.09}), 4.06-4.02 (m, 1H, H5''), 3.98 (dd, 1H, H6_b, $J_{H6b,H6a} = 10.5$ Hz, $J_{H6b,H5} = 3.0$ Hz), 3.89-3.71 (m, 3H, H3 {3.80}, H6'' {3.78}, H9''_b {3.73}), 3.58-3.48 (m, 2H, H6'_a {3.52}, H5' {3.49}), 3.43 (dd, 1H, H6'_b, $J_{H6'b,H6'a} = 9.7$ Hz, $J_{H6'b,H5'} = 6.1$ Hz), 2.62 (dd, 1H, H3''_{äq}, $J_{H3''äq,H3''ax} = 12.3$ Hz, $J_{H3''äq,H4''} = 4.1$ Hz), 2.25, 2.18, 2.13, 2.05, 2.03, 1.98, 1.81 (7 \times s, 30H, 10 \times CH₃ (Ac)), 1.65 (t, 1H, H3''_{ax}, $J_{H3''ax,H,H3''äq} = 12.4$ Hz), 1.30-1.25 (m, 3H, T ^{γ}).

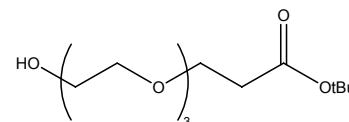
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, BB, HMQC, CDCl_3), δ [ppm]: 173.0, 172.1, 171.0, 170.7, 170.3, 170.1 (11C, 11 \times C=O), 167.2 (1C, C1''), 157.7 (1C, C=O (Urethan)), 143.7 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 137.9, 134.6 (2C, 2 \times C_q (Bn)), 128.9, 128.7, 128.4, 128.3, 127.8, 127.7, 127.0 (14C, 2 \times C_{ar} (Bn), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.0, 124.9 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.1, 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 100.4 (1C, C1'), 98.2 (1C, C1), 96.9 (1C, C2''), 75.7 (1C, T ^{β}), 74.1 (1C, C3), 73.2 (1C, CH₂ (Bn)), 72.0 (1C, C6''), 71.2 (1C, C3'), 69.3 (1C, C4), 68.9 (1C, C4''), 68.8 (1C, C2'), 68.4 (1C, CH₂ (Bn)), 68.1 (1C, C6'), 67.9 (1C, C8''), 67.8 (2C, C5, C7''), 67.3 (1C, C4'), 66.8 (1C, CH₂ (Fmoc)), 63.4 (1C, C9''), 63.0 (1C, C6), 58.3 (1C, T ^{α}), 49.2 (1C, C2), 48.6 (1C, C5''), 46.8 (1C, CH (Fmoc)), 37.3 (1C, C3''), 23.0, 22.6 (2C, 2 \times CH₃ (NHAc)), 21.3, 21.2, 21.0, 20.9, 20.7 (8C, 8 \times CH₃ (OAc)), 18.7 (1C, T ^{γ}).

5.3 Synthese von Glycopeptid-Protein-Konjugaten

5.3.1 Synthese des Olefin- und des Thiol-Linkers

12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (36)^{186,220}

(HO-{OEG}-COO*t*Bu)



Zu einer Lösung von 32 ml (239 mmol) frisch destilliertem Triethylenglycol in 125 ml absol. THF gibt man 0.15 g Natrium. Nachdem sich das Natrium vollständig aufgelöst hat, setzt man 12 ml (83.3 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester zu. Es wird 22 Stunden bei Raumtemp. gerührt und dann mit 2 ml 1M HCl neutralisiert. Das THF wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 100 ml ges. NaCl-Lsg aufgenommen. Das Produkt wird dreimal mit je 50 ml Ethylacetat aus der wäßrigen Phase extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit 30 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Nach anschließender Trocknung i. Hochvak. wird das Produkt in einer für die weitere Umsetzung ausreichend reinen Form erhalten.

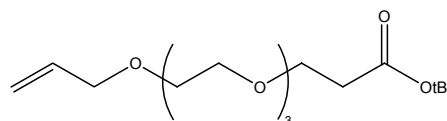
Ausb.: 18.55 g (80%); farblose Flüssigkeit; $R_f = 0.25$ (EE).

$C_{13}H_{26}O_6$ (M = 278.34 g/mol) [278.17].

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 3.68-3.52 (m, 14H, $(CH_2CH_2O)_3$, $COCH_2CH_2$), 2.87 (bs, 1H, OH), 2.45 (t, 2H, $COCH_2CH_2$, $J_{CH_2,CH_2} = 6.3$ Hz), 1.38 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)).

4,7,10,13-Tetraoxa-15-hexadecensäure-*tert*-butylester (37)

($H_2C=CH-CH_2$ -{OEG}-COO*t*Bu)



In 30 ml Dichlormethan werden 3.0 g (10.8 mmol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (36) und 3.9 g (32.3 mmol) Allylbromid gelöst. Man gibt eine Lösung von 0.9 g (22.5 mmol) NaOH und 3.66 g (10.8 mmol) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat in 25 ml Wasser zu und rührt das zweiphasige Gemisch kräftig bei Raumtemp. 14 Stunden. Die organische Phase wird abgetrennt und die wäßrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand mit 60 ml Ether versetzt. Der entstehende Niederschlag von Tetrabutylammoniumbromid wird abfiltriert und mit Ether nachgewaschen. Das Filtrat wird noch dreimal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über Magnesiumsulfat

getrocknet und der Ether i. Vak. abdestilliert. Das Produkt wird aus dem Rückstand durch Säulenchromatographie (PE/EE) isoliert.

Ausb.: 1.83 g (55%); gelbliche Flüssigkeit; $R_f = 0.55$ (PE/EE 3:1).

$C_{16}H_{30}O_6$ (M = 318.41 g/mol) [318.20].

Ber.: C 60.35% H 9.50%

Gef.: C 60.22% H 9.60%

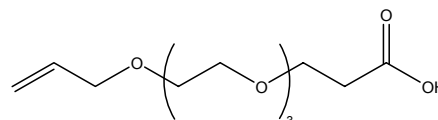
FD-MS: 341.8 ($[M+Na]^+$, ber.: 341.2).

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 5.96-5.76 (m, 1H, $H_2C=CH-$), 5.25-5.09 (m, 2H, $H_2C=CH-$), 3.97 (d, 2H, $=CH-CH_2-$, $J_{CH_2,CH} = 5.4$ Hz), 3.68-3.57 (m, 14H, $((CH_2CH_2O)_3, COCH_2CH_2)$), 2.44 (t, 2H, $COCH_2CH_2$, $J_{CH_2,CH} = 6.6$ Hz), 1.39 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)).

^{13}C -NMR (50.3 MHz, $CDCl_3$, BB), δ [ppm]: 170.8 (1C, C=O), 134.8 (1C, $H_2C=CH-$), 117.0 (1C, $H_2C=CH-$), 80.4 (1C, C_q (*t*Bu)), 72.2, 70.6, 70.5, 70.4 (6C, $(CH_2CH_2O)_3$), 69.4 (1C, $=CH-CH_2-$), 66.9 (1C, $COCH_2CH_2$), 36.3 (1C, $COCH_2CH_2$), 28.1 (3C, CH_3 (*t*Bu)).

4,7,10,13-Tetraoxa-15-hexadecensäure (38)

$(H_2C=CH-CH_2-\{OEG\}-COOH)$



500 mg (1.80 mmol) 4,7,10,13-Tetraoxa-15-hexadecensäure-*tert*-butylester (37) werden in 15 ml Trifluoressigsäure gelöst und eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Die Trifluoressigsäure wird i. Vak. abdestilliert und das zurückbleibende Öl zweimal mit Toluol kdestilliert. Der Rückstand wird in 20 ml Chloroform aufgenommen und mit 1M HCl gewaschen. Die wäßrige Phase wird einmal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel anschließend i. Vak. entfernt. Das Produkt wird aus dem öligen Rückstand durch Säulenchromatographie (EE/AcOH 100:1) isoliert.

Ausb.: 330 mg (83%); gelbliche Flüssigkeit; $R_f = 0.51$ (EE/MeOH 2:1); $R_f = 0.23$ (EE/AcOH 100:1).

$C_{12}H_{22}O_6$ (M = 262.30 g/mol) [262.14].

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 9.44 (bs, 1H, COOH), 5.98-5.79 (m, 1H, $H_2C=CH-$), 5.28-5.12 (m, 2H, $H_2C=CH-$), 3.99 (d, 2H, $=CH-CH_2-$, $J_{CH_2,CH} = 5.8$ Hz), 3.72 (t, 2H, $COCH_2CH_2$, $J_{CH_2,CH_2} = 6.4$ Hz), 3.65-3.55 (m, 12H, $(CH_2CH_2O)_3$), 2.59 (t, 2H, $COCH_2CH_2$, $J_{CH_2,CH_2} = 6.4$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (50.3 MHz, CDCl_3 , BB), δ [ppm]: 175.9 (1C, C=O), 134.6 (1C, $\text{H}_2\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}$ -), 117.2 (1C, $\underline{\text{H}}_2\text{C}=\text{CH}$ -), 72.2, 70.6, 70.3 (6C, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3$), 69.4 (1C, $=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -), 66.4 (1C, $\text{COCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 34.9 (1C, $\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

Olefin-modifiziertes BSA (39)

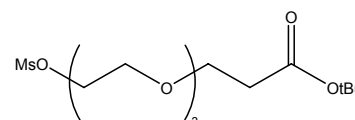
Eine Lösung von 15 mg (57.2 μmol) 4,7,10,13-Tetraoxa-15-hexadecensäure (**38**) in 4 ml dest. Wasser wird mit 30 mg (260.7 μmol) *N*-Hydroxysuccinimid (HOSu) und 60 mg (313.0 μmol) *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) versetzt und fünf Minuten geschüttelt. Anschließend gibt man die Lösung der aktivierten Säure zu 20 mg (0.3 μmol) BSA in 5 ml dest. Wasser und lässt 20 Stunden bei Raumtemp. stehen. Reinigung des Konjugats erfolgt durch Dialyse (*Spectra/Por*[®] Floatalyzer) gegen dest. Wasser und anschließende Lyophilisierung.

Ausb.: 18 mg; farbloses Lyophilisat.

MALDI-MS (positiv), m/z : 73000.4 (Mittelwert aus mehreren Messungen), entspricht 24-25 Linkermolekülen pro Molekül BSA.

12-Methansulfonyloxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**40**)²³⁴

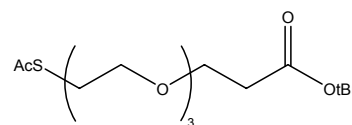
(MsO-{OEG}-COOtBu)



Eine Lösung von 2.3 g (8.3 mmol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**36**) und 2.0 ml (14.2 mmol) Triethylamin in 20 ml absol. Dichlormethan wird auf 0 °C abgekühlt. Man tropft langsam 1.0 ml (13.0 mmol) Methansulfonsäurechlorid zu und rührt die Reaktionsmischung unter langsamem Aufwärmen auf Raumtemp. über 5.5 Stunden. Ausgefallenes Aminhydrochlorid wird abfiltriert und die Lösung nacheinander mit je 15 ml Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung direkt weiter umgesetzt.

Ausb.: 3.0 g (quant); gelbliches Öl.

$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_8\text{S}$ ($M = 356.43$ g/mol) [356.15].

12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (41)**(AcS-{OEG}-COOtBu)**

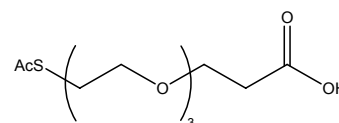
Eine Lösung von 1.00 g (13.1 mmol) frisch destillierter Thioessigsäure in 20 ml Methanol wird portionsweise unter Rühren mit 3.60 g (11.0 mmol) Cäsiumcarbonat versetzt. Nach Abklingen der Gasentwicklung wird weitere 15 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Das Methanol wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand noch zweimal mit je 20 ml Toluol kodestilliert. Das auf diese Weise erhaltene, leicht gelbliche Cäsiumthioacetat wird in 30 ml DMF aufgenommen und mit 3.50 g (9.8 mmol) 12-Methansulfonyloxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**40**) versetzt. Die Lösung wird 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt und dann i. Vak. auf das halbe Volumen eingengt. Die Lösung wird in 150 ml Ethylacetat aufgenommen und mit je zweimal 20 ml Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (PE/EE 5:1) gereinigt.

Ausb.: 2.30 g (70%); farbloses Öl; $R_f = 0.55$ (EE/PE 3:1).

$C_{15}H_{28}O_6S$ ($M = 336.44$ g/mol) [336.16].

FD-MS, m/z : 337.7 ($[M+H]^+$, ber.: 337.2).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 3.64 (t, 2H, $COCH_2CH_2$, $J_{CH_2,CH_2} = 6.6$ Hz), 3.56-3.50 (m, 10H, $-(CH_2OCH_2)_2CH_2-$), 3.02 (t, 2H, $-SCH_2-$, $J_{CH_2,CH_2} = 6.2$ Hz), 2.43 (t, 2H, $COCH_2$, $J_{CH_2,CH_2} = 6.6$ Hz), 2.27 (s, 3H, CH_3 (SAc)), 1.38 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)).

12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure (42)**(AcS-{OEG}-COOH)**

Eine Lösung von 600 mg (1.78 mmol) 12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**41**) in 2 ml Dichlormethan wird mit 5 ml Trifluoressigsäure versetzt und 90 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Die Trifluoressigsäure wird i. Vak. abdestilliert und das zurückbleibende Öl zweimal mit Toluol kodestilliert. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (EE/MeOH 3:1) gereinigt.

Ausb.: 480 mg (96%); leicht gelbliches Öl; $R_f = 0.50$ (EE/MeOH 2:1); $R_f = 0.35$ (EE/AcOH 100:1).

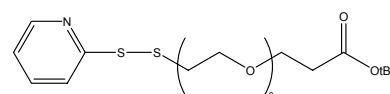
$C_{11}H_{20}O_6S$ ($M = 280.34$ g/mol) [280.10].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 10.80 (bs, 1H, COOH), 3.70 (t, 2H, COCH_2CH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.2$ Hz), 3.58-3.51 (m, 10H, $-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_2\text{CH}_2-$), 3.02 (t, 2H, $-\text{SCH}_2-$, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.6$ Hz), 2.58 (t, 2H, COCH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.2$ Hz), 2.27 (s, 3H, CH_3 (SAc)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , BB), δ [ppm]: 195.7 (1C, COS), 176.5 (1C, COO), 70.4, 70.3, 70.2, 69.7 (5C, $-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_2\text{CH}_2-$), 66.3 (1C, COCH_2CH_2), 34.8 (1C, COCH_2), 30.5 (1C, $-\text{SCH}_2-$), 28.7 (1C, CH_3 (Ac)).

12-[2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl]-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (43)

(Pyr-S-S-{OEG}-COO*t*Bu)



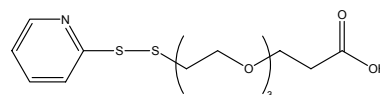
Eine Lösung von 150 mg (0.45 mmol) 12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**41**) in 10 ml entgastem Methanol wird mit 150 mg (0.68 mmol) Dipyridyldisulfid versetzt. Eine Lösung von 13 mg (0.54 mmol) Lithiumhydroxid in 2 ml entgastem Methanol wird langsam zugetropft und die Reaktionsmischung anschließend 60 Stunden bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Es wird durch Zugabe von zwei Tropfen Essigsäure neutralisiert, das Methanol anschließend i. Vak. abdestilliert und der Rückstand in 40 ml Ethylacetat aufgenommen. Die org. Phase wird mit 10 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (PE/EE 3:1) gereinigt.

Ausb.: 104 mg (63%); gelbliches Öl; $R_f = 0.69$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1).

$\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_5\text{S}_2$ ($M = 403.56$ g/mol) [403.15].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 8.39 (ddd, 1H, H6 (Pyr), $J_{\text{H}_6,\text{H}_5} = 4.9$ Hz, $J_{\text{H}_6,\text{H}_4} = 1.8$ Hz, $J_{\text{H}_6,\text{H}_3} = 0.9$ Hz), 7.73 (td, 1H, H3 (Pyr), $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 8.1$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_5} = J_{\text{H}_3,\text{H}_6} = 1.0$ Hz), 7.62 (ddd, 1H, H4 (Pyr), $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 8.1$ Hz, $J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 7.4$ Hz, $J_{\text{H}_4,\text{H}_6} = 1.8$ Hz), 7.05 (ddd, 1H, H5 (Pyr), $J_{\text{H}_5,\text{H}_4} = 7.4$ Hz, $J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 4.9$ Hz, $J_{\text{H}_5,\text{H}_3} = 1.1$ Hz), 3.69-3.48 (m, 12H, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3$), 2.94 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $H_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.4$ Hz), 2.44 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $H_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.6$ Hz), 1.38 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , BB), δ [ppm]: 170.8 (1C, C=O), 160.4 (1C, C_q (Pyr)), 149.3 (1C, C6 (Pyr)), 137.2 (1C, C4 (Pyr)), 120.6, 119.6 (2C, C3,C5 (Pyr)), 80.4 (1C, C_q (*t*Bu)), 70.5, 70.4, 70.3, 68.9 (5C, $\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$), 66.8 (1C, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}t\text{Bu}$), 38.4 (1C, $-\text{CH}_2\text{COO}t\text{Bu}$), 36.23 (1C, $-\text{S}-\text{CH}_2-$), 28.1 (3C, CH_3 (*t*Bu)).

12-[2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl]-4,7,10-trioxa-dodecansäure (44)**(Pyr-S-S-{OEG}-COOH)**

Eine Lösung von 80 mg (0.20 mmol) 12-(2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**43**) in 1 ml Dichlormethan wird mit 3 ml Trifluoressigsäure versetzt und drei Stunden bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird mit 15 ml Toluol verdünnt und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand wird i. Vak. dreimal mit Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flashchromatographie (EE/AcOH 100:1).

Ausb.: 63 mg (93%); leicht gelblicher, amorpher Feststoff; $R_f = 0.25$ (EE/AcOH 100:1).

$C_{14}H_{21}NO_5S_2$ ($M = 347.45$ g/mol) [347.09].

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 11.37 (s, 1H, COOH), 8.45 (d, 1H, H6 (Pyr), $J_{H6,H5} = 4.5$ Hz), 7.79 (d, 1H, H3 (Pyr), $J_{H3,H4} = 8.1$ Hz), 7.68 (ddd, 1H, H4 (Pyr), $J_{H4,H3} = 8.0$ Hz, $J_{H4,H5} = 7.8$ Hz, $J_{H4,H6} = 1.7$ Hz), 7.13-7.07 (m, 1H, H5 (Pyr)), 3.75-3.50 (m, 12H, $(CH_2CH_2O)_3$), 2.94 (t, 2H, $-CH_2CH_2COOH$, $H_{CH_2,CH_2} = 6.3$ Hz), 2.58 (t, 2H, $-CH_2COOH$, $H_{CH_2,CH_2} = 6.2$ Hz).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$, BB), δ [ppm]: 174.2 (1C, C=O), 160.6 (1C, C_q (Pyr)), 149.1 (1C, C6 (Pyr)), 137.1 (1C, C4 (Pyr)), 120.8, 119.7 (2C, C3, C5 (Pyr)), 70.6, 70.5, 70.4, 68.9 (5C, $CH_2(OCH_2CH_2)_2$), 66.9 (1C, $-CH_2CH_2COOH$), 36.4, 36.1 (2C, $-CH_2COOH$, $-S-CH_2-$).

5.3.2 Synthese von Thiol-funktionalisierten Glycopeptiden und Konjugation mit BSA

Allgemeines Protokoll der automatisierten (Glyco-)Peptid-Festphasensynthese

Sämtliche automatisierten Glycopeptid-Festphasensynthesen werden an einem ABI-433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems* nach der Fmoc-Strategie durchgeführt. Als polymere Träger werden mit der entsprechenden Fmoc-geschützten Startaminosäure beladene TentaGel-Harze der Firma *Rapp Polymere*, Tübingen, bzw. die selbst beladenen Tentagel-Harze (**60**) und (**70**) benutzt. Die Harze sind alle mit dem säurelabilen Wang-Anker oder dem ebenfalls säurelabilen Trityl-Linker versehen.

Zur Blockierung der Seitenkettenfunktionalitäten der verwendeten Aminosäuren kommen säurelabile Schutzgruppen zum Einsatz (*t*Bu-Ether für Ser, Thr und Tyr; *t*Bu-Ester für Asp; Trt für Asn und His; Boc für Lys; Pmc für Arg).

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem vorgegebenen Standardprogramm (*Fastmoc 0.1 mmol*). Hierbei wird für jede zu kuppelnde Aminosäure der gleiche, aus drei Teilschritten bestehende Syntheseyklus durchlaufen: Im ersten Schritt wird die temporäre Fmoc-Schutzgruppe vom Aminoterminus durch 2.5-minütige Behandlung mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Dieser Prozess wird mindestens zweimal wiederholt, wobei die Abspaltung durch eine UV-Absorptionsmessung des gebildeten Dibenzofulven-Piperidin-Addukts in der Abspalllösung (bei $\lambda = 301$ nm) verfolgt wird. Ändert sich der Wert der gemessenen UV-Absorption um mehr als 10% im Vergleich zum vorangegangenen Wert, so wird ein weiterer Abspaltzyklus durchgeführt. Im zweiten Schritt erfolgt die Kupplung der nächsten Aminosäure mit einer Lösung aus 1 mmol des jeweiligen Aminosäurebausteins, 1 mmol HBTU, 1 mmol HOBt und 2 mmol *N*-Ethyldiisopropylamin in DMF. Das Harz wird dabei 30 Minuten in der Kupplungslösung geschüttelt (Vortex). Die glycosylierten Aminosäurebausteine werden in einer halbautomatisch durchgeführten Kupplung mittels der reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU und HOAt unter Zusatz von *N*-Methylmorpholin und einer Verlängerung der Reaktionszeit gekuppelt (die genauen Reaktionsbedingungen sind bei den einzelnen Synthesen angegeben). Die Aminosäurebausteine werden dazu zusammen mit den Kupplungsreagenzien in eine Kartusche eingewogen, in 2 ml NMP gelöst und durch Zugabe von 2 Äquivalenten NMM aktiviert. Die Kupplungslösung wird dann in den Festphasenreaktor gepumpt. Nach jeder Peptidkupplung werden im vorherigen Schritt eventuell nicht umgesetzte Aminofunktionen mit einer Lösung von 0.5 M Acetanhydrid, 0.125 M DIPEA und 0.015 M HOBt in NMP acetyliert (Capping). Nach jedem Teilschritt wird die Reaktionslösung durch Filtration entfernt und das Harz gründlich mit NMP

gewaschen. Durch Wiederholung dieser drei Syntheseschritte wird das (Glyco-)Peptid schrittweise aufgebaut. Nach Beendigung der (Glyco-)Peptid-Festphasensynthese wird das Harz zusätzlich mit Dichlormethan gewaschen und in einem Stickstoffstrom getrocknet.

12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-threonyl-L-seryl-L-seryl-L-alanyl-L-seryl--L-threonyl-glycyl-L-histidyl-L-alanyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-prolyl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-L-threonyl-L-asparaginsäure (46)

(AcS-{OEG}-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-Thr(α Ac₃GalNAc)-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp-OH)

Die automatisierte Peptidsynthese erfolgt ausgehend von 400 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Asp(*t*Bu) vorbeladenen Wang-Tentagel-Harzes (Beladung: 0.26 mmol/g). Die Kupplung der ersten fünf Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll (s. S. 167). Die Kupplung des T_N-Bausteins erfolgt halbautomatisch. Hierzu wird zunächst die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe vom Harz abgespalten. Der Glycosylaminosäurebaustein (**9**) (270 mg, 0.4 mmol, 4 eq.) wird mit 168 mg (0.44 mmol) HATU und 60 mg (0.44 mmol) HOAt in 2 ml NMP gelöst, mit 97 μ l (0.88 mmol) NMM aktiviert und in den Reaktor überführt. Das Harz wird drei Stunden in dieser Lösung geschüttelt. Die Kupplung der restlichen neun Aminosäuren erfolgt wieder vollautomatisch nach dem Standardprotokoll. Die Anbindung des Thiollinkers erfolgt in einer manuellen Kupplung. Dazu wird das Harz in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt und zunächst die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch einstündiges Schütteln in 6 ml DMF/Morpholin (1:1) abgespalten. Das Harz wird sechsmal mit je 3 ml DMF gewaschen und anschließend drei Stunden in einer Lösung von 281 mg (1 mmol) 12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure (**42**), 322 mg (1 mmol) TBTU, 154 mg (1 mmol) HOBt und 340 μ l DIPEA in 3 ml DMF geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz sechsmal mit je 3 ml DMF gewaschen. Es folgt ein Cappingschritt mit 3 ml Pyridin/Acetanhydrid 2:1 über 15 Minuten. Anschließend wird das Harz sechsmal mit je 3 ml DMF und sechsmal mit je 3 ml Dichlormethan gewaschen und i. Vak. getrocknet. Die Abspaltung vom Harz erfolgt durch zweistündiges Schütteln in einer Lösung aus 15 ml TFA, 0.9 ml TIS und 0.9 ml dest. Wasser. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit je 5 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. auf ca. 2 ml eingeeengt und dann in 20 ml eiskalten Diethylether getropft. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert, in

dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgt durch präparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) → (50:50) in 60. Min., $R_t = 44.8$ Min., $\lambda = 214$ nm).

Ausb.: 158 mg (74%); farbloses Lyophilisat; $R_t = 20.7$ Min. (Luna C18, A/B (95:5)→(0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm), $R_t = 35.9$ Min. (Luna C18, A/B (95:5)→(50:50) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{89}H_{141}N_{19}O_{39}S$ ($M = 2133.24$ g/mol) [2131.94]

ESI-MS (positiv), m/z : 2155.1 ($[M+Na]^+$, ber.: 2154.9), 2133.1 ($[M+H]^+$, ber.: 2132.9), 1089.1 ($[M+2Na]^{2+}$, ber.: 1089.0), 1078.1 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1078.0).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 2132.9421 ($[M+H]^+$, ber.: 2132.9433).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ [ppm]: 8.62 (s, 1H, H^e), 7.28 (s, 1H, H^d), 5.42 (d, 1H, H_4 , $J_{H_4,H_3} = 2.8$ Hz), 5.25 (d, 1H, H_3 , $J_{H_3,H_4} = 2.7$ Hz), 5.23 (d, 1H, H_1 , $J_{H_1,H_2} = 2.8$ Hz), 4.79-4.70 (m, 3H, D^a {4.77}, H^a {4.73}, T^{a*} {4.74}), 4.53-4.39 (m, 7H, H_5 {4.51}, A^a {4.50}, P^a {4.49, 4.43}, $3 \times S^a$ {4.52, 4.47}), 4.37-4.30 (m, 7H, L^a {4.37}, A^a {4.34}, $3 \times T^a$ {4.37}), T^{b*} {4.33}, H_2 {4.30}), 4.29-4.15 (m, 6H, $H_{6,a,b}$ {4.25, 4.18}, $3 \times T^b$ {4.21}, V^a {4.16}), 3.93-3.75 (m, 8H, G^a {3.92}, P^d_a {3.77}, $2 \times S^b$ {3.89}, H_2 {3.80}), 3.72-3.60 (m, 16H, P^d_b {3.61}, S^b {3.61}, $(CH_2OCH_2)_3$), 3.30 (dd, 1H, H^b_a , $J_{H^b_a,H^b_b} = 15.5$ Hz, $J_{H^b_a,H^a} = 5.2$ Hz), 3.18-3.10 (m, 1H, H^b_b), 3.10 (t, 2H, S- CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 6.2$ Hz), 2.96 (d, 2H, D^b , $J_{D^b,D^a} = 5.9$ Hz), 2.68-2.62 (m, 2H, $COCH_2CH_2$), 2.37 (s, 3H, CH_3 (SAc)), 2.32-2.19 (m, 2H, P^b_a), 2.22 (s, 3H, CH_3 (Ac)), 2.12-1.83 (m, 7H, V^b {2.08}, P^y {2.03}, P^b_b {1.91, 1.84}), 2.08, 1.98, 1.94 (3xs, 3x3H, $3 \times CH_3$ (Ac)), 1.70-1.48 (m, 3H, L^y {1.65}, L^b {1.55}), 1.41 (d, 3H, A^b_1 , $J_{A^b_1,A^a} = 2.7$ Hz), 1.39 (d, 3H, A^b_2 , $J_{A^b_2,A^a} = 2.7$ Hz), 1.36 (d, 3H, T^{y*} , $J_{T^{y*},T^{a*}} = 6.3$ Hz), 1.23-1.17 (m, 9H, $3 \times T^y$), 0.99-0.90 (m, 12H, V^y , L^d).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , BB, HMQC), δ [ppm]: 200.7 (1C, COS), 175.1, 174.9, 174.6, 174.0, 173.9, 173.5, 173.4, 173.3, 173.2, 173.1, 172.6, 172.3, 172.1, 171.9, 171.5, 171.1, 171.0, 170.9, 169.8 (22C, $22 \times C=O$), 133.3 (1C, H^e), 128.2 (1C, H^y), 117.2 (1C, H^d), 98.6 (1C, C1), 75.5 (1C, T^{b*}), 69.6, 69.4, 69.2, 68.8 (5C, $CH_2(CH_2OCH_2)_2$), 69.6 (1C, C3), 68.5 (1C, C4), 67.0 (1C, C5), 67.0, 66.9, 66.8 (3C, $3 \times T^b$), 66.5 (1C, $COCH_2CH_2$), 62.6 (1C, C6), 60.9, 60.8 (3C, $3 \times S^b$), 60.1, 59.7 (2C, $2 \times P^a$), 59.4 (1C, V^a), 59.1, 58.8, 58.6 (3C, $3 \times T^a$), 55.6, 55.4 (3C, $3 \times S^a$), 55.4 (1C, T^{a*}), 51.9 (1C, H^a), 50.3 (1C, L^a), 49.9, 49.4 (2C, $2 \times A^a$), 48.8 (1C, D^a), 48.1 (1C, C2), 48.0, 47.8 (2C, $2 \times P^d$), 42.4 (1C, G^a), 39.6 (1C, L^b), 35.6 (1C, $COCH_2CH_2$), 35.3 (1C, D^b), 32.7 (1C, V^b), 32.5 (1C, CH_3 (SAc)), 32.0 (2C, $2 \times P^b$), 30.8 (1C, S- CH_2), 27.2 (2C, $2 \times P^y$), 26.3 (1C, H^b), 24.7 (1C, L^y), 24.5, 22.8, 22.7, 21.8, 20.0 (5C, $5 \times CH_3$)

(Ac)), 22.2, 21.5 (2C, 2×L^δ), 21.3, 21.2 (4C, 4×T^γ), 18.6, 18.3 (2C, V^γ), 16.4, 16.3 (2C, 2×A^β).

12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (47)

(AcS-{OEG}-Gly-Val-Thr(α Ac₃GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)

Die automatisierte Peptidsynthese erfolgt ausgehend von 455 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Pro vorbeladenen Trityl-Tentagel-Harzes (Beladung: 0.22 mmol/g). Die Kupplung der ersten acht Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll (s. S. 167). Die Kupplung des T_N-Bausteins erfolgt halbautomatisch. Hierzu wird zunächst die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe vom Harz abgespalten. Der Glycosylaminosäurebaustein (**9**) (235 mg, 0.35 mmol, 3.5 eq.) wird mit 140 mg (0.37 mmol) HATU und 50 mg (0.37 mmol) HOAt in 2 ml NMP gelöst, mit 80 μ l (0.73 mmol) NMM aktiviert und in den Reaktor überführt. Das Harz wird drei Stunden in dieser Lösung geschüttelt. Die Kupplung der restlichen zwei Aminosäuren erfolgt wieder vollautomatisch nach dem Standardprotokoll. Die Anbindung des Thiollinkers erfolgt in einer manuellen Kupplung. Dazu wird das Harz in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt und zunächst die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch 40-minütiges Schütteln in 8 ml DMF/Morpholin (1:1) abgespalten. Das Harz wird sechsmal mit je 4 ml DMF gewaschen und anschließend sechs Stunden in einer Lösung aus 280 mg (1 mmol) 12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure (**42**), 322 mg (1 mmol) TBTU, 154 mg (1 mmol) HOBt und 340 μ l DIPEA in 3 ml DMF geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz sechsmal mit je 3 ml DMF gewaschen. Es folgt ein Cappingschritt mit 3 ml Pyridin/Acetanhydrid 2:1 über 15 Minuten. Anschließend wird das Harz sechsmal mit je 3 ml DMF und sechsmal mit je 3 ml Dichlormethan gewaschen und i. Vak. getrocknet. Die Abspaltung vom Harz erfolgt durch zweistündiges Schütteln in einer Lösung aus 15 ml TFA, 0.9 ml TIS und 0.9 ml dest. Wasser. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit je 5 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. auf ca. 2 ml eingeeengt und dann in 20 ml eiskalten Diethylether getropft. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert, in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgt durch präparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 100. Min., R_t = 42.5 Min., λ = 214 nm).

Ausb.: 78 mg (40%); farbloses Lyophilisat; $R_t = 22.5$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{74}H_{118}N_{16}O_{31}S$ ($M = 1759.88$ g/mol) [1758.79].

ESI-MS (positiv), m/z : 1781.8 ($[M+Na]^+$, ber.: 1781.8), 1759.8 ($[M+H]^+$, ber.: 1759.8), 891.4 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 891.4).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1759.7931 ($[M+H]^+$, ber.: 1759.7948), 891.3917 ($[M+Na+H]^{2+}$, ber.: 891.3923).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ [ppm]: 5.29 (d, 1H, H4, $J_{H4,H3} = 2.9$ Hz), 5.09 (dd, 1H, H3, $J_{H3,H2} = 11.2$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.1$ Hz), 4.99 (d, 1H, H1, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz), 4.64-4.57 (m, 1H, D^α), 4.56-4.49 (m, 3H, $T^{\alpha*}$ {4.56}, R^α {4.54}, $A^{\alpha 1}$ {4.49}), 4.39-4.22 (m, 8H, H5 {4.34}, T^α {4.34}, S^α {4.34}, $A^{\alpha 2}$ {4.32}, $3 \times P^\alpha$ {4.28}, $T^{\beta*}$ {4.24}), 4.22-4.15 (m, 3H, H2 {4.19}, V^α {4.19}, T^β {4.18}), 4.14-4.01 (m, 1H, H6), 3.87 (d, 1H G^α_a , $J_{G^\alpha_a,G^\alpha_b} = 16.9$ Hz), 3.80 (d, 1H G^α_b , $J_{G^\alpha_b,G^\alpha_a} = 16.8$ Hz), 3.74-3.45 (m, 7H, S^β {3.71}, $3 \times P^\delta_a$ {3.70}, $COCH_2CH_2$ {3.67}), 3.72-3.60 (m, 13H, $3 \times P^\delta_b$ {3.55}, $CH_2(CH_2OCH_2)_2$), 3.08 (t, 2H, R^δ , $J_{R^\delta,R^\gamma} = 7.3$ Hz), 2.98 (t, 2H, S- CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 6.2$ Hz), 2.84 (dd, 1H, D^β_a , $J_{D^\beta_a,D^\beta_b} = 17.1$ Hz, $J_{D^\beta_a,D^\alpha} = 6.5$ Hz), 2.79 (dd, 1H, D^β_b , $J_{D^\beta_b,D^\beta_a} = 17.0$ Hz, $J_{D^\beta_b,D^\alpha} = 6.8$ Hz), 2.48 (t, 2H, $COCH_2CH_2$, $J_{CH_2,CH_2} = 6.0$ Hz), 2.25 (s, 3H, CH_3 (SAc)), 2.23-2.11 (m, 3H, $3 \times P^\beta_a$ {2.19}), 2.09, 1.96, 1.86, 1.85 (4 \times s, 12H, 4 \times CH_3 (Ac)), 1.96-1.86 (m, 7H, V^β {1.92}, $3 \times P^\gamma$ {1.92}), 1.84-1.48 (m, 7H, $3 \times P^\beta_b$ {1.80}, R^β {1.73, 1.64}, R^γ {1.56}), 1.25 (d, 3H, $A^{\beta 1}$, $J_{A^{\beta 1},A^{\alpha 1}} = 2.1$ Hz), 1.24 (d, 3H, $A^{\beta 2}$, $J_{A^{\beta 2},A^{\alpha 2}} = 2.1$ Hz), 1.18 (d, 3H, $T^{\gamma*}$, $J_{T^{\gamma*},T^{\beta*}} = 6.3$ Hz), 1.06 (d, 3H, T^γ , $J_{T^\gamma,T^\beta} = 6.4$ Hz), 0.84, 0.82 (2 \times d, 6H, V^γ , $J_{V^\gamma,V^\beta} = 2.0$ Hz).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , BB, HMQC), δ [ppm]: 200.8 (1C, COS), 176.1, 174.5, 174.1, 173.9, 173.8, 173.5, 173.4, 173.3, 173.1, 173.0, 172.8, 172.5, 171.3, 171.2, 170.8 (18C, 18 \times C=O), 98.8 (1C, C1), 77.7 (1C, $T^{\beta*}$), 69.5, 69.3, 69.1, 68.8 (5C, $CH_2(CH_2OCH_2)_2$), 68.9 (1C, C3), 68.0 (1C, C4), 66.9 (1C, T^β), 66.4 (1C, $COCH_2CH_2$), 62.4 (1C, C6), 61.0 (1C, S^β), 60.1 (3C, $3 \times P^\alpha$), 59.1 (1C, V^α), 56.8 (1C, $T^{\alpha*}$), 55.0 (1C, T^α), 54.9 (1C, S^α), 50.9 (1C, R^α), 50.1 (1C, D^α), 48.3 (1C, C5), 47.6, 47.3 (2C, 2 \times A^α), 47.5 (1C, C2), 47.4 (3C, $3 \times P^\delta$), 42.2 (1C, G^α), 40.4 (1C, R^δ), 35.5 (1C, $COCH_2CH_2$), 35.1 (1C, D^β), 30.0 (1C, V^β), 29.8 (1C, CH_3 (SAc)), 29.0 (3C, $3 \times P^\beta$), 28.1 (1C, S- CH_2), 27.6 (1C, R^β), 24.5 (3C, $3 \times P^\gamma$), 24.0 (1C, R^γ), 21.9, 20.0, 19.9, 19.8 (4C, 4 \times CH_3 (Ac)), 18.6 (1C, T^γ), 18.0 (1C, $T^{\gamma*}$), 18.0, (2C, V^γ), 15.0 (2C, 2 \times A^β).

12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-glycyl-L-valyl-O-{2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (48)
(AcS-{OEG}-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)

Die automatisierte Peptidsynthese erfolgt ausgehend von 150 mg (0.033 mmol) eines mit Fmoc-Pro vorbeladenen Tritel-Tentagel-Harzes (Beladung: 0.22 mmol/g). Die Kupplung der ersten acht Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll (s. S. 167). Die Kupplung des ST_N-Bausteins erfolgt halbautomatisch. Hierzu wird zunächst die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe vom Harz abgespalten. Der Glycosylaminosäurebaustein (**25**) (60 mg, 0.05 mmol, 1.5 eq.) wird mit 24 mg (0.063 mmol) HATU und 9 mg (0.066 mmol) HOAt in 2 ml NMP gelöst, mit 14 μ l (0.127 mmol) NMM aktiviert und in den Reaktor überführt. Das Harz wird sechs Stunden in dieser Lösung geschüttelt. Die Kupplung der restlichen zwei Aminosäuren und des Thiollinkers (**42**) (281 mg, 10 eq.) erfolgt wieder vollautomatisch nach dem Standardprotokoll. Die Abspaltung vom Harz erfolgt durch zweistündiges Schütteln in einer Lösung aus 10 ml TFA, 0.6 ml TIS und 0.6 ml dest. Wasser. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit je 3 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. auf ca. 2 ml eingengt und dann in 20 ml eiskalten Diethylether getropft. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert, in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgt durch semipräparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 100 Min., R_t = 29.9 Min., λ = 214 nm). Neben dem gewünschten Produkt werden auch 3 mg (10%) der Abbruchsequenz (**48a**) (R_t = 19.4 Min.) isoliert.

Ausb.: 31 mg (41%); farbloses Lyophilisat ; R_t = 26.6 Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 60 Min., λ = 214 nm).

C₉₈H₁₄₇N₁₇O₄₂S (M = 2267.37 g/mol) [2265.96].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 1134.55 ([M+2H]²⁺, ber.: 1134.49).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 2267.9629 ([M+H]⁺, ber.: 2267.9722).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, DQF-COSY), δ [ppm]: 7.33-7.30 (m, 5H H_{ar} (Bn)), 5.28 (d, 1H, CH_{2a} (Bn), J_{a,b} = 11.7 Hz), 5.23 (dd, 1H, H7''), J_{H7'',H6''} = 8.4 Hz, J_{H7'',H8''} = 1.9 Hz), 5.09 (d, 1H, CH_{2b} (Bn), J_{b,a} = 11.7 Hz), 5.18-5.12 (m, 1H, H8''), 4.95-4.90 (m, 2H, H3 {4.93}, H1 {4.94}), 4.89-4.86 (m, 1H, H4), 4.78-4.715 (m, 1H, C4''), 4.59 (t, 1H, D ^{α} , J_{D α ,D β} = 6.7 Hz),

4.56-4.48 (m, 2H, $T^{\alpha*}$ {4.54}, R^{α} {4.52}), 4.43 (d, 3H, $A^{\alpha 1}$, $J_{A\alpha, A\beta} = 7.1$ Hz), 4.35-4.30 (m, 2H, T^{α} {4.34}, S^{α} {4.34}), 4.30-4.20 (m, 5H, $3 \times P^{\alpha}$ {4.28, 4.25}, $A^{\alpha 2}$ {4.27}, V^{α} {4.21}), 4.21-4.17 (m, 1H, $T^{\beta*}$), 4.17-4.14 (m, 1H, $H9''_a$), 4.13-4.06 (m, 4H, $A^{\alpha 1}$ {4.12}, $A^{\alpha 2}$ {4.10}, $H6''$ {4.11}, T^{β} {4.08}), 4.02 (dd, 1H, $H9''_b$, $J_{H9''_b, H9''_a} = 12.7$ Hz, $J_{H9''_b, H8''} = 5.1$ Hz), 3.90-3.72 (m, 4H, $H5$ {3.88}, G^{α} {3.84, 3.81}, $H5''$ {3.78}), 3.71-3.58 (m, 6H, S^{β} {3.71, 3.66}, $COCH_2CH_2$ {3.62}, $H6_a$ {3.61}), 3.57-3.43 (m, 18H, $3 \times P^{\delta}$ {3.54, 3.48}, $6 \times CH_2O$), 3.07 (t, 2H, R^{δ} , $J_{R\delta, R\gamma} = 7.3$ Hz), 2.95 (t, 2H, SCH_2 , $J_{CH_2, CH_2} = 6.2$ Hz), 2.84 (dd, 1H, D^{β}_a , $J_{D^{\beta}_a, D^{\beta}_b} = 16.8$ Hz, $J_{D^{\beta}_a, D\alpha} = 6.1$ Hz), 2.73 (dd, 1H, D^{β}_b , $J_{D^{\beta}_b, D^{\beta}_a} = 17.1$ Hz, $J_{D^{\beta}_b, D\alpha} = 6.8$ Hz), 2.58 (dd, 1H, $H3''_{aq}$, $J_{H3''_{aq}, H3''_{ax}} = 12.7$ Hz, $J_{H3''_{aq}, H4''} = 4.4$ Hz), 2.42 (t, 2H, $COCH_2CH_2$, $J_{CH_2, CH_2} = 6.0$ Hz), 2.23 (s, 3H, CH_3 (SAc)), 2.20-2.09 (m, 3H, $3 \times P^{\beta}_a$), 2.04, 2.03, 2.01, 1.93, 1.90, 1.86, 1.85, 1.77 (8xs, 24H, $8 \times CH_3$ (Ac)), 1.96-1.86 (m, 7H, V^{β} {1.94}, $3 \times P^{\gamma}$ {1.90}), 1.84-1.48 (m, 7H, $3 \times P^{\beta}_b$ {1.77}, $H3''_{ax}$ {1.74}, R^{β} {1.71, 1.62}, R^{γ} {1.55}), 1.23 (d, 6H, $2 \times A^{\beta}$, $J_{A\beta, A\alpha} = 7.1$ Hz), 1.12 (d, 3H, $T^{\gamma*}$, $J_{T^{\gamma*}, T\beta*} = 6.3$ Hz), 1.05 (d, 3H, T^{γ} , $J_{T^{\gamma}, T\beta} = 1.7$ Hz), 0.86-0.81 (m, 6H, $2 \times V^{\gamma}$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , BB, HSQC), δ [ppm]: 200.6 (1C, COS), 175.9, 174.4, 174.2, 174.0, 173.9, 173.6, 173.5, 173.4, 173.2, 172.9, 172.8, 172.5, 172.3, 172.2, 171.3, 171.2, 170.9, 170.8 (22C, $22 \times C=O$), 167.6 (1C, $C1''$), 134.8 (1C, C_q (Bn)), 129.3, 128.9 (5C, C_{ar} (Bn)), 98.9 (1C, $C2''$), 98.7 (1C, $C1$), 77.8 (1C, $T^{\beta*}$), 71.6 (1C, $C6''$), 69.5, 69.3, 68.8 (5C, $CH_2(CH_2OCH_2)_2$), 69.1 (1C, $C4''$), 69.0 (1C, $C3$), 68.3 (1C, CH_2 (Bn)), 68.1 (1C, $C4$), 68.0 (1C, $C8''$), 67.6 (1C, $C5$), 67.1 (1C, $C7''$), 66.8 (1C, T^{β}), 66.4 (1C, $COCH_2CH_2$), 63.7 (1C, $C6$), 61.9 (1C, $C9''$), 61.2 (1C, S^{β}), 60.5, 60.1, 59.4 (3C, $3 \times P^{\alpha}$), 58.9 (1C, V^{α}), 56.6 (1C, $T^{\alpha*}$), 54.9 (2C, T^{α} , S^{α}), 51.0 (1C, R^{α}), 49.9 (1C, D^{α}), 48.5 (1C, $C5''$), 47.6, 47.3 (2C, $2 \times A^{\alpha}$), 47.4 (1C, $C2$), 47.5 (3C, $3 \times P^{\delta}$), 42.4 (1C, G^{α}), 40.5 (1C, R^{δ}), 36.7 (1C, $C3''$), 35.6 (1C, $COCH_2CH_2$), 34.9 (1C, D^{β}), 30.4 (1C, V^{β}), 29.9 (1C, CH_3 (SAc)), 29.3, 29.2 (3C, $3 \times P^{\beta}$), 28.3 (1C, $S-CH_2$), 27.4 (1C, R^{β}), 24.6, 24.5 (3C, $3 \times P^{\gamma}$), 23.9 (1C, R^{γ}), 21.9, 21.7 (2C, $2 \times CH_3$ (NAc)), 20.4, 20.1, 20.0, 19.9 (6C, $6 \times CH_3$ (OAc)), 18.7 (1C, T^{γ}), 18.2 (1C, $T^{\gamma*}$), 17.7, (2C, V^{γ}), 15.1, 15.0 (2C, $2 \times A^{\beta}$).

12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[2,4-di-O-acetyl-6-O-benzyl-3-O-{benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galacto-

pyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (49)
(AcS-{OEG}-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→3)- β 6-Bn-Ac₂Gal-(1→3)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)

Die automatisierte Peptidsynthese erfolgt ausgehend von 300 mg (0.066 mmol) eines mit Fmoc-Pro vorbeladenen Trityl-Tentagel-Harzes (Beladung: 0.22 mmol/g). Die Kupplung der ersten acht Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll (s. S. 167). Die Kupplung des (2,3)-ST-Bausteins erfolgt halbautomatisch. Hierzu wird zunächst die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe vom Harz abgespalten. Der Glycosylaminosäurebaustein (**35**) (130 mg, 85.8 μ mol, 1.3 eq.) wird mit 38 mg (100 μ mol) HATU und 14 mg (103 μ mol) HOAt in 2 ml NMP gelöst, mit 22 μ l (200 mmol) NMM aktiviert und in den Reaktor überführt. Das Harz wird sechs Stunden in dieser Lösung geschüttelt. Die Kupplung der restlichen zwei Aminosäuren und des Thiollinkers (**42**) (280 mg, 10 eq.) erfolgt wieder vollautomatisch nach dem Standardprotokoll. Die Abspaltung vom Harz erfolgt durch zweistündiges Schütteln in einer Lösung aus 10 ml TFA, 0.6 ml TIS und 0.6 ml dest. Wasser. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit je 3 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. auf ca. 2 ml eingeeengt und dann in 20 ml eiskalten Diethylether getropft. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert, in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgt durch präparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 100 Min., R_t = 61.3 Min., λ = 214 nm).

Ausb.: 62 mg (36%); farbloses Lyophilisat ; R_t = 33.0 Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 60 Min., λ = 214 nm).

C₁₁₅H₁₆₇N₁₇O₄₉S (M = 2603.71 g/mol) [2692.08].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 2626.2 ([M+Na]⁺, ber.: 2626.1), 2604.2 ([M+H]⁺, ber.: 2604.1), 1313.6 ([M+Na+H]²⁺, ber.: 1313.5).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 2604.0803 ([M+H]⁺, ber.: 2604.0931).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, DQF-COSY), δ [ppm]: 7.30-7.12 (m, 10H H_{ar} (2×Bn)), 5.33-5.16 (m, 4H, H8'' {5.30}, H4 {5.27}, H7'' {5.26}, CH_{2a} (Bn-Ester) {5.23}), 5.00-4.86 (m, 3H, CH_{2b} (Bn-Ester) {4.95}, C4' {4.91}, H1 {4.88}), 4.83-4.64 (m, 3H, H2' {4.78}, H4'' {4.71}, H1' {4.68}), 4.61 (t, 1H, D ^{α} , J_{D α ,D β} = 6.7 Hz), 4.57-4.50 (m, 2H, T ^{α *} {4.54}, R ^{α} {4.53}), 4.49-4.07 (m, 17H, T ^{α} {4.48}, A ^{α 1} {4.45}, CH_{2a,b} (Bn-Ether) {4.43, 4.34}, H3' {4.39}, A ^{α 2} {4.35}, S ^{α} {4.35}, 3×P ^{α} {4.28, 4.20}, V ^{α} {4.27}, H9''_a {4.27}, T ^{β *} {4.23}, H5 {4.20}, H2

{4.16}, H6'' {4.15}, T^β {4.09}), 4.05-3.89 (m, 3H, H9''_b {3.98}), H6_{a,b} {3.97, 3.91}), 3.87-3.41 (m, 31H, 2×G^α {3.83, 3.81}, H5'' {3.76}, S^β {3.71}, 3×P^δ {3.68, 3.55, 3.50}, H3 {3.65}, COCH₂CH₂ {3.62}, 6×CH₂O {3.47}, H6' {3.45}, H5' {3.44}), 3.09 (t, 2H, R^δ, J_{Rδ,Rγ} = 7.3 Hz), 2.95-2.88 (m, 2H, SCH₂), 2.85 (dd, 1H, D^β_a, J_{Dβa,Dβb} = 17.3 Hz, J_{Dβa,Dα} = 6.6 Hz), 2.77 (dd, 1H, D^β_b, J_{Dβb,Dβa} = 17.3 Hz, J_{Dβb,Dα} = 6.9 Hz), 2.49-2.37 (m, 3H, H3''_{äq} {2.44}, COCH₂CH₂ {2.42}), 2.24-2.09 (m, 9H, CH₃ (SAc) {2.18}, 3×P^β_a {2.16}, CH₃ (Ac) {2.18}), 2.07-1.68 (m, 12H, V^β {1.95}, 3×P^γ {1.90, 1.78}), 3×P^β_b {1.77}, R^β {1.73, 1.64}), 2.04, 2.00, 1.96, 1.92, 1.84, 1.85, 1.79, 1.78, 1.74 (9×s, 27H, 9×CH₃ (Ac)), 1.60-1.50 (m, 2H, R^γ {1.56}), 1.48-1.39 (m, 1H, H3''_{ax}), 1.25 (d, 6H, 2×A^β, J_{Aβ,Aα} = 7.1 Hz), 1.21-1.13 (m, 3H, T^{γ*}), 1.06 (d, 3H, T^γ, J_{Tγ,Tβ} = 6.4 Hz), 0.89-0.81 (m, 6H, 2×V^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, BB, HSQC), δ [ppm]: 201.6 (1C, COS), 178.3, 176.4, 175.9, 175.4, 174.9, 174.4, 173.8, 173.7, 173.3, 173.2, 169.7 (24C, 22×C=O), 167.6 (1C, C1''), 139.9, 136.8 (2C, 2×C_q (Bn)), 131.5, 131.2, 131.0, 130.4, 130.3 (10C, C_{ar} (Bn)), 100.8 (1C, C1'), 98.9 (2C, C1, C2''), 77.5 (1C, T^{β*}), 73.5 (1C, C6''), 72.8 (1C, CH₂ (Bn-Ether)), 71.4 (1C, C3), 71.3 (1C, C3'), 70.3 (1C, C4), 70.2 (1C, C5'), 69.4, 69.3, 67.9 (5C, CH₂(CH₂OCH₂)₂), 69.6 (2C, C2', C4''), 68.6 (1C, CH₂ (Bn-Ester)), 68.0 (1C, C4'), 67.5 (1C, C8''), 67.4 (1C, C5), 67.3 (1C, C6'), 67.2 (1C, C7''), 66.8 (1C, T^β), 66.3 (1C, COCH₂CH₂), 63.1 (1C, C6), 61.6 (1C, C9''), 61.2 (1C, S^β), 60.0, 59.1, 58.9 (3C, 3×P^α), 58.8 (1C, V^α), 56.7 (1C, T^{α*}), 54.5 (2C, T^α, S^α), 51.0 (1C, R^α), 50.0 (1C, D^α), 48.5 (1C, C5''), 48.4 (1C, C2), 47.7, 47.4 (2C, 2×A^α), 47.4, 47.3 (3C, 3×P^δ), 42.2 (1C, G^α), 40.3 (1C, R^δ), 36.8 (1C, C3''), 35.7 (1C, COCH₂CH₂), 35.0 (1C, D^β), 30.2 (1C, V^β), 30.0 (1C, CH₃ (SAc)), 29.2, 28.8, 28.7 (3C, 3×P^β), 28.2 (1C, S-CH₂), 27.4 (1C, R^β), 24.5 (3C, 3×P^γ), 23.9 (1C, R^γ), 22.3, 21.7 (2C, 2×CH₃ (NAc)), 20.9, 20.7, 20.1, 19.9, 19.8 (8C, 8×CH₃ (OAc)), 18.7 (1C, T^γ), 18.3 (1C, T^{γ*}), 18.4, (2C, V^γ), 15.2 (2C, 2×A^β).

12-Mercapto-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-threonyl-L-seryl-L-seryl-L-alanyl-L-seryl-L-threonyl-glycyl-L-histidyl-L-alanyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-prolyl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-L-threonyl-L-asparaginsäure (50)
(HS-{OEG}-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-Thr(αGalNAc)-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp-OH)

Eine Lösung von 22 mg (10.3 μmol) AcS-{OEG}-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-

Thr(α Ac₃GalNAc)-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp-OH (**46**) in 30 ml entgastem Methanol (HPLC-Grade) wird tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen Lösung von Natriummethanolat in entgastem Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5-10 erreicht ist. Die Lösung wird drei Stunden bei Raumtemp. unter Argon gerührt und anschließend durch Zugabe von Kationaustauscher (Amberlyst 15, stark sauer) neutralisiert. Das Methanol wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand durch semipräparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) → (50:50) in 60 Min., $R_t = 24.1$ Min., $\lambda = 214$ nm) gereinigt. Um eine oxidative Dimerisierung zu vermeiden, wird das Produkt nur massenspektrometrisch charakterisiert und gleich weiter verarbeitet.

Ausb.: 7 mg (35%); farbloses Lyophilisat.

C₈₁H₁₃₃N₁₉O₃₅S (M = 1965.09 g/mol) [1963.89].

ESI-MS (positiv), m/z: 1964.9 ([M+H]⁺, ber.: 1964.9), 994.0 ([M+H+Na]²⁺, ber.: 994.0).

Kupplung des MUC4(T_N)-Glycopeptids an BSA (51)

In 2 mL entgastem Phosphat-Puffer (pH=7.0) werden 7 mg (3.56 μ mol) HS-{OEG}-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-Thr(α GalNAc)-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp-OH (**50**) gelöst und zu einer Lösung von 4 mg mit dem Olefin-Linker modifiziertem BSA (**39**) in 2 ml entgastem Phosphat-Puffer gegeben. Die Lösung wird sechs Stunden in einem Quarzglas unter Argon mit UV-Licht bestrahlt. Das Konjugat wird durch Dialyse (*Spectra/Por*[®] *Floatalyzer*) gegen dest. Wasser gereinigt und lyophilisiert.

Ausb.: 5 mg; leicht gelbliches Lyophilisat.

MALDI-MS (positiv), m/z: 76320.0, entspricht 2 Molekülen Glycopeptid pro Molekül BSA.

12-Mercapto-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (52)

HS-{OEG}-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH

Eine Lösung von 22 mg (12.5 μ mol) AcS-{OEG}-Gly-Val-Thr(α Ac₃GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH (**47**) in 20 ml entgastem MeOH wird tropfenweise mit einer

frisch hergestellten 1%igen Lösung von Natriummethanolat in entgastem Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5-10 erreicht ist. Die Lösung wird drei Stunden bei Raumtemp. unter Argon gerührt und anschließend mit zwei Tropfen Essigsäure neutralisiert. Das Methanol wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand durch semipräparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) → (50:50) in 60 Min., $R_t = 22.7$ Min., $\lambda = 214$ nm) gereinigt. Um eine oxidative Dimerisierung zu vermeiden, wird das Produkt nur massenspektrometrisch charakterisiert und gleich weiter verarbeitet.

Ausb.: 12 mg (60%); farbloses Lyophilisat.

$C_{66}H_{110}N_{16}O_{27}S$ ($M = 1591.74$ g/mol) [1590.75].

ESI-MS (positiv), m/z : 1635.7 ($[M-H+2Na]^+$, ber.: 1635.7), 1613.8 ($[M+Na]^+$, ber.: 1613.7), 829.3 ($[M-H+3Na]^{2+}$, ber.: 829.4).

Kupplung des MUC1(T_N)-Glycopeptids an BSA (53)

In 4 mL entgastem Phosphat-Puffer (pH=7.0) werden 11 mg (6.9 μ mol) HS-{OEG}-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH (**52**) gelöst und zu 4 mg mit dem Olefin-Linker modifiziertem BSA (**39**) gegeben. Die Lösung wird sechs Stunden in einem Quarzglas unter Argon mit UV-Licht bestrahlt. Das Konjugat wird durch Dialyse (*Spectra/Por[®] Floatalyzer*) gegen dest. Wasser gereinigt und lyophilisiert.

Ausb.: 7 mg; farbloses Lyophilisat.

MALDI-MS (positiv), m/z : 83923.6, entspricht 7-8 Molekülen Glycopeptid pro Molekül BSA.

Nachkupplung des MUC1(T_N)-Glycopeptids (53a)

In 3 mL entgastem Phosphat-Puffer (pH=7.0) werden 7 mg (4.4 μ mol) HS-{OEG}-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH (**52**) gelöst und zu 2 mg bereits beladenem BSA (**53**) gegeben. Die Lösung wird neun Stunden in einem Quarzglas unter Argon mit UV-Licht bestrahlt. Das Konjugat wird durch Dialyse (*Spectra/Por[®] Floatalyzer*) gegen dest. Wasser gereinigt und lyophilisiert.

Ausb.: 2 mg; farbloses Lyophilisat.

12-Mercapto-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-glycyl-L-valyl-O-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (54)

(HS-{OEG}-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)

1. Hydrierung: Eine Lösung von 20 mg (8.8 μ mol) AcS-{OEG}-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH (**48**) in 10 ml Methanol (HPLC-grade) wird mit einer Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle (10%) versetzt. Die Suspension wird durch abwechselndes Evakuieren und Spülen mit Argon entgast. Die Argonatmosphäre wird durch Wasserstoff ersetzt (H₂-Ballon) und die Suspension 24 Stunden gerührt (Reaktionskontrolle durch analytische HPLC). Der Katalysator wird über *Hyflo* abfiltriert, wobei mit ca. 50 ml Methanol nachgewaschen wird. Das Methanol wird i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Ausb.: 15 mg (max. 78%); farbloses Lyophilisat; R_t = 20.8 Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 60 Min., λ = 214 nm).

C₉₁H₁₄₁N₁₇O₄₂S (M = 2177.25 g/mol) [2175.91].

2. Deacetylierung: Eine Lösung des rohen Debenzylierungsprodukts in 20 ml entgastem Methanol wird tropfenweise mit einer 1%igen Lösung von Natriummethanolat in entgastem Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5 erreicht ist. Die Lösung wird 7 Stunden unter Argon gerührt (Reaktionskontrolle durch analytische HPLC). Durch Zugabe von 2 Tropfen Essigsäure wird die Lösung neutralisiert und das Methanol i. Vak. abdestilliert. Die Reinigung des Rückstands erfolgt durch semipräparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (50:50) in 60 Min., R_t = 24.1 Min., λ = 214 nm).

Ausb.: 8 mg (42%, 2 Stufen); farbloses Lyophilisat.

C₇₇H₁₂₇N₁₇O₃₅S (M = 1882.99 g/mol) [1881.84].

ESI-MS (positiv), m/z: 1010.0 ([M-2H+3K+Na]²⁺, ber.: 1009.9), 1002.0 ([M-2H+2K+2Na]²⁺, ber.: 1001.9), 994.0 ([M-2H+3Na+K]²⁺, ber.: 993.9), 986.0 ([M-2H+4Na]²⁺, ber.: 985.9).

Kupplung des MUC1(ST_N)-Glycopeptids an BSA (55)

In 3 mL entgastem Phosphat-Puffer (pH=7.0) werden 8 mg (4.2 μ mol) HS-{OEG}-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH (54) gelöst und zu 3 mg mit dem Olefin-Linker modifiziertem BSA (39) gegeben. Die Lösung wird neun Stunden in einem Quarzglas unter Argon mit UV-Licht bestrahlt. Das Konjugat wird durch Dialyse (*Spectra/Por[®] Floatalyzer*) gegen dest. Wasser gereinigt und lyophilisiert. *Ausb.*: 5 mg; farbloses Lyophilisat.

12-Mercapto-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[3-O-((5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (56)
(HS-{OEG}-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2 \rightarrow 3)- β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)

1. Hydrierung: Eine Lösung von 35 mg (13.4 μ mol) AcS-{OEG}-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)- β 6-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH (49) in 10 ml Methanol (HPLC-grade) wird mit einer Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle (10%) versetzt. Die Suspension wird durch abwechselndes Evakuieren und Spülen mit Argon entgast. Die Argonatmosphäre wird durch Wasserstoff ersetzt (H₂-Ballon) und die Suspension 48 Stunden gerührt (Reaktionskontrolle durch analytische HPLC). Der Katalysator wird über *Hyflo* abfiltriert, wobei mit ca. 50 ml Methanol nachgewaschen wird. Das Methanol wird i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Ausb.: 24 mg (max. 74%); schwach gelbliches Lyophilisat; R_t=21.7 Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 60 Min., λ = 214 nm).

C₁₀₁H₁₅₅N₁₇O₄₉S (M = 2423.46 g/mol) [2421.99].

ESI-MS (positiv), m/z: 1234.6 ([M+2Na]²⁺, ber.: 1234.5).

2. Deacetylierung: Das rohe Debenzylierungsprodukt wird in 15 ml entgaster wässriger Natriumhydroxidlösung (pH = 11.5) gelöst und 50 Stunden unter Argon gerührt

(Reaktionskontrolle durch analytische HPLC). Durch Zugabe von 3 Tropfen Essigsäure wird die Lösung neutralisiert und anschließend lyophilisiert. Die Reinigung des Rückstands erfolgt durch semipräparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) → (50:50) in 60 Min., $R_t = 21.1$ Min., $\lambda = 214$ nm).

Ausb.: 10 mg (36%, 2 Stufen); farbloses Lyophilisat; $R_t = 15.7$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{83}H_{137}N_{17}O_{40}S$ ($M = 2045.13$ g/mol) [2043.89].

Kupplung des MUC1(ST)-Glycopeptids an BSA (57)

In 4 mL entgastem Phosphat-Puffer (pH=7.0) werden 10 mg (4.9 μ mol) HS- $\{OEG\}$ -Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→3)- β Gal-(1→3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-OH (**56**) gelöst und zu 3.5 mg mit dem Olefin-Linker modifiziertem BSA (**39**) gegeben. Die Lösung wird neun Stunden in einem Quarzglas unter Argon mit UV-Licht bestrahlt. Das Konjugat wird durch Dialyse (*Spectra/Por[®] Floatalyzer*) gegen dest. Wasser gereinigt und lyophilisiert.

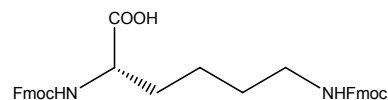
Ausb.: 6 mg; farbloses Lyophilisat.

5.4 Synthese der dendrimeren Glycopeptide (MAPs)

5.4.1 Synthese des festphasengebundenen, tetrameren Lysin-Cores

N^α, N^ϵ -Bis(9H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-lysin (58)

(Fmoc-Lys(Fmoc)-OH)



In einer Mischung aus 80 ml Wasser und 80 ml 1,4-Dioxan werden 1.50 g (8.2 mmol) L-Lysin-monohydrochlorid und 3.30 g (31.0 mmol) Natriumcarbonat gelöst. Die Lösung wird im Eisbad gekühlt. Man gibt nun langsam unter Rühren 6.90 g (20.5 mmol) Fmoc-OSu, suspendiert in 25 ml Aceton hinzu. Die Suspension wird zwei Stunden bei 0°C und anschließend 18 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Dioxan und Aceton werden i. Vak. abdestilliert und die wässrige Reaktionslösung anschließend mit konz. HCl auf pH=1 angesäuert. Das ausgefallene Rohprodukt wird abfiltriert und mit je 25 ml 1M HCl, Dichlormethan und Diethylether gewaschen. Der Feststoff wird in ca. 150 ml Diethylether suspendiert und 30 Minuten unter kräftigem Rühren refluxiert. Das Produkt wird noch heiß abfiltriert und i. Vak. getrocknet.

Ausb.: 3.51 g (73%); farbloser, amorpher Feststoff; Schmp. 132-134 °C; $[\alpha]_D^{23} = -7.5^\circ$ (c = 1.00, DMF).

$C_{36}H_{34}N_2O_6$ (M = 590.67 g/mol) [590.24].

ESI-MS (positiv), m/z: 1203.7 ($[2M+Na]^+$, ber.: 1203.5), 613.3 ($[M+Na]^+$, ber.: 613.2).

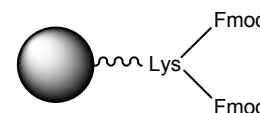
1H -NMR (200 MHz, DMSO), δ [ppm]: 12.57 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, 4H, 2×H4-, 2×H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz), 7.75-7.61 (m, 4H, 2×H1-, 2×H8-Fmoc), 7.41 (t, 4H, 2×H3-, 2×H6-Fmoc, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4$ Hz), 7.32 (t, 4H, 2×H2-, 2×H7-Fmoc, $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.3$ Hz), 4.32-4.16 (m, 6H, 2×CH₂ (Fmoc), 2×CH (Fmoc)), 3.96-3.86 (m, 1H, K^α), 3.02-2.93 (m, 2H, K^ε), 1.76-1.52 (m, 2H, K^β), 1.46-1.26 (m, 4H, K^δ, K^γ).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, BB, DEPT, DMSO), δ [ppm]: 144.1 (4C, 2×C1a-, 2×C8a-Fmoc), 140.8 (4C, 2×C4a-, 2×C5a-Fmoc), 127.7 (4C, 2×C3-, 2×C6-Fmoc), 127.4, 127.2 (4C, 2×C2-, 2×C7-Fmoc), 125.4, 125.3 (4C, 2×C1-, 2×C8-Fmoc), 121.5, 120.1 (4C, 2×C4-, 2×C5-Fmoc), 65.3 (2C, 2×CH₂ (Fmoc)), 54.8 (1C, K^α), 46.9 (2C, 2×CH (Fmoc)), 29.3 (1C, K^δ), 25.3 (1C, K^β), 22.6 (1C, K^γ).

(Das Signal von K^ε ist durch DMSO verdeckt.)

Anbindung an die feste Phase (59)

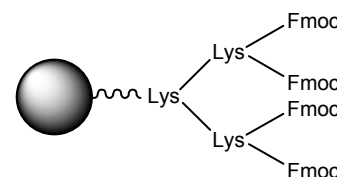
Tentagel-PHB-{Fmoc-Lys(Fmoc)}



500 mg mit dem PHB-Linker funktionalisiertes Tentagel-Harz (*Rapp* Tentagel S PHB, S30013; Beladung 0.24 mmol/g, 0.12 mmol) werden im Merrifield-Festphasenreaktor in 5 ml DMF 1 Stunde vorgequollen. 710 mg (1.2 mmol, 10 eq.) N^α , N^ϵ -Di(9*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-lysin (**59**) werden in 4 ml DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 90 μ L (0.61 mmol, 5eq.) N , N' -Diisopropyl-carbodiimid (DIC) versetzt. Es wird 1 Stunde bei 0°C gerührt, anschließend wird die Lösung des symmetrischen Anhydrids zum Harz gegeben. Nach Zugabe von 2 mg (0.01 mmol, 0.1 eq.) N,N -Dimethylaminopyridin (DMAP) in 0.5 ml DMF wird 20 Stunden geschüttelt. Die Reaktionslösung wird abfiltriert, anschließend erfolgt eine Nachkupplung mit dem halben Ansatz über fünf Stunden. Es wird filtriert und dreimal mit je 5 ml DMF gewaschen. Zum Blockieren nicht umgesetzter Hydroxylfunktionen wird das Harz 20 Minuten in einer Mischung aus 6 ml Pyridin und 3 ml Acetanhydrid geschüttelt. Es wird filtriert und nacheinander viermal mit je 5 ml DMF und insgesamt sechsmal wechselweise mit je 5 ml Dichlormethan und 5 ml Methanol gewaschen. Abschließend wird siebenmal mit je 5 ml Diethylether gewaschen und das Harz i. Hochvak. getrocknet. Es werden 505 mg Harz erhalten, das laut photometrischer Bestimmung (s. S. 125) eine Fmoc-Beladung von 0.432 mmol/g aufweist (entspricht 0.216 mmol Fmoc-Lys(Fmoc)-OH pro g, Kupplungsausbeute 90%).

Kupplung einer zweiten Lage Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (60)

Tentagel-PHB-{Lys-[Fmoc-Lys(Fmoc)]₂}



480 mg mit Fmoc-Lys(Fmoc) beladenes Tentagel-Harz (**59**, Beladung 0.432 mmol/g, 0.21 mmol) werden im Merrifield-Festphasenreaktor in 5 ml DMF 30 Minuten vorgequollen. Die Fmoc-Schutzgruppen werden durch einstündiges Schütteln in 10 ml DMF/Morpholin 1:1 abgespalten. Das Harz wird anschließend fünfmal mit je 10 ml DMF gewaschen. 1.22 g (2.07 mmol, 10 eq.) N^α , N^ϵ -Bis(9*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-lysin (**58**) werden in 10 ml DMF gelöst und nacheinander mit 317 mg (2.07 mmol) HOBt, 703 μ L (4.14 mmol) DIPEA und 665 mg (2.07 mmol) TBTU versetzt. Die Kupplungslösung wird zum Harz gegeben, und es wird 18 Stunden geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz mit viermal je 5 ml DMF gewaschen. Zur Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen wird

das Harz 20 Minuten in einer Mischung aus 6 ml Pyridin und 3 ml Acetanhydrid geschüttelt. Es wird filtriert und nacheinander fünfmal mit je 5 ml DMF und insgesamt sechsmal wechselweise mit je 5 ml Dichlormethan und 5 ml Methanol gewaschen. Abschließend wird sechsmal mit je 5 ml Diethylether gewaschen und das Harz i. Hochvak. getrocknet. Es werden 490 mg Harz erhalten, das laut photometrischer Bestimmung (s. S. 125) eine Fmoc-Beladung von 0.827 mmol/g aufweist (entspricht 0.413 mmol [Fmoc-Lys(Fmoc)]₂ pro g, Kupplungsausbeute 96%).

5.4.2 Synthese der dendrimeren Glycopeptide

***N*^α,*N*^ε-Bis-{-*N*^α,*N*^ε-bis-[*N*-acetyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-aspartyl-]-L-lysyl-}-L-lysine (61)
{[Ac-Thr(αAc₃GalNAc)-Asp]₂Lys}₂Lys-OH**

In 5 ml DMF werden 120 mg (60) (Beladung 0.207 mmol/g Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, entspricht 0.827 mmol/g Fmoc) eine Stunde vorgequollen. Dann werden die Fmoc-Gruppen durch einstündiges Schütteln in 6 ml DMF/Morpholin (1:1) abgespalten. Das Harz wird fünfmal mit je 5 ml DMF gewaschen. Eine Lösung von 340 mg (0.827 mmol, 10 eq.) Fmoc-Asp(*t*Bu) in 4 ml DMF wird nacheinander mit 130 mg (0.849 mmol) HOBt×H₂O, 280 μl (1.63 mol) DIPEA und 345 mg (0.834 mmol) HCTU versetzt, 5 Minuten gerührt und dann zum Harz gegeben. Das Harz wird in der Kupplungslösung 5 Stunden geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz viermal mit je 4 ml DMF gewaschen. Es folgt ein Capping mit 6 ml Pyridin/Acetanhydrid über 20 Minuten. Das Harz wird wieder viermal mit je 4 ml DMF gewaschen und anschließend eine Stunde in 6 ml DMF/Morpholin (1:1) geschüttelt. Nach viermaligem Waschen mit je 4 ml DMF, gibt man eine Lösung von 220 mg (0.328 mmol, 4 eq.) (9), 138 mg HATU (0.363 mmol), 50 mg HOAt (0.367 mmol) und 123 μl (0.718 mmol) DIPEA zu und schüttelt 12 Stunden. Die Kupplungslösung wird abfiltriert, es folgen ein Wasch-, ein Capping-, ein Wasch-, ein Fmoc-Abspaltung und schließlich noch ein Waschschrift (s.o.). Das Peptid wird durch zweistündiges Schütteln des Harzes in einer Mischung aus 5 ml TFA, 0.3 ml dest. Wasser und 0.3 ml TIS vom Harz abgespalten. Das Harz wird noch dreimal mit je 5 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. von der TFA befreit und der Rückstand dreimal i. Vak. mit Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird in wenig Acetonitril gelöst und in 20 ml eiskalten Diethylether getropft. Das

ausgefällene Peptid wird abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgt durch semipräparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) → (50:50) in 60 Min., $R_t = 14.9$ Min., $\lambda = 210$ nm).

Ausb.: 32 mg (56%); farbloses Lyophilisat; $R_t = 19.2$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 30 Min., $\lambda = 210$ nm).

$C_{114}H_{170}N_{18}O_{60}$ ($M = 2752.65$ g/mol) [2751.08].

ESI-MS (positiv), m/z : 2791.2 ($[M+K]^+$, ber.: 2791.0), 2775.2 ($[M+Na]^+$, ber.: 2775.1), 1399.1 ($[M+2Na]^{2+}$, ber.: 1399.0).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ [ppm]: 5.41 (d, 4H, 4×H4, $J_{H4,H3} = 2.8$ Hz), 5.16 (dd, 4H, 4×H3, $J_{H3,H4} = 10.5$ Hz, $J_{H3,H2} = 2.9$ Hz), 5.03 (d, 4H, 4×H1, $J_{H1,H2} = 3.2$ Hz), 4.76-4.71 (m, 2H, 2×D $^\alpha$), 4.66 (t, 2H, 2×D $^\alpha$, $J_{D^\alpha,D^\beta} = 6.8$ Hz), 4.55-4.51 (m, 4H, 4×T $^\alpha$), 4.47-4.23 (m, 4H, 4×H5), 4.38-4.26 (m, 11H, 4×T $^\beta$ {4.31}, 4×H2 {4.35}, 1×K $^\alpha$ {4.31}), 4.24-4.09 (m, 10H, 4×H6 $_{a,b}$ {4.20, 4.17}, 2×K $^\alpha$ {4.20, 4.11}), 3.27-3.02 (m, 6H, 3×K $^\epsilon$), 2.98-2.72 (m, 8H, 4×D $^\beta$), 2.19, 2.09, 2.07, 2.06, 1.97 (5×s, 20×3H, 20×CH $_3$ (Ac)), 1.83-1.63 (m, 6H, 3×K $^\beta$), 1.56-1.43 (m, 6H, 3×K $^\delta$), 1.41-1.23 (m, 6H, 3×K $^\gamma$), 1.28 (d, 4×3H, 4×T $^\gamma$, $J_{T^\gamma,T^\beta} = 6.3$ Hz).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , BB, HMQC): δ [ppm]: 174.5, 173.7, 173.5, 173.3, 173.2, 172.9, 171.2 (35C, 35×C=O); 101.3 (4C, 4×C1), 79.1 (4C, 4×T $^\beta$), 71.6 (4C, 4×C3), 70.7 (4C, 4×C4), 69.5 (4C, 4×C5), 65.2 (4C, 4×C6), 59.9 (4C, 4×T $^\alpha$), 56.7, 56.3, 55.2 (3C, 3×K $^\alpha$), 52.8, 52.5 (4C, 4×D $^\alpha$), 50.1 (4C, 4×C2), 41.7 (3C, 3×K $^\epsilon$), 38.3 (4C, 4×D $^\beta$), 33.2 (3C, 3×K $^\beta$), 30.5 (3C, 3×K $^\delta$), 24.8 (3C, 3×K $^\gamma$), 24.6, 24.2, 22.7 (20C, 20×CH $_3$ (Ac)), 20.3 (4C, 4×T $^\gamma$).

N^α, N^ϵ -Bis- $\{N^\alpha, N^\epsilon$ -bis-[*N*-acetyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-aspartyl]-L-lysyl}-L-lysine (62)
 $\{[Ac-Thr(\alpha GalNAc)-Asp]_2Lys\}_2Lys-OH$

Eine Lösung von 27 mg (9.8 μ mol) $\{[Ac-Thr(\alpha Ac_3GalNAc)-Asp]_2Lys\}_2Lys-OH$ (**61**) in 10 ml Methanol (HPLC-grade) wird tropfenweise mit einer frisch hergestellten, 1%igen Lösung von Natriummethanolat in Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 9-9.5 erreicht ist. Die Lösung wird 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt (Reaktionskontrolle durch analytische HPLC) und anschließend mit drei Tropfen Essigsäure neutralisiert. Das Methanol wird i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Reinigung

erfolgt durch semipräparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) → (50:50) in 100 Min., $R_t = 20.7$ Min., $\lambda = 214$ nm).

Ausb.: 22 mg (quant); farbloses Lyophilisat; $R_t = 8.9$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 30 Min., $\lambda = 214$ nm), $R_t = 16.7$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (50:50) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{90}H_{146}N_{18}O_{48}$ ($M = 2248.21$ g/mol) [2246.95].

ESI-MS (positiv), m/z : 1146.9 ($[M+2Na]^{2+}$, ber.: 1147.0), 1135.9 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1136.0), 1124.9 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1125.0).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ [ppm]: 4.92, 4.88 (2×d, 4H, 4×H1, $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz), 4.71-4.65 (2×t, 4H, 4×D $^\alpha$, $J_{D\alpha,D\beta} = 6.9$ Hz), 4.46 (d, 4H, 4×T $^\alpha$, $J_{T\alpha,T\beta} = 3.2$ Hz), 4.31-4.09 (m, 7H, 4×T $^\beta$ {4.22}, 3×K $^\alpha$ {4.30, 4.21, 4.11}), 4.09 (dd, 4H 4×H2, $J_{H2,H3} = 11.0$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.2$ Hz), 4.00-3.96 (m, 4H, 4×H5), 3.95-3.92 (m, 4H, 4×H4), 3.85-3.80 (m 4H, 4×H3), 3.72-3.69 (m, 8H, 4×H6_{a,b}), 3.24-3.03 (m, 6H, 3×K $^\epsilon$), 2.94-2.73 (m, 8H, 4×D $^\beta$), 2.08, 2.07, 2.02 (3×s, 24H, 8×CH $_3$ (Ac)), 1.86-1.64 (m, 6H, 3×K $^\beta$), 1.52-1.43 (m, 6H, 3×K $^\delta$), 1.37-1.25 (m, 6H, 3×K $^\gamma$), 1.24 (d, 12H, 4×T $^\gamma$, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , BB, HMQC): δ [ppm]: 175.3, 174.6, 174.4, 174.0, 173.6, 171.4, 171.2 (23C, 23×C=O), 99.2 (4C, 4×C1), 75.7 (4C, 4×T $^\beta$), 72.0 (4C, 4×C5), 69.0 (4C, 4×C4), 68.5 (4C, 4×C3), 61.8 (4C, 4×C6), 58.5 (4C, 4×T $^\alpha$), 54.8, 54.2, 53.1 (3C, 3×K $^\alpha$), 50.8, 50.5 (4C, 4×D $^\alpha$), 50.3 (4C, 4×C2), 39.6 (3C, 3×K $^\epsilon$), 36.2 (4C, 4×D $^\beta$), 30.8 (3C, 3×K $^\beta$), 28.3 (3C, 3×K $^\delta$), 22.2, 22.0, 21.6 (11C, 8×CH $_3$ (Ac), 3×K $^\gamma$), 18.6 (4C, 4×T $^\gamma$).

***N* $^\alpha$,*N* $^\epsilon$ -Bis- $\{N^\alpha$,*N* $^\epsilon$ -bis-[*N*-acetyl-L-threonyl-L-seryl-L-seryl-L-alanyl-L-seryl-L-threonyl-L-glycyl-L-histidyl-L-alanyl-L-threonyl-L-prolyl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-L-threonyl-L-aspartyl]-L-lysyl}-L-lysine (63)**
 $\{[Ac-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-Thr-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp]_2Lys\}_2Lys-OH$

Die automatisierte Peptidsynthese im Synthesizer erfolgt ausgehend von 120 mg (Beladung 0.207 mmol/g Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, entspricht 0.827 mmol/g Fmoc) des mit dem tetrameren Lysin-Core beladenen Harzes (**60**) nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll (S. 167). Nach Kupplung der letzten Aminosäure wird die *N*-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten und der *N*-Terminus mit Capping-Reagenz acetyliert. Zur Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger

Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt und zwei Stunden in einer Lösung aus 15 ml TFA, 0.9 ml TIS und 0.9 ml dest. Wasser geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit je 5 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. auf ca. 2 ml eingengt und dann in 20 ml eiskalten Diethylether getropft. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert, in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgt durch präparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 100. Min., $R_t = 41.9$ Min., $\lambda = 214$ nm).

Ausb.: 56 mg (40%); farbloses Lyophilisat; $R_t = 16.7$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{282}H_{454}N_{78}O_{108}$ ($M = 6665.09$ g/mol) [6661.24].

MALDI-MS (positiv), m/z : 6726.0 ($[M-H+K+Na]^+$, ber.: 6725.2).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ [ppm]: 8.60 (s, 4H, $4 \times H^e$), 7.26 (s, 4H, $4 \times H^d$), 4.76-4.63 (m, 8H, $4 \times D^a$ {4.71}, $4 \times H^a$ {4.70}), 4.59-4.29 (m, 48H, $16 \times T^a$ {4.54}, $4 \times L^a$ {4.54}, $12 \times S^a$ {4.48}, $8 \times P^a$ {4.41}, $8 \times A^a$ {4.33}), 4.27-4.08 (m, 23H, $4 \times V^a$ {4.09}, $16 \times T^b$ {4.08}, $3 \times K^a$ {4.26, 4.14, 4.11}), 3.92-3.79 (m, 40H, $4 \times G^a$ {3.90}, $12 \times S^b$ {3.85}, $4 \times P^b_a$ {3.81}), 3.73-3.56 (m, 4H, $4 \times P^b_b$), 3.26 (dd, 4H, $4 \times H^b_a$, $J_{H^b_a, H^b_b} = 15.5$ Hz, $J_{H^b_a, H^a} = 5.3$ Hz), 3.22-3.07 (m, 10H, $4 \times H^b_b$, $3 \times K^e$), 2.98-2.77 (m, 8H, $4 \times D^b$), 2.31-2.19 (m, 8H, $4 \times P^b_a$), 2.06 (s, $4 \times 3H$, $4 \times CH_3$ (Ac)), 2.08-1.92 (m, 20H, $4 \times V^b$ {2.05}, $4 \times P^b$ {1.98}), 1.91-1.80 (m, 14H, $4 \times P^b_b$, $3 \times K^b$), 1.75-1.64 (m, 4H, $4 \times L^b$), 1.58-1.43 (m, 14H, $4 \times L^b$, $3 \times K^d$), 1.38-1.32 (m, 30H, $8 \times A^b$ {1.38}, $3 \times K^b$ {1.34}), 1.23 (d, 12H, $4 \times T^b$), 1.21-1.14 (m, 36H, $12 \times T^b$), 0.97-0.86 (m, 48H, $4 \times V^b$ {0.92}, $4 \times L^d$ {0.89}).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , BB, HMQC), δ [ppm]: 175.1, 174.6, 173.6, 172.3, 172.1, 171.8, 171.5, 170.9, 169.9, 163.0 (75C, $75 \times C=O$), 133.3 (4C, $4 \times H^e$), 128.2 (4C, $4 \times H^f$), 117.3 (4C, $4 \times H^d$), 66.9, 66.8 (16C, $16 \times T^b$), 60.9, 60.7 (12C, $12 \times S^b$), 60.1, 59.1, 59.0 (8C, $8 \times P^a$), 59.7 (4C, $4 \times V^a$), 56.9 (16C, $16 \times T^a$), 56.4, 55.4 (3C, $3 \times K^a$), 55.4, 55.3 (12C, $12 \times S^a$), 51.9 (4C, $4 \times H^a$), 50.1 (4C, $4 \times L^a$), 50.0, 49.8 (8C, $8 \times A^a$), 49.5 (4C, $4 \times D^a$), 48.3, 47.6 (8C, $8 \times P^d$), 42.3 (4C, $4 \times G^a$), 41.6 (3C, $3 \times K^e$), 38.8 (4C, $4 \times L^b$), 36.4 (4C, $4 \times D^b$), 30.4 (3C, $3 \times K^d$), 29.8 (4C, $4 \times V^b$), 29.3, 29.2 (8C, $8 \times P^b$), 27.0 (3C, $3 \times K^b$), 26.3 (4C, $4 \times H^b$), 24.5 (8C, $8 \times P^b$), 24.2 (4C, $4 \times L^b$), 22.3, 20.5 (8C, $8 \times L^d$), 21.6 (4C, $4 \times CH_3$ (Ac)), 18.6, 18.5 (16C, $16 \times T^b$), 18.3, 17.6 (8C, $8 \times V^b$), 16.4, 16.2 (8C, $8 \times A^b$).

***N*^α,*N*^ε-Bis-{{*N*^α,*N*^ε-bis-[*N*-acetyl-L-threonyl-L-seryl-L-seryl-L-alanyl-L-seryl-L-threonyl-L-glycyl-L-histidyl-L-alanyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-prolyl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-L-threonyl-L-aspartyl]-L-lysyl}-L-lysine (64)**

{{Ac-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-Thr(αAc₃GalNAc)-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp}₂Lys}₂Lys-OH

Die automatisierte Peptidsynthese im Synthesizer erfolgt ausgehend von 125 mg (Beladung 0.207 mmol/g Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, entspricht 0.827 mmol/g Fmoc) des mit dem tetrameren Lysin-Core beladenen Harzes (**60**). Die Kupplung der ersten fünf Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll (S. 167). Die Kupplung des T_N-Bausteins erfolgt halbautomatisch. Hierzu wird zunächst die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe vom Harz abgespalten. Der Glycosylaminosäurebaustein (270 mg, 0.40 mmol, 4 eq.) wird mit 168 mg (0.44 mmol) HATU, 60 mg (0.44 mmol) HOAt und 97 μl (0.88 mmol) NMM aktiviert und in den Reaktor überführt. Das Harz wird drei Stunden in dieser Lösung geschüttelt. Die Kupplung der restlichen neun Aminosäuren erfolgt wieder vollautomatisch nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wird die *N*-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten und der *N*-Terminus mit Capping-Reagenz acetyliert. Zur Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt und zwei Stunden in einer Lösung aus 15 ml TFA, 0.9 ml TIS und 0.9 ml dest. Wasser geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz noch dreimal mit je 5 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. auf ca. 2 ml eingengt und dann in 20 ml eiskalten Diethylether getropft. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert, in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgt durch präparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) → (50:50) in 60. Min., R_t = 46.0 Min., λ = 214 nm).

Ausb.: 139 mg (68%); farbloses Lyophilisat; R_t = 12.7 Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 30 Min., λ = 214 nm); R_t = 21.1 Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 60 Min., λ = 214 nm).

C₃₃₈H₅₃₀N₈₂O₁₄₀ (M = 7982.39 g/mol) [7977.69].

ESI-MS (positiv), m/z: 2493.3 ([M+3H]³⁺, ber.: 2493.2), 1870.2 ([M+4H]⁴⁺, ber.: 1870.2).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY), δ [ppm]: 8.64 (s, 4H, 4×H^ε), 7.27 (s, 4H, 4×H^δ), 5.43-5.40 (m, 4H, 4×H₄), 5.27-5.25 (m, 4H, 4×H₃), 5.24-5.21 (m, 4H, 4×H₁), 4.82-4.65 (m, 12H,

4×T^{α*} {4.76}, 4×D^α {4.67}, 4×H^α {4.71}), 4.53-4.39 (m, 28H, 12×S^α {4.54, 4.49}, 4×H5 {4.50}, 4×A^α {4.49}, 8×P^α {4.48, 4.42}), 4.38-4.09 (m, 55H, 12×T^α {4.50}, 4×L^α {4.36}, 4×T^{β*} {4.32}, 4×A^α {4.32}, 4×H2 {4.28}, 3×K^α {4.28, 4.15}, 4×H6_{a,b} {4.25, 4.17}, 12×T^β {4.20}, 4×V^α {4.15}), 3.94-3.80 (m, 30H, 4×G^α {3.92}, 4×P^δ_a {3.90}, 12×S^β {3.83}), 3.78-3.56 (m, 12H, 8×P^δ {3.76, 3.69, 3.63}), 3.30 (dd, 4H, 4×H^β_a, J_{Hβa,Hβb} = 15.5 Hz, J_{Hβa,Hα} = 5.2 Hz), 3.20-3.08 (m, 10H, 4×H^β_b {3.13}, 3×K^ε {3.16}), 2.98-2.77 (m, 8H, 4×D^β), 2.34-2.17 (m, 8H, 4×P^β_a {2.30, 2.24}), 2.21, 2.07, 2.06, 1.97, 1.92 (5×s, 5×12H, 20×CH₃ (Ac)), 2.11-1.80 (m, 20H, 4×V^β {2.06}, 4×P^γ {2.09, 2.02}, 8×P^β_b {1.87, 1.83}), 1.79-1.43 (m, 24H, 3×K^β {1.78, 1.70}, 4×L^γ {1.64}, 4×L^β {1.55}), 3×K^δ {1.48}), 1.41 (d, 4H, 4×A^β, J_{Aα,Aβ} = 2.7 Hz), 1.39 (d, 4H, 4×A^β, J_{Aα,Aβ} = 2.7 Hz), 1.35 (d, 4H, 4×T^γ, J_{Tγ,Tβ} = 6.2 Hz), 1.32-1.26 (m, 6H, 3×K^γ), 1.21-1.15 (m, 36H, 12×T^γ), 1.01-0.86 (m, 48H, 4×V^γ {0.91}, 4×L^δ {0.89}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, BB, HMQC), δ [ppm]: 175.1, 174.9, 174.6, 174.0, 173.7, 173.6, 173.3, 173.2, 172.3, 171.9, 171.0, 170.9, 169.7, 162.9 (91C, 91×C=O), 133.3 (4C, 4×H^ε), 128.6 (4C, 4×H^γ), 117.2 (4C, 4×H^δ), 98.6 (4C, 4×C1), 75.5 (4C, 4×T^{β*}), 69.7 (4C, 4×C3), 68.4 (4C, 4×C4), 67.2 (4C, 4×C5), 67.0, 66.9, 66.8 (12C, 12×T^β), 62.6 (4C, 4×C6), 60.9, 60.7 (12C, 12×S^β), 60.1 (8C, 8×P^α), 59.8 (4C, 4×V^α), 59.7, 59.6, 59.5 (12C, 12×T^α), 55.6, 55.4 (12C, 12×S^α), 55.3 (4C, 4×T^{α*}), 54.2, 53.6 (3C, 3×K^α), 51.9 (4C, 4×H^α), 50.2 (4C, 4×L^α), 50.1, 49.6 (8C, 8×A^α), 50.1 (4C, 4×D^α), 47.9 (4C, 4×C2), 48.1, 47.8, 47.7 (8C, 8×P^δ), 42.6 (4C, 4×G^α), 39.7 (4C, 4×L^β), 39.1 (3C, 3×K^ε), 35.4 (4C, 4×D^β), 30.6 (3C, 3×K^β), 29.9 (4C, 4×V^β), 29.4, 29.2 (8C, 8×P^β), 27.8 (3C, 3×K^δ), 26.3 (4C, 4×H^β), 24.7, 24.3 (8C, 8×P^γ), 24.2 (4C, 4×L^γ), 22.3 (8C, 8×L^δ), 22.2 (3C, 3×K^γ), 21.9, 21.7, 20.2, 20.1 (20C, 20×CH₃ (Ac)), 18.7 (16C, 16×T^γ), 18.6 (4C, 4×T^{γ*}), 18.4, 17.6 (8C, 8×V^γ), 16.4, 16.2 (8C, 8×A^β).

N^α,N^ε-Bis-{N^α,N^ε-bis-[N-acetyl-L-threonyl-L-seryl-L-seryl-L-alanyl-L-seryl-L-threonyl-L-glycyl-L-histidyl-L-alanyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-prolyl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-L-threonyl-L-aspartyl]-L-lysyl}-L-lysine (65)

{[Ac-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-Thr(αGalNAc)-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp]₂Lys}₂Lys-OH

Eine Lösung von 56 mg (0.13 μmol) {[Ac-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-Thr(αAc₃GalNAc)-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp]₂Lys}₂Lys-OH (**64**) in 50 ml Methanol (HPLC-grade) wird tropfenweise mit einer frisch hergestellten, 1%igen Lösung von

Natriummethanolat in Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 9-9.5 erreicht ist. Die Lösung wird 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt, wobei das Peptid teilweise ausfällt, und anschließend mit zwei Tropfen Essigsäure neutralisiert. Das Methanol wird i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt durch semipräparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) → (50:50) in 80 Min., $R_t = 26.3$ Min., $\lambda = 214$ nm).

Ausb.: 35 mg (67%); farbloses Lyophilisat; $R_t = 17.5$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{314}H_{506}N_{82}O_{128}$ ($M = 7477.85$ g/mol) [7473.56].

ESI-MS (positiv), m/z : 2493.3 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 2493.2), 1870.2 ($[M+4H]^{4+}$, ber.: 1870.2).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ [ppm]: 8.61 (s, 4H, $4 \times H^e$), 7.28 (s, 4H, $4 \times H^d$), 5.04 (d, 4H, $4 \times H1$, $J_{H1,H2} = 3.5$ Hz), 4.79-4.63 (m, 12H, $4 \times D^\alpha$ {4.69}, $4 \times H^\alpha$ {4.72}, $4 \times T^{\alpha*}$ {4.70}), 4.56-4.40 (m, 28H, $12 \times S^\alpha$ {4.49}, $4 \times A^\alpha$ {4.46}, $8 \times P^\alpha$ {4.45}, $4 \times L^\alpha$ {4.42}), 4.38-4.31 (m, 16H, $4 \times A^\alpha$ {4.35}, $12 \times T^\alpha$ {4.34}), 4.30-4.10 (m, 23H, $3 \times K^\alpha$ {4.29, 4.16}, $4 \times T^{\beta*}$ {4.25}, $12 \times T^\beta$ {4.20}, $4 \times V^\alpha$ {4.12}), 4.09-4.01 (m, 8H, $4 \times H2$ {4.09}, $4 \times H5$ {4.05}), 3.96 (d, 4H, $4 \times H4$, $J_{H4,H3} = 2.5$ Hz), 3.94-3.83 (m, 40H, $4 \times G^\alpha$ {3.93}, $12 \times S^\beta$ {3.88}, $4 \times H3$ {3.88}, $4 \times P_a^\delta$ {3.87}), 3.78-3.55 (m, 16H, $4 \times H_{6a,b}$ {3.76}, $4 \times P_b^\delta$ {3.74, 3.62}), 3.29 (dd, 4H, $4 \times H_{\beta a}$, $J_{H_{\beta a}, H_{\beta b}} = 15.5$ Hz, $J_{H_{\beta a}, H_\alpha} = 5.3$ Hz), 3.21-3.09 (m, 10H, $4 \times H_{\beta b}$ {3.13}, $3 \times K^e$ {3.18}), 2.99-2.77 (m, 8H, $4 \times D^\beta$), 2.32-2.18 (m, 8H, $4 \times P_a^\beta$), 2.06 (s, $4 \times 3H$, $4 \times CH_3$ (Ac)), 2.08-1.92 (m, 20H, $4 \times V^\beta$ {2.05}, $4 \times P^\gamma$ {1.98}), 1.91-1.80 (m, 14H, $4 \times P_b^\beta$, $3 \times K^\beta$), 1.75-1.64 (m, 4H, $4 \times L^\gamma$), 1.58-1.43 (m, 14H, $4 \times L^\beta$, $3 \times K^\delta$), 1.38-1.32 (m, 30H, $8 \times A^\beta$ {1.38}, $3 \times K^\gamma$ {1.34}), 1.23 (d, 12H, $4 \times T^\gamma$), 1.21-1.14 (m, 36H, $12 \times T^\gamma$), 0.97-0.86 (m, 48H, $4 \times V^\gamma$ {0.92}, $4 \times L^\delta$ {0.89}).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , BB, HMQC), δ [ppm]: 175.1, 174.8, 174.6, 173.3, 172.3, 172.1, 171.5, 171.5, 171.2, 171.0, 170.9, 169.5 (79C, $79 \times C=O$), 133.3 (4C, $4 \times H^e$), 128.2 (4C, $4 \times H^d$), 117.2 (4C, $4 \times H^d$), 98.5 (4C, $4 \times C1$), 74.7 (4C, $4 \times T^{\beta*}$), 71.2 (4C, $4 \times C5$), 68.7 (4C, $4 \times C3$), 68.5 (4C, $4 \times C4$), 66.9, 66.8, 66.7 (12C, $12 \times T^\beta$), 61.2 (4C, $4 \times C6$), 60.9, 60.8 (12C, $12 \times S^\beta$), 60.1, 59.7 (8C, $8 \times P^\alpha$), 59.7 (4C, $4 \times V^\alpha$), 59.6, 59.1 (3C, $3 \times K^\alpha$), 59.2, 59.1, 58.9, 58.8 (12C, $12 \times T^\alpha$), 55.6 (4H, $4 \times T^{\alpha*}$), 55.5, 55.3 (12C, $12 \times S^\alpha$), 51.9 (4C, $4 \times H^\alpha$), 50.3 (4C, $4 \times L^\alpha$), 49.9, 49.7 (8C, $8 \times A^\alpha$), 49.8 (4C, $4 \times C2$), 49.5 (4C, $4 \times D^\alpha$), 47.9, 47.8 (8C, $8 \times P^\delta$), 42.4 (4C, $4 \times G^\alpha$), 39.3 (4C, $4 \times L^\beta$), 39.0 (3C, $3 \times K^e$), 35.3 (4C, $4 \times D^\beta$), 30.4 (3C, $3 \times K^\beta$), 29.9 (4C, $4 \times V^\beta$), 29.3, 29.2 (8C, $8 \times P^\beta$), 27.6 (3C, $3 \times K^\delta$), 26.3 (4C, $4 \times H^\beta$), 24.6, 24.4 (8C, $8 \times P^\gamma$), 24.2 (4C, $4 \times L^\gamma$), 22.4, 21.3

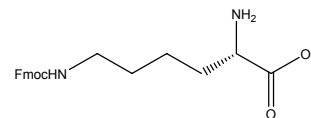
(8C, 8×L^δ), 22.1, 21.6 (8C, 8×CH₃ (Ac)), 18.6 (12C, 12×T^γ), 18.5 (4C, 4×T^{γ*}), 18.3, 17.7 (8C, 8×V^γ), 16.4, 16.2 (8C, 8×A^β).

5.5 Synthese von Konjugaten aus Glycopeptid und T-Zell-Epitop

5.5.1 Synthese von ivDde-Lys(Fmoc)-OH und Anbindung ans Harz

N^ε-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-lysin (67)²³²

(H-Lys(Fmoc)-OH)



1.1 g (6.02 mmol) L-Lysin-monohydrochlorid und 200 mg Natriumhydroxid werden in 10 ml Wasser gelöst. Man gibt 0.8 g (3.20 mmol) Kupfersulfat-Pentahydrat in 10 ml Wasser zu und rührt die tief-dunkelblaue Lösung 30 Minuten. Anschließend wird die Lösung auf 0 °C gekühlt und man tropft 1.60 g (6.19 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-chlorid (Fmoc-Cl), gelöst in 5 ml Dioxan, über 5 Minuten zu. Die Reaktionsmischung wird noch 15 Minuten im Eisbad und anschließend 3 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, nacheinander mit je 20 ml kaltem Wasser, Ethanol und Essigester gewaschen und i. Vak. getrocknet. Das hellblaue Rohprodukt wird in 100 ml Wasser suspendiert, mit 2.5 g Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) versetzt und bei 80 °C eine Stunde gerührt. Nach Abkühlen wird der Feststoff abfiltriert und mit je 50 ml kaltem Wasser und Ethanol gewaschen. Das Produkt wird i. Vak. getrocknet. Es ist ausreichend rein für die weitere Umsetzung.

Ausb.: 1.62 g (73%); farbloser, amorpher Feststoff.

C₂₁H₂₄N₂O₄ (M = 368.43 g/mol) [368.17].

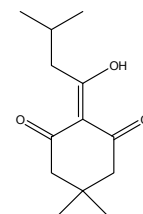
ESI-MS (positiv), *m/z*: 737.4 ([2M+H]⁺, ber.: 737.4), 369.2 ([M+H]⁺, ber.: 369.2).

¹*H-NMR* (300 MHz, DMSO), δ [ppm]: 7.87 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.0 Hz), 7.73-7.58 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.40 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.1 Hz), 7.31 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, J_{H2,H34} = J_{H7,H6} = 7.1 Hz), 4.33-4.08 (m, 4H, CH₂ (Fmoc), CH (Fmoc), K^α), 3.03-2.87 (m, 2H, K^ε), 1.77-1.47 (m, 4H, K^β, K^δ), 1.45-1.13 (m, 2H, K^γ).

2-(1-Hydroxy-3-methyl-butyliden)-5,5-dimethyl-cyclohexan-1,3-dion (68)

(ivDde-OH)²²⁹

Eine Lösung von 5.0 g (35.7 mmol) Dimedon in 70 ml DMF/Dichlormethan 2:5 wird nacheinander mit 4.0 ml (36.2 mmol) Isovaleriansäure, 6.9 g (36.0 mmol) *N*-Ethyl-*N*'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) und 4.4 g (36.0 mmol) *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) versetzt und 24 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Die



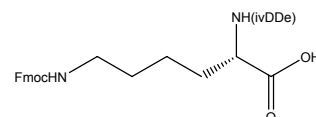
Reaktionsmischung wird mit 300 ml Dichlormethan verdünnt und mit je zweimal mit 100 ml Wasser, 5%iger Zitronensäure- und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak entfernt. Das so erhaltene Produkt ist rein genug für die weitere Umsetzung.

Ausb.: 6.20 g (78%); gelbe Flüssigkeit; $R_f = 0.75$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1).

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ ($M = 224.30$ g/mol) [224.14].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 13.94 (s, 1H, OH (Enol)), 2.86 (d, 2H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-$, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 6.6$ Hz), 2.49 (s, 2H, CO- CH_2), 2.30 (s, 2H, CO- CH_2), 2.08 (sep, 1H, CH, $J_{\text{CH},\text{CH}_3} = 7.0$ Hz), 1.02 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$ (Dimedon)), 0.91 (d, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}} = 7.0$ Hz).

N^α -[1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-3-methylbutyl]- N^ϵ -(9H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-lysin (69)
(ivDde-Lys(Fmoc)-OH)



Zu einer Lösung von 2.60 g (11.6 mmol) 2-(1-Hydroxy-3-methyl-butyliden)-5,5-dimethylcyclohexan-1,3-dion (**68**) in 50 ml Ethanol gibt man 2.30 g (6.2 mmol) fein pulverisiertes N^ϵ -(9H-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-lysin (**67**). Die Suspension wird mit 50 μL Trifluoressigsäure versetzt und 80 Stunden unter Rückfluss gekocht. Die noch heiße Reaktionsmischung wird filtriert und das Filtrat i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird in 300 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit je 100 ml 5%iger Zitronensäurelösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (CH/EE 1:1 \rightarrow EE \rightarrow EE/MeOH 4:1) gereinigt.

Ausb.: 1.62 g (45%); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.20$ (EE/AcOH 100:1); $R_t = 45.5$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm); $[\alpha]_D^{23} = 7.4^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_6$ ($M = 574.71$ g/mol) [574.30].

ESI-MS (positiv), m/z : 575.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 575.3).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 14.11, 14.00 ($2 \times$ d (Konformere), 1H, NH (Enamin), $J_{\text{NH},\text{K}\alpha} = 7.5$ Hz), 8.81 (bs, 1H COOH), 7.73 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$ Hz), 7.60-7.49 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.36 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2/\text{H}_4} = J_{\text{H}_6,\text{H}_5/\text{H}_7} = 7.4$ Hz), 7.27 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1/\text{H}_3} = J_{\text{H}_7,\text{H}_6/\text{H}_8} = 7.3$ Hz), 5.11 (s, 1H, NH (Urethan)), 4.50-

4.33 (m, 3H, CH₂ (Fmoc), K^α). 4.22-4.13 (m, 1H, CH (Fmoc)), 3.20-2.77 (m, 4H, K^ε, =C-CH₂-), 2.38 (s, 4H, 2×CH₂ (Dimedon)), 1.99-1.84 (m, 4H, CH(CH₃)₂, K^β, K^{δ_a}), 1.59-1.38 (m, 3H, K^{δ_b}, K^γ), 1.01-0.88 (m, 12H, CH(CH₃)₂, C(CH₃)₂).

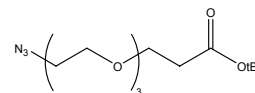
¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 198.6 (2C, 2× C=O (Keton)), 176.6, 175.4 (2C, COOH, =C-NH), 156.6 (1C, C=O (Urethan)), 143.9 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.0 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.0 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 107.3 (1C, CO-C-CO), 66.7 (1C, CH₂ (Fmoc)), 56.3 (1C, K^α), 52.6 (2C, 2×CO-CH₂-), 47.2 (1C, CH (Fmoc)), 40.5 (1C, K^ε), 37.9 (1C, CH(CH₃)₂), 32.8 (1C, K^δ), 30.0, 29.3 (3C, K^β, =C-CH₂), 28.2 (2C, C(CH₃)₂), 22.6, 22.4 (3C, K^γ, CH(CH₃)₂), 14.2 (1C, C(CH₃)₂).

Anbindung an die feste Phase (70)

Tentagel-PHB-{ivDde-Lys(Fmoc)}

500 mg mit dem PHB-Linker funktionalisiertes Tentagel-Harz (*Rapp* Tentagel R PHB, S30013; Beladung 0.21 mmol/g, 0.105 mmol) werden im Merrifield-Festphasenreaktor in 5 ml DMF 1 Stunde vorgequollen. 575 mg (1.0 mmol, 9.5 eq.) N^α-[1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-3-methylbutyl]-N^ε-(9*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-lysin (**69**) werden in 4 ml DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 78 μL (0.53 mmol) *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) versetzt. Es wird 35 Minuten bei 0°C gerührt, anschließend wird die Lösung des symmetrischen Anhydrids zum Harz gegeben. Nach Zugabe von 1.3 mg (0.01 mmol, 0.1 eq.) DMAP in 0.5 ml DMF wird 20 Stunden geschüttelt. Die Reaktionslösung wird abfiltriert, anschließend erfolgt eine Nachkupplung mit dem halben Ansatz über fünf Stunden. Es wird filtriert und dreimal mit je 5 ml DMF gewaschen. Zum Blockieren nicht umgesetzter Hydroxylfunktionen wird das Harz 20 Minuten in einer Mischung aus 4 ml Pyridin und 1.5 ml Acetanhydrid geschüttelt. Es wird filtriert und nacheinander viermal mit je 4 ml DMF und insgesamt sechsmal wechselweise mit je 4 ml Dichlormethan und 4 ml Methanol gewaschen. Abschließend wird siebenmal mit je 4 ml Diethylether gewaschen und das Harz i. Hochvak. getrocknet. Es werden 510 mg Harz erhalten, das laut photometrischer Bestimmung (s. S. 125) eine Fmoc-Beladung von 0.21 mmol/g aufweist (Kupplungsausbeute quant.).

5.5.2 Synthese eines Fmoc-geschützten Ethylenglykol-Spacers

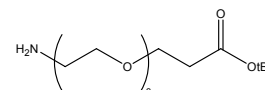
12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (71)²³⁴**(N₃-{OEG}-COO*t*Bu)**

Eine Lösung von 2.40 g (6.73 mmol) 12-Methansulfonyl-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**40**) in 15 mL DMF wird mit 0.90 g (13.84 mmol) Natriumazid versetzt und 60 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Das DMF wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand in 50 ml Diethylether aufgenommen. Die Etherphase wird mit 30 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen und die wässrige Phase anschließend dreimal mit je 15 ml Ether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (CH/EE 3:1) gereinigt.

Ausb.: 1.45 g (71%); farbloses Öl; R_f = 0.43 (EE/CH 3:1).

C₁₃H₂₅N₃O₅ (M = 303.36 g/mol) [303.18].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 3.67 (t, 2H, CO-CH₂-CH₂-, J_{CH₂,CH₂} = 6.5 Hz), 3.64-3.57 (m, 10H, 5×OCH₂), 3.35 (t, 2H, N-CH₂-, J_{CH₂,CH₂} = 5.1 Hz), 2.46 (t, 2H, CO-CH₂-, J_{CH₂,CH₂} = 6.6 Hz). 1.41 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

12-Amino-4,7,10-trioxa-decansäure-*tert*-butylester (72)²³⁴**(H₂N-{OEG}-COO*t*Bu)**

1.45 g (4.8 mmol) 12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**71**) werden in 20 ml Isopropanol gelöst. Nach mehrmaligem Evakuieren und Begasen mit Argon wird aus 500 mg Ni/Al-Legierung frisch hergestellter, neutral gewaschener Raney-Nickel zugegeben. Nach erneutem Evakuieren und Begasen mit Argon wird die Argon-Atmosphäre durch Wasserstoff ersetzt (H₂-Ballon). Man rührt 20 Stunden bei Raumtemp. und filtriert den Katalysator anschließend über *Hyflo* ab. Das Filtrat wird i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und das Produkt i. Hochvak. getrocknet. Es ist ausreichend rein.

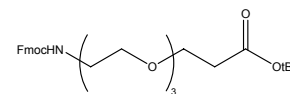
Ausb.: 1.15 g (87%); farblose Flüssigkeit.

C₁₃H₂₇NO₅ (M = 277.36 g/mol) [277.19].

ESI-MS (positiv), m/z: 278.2 ([M+H]⁺, ber.: 278.2).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-amido-4,7,10-trioxadecansäure-*tert*-butylester (73)¹¹⁸**

(FmocNH-{OEG}-COO*t*Bu)



Eine Lösung von 3.45 g (12.4 mmol) 12-Amino-4,7,10-trioxa-decansäure-*tert*-butylester (**72**) in 100 ml Aceton/Wasser 1:1 wird mit 1.05 g NaHCO₃ (12.5 mmol) versetzt. Man gibt portionsweise 4.30 g (12.8 mmol) Fmoc-OSu zu und rührt anschließend bei Raumtemp. 6 Stunden. Die Lösung wird mit 1M HCl auf einen pH-Wert von 6 gebracht und das Aceton i. Vak. abdestilliert. Das Produkt wird aus der wässrigen Phase mit 4×50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit je 100 ml 5%iger Zitronensäure- und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Öl wird durch Flashchromatographie (CH/EE 4:1) gereinigt.

Ausb.: 4.60 g (74%); gelbliches Öl; R_f = 0.43 (EE/PE 3:1).

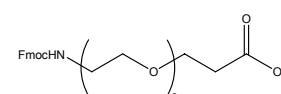
C₂₈H₃₇NO₇ (M = 499.60 g/mol) [499.26].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.74 (d, 2H, H4-, H5- Fmoc, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5 Hz), 7.58 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4 Hz), 7.37 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.0 Hz), 7.29 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.4 Hz), 5.40 (bs, 1H, NH-Fmoc), 4.38 (d, 2H, CH₂ (Fmoc), J_{CH₂,CH} = 6.9 Hz) 4.20 (t, 1H, CH (Fmoc), J_{CH,CH₂} = 6.8 Hz), 3.67 (t, 2H, N-CH₂-CH₂, J_{CH₂,CH₂} = 6.6 Hz), 3.63-3.48 (m, 10H, 5×OCH₂), 3.37 (bs, 2H, N-CH₂-), 2.46 (t, 2H, CO-CH₂-), J_{CH₂,CH₂} = 6.6 Hz). 1.41 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 170.9 (1C, C=O (Ester)), 156.5 (1C, C=O (Urethan)), 144.0 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 126.7 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.0 (2C, C2-,C7-Fmoc), 125.1 (2C, C1-, C8-Fmoc), 119.9 (2C, C4-, C5-Fmoc), 80.5 (1C, C_q (*t*Bu)), 70.5, 70.3, 70.0 (4C, 4×OCH₂), 66.9, 66.6 (2C, CO-CH₂-CH₂-, CH₂ (Fmoc)), 47.3 (2C, N-CH₂-, CH (Fmoc)), 36.2 (1C, CO-CH₂-), 28.1 (3C, (CH₃ (*t*Bu))).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-amido-4,7,10-trioxadecansäure (74)¹¹⁸**

(FmocNH-{OEG}-COOH)



Eine Lösung von 1.71 g (3.4 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxadecansäure-*tert*-butylester (**73**) in 2 ml Dichlormethan wird mit 10 ml Trifluoressigsäure versetzt und zwei Stunden bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 40 ml

Toluol verdünnt, i. Vak eingengt und der Rückstand dreimal i. Vak. mit Toluol kodestilliert. Das Produkt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (EE/AcOH 200:1) gereinigt. Zum Entfernen der Essigsäure wird das Produkt anschließend viermal mit Toluol kodestilliert.

Ausb.: 1.52 g (quant.); farbloses, hochviskoses Öl; $R_f = 0.16$ (EE/AcOH 200:1).

$C_{24}H_{29}NO_7$ ($M = 443.49$ g/mol) [443.19].

ESI-MS (positiv), m/z : 466.3 ($[M+Na]^+$, ber.: 466.2).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.74 (d, 2H, H4-, H5- Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz), 7.61-7.53 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.38 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.3$ Hz), 7.29 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.3$ Hz), 6.74 (bs, 1H, NH), 5.50 (bs, 1H, COOH), 4.36-4.37 (m, 2H, CH_2 (Fmoc)) 4.26-4.16 (m, 1H, CH (Fmoc)), 3.72 (t, 2H, N- CH_2 - CH_2 , $J_{CH_2,CH_2} = 6.0$ Hz), 3.66-3.53 (m, 10H, $5 \times OCH_2$), 3.45-3.28 (m, 2H, N- CH_2 -), 2.58 (t, 2H, CO- CH_2 -, $J_{CH_2,CH_2} = 5.8$ Hz).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$, BB), δ [ppm]: 174.8 (1C, COOH), 156.3 (1C, C=O (Urethan)), 143.9 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.0 (2C, C2-, C7-Fmoc), 125.0 (2C, C1-, C8-Fmoc), 119.9 (2C, C4-, C5-Fmoc), 77.2 (1C, N- CH_2 - CH_2), 70.5, 70.4, 70.1 (4C, $4 \times OCH_2$), 66.3 (2C, CO- CH_2 - CH_2 -, CH_2 (Fmoc)), 47.2 (2C, N- CH_2 -, CH (Fmoc)), 34.8 (1C, CO- CH_2 -).

5.5.3 Synthese der Konjugate aus Glycopeptid und T-Zell-Epitop

N^α -[N-Acetyl-L-threonyl-L-seryl-L-seryl-L-alanyl-L-seryl-L-threonyl-glycyl-L-histidyl-L-alanyl-L-threonyl-L-prolyl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-L-threonyl-L-aspartyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl]- N^ϵ -[N-Acetyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valyl]-L-lysin (75)

(N^α -[Ac-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-Thr-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp-{OEG}]- N^ϵ -[Ac-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val]-Lys-OH)

Die automatisierte Peptidsynthese im Synthesizer erfolgt ausgehend von 240 mg (Beladung 0.21 mmol/g; 0.05 mmol) des mit ivDde-Lys(Fmoc) beladenen Harzes (70). Die Kupplung der sieben Aminosäuren der Sequenz aus Tetanus-Toxin erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll (s. 167). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten und der *N*-Terminus mit Cappingreagenz acetyliert. Zur Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe und

Kupplung des Oligoethylenglykol-Spacers wird das Harz in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird zunächst 30 Minuten in 5 ml DMF vorgequollen. Die Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe erfolgt durch fünfmaliges jeweils fünfminütiges Schütteln in 3 ml einer 2%igen Lösung von Hydrazin-Hydrat (100%, 64% Hydrazin) in DMF. Die Abspaltungslösungen werden jeweils abfiltriert und das Harz viermal mit je 3 ml DMF gewaschen. Nach dem abschließenden Waschschrift wird zur Anbindung des Spacers eine Lösung von 350 mg (0.79 mmol) (74), 108 mg (0.79 mmol) HOAt und 300 mg (0.79 mmol) HATU in 3 ml DMF mit 173 μ l (1.57 mmol) NMM versetzt und zum Harz gegeben. Das Harz wird 8 Stunden in dieser Lösung geschüttelt und dann viermal mit je 5 ml DMF gewaschen. Es folgt ein Cappingschritt mit 3 ml Pyridin/Acetanhydrid 2:1 über 10 Minuten. Das Harz wird viermal mit je 5 ml DMF und dreimal mit je 5 ml Dichlormethan gewaschen und i. Vak. getrocknet. Die weitere Kupplung der aus 16 Aminosäuren bestehenden MUC4-Sequenz erfolgt wieder vollautomatisch im Synthesizer nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wird die *N*-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten und der *N*-Terminus mit Capping-Reagenz acetyliert. Zur Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz in den Merrifield-Festphasenreaktor überführt und zwei Stunden in einer Lösung aus 15 ml TFA, 0.9 ml TIS und 0.9 ml dest. Wasser geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit je 5 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. auf ca. 2 ml eingeengt und dann in 20 ml eiskalten Diethylether getropft. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert, in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgt durch präparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (50:50) in 100 Min., R_t = 64.2 Min., λ = 214 nm).

Ausb.: 65 mg (46%); farbloses Lyophilisat; R_t = 12.4 Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 30 Min., λ = 214 nm), R_t = 35.6 Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (50:50) in 60 Min., λ = 214 nm).

$C_{126}H_{190}N_{28}O_{44}$ (M = 2801.02 g/mol) [2799.35].

ESI-MS (positiv), m/z : 2823.5 ($[M+Na]^+$, ber.: 2823.3), 1412.3 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1412.2), 949.2 ($[M+H+2Na]^{3+}$, ber.: 949.1).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ [ppm]: 8.60 (s, 1H, H^e), 7.32-7.25 (m, 6H, H^d {7.26}, F_{ar}), 7.02 (dd, 4H, $2 \times Y^d$, $J_{Y^d, Y^{ea}}$ = 13.2 Hz, $J_{Y^d, Y^{eb}}$ = 8.5 Hz), 6.76 (dd, 4H, $2 \times Y^e$, $J_{Y^e, Y^{da}}$ = 8.3 Hz, $J_{Y^e, Y^{db}}$ = 5.5 Hz), 4.92-4.67 (m, 2H, H^a {4.72}, D^α {4.70}), 4.61-4.29 (m, 18H, $5 \times S^\alpha$ {4.47}, F^α + $2 \times Y^\alpha$ {4.37, 4.31}, $2 \times A^\alpha$ {4.36}, $3 \times P^\alpha$ {4.39}, $3 \times T^\alpha$ {4.34},

L^α {4.55}, K^α {4.30}), 4.28-4.17 (m, 3H, $3 \times T^\beta$ {4.22}), 4.14 (d, 1H, $V^{\alpha 1}$, $J_{V\alpha, V\beta} = 7.5$ Hz), 4.07 (d, 1H, $V^{\alpha 2}$, $J_{V\alpha, V\beta} = 7.3$ Hz), 3.95-3.80 (m, 4H, G^α {3.92}, $3 \times P_a^\delta$ {3.82}), 3.76 (t, 2H, CO-CH₂-CH₂-, $J_{CH_2, CH_2} = 6.1$ Hz), 3.71-3.54 (m, 25H, $5 \times S^\beta$ {3.67}, (OCH₂CH₂)₃, $3 \times P_b^\delta$ {3.59}), 3.41-3.04 (m, 7H, H^β {3.27, 3.12}, K^ϵ {3.16}, $F_a^\beta + 2 \times Y_a^\beta$ {3.07}), 2.99-2.76 (m, 5H, D^β {2.85}, $F_b^\beta + 2 \times Y_b^\beta$ {2.83}), 2.56 (t, 2H, 2H, CO-CH₂-CH₂-, $J_{CH_2, CH_2} = 5.4$ Hz), 2.31-2.19 (m, 3H, $3 \times P_a^\beta$ {2.25}), 2.08, 1.93 (2 \times s, 2 \times 3H, 2 \times CH₃ (Ac)), 2.13-1.78 (m, 13H, $2 \times V^\beta$ {2.06}, $3 \times P^\gamma$ {1.99}, $3 \times P_b^\beta$ {1.88}, K^β {1.85}), 1.61-1.44 (m, 5H, L^γ {1.70}, L^β {1.56}), K^δ {1.51}), 1.40 (d, 4H, $4 \times A^\beta$, $J_{A\alpha, A\beta} = 7.3$ Hz), 1.36 (d, 4H, $4 \times A^\beta$, $J_{A\alpha, A\beta} = 7.2$ Hz), 1.35-1.28 (m, 2H, K^γ), 1.27-1.14 (m, 9H, $3 \times T^\gamma$), 0.99-0.85 (m, 48H, $2 \times V^\gamma$ {0.93}, L^δ {0.91}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, BB, HMQC), δ [ppm]: 175.7, 175.1, 174.6, 174.0, 173.9, 173.8, 173.6, 173.2, 172.7, 172.5, 172.3, 171.9, 171.7, 171.5, 171.1, 171.0 (28C, 28 \times C=O), 133.3 (1C, H^ϵ), 130.3 (4C, $2 \times Y^\delta$), 129.2, 128.5 (5C, F_{ar}), 115.2 (4C, $2 \times Y^\epsilon$), 128.6 (1C, H^γ), 117.3 (1C, H^δ), 69.5, 69.4, 69.3, 68.6 (6C, (CH₂CH₂O)₃), 66.9, 66.8 (3C, $3 \times T^\beta$), 66.5 (1C, CO-CH₂-CH₂-), 61.0, 60.9, 60.7 (5C, $5 \times S^\beta$), 60.3, 60.1 (3C, $3 \times P^\alpha$), 59.5 (2C, $2 \times V^\alpha$), 58.9, 58.7 (13C, $3 \times T^\alpha$), 56.8 (3C, $2 \times Y^\alpha$, F^α), 55.5, 55.2 (5C, $5 \times S^\alpha$), 54.7 (1C, K^α), 52.1 (1C, H^α), 50.1 (4C, $4 \times L^\alpha$), 50.0 (1C, D^α), 49.8, 49.5 (8C, $8 \times A^\alpha$), 47.9, 47.6 (3C, $3 \times P^\delta$), 42.3 (1C, G^α), 38.9 (1C, K^ϵ), 38.8 (1C, L^β), 36.6 (3C, $2 \times Y^\beta$, F^β), 36.1 (1C, D^β), 35.4 (1C, CO-CH₂-CH₂-), 30.1 (1C, K^β), 29.8 (2C, $2 \times V^\beta$), 29.2 (3C, $3 \times P^\beta$), 27.5 (1C, K^δ), 26.2 (1C, H^β), 24.4 (3C, $3 \times P^\gamma$), 24.1 (1C, L^γ), 22.4, 20.4 (2C, L^δ), 22.2 (1C, K^γ), 21.6, 21.2 (2C, $2 \times CH_3$ (Ac)), 18.6, 18.4 (4C, $4 \times T^\gamma$), 18.3, 17.6 (4C, $2 \times V^\gamma$), 16.3, 16.2 (2C, $2 \times A^\beta$).

***N*^α-[*N*-Acetyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl--L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl]-*N*^ε-[*N*-Acetyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valyl]-L-lysine (76)**

(*N*^α-[Ac-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-{OEG}]-*N*^ε-[Ac-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val-Ile-Ser]-Lys-OH)

Die automatisierte Peptidsynthese im Synthesizer erfolgt ausgehend von 215 mg (Beladung 0.21 mmol/g; 0.045 mmol) des mit ivDde-Lys(Fmoc) beladenen Harzes (70). Die Kupplung der elf Aminosäuren der Sequenz aus Tetanus-Toxin erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll (s. 167). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten und der

N-Terminus mit Cappingreagenz acetyliert. Zur Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe und Kupplung des Oligoethylenglykol-Spacers wird das Harz in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird zunächst 30 Minuten in 5 ml DMF vorgequollen. Die Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe erfolgt durch fünfmaliges jeweils fünfminütiges Schütteln in 3 ml einer 2%igen Lösung von Hydrazin-Hydrat (100%, 64% Hydrazin) in DMF. Die Abspaltungslösungen werden jeweils abfiltriert und das Harz viermal mit je 3 ml DMF gewaschen. Nach dem abschließenden Waschschrift wird zur Anbindung des Spacers eine Lösung von 200 mg (0.45 mmol) (**74**), 62 mg (0.46 mmol) HOAt und 172 mg (0.45 mmol) HATU in 3 ml DMF mit 100 μ l (0.91 mmol) NMM versetzt und zum Harz gegeben. Das Harz wird 8 Stunden in dieser Lösung geschüttelt und dann viermal mit je 5 ml DMF gewaschen. Es folgt ein Cappingschritt mit 3 ml Pyridin/Acetanhydrid 2:1 über 10 Minuten. Das Harz wird viermal mit je 5 ml DMF und dreimal mit je 5 ml Dichlormethan gewaschen und i. Vak. getrocknet. Die weitere Kupplung der aus 12 Aminosäuren bestehenden MUC1-Sequenz erfolgt vollautomatisch im Synthesizer nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wird die *N*-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten und der *N*-Terminus mit Capping-Reagenz acetyliert. Zur Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz wieder in den Merrifield-Festphasenreaktor überführt und zwei Stunden in einer Lösung aus 15 ml TFA, 0.9 ml TIS und 0.9 ml dest. Wasser geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit je 5 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. auf ca. 2 ml eingeeengt und dann in 20 ml eiskalten Diethylether getropft. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert. Da es sowohl in Wasser, Methanol, Acetonitril DMF und DMSO nur wenig löslich ist, war eine Reinigung durch präparative HPLC nicht möglich.

Ausb.: 112 mg (roh, max. 87%); farbloses Lyophilisat; $R_t = 13.5$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 30 Min., $\lambda = 214$ nm); $R_t = 22.4$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{132}H_{206}N_{30}O_{41}$ ($M = 2869.22$ g/mol) [2867.50].

ESI-MS (positiv), m/z : 2869.5 ($[M+H]^+$, ber.: 2869.5), 1457.3 ($[M+2Na]^{2+}$, ber.: 1457.3), 1446.3 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1446.3), 1435.3 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1435.3).

***N*^α-[*N*-Acetyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl]-*N*^ε-[*N*-Acetyl-L-asparagyl-L-seryl-L-threonyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valyl]-L-lysine (77)**

(*N*^α-[Ac-Gly-Val-Thr(α Ac₃GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-{OEG}]-*N*^ε-[Ac-Asn-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val]-Lys-OH)

Die automatisierte Peptidsynthese im Synthesizer erfolgt ausgehend von 330 mg (Beladung 0.15 mmol/g; 0.05 mmol) des mit ivDde-Lys(Fmoc) beladenen Harzes (70). Die Kupplung der zwölf Aminosäuren der Sequenz aus Tetanus-Toxin erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll (s. 167). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten und der *N*-Terminus mit Cappingreagenz acetyliert. Zur Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe und Kupplung des Oligoethylenglykol-Spacers wird das Harz in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird zunächst 30 Minuten in 5 ml DMF vorgequollen. Die Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe erfolgt durch fünfmaliges jeweils fünfminütiges Schütteln in 3 ml einer 2%igen Lösung von Hydrazin-Hydrat (100%, 64% Hydrazin) in DMF. Die Abspaltungslösungen werden jeweils abfiltriert und das Harz viermal mit je 3 ml DMF gewaschen. Nach dem abschließenden Waschschrift wird zur Anbindung des Spacers eine Lösung von 220 mg (0.50 mmol) (74), 68 mg (0.50 mmol) HOAt und 190 mg (0.50 mmol) HATU in 4 ml DMF mit 110 μ l (1.00 mmol) NMM versetzt und zum Harz gegeben. Das Harz wird 8 Stunden in dieser Lösung geschüttelt und dann viermal mit je 5 ml DMF gewaschen. Es folgt ein Cappingschritt mit 3 ml Pyridin/Acetanhydrid 2:1 über 10 Minuten. Das Harz wird viermal mit je 5 ml DMF und dreimal mit je 5 ml Dichlormethan gewaschen und i. Vak. getrocknet. Die weitere Kupplung der MUC1-Sequenz bis Ser(4) erfolgt vollautomatisch im Synthesizer nach dem Standardprotokoll. Die Kupplung des T_N-Bausteins erfolgt halbautomatisch. Hierzu wird zunächst die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe vom Harz abgespalten. Der Glycosylaminosäurebaustein (300 mg, 0.45 mmol, 9 eq.) wird mit 187 mg (0.49 mmol) HATU und 67 mg (0.49 mmol) HOAt in 2 ml NMP gelöst, mit 108 μ l (0.98 mmol) NMM aktiviert und in den Reaktor überführt. Das Harz wird vier Stunden in dieser Lösung geschüttelt. Die Kupplung der restlichen zwei Aminosäuren erfolgt vollautomatisch nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wird die *N*-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten und der *N*-Terminus mit Capping-Reagenz acetyliert. Zur Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen

Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz wieder in den Merrifield-Festphasenreaktor überführt und zwei Stunden in einer Lösung aus 15 ml TFA, 0.9 ml TIS und 0.9 ml dest. Wasser geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit je 5 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. auf ca. 2 ml eingengt und dann in 20 ml eiskalten Diethylether getropft. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert. Es lässt sich nur in einer größeren Menge (ca. 25 ml) Wasser aufnehmen. Eine Reinigung durch präparative HPLC ist daher nicht möglich.

Ausb.: 97 mg (roh, max. 59%); farbloses Lyophilisat; $R_t = 21.7$ Min. (Luna C18, A/C (95:5) → (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm), $R_t = 39.3$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (50:50) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{148}H_{227}N_{33}O_{52}$ ($M = 3300.58$ g/mol) [3298.61].

ESI-MS (positiv), m/z : 1672.9 ($[M+2Na]^{2+}$, ber.: 1672.8), 1661.9 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1661.8), 1650.9 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 11650.8), 1108.3 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 1108.2).

N^α -[*N*-Acetyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl]- N^ϵ -[*N*-Acetyl-L-asparagyl-L-seryl-L-threonyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valyl]-L-lysin (78) (N^α -[Ac-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-{OEG}]- N^ϵ -[Ac-Asn-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val]-Lys-OH)

Eine Lösung von 50 mg (roh, max. 15.15 μ mol) N^α -[Ac-Gly-Val-Thr(α Ac₃GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-{OEG}]- N^ϵ -[Ac-Asn-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val]-Lys-OH (77) in 25 ml Methanol (HPLC-grade) wird tropfenweise mit einer frisch hergestellten, 1%igen Lösung von Natriummethanolat in Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 9-9.5 erreicht ist. Die Lösung wird 24 Stunden bei Raumtemp. gerührt und dann durch Zugabe von Ionenaustauscher (Amberlyst 15, stark sauer) neutralisiert. Der Austauscher wird abfiltriert, mit Methanol nachgewaschen und das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird durch Gelpermeationschromatographie (Sephadex LH20, MeOH/H₂O 1:1) und anschließende semipräparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) → (50:50) in 60 Min., $R_t = 24.8$ Min., $\lambda = 214$ nm)

Ausb.: 21 mg (26%, bezogen auf die Anfangsbeladung des Harzes und die Gesamtausbeute an rohem Peptid (77), 56 Stufen); farbloses Lyophilisat; $R_t = 33.6$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (50:50) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm), $R_t = 20.5$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{142}H_{221}N_{33}O_{49}$ ($M = 3174.47$ g/mol) [3172.58].

ESI-MS (positiv), m/z : 1598.9 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1598.8), 1587.9 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1587.8), 1073.6 ($[M+H+2Na]^{3+}$, ber.: 1073.5), 1066.3 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 1066.2).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ [ppm]: 7.27-7.06 (m, 5H, F_{ar}), 7.00-6.84 (m, 4H, $2 \times Y^\delta$), 6.71-6.56 (m, 4H, $2 \times Y^\epsilon$), 4.81-4.55 (m, 6H, H1 {4.79}, F^α {4.67}, $2 \times Y^\alpha$ {4.67}, N^α {4.59}, D^α {4.58}), 4.53-4.02 (m, 23H, $T^{\alpha*}$ {4.50}, R^α {4.50}, $A^{\alpha 1}$ {4.43}, $A^{\alpha 2}$ {4.36}, H4 {4.35}, $4 \times S^\alpha$ {4.33}, $4 \times P^\alpha$ {4.26}, $2 \times K^\alpha$ {4.24}, $2 \times T^\alpha$ {4.20}, $T^{\beta*}$ {4.19}, $2 \times V^\alpha$ {4.18}, I^α {4.11}, $2 \times T^\beta$ {4.06}), 4.00-3.39 (m, 37H, H2 {3.94}, G^α {3.79}, H5 {3.75}, H3 {3.73}, $4 \times S^\beta$ {3.71, 3.61}, H6 {3.70, 3.60}, $4 \times P^\delta$ {3.67, 3.52}, CO-CH₂-CH₂- {3.64}, (OCH₂CH₂)₃), 3.12-2.95 (m, 12H, $2 \times Y^\beta$ {3.11, 3.03}, F^β {3.11, 3.03}, $2 \times K^\epsilon$ {3.09, 3.04}, R^δ {3.07}), 2.89-2.56 (m, 4H, N^β {2.85, 2.74}, D^β {2.70, 2.59}, 2.48-2.36 (bs, 2H, CO-CH₂-CH₂-), 2.25-2.03 (m, 4H, $4 \times P^\beta_a$), 1.99-1.66 (m, 20H, $2 \times V^\beta$ {1.95}, $4 \times P^\gamma$ {1.89}, $2 \times K^\beta$ {1.82, 1.72}, $4 \times P^\beta_b$ {1.77}, R^β {1.77}), 1.89 (s, 6H, $2 \times CH_3$ (Ac)), 1.64-1.44 (m, 3H, I^β {1.60}, R^γ {1.50}), 1.42-1.32 (m, 4H, $2 \times K^\delta$), 1.29-1.16 (m, 11H, $2 \times K^\gamma$ {1.25}, $2 \times A^\beta$ {1.24}, I^γ {1.19}), 1.12 (d, 3H, $T^{\gamma*}$, $J_{T^{\gamma*}, T^{\alpha*}} = 5.7$ Hz), 1.08-0.98 (m, 6H, $2 \times T^\gamma$ {1.04}), 0.87-0.72 (m, 12H, $2 \times V^\gamma$ {0.83}), 0.70-0.58 (m, 6H, I^δ {0.65}, $I^{\gamma'}$ {0.64}).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , BB, HMQC), δ [ppm]: 176.4, 175.8, 175.7, 174.7, 173.9, 173.7, 173.4, 173.1, 172.9, 172.0, 171.4, 171.1, 170.7, 170.5 (30C, 30 \times C=O), 98.9 (1C, C1), 76.7 (1C, $T^{\beta*}$), 69.6, 69.5, 69.4, 69.3 (6C, (CH₂CH₂O)₃), 68.0 (2C, C3, C5), 66.8 (2C, $2 \times T^\beta$), 66.5 (1C, CO-CH₂-CH₂-), 61.1 (4C, $4 \times S^\beta$), 61.0 (1C, C6), 60.5 (2C, $2 \times T^\alpha$), 60.2 (6C, $4 \times P^\alpha$, $2 \times K^\alpha$), 59.4 (1C, I^α), 59.2 (2C, $2 \times V^\alpha$), 56.8 (1C, $T^{\alpha*}$), 54.9 (4C, $4 \times S^\alpha$), 54.8 (1C, C4), 51.0 (1C, R^α), 50.2 (1C, N^α), 50.1 (1C, D^α), 49.5 (1C, C2), 47.6, 47.4 (2C, $2 \times A^\alpha$), 47.6 (4C, $4 \times P^\delta$), 42.2 (1C, G^α), 40.1 (1C, R^δ), 38.7 (2C, $2 \times K^\epsilon$), 36.2 (1C, D^β), 35.8 (1C, I^β), 35.5 (1C, CO-CH₂-CH₂-), 34.8 (1C, N^β), 30.4 (2C, $2 \times K^\delta$), 29.9 (4C, $2 \times V^\beta$, $2 \times K^\beta$), 29.3 (1C, R^β), 29.2 (4C, $4 \times P^\beta$), 24.4 (4C, $4 \times P^\gamma$), 23.9 (1C, R^γ), 22.3 (2C, $2 \times K^\gamma$), 22.2 (1C, I^γ), 21.5 (2C, $2 \times CH_3$ (Ac)), 18.6 (2C, $2 \times T^\gamma$), 18.1 (1C, $T^{\gamma*}$), 17.9, (4C, $2 \times V^\gamma$), 15.1 (2C, $2 \times A^\beta$), 14.5 (2C, $I^{\gamma'}$, I^δ).

***N*^α-[*N*-Acetyl-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl]-*N*^ε-[*N*-Acetyl-L-asparagyl-L-seryl-L-threonyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valyl]-L-lysin (79)
(*N*^α-[Ac-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-{OEG}]-*N*^ε-[Ac-Asn-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val]-Lys-OH)**

Die automatisierte Peptidsynthese im Synthesizer erfolgt ausgehend von 300 mg (Beladung 0.15 mmol/g; 0.045 mmol) des mit ivDde-Lys(Fmoc) beladenen Harzes (**70**). Die Kupplung der zwölf Aminosäuren der Sequenz aus Tetanus-Toxin erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll (S. 167). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten und der *N*-Terminus mit Cappingreagenz acetyliert. Zur Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe und Kupplung des Oligoethylenglykol-Spacers wird das Harz in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird zunächst 30 Minuten in 10 ml DMF vorgequollen. Die Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe erfolgt durch fünfmaliges jeweils fünfminütiges Schütteln in 4 ml einer 2%igen Lösung von Hydrazin-Hydrat (100%, 64% Hydrazin) in DMF. Die Abspaltungslösungen werden jeweils abfiltriert und das Harz fünfmal mit je 4 ml DMF gewaschen. Nach dem abschließenden Waschschrift wird zur Anbindung des Spacers eine Lösung von 217 mg (0.49 mmol) (**74**), 67 mg (0.49 mmol) HOAt und 187 mg (0.49 mmol) HATU in 4 ml DMF mit 108 μ l (1.98 mmol) NMM versetzt und zum Harz gegeben. Das Harz wird 8 Stunden in dieser Lösung geschüttelt und dann viermal mit je 4 ml DMF gewaschen. Es folgt ein Cappingschritt mit 3 ml Pyridin/Acetanhydrid 2:1 über 10 Minuten. Das Harz wird fünfmal mit je 4 ml DMF und fünfmal mit je 4 ml Dichlormethan gewaschen und i. Vak. getrocknet. Die weitere Kupplung der MUC1-Sequenz bis Ser(4) erfolgt vollautomatisch im Synthesizer nach dem Standardprotokoll. Die Kupplung des ST_N-Bausteins erfolgt halbautomatisch. Hierzu wird zunächst die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe vom Harz abgespalten. Der Glycosylaminosäurebaustein (**25**) (220 mg, 0.187 mmol, 4 eq.) wird mit 73 mg (0.19 mmol) HATU und 26 mg (0.19 mmol) HOAt in 2 ml NMP gelöst, mit 42 μ l (0.38 mmol) NMM aktiviert und in den Reaktor überführt. Das Harz wird vier Stunden in dieser Lösung geschüttelt. Die Kupplung der restlichen zwei Aminosäuren erfolgt vollautomatisch nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wird

die *N*-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten und der *N*-Terminus mit Capping-Reagenz acetyliert. Zur Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz wieder in den Merrifield-Festphasenreaktor überführt und zwei Stunden in einer Lösung aus 15 ml TFA, 0.9 ml TIS und 0.9 ml dest. Wasser geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit je 5 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. auf ca. 2 ml eingeeengt und dann in 20 ml eiskalten Diethylether getropft. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert. Es lässt sich nur in einer größeren Menge (ca. 20 ml) Wasser aufnehmen. Eine Reinigung durch präparative HPLC ist daher nicht möglich.

Ausb.: 96 mg (roh, max. 56%); farbloses Lyophilisat; $R_t = 23.3$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm), $R_t = 42.9$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (50:50) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{172}H_{256}N_{34}O_{63}$ ($M = 3808.1$ g/mol) [3805.8].

ESI-MS (positiv), m/z : 1904.6 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1904.4).

***N*^α-[*N*-Acetyl-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl]-*N*^ε-[*N*-Acetyl-L-asparagyl-L-seryl-L-threonyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valyl]-L-lysin (80) (*N*^α-[Ac-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-{OEG}]-*N*^ε-[Ac-Asn-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val]-Lys-OH)**

I. Hydrierung: Eine Lösung von 40 mg (roh, max. 10.5 μ mol) *N*^α-[Ac-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-{OEG}]-*N*^ε-[Ac-Asn-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val]-Lys-OH (79) in 15 ml Methanol (HPLC-grade) wird mit einer Spatelspitze Pd/C (10%) versetzt und durch mehrmaliges Anlegen eines Vakuums und Belüften mit Argon entgast. Die Argonatmosphäre wird durch Wasserstoff ersetzt (Ballon mit H₂-Gas) und die Suspension 24 Stunden gerührt (Reaktionskontrolle durch analytische HPLC). Der Katalysator wird über *Hyflo* abfiltriert,

wobei mit reichlich Methanol nachgespült wird. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt, der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Ausb.: 37 mg; farbloses Lyophilisat; $R_t = 21.5$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{165}H_{250}N_{34}O_{63}$ ($M = 3717.94$ g/mol) [3715.74].

ESI-MS (positiv), m/z : 1870.4 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1870.4), 1859.4 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1859.4).

2. Deacetylierung: Eine Lösung von 37 mg des rohen Debenzylierungsproduktes in 30 ml Methanol (HPLC-grade) wird tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen Lösung von Natriummethanolat in Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5 erreicht ist. Die Lösung wird 18 Stunden unter Argon gerührt. Da die massenspektrometrische Analyse der Reaktionsmischung eine unvollständige Deacetylierung zeigt, wird der pH-Wert durch weitere Zugabe von Natriummethanolat-Lösung auf 10.5 erhöht und weitere 20 Stunden gerührt. Da die Deacetylierung laut analytischer HPLC und massenspektrometrischer Analyse immer noch unvollständig ist, wird die Reaktionslösung mit 2 Tropfen Essigsäure neutralisiert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in verdünnter wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH= 11.5) gelöst und 30 Stunden gerührt. Nachdem nun in der HPLC-Analyse die Bildung eines einheitlichen Produktes zu beobachten ist, wird mit 2 Tropfen Essigsäure neutralisiert und lyophilisiert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch semipräparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:50) in 60 Min., $R_t = 29.4$ Min., $\lambda = 214$ nm)

Ausb.: 7.5 mg (12%, bezogen auf die Anfangsbeladung des Harzes und die Gesamtausbeute an rohem Peptid (**79**), 57 Stufen); farbloses Lyophilisat; $R_t = 19.4$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{153}H_{238}N_{34}O_{57}$ ($M = 3465.72$ g/mol) [3464.68].

MALDI-MS (positiv), m/z : 3465.9 ($[M+H]^+$, ber.: 3466.7), 3525.4 ($[M-H+Na+K]^+$, ber.: 3525.6)

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ [ppm]: 7.28-7.09 (m, 5H, F_{ar}), 6.95 (d, 2H, $2 \times Y^{\delta 1}$, $J_{Y^{\delta}, Y^{\epsilon}} = 7.8$ Hz), 6.90 (d, 2H, $Y^{\delta 2}$, $J_{Y^{\delta}, Y^{\epsilon}} = 8.1$ Hz), 6.65 (d, 4H, Y^{ϵ} , $J_{Y^{\epsilon}, Y^{\delta}} = 8.0$ Hz), 4.81 (d, 1H, $H1$, $J_{H1, H2} = 6.3$ Hz), 4.81 (d, 1H, $H1$, $J_{H1, H2} = 3.9$ Hz), 4.70-4.56 (m, 2H, N^{α} {4.67}, D^{α} {4.60}), 4.55-4.49 (m, 2H, R^{α} {4.53}, $T^{\alpha*}$ {4.52}), 4.48-4.41 (m, 2H, $A^{\alpha 1}$ {4.45}, S^{α} {4.44}), 4.40-4.07 (m, 21H, $3 \times S^{\alpha}$ {4.39, 4.36}, $F^{\alpha} + 2 \times Y^{\alpha}$ {4.38, 4.32}, $A^{\alpha 2}$ {4.36}, $4 \times P^{\alpha}$ {4.28, 4.23}, $V^{\alpha 1}$ {4.24}, $2 \times T^{\alpha}$ {4.21, 4.19}, $4 \times K^{\alpha}$ {4.19, 4.15}, $T^{\beta*}$ {4.17}, $2 \times T^{\beta}$ {4.11}), 4.00-

3.92 (m, 4H, I^α {3.99}, H5 {3.98}, H2 {3.96}, V^α2 {3.95}), 3.86-3.63 (m, 22H, H4 {3.85}, G^α {3.86,3.78}, H6_a {3.80}, 4×S^β {3.79, 3.74, 3.63}, H7'' {3.75}, H9''_a {3.74}, H3 {3.73}, H5'' {3.70}, CO-CH₂-CH₂- {3.65}, 4×P^δ_a {3.68}), 3.61-3.38 (m, 21H, H6'' {3.60}, H4'' {3.57}, (OCH₂CH₂)₃ {3.57-3.51}, H9''_b {3.51}, H6_b {3.50}, H8'' {3.45}, 4×P^δ_b {3.53, 3.48, 3.39}), 3.33-3.18 (m, 2H, K^ε_a1), 3.14-2.94 (m, 6H, K^ε_b1 {3.09}, R^δ {3.08}, F^β_a + 2×Y^β_a {2.97}), 2.89-2.54 (m, 9H, F^β_b + 2×Y^β_b {2.82}, K^ε2 {2.81}, N^β {2.80}, D^β {2.71, 2.64}), 2.58 (dd, 1H, H3''_{äq}, J_{H3''_{äq},H3''_{ax}} = 12.6 Hz, J_{H3''_{äq},H4''} = 4.7 Hz), 2.49 (t, 2H, 2H, CO-CH₂-CH₂-, J_{CH₂,CH₂} = 5.4 Hz), 2.23-2.08 (m, 4H, 4×P^β_a), 2.00-1.68 (m, 17H, 2×V^β {1.97}, 4×P^γ {1.89}, 4×P^β_b {1.78}, 2×K^β_a {1.73}, R^β_a {1.71}), 1.93, 1.91 (2×s, 12H, 4×CH₃ (NHAc)), 1.66-1.46 (m, 11H, I^β {1.64}, 2×K^β_b {1.62}, R^β_b {1.60}, H3''_{ax} {1.57}, 2×K^γ {1.55}, R^γ {1.52}), 1.43-1.34 (m, 4H, 2×K^δ), 1.28-1.22 (m, 8H, 2×A^β {1.25}, I^γ {1.24}), 1.17 (d, 3H, T^{γ*}, J_{T^{γ*},T^{α*}} = 6.3 Hz), 1.09-1.04 (m, 6H, 2×T^γ), 0.86-0.78 (m, 12H, 2×V^γ {0.84}), 0.71-0.63 (m, 6H, I^δ {0.69}, I^{γ'} {0.67}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, BB, HSQC), δ [ppm]: 174.9, 174.7, 174.3, 174.2, 174.1, 174.0, 173.8, 173.6, 173.4, 173.2, 173.1, 173.0, 172.8, 171.8, 171.4, 171.2, 170.7, 169.3 (33C, 33×C=O), 154.5 (1C, R^ε), 130.4 (4C, 2×Y^δ), 129.2, 128.5, 126.8 (5C, F_{ar}), 115.1 (4C, 2×Y^ε), 100.0 (1C, C2''), 99.1 (1C, C1), 77.2 (1C, T^{β*}), 72.3 (1C, C6''), 71.5 (1C, C7''), 69.8 (1C, C5), 69.5, 69.3 (6C, (CH₂CH₂O)₃), 68.4 (1C, C4), 68.0 (1C, C3), 67.9 (1C, C4''), 67.8 (1C, C8''), 66.8 (2C, 2×T^β), 66.4 (1C, CO-CH₂-CH₂-), 63.7 (1C, C9''), 62.5 (1C, C6), 61.3, 60.9, 60.7 (4C, 4×S^β), 60.5, 60.2 (4C, 4×P^α), 59.5 (1C, V^α(1)), 59.1 (2C, 2×T^α), 57.8 (1C, I^α), 56.9 (1C, T^{α*}), 55.5, 55.4 (3C, 2×Y^α, F^α), 54.9 (1C, V^α(2)), 54.7, 54.6 (4C, 4×S^α), 53.3, 52.8 (2C, 2×K^α), 52.2 (1C, N^α), 51.5 (1C, C5''), 51.0 (1C, R^α), 50.2 (1C, D^α), 49.4 (1C, C2), 47.6 (1C, A^α(1)), 47.7 (4C, 4×P^δ), 47.2 (1C, A^α(2)), 42.2 (1C, G^α), 40.4 (1C, R^δ), 39.7 (1C, C3''), 38.9 (1C, N^β), 38.6 (1C, K^ε(1)), 36.5 (3C, 2×Y^β, F^β), 36.1 (1C, D^β), 35.8 (1C, I^β), 35.4 (1C, CO-CH₂-CH₂-), 34.9 (1C, K^ε(2)), 30.0 (1C, R^β), 29.9 (4C, 2×V^β), 29.2 (4C, 4×P^β), 27.6 (2C, 2×K^δ), 27.4 (2C, 2×K^β), 26.0 (1C, R^γ), 24.4 (4C, 4×P^γ), 23.9 (2C, 2×K^γ), 22.1 (1C, I^γ), 21.7 (4C, 4×CH₃ (NHAc)), 18.6 (2C, 2×T^γ), 18.1 (1C, T^{γ*}), 17.8 (4C, 2×V^γ), 15.2, 15.1 (2C, 2×A^β), 14.4 (1C, I^{γ'}) 9.6 (1C, I^δ).

***N*^α-[*N*-Acetyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-3-*O*-{benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl]-*N*^ε-[*N*-Acetyl-L-asparagyl-L-seryl-L-threonyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valyl]-L-lysine (81)**

(*N*^α-[Ac-Gly-Val-Thr(αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→3)-β6-Bn-Ac₂Gal-(1→3)-αAc₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-{OEG}]-*N*^ε-[Ac-Asn-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val]-Lys-OH)

Die automatisierte Peptidsynthese im Synthesizer erfolgt ausgehend von 280 mg (Beladung 0.22 mmol/g; 0.06 mmol) des mit ivDde-Lys(Fmoc) beladenen Harzes (**70**). Die Kupplung der zwölf Aminosäuren der Sequenz aus Tetanus-Toxin erfolgt nach dem allgemeinen Syntheseprotokoll (S. 167). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten und der *N*-Terminus mit Cappingreagenz acetyliert. Zur Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe und Kupplung des Oligoethylenglykol-Spacers wird das Harz in einen Merrifield-Festphasenreaktor überführt. Das Harz wird zunächst 30 Minuten in 5 ml DMF vorgequollen. Die Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe erfolgt durch fünfmaliges jeweils fünfminütiges Schütteln in 4 ml einer 2%igen Lösung von Hydrazin-Hydrat (100%, 64% Hydrazin) in DMF. Die Abspaltungslösungen werden jeweils abfiltriert und das Harz fünfmal mit je 4 ml DMF gewaschen. Nach dem abschließenden Waschschrift wird zur Anbindung des Spacers eine Lösung von 215 mg (0.48 mmol) (**84**), 66 mg (0.48 mmol) HOAt und 183 mg (0.48 mmol) HATU in 4 ml DMF mit 106 µl (0.96 mmol) NMM versetzt und zum Harz gegeben. Das Harz wird 8 Stunden in dieser Lösung geschüttelt und dann viermal mit je 4 ml DMF gewaschen. Es folgt ein Cappingschritt mit 3 ml Pyridin/Acetanhydrid 2:1 über 10 Minuten. Das Harz wird fünfmal mit je 4 ml DMF und fünfmal mit je 4 ml Dichlormethan gewaschen und i. Vak. getrocknet. Die weitere Kupplung der MUC1-Sequenz bis Ser(4) erfolgt vollautomatisch im Synthesizer nach dem Standardprotokoll. Die Kupplung des (2,3)-ST-Bausteins erfolgt halbautomatisch. Hierzu wird zunächst die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe vom Harz abgespalten. Der Glycosylaminosäurebaustein (**35**) (220 mg, 0.15 mmol, 2.4 eq.) wird mit 70 mg (0.18 mmol) HATU und 25 mg (0.18 mmol) HOAt in 2 ml NMP gelöst, mit 40 µl (0.36 mmol) NMM aktiviert und in den Reaktor überführt. Das Harz wird sechs Stunden in dieser Lösung geschüttelt. Die Kupplung der restlichen zwei Aminosäuren erfolgt

vollautomatisch nach dem Standardprotokoll. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wird die *N*-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten und der *N*-Terminus mit Capping-Reagenz acetyliert. Zur Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz wieder in den Merrifield-Festphasenreaktor überführt und zwei Stunden in einer Lösung aus 15 ml TFA, 0.9 ml TIS und 0.9 ml dest. Wasser geschüttelt. Die Lösung wird abfiltriert und das Harz dreimal mit je 5 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden i. Vak. auf ca. 2 ml eingengt und dann in 20 ml eiskalten Diethylether getropft. Das ausgefallene Peptid wird abzentrifugiert. Es lässt sich nur in einer größeren Menge (ca. 20 ml) Wasser aufnehmen. Eine Reinigung durch präparative HPLC ist daher nicht möglich.

Ausb.: 145 mg (roh, max. 58%); farbloses Lyophilisat; $R_t = 29.5$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{189}H_{276}N_{34}O_{70}$ (M = 4144.40 g/mol) [4141.91].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 2083.9 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 2084.0), 2072.9 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 2073.0), 1389.6 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 1389.6).

***N*^α-[*N*-Acetyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3-*O*-{(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanoyl]-*N*^ε-[*N*-Acetyl-L-asparagyl-L-seryl-L-threonyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valyl]-L-lysine (82)**

(*N*^α-[Ac-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→3)- β Gal-(1→3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-{OEG}]-*N*^ε-[Ac-Asn-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val]-Lys-OH)

1. *Hydrierung*: Eine Lösung von 100 mg (roh, max. 24.1 μ mol) *N*^α-[Ac-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→3)- β 6-Bn-Ac₂Gal-(1→3)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-{OEG}]-*N*^ε-[Ac-Asn-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val]-Lys-OH (**81**) in 15 ml Methanol (HPLC-grade) wird mit einer Spatelspitze Pd/C (10%) versetzt und durch mehrmaliges Anlegen eines Vakuums und Belüften mit Argon entgast. Die Argonatmosphäre wird durch Wasserstoff ersetzt (Ballon mit H₂-Gas) und die Suspension

90 Stunden gerührt (Reaktionskontrolle durch analytische HPLC). Der Katalysator wird über *Hyflo* abfiltriert, wobei mit reichlich Methanol nachgespült wird. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt, der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Ausb.: 62 mg; farbloses Lyophilisat; $R_t = 21.9$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{175}H_{264}N_{34}O_{70}$ ($M = 3964.15$ g/mol) [3963.82].

ESI-MS (positiv), m/z : 1322.0 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1321.9).

2. *Deacetylierung*: 62 mg des rohen Debenzylierungsproduktes werden in verdünnter wässriger Natriumhydroxid-Lösung (pH = 11.5) gelöst und 48 Stunden gerührt (Reaktionskontrolle durch analytische HPLC). Nachdem das Edukt vollständig umgesetzt ist, wird mit 2 Tropfen Essigsäure neutralisiert und dann lyophilisiert. Der Rückstand wird in 10 ml dest. Wasser aufgenommen und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Das nach erneuter Lyophilisation erhaltene Rohprodukt wird durch präparative HPLC (Luna C18, A/B (5) \rightarrow (5) in 60 Min., $R_t = 47.4$ Min., $\lambda = 214$ nm) und anschließende semipräparative HPLC (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (50:50) in 60 Min., $R_t = 30.1$ Min., $\lambda = 214$ nm) gereinigt.

Ausb.: 17 mg (11 %, bezogen auf die Anfangsbeladung des Harzes und die Gesamtausbeute an rohem Peptid (**81**), 57 Stufen); farbloses Lyophilisat; $R_t = 20.1$ Min. (Luna C18, A/B (95:5) \rightarrow (0:100) in 60 Min., $\lambda = 214$ nm).

$C_{159}H_{248}N_{34}O_{62}$ ($M = 3627.86$ g/mol) [3625.73].

ESI-MS (positiv), m/z : 1836.0 ($[M+2Na]^{2+}$, ber.: 1836.4), 1814.9 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1814.4).

MALDI-MS (positiv), m/z : 3672.0 ($[M-H+2Na]^+$, ber.: 3671.7), 3629.6 ($[M+H]^+$, ber.: 3628.7).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ [ppm]: 7.31-7.07 (m, 5H, F_{ar}), 6.94 (d, 2H, $2 \times Y^{\delta 1}$, $J_{Y^{\delta}, Y^{\epsilon}} = 8.3$ Hz), 6.89 (d, 2H, $Y^{\delta 2}$, $J_{Y^{\delta}, Y^{\epsilon}} = 8.5$ Hz), 6.63 (d, 4H, Y^{ϵ} , $J_{Y^{\epsilon}, Y^{\delta}} = 8.4$ Hz), 4.82 (d, 1H, $H1$, $J_{H1, H2} = 3.5$ Hz), 4.78 (s, 1H, $H1'$), 4.76-4.56 (m, 2H, $N\alpha$ {4.66}, D^{α} {4.60}), 4.53-4.47 (m, 2H, R^{α} {4.52}, $T^{\alpha*}$ {4.51}), 4.46-4.40 (m, 2H, $A^{\alpha 1}$ {4.43}, S^{α} {4.44}), 4.38-4.01 (m, 22H, $3 \times S^{\alpha}$ {4.38, 4.33}, F^{α} , $2 \times Y^{\alpha}$ {4.37, 4.29}, $A^{\alpha 2}$ {4.36}, $4 \times P^{\alpha}$ {4.27, 4.21}, $V^{\alpha 1}$ {4.24}, $2 \times T^{\alpha}$ {4.20}, $2 \times K^{\alpha}$ {4.20, 4.15}, $T^{\beta*}$ {4.21}, $H2'$ {4.11}, $2 \times T^{\beta}$ {4.09}, $H2$ {4.06}, $H5$ {4.05},), 4.00-3.87 (m, 6H, I^{α} {3.98}, $H4$ {3.97}, $V^{\alpha 2}$ {3.94}, $H7''$ {3.93}, $H3'$ {3.93}, $H3$ {3.92}), 3.86-3.25 (m, 46H, G^{α} {3.84, 3.78}, $H4''$ {3.79}, $4 \times S^{\beta}$ {3.74, 3.61}, $H6_a$ {3.72},

H6'' {3.78}, H4' {3.76}, H5'' {3.72}, H9''_a {3.71}, CO-CH₂-CH₂- {3.65}, 4×P^δ_a {3.68}, H6' {3.63-3.55}, (OCH₂CH₂)₃ {3.55-3.44}, H9''_b {3.54}, H5' {3.54}, H2' {3.53}, H6_b {3.52}, H8'' {3.48}, K^ε_{a1} {3.45-3.30}, 4×P^δ_b {3.53, 3.44, 3.38}, 3.24-2.91 (m, 6H, K^ε_{b1} {3.19-3.10}, R^δ {3.07}, F^β_a + 2×Y^β_a {2.98}), 2.88-2.51 (m, 10H, F^β_b + 2×Y^β_b {2.80}, K^ε₂ {2.82}, N^β {2.79}, D^β {2.72, 2.64}, H3''_{aq} {2.60}), 2.43 (t, 2H, 2H, CO-CH₂-CH₂-, J_{CH₂,CH₂} = 5.6 Hz), 2.20-2.05 (m, 4H, 4×P^β_a), 1.98-1.66 (m, 15H, 2×V^β {1.96}, 4×P^γ {1.88}, 4×P^β_b {1.78}, R^β_a {1.73}), 1.91, 1.89, 1.88, 1.87 (4×s, 12H, 4×CH₃ (NHAc)), 1.65-1.44 (m, 9H, I^β {1.63}, R^β_b {1.59}, H3''_{ax} {1.67}, 2×K^γ {1.55}, R^γ {1.51}), 1.43-1.32 (m, 4H, 2×K^δ), 1.26-1.18 (m, 8H, 2×A^β {1.24}, I^γ {1.25}), 1.13 (d, 3H, T^{γ*}, J_{T^{γ*},T^{α*}} = 6.3 Hz), 1.08-0.98 (m, 6H, 2×T^γ), 0.86-0.73 (m, 12H, 2×V^γ {0.83}), 0.70-0.60 (m, 6H, I^δ {0.68}, I^{γ'} {0.67}).

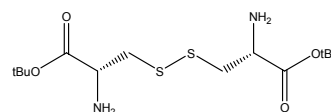
¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, BB, HSQC), δ [ppm]: 174.5, 173.9, 173.8, 173.7, 173.0, 172.9, 172.8, 172.7, 172.6, 171.0 (33C, 33×C=O), 155.0 (1C, R^ζ), 130.4 (4C, 2×Y^δ), 129.2, 128.4, 126.9 (5C, F_{ar}), 115.1 (4C, 2×Y^ε), 101.4 (1C, C2''), 99.2 (1C, C1'), 99.0 (1C, C1), 77.3 (1C, C3), 76.8 (1C, T^{β*}), 75.8 (1C, C3'), 71.5 (1C, C6''), 71.4 (1C, C4'), 71.1 (1C, C5'), 70.8 (1C, C7''), 70.3 (1C, C2'), 69.5, 69.4, 69.1 (6C, (CH₂CH₂O)₃), 68.5, 68.4 (2C, C5, C8''), 67.3 (1C, C4''), 66.8 (2C, 2×T^β), 66.7 (1C, C4), 66.6 (1C, CO-CH₂-CH₂-), 62.7 (1C, C9''), 61.9, 61.7, 61.6 (2C, C6, C6'), 61.1, 60.8 (4C, 4×S^β), 60.4, 60.2 (4C, 4×P^α), 59.6 (1C, V^α(1)), 59.1 (2C, 2×T^α), 58.0 (1C, I^α), 56.8 (1C, T^{α*}), 55.9, 55.8 (3C, 2×Y^α, F^α), 55.2, 54.8 (4C, 4×S^α), 54.9 (1C, V^α(2)), 53.3, 52.6 (2C, 2×K^α), 52.4 (1C, N^α), 51.4 (1C, C5''), 50.9 (1C, R^α), 50.1 (1C, D^α), 48.1 (1C, C2), 47.7 (1C, A^α(1)), 47.5 (4C, 4×P^δ), 47.4 (1C, A^α(2)), 42.1 (1C, G^α), 40.5 (1C, R^δ), 39.5 (1C, C3''), 38.8 (1C, N^β), 38.7 (1C, K^ε(1)), 36.5 (3C, 2×Y^β, F^β), 36.1 (1C, D^β), 35.9 (1C, I^β), 35.7 (1C, CO-CH₂-CH₂-), 34.9 (1C, K^ε(2)), 30.3 (1C, R^β), 29.9 (4C, 2×V^β, 29.2 (4C, 4×P^β), 27.3 (2C, 2×K^δ), 26.0 (1C, R^γ), 24.4 (4C, 4×P^γ), 24.0 (2C, 2×K^γ), 22.0 (1C, I^γ), 22.0, 21.6 (4C, 4×CH₃ (NHAc)), 18.7 (2C, 2×T^γ), 18.2 (1C, T^{γ*}), 17.9 (4C, 2×V^γ), 15.1 (2C, 2×A^β), 14.6 (1C, I^{γ'}), 9.7 (1C, I^δ).

5.6 Synthese von Pam₃Cys-Konjugaten

5.6.1 Synthese von Pam₃Cys-OH

L-Cystin-di-*tert*-butylester (**83**)²⁴⁵

(H-Cys-O*t*Bu)₂



In 45.0 g 70%iger Perchlorsäure werden 15.0g (62.4 mmol) L-Cystin unter Eiskühlung gelöst. Man gibt 350 ml Essigsäure-*tert*-butylester hinzu und rührt die Mischung bei Raumtemp. in einem gut verschlossenen Kolben. Nach ca. einer Stunde hat sich eine homogene Lösung gebildet. Diese wird weitere 48 Stunden bei Raumtemp. gerührt, wobei ein farbloser Niederschlag ausfällt. Die Mischung wird 24 Stunden bei -4 °C aufbewahrt, anschließend wird der Feststoff abfiltriert und mit kaltem Diethylether gewaschen. Das so erhaltene Perchlorat wird in etwas Wasser aufgeschlämmt und vorsichtig mit ges. NaHCO₃-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8 erreicht ist. Anschließend wird dreimal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 150 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Man erhält ein leicht gelbliches Öl, das ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt wird.

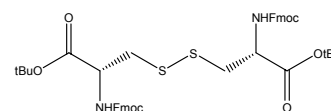
Ausb.: 16.4 g (75%); leicht gelbliches Öl.

C₁₄H₂₈N₂O₄S₂ (M = 352.51 g/mol) [352.15].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO), δ [ppm]: 3.47 (t, 2H, 2×C^α, J_{C^α,C^β} = 6.4 Hz); 3.00-2.84 (m, 4H, 2×C^β), 1.87 (bs, 4H, 2×NH₂), 1.41 (s, 18H, CH₃ (2×*t*Bu)).

N,N'-Bis(9*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-cystin-di-*tert*-butylester (**84**)²⁴⁴

(Fmoc-Cys-O*t*Bu)₂



In 80 ml absol. THF werden 8.4 g (23.8 mmol) L-Cystin-di-*tert*-butylester (**83**) und 22.0 g (58.9 mmol) Fmoc-OSu gelöst. Man gibt langsam 5.5 ml (5.1 g; 50.1 mmol) *N*-Methylmorpholin, gelöst in 5 ml absol. THF, zu und rührt fünf Stunden unter Argon. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 200 ml Ethylacetat aufgenommen. Man wäscht zweimal mit je 50 ml 5%iger Zitronensäure-Lösung, trocknet über Magnesiumsulfat und destilliert das Lösungsmittel i. Vak. ab. Der

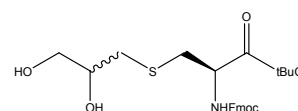
Rückstand wird aus 300 ml Dichlormethan/Methanol 1:4 umkristallisiert. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, mit *tert*-Butanol/Isopropanol 1:1 gewaschen und i. Vak. getrocknet.

Ausb.: 16.4 g (86%); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.72$ (EE/PE 3:1); Schmp.: 148-150 °C.

$C_{44}H_{48}N_2O_8S_2$ (M = 796.99 g/mol) [796.29].

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 7.72 (d, 4H, 2×H4-, 2×H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.7$ Hz), 7.56 (d, 4H, 2×H1-, 2×H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.7$ Hz), 7.39(t, 4H, 2×H3-, 2×H6-Fmoc, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 8.5$ Hz), 7.29(t, 4H, 2×H2-, 2×H7-Fmoc, $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.4$ Hz), 5.70 (d, 2H, 2×NH, $J_{NH,C\alpha} = 7.4$ Hz), 4.54-4.52 (m, 2H, 2×C $^\alpha$), 4.35 (d, 4H, 2×CH₂ (Fmoc), $J_{CH_2,CH} = 7.4$ Hz), 4.24-4.16 (m, 2H, 2×CH (Fmoc), 3.19-3.15 (m, 4H, 2×C $^\beta$), 1.46 (s, 18H, CH₃ (2×*t*Bu)).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-dihydroxy-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (**85**)²⁴²**



In 40 ml entgastem Dichlormethan werden 3.60 g (4.52 mmol)

N,N'-Di-(9*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*L*-cystin-di-*tert*-butylester (**84**) gelöst und mit 2.10 g (32.10 mmol) Zinkstaub versetzt. Unter kräftigem Rühren werden 15 ml einer Mischung von MeOH, konz. HCl und konz. H₂SO₄ (100:7:1) zugegeben. Nach 20 Minuten werden 3.40 g (45.9 mmol) Glycidol zugegeben, und es wird bei 40 °C über 4.5 Stunden gerührt. Die Reaktionsmischung wird anschließend i. Vak. auf halbes Volumen eingeeengt und mit 5 ml 5%iger KHSO₄-Lösung versetzt. Die Mischung wird 20 Stunden bei -4 °C aufbewahrt und dann über *Hyflo* filtriert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 20 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Öl wird im Feinvakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet.

Ausb.: 4.28 g (quant.); farbloses, hochviskoses Öl; $R_f = 0.37$ (EE/PE 3:1).

$C_{25}H_{31}NO_6S$ (M = 473.58 g/mol) [473.19].

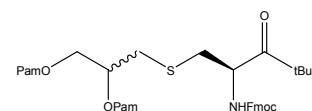
1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz), 7.39(t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4$ Hz), 7.30(t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.4$ Hz), 5.85-5.65 (m,

1H, NH), 4.57-4.30 (m, 3H, C^α, CH₂ (Fmoc)), 4.21 (t, 1H, CH (Fmoc), J_{CH,CH2} = 7.0 Hz), 3.83-3.66 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 3.66-3.43 (m, 2H, OCH₂ (Glyceryl)), 3.05-2.83 (m, 2H, C^β), 2.82-2.70 (m, 1H, SCH_{2a} (Glyceryl)), 2.69-2.53 (m, 1H, SCH_{2b} (Glyceryl)), 1.47 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 143.8 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1, (2C, C2-, C7-Fmoc) 125.1 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 83.2 (1C, C_q (*t*Bu)), 70.5, 70.3 (1C, CH (Glyceryl))* , 67.2 (1C, CH₂ (Fmoc)), 65.2, 65.1 (1C, CH₂ (Glyceryl))* , 54.5 (1C, C^α), 47.1 (1C, CH (Fmoc)), 36.8, 36.7 (1C, C^β)* , 35.9, 35.8 (1C, SCH₂ (Glyceryl))* , 28.0 (3C, CH₃ (*t*Bu)).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise (*) Signalverdopplung auf.

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (86)²⁴²**



In 75 ml absol. THF werden 3.00 g (6.33 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-dihydroxy-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (**85**) gelöst. Man gibt 5.40 g (20.67 mmol) Palmitinsäure, 4.0 ml DIC (25.83 mmol) und 0.3 g DMAP (2.60 mmol) zu und rührt die Reaktionsmischung fünf Stunden unter Argon. Nach Zugabe von 3 ml Essigsäure wird die Lösung i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand aus Dichlormethan/Methanol 20:1 umkristallisiert.

Ausb.: 5.91 g (98%); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.81 (EE/PE 3:1); Schmp.: 43-44 °C, Lit.:²⁴² Schmp.: 38-42 °C.

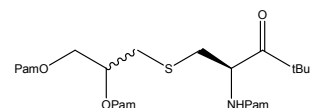
C₅₇H₉₁NO₈S (M = 950.40 g/mol) [949.65].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.7 Hz), 7.60 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.0 Hz), 7.38(t, 2H, H3-, H6-Fmoc, J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4 Hz), 7.29(t, 2H, H2-, H7-Fmoc, J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.4 Hz), 5.67-5.64 (m, 1H, NH), 5.17-5.11 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.48-4.42 (m, 1H, C^α), 4.37-4.11 (m, 5H, CH₂ (Fmoc), CH (Fmoc), OCH₂ (Glyceryl)), 3.05-3.01 (m, 2H, C^β), 2.75 (d, 2H, SCH₂ (Glyceryl), J_{CH2,CH} = 6.3 Hz), 2.32-2.24 (m, 6H, 3×αCH₂ (Pam)), 1.58-1.53 (m, 6H, 3×βCH₂ (Pam)), 1.47 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)), 1.23 (bs, 48H, 2×(CH₂)₁₂ (Pam)), 0.86 (t, 6H, 2×CH₃ (Pam), J_{CH3,CH2} = 6.6 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , BB), δ [ppm]: 173.3, 173.0 (3C, $3\times\text{C}=\text{O}$), 156.1 (1C, $\text{C}=\text{O}$ (Urethan)), 143.8 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (2C, C3-, C6-Fmoc), 127.1, (2C, C2-, C7-Fmoc) 125.2 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 83.0 (1C, C_q (*t*Bu)), 70.3, 70.0 (1C, CH (Glyceryl))*, 67.2 (1C, CH_2 (Fmoc)), 63.4 (1C, CH_2 (Glyceryl)), 54.3, 53.7 (1C, C^α)*, 47.1 (1C, CH (Fmoc)), 35.4 (1C, C^β), 34.3, 34.2, 34.1, 31.9, 29.7, 29.6, 29.1, 29.2, 29.0, 24.9, 22.7 (28C, $28\times\text{CH}_2$ (Pam)), 33.3, 33.2 (1C, SCH_2 (Glyceryl))*, 28.0 (3C, CH_3 (*t*Bu)), 14.1 (3C, $3\times\text{CH}_3$ (Pam)).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise (*) Signalverdopplung auf.

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (87)²⁴²
(Pam₃Cys-*Ot*Bu)**



In 10 ml DMF/Morpholin (1:1) werden 881 mg (0.93 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (**86**) gelöst und zwei Stunden bei Raumtemp. gerührt. Es wird i. Vak. eingengt und der Rückstand dreimal i. Vak. mit Toluol kodestilliert. Das freie Amin wird in 15 ml Dichlormethan/DMF 5:2 aufgenommen. Die Lösung wird mit 420 mg (1.64 mmol) Palmitinsäure, 222 mg (1.64 mmol) HOBt \times H₂O und 208 mg (1.64 mmol) Diisopropylcarbodiimid (DIC) versetzt und 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 20 ml Dichlormethan verdünnt und je dreimal mit 20 ml Wasser, ges. NaHCO₃-Lösung und wieder Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der so erhaltene gelbliche Feststoff wird durch Umkristallisation aus 20 ml Chloroform/Methanol 20:1 bei -20 °C gereinigt.

Ausb.: 805 mg (90%); farbloser, amorpher Feststoff; Schmp.: 59 °C.

$\text{C}_{58}\text{H}_{111}\text{NO}_7\text{S}$ ($M = 966.57$ g/mol) [965.81].

FD-MS, m/z : 966.9 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 966.8)

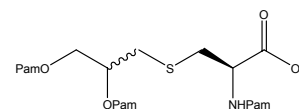
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 6.34-6.28 (m, 1H, NH), 5.13-5.10 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.68-4.71 (m, 1H, C^α), 4.33-4.27 (m, 1H, OCH_{2a} (Glyceryl)), 4.14-4.08 (m, 1H, OCH_{2b} (Glyceryl)), 3.04-2.95 (m, 2H, C^β), 2.71 (d, 2H, SCH_2 (Glyceryl), $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 6.6$ Hz), 2.32-2.20 (m, 6H, $3\times\alpha\text{CH}_2$ (Pam)), 1.70-1.50 (m, 6H, $3\times\beta\text{CH}_2$ (Pam)), 1.46 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)), 1.23 (bs, 72H, $3\times(\text{CH}_2)_{12}$ (Pam)), 0.86 (t, 9H, $3\times\text{CH}_3$ (Pam), $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 6.2$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , BB), δ [ppm]: 173.0, 172.9, 169.7 (4C, $4\times\text{C}=\text{O}$), 82.8 (1C, C_q (*t*Bu)), 70.3, 70.0 (1C, CH (Glyceryl))* , 63.5 (1C, OCH_2 (Glyceryl)), 52.5 (1C, C^α), 35.2 (1C, C^β), 36.5, 34.3, 34.1, 32.9, 31.9, 29.7, 29.5, 29.3, 24.9, 22.7 (42C, $3\times(\text{CH}_2)_{14}$ (Pam)), 33.2 (1C, SCH_2 (Glyceryl)), 28.0 (3C, CH_3 (*t*Bu)), 14.1 (3C, $3\times\text{CH}_3$ (Pam)).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise (*) Signalverdopplung auf.

N-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cystein (**88**)²⁴²

(Pam₃Cys-OH)



In 10 mL Dichlormethan werden 4.26 g (4.41 mmol) *N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (**87**) gelöst, mit 2.0 mL Anisol und 50 mL Trifluoressigsäure versetzt und 90 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird mit 60 mL Toluol verdünnt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird noch dreimal i. Vak. mit Toluol kodestilliert. Das Produkt wird durch Umkristallisation aus Petrolether/Chloroform 16:1 bei -20 °C gereinigt.

Ausb.: 3.66 g (91%); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.43$ (EE/AcOH 100:1); Schmp.: 62 °C.

$\text{C}_{54}\text{H}_{103}\text{NO}_7\text{S}$ ($M = 910.46$ g/mol) [909.75].

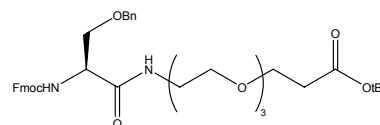
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 6.60-6.58 (m, 1H, NH), 5.21-5.08 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.83-4.67 (m, 1H, C^α), 4.41-4.27 (m, 1H, OCH_{2a} (Glyceryl)), 4.19-4.05 (m, 1H, OCH_{2b} (Glyceryl)), 3.18-2.97 (m, 2H, C^β), 2.72 (d, 2H, SCH_2 (Glyceryl), $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 6.0$ Hz), 2.32-2.20 (m, 6H, $3\times\alpha\text{CH}_2$ (Pam)), 1.68-1.52 (m, 6H, $3\times\beta\text{CH}_2$ (Pam)), 1.22 (bs, 72H, $3\times(\text{CH}_2)_{12}$ (Pam)), 0.86 (t, 9H, $3\times\text{CH}_3$ (Pam), $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 6.6$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , BB), δ [ppm]: 173.4, 173.6, 173.5, 172.6 (4C, $4\times\text{C}=\text{O}$), 70.2, 70.1 (1C, CH (Glyceryl))* , 63.7 (1C, CH_2 (Glyceryl)), 52.1, 51.9 (1C, C^α)* , 36.3 (1C, C^β), 36.2, 34.3, 34.1, 32.9, 31.9, 29.7, 29.5, 29.3, 25.5, 24.9, 22.7 (42C, $3\times(\text{CH}_2)_{14}$ (Pam)), 33.8 (1C, SCH_2 (Glyceryl)), 14.1 (3C, $3\times\text{CH}_3$ (Pam)).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise (*) Signalverdopplung auf.

5.6.2 Versuche zur direkten Verknüpfung

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-benzyl-serin-12-amido-4,7,10-trioxa-decansäure-*tert*-butylester (89)**
(Fmoc-Ser(Bn)-{OEG}-COO*t*Bu)



In 10 ml Dichlormethan werden 1.50 g (3.59 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-benzyl-serin (Fmoc-Ser(Bn)-OH) gelöst. Die Lösung wird im Eisbad gekühlt und mit 560 mg (3.66 mmol) HOBT×H₂O und 700 mg (3.66 mmol) EDC versetzt. Die Reaktionsmischung wird 15 Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend mit 1.15 g (3.58 mmol) (72) in 10 ml Dichlormethan versetzt. Die Lösung wird 20 Stunden unter langsamem Aufwärmen auf Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand in 50 ml Ethylacetat aufgenommen. Die org. Phase zweimal mit je 20 ml Wasser und dann nacheinander mit je 15 ml 5%iger Zitronensäure-, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (EE/CH 1:3→3:1) gereinigt.

Ausb.: 2.17 g (84%); leicht gelblicher, amorpher Feststoff; R_f = 0.33 (EE/PE 3:1).

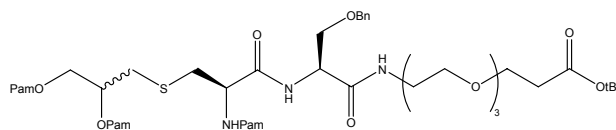
C₃₈H₄₈N₂O₉ (M = 676.80 g/mol) [676.34].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.57 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, J_{H₄,H₃} = J_{H₅,H₆} = 7.5 Hz), 7.50 (d, 2H, H₁-, H₈-Fmoc, J_{H₁,H₂} = J_{H₈,H₇} = 7.4 Hz), 7.38 (t, 2H, H₃-, H₆-Fmoc, J_{H₃,H₂/H₄} = J_{H₆,H₅/H₇} = 7.3 Hz), 7.33-7.27 (m, 7H, H₂-, H₇-Fmoc, H_{ar} (Bn)), 6.81 (bs, 1H, Ser-NH-CH₂), 5.76 (bs, 1H, NH (Urethan)), 4.56-4.53 (m, 2H, CH₂ (Bn)), 4.43-4.30 (m, 3H, S^α, CH₂ (Fmoc)), 4.20 (t, 1H, CH (Fmoc), J_{CH,CH₂} = 6.9 Hz), 3.90-3.83 (m, 1H, S^{β_a}), 3.65 (t, 2H, -CH₂CH₂COO*t*Bu, J_{CH₂,CH₂} = 6.6 Hz), 3.54-3.46 (m, 13H, S^{β_b}, -(CH₂CH₂O)₃-), 2.45 (t, 2H, -CH₂COO*t*Bu, J_{CH₂,CH₂} = 6.6 Hz), 1.41 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 170.9, 169.8 (2C, 2×C=O), 156.0 (1C, C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (2C, C_{1a}-, C_{8a}-Fmoc), 141.3 (2C, C_{4a}-, C_{5a}-Fmoc), 137.5 (1C, C_q (Bn)), 129.0, 128.5, 127.9 (5C, C_{ar} (Bn)), 127.8, 127.7 (2C, C₃, C₆-Fmoc), 127.1 (2C, C₂-, C₇-Fmoc), 125.3, 125.1 (2C, C₁-, C₈-Fmoc), 120.0 (2C, C₄-, C₅-Fmoc), 80.5 (1C, C_q (*t*Bu)), 73.4 (1C, CH₂ (Bn)), 70.5, 70.4, 70.3, 69.6 (8C, S^β, (CH₂CH₂O)₃CH₂-), 66.9 (1C, CH₂ (Fmoc)), 54.3 (1C, S^α), 47.2 (1C, CH (Fmoc), 39.5 (1C, -CH₂-NH-), 36.2 (1C, -CH₂COO*t*Bu), 28.1 (3C, CH₃ (*t*Bu)).

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cysteinyl-*O*-benzyl-seryl-12-amido-4,7,10-trioxa-decansäure-*tert*-butylester (90)**

(Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-COOtBu)



Eine Lösung von 2.10 g (2.91 mmol)

(Fmoc-Ser(Bn)-{OEG}-COOtBu) (**89**) in 30 ml DMF:Morpholin 1:1 wird 90 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird mit 50 ml Toluol verdünnt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird noch viermal mit Toluol kodestilliert und anschließend i. Hochvak. getrocknet. Eine Lösung von 2.55 g (2.80 mmol) *N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cystein (**88**) in einer Mischung aus 20 ml Dichlormethan und 5 ml DMF wird nacheinander mit 460 mg (3.00 mmol) HOBt×H₂O, 965 mg (3.01 mmol) TBTU und 1.03 ml (6.01 mmol) DIPEA versetzt und 10 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Das vorher dargestellte freie Amin, gelöst in 20 ml Dichlormethan und 5 ml DMF, wird zugegeben und die Reaktionsmischung 18 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit je 20 ml ges. NaHCO₃-, 5%iger Zitronensäure- und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂/MeOH 5:1) gereinigt.

Ausb.: 2.27 g (60%); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.38 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1).

C₇₇H₁₃₉N₃O₁₃S (M = 1347.00 g/mol) [1346.00].

ESI-MS (positiv), m/z: 1369.4 ([M+Na]⁺, ber.: 1369.0).

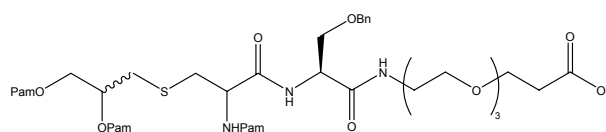
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.33-7.15 (m, 6H, C_{ar} (Bn), NH (C oder S)), 7.05-6.90 (m, 1H, -CH₂NH-Ser), 6.55-6.45 (m, 1H, NH (C oder S)), 5.16-5.03 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.56-4.44 (m, 4H, CH₂ (Bn), C^α, S^α), 4.33-4.23 (m, 1H, OCH_{2a} (Glyceryl)), 4.13-4.04 (m, 1H, OCH_{2b} (Glyceryl)), 3.90-3.81 (m, 1H, S^{β_a}), 3.64 (t, 2H, -CH₂CH₂COOtBu), 3.59-3.45 (m, 11H, S^{β_b}, -(CH₂OCH₂)₂CH₂-), 3.45-3.35 (m, 2H, -CH₂-NH-Ser), 2.92-2.83 (m, 2H, C^β), 2.74-2.67 (m, 2H, -SCH₂- (Glyceryl)), 2.44 (t, 2H, -CH₂COOtBu, J_{CH₂CH₂} = 6.5 Hz), 2.30-2.20 (m, 2H, αCH₂ (NHPam)), 2.20-2.12 (m, 4H, 2×αCH₂ (OPam)), 1.61-1.48 (m, 6H, 3×βCH₂ (Pam)), 1.39 (s, 9H, CH₃ (tBu)), 1.25 (bs, 72H, 3×(CH₂)₁₂ (Pam)), 0.83 (t, 9H, 3×CH₃ (Pam), J_{CH₃,CH₂} = 6.7 Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB, DEPT), δ [ppm]: 173.3, 170.8, 170.3, 170.1, 169.4, 169.2 (6C, 6×C=O), 137.5 (1C, C_q (Bn)), 128.4, 127.8, 127.6 (5C, C_{ar} (Bn)), 80.5 (1C, C_q (tBu)), 73.3 (1C, CH₂ (Bn)), 70.5, 70.4, 70.3, 70.1, 69.5, 69.4 (8C, S^β, CH (Glyceryl),

-(CH₂CH₂O)₃-), 66.8 (1C, -CH₂CH₂COO*t*Bu), 63.6, 63.5 (1C, OCH₂ (Glyceryl))* , 53.0, 52.3, 52.0 (2C, C^α, S^α)* , 39.5 (1C, -CH₂-NHBoc), 36.3 (2C, 2×αCH₂ (OPam)), 36.2 (1C, -CH₂COO*t*Bu), 34.3 (1C, C^β), 34.0 (1C, αCH₂ (NHPam)), 31.9 (1C, -SCH₂- (Glyceryl)), 28.0 (3C, CH₃ (*t*Bu)), 25.5 (1C, βCH₂ (NHPam)), 24.9, 24.8 (2C, 2×βCH₂ (OPam)), 32.1, 29.7, 29.5 29.3, 29.1, 22.6 (36C, 3×(CH₂)₁₄ (Pam)), 14.1 (3C, 3×CH₃ (Pam)).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise (*) Signalverdopplung auf.

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cysteinyl-*O*-benzyl-seryl-12-amido-4,7,10-trioxa-decansäure (91)**
(Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-COOH)



Eine Lösung von 40 mg Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-COO*t*Bu (**90**) in 1 ml Dichlormethan wird mit 2.5 ml Trifluoressigsäure versetzt und eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird mit 10 ml Toluol verdünnt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird noch zweimal mit Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Produktes erfolgt durch Flashchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 100:10:1).

Ausb.: 38 mg (99%); farbloser amorpher Feststoff; R_f = 0.49 (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 100:10:1).

C₇₃H₁₃₁N₃O₁₃S (M = 1290.9 g/mol) [1289.9].

ESI-MS (positiv), m/z: 1313.0 ([M+Na]⁺, ber.: 1312.9).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ [ppm]: 7.63-7.56 (m, 1H, NH (S)), 7.33-7.13 (m, 5H, C_{ar} (Bn)), 6.86-6.73 (m, 1H, -CH₂NH-Ser), 6.65-6.61 (m, 1H, NH (C)), 5.17-5.13 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.74-4.69 (m, 1H, S^α), 4.67-4.62 (m, 1H, C^α), 4.52 (s, 2H, CH₂ (Bn)), 4.36-4.25 (m, 1H, OCH_{2a} (Glyceryl)), 4.17-4.07 (m, 1H, OCH_{2b} (Glyceryl)), 3.96-3.86 (m, 1H, S^β_a), 3.74-3.69 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COOH), 3.67-3.62 (m, 1H, S^β_b), 3.77-3.40 (m, 10H, -CH₂(CH₂OCH₂)₂-), 3.39-3.33 (m, 2H, Ser-NH-CH₂-), 3.00-2.84 (m, 2H, C^β), 2.79-2.73 (m, 1H, -SCH_{2a}- (Glyceryl)), 2.72-2.66 (m, 1H, -SCH_{2b}- (Glyceryl)), 2.58-2.50 (m, 2H, -CH₂COO*t*Bu), 2.30-2.26 (m, 2H, αCH₂ (NHPam)), 2.21-2.16 (m, 4H, αCH₂ (OPam)), 1.63-1.50 (m, 6H, 3×βCH₂ (Pam)), 1.22 (bs, 72H, 3×(CH₂)₁₂ (Pam)), 0.84 (t, 9H, 3×CH₃ (Pam)), J_{CH₃,CH₂} = 6.7 Hz).

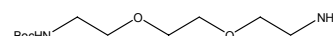
¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, BB, HMQC), δ [ppm]: 173.4, 170.6 (6C, 6×C=O), 137.5 (1C, C_q (Bn)), 128.4, 127.8, 127.7 (5C, C_{ar} (Bn)), 73.3 (1C, CH₂ (Bn)), 70.6, 70.4, 70.3, 70.2, 70.1,

69.6, 69.4 (8C, S^β, CH (Glyceryl), -(CH₂CH₂O)₃-), 66.5 (1C, -CH₂CH₂COOtBu), 63.6, 63.5 (1C, OCH₂ (Glyceryl))* , 53.4, 52.8, 52.0 (2C, C^α, S^α)* , 39.7 (1C, -CH₂-NHBoc), 36.4, 36.3 (2C, 2×αCH₂ (OPam)), 35.0 (1C, -CH₂COOtBu), 34.3 (1C, C^β), 34.1 (1C, αCH₂ (NHPam)), 31.2 (1C, -SCH₂- (Glyceryl)), 25.5 (1C, βCH₂ (NHPam)), 24.9, 24.8 (2C, 2×βCH₂ (OPam)), 32.9, 29.7, 29.5, 29.3, 29.1, 22.7 (36C, 3×(CH₂)₁₄ (Pam)), 14.1 (3C, 3×CH₃ (Pam)).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise (*) Signalverdopplung auf.

N-(*tert*-Butyloxycarbonyl)aminoethoxyethoxyethylamin (92)

(BocNH-{OEG}-NH₂)



In 80 ml 1,4-Dioxan werden 18 ml (18.2 g, 120 mmol) Aminoethoxyethoxyethylamin gelöst. Über einen Zeitraum von vier Stunden wird eine Lösung von 4.37 g (20 mmol) Di-*tert*-butyl-dicarbonat (Boc₂O) in 30 ml Dioxan zugetropft und die entstehende Suspension anschließend noch 15 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Das Dioxan wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand in 40 ml Wasser aufgenommen. Das Produkt wird viermal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden dreimal mit je 30 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Öl ist nach Trocknung i. Hochvak. rein genug für die weitere Umsetzung.

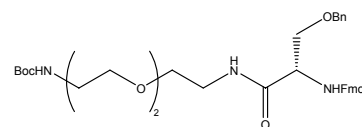
Ausb.: 4.90 g (99%); leicht gelbliches Öl.

C₁₁H₂₄N₂O₄ (M = 248.32 g/mol) [248.17].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 5.15 (bs, 1H, NH), 3.58-3.51 (m, 4H, -OCH₂CH₂O-), 3.50-3.42 (m, 4H, 2×-NCH₂CH₂-O-), 3.28 (d, 2H, -CH₂NH-, J_{CH₂,NH} = 4.8 Hz), 2.87 (t, 2H, -CH₂-NH₂, J_{CH₂CH₂} = 5.0 Hz), 2.35 (s, 2H, NH₂), 1.40 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

N-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-benzyl-serin-[*N'*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-aminoethoxyethoxyethyl]amid (93)

(Fmoc-Ser(Bn)-{OEG}-NHBoc)



In 30 ml Dichlormethan werden 3.40 g (8.14 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-benzyl-serin (Fmoc-Ser(Bn)-OH) gelöst. Die Lösung wird im Eisbad gekühlt und mit

1.25 g (8.16 mmol) HOBt·H₂O und 1.56 g (8.16 mmol) *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 15 Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend mit 2.0 g (8.05 mmol) *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)aminoethoxyethoxyethylamin (**92**) in 10 ml Dichlormethan versetzt. Die Lösung wird 30 Minuten bei 0 °C gerührt, dann wird das Eisbad entfernt und es wird noch weitere 24 Stunden gerührt. Die Reaktionsmischung wird zweimal mit je 20 ml Wasser und dann nacheinander mit je 15 ml 5%iger Zitronensäure-, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (EE/CH 3:1) gereinigt.

Ausb.: 4.20 g (80%); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.24 (EE/PE 3:1).

C₃₆H₄₅N₃O₈ (M = 647.76 g/mol) [647.32].

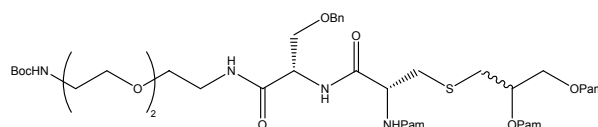
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.74 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, J_{H₄,H₃} = J_{H₅,H₆} = 7.5 Hz), 7.57 (d, 2H, H₁-, H₈-Fmoc, J_{H₁,H₂} = J_{H₈,H₇} = 7.5 Hz), 7.38 (t, 2H, H₃-, H₆-Fmoc, J_{H₃,H₂/H₄} = J_{H₆,H₅/H₇} = 7.3 Hz), 7.33-7.25 (m, 7H, H₂-, H₇-Fmoc, H_{ar} (Bn)), 6.79 (bs, 1H, Ser-NH-CH₂), 5.74 (bs, 1H, NH (Urethan)), 5.00 (bs, 1H, NH (Boc)), 4.57-4.50 (m, 2H, CH₂ (Bn)), 4.42-4.30 (m, 3H, S^α, CH₂ (Fmoc)), 4.19 (t, 1H, CH (Fmoc), J_{CH₃,CH₂} = 6.9 Hz), 3.92-3.84 (m, 1H, S^{β_a}), 3.61-3.39 (m, 11H, S^{β_b}, -(CH₂CH₂O)₂-CH₂), 3.24 (t, 2H, -CH₂-NHBoc, J_{CH₂,CH₂} = 5.1 Hz), 1.41 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB, DEPT), δ [ppm]: 169.9 (1C, C=O), 156.1 (2C, 2×C=O (Urethan)), 143.7 (2C, C_{1a}-, C_{8a}-Fmoc), 141.3 (2C, C_{4a}-, C_{5a}-Fmoc), 137.4 (1C, C_q (Bn)), 129.0, 128.5, 128.2 (5C, C_{ar} (Bn)), 127.7 (2C, C₃, C₆-Fmoc), 127.1 (2C, C₂-, C₇-Fmoc), 125.1 (2C, C₁-, C₈-Fmoc), 120.0 (2C, C₄-, C₅-Fmoc), 79.4 (1C, C_q (*t*Bu)), 73.4 (1C, S^β), 70.1, 69.9, 69.7 (6C, CH₂ (Bn), (CH₂CH₂O)₂CH₂-), 67.2 (1C, CH₂ (Fmoc)), 54.3 (1C, S^α), 47.1 (1C, CH (Fmoc), 39.5 (1C, -CH₂-NH-), 28.4 (3C, CH₃ (*t*Bu)).

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cysteinyl-*O*-benzyl-seryl-8-amido-3,6-dioxa-1-*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-amino-octan**

(**94**)

(Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-NHBoc)



Eine Lösung von 1.80 g (2.78 mmol) Fmoc-Ser(Bn)-{OEG}-NHBoc (**93**) in 20 ml DMF:Morpholin (1:1) wird eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird mit 50 ml

Toluol verdünnt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird noch viermal mit Toluol kodestilliert und anschließend i. Hochvak. getrocknet. Eine Lösung von 2.45 g (2.69 mmol) Pam₃Cys-OH (**88**) in einer Mischung aus 10 ml Dichlormethan und 2 ml DMF wird nacheinander mit 430 mg (2.80 mmol) HOBt·xH₂O, 900 mg (2.80 mmol) TBTU und 950 µl (5.60 mmol) DIPEA versetzt und 15 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Das vorher dargestellte freie Amin, gelöst in 10 ml Dichlormethan und 2 ml DMF, wird zugegeben und die Reaktionsmischung 3.5 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 50 ml Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit je 10 ml ges. NaHCO₃-, 5%iger Zitronensäure- und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂/MeOH 5:1) gereinigt.

Ausb.: 1.80 g (51%); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.73 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1); R_f = 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1).

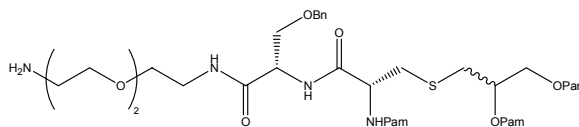
C₇₅H₁₃₆N₄O₁₂S (M = 1317.97 g/mol) [1316.99].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.34-7.16 (m, 6H, C_{ar} (Bn), NH (C oder S)), 6.98-6.87 (m, 1H, -CH₂NH-Ser), 6.56-6.40 (m, 1H, NH (C oder S)), 5.21-5.13 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 5.13-5.01 (m, 1H, NH (Urethan)), 4.60-4.44 (m, 4H, CH₂ (Bn), C^α, S^α), 4.36-4.25 (m, 1H, OCH_{2a} (Glyceryl)), 4.15-4.06 (m, 1H, OCH_{2b} (Glyceryl)), 3.95-3.87 (m, 1H, S^{β_a}), 3.63-3.54 (m, 1H, S^{β_b}), 3.54-3.48 (m, 8H, -(CH₂OCH₂)₂-), 3.48-3.38 (m, 2H, -CH₂-NH-Ser), 3.30-3.15 (bs, 2H, -CH₂-NHBoc), 2.94-2.86 (m, 2H, C^β), 2.78-2.67 (m, 2H, -SCH₂- (Glyceryl)), 2.27 (t, 2H, αCH₂ (NHPam), J_{CH₂,CH₂} = 7.3 Hz), 2.23-2.15 (m, 4H, 2×αCH₂ (OPam)), 1.62-1.50 (m, 6H, 3×βCH₂ (Pam)), 1.40 (s, 9H, CH₃ (tBu)), 1.24 (bs, 72H, 3×(CH₂)₁₂ (Pam)), 0.84 (t, 9H, 3×CH₃ (Pam), J_{CH₃,CH₂} = 6.7 Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 173.4, 173.3, 169.3 (5C, 5×C=O), 156.1 (1C, C=O (Urethan)), 137.5 (1C, C_q (Bn)), 128.4, 127.8, 127.7, 127.6 (5C, C_{ar} (Bn)), 79.3 (1C, C_q (tBu)), 73.4 (1C, S^β), 70.2, 70.1, 69.5, 69.3 (8C, CH₂ (Bn), CH (Glyceryl), -(CH₂CH₂O)₃-), 63.6, 63.5 (1C, OCH₂ (Glyceryl))* , 53.1, 52.9, 52.1 (2C, C^α, S^α)* , 39.5 (1C, -CH₂-NHBoc), 36.4 (2C, 2×αCH₂ (OPam)), 34.3 (1C, C^β), 34.1 (1C, αCH₂ (NHPam)), 31.9 (1C, -SCH₂- (Glyceryl)), 28.4 (3C, CH₃ (tBu)), 25.5 (1C, βCH₂ (NHPam)), 25.4 (2C, 2×βCH₂ (OPam)), 31.9, 29.7, 29.3, 29.1, 28.4, 22.7 (36C, 3×(CH₂)₁₄ (Pam)), 14.1 (3C, 3×CH₃ (Pam)).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise (*) Signalverdopplung auf.

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cysteinyl-*O*-benzyl-seryl-8-amido-3,6-dioxa-1-amino-octan,
 Trifluoressigsäuresalz (**95**)
 (Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-NH₂×TFA)**



Eine Lösung von 500 mg (0.38 mmol) Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-NHBoc (**94**) in 2 ml Dichlormethan wird mit 4 ml TFA versetzt und eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird mit 20 ml Toluol verdünnt und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird dreimal i. Vak. mit Toluol kodestilliert und dann in wenig Dichlormethan aufgenommen. Die Lösung wird in 20 ml eiskaltes Methanol getropft und der ausgefallene Niederschlag abzentrifugiert. Das Produkt wird nochmals durch Aufschlänmen in Methanol und Abzentrifugieren gereinigt und anschließend i. Vak. getrocknet.

Ausb.: 445 mg (88 %); farbloser, amorpher Feststoff.

C₇₂H₁₂₉F₃N₄O₁₂S (M = 1331.87 g/mol) [1330.93].

ESI-MS (positiv), m/z: 1218.5 ([M-TFA+H]⁺, ber.: 1217.9).

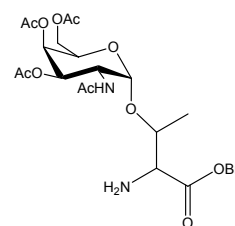
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.99-7.67 (m, 1H, NH (C oder S)), 7.63-7.50 (m, 1H, NH (C oder S)), 7.41-7.20 (m, 5H, C_{ar} (Bn)), 7.13-6.92 (m, 1H, -CH₂NH-Ser), 6.02-5.78 (m, 2H, NH₂), 5.21-5.06 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.62-4.43 (m, 4H, CH₂ (Bn), C^α, S^α), 4.40-4.24 (m, 1H, OCH_{2a} (Glyceryl)), 4.15-3.99 (m, 1H, OCH_{2b} (Glyceryl)), 3.98-3.87 (m, 1H, S^β_a), 3.73-3.48 (m, 11H, -CH₂(CH₂OCH₂)₂-, S^β_b), 3.47-3.37 (m, 2H, -CH₂-NH-Ser), 3.09-2.85 (m, 2H, C^β), 2.76-2.65 (m, 2H, -SCH₂- (Glyceryl)), 2.34-2.17 (m, 6H, 3×αCH₂ (Pam)), 1.64-1.48 (m, 6H, 3×βCH₂ (Pam)), 1.23 (bs, 72H, 3×(CH₂)₁₂ (Pam)), 0.85 (t, 9H, 3×CH₃ (Pam), J_{CH₃,CH₂} = 6.7 Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 173.5, 171.9, 170.1 (5C, 5×C=O), 137.3 (1C, C_q (Bn)), 128.5, 128.0, 127.8 (5C, C_{ar} (Bn)), 73.4 (1C, S^β), 70.1, 69.9, 69.5, 69.2 (8C, CH₂ (Bn), CH (Glyceryl), -(CH₂CH₂O)₃-), 63.7, 63.5 (1C, OCH₂ (Glyceryl))^{*}, 54.3, 53.8 (2C, C^α, S^α), 36.1 (2C, 2×αCH₂ (OPam)), 34.3 (1C, C^β), 34.0 (1C, αCH₂ (NHPam)), 31.9 (1C, -SCH₂- (Glyceryl)), 25.6 (1C, βCH₂ (NHPam)), 24.8 (2C, 2×βCH₂ (OPam)), 29.7, 29.5, 29.3, 29.1, 22.7 (36C, 3×(CH₂)₁₄ (Pam)), 14.1 (3C, 3×CH₃ (Pam)).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise (*) Signalverdopplung auf.

***O*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-benzylester (96)**

(H-Thr(α Ac₃GalNAc)-OBn)



Eine Lösung von 500 mg (0.66 mmol) Fmoc-Thr(T_N)-OBn (**8**) in 3 ml Dichlormethan wird mit 6 ml Morpholin versetzt und zwei Stunden bei Raumtemp. gerührt. Dichlormethan und Morpholin werden i. Vak. abdestilliert und der Rückstand noch dreimal mit Toluol kdestilliert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flachchromatographie (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂/MeOH 10:1).

Ausb.: 352 mg (quant.); farbloser Feststoff; R_f = 0.49 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1).

C₂₅H₃₄N₂O₁₁ (M = 538.54 g/mol) [538.22].

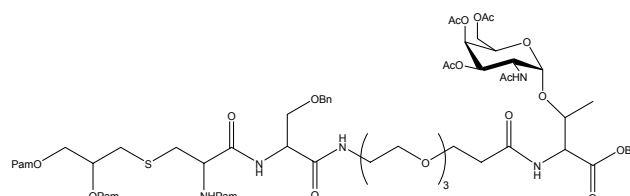
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.39-7.30 (m, 5H, H_{ar} (Bn)), 6.12 (bs, 1H, NH (GalNAc)), 5.34 (d, 1H, H₄, J_{H₄,H₃} = 2.6 Hz), 5.17 (d, 1H, CH_{2a} (Bn), J_{a,b} = 11.8 Hz), 5.10-5.03 (m, 2H, CH_{2b} (Bn), H₃), 4.78 (d, 1H, H₁, J_{H₁,H₂} = 3.7 Hz), 4.50 (dd, 1H, H₂, J_{H₁,H₂} = 3.7 Hz, J_{H₂,H₃} = 8.6 Hz), 4.24-4.19 (m, 1H, T ^{β}), 4.06-4.03 (m, 3H, H₅, H_{6_{a,b}}), 3.47 (bs, 1H, T ^{α}), 2.13, 2.00, 1.96, 1.94 (4xs, 12H, 4×CH₃ (Ac)), 1.35 (d, 3H, T ^{γ} , J_{T ^{γ} ,T ^{β}} = 6.2 Hz)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 170.9, 170.3 (5C, 5×C=O), 134.8 (1C, C_q (Bn)), 128.8, 128.6, 120.7 (5C, C_{ar} (Bn)), 100.0 (1C, C₁), 77.9 (1C, T ^{β}), 68.6, 67.4, 67.2 (4C, C₃, C₄, C₅, CH₂ (Bn)), 62.1 (1C, C₆), 59.1 (1C, T ^{α}), 47.6 (1C, C₂), 23.1 (1C, CH₃ (NHAc)), 20.7, 20.6 (3C, 3×CH₃ (OAc)), 18.3 (1C, T ^{γ}).

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cysteinyl-*O*-benzyl-seryl-12-amido-4,7,10-trioxa-decanoyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-benzylester (97)**

(Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-

Thr(α Ac₃GalNAc)-OBn)



Eine Lösung von 40 mg (74.3 μ mol)

Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-COOH (**91**) in 3 ml Dichlormethan/DMF 5:1 wird nacheinander mit 12 mg (78.4 μ mol) HOBt×H₂O, 24 mg (74.7 μ mol) TBTU und 25 μ l (146 μ mol) DIPEA versetzt und fünf Minuten gerührt. Eine Lösung von 85 mg (65.9 μ mol) H-Thr(α Ac₃GalNAc)-OBn (**96**) in 1.5 ml DMF/Dichlormethan 2:1 wird zugegeben und die

Reaktionslösung 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird mit 50 ml Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit je 10 ml 5%iger Citronensäure-, ges. NaHCO₃ und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in 15 ml Dichlormethan gelöst, auf -20 °C gekühlt und mit 50 ml eiskaltem Methanol versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wird abzentrifugiert, in Methanol aufgeschlämmt und nochmals abzentrifugiert. Das Produkt wird i. Vak. getrocknet.

Ausb.: 89 mg (75%); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.55 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1).

C₉₈H₁₆₃N₅O₂₃S (M = 1811.43 g/mol) [1810.15].

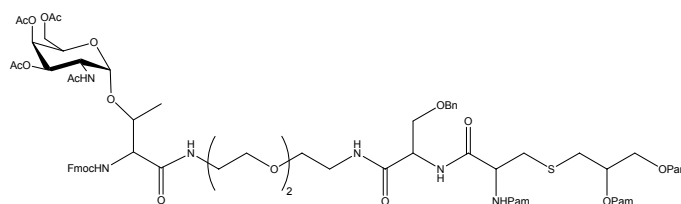
ESI-MS (positiv), m/z: 1834.4 ([M+Na]⁺, ber.: 1834.1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ [ppm]: 7.37-7.22 (m, 11H, H_{ar} (Bn), S^α oder C^α {7.29}), 7.20-7.18 (m, 1H, NH(Thr)), 7.03-7.00 (m, 1H, -CH₂NH-), 6.54-6.50 (bs, 1H, S^α oder C^α), 6.12 (bs, 1H, NH (GalNAc)), 5.35-5.31 (m, 1H, H₄), 5.19-5.10 (m, 3H, CH (Glyceryl) {5.14}, CH₂ (Bn-Ester) {5.13, 5.04}), 5.07-4.99 (m, 1H, H₃), 4.81 (d, 1H, H₁, J_{H₁,H₂} = 3.6 Hz), 4.70 (d, 1H, T^α, J_{T^α,T^β} = 8.8 Hz), 4.60-4.45 (m, 5H, S^α {4.54}, C^α {4.52}, H₂ {4.49}, CH₂ (Bn-Ether) {4.49}), 4.36-3.97 (m, 6H, OCH_{2a} (Glyceryl) {4.30}, T^β {4.20}, H₅ {4.16}, {4.30}, OCH_{2b} (Glyceryl) {4.10}, H_{6a,b} {4.03}), 3.91-3.87 (m, 1H, S^{β_a}), 3.73-3.70 (m, 2H, -COCH₂CH₂-), 3.62-3.49 (m, 11H, S^{β_b} {3.56}, -(CH₂OCH₂)₂CH₂-), 3.44-3.41 (m, 2H, NH-CH₂-), 2.92-2.89 (m, 2H, C^β), 2.74-2.70 (m, 2H, -SCH₂- (Glyceryl)), 2.55-2.51 (m, 2H, -COCH₂-), 2.29-2.25 (m, 4H, 2×αCH₂ (OPam)), 2.21-2.18 (m, 2H, αCH₂ (NHPam)), 2.12, 1.99, 1.94, 1.92 (4xs, 12H, 4×CH₃ (Ac)), 1.55 (bs, 6H, 3×βCH₂ (Pam)), 1.21 (bs, 39H, 3×(CH₂)₁₂ (Pam), T^γ), 0.83 (t, 9H, 3×CH₃ (Pam), J_{CH₃,CH₂} = 7.1 Hz).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, BB, HMQC), δ [ppm]: 173.5, 173.3, 171.8, 170.3 (11C, 11×C=O), 137.5, 134.5 (2C, C_q (2×Bn)), 128.8, 128.6, 128.4, 127.8, 127.6 (12C, C_{ar} (2×Bn)), 99.0 (1C, C₁), 76.7 (1C, T^β), 73.5 (1C, CH₂ (Bn-Ether)), 70.4, 70.3, 69.5, 69.4 (4C, -(CH₂CH₂O)₂-), 70.0 (1C, CH (Glyceryl)), 69.5 (1C, S^β), 68.6 (1C, C₃), 67.7 (1C, CH₂ (Bn-Ester)), 67.5 (1C, C₄), 67.3 (1C, CO-CH₂CH₂-), 67.2 (1C, C₅), 63.5 (1C, OCH₂ (Glyceryl)), 62.4 (1C, C₆), 56.5 (1C, T^α), 53.2 (2C, C^α, S^α), 47.5 (1C, C₂), 39.6 (1C, -CH₂NH-), 36.8 (1C, CO-CH₂-), 36.4, 34.2 (3C, 3×αCH₂ (Pam)), 34.4 (1C, C^β), 32.7 (1C, -SCH₂- (Glyceryl)), 29.7, 29.5, 29.3, 29.1, 20.6 (36C, 3×(CH₂)₁₂ (Pam)), 25.5, 24.8 (3C, 3×βCH₂ (Pam)), 23.2, 20.8, 20.7 (4C, 4×CH₃ (Ac)), 18.4 (1C, T^γ), 14.1 (3C, 3×CH₃ (Pam)).

***N*-[*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonyl], *N*'-[*N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cysteinyl-*O*-benzyl-seryl]-3,6-dioxa-1,8-diamino-octan (**98**)**

(Fmoc-Thr((α Ac₃GalNAc)-{OEG}-Ser(Bn)-CysPam₃))



Eine Lösung von 50 mg (74.6 μ mol)

Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OH (**9**) in 2 ml DMF wird nacheinander mit 14 mg (91.4 μ mol) HOBt \times H₂O, 50 μ l (294.5 μ mol) DIPEA und 28 mg (87.2 μ mol) TBTU versetzt und 10 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Eine Lösung von 110 mg (93.7 μ mol) Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-NH₂ \times TFA in 3 ml Dichlormethan wird mit 17 μ l (100 μ mol) DIPEA versetzt und zur aktivierten Carbonsäure gegeben. Die Reaktionsmischung wird 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt und dann mit 40 ml Dichlormethan verdünnt. Es wird nacheinander mit je 10 ml 5%iger Citronensäure-, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Dichlormethan wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand durch Flashchromatographie (CH₂Cl₂ \rightarrow CH₂Cl₂/MeOH 20:1) gereinigt.

Ausb.: 120 mg (86%); leicht gelblicher Feststoff; R_f = 0.19 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1).

C₉₆H₁₅₈N₆O₂₂S (M = 1780.37 g/mol) [1779.11].

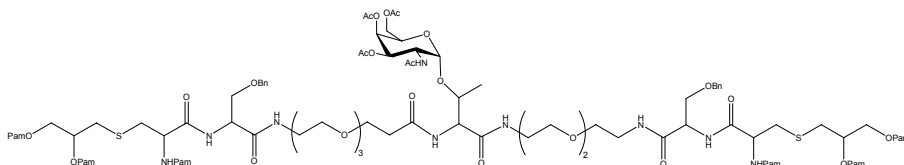
ESI-MS (positiv), *m/z*: 1893.5 ([M+Na]⁺, ber.: 1893.5), 958.2 ([M+2Na]²⁺, ber.: 958.1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ [ppm]: 7.72 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz), 7.60 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.0$ Hz), 7.38-7.31 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.30-7.17 (m, 7H, H2-, H7-Fmoc, H_{ar} (Bn)), 7.50, 7.06 (2 \times bs, 2H, 2 \times -CH₂NH-), 7.30, 6.82, 6.60 (3 \times bs, 3H, 3 \times NH (C, S, T)), 5.95 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{NH,H2} = 7.4$ Hz), 5.38-5.36 (m, 1H, H4), 5.13-5.07 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 5.06 (dd, 1H, H3, $J_{H3,H2} = 10.2$ Hz, $J_{H3,H4} = 2.4$ Hz), 4.89-4.86 (m, 1H, H1), 4.55-4.17 (m, 11H, S ^{α} , C ^{α} {4.53, 4.52}, H2 {4.52}, CH₂ (Bn) {4.46}, T ^{α} {4.35}, CH₂ (Fmoc) {4.33}, OCH_{2a} (Glyceryl) {4.28}, H5 {4.23}, CH (Fmoc) {4.21}), 4.13-4.10 (m, 4H, T ^{β} {4.08}, OCH_{2b} (Glyceryl) {4.07}, H_{6a,b} {4.04}), 3.92-3.88 (m, 1H, S ^{β} _a), 3.61-3.51 (m, 1H, S ^{β} _b), 3.50-3.39 (m, 12H, -CH₂(CH₂OCH₂)₂CH₂-), 2.98-2.79 (m, 2H, C ^{β}), 2.65 (bs, 2H, -SCH₂- (Glyceryl)), 2.25 (t, 4H, 2 \times α CH₂ (OPam), $J_{CH_2CH_2} = 7.0$ Hz), 2.17 (t, 2H, α CH₂ (NHPam), $J_{CH_2CH_2} = 7.0$ Hz), 2.10, 1.99, 1.98, 1.95 (4 \times s, 12H, 4 \times CH₃ (Ac)), 1.60-1.50 (bs, 6H, 3 \times β CH₂ (Pam)), 1.22 (bs, 75H, 3 \times (CH₂)₁₂ (Pam), T ^{γ}), 0.83 (t, 9H, 3 \times CH₃ (Pam), $J_{CH_3,CH_2} = 7.0$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , BB, DEPT), δ [ppm]: 173.4, 173.3, 170.5, 170.3, 169.6, 169.5 (10C, $10\times\text{C}=\text{O}$), 156.8 (1C, $\text{C}=\text{O}$ (Urethan)), 143.7 (2C, C1a-, C8a-Fmoc), 141.2 (2C, C4a-, C5a-Fmoc), 137.4 (1C, C_q (Bn)), 128.4, 127.8, 127.6 (5C, C_{ar} (Bn)), 127.7 (2C, C3, C6-Fmoc), 127.1 (2C, C2-,C7-Fmoc), 125.1 (2C, C1-, C8-Fmoc), 120.0 (2C, C4-, C5-Fmoc), 100.4 (1C, C1), 78.4 (1C, T^β), 73.5 (1C, CH_2 (Bn)), 70.5, 70.4, 69.4, 69.0 (4C, $-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_2-$), 70.1 (1C, CH (Glyceryl)), 69.5 (1C, S^β), 69.1 (1C, C3), 67.6 (1C, CH_2 (Fmoc)), 67.5 (1C, C4), 67.2 (1C, C5), 63.6 (1C, OCH_2 (Glyceryl)), 62.1 (1C, C6), 58.5 (1C, T^α), 53.3 (2C, C^α , S^α), 47.5 (1C, C2), 47.1 (1C, CH (Fmoc)), 39.5 (2C, $2\times\text{CH}_2\text{NH}-$), 36.2, 34.2 (3C, $3\times\alpha\text{CH}_2$ (Pam)), 34.0 (1C, C^β), 33.2 (1C, $-\text{SCH}_2-$ (Glyceryl)), 29.7, 29.3, 29.1, 24.9, 24.8, 22.6, 20.6 (36C, $3\times(\text{CH}_2)_{12}$ (Pam)), 25.0 (3C, $3\times\beta\text{CH}_2$ (Pam)), 23.1, 20.8, 20.7 (4C, $4\times\text{CH}_3$ (Ac)), 18.4 (1C, T^γ), 14.1 (3C, $3\times\text{CH}_3$ (Pam)).

***N*-[*N*-(*N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cysteinyl-*O*-benzyl-seryl-12-amido-4,7,10-trioxa-decanoyl]-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonyl], *N*'-[*N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cysteinyl-*O*-benzyl-seryl]-3,6-dioxa-1,8-diamino-octan (**99**)
(Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-Thr(α Ac₃GalNAc)-{OEG}-Ser(Bn)-CysPam₃)**

Eine Lösung von
25 mg (13.4 μmol)



Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-{OEG}-Ser(Bn)-CysPam₃ (**98**) in 2 ml Dichlormethan wird mit 2 ml Morpholin versetzt und eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Dichlormethan und Morpholin werden i. Vak. abdestilliert und der Rückstand noch viermal mit Toluol kodestilliert. Durch flashchromatographische Reinigung ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1, $R_f = 0.41$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1)) wird das freie Amin erhalten. Es wird ohne Charakterisierung direkt weiter umgesetzt. Dazu werden 20 mg (15.5 μmol) Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-COOH (**91**) in 1.5 ml Dichlormethan/DMF 2:1 gelöst, mit 4 mg (26.1 μmol) HOBt \times H₂O, 9 μl (53.0 μmol) DIPEA und 8 mg (25.0 μmol) TBTU versetzt und 10 Minuten gerührt. Eine Lösung des freienamins in 1 ml Dichlormethan wird zugegeben und weitere 18 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird i. Vak. auf ca. 1 ml eingengt und in 15 ml eiskaltes Methanol getropft. Der Niederschlag wird abfiltriert und durch Flashchromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1) gereinigt.

Ausb.: 46 mg (75 %); farblos, amorpher Feststoff; $R_f = 0.45$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1).

$\text{C}_{161}\text{H}_{283}\text{N}_9\text{O}_{32}\text{S}_2$ ($M = 2921.14$ g/mol) [2919.02].

ESI-MS (positiv), m/z : 2943.4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2943.0), 1483.7 ($[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1483.0).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ [ppm]: 7.31-7.26 (m, 10H, H_{ar} (2×Bn)), 7.13 (bs, 3H, 3×-CH₂NH-), 7.50, 6.83, 6.62 (3×bs, 5H, S^α , C^α , NH(Thr)), 5.36-5.32 (m, 1H, H₄), 5.19-5.01 (m, 3H, CH (Glyceryl) {5.13}, H₃ {5.04}), 4.92-4.88 (m, 1H, H₁), 4.72-4.44 (m, 9H, C^α {4.59}, S^α {4.55}, H₂ {4.52}, CH₂ (Bn) {4.50}), 4.38-4.19 (m, 4H, T^α {4.31}, OCH_{2a} (Glyceryl) {4.29}, H₅ {4.22}), 4.16-3.99 (m, 5H, T^β {4.10}, OCH_{2b} (Glyceryl) {4.10}, H_{6a,b} {4.04}), 3.90-3.86 (m, 2H, 2× S^β_a), 3.73-3.70 (m, 2H, -COCH₂CH₂-), 3.62-3.59 (m, 2H, 2× S^β_b), 3.55-3.43 (m, 9H, -(CH₂OCH₂-)), 3.42-3.40 (m, 6H, 3×NH-CH₂-), 2.92-2.90 (m, 4H, 2× C^β), 2.72-2.70 (m, 4H, 2×-SCH₂- (Glyceryl)), 2.57-2.52 (m, 2H, -COCH₂-), 2.30-2.26 (m, 8H, 4× αCH_2 (OPam)), 2.23-2.20 (m, 5H, 2× αCH_2 (NHPam)), 2.12, 2.03, 1.99, 1.93 (4×s, 12H, 4×CH₃ (Ac)), 1.56 (bs, 12H, 6× βCH_2 (Pam)), 1.22 (bs, 75H, 6×(CH₂)₁₂ (Pam), T^γ), 0.85 (t, 18H, 6×CH₃ (Pam), $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 6.7$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , BB, HMQC), δ [ppm]: 173.5, 170.7, 170.4, 170.3, 166.9 (16C, 16×C=O), 137.6 (2C, C_q (2×Bn)), 128.4, 127.6 (10C, C_{ar} (2×Bn)), 100.3 (1C, C₁), 78.0 (1C, T^β), 73.4 (2C, CH₂ (2×Bn)), 70.4, 70.2, 70.1, 69.6, 69.4 (7C, -(CH₂CH₂O)-), 70.2 (2C, 2×CH (Glyceryl)), 69.5 (2C, 2× S^β), 69.2 (1C, C₃), 67.5 (1C, C₄), 67.3 (1C, C₅), 67.2 (1C, CO-CH₂CH₂-), 63.6 (2C, 2×OCH₂ (Glyceryl)), 62.2 (1C, C₆), 56.9 (1C, T^α), 53.2 (4C, 2× C^α , 2× S^α), 47.6 (1C, C₂), 39.5 (3C, 3×-CH₂NH-), 36.9 (1C, CO-CH₂-), 36.2, 34.3 (6C, 6× αCH_2 (Pam)), 34.3 (2C, 2× C^β), 33.1 (2C, 2×-SCH₂- (Glyceryl)), 29.5, 29.3, 29.2, 25.6, 20.5 (72C, 6×(CH₂)₁₂ (Pam)), 25.1 (6C, 6× βCH_2 (Pam)), 22.9, 20.8, 20.7 (4C, 4×CH₃ (Ac)), 18.6 (1C, T^γ), 14.1 (6C, 6×CH₃ (Pam)).

Versuche zur Schutzgruppenabspaltung:

(1): Eine Lösung von 25 mg (13.8 mmol) Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-Thr($\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$)-OBn (**97**) in 2 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) wird durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit Argon vom Sauerstoff befreit. Es wird eine Spatelspitze Pd/C (10%) zugegeben und nach erneutem Evakuieren wird die Argon-Atmosphäre durch Wasserstoff ersetzt (H_2 -Ballon). Man läßt drei Stunden bei Raumtemp. rühren (Reaktionskontrolle durch DC). Anschließend

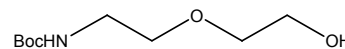
wird der Katalysator über einen Spritzenfilter abfiltriert und das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in 5 ml MeOH/CH₂Cl₂ 3:2 gelöst und tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen Lösung von Natriummethanolat in Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5 erreicht ist. Bereits nach kurzer Zeit zeigt die dünnschichtchromatographische Kontrolle eine Vielzahl von Produkten an. Die massenspektrometrische Analyse der Reaktionsmischung ergibt, dass die Palmitinsäureester größtenteils gespalten wurden. Das gewünschte Produkt (**100**) kann nicht nachgewiesen werden.

(2): Eine Wiederholung der obigen Vorgehensweise bei einem niedrigeren pH-Wert von 8.5 führt ebenfalls schon nach kurzer Zeit zur Spaltung der Palmitinsäureester.

(3): Eine Lösung von 10 mg (3.4 mmol) Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-Thr(α Ac₃GalNAc)-{OEG}-Ser(Bn)-CysPam₃ (**99**) in 2 ml CH₂Cl₂/MeOH (1:1) wird durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit Argon vom Sauerstoff befreit. Es wird eine Spatelspitze Pd/C (10%) zugegeben und nach erneutem Evakuieren wird die Argon-Atmosphäre durch Wasserstoff ersetzt (H₂-Ballon). Man läßt drei Stunden bei Raumtemp. rühren (Reaktionskontrolle durch DC). Anschließend wird der Katalysator über einen Spritzenfilter abfiltriert und das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in 2 ml Toluol gelöst und mit 1 ml einer wässrigen NaOH-Lösung (pH=9.0) versetzt. Das Zweiphasengemisch wird 3 Stunden kräftig gerührt. Die massenspektrometrische Kontrolle des Reaktionsgemischs zeigt erneut die Spaltung der Palmitinsäureester.

(4): Eine Lösung von 10 mg (3.4 mmol) Pam₃Cys-Ser(Bn)-{OEG}-Thr(α Ac₃GalNAc)-{OEG}-Ser(Bn)-CysPam₃ (**99**) in 3 ml CH₂Cl₂/MeOH 1:1 wird durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit Argon vom Sauerstoff befreit. Es wird eine Spatelspitze Pd/C (10%) zugegeben und nach erneutem Evakuieren wird die Argon-Atmosphäre durch Wasserstoff ersetzt (H₂-Ballon). Man läßt drei Stunden bei Raumtemp. rühren (Reaktionskontrolle durch DC). Anschließend wird der Katalysator über einen Spritzenfilter abfiltriert und das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in 2 ml CH₂Cl₂ gelöst und mit 4 ml Methanol versetzt, welches zuvor 8 Wochen über aktiviertem Molsieb (4Å, Kugeln) aufbewahrt wurde. Nach 48-stündigem Rühren bei Raumtemp. ist dünnschichtchromatographisch keinerlei Reaktion erkennbar.

5.6.3 Mitogen-Konjugate durch Thiol-Olefin-Verknüpfung

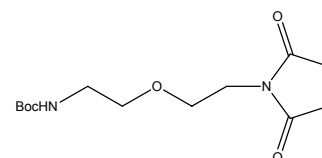
N*-tert-Butyloxycarbonyl-2-(2-hydroxyethoxy)aminoethan (101)*(BocNH-{OEG}-OH)**

Eine Lösung von 2.50 g (23.8 mmol) 2-(2-Aminoethoxy)ethanol in 20 ml Chloroform wird langsam mit 5.20 g (23.8 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc_2O) in 20 ml Chloroform versetzt und 90 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionslösung wird zweimal mit je 15 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird i. Hochvak. getrocknet.

Ausb.: 4.75 g (98%); farbloses, hochviskoses Öl.

$\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}_4$ ($M = 205.25$ g/mol) [205.13].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 3.69 (t, 2H, HO- CH_2 -, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 4.5$ Hz), 3.55-3.48 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$), 3.28 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 5.1$ Hz), 1.40 (s, 9H, CH_3 (*t*Bu)).

N*-tert-Butyloxycarbonyl-2-(2-maleinimidoethoxy)aminoethan (102)*(BocNH-{OEG}-Mal)**

Eine Lösung von 2.30 g (8.77 mmol) Triphenylphosphin in 50 ml

THF wird auf -78 °C gekühlt. Man tropft langsam 1.80 ml (9.08 mmol) Diisopropylazodicarboxylat zu und rührt 10 Minuten. Anschließend werden 2.00 g (9.76 mmol) *N*-tert-Butyloxycarbonyl-2-(2-hydroxyethoxy)aminoethan (**101**) in 1 ml THF zugegeben. Nach fünfminütigem Rühren gibt man eine Lösung von 860 mg (8.86 mmol) Maleinimid und 390 mg (4.42 mmol) Neopentylalkohol in 2 ml THF zu und rührt weitere 5 Minuten. Das Kältebad wird entfernt und die Reaktionsmischung weitere 16 Stunden unter langsamem Aufwärmen auf Raumtemp. gerührt. Die rot-violette Lösung wird i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand in 200 ml Dichlormethan aufgenommen. Es wird mit je 40 ml Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Dichlormethan wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand durch Flashchromatographie (CH/EE 3:1) gereinigt.

Ausb.: 1.25g (50%); leicht gelblicher, amorpher Feststoff; $R_f = 0.51$ (EE/PE 3:1).

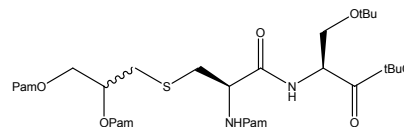
$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$ ($M = 284.31$ g/mol) [284.14].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 6.68 (s, 2H, H (Mal)), 4.82 (bs, 1H, NH), 3.69 (t, 2H,

Mal-CH₂-, J_{CH₂,CH₂} = 5.7 Hz), 3.56 (t, 2H, -CH₂O-, J_{CH₂,CH₂} = 5.4 Hz), 3.46 (t, 2H, -CH₂O-, J_{CH₂,CH₂} = 5.1 Hz), 3.26-3.18 (m, 2H, -CH₂NH-), 1.40 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu)).

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cysteinyl-*O*-*tert*-butyl-serin-*tert*-butylester (103)**

(Pam₃Cys-Ser(*t*Bu)-*Ot*Bu)**



Eine Lösung von 700 mg (0.77 mmol) Pam₃Cys-OH (**88**) in 4 ml Dichlormethan wird mit 125 mg (0.81 mmol) HOBt und 155 mg (0.81 mmol) EDC versetzt. Es wird 25 Minuten bei Raumtemp. gerührt und anschließend eine Lösung von 200 mg (0.79 mmol) *O*-*tert*-Butyl-Serin-*tert*-butylester-hydrochlorid H-Ser(*O**t*Bu)-*O**t*Bu×HCl und 135 µl (0.79 mmol) DIPEA in 1.5 ml DMF zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 20 Stunden bei Raumtemp. gerührt und dann mit 80 ml Dichlormethan verdünnt. Die Lösung wird nacheinander mit je 20 ml 5%iger Zitronensäure-, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in 30 ml Methanol aufgenommen und drei Stunden bei 4 °C aufbewahrt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit kaltem Methanol gewaschen und i. Vak. getrocknet.

Ausb.: 720 mg (84%); farbloser, amorpher Feststoff.

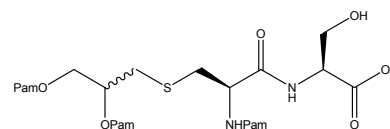
C₆₅H₁₂₄N₂O₉S (M = 1109.75 g/mol) [1108.9].

FD-MS, m/z: 1109.8 (M⁺, ber.:1109.8).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.10-6.98 (m, 1H, NH (Ser)), 6.52-6.41 (m, 1H, NH (Cys)), 5.24-5.07 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.70-4.46 (m, 2H, C^α, S^α), 4.38-4.26 (m, 1H, OCH_{2a} (Glyceryl)), 4.19-4.07 (m, 1H, OCH_{2b} (Glyceryl)), 3.80-3.70 (m, 1H, S^{β_a}), 3.54-3.44 (m, 1H, S^{β_b}), 3.03-2.68 (m, 4H, C^β, SCH₂ (Glyceryl)), 2.36-2.14 (m, 6H, 3×αCH₂ (Pam)), 1.66-1.52 (m, 6H, 3×βCH₂ (Pam)), 1.44 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu-Ester)), 1.23 (bs, 72H, 3×(CH₂)₁₂ (Pam)), 1.12 (s, 9H, CH₃ (*t*Bu-Ether)), 0.85 (t, 9H, 3×CH₃ (Pam), J_{CH₃,CH₂} = 6.7 Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 173.3, 173.2, 173.1, 168.8 (5C, 5×C=O), 81.9 (2C, 2×C_q (*t*Bu)), 70.1, 69.9 (1C, CH (Glyceryl))*, 63.6 (1C, -OCH₂- (Glyceryl)), 61.9 (1C, S^β), 53.6, 53.4 (1C, S^α)*, 52.5, 51.9 (1C, C^α)*, 35.3 (1C, C^β), 36.5, 34.3, 34.1, 32.2, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.1, 25.6, 24.9, 22.7 (42C, 3×(CH₂)₁₄ (Pam)), 33.2 (1C, -SCH₂- (Glyceryl)), 28.0, 27.3 (6C, CH₃ (*t*Bu)), 14.1 (3C, 3×CH₃ (Pam)).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise (*) Signalverdopplung auf.

N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cysteinyl-serin (**104**)²⁴²*(Pam₃Cys-Ser(OH)-OH)**

Eine Lösung von 700 mg (0.63 mmol) Pam₃Cys-Ser(*t*Bu)-*Ot*Bu (**103**) in 0.5 ml Chloroform wird mit 0.3 ml Triisopropylsilan und 10 ml Trifluoressigsäure versetzt und 1.5 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 20 ml Toluol verdünnt, i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit und noch dreimal mit Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in wenig Dichlormethan aufgenommen und mit 30 ml Methanol versetzt. Nach dreistündigem Stehen bei 4 °C wird der Niederschlag abfiltriert, mit kaltem Methanol gewaschen und i. Vak. getrocknet.

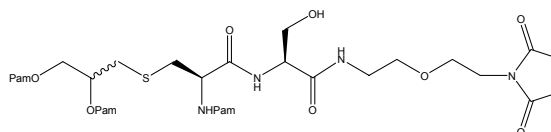
Ausb.: 620 mg (99%); leicht gelblicher, amorpher Feststoff.

C₅₇H₁₀₈N₂O₉S (M = 997.54 g/mol) [996.78].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.72 (bs, 1H, NH (Ser)), 6.94 (bs, 1H, NH (Cys)), 5.70 (bs, 1H, OH), 5.21-5.09 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.85-4.68 (m, 1H, C^α), 4.66-4.56 (m, 1H, S^α), 4.39-4.26 (m, 1H, OCH_{2a} (Glyceryl)), 4.18-4.01 (m, 1H, OCH_{2b} (Glyceryl)), 3.95-3.83 (m, 1H, S^{β_a}), 3.67-3.47 (m, 1H, S^{β_b}), 3.03-2.82 (m, 2H, C^β), 2.80-2.64 (m, 2H, SCH₂ (Glyceryl)), 2.35-2.20 (m, 6H, 3×αCH₂ (Pam)), 1.68-1.49 (m, 6H, 3×βCH₂ (Pam)), 1.23 (bs, 72H, 3×(CH₂)₁₂ (Pam)), 0.85 (t, 9H, 3×CH₃ (Pam)), J_{CH₃,CH₂} = 6.7 Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB, DEPT), δ [ppm]: 174.7, 173.6, 172.4, 172.1, 170.4 (5C, 5×C=O), 70.3, 70.2 (1C, CH (Glyceryl))* , 63.8, 63.7 (1C, -OCH₂- (Glyceryl))* , 62.6 (1C, S^β), 54.7 (1C, S^α), 52.4, 51.9 (1C, C^α)* , 35.3 (1C, C^β), 36.4, 34.3, 34.0, 31.9, 29.7, 29.5, 29.3, 29.1, 25.5, 24.9, 22.7 (42C, 3×(CH₂)₁₄ (Pam)), 32.7, 32.2 (1C, -SCH₂- (Glyceryl))* , 14.1 (3C, 3×CH₃ (Pam)).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise (*) Signalverdupplung auf.

N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cysteinyl-seryl-amido-2-(2-maleinimidooxy)ethan (**105**)*(Pam₃Cys-Ser(OH)-{OEG}-Mal)**

Eine Lösung von 130 mg (0.46 mmol) BocNH-{OEG}-Mal (**102**) in 2 ml Dichlormethan wird auf 0 °C abgekühlt. Man gibt 2 ml Trifluoressigsäure zu und rührt 1.5 Stunden im Eisbad. Die Reaktionslösung wird mit 20 ml Toluol verdünnt. Die Lösungsmittel werden i. Vak.

abdestilliert, der Rückstand dreimal i. Vak. mit Toluol kodestilliert und anschließend i. Hochvak. getrocknet. Eine Lösung von 300 mg (0.30 mmol) Pam₃Cys-Ser(OH)-OH (**104**) in 6 ml Dichlormethan/DMF 2:1 wird nacheinander mit 56 mg (0.36 mmol) HOBt, 122 µl (0.71 mmol) DIPEA und 116 mg (0.36 mmol) TBTU versetzt und 10 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird eine Lösung des vorher dargestellten freien Amins und 180 µl (1.05 mmol) DIPEA in 1 ml DMF zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 18 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Das Dichlormethan wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand mit 20 ml kaltem Acetonitril versetzt. Nach vierstündigem Stehen bei -20 °C wird der Niederschlag abfiltriert und mit eiskaltem Acetonitril gewaschen. Die weitere Reinigung des Produktes erfolgt durch Flashchromatographie (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂/MeOH 20:1).

Ausb.: 234 mg (67%); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.23$ (CH₂Cl₂/MeOH 20:1).

C₆₅H₁₁₈N₄O₁₁S (M = 1163.72 g/mol) [1162.85].

ESI-MS (positiv), m/z: 1185.9 ([M+Na]⁺, ber.: 1885.8).

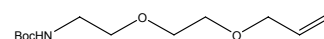
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.52-7.39 (m, 1H, NH (Ser)), 7.08-6.90 (bs, 1H, NH (Cys)), 6.72 (s, 2H, H (Mal)), 6.66-6.55 (m, 1H, NH-CH₂-), 5.22-5.06 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.68-4.53 (m, 1H, C^α), 4.51-4.42 (m, 1H, S^α), 4.38-4.24 (m, 1H, OCH_{2a} (Glyceryl)), 4.16-3.96 (m, 2H, OCH_{2b} (Glyceryl), S^β_a), 3.76-3.62 (m, 3H, S^β_b, Mal-CH₂-), 3.62-3.38 (m, 4H, -CH₂OCH₂), 3.36-3.22 (m, 2H, -CH₂NH-), 3.00-2.87 (m, 2H, C^β), 2.78-2.66 (m, 2H, SCH₂ (Glyceryl)), 2.34-2.16 (m, 6H, 3×αCH₂ (Pam)), 1.66-1.47 (m, 6H, 3×βCH₂ (Pam)), 1.22 (bs, 72H, 3×(CH₂)₁₂ (Pam)), 0.84 (t, 9H, 3×CH₃ (Pam), J_{CH₃,CH₂} = 6.7 Hz).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB, DEPT), δ [ppm]: 171.0, 170.7, 170.2, 170.1 (7C, 7×C=O), 134.2 (2C, -C=C-), 70.2 (1C, CH (Glyceryl)), 68.9, 68.0 (2C, -CH₂OCH₂-), 63.7, 63.6 (1C, -OCH₂- (Glyceryl))* , 62.6 (1C, S^β), 54.5 (1C, S^α), 52.9, 52.4 (1C, C^α)* , 39.3, 37.3 (2C, 2×N-CH₂-), 36.3 (1C, C^β), 36.4, 34.3, 34.0, 29.7, 29.3, 25.5, 24.9, 24.8, 22.7 (42C, 3×(CH₂)₁₄ (Pam)), 31.9 (1C, -SCH₂- (Glyceryl)), 14.1 (3C, 3×CH₃ (Pam)).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise (*) Signalverdopplung auf.

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-2-(2-allyloxyethoxy)aminoethan (**106**)**

(BocNH-{OEG}-CH₂CH=CH₂)



Eine Lösung von 2.0 g (9.8 mmol) BocNH-{OEG}-OH (**101**) in 10 ml DMF wird auf 0 °C

abgekühlt und portionsweise mit 1.5 g Natriumhydrid (60%ige Dispersion in Mineralöl, 37.5 mmol) versetzt. Nach Abklingen der Gasentwicklung wird noch 20 Minuten gerührt. Man gibt langsam 3.3 ml (38.1 mmol) Allylbromid zu und rührt die Mischung unter langsamem Aufwärmen auf Raumtemp. noch 20 Stunden. Die Reaktionslösung wird mit 150 ml Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit 3×30 ml Wasser und 30 ml ges. NaCl-Lösung. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird durch Flashchromatographie (CH/EE 1:1) gereinigt. *Ausb.*: 1.30 g (54%); leicht gelbliches Öl; $R_f = 0.61$ (EE/PE 3:1).

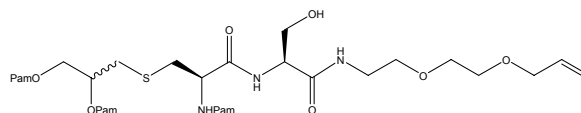
$C_{12}H_{23}NO_4$ (M = 245.32 g/mol) [245.16].

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 5.95-5.80 (m, 1H, =CH-), 5.28-5.10 (m, 2H, =CH₂), 5.10-4.94 (m, 1H, NH), 3.98 (ddd, 1H, H₂C=CH-CH₂-, $J_{CH_2,CH} = 5.7$ Hz, $J_{CH_2,=CH_2a} = 2.9$ Hz, $J_{CH_2,=CH_2b} = 1.6$ Hz), 3.61-3.45 (m, 6H, CH₂OCH₂CH₂), 3.31-3.23 (m, 2H, N-CH₂).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$, BB), δ [ppm]: 155.9 (1C, C=O (Urethan)), 134.6 (1C, =CH-), 117.2 (1C, =CH₂), 79.0 (1C, C_q (tBu)), 72.2 (1C, H₂C=CH-CH₂-), 70.2, 69.7, 69.3 (3C, CH₂OCH₂CH₂), 40.3 (1C, N-CH₂), 28.3 (3C, CH₃ (tBu)).

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-(*R*)-cysteinyl-seryl-amido-2-(allyloxyethoxy)-ethan (107)**

Pam₃Cys-Ser(OH)-{OEG}-CH₂CH=CH₂



Eine Lösung von 244 mg (1.00 mmol) BocNH-{OEG}-CH₂CH=CH₂ (**106**) in 2 ml Chloroform wird mit 2 ml Trifluoressigsäure versetzt und 45 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 15 ml Toluol verdünnt und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Anschließend wird dreimal i. Vak. mit Toluol kodestilliert und dann i. Hochvak. getrocknet. Eine Lösung von 500 mg (0.50 mmol) (Pam₃Cys-Ser(OH)-OH) (**104**) in 7 ml Chloroform/DMF 5:2 wird nacheinander mit 80 mg (0.52 mmol) HOBt, 165 mg (0.51 mmol) TBTU sowie 175 μ l (1.03 mmol) DIPEA versetzt und 5 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird eine Lösung des vorher dargestellten freien Amins und 180 μ l (1.06 mmol) DIPEA in 2 ml Dichlormethan zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 16 Stunden bei Raumtemp. gerührt und dann mit 50 ml Dichlormethan verdünnt. Es wird nacheinander mit je 2×20 ml 5%iger Zitronensäure-, ges. NaHCO₃- sowie ges. NaCl-Lösung

gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 30:1) gereinigt.

Ausb.: 394 mg (70%); leicht gelblicher, amorpher Feststoff; $R_f = 0.12$ (CH₂Cl₂/MeOH 20:1). C₆₄H₁₂₁N₃O₁₀S (M = 1124.72 g/mol) [1123.88].

ESI-MS (positiv), m/z : 1146.9 ([M+Na]⁺, ber.: 1146.9).

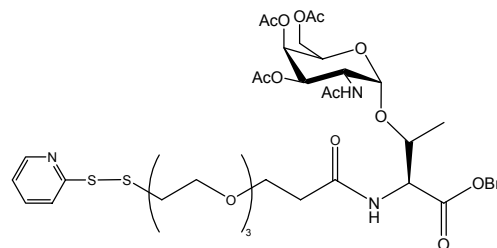
¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, BB), δ [ppm]: 155.9 (1C, C=O (Urethan)), 134.6 (1C, =CH-), 117.2 (1C, =CH₂), 79.0 (1C, C_q (*t*Bu)), 72.2 (1C, H₂C=CH-CH₂-), 70.2, 69.7, 69.3 (3C, CH₂OCH₂CH₂), 40.3 (1C, N-CH₂), 28.3 (3C, CH₃ (*t*Bu)).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ [ppm]: 7.45-7.30 (m, 1H, NH (Ser)), 7.11-6.90 (bs, 1H, NH (Cys)), 6.67-6.49 (m, 1H, NH--CH₂-), 5.94-5.82 (m, 1H, H₂C=CH-), 5.30-5.14 (m, 2H, H₂C=CH-), 5.13-5.05 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.64-4.48 (m, 1H, C ^{α}), 4.46-4.38 (m, 1H, S ^{α}), 4.37-4.25 (m, 1H, OCH_{2a} (Glyceryl)), 4.15-3.96 (m, 4H, OCH_{2b} (Glyceryl), S ^{β} _a, H₂C=CH-CH₂-), 3.76-3.72 (m, 1H, S ^{β} _b), 3.69-3.50 (m, 6H, CH₂OCH₂CH₂), 3.47-3.39 (m, 2H, -CH₂NH-), 2.98-2.87 (m, 2H, C ^{β}), 2.78-2.67 (m, 2H, SCH₂ (Glyceryl)), 2.34-2.25 (m, 4H, 2 \times α CH₂ (OPam)), 2.24-2.18 (m, 2H, α CH₂ (NHPam)), 1.65-1.52 (m, 6H, 3 \times β CH₂ (Pam)), 1.22 (bs, 72H, 3 \times (CH₂)₁₂ (Pam)), 0.85 (t, 9H, 3 \times CH₃ (Pam), $J_{\text{CH}_3, \text{CH}_2} = 6.8$ Hz).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, BB, HMQC), δ [ppm]: 173.8, 173.4, 170.5, 170.2 (5C, 5 \times C=O), 134.4 (1C, =CH-), 117.6 (1C, =CH₂), 72.2 (1C, H₂C=CH-CH₂-), 70.2, 70.1, 69.3 (4C, CH₂OCH₂CH₂, CH (Glyceryl)), 63.7, 63.5 (1C, -OCH₂- (Glyceryl))* , 62.6, 62.5 (1C, S ^{β})* , 54.6, 54.5 (1C, S ^{α})* , 52.9, 52.4 (1C, C ^{α})* , 49.2, 38.6 (1C, N-CH₂)* , 36.3, 36.2 (1C, C ^{β})* , 36.4, 34.3, 34.1, 29.7, 29.3, 29.1, 25.5, 24.9, 24.8 (42C, 3 \times (CH₂)₁₄ (Pam)), 31.9 (1C, -SCH₂- (Glyceryl)), 14.1 (3C, 3 \times CH₃ (Pam)).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise (*) Signalverdopplung auf.

***N*-{12-[2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl]-4,7,10-trioxa-dodecanoyl}-*O*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-benzylester (108)**
(Pyridyl-S-S-{OEG}-Thr(α Ac₃GalNAc)-OBn)



Eine Lösung von 63 mg (0.20 mmol) 12-(2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)-4,7,10-trioxa-dodecansäure (**44**) in 5 ml DMF wird nacheinander mit 32 mg (0.21 mmol) HOBt \times H₂O, 68 μ l (0.40 mmol) DIPEA und 65 mg (0.20 mmol) TBTU versetzt

und 10 Minuten gerührt. Die Lösung des Aktivesters wird zu 105 mg (0.20 mmol) H-Thr(α Ac₃GalNAc)-OBn (**96**) in 5 ml DMF gegeben und 18 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Das DMF wird i. Vak abdestilliert, der Rückstand in 50 ml Ethylacetat aufgenommen und nacheinander mit je 10 ml 5%iger Citronensäure-, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂/MeOH 10:1) gereinigt.

Ausb.: 150 mg (86%); leicht gelbliches, hochviskoses Öl; R_f = 0.37 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1).

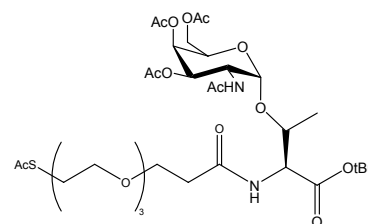
C₃₉H₅₃N₃O₁₅S₂ (M = 867.98 g/mol) [867.29].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 8.49 (d, 1H, H₆ (Pyr), J_{H₆,H₅} = 4.5 Hz), 7.81 (d, 1H, H₃ (Pyr), J_{H₃,H₄} = 8.0 Hz), 7.71 (ddd, 1H, H₄ (Pyr), J_{H₄,H₃} = 8.0 Hz, J_{H₄,H₅} = 7.8 Hz, J_{H₄,H₆} = 1.6 Hz), 7.38-7.26 (m, 5H, H_{ar} (Bn)), 7.21-7.10 (m, 1H, H₅ (Pyr)), 6.09 (d, 1H, NH (Thr), J_{NH,T α} = 9.1 Hz), 5.73 (d, 1H, NH (GalNAc), J_{NH,H₂} = 9.8 Hz), 5.33 (d, 1H, H₄, J_{H₄,H₃} = 3.0 Hz), 5.15 (d, 1H, CH_{2a} (Bn), J_{a,b} = 11.9 Hz), 5.07-5.04 (m, 1H, H₃), 5.04 (d, 1H, CH_{2b} (Bn), J_{a,b} = 12.0 Hz), 4.81 (d, 1H, H₁, J_{H₁,H₂} = 3.7 Hz), 4.71 (dd, 1H, T ^{α} , J_{T α ,NH} = 9.0 Hz, J_{T α ,T β} = 2.4 Hz), 4.50 (ddd, 1H, H₂, J_{H₂,H₃} = 11.3 Hz, J_{H₂,NH} = 9.7 Hz, J_{H₂,H₁} = 3.7 Hz), 4.24-4.12 (m, 2H, H₅, T ^{β}), 4.06-4.00 (m, 2H, H_{6a,b}), 3.79-3.53 (m, 12H, (CH₂CH₂O)₃), 2.98 (t, 2H, -CH₂CH₂CO, H_{CH₂,CH₂} = 6.3 Hz), 2.59 (t, 2H, -CH₂CO, H_{CH₂,CH₂} = 5.9 Hz), 2.14, 1.99, 1.95, 1.93 (4×s, 12H, 4×CH₃ (Ac)), 1.24 (d, 3H, T ^{γ} , J_{T γ ,T β} = 6.5 Hz).

***N*-(12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecanoyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester**

(109)

(AcS-{OEG}-Thr(Ac₃GalNAc)-OtBu)



Eine Lösung von 150 mg (0.21 mmol) (**18**) in 2 ml DMF wird mit 2 ml Morpholin versetzt und 2 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Die Lösungsmittel werden i. Vak. abdestilliert, der Rückstand noch viermal mit Toluol kodestilliert und i. Hochvak. getrocknet. Eine Lösung von 75 mg (0.27 mmol) (**42**) in 2 ml DMF wird nacheinander mit 55 mg (0.36 mmol) HOBt, 120 μ l (0.71 mmol) DIPEA und 110 mg (0.34 mmol) TBTU versetzt und 10 Minuten bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird eine Lösung des freien Amins in 6 ml DMF/Dichlormethan (1:1) zugegeben 16 Stunden gerührt.

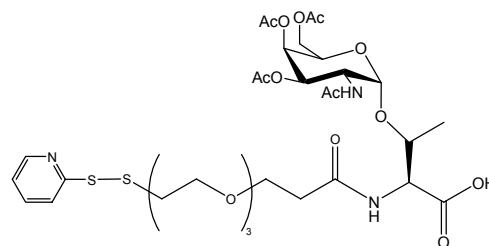
Die Reaktionsmischung wird mit 50 ml Ethylacetat verdünnt, mit je 10 ml ges. NaHCO₃-, 5%iger Zitronensäure- und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Produktes erfolgt durch Flashchromatographie (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂/MeOH 10:1).

Ausb.: 115 mg (73%); gelbliches Öl; R_f = 0.43 (CH₂Cl₂/MeOH 10:1); R_f = 0.08 (EE/AcOH 100:1).

C₃₃H₅₄N₂O₁₆S (M = 766.85 g/mol) [766.32].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 6.98 (d, 1H, NH (Thr), J_{NH,Tα} = 9.9 Hz), 6.17 (d, 1H, NH (GalNAc), J_{NH,H2} = 9.8 Hz), 5.33 (d, 1H, H4, J_{H4,H3} = 3.0 Hz), 5.03 (dd, 1H, H3, J_{H3,2} = 11.4 Hz, J_{H3,4} = 3.2 Hz), 4.87 (d, 1H, H1, J_{H1,H2} = 3.7 Hz), 4.71 (dd, 1H, T^α, J_{Tα,NH} = 9.0 Hz, J_{Tα,Tβ} = 2.4 Hz), 4.58 (ddd, 1H, H2, J_{H2,H3} = 11.4 Hz, J_{H2,NH} = 9.7 Hz, J_{H2,H1} = 3.7 Hz), 4.54-4.49 (m, 1H, H5), 4.22-4.01 (m, 4H, T^α, T^β, H_{6a,b}), 3.77 (t, 2H, -CH₂CH₂CO, H_{CH₂,CH₂} = 5.8 Hz), 3.66-3.52 (m, 10H, -(CH₂CH₂O)₂CH₂-), 3.04 (t, 2H, -S-CH₂-, J_{CH₂,CH₂} = 6.5 Hz), 2.54 (t, 2H, -CH₂CO, J_{CH₂,CH₂} = 5.9 Hz), 2.30 (s, 3H, CH₃ (SAc)), 2.11, 2.00, 1.97, 1.93 (4×s, 12H, 4×CH₃ (Ac)), 1.42 (s, 9H, CH₃ (tBu)), 1.17 (d, 3H, T^γ, J_{Tγ,Tβ} = 6.1 Hz).

***N*-{12-[2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl]-4,7,10-trioxa-dodecanoyl}-*O*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin
(Pyridyl-S-S-{OEG}-Thr(α Ac₃GalNAc)-OH)**

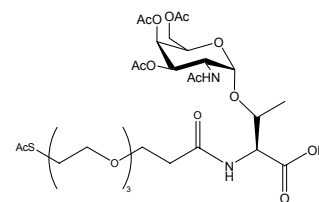


Eine Lösung von 70 mg Thiopyridyl-{OEG}-

Thr(T_N)-OBn (81 μmol) (**108**) in 3 ml Methanol wird mit einer Spatelspitze Pd auf Aktivkohle (10%Pd) versehen. Durch wiederholtes Evakuieren und Spülen mit Argon wird die Suspension vom Sauerstoff befreit. Das Argon wird durch Wasserstoff ersetzt (H₂-Ballon) und die Lösung 6 Stunden bei Raumtemp. gerührt. Dünnschichtchromatographische Kontrolle sowie massenspektroskopische Analyse zeigen, dass die Disulfidbindung teilweise schon vor dem Benzylester gespalten wird.

***N*-(12-Acetylsulfanyl-4,7,10-trioxa-dodecanoyl)-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (110)**

(AcS-{OEG}-Thr(α Ac₃GalNAc)-OH)



Man löst 125 mg (0.163 mmol) AcS-{OEG}-Thr(Ac₃GalNAc)-

OtBu (**109**) in 3 ml Trifluoressigsäure und rührt die Lösung bei Raumtemp. eine Stunde. Die Reaktionsmischung wird mit 15 ml Toluol verdünnt und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand wird dreimal i. Vak. mit Toluol kodestilliert und anschließend durch Flashchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 10:1) gereinigt.

Ausb.: 115 mg (quant.); leicht gelblicher, amorpher Feststoff; R_f = 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH 2.5:1); R_t = 15.6 Min. (Luna C18, A/B (95:5) → (0:100) in 30 Min., λ = 235 nm).

C₂₉H₄₆N₂O₁₆S (M = 710.74 g/mol) [710.26].

ESI-MS (negativ), m/z : 709.1 ([M-H]⁻, ber.: 709.2).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.18 (d, 1H, NH (Thr), $J_{\text{NH},\text{T}\alpha}$ = 8.4 Hz), 6.51 (d, 1H, NH (GalNAc), $J_{\text{NH},\text{H}2}$ = 8.9 Hz), 5.34 (d, 1H, H4, $J_{\text{H}4,\text{H}3}$ = 2.7 Hz), 5.08 (d, 1H, H1, $J_{\text{H}1,\text{H}2}$ = 3.0 Hz), 5.03 (dd, 1H, H3, $J_{\text{H}3,4}$ = 3.6 Hz), 4.66 (dd, 1H, H2, $J_{\text{H}2,\text{NH}}$ = 8.8 Hz, $J_{\text{H}2,\text{H}1}$ = 2.3 Hz), 4.51-4.02 (m, 5H, T ^{α} , T ^{β} , H5, H6_{a,b}), 3.83-3.73 (m, 2H, -CH₂CH₂CO), 3.69-3.52 (m, 10H, -(CH₂CH₂O)₂CH₂-), 3.06 (t, 2H, -S-CH₂-, $J_{\text{CH}2,\text{CH}2}$ = 6.6 Hz), 2.62-2.55 (m, 2H, -CH₂CO), 2.31 (s, 3H, CH₃ (SAc)), 2.13, 2.04, 2.01, 1.95 (4 \times s, 12H, 4 \times CH₃ (Ac)), 1.27 und 1.19 (d, 3H, T ^{γ} , $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta}$ = 6.4 Hz (Konformere)).

Konjugation des T_N-Bausteins mit dem Mitogenbaustein (105)

(Pam₃Cys-Ser(OH)-{OEG}-Mal-S-Thr(T_N)) (111)

Eine Lösung von 20 mg (28 μ mol) AcS-{OEG}-Thr(T_N)-OH (**110**) in 5 ml entgastem Methanol wird tropfenweise mit einer 1%igen Lösung von Natriummethanolat in entgastem Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5-10 erreicht ist. Die Lösung wird unter Argon 90 Minuten bei Raumtemp. gerührt und dann durch Zugabe von Kationenaustauscher (IR-120, stark sauer) neutralisiert. Die Lösung des deblockierten Glycosylaminosäurebausteins wird vom Austauscher abfiltriert und zu 20 mg (17 μ mol) Pam₃Cys-Ser(OH)-{OEG}-Mal (**105**) in 2 ml entgastem Dichlormethan gegeben. Die Reaktionsmischung wird 24 Stunden

unter Argon gerührt und dann i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5:2 $\rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 5:4:1) gereinigt. *Ausb.*: 25 mg (85%); farbloser amorpher Feststoff; $R_f = 0.79$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 5:4:1). $\text{C}_{86}\text{H}_{156}\text{N}_6\text{O}_{23}\text{S}_2$ ($M = 1706.32$ g/mol) [1705.07].

ESI-MS (positiv), m/z : 1728.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1728.1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$, COSY), δ [ppm]: 5.12-5.00 (m, 1H, CH (Glyceryl)), 4.82 (d, 1H, H1, $J_{\text{H1},\text{H2}} = 3.5$ Hz), 4.57-4.53 (m, 1H, T^α), 4.52-4.40 (m, 1H, C^α), 4.37-4.30 (m, 1H, S^α), 4.29-4.20 (m, 2H, OCH_{2a} (Glyceryl) {4.25}, T^β {4.22}), 4.11 (dd, 1H, H2, $J_{\text{H2},\text{H3}} = 10.8$ Hz, $J_{\text{H2},\text{H1}} = 3.5$ Hz), 4.08-4.00 (m, 1H, OCH_{2b} (Glyceryl)), 3.96-3.87 (m, 1H, H3), 3.87-3.37 (m, 26H, S^β_a {3.82}, H5 {3.75}, S^β_b {3.67}, H6a {3.67}, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ {3.64}, $2 \times \text{N-CH}_2$ {3.61}, Mal-CH {3.53}, H6b {3.51}, CH_2O), 3.36-3.10 (m, 1H, Mal- CH_{2a} {3.31}, H4 {3.27}, Mal- CH_{2b} {3.22}), 3.09-2.99 (m, 1H, $-\text{SCH}_{2a}$), 2.96-2.86 (m, 1H, C^β_a), 2.84-2.73 (m, 2H, C^β_b {2.78}, $-\text{SCH}_{2b}$ {2.77}), 2.69-2.62 (m, 2H, SCH_2 (Glyceryl)), 2.48 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{CO}$, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 5.9$ Hz), 2.27-2.11 (m, 6H, $2 \times \alpha\text{CH}_2$ (OPam) {2.21}, αCH_2 (NHPam) {2.14}), 1.93 (s, 3H, CH_3 (NHAc)), 1.56-1.44 (m, 6H, $3 \times \beta\text{CH}_2$ (Pam)), 1.15 (bs, 75H, $3 \times (\text{CH}_2)_{12}$ (Pam), T^γ), 0.77 (t, 9H, $3 \times \text{CH}_3$ (Pam), $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 6.8$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , BB, DEPT), δ [ppm]: 173.7, 172.2, 172.1 (10C, $10 \times \text{C}=\text{O}$), 99.4 (1C, C1), 81.0 (1C, Mal-CH), 76.0 (1C, T^β), 70.5 (1C, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 70.4 (1C, C5), 70.3, 70.2, 68.9 (7C, $7 \times \text{CH}_2\text{O}$), 70.0 (1C, CH (Glyceryl)), 69.3 (1C, C3), 67.3 (1C, C6), 63.7 (1C, $-\text{OCH}_2-$ (Glyceryl)), 61.9 (1C, S^β), 56.0 (1C, T^α), 55.1 (1C, S^α), 52.6 (1C, C^α), 50.1 (1C, C2), 49.2 (1C, C4), 39.6 (2C, $2 \times \text{N-CH}_2-$), 39.3 (1C, Mal-S- CH_2), 36.6 (1C, $-\text{CH}_2\text{CO}$), 36.2 (1C, αCH_2 (NPam)), 34.2 (2C, $2 \times \alpha\text{CH}_2$ (OPam)), 34.0 (1C, C^β), 32.4 (1C, $-\text{SCH}_2-$ (Glyceryl)), 31.1 (1C, Mal- CH_2), 29.6, 29.4, 25.5, 25.0, 22.7 (39C, $3 \times (\text{CH}_2)_{13}$ (Pam)), 22.6 (1C, CH_3 (NHAc)), 18.3 (1C, T^γ), 14.1 (3C, $3 \times \text{CH}_3$ (Pam)).

Konjugation des Muc4(T_N)-Glycopeptids mit dem Mitogenbaustein (105)

(Pam₃Cys-Ser(OH)-{OEG}-Mal-S-Muc4(T_N)) (112)

Eine Lösung von 5 mg (2.5 μmol) HS-{OEG}-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-Thr(αGalNAc)-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp-OH (**50**) in einer Mischung aus 2 ml Methanol und 1 ml Chloroform wird mit 2 mg (1.7 μmol) Pam₃Cys-Ser(OH)-{OEG}-Mal (**105**) in 2 ml Chloroform / 1 ml Methanol (alle Lösungsmittel entgast) versetzt und unter Argon 40 Stunden

gerührt. Die Reaktionsmischung wird i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Durch Waschen des Rückstandes mit Wasser lassen sich Reste des Thiols größtenteils entfernen.

Ausb.: 4 mg (max. 75%); farbloser amorpher Feststoff.

$C_{146}H_{251}N_{23}O_{46}S_2$ (M = 3128.81 g/mol) [3126.75].

ESI-MS (positiv), m/z: 1619.0 ($[M+2MeOH+2Na]^{2+}$, ber.: 1618.9).

MALDI-MS (positiv), m/z: 3151.1 ($[M+Na]^+$, ber.: 3150.7), 3129.7 ($[M+H]^+$, ber.: 3128.8).

Konjugation des Muc4(T_N)-Glycopeptids mit dem Mitogenbaustein (107)

(Pam₃Cys-Ser(OH)-{OEG}-S-Muc4(T_N)) (113)

Eine Lösung von 16 mg (8.1 μmol) HS-{OEG}-Thr-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Gly-His-Ala-Thr(αGalNAc)-Pro-Leu-Pro-Val-Thr-Asp-OH (**50**) in einer Mischung aus 2 ml Methanol und 1 ml Chloroform wird mit 4 mg (3.6 μmol) Pam₃Cys-Ser(OH)-{OEG}-CH=CH₂ (**107**) in 2 ml Chloroform / 1 ml Methanol (alle Lösungsmittel entgast) versetzt und unter Argon 8 Stunden mit UV-Licht bestrahlt. Die Reaktionsmischung wird i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Durch Waschen des Rückstandes mit Wasser lassen sich Reste des Thiols größtenteils entfernen.

Ausb.: 9 mg (max. 80 %); leicht gelblicher amorpher Feststoff.

$C_{145}H_{254}N_{22}O_{45}S_2$ (M = 3089.82 g/mol) [3087.77].

MALDI-MS (positiv), m/z: 3127.3 ($[M+K]^+$, ber.: 3127.7).

6 Literaturverzeichnis

- [1] A. Ribas, L. H. Butterfield, J. A. Glaspy, J. S. Economou, *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 2415-2432.
- [2] J. N. Blattman, P. D. Greenberg, *Science* **2004**, *305*, 200-205.
- [3] J. A. Berzofsky, M. Terabe, S. Oh, I. M. Belyakov, J. D. Ahlers, J. E. Janik, J. C. Morris, *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1515-1525.
- [4] I. Espinoza-Delgado, *Oncologist* **2002**, *7 Suppl 3*, 20-33.
- [5] E. Jager, D. Jager, A. Knuth, *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 817-820.
- [6] Z. Yu, N. P. Restifo, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 289-294.
- [7] P. Moingeon, *Vaccine* **2001**, *19*, 1305-1326.
- [8] <http://www.krebsinformation.de/>.
- [9] M. S. Mitchell, *Int. J. Immunopharmacol.* **2003**, *3*, 1051-1059.
- [10] S. Hakomori, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 2405-2414.
- [11] I. Brockhausen, *Bba-Gen Subjects* **1999**, *1473*, 67-95.
- [12] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 836-863.
- [13] S. Muller, S. Goletz, N. Packer, A. Gooley, A. M. Lawson, F. G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24780-24793.
- [14] I. Brockhausen *The biosynthesis of O-glycosylprotein*; Elsevier: Amsterdam, 1996; Vol. 29a.
- [15] P. van den Steen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, G. Opdenakker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33*, 151-208.
- [16] E. F. Hounsell, M. J. Davies, D. V. Renouf, *Glycoconj. J.* **1996**, *13*, 19-26.
- [17] F. G. Hanisch, G. Uhlenbruck, J. Peter-Katalinic, H. Egge, J. Dabrowski, U. Dabrowski, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 872-883.
- [18] F. G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbruck, *Glycoconj. J.* **1990**, *7*, 525-543.
- [19] F.-G. Hanisch, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 143-149.
- [20] I. Brockhausen, J.-M. Yang, J. Bruchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607-617.
- [21] I. Brockhausen, J. Yang, N. Dickinson, S. Ogata, S. H. Itzkowitz, *Glycoconj. J.* **1998**, *15*, 595-603.
- [22] G. F. Springer, *Science* **1984**, *224*, 1198-1206.
- [23] C. Whitehouse, J. Burchell, S. Gschmeissner, I. Brockhausen, K. O. Lloyd, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Cell Biol.* **1997**, *137*, 1229-1241.
- [24] F. Dall'Olio, M. Chiricolo, *Glycoconj. J.* **2001**, *18*, 841-850.
- [25] Y. Ikehara, N. Kojima, N. Kurosawa, T. Kudo, M. Kono, S. Nishihara, S. Issiki, K. Morozumi, S. Itzkowitz, T. Tsuda, S. I. Nishimura, S. Tsuji, H. Narimatsu, *Glycobiology* **1999**, *9*, 1213-1224.
- [26] S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 197-204.
- [27] I. Takahashi, Y. Maehara, T. Kusumoto, M. Yoshida, Y. Kakeji, H. Kusumoto, M. Furusawa, K. Sugimachi, *Cancer* **1993**, *72*, 1836-1840.
- [28] F.-G. Hanisch, T. R. E. Stadie, F. Deutzmann, J. Peter-Katalinic, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236*, 318-327.
- [29] M. Fukuda, S. R. Carlsson, J. C. Klock, A. Dell, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 12796-12806.
- [30] M. Fukuda, S. Tsuboi, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 205-217.
- [31] D. Baeckstrom, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11503-11509.
- [32] S. Muller, F. G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26103-26112.
- [33] P. Roussel, G. Lamblin *Glycoproteins and Disease*; Elsevier: Amsterdam, 1996; Vol. 30.
- [34] J. R. Gum, Jr., *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 795-799.
- [35] I. Carlstedt, J. R. Davies, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 214-219.
- [36] T. Feizi, *Nature* **1985**, *314*, 53-57.
- [37] P. L. Nguyen, G. A. Niehans, D. L. Cherwitz, Y. S. Kim, S. B. Ho, *Tumour Biol.* **1996**, *17*, 176-192.

- [38] S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, E. N. Lalani, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15286-15293.
- [39] J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 301-313.
- [40] S. von Mensdorff-Pouilly, F. G. Snijdwint, A. A. Verstraeten, R. H. Verheijen, P. Kenemans, *Int. J. Biol. Markers* **2000**, *15*, 343-356.
- [41] F. G. Hanisch, S. Muller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439-449.
- [42] S. J. Gendler, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, *6*, 339-353.
- [43] J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, T. Plunkett, R. Graham, I. Correa, D. Miles, M. Smith, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2002**, *7*, 209-221.
- [44] A. M. Vlad, J. C. Kettel, N. M. Alajez, C. A. Carlos, O. J. Finn, *Adv. Immun.* **2004**, *82*, 249-293.
- [45] D. M. Swallow, S. Gendler, B. Griffiths, G. Corney, J. Taylor-Papadimitriou, M. E. Bramwell, *Nature* **1987**, *328*, 82-84.
- [46] J. Hilkens, M. J. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 359-363.
- [47] M. E. Bramwell, G. Wiseman, D. M. Shotton, *J. Cell Sci.* **1986**, *86*, 249-261.
- [48] C. Brocke, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2003**.
- [49] N. Porchet, V. C. Nguyen, J. Dufosse, J. P. Audie, V. Guyonnet-Duperat, M. S. Gross, C. Denis, P. Degand, A. Bernheim, J. P. Aubert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *175*, 414-422.
- [50] A. Girling, J. Bartkova, J. Burchell, S. Gendler, C. Gillett, J. Taylor-Papadimitriou, *Int. J. Cancer* **1989**, *43*, 1072-1076.
- [51] R. Lev, *Lab. Invest.* **1965**, *14*, 2080-2100.
- [52] P. B. Hukill, R. A. Vidone, *Lab. Invest.* **1965**, *14*, 1624-1635.
- [53] K. R. Jerome, D. L. Barnd, K. M. Bendt, C. M. Boyer, J. Taylor-Papadimitriou, I. F. McKenzie, R. C. Bast, Jr., O. J. Finn, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2908-2916.
- [54] K. R. Jerome, N. Domenech, O. J. Finn, *J. Immunol.* **1993**, *151*, 1654-1662.
- [55] C. G. Ioannides, B. Fisk, K. R. Jerome, T. Irimura, J. T. Wharton, O. J. Finn, *J. Immunol.* **1993**, *151*, 3693-3703.
- [56] C. G. Ioannides, R. S. Freedman, C. D. Platsoucas, S. Rashed, Y. P. Kim, *J. Immunol.* **1991**, *146*, 1700-1707.
- [57] C. M. Bohm, M. C. Mulder, R. Zennadi, M. Notter, A. Schmitt-Graeff, O. J. Finn, J. Taylor-Papadimitriou, H. Stein, H. Clausen, E. O. Riecken, C. Hanski, *Scand. J. Immunol.* **1997**, *46*, 27-34.
- [58] N. Domenech, R. A. Henderson, O. J. Finn, *J. Immunol.* **1995**, *155*, 4766-4774.
- [59] T. Takahashi, Y. Makiguchi, Y. Hinoda, H. Kakiuchi, N. Nakagawa, K. Imai, A. Yachi, *J. Immunol.* **1994**, *153*, 2102-2109.
- [60] S. von Mensdorff-Pouilly, M. M. Gourevitch, P. Kenemans, A. A. Verstraeten, S. V. Litvinov, G. J. van Kamp, S. Meijer, J. Vermorken, J. Hilgers, *Eur. J. Cancer* **1996**, *32A*, 1325-1331.
- [61] Y. Hinoda, N. Nakagawa, H. Nakamura, Y. Makiguchi, F. Itoh, M. Adachi, T. Yabana, K. Imai, A. Yachi, *Immunol. Lett.* **1993**, *35*, 163-168.
- [62] A. Rughetti, V. Turchi, C. A. Ghetti, G. Scambia, P. B. Panici, G. Roncucci, S. Mancuso, L. Frati, M. Nuti, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2457-2459.
- [63] Y. Kotera, J. D. Fontenot, G. Pecher, R. S. Metzgar, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 2856-2860.
- [64] I. F. C. McKenzie, P. X. Xing, *Cancer Cells* **1990**, *2*, 75-78.
- [65] M. R. Price, P. D. Rye, E. Petrakou, A. Murray, K. Brady, S. Imai, S. Haga, Y. Kiyozuka, D. Schol, M. F. Meulenbroek, F. G. Snijdwint, S. von Mensdorff-Pouilly, R. A. Verstraeten, P. Kenemans, A. Blockzijl, K. Nilsson, O. Nilsson, M. Reddish, M. R. Suresh, R. R. Koganty, S. Fortier, L. Baronic, A. Berg, M. B. Longenecker, J. Hilgers, *Tumour Biol.* **1998**, *19 Suppl 1*, 1-20.
- [66] S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, J. Rothbard, J. Burchell, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 12820-12823.

- [67] S. von Mensdorff-Pouilly, A. A. Verstraeten, P. Kenemans, F. G. M. Snijdwint, A. Kok, G. J. Van Kamp, M. A. Paul, P. J. Van Diest, S. Meijer, J. Hilgers, *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 574-583.
- [68] G. A. Banat, O. Christ, B. Cochlovius, H. B. Pralle, M. Zoller, *Cancer Immunol. Immunother.* **2001**, *49*, 573-586.
- [69] P. Zheng, S. Sarma, Y. Guo, Y. Liu, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 3461-3467.
- [70] B. Agrawal, M. J. Krantz, M. A. Reddish, B. M. Longenecker, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 43-49.
- [71] A. K. Chan, D. C. Lockhart, W. von Bernstorff, R. A. Spanjaard, H. G. Joo, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure, *Int. J. Cancer* **1999**, *82*, 721-726.
- [72] R. S. Bresalier, Y. Niv, J. C. Byrd, Q. Y. Duh, N. W. Toribara, R. W. Rockwell, R. Dahiya, Y. S. Kim, *J. Clin. Invest.* **1991**, *87*, 1037-1045.
- [73] H. Kobayashi, T. Terao, Y. Kawashima, *J. Clin. Oncol.* **1992**, *10*, 95-101.
- [74] S. Nakamori, D. M. Ota, K. R. Cleary, K. Shirohani, T. Irimura, *Gastroenterology* **1994**, *106*, 353-361.
- [75] M. A. McGuckin, M. D. Walsh, B. G. Hohn, B. G. Ward, R. G. Wright, *Hum. Pathol.* **1995**, *26*, 432-439.
- [76] A. M. Vlad, O. J. Finn, *Breast. Dis.* **2004**, *20*, 73-79.
- [77] W. Dippold, A. Steinborn, K. H. Meyer zum Buschenfelde, *Environ. Health Perspect.* **1990**, *88*, 255-257.
- [78] A. Steinborn, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz Mainz, **1990**.
- [79] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 354-355.
- [80] H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495-4537.
- [81] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [82] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [83] F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686-4690.
- [84] G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180-6183.
- [85] A. J. Mort, D. T. Lampion, *Anal. Biochem.* **1977**, *82*, 289-309.
- [86] C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246-249.
- [87] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. D. Chang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35-42.
- [88] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
- [89] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [90] L. A. Carpino, *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 401.
- [91] B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1939-1944.
- [92] P. Schultheiss-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 64.
- [93] T. W. Greene, P. G. Wuts *Protective groups in organic synthesis*; 3rd ed.; Wiley: New York, 1999.
- [94] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chemical Reviews (Washington, D. C.)* **2000**, *100*, 2091-2157.
- [95] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [96] J. M. J. Frechet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 3055-3056.
- [97] T. M. Fyles, C. C. Leznoff, *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 935-942.
- [98] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- [99] F. Albericio, R. Chinchilla, D. J. Dodsworth, C. Najera, *Org. Prep. Proced. Int.* **2001**, *33*, 203-303.
- [100] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- [101] V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269-1272.
- [102] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, 572-574.
- [103] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- [104] J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2525-2528.
- [105] L. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201-203.
- [106] L. A. Carpino, A. El-Faham, e. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279-2282.
- [107] I. Abdelmoty, F. Albericio, L. A. Carpino, B. M. Foxman, S. A. Kates, *Lett. Pept. Sci.* **1994**, *1*, 57-67.

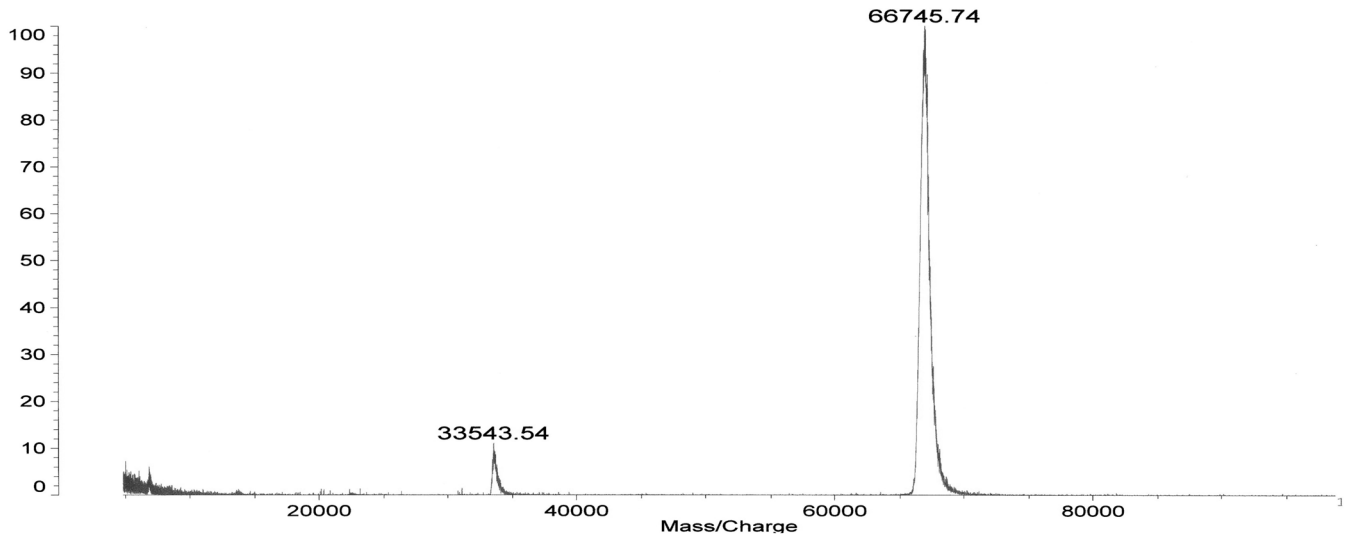
- [108] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mugge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angewandte Chemie, International Edition* **2002**, *41*, 441-445.
- [109] W. Koenig, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [110] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [111] G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2839-2876.
- [112] R. N. Germain, *Cell* **1994**, *76*, 287-299.
- [113] S. Muller in *Synthetic peptides as antigens*; (Ed.: S. Pillai, P. C. van der Vliet), Elsevier: Amsterdam, **1999**; Vol. 28, p 79-131.
- [114] V. P. Butler, Jr., S. M. Beiser, *Adv. Immun.* **1973**, *17*, 255-310.
- [115] T. Peters, Jr., *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 161-245.
- [116] K. E. van Holde, K. I. Miller, *Adv. Protein Chem.* **1995**, *47*, 1-81.
- [117] D. N. Posnett, H. McGrath, J. P. Tam, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1719-1725.
- [118] S. Dziadek, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2004**.
- [119] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 751-769.
- [120] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1763-1765.
- [121] G. Zemplen, A. Kuntz, *Chem. Ber.* **1923**, *56B*, 1705-1710.
- [122] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976-980.
- [123] W. H. Hartung, R. Simonoff, *Org. React. (N.Y.)* **1953**, *VII*, 263-326.
- [124] S. Koto, K. Asami, M. Hirooka, K. Nagura, M. Takizawa, S. Yamamoto, N. Okamoto, M. Sato, H. Tajima, T. Yoshida, N. Nonaka, T. Sato, S. Zen, K. Yago, F. Tomonaga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 765-777.
- [125] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.
- [126] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Deutsche Patentanmeldung*, **1978**, AZ: P 2816340.8.
- [127] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129-132.
- [128] M. Liu, V. G. Young, S. Lohani, D. Live, G. Barany, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1273-1285.
- [129] H. Paulsen, J. P. Hoelck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89-107.
- [130] W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957-981.
- [131] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 618-621.
- [132] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473-1482.
- [133] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1996**, 985-993.
- [134] T. Rosen, D. T. W. Chu, I. M. Lico, P. B. Fernandes, K. Marsh, L. Shen, V. G. Cepa, A. G. Pernet, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1598-1611.
- [135] J. Das, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1609-1613.
- [136] G. A. Winterfeld, Y. Ito, T. Ogawa, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1167-1171.
- [137] G. A. Winterfeld, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2718-2721.
- [138] G. A. Winterfeld, A. I. Khodair, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1009-1021.
- [139] A. Armstrong, I. Brackenridge, R. F. W. Jackson, J. M. Kirk, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2483-2486.
- [140] S. Nishimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1959**, *32*, 61-64.
- [141] T. P. Kogan, F. C. A. Gaeta, *Synthesis* **1988**, 706-707.
- [142] T. Reipen, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2002**.
- [143] H. Kunz in *Preparative Carbohydrate Chemistry*; (Ed.: S. Hanessian), Marcel Dekker: New York, **1997**, p 265.
- [144] E. Vowinkel, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 16-22.
- [145] G.-J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4539-4565.
- [146] T. J. Martin, R. Brescello, A. Toepfer, R. R. Schmidt, *Glycoconj. J.* **1993**, *10*, 16-25.
- [147] A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35-42.
- [148] K. Furuhata, K. Komiyama, H. Ogura, T. Hata, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1991**, *39*, 255-259.
- [149] F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, C13-C17.
- [150] V. Martichonok, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1702-1706.
- [151] P. Fugedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1986**, *149*, C9-C12.
- [152] A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1990**, *195*, 303-308.

- [153] G. H. Veeneman, S. H. Van Leeuwen, J. H. Van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331-1334.
- [154] P. Konradsson, U. E. Udodong, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4313-4316.
- [155] H. Loenn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115-116.
- [156] R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, 694-696.
- [157] I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. H. du Penhoat, J. M. Mallet, V. Michon, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1993**, *246*, 23-41.
- [158] S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2001**, 880-885.
- [159] O. T. Schmidt in *Methods in Carbohydrate Chemistry*; (Ed.: R. L. Whistler, M. L. Wolfrom, J. N. BeMiller), Academic Press Inc.: New York, London, **1963**; Vol. II, p 318.
- [160] X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6569-6578.
- [161] W. Steglich, G. Hoefle, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1969**, *8*, 981.
- [162] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556-557.
- [163] B. Helferich, K. F. Wedemeyer, *Liebigs Ann. Chem.* **1949**, *563*, 139-145.
- [164] H. Paulsen, W. Rauwald, U. Weichert, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 75-86.
- [165] H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, *125*, 47-64.
- [166] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5233-5236.
- [167] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5229-5232.
- [168] B. Liebe, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1997**.
- [169] C. A. Janeway, P. Travers *Immunologie*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 1997.
- [170] B. F. Erlanger, *Methods Enzymol.* **1980**, *70*, 85-104.
- [171] E. E. M. G. Loomans, A. P.-v. Ettekoven, H. P. J. Bloemers, W. J. G. Schielen, *Anal. Biochem.* **1997**, *248*, 117-129.
- [172] S. Bauminger, M. Wilchek, *Methods Enzymol.* **1980**, *70*, 151-159.
- [173] T. H. Ji, *Methods Enzymol.* **1983**, *91*, 580-609.
- [174] A. J. Habeeb, R. Hiramoto, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *126*, 16-26.
- [175] R. B. Mikkelsen, D. F. Wallach, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 7413-7416.
- [176] T. H. Ji, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7841-7847.
- [177] C. D. Demoliou, R. M. Eband, *Biochemistry* **1980**, *19*, 4539-4546.
- [178] J. Carlsson, H. Drevin, R. Axen, *Biochem. J.* **1978**, *173*, 723-737.
- [179] S. Yoshitake, Y. Yamada, E. Ishikawa, R. Masseyeff, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *101*, 395-399.
- [180] T. Kitagawa, T. Aikawa, *J. Biochem. (Tokyo)* **1976**, *79*, 233-236.
- [181] T. Buskas, Y. Li, G.-J. Boons, *Chemistry--A European Journal* **2004**, *10*, 3517-3524.
- [182] T. Posner, *Chem. Ber.* **1905**, *38*, 646-657.
- [183] F. W. Stacey, J. F. Harris, Jr., *Org. React. (N.Y.)* **1963**, *13*, 150-376.
- [184] K. Griesbaum, *Angew. Chem.* **1970**, *82*, 276-290.
- [185] T. Becker, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2002**.
- [186] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813-826.
- [187] M. Adamczyk, A. Buko, Y.-Y. Chen, J. R. Fishpaugh, J. C. Gebler, D. D. Johnson, *Bioconjug. Chem.* **1994**, *5*, 631-635.
- [188] I. Wengatz, R. D. Schmid, S. Kreissbig, C. Wittmann, B. Hock, A. Ingendoh, F. Hillenkamp, *Anal. Lett.* **1992**, *25*, 1983-1997.
- [189] A. Schöbel, H. Wagner in *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*; (Ed.: E. Müller), Georg-Thieme-Verlag: Stuttgart, **1955**; Vol. (4)-9, p 3-48.
- [190] B. Strijveen, R. M. Kellogg, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3664-3671.
- [191] L. Zervas, I. Photaki, N. Ghelis, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 1337-1341.
- [192] D. G. Clark, E. H. Cordes, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 270-277.
- [193] C. L. Cywin, R. A. Firestone, D. W. McNeil, C. A. Grygon, K. M. Crane, D. M. White, P. R. Kinkade, J. L. Hopkins, W. Davidson, M. E. Labadia, J. Wildeson, M. M. Morelock, J. D. Peterson, E. L. Raymond, M. L. Brown, D. M. Spero, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 733-740.
- [194] E. Bayer, W. Rapp, *Chemistry of Peptides and Proteins* **1986**, *3*, 3-8.
- [195] R. Ramage, J. Green, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2287-2290.
- [196] J. Green, O. M. Ogunjobi, R. Ramage, A. S. J. Stewart, S. McCurdy, R. Noble, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4341-4344.
- [197] R. Ramage, J. Green, A. J. Blake, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6353-6370.

- [198] P. Veprek, J. Jezek, *J. Peptide Sci.* **1999**, *5*, 5-23.
- [199] P. Veprek, J. Jezek, *J. Peptide Sci.* **1999**, *5*, 203-220.
- [200] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 5409-5413.
- [201] S. Ota, T. Ono, A. Morita, A. Uenaka, M. Harada, E. Nakayama, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 1471-1476.
- [202] K. L. Rock, *Immunol. Today* **1996**, *17*, 131-137.
- [203] W. R. Heath, F. R. Carbone, *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 47-64.
- [204] W. R. Heath, F. R. Carbone, *Nat. Rev. Immunol.* **2001**, *1*, 126-134.
- [205] B. Nardelli, Y. A. Lu, D. R. Shiu, C. Delpierre-Defoort, A. T. Profy, J. P. Tam, *J. Immunol.* **1992**, *148*, 914-920.
- [206] J. P. Defoort, B. Nardelli, W. Huang, D. D. Ho, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 3879-3883.
- [207] J. P. Tam, Y. A. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 9084-9088.
- [208] S. Bay, R. Lo-Man, E. Osinaga, H. Nakada, C. Leclerc, D. Cantacuzene, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 620-625.
- [209] R. Lo-Man, S. Vichier-Guerre, S. Bay, E. Deriaud, D. Cantacuzene, C. Leclerc, *J. Immunol.* **2001**, *166*, 2849-2854.
- [210] O. Marder, Y. Shvo, F. Albericio, *Chimica Oggi* **2002**, *20*, 37-41.
- [211] G. Sabatino, B. Mulinacci, M. C. Alcaro, M. Chelli, P. Rovero, A. M. Papini, *Lett. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 119-123.
- [212] A. Di Fenza, P. Rovero, *Lett. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 125-129.
- [213] E. Krambovitis, G. Hatzidakis, K. Barlos, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 10874-10879.
- [214] C. Leclerc, G. Przewlocki, M. P. Schutze, L. Chedid, *Eur. J. Immunol.* **1987**, *17*, 269-273.
- [215] P. C. Ho, D. A. Mutch, K. D. Winkel, A. J. Saul, G. L. Jones, T. J. Doran, C. M. Rzepczyk, *Eur. J. Immunol.* **1990**, *20*, 477-483.
- [216] J. C. Reece, H. M. Geysen, S. J. Rodda, *J. Immunol.* **1993**, *151*, 6175-6184.
- [217] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, *40*, 366-369.
- [218] M. Wagner, S. Dziadek, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 6018-6030.
- [219] M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 317-321.
- [220] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 803-805.
- [221] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 513-520.
- [222] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriou, W. Yao, W. Schaefer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946.
- [223] K. Barlos, D. Gatos, S. Kapolos, G. Papaphotiu, W. Schaefer, W. Yao, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3947-3950.
- [224] K. Barlos, D. Gatos, S. Kapolos, C. Poulos, W. Schafer, W. Yao, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *38*, 555-561.
- [225] K. Barlos, D. Gatos, S. Kutsogianni, G. Papaphotiu, C. Poulos, T. Tsegenidis, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *38*, 562-568.
- [226] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005-4008.
- [227] M. Mergler, J. Gosteli, P. Grogg, R. Nyfeler, R. Tanner, *Chimia* **1999**, *53*, 29-34.
- [228] M. Mergler, R. Nyfeler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4009-4012.
- [229] S. R. Chhabra, B. Hothi, D. J. Evans, P. D. White, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1603-1606.
- [230] B. W. Bycroft, W. C. Chan, S. R. Chhabra, P. H. Teesdale-Spittle, P. M. Hardy, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 776-777.
- [231] B. W. Bycroft, W. C. Chan, S. R. Chhabra, N. D. Hone, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 778-779.
- [232] M. Henczi, D. F. Weaver, *Org. Prep. Proced. Int.* **1994**, *26*, 578-580.
- [233] B. Kellam, W. C. Chan, S. R. Chhabra, B. W. Bycroft, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5391-5394.
- [234] S. Keil, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.
- [235] G. Jung, C. Carrera, H. Brueckner, W. G. Bessler, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1608-1622.
- [236] G. Jung, K. H. Wiesmueller, W. Scheuer, W. G. Bessler, *Pept.: Struct. Funct., Proc. Am. Pept. Symp., 8th* **1983**, 179-182.

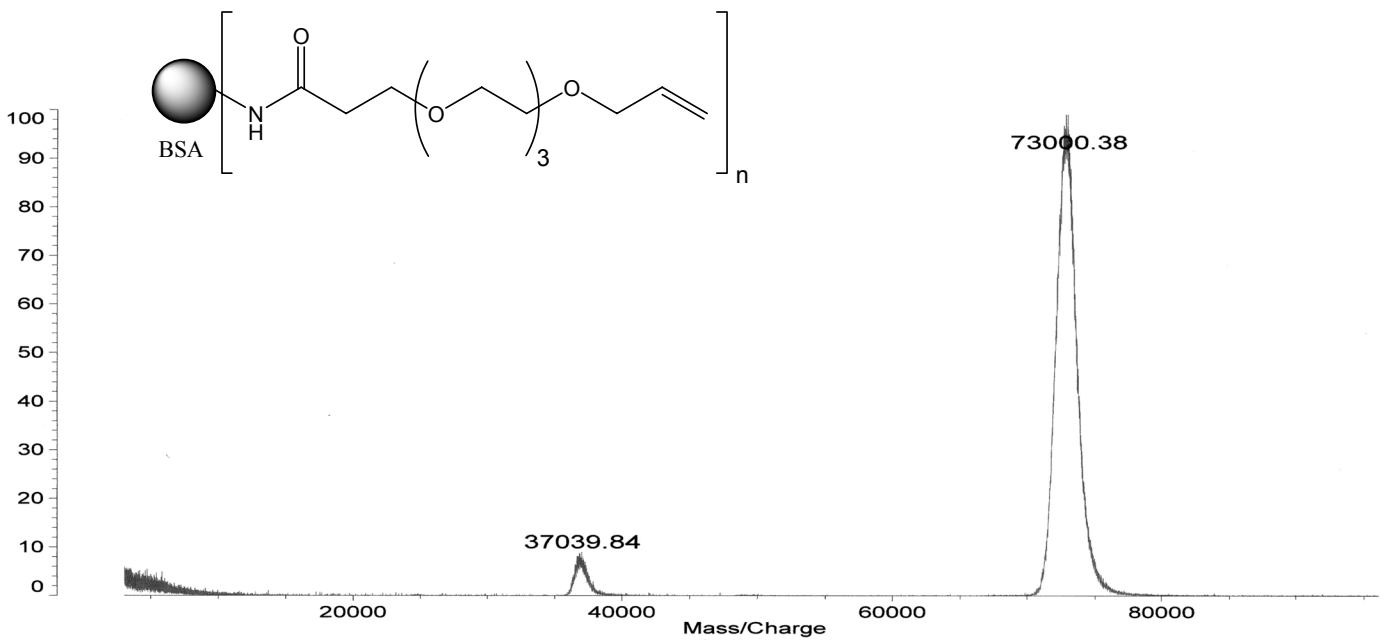
- [237] K. H. Wiesmüller, S. Freund, G. Jung, M. Krug, G. Folkers, G. Hess, *Peptides* **1988**, 695-697.
- [238] J. Metzger, G. Jung, W. G. Bessler, P. Hoffmann, M. Strecker, A. Lieberknecht, U. Schmidt, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1969-1974.
- [239] S. D. C. Muller, M. R. Muller, M. Huber, U. van der Esche, C. J. Kirschning, H. Wagner, W. G. Bessler, K. Mittenbuhler, *International Immunopharmacology* **2004**, 4, 1287-1300.
- [240] R. Spohn, U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, K. H. Wiesmuller, *Vaccine* **2004**, 22, 2494-2499.
- [241] K. H. Wiesmueller, W. Bessler, G. Jung, *Hoppe. Seylers Z. Physiol. Chem.* **1983**, 364, 593-606.
- [242] F. Reichel, A. M. Roelofsen, H. P. M. Geurts, T. I. Hamalainen, M. C. Feiters, G. J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7989-7997.
- [243] J. Metzger, K. H. Wiesmueller, R. Schauder, W. G. Bessler, G. Jung, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37, 46-57.
- [244] J. W. Metzger, K. H. Wiesmueller, G. Jung, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 38, 545-554.
- [245] M. J. Amaral, M. A. Macedo, M. I. Oliveira, *J. Chem. Soc. [Perkin. 1]*. **1977**, 2, 205-206.
- [246] J. Habermann, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4797-4800.
- [247] K. P. R. Kartha, B. Mukhopadhyay, R. A. Field, *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 729-732.
- [248] P. Schelte, C. Boeckler, B. Frisch, F. Schuber, *Bioconjug. Chem.* **2000**, 11, 118-123.
- [249] A. Roth, S. Espuelas, C. Thumann, B. Frisch, F. Schuber, *Bioconjug. Chem.* **2004**, 15, 541-553.
- [250] D. A. Williamson, B. E. Bowler, *Tetrahedron* **1996**, 52, 12357-12372.
- [251] <http://www.aeisner.de/rezepte/puffer2.html>.
- [252] *Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Synthesis*, 1998.

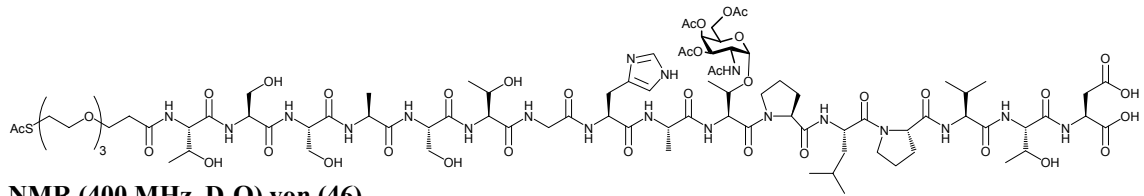
7 Spektrenanhang



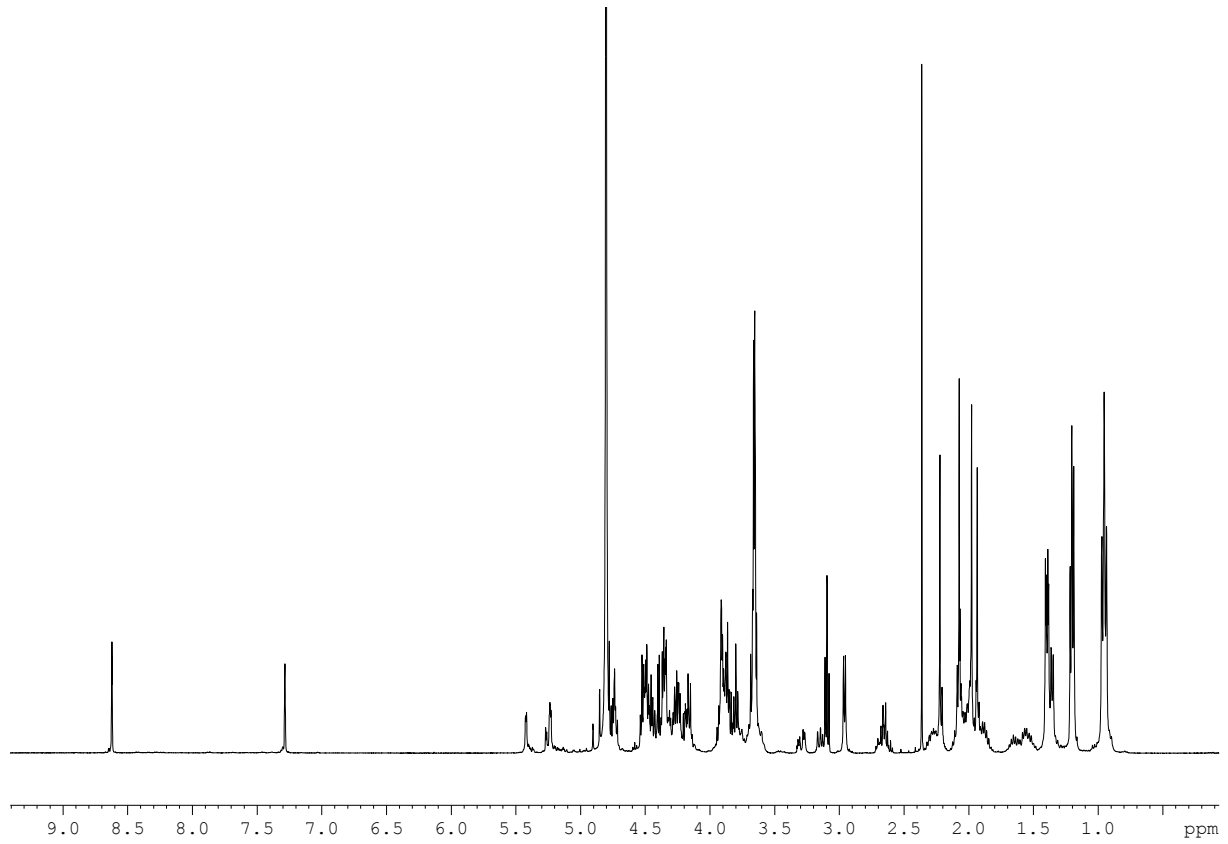
Maldi-TOF-Spektrum von unmodifiziertem BSA

Maldi-TOF-Spektrum von mit dem Olefinlinker modifizierten BSA

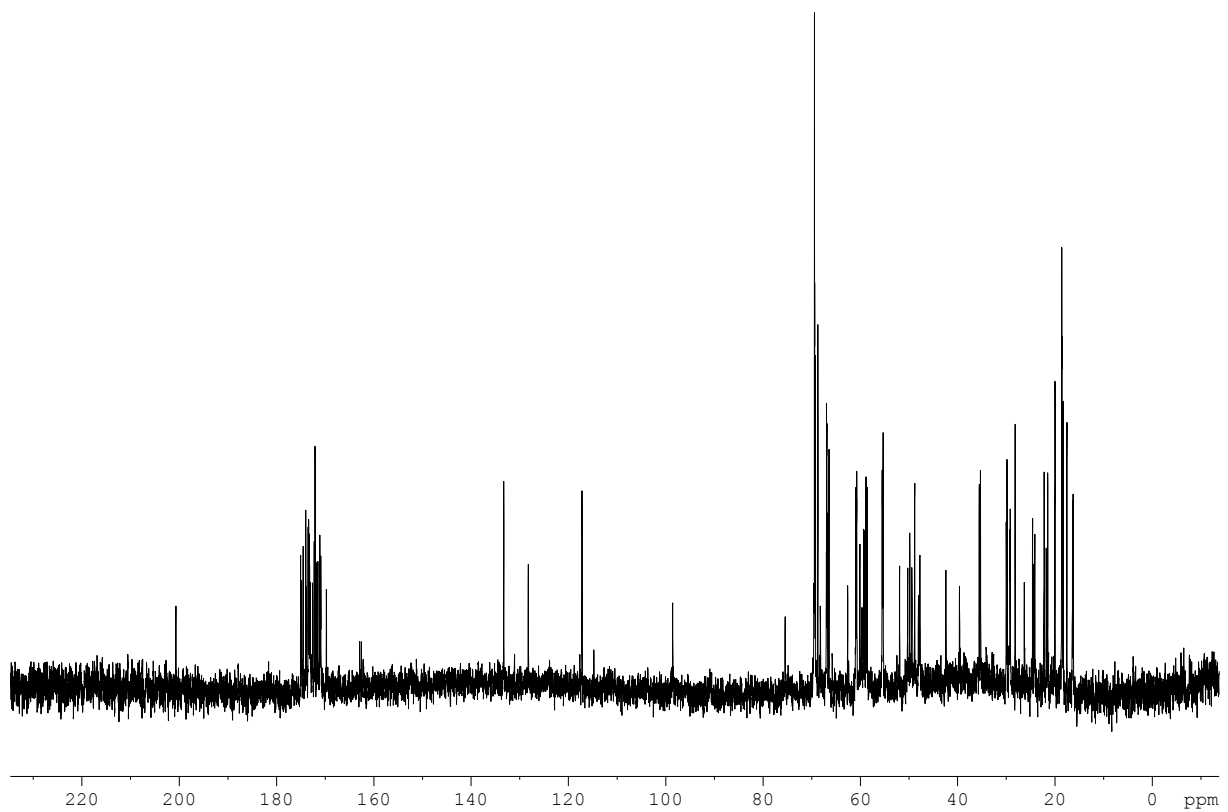


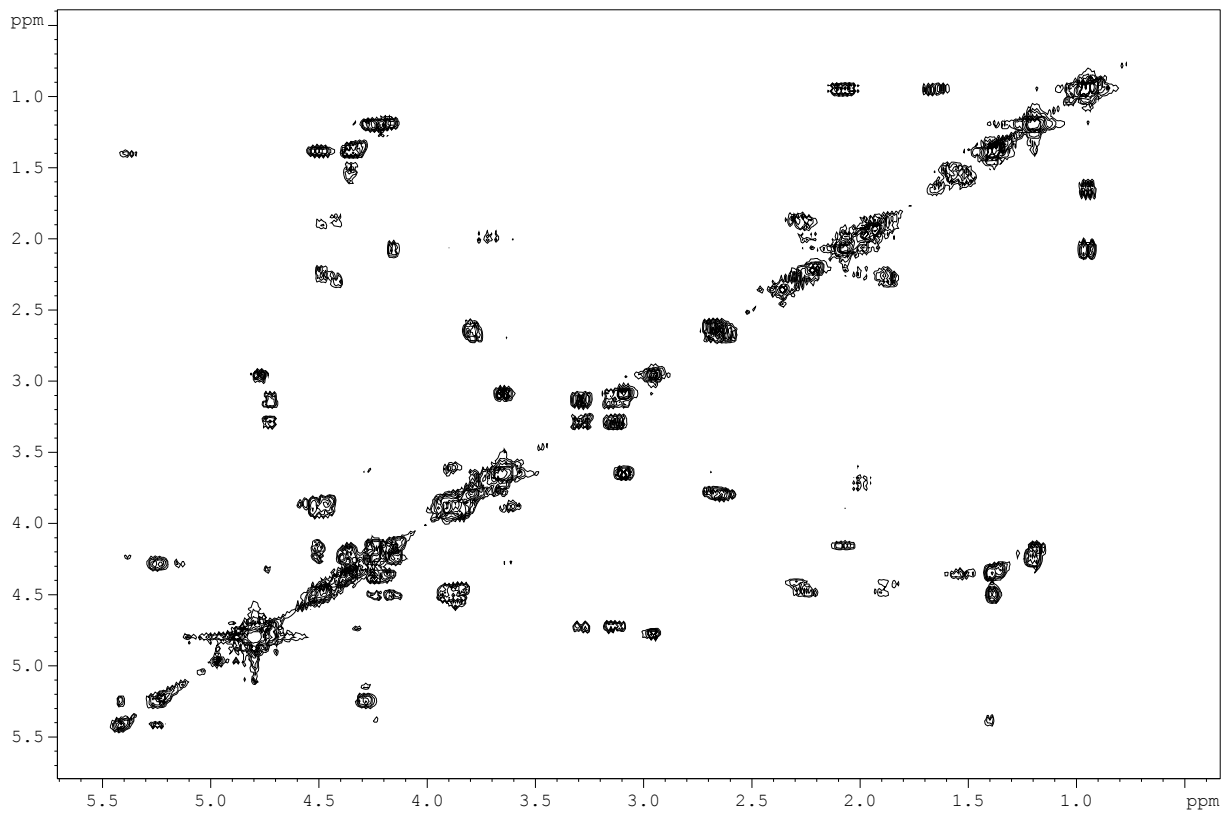
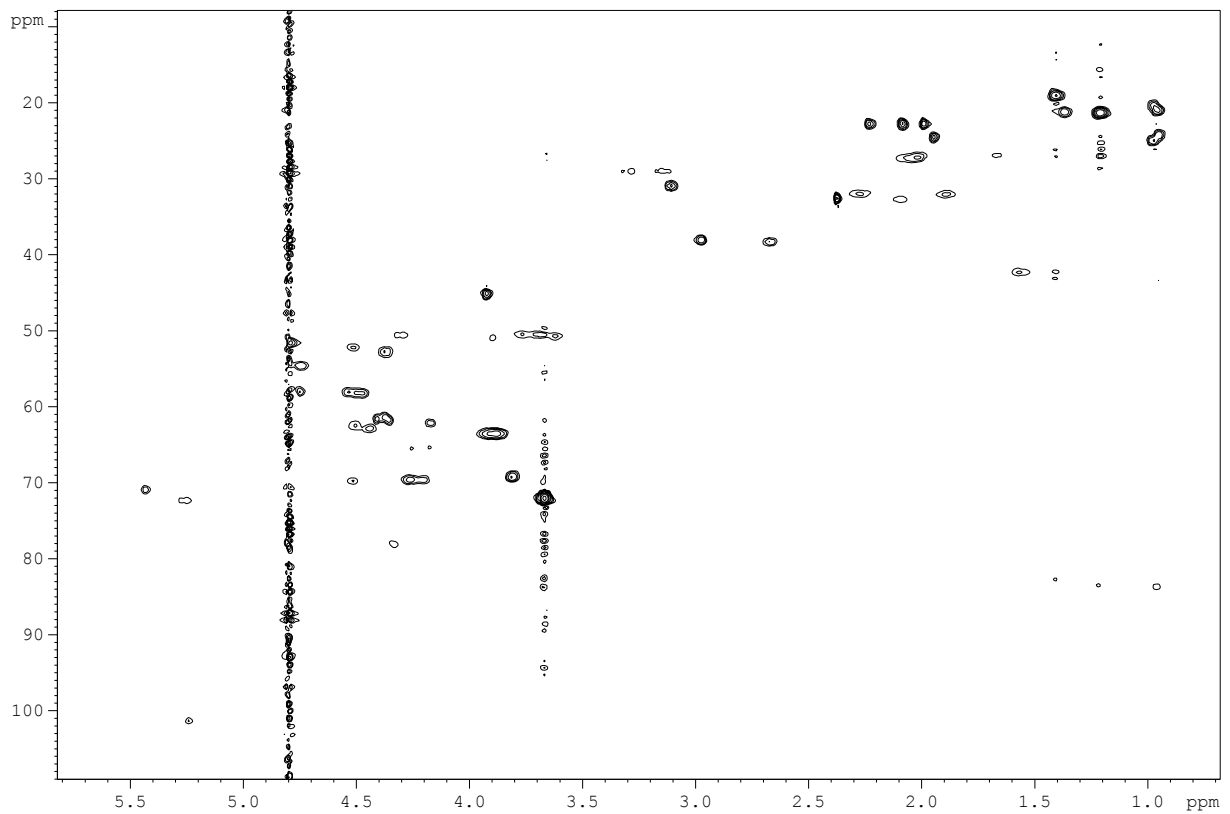


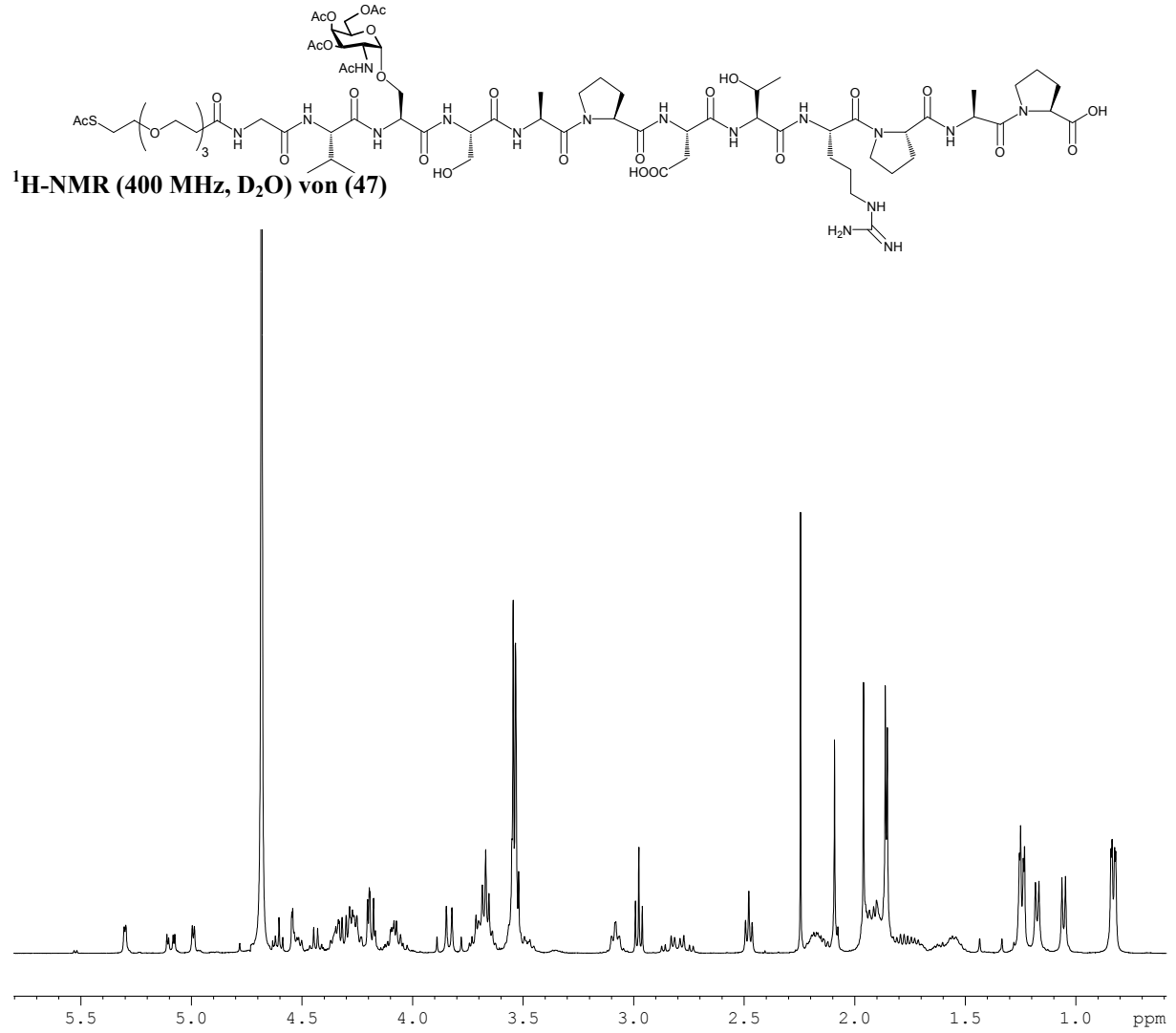
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) von (46)



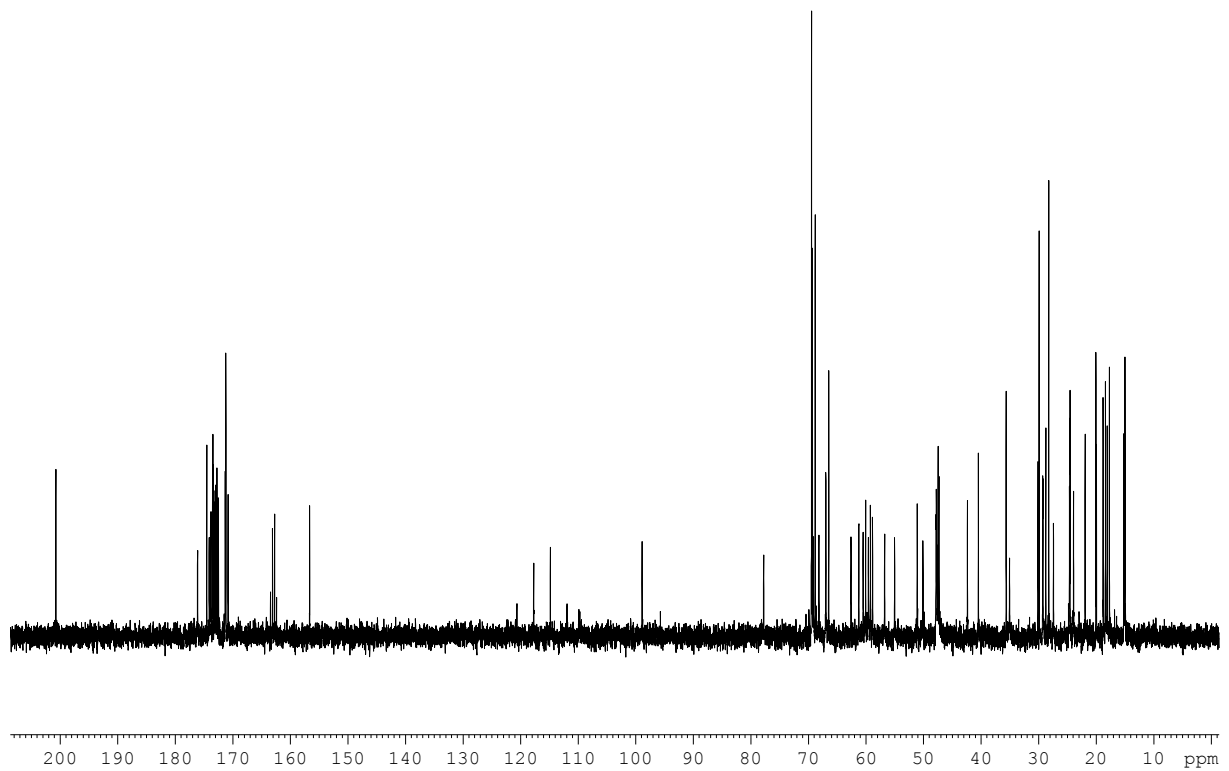
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, D_2O)

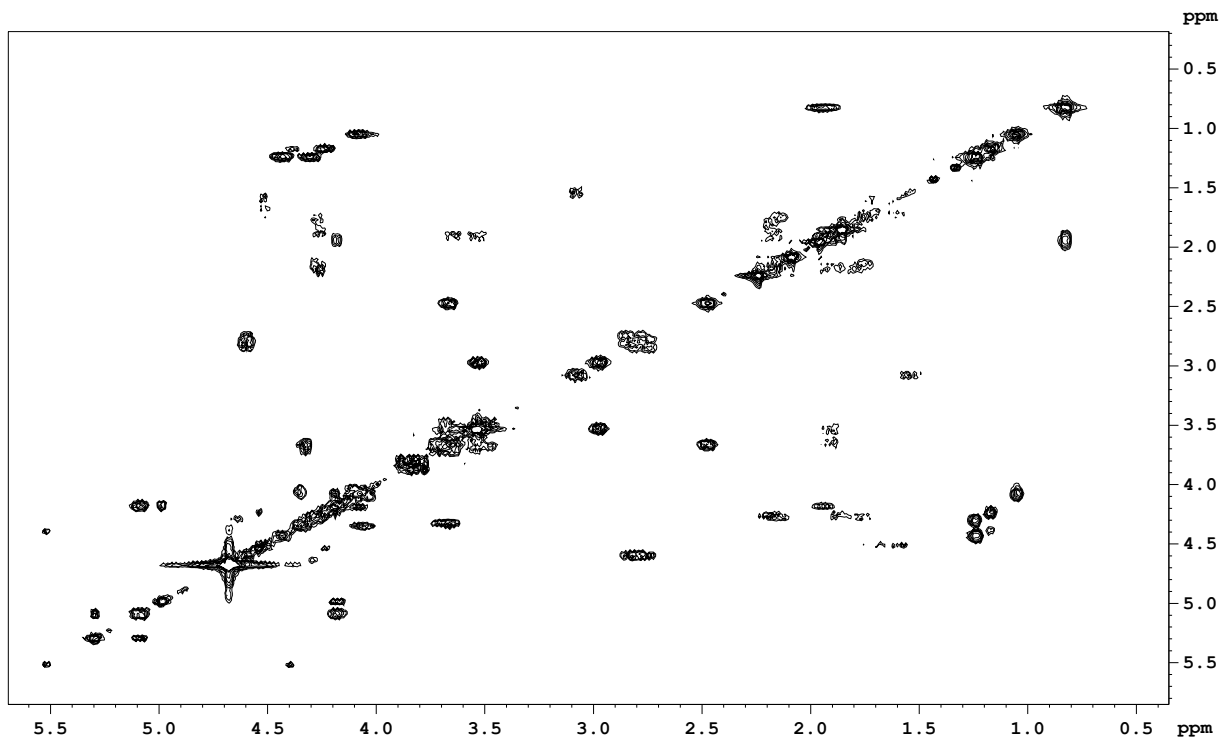
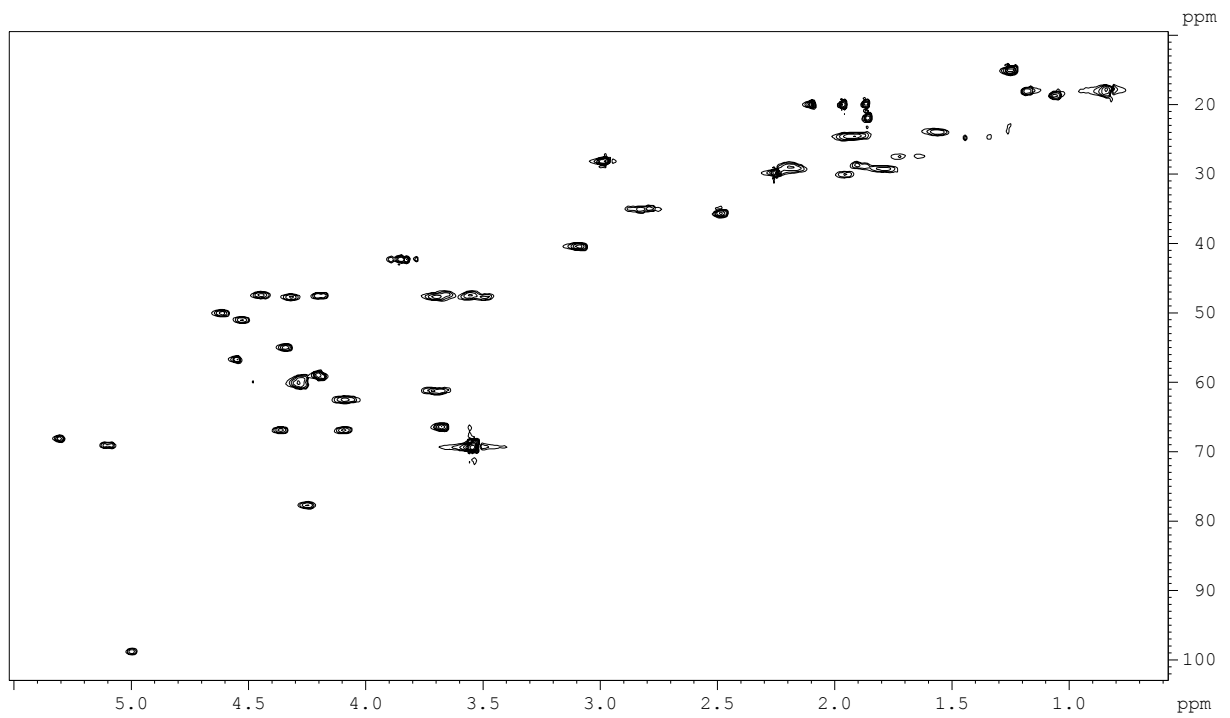


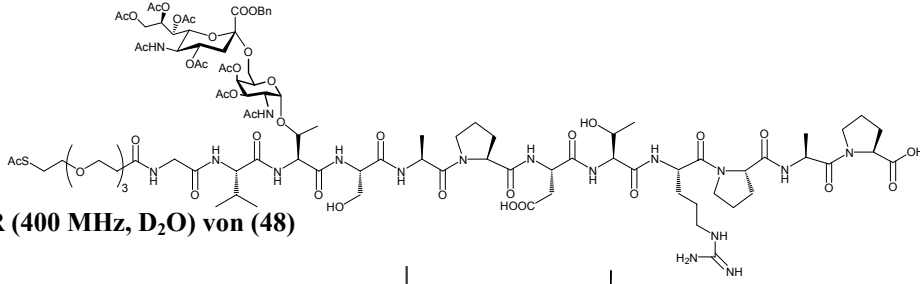
^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC



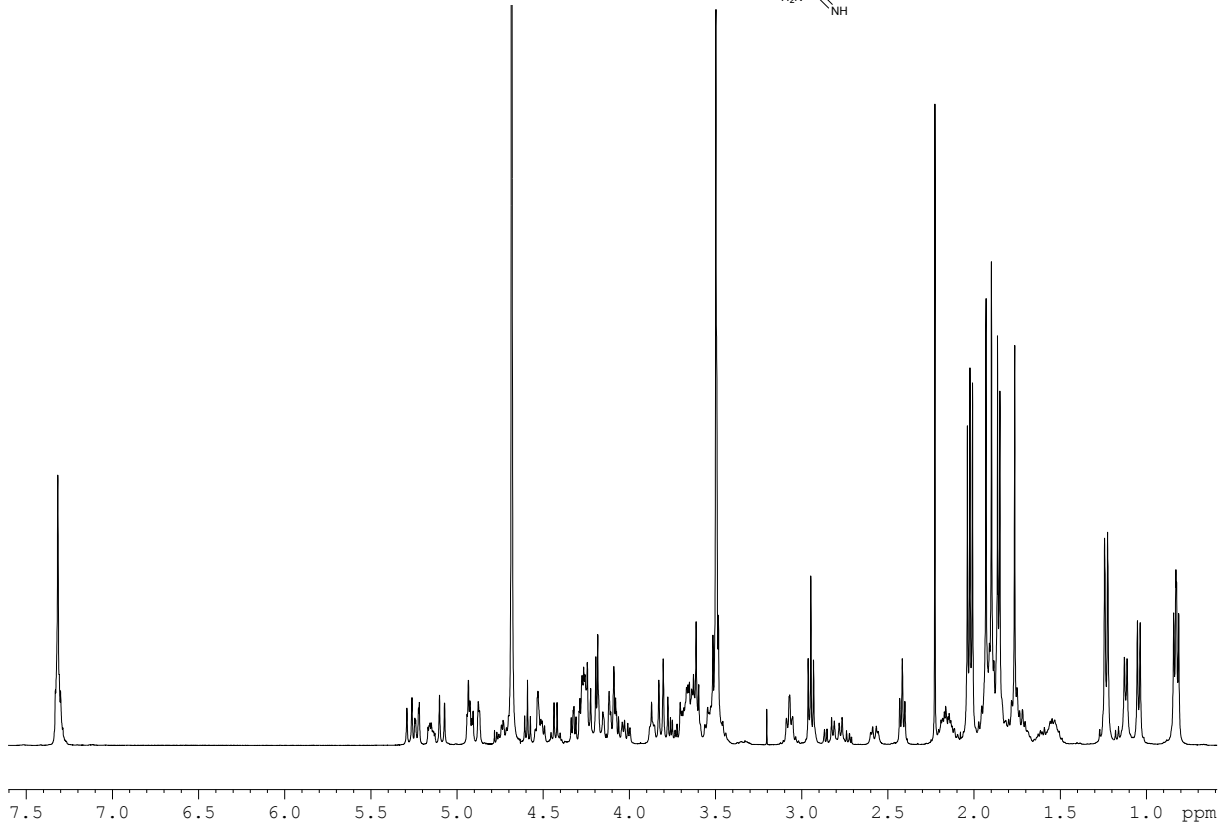
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, D_2O)



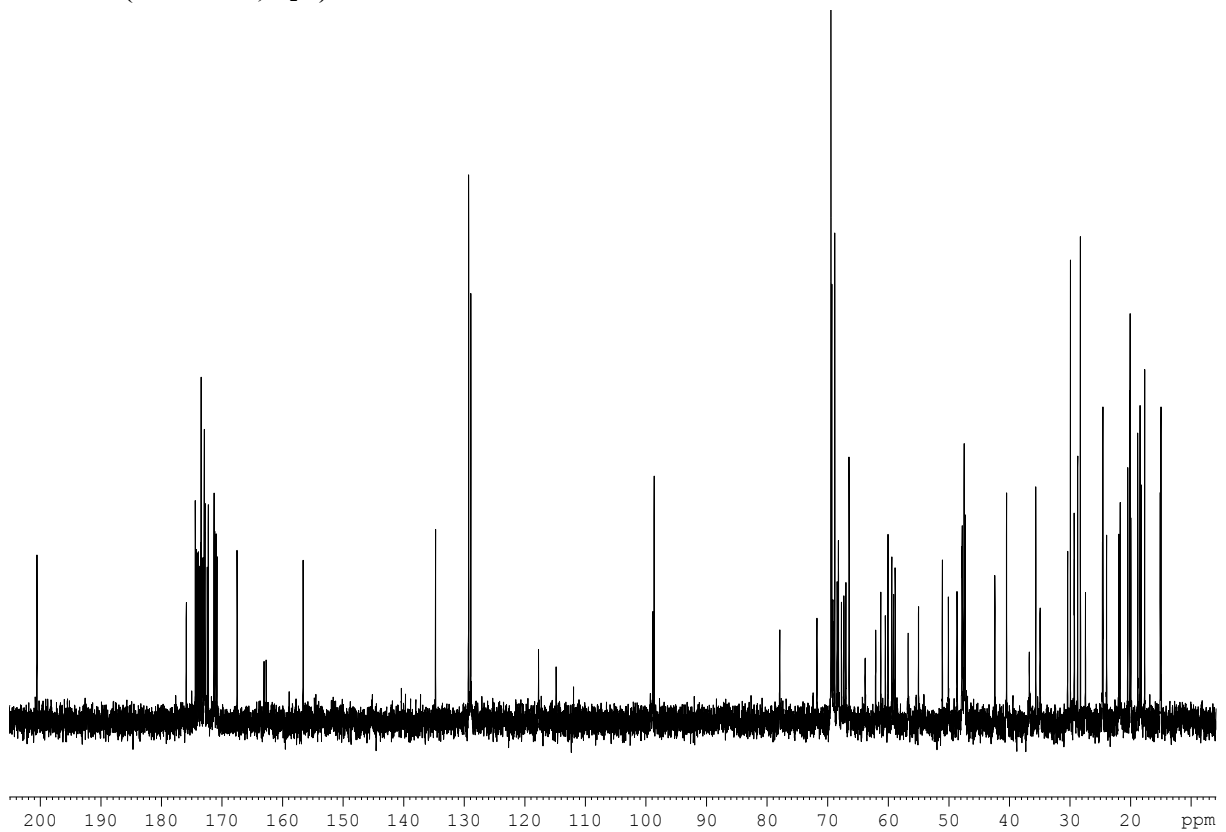
^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

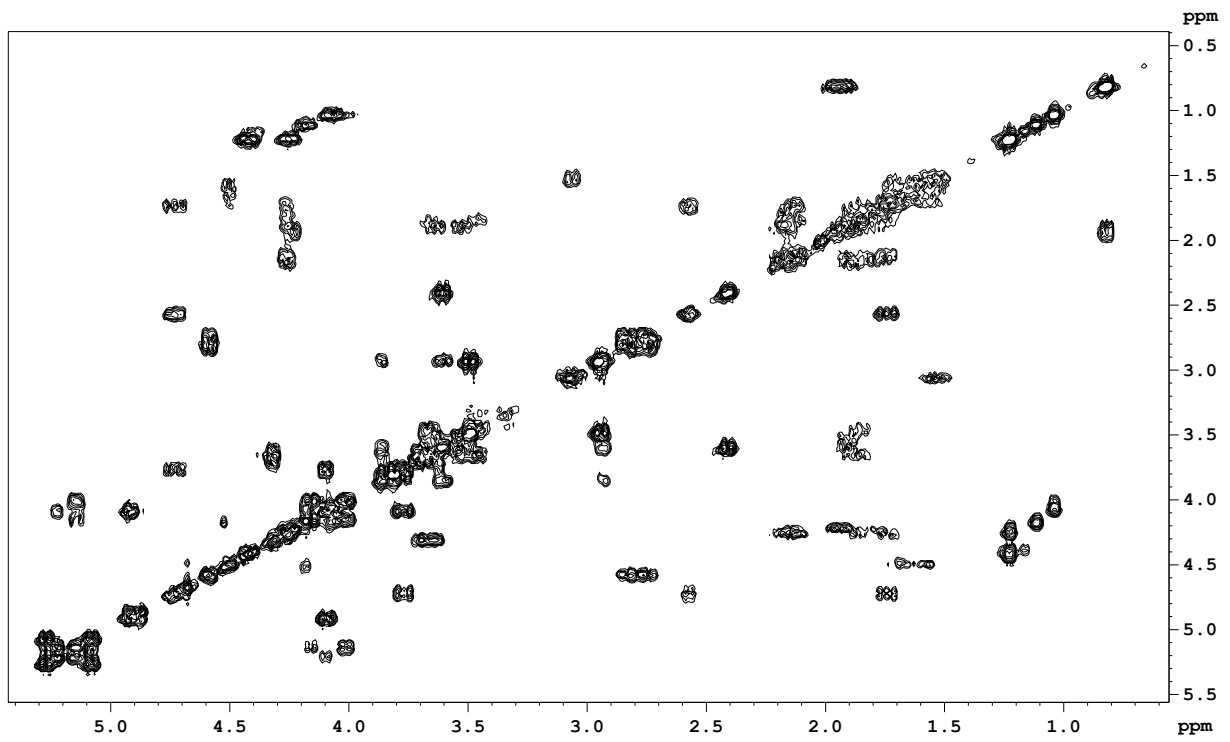
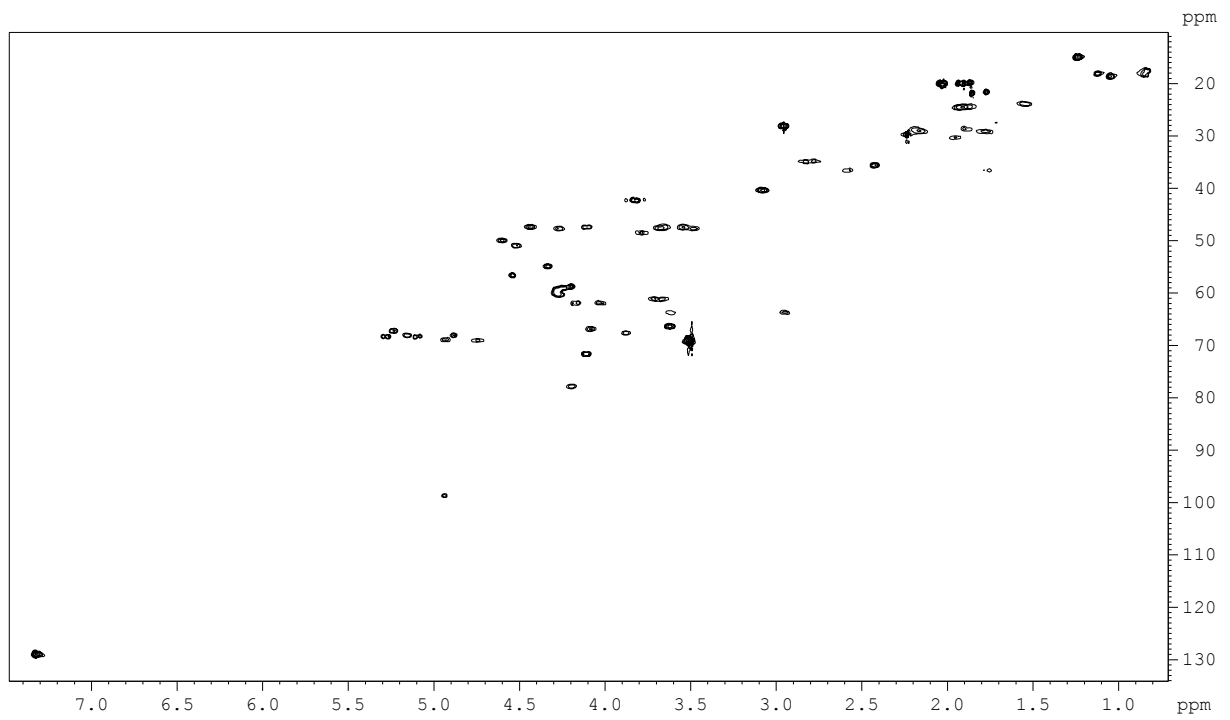


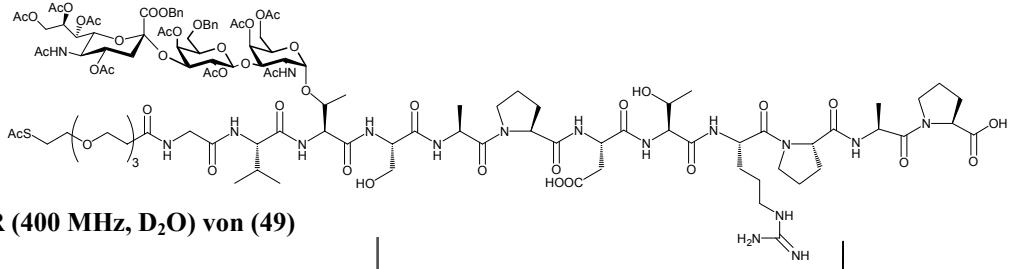
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) von (48)



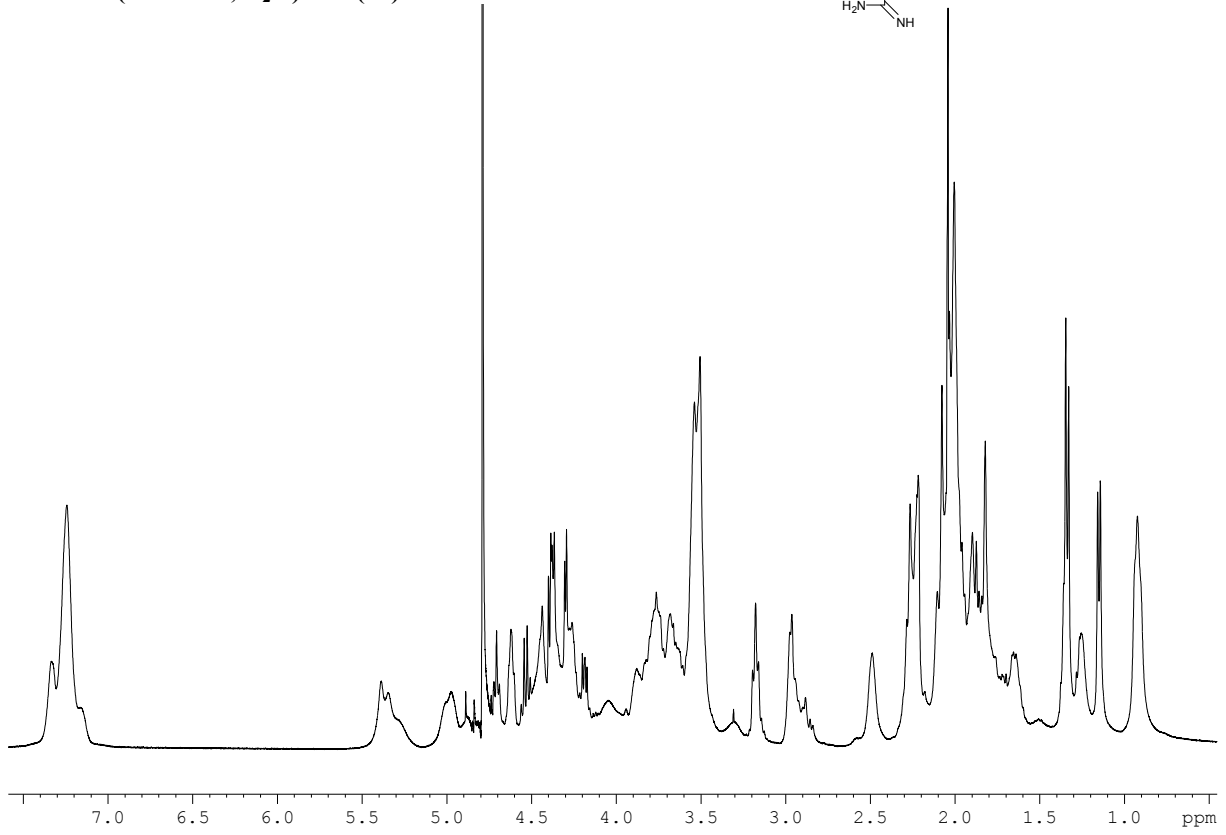
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, D_2O)



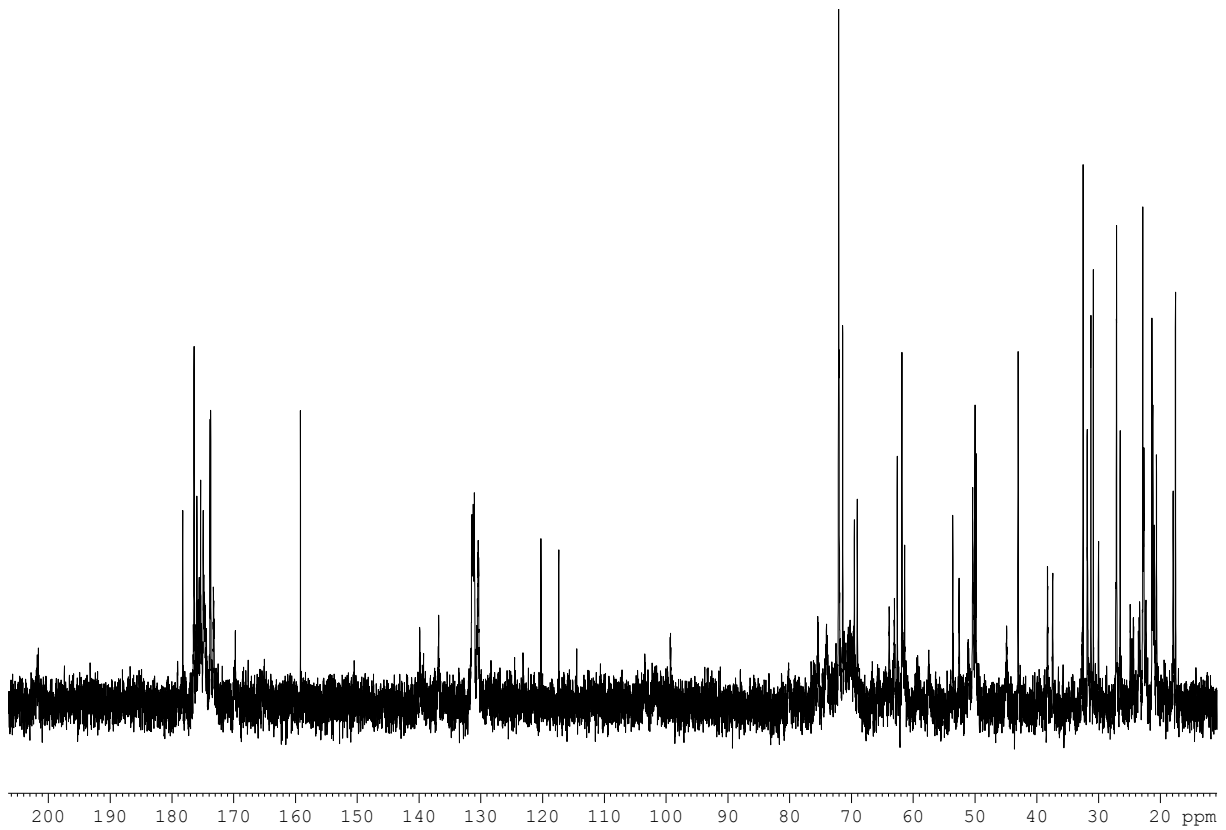
^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

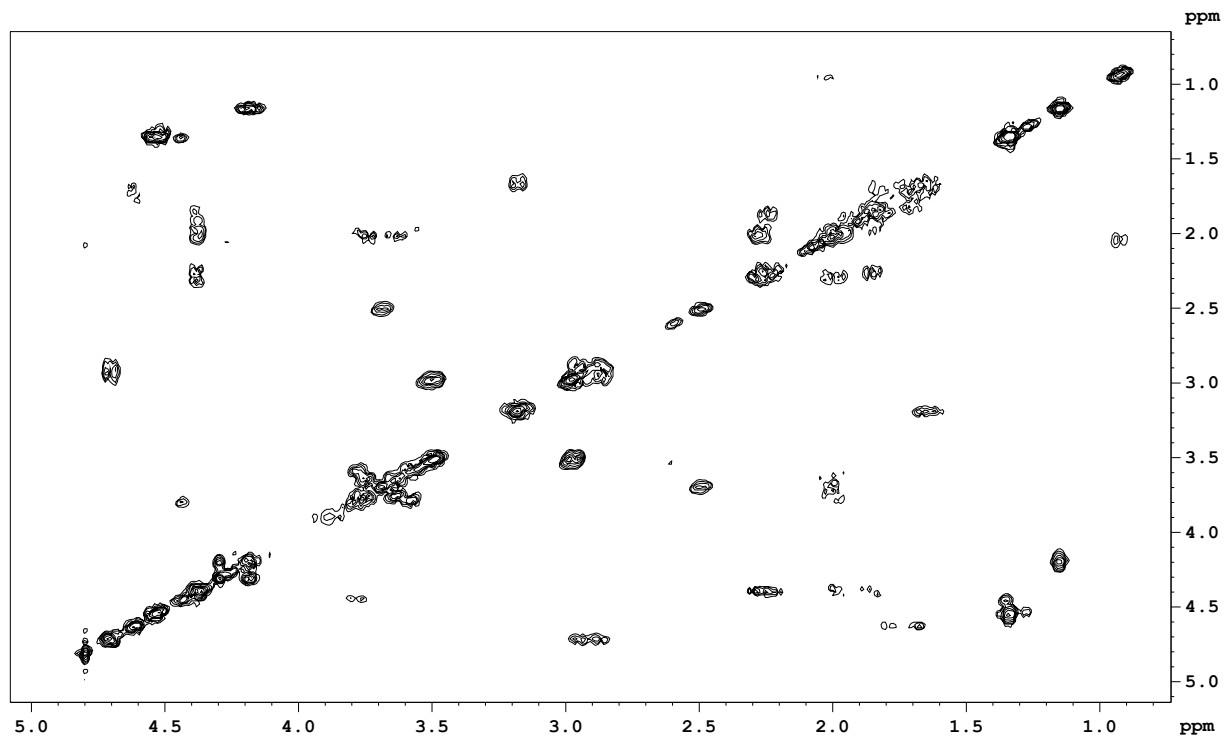
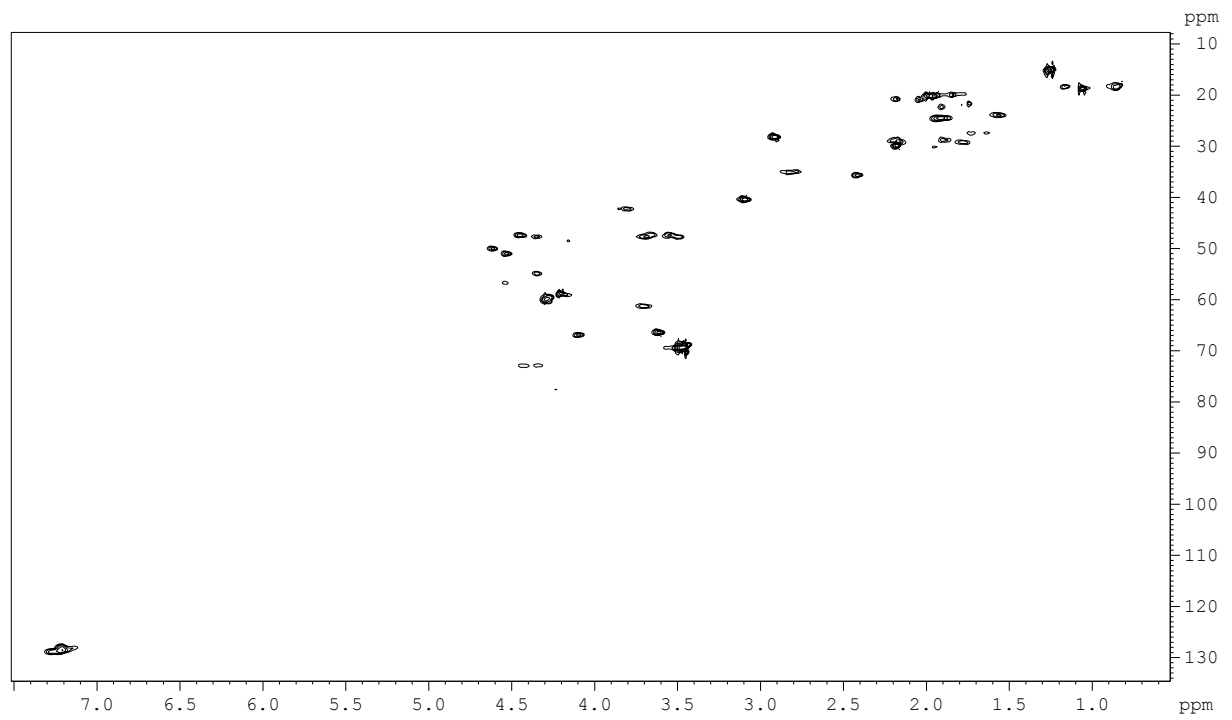


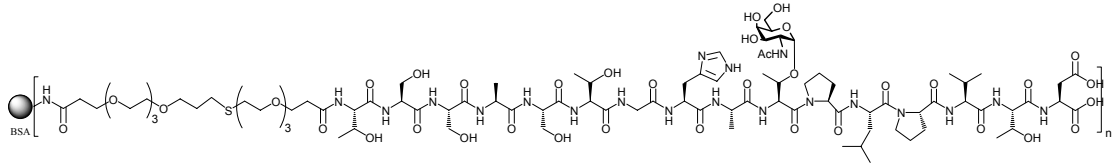
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) von (49)



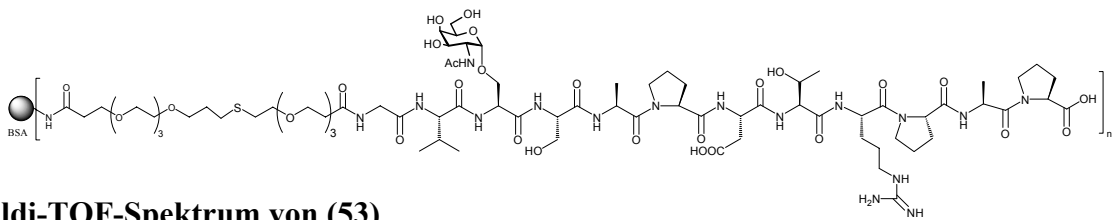
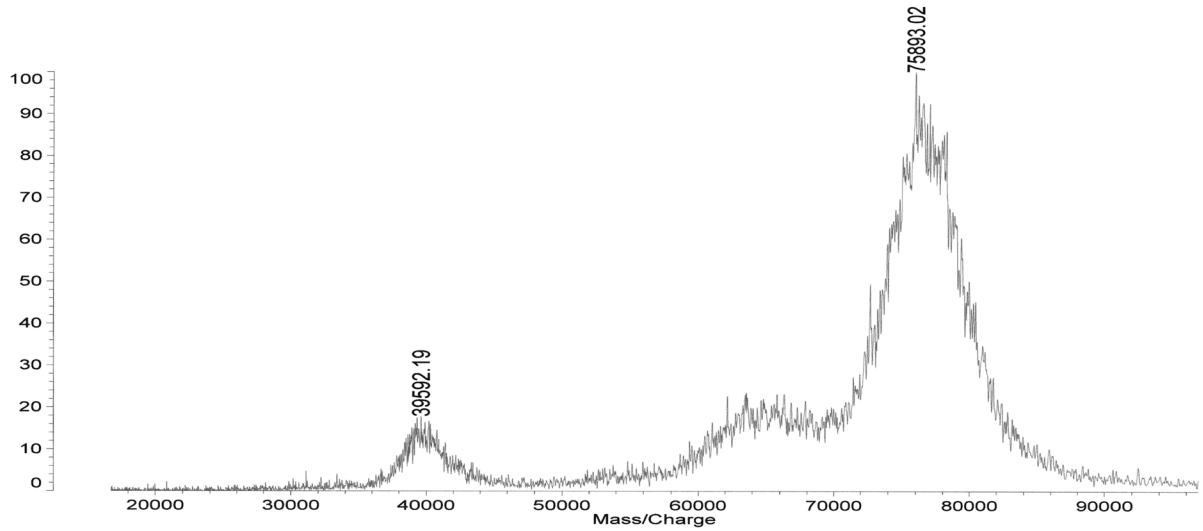
¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O)



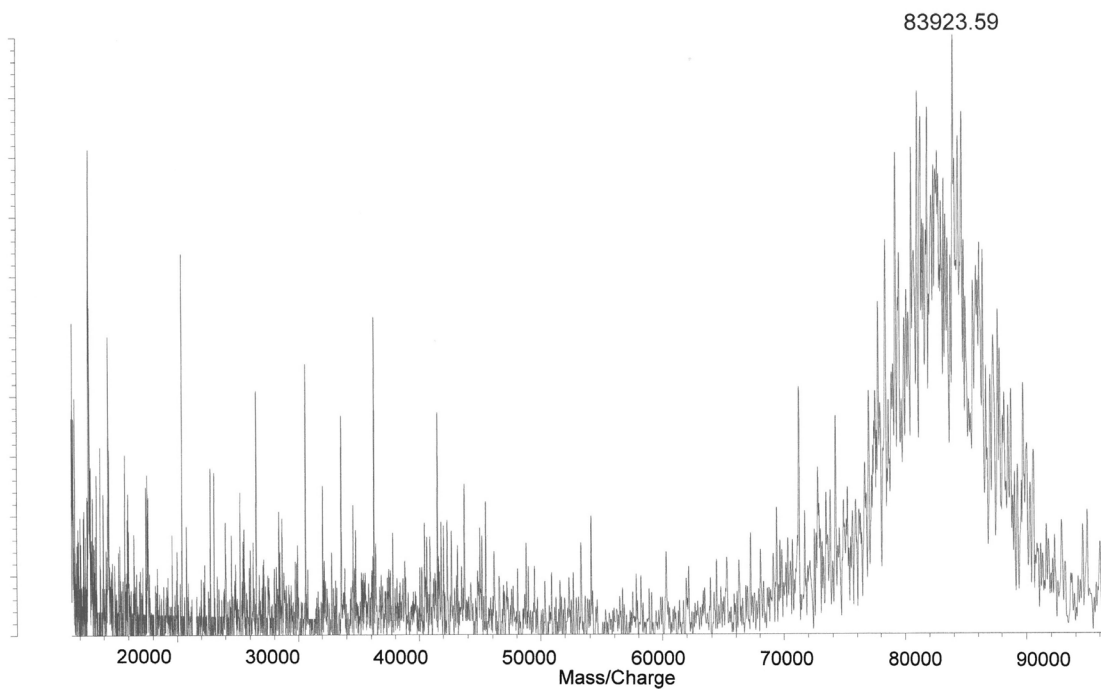
^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

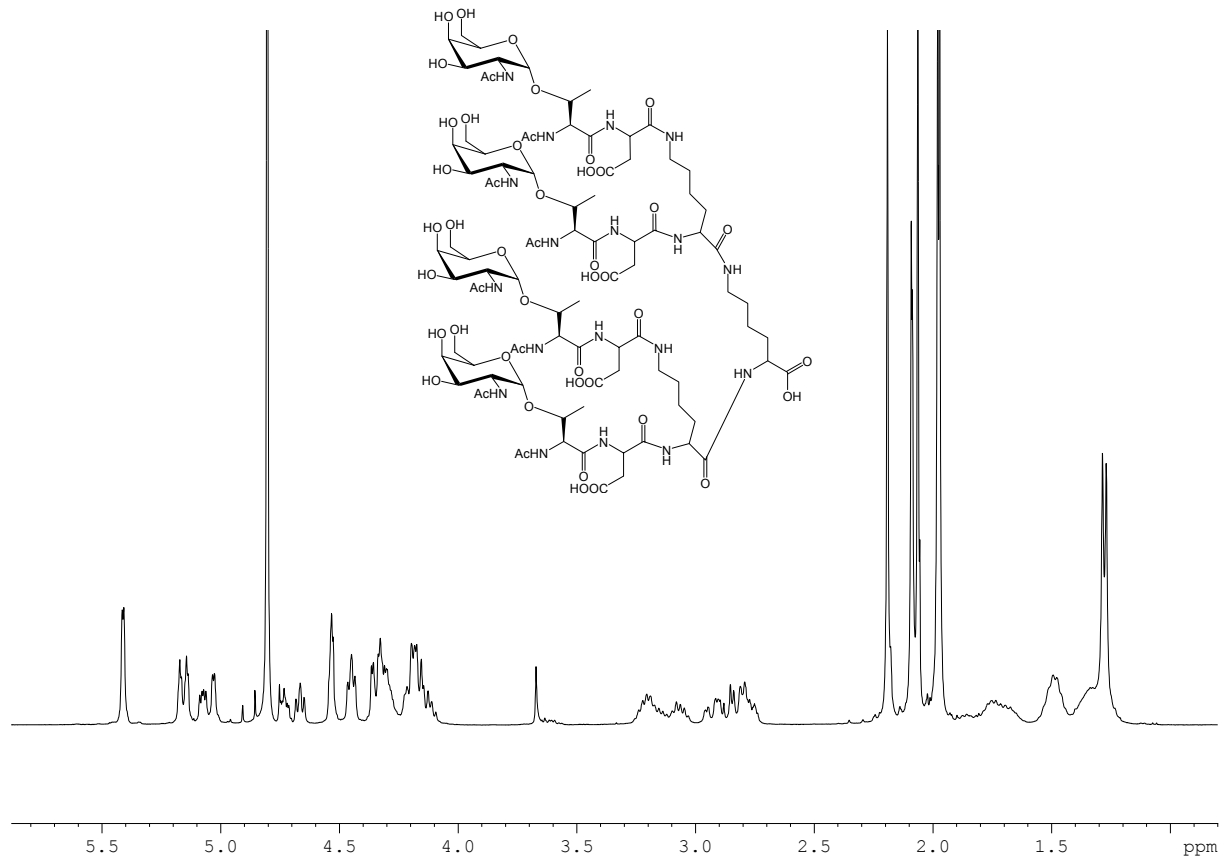
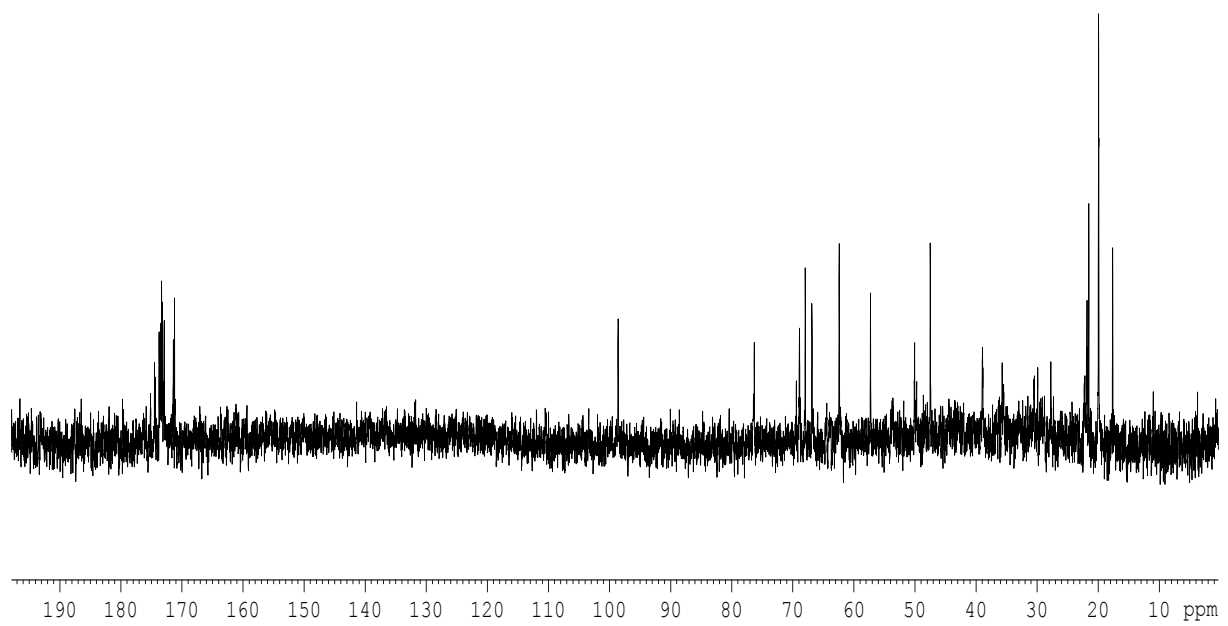


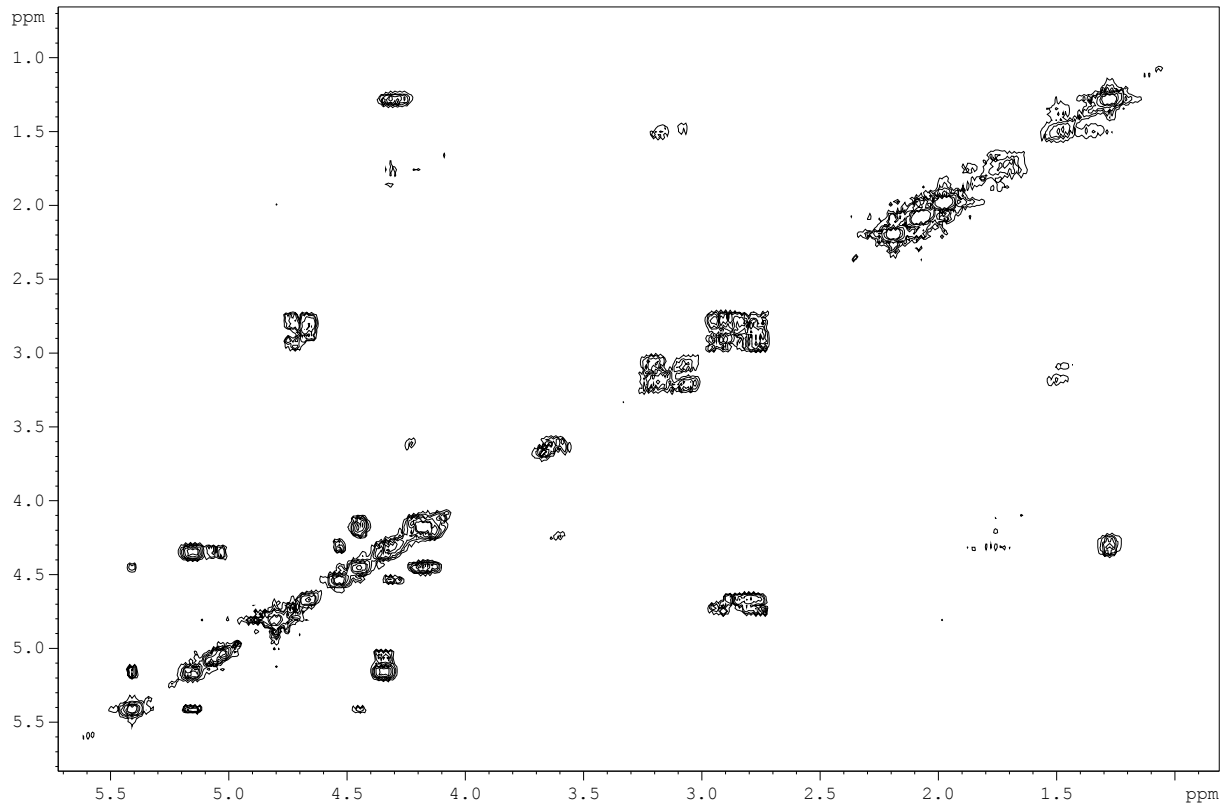
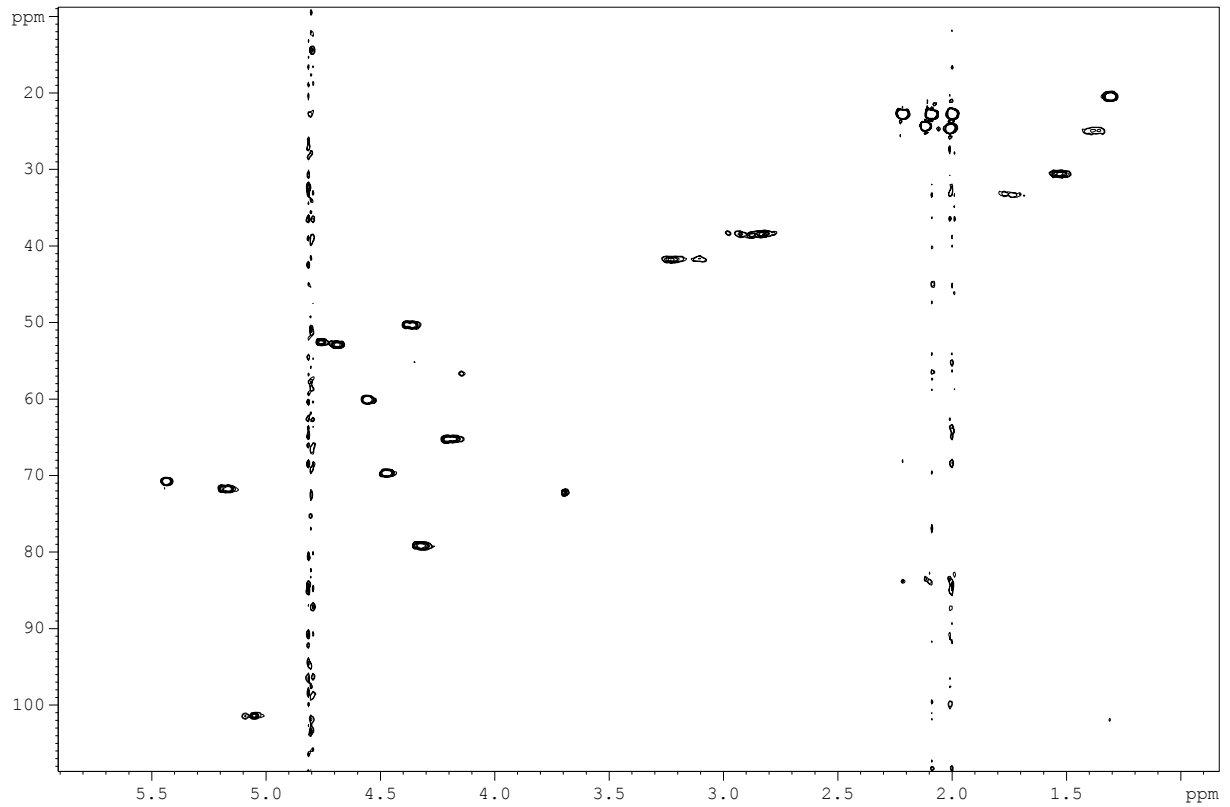
Maldi-TOF-Spektrum von (51)

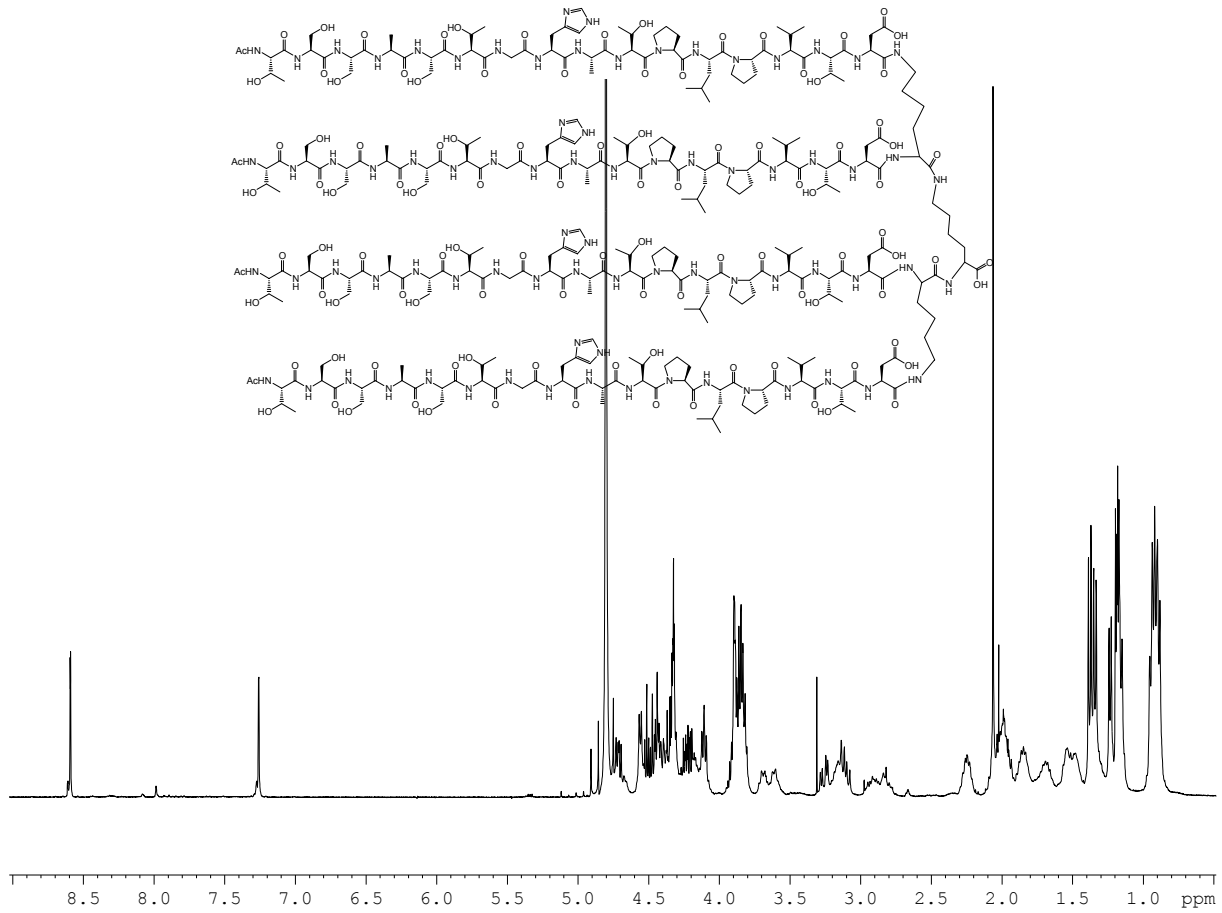
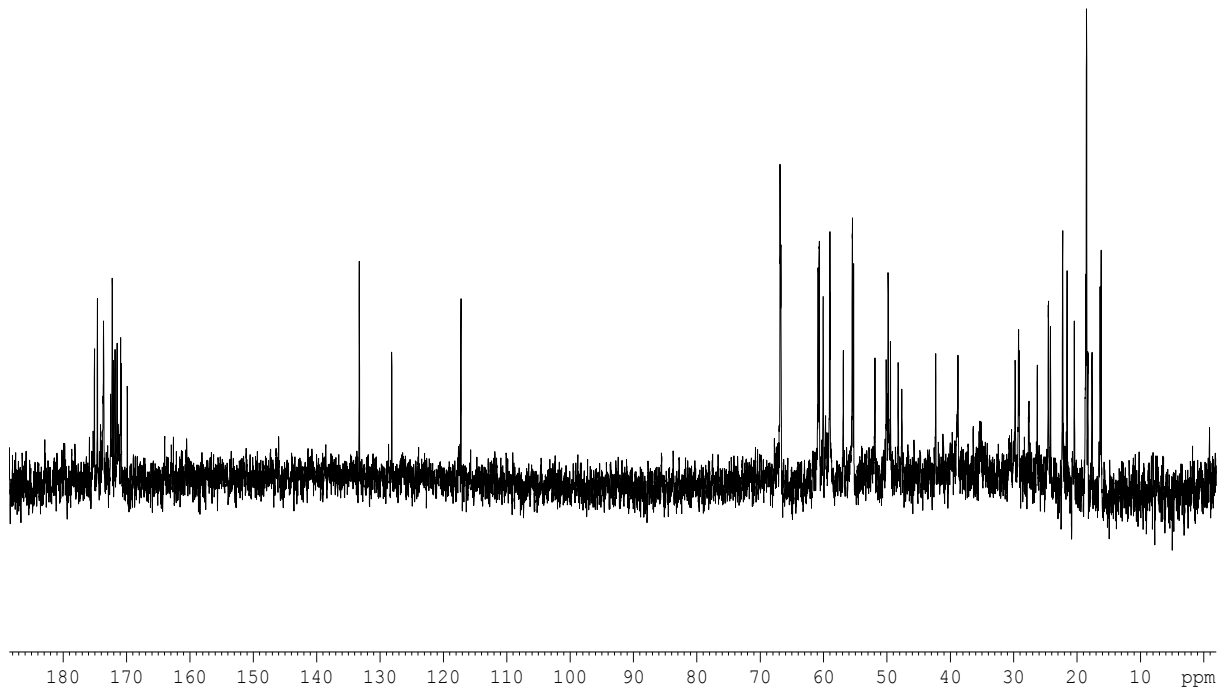


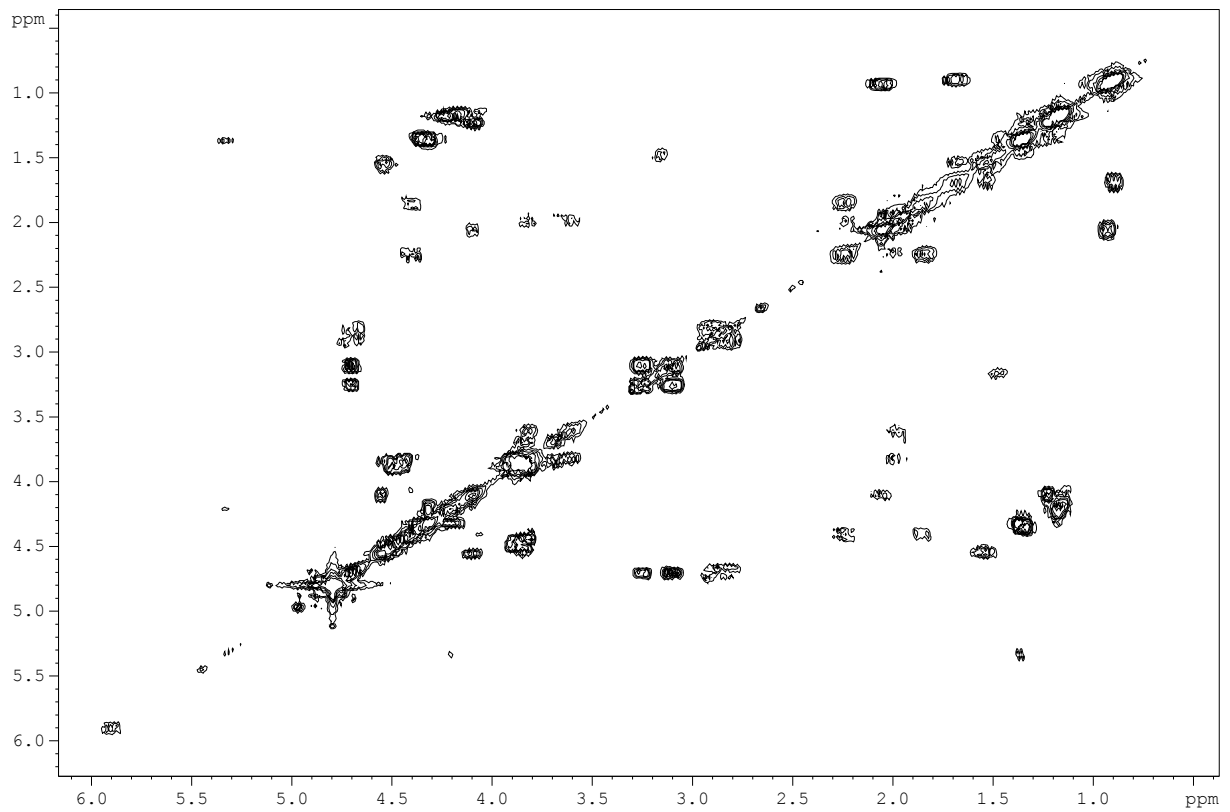
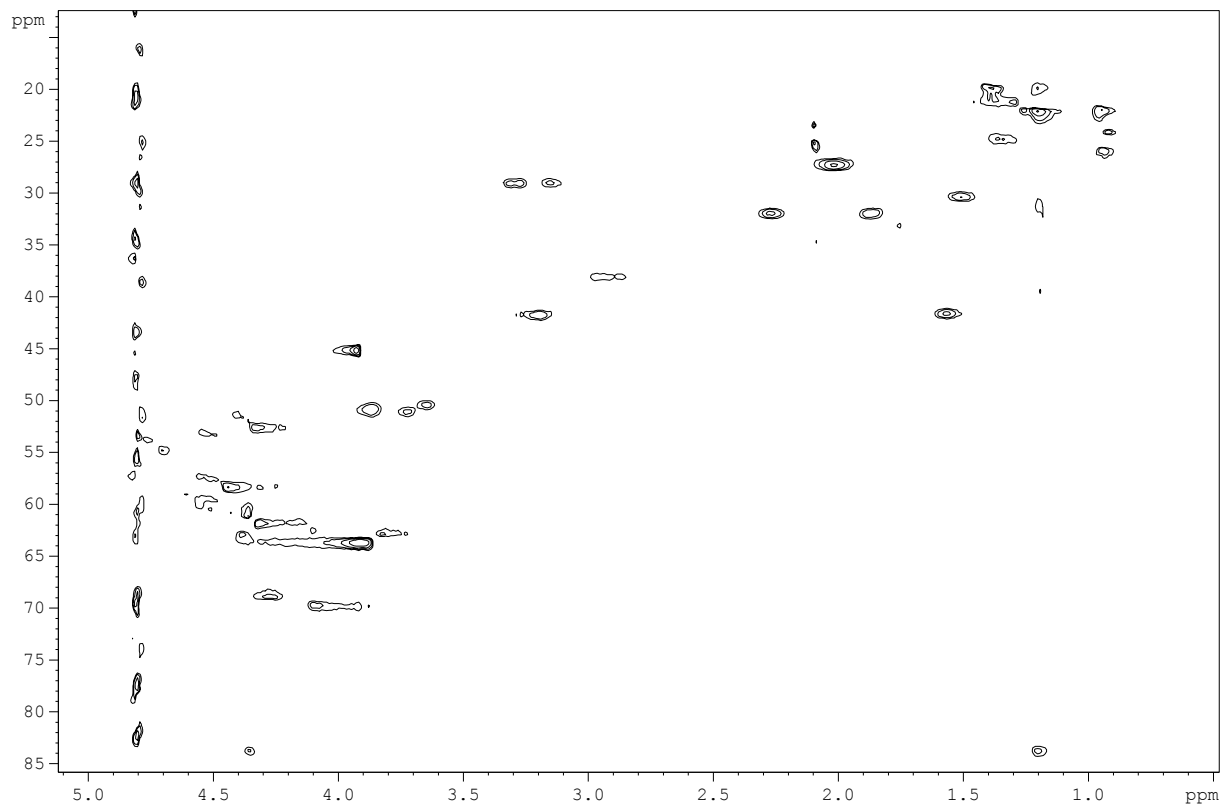
Maldi-TOF-Spektrum von (53)

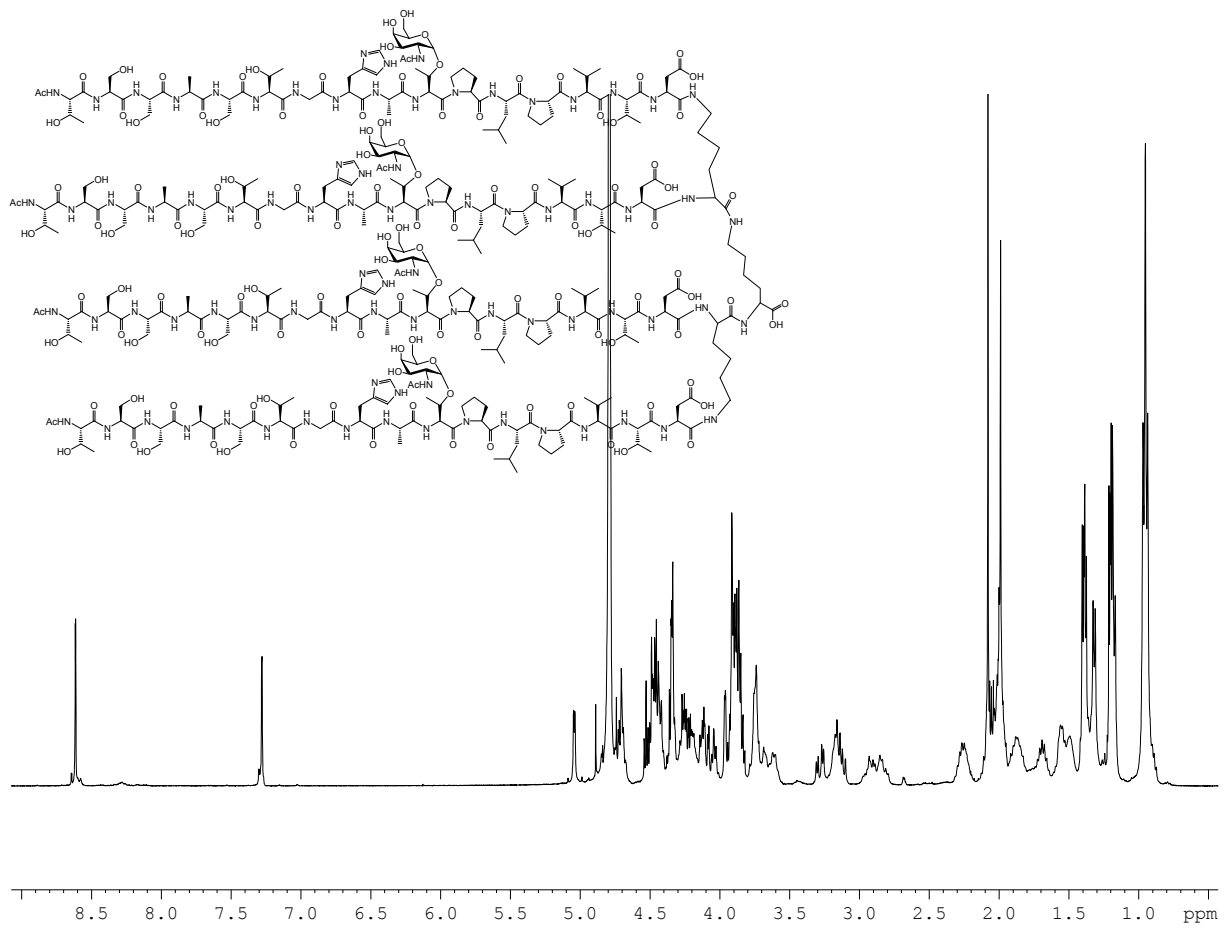
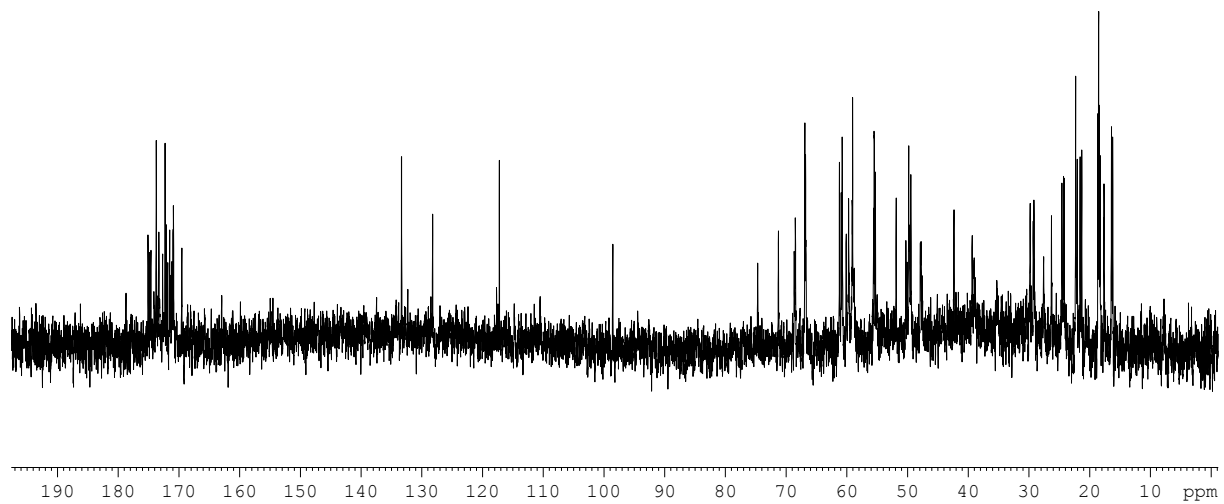


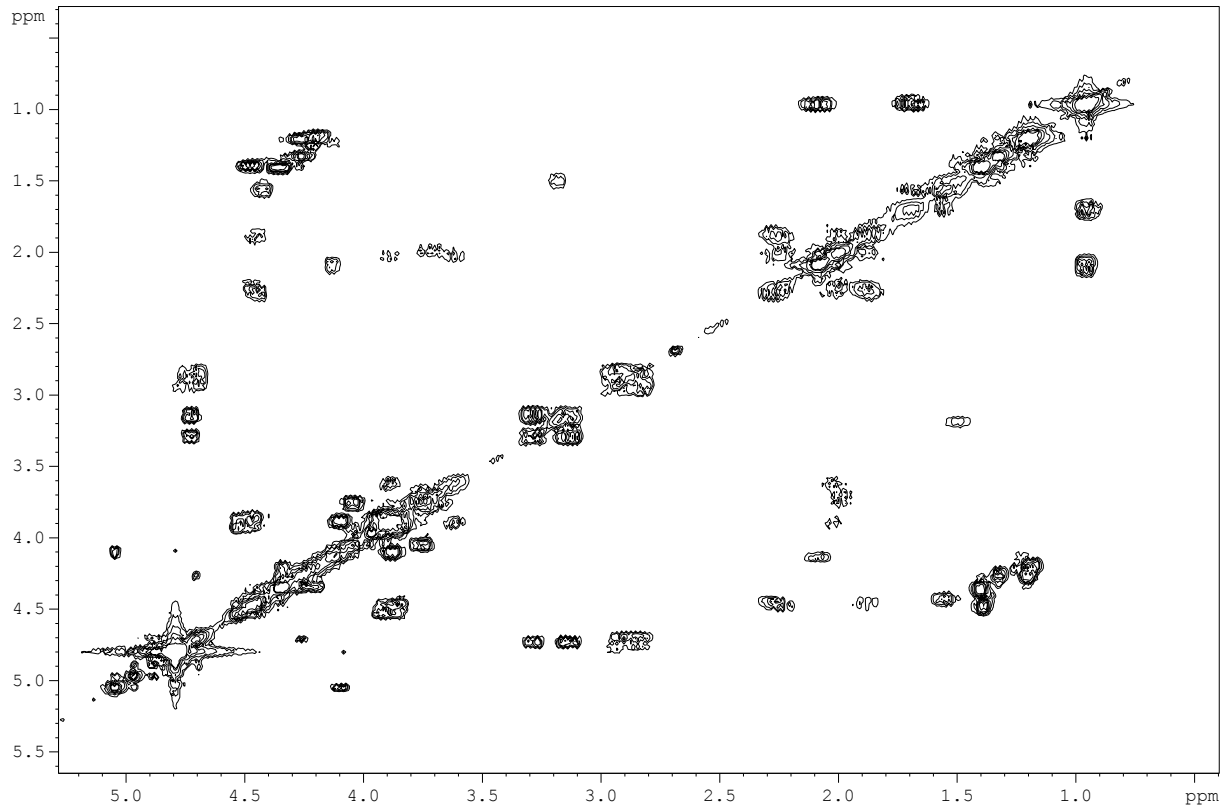
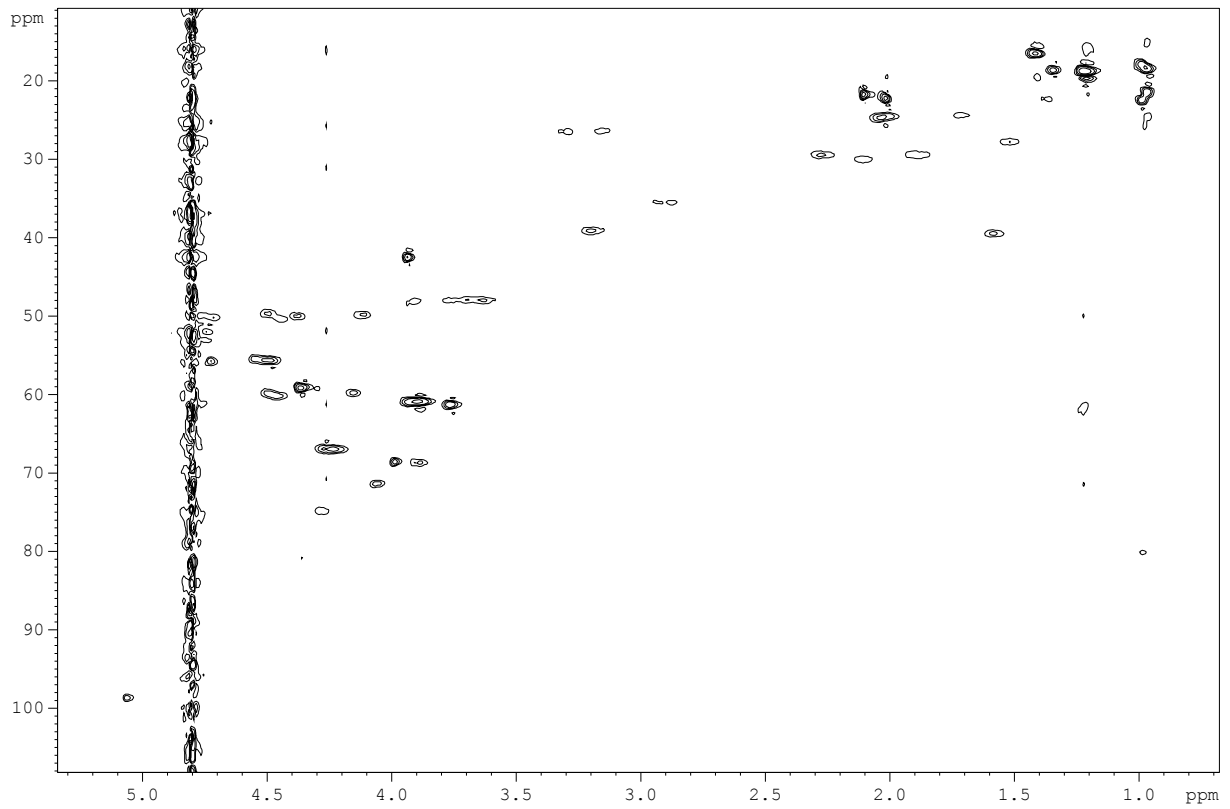
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) von (62) **$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, D_2O)**

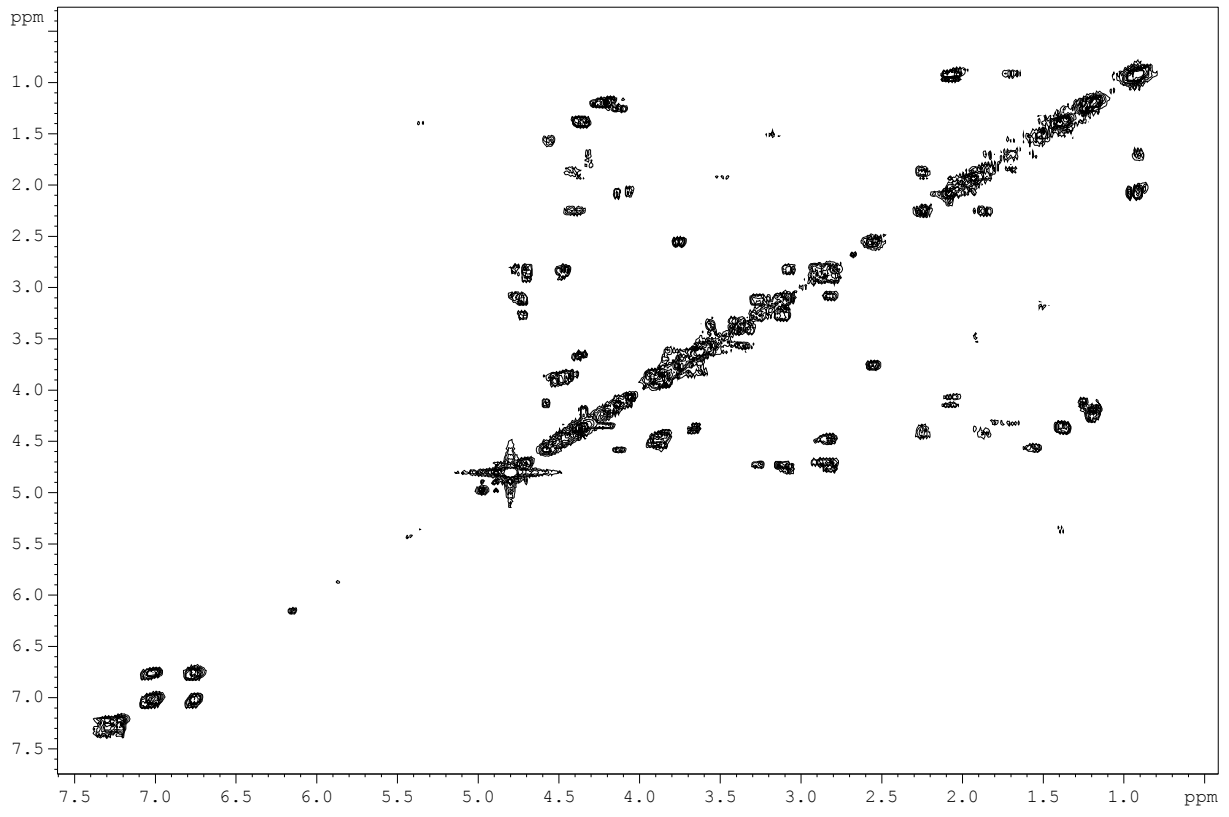
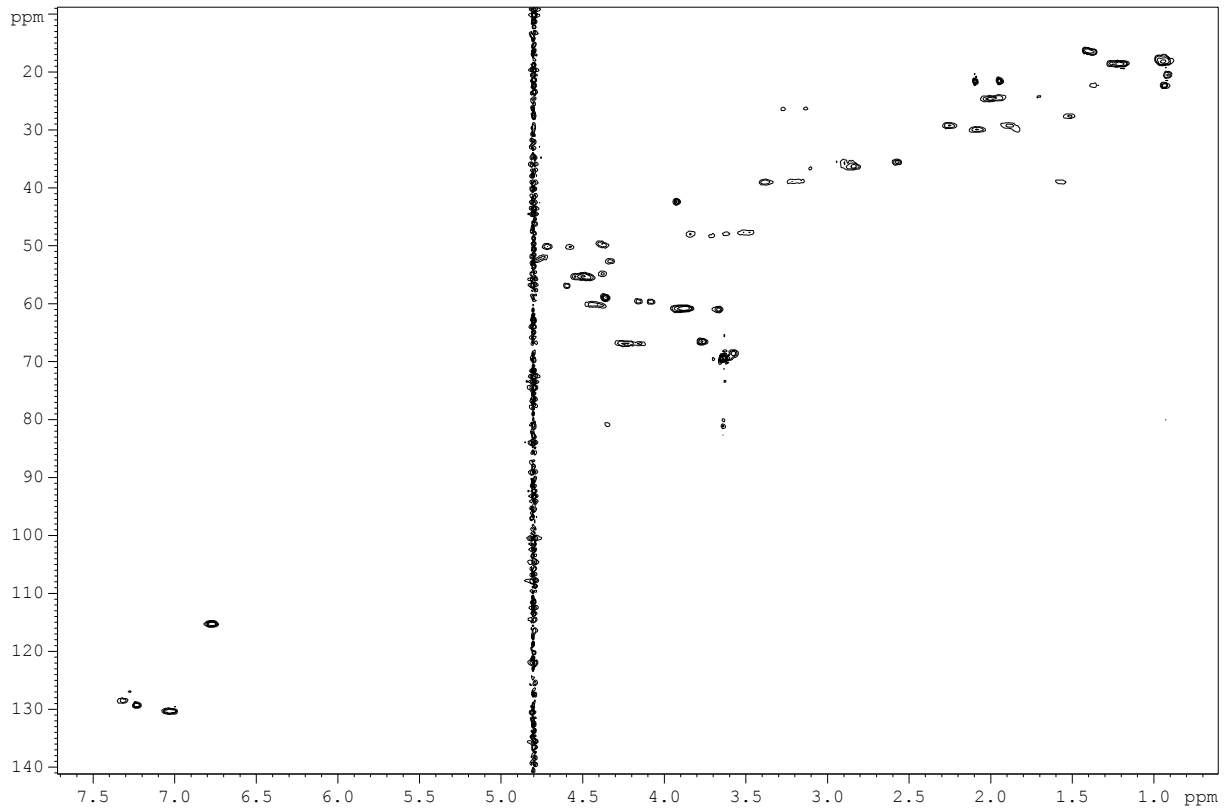
^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

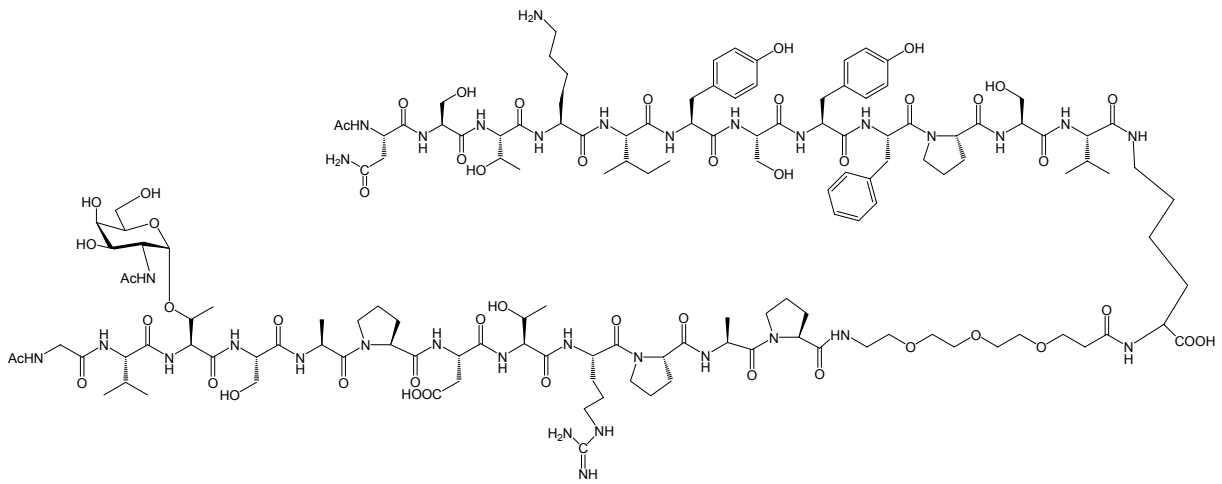
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) von (63) **$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, D_2O)**

^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

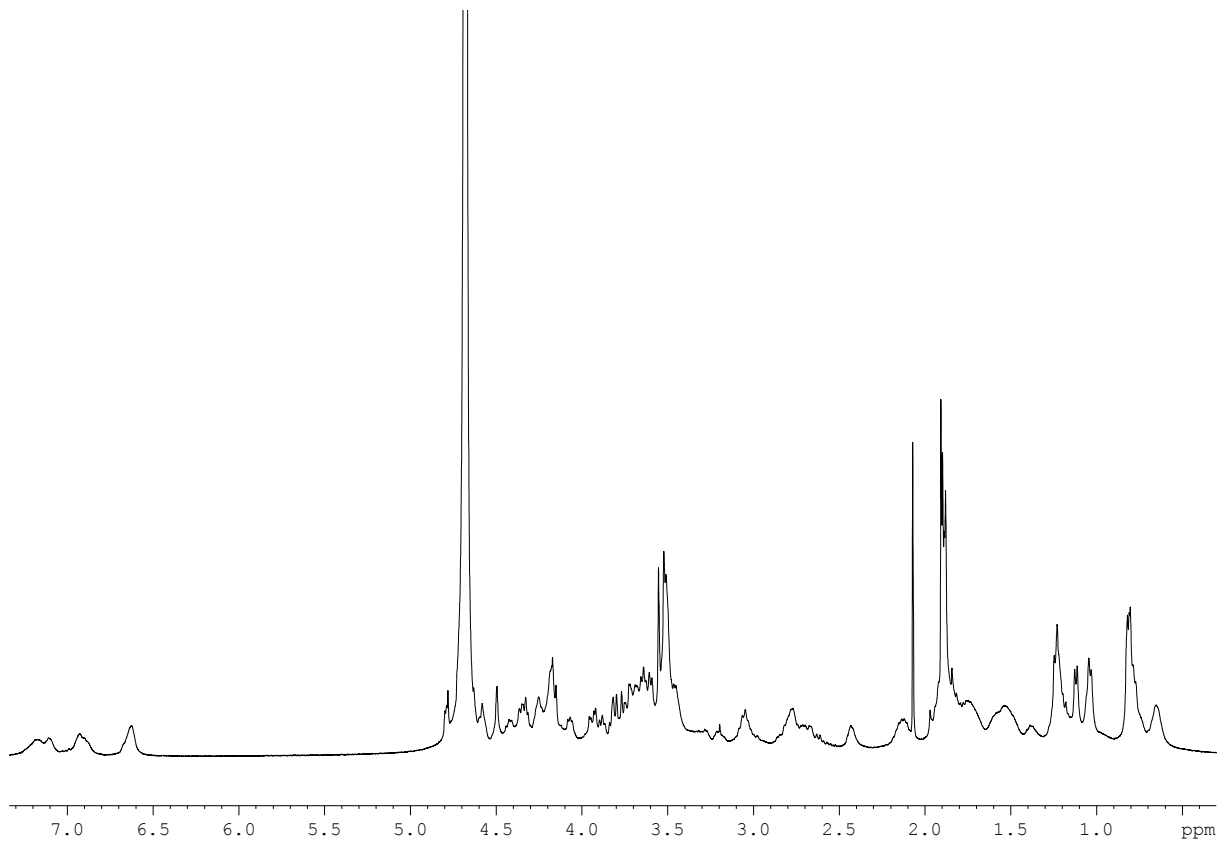
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) von (65) **$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, D_2O)**

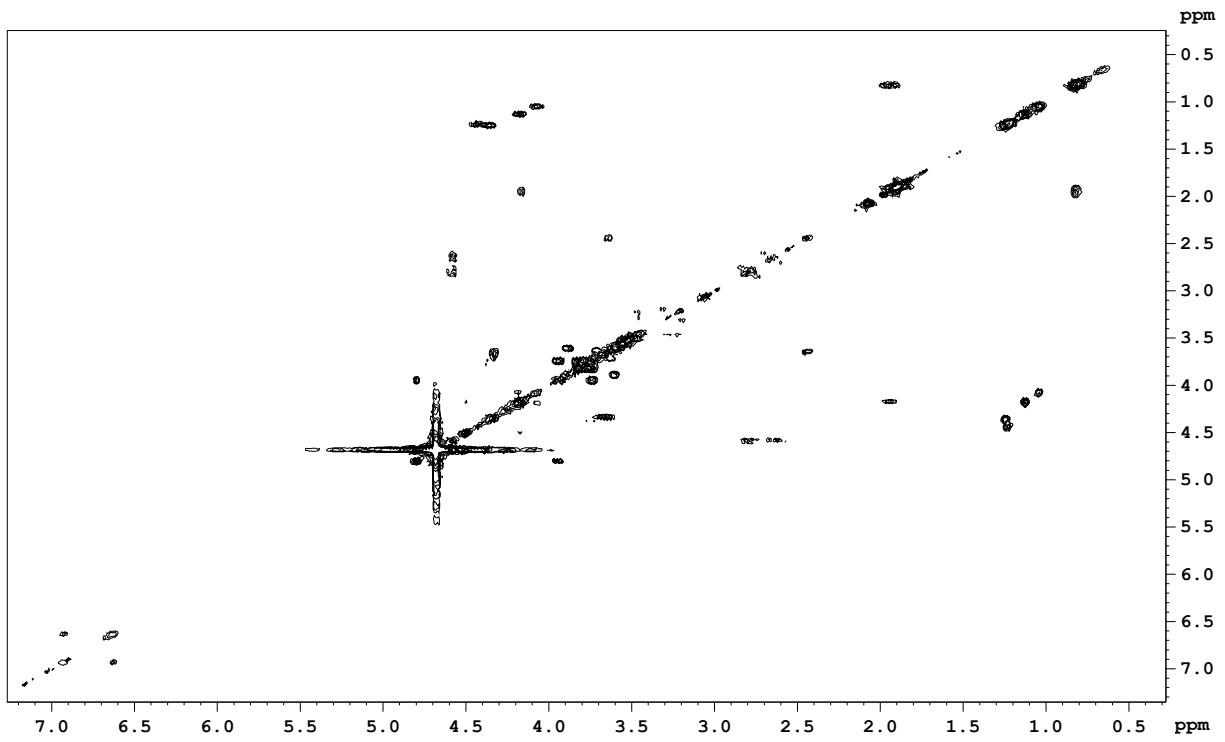
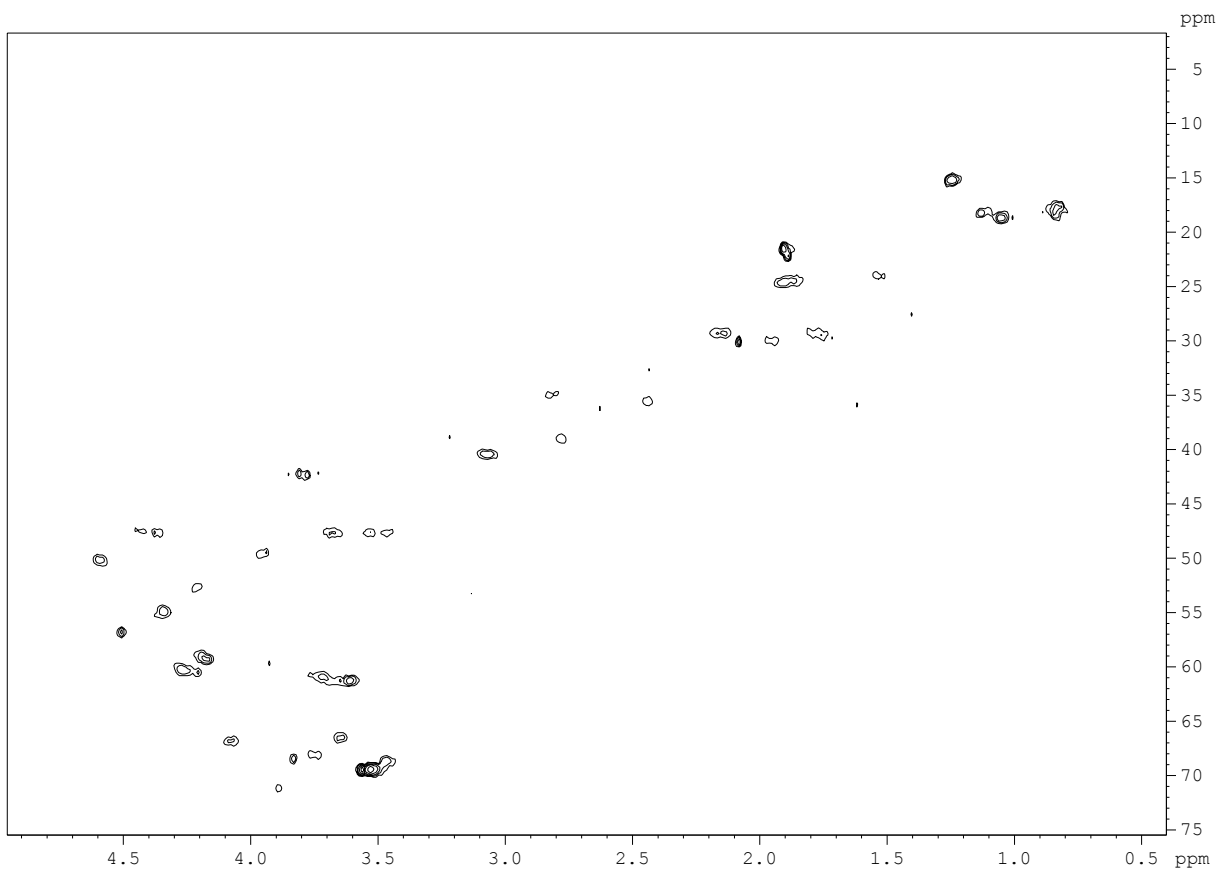
^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

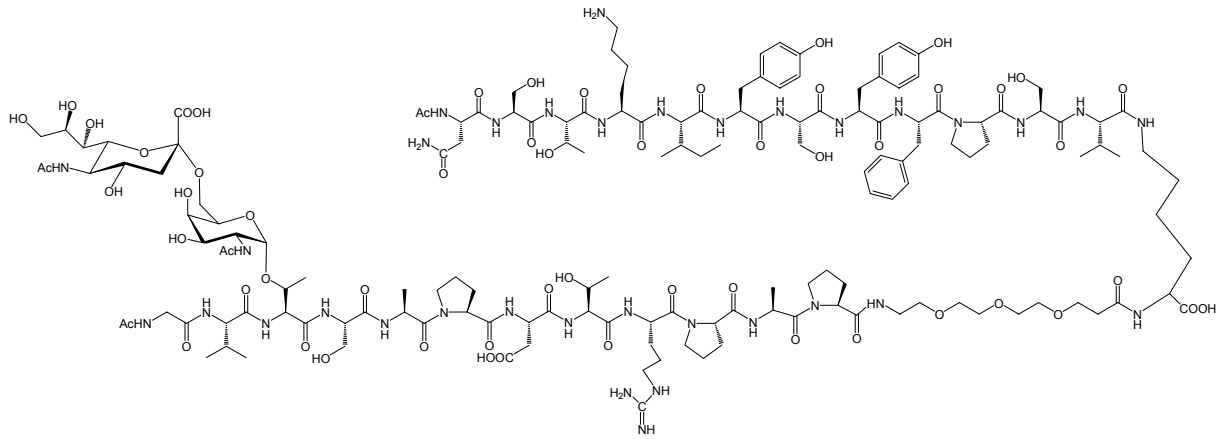
^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC



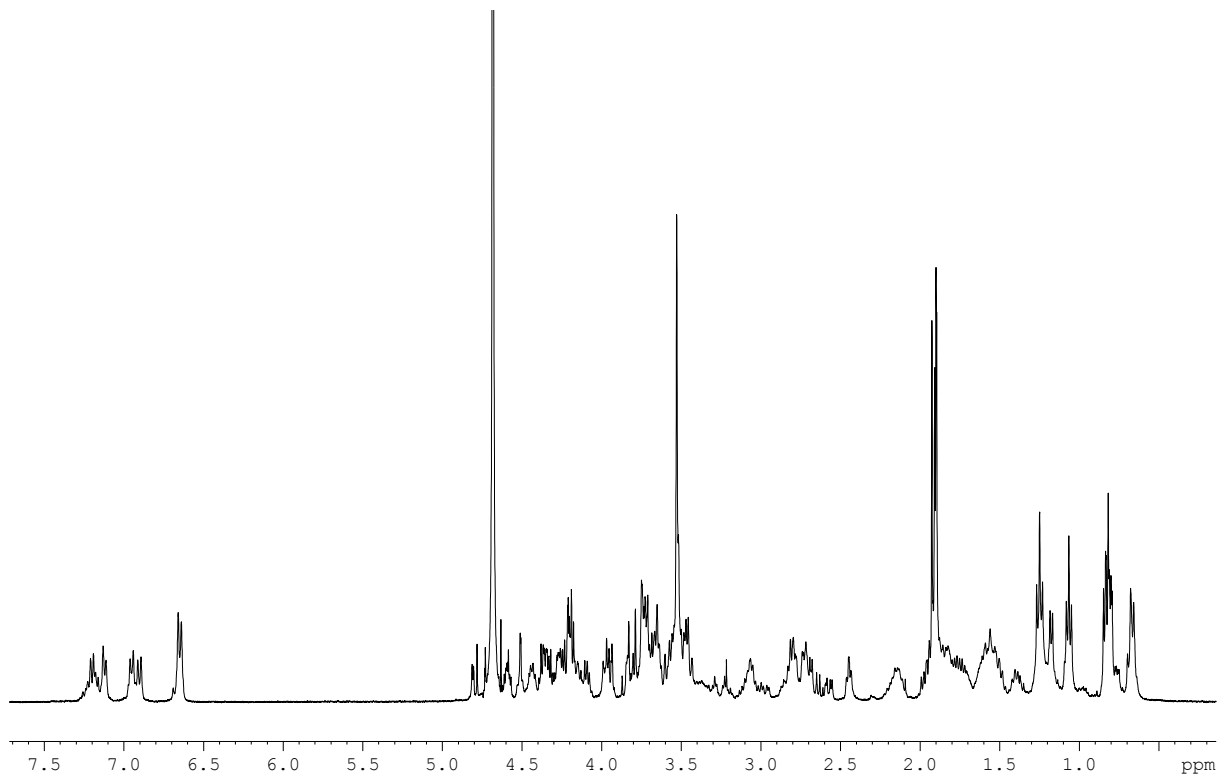
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) von (78)

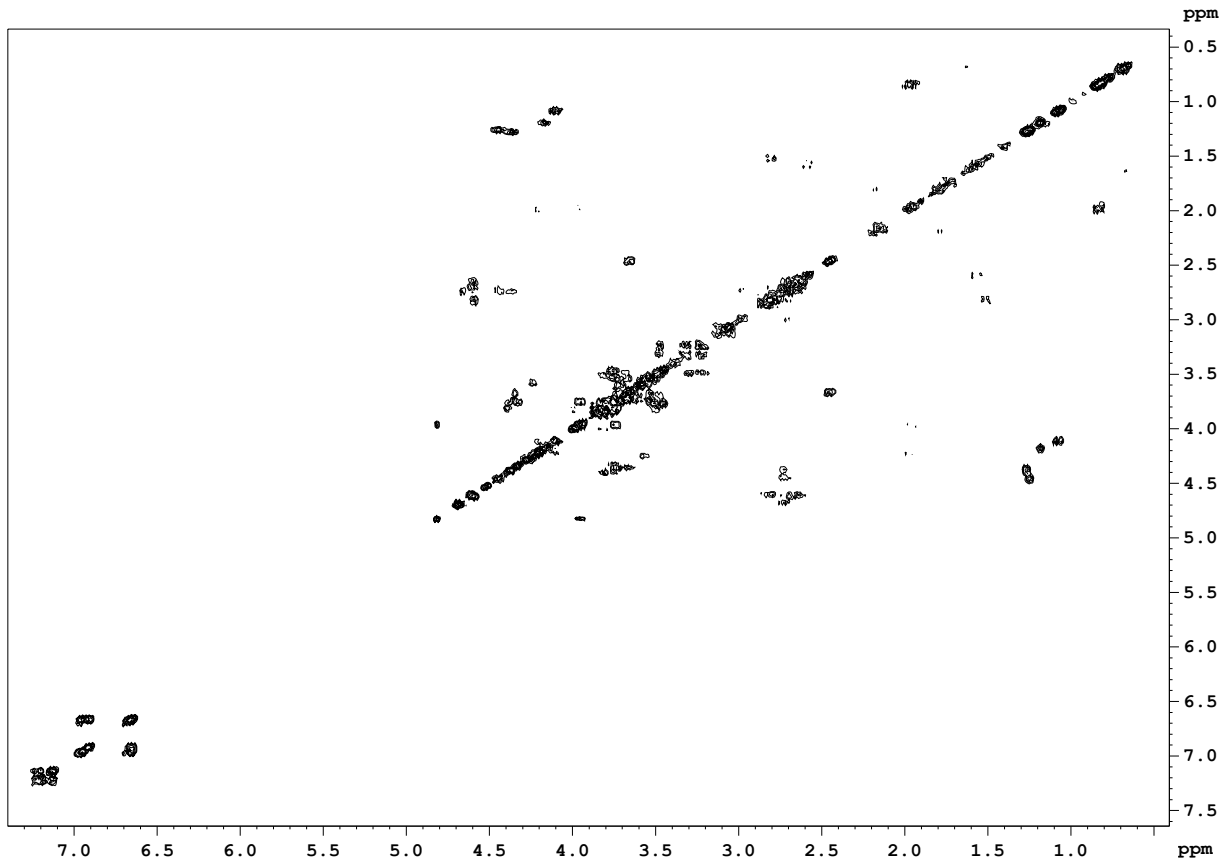
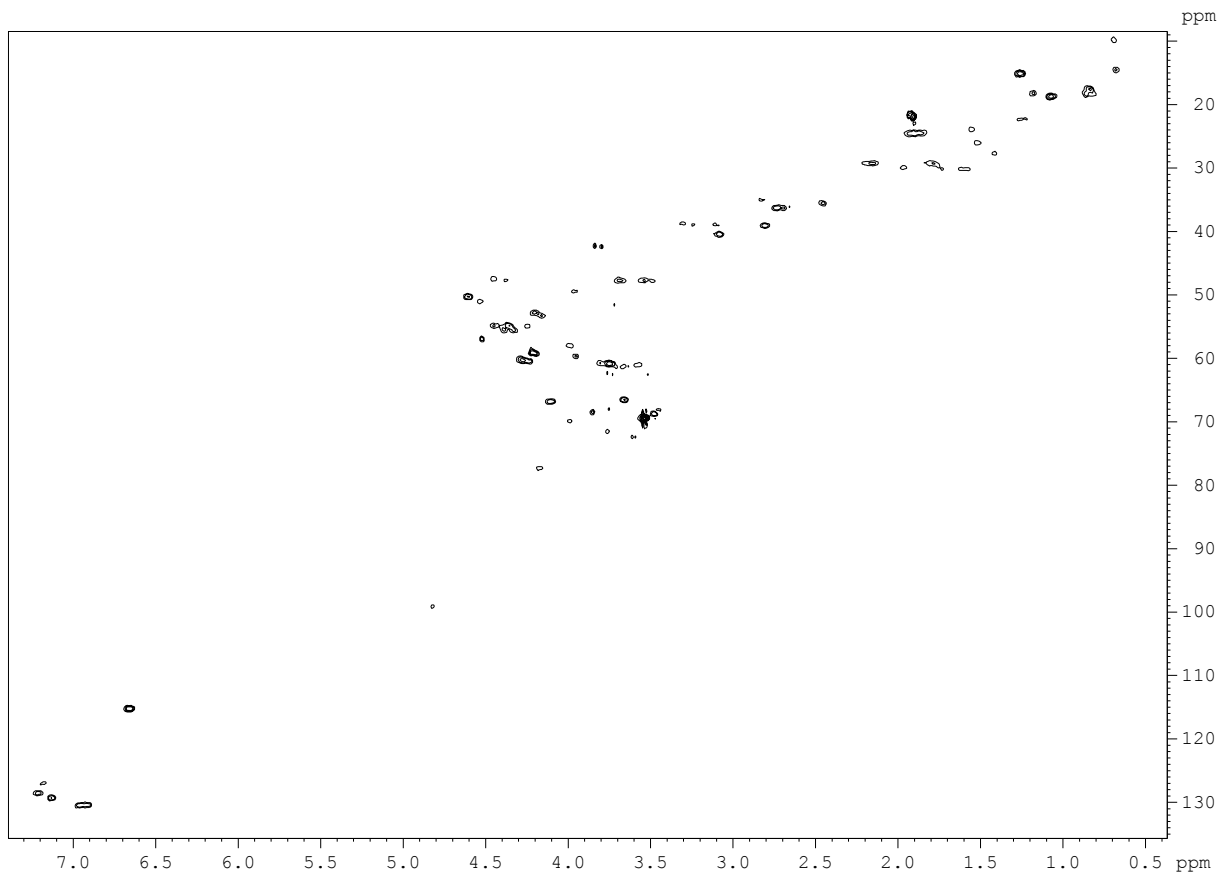


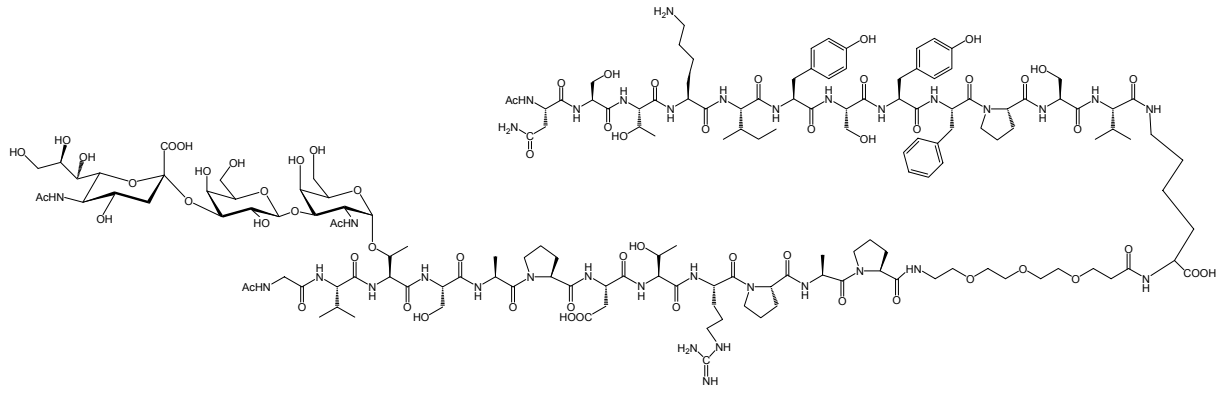
^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC



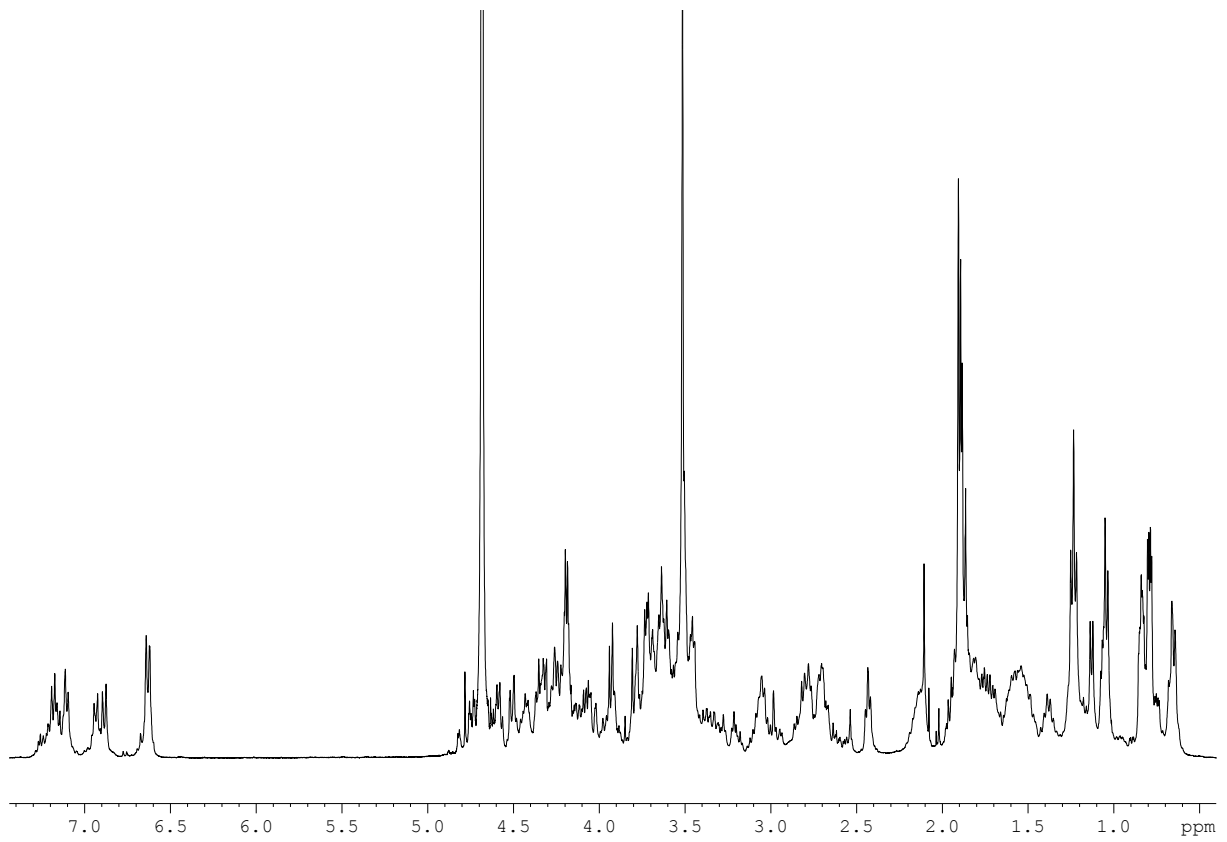
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) von (80)

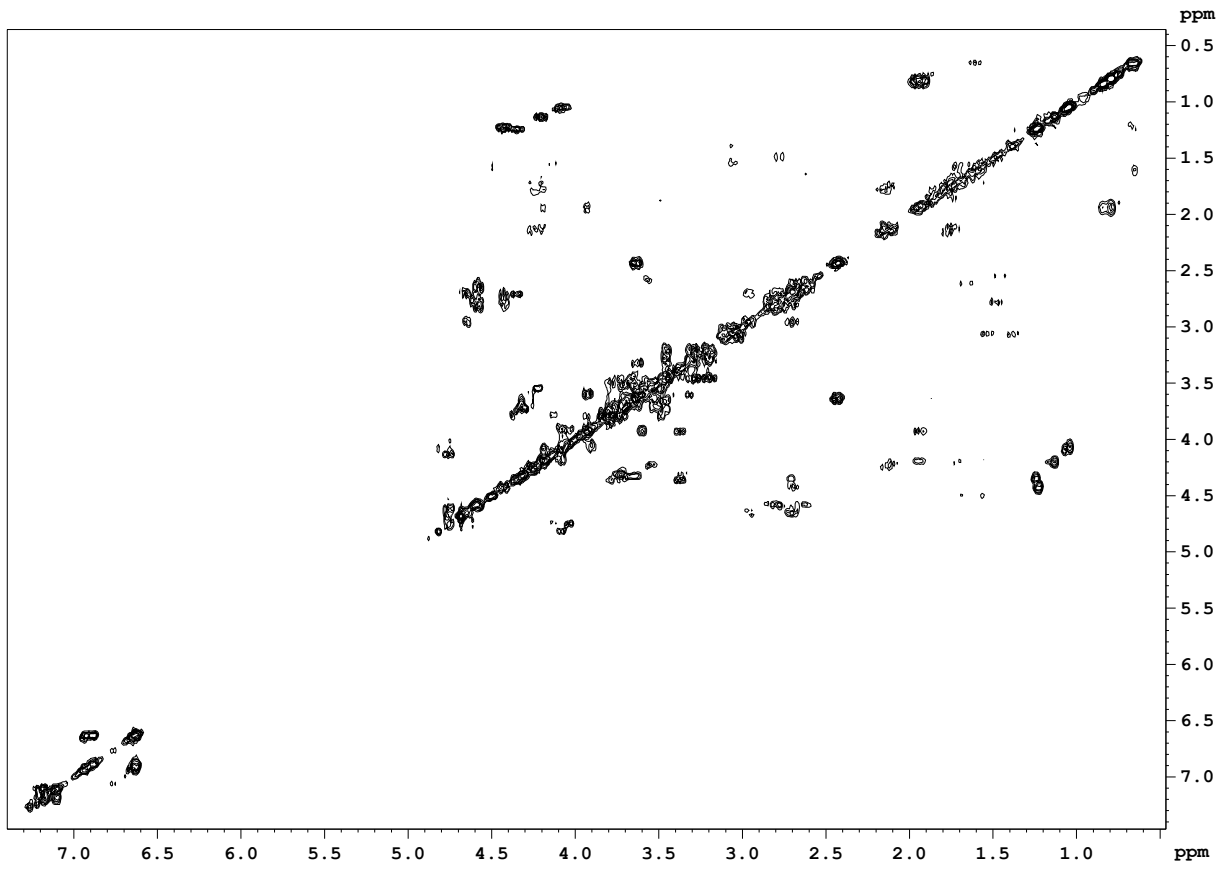
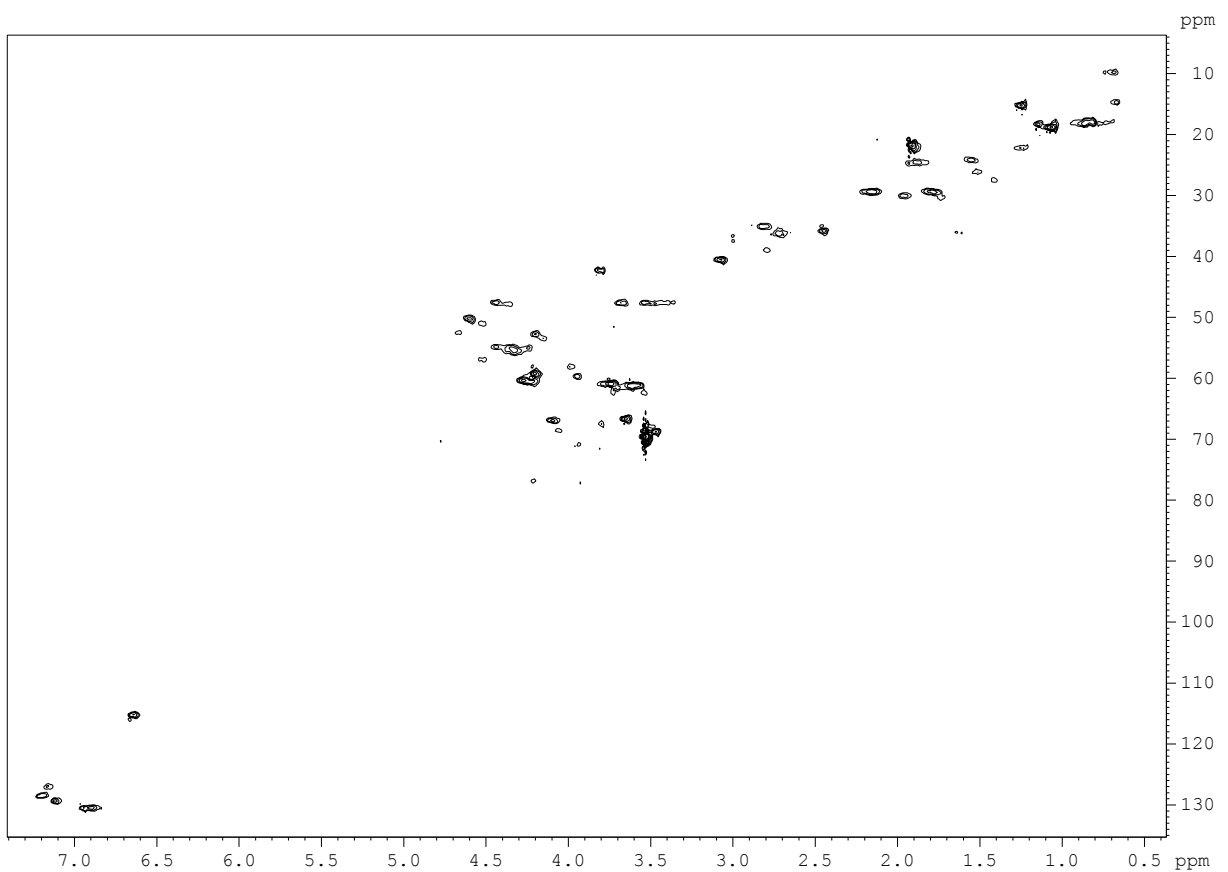


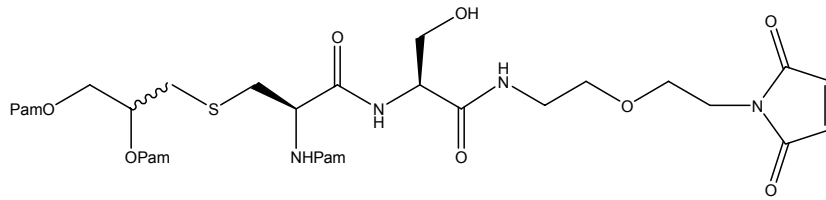
^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC



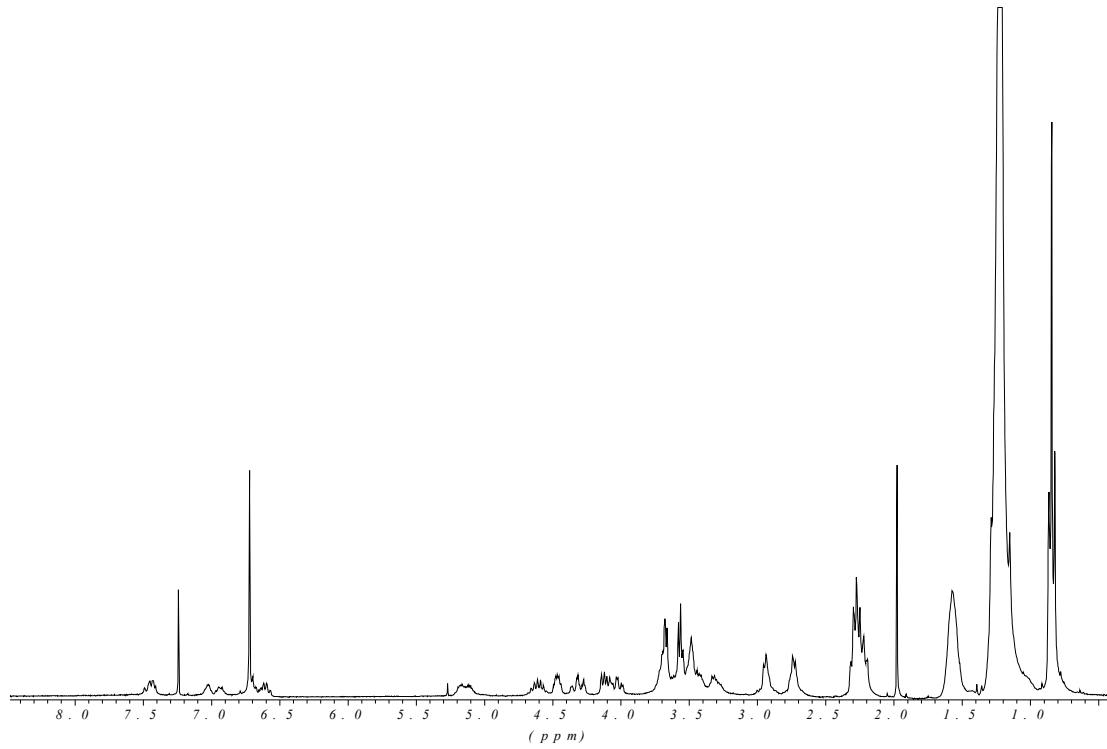
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) von (82)



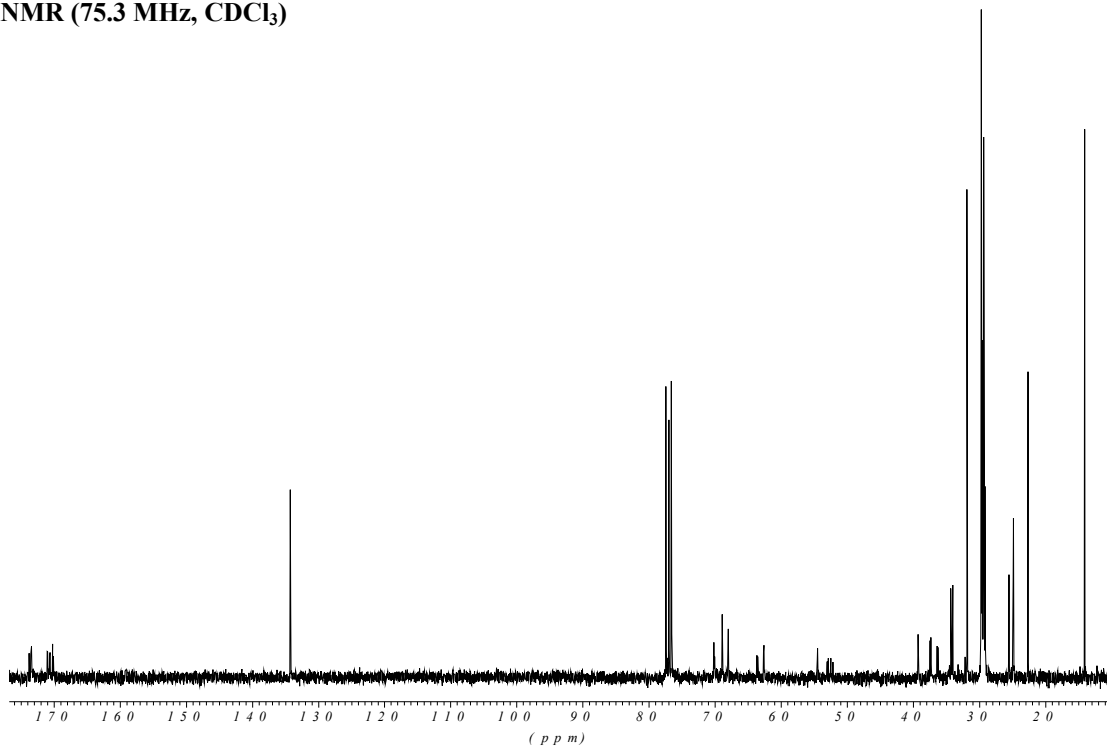
^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

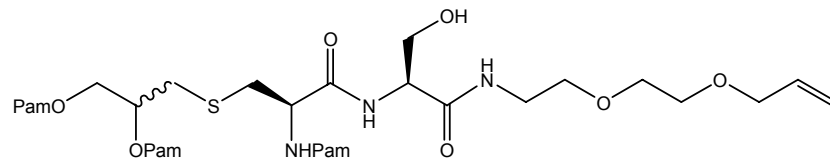
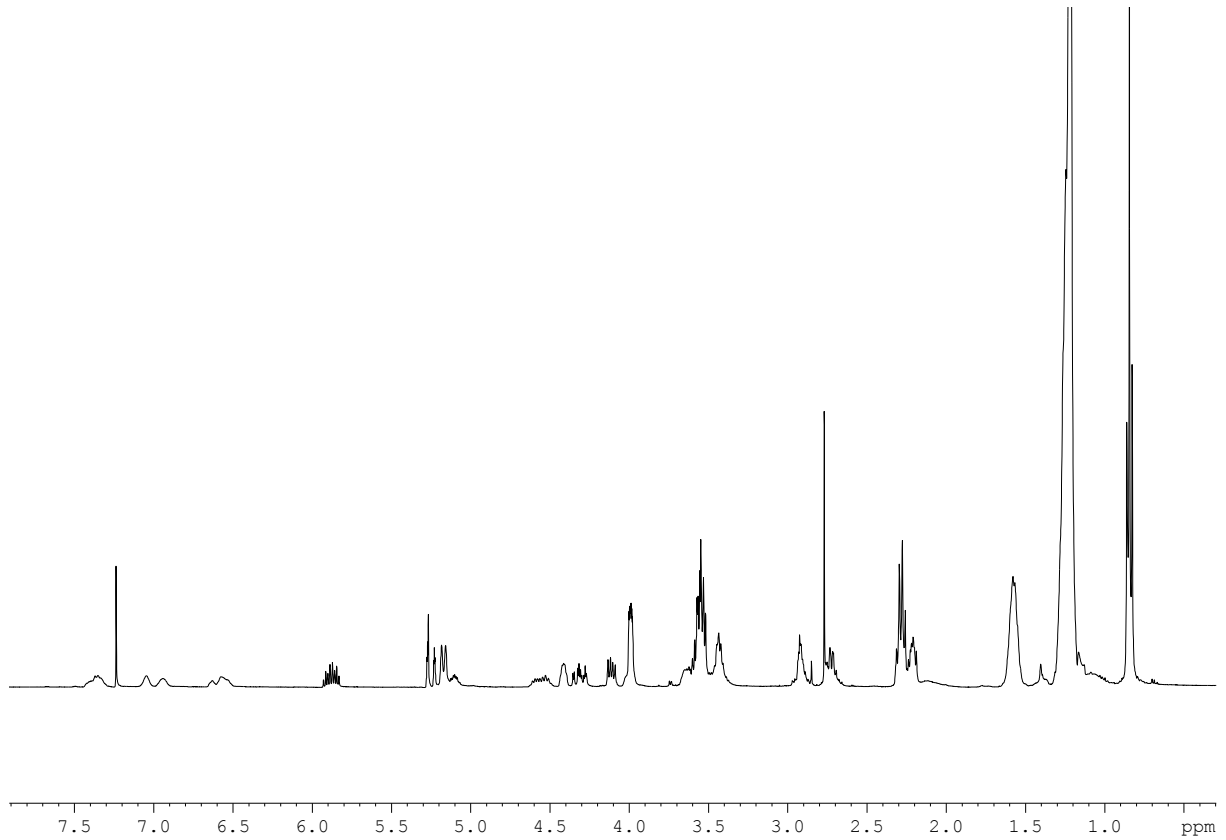
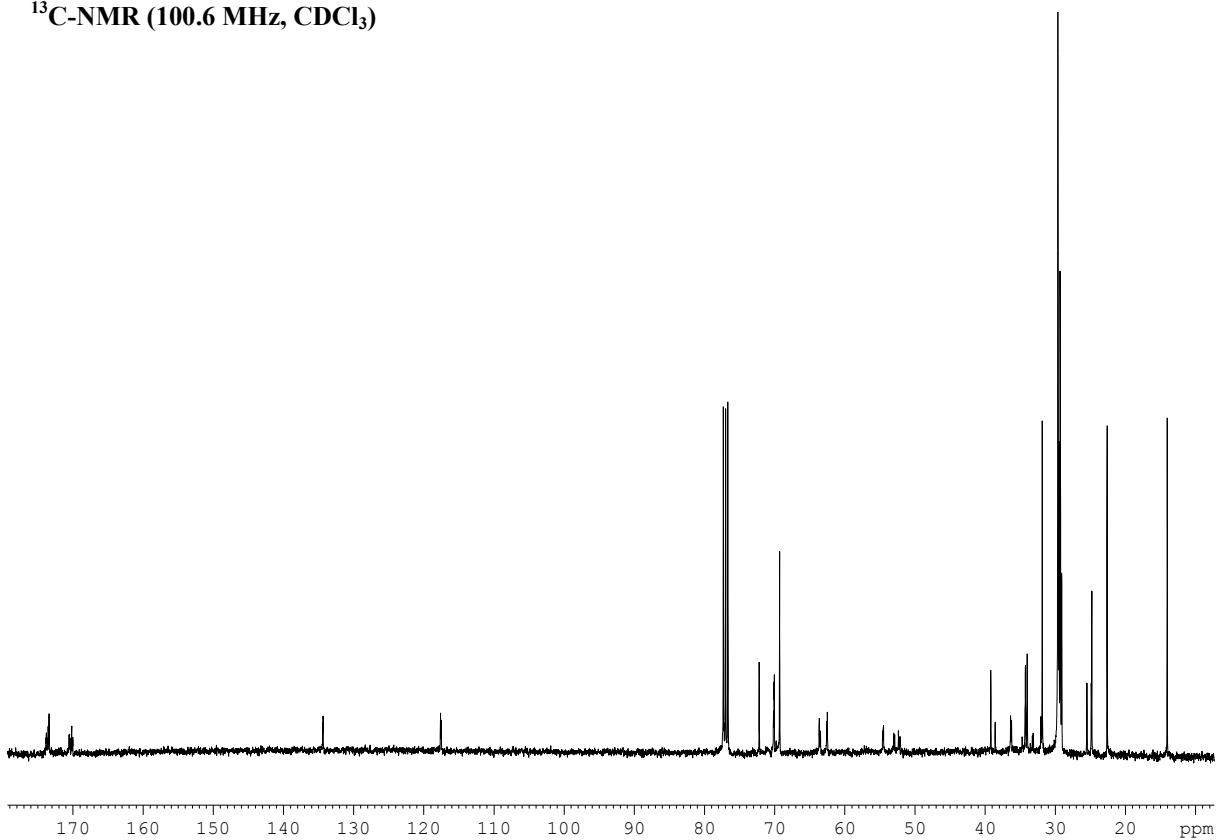


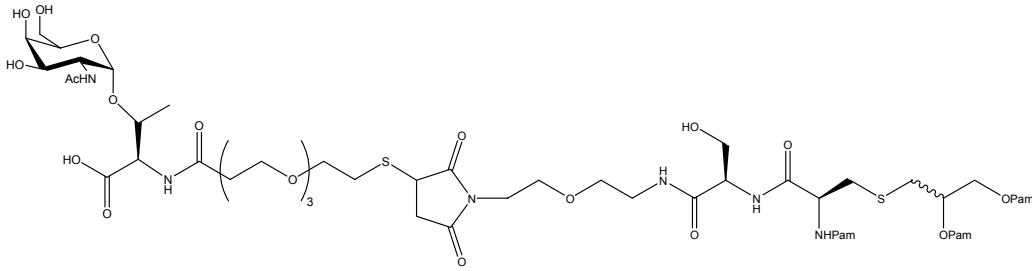
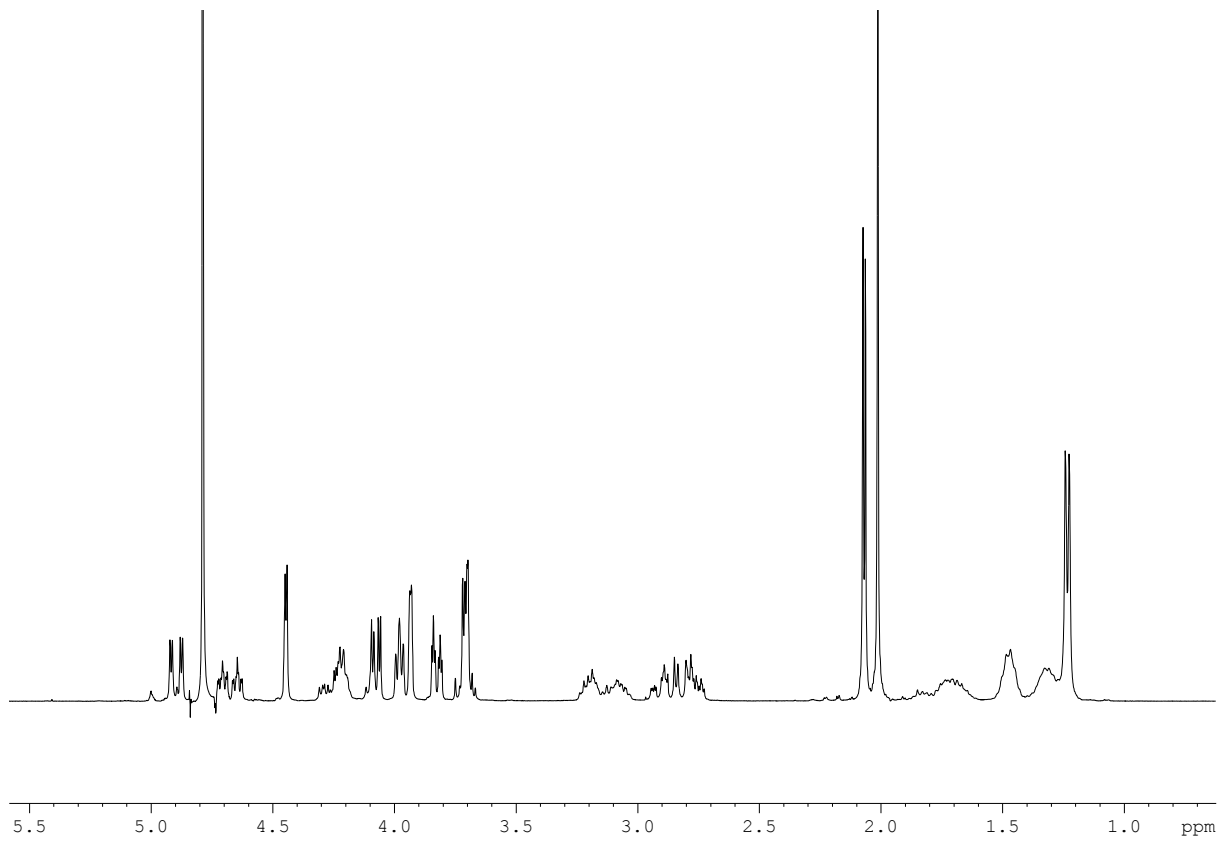
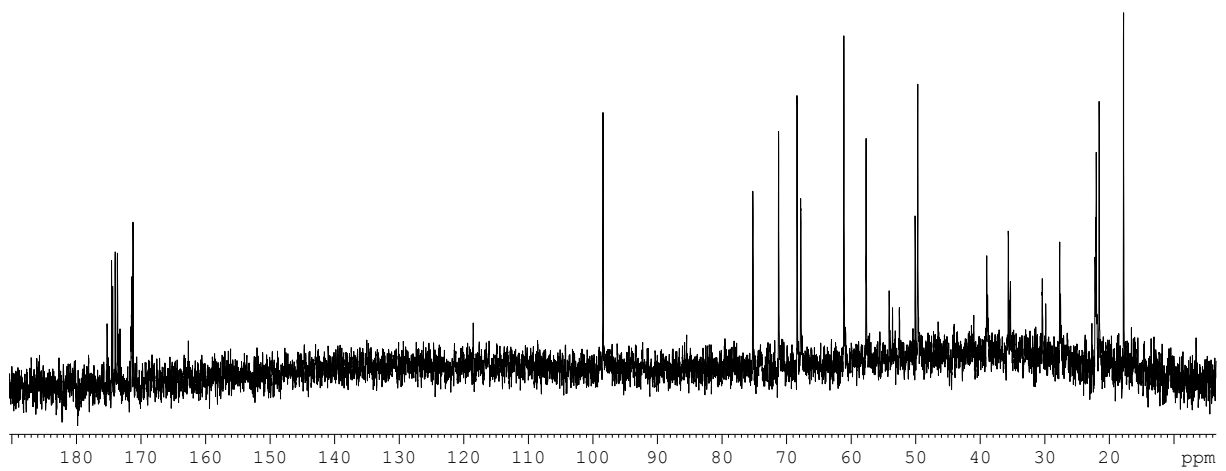
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) von (105)

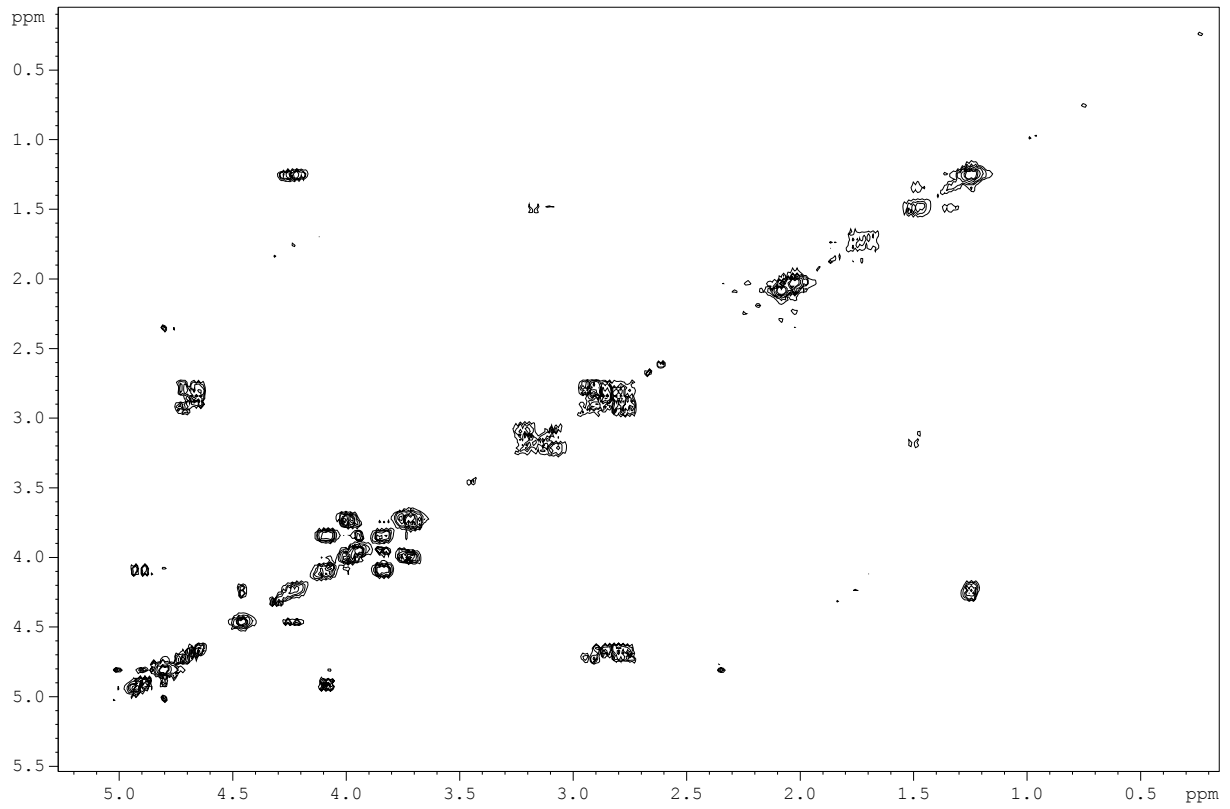
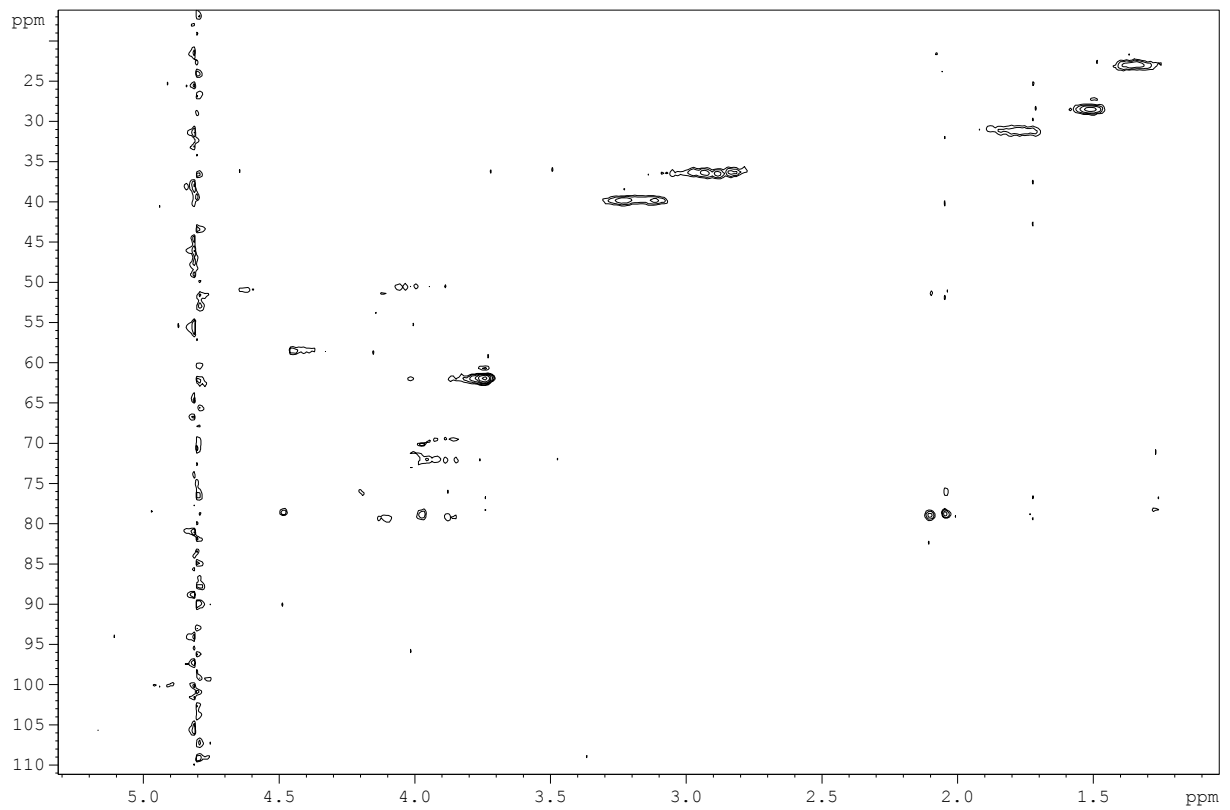


$^{13}\text{C-NMR}$ (75.3 MHz, CDCl_3)



**¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) von (107)****¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃)**

 **$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$) von (111)** **$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$)**

^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Torsten Becker
Anschrift	Kästrich 23 55116 Mainz
Geburtsdatum	16.04.1977 in Mainz
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1983 - 1987	Heinrich-Mumbächer Grundschule, Mainz-Bretzenheim
1987 – 1996	Gutenberg-Gymnasium, Mainz
Sommer 1996	Abitur

Zivildienst

09/1996 – 09/1997	Rettungsdienst, Arbeiter-Samariter-Bund Mainz, Ausbildung zum Rettungssanitäter
-------------------	--

Studium

10/1997 – 09/2002	Studium Diplom-Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
24.08.1999	Diplomvorprüfung in Chemie
08/2000 – 03/2001	Auslandssemester im Rahmen des Integrierten Auslandsstudiums des DAAD, Kyoto University (Japan) bei Prof. T. Hiyama
10/2001 – 09/2002	Diplomarbeit bei Prof. H. Kunz Thema: „ <i>Radikalische Kupplung von Peptiden an mit olefinischen Abfängern belegtes Protein</i> “
27.08.2002	Diplom im Fach Chemie, Nebenfach Makromolekulare Chemie

seit 10/2002 Dissertation bei Prof. H. Kunz
Thema: „*Synthese tumorassoziierter Glycopeptidkonjugate basierend auf den epithelialen Mucinen MUC1 und MUC4 als potentielle Antitumorvakzine*“

12/2002 - 10/2004 Postgradualstudium „Analytik und Spektroskopie“, Universität
Leipzig
Abschluss: „Fachchemiker für Analytik und Spektroskopie“

Lehrtätigkeit

seit 10/2002 Assistent am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz; Betreuung von Übungen sowie Grund- und
Fortgeschrittenpraktika der Organischen Chemie

Veröffentlichungen

M. Shimizu, K. Watanabe, H. Nakagawa, T. Becker, S. Sugimoto, T. Hiyama, “*1-Aryl-substituted cage molecules $ArC(SiMe_2SiMe_2)_3CR$: Preparation, properties and application to liquid crystalline compounds*”, *Chem. Lett.* **2001**, 1090

T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H.Kunz, „*Synthetic glycopeptides from the mucin family as targets in cancer immunotherapy*“, *Current cancer drug targets*, im Druck