

**SYNTHESE UND KONFORMATIONSANALYSE VON
GLYCOPEPTIDEN AUS DER HOMOPHILEN
ERKENNUNGSREGION DES LI-CADHERINS**

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

Axel Kuhn
geboren in Wiesbaden

Mainz, März 2005

Dekan: ***

1. Berichterstatter: ***

2. Berichterstatter: ***

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von November 2001 bis Dezember 2004
am Institut für Organische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
unter Anleitung von Herrn *** angefertigt.

FÜR MEINE ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	GLYCOPROTEINE, GLYCOPEPTIDE	1
1.2	TUMORASSOZIIERTE ANTIGENE	2
1.3	DIE ZELLADHÄSION	4
1.4	CADHERINE	5
1.4.1	<i>Das E-Cadherin</i>	6
1.4.2	<i>Das LI-Cadherin</i>	11
1.5	DIE FESTPHASENSYNTHESE	14
1.6	MM2 - DAS KRAFTFELD	16
1.6.1	<i>Das Kraftfeld</i>	16
1.6.2	<i>MM2</i>	17
2	KONZEPTION UND ZIELSETZUNG	21
3	ALLGEMEINER TEIL	23
3.1	SYNTHESEN DER GLYCOSYLIERTEN SERIN-BAUSTEINE	23
3.1.1	<i>Synthese des T_N-Antigen-Bausteins</i>	24
3.1.2	<i>Synthese des T-Antigen-Bausteins</i>	28
3.1.3	<i>Synthese des (2 \rightarrow6)-Sialyl-T_N-Antigen-Bausteins</i>	33
3.1.4	<i>Synthese des (2 \rightarrow3)-Sialyl-T-Antigen-Bausteins</i>	37
3.1.5	<i>Synthese des (2 \rightarrow6)-Sialyl-T-Antigen-Bausteins</i>	43
3.1.6	<i>Synthese des Glycophorin-Antigen-Bausteins</i>	47
3.2	DARSTELLUNG DER PTMSEL-ANKER	48
3.2.1	<i>Synthese der Anker-Vorstufen</i>	48
3.2.2	<i>Verknüpfung mit den Aminosäuren</i>	49
3.3	FESTPHASENSYNTHESEN DER PEPTIDE UND GLYCOPEPTIDE	51
3.3.1	<i>Allgemeine Überlegungen zur Festphasensynthese und deren Protokolle</i>	51
3.3.2	<i>Untersuchung der Verwendbarkeit des PTMSEL Ankers</i>	53
3.3.3	<i>Evaluierung der Zielsequenz</i>	57
3.3.4	<i>Synthese des Undekapeptids</i>	67
3.3.5	<i>Synthese des mit dem T_N-Antigen glycosylierten Undekapeptids</i>	68
3.3.6	<i>Synthese des mit dem T-Antigen glycosylierten Undekapeptids</i>	70
3.3.7	<i>Synthese des (2 \rightarrow6)-Sialyl-T_N-Antigen glycosylierten Undekapeptids</i>	72
3.3.8	<i>Synthese des mit dem (2 \rightarrow6)-Sialyl-T-Antigen glycosylierten Undekapeptids</i>	73
3.3.9	<i>Synthese des mit dem (2 \rightarrow3)-Sialyl-T-Antigen glycosylierten Undekapeptids</i>	75
3.3.10	<i>Synthese des mit dem Disialyl-T-Antigen glycosylierten Undekapeptids</i>	79
3.4	SYSTEMATISCHE NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN DER RÄUMLICHEN STRUKTUR DER SYNTHETISIERTEN (GLYCO-)PEPTIDE	81
3.4.1	<i>Energieminimierte Struktur des Undekapeptids</i>	89
3.4.2	<i>Energieminimierte Struktur des mit dem T_N-Antigen glycosylierten Undeka- und Nonapeptids</i>	90

3.4.3	<i>Energieminimierte Struktur des T-Antigen-Undekapeptids</i>	95
3.4.4	<i>Energieminimierte Struktur des (2 →6)-Sialyl-T_N-Antigen-Undekapeptids</i>	97
3.4.5	<i>Energieminimierte Struktur des (2 →6)-Sialyl-T-Antigen-Undekapeptids</i>	100
3.4.6	<i>Energieminimierte Struktur des (2 →3)-Sialyl-T-Antigen-Undekapeptids</i>	103
3.4.7	<i>Energieminimierte Struktur des Glycophorin-Antigen-Undekapeptids</i>	108
3.4.8	<i>Vergleich der Diederwinkel und Chemical Shift Deviation-Werte</i>	110
4	ZUSAMMENFASSUNG	112
5	EXPERIMENTELLER TEIL	120
5.1	ALLGEMEINES UND MESSGERÄTE.....	120
5.2	SYNTHESE DER SACCHARIDBAUSTEINE	125
5.2.1	<i>Synthesen zum Kapitel 3.1</i>	125
5.2.2	<i>Synthesen zum Kapitel 3.1.1</i>	127
5.2.3	<i>Synthesen zum Kapitel 3.1.2</i>	135
5.2.4	<i>Synthesen zum Kapitel 3.1.3</i>	144
5.2.5	<i>Synthesen zum Kapitel 3.1.4</i>	150
5.2.6	<i>Synthesen zum Kapitel 3.1.5</i>	163
5.2.7	<i>Synthesen zum Kapitel 3.1.6</i>	171
5.3	SYNTHESEN DER PTMSEL-ANKERSYSTEME	175
5.3.1	<i>Synthesen zum Kapitel 3.2.1</i>	175
5.3.2	<i>Synthesen zum Kapitel 3.2.2</i>	177
5.4	AUTOMATISIERTE FESTPHASENSYNTHESE.....	182
5.4.1	<i>Allgemeines Kupplungsprotokoll</i>	182
5.4.2	<i>Synthesen zum Kapitel 3.3.2</i>	182
5.4.3	<i>Synthesen zum Kapitel 3.3.3</i>	186
5.4.4	<i>Synthesen zum Kapitel 3.3.4</i>	195
5.4.5	<i>Synthesen zum Kapitel 3.3.5</i>	196
5.4.6	<i>Synthesen zum Kapitel 3.3.6</i>	201
5.4.7	<i>Synthesen zum Kapitel 3.3.7</i>	205
5.4.8	<i>Synthesen zum Kapitel 3.3.8</i>	209
5.4.9	<i>Synthesen zum Kapitel 3.3.9</i>	212
5.5	MANUELLE FESTPHASENSYNTHESE	216
5.5.1	<i>Allgemeines Kupplungsprotokoll</i>	216
5.5.2	<i>Synthesen zum Kapitel 3.3.9</i>	217
5.5.3	<i>Synthesen zum Kapitel 3.3.10</i>	219
6	LITERATURVERZEICHNIS	223
7	SPEKTRENANHANG	228
7.1	SUBSTANZENKATALOG.....	228
7.2	SPEKTREN.....	232

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$[\alpha]_D^{22}$	spezifischer Drehwert bei 22 °C	Fmoc	9- <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl
absol.	absolut	Gal	D-Galactose
Abb.	Abbildung	GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
Ac	Acetyl	ges.	gesättigt, innerhalb von Formeln: geschützt
AcOH	Essigsäure	HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphat
AMPS	Aminomethylpolystyrol	HBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphat
Äquiv	Äquivalent(e)	HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
arom.	aromatisch	HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
AS	Aminosäure	HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
Ausb.	Ausbeute	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
BB	Breitband	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ber.	berechnet	HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Bn	Benzyl	Hz	Hertz
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	<i>i</i> Pr	Isopropyl
Bzn	Benzyliden	i. Vak.	im Vakuum
<i>c</i>	Konzentration	<i>J</i>	Kopplungskonstante
CAD	Cadherin	kat.	katalytisch
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>	konz.	konzentriert
CPBA	Chlorperbenzoesäure	λ	Wellenlänge
CSD	<i>Chemical Shift Deviation</i>	LI-Cadherin	(Liver and Intestine) Leber- und Darm-Cadherin
d	Dublett	Lit.	Literaturangabe
δ	chemische Verschiebung	m	Multiplett
DC	Dünnschichtchromatographie;	M	Molarität
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
dd	doppeltes Dublett	mbar	Millibar
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>	Me	Methyl
dest.	destilliert	MeOH	Methanol
dhb	2,5-Dihydroxybenzoesäure	min	Minute(n)
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin		
DMAP	4-Dimethylaminopyridin		
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DQF	<i>double quantum filtered</i>		
E-Cadherin	epitheliales Cadherin		
EE	Ethylacetat		
Et	Ethyl		
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>		

MS	Massenspektrometrie	ROESY	<i>Rotating Frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
NeuNAc	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure		
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin		
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon	R _t	Retentionszeit
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	s	Singulett
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>	s _b	breites Singulett
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>	SG	Schutzgruppe
OD	<i>Optical Density</i>	Smp.	Schmelzpunkt
OTf	Trifluormethansulfonat, Triflat	Su	Succinimidyl
<i>p</i>	<i>para</i>	t	Triplet
p.a.	pro analysi	TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
PE	Petrolether	TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
Ph	Phenyl	TBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluorborat
PHB	Polyhydroxybenzol	<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
Pmb	<i>para</i> -Methoxybenzyliden	Tentagel	Polyethylenglycol-Polystyrol-Copolymer
ppm	<i>parts per million</i>	TFA	Trifluoressigsäure
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat	THF	Tetrahydrofuran
PTMSEL	2-Phenyl-2-trimethylsilylethyl-Linker	TIS	Triisopropylsilan
q	Quartett	TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
quant.	quantitativ	TOF	<i>time of flight</i>
R _f	Retentionsfaktor	Trt	Trityl
RP	<i>Reversed Phase</i>	<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
ROE	<i>Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect</i>	UV	Ultraviolett

Verwendete Aminosäuren

Ala, A	Alanin	Ile, I	Isoleucin
Asp, D	Asparaginsäure	Leu, L	Leucin
Gln, Q	Glutamin	Pro, P	Prolin
Gly, G	Glycin	Ser, S	Serin
His, H	Histidin	Val, V	Valin

1 Einleitung

1.1 Glycoproteine, Glycopeptide

Die hervorgehobene Bedeutung von Glycoproteinen bei einer Vielzahl biologischer Prozesse ist heute allgemein anerkannt.^{1,2,3} Neben der Regulierung des Zellwachstums, der interzellulären Kommunikation und der Zelldifferenzierung spielen sie eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen.⁴ Eine unerwünschte Folge der biologischen Erkennung der Glycoproteine in der inflammatorischen Kaskade ist, daß der gleiche Prozeß Tumorzellen die Anlagerung an Endothelzellen erlaubt, was die Invasion der Tumorzellen in gesundes Gewebe ermöglichen kann.

Die Funktion der Kohlenhydratstrukturen der Glycoproteine ist von Fall zu Fall durchaus verschieden. Ihnen wird allgemein eine Schutzfunktion vor proteolytischem Abbau, eine Beeinflussung der Konformation des Proteins sowie eine Änderung der physikochemischen Eigenschaften wie Löslichkeit oder der elektrischen Ladung zugeschrieben. Man unterscheidet *N*- und *O*-glycosidisch gebundene Kohlenhydratstrukturen. Erstere sind bei den Säugetieren über *N*-Acetylglucosamin β -glycosidisch an Asparagin gebunden, während *O*-Glycane an die Seitenkette von Serin oder Threonin gebunden sind. Anders als bei den *N*-Glycanen erfolgt die Verknüpfung an das Oligosaccharid nicht nur über eine einzige Kohlenhydratstruktur. Allerdings überwiegt als Verknüpfungspartner *N*-Acetylgalactosamin. Im Unterschied zu den *N*-Glycanen ist es bisher bei den *O*-Glycanen noch nicht gelungen, anhand der Aminosäuresequenz verlässliche Voraussagen über mögliche *O*-Glycosylierungsstellen zu machen.

Zellen verwenden Oligosaccharide auch zur Codierung von Informationen über die Art der Proteinfaltung verbunden mit der Erkennung anderer Proteine. Ein Beispiel für die von Kohlenhydraten vermittelte Zelladhäsion ist die Wechselwirkung zwischen dem Glycoprotein E-Selectin (endothelial leucocyte adhesion molecule, ELAM-1) und dem Tetrasaccharid

¹ A. Varki, *Glycobiol.* **1993**, 3, 97.

² H. Lid, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 1.

³ R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683.

⁴ H.-D. Jakubke, „*Peptide*“ Spektrum, akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.

Sialyl-Lewis^x auf der Oberfläche von Leukozyten bei Entzündungsprozessen.⁵ Der Kohlenhydratanteil von Tumorzellen ist häufig gegenüber demjenigen von gesunden Zellen spezifisch verändert,⁶ so daß sich damit ein Ansatzpunkt für die Diagnostik und die Immuntherapie in der Tumorforschung bietet.

1.2 Tumorassoziierte Antigene

Die biologisch aktive Form eines Glycoproteins wird erst durch zahlreiche posttranslationale Modifikationen erreicht, die sich mehr oder weniger direkt an die ribosomale Proteinbiosynthese anschließen.⁷ Neben Phosphorylierungen, Methylierungen und proteolytischen Prozessen gehören dazu auch die *N*- und *O*-glycosidischen Verknüpfungen mit Oligosacchariden, die im Fall der *O*-Glycane im Golgi-Apparat stattfinden.⁸ *N*-Acetylgalactosamin wird dabei im *cis*-Golgi an Serin oder Threonin gekoppelt, und anschließend wird während der Wanderung des Proteins zum *trans*-Golgi der Saccharidteil vergrößert. Die dafür zuständigen Glycosyltransferasen sind entsprechend unterschiedlich über den Golgi-Apparat verteilt. Die β -(1 \rightarrow 3)-Galactosyltransferase, die die sogenannte *Core 1 Struktur* erzeugt, findet sich im mittleren Bereich des Golgi-Apparats, während Sialyltransferasen, die terminale Sialinsäuren übertragen, sich vorwiegend im *trans*-Golgi befinden (Abb. 1-1).⁹ Das Glycosylierungsmuster ist dabei nicht nur zelltypenspezifisch, sondern hängt auch vom Entwicklungsstadium des Organismus ab. Insbesondere aber kann man unter pathologischen Bedingungen, wie sie bei Tumorzellen zu finden sind, die verstärkte Präsenz bestimmter Glycosyltransferasen, insbesondere der Sialyltransferasen, sowie das Fehlen anderer beobachten. Dies führt zu verkürzten Kohlenhydratstrukturen, sogenannten tumorassoziierten Antigenen.^{10,11} Bei Darmkrebs konnte z. B. die Expression des T_N- und des T-Antigens sowie der Sialyl-T-Antigene beobachtet werden, die im gesunden

⁵ R. P. McEver, K. L. Moore, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 11025.

⁶ S. Hakomori, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 2405.

⁷ B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, Wiley-VCH Weinheim **1999**.

⁸ I. Brockhausen, H. Schachter, J. F. G. Vliegthart (Hrsg.), *Glycoproteins*, Elsevier, Amsterdam **1995**, 201.

⁹ J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, *6*, 355.

¹⁰ S. Hakomori, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 2405.

¹¹ I. Brockhausen, J. Yang, N. Dickinson, S. Ogata, S. H. Itzkowitz, *Glycoconj. J.* **1998**, *15*, 595.

Gewebe nicht nachgewiesen werden können.¹²

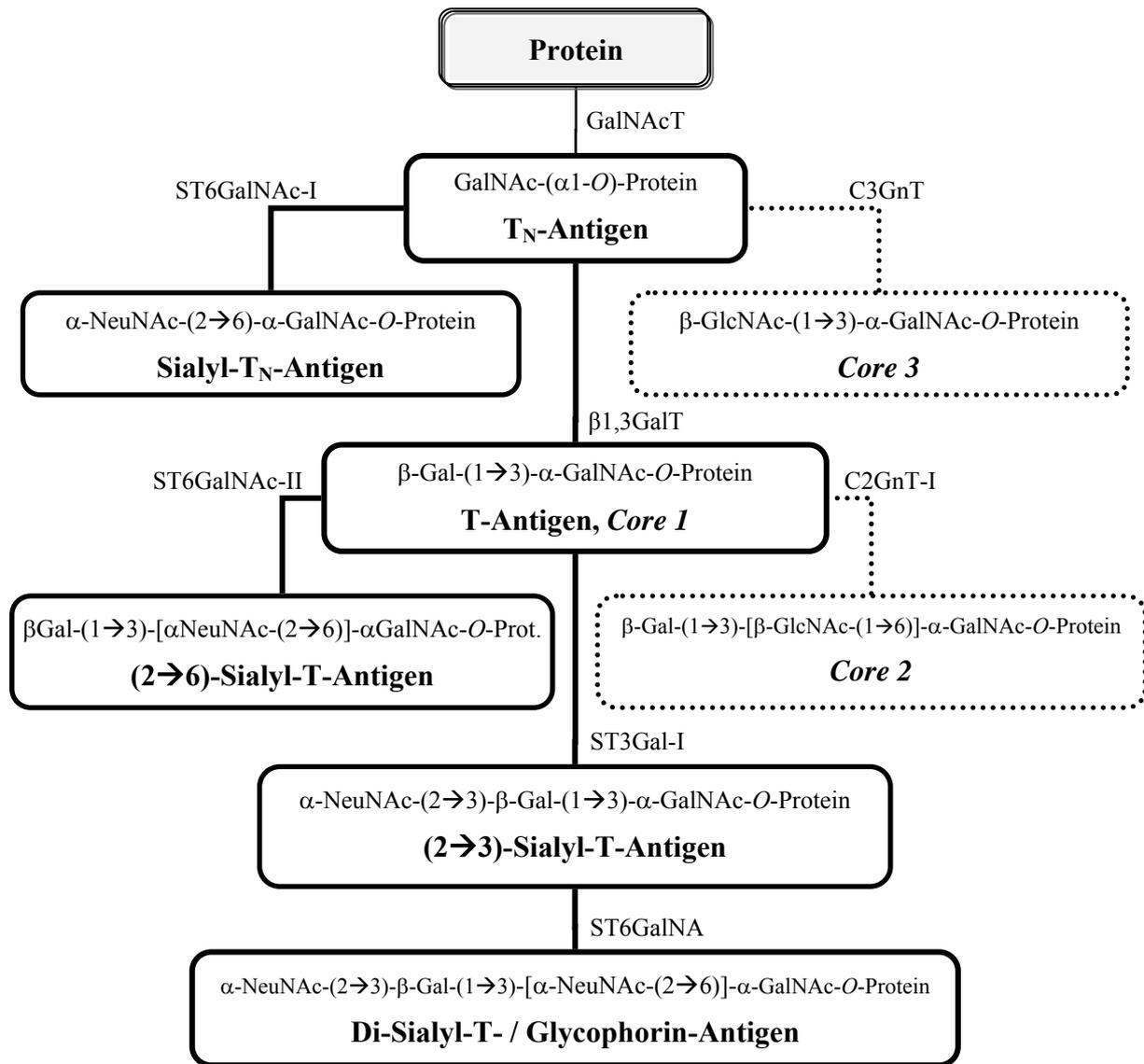


Abb. 1-1: Schema der O-Glycan-Biosynthese in Tumorzellen.

Produkte von Enzymen mit erhöhter Aktivität sind fett eingezeichnet, Produkte von in Tumorzellen nicht oder reduziert exprimierten Enzymen sind gepunktet eingezeichnet.

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

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

β 1,3GalT: Core 1 β 1,3-Galactosyltransferase C2GnT-I: Core 2 β 1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase-I

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

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

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

¹² S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. M. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 197.

1.3 Die Zelladhäsion

Zellen sind die im Grundbauplan einheitlichen Bauelemente aller Lebewesen, und ihre differenzierte Anordnung und Funktion führt zur Vielfalt der Organismen. Eine spezifische Interaktion zwischen einzelnen Zellen oder einer Zelle und der sie umgebenden extrazellulären Matrix ist Voraussetzung für die Entstehung komplexer Strukturen, Gewebe, Organe und Organismen. Adhäsive Wechselwirkungen spielen eine entscheidende Rolle bei morphogenetischen Prozessen, inflammatorischen Vorgängen und der frühen Entwicklung von Organismen. Ein gemeinsames Merkmal der Adhäsionsproteine ist ihre Zusammensetzung aus sich mehrmals wiederholenden Domänen. Man unterscheidet vier Klassen von Adhäsionsmolekülen: Integrine, Immunoglobuline, Selektine und Cadherine.^{7,13}

Integrine bestehen aus zwei Untereinheiten, einer α - und einer β -Untereinheit. Es handelt sich um heterodimere Transmembranglycoproteine. Es existieren acht verschiedene α - und 15 verschiedene β -Untereinheiten, wobei die α - und β -Untereinheit eines Integrins C-terminal über Talin oder Actinin an das Zytoskelett verbunden ist. Im extrazellulären Bereich nahe des N-Terminus sind neben der Ligandenbindungsstelle auch Ca^{2+} -Bindungsstellen vorhanden. Zu den Aufgaben der Integrine gehört die Kontaktvermittlung zu anderen Zellen sowie zur extrazellulären Matrix. Sie vermitteln z.B. die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel (β_2 -Integrine) und nehmen so an inflammatorischen Prozessen teil. Weiterhin sind sie für die Aggregation von Blutplättchen an beschädigtes Gewebe (β_3 -Integrine) mitverantwortlich und auch für Prozesse der Tumormetastasierung und Angiogenese.¹⁴

Die Proteine der *Immunoglobulin*-Familie bestehen aus ca. 1000 Aminosäuren, deren extrazelluläre Bereiche große Homologien zu den konstanten Bereichen von Antikörpern aufweisen. Sie sind in mehrere Domänen unterteilt und vermitteln calciumunabhängige Bindungen, entweder homophiler Art zu anderen Immunoglobulinen oder zu Integrinen. Immunoglobuline spielen z.B. bei der Entwicklung und Regulierung des Nervensystems eine entscheidende Rolle (N-CAM).

Selektine sind Transmembranglycoproteine, die eine kurze intrazelluläre und eine vergleichsweise große extrazelluläre Domäne besitzen. Nur eine einzige Peptidkette durchspannt die Membran. Der extrazelluläre Teil wird durch SCR (*short consensus repeats*) Einheiten aufgebaut, die am N-Terminus über eine EGF-Einheit (*epidermal growth factor*) mit

¹³ C. A. Janeway, P. Travers, *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1995.

¹⁴ R. O. Hynes, *Cell* 1992, 69, 11.

einer CRD-Domäne (*carbohydrate recognition domain*) verbunden sind. Die Liganden der Selektine sind Glycoproteine. Die Hauptaufgabe der Selektine besteht in der Kontaktvermittlung von Zellen zum vaskulären System. Sie besitzen somit eine große Bedeutung für die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom.

1.4 Cadherine

Bei der Familie der Cadherine handelt es sich um Transmembranproteine mit extrazellulären Wiederholungseinheiten mit einer Länge von etwa 110 Aminosäuren. Mittlerweile sind gut 80 Mitglieder der Cadherin-Familie bekannt. Zu dieser Überfamilie zählen klassische Cadherine (wie das E-Cadherin), Desmogleine, Desmocolline, Protocadherine, CNRs (Cadherin related neuronal receptor), Fats, Seven-pass-Cadherine und Ret-Tyrosin-Kinase (Abb. 1-2).¹⁵

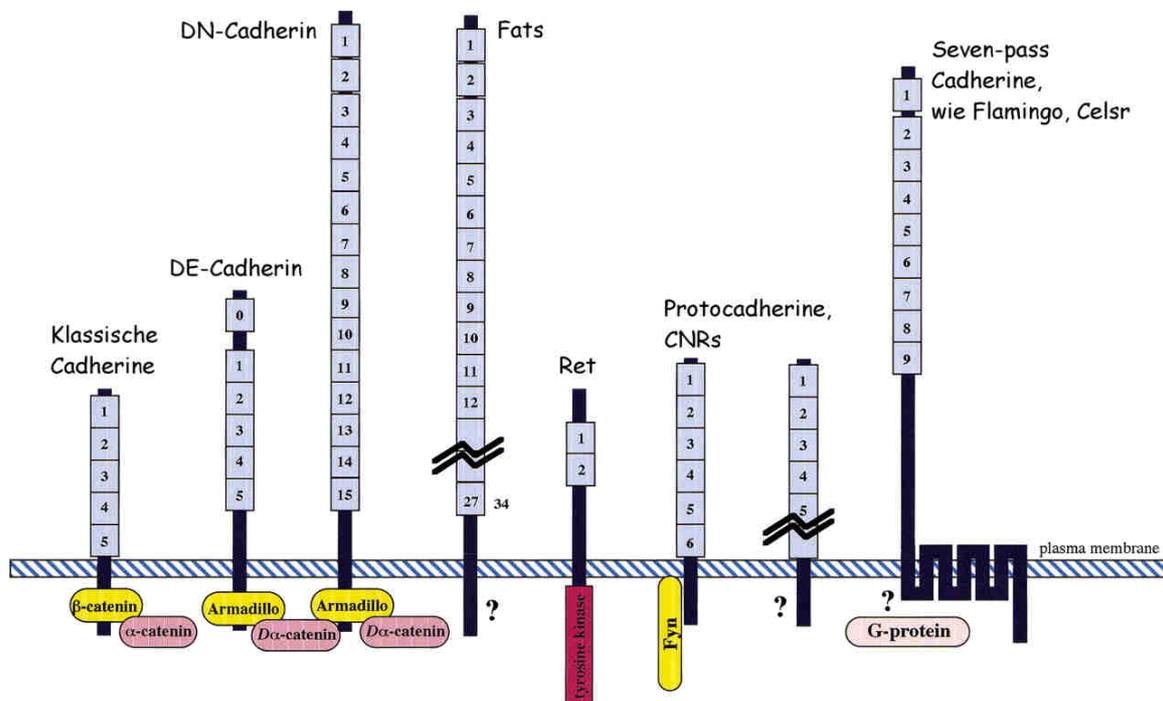


Abb. 1-2: Die verschiedenen Unterarten der Cadherine.

Zu den klassischen Cadherinen zählen ca. 30 verwandte Glycoproteine, die Ca^{2+} -abhängig Zelladhäsionskontakte vermitteln. Anders als bei den Immunglobulinen ist die Anwesenheit von Ca^{2+} essentiell, da sonst die Tertiärstruktur verloren geht und ein proteolytischer Abbau des Proteins einsetzt. Zudem führt ein zu niedriger Calciumspiegel zum Verlust der Kontaktinhibitor.^{16,17} Alle feste Gewebe bildenden Zellen exprimieren Cadherin, wobei der

¹⁵ T. Yagi, M. Takeichi, *Genes & Develop.* **2000**, *14*, 1169.

¹⁶ B. Nagar, M. Overduin, M. Ikura, J. M. Rini, *Nature* **1996**, *380*, 360.

Expressionsgrad äquivalent zur Adhäsivität ist. Eine wichtige Funktion spielen die Cadherine bei der Morphogenese.¹⁸ Während eine Cadherindefizienz bei Embryonen zu einem frühen Tod führt,¹⁹ hat eine Inaktivierung anderer Adhäsionssysteme nur geringe Auswirkungen auf die Adhäsivität der Zelle.²⁰ Durch eine Transfektion mit Cadherin kodierender cDNA von Zellen mit Cadherindefizienz erreichen diese eine Ca²⁺-abhängige Zelladhäsion.

Schon in der Zellentwicklung findet eine differenzierte Expression verschiedener Cadherine statt, weswegen man annimmt, daß dadurch eine zielgerichtete Sortierung der Zellen eingeleitet wird.²¹ Die Tatsache, daß ein bestimmtes Cadherin nur in jeweils einem Zelltyp exprimiert wird, weist darauf hin, daß Cadherine auch in die Differenzierung von spezialisierten Zellphänotypen involviert sind.

1.4.1 Das E-Cadherin

E-Cadherin, ein Glycoprotein mit einer molaren Masse von 124000 Dalton, wird in polarisierten Epithelzellen exprimiert. Die Art der Bindung von Cadherinmolekülen ist sowohl homophil (Bindung zwischen zwei gleichen Molekülen) als auch homotypisch (Bindung zwischen dem gleichen Zelltyp). Diese Wechselwirkung vermittelt zugleich eine Signaltransduktion. Eingeleitet wird die Zelladhäsion durch die Paarbildung zweier N-terminaler Domänen von benachbarten Cadherinmolekülen, dem sog. *cis-Dimer*. Hieran bindet dann ein identischer Komplex einer anderen Zelle,²² was als *trans-Dimer* bezeichnet wird (Abb. 1-3).

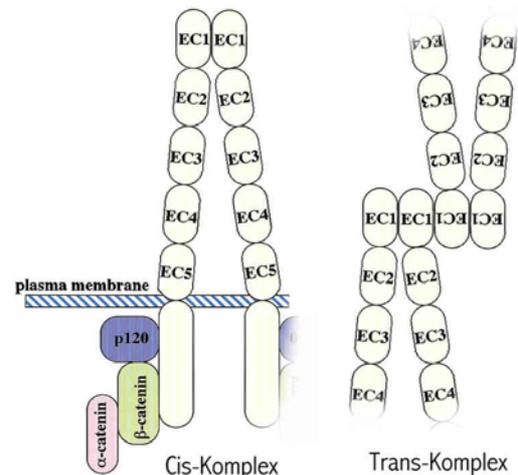


Abb. 1-3: *cis*- und *trans*-Dimer.

¹⁷ S. Kandikonda, D. Oda, R. Niederman, B. C. Sorkin, *Cell Adhes. Commun.* **1996**, 4, 13.

¹⁸ M. Takeichi, *Science* **1991**, 251, 1451; *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, 7, 619.

¹⁹ O. Huber, C. Bierkamp, R. Kemler, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, 8, 685.

²⁰ M. Boubelik, L. Draberova, P. Draber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 224, 283.

²¹ M. S. Steinberg, M. Takeichi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 91, 206.

²² A.W. Koch, S. Pokutta, A. Lustig, J. Engel, *Biochemistry*, **1997**, 15, 3507.

Dieses Modell beruht allerdings auf Röntgenstrukturanalysen. Der Nachweis des detektierten *trans-Dimer* konnte in Lösung in dieser Form nicht bestätigt werden.²³ In beiden Fällen ist das Vorhandensein von Ca^{2+} -Ionen essentiell, die dafür sorgen, daß die extrazelluläre Region in relativ steifer, stäbchenförmiger Struktur vorliegt. Zwischen den einzelnen extrazellulären Domänen, in den sehr flexiblen sogenannten „hinge“-Regionen, finden sich Calcium-Bindungsstellen, die durch die Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen stabilisiert werden und so für die stabförmige Struktur sorgen.^{24,25} Weitere Experimente mit neuen biophysikalischen Untersuchungsmethoden (SFM, *surface force measurements*) weisen darauf hin, daß nicht nur die äußere, *N*-terminale Domäne der klassischen Cadherine an der Zelladhäsion beteiligt ist, sondern vielmehr alle fünf extrazellulären Domänen (Abb. 1-4).^{26,27,28}

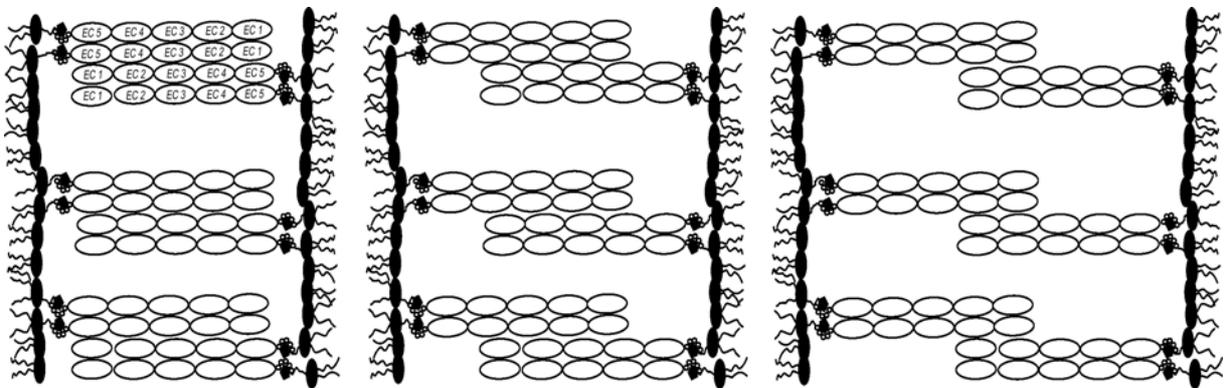


Abb. 1-4: Mögliche Überlappungsmuster der extrazellulären Domänen des E-Cadherin.

Die His-Ala-Val-Sequenz (HAV) in der ersten extrazellulären Domäne ist für diese homophilen Wechselwirkungen notwendig,²⁹ jedoch sind die molekularen Mechanismen noch ungeklärt. Die HAV-Sequenz tritt in der Natur nur relativ selten auf. Außer in den Cadherinen sind bisher nur noch Sequenzen in den Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren und in den

²³ S. Pokutta, K. Herrenknecht, R. Kemler, J. Engel, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 223, 1019.

²⁴ B. Nagar, M. Overduin, M. Ikura, J. M. Rini, *Nature* **1996**, 380, 360.

²⁵ S. Pokutta, K. Herrenknecht, R. Kemler, J. Engel, *Eur. J. Biochem* **1994**, 223, 1019.

²⁶ D. Leckband, S. Sivasankar, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, 12, 587.

²⁷ S. Sivasankar, B. Gumbiner, D. Leckband, *Biophys. J.* **2001**, 80, 1758.

²⁸ S. Chappius-Flament et al., *J. Cell Biol.* **2001**, 154, 231-243.

²⁹ K.L. Lutz, T.J. Sahaan, in: *Peptides: Chemistry, Structure and Biology. Proceedings of the 14th American Peptide Symposium*, Eds. P. T. P. Kaumaya, R. S. Hodges, Mayflower Scientific Ltd., Kingswinford, England, **1996**, 88, 8024.

Hämagglutininen von Influenza A bekannt.³⁰ Es konnte gezeigt werden, daß die durch E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion gestört wird, wenn Peptide diese Sequenz enthalten.^{31,32} Dazu wurde die Hypothese aufgestellt, daß derartige Fragmente durch exzessiven proteolytischen Abbau an der Oberfläche von Tumorzellen auftreten können, so daß diese Peptide die Adhäsionsprozesse behindern.

Eine Unterbrechung der durch E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion kann zur Dissoziation epithelialer Zellmonoschichten und zur Umdifferenzierung der Zellen in eine fibroblastenartige Morphologie führen.³³ Die Expression von E-Cadherin in nicht-epithelialen Zellen kann dagegen zur Ausbildung von polarisierten epithelähnlichen Zellmonoschichten führen.³⁴ Die Verringerung der Expression von E-Cadherin in transformierten Zellen geht einher mit zunehmender Invasivität.³⁵ Gleichzeitig steigt die durch CD 44 vermittelte Adhäsion.³⁶ Zudem spielt E-Cadherin eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung des Wandels eines Adenoms zu einem Karzinom.³⁷ Zellen mit verringerter E-Cadherin-Expression besitzen jedoch nicht notwendigerweise die Fähigkeit Metastasen zu bilden.³⁸

Durch Röntgenstrukturanalyse und multidimensionale Kernresonanzspektroskopie unter Anwendung eines isotonenangereicherten Proteins (¹⁵N, ¹³C) wurde die dreidimensionale Struktur der aminoterminalen Wiederholungseinheit von epithelalem Cadherin³⁹ aufgeklärt (Abb. 1-5).^{40,41} E-CAD1 bildet sieben β -Faltblattbereiche (β A bis β G) und zwei kurze α -Helices (α A und α B). Alle β -Faltblattpaarungen sind antiparallel mit Ausnahme derjenigen zwischen β A' und β G, so daß eine β -Faßtopologie (β -barrel) resultiert. Diese Struktur ähnelt

³⁰ A. Leroy, V. Noe, M. Mareel, H. Nelis, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, 25, 228.

³¹ O.W. Blaschuk, R. Sullivan, S. David, Y. Pouliot, *Dev. Biol.* **1990**, 139, 227.

³² J. Willems, E. Bruyneel, V. Noe, H. Sledgers, A. Zwijsen, R.-M. Mège, M. Mareel, *FEBS Lett.* **1995**, 363, 289.

³³ B. Gumbiner, K. Simons, *J. Cell Biol.* **1986**, 102, 457.

³⁴ H. McNeill, M. Ozawa, R. Kemler, W. J. Nelson, *Cell* **1990**, 62, 309.

³⁵ M. Takeichi, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1993**, 5, 806.

³⁶ S. Jothy, S. B. Munro, L. LeDuy, D. McClure, O. W. Blaschuk, *Cancer Metastasis Rev.* **1995**, 14, 363.

³⁷ A.-K. Perl, P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb, G. Christofori, *Nature* **1998**, 392, 190.

³⁸ M. J. Bussemakers, R. J. van Moorselaar, L. A. Giroldi, T. Ichikawa, J. T. Isaacs, M. Takeichi, F. M. Debruyne, J.A. Schalken, *Cancer Res.* **1992**, 52, 2916.

³⁹ E. Y. Jones, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, 8, 602.

⁴⁰ K. I. Tong, P. Yau, M. Overduin, S. Bagby, T. Porumb, M. Takeichi, M. Ikura, *FEBS Lett.* **1994**, 352, 318.

⁴¹ M. Overduin, T.S. Harvey, S. Bagby, K. I. Tong, P. Yau, M. Takeichi, M. Ikura, *Science* **1995**, 267, 386.

der konstanten Domäne von Immunglobulin.⁴²

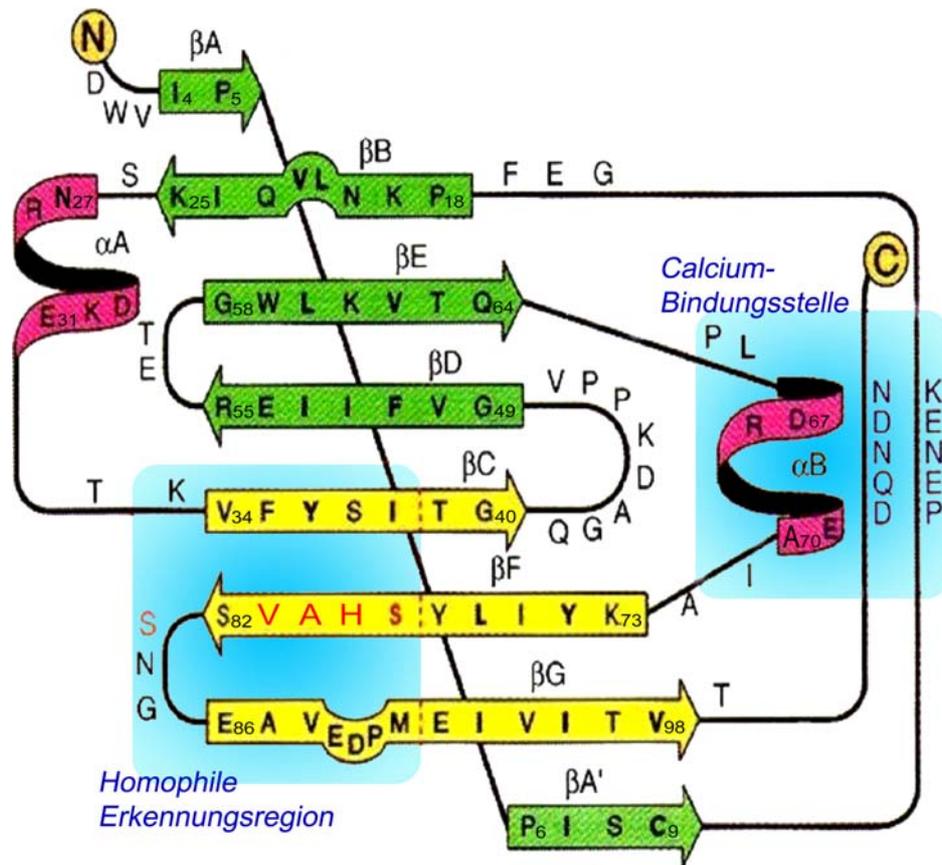


Abb. 1-5: Struktur der N-terminalen Domäne von E-Cadherin (E-CAD1).

Die β -Faltblattstruktur (β G) in der Nähe des Turns der homophilen Erkennungsoberfläche ist nicht ideal, sondern geht vom C-Terminus aus in einen *random coil*-Bereich über (Abb. 1-6, Mitte links). Man vermutet, daß die gesamte konkave Oberfläche, gebildet durch die Faltblattstrukturen β C, β F und β G an der homophilen Erkennung beteiligt ist, da Punktmutationen im β F-Bereich nur zu einer partiellen Spezifitätsänderung führen.

Durch Analyse der das Protein codierenden RNA-Sequenz wurde die Sequenz des nativen Proteins ermittelt. Hierzu wurde die mRNA mittels reverser Transkriptase in einen Strang komplementärer DNA transkribiert, die dann sequenziert wurde. Bei dieser Vorgehensweise können jedoch keine Informationen über mögliche Glycosylierungen des Proteins erhalten werden, da Glycosylierungen erst posttranslational erfolgen.

⁴² R. J. Poljak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1974, 71, 3440.

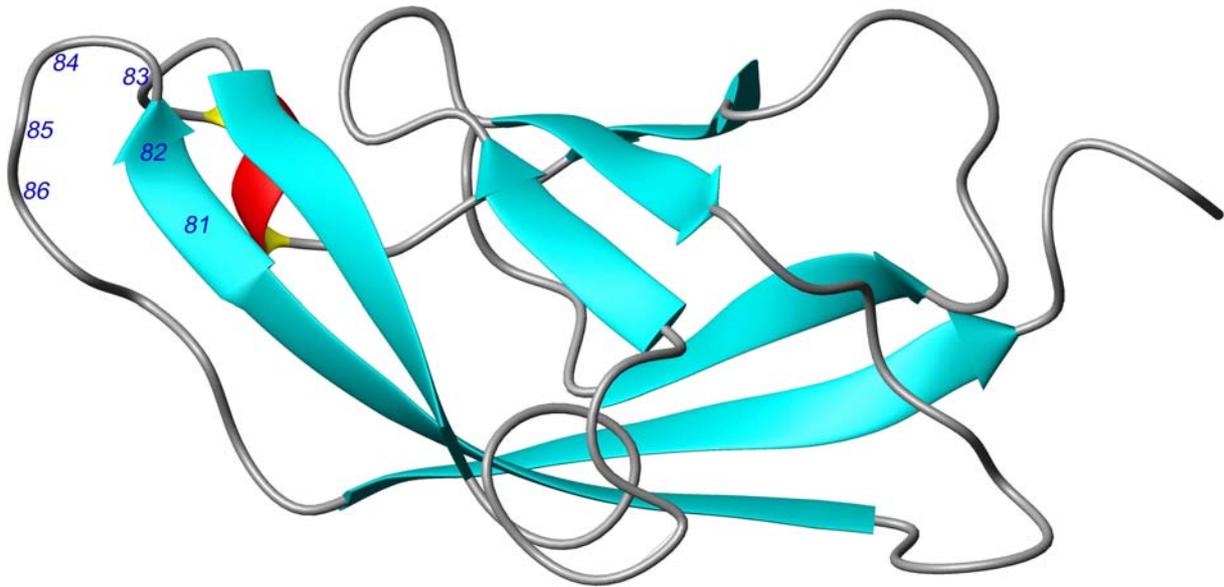


Abb. 1-6: Röntgenstruktur (Auflösung 2 Å) der E-CAD1 Domäne.⁴³

Numerierte, zum Teil den Turn bildende Sequenz: Val(81)-Ser-Ser-Asn-Gly-Glu(86).

Untersuchungen an Zellen, die mit Tunicamycin⁴⁴ behandelt wurden zeigten, daß die vorhandenen *N*-Glycosylierungen nicht entscheidend für die einwandfreie Vermittlung der Zell-Zell-Adhäsion sind.⁴⁵ Bezüglich der *O*-Glycosylierungsstellen läßt sich die Annahme machen, daß der sterische Anspruch einer Glycosylierung eine Turn-Sequenz induzieren kann. Es gibt jedoch im Gegensatz zur *N*-Glycosylierung keine Konsensussequenz (Ausnahme: Fucosylierung⁴⁶). Bei der Übertragung von *N*-Acetylgalactosamin durch die Polypeptid-*N*-Acetylgalactosaminyltransferase auf die Hydroxyaminosäure haben jedoch die flankierenden Sequenzen einen großen Einfluß. Vorteilhaft für die Glycosylierung sind Prolin-, Alanin-, Serin- und Threoninreste an den Positionen +3, -1, -3 und -6 ([+] und [-] charakterisieren Aminosäurereste, die sich *C*- oder *N*-terminal zur Hydroxyaminosäure befinden).

⁴³ B. Nagar, M. Overduin, M. Ikura, J. M. Rini, *Nature* **1996**, 380, 360.

⁴⁴ Tunicamycin ist ein Antibiotikum das die Übertragung von *N*-Acetylglucose von UDP-GlcNAc auf das Isoprenoid Dol-P (Dolicholphosphat) stört und somit den ersten Schritt der Proteinglycosylierung verhindert.

⁴⁵ Y. Shirayoshi, A. Nose, K. Iwasaki, M. Takeichi, *Cell Struct. Funct.* **1986**, 11, 245.

⁴⁶ R. J. Harris, M. W. Spellman, *Glycobiology* **1993**, 3, 219.

1.4.2 Das LI-Cadherin

Die 7D-Cadherine (7 Domänen Cadherine) besitzen als gemeinsame Strukturmerkmale sieben Cadherin-Domänen und einen kurzen, etwa 25 Aminosäuren umfassenden, cytoplasmatischen Anteil. Das aufgrund seines Vorkommens in Leber (liver) und Darm (intestine) LI-Cadherin genannte Protein wurde 1994 in Leber und Darm der Ratte identifiziert.⁴⁷ In diesen Geweben befindet sich das LI-Cadherin an den basolateralen Domänen von epithelialen Hepatozyten und Enterozyten. Dieses neue Cadherin kann strukturell keiner der bereits bekannten Cadherin-Unterfamilien zugeordnet werden, obwohl es gewisse Ähnlichkeiten mit den klassischen Cadherinen aufweist. Das LI- und das Ksp-Cadherin (*Kidney specific*) sind die bislang einzigen Mitglieder dieser Familie.⁴⁸

Mit einer durchschnittlichen Sequenzidentität auf Aminosäureebene von nur 30% zwischen murinem LI- und Ksp-Cadherin, zeigen diese untereinander einen ähnlich geringen Anteil konservierter Aminosäuren wie jeweils im Vergleich zu E-Cadherin (je 29%). Klassische Cadherine untereinander zeigen dagegen eine größere Sequenzidentität (Abb. 1-7).

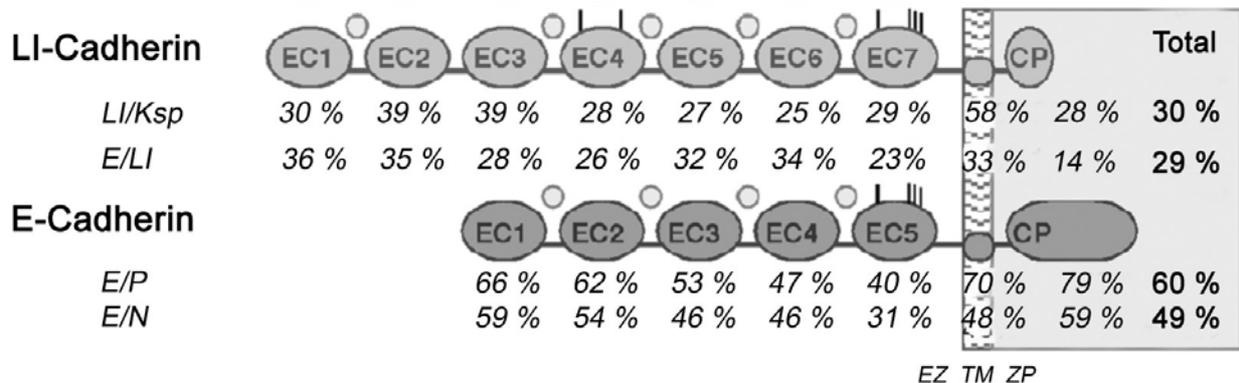


Abb. 1-7: Prozentualer Anteil identischer Aminosäuren (Organismus: Maus).

LI-Cadherin (LI) wurde mit Ksp-Cadherin (Ksp) und E-Cadherin (E) verglichen.⁴⁹ Ein weiterer Vergleich von E-Cadherin mit P-Cadherin (P) und N-Cadherin (N) zeigt große Homologien der klassischen Cadherine. Symbole: Kreise = Ca²⁺-Ionen; senkrechte Striche (EC4, EC5, EC7) = konservierte Cysteine. EZ: extrazellulär, TM: Transmembranbereich, ZP: zytoplasmatisch.

⁴⁷ D. Berndorff, R. Gessner, B. Kreft, N. Schnoy, A.-M. Lajous-Petter, N. Loch, W. Reutter, M. Hortsch, R. Tauber, *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 1353.

⁴⁸ R. B. Thomson, P. Igarashi, D. Biemesderfer, R. Kim, A. Abu-Alfa, M. Soleimani, P. S. Aronson, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 17594-601.

⁴⁹ Softwarepaket MacMolly Tetra 3.7, Modul „Align“; Soft Gene, Berlin.

Trotz der relativ geringen Homologie auf Aminosäureebene besitzen die 7D-Cadherine auffällige strukturelle Gemeinsamkeiten. So besitzen die 7D-Cadherine zwei konservierte Cysteine in der vierten Cadherin-Domäne (EC4). Des Weiteren fehlen sowohl LI- als auch Ksp-Cadherin drei der vier für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen notwendigen Sequenzmotive am Übergang der Cadherin-Domänen zwei und drei. Entsprechend unterscheidet sich die einheitliche Zusammensetzung des LI-Cadherins von der der klassischen Cadherine. Der extrazelluläre Teil des LI-Cadherins besitzt zusätzlich zu den fünf sich tandemartig wiederholenden Domänen EC 1-5 der klassischen Cadherine zwei weitere extrazelluläre Domänen. In der extrazellulären Domäne EC 1 des LI-Cadherins ist das typische HAV-(His-Ala-Val)-Motiv durch eine AAL-(Ala-Ala-Leu)-Sequenz ersetzt.

Wie auch bei den klassischen Cadherinen verläuft die von LI-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion Calcium-abhängig. Allerdings konnte gezeigt werden, daß LI-Cadherin weder mit den Cateninen wechselwirkt noch an das Actin-Cytoskelett gebunden ist und daß dadurch auch für die von LI-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion keine cytoplasmatischen Wechselwirkungen erforderlich sind.⁵⁰ Im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen, die eine cytoplasmatische Domäne von etwa 155 ± 15 Aminosäuren besitzen, weist das LI-Cadherin nur eine sehr kurze, von den vorgenannten Cadherinen völlig verschiedenartige cytoplasmatische Domäne von etwa 20 Aminosäuren auf. Durch die Isolierung und Sequenzierung von cDNA-Klonen konnte sowohl humanes LI-Cadherin⁵¹ als auch das LI-Cadherin der Maus⁵² decodiert werden. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen des LI-Cadherins der Ratte, der Maus und des Menschen zeigen große Übereinstimmung. Die zwei zusätzlichen Domänen im extrazellulären Teil scheinen dabei das charakteristische Merkmal der LI-Cadherine zu sein.

Über die Struktur von LI-Cadherin ist bislang wenig bekannt. Es existieren keine Röntgenstrukturen oder gar NMR-spektroskopische Untersuchungen einzelner Domänen. Man kann nur aufgrund der Homologien (Sequenzhomologien in den einzelnen Domänen) zu den bereits aufgeklärten Cadherinen, E- und N-Cadherin, vermuten, daß im LI-Cadherin

⁵⁰ B. Kreft, D. Berndorff, A. Böttinger, S. Finnemann, D. Wedlich, M. Hortsch, R. Tauber, R. Gessner, *J. Cell Biol.* **1997**, *136*, 1109.

⁵¹ A. Boettinger, B. Kreft, C. Fieger, B. Dlouhy, D. Berndorff, R. Gessner, R. Tauber; „*Molecular cloning of human LI-cadherin: evidence for a novel type of cadherin within the cadherin superfamily.*“ **1994**; submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

⁵² B. Angres, L. Kirn, R. Jung, R. Gessner, R. Tauber, *Dev. Dyn.* **2001**, *221*, 182.

ähnliche Verhältnisse vorliegen könnten. So kann für die Studien in dieser Arbeit angenommen werden, daß es im LI-Cadherin eine „homophile Erkennungsregion“ gibt, die anstelle des HAV-Motivs das AAL-Motiv besitzt, an das sich in C-terminaler Richtung ein typisches β -Turn-Motiv anschließt (Abb. 1-8).

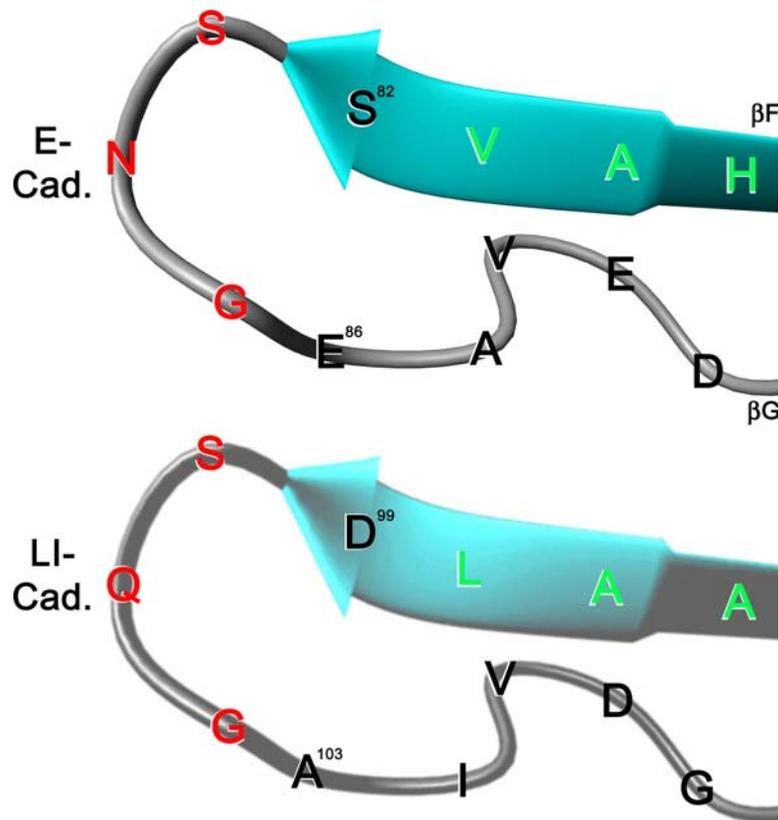


Abb. 1-8: Der β -Turn der homophilen Erkennungsregion des E-Cadherin (Mensch, oben), sowie der postulierte β -Turn des LI-Cadherin (Ratte, unten).

Die in rot eingezeichneten Aminosäuresequenzen Ser-Gln-Gly (SQG) und Ser-Asn-Gly (SNG) stellen typische β -Turn-Motive dar. Das konservierte Ala-Ala-Leu (AAL)-Motiv sowie das HAV-Motiv ist grün gezeichnet.

Hinsichtlich einer möglichen biologischen Funktion des LI-Cadherins bei der Zelldifferenzierung gibt es einige Hinweise. So sind Transkriptionsfaktoren der sog. Caudal-Familie Cdx1 und Cdx2 an der Darmentwicklung der Maus beteiligt.⁵³ Cdx2 reguliert unter anderem die Expression von LI-Cadherin im Darmepithel.⁵⁴ Die Beobachtung, daß LI-Cadherin bei der intestinalen Metaplasie (Umwandlung einer differenzierten Zellart in eine

⁵³ D. G. Silberg, G. P. Swain, E. R. Suh, P. G. Traber, *Gastroenterology* **2000**, *119*, 961-71.

⁵⁴ T. Hinoi, P. C. Lucas, R. Kuick, S. Hanash, K. R. Cho, E. R. Fearon, *Gastroenterology* **2002**, *123*, 1565-77.

anders differenzierte Zellart) des Magens und bei Magenkarzinomen ektopisch⁵⁵ in den transformierten Zellen des Magenepithels exprimiert wird, liefert einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Funktion von LI-Cadherin bei Differenzierungsvorgängen.⁵⁶ Zudem wurde ein Anstieg der LI-Cadherin-Expression mit dem Differenzierungsgrad von Adenokarzinomen des Pankreas in Verbindung gebracht.⁵⁷ Interessant ist auch, daß die Expression von LI-Cadherin mit der morphologischen Transformation von viellagigen Epithelschichten in eine einzelne, säulenartige Epithelschicht zusammenfällt, eine Entwicklungsstufe, während der entscheidende Gewebeumordnungs-, Gewebewachstums- und Gewebedifferenzierungsvorgänge im embryonalen Darm stattfinden.

Auch über die Mechanismen der von LI-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion weiß man bislang nur wenig. Da allerdings zwischen den extrazellulären Domänen 2 und 3 keine Calcium-Bindungsstelle vorhanden ist vermutet man, daß Adhäsionsvorgänge hier flexibler ablaufen könnten. Fragen wie z.B. nach *cis*- und *trans*-Interaktionen müssen hier noch geklärt werden.

1.5 Die Festphasensynthese

Exakt definierte Glycopeptide sind durch biochemische und gentechnologische Methoden oft nur schwer zu bekommen, da Glycosylierungsreaktionen Teil posttranslationaler Prozesse sind. Das in den letzten Jahren wachsende Interesse an solchen Verbindungen förderte daher die chemische Synthese solcher Verbindungen, die das Studium von Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermöglichen und auch als synthetische Impfstoffe (Vakzine) verwendet werden können. Zudem können so auch naturfremde Peptide aufgebaut werden, die pharmakologische Aktivität besitzen.

Zwei Methoden der chemischen Glycopeptidsynthese sind möglich: die Synthese in Lösung und die Festphasensynthese. Für die Synthese in Lösung gibt es zahlreiche Beispiele,⁵⁸ allerdings gewinnt die Synthese an der festen Phase zunehmend an Bedeutung. Die

⁵⁵ Als Ektopie bezeichnet man die Ansiedlung von Organen oder Gewebe an einer unter physiologischen Bedingungen von diesem Gewebe freien Stelle des Organismus.

⁵⁶ C. Grötzinger, J. Kneifel, D. Patschan, N. Schnoy, I. Anagnostopoulos, S. Faiss, R. Tauber, B. Wiedenmann, R. Geßner, *Gut* **2001**, *49*, 73-81.

⁵⁷ M. Takamura, M. Sakamoto, Y. Ino, T. Shimamura, T. Ichida, S. Hirohashi, *Cancer Sci.* **2003**, *94*, 425-30.

⁵⁸ a.) H. Kunz, M. Schultz, in D.G. Large, C.D. Warren (Hrsg.): *Glycopeptides and related compounds*, Marcel Dekker, Inc., New York, **1997**, 23; b.) H. Kunz, *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 1223.

sequentielle Festphasenglycopeptidsynthese⁵⁹ stellt eine Weiterentwicklung der 1963 von Merrifield eingeführten Festphasensynthese dar. Die Festphasensynthese geht von einer an einen polymeren Träger gekoppelten Aminosäure aus, die in nachfolgenden zyklischen Schritten mit *N*-terminal geschützten Aminosäuren gekuppelt wird. Nach jeder Kupplung wird der *N*-Terminus wieder freigelegt, so daß schrittweise ein größeres Peptid aufgebaut wird. Gegenüber der Synthese in Lösung erlaubt diese Strategie den Einsatz großer Überschüsse, so daß hohe Reaktionsausbeuten möglich sind. Zudem kann durch einfache Filtration auf aufwendige Reinigungsschritte verzichtet werden. Die sequentielle Festphasenglycopeptidsynthese benutzt nicht nur einfache Aminosäuren, sondern auch solche, die über eine Seitenkettenverknüpfung mit einem Saccharidrest verbunden sind. Voraussetzung dafür ist ein zu den Schutzgruppen der Aminosäuren orthogonales Schutzgruppenmuster des Saccharidbausteins.

Alternativ können Peptide auch direkt glycosyliert werden. *N*-Glycane wurden bislang meist durch Synthesen in Lösung hergestellt^{60,61}, während *O*-Glycane auch durch Synthese von Saccharidbausteinen an festphasengebundene Peptide erhalten werden.^{62,63} Dazu wird erst ein Peptid synthetisiert, das dann selektiv an der Serin- oder Threonin-Seitenkette deblockiert wird, um dann mit stark aktivierten Glycosyldonoren verknüpft zu werden.

Eine weitere Möglichkeit zum Aufbau von Glycopeptiden besteht in der Verwendung von polymergebundenen Oligosacchariden, an die eine Peptidsequenz über eine Aminofunktion gebunden wird, welche dann verlängert werden kann.⁶⁴

⁵⁹ G.B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 35, 161.

⁶⁰ S.H. Cohen-Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10531.

⁶¹ U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 359.

⁶² O. Setz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 813.

⁶³ A. Schleyer, M. Meldal, M. Renil, H. Paulson, K. Bock, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2064.

⁶⁴ a) J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3915; b) J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *Science* **1995**, 269, 202; c) K. A. Savin, J. C. G. Woo, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 4183.

1.6 MM2 - Das Kraftfeld

1.6.1 Das Kraftfeld

Rechnerische Modelle ("molecular mechanics") behandeln Atome in der Regel als Ellipsen und Bindungen als Federn. Die Mathematik für Feder-Deformationen (Hooke's Law) wird dazu benutzt die Fähigkeit von Bindungen zu beschreiben sich zu dehnen, biegen oder verdrehen. Nicht kovalente Interaktion zwischen zwei Atomen werden von van der Waals Kräften, sterischen Ansprüchen und elektrostatische Einziehung und Abstoßung bestimmt. Diese Eigenschaften sind am einfachsten mathematisch zu beschreiben, wenn die Atome als Ellipsen mit einem bestimmten Radius charakterisiert sind.

Die gesamte potentielle Energie eines Moleküls kann als Summe folgender Interaktion beschrieben werden:

$$E_{\text{Gesamt}} = \sum_{\substack{\text{Bindungs-} \\ \text{Streckung}}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\substack{\text{Valenz-} \\ \text{winkel}}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{Torsion}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\ + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)$$

Bei den ersten drei Termen handelt es sich Wechselwirkungen kovalent verbundener Atome. Der letzte Term, der nicht kovalente Wechselwirkungen beschreibt, enthält die in Abb. 1-9 als "D" bezeichneten Kräfte.

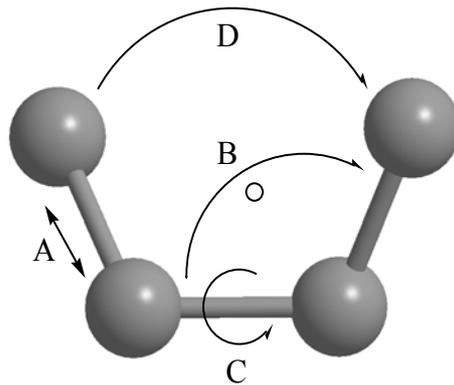


Abb. 1-9: in MM2-Rechnungen berücksichtigte Wechselwirkungen

Die gesamte potentielle Energie kann durch die folgenden Beziehungen zwischen Atomen beschrieben werden.

- Bindungsdeformation: Dehnung oder Streckung der Bindung (A)
- Valenzwinkel: Änderung des optimalen Winkels geminaler Atome (B)
- Torsionsenergie: Änderung des Bindungs-Winkels vicinaler Atome (C)

- Abstoßung zwischen sehr nahen Atomen und Anziehung auf längere Entfernung durch Dispersions-Kräfte (van der Waals, D).
- Wechselwirkungen durch Ladungen, Dipole, Quadrupole (elektrostatische Wechselwirkungen, D).

Verschiedene Arten von Kraftfeldern wurden entwickelt. Einige fügen zusätzliche Kräfte hinzu die beispielsweise die Deformationen von Bindungsebenen beschreiben, um die Genauigkeit des Modells zu erhöhen.

Die Zuverlässigkeit eines Kraftfelds hängt von den Parametern desselben und den Funktion der potentiellen Energie ab, die benutzt werden um die gesamte Energie des Modells zu berechnen. Die Parameter müssen für einen gegebenen Satz von Energiefunktion optimiert werden, und können in der Regel nicht von einem Modell auf ein anderes übertragen werden.

1.6.2 MM2

*Chem3d*⁶⁵ benutzt eine modifizierte Version von Allingers⁶⁶ MM2-Kraftfeld.⁶⁷ Zusätzlich zu Allingers Kraftfeld wurden folgende Terme hinzugefügt:

- Berücksichtigung von Ladung/Dipol-Wechselwirkungen
- Ein Term für die Beschreibung nichtharmonischer Deformationen von Bindungen
- Einbeziehung von „cut offs“ von raumübergreifenden Wechselwirkungen
- Berücksichtigung von ausgedehnten π -Systemen
- Einbeziehung benutzerdefinierter Randbedingungen (z.B. NOE-Kontakte)

Im folgenden werden kurz die verschiedenen Energieterme unter Einbeziehung der eben genannten Modifikationen diskutiert.

1.6.2.1 Spannungsenergie

$$E_{\text{Bindungs-}}^{\text{Streckung}} = \sum_{\text{Bindungs-}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2$$

Die Spannungsenergie basiert auf Hook's Gesetz. Der Parameter k_i entspricht der Federkonstanten, während $l_{i,0}$ der Abstand für das Atom i im Gleichgewicht ist. Das Programm verwendet tabellierte Parameter für die verschiedenen möglichen Atompaare (C-C, C-H, N-H etc.). Das Ergebnis der Gleichung ist die Energie verbunden mit der Auslenkung

⁶⁵ Chem3D, Version 9.0, © 1986-2004 CambridgeSoft.

⁶⁶ Allinger, N. L., *J. Amer. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8127.

⁶⁷ U. Burkert, N. L. Allinger, *Molecular Mechanics*, American Chemical Society: Washington, DC, **1982**.

aus dem Gleichgewicht, d.h. eine Abweichung vom idealen Abstand.

Eine einfache Parabel führt zu falschen Ergebnissen wenn die Bindung soweit gedehnt wird, daß sie nahezu oder tatsächlich dissoziiert. Die Morse-Funktion⁶⁸ stellt die beste Korrektur für dieses Problem dar. Da diese Funktion jedoch zu einem erheblichen Anstieg der Rechenzeit führen würde, wird als Alternative nur je ein kubischer und quartischer Term hinzugefügt. Die Gleichung für die Energie der Bindungs-Streckung wird damit zu folgendem Ausdruck:

$$E_{\text{Bindungs-Streckung}} = \sum_{\text{Bindungs-Streckung}} \frac{k_i}{2} \left((l_i - l_{i,0})^2 + S_C (l_i - l_{i,0})^3 + S_Q (l_i - l_{i,0})^4 \right)$$

Die Parameter S_C und S_Q sind in einer Tabelle des Programms Chem3D gespeichert.

1.6.2.2 Valenzwinkel Energie

$$E_{\text{Valenzwinkel}} = \sum_{\text{Valenzwinkel}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2$$

Auch der Energiebeitrag durch eine Veränderung des Valenzwinkels basiert auf Hook's Gesetz. Der Parameter k_i entspricht der Federkonstanten, und θ_0 ist der Wert des Winkels im Gleichgewicht. Entsprechend beschreibt die Gleichung die Energieänderung verbunden mit einer Auslenkung aus dem Gleichgewicht.

Für jedes Atom-Triplett sind die Bindungswinkel abhängig von der Atomart tabelliert, die auch die Substitution am Zentralatom berücksichtigten. Das Programm verwendet einen weiteren Term, um sehr starke Deformationen vom idealen Wert zu berücksichtigen. Dadurch wird die Gleichung zu:

$$E_{\text{Valenzwinkel}} = \sum_{\text{Valenzwinkel}} \frac{k_i}{2} \left((\theta_i - \theta_{i,0})^2 + S_W (\theta_i - \theta_{i,0})^6 \right)$$

Auch die Konstante S_W ist tabelliert, ebenso alle idealen Winkel $\theta_{i,0}$, die die Verhältnisse in Ringsystemen beschreiben.

⁶⁸ $E_{\text{pot}}(r) = D(1 - e^{-a(r-r_k)})^2$; D: Dissoziationsenergie (eV), Gleichgewichtsabstand r_k (Å), Steifeparameter a (1/Å).

1.6.2.3 Torsionsenergie

$$E_{Torsion} = \sum_{Torsion} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))$$

Die Gleichung beschreibt die Energieminima bei $360/n$ Grad, die bei Diederwinkeln auftritt. Im Programm Chem3d kann n nur die Zahlen 1, 2 oder 3 einnehmen. Der Parameter V_n ist die Torsions-Kraftkonstante. Sämtliche Parameter sind jeweils einem Atom-Quartett zugewiesen und abhängig von den Atomtypen tabelliert (C-C-C-C, C-O-C-N, H-C-C-H etc.). Auch in diesem Fall werden die besonderen Verhältnisse in Ringsysteme berücksichtigt.

1.6.2.4 Nicht kovalente Wechselwirkungen

Unter den nicht kovalenten Wechselwirkungen sind alle Energien von Atompaaaren i, j zusammengefaßt, denen im Modell keine Valenzbindung zugeordnet ist. Zudem ist ein "cut off" definiert, der diese bei langen Distanzen aussetzen läßt. Es werden sowohl repulsive als auch attraktive Kräfte berücksichtigt.

Van der Waals Energie

Bei Abständen die geringer sind als die kovalenten Radien der beiden Atome i, j überwiegen repulsive Kräfte, die in der folgenden Gleichung im linken Term in der 12. Potenz Ausdruck finden. Die attraktiven Kräfte sind proportional zu r_{ij}^6 :

$$E_{Van\ der\ Waals} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

- σ_{ij} sind die *Van der Waals* Radii für die Atome i, j .
- ε_{ij} ist eine von den Atomtypen abhängige Kraftkonstante.
- r_{ij} ist der tatsächliche Abstand zwischen den beiden Atomen.

Da durch diese Gleichung bei kurzen Distanzen repulsive vor dispersiven Wechselwirkungen bevorzugt werden, wird die Gleichung für kurze Distanzen durch folgende ersetzt:

$$E_{Van\ der\ Waals} = S_{kurz} \sum \sum \varepsilon \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^2$$

Um die Rechenzeit zu verringern wird für Distanzen größer als 10 \AA ein *cut off* definiert, das heißt der gesamte Term wird in der Berechnung nicht weiter berücksichtigt.

Elektrostatische Energien

$$E_{\text{Elektro-}}^{\text{statik}} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)$$

- q_i, q_j sind die Ladungen der beteiligten Atome.
- r_{ij} stellt den Abstand zwischen den Atomen dar.
- ϵ_0 ist die Permittivität und damit eine von der Umgebung abhängige Konstante.

Das Programm unterscheidet zwischen Ladung/Ladungs-, Dipol/Dipol- und Ladung/Dipol-Wechselwirkungen. Der *cut off* für elektrostatische Wechselwirkungen liegt für Ladung/Ladungs-Wechselwirkungen bei 30 bis 40 Å, der für Dipol/Dipol und Ladung/Dipol Wechselwirkungen bei 18 bis 25 Å.

Weitere in Chem3d berücksichtigte Terme

Atome die in einer trigonal planaren Weise arrangiert sind, zum Beispiel im Fall der sp^2 Hybridisierung, benötigen einen zusätzlichen Term, der die *out-of-plane*-(OOP)-Dehnung beschreibt. Für Strukturen die π -Systeme beinhalten führt das Programm SCF-Rechnungen aus.⁶⁹ Abhängigkeiten von Bindungsdeformationen zu Valenzwinkeländerungen werden in Deformations-Biegungs-Kreuztermen ausgedrückt. Für weiterführende Informationen wird auf die Literatur verwiesen.⁷⁰

⁶⁹ D.H. Lo, M.A. Whitehead, *Can. J. Chem.* **1968**, 46, 2027; G.D. Zeiss, M. A. Whitehead, *J. Chem. Soc. A* **1971**, 1727-1738.

⁷⁰ W.H.E. Schwarz, *Theoret. Chim. Acta* **1972**, 24, 29-34.

2 Konzeption und Zielsetzung

Viele Proteine und Peptide, insbesondere solche, die zur Ausbildung definierter Sekundärstrukturen neigen, besitzen auch eine erhöhte Aggregationsfähigkeit. In besonderem Maße gilt das für solche Peptide, die β -Faltblätter ausbilden; berühmt wurde dieses Phänomen durch die Forschungsergebnisse hinsichtlich der Alzheimer-Krankheit.^{71,72}

Da auch im Fall des E-Cadherin der Bereich des β -Turn (Aminosäuren 82-86) mit β -Faltstrukturen umgeben ist (Abb. 1-5, Abb. 1-6, S. 9), führt dies in fast allen Fällen zu einer völligen Unlöslichkeit synthetisierter Peptidsequenzen mit einer Länge um die 10 Aminosäuren aus diesem Bereich. Solche Peptidsequenzen lassen sich schwer analysieren und sind in der Regel für biologische Untersuchungen ungeeignet. Glycosylierungen des Peptids - relativ unabhängig von der Position der glycosylierten Aminosäure - führen zu einer deutlich verbesserten Löslichkeit. Durch die gezielte Glycosylierung einer Aminosäure läßt sich jedoch nicht nur die Löslichkeit verbessern, sondern auch die Sekundärstruktur beeinflussen und stabilisieren. Die meisten kurzen Peptide bevorzugen bei Raumtemperatur *random coil*-Strukturen, das glycosylierte Peptid gleicher Sequenz sollte eine erhöhte Tendenz zur Ausbildung definierter Sekundärstrukturen haben.

Aus diesem Grund wurden glycosylierte Partialsequenzen aus Bereich der homophilen Erkennungsregion des humanen E-Cadherin synthetisiert.^{78,87,96} Fragen hinsichtlich der Ausbildung eines β -Turns und des Einflusses einer Glycosylierung der in der Turnsequenz vorkommenden Aminosäure Serin konnten jedoch nicht vollständig beantwortet werden.⁸⁷ Als ein Problem zeigte sich weiterhin die Löslichkeit der (Glyco-)Peptide, und eine Glycosylierung mit Monosacchariden (T_N-Antigen) war nicht ausreichend.

Für das LI-Cadherin waren bislang wenige Glycopeptide aus dem Bereich der postulierten Erkennungsregion synthetisiert worden.⁷³ Die zeigten jedoch alle eine im Vergleich zum E-Cadherin bessere Löslichkeit, was NMR-spektroskopische Untersuchungen auch in systematischer Weise ermöglicht. Da zudem wenig über Sekundär- und Tertiärstruktur des

⁷¹ C. Soto et al., *The Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270 (7), 3063-3067.

⁷² (a) H. Sticht, P. Bayer, D. Willbold, S. Dames, C. Hilbich, K. Beyreuther, R. W. Frank, P. Rösch, *Eur. J. Biochem* **1995**, 233, 293-298. (b) M. Coles, W. Bicknell, A. A. Watson, D. P. Fairlie, D. J. Craik, *Biochemistry* **1998**, 37, 11064-11077.

⁷³ M. Wagner, Dissertation, Universität Mainz, **2001**.

LI-Cadherin bekannt ist wurde es als Zielprotein für diese Arbeit gewählt. Aufgrund von Sequenzhomologien zum E-Cadherin wurde die homophile Erkennungsregion dem Bereich der Aminosäuren 90-110 zugeordnet (Abb. 2-1).

$\begin{array}{cccccccc} 70 & & 80 & & 90 & & 100 & & 110 & & 120 \\ \text{LTGETDGIFK} & \text{IEKDGLLYHT} & \text{RVLDRRETRAV} & \text{HHLQLAALDS} & \text{QGAIVDGPVP} & \text{IIIEVKDIND} \end{array}$

Abb. 2-1: Ausschnitt aus der cDNA der Region L-CAD1 (LI-Cadherin, Ratte).

Fett: Bereich der homophilen Erkennungsregion, in Grau: potentieller β -Turn.

In einem ersten Schritt sollte der komplette Bereich der homophilen Erkennungsregion synthetisiert werden, und dann anhand dessen dreidimensionalen Modells die konkrete Zielsequenz ermittelt werden. Der Einfluß verschiedener Saccharid-Antigene (Abb. 2-2), kovalent mit der Seitenkette von Serin(100) verknüpft, sollte im nächsten Schritt mittels NOE-Experimenten untersucht werden. Die biologische Wirksamkeit der so gewonnen Glycopeptide soll in einer Kooperation erprobt werden.

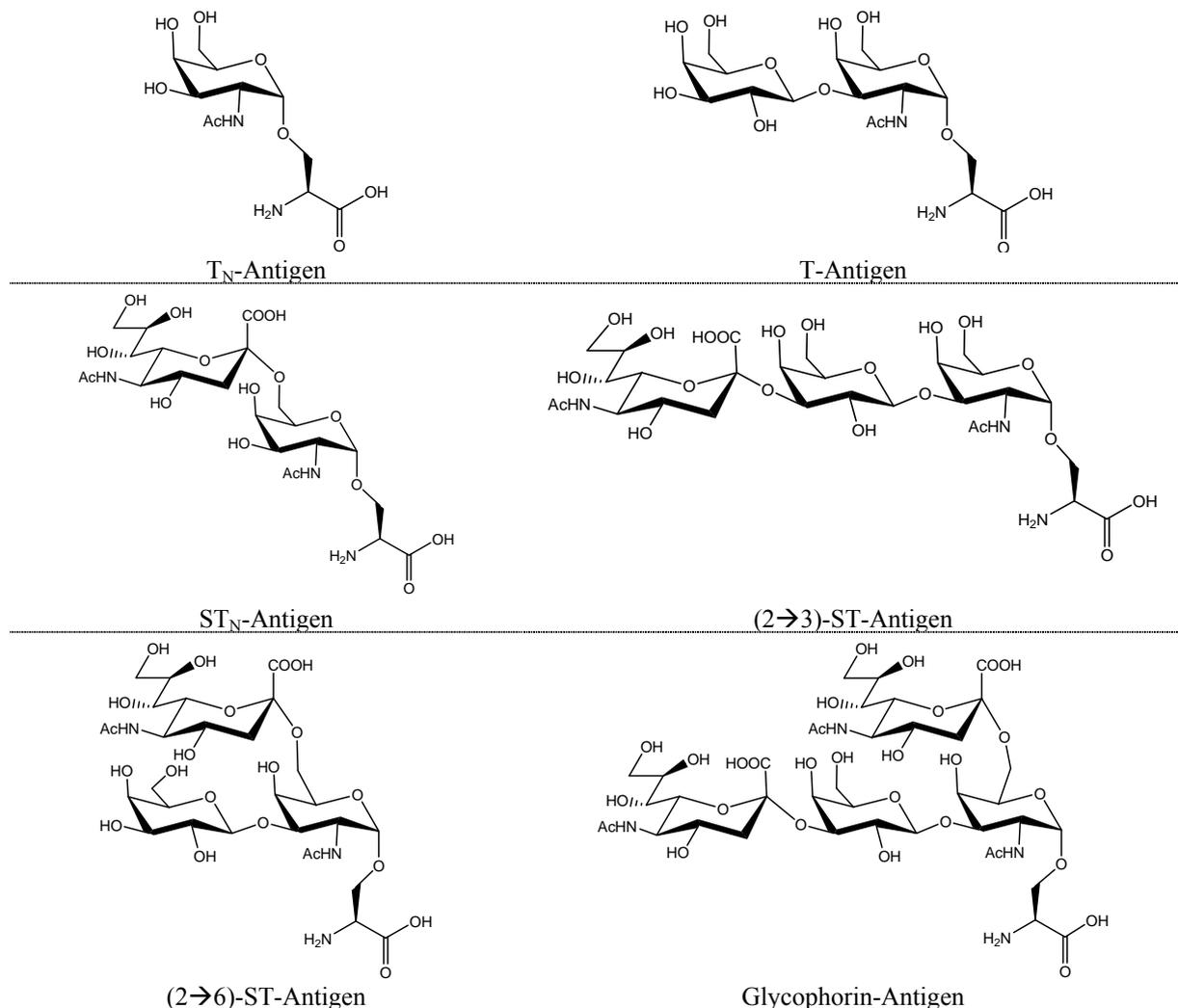


Abb. 2-2: Geplante Antigene zum Einsatz zur Synthese der Glycopeptide.

3 Allgemeiner Teil

3.1 Synthesen der glycosylierten Serin-Bausteine

Für sämtliche auf den folgenden Seiten vorgestellten verschiedenen Bausteine für die sequentielle Festphasensynthese wird das Galactosamin als zentrales Element genutzt. In allen Fällen wird zuerst die Position 1 des Galactosamin mit der Aminosäure Serin verbunden, während die verschiedenen Substitutionsmuster der restlichen vier Hydroxygruppen - insbesondere der Positionen 3 und 6 - die verschiedenen Saccharid-Antigene ergeben.

Die Synthese des Monosaccharids **4**, ausgehend von Galactose, ist literaturbekannt^{74,75} und soll hier nur kurz aufgeführt werden.

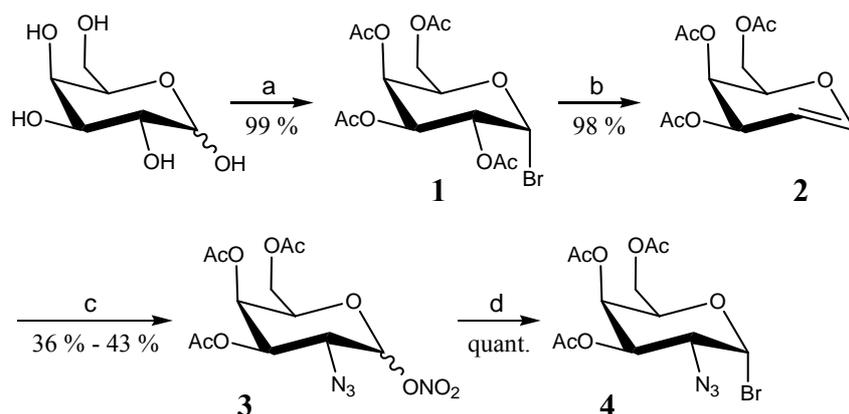


Abb. 3-1: Synthese des Galactosederivats **4**

(a) 1) Ac_2O , HClO_4 , Raumtemp., 12 h 2) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{AcOH}/\text{HBr}$, Raumtemp., 12h (b) N-Methyl-imidazol, Zn, 80°C , 3 h (c) $\text{Ce}[(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6]$, NaN_3 , Acetonitril, -20°C , 14 h (d) LiBr, Acetonitril, Raumtemp., 12 h.

Das durch Peracetylierung und nachfolgende Behandlung mit HBr leicht darstellbare Galactosyl-Bromid **1** läßt sich in Gegenwart einer Base nahezu quantitativ mit Zink zum Galaktal **2** reduzieren.⁷⁶ Mittels des von Lemieux⁷⁷ eingeführte Verfahren der Azidonitratierung wurde das Azidonitrat **3** in mäßigen Ausbeuten erhalten. Das bei -20°C unzersetzt lagerbare Azidonitrat läßt sich bei Raumtemp. mit Lithiumbromid zum

⁷⁴ S. Keil, Dissertation Universität Mainz **2000**.

⁷⁵ B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 629.

⁷⁶ J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, 13(1), 129.

Die in der Vorschrift erwähnte Aufarbeitung wurde abgeändert.

⁷⁷ R. Lemieux, R.M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244.

entsprechenden Galactosyl-Bromid **4** umsetzen. Durch den anomeren Effekt wird ausschließlich das α -Produkt gebildet. Das Bromid selbst ist instabil und sollte direkt in der weiter umgesetzt werden. Die Azidonitratisierung, deren Ausbeute bei Ansätzen über 15 g abnimmt (auf Grund schlechter Durchmischung des Reaktionsgemischs bei tiefen Temperaturen verbunden mit der Notwendigkeit wasserfreier Lösungsmittel), bleibt der limitierende Schritt der Reaktionssequenz.

3.1.1 Synthese des T_N-Antigen-Bausteins

Da die Synthesestrategie den vollständig geschützten T_N-Baustein **8** als Edukt für sämtliche anderen Antigene benützt, wird mindestens einmal - im Fall der (2→3)-Sialyl-Antigene auch zweimal - eine nicht unproblematische Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen in Gegenwart der Fmoc-Schutzgruppe notwendig. Da die Orthogonalität der Schutzgruppen der Saccharid-Bausteine zu geschützten Aminosäuren in der späteren Festphasensynthese notwendig ist, liegt es nahe, einen Ersatz für die Fmoc-Schutzgruppe zu verwenden. Da die Carboxygruppe der für den Baustein benötigten Aminosäure *tert*-Butyl geschützt ist, verspricht die Verwendung der Boc-Schutzgruppe, das Carbamat derselben, nur eine zusätzliche Stufe ohne eine weitere Einschränkung der Synthesemethoden. Zuerst sei aber die bewährte Syntheseroute unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe vorgestellt.

3.1.1.1 Unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe

Die für den T_N-Baustein benötigte, in der Seitenkette ungeschützte Aminosäure Fmoc-L-Ser(OH)-*Ot*Bu **6** wurde synthetisiert, indem L-Serin mit Fmoc-ONSu in Acetonitril umgesetzt wurde⁷⁸, welches dann mit DCC, *tert*-Butanol und CuCl selektiv zum gewünschten Produkt reagierte⁷⁹ (Abb. 3-2).

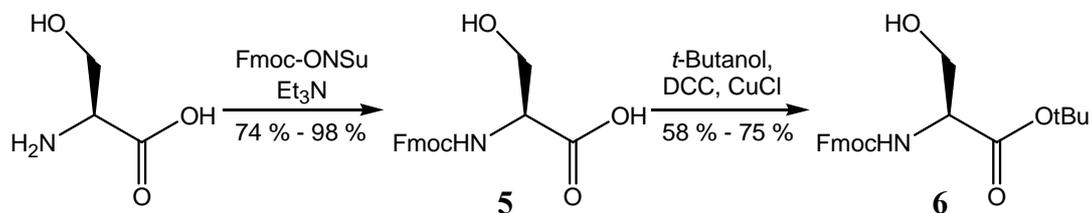


Abb. 3-2: Synthese des Serin-Derivats Fmoc-L-Ser(OH)-*Ot*Bu **6**

⁷⁸ J. Habermann, Dissertation, Universität Mainz **1997**, 76.

⁷⁹ G. Braun, Dissertation, Universität Mainz **1991**, 103.

Die Glycosylierung des Serin-Derivats **6** erfolgte nach der von Paulsen und Hölck beschriebenen Methode.⁸⁰ Das mit Silbercarbonat und Silberperchlorat aktivierte Bromid **4** läßt sich so mit hoher Ausbeute zum Glycosid **7** umsetzen. Auf Grund des anomeren Effekts erhält man als Hauptprodukt das α -Glycosid. Eine einfache und vollständige chromatographische Trennung des Anomerengemischs gelingt auf der nächsten Stufe; Fmoc-Ser(Ac₃GalN₃)-OtBu **7** wird dazu mit aktiviertem Zinkstaub in einer Mischung aus THF, Ac₂O und AcOH nach K. Bock et al. in guten Ausbeuten zum Acetamid **8** umgesetzt (Abb. 3-3).⁸¹

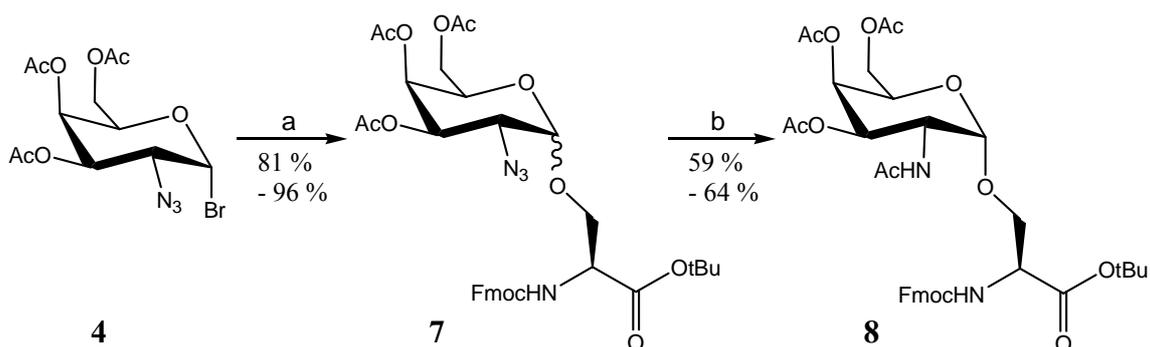


Abb. 3-3: Synthese des vollständig geschützten T_N-Bausteins

(a) Fmoc-L-Ser(OH)-OtBu **6**, AgCO₃, AgClO₄, Toluol, CH₂Cl₂, Raumtemp., 12 h.

(b) Zn/CuSO₄, THF/Ac₂O/AcOH, Raumtemp., 12 h, 87 % (α + β)

Der für die Festphasensynthese benötigte C-terminal ungeschützte Baustein ließ sich in guten Ausbeuten durch Behandlung der Verbindung **8** mit TFA erzielen (Abb. 3-4), wobei Anisol als Kationenfänger diente. Die säulenchromatische Reinigung erwies sich als unzureichend um letzte Reste des β -Anomers zu entfernen. Nach Reinigung mittels HPLC wurde das reine α -Anomer **9** in 73 %-iger Ausbeute erhalten, ausgehend von Galactose in einer Gesamtausbeute von 12-19 %.

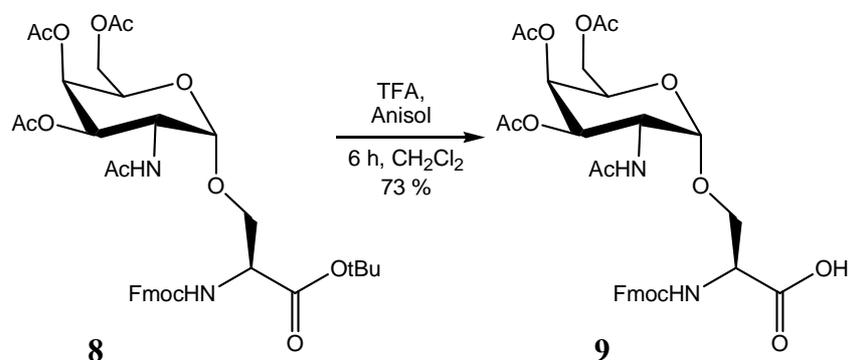


Abb. 3-4: Der T_N-Serin-Baustein.

⁸⁰ H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, 109, 89.

⁸¹ E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1*, **1996**, 985.

3.1.1.2 Unter Verwendung der Boc Schutzgruppe

Auch wenn die Verwendung der Boc-Schutzgruppe während der Synthese des Glycosylaminosäure-Bausteins vorteilhaft erscheint, sollte im letzten Schritt die Fmoc-Schutzgruppe wieder eingeführt werden, um das Fmoc-Protokoll während der Festphasensynthese weiterhin nutzen zu können. Die nachträgliche Einführung der *N*-terminalen Schutzgruppe wurde in einer ersten Testreaktion überprüft (Abb. 3-5).⁸²

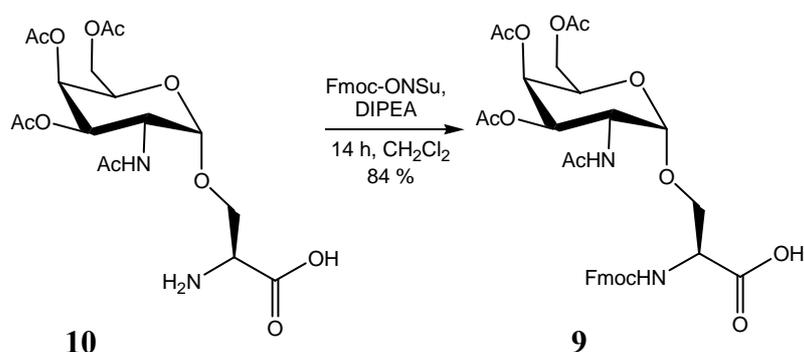


Abb. 3-5: Nachträgliche Einführung der *N*-terminalen Schutzgruppe

Durch Behandlung von **9** mit einer Lösung aus DMF/Piperidin 4:1 wurde das *N*-terminal deblockierte Serin-Derivat **10** quantitativ *in situ* erzeugt, was sich mittels Dünnschichtchromatographie feststellen ließ. Dann konnte es im relevanten folgenden Reaktionsschritt mit 1.2 Äquivalenten Fmoc-ONSu und DIPEA als Base zu 84 % wieder mit der Fmoc-Gruppe geschützt werden. Da somit die Einführung der Fmoc-Schutzgruppe im letzten Schritt der Synthese des Bausteins mit sehr guter Ausbeute gelang, wurde analog zur Fmoc-Strategie das *N*-terminal Boc geschützte Serin-Derivat **12** synthetisiert (Abb. 3-6).

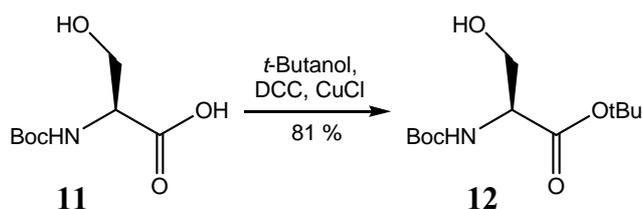


Abb. 3-6: Synthese des Serin-Derivats **12**

Der sterische Anspruch der Boc-Schutzgruppe sorgt im Gegensatz zum äquivalenten Fmoc-Derivat **5** für eine Abschirmung der Alkohol-Funktion der Seitenkette, so daß die unerwünschte Nebenreaktion der Veresterung derselben weitgehend unterdrückt wird. Auch die Glycosylierung und die folgende reduktive Acetylierung zum Acetamid wurden in Analogie zur Fmoc-Strategie durchgeführt (Abb. 3-7).

⁸² nach der allgemeinen Reaktionsführung aus *Synthesis* **1978**, 671.

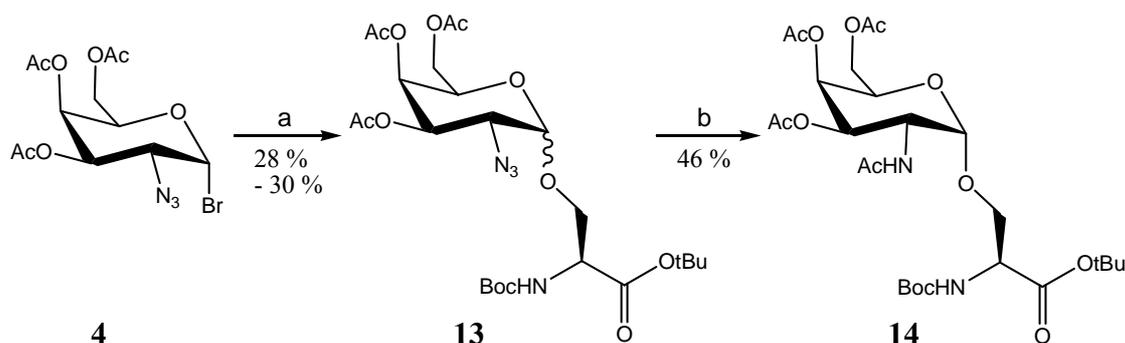


Abb. 3-7: Synthese der Verbindung Boc-Ser(Ac₃GalNAc)-OtBu **14**

(a) Boc-L-Ser(OH)-OtBu **12**, AgCO₃, AgClO₄, Toluol, CH₂Cl₂, Raumtemp., 12 h.

(b) Zn/CuSO₄, THF/Ac₂O/AcOH, Raumtemp., 12 h, 83 % (α + β)

Die Koenigs-Knorr-Glycosylierungsvariante⁸³ nach Paulsen und Hölck⁸⁰ (AgCO₃, AgClO₄) lieferte jedoch an **12** nur mäßige Ausbeuten von 28-30%. Wie schon bei dem vergleichbaren Fmoc-Derivat wurde das Produkt als Anomerengemisch erhalten, das sich nicht chromatographisch trennen ließ. Die Reduktion zum Acetamid mit aktiviertem Zinkstaub in einer Mischung aus THF, Ac₂O und AcOH nach K. Bock et al.⁸¹ gelang dagegen in guten Ausbeuten, und auch die chromatographische Trennung der beiden Anomere war möglich. Jedoch zeigte sich dabei, daß der Anomerenüberschuß, resultierend aus der vorangegangenen Glycosylierung (α : β = 46:37), nur noch sehr gering war.

Es wurden daher verschiedene alternative Glycosylierungsmethoden geprüft, alle mit den Galactosylbromid **4** und Serin-Derivat **12** als Edukte. Die *in situ*-Anomerisierung nach R. Lemieux mit *n*Bu₄NBr in Acetonitril/CH₂Cl₂-Gemischen führte zu keinem Umsatz. Wurde die Reaktion bei Temperaturen über 0 °C geführt, trat lediglich eine langsame Zersetzung des Donors **4** trat ein. Eine Katalyse mit Silbertriflat, oder auch eine Aktivierung mit Natriumhydrid führte auch bei tiefen Temperaturen (-30 °C) zur Zersetzung des Donors, das gewünschte Produkt wurde nicht gebildet.

Als weitere Koenigs-Knorr-Glycosylierungsvariante wurde die Methode nach Helferich, bei der Hg(CN)₂ als Promotor eingesetzt wird, erprobt.⁸⁴ Die Reaktion wurde bei -30 °C in einem CH₂Cl₂/Nitromethan-Gemisch geführt. Ähnlich wie die Variante mit Silbercarbonat und Silberperchlorat wurde zwar Produkt gebildet (ca. 10 %), das aber wegen der vergleichsweise raschen Zersetzung des Bromids **4**, verbunden mit zahlreichen Nebenprodukten, nicht isoliert wurde.

⁸³ W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, 34, 957.

⁸⁴ B. Helferich, K. Weis, *Chem. Ber.* **1956**, 89, 314.

Der in Abb. 3-7 gezeigte Reaktionsweg erwies sich damit immer noch als günstigste Syntheseroute. Da die Gesamtausbeute, ausgehend von Galactose, mit 4-6 % deutlich niedriger ist als die der Route unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe, wurden keine weiteren Synthesen mit *N*-terminaler Boc-Schutzgruppe durchgeführt.

3.1.2 Synthese des T-Antigen-Bausteins

Zur Synthese des T-Antigens wurde der T_N-Antigen-Baustein **9** deblockiert, und danach die reaktivierte 6-Position, zusammen mit der 4-Position, als Benzylidenacetal geschützt. Da der geschützte T-Baustein bei später folgenden Synthesen noch als Edukt für die Sialyl-T-Bausteine genutzt werden sollte, wurde nicht nur die Benzyliden-, sondern auch die *p*-Methoxybenzyliden-Schutzgruppe verwendet, um so ein breiteres Spektrum an Deblockierungsbedingungen zu haben (Abb. 3-8).

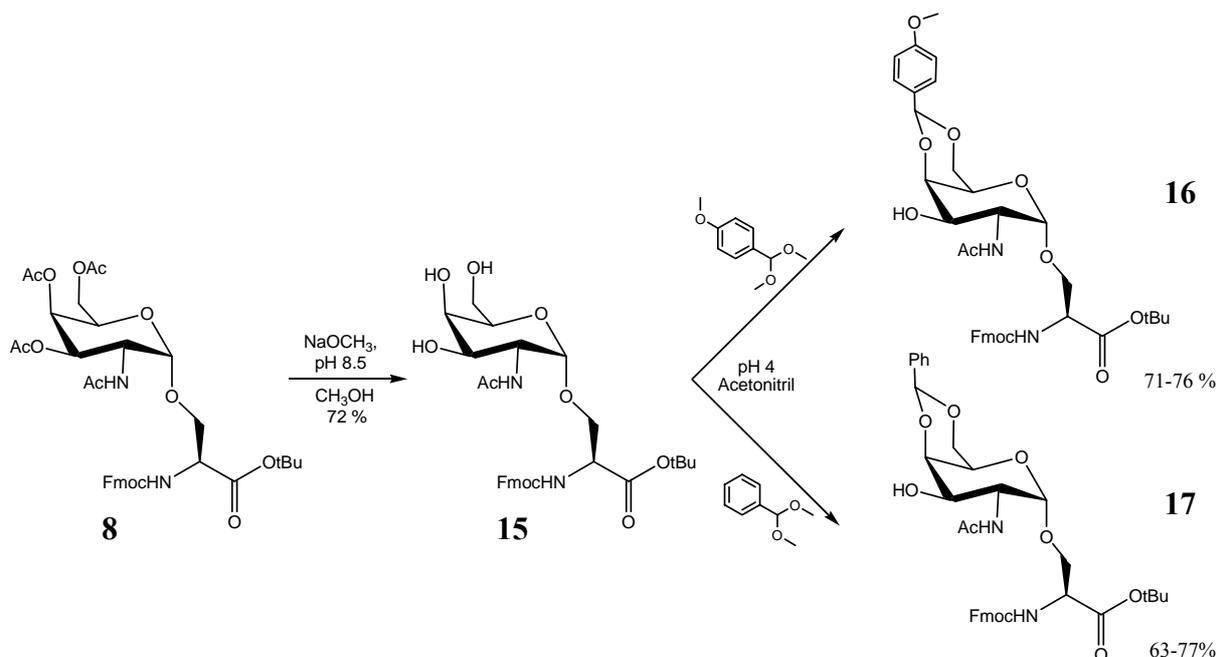


Abb. 3-8: Synthese der Acceptoren **16** und **17**.

Die Umesterung der *O*-Acetylgruppen von Verbindung **8** läßt sich unter Zemplén-Bedingungen durchführen. Die Behandlung mit Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von ca. 8.5 führt so in mäßigen bis guten Ausbeuten zum *O*-deacetylierten Serin-Derivat **15**. Schon geringe Abweichungen vom optimalen pH-Wert führen entweder zu Reaktionszeiten von Tagen oder aber zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Letzteres Problem läßt sich jedoch größtenteils umgehen, indem man das Rohprodukt mit Fmoc-ONSu nach den in Abb. 3-5 gezeigten Reaktionsbedingungen umsetzt, um abgespaltene Fmoc-

Schutzgruppen wieder zu ersetzen. DMF als Lösungsmittel anstelle von Dichlormethan lieferte die besseren Ausbeuten.

Die Synthese des Benzylidenacetals **16** und **17** gelang in guten Ausbeuten. Dazu wurden *p*-Methoxybenzaldehyddimethylacetal und Benzaldehyddimethylacetal in Acetonitril mit Verbindung **15** bei pH 3.5 bis 4 in Acetonitril bei Raumtemp. umgesetzt. Da man einen großen Überschuß des Acetals einsetzen kann, wird das gesamte Galactose-Derivat umgesetzt. Trotzdem ließen sich keine höheren Ausbeuten erzielen, da gleichzeitig eine langsame Anomerisierung einsetzt; bei einem weniger sauren pH-Wert findet dagegen keine Reaktion statt. Durch Säulenchromatographie lassen sich beide Anomere trennen. Zur Glycosylierung von Verbindung **17** zum T-Antigen-Baustein wurde in einem ersten Versuch das Trichloracetimidat **21** verwendet (Abb. 3-9).

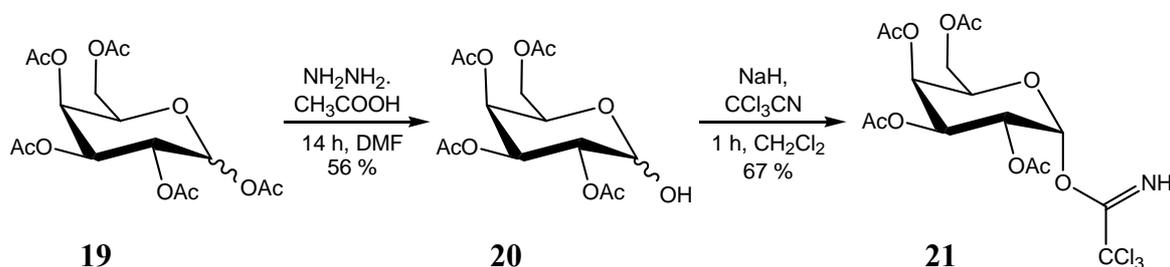


Abb. 3-9: Darstellung des Trichloracetimidats **21**

Die literaturbekannte Synthese⁸⁵ des Donors **21** verlief in mäßigen bis guten Ausbeuten. Nach selektiver Hydrolyse der 1-Position der peracetylierten Galactose **19** mit Hydrazinacetat ließ sich der entstandene Alkohol nach chromatographischer Reinigung mit Natriumhydrid zum Alkoholat umsetzen, der dann mit Trichloracetonitril zum α -Trichloracetimidat **21** in

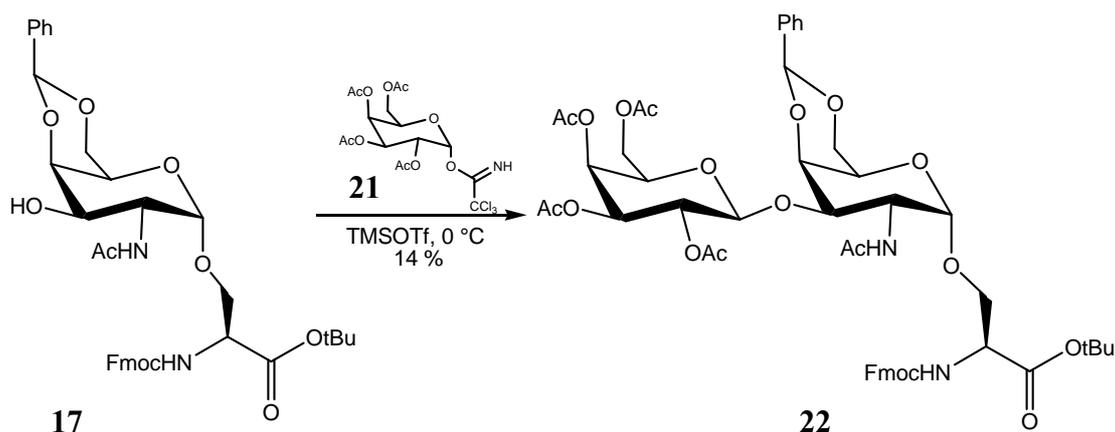


Abb. 3-10: Glycosylierung nach Schmidt

⁸⁵ M. Stumpp, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1249.

38 %-iger Gesamtausbeute umsetzen ließ. Nun konnte der Versuch einer Glycosylierung nach der Methode von Schmidt et al. unternommen werden (Abb. 3-10).⁸⁶

Dazu wurde eine Lösung von Akzeptor **17** und zwei Äquivalenten Donor **21** bei 0 °C mit TMSOTf aktiviert und zwei Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung und chromatographischen Reinigung wurde das Disaccharid **22** in 14 %-iger Ausbeute isoliert. Damit bestätigte sich leider die schlechte Nutzbarkeit der Methode für diese Reaktion, wie sie auch schon für den *p*-Methoxybenzyliden-geschützten Akzeptor **16** gefunden worden war.⁸⁷

Da der Akzeptor auf Grund zahlreicher Nebenreaktionen nicht zurückisoliert werden konnte, wurde auf die für den *p*-Methoxybenzyliden-Fall bewährte Methode⁸⁷ der Helferich-Reaktion zurückgegriffen,⁸⁴ die allerdings nicht katalytischer Mengen Hg(CN)₂ erfordert (Abb. 3-11).

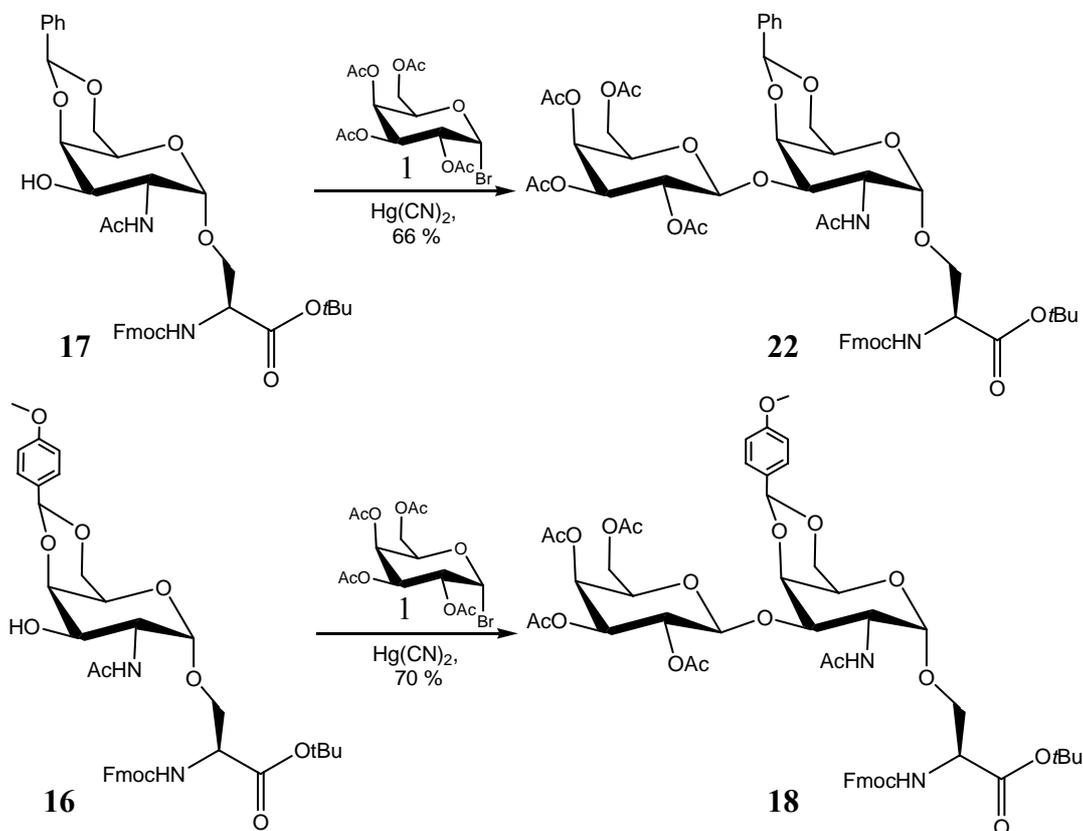


Abb. 3-11: Glycosylierung nach Helferich

Die Glycosylierungen nach Helferich erfolgten bei Raumtemp. in einem Nitromethan/Dichlormethan-Gemisch. Die Reaktionen mußten mit einem Überschuß an Hg(CN)₂ geführt werden, da sonst kein Umsatz zu beobachten war. Für beide Produkte **18**

⁸⁶ R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, 92, 763. R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213. R. R. Schmidt, *Pure App. Chem.* **1989**, 61, 1257.

⁸⁷ T. Reipen, Dissertation, Universität Mainz, **2002**.

und **22** wurden nach chromatographischer Reinigung gute Ausbeuten erzielt. Da zudem der Donor **1** schon für die Synthese des Galactals benötigt wird (Abb. 3-1, S. 23), verursacht diese Methode einen geringen Syntheseaufwand.

Da die Benzyliden-Schutzgruppen der beiden Disaccharide **18** und **22** die saure Hydrolyse der *tert*-Butylschutzgruppe nicht überstehen würden, wurden sie zuerst selektiv abgespalten und später, soweit erforderlich, durch Acetyl-Schutzgruppen ersetzt (Abb. 3-12).

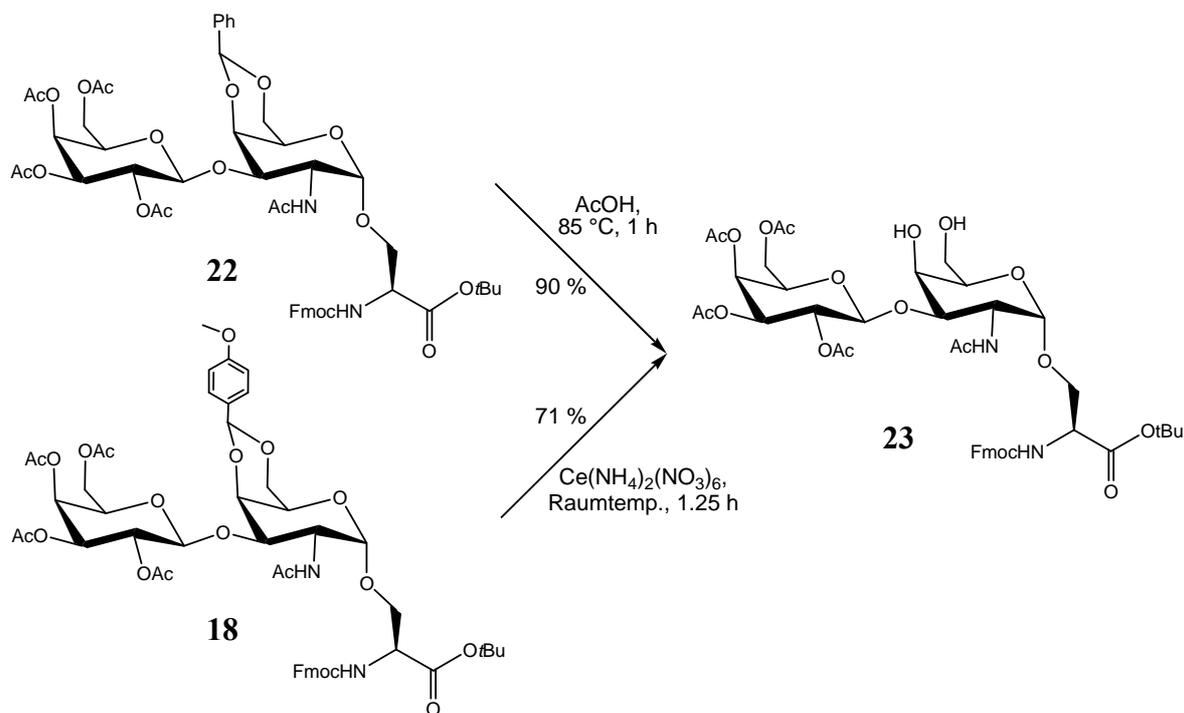


Abb. 3-12: Darstellung des Akzeptors **23**

Für die Benzyliden-Schutzgruppe der Verbindung **22** stellt die saure Abspaltung mit Essigsäure bei ~80 °C das Mittel der Wahl dar, da eine reduktive Abspaltung mit Wasserstoff in größerem Maße auch die Fmoc-Schutzgruppe angreifen würde. Entsprechend wurde die Reaktion in Essigsäure bei 85 °C geführt, und das gewünschte Produkt **23** nach einer Stunde in hohen Ausbeuten erhalten.⁸⁸ Auch die *p*-Methoxybenzyliden Schutzgruppe der Verbindung **18** kann auf diese Weise hydrolysiert werden, allerdings sollte die oxidative Abspaltung mit Cerammoniumnitrat in Acetonitril die bessere Ausbeute ergeben.^{87,89} Zwar wurde eine ähnlich hohe Ausbeute erzielt wie in der Literatur beschrieben, allerdings wurde mit der einfacheren Benzyliden-Schutzgruppe insgesamt das bessere Ergebnis erzielt. Ist man an der ¹H-NMR spektroskopischen Analyse der Benzyliden-geschützten Verbindungen interessiert,

⁸⁸ M. Smith, R. Rammner, I. H. Goldberg, H. G. Khordua, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430.

⁸⁹ K. Toshima, S. Mukaiyama, T. Yoshida, T. Tamai, K. Tatsuta, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *32*, 6155.

erhält man mit der *p*-Methoxybenzyliden Schutzgruppe die besseren Ergebnisse, da nur selten Signalverdopplung auftritt, woraus man schließen kann das ein Konformer bevorzugt vorliegt. Um den fertigen T-Antigen-Baustein zu erhalten, mußten nun die freien Hydroxygruppen wieder acetyliert, und die Säurefunktion der Aminosäure deblockiert werden (Abb. 3-13).

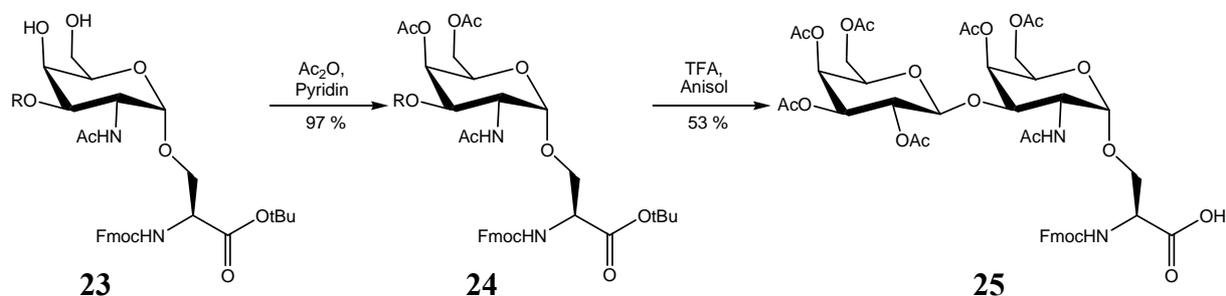


Abb. 3-13: Synthese des T-Antigen-Bausteins **25** (R= β -Ac₄Gal)

Das Serin-Derivat **23** wurde 14 h in einer Mischung aus Acetanhydrid und Pyridin gerührt und chromatographisch gereinigt. Das in hohen Ausbeuten erhaltene acetylierte Produkt **24** wurde dann mit TFA und Anisol bei Raumtemp. gerührt. Zwar ließ sich das Rohprodukt in nahezu quantitativer Ausbeute isolieren, und auch nach Flashchromatographie war die Ausbeute noch hoch, aber eine analytische HPLC-Analyse zeigte das Vorliegen eines Anomerengemischs an, so daß eine Reinigung mittels präparativer HPLC notwendig wurde. So ließ sich das reine β -Anomer Fmoc-Ser([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)-OH **25** in 53 % Ausbeute isolieren. Die mäßige Ausbeute liegt an den erhöhten Temperaturen im Sommer (die Reaktion wurde bei einer Raumtemp. von ca. 30 °C durchgeführt). Die vergleichbaren Behandlungen der anderen Saccharid-Bausteine mit TFA zur *tert*-Butyl-Abspaltung bei ca. 20 °C führten zu deutlich besseren Ausbeuten. Ein Testansatz in einem Wasserbad bei 40 °C wurde durch HPLC-Monitoring verfolgt und zeigte einen langsamen Zerfall in zahlreiche Nebenprodukte (ca. 10 % Produktverlust pro Stunde in den ersten 4 h).

Der T-Antigen-Baustein ließ sich ausgehend vom vollständig geschützten T_N-Derivat **8** in 17 %-iger Gesamtausbeute über den Benzyliden-, bzw. mit 14 %-iger Gesamtausbeute über den *p*-Methoxybenzylidenweg darstellen.

3.1.3 Synthese des (2→6)-Sialyl-T_N-Antigen-Bausteins

Ähnlich wie schon bei der Synthese des T-Antigen-Bausteins läßt sich der *O*-deacetylierte T_N-Antigen-Baustein als Akzeptor für eine weitere Glycosylierung einsetzen. Anders jedoch als die bislang eingesetzten Galactosederivate besitzt die Sialinsäure in der α -Position zum anomeren Zentrum, also am C-3 Atom, keinen nachbargruppenaktiven Substituenten. Zudem führt die elektronenanziehende Carboxygruppe vermehrt zu 2,3-Eliminierungen und somit zur Glycalbildung, was die Sialylierung oft zu einer schwierigen Reaktion werden läßt.

Das Fehlen eines Substituenten in 3-Position der Neuraminsäure kann in Maßen durch kinetische Kontrolle und der Wahl des Lösungsmittels kompensiert werden. Acetonitril dirigiert durch den sog. Nitrileffekt zum äquatorialen α -Produkt erhalten (Abb. 3-14).^{90,91}

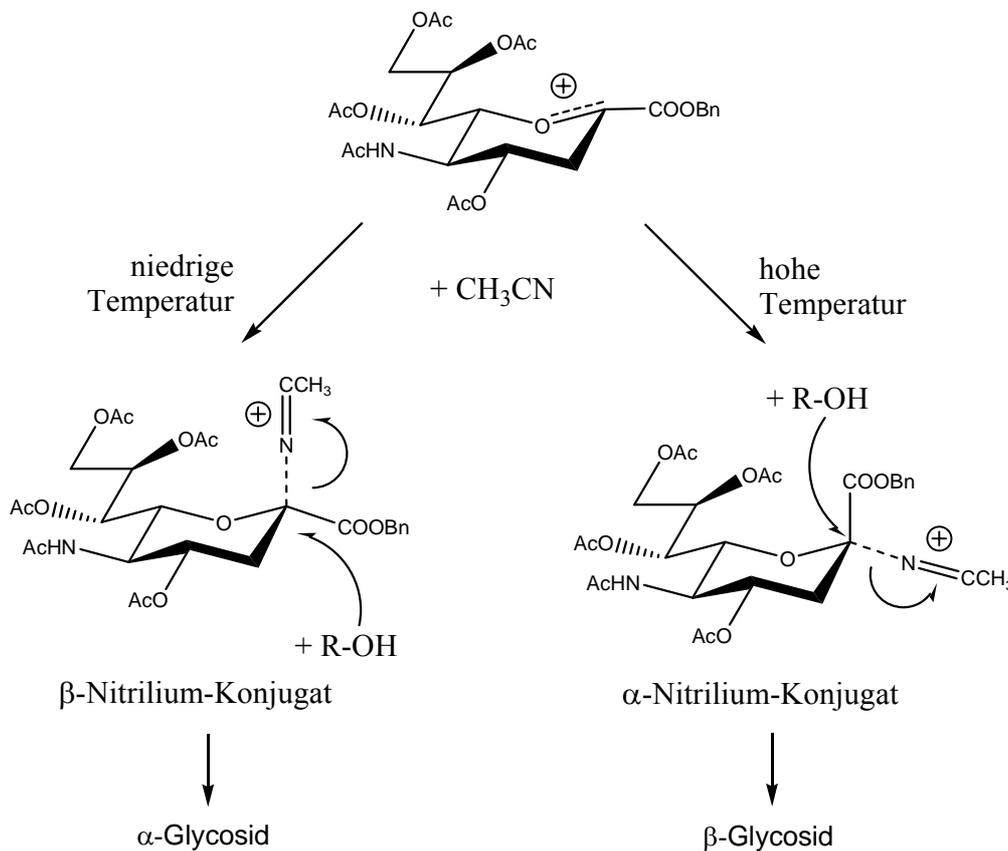


Abb. 3-14: Der Nitrileffekt bei Sialylierungsreaktionen

An das intermediär gebildete Glycosylkation addiert sich Acetonitril bei kinetischer Reaktionskontrolle axial, während bei höherer Temperatur das thermodynamisch stabilere äquatoriale α -Nitrilium-Zwischenprodukt entsteht. Genauer bildet sich nicht nur ein

⁹⁰ A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, K. Hotta, H. Ishida, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, *10*, 493.

Nitrilium-Konjugat, sondern Acetonitriliumion-Acetonitril-Konjugate.⁹¹ Durch anschließende Addition eines Nucleophils entsteht schließlich das entsprechende α/β -Produkt. Da das α -Produkt gebildet werden soll, erfordert dies tiefe Temperaturen (ca. $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), weswegen Acetonitril nicht als alleiniges Lösungsmittel verwendet werden kann.

Von den beschriebenen Glycosylierungsmethoden hat sich für die Synthese der Sialinsäurederivate der Einsatz von Austrittsgruppen wie anomere Phosphite⁹² oder Xanthogenate⁹³ **29** bewährt. Nach der Methode von Sinaÿ et al.⁹³ wurde das entsprechende Xanthogenat eingesetzt, das sich in fünf literaturbekannten Stufen in guter Gesamtausbeute synthetisieren läßt (Abb. 3-15). Die stereochemische Kontrolle von Sialylierungsreaktionen ist durch geeignete Wahl des Lösungsmittels und der Temperatur möglich.^{94,95}

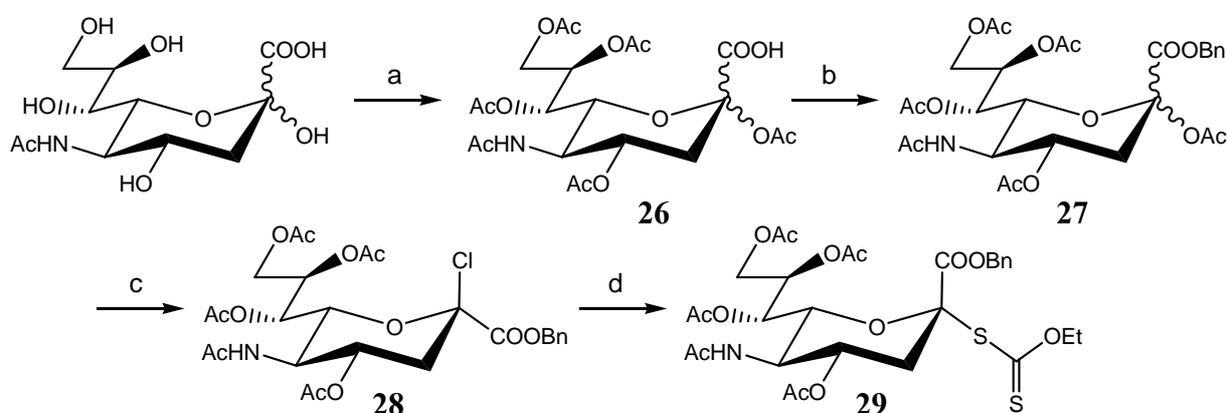


Abb. 3-15: Synthese des Neuraminsäure-Donors **29**.

- (a) Ac_2O , Pyridin, Raumtemp., 14 h, quant.; (b) 1.) Cs_2CO_3 , EtOH/ H_2O , Raumtemp., 30 min.;
 2.) BnBr , DMF, Raumtemp., 12 h, 86-89 %; (c) Acetylchlorid, Raumtemp., 3 d, quant.;
 (d) KCS_2OEt , EtOH, Raumtemp., 4 h, 58-75 %, Umsatz bis zu 94 %.

Nach Peracetylierung der *N*-Acetylneuraminsäure wurde die Carboxyfunktion zum Benzylester umgesetzt.⁹³ Dazu wurde die acetylierte Sialinsäure **26** mit Cs_2CO_3 in das Cäsiumsalz überführt und durch Zugabe von einem Überschuß an Benzylbromid zum vollständig geschützten Neuraminsäure-Derivat **27** umgesetzt. Das so entstandene Anomerengemisch ließ sich mit Acetylchlorid und ein paar Tropfen Wasser über einen $\text{S}_{\text{N}}1$ -Weg selektiv zum β -Chlorid **28** umsetzen. Dieses wiederum reagierte mit

⁹¹ R.R. Schmidt, M. Behrendt, A.Toepfer, *Synlett* **1990**, 694; I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. Hervé du Penhoat, J.-M. Mallet, V. Michon, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1993**, 246, 23.

⁹² T. J. Martin, R. Brescello, A. Toepfer, R. R. Schmidt, *Glycoconjugate J.* **1993**, 10, 16.

⁹³ A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res* **1989**, 187, 35-42.

⁹⁴ O. Kanie, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, 7, 501.

⁹⁵ W. Birberg, H. Lönn, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 7457.

Kaliummethylxanthogenat zum Sialyl-Donor **29**, der sich so ausgehend von *N*-Acetylneuraminsäure in einer Gesamtausbeute von 50-67 % synthetisieren ließ.

Mit dem Donor **29** ließ sich der schon für die Synthese des T-Antigen-Bausteins hergestellte Akzeptor **15** (Abb. 3-8, S. 28) zum ST_N-Antigen-Derivat **30** sialylieren (Abb. 3-16).⁹⁶

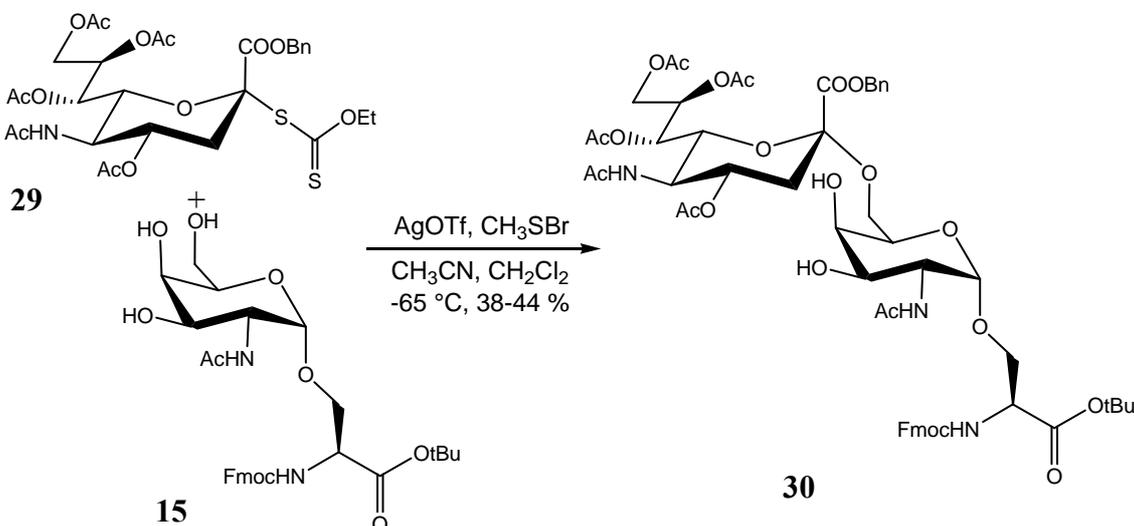


Abb. 3-16: Sialylierung des Galactosamin-Serin-Konjugats **15**.

Dazu wurden Donor **29**, Akzeptor **15** und Silbertriflat vorgelegt und langsam bei -65 °C mit aus äquimolaren Mengen von Brom und Dimethyldisulfid hergestelltem Methylsulfenylbromid⁹⁷ versetzt, um mit *in situ* erzeugtem Methylsulfenyltriflat den Donor **29** zu aktivieren. Das Donor/Akzeptor-Verhältnis wurde mit 6:5 relativ niedrig gewählt. Ein größerer Überschuß (5:2) führte zwar bei einer Testreaktion zu 46 % Ausbeute, jedoch war bei Ansätzen im Gramm-Maßstab die β -Eliminierung des intermediär gebildeten Glycosylkations zum Glycal die dominierende (Neben-)Reaktion. Die chromatographische Reinigung des Produktes war dann problematisch. Eine vollständige Trennung der Anomeren voneinander und vom Akzeptor gelang besser nach Acetylierung der freien 3,4-Hydroxygruppen. Da in späteren Synthesen Verbindung **30** auch als Acceptor für eine weitere Glycosylierung verwendet wurde (Kapitel 3.1.5, S. 43), wurde ein Teil durch präparativer HPLC gereinigt, was die Ausbeute für das reine Anomer auf 38 % senkte. Mittels analytischer HPLC wurde ein α : β Verhältnis von ca. 15:1 nachgewiesen. Die Zuweisung der anomeren Konfiguration der Neuraminsäurederivate erfolgte mittels ¹H-NMR-Spektrometrie

⁹⁶ A. Kuhn, Diplomarbeit, Universität Mainz, 2001.

⁹⁷ F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, 177, C13.

auf Grund empirischer Regeln:^{98,99}

$$\delta \text{ (ppm) } (\alpha\text{-H3}_{\text{equ.}}) > \delta \text{ (ppm) } (\beta\text{-H3}_{\text{equ.}}) \text{ und } \delta \text{ (ppm) } (\alpha\text{-H4}) < \delta \text{ (ppm) } (\beta\text{-H4})$$

In den meisten Fällen gilt auch ${}^3J_{3,4}(\alpha) < {}^3J_{3,4}(\beta)$, allerdings beträgt der Unterschied in manchen Fällen weniger als 1 Hz. Die 3J -Kopplung von H7 zu H8 (${}^3J_{7,8}(\alpha) > {}^3J_{7,8}(\beta)$) ist ein weiterer Anhaltspunkt für die korrekte Interpretation, ebenso wie die Aufspaltung der beiden H9 Protonen ($\delta \text{ (ppm) } (\alpha\text{-|H9a-H9b|}) > \delta \text{ (ppm) } (\beta\text{-|H9a-H9b|})$). In beiden Fällen sind diese Signale allerdings oftmals von anderen überlagert, so daß sie seltener zu Unterscheidung der beiden Anomere herangezogen werden können.

Um den für die Festphasensynthese geeigneten Baustein Fmoc-Ser(α -NeuAc₄NacCOOBn-(2→6)- α -GalAc₂Nac)-OH **32** zu erhalten, wurde das Sialylierungsprodukt **30** mit Acetanhydrid in Pyridin acetyliert und die *tert*-Butyl Schutzgruppe am C-Terminus des Serins mit Trifluoressigsäure in Gegenwart von Anisol als Kationenfänger abgespalten (Abb. 3-17).

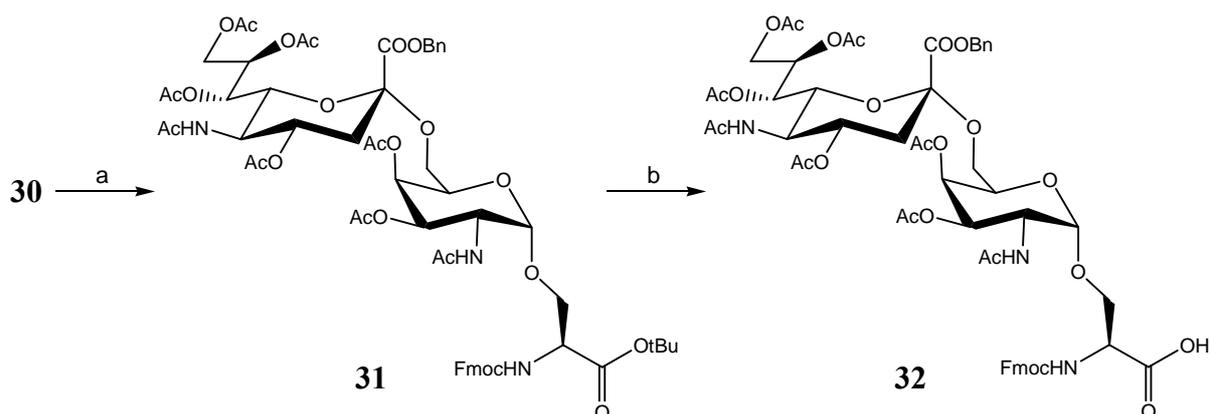


Abb. 3-17: Synthese des Sialyl-T_N-Bausteins **32**.

(a) Ac₂O, Pyridin, 0 °C 4 h, Raumtemp. 12 h, 77-99 %; (b) TFA/CH₂Cl₂ 1:1, Anisol, Raumtemp., 6 h, 99 %.

Diese letzten beiden Reaktionen der Synthese des Sialyl-T_N-Bausteins konnten mit sehr guter Ausbeute geführt werden. Für den Teil des Bausteins **32**, der nicht schon auf der Stufe von Verbindung **30** durch präparative HPLC gereinigt worden war, wurde dies nachgeholt und das α,α -Anomer in 62 %-iger Ausbeute isoliert. Die geringere Wasserlöslichkeit der Verbindung **30** führte aufgrund der langen Retentionszeit zu Verlusten während der Reinigung durch präparative HPLC. Die Gesamtausbeute an Fmoc-Ser(α -NeuAc₄NacCOOBn-(2→6)- α -GalAc₂Nac)-OH **32**, ausgehend vom Akzeptor **15**, betrug 22-27 %.

⁹⁸ H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, 125, 47

⁹⁹ K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5229 & 5233.

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

Dem Beispiel der Natur folgend wurde das T-Antigen als Substrat für die Silylierung gewählt. Ausgangsverbindung war das vollständig geschützte T-Antigen-Derivat **22**, das in einem Schritt zum Akzeptor **34** umgesetzt wurde (Abb. 3-18).

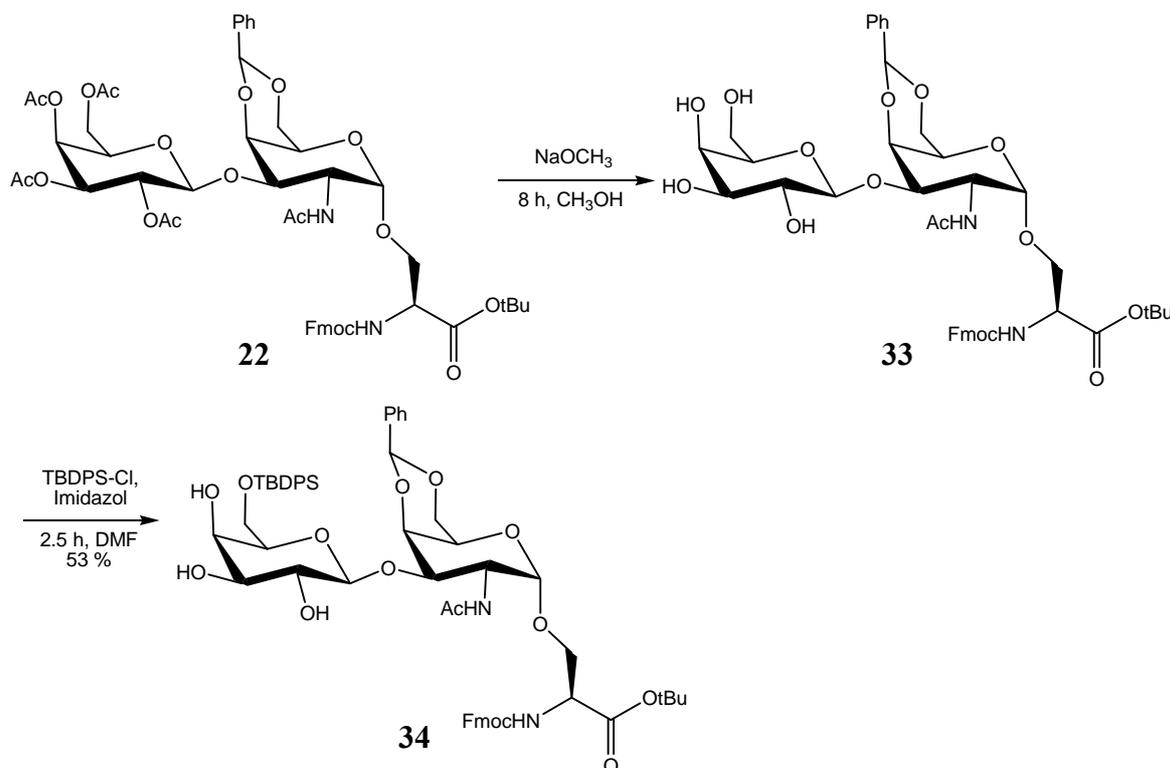


Abb. 3-18: Synthese des TBDPS-geschützten Akzeptors **34**.

Unter Zemplén-Bedingungen (Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von ca. 8.5) konnte die Verbindung **22** deacetyliert werden, ohne in größerem Maße die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe abzuspalten. Um Ausbeuteverluste durch Säulenchromatographie zu vermeiden wurde das Rohprodukt **33** direkt weiter umgesetzt. Ausgehend von Verbindung **22** konnte mit TBDPS-Cl und Imidazol als Base die Silylschutzgruppe in die 6-Position der β -Galactose-Einheit mit einer Ausbeute von 53 % eingeführt werden.

Der so hergestellte Akzeptors **34** wurde mit dem Sialyl-Donor **29** (Abb. 3-15, S. 34) in einer Silylierungsreaktion umgesetzt (Abb. 3-19). Die Reaktion wurde unter denselben Bedingungen geführt, unter denen die Synthese des ST_N-Antigen-Bausteins gelungen war. Akzeptor und Donor wurden in Acetonitril/Dichlormethan vorgelegt, auf -65 °C gekühlt und mit Silbertriflat versetzt. Nachdem die Aktivierung mit CH₃SBr nicht erfolgreich war, wobei lediglich das Glycal des Donors entstand, wurde statt dessen das langsamer reagierende

PhSCI¹⁰⁰ eingesetzt. Aber auch mit dieser Reagenz und Variation der Reaktionstemperatur konnte keine erfolgreiche Sialylierung beobachtet werden.

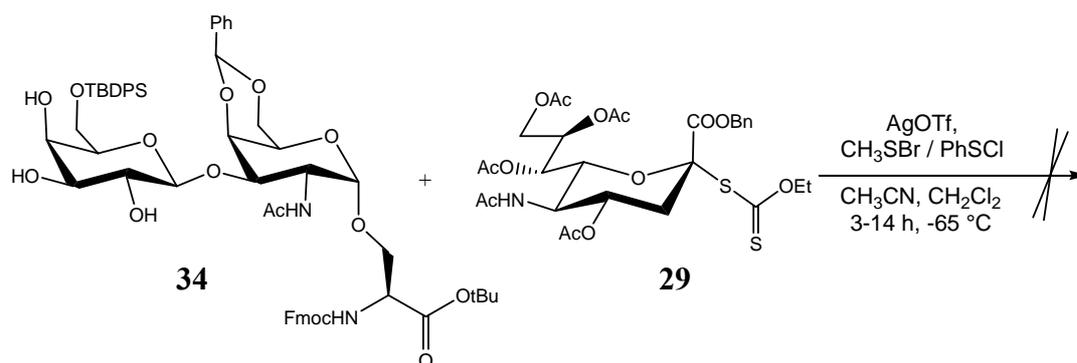


Abb. 3-19: Sialylierungsversuch mit dem Akzeptor **34**.

Offenbar ist die sterische Hinderung der *tert*-Butyldiphenylsilyl(TBDPS)-Schutzgruppe zu groß; ein Vergleich mit der Sialylierungsreaktion zum ST_N-Antigen-Baustein steht im Prinzip im Einklang mit dieser Beobachtung, da auch dort keine Sialylierung der 3-Position beobachtet wurde. Allerdings wurde nur ein Überschuß von 0.2 Äquivalenten des Donors **29** verwendet, und der sterische Anspruch der voll geschützten Sialinsäure ist deutlich größer als der der TBDPS-Schutzgruppe.

Da der Akzeptor **34** nahezu quantitativ aus den fehlgeschlagenen Sialylierungsreaktionen zurückisoliert werden konnte, war es naheliegend die TBDPS-Schutzgruppe auszutauschen. Dazu wurde der Akzeptor zuerst mit TBAF in CH₂Cl₂ bei Raumtemp. behandelt. Zwar konnte so die TBDPS-Schutzgruppe abgespalten werden, allerdings war die Basizität der TBAF-Lösung so hoch, daß auch die Fmoc-Schutzgruppe eliminiert wurde. Durch eine Behandlung des Rohproduktes mit Fmoc-ONSu/DIPEA in DMF ließ sich die Fmoc-Schutzgruppe nicht bzw. nur in sehr geringen Ausbeuten wieder einführen. Ein leichtes Ansäuern der TBAF-Lösung in CH₂Cl₂ mit Essigsäure verhinderte zwar die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, allerdings blieb so die TBDPS-Schutzgruppe unangetastet. Eine alternative Abspaltung der TBDPS-Schutzgruppe mit Essigsäure in der Wärme gelang, aber es wurde auch - wie erwartet - die Benzyliden-Schutzgruppe abgespalten. Eine deutliche Differenzierung zwischen beiden Schutzgruppen durch Variation der Temperatur konnte nicht erreicht werden.

Die doppelte Einführung der Benzyliden-Schutzgruppe zu Derivat **35** gelang mit Benzaldehyddimethylacetal in DMF bei pH 4, jedoch nur in geribngiger Ausbeute bei Bildung einer Vielzahl von Nebenprodukten. Der nachfolgende Versuch der Sialylierung unter

¹⁰⁰ Martichonoh, G. M. Whitesides, *JOC* **1996**, *61*, 1702; S. Thea, G. Cevasco, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 2865.

Aktivierung des Donors mit Silbertriflat und Methylsulfenylbromid in Acetonitril/ CH_2Cl_2 , scheiterte. Es konnte nur die langsame Zersetzung des Sialyl-Donors **29** beobachtet werden (Abb. 3-20).

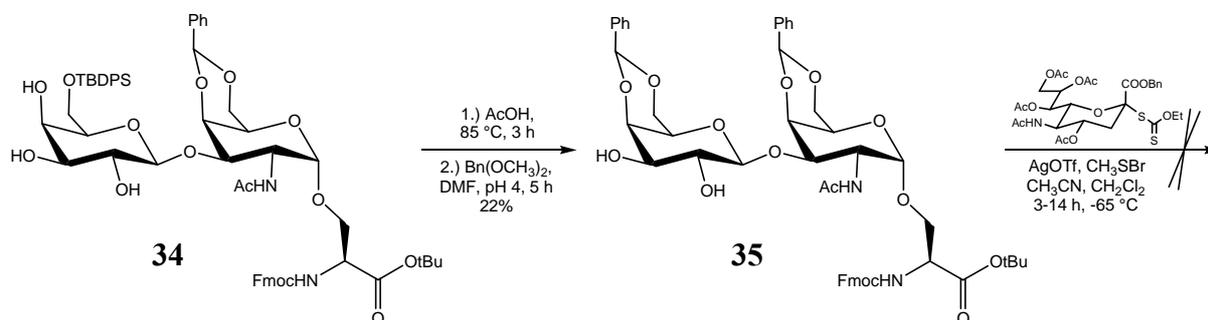


Abb. 3-20: Versuch der Sialylierung des Dibenzyliden-Derivats **35**.

Will man in der 3-Position des T-Antigen-Bausteins glycosylieren, ist eine Schutzgruppe in der 6-Position der β -Galactose unumgänglich. Andererseits ist der sterische Anspruch während der Sialylierungsreaktion so hoch, daß nur eine relativ schlanke Schutzgruppe in der 6-Position geduldet wird. Daher wurde die sterisch weniger anspruchsvolle Benzyl-Schutzgruppe zur Besetzung der 6-Position gewählt. Da diese sich nachträglich nur sehr umständlich in den T-Antigen-Baustein einfügen läßt, wurde die Synthese ab dem Benzyliden-geschützten T_N -Antigen-Derivat **17** neu geführt. Das dafür notwendige, in 6-Position als Benzylether geschützte Galactosylbromid ist literaturbekannt¹⁰¹ und läßt sich in

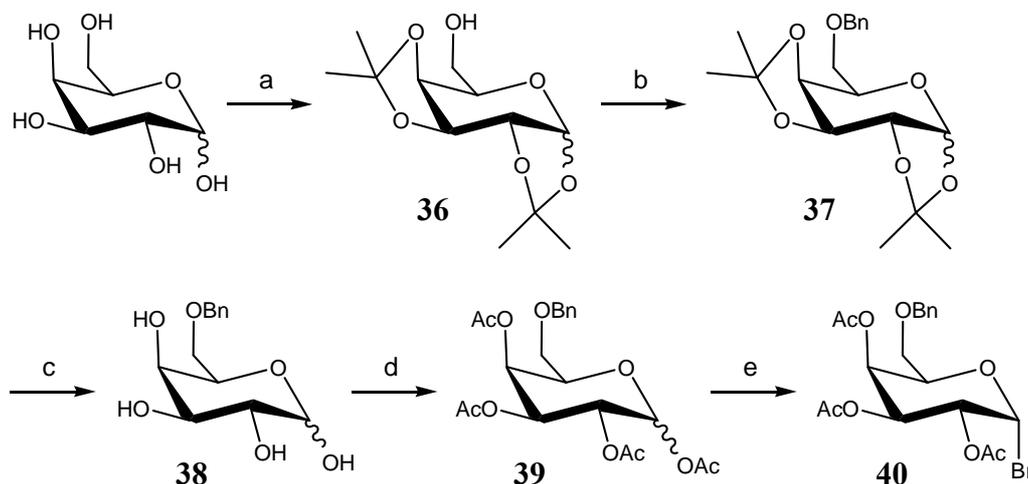


Abb. 3-21: Synthese des Galactosylbromids **40**.

(a) CuSO_4 , Aceton, H_2SO_4 , 4 h, Raumtemp., 92 %; (b) 1. NaH, 2. BnBr, DMF, 24 h, Raumtemp., 82 %; (c) AcOH, H_2O , 85 °C, 5 h, 83 %; (d) Ac_2O , Pyridin, 12 h, Raumtemp., 87 %; (e) HBr/AcOH, CH_2Cl_2 , 0 °C, 50 %.

¹⁰¹ O. T. Schmidt in *Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol II* (Hrsg.: R. L. Whister, M. L. Wolfrom, J. N. BeMiller), Academic Press Inc., New York, London, 1963, 318.

wenigen Stufen und guter Ausbeute synthetisieren (Abb. 3-21).¹⁰²

Das Diisopropyliden-Derivat **36** wurde in 91 %-iger Ausbeute nach 24 h Rühren in Aceton mit einem Überschuß von wasserfreiem CuSO₄ erhalten. Bildung des Alkoholats mit Natriumhydrid und nachfolgende Veretherung der 6-Position mit Benzylbromid gelang ebenfalls in hoher Ausbeute. Die Abspaltung der Isopropyliden-Schutzgruppen mit Essigsäure in der Hitze und Acetylierung mit Ac₂O/Pyridin zur Verbindung **39** verlief problemlos, lediglich die Darstellung des Galactosylbromids **40** mit HBr/Eisessig gelang nur in mäßigen Ausbeuten, da es im Vergleich zum peracetylierten Bromid **1** weniger stabil ist und sich bei Raumtemp. innerhalb von wenigen Stunden zersetzt.^{103, 104} Das in einer Gesamtausbeute von 27 % hergestellte Bromid **40** wurde daher sofort weiter umgesetzt (Abb. 3-22).

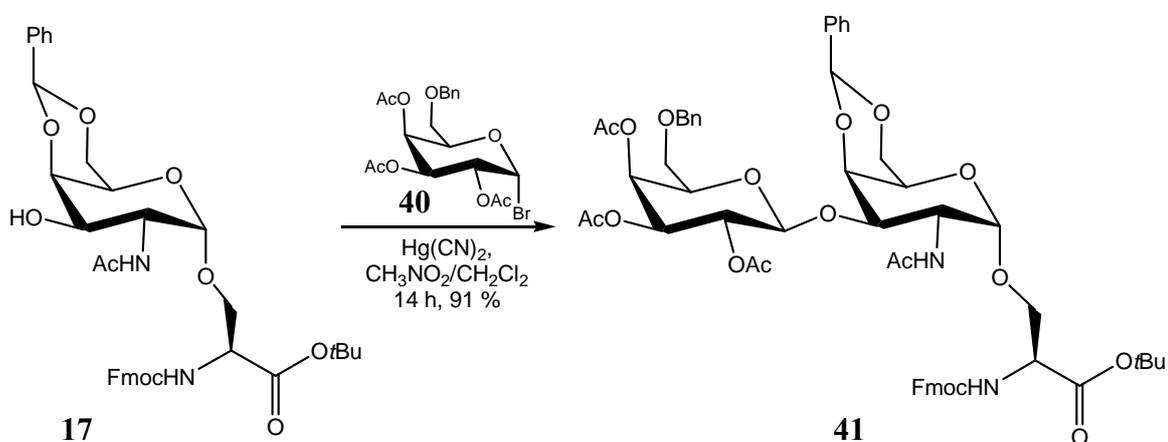


Abb. 3-22: Synthese des T-Antigen-Baustein-Derivats **41**.

Die Glycosylierung nach Helferich⁸⁴ konnte in sehr guter Ausbeute durchgeführt werden. Drei Äquivalente des Donors **40**, aktiviert mit Hg(CN)₂, wurden im Grammaßstab in einer Mischung aus Nitromethan und Dichlormethan bei Raumtemp. mit dem Akzeptor **17** zu 91 % zum Disaccharid **41** umgesetzt.

Während sich bei der Glycosylierung die Anwesenheit der Benzylgruppe positiv auswirkte¹⁰⁵, gelang die Umesterung unter Zemplén-Bedingungen nur in mäßiger Ausbeute (Abb. 3-23). Um die Reaktion überhaupt zu starten war ein vergleichsweise hoher pH-Wert von ca. 9.5 nötig, und auch dann verlief die Umesterung in Methanol mit NaOCH₃ eher zögerlich, so daß die Reaktion gut 24 h bei Raumtemp. gerührt werden mußte, was zu Ausbeuteverlusten führte und eine säulenchromatographische Reinigung notwendig machte. Da die 6-Position

¹⁰² X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6569.

¹⁰³ K. Donsbach, Diplomarbeit, Universität Mainz, **1996**.

¹⁰⁴ C. Brocke, Dissertation, Universität Mainz, **2002**.

¹⁰⁵ zum Vergleich: mit dem Tetraacetylgalactosylbromid **1** wurden 66 % Ausbeute erzielt; Abb. 3-11, S. 30

benzyliert ist, kann keine Acetyl-Wanderung stattfinden, was insbesondere die Deblockierung der 4-Position der β -Galactose erschwert.

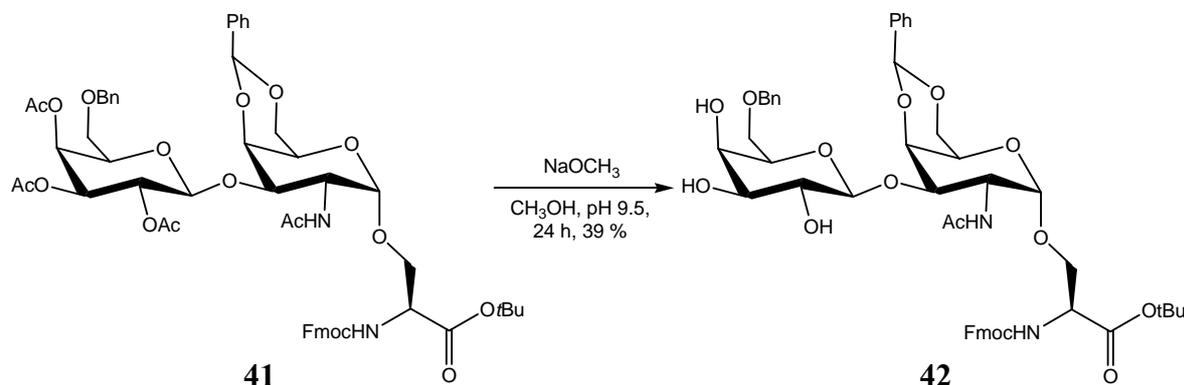


Abb. 3-23: Synthese des Akzeptors **42** durch Umesterung.

Zur Reaktion des Sialyl-Donors **29** mit dem Akzeptors **42** wurde der Donor wie in den entsprechenden Sialylierungsreaktionen zuvor mit Silbertriflat und Methylsulfenylbromid aktiviert, allerdings bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach vollständiger Zugabe der CH_3SBr -Lösung wurde die Reaktionsmischung noch 14 h bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ nachgerührt (Abb. 3-24).

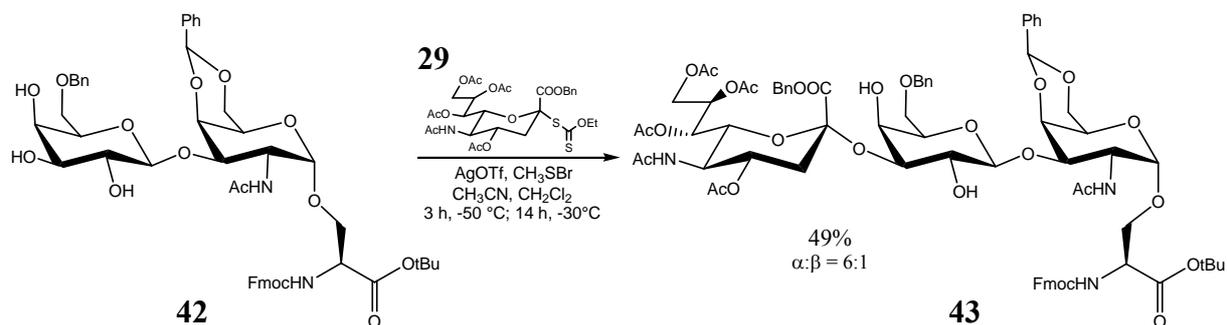


Abb. 3-24: Sialylierung zum (2 \rightarrow 3)-ST-Antigen-Derivat **43**.

Die Sialylierungsreaktion lieferte das Produkt **43** in 49 % Ausbeute als Anomerengemisch mit einem ungefähr 15- bis 25-fachen Überschuß an gewünschtem α -Anomer. Da sich das β -Anomer chromatographisch nicht abtrennen ließ, und zudem noch Spuren des Akzeptors **42** vorhanden waren, wurde das Anomerengemisch mittels analytischer HPLC vermessen, und auf eine Interpretation NMR-spektroskopischer Messungen verzichtet. Nach Acetylierung der freien Hydroxygruppen konnte dies nachgeholt werden (Abb. 3-25).

Das Produkt der Sialylierung wurde mit Pyridin/Acetanhydrid mit einer Ausbeute von 95 % acetyliert, und die voll geschützte Verbindung **44** chromatographisch gereinigt und analysiert. Durch Behandlung mit Essigsäure bei $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ konnte innerhalb einer Stunde die Benzyliden-Schutzgruppe hydrolysiert werden. Das entstandene Derivat **45** wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und in einer Ausbeute von 76 % isoliert. Acetylierung mit

Pyridin/Acetanhydrid über 14 h und nachfolgende Behandlung mit TFA und Anisol als Kationenfänger lieferte nach chromatographischer Reinigung den fertigen Baustein **47** in 98 %-iger Ausbeute. Da ein analytischer HPLC-Lauf eine geringe Verunreinigung anzeigte, wurde der Baustein einer präparativen HPLC unterzogen, und damit das reine Anomer in 85 %-iger Ausbeute isoliert.

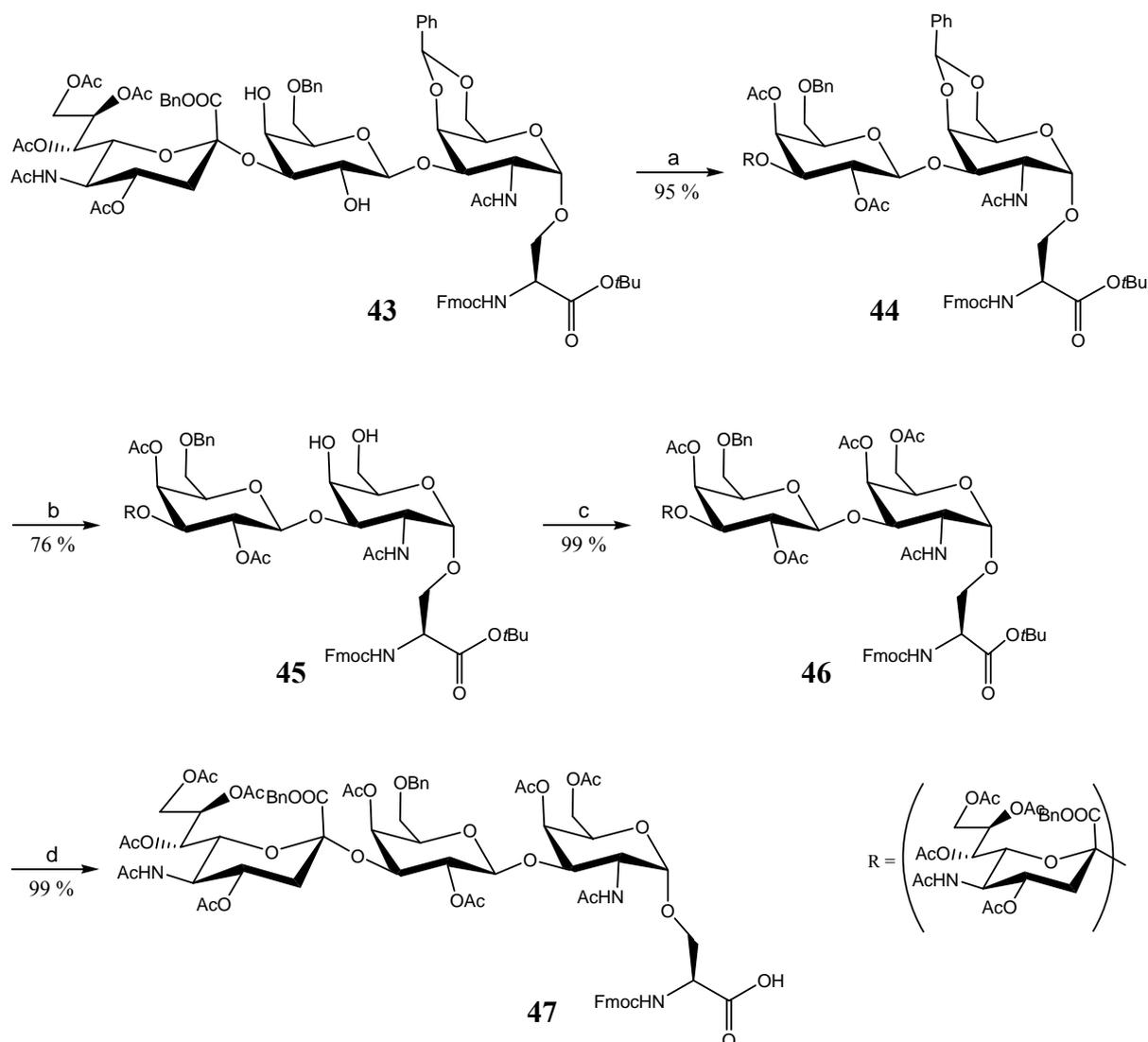


Abb. 3-25: Synthese des (2→3)-ST-Antigen-Bausteins **47**.

(a) Pyridin/Ac₂O, Raumtemp. 14 h, 95 %; (b) AcOH/H₂O 4:1, 1 h, 76 %;
(c) wie a), 99 %; (d) TFA/Anisol, 1 h, 99 %, 85 % nach präparativer HPLC.

Die letzten drei Reaktionsschritte a)-c) ließen sich in kleinen Testansätzen (10 mmol) auch ohne chromatographische Reinigung der einzelnen Produkte mit etwas besserer Ausbeute durchführen; da aber der Akzeptor **45** auch für die Synthese des Glycophorin-Antigen-Bausteins benötigt wurde, war für den Hauptteil der Substanzen eine Reinigung mittels HPLC unerlässlich. Ausgehend vom Monosaccharid **17** konnte der Sialyl-T-Antigen-Baustein **47** in 11 %-iger Gesamtausbeute synthetisiert werden.

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

Eine Möglichkeit den (2→6)-ST-Antigen-Baustein aufzubauen besteht in der Glycosylierung des nicht vollständig geschützten ST_N -Antigen-Derivats **30** durch die Helferich-Reaktion (Abb. 3-26).⁸⁴

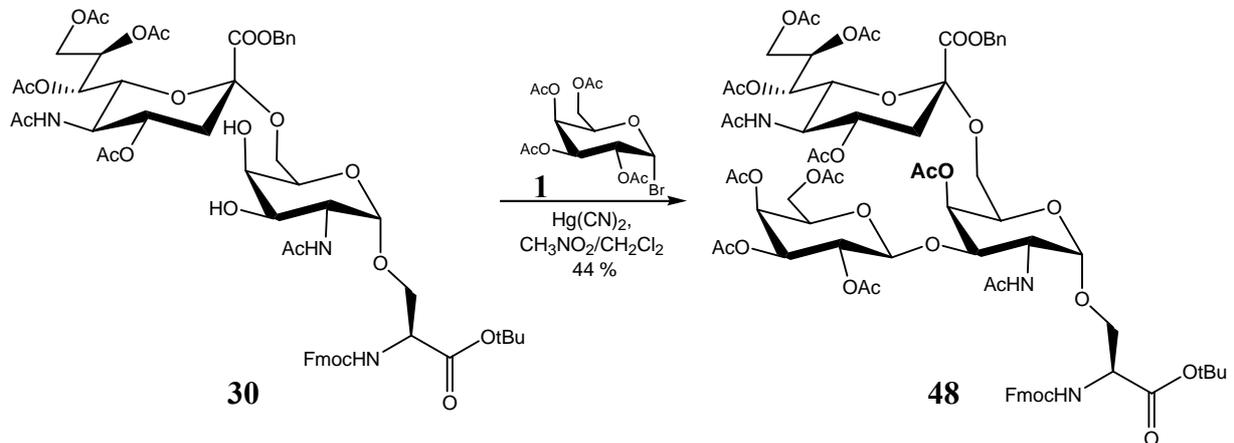


Abb. 3-26: Synthese des (2→6)-ST-Antigen-Derivats **48** mittels einer Helferich-Knorr-Reaktion.

Als Akzeptor wurde das ST_N -Antigen-Derivat **30** eingesetzt. Die Reaktionsführung erfolgte wie in den Glycosylierungsreaktionen zum Aufbau des T-Antigen-Bausteins ausgehend vom T_N -Antigen-Derivat. Die Reaktion wurde in einem Nitromethan/Dichlormethan-Gemisch bei Raumtemp. über 14 h durchgeführt. Dabei konnte jedoch trotz der Verwendung von 8 Äquivalenten des Donors **1** nur eine Ausbeute von 44 % erzielt werden.

Eine eher ungewöhnliches Nebenreaktion liegt in der Übertragung einer Acetylgruppe vom Donor auf die 4-Position des α -N-Acetylglactosamins vor, die vermutlich über eine Umesterung verläuft. Wurden nur bis zu 2 Äquivalente des Donors eingesetzt, halbierte sich die Ausbeute, und man erhielt ein Produktgemisch mit teilweise freier 4-OH-Funktion. Da somit der Weg über einen ST_N -Antigen Akzeptor unvorteilhaft erschien, wurde der alternative Weg der Sialylierung eines T-Antigen Akzeptors eingeschlagen.

Sowohl aus der Synthese des T-Antigen-Bausteins als auch aus der des (2→3)-ST-Antigen-Bausteins konnte ein Akzeptor für die Darstellung des (2→6)-ST-Antigen-Bausteins gewonnen werden. Ausgehend von den Benzyliden-Derivaten **41** und **22** ließen sie sich beide durch einstündiges Rühren in Essigsäure/Wasser 4:1 bei 85 °C darstellen (Abb. 3-27. Die Synthese von Verbindung **22** und **23** ist in Abb. 3-12, S. 31 gezeigt, die von Verbindung **41** in Abb. 3-22, S. 40).

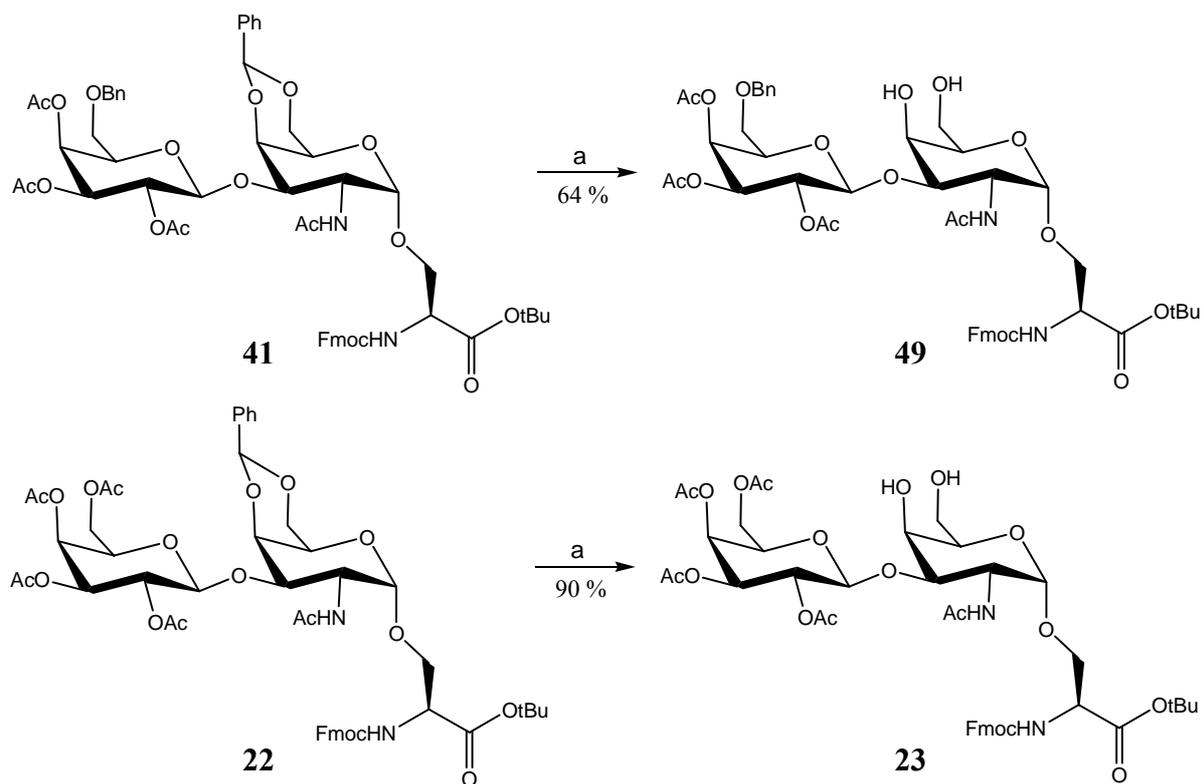


Abb. 3-27: T-Antigen-Derivate als Akzeptoren für den (2→6)-ST-Antigen-Baustein.

(a) AcOH/H₂O 4:1, 1 h, 85 °C (Badtemp.).

Obwohl die Verbindungen sich nur durch eine Acetyl- bzw. Benzylgruppe unterscheiden, ließ sich das 6-*O*-Acetyl Derivat **23** ins sehr guten, das 6-*O*-Benzyl Derivat **49** dagegen nur in mäßigen Ausbeuten herstellen. Eine Ursache für dieses Geschehen könnte die in polaren Lösungsmitteln geförderte Wechselwirkung zwischen den Aromaten der Benzylgruppe der β -Galactose-Einheit und der Benzylidengruppe der α -Galactosamin-Einheit sein, die nicht nur das Edukt stabilisiert, sondern auch das acetalische C-Atom der Benzylidengruppe abschirmt.

Die Sialylierung der beiden Akzeptoren erfolgte mit dem Xanthogenat-Donor **29**. Dieser ließ sich mit Silbertriflat und langsamer Aktivierung mit CH₃SBr bei -50 °C in das entsprechende Triflat überführen, daß dann - neben der immer beobachteten Eliminierung zum Glycal - zum Sialylierungsprodukt abreagierte (Abb. 3-28). Mit dem 6-*O*-Acetyl-Derivat **23** ließ sich nur eine bescheidene Ausbeute von 20 % erreichen (bei einem Umsatz von 58 %). Die Reaktionsdauer betrug 3 h bei -65 °C. Die im späteren Verlauf der Doktorarbeit ausgehend vom 6-*O*-Benzyl-Derivat **49** geführte Synthese des Sialyl-T-Antigen-Derivats **51** wurde ca. 3 h bei -50 °C, dann 14 h bei -30 °C gerührt und gelang mit einer vergleichsweise hohen Ausbeute von 71 %.

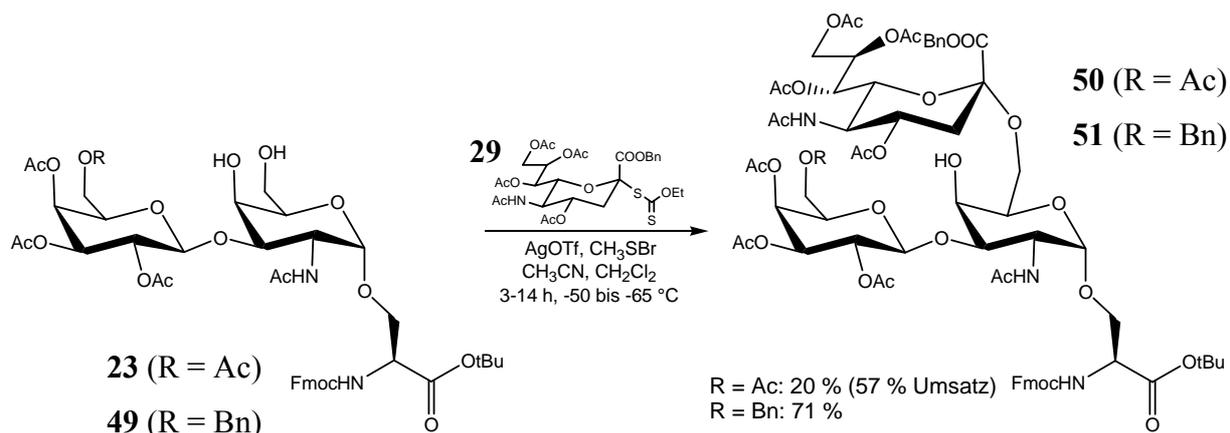


Abb. 3-28: Sialylierungsreaktion der (2→6)-ST-Antigen-Derivate.

Dieses Ergebnis rechtfertigt die Verwendung des Akzeptors **49** trotz des zusätzlichen Synthesaufwands, selbst wenn man auf die Darstellung des (2→3)-ST-Antigen-Bausteins **47** (Abb. 3-25, S. 42), für deren Synthese er ursprünglich gedacht war, verzichten will.

Die direkte Fertigstellung des (2→6)-ST-Antigen-Bausteins **52** durch Behandlung der Verbindung **50** mit TFA und Anisol als Kationenfänger sollte eigentlich problemlos funktionieren, da die Hydroxyfunktion in der 4-Position der α -Galactose erfahrungsgemäß stark deaktiviert ist und daher nur sehr langsam acetyliert werden sollte. (Abb. 3-29).

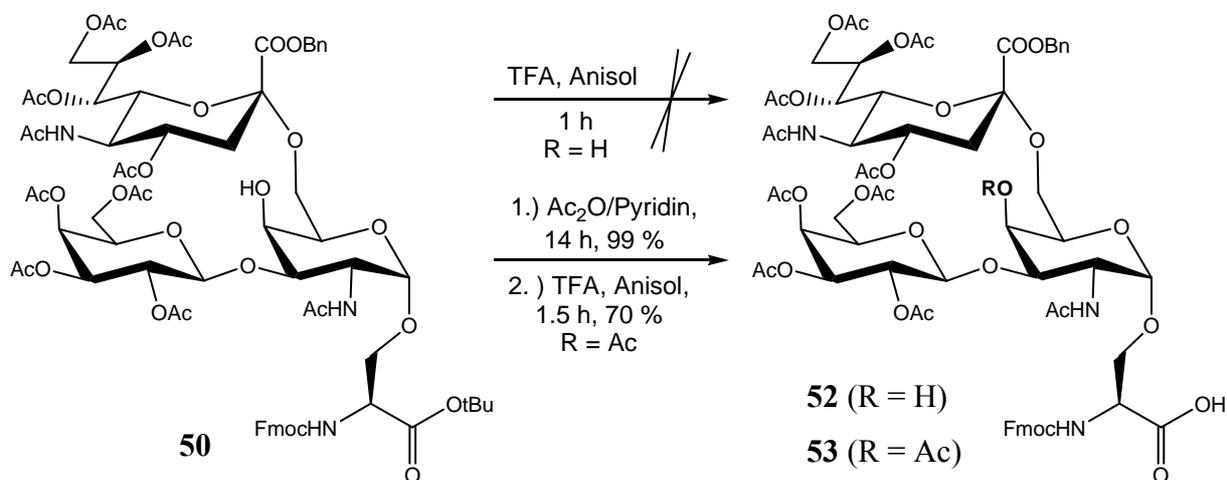


Abb. 3-29: Synthese des (2→6)-ST-Antigen-Bausteins **52/53**.

Tatsächlich konnte jedoch der (2→6)-ST-Antigen-Baustein **52** (R = H) nach einer Stunde Rühren in TFA nicht isoliert werden, statt dessen wurde eine Vielzahl von Produkten beobachtet, die zum Großteil auf einer Acetylgruppenwanderung beruhten. Das Produktgemisch wurde nicht aufgearbeitet, sondern mit Essigsäureanhydrid und Pyridin zum peracetylierten (2→6)-ST-Antigen-Baustein **53** (R = Ac) in mäßiger Ausbeute umgesetzt. Der Hauptteil des Derivats **50** wurde daher mit Essigsäureanhydrid/Pyridin über 14 h acetyliert,

und das peracetylierte Produkt **48** nahezu quantitativ isoliert. Dann wurde es weiter mit TFA und Anisol innerhalb von 1.5 h zum fertigen Baustein **53** mit einer Ausbeute von 70 % nach präparativer HPLC umgesetzt.

Völlig problemlos verlief dagegen die Darstellung des (2→6)-ST-Antigen-Bausteins **54**, der durch Behandlung des 6-*O*-Benzyl-Derivats **51** mit TFA/Anisol bei Raumtemp. erhalten wurde (Abb. 3-30).

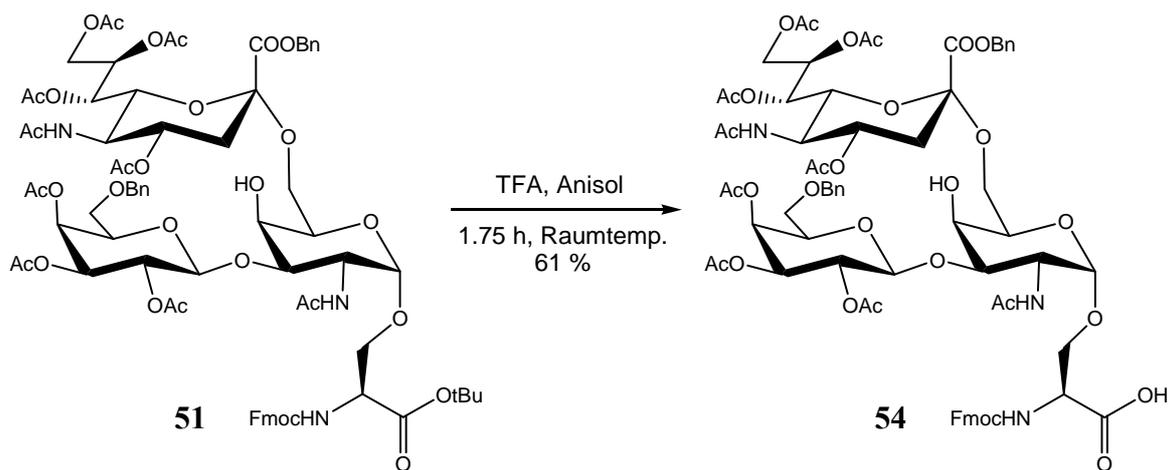


Abb. 3-30: Synthese des (2→6)-ST-Antigen-Bausteins **54**.

Nach Reinigung durch semipräparative HPLC konnte das α -Anomer **54** in 61 %-iger Ausbeute isoliert werden. In einer weiteren Fraktion fand sich das β -Anomer in 10 %-iger Ausbeute. Da die Ausbeute um ca. 10 % schlechter war als die des vergleichbaren Derivats **53** (Abb. 3-29) und eine größere Anzahl Nebenprodukte in sehr geringen Mengen gebildet wurde, kann man davon ausgehen, daß auch bei dieser Reaktion eine Acetylgruppenwanderung stattgefunden hat, allerdings in vergleichsweise geringem Maß. Dies legt einen Mechanismus über die 6-*O*-Position der β -Galactose-Einheit nahe, die im Derivat **54** bzw. **51** durch die Benzyl-Schutzgruppe blockiert ist.

Ausgehend vom T-Antigen-Derivat **23** ließ sich so der (2→6)-ST-Antigen-Bausteins **53** in einer Gesamtausbeute von 14 % darstellen, ausgehend vom T-Antigen-Derivat **49** der (2→6)-ST-Antigen-Baustein **54** in 43 % Gesamtausbeute.

3.1.6 Synthese des Glycophorin-Antigen-Bausteins

Um den Glycophorin-Antigen-Baustein **56** aufzubauen können mehrere Reaktionswege eingeschlagen werden. Eine Entscheidung ergibt sich aus der Frage, ob die notwendigen Sialylierungen in einem oder zwei Schritten durchgeführt werden sollen. Da die Synthese des (2→3)-ST-Antigen-Bausteins **47** (Abb. 3-25, S. 42) den Akzeptor **45** ohne die Notwendigkeit weiterer Modifikationen liefert, wurde für diese Arbeit der letztere Weg gewählt. Die Sialylierung des Akzeptors **45** mit dem Donor **29** ist in Abb. 3-31 gezeigt.

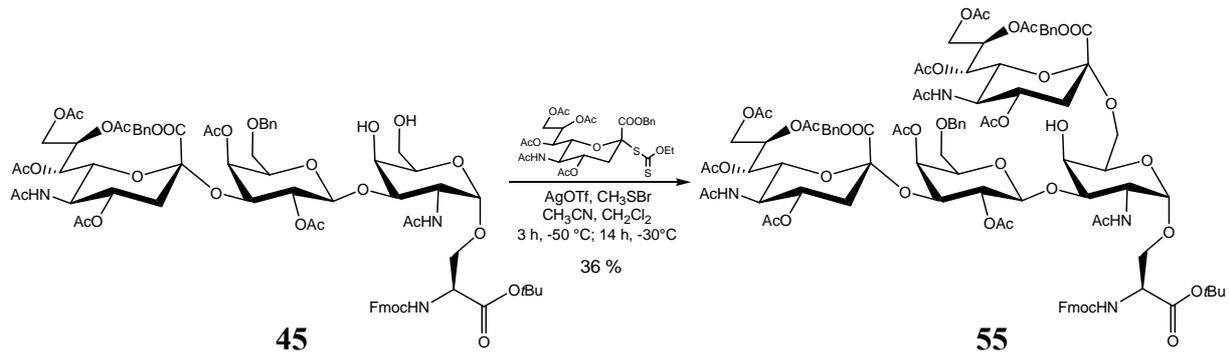


Abb. 3-31: Sialylierungsreaktion zum Glycophorin-Antigen-Derivat **55**.

Akzeptor, Donor und Silbertriflat wurden in einer Mischung aus CH₃NO₂ und Acetonitril vorgelegt, auf -50 °C gekühlt und langsam mit einer Lösung von Methylsulfonylbromid versetzt und anschließend 14 h bei -30 °C nachgerührt. Nach Abbrechen der Reaktion mit DIPEA in der Kälte, Aufarbeitung und Reinigung des Produktes mittels semipräparativer HPLC konnte das reine α-Anomer **55** in 36%-iger Ausbeute isoliert werden. Nach Behandlung mit TFA und etwas Anisol als Kationenfänger wurde der fertige Glycophorin-Antigen-Baustein **56**, nach Reinigung mittels semipräparativer HPLC, in 93 %-iger Ausbeute erhalten (Abb. 3-32).

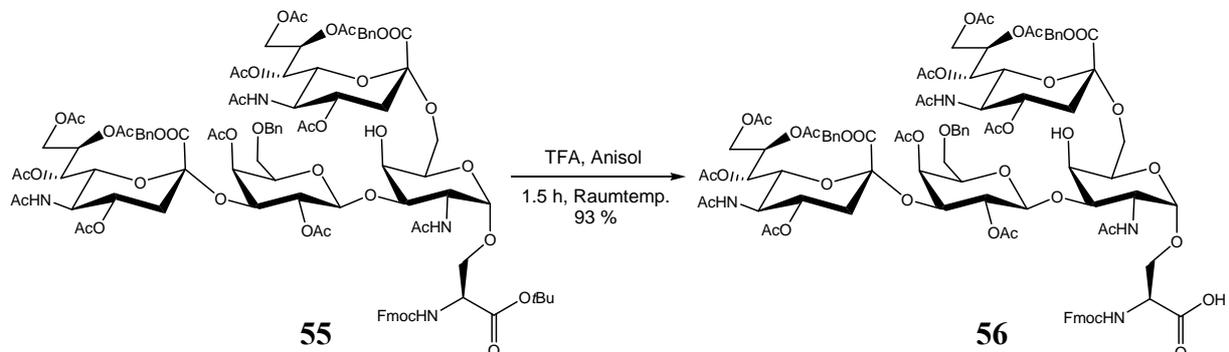


Abb. 3-32: Synthese des Glycophorin-Antigen-Baustein **56**.

Ausgehend vom Akzeptor **45** wurde der Glycophorin-Antigen-Baustein **56** in nur zwei Stufen in 33 %-iger Gesamtausbeute erhalten.

3.2 Darstellung der PTMSEL-Anker

Neben den kommerziell erhältlichen mit verschiedenen Aminosäuren vorbeladenen Tentagel-PHB-Harzen, wurde der von M. Wagner¹⁰⁶ entwickelte *para*-(Trimethylsilylethyl)-phenoxy-essigsäure-Anker in den Glycopeptidsynthesen verwendet. Während Tentagel-PHB-Harze eine Abspaltung eines synthetisierten (Glyco-)Peptides vom Harz bei gleichzeitiger Deblockierung säurelabiler Schutzgruppen erlauben, wird die Abspaltung der über den PTMSEL-Anker ans Harz gebundenen Substanz mittels TBAF in CH₂Cl₂ bewirkt, wobei das Schutzgruppenmuster des (Glyco-)Peptides in der Regel vollständig erhalten bleibt. Stark basenempfindliche Schutzgruppen wie die Fmoc-Schutzgruppe können auch teilweise abgespalten werden, weswegen für den *N*-Terminus eines Peptides Boc-geschützte Aminosäuren verwendet werden. Ein vollständiges geschütztes (Glyco-)Peptid wird z.B. für eine Fragmentkondensation benötigt. Leider sind mit Aminosäuren vorbeladene PTMSEL-Harze (noch) nicht kommerziell erhältlich und mußten daher ausgehend Trimethylsilylethen nach literaturbekannten Methoden synthetisiert werden.¹⁰⁷

3.2.1 Synthese der Anker-Vorstufen

Trimethylsilylethen **57** ließ sich in einer Prileschajew-Reaktion¹⁰⁸ mit *m*CPBA bei 0 °C in Chloroform zum Epoxid oxidieren. In drei weiteren Stufen ausgehend vom 2-Trimethylsilyloxiran **58** wurde der Allylester **61** in literaturbekannter Weise synthetisiert (Abb. 3-33). Mittels einer Cuprataddition ließ sich 2-Trimethylsilyloxiran **58** mit Butyllithium, CuI und 1-(4-Bromphenoxy)-1-ethoxyethan in absol. Diethylether zum Ethoxyethyl-geschützten Derivat **59** umsetzen. Nach Abspaltung der Ethoxyethyl-Schutzgruppe mit Pyridinium-toluol-4-sulfonat wurde die phenolische Hydroxy-Gruppe mit Chloressigsäureallylester und K₂CO₃ als Base verethert. Der zur Veresterung mit Aminosäuren für den PTMSEL-Anker benötigte Alkohol **61** wurde in einer Gesamtausbeute von 39-46 % synthetisiert.

¹⁰⁶ M. Wagner, H. Kunz, *Deutsche Patentanmeldung*, **2001**, 10116252.9; M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chemie* **2002**, *114*, 315-319.

¹⁰⁷ I. M. Wagner, H. Kunz, *Synlett* **2000**, 400; 2. M. Wagner, H. Kunz, *Z. Naturforsch.* **2002**, *57b*, 928-936.

¹⁰⁸ N. Prileschajew, *Ber.* **1909**, *42*, 4811.

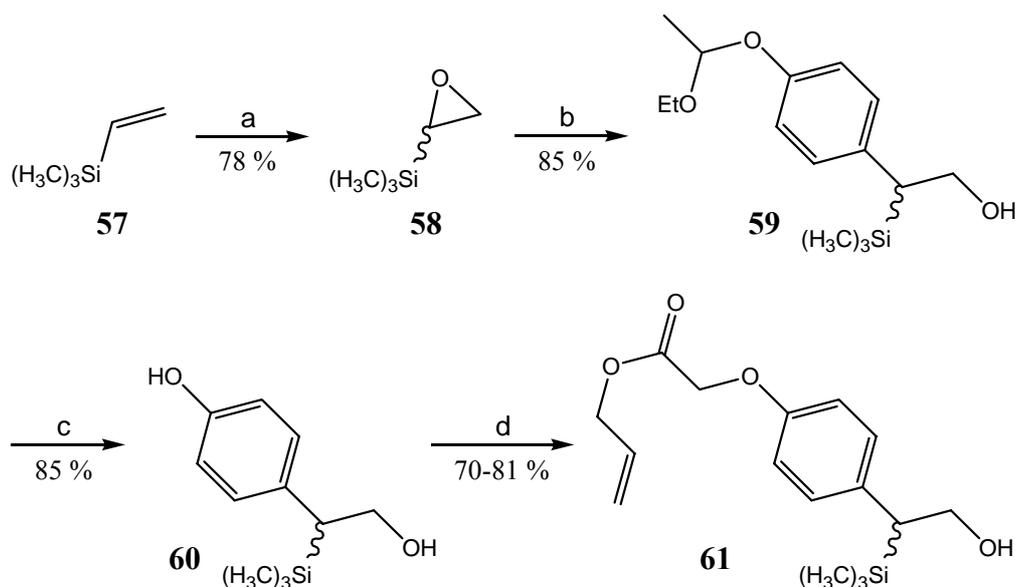


Abb. 3-33: Synthese der Ankervorstufe **61**

(a) *m*CPBA, Chloroform, 0 °C; (b) 1-(4-Bromphenoxy)-1-ethoxyethan, *n*BuLi, CuI, Ether, -50 °C, 3 h → 22 °C, 12 h; (c) PPTS, Methanol, Raumtemp., 2 h; (d) K₂CO₃, KI, Chloressigsäureallylester, Aceton, Raumtemp., 36 h.

3.2.2 Verknüpfung mit den Aminosäuren

Um in der Wahl der zu synthetisierenden Sequenz flexibel sein zu können, sollten mit unterschiedlichen Aminosäuren beladene Harze hergestellt werden. Die Wahl dieser Aminosäuren erfolgte aufgrund der Häufigkeit, mit der sie in der später an der festen Phase synthetisierten Partialsequenz des LI-Cadherin vorkommen. C-Terminal der Turn-Sequenz Ser¹⁰⁰-Gln¹⁰¹-Gly¹⁰² kommen im LI-Cadherin in dem folgendem Duzend Aminosäuren Alanin, Asparaginsäure, Glycin, Isoleucin, Leucin, Prolin und Valin vor. Alanin und Asparaginsäure nur je einmal, zudem Alanin direkt nach der Turn-Sequenz, weswegen die beiden Aminosäuren nicht als Startaminosäuren gewählt wurden. Glycin und Prolin als Startaminosäuren neigen zur Nebenreaktion der Diketopiperazinbildung,^{109,110} entsprechend bleiben Isoleucin, Leucin und Valin übrig. Diese wurden dann auch mit dem Alkohol **61** umgesetzt und weiter zu je einem einsatzfähigen PTMSEL-Anker ausgebaut (Abb. 3-34).

Die Veresterung des Alkohols **61** mit einer Fmoc- geschützten Aminosäure funktionierte für alle drei Fälle mit sehr guten Ausbeuten. Die Bezifferung der Verbindungen in Abb. 3-34 erfolgte jeweils beginnend mit Leucin, Valin, dann Isoleucin. Die Abspaltung der allylischen Schutzgruppe durch Pd⁰-katalysierte Allyl-Übertragung auf das *p*-Toluolsulfinsäure-Salz

¹⁰⁹ M. Rothe, J. Mazánek, *Angew. Chemie*. **1972**, *84*, 290.

¹¹⁰ M. Rothe, J. Mazánek, *Liebigs Ann. Chemie*. **1974**, 439.

gelang mit sehr unterschiedlichen Ausbeuten. Während sich das Leucin-Derivat **63** in 64 %-iger Ausbeute, und das Isoleucin-Derivat **69** sogar in 98 %-iger Ausbeute darstellen ließ, konnte das Valin-Derivat **66** nur in 17 %-iger Ausbeute isoliert werden - allerdings bei 80 % Umsatz. Verantwortlich dafür ist die Qualität des eingesetzten Katalysators. Diese wiederum hängt vom Alter und der Charge ab. Bei sinkender Ausbeute konnten jedoch entsprechend größere Mengen Edukt zurückisoliert werden.

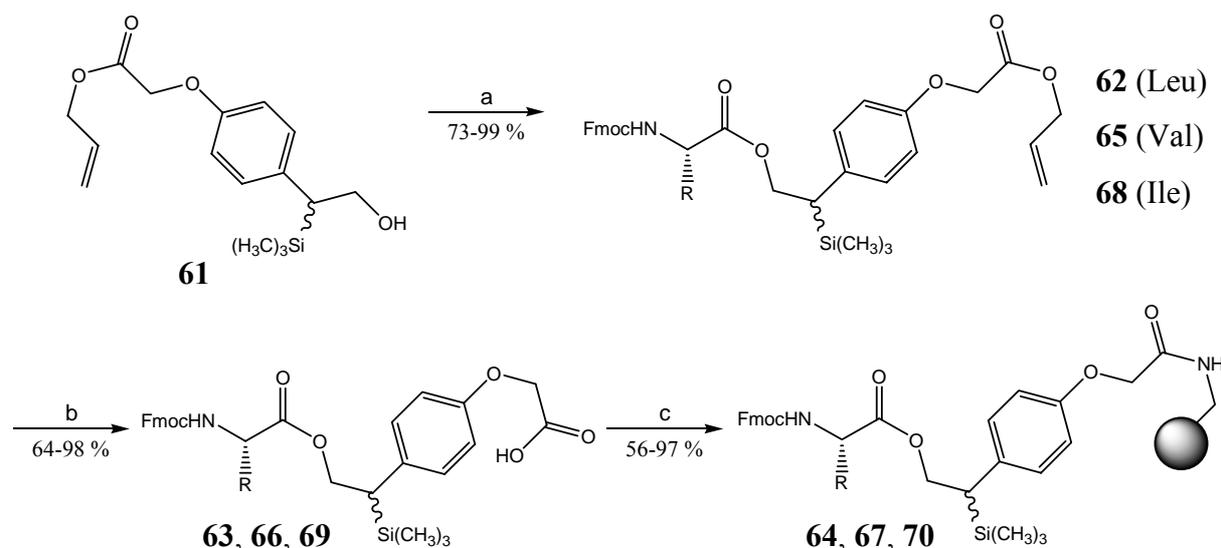


Abb. 3-34: Beladung eines AMPS-Harzes mit den Aminosäuren Ile, Leu und Val.

(a) Fmoc-AS-OH, DCC, DMAP, 0 °C, 5 h; (b) *p*-Toluolsulfinsäure-Na-Salz, $\text{Pd}(\text{PH}_3)_4$,

CH_3OH , Raumtemp., 14 h; (c) AMPS-Harz, HOAt, TBTU, NMM, Raumtemp., 14 h.

Die Beladung des AMPS-Harzes gelang in guten bis sehr guten Ausbeuten mit den Kupplungsreagenzien HOAt und TBTU. Ausbeuteverluste bei Ansätzen von größer als 10 g sind wohl im Wesentlichen auf schlechtere Durchmischung zurückzuführen. Die Beladung des Harzes wurde durch Messung der Absorption eines Piperidin-Fmoc-Adduktes bestimmt, wie im experimentellen Teil beschrieben wird (Kapitel 5.1, S. 120). Ausgehend vom Allylester **61** konnten die PTMSEL-Anker in einer Gesamtausbeute von bis zu 54 % hergestellt werden.

3.3 Festphasensynthesen der Peptide und Glycopeptide

Wie in der Zielsetzung beschrieben (Kapitel 2, S. 21) sollte der Einfluß verschiedener Saccharide, die an die Serinseitenkette aus der Turn-Sequenz Ser-Gln-Gly gebunden sind, untersucht werden. Da die Kupplungsausbeuten von Peptiden abhängig vom gewählten Ankersystem und Harz sehr unterschiedlich sein können, wurde zuerst die Verwendbarkeit der beiden polymeren Trägersysteme (PTMSEL-AMPS-Harz und PHB-Tentagel-Harz) überprüft. Danach wurde mit dem T_N-Antigen ein glycosyliertes Tetracosapeptid synthetisiert und seine dreidimensionale Struktur basierend auf NOE-Messungen durch Energieminimierungsrechnungen bestimmt. Ausgehend von den so gewonnenen Informationen wurden verschiedene Undekapeptide gleicher Sequenz, aber mit unterschiedlichem Glycosylierungsmuster, synthetisiert.

3.3.1 Allgemeine Überlegungen zur Festphasensynthese und deren Protokolle

Abhängig davon, ob die zu synthetisierende Zielsequenz ein geschütztes oder ungeschütztes (Glyco-)Peptid liefern sollte, wurde für den ersteren Fall das PTMSEL-Harz, im letzteren das PHB-Tentagel R[®]-Harz¹¹¹ benutzt (Abb. 3-35, Abb. 3-36). Der PTMSEL-Anker läßt sich mit TBAF in CH₂Cl₂, also unter milden Bedingungen, spalten.¹⁰⁶ Lediglich die gegenüber Fluoridionen empfindlichen Silylether werden dabei gespalten, zum Teil allerdings auch basenempfindliche Schutzgruppen, was in der Regel unerwünscht Nebenreaktion ist. Abhängig von der Dauer der Abspaltungsreaktion wird insbesondere die Fmoc-Schutzgruppe angegriffen, die Acetyl-Schutzgruppen bleiben stabil. Die sauren Abspaltbedingungen für den PHB-Anker (50 % - 95 % TFA) liefern unter Verwendung des PHB-Tentagel-Harzes ein ungeschütztes Peptid, lediglich die Schutzgruppen der Saccharid-Antigene bleiben erhalten.

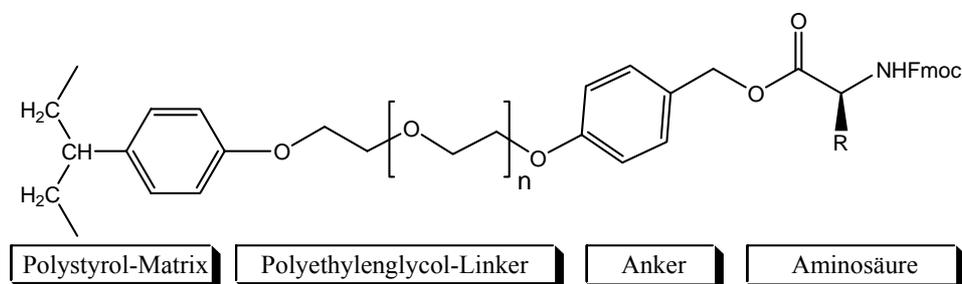


Abb. 3-35: Das PHB-Tentagel R[®]-Harz.

¹¹¹ E. Bayer, W. Rapp, *Chem. Pept. Protein* **1986**, 3, 3.

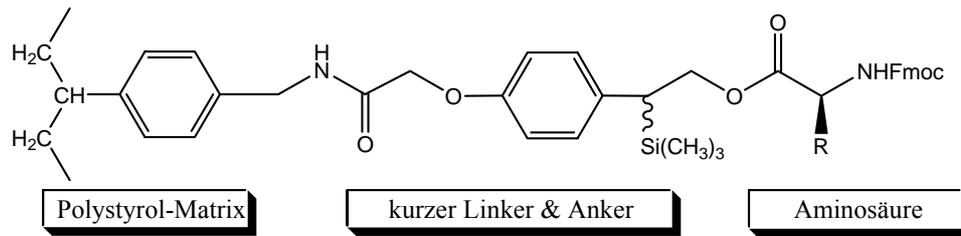


Abb. 3-36: PTMSEL-Harz.

Sämtliche durchgeführten Festphasensynthesen wurden nach dem Fmoc-Protokoll durchgeführt, d.h. die Seitenketten der Aminosäuren waren - sofern notwendig - mit säurelabilen Schutzgruppen versehen, während der *N*-Terminus der Aminosäuren Fmoc-geschützt war. Der *C*-Terminus blieb frei. Serin war in seiner Seitenkette als *tert*-Butylether geschützt, Asparaginsäure als *tert*-Butylester, und die Aminosäuren Glutamin und Histidin waren in ihren Seitenketten durch die Tritylschutzgruppe blockiert.

Die automatisierten Festphasensynthesen der (Glyco-)Peptide wurden in einem Peptid-synthesizer durchgeführt, manuelle Festphasenreaktionen in einem dem Merrifield-Festphasenreaktor nachempfundenem Glasreaktor. Schematisch ist der Reaktionsablauf in beiden Fällen jedoch identisch. Das mit der Startaminosäure beladene Harz wurde vorgelegt,

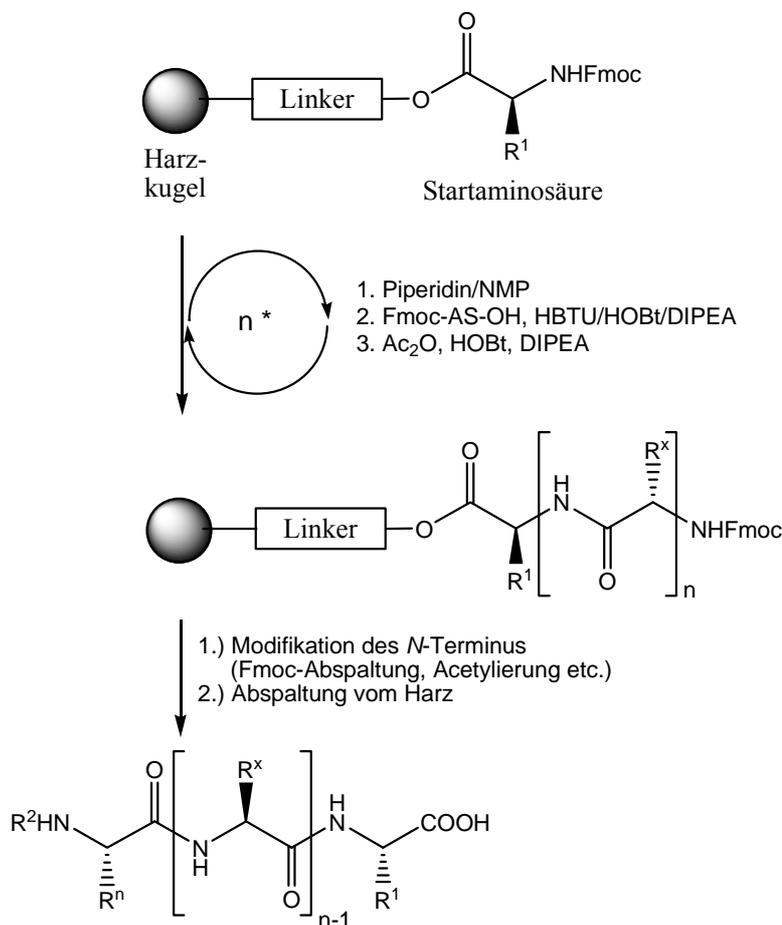


Abb. 3-37: Allgemeine Festphasensynthese nach dem Fmoc-Protokoll.

und durch aufeinanderfolgende Synthesesyklen wurde die Peptidkette Schritt für Schritt aufgebaut (Abb. 3-37).

Jeder Synthesesyklus begann mit der Deblockierung der Aminofunktion der harzgebundenen Aminosäure durch Behandlung mit einer 20 %-igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde in mindestens drei Zyklen von jeweils 2-2.5 Minuten durchgeführt. Nach der Deblockierung der Aminofunktion wurde im Fall der automatisierten Festphasensynthese entweder durch Messung der Leitfähigkeit der Abspaltungslösung oder durch Absorptionsmessungen gebildetes Fmoc-Piperidin-Addukt nachgewiesen. Durch einen Vergleich der Leitfähigkeit bzw. Absorption der dritten Abspaltungslösung mit denen der vorhergehenden wurde festgestellt, ob ein weiterer Abspaltzyklus erforderlich ist. Bei einer Differenz von mehr als 10 % begann ein weiterer Abspaltzyklus, ansonsten wurde nach dem Syntheseprotokoll fortgefahren.

Kupplungen der Aminosäuren wurden mit den Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt unter Zugabe von Hünigs-Base durchgeführt. Die Kupplungszeiten betragen mindestens 30 Minuten. Nach jedem Kupplungsschritt wurden eventuell nicht umgesetzte Aminogruppen acetyliert. Dieser sog. Cappingschritt verhindert die Bildung von Fehlsequenzen, die sich in nur einer Aminosäure von der Zielsequenz unterscheiden. Das ähnliche physikochemische Verhalten solcher Fehlsequenzen gegenüber der Zielsequenz würde eine spätere chromatographische Trennung erschweren. Kupplungsbedingungen für Antigen-Bausteine sind bei den jeweiligen Synthesen zu finden; zudem finden sich allgemeine Synthesevorschriften im experimentellen Teil (automatisierte Festphasensynthesen: Kapitel 5.4.1, S. 182; manuelle Festphasensynthesen: Kapitel 5.5.1, S. 216).

3.3.2 Untersuchung der Verwendbarkeit des PTMSEL Ankers

Schon 2001 konnte das Glycopeptid mit der Sequenz Boc-LAALD(*t*Bu)S(T_N)Q(Trt)GAI-OH mit durch Acetylgruppen geschütztem T_N-Antigen in 66 %-iger Ausbeute unter Verwendung des PTMSEL-Ankers hergestellt werden.^{106,112}

Ausbeuteverluste während der automatisierten Festphasensynthese wurden einer frühzeitigen Ankerspaltung durch von den Kupplungsreagenzien freigesetzten F⁻-Ionen zugeschrieben. Da diese Art von Ausbeuteverlust proportional zur Synthesedauer und damit proportional zur Länge der zu synthetisierenden Peptidsequenz ist, wurde eine ähnliche Peptidsequenz

¹¹² M. Wagner, Dissertation, Universität Mainz, 2001.

synthetisiert, um - abhängig von der Ausbeute - die Nutzbarkeit des Ankers auch für längere Zielsequenzen zu überprüfen (Abb. 3-38).

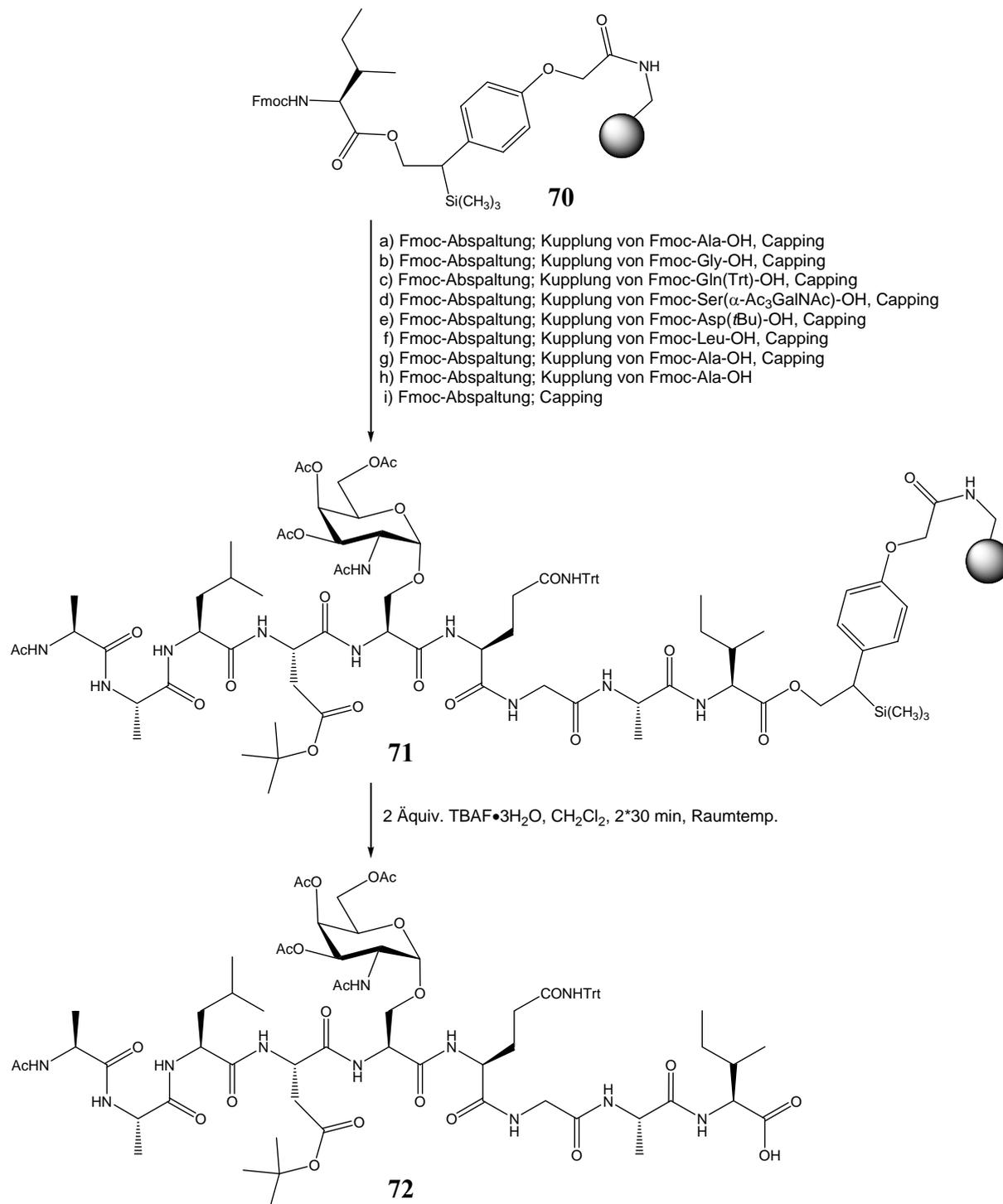


Abb. 3-38: Synthese des Glycopeptids Ac-AALD(*t*Bu)S(α -Ac₃GalNAc)Q(Trt)GAI-OH (**72**).

Die automatisierte Festphasensynthese erfolgte unter optimierten Bedingungen; sämtliche Kupplungsreagenzien wurden frisch angesetzt, und die Reaktionszeit so kurz wie möglich gehalten. Für den Einbau des Saccharidbausteins wurde der Synthesizer angehalten und der Reaktor mit einer extern angesetzten Reagenzienlösung aus HOAt, HATU, 2 Äquivalenten

Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAc)-OH (**9**) und DIPEA befüllt. Danach wurde die automatisierte Synthese fortgesetzt. Nach Abspaltung vom Harz mit TBAF·3H₂O in CH₂Cl₂ wurde ein sehr sauberes Glycopeptid in 71 %-iger Ausbeute erhalten, das nicht weiter durch präparative HPLC gereinigt werden mußte. Damit erwies sich das Ankersystem für die gewählte Peptidsequenz als geeignet.

Durch Behandlung mit TFA wurden die säurelabilen Schutzgruppen abgespalten und in einem zweiten Schritt wurden die Acetyl-Schutzgruppen des T_N-Antigens unter Zemplén-Bedingungen entfernt (Abb. 3-39).

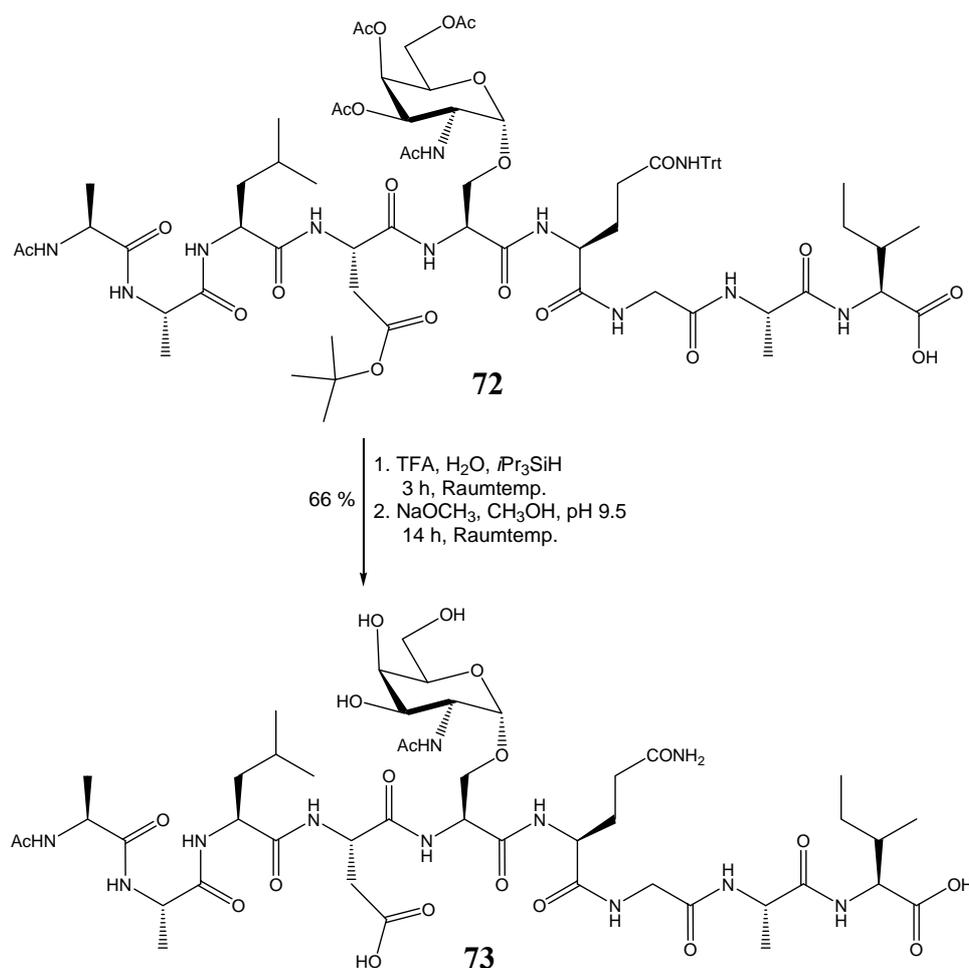


Abb. 3-39: Synthese des Nonapeptids Ac-AALDS(α -GalNAc)QGAI-OH (**73**).

Das nun vollständig deblockierte Glycopeptid **73** wurde mittels Ausschlußchromatographie gereinigt. Die Ausbeute betrug 66 %, die Gesamtausbeute, ausgehend vom mit der Startaminosäure beladenen Harz, 47 %.

Das Glycopeptid **73** ist sowohl in Wasser als auch in DMSO löslich, zudem in ähnlich polaren Lösungsmitteln wie Methanol, die in diesem Fall für die NMR-Spektroskopie jedoch weniger wichtig sind. Protische Lösungsmittel tauschen Protonen mit denen der NH- und OH-Gruppen der (Glyco-)Peptide aus. Im Fall von deuterierten protischen Lösungsmitteln führt das bei

Peptiden in NMR-Experimenten zum Verschwinden der Amid-Signale. Diese sind jedoch für die dreidimensionale Strukturaufklärung basierend auf NOE-Kontakten sehr hilfreich, was für eine Verwendung aprotischer Lösungsmittel - insbesondere DMSO-d₆ - für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen spricht. Da aber das „natürliche“ Lösungsmittel - im Fall der Ratte - Wasser ist, mußte untersucht werden, inwieweit sich die Verwendung der beiden deuterierten Lösungsmittel (D₂O und DMSO-d₆) auf mögliche Strukturinformationen auswirkt. Dazu wurden NMR-spektroskopische Daten (¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C-HMQC, ¹H-¹H-NOESY, ¹H-¹H-ROESY) vom Glycopeptid **73** einmal in D₂O, in DMSO-d₆ und in einem D₂O/DMSO-d₆-Gemisch (30:70) bei Raumtemp. aufgenommen. Wie zu erwarten wurden geringfügige Verschiebungen der einzelnen Resonanzen abhängig vom gewählten Lösungsmittel beobachtet, in der Regel nicht mehr als 0.15 ppm. Die Signale der Amid-Protonen konnten nur in reinem DMSO-d₆ beobachtet werden. NOESY- und ROESY-Experimente lieferten sehr ähnliche Daten bei schwankender Intensität der einzelnen Signale, wobei diese im Fall von D₂O bei gleicher Probenkonzentration am geringsten war. Da so qualitativ übereinstimmende Protonen-Kontakte ermittelt wurden (unter Vernachlässigung von NH-Kontakten), wurde DMSO-d₆ als Lösungsmittel für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen der folgenden (Glyco-)Peptide gewählt. NOE-Kontakte und Struktur des Moleküls **73** werden in Kapitel 3.4.2 (S. 90) diskutiert.

Daß das Lösungsmittel DMSO die biologische Aktivität von Proteinen, insbesondere von Enzymen beeinträchtigt, ist bekannt. Es wurde auch ein stabilisierender Einfluß von DMSO auf kleine Peptide festgestellt, wobei einerseits die in Wasser vorkommenden Strukturen wiedergefunden wurden, andererseits aber auch beobachtet wurde, daß in Wasser bei Raumtemp. innerhalb der NMR-Zeitskala instabile Turn-Strukturen in DMSO stabil sind und detektiert werden können.^{113,114}

¹¹³ M. M. Dhingra, *Indian J. Biochem. Biophys.* **1992**, *29*, 458.

¹¹⁴ E. R. Stimson, Y. C. Meinwald, G. T. Montelione, H. A. Scheraga, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 569.

3.3.3 Evaluierung der Zielsequenz

Über die Struktur von LI-Cadherin ist bislang wenig bekannt, aber eine Isolierung und Sequenzierung von cDNA-Klonen des LI-Cadherins ist erfolgreich durchgeführt worden.¹¹⁵ Das LI-Cadherin kann zwar strukturell keiner der bereits bekannten Cadherin-Unterfamilien zugeordnet werden, besitzt aber gewisse Ähnlichkeiten mit den klassischen Cadherinen (Abb. 1-7, S. 11). Aufgrund von Sequenzhomologien in den einzelnen Domänen zu den bereits aufgeklärten Cadherinen vermutet man ähnliche strukturelle Eigenschaften. In der extrazellulären Domäne EC 1 des LI-Cadherins ist das typische His-Ala-Val-Motiv durch eine Ala-Ala-Leu-Sequenz ersetzt. Die C-terminal anschließende Aminosäuresequenz Asp-Ser-Gln-Gly stellt ein typisches β -Turn-Motiv dar. Entsprechend wurde ein auf beiden Seiten dieser Sequenz erweitertes (Glyco-)Peptid synthetisiert. Für weitere Synthesen und Untersuchungen sollte dann eine kleinere Sequenz betrachtet werden, die auch tatsächlich eine dem β -Faltblatt ähnliche Struktur ausbildet und weiterhin das β -Turn-Motiv enthält. Je größer die anfängliche Sequenz gewählt wird, desto wahrscheinlicher wird es, daß ihre dreidimensionale Struktur der des nativen Proteins gleicht oder zumindest ähnelt. Andererseits nimmt der Aufwand einer NMR-spektroskopischen Untersuchung nicht linear, sondern näherungsweise exponentiell mit wachsender Größe eines Peptids zu, besonders wenn einzelne Aminosäuren mehrfach in der Zielsequenz enthalten sind. Das trifft für den Fall des LI-Cadherins der Ratte zu, weswegen als Kompromiß die Zielsequenz AVHHLQLAALDSQGAIVDGPVPI gewählt wurde.

3.3.3.1 Synthese eines mit dem T_N-Antigen glycosylierten Tricosapeptids

Um eine ausreichende Löslichkeit des zu untersuchenden Moleküls für NMR-Experimente zu gewährleisten, sollte nicht das einfache Peptid, sondern das an der Serinseitenkette glycosylierte Derivat synthetisiert werden. Theoretisch wäre nun eine lineare, sequentielle Synthese der Zielsequenz möglich gewesen. Ausgehend von den Ergebnissen der optimierten Synthese des Glycopeptids **72** (Abb. 3-38, S. 54), mit einer Ausbeute von ca. 96 % pro Kupplung, würde das - ähnliche Kupplungsausbeuten vorausgesetzt - für ein Tricosapeptid (23 Aminosäuren, entsprechend 22 Kupplungen) eine Gesamtausbeute von 41 % bedeuten. Sicherlich wäre das noch im Rahmen des Möglichen, aber unter Berücksichtigung der

¹¹⁵ R. Gessner, B. Kreft, N. Schnoy, A. M. Lajous-Petter, N. Loch, W. Reutter, M. Hortsch, R. Tauber, *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 1353.

Tatsache, daß bei einer so langen Sequenz Syntheseprobleme durch Rückfaltung zu erwarten sind, kaum sinnvoll. Daher sollte die Sequenz AVHHLQLAAL synthetisiert und mittels einer Fragmentkondensation an den fehlenden Teil DSQGAIVDGPVPI gekuppelt werden.

Zuerst wurde das Fragment Ac-AVH(Trt)H(Trt)LQ(Trt)LAAL-OH am PTMSEL-Anker synthetisiert, und dann das Produkt mit TBAF·3H₂O in CH₂Cl₂ vom Harz gespalten (Abb. 3-40).

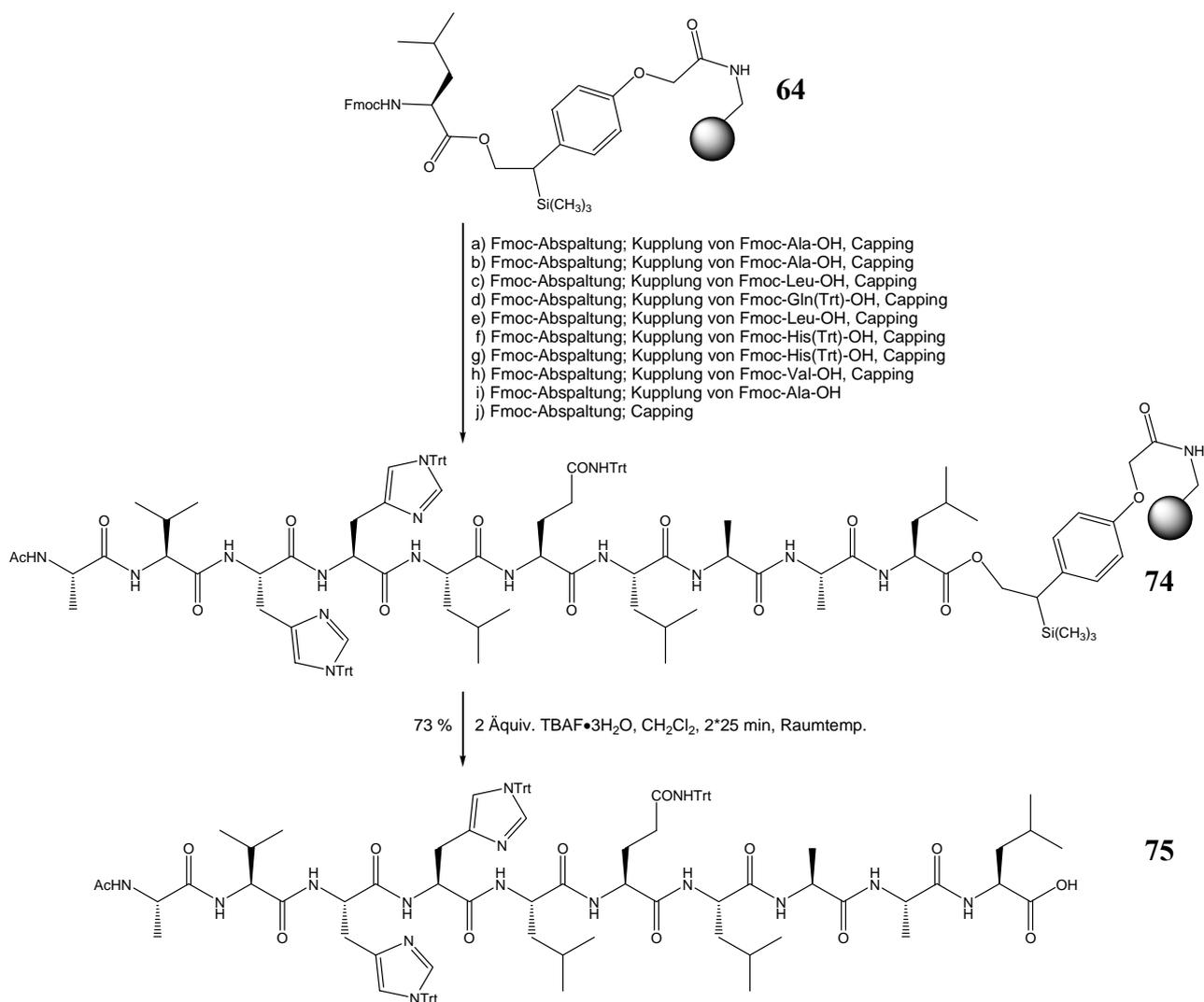


Abb. 3-40: Synthese des Fragments Ac-AVH(Trt)H(Trt)LQ(Trt)LAAL-OH (**75**).

Das in den Seitenketten Trityl-geschützte Peptide **75** wurde in 73 %-iger Ausbeute erhalten. Da es nach analytischer HPLC in mind. 93 %-iger Reinheit vorlag, wurde es nicht weiter durch präparative HPLC gereinigt, sondern direkt für die Fragmentkondensation eingesetzt. Dazu mußte zuerst die Sequenz DSQGAIVDGPVPI am Harz mit dem Peptidsynthesizer aufgebaut werden, um dann das geschützte Peptid **75** mit HATU, HOAt und *N*-Methylmorpholin in einem externen Reaktor zu kuppeln (Abb. 3-41).

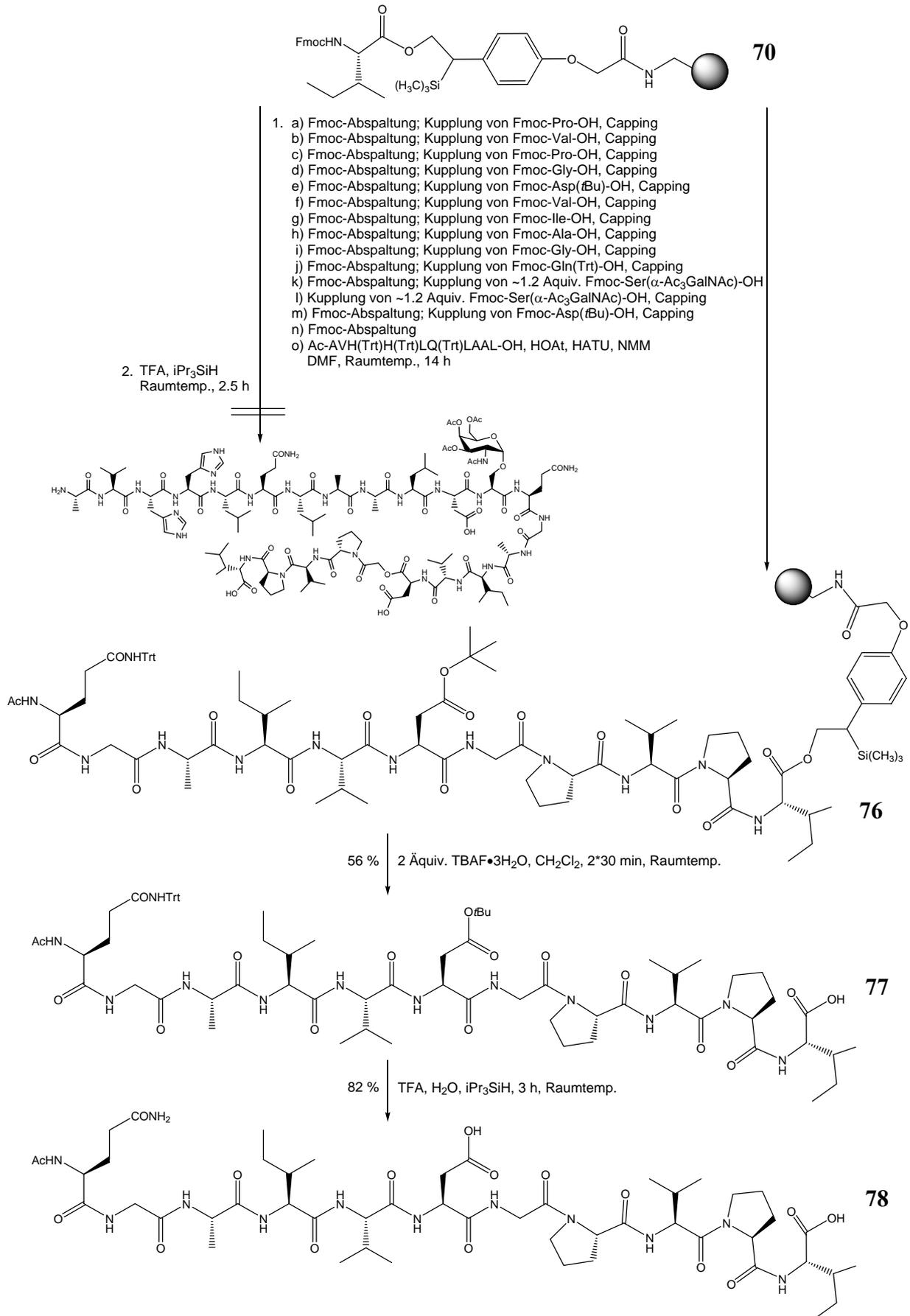


Abb. 3-41: Erster Versuch einer Fragmentkondensation.

Ausgehend vom mit Fmoc-Ile-PTMSEL vorbeladenem AMPS-Harz **70** wurden die Aminosäuren durch den Synthesizer gekuppelt (a bis j). Für den Saccharidbaustein Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAc)-OH (**9**) wurde eine Doppelkupplung mit je 1.2 Äquivalenten durchgeführt, wobei hier die reaktiveren Kupplungsreagenzien HOAt und HATU verwendet wurden. Die Leitfähigkeitsmessung der darauf folgenden Fmoc-Abspaltung zeigte eine Ausbeute der Kupplungsreaktion von nur 40-50 % an. Trotzdem wurde die Synthese (Kupplung von Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH und folgende Fragmentkondensation) fortgeführt. Die Abspaltung vom Harz mit TBAF·3H₂O in CH₂Cl₂ lieferte jedoch nicht ein einzelnes Produkt, sondern - untypisch für die Festphasensynthese - ein komplexes Gemisch. Dieses konnte mittels semipräparativer HPLC aufgetrennt werden, und die Abbruchsequenz **77** wurde in 56 %-iger Ausbeute, ausgehend von der Beladung des Harzes, isoliert. Behandlung mit H₂O, iPr₃SiH als Kationenfänger in TFA lieferte das *N*-terminal acetylierte Peptid **78** in 82 %-iger Ausbeute nach präparativer HPLC. Schwerere Moleküle konnten massenspektroskopisch nur in Spuren nachgewiesen werden.

Ein weiterer Versuch, diesmal mit einem mit Fmoc-Ile vorbeladenem PHB-Tentagel-Harz, führte nach Abspaltung vom Harz mit TFA, H₂O und iPr₃SiH zu einem etwas besseren Ergebnis, allerdings nur was die Reinheit der isolierten Abbruchsequenz **78** betraf. Diese konnte nach präparative HPLC in 84 %-iger Ausbeute, ausgehend von der Beladung des Harzes, isoliert werden. Die Doppelkupplung war mit zweimal je einem Äquivalent des T_N-Antigen-Bausteins **9** durchgeführt worden. Da die Variation des Harzes keinen Einfluß auf die Kupplung dieses Bausteins hatte, wurde nun die Art der Kupplungsreaktion des T_N-Antigen-Bausteins **9** variiert (Abb. 3-42).

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wurde mit dem mit Fmoc-Ile vorbeladenen PHB-Tentagel-Harz befüllt, und die automatisierte Synthese bis zum T_N-Antigen-Baustein durchgeführt. Die Kupplung des Bausteins **9** erfolgte wieder mit einer extern angesetzten Lösung aus HOAt, HATU und Hünigs Base in NMP. Jedoch wurde statt einer Doppelkupplung eine einfache Kupplung über 3 h mit 3 Äquivalenten des Bausteins durchgeführt. Anschließend wurde die Aminosäure Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH im Synthesizer gekuppelt und die letzte Fmoc-Gruppe abgespalten. Da die Reaktionskontrolle bei der Durchführung der Synthese im Synthesizers durch Leitfähigkeitsmessung der Fmoc-Abspaltung in den beiden vorhergehenden Reaktionen betreffend der Baustein-Kupplung falsche Ergebnisse geliefert hatte, wurde das Harz i. Vak. getrocknet und 20 mg wurden von der Hauptmenge des Harzes abgetrennt. Diese 20 mg wurden mit TFA, H₂O und iPr₃SiH geschüttelt, und das extrahierte Produkt untersucht. Da nach analytischer HPLC das Produkt

in großer Reinheit vorlag, war keine Reinigung durch präparative HPLC notwendig, und Massenspektrometrie und NMR-Experimente bestätigten die Struktur des gewünschten Produkts **80**.

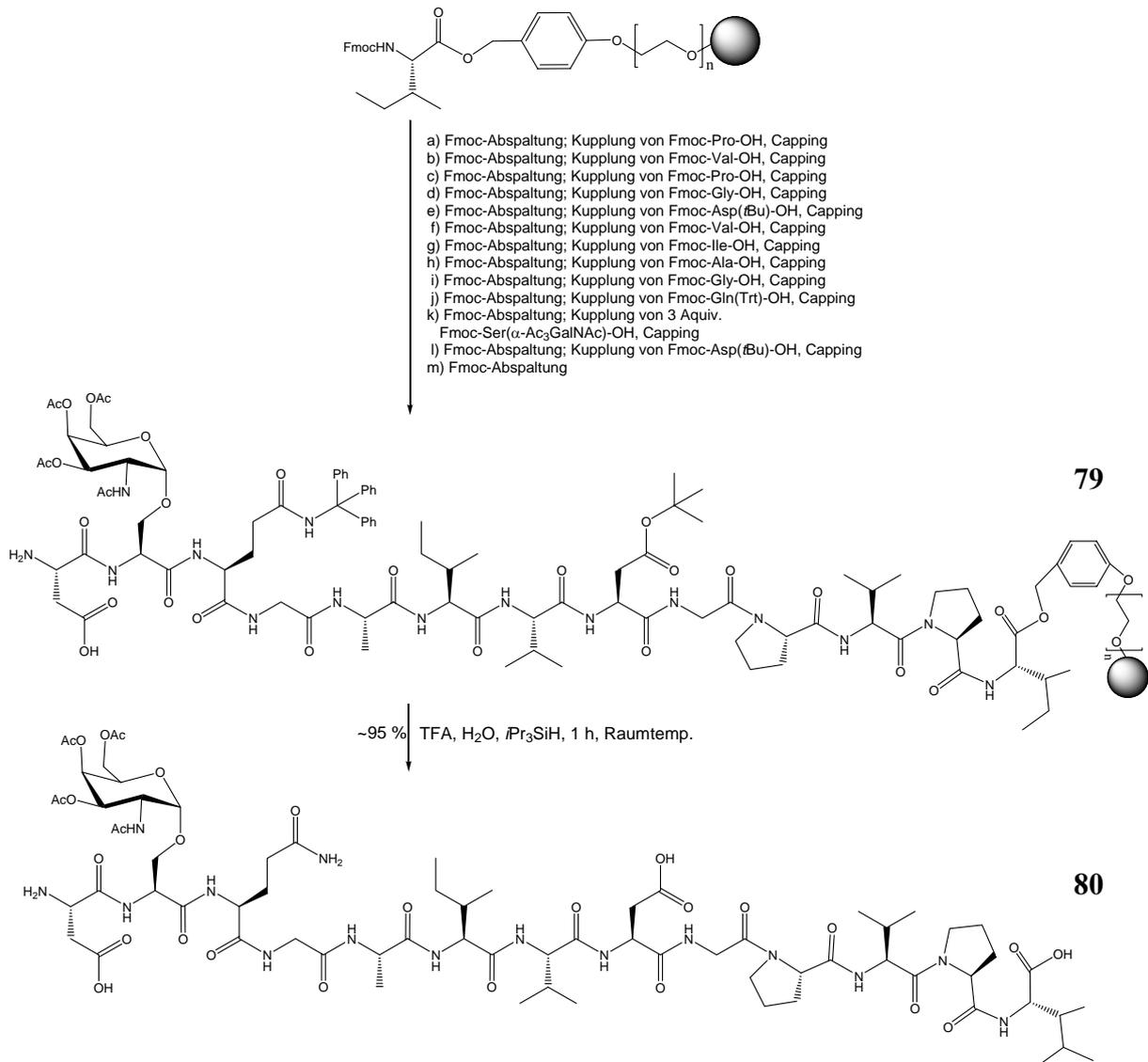


Abb. 3-42: Synthese des Fragmentes H-D(*t*Bu)S(Ac₃GalNAc)Q(Trt)GAIVD(*t*Bu)GPVPI-PHB (**79**).

Das Fragment Boc-AVH(Trt)H(Trt)LQ(Trt)LAAL-OH (**82**) konnte mittels des Peptid-synthesizers am PTMSEL-Anker aufgebaut, und dann durch Schütteln mit TBAF·3H₂O in CH₂Cl₂ vom Harz abgespalten werden (Abb. 3-43). Obwohl es ohne größere Mengen an Nebenprodukten erhalten wurde (Reinheit > 92 % nach analytischer HPLC) wurde das Peptid einer Reinigung durch präparative HPLC unterzogen, um in der folgenden Fragmentkondensation ein optimales Ergebnis erzielen zu können und es von letzten TBAF-Spuren zu befreien. Das Peptid **82** wurde so in 67 %-iger Ausbeute erhalten.

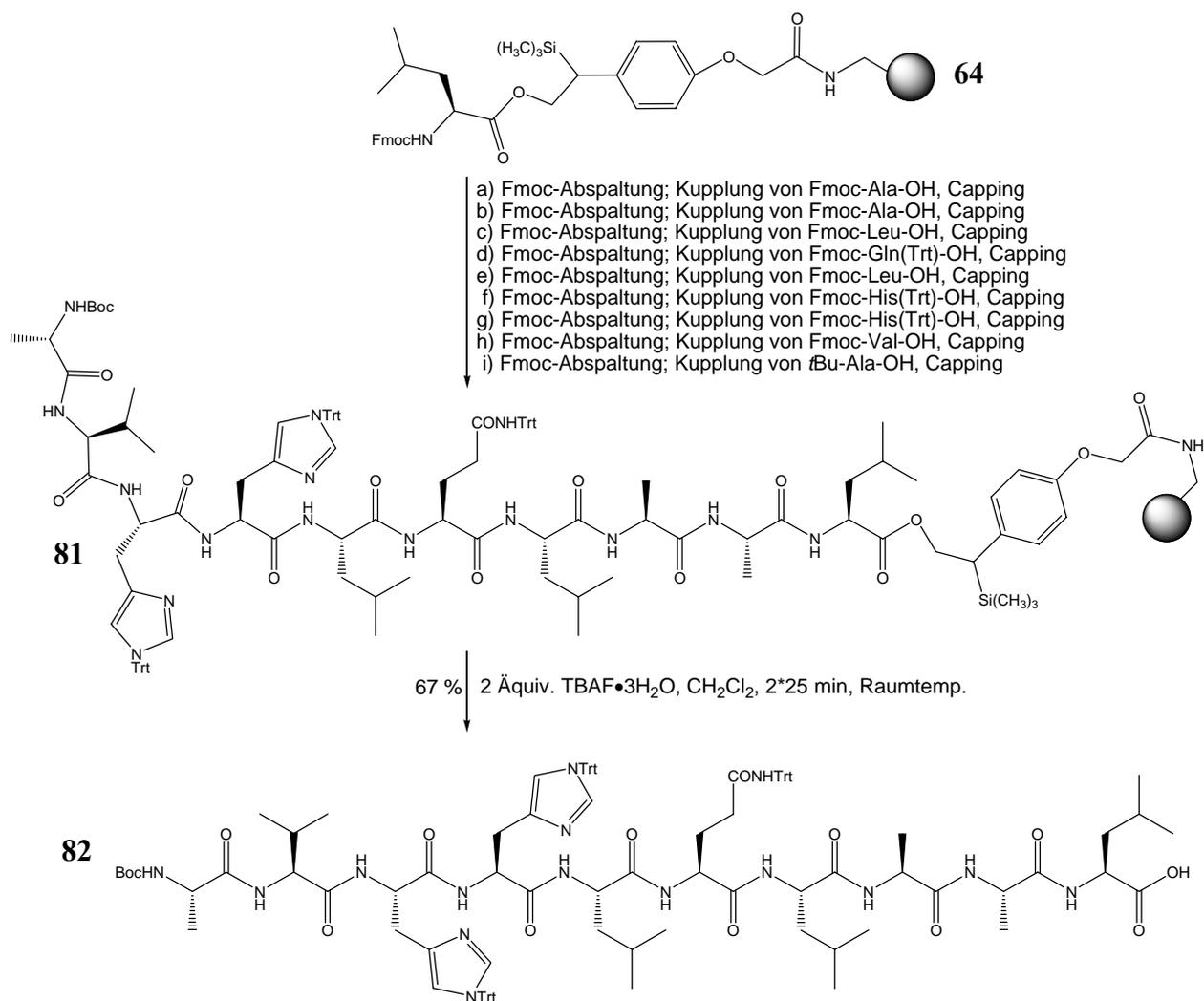
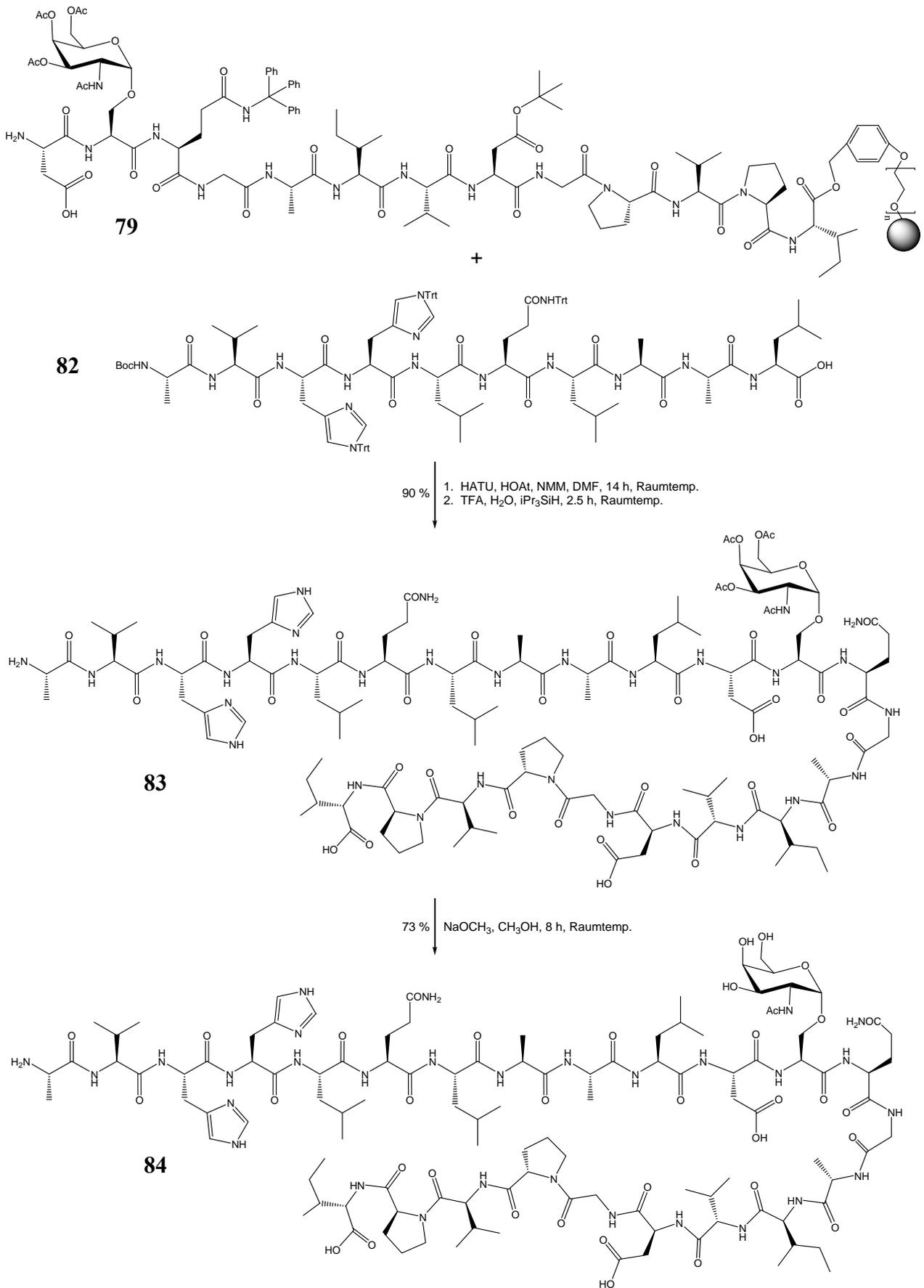


Abb. 3-43: Synthese des Peptids Boc-AVH(Trt)H(Trt)LQ(Trt)LAAL-OH (**82**).

Das am Harz gebundene Glycopeptid **79** wurde vorgelegt und dann mit dem Peptid **82** in einer Lösung aus HATU und HOAt in DMF, aktiviert mit *N*-Methylmorpholin, gekuppelt (Abb. 3-44). Nach Abspaltung vom Harz mit TFA konnte das Tricosapeptid **83** in 90 %-iger Ausbeute erhalten werden.

Analytische HPLC bescheinigte eine Reinheit von 96 % nach Extraktion mit Diethylether, weswegen auf aufwendigere Reinigungsschritte verzichtet werden konnte. Eine Umesterung der Acetyl-Schutzgruppen unter Zemplén-Bedingungen und anschließende Reinigung durch Ausschlußchromatographie an einer Sephadex-Säule lieferte schließlich das Glycopeptid **84** in 73 %-iger Ausbeute. Ausgehend von der Startbeladung des Harzes konnte es so in einer Gesamtausbeute von 62 % hergestellt werden.

Abb. 3-44: Synthese des Tricosapeptids **84**.

3.3.3.2 NMR-spektroskopische Untersuchung der dreidimensionalen Struktur des Tricosapeptids

Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HMQC, ^1H - ^1H -NOESY, ^1H - ^1H -ROESY) wurden zuerst die Protonen- und ^{13}C -Signale des Glycopeptids **84** zugeordnet. Das mehrfache Auftreten gleicher Aminosäuren erschwerte die Interpretation und erforderte die Verwendung der NOE-Kontakte zu Protonen benachbarter Aminosäuren, um die jeweiligen Reste in ihr Umfeld einordnen zu können. Eine eindeutige Zuordnung aller Protonen mehrfach vorkommender Aminosäuren war trotzdem nicht möglich. Abb. 3-45 zeigt die zur Strukturaufklärung verbliebenen raumübergreifenden NOE-Kontakte.

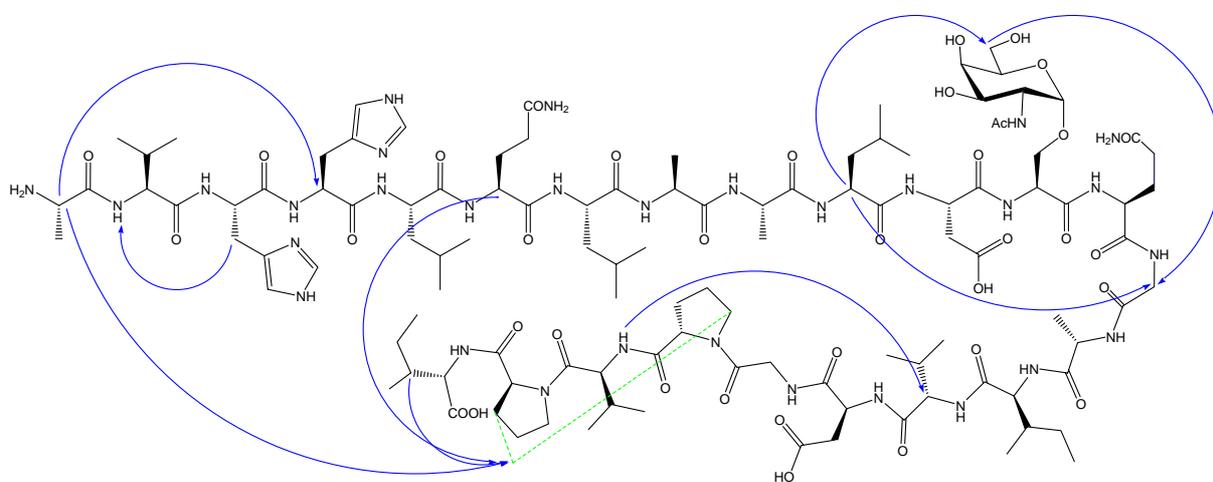


Abb. 3-45: NOE-Kontakte des Glycopeptids **84**.

Kontakte zu Protonen direkt benachbarter Aminosäuren sind nicht eingetragen. Sie würden Abb. 3-45 überladen und sind zudem bei den folgenden Rechnungen nicht sinnvoll verwendbar, da die ermittelten NOE-Kontakte nur qualitativ, aber nicht quantitativ interpretiert wurden. Die Berechnung der dreidimensionalen Struktur erfolgte mit einer dem Programm Chem3D⁶⁵ implementierten MM2-Routine, basierend auf den abgebildeten raumübergreifenden NOE-Kontakten. Die MM2-Methode, nach der sämtliche Strukturen in dieser Arbeit berechnet wurden, ist in Kapitel 3.4 (S. 81) näher erläutert. Da die δ -Protonen der beiden Proline nicht differenziert werden konnten (durch gestrichelte Linien angedeutet), ist die berechnete Struktur im C-terminalen Bereich ungenau. Die Energieminimierung lieferte zwei Struktursätze, die sich hinsichtlich des Peptidrückgrades aber nur durch einen geringen Unterschied der Lage der Peptidbindungsebenen in der Nähe des T_N-Antigens unterscheiden. Das Ergebnis der MM2-Rechnungen ist in Abb. 3-46 und Abb. 3-47 dargestellt.

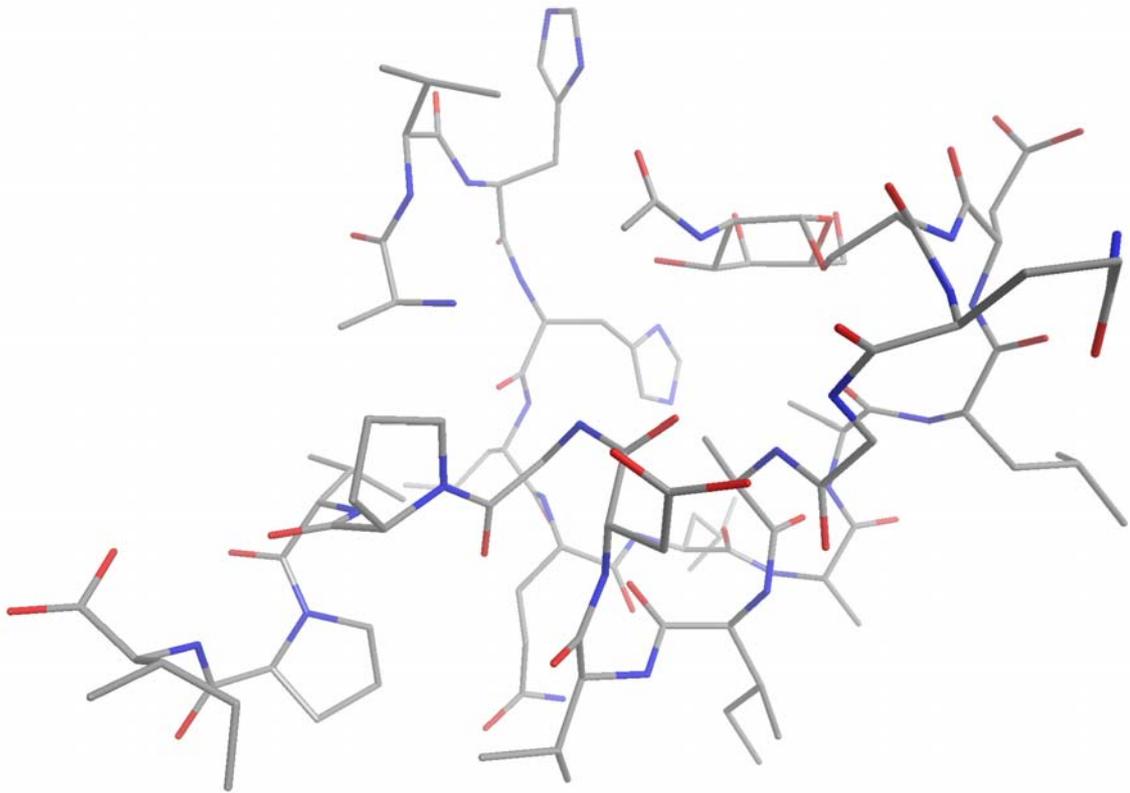


Abb. 3-46: MM2-Energieminimierung des Glycopeptids **84**.

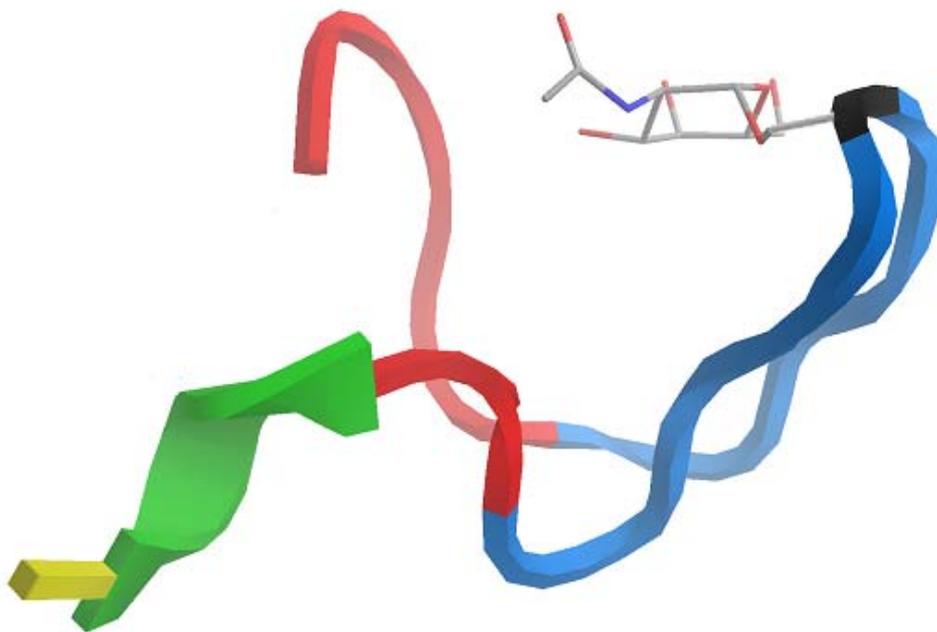


Abb. 3-47: Darstellung des Peptidrückrates von Verbindung **84** sowie dessen T_N-Antigen.

Der C-Terminus ist gelb dargestellt, der α -helikale Bereich grün, die Sequenz LAALDSQGAIV blau, und die Aminosäure Serin schwarz.

Der *N*-Terminus des Glycopeptids **84** liegt in einer *random coil*-Struktur vor, und *C*-Terminus nimmt in der Berechnung die energetisch günstige α -Helix ein. Der für diese Arbeit relevante Bereich aus den Aminosäuren um das T_N-Antigen bzw. Serin in Richtung der *N*- und *C*-Termini bildet eine fehlerhafte, im Peptidrückrat verdrehte β -Faltblattstruktur aus. Dies ist ähnlich der situation beim E-Cadherin, bei dem der β -Turn von einem Faltblatt-Motiv - zumindest in Richtung des *N*-Terminus - eingerahmt ist. Die Sequenz Leu-Asp-Ser-Gln bildet in diesem Fall den Turn und ist, von den Diederwinkeln¹¹⁶ ausgehend ($\Phi_{i+1} = -82.4^\circ$, $\Psi_{i+1} = 35.8^\circ$, $\Phi_{i+2} = -143.1^\circ$, $\Psi_{i+2} = -36.8^\circ$), keinem speziellen Typ zuzuordnen - insbesondere da eine Wasserstoffbrücke von der Art *i/i+3* (*i* = Leu) fehlt.

Der Turn und der dem β -Faltblatt ähnliche Bereich bestehen in der energieminierten Struktur des Glycopeptids **84** aus der Sequenz LAALDSQGAIV, abzüglich der ersten und letzten Aminosäure. Die beiden Termini liegen nicht mehr in der Ebene eines möglichen β -Faltblattes, wurden aber hinzugenommen um elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Amino- und Carboxy-Funktion der Termini zu erlauben ohne ein mögliches Faltblatt direkt zu beeinflussen. In den folgenden Synthesen wurden sowohl das reine Peptid, als auch verschiedene Glycopeptide dieser Aminosäuresequenz aufgebaut.

¹¹⁶ Eine Diskussion der Eigenschaften von Sekundärstrukturelementen sowie ideale Diederwinkel findet sich in Kapitel 3.4, S. 81.

3.3.4 Synthese des Undekapeptids

Das Peptid **85** wurde durch automatisierte Festphasensynthese ausgehend von mit Fmoc-Valin beladenem PHB-Tentagel-Harz erhalten (Abb. 3-48). Es wurde vom Harz unter Standardbedingungen mit TFA und $\text{H}_2\text{O}/i\text{Pr}_3\text{SiH}$ abgespalten. In reinem Wasser ist Verbindung **85** sehr schlecht löslich, besitzt aber eine mäßige Löslichkeit in mit TFA angesäuerten Acetonitril/Wasser-Gemischen, so daß auch eine präparative HPLC mit einem solchen Gemisch als Laufmittel durchgeführt werden konnte. Die Ausbeute von 99 % deutet auf keinerlei sterische Hinderung während der Synthese hin, wie sie z.B. durch Rückfaltung oder der Ausbildung von Faltblattstrukturen entstehen würde.

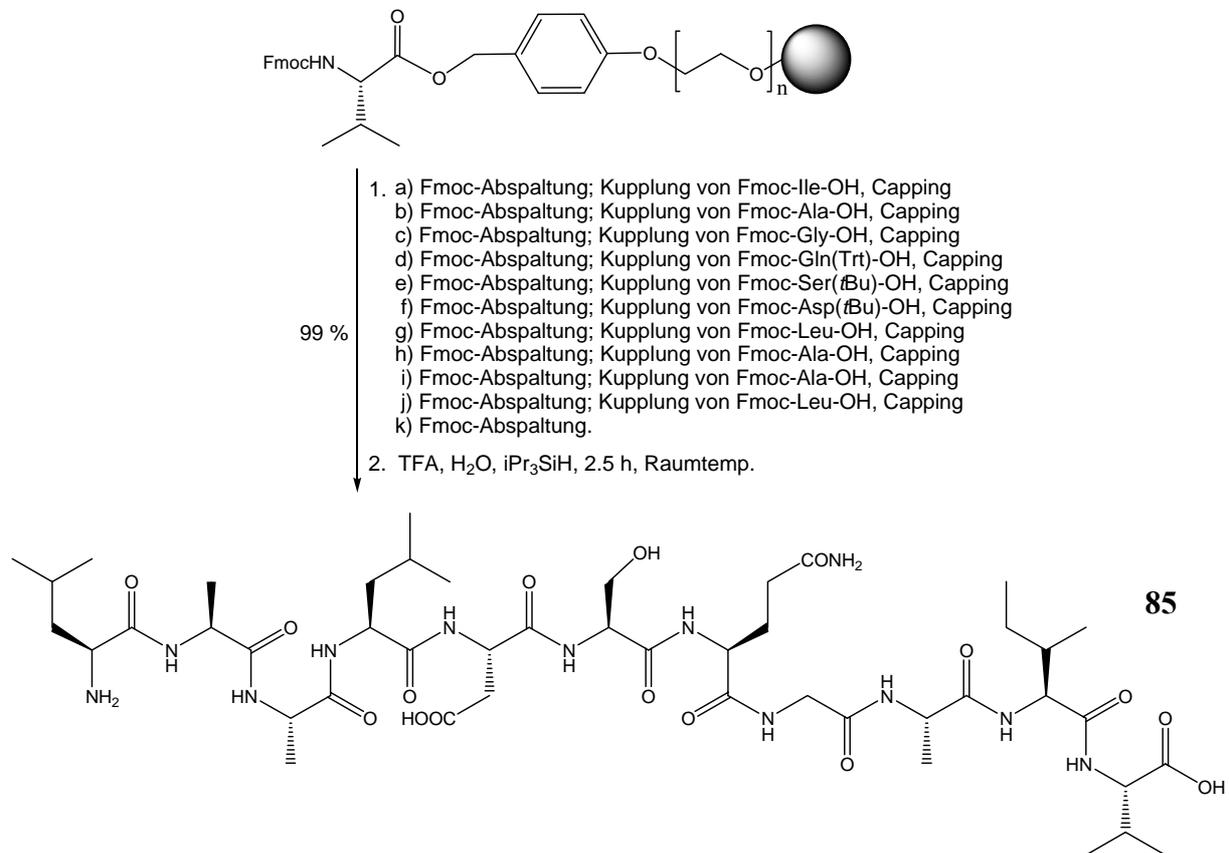


Abb. 3-48: Synthese des Undekapeptids **85**.

3.3.5 Synthese des mit dem T_N-Antigen glycosylierten Undekapeptids

Da sowohl die Verwendung eines vorbeladenen Tentagel-PHB-Harzes als auch die Verwendung eines mit dem PTMSEL-Anker funktionalisierten Harzes für die Synthesen der Verbindungen **84** und **85** hohe Ausbeuten lieferte, wurden für die Synthese des mit dem T_N-Antigen glycosylierten Peptids **89** noch einmal beide Ankersysteme verwendet und miteinander verglichen (Abb. 3-49).

Die Kupplungsfolge entspricht der in Abb. 3-48 (S. 67) gezeigten, jedoch wurde das mit dem PTMSEL-Anker funktionalisierte Harz **67** verwendet und statt Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH wurde der T_N-Antigen-Baustein **9** (Schritt *e*) mit einer Lösung aus HOAt, HATU und Hünigs Base in NMP gekuppelt. Der direkte Vergleich der beiden Synthesen scheiterte leider an einer Fehlfunktion des Peptidsynthesizers während der Synthese am PTMSEL-Anker. Nach Abspaltung vom Harz mit TBAF in CH₂Cl₂ war das geschützte Glycopeptid **86** nach Reinigung mittels semipräparative HPLC als eine von zwei Hauptfraktionen in nur 9 %-iger Ausbeute zu isolieren. Während die niedrige Ausbeute und die Entstehung eines komplexen Gemisches auch bei der Synthese einer schwierigen Aminosäuresequenz hätte auftreten können, deutet die Isolierung der ungewöhnlichen Abbruchsequenz **87** auf eine Fehlfunktion des Peptidsynthesizers hin, da ein Syntheseabbruch - wenn überhaupt - vor der Kupplung des T_N-Antigen-Bausteins **9** zu erwarten gewesen wäre.

Die Verwendung des Fmoc-Val-Tentagel-PHB-Harzes lieferte unter ansonsten identischen Bedingungen hohe Ausbeuten, weswegen die Synthese ausgehend vom PTMSEL-Anker nicht wiederholt wurde. Nach Abspaltung vom Harz mit TFA konnte das Glycopeptid **88** in 78 %-iger Ausbeute isoliert werden. Die durch analytische HPLC überprüfte Reinheit machte eine weitere Reinigung unnötig. Im nächsten Schritt wurden die Acetyl-Schutzgruppen unter Zemplén-Bedingungen bei pH 9.5 abgespalten. Nach Reinigung mittels semipräparativer HPLC wurde das Glycopeptid **89** in 73 %-iger Ausbeute erhalten. Ausgehend vom Fmoc-Val-Tentagel-PHB-Harz wurde es so in einer Gesamtausbeute von 57 % synthetisiert. Sofern man nicht an weiteren Synthesen mit dem vollständig geschützten (Glyco-)Peptid interessiert ist, spart die Verwendung des Tentagel-PHB-Harzes einen Syntheseschritt und wurde daher für die folgenden Synthesen verwendet.

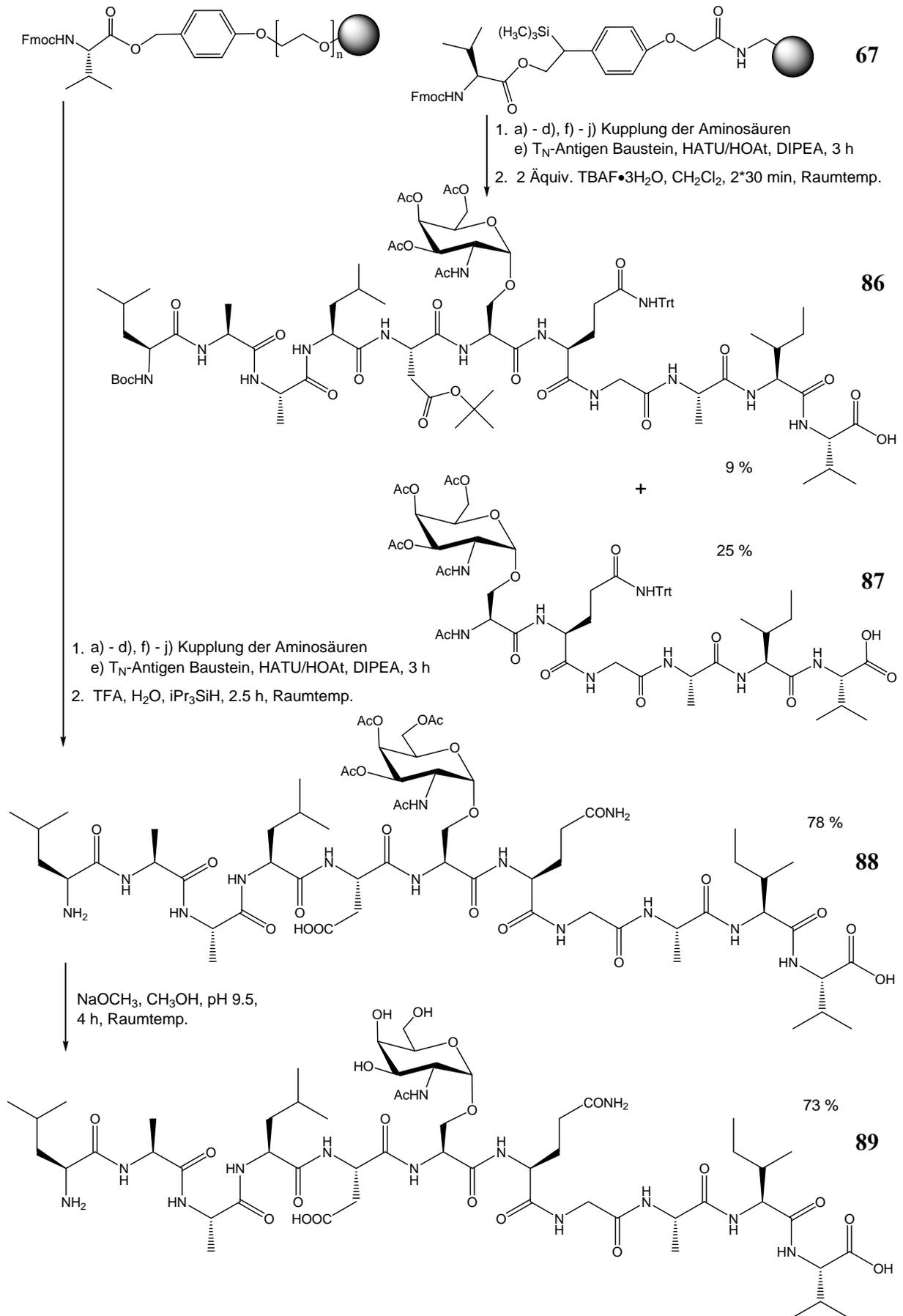


Abb. 3-49: Synthese des Glycopeptids 89.

3.3.6 Synthese des mit dem T-Antigen glycosylierten Undekapeptids

Das mit dem T-Antigen glycosylierte Undekapeptid **92** wurde ausgehend von vorbeladenem Tentagel-PHB-Harz durch den Peptidsynthesizer hergestellt. Die Kupplungssequenz entspricht der in Abb. 3-48 (S. 67) gezeigten, statt Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH wurde der T-Antigen-Baustein **25** (Schritt *e*) eingesetzt. Dazu wurde der Reaktor des Synthesizers mit zwei Äquivalenten des Saccharidbausteins und einer extern angesetzten Lösung aus HOAt, HATU und DIPEA in NMP beschickt. Es wurde 4 h bei Raumtemp. geschüttelt (Abb. 3-50).

Die Kupplung des Bausteins **25** gelang nur mit mäßiger Ausbeute. Das verunreinigte Glycopeptid wurde vom Harz mit TFA und iPr_3SiH /Wasser als Kationenfänger abgespalten. Die Reinigung des Gemischs durch semipräparative HPLC lieferte das Produkt **90** in 46 %-iger Ausbeute. Offenbar ist der sterische Anspruch des T-Antigen-Bausteins für diese Sequenz schon recht groß. Neben dem Glycopeptid **90** wurde die Abbruchsequenz **91** in ca. 35 %-iger Ausbeute isoliert. Das Pentapeptid ist nur in mit TFA angesäuerten Acetonitril/Wasser-Gemischen löslich, und weist eine von den Glycopeptiden deutlich unterschiedliche Retentionszeit auf. Da es in der hier beschriebenen Synthese nur als Mischfraktion mit anderen (Glyco-)Peptiden erhalten werden konnte, wurde es in einer separaten Festphasensynthese ausgehend von Tentagel-PHB-Harz hergestellt. Das Rohprodukt konnte quantitativ erhalten werden, aber nach semipräparativer HPLC wurde das Pentapeptid **91** aufgrund von Löslichkeitsproblemen in nur 54 %-iger Ausbeute als Vergleichssubstanz isoliert. Die für das Peptid **91** erhaltene Retentionszeit erlaubte eine eindeutige Zuweisung des analytischen und präparativen HPLC-Peaks der Abbruchsequenz, wie sie bei allen Synthesen mit anspruchsvolleren Antigen-Bausteinen als dem T_N -Antigen auftrat.

Zur Abspaltung der Acetylgruppen wurde das Glycopeptid **90** 4 Stunden in Methanol mit $NaOCH_3$ bei pH 9.5 gerührt, mit saurem Ionenaustauscher neutralisiert und durch semipräparative HPLC gereinigt. Das vollständig deblockierte Glycopeptid **92** ließ sich so in 51 %-iger Ausbeute herstellen. Die Gesamtausbeute betrug, ausgehend von der Startbeladung des Harzes, 23 %.

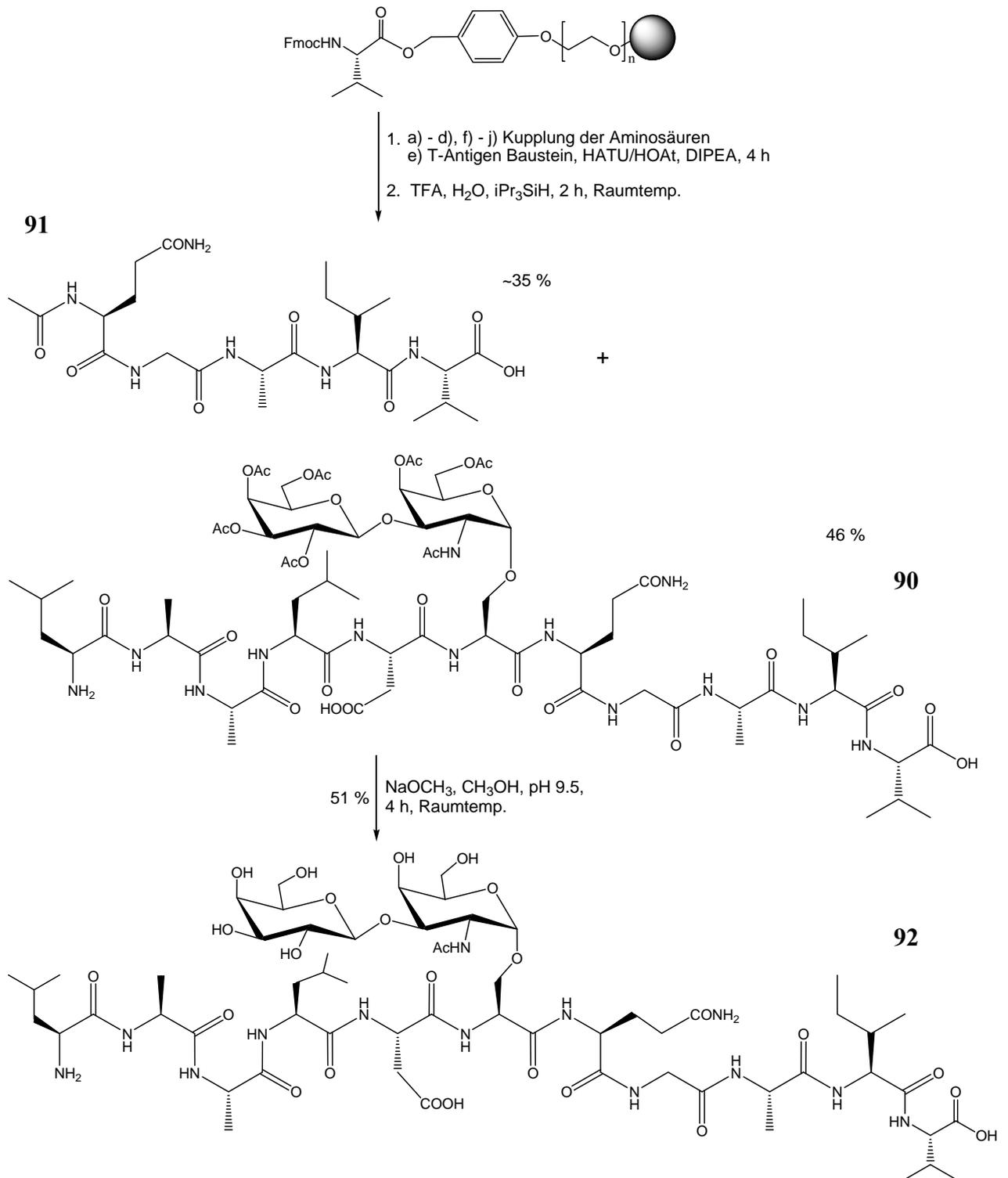


Abb. 3-50: Synthese des mit dem T-Antigen glycosylierten Undekapeptids **92**.

3.3.7 Synthese des (2→6)-Sialyl-T_N-Antigen glycosylierten Undekapeptids

Die Festphasensynthese des (2→6)-Sialyl-T_N-Antigen glycosylierten Peptids **94** erfolgte wie die vorangegangenen Synthesen ausgehend von mit Fmoc-Valin vorbeladenem Tentagel-PHB-Harz im Peptidsynthesizer. Die Kupplungssequenz entspricht der in Abb. 3-48 (S. 67) gezeigten. Da schon die Verwendung des T-Antigen-Bausteins **25** in der vorherigen

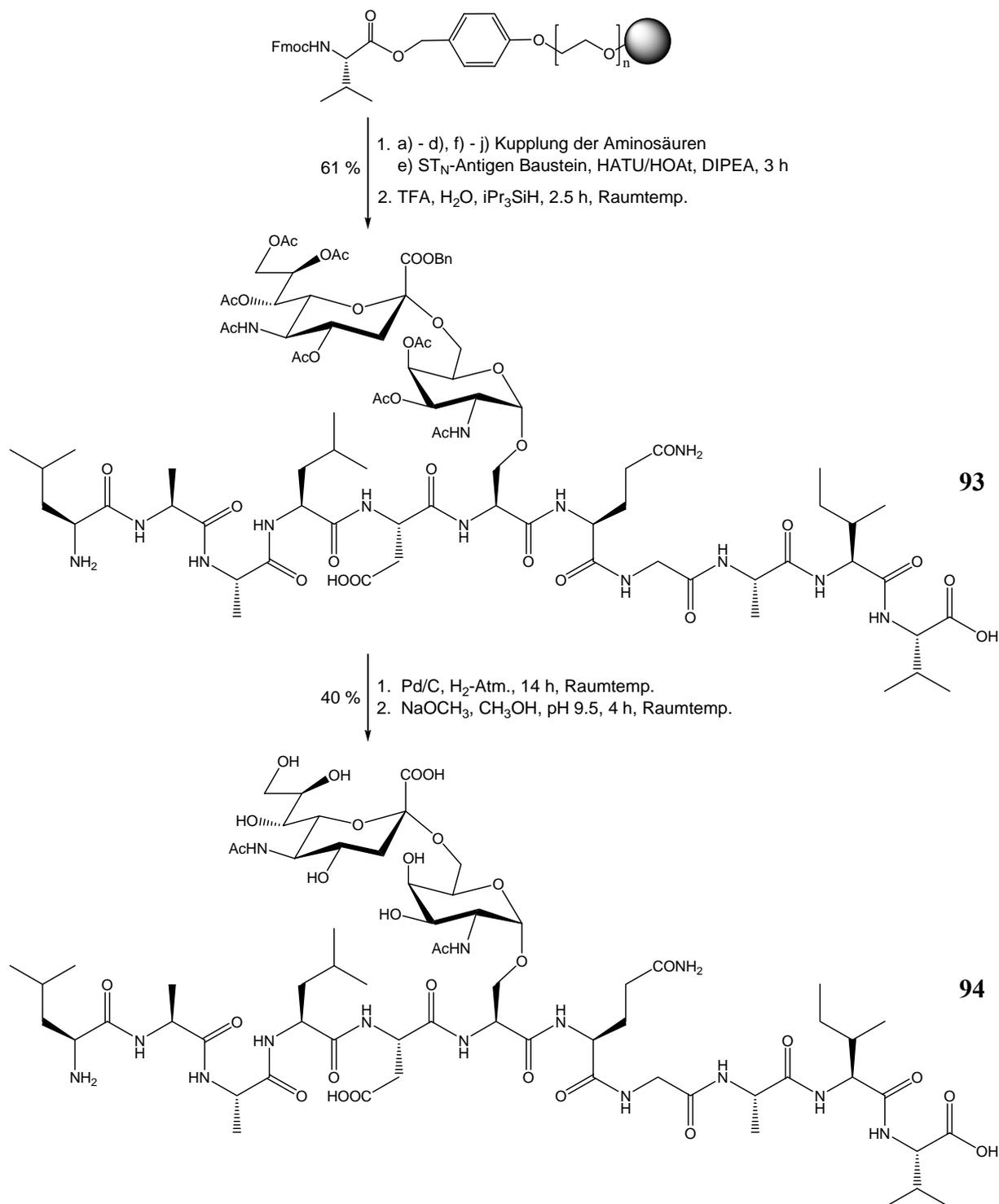


Abb. 3-51: Synthese des mit dem (2→6)-Sialyl-T_N-Antigen glycosylierten Undekapeptids **94**.

Synthese des glycosylierten Peptids **92** Probleme bereitete, wurden für die Kupplung des teureren (2→6)-Sialyl-T_N-Antigen-Bausteins **32** (Schritt *e*) 0.5 Äquivalente mehr eingesetzt. Entsprechend wurde das Harz mit einer extern angesetzten Lösung aus 2.5 Äquivalenten des Saccharidbausteins **32**, HOAt, HATU und Hünigs Base in NMP behandelt (Abb. 3-51).

Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde das Produkt vom Harz mit TFA abgespalten. Durch nachfolgende Reinigung mittels semipräparativer HPLC ließ sich das teilweise geschützte Glycopeptid **93** in 61 %-iger Ausbeute isolieren. Die Abspaltung der Benzyl- und der Acetyl-Schutzgruppen erfolgte in einer Reaktionssequenz. Dazu wurde zuerst das Glycopeptid **93** unter einer Wasserstoff-Atmosphäre mit Palladium in katalytischen Mengen 14 h gerührt. Dann wurden bei pH 9.5 innerhalb von 4 h mit NaOCH₃ in Methanol die Acetylgruppen abgespalten. Nach semipräparativer HPLC wurde das mit dem (2→6)-Sialyl-T_N-Antigen glycosylierte Undekapeptid **94** in 40 %-iger Ausbeute erhalten. Ausgehend von der Startbeladung des Harzes betrug die Gesamtausbeute 24 %.

3.3.8 Synthese des mit dem (2→6)-Sialyl-T-Antigen glycosylierten Undekapeptids

Für die Synthese des (2→6)-Sialyl-T-Antigen glycosylierten Undekapeptids **96** standen zwei verschiedene Bausteine zur Verfügung. Der wesentliche Unterschied des zuerst hergestellten (2→6)-Sialyl-T-Antigen-Bausteins **53** zum Baustein **54** besteht in einer acetylierten 4-Hydroxy-Gruppe der zentralen *N*-Acetyl-Galactosamineinheit. Da diese Position nur sehr langsam acetyliert wurde, waren Probleme bei der Abspaltung dieser Acetyl-Schutzgruppe nach vollendeter Synthese des Glycopeptids zu erwarten. Dieses Problem sollte mit dem Baustein **54** umgangen werden, auch wenn die freie Hydroxyfunktion u.U. während der Festphasensynthese zu Nebenreaktion führen könnte. Tatsächlich jedoch stellten sich die Kupplungsreaktionen beider Bausteine als problematisch heraus (Abb. 3-52).

Für die mit dem Peptidsynthesizer durchgeführten Synthesen wurde ein mit Fmoc-Valin vorbeladenes Tentagel-PHB-Harz verwendet. Die Kupplungsfolge der Aminosäuren entspricht der in Abb. 3-48 (S. 67). Zur Kupplung der beiden (2→6)-Sialyl-T-Antigen-Bausteine **53** und **54** wurde der Synthesizer jeweils gestoppt, und der Festphasenreaktor mit einer extern angesetzten Lösung aus dem Antigen-Baustein, HATU und HOAt, aktiviert mit zwei Äquivalenten DIPEA (bezogen auf den Antigen-Baustein), beschickt. Für den ersten Versuch wurden 1.6 Äquivalente des Bausteins **53** eingesetzt, und die Kupplungszeit betrug 4 h (Schritt *e*).

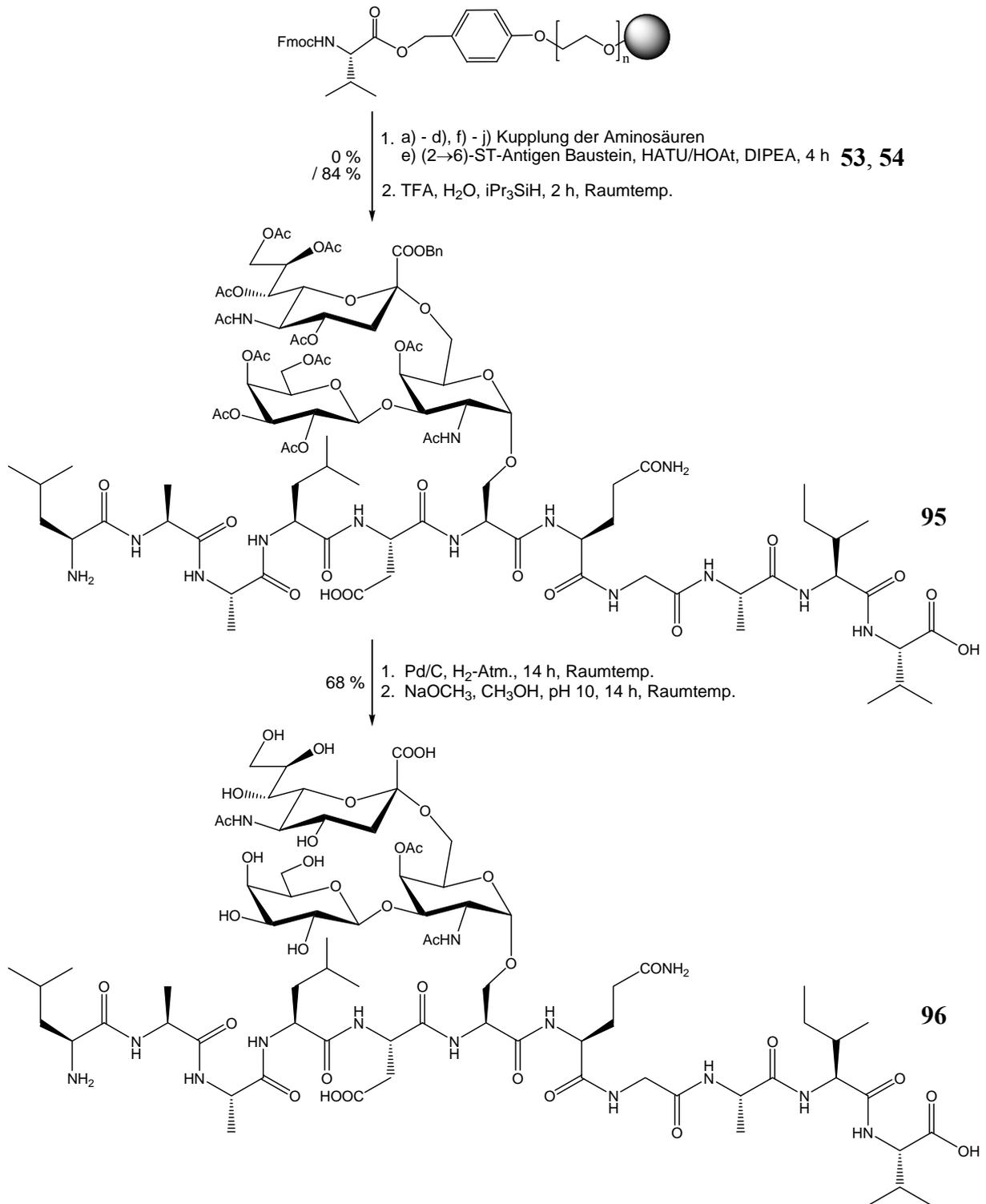


Abb. 3-52: Synthese des mit dem (2→6)-Sialyl-T-Antigen glycosylierten Undekapeptids **96**.

Die Bestimmung der Kupplungsausbeute durch UV-Spektroskopie zeigte nur ein mäßiges Ergebnis. Nach Ablauf sämtlicher Reaktionssequenzen - mit schwankenden Kupplungsausbeuten - wurden die Produkte mittels TFA vom Harz abgespalten. Massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten jedoch, daß der Antigen-Baustein nicht gekuppelt worden war. Der Versuch wurde unter ähnlichen

Bedingungen mit 1.4 Äquivalenten von Baustein **54** bei einer Kupplungsdauer von 6 h wiederholt. Statt des Glycopeptids **95** wurde jedoch wieder nur die Abbruchsequenz Ac-QGAIIV **91** isoliert. Ein letzter Versuch mit verbliebenen 1.6 Äquivalenten (2→6)-Sialyl-T-Antigen-Baustein **53** wurde durchgeführt. Prinzipiell wurden wieder identische Reaktionsbedingungen gewählt - schließlich hatten sie sich bei den anderen Antigen-Bausteinen bewährt - jedoch wurden sämtliche Reagenzienlösungen des Synthesizers neu angesetzt. Auch wurde auf eine möglichst kurze Reaktionszeit geachtet. Nach Abspaltung vom Harz mit TFA und Reinigung durch Extraktion mit Diethylether konnte das Glycopeptid **95** in 84 %-iger Ausbeute isoliert werden.

Die hydrogenolytische Abspaltung der benzylicischen Schutzgruppe erfolgte über katalytischen Mengen Palladium auf Kohle. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Lösung 10 h bei Raumtemp. mit NaOCH₃ in Methanol bei pH 10.5 gerührt. Dieser letzte Schritt führte auch zur Umesterung aller Acetyl-Schutzgruppen bis auf die in der 4-Position des *N*-Acetylgalactosamins. Das Glycopeptid **96** wurde so nach Reinigung durch semipräparative HPLC in 68 %-iger Ausbeute erhalten. Die Gesamtausbeute ausgehend vom der Startbeladung des Harzes betrug bis 57 %.

Um die letzte *O*-Acetylgruppe abzuspalten wurde das Glycopeptid **96** in einer wäßrigen NaOH-Lösung 14 h bei pH 10 gerührt. Die Reaktionskontrolle durch analytische HPLC zeigte jedoch keinen Umsatz, weswegen der pH Wert auf 11 bis 11.5 erhöht wurde. Auch unter diesen Bedingungen war mittels analytischer HPLC nur eine sehr langsame Reaktion zu beobachten, und statt eines vollständig deblockierten Glycopeptids konnte nur nach Verlust der Saccharideinheit das Peptid **85** isoliert werden.

3.3.9 Synthese des mit dem (2→3)-Sialyl-T-Antigen glycosylierten Undekapeptids

Wie schon das (2→6)-Sialyl-T-Antigen-Derivat **96** sollte das mit dem (2→3)-Sialyl-T-Antigen glycosylierte Undekapeptid **100** durch automatisierte Festphasensynthese hergestellt werden. Die Kupplungsreihenfolge der Aminosäuren blieb unverändert (Abb. 3-48, S. 67). Es wurden 1.6 Äquivalente des (2→3)-Sialyl-T-Antigen-Bausteins **47** mit HATU, HOAt und Hünigs Base gekuppelt, wozu die automatisierte Synthese unterbrochen wurde. Nachdem das Glycopeptid vollständig am Harz aufgebaut worden war, wurde es in TFA mit den Kationenfängern *i*Pr₃SiH und H₂O geschüttelt. Nach Reinigung durch semipräparative HPLC konnte so das gewünschte Glycopeptid **97** in 13 %-iger Ausbeute erhalten werden (Abb. 3-53).

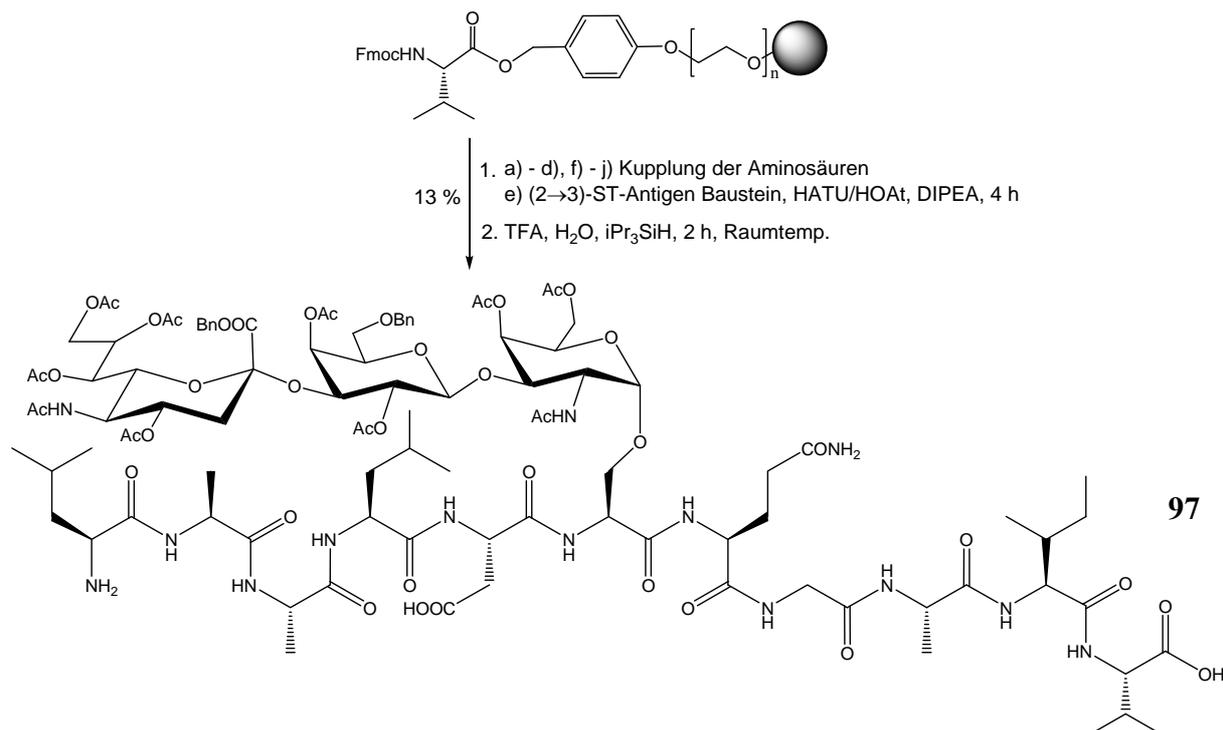


Abb. 3-53: Automatisierte Festphasensynthese des (2→3)-Sialyl-T-Derivats **97**.

Offenbar traten ähnliche Probleme wie schon bei der Synthese des (2→6)-Sialyl-T-Antigen-Analogon **96** auf. Zum Teil sind sie auf sterische Hinderung der beteiligten Edukte zurückzuführen, aber die deutlich verschiedenen Ausbeuten der analogen Synthesen mit den (2→6)-Sialyl-T-Antigen-Bausteinen **53** und **54** (Abb. 3-52, S. 74), d.h. die schlechte Reproduzierbarkeit, deuteten auf technische Probleme mit dem Synthesizer hin.¹¹⁷ Da die Menge des hergestellten Glycopeptids **97** nicht für weitere Reaktionen verbunden mit NMR-spektroskopischen Untersuchungen ausreichte wurde die Synthese manuell wiederholt.

Die manuelle Festphasensynthese (Kapitel 5.5.1, S. 216) entspricht in großen Teilen der automatisierten, sieht man davon ab, daß jeder Reaktions- und Waschschrift selbst durchgeführt werden muß. Insbesondere die Reaktionszeiten wurden durch die Verwendung ähnlich hoch konzentrierter Lösungen kurz gehalten, so daß die komplette Synthese des Glycopeptids **99** in 2½ Tagen beendet war (Abb. 3-54).

¹¹⁷ Tatsächlich wurde der Peptidsynthesizer einer gründlichen Wartung unterzogen, jedoch ließen die Vielzahl ausgetauschter Wartungsteile keine eindeutige Fehlerquellenzuweisung zu.

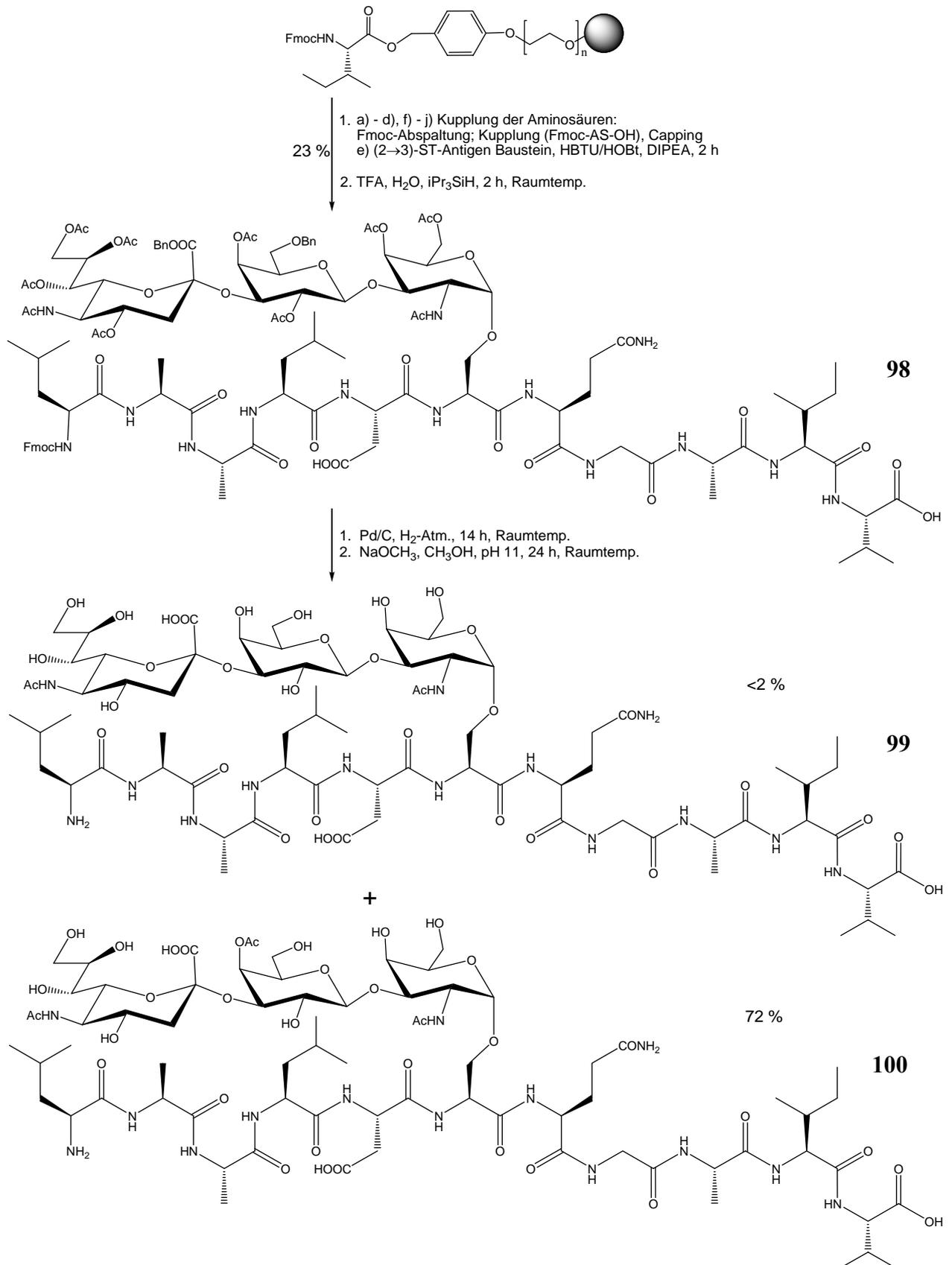


Abb. 3-54: Synthese des mit dem (2→3)-Sialyl-T-Antigen glycosylierten Undekapeptid **100**.

Ausgehend von mit Fmoc-Valin vorbeladenem Tentagel-PHB-Harz wurde das Glycopeptid **98** schrittweise aufgebaut. Für den Saccharidbaustein **47** wurde die Reaktionsdauer verdoppelt (2 h), jedoch wurden die Kupplungsreagenzien - eine Lösung aus HBTU und HOBt, aktiviert mit DIPEA - beibehalten. Vorangegangene Kupplungsversuche des T_N-Antigen-Bausteins **9** an die Sequenz Q(Trt)GAIV auf Tentagel-PHB-Harz zeigten, daß bei dieser Reaktionsführung mit der Verwendung von HATU und HOAt als Kupplungsreagenzien keine signifikante Steigerung der Ausbeute einherging. Chargenabhängig wurden teilweise schlechtere Ergebnisse erzielt, während mit der HBTU/HOBt-Lösung die Ausbeute und Reproduzierbarkeit sehr gut war.

Das (2→3)-Sialyl-T-Antigen-Derivat **98** ließ sich nach Abspaltung vom Harz mit TFA und Reinigung durch semipräparative HPLC in 23 %-iger Ausbeute isolieren. Im Vergleich zur automatisierten Synthese (13 % Ausbeute, 2 Äquivalente des Saccharidbausteins **47**) erscheint dies u.U. nur als eine geringfügige Verbesserung, jedoch wurden bei der manuellen Synthese nur 1.14 Äquivalente des Saccharidbausteins **47** eingesetzt.

Die Abspaltung der Schutzgruppen wurde in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt. Zuerst wurde der Benzylester hydrogenolytisch mit H₂/Pd(C) gespalten. Dann wurden die Acetyl-Schutzgruppen bei pH 11 mit Natriummethanolat in Methanol umgeestert. Nach 24 h zeigte die analytische HPLC nur noch ein Produkt, und nach Aufarbeitung und semipräparativer HPLC wurde das Glycopeptid **100** isoliert. Statt der erwarteten vollständig deblockierten Verbindung **99**, von der massenspektrometrisch nur Spuren nachgewiesen werden konnten, blieb beim erhaltenen (2→3)-Sialyl-T-Antigen-Derivat **100** die 4-O-Position der zweiten Galactoseeinheit acetyliert. Da die analytische HPLC bei der Umesterung bei pH 11 schon geringe Mengen des Peptides ohne den Saccharidsubstituenten detektierte, wurde in Anbetracht der negativen Ergebnisse bei dem Versuch der Darstellung des (2→6)-Sialyl-T-Analogons (Abb. 3-52, S. 74) auf eine Behandlung mit wäßriger NaOH-Lösung verzichtet und das Derivat **100** für NMR-spektroskopische Untersuchungen verwendet. Ausgehend von der Startbeladung des Harzes betrug die Gesamtausbeute 17 %.

3.3.10 Synthese des mit dem Disialyl-T-Antigen glycosylierten Undekapeptids

Da für die Glycopeptidsynthese nur 53 mg (26 μmol) des Disialyl-T-Antigen-Bausteins **56** zur Verfügung standen, kam eine automatisierte Festphasensynthese durch den Peptidsynthesizer nicht in Frage. Für die manuelle Festphasensynthese wurde mit Fmoc-Valin

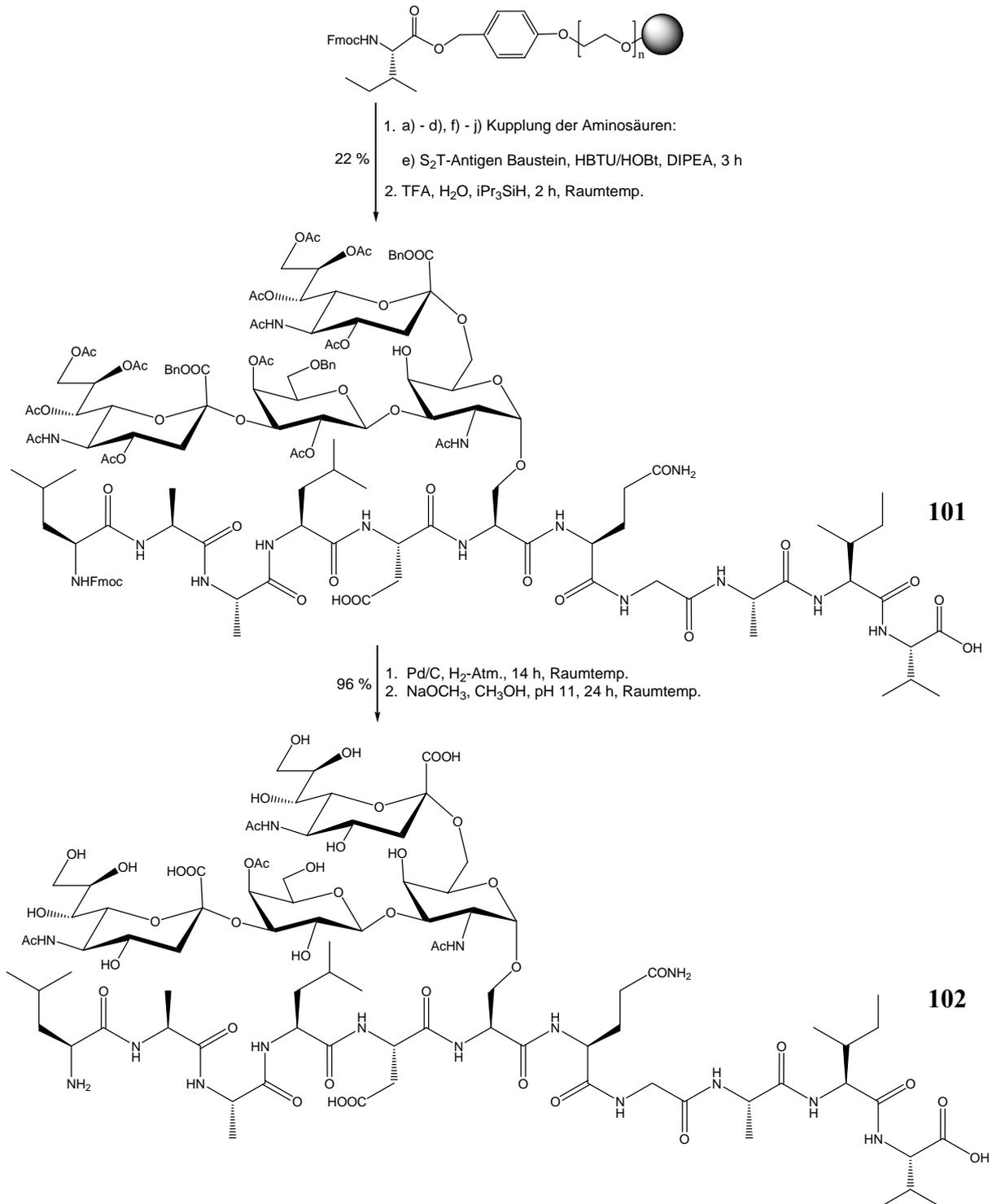


Abb. 3-55: Synthese des mit dem Disialyl-T-Antigen glycosylierten Undekapeptids **102**.

vorbeladenem Tentagel-PHB-Harz verwendet. Die geschützten Aminosäuren wurden sequentiell gekuppelt. Der Einbau des Saccharid-Bausteins **56** erfolgte durch Schütteln mit einer Lösung aus HBTU und HOBT, aktiviert mit DIPEA. Es wurden 0.52 Äquivalente¹¹⁸ im Vergleich zum Harz verwendet; die Kupplungszeit betrug drei Stunden (Abb. 3-55).

Das Glycopeptid **101** wurde mit TFA vom Harz abgespalten, und nach Reinigung durch semipräparative HPLC konnte es in 22 %-iger Ausbeute erhalten werden. Während die hydrogenolytische Spaltung der Benzylesterbindung kein Problem darstellte, gelang die vollständige Umesterung der Acetyl-Schutzgruppen unter Zemplén-Bedingungen trotz einer Erhöhung des pH-Wertes auf 11 nicht. Analog zur Synthese des (2→3)-Sialyl-T-Antigen-Derivats **100** blieb die 4-*O*-Position der zweiten Galactoseeinheit acetyliert. Unter Berücksichtigung der Erfahrungen mit dem (2→6)-Sialyl-T-Analogon (Abb. 3-52, S. 74) wurde auf eine Esterhydrolyse unter basischen, wäßrigen Bedingungen verzichtet. Nach Reinigung durch semipräparative HPLC wurde das mit dem Disialyl-T-Antigen glycosylierte Undekapeptid **102** in 96 %-iger Ausbeute isoliert. Die Gesamtausbeute, ausgehend vom eingesetzten Saccharidbaustein **56**, betrug 21 %.

¹¹⁸ Der Einsatz von <1 Äquivalent Saccharid-Baustein macht eine Reinigung durch präparative HPLC notwendig, ermöglicht aber auch quantitativ bessere Ausbeuten.

3.4 Systematische NMR-spektroskopische Untersuchungen der räumlichen Struktur der synthetisierten (Glyco-)Peptide

In der E-Cadherin-Domäne 1 ist die gesamte Oberfläche der Faltblätter C, F und G für die homophile Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich (Kapitel 1.4.1, S. 6). Dabei wird das HAV-Motiv durch das sich anschließende Sekundärstrukturelement eines β -Turns und die Einbettung in ein β -Faltblatt in einer bestimmten geometrischen Anordnung präsentiert. Aminosäurehomologien weisen darauf hin, daß im LI-Cadherin ähnliche Verhältnisse vorliegen könnten. Die in dieser Arbeit synthetisierten Partialsequenzen des LI-Cadherins enthalten das dem HAV-Motiv entsprechende AAL-Motiv, an das sich in C-terminaler Richtung typische Turn-Sequenzen (DSQG/SQGA) anschließen. Sollten sich diese strukturellen Analogien auch in räumlich analogen Strukturen bestätigen lassen, dann könnte das als notwendige Voraussetzung für eine ähnliche biologische Wirkung wie beim E-Cadherin bezüglich der Zelladhäsion und vielleicht auch der Zelldifferenzierung angesehen werden.

Die Röntgenstrukturanalyse ist eine der zwei wichtigen Möglichkeiten, die räumliche Struktur von Peptiden aufzuklären. Sie liefert die sichersten Aussagen über Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen. Allerdings ist die Kristallisation von Glycopeptiden erheblich schwieriger als die ohnehin nicht einfache Kristallisation von Proteinen, und die Tertiärstruktur von Proteinen in der Kristallpackung kann entscheidend von der nativen Form in Lösung abweichen.¹¹⁹ Somit scheidet diese Möglichkeit in den meisten Fällen aus. Als sinnvolle Alternative bleibt die NMR-Spektroskopie, mit der durch spezielle Experimente die räumliche Struktur von Peptiden und natürlich auch vielen anderen organischen Substanzklassen wie z.B. Nukleinsäuren, etc. aufgeklärt werden können.¹²⁰

Da bei der NMR-Spektroskopie die Verhältnisse in Lösung erfaßt werden, ist eine Messung der NMR-spektroskopischen Daten im Lösungsmittel Wasser naheliegend. Andererseits erlaubt insbesondere die Verwendung von deuteriertem DMSO die einfache Detektion von Amid-Protonen, was die Strukturaufklärung unterstützt.^{113,114} Der Vorzugskonfirmationen stabilisierende Einfluß von DMSO ist ein weiterer positiver Aspekt, und letztlich ist die sehr

¹¹⁹ H.-D. Jakubke, *Peptide*, Spektrum Akademischer Verlag, 1996.

¹²⁰ a) K. Wüthrich, „*NMR of Proteins and Nucleic Acids*“, Wiley, New York, 1986. b) K. Wüthrich, *Angewandte Chemie* 2003, 115 (29), 3462.

begrenzte Löslichkeit vieler Peptide in Wasser - gegenüber einer guten Löslichkeit in DMSO - ausschlaggebend für dessen Verwendung.

Zu Beginn einer konformationellen Analyse ist die eindeutige und möglichst vollständige Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffresonanzen erforderlich. Zu diesem Zweck wird neben eindimensionaler ^1H - und ^{13}C -Spektroskopie die zweidimensionale, homonukleare COSY-(*Correlated Spectroscopy*) NMR-Spektroskopie eingesetzt. Hierdurch sind alle Protonen eines Spinsystems über skalare Kopplungen (über die Bindungen) miteinander korreliert. Man erhält so im Spektrum für jeden Aminosäurerest ein charakteristisches Signalmuster, das dem Spinsystem dieser Aminosäure entspricht. Zuordnungsprobleme, die durch Signalüberlagerungen hervorgerufen werden, können durch Anwendung heteronuklearer, zweidimensionaler Korrelationsmethoden gelöst werden, da die Verschiebungsinformationen bei diesen Experimenten auf das größere spektrale Fenster der Heterokerne verteilt werden. Besonders leistungsfähige Techniken stellen hierbei das HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) und das HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) sowie deren empfindlichere gradientengestützte Varianten dar. So werden im ^1H - ^{15}N -HSQC die chemischen Verschiebungen der Stickstoffatome mit den daran gebundenen Wasserstoffatomen verknüpft, wohingegen im ^1H - ^{13}C -HMQC bzw. -HSQC jedes Proton mit dem direkt koppelnden Kohlenstoffatom korreliert wird. In Kombination mit einem HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), das heteronukleare Weitbereichskopplungen über zwei und drei Bindungen nachweist, können so sämtliche Kohlenstoffresonanzen zugeordnet werden.

In der NMR-Spektroskopie finden vornehmlich zwei Experimente Anwendung, die es ermöglichen, Information über den Abstand zwischen zwei Kernen zu erhalten: NOESY (*Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*) und ROESY (*Rotating Frame Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*).^{121,122} Beide Experimente basieren auf der Tatsache, daß sowohl bei NOEs als auch bei ROEs Relaxationseffekte zu einem Transfer der Magnetisierung durch dipolare Kopplung über den Raum von Kernen führen, welche bis zu 5 Å voneinander entfernt sein können. Im NOESY-Spektrum resultieren die Cross Peaks aus der Cross-Relaxierung der longitudinalen Magnetisierung, während die Cross Peaks des ROESY-Spektrums durch die Cross-Relaxierung der transversalen Magnetisierung generiert

¹²¹ H. Kessler, S. Seip; NMR of Peptides - in: *Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists* (Eds.: W.R. Croasmun, R.M.K. Carlson) VCH Publishers, New York, 1994, 619- 654.

¹²² D. Neuhaus, M. P. Williamson, „*The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*“, VCH Publishers, New York, 1989.

werden. In beiden Experimenten ist die Cross Peak-Intensität A direkt proportional zur Cross-Relaxierungsgeschwindigkeit und steht somit in folgender Weise mit dem Abstand der beiden Kerne in Relation:

$$A_{NOE/ROE} \sim \frac{1}{r_{ij}^6}$$

Häufig läßt sich nicht entscheiden, welches der beiden Experimente zum Erfolg bzw. zu besseren Ergebnissen führt. Obwohl aus beiden Experimenten Distanzinformationen hervorgehen, gibt es dennoch einige wichtige Unterschiede in ihrer Anwendung und auch in der Evaluierung der aus ihnen resultierenden Spektren. Das NOESY-Experiment eignet sich für kleine Moleküle mit positiven NOEs oder aber für große Moleküle mit stark negativen NOEs. Bei mittelgroßen Molekülen werden oftmals nur kleine oder nahezu keine NOEs beobachtet.¹²⁰ In diesen Fällen eignet sich das ROESY-Experiment, welches von solchen Einflüssen unabhängig ist. Beide Experimente haben Vor- und Nachteile, die hier nicht weiter erläutert werden sollen, aber natürlich bei der jeweiligen Interpretation berücksichtigt werden müssen. Bei allen in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden sowohl NOESY- als auch ROESY-Spektren gemessen. Es erwies sich mal das eine und mal das andere Experiment als aussagekräftiger. Die aus NOESY- und ROESY-Spektren entnommenen Informationen ermöglichen so eine Sequenzierung. Hierbei geht man in der Regel von isolierten, d.h. nur einmal in der Sequenz vorkommenden Aminosäuren aus, die als hilfreiche Startpunkte fungieren.¹²³

Abweichungen der chemischen Verschiebungen (*chemical shift deviation*, CSD) der α -Protonen bzw. α -Kohlenstoffatome eines Peptids oder Proteins von den für Aminosäuren in einem völlig unstrukturierten Peptid (*random coil*) ermittelten Werten geben oft wertvolle Anhaltspunkte für Sekundärstrukturelemente (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Chemische Verschiebungen der α -Protonen von Aminosäuren in *random coil* Strukturen.¹²⁴

Aminosäure	Ala	Asp	Gly	Ile	Leu	Pro	Gln	Ser	Val
δ (ppm) \pm 0.10	4.35	4.76	3.97	3.95	4.17	4.44	4.37	4.50	3.95

¹²³ J. N. S. Evans, *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, **1995**.

¹²⁴ D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647.

So weichen etwa die α -Protonenverschiebungen der zwanzig natürlichen Aminosäuren im Mittel um etwa -0.39 ppm relativ zum *random coil*-Wert (Hochfeldverschiebung) ab, wenn sich ein Rest in einer helikalen Domäne befindet. Für eine Aminosäure in einer β -Faltblatt Konformation hingegen differieren die Verschiebungen durchschnittlich um $+0.37$ ppm (Tieffeldverschiebung).^{124,125,126} Dabei liegt ein Hinweis auf eine definierte Sekundärstruktur nur dann vor, wenn drei (β -Faltblatt) bzw. vier (α -Helix) aufeinanderfolgende Aminosäuren die gleichen CSD-Tendenzen aufweisen. Die Verschiebungstendenzen für ^{13}C -Kerne sind denen der α -Protonen entgegengesetzt, so daß α -Kohlenstoffatome eine Tieffeldverschiebung innerhalb einer helikalen und eine Hochfeldverschiebung in einer ausgestreckten Konformation erfahren. Zur Bestimmung der CSD-Werte ($\Delta\delta_{\text{H}\alpha}$ bzw. $C\alpha = \delta_{\text{beob.}} - \delta_{\text{random coil}}$) wurden die chemischen Verschiebungen der in Tab. 3-1 genannten *random coil*-Aminosäuren verwendet.¹²⁴

In Peptiden und besonders in Proteinen werden verschiedene Arten von Sekundärstrukturelementen gefunden. Die wichtigsten von ihnen sind α -Helix, β -Faltblatt und sogenannte β -Turns (Abb. 3-57). Die Positionen eines Turn werden vom *N*- zum *C*-Terminus durchnummeriert (Abb. 3-56). Beziffert mit $i, \dots, i+3$ sind jeweils die α -C-Atome der Aminosäuren. Protonen sind hellgrau, C-Atome dunkelgrau dargestellt. Alle Substituenten der β -Atome sind der Übersicht halber unsichtbar.

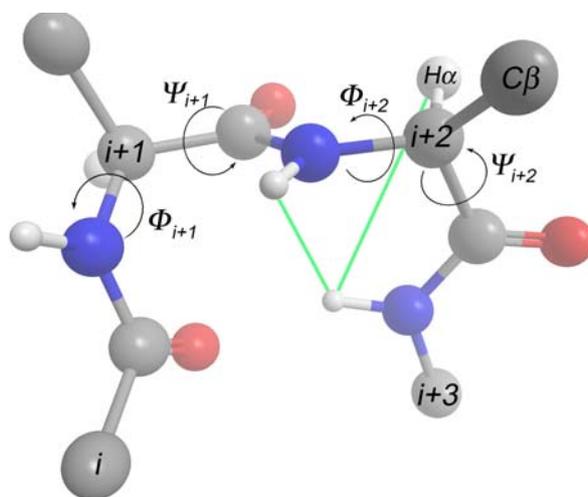


Abb. 3-56: Nomenklatur, Diederwinkel und Kontakte am Beispiel des β -Turn, Typ I.

Grüne Linien, Kontakt links = $d(\text{NH}^n / \text{NH}^{n+1})$, Kontakt rechts = $d(\alpha\text{-CH}^n / \text{NH}^{n+1})$. Φ , Ψ : Diederwinkel.

¹²⁵ D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, 222, 311–333.

¹²⁶ D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, 5, 67.

Alle diese Sekundärstrukturelemente zeichnen sich durch charakteristische Eigenschaften aus (Tab. 3-2), die mittels der NMR-Spektroskopie detektiert werden können.¹²⁷ Die in Tab. 3-2 angegebenen Abstände sind ideale, literaturbekannte Werte. Sie wurden für den Fall des β -Turns, basierend auf den im Programm *ChemDraw*⁶⁵ verankerten Daten, überarbeitet.

Tab. 3-2: Ideale Abstände (Å) und durchschnittliche Kopplungskonstanten (Hz) in Sekundärstrukturelementen. Die Bezugsatome sind in der linken Spalte in Klammern geschrieben. Der Index i definiert die Position eines Atoms im Motiv, der Index j den des gegenüberliegenden Atoms im anderen Strang (nur bei Faltblattstrukturen relevant).

Einheiten: d: Å, J: Hz	β -Turn, Typ I		β -Turn, Typ II		α -Helix	β -Faltblatt	β -Faltblatt
	n = i+1	n = i+2	n = i+1	n = i+2	n = i	antiparallel, n = i	parallel, n = i
d(α -CH ⁿ / NH ⁿ⁺¹)	3.5	3.2	2.1	3.2-3.3	3.5-3.6	2.1	2.1
d(α -CH ⁿ / NH ⁿ⁺²)	3.6-3.8		3.2-3.5		4.5-4.8		
d(α -CH ⁿ / NH ⁿ⁺³)	3.2-4.4		3.8-4.8		3.5-3.7		
d(α -CH ⁿ / NH ⁿ⁺⁴)					3.0-4.1		
d(NH ⁿ / NH ⁿ⁺¹)	2.6	2.4-2.5	4.5-4.6	2.5-2.6	2.7-2.8	4.4	4.3
d(NH ⁿ / NH ⁿ⁺²)	3.9-4.0		4.2-4.3		4.2		
d(β -CH _x ⁿ / NH ⁿ⁺¹)	2.9-4.3	3.6-4.6	3.6-4.6		2.5-4.0	3.2-4.4	3.7-4.6
d(α -CH ⁿ / β -CH _x ⁿ⁺¹)					2.6-4.4		
d(α -CH ⁱ / α -CH ^j)						2.3	4.7
d(α -CH ⁱ / NH ^j)						3.1	3.0
d(NH ⁱ / NH ^j)						3.3	3.9
³ J(α -CH / NH) [*]	4 (7)	9 (5)	4 (7)	5 (9)	4		

*Die in Klammern angegebenen Werte beziehen sich auf den β' -Typ

Neben räumlich eng benachbarten Protonen spielen Kopplungskonstanten und auch die chemische Verschiebung der Amidprotonen eine wesentliche Rolle. Kleine Kopplungskonstanten von 4-5 Hz weisen auf einen β -Turn hin. Im Fall eines β' -Turns liegen diese allerdings wieder mit 7-9 Hz im Bereich einer *random coil*-Struktur. Die chemische Verschiebung der Amidprotonen ist für das Auffinden von Wasserstoffbrücke relevant aber stark temperaturabhängig und pH Wert-abhängig. Allerdings ist der Austausch von in Wasserstoffbrücken gebundenen Protonen im allgemeinen zu schnell um in der NMR-Zeitskala tatsächlich gemessen zu werden.¹²⁰ Während die Positionen einer Turn-Struktur in den meisten Fällen durch Aminosäuren variabel besetzt werden können, ist im Fall des Typ II

¹²⁷ J. Rizzo, M. D. Bruch, *Structure Determination of Biological Macromolecules in NMR-Spectroscopy Techniques*, 2nd Edition, 1996, ed. M. D. Bruch.

β -Turns die Position $i+2$ Glycin vorbehalten, da eine sterische Hinderung zwischen dem Rest dieser Position mit dem Carbonyl-Sauerstoff der vorangehenden Position einen möglichst kleinen Substituenten begünstigt (Abb. 3-57 b).

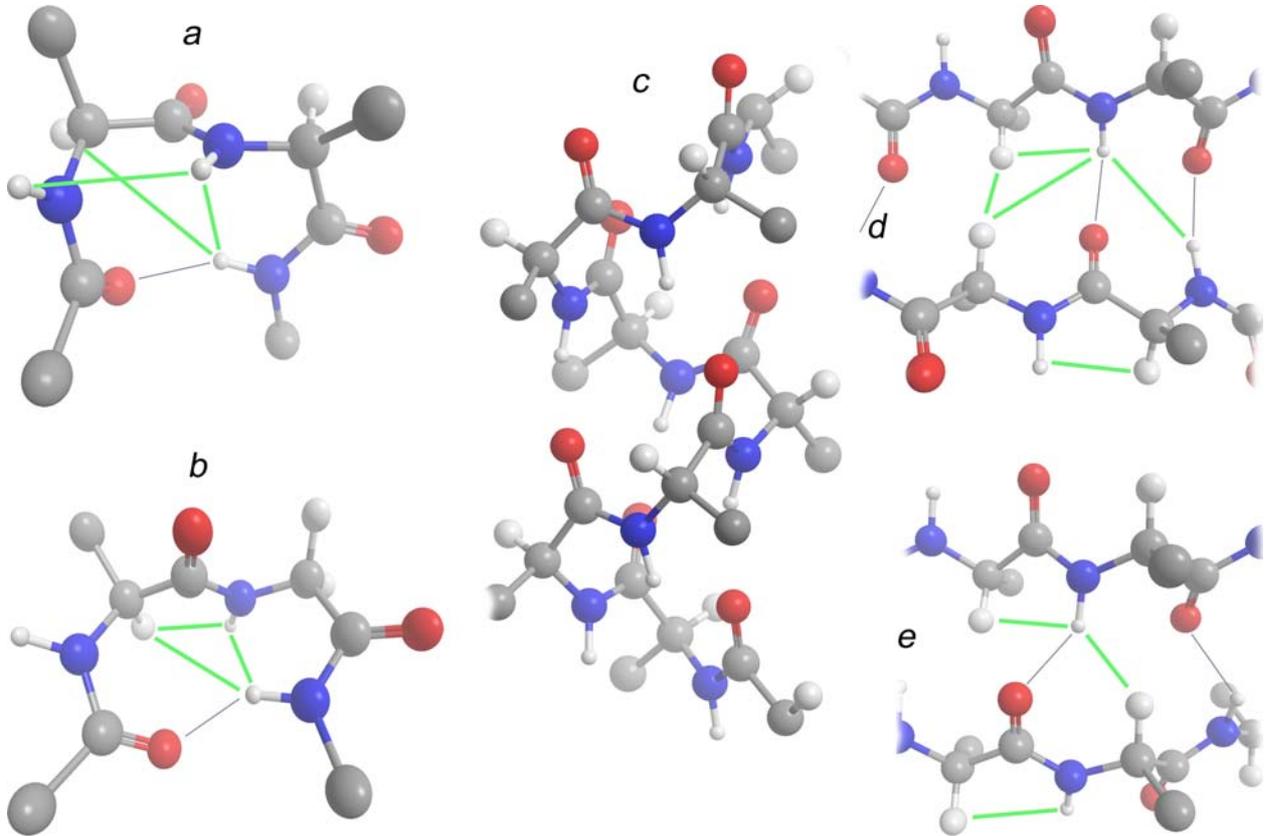


Abb. 3-57: Sekundärstrukturelemente

Graue Linien: Wasserstoffbrücken, grüne Linien: kurze Protonenabstände. Für die dargestellte α -Helix (c) sind weder Wasserstoffbrücken noch Protonenkontakte eingezeichnet.

a: β -Turn, Typ I; b: β -Turn, Typ II; c: α -Helix; d: β -Faltblatt, antiparallel; e: β -Faltblatt, parallel.

Wie bereits in Abb. 3-56 dargestellt, erfährt bei einem β -Turn die Peptidkette im Bereich von vier aufeinanderfolgenden Aminosäuren eine Richtungsänderung von 180 Grad. Ein solcher β -Turn wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Peptidgruppen der ersten (CO^i) und der vierten Aminosäure (NH^{i+3}) stabilisiert. Für die NMR-spektroskopische Identifizierung eines β -Turns sind die kurzen Abstände von α -CH zu Amidprotonen am charakteristischsten. Auch kurze Kontakte benachbarter Amidprotonen sind charakteristisch, sofern sie spektroskopisch getrennt werden können.¹²⁰ Die Identifizierung eines β -Turns wird dadurch erschwert, daß es nicht nur einen solchen β -Turn gibt, sondern mehrere (Tab. 3-3).

Nach der heute oft angewandten Klassifizierung von Richardson definieren die Diederwinkel

Tab. 3-3: Ideale Diederwinkel ausgewählter Turn-Motive.

Turn	Diederwinkel	Φ_{i+1}	Ψ_{i+1}	Φ_{i+2}	Ψ_{i+2}
β -Turn, Typ I		-60 °	-30 °	-90 °	0 °
β -Turn, Typ I'		60 °	30 °	90 °	0 °
β -Turn, Typ II		-60 °	120 °	80 °	0 °
β -Turn, Typ II'		60 °	-120 °	-80 °	0 °
β -Turn, Typ III		-58 °	-33 °	-64 °	-26 °
β -Turn, Typ III'		60 °	24 °	65 °	34 °
γ -Turn		70 °	-60 °	-	-
γ' -Turn		-70 °	60 °	-	-

der Aminosäurebausteine $i+1$ und $i+2$ verschiedene Typen von β -Turns.¹²⁸ Der Typ I β -Turn beziehungsweise Typ II β -Turn unterscheidet sich von dem Typ I' β -Turn bzw. Typ II' β -Turn nur durch die Vorzeichen der Diederwinkel. Die Interpretation wird dadurch erschwert, daß charakteristische Eigenschaften des β -Turns auch in anderen Strukturelementen vorkommen. So entsprechen z.B. die Abstandseigenschaften der Protonen denen der α -Helix. Der Typ III wiederum ist dem Typ I sehr ähnlich, die „krummen“ Diederwinkel erlauben eine Besetzung der Position $i+2$ auch durch sterisch anspruchsvollere Aminosäuren als Glycin. Der γ -Turn unterscheidet sich grundlegend vom β -Turn. Er wird nur aus drei Aminosäuren gebildet, in deren Schleifenkopf zentriert statt einer Peptidbindung die α -Gruppe der Aminosäure $i+1$ sitzt. Eine Wasserstoffbrücke zwischen Carbonyl- und Amid-Gruppe $i/i+2$ stabilisiert den Turn.

Abhängig von der Art der an einem Turn beteiligten Aminosäuren weichen die Diederwinkel von den idealen Werten ab. Tab. 3-4 zeigt für die Sequenz Asp^{*i*}-Ser^{*i+1*}-Gln^{*i+2*}-Gly^{*i+3*} (DSQG) die Diederwinkel nach Energieminimierung (MM2). Die berechneten Winkel wurden auf ganze Zahlen gerundet, der RMS-Gradient betrug 0.1. In der rechten Spalte ist die Summe der

Tab. 3-4: Berechnete Diederwinkel der β -Turn-Motive der Sequenz DSQG durch Energieminimierung

Turn	Diederwinkel	Φ_{i+1}	Ψ_{i+1}	Φ_{i+2}	Ψ_{i+2}	Σ (Diff.)
β -Turn, Typ I		-59 °	-50 °	-80 °	30 °	61
β -Turn, Typ I'		42 °	63 °	79 °	7 °	69
β -Turn, Typ II		-55 °	92 °	79 °	-12 °	46
β -Turn, Typ II'		-36 °	-71 °	-77 °	-9 °	157

¹²⁸ J. S. Richardson, *Protein Chem.* **1981**, *34*, 167.

absoluten Abweichungen vom Idealwert aufgeführt. Für die Sequenz DSQG ähnelt der Typ II- β -Turn dem idealen Turn am meisten, gefolgt von Typ I und I' Motiven. Da der γ -Turn nur durch zwei Diederwinkel definiert wird und es mindestens drei sinnvolle Besetzungen für die Position $i+1$ gibt (Asp, Ser, Gln), wurde auf Modellrechnungen für diesen Typ verzichtet.

Auf den folgenden Seiten werden die NOE-Kontakte diskutiert, die für die Ausbildung einer dreidimensionalen Struktur von Relevanz waren. Die in den meisten Fällen auftretenden Kontakte innerhalb einer Aminosäure (z.B. CH- α -Valin zu CH₃- γ -Valin) wurden zwar detektiert, aber für Rechnungen nicht verwendet, da die maximal möglichen Abstände dieser Protonen innerhalb der zu erwartenden Grenzen eines NOE-Kontakts liegen. Da die chemischen Verschiebungen der NH-Protonen des Peptidrückrats bei vielen der Glycopeptide zusammenfallen, und somit bestenfalls zweideutige NOE-Kontakte lieferten, sind nur die eindeutig zugeordneten NH-NH-Kontakte aufgeführt.

Die Aminosäuren der folgenden Peptide sind vom *N*-Terminus beginnend durchnummeriert, von Leu¹ bis Val¹¹. Für das kürzere Nonapeptid **73** wurde eine Ausnahme gemacht; um eine im Vergleich zu den anderen Glycopeptiden identische Bezeichnung zu verwenden, beginnt hier die *N*-acetylierte Aminosäure Alanin mit der Ziffer „2“ (Ala² bis Ile¹⁰).

3.4.1 Energieminimierte Struktur des Undekapeptids

Die durch NOESY- und ROESY-Experimente gemessenen NOE-Kontakte sind in Abb. 3-58 dargestellt. Die NH-Kontakte des Peptidrückrates der Sequenz Asp⁵-Ser⁶-Gln⁷ deuten auf die Bildung einer β -Turn-Struktur hin, die allerdings in Richtung des C-Terminus nicht fortgesetzt wird. Die raumübergreifenden Kontakte NH-Ala⁹ zu CH-Leu⁴ sowie α -CH-Gln⁷ zu α -CH-Val¹¹ weisen auf eine schleifenartige Struktur hin.

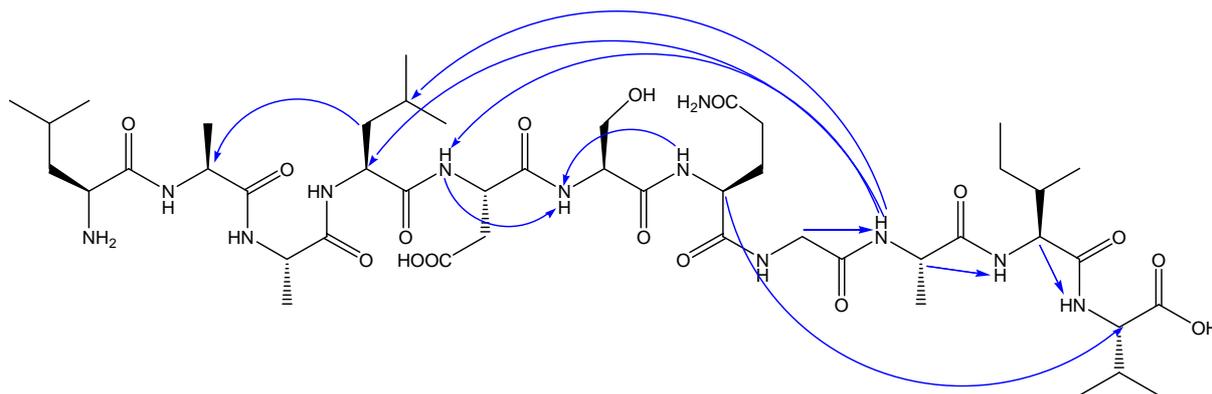


Abb. 3-58: NOE-Kontakte des Peptids **85**

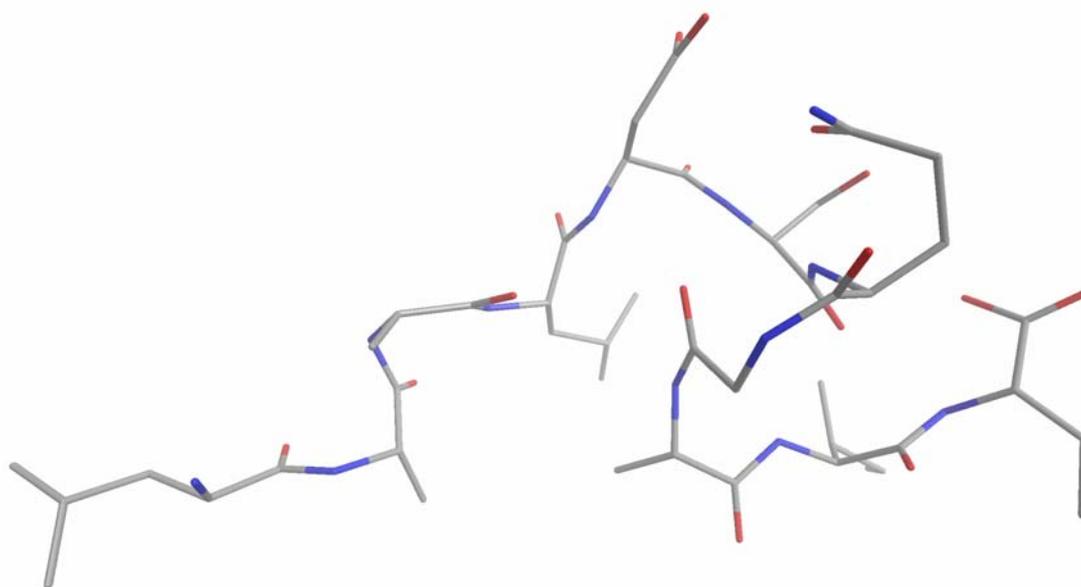


Abb. 3-59: Dreidimensionale Struktur des Peptids **85** nach Energieminimierung (MM2)

Grau: C, Rot: O, Blau: N. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

Basierend auf den NOE-Kontakten wurde durch Energieminimierung eine räumliche Struktur berechnet (Abb. 3-59, Abb. 3-60). Die Sequenz Asp⁵-Ser⁶-Gln⁷-Gly⁸ geht dabei von einem β -Turn ähnlichen in einen schleifenartigen *random coil-Bereich* über. Auch die Enden des

Peptids nehmen eine *random coil* Struktur ein. Der Turn wird zwar durch eine $i/i+3$ Wasserstoffbrücke stabilisiert ($i = \text{Asp}$), ist aber keinem der gängigen Typen zuweisbar, da der Schleifenkopf durch zwei statt einer Aminosäure gebildet wird. Entsprechend weisen auch die Diederwinkel ($\Phi_{i+1} = -168.7^\circ$, $\Psi_{i+1} = -19.2^\circ$, $\Phi_{i+2} = -152.9^\circ$, $\Psi_{i+2} = 59.5^\circ$) für einen β -Turn untypische Werte auf. Eine weitere Stabilisierung wird durch elektrostatische Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen der Seitenketten von Asp^4 und Gln^6 verursacht.

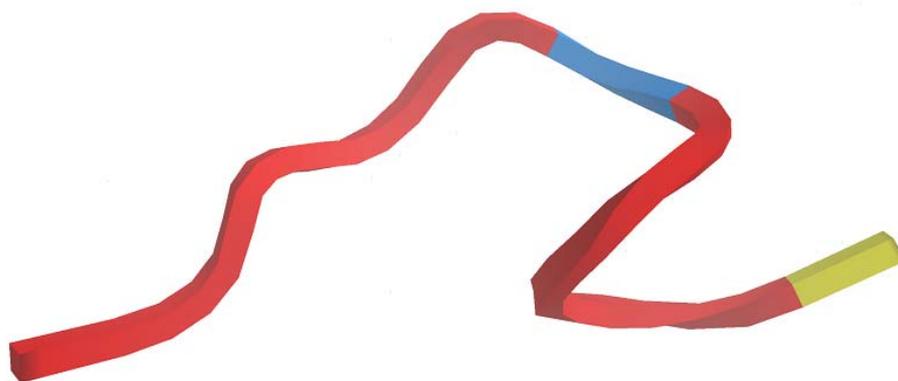


Abb. 3-60: Dreidimensionale Struktur des Peptidrückrats von Verbindung **85**
Markierungen: Blau: Ser(OH), Gelb: C-Terminus (Val)

3.4.2 Energieminimierte Struktur des mit dem T_N -Antigen glycosylierten Undeka- und Nonapeptids

Im Gegensatz zu den anderen diskutierten (Glyco-)Peptiden ist das Nonapeptid **73** *N*-terminal acetyliert und damit einer der Kräfte beraubt, die die Ausbildung einer Turnstruktur durch Ladungswechselwirkungen unterstützen. Trotzdem wurde durch NOESY- und ROESY-Experimente ein raumübergreifender schwacher $\delta\text{-CH}_3\text{-Leu}^4/\gamma\text{-CH}_2\text{-Ile}^{10}$ Kontakt und damit eine bevorzugte Sekundärstruktur beobachtet (Abb. 3-77).

NOE CH-Kontakte zwischen Serin⁶ und Glycin⁸ führen zwar zu einer Schleife im Peptidrückrat, allerdings ist diese zum C-Terminus verschoben, und die Sequenz L^4DSQ^7 liegt nahezu linear vor (Abb. 3-62, Abb. 3-63). Weder Turn-typische Wasserstoffbrücken ($i/i+2$ oder $i/i+3$) noch elektrostatische Wechselwirkungen (Seitenketten von Asp^5 zu Gln^7) sind zu beobachten. In diesem Fall unterstützt die Glycosylierung die Ausbildung eines Turn im besten Fall indirekt. Der Einfluß auf die Löslichkeit dagegen ist groß und erlaubte erst NMR-spektroskopische Untersuchungen.

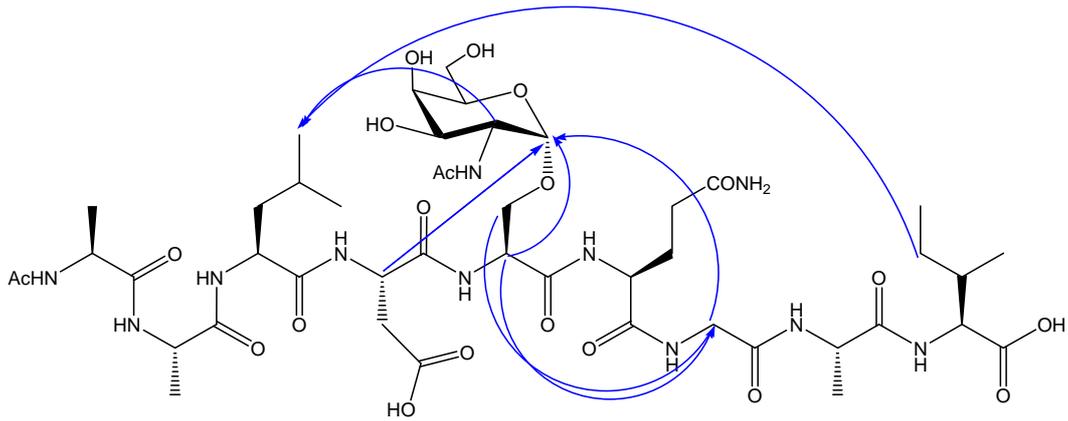


Abb. 3-61: NOE-Kontakte des Glycopeptids **73**.

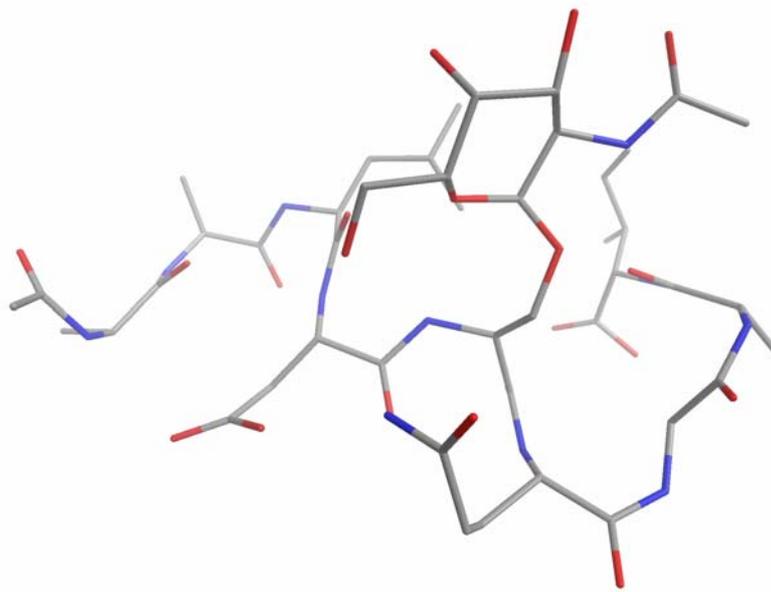


Abb. 3-62: Dreidimensionale Struktur des Glycopeptids **73** nach Energieminimierung (MM2)

Grau: C, Rot: O, Blau: N. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

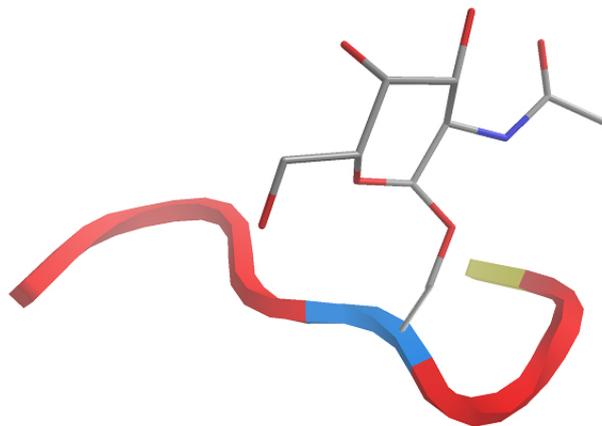


Abb. 3-63: Dreidimensionale Struktur des Peptidrückrats von Verbindung **73**

Markierungen: Blau: Ser(α -GalNAc), Gelb: C-Terminus (Ile)

Im T_N-Antigen-Undekapeptid **89** führt ein NH-Ser⁶/α-CH-Gly⁸ NOE-Kontakt zur Ausbildung eines Turns, der jedoch durch einen zweiten entgegengerichteten NH-Gly⁸/CH-Ile¹⁰-NOE-Kontakt einen schleifenartigen Charakter erhält (Abb. 3-64, Abb. 3-66). Raumübergreifende NOE-Kontakte von Leu⁴ zu Ile¹⁰ und Val¹¹ verursachen eine weitere Schleife. Die Faltung der N-terminalen Sequenz L¹AAL⁴, wie sie in Abb. 3-65 zu sehen ist, beruht auf elektrostatischen Effekten zwischen den terminalen Funktionalitäten.

Die Sequenz Leu⁴-Asp-Ser-Gln⁷ wird sowohl durch eine *i*/*i*+3 Wasserstoffbrücke (*i* = Leu) als auch durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten von Asp⁴ und Gln⁶ stabilisiert. Die Diederwinkel des β-Turns ($\Phi_{i+1} = 43.8^\circ$, $\Psi_{i+1} = 39.1^\circ$, $\Phi_{i+2} = 69.7^\circ$, $\Psi_{i+2} = 28.7^\circ$) weisen auf Typ I' oder Typ III' hin. Da in der Position *i*+2 nicht Glycin sitzt und zudem die Abweichungen von den idealen Diederwinkeln des Typ III' geringer sind, ist der Turn diesem Typ zuzuweisen. Die zweite, sehr enge Schleife aus Gln⁷-Gly⁸ wird durch eine in *cis*-Konformation vorliegende Peptidbindung verursacht.

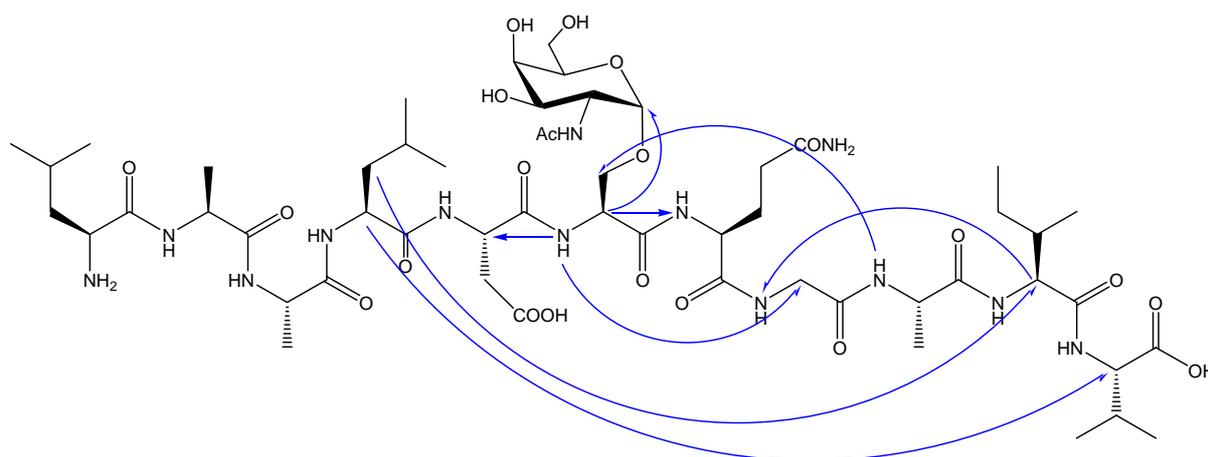


Abb. 3-64: NOE-Kontakte des Glycopeptids **89**.

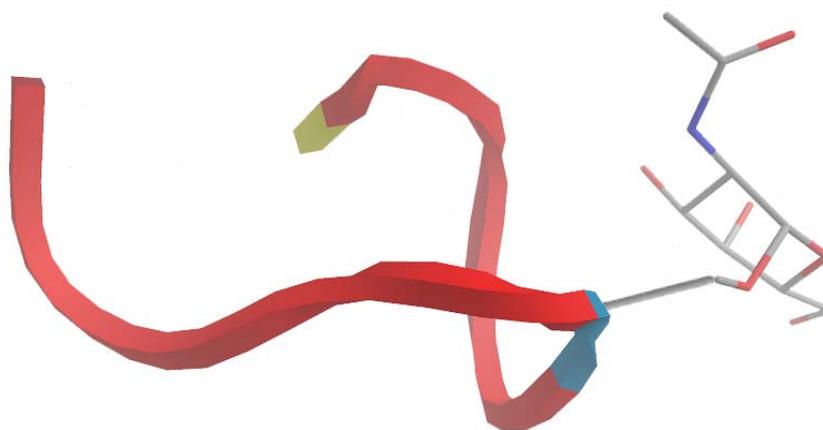


Abb. 3-65: Dreidimensionale Struktur des Peptidrückrats von Verbindung **89**.

Markierungen: Blau: Ser(α-GalNAc), Gelb: C-Terminus (Val)

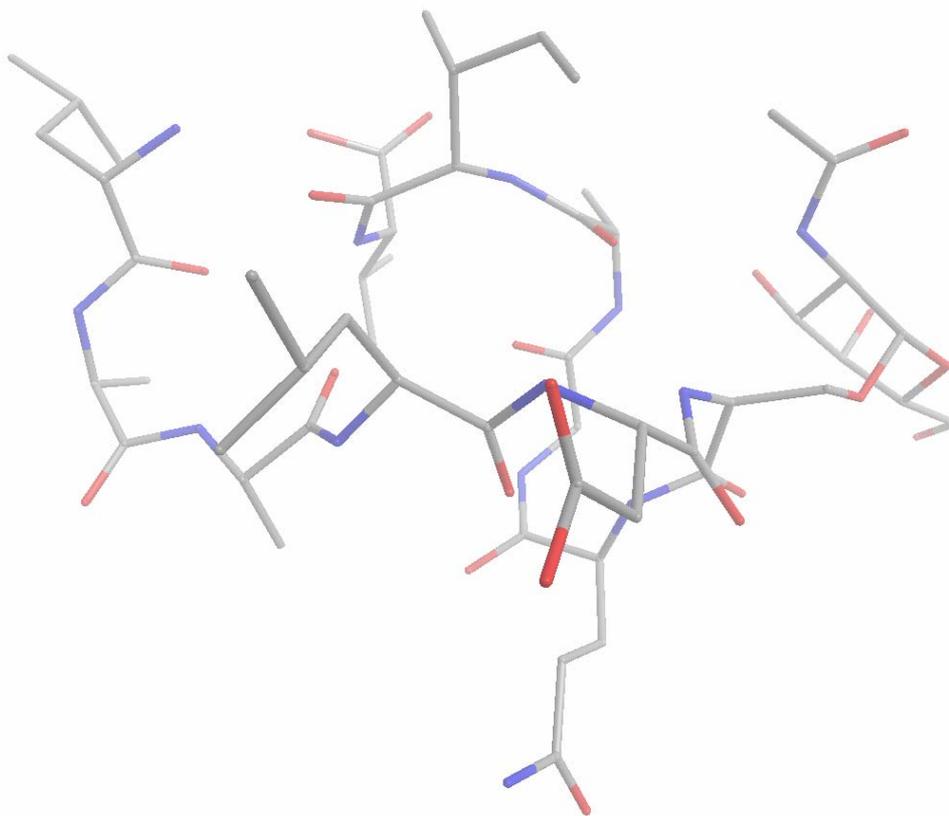


Abb. 3-66: Dreidimensionale Struktur des Glycopeptids **89** nach Energieminimierung (MM2).
Grau: C, Rot: O, Blau: N. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

Während der Unterschied des Undekapeptids **89** zum um zwei Aminosäuren kürzeren Nonapeptid **73** offensichtlich ist, besteht zum Peptid **85** im zentralen Bereich um Serin eine auffallende Ähnlichkeit der Faltungsmuster (Abb. 3-67), auch wenn die Atome der Seitenketten der beiden Verbindungen um bis zu 0,4 nm verschoben sind. Die terminalen Aminosäuren sind in dieser Abbildung nicht dargestellt, zur besseren Anschaulichkeit sind die beiden Glycopeptide nach Art der Aminosäuren gefärbt. Links kann man in Schwarz das T_N -Antigen erkennen; der Platz den die Galactosamin-Gruppe einnimmt ist auch im Peptid **85** durch keine Seitenkette belegt, so daß das Peptidrückrat nicht notwendigerweise eine andere Konformation einnehmen muß. Die Induktion eines Turns durch das T_N -Antigen scheint daher weniger durch sterische Einflüsse verursacht. Die rechts in der Abbildung zu sehende Erkennungssequenz AAL ist in beiden Fällen exponiert und gut zugänglich.

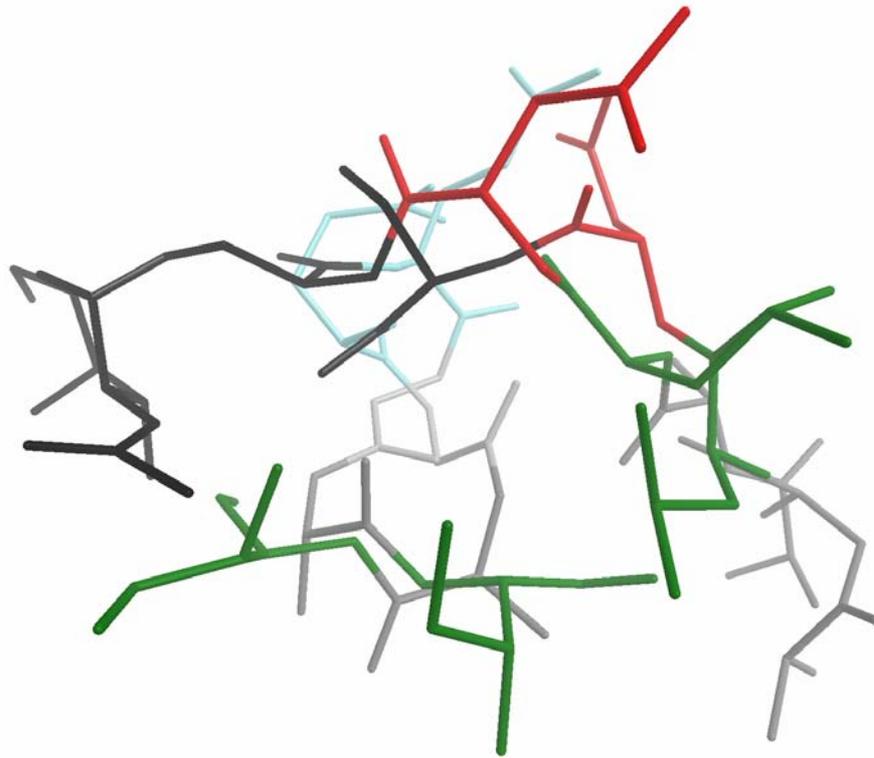


Abb. 3-67: Überlagerung des Peptids **85** und des Glycopeptids **89**.
Grau: Gly, Ala; Schwarz: Ser; Blau: Gln; Rot: Asp; Grün: Ile, Leu.

3.4.3 Energieminimierte Struktur des T-Antigen-Undekapeptids

NOESY- und ROESY-Spektren der Verbindung **92** zeigen CH-Kontakte von Leu⁴ zu Ile¹⁰, sowie CH-Kontakte zu NH-Protonen von Val¹¹ (Abb. 3-68). Da die Acetylgruppe des Galactosamin-Restes nur *N*-terminal ausgehend von Ser⁶ zum Peptidrückgrat NOE-Kontakte aufweist, liegt das Disaccharid nicht zentriert über dem Turn-Bereich, sondern ragt nach außen (Abb. 3-69, Abb. 3-70). Die Sequenz L¹AAL⁴ nimmt in der energieminimierten Struktur eine gestreckte Konformation ein und ist zur Turn-Ebene hin stark abgewinkelt. Die Sekundärstruktur ist vom unglycosylierten Peptid **85** (Struktur S. 89) deutlich verschieden, und ausgehend vom Turn ist die *C*-terminale Struktur der eines idealen β -Faltblattes sehr ähnlich.

Die energieminimierte Struktur der Sequenz Asp⁵-Ser-Gln-Gly⁸ entspricht nicht exakt einem Typ II β -Turn, wobei die Abweichungen von den idealen Diederwinkeln mit Ausnahme von Φ_{i+1} sind jedoch recht gering ($\Phi_{i+1} = -19.3^\circ$, $\Psi_{i+1} = 121.9^\circ$, $\Phi_{i+2} = 66.2^\circ$, $\Psi_{i+2} = -5.3^\circ$). Der Turn wird durch die zu erwartende *i/i+3* Wasserstoffbrücke (*i* = Asp⁵) stabilisiert.

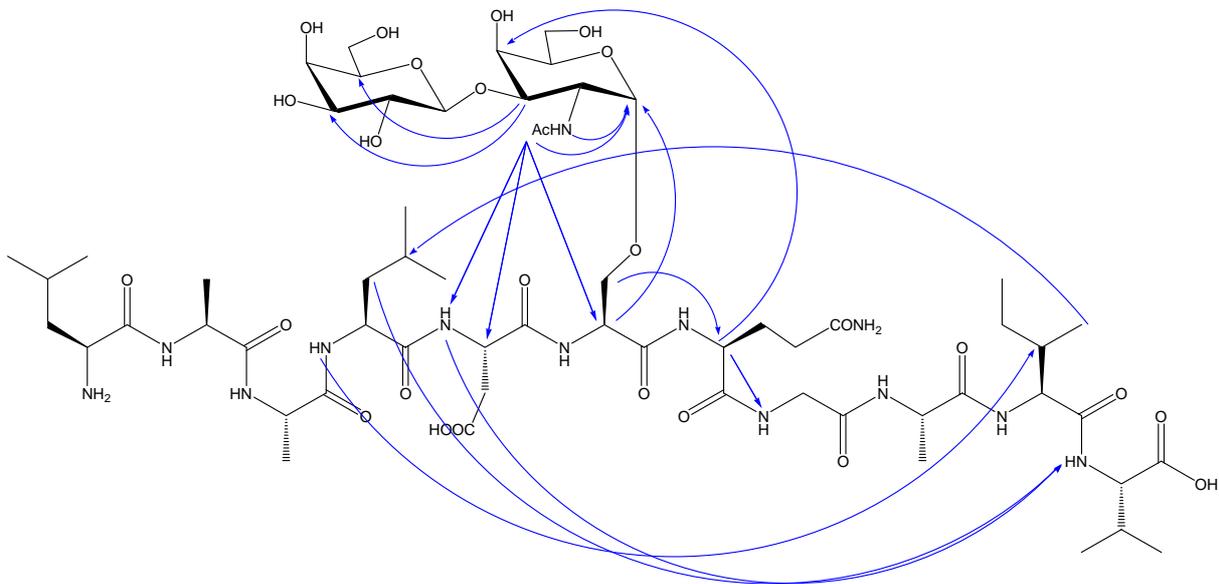


Abb. 3-68: NOE-Kontakte des Glycopeptids **92**.

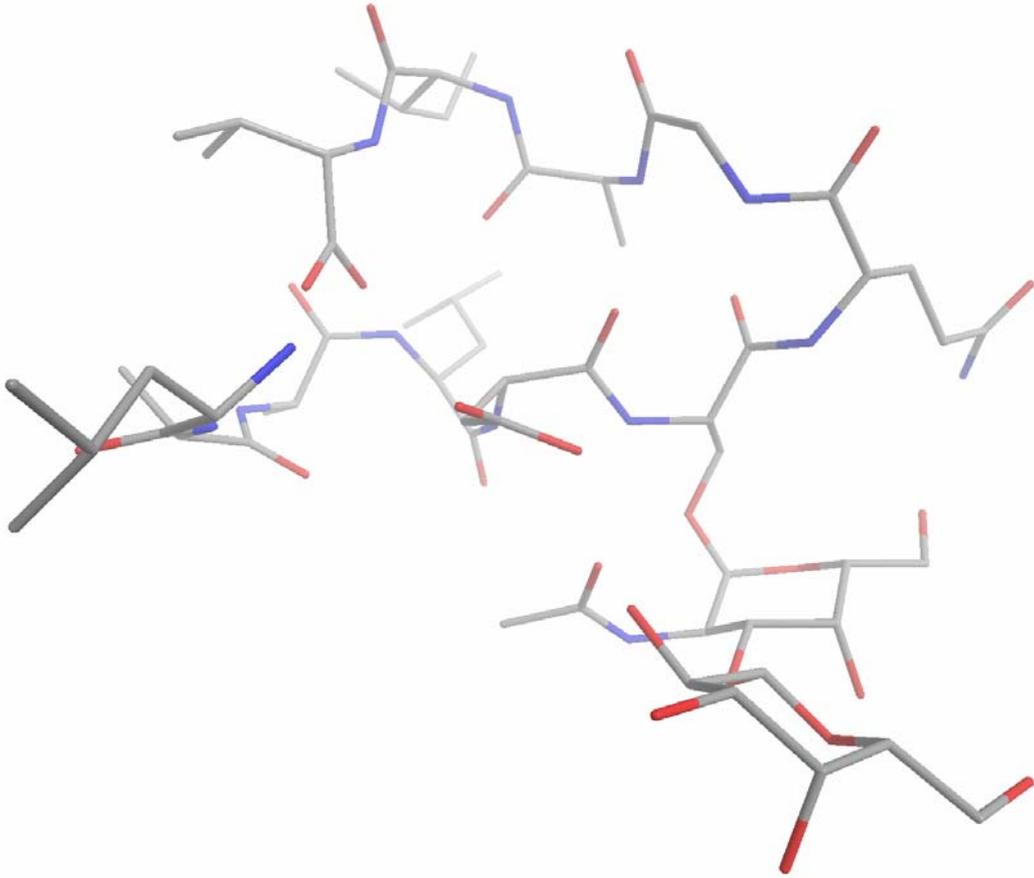


Abb. 3-69: Dreidimensionale Struktur des Glycopeptids **92** nach Energieminimierung (MM2).
Grau: C, Rot: O, Blau: N. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

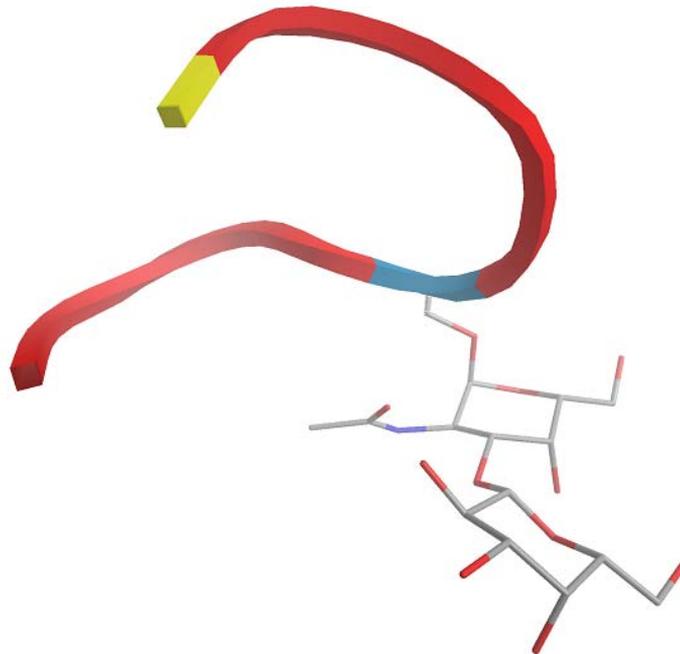


Abb. 3-70: Dreidimensionale Struktur des Peptidrückrats von Verbindung **92**.
Markierungen: Blau: Ser(β -Gal-(1 \rightarrow 3))- α -GalNAc, Gelb: C-Terminus (Val).

3.4.4 Energieminimierte Struktur des (2→6)-Sialyl-T_N-Antigen-Undekapeptids

Obwohl mittels NMR-Spektroskopie sämtliche Protonen des Undekapeptids **94** eindeutig zugewiesen werden konnte, und auch die Signalintensität gut bis sehr gut war, lieferten NOESY- und ROESY-Spektren nur relativ wenige deutliche Signale. Die daraus resultierenden NOE-Kontakte sind in Abb. 3-71 dargestellt. Zwei Kontakte beeinflussen die Sekundärstruktur der Verbindung maßgeblich: ein raumübergreifender Kontakt zwischen α -CH-Leu⁴ und γ -CH₃-Ile¹⁰ sowie ein Kontakt zwischen γ -CH₃-Ile¹⁰ und α -CH-Gln⁷. Daraus resultiert eine doppelte Schleife, wie sie auch schon im T_N-glycosylierten Undekapeptid **89** beobachtet worden war (Abb. 3-64, Abb. 3-66, S. 93). Weitere, für die Sekundärstruktur der Verbindung **94** nicht relevante Kontakte des Saccharids waren nur zwischen den Protonen des T-Antigens selbst zu beobachten.

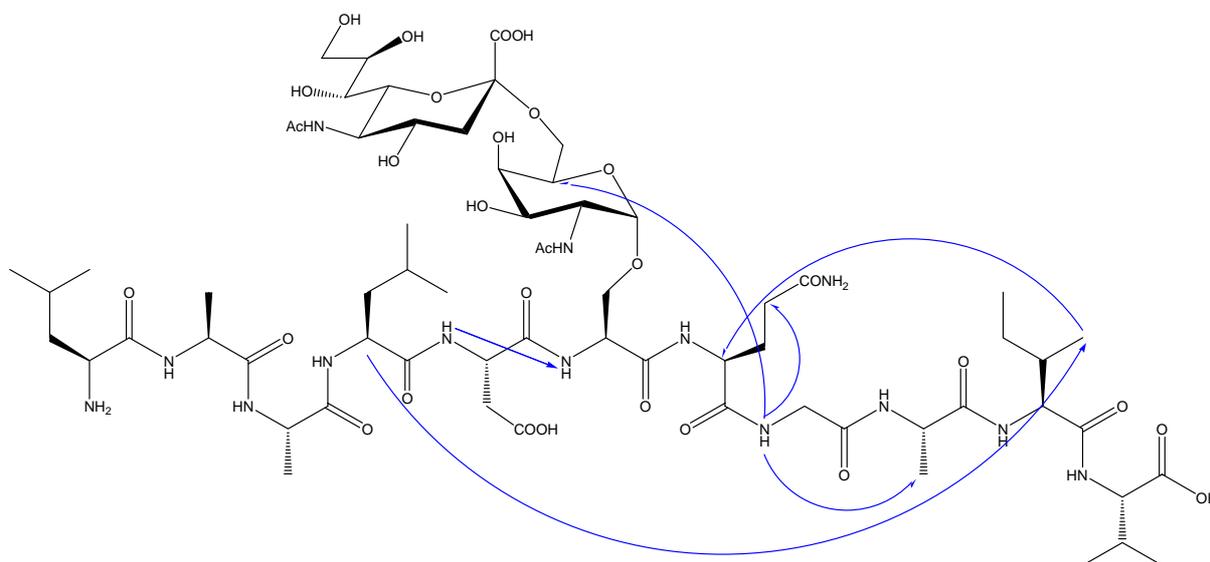


Abb. 3-71: NOE-Kontakte des Glycopeptids **94**.

Die Aminosäuren Gln⁷-Gly⁸-Ala⁹ nehmen in der energieminimierten Struktur die Konformation einer α -Helix ein (Abb. 3-72, Abb. 3-73). Der Turn selbst wird durch die Sequenz Asp⁵-Ser⁶-Gln⁷ gebildet, und entspricht vom Typ einem γ -Turn ($\Phi_{i+1} = 77.1^\circ$, $\Psi_{i+1} = -63.0^\circ$). Er wird sowohl durch die erwartete $i/i+2$ Wasserstoffbrücke ($i = \text{Asp}^5$) als auch durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten von Asp⁵ und Gln⁷ stabilisiert.

Eine Überlagerung der Strukturen vom mit dem T_N-Antigen glycosylierten Undekapeptid **89** und dem T-Antigen glycosylierten Undekapeptid **94** ist in Abb. 3-74 dargestellt. Die terminalen Aminosäuren sind nicht sichtbar, ebenso die Saccharidreste, wodurch Ser⁶ (in Schwarz) als Glycin erscheint, da die β -CH₂-Gruppe nicht angezeigt wird. Links unten ist in

Grün Ile¹⁰ zu sehen, der *N*-Terminus liegt direkt hinter Asp⁵ (rot) und zeigt in den Hintergrund (in Grau). Der maximale Abstand der Atome voneinander liegt in den Seitenketten bei ca. 0.3 nm. Im Peptidrückrat beträgt er ungefähr 0.2 nm. Eines der Differenz-Maxima liegt bei dem glycosylierten Ser⁶, was im Fall der Verbindung **94** C-terminal zur Ausbildung einer α -Helix führt, wogegen Verbindung **89** in dieser Region noch als *random coil* vorliegt. Die Abweichungen beider Strukturen sind, von den Diederwinkeln abgesehen, relativ gering.

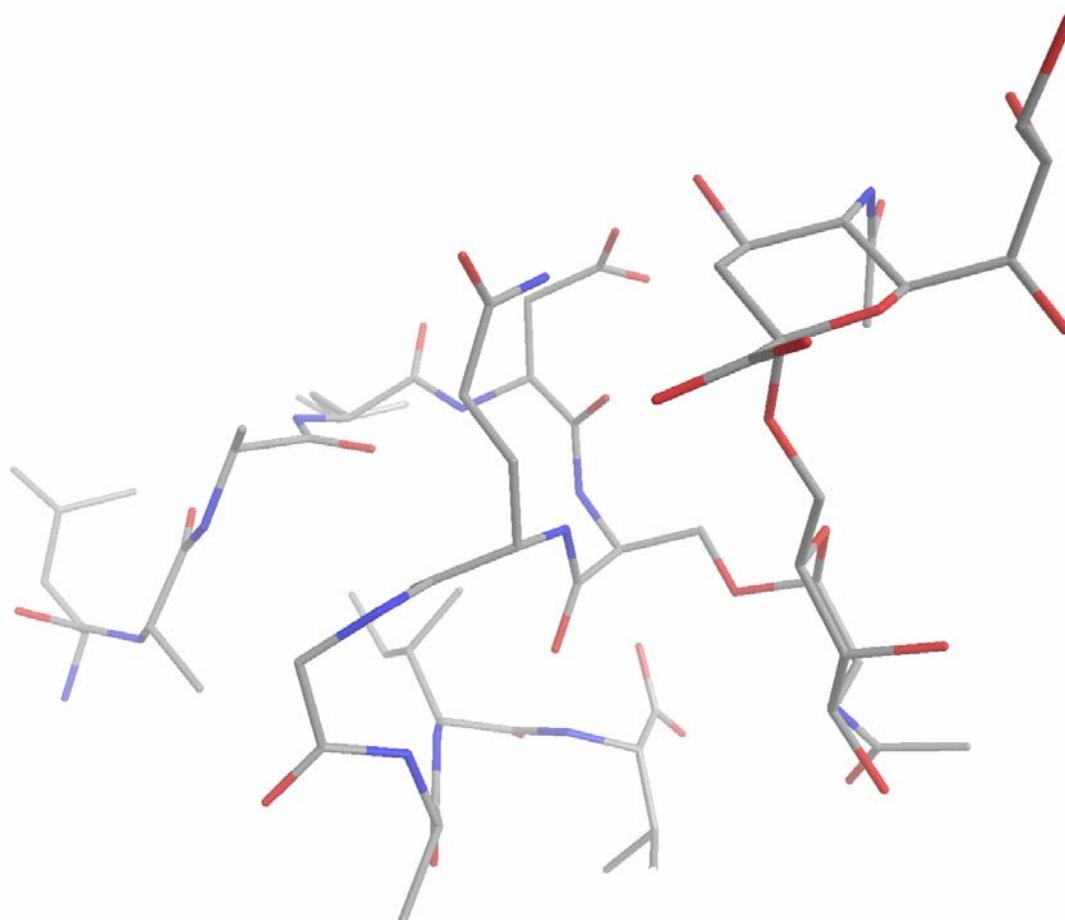


Abb. 3-72: Dreidimensionale Struktur des Glycopeptids **94** nach Energieminimierung (MM2).

Grau: C, Rot: O, Blau: N. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

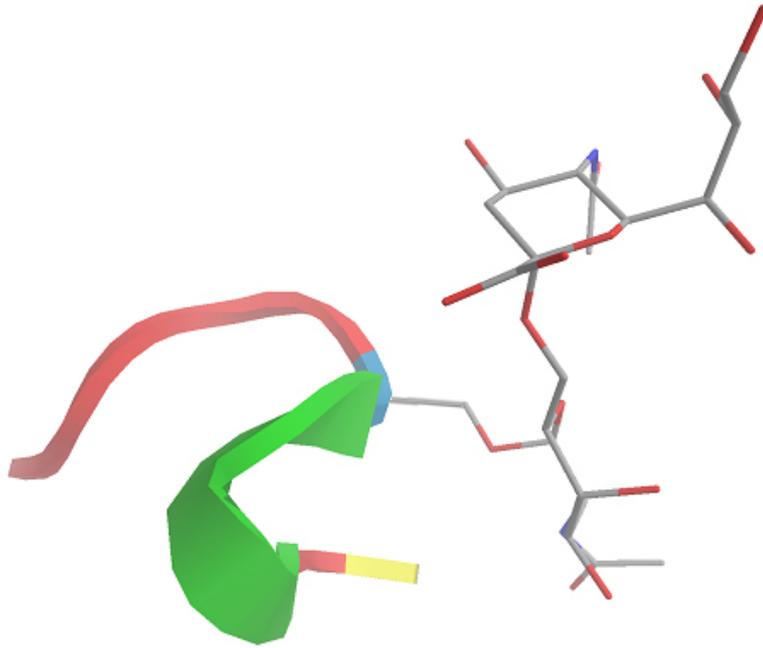


Abb. 3-73: Dreidimensionale Struktur des Peptidrückrats von Verbindung **94**.
Markierungen: Blau: Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α -Ac₂GalNAc), Gelb: C-Terminus (Val)

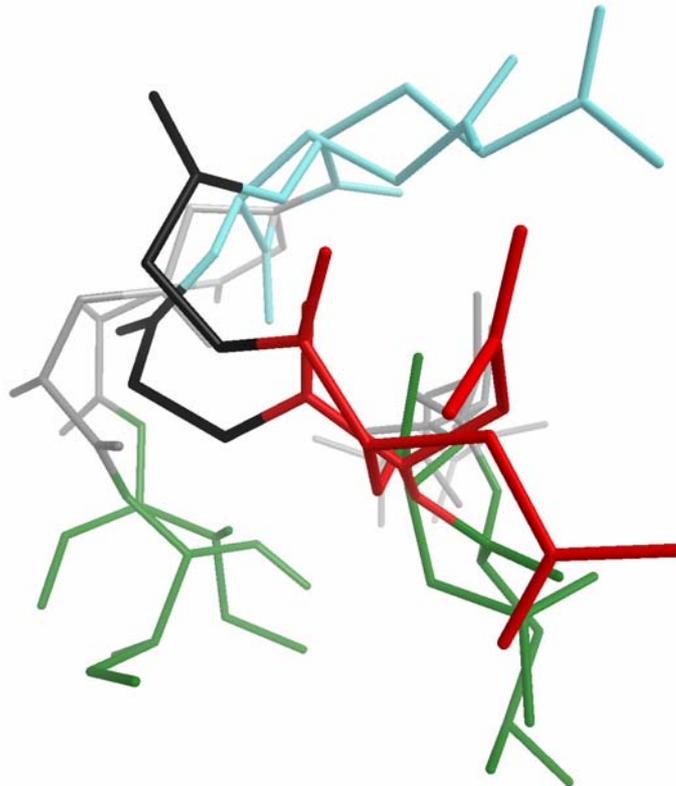


Abb. 3-74: Überlagerung von Glycopeptid **94** und Glycopeptid **89**.
Grau: Gly, Ala; Schwarz: Ser; Blau: Gln; Rot: Asp; Grün: Ile, Leu.

3.4.5 Energieminimierte Struktur des (2→6)-Sialyl-T-Antigen-Undekapeptids

Die aus NOESY- und ROESY-Spektren gewonnenen NOE-Kontakte für das Glycopeptid **96** ließen für die Aminosäuren Alanin drei unterschiedliche sinnvolle Anordnungen zu (Abb. 3-75). In Blau sind die eindeutig zugewiesenen Kontakte zu sehen, in Rot die für die Aminosäure Alanin. Die Bezifferung in römischen Ziffern zählt die chemische Verschiebung für das α -Proton vom tiefen zum hohen Feld durch. Die in der Abb. 3-75 gewählte Anordnung (A I = Ala², A II = Ala⁹, A III = Ala³) stellt die korrekteste der drei möglichen Anordnungen dar, die für alle der gemessenen NOE-Kontakte sinnvolle Abstände lieferte. Der Weg dahin ist für das gleiche Problem in Kapitel 3.4.6 (S. 103) dargestellt, da sich dort aufgrund mangelnder NOE-Kontakte die richtige Zuordnung als weit schwieriger erwies. Die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Leu⁴ und Ile¹⁰ führen zu einer gebogenen Sekundärstruktur, und die NOE-Kontakte zwischen der Seitenkette von α -CH-Gln⁷ und Ile¹⁰ führen zu einer zweiten, weniger stark ausgeprägten Schleife.

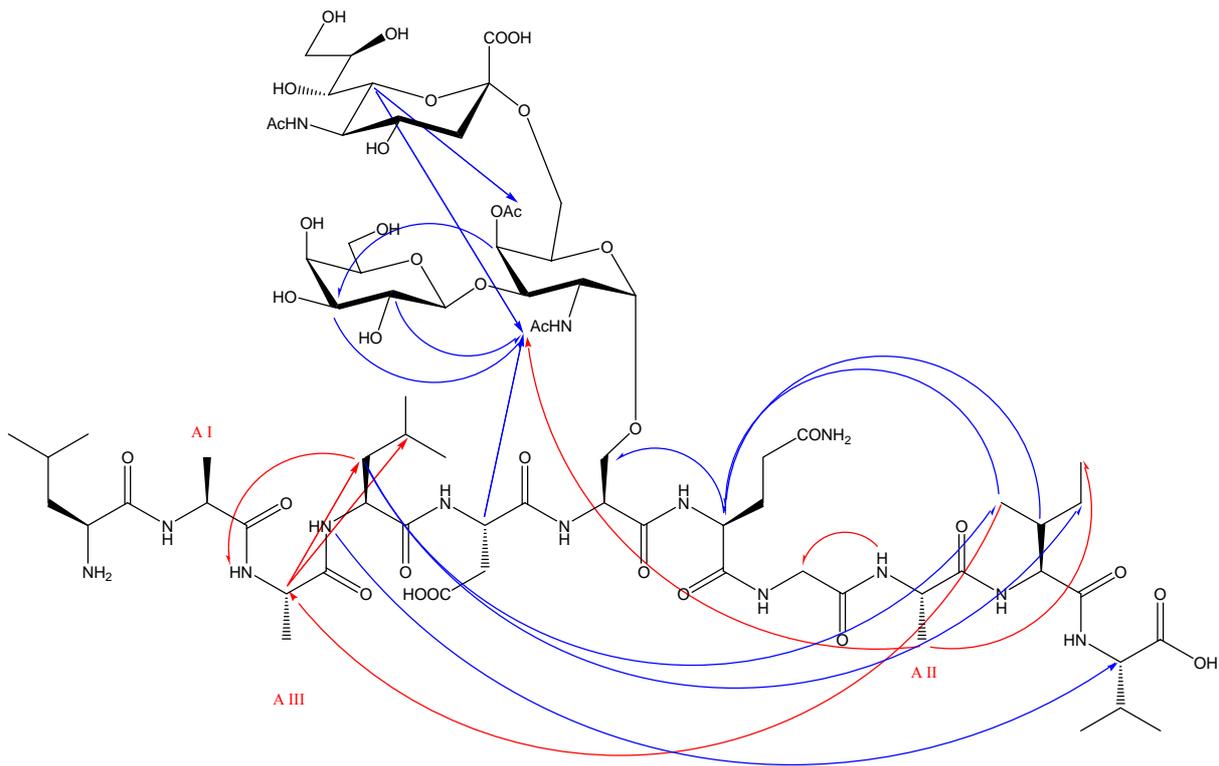


Abb. 3-75: NOE-Kontakte des Glycopeptids **96**.

Anders als im Fall des T_N-Antigen-Glycopeptids **89** ist die zentrale Schleife weniger stark ausgeprägt, und es resultiert eine aufgeweitete Turn-Struktur, deren beide Stränge weniger durch Wasserstoffbrücken als durch hydrophobe Wechselwirkungen der Seitenketten stabilisiert wird (Abb. 3-76, Abb. 3-77). Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten von Asp⁴ und Gln⁶ stabilisieren den Turn, dem kein spezieller Typ zuweisbar ist.

Die Diederwinkel ähneln am ehesten denen eines Typ I'- oder Typ III'-Turns, aber die Summe der absoluten Differenzen ist mit 165° bzw. 168° recht groß (die idealen Winkel sind zum Vergleich in eckigen Klammern angegeben; $\Phi_{i+1} = 160.4^\circ$ [60°], $\Psi_{i+1} = -2.9^\circ$ [30°], $\Phi_{i+2} = 59.0^\circ$ [90°], $\Psi_{i+2} = -0.7^\circ$ [0°]). Wasserstoffbrücken benachbarter Aminosäuren finden sich im Turn-Bereich (aber keine des Typs $i/i+3$), an denen auch die NH-Acetyl-Gruppe der zentralen Galactoseeinheit teilnimmt.

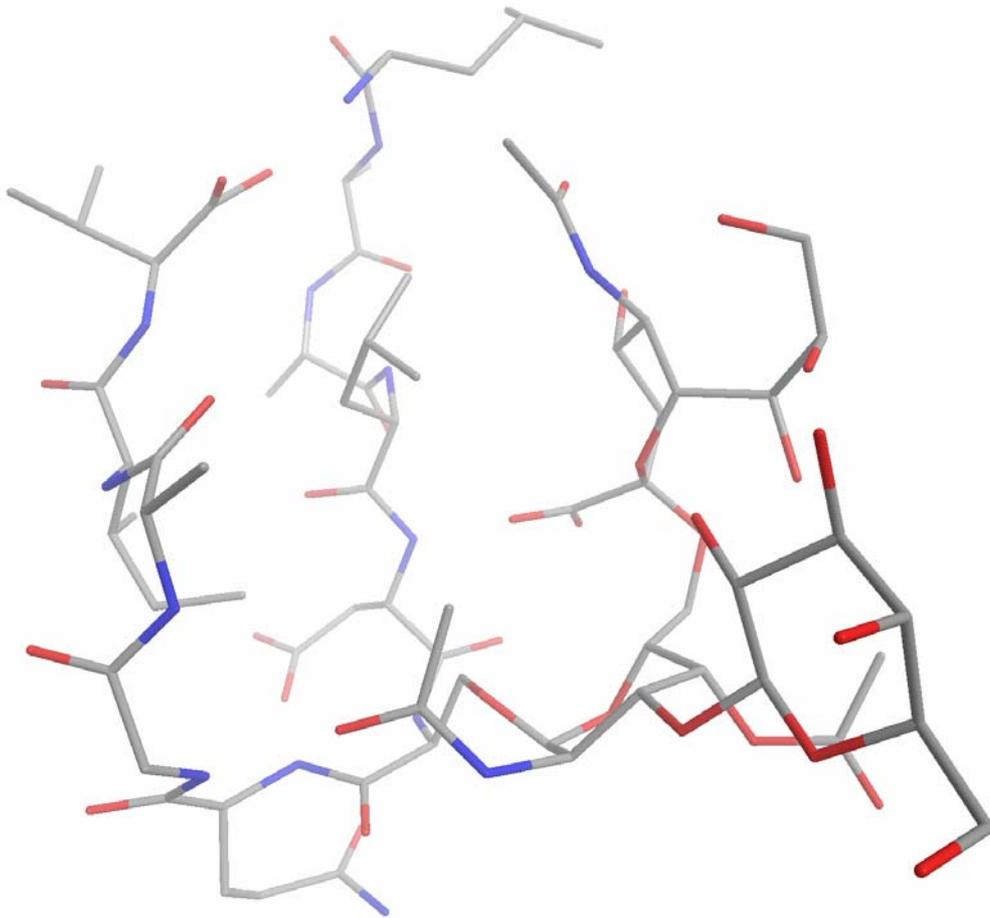


Abb. 3-76: Dreidimensionale Struktur des Glycopeptids **96** nach Energieminimierung (MM2).
Grau: C, Rot: O, Blau: N. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

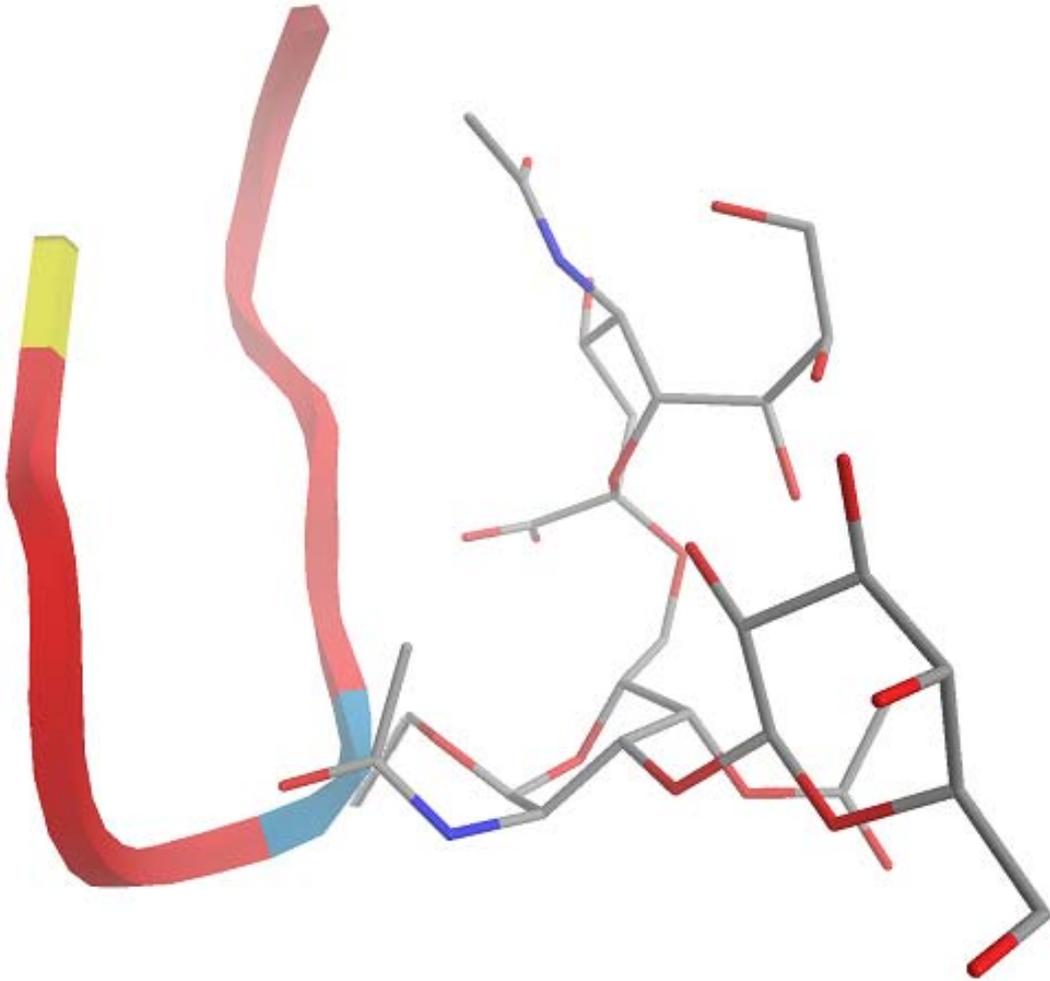


Abb. 3-77: Dreidimensionale Struktur des Peptidrückrats von Verbindung **96**.

Markierungen, blau: Ser($[\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{3})][\alpha\text{-Neu5NAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{6})-\alpha\text{-AcGalNAc}$), gelb: C-Terminus (Val).

3.4.6 Energieminimierte Struktur des (2→3)-Sialyl-T-Antigen-Undekapeptids

Die vom (2→3)-Sialyl-T-Antigen-Undekapeptid **100** aufgenommenen NOESY- und ROESY-Spektren waren bedingt durch die geringe verfügbare Substanzmenge intensitätsschwach. Entsprechend konnten nur wenige verwertbare NOE-Kontakte detektiert werden. Diese stammten zum Hauptteil von der dreifach vorhandenen Aminosäure Alanin (Abb. 3-78). Da auch keine eindeutigen NOE-Kontakte zu benachbarten Aminosäuren existierten, gibt es formal 9 Möglichkeiten, die drei Aminosäuren innerhalb der Peptidkette anzuordnen. Zwei der Alanine sind jedoch direkt nebeneinander angeordnet (Ala², Ala³), und der maximale Abstand ihrer β -CH₃ Protonen beträgt ca. 0.7 nm, der der α -CH-Protonen ungefähr 0.4 nm. Dadurch lassen sich während der Energieminimierung im Anfangsstadium die beiden Aminosäuren als eine einzige behandeln, und erst im späteren Stadium ist eine Unterscheidung notwendig. Numeriert man die α -CH Alanin Protonen mit lateinischen Zahlen anhand ihrer chemischen Verschiebung vom tiefen zum hohen Feld durch, lassen sich die Fälle „II, III - I“, „I, II - III“ und „I, III - II“ unterscheiden. Die durch das Komma getrennten Ziffern geben das Pärchen an, die rechte Ziffer das isolierte Alanin. Die in Abb. 3-78 aufgeführten Fälle stellen diesen Ansatz dar; in Grün sind die eindeutigen NOE-Kontakte eingezeichnet, blaue Kontakte stellen je zwei Möglichkeiten dar, gelbe vier. Die roten Doppelpfeile kennzeichnen die Möglichkeit, daß entweder die β -CH₃-Gruppen bzw. für den anderen Pfeil die α -CH-Protonen von Ala² oder Ala³ gemeint sind, stellen selber aber keine NOE-Kontakte zwischen Ala² und Ala³ dar.

Werden nun diese drei Möglichkeiten getrennt voneinander basierend auf den NOE-Kontakten mittels einer Energieminimierung durchgerechnet und unterscheidet man im letzten Stadium zwischen Ala² und Ala³, erhält man die in Abb. 3-79 dargestellten Strukturen mit eindeutiger Zuordnung der NOE-Kontakte (in Blau). Rot dargestellte Kontakte erwiesen sich insofern als falsch, als daß nach Energieminimierung der NOE-Abstand zu groß war (> 5 Å). Übrig blieb dadurch nur der Fall „I, III - II“, bei dem alle gemessenen NOE-Kontakte sich nach Energieminimierung auch im Modell noch wiederfanden.

Die Sekundärstruktur ist in Abb. 3-80 dargestellt. Die beiden Enden nehmen eine dem β -Faltblatt ähnliche, aber verdrehte Struktur ein, die durch Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Ketten stabilisiert wird. Die Lage des Saccharidrestes wird zum Teil durch die NOE-Kontakte bestimmt, die das Sialyl-T-Antigen zum C-Terminus hin ausrichten.

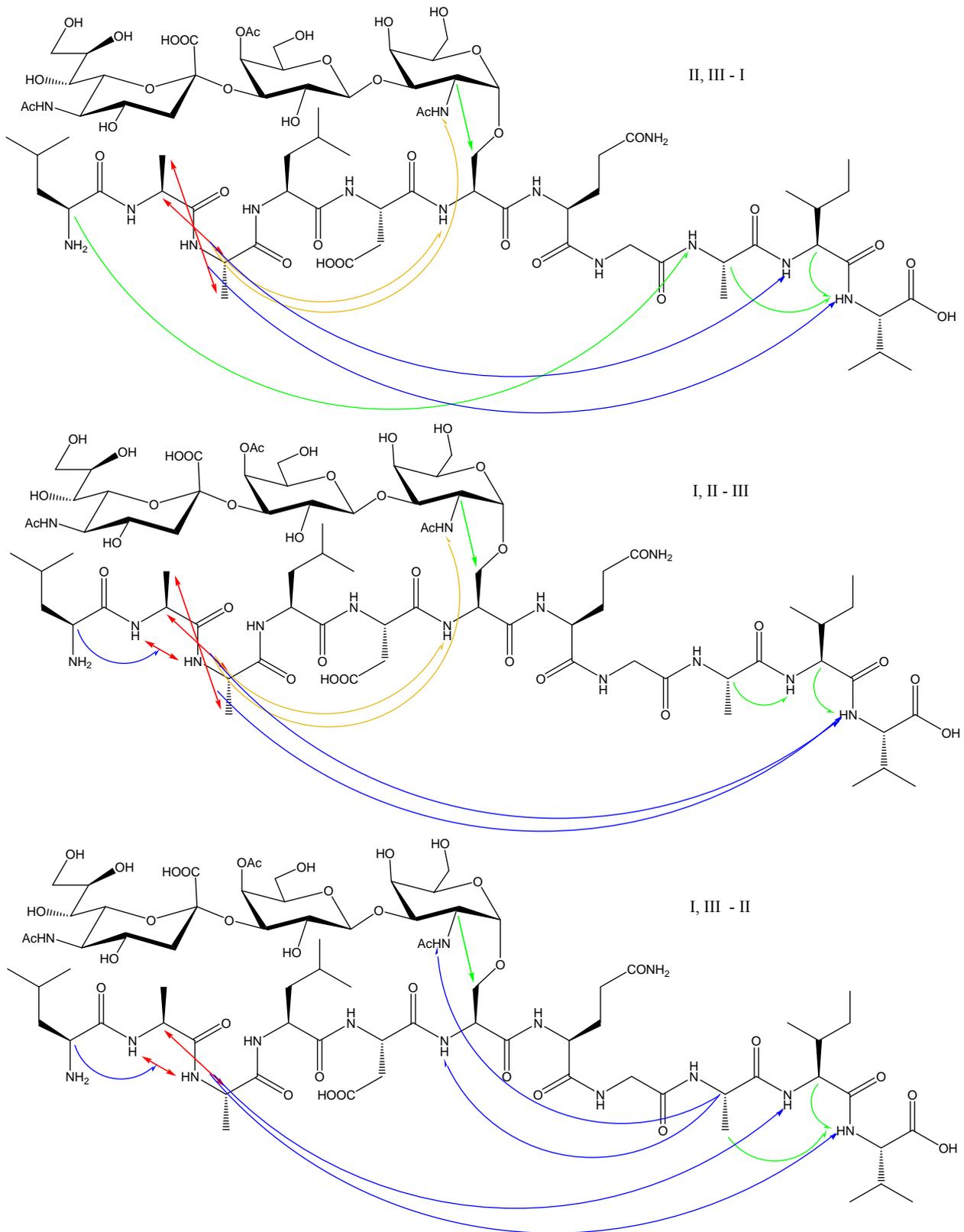


Abb. 3-78: Mögliche NOE-Kontakte des Glycopeptids 100.

Grün: Eindeutig, Blau: 2 Möglichkeiten, Gelb: 4 Möglichkeiten.

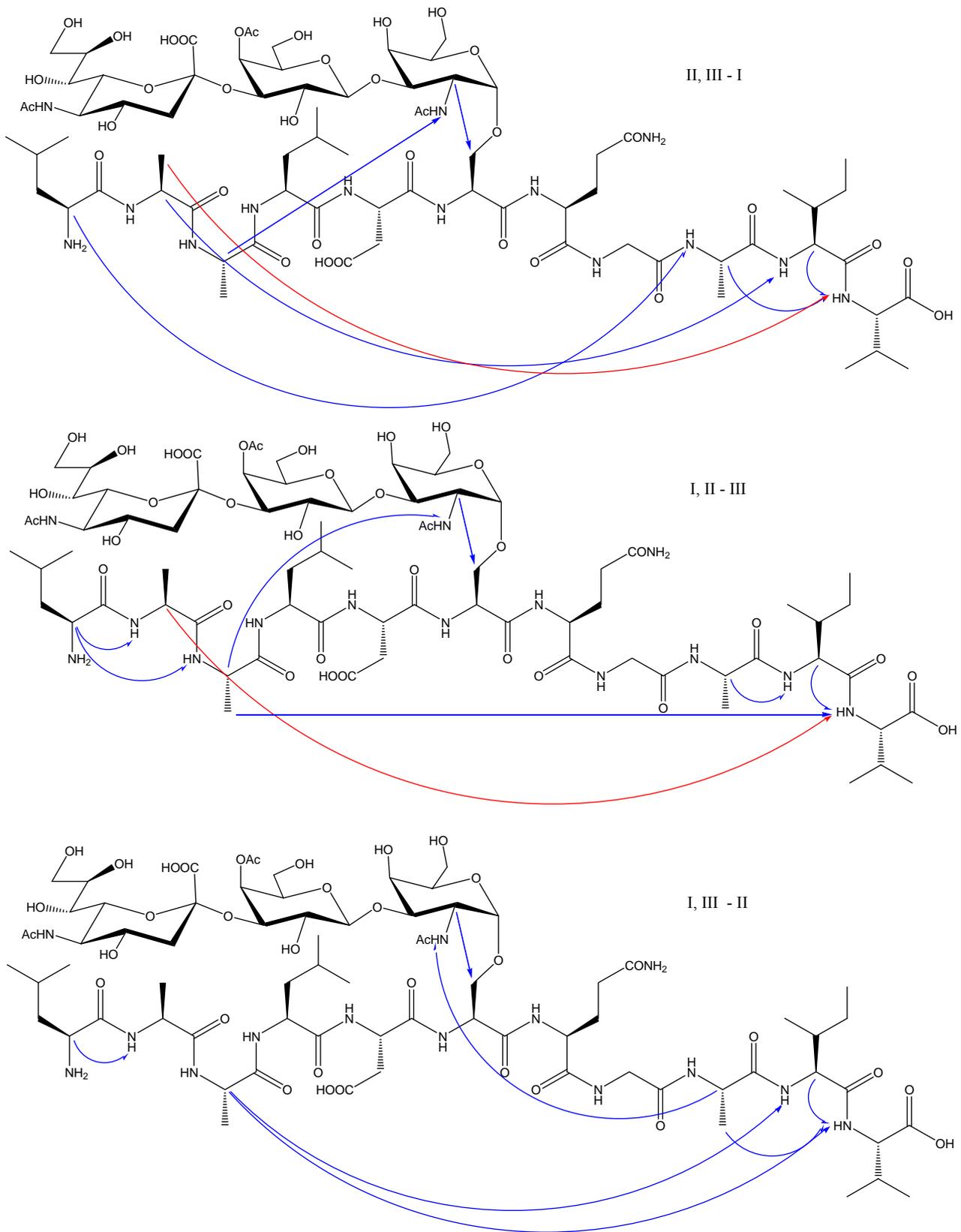


Abb. 3-79: Tatsächliche NOE-Kontakte des Glycopeptids **100** nach Energieminimierung.

Blau: kein Widerspruch; Rot: NOE-Kontakt zu lang.

Die Lage der Neuraminsäure wird durch die Energieminimierung bestimmt. Mit den gegebenen Parametern sind zahlreiche Anordnungen der Neuraminsäure mit ähnlichen Energieinhalten möglich. Der Turn-Bereich besteht tatsächlich aus einer Schleife mit einem anschließendem kurzen *random coil*-Motiv, *N*-terminal beginnend mit Leu⁵ bis Gly⁸. Die Sequenz dieser vier Aminosäuren, die auch keine Stabilisierung durch elektrostatische Wechselwirkungen erfährt, erlaubt keine Zuordnung zu einem bestimmten Schleifentyp. Anders verhält es sich mit der Sequenz Leu⁴-Asp-Ser⁶. Sie bildet einen γ -Turn, der im Fall „I, II - III“ am ausgeprägtesten ist ($\Phi_{i+1} = 84.1^\circ$, $\Psi_{i+1} = -49.3^\circ$). Die für einen γ -Turn notwendige *i*/*i*+2 Wasserstoffbrücke (*i* = Leu) ist in allen drei Fällen zu beobachten. Der Bereich um Gln⁷-Gly⁸ ist leicht gewinkelt, was in diesem Teil zu einer leichten Aufweitung der Struktur führt, was in Abb. 3-81 rechts unten als leichte Ausbeulung des Peptid-Rückrates zu erkennen ist.

Daß alle drei berechneten Strukturen - „II, III - I“, „I, II - III“ und „I, III - II“ - eine große Übereinstimmung haben, zeigt eine Überlagerung derselben (Abb. 3-82). Die Lage des Sialyl-T-Antigens ist der Übersicht halber nicht dargestellt, ist aber in allen drei Strukturen genauso wie das Peptidrückrat und die Seitenketten sehr ähnlich. Der lineare Charakter des Saccharidrestes scheint sich dabei auf das Peptidrückrat zu übertragen.

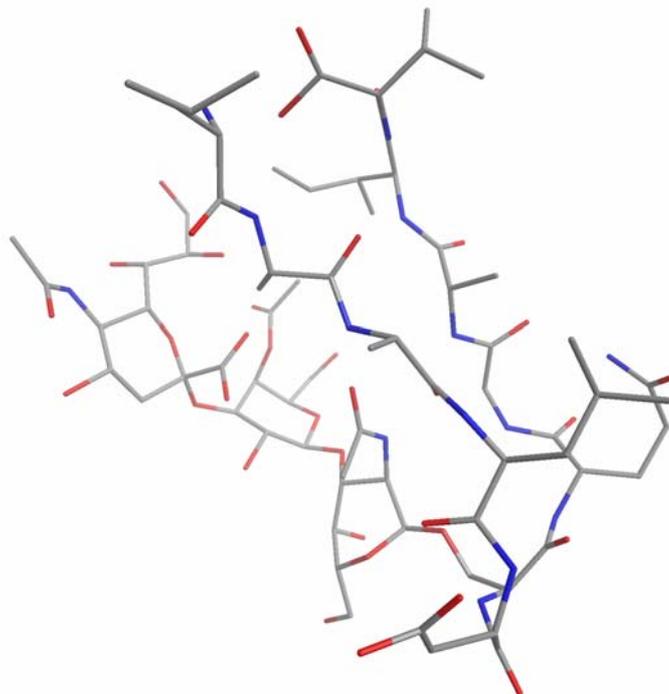


Abb. 3-80: Dreidimensionale Struktur des Glycopeptids **100** („I, III - II“) nach Energieminimierung (MM2).

Grau: C, Rot: O, Blau: N. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

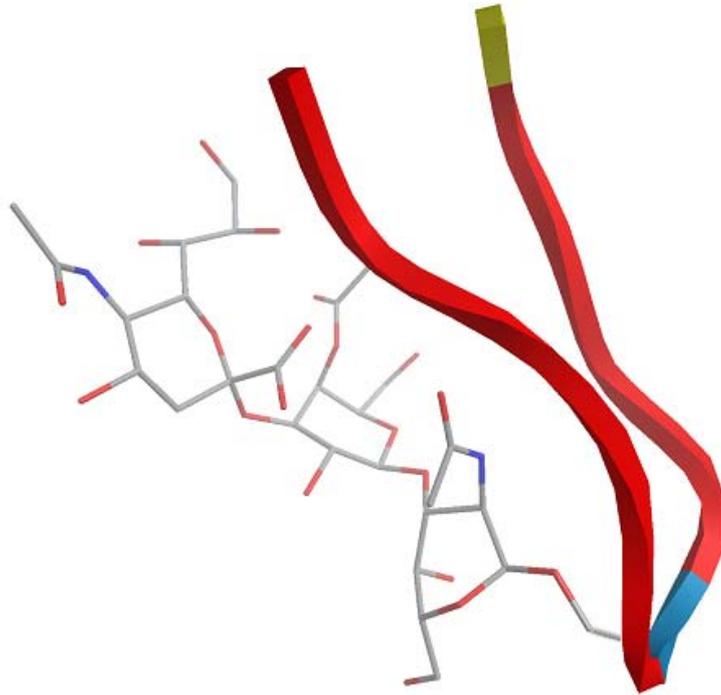


Abb. 3-81: Dreidimensionale Struktur des Peptidrückrats von Verbindung **100** („I, III - II^{cc}“).
Markierungen, blau: (2→3)-Sialyl-T-Antigen, gelb: C-Terminus (Val).

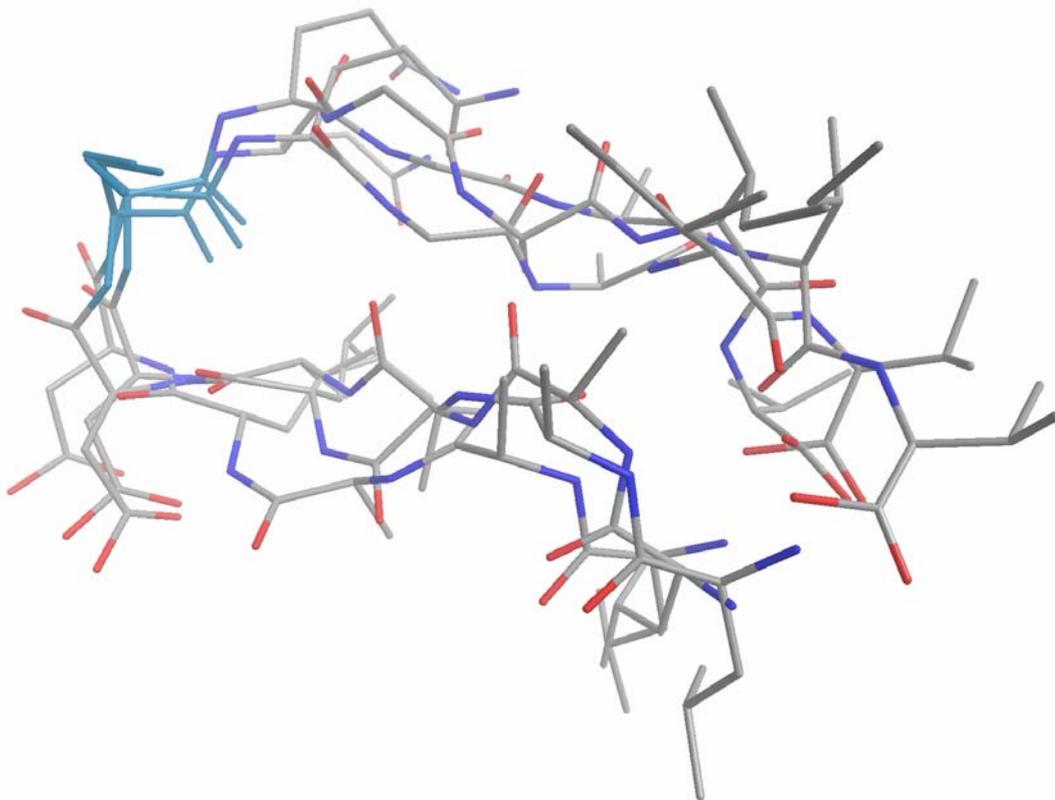


Abb. 3-82: Überlagerung der Peptidketten aller drei Konformationen.
Grau: C, Rot: O, Blau: N. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

3.4.7 Energieminimierte Struktur des Glycophorin-Antigen-Undekapeptids

Die Sekundärstruktur des mit dem Glycophorin-Antigen glycosylierten Undekapeptids **102** wird durch raumübergreifende NOE-Kontakte zwischen Leu⁴ und Ile¹⁰ dominiert, die ähnlich wie im Fall des (2→6)-ST-Antigen Glycopeptid **96** zu einer aufgeweiteten Turn-Struktur führen sollten (Abb. 3-83). Die Lage des Disialyl-T-Antigens wird durch einen Kontakt des H2-Protons des *N*-Acetylgalactosaminrestes zum Amid-Proton des Glycin bestimmt, während die Ausrichtung der beiden Sialinsäuren ausschließlich auf Berechnungen, d.h. Energieminimierung, beruht.

Die Sekundärstruktur ist in Abb. 3-84 und Abb. 3-85 dargestellt. Zwei durch Wasserstoffbrücken stabilisierte Schleifen beherrschen die Struktur. Die Turn-Struktur um Asp⁵ bis Gly⁸ ist aufgeweitet, und am ehesten dem β -Turn Typ II' zuweisbar ($\Phi_{i+1} = 45.1^\circ$, $\Psi_{i+1} = -79.5^\circ$, $\Phi_{i+2} = -159.5^\circ$, $\Psi_{i+2} = 0.9^\circ$). Der Turn wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten von Asp⁴ und Gln⁶ stabilisiert. Die zu erwartende Wasserstoffbrücke $i/i+3$ ($i = \text{Asp}^5$) ist vorhanden, resultierend durch die vom idealen β -Turn abweichenden Diederwinkel eine weitere vom $i/i+2$ Typ. Die Differenzen von den idealen Diederwinkeln sind mit 136° relativ groß.

Der *N*-terminalen Schleife, verursacht durch den $\beta\text{-CH}_2\text{-Leu}^4/\alpha\text{-CH-Ala}^3\text{-NOE}$ -Kontakt, ist kein spezieller Typ zuweisbar. Obwohl das Disialyl-Antigen größer ist als das (2→3)-ST-Antigen, ist die Kontaktfläche des Saccharids zum Peptid kleiner (in Abb. 3-81 verglichen mit Abb. 3-84 zu sehen).

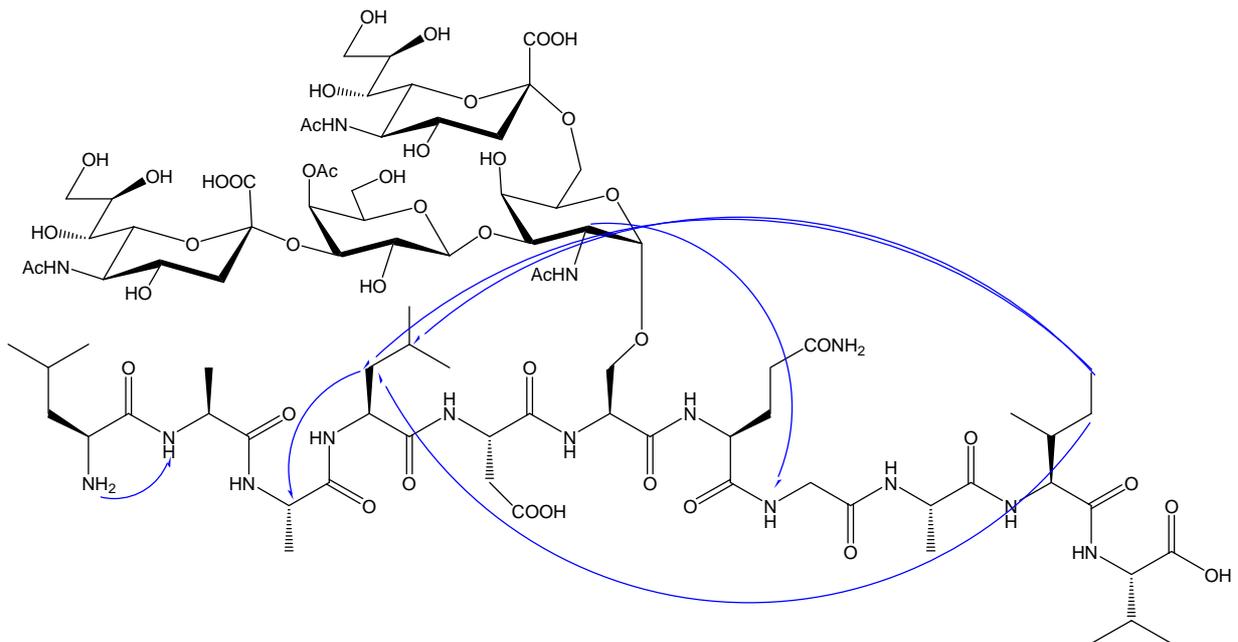


Abb. 3-83: NOE-Kontakte des Undekapeptid **102**.

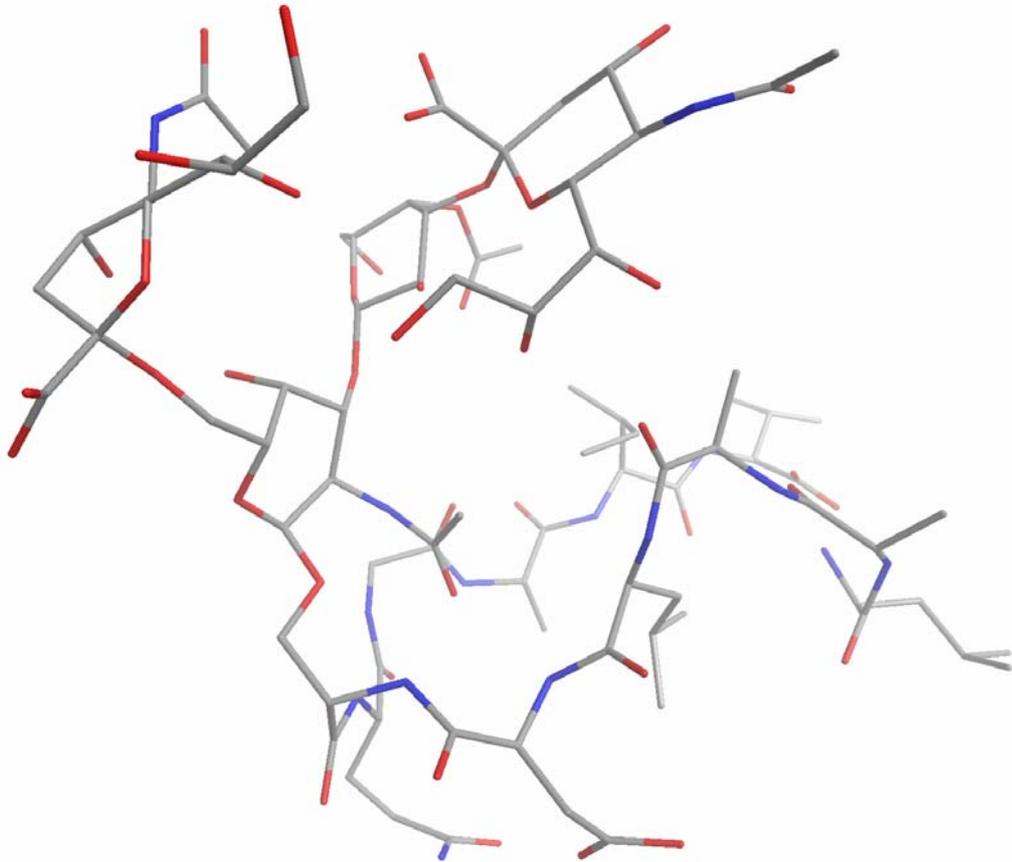


Abb. 3-84: Dreidimensionale Struktur des Glycopeptids **102** nach Energieminimierung (MM2).
Grau: C, Rot: O, Blau: N. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

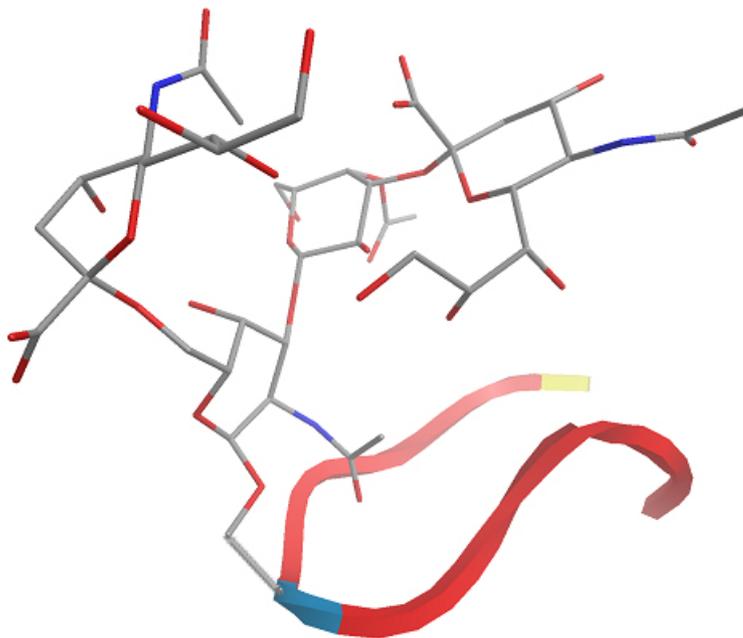


Abb. 3-85: Dreidimensionale Struktur des Peptidrückrats von Verbindung **102**.
Markierungen, blau: Glycophorin-Antigen, gelb: C-Terminus (Val).

3.4.8 Vergleich der Diederwinkel und *Chemical Shift Deviation*-Werte

In Tab. 3-5 sind die Diederwinkel der gut vergleichbaren Sequenzen (d.h. mit dem gleichen Aminosäurenrückrat) zusammengefasst. Das „Antigen“ bezeichnet die Substitution an Ser⁶, unter „Seq.“ (Sequenz) sind die Aminosäuren zu verstehen, die den Turn bilden. Für Verbindung **100** bilden die ersten drei Aminosäuren (kursiv gedruckt) den γ -Turn. Die „Differenzen vom idealen Turn“ bezeichnen die Summe der absoluten Differenzen von den idealen Diederwinkeln (diese sind in Tab. 3-3, S. 87 zu finden). Dabei sind die kleinsten Fehlersummen, die auf eine Schleife des entsprechenden Typs hindeuten, fett gedruckt. Die Abweichungen von γ -Turn sind mit dem Faktor 2 multipliziert, da hier nur zwei statt vier Diederwinkel zum Vergleich beitragen.

Tab. 3-5: Diederwinkel der (Glyco-)Peptide der Sequenz LAALDSQGAIV.

Nr.	Antigen	Seq.	Diederwinkel				Differenzen vom idealen Turn (Typ β)						(Typ γ)	
			Φ_{i+1}	Ψ_{i+1}	Φ_{i+2}	Ψ_{i+2}	I	I'	II	II'	III	III'	γ	γ'
85	keines	DSQG	-168.7	-19.2	-152.9	59.5	242	580	540	462	299	515		
89	T _N	LDSQ	43.8	39.1	69.7	28.7	361	74	224	354	362	41		
92	T	DSQG	-19.3	121.9	66.2	-5.3	354	200	62	473	345	218		
94	ST _N	DSQ	77.1	-63.0									40	520
96	(2→6)ST	DSQG	160.4	-2.9	59.0	-0.7	397	165	365	357	397	168		
100	(2→3)ST, „I,II-III“	LDSQ	84.1	-49.3	-100.5	-154.8	329	449	649	270	324	452	70	506
	„I, III - II“	LDSQ	87.9	-38.9	139.7	63.4	450	210	430	392	445	195	98	494
	„II, III - I“	LDSQ	81.9	-36.8	-98.0	-168.8	326	446	646	292	321	449	90	478
102	S ₂ T	DSQG	45.1	-79.5	-159.5	0.9	225	375	545	136	272	376	68	490

Die Daten zeigen keine Präferenz für einen bestimmten β -Turn. Allerdings scheinen sterisch anspruchsvolle Substituenten - wie die Sialyl-T_N- und (2→3)-ST- und Glycophorin-Antigene - die Ausbildung eines γ -Turn zu fördern, wobei die hydrophoben Wechselwirkungen der Peptidkette nach innen zeigen. Dies führt zwar zu einem gestreckten Charakter solcher Moleküle, allerdings wird die Ausbildung eines antiparallelen Faltblatts ungünstig. Verbindung **92** weist die dem idealen β -Turn und antiparallelem Faltblatt ähnlichste Sekundärstruktur auf, lediglich der Φ_{i+1} Winkel weicht mit einer absoluten Differenz von ca. 40° vom idealen Diederwinkel ab.

Die Abweichungen der chemischen Verschiebungen (*chemical shift deviation*, CSD^{124,125}) der α -Protonen der (Glyco-)Peptide von den Werten für ein *random coil*-Peptid ist in Tab. 3-6 für

die einzelnen Verbindungen angegeben. Negative CSD's zeigen helikale Strukturen, positive Faltblätter an. Die Sequenz ist vom *N*-Terminus zum *C*-Terminus durchgezählt, wobei die CSD der ersten Aminosäure (Leu) zwar aufgeführt, aber nicht ausgewertet werden sollte, da sie als Amin statt Amid vorliegt. In Schwarz sind Regionen dargestellt, die *random coil*-Werte liefern, in Blau Hinweise auf helikale Strukturen (oder aber Turnstrukturen) und in Rot Hinweise auf das Vorliegen eines β -Faltblatts.

Tab. 3-6: CSD's der (Glyco-)Peptide der Sequenz LAALDSQGAIV.

Nr.	Antigen	Leu	Ala	Ala	Leu	Asp	Ser	Gln	Gly	Ala	Ile	Val
85	keines	-0.4	-0.1	0.0	0.1	-0.2	-0.3	-0.2	-0.3	0.0	0.3	0.2
89	T _N	-0.4	0.0	0.0	0.1	-0.2	-0.1	-0.2	-0.3	-0.1	0.3	0.1
92	T	-0.4	-0.1	0.0	0.1	-0.2	-0.1	-0.1	-0.3	0.0	0.3	0.2
94	ST _N	-0.4	0.0	0.0	0.2	-0.2	0.0	-0.2	-0.3	0.0	0.4	0.2
96	(2→6)ST	-0.4	0.0	0.0	0.2	-0.2	0.0	-0.1	-0.2	0.0	0.3	0.2
100	(2→3)ST	-0.4	-0.1	0.0	0.1	-0.6	0.1	-0.2	-0.3	0.0	0.3	0.2
102	S ₂ T	-0.4	-0.1	0.0	0.1	-0.6	0.1	-0.2	-0.3	0.0	0.3	0.2

Für die terminalen Regionen kann keine strukturelle Präferenz festgestellt werden, die Sequenz DSQG dagegen scheint zu helikalen Strukturen zu tendieren, was innerhalb der Aussage der CSD's identisch mit Schleifenstrukturen ist. Auffällig sind die sehr ähnlichen CSD einzelner Aminosäuren, vergleicht man die Verbindungen untereinander.

4 Zusammenfassung

Über die Sekundärstruktur von LI-Cadherin ist bislang wenig bekannt. Es gibt keine Röntgenanalysen und keine NMR-spektroskopische Untersuchungen. Man kann nur aufgrund der Sequenzhomologien zu den bereits untersuchten klassischen Cadherinen vermuten, daß im LI-Cadherin ähnliche Verhältnisse in der entscheidenden Wechselwirkungsdomäne vorliegen. Für die Studien dieser Arbeit wurde nach Vorgaben aus der Literatur^{31,47} angenommen, daß es im LI-Cadherin eine „homophile Erkennungsregion“ gibt, die anstelle des HAV-Motivs das AAL-Motiv besitzt,⁴⁷ an die sich in C-terminaler Richtung eine typische β -Turn-Struktur anschließen sollte (Abb. 4-1).

Um den Einfluß verschiedener Saccharid-Antigene auf die Turn-Bildung zu untersuchen, wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit verschiedene Saccharid-Antigen-Bausteine synthetisiert, mit denen dann im zweiten Teil der Arbeit durch sequentielle Festphasensynthese

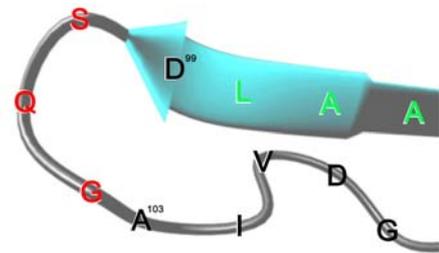


Abb. 4-1: Turn und AAL-Motiv.

entsprechende Glycopeptidstrukturen aus dieser Region des LI-Cadherins aufgebaut wurden.

Zur Synthese sämtlicher Antigen-Bausteine ging man von D-Galactose aus, die über das Galactal und eine Azidonitratisierung in vier Stufen zum Azidobromid **4** in 42 % Ausbeute umgesetzt wurde (Abb. 4-2). In einer Koenigs-Knorr-Glycosylierung wurde dieses dann auf die Seitenkette eines geschützten Serin-Derivats in 81-96 %-iger Ausbeute übertragen. Das Derivat **7** ließ sich nach reduktiver Acetylierung der Azidgruppe und Abspaltung der *tert*-Butylschutzgruppe mit 47 % Ausbeute zum T_N-Antigen-Baustein **9** umsetzen.

Das T_N-Antigen-Derivat **15**, in 53% Ausbeute durch reduktive Acetylierung und Umesterung der Acetylgruppen der Verbindung **7** unter Zemplén-Bedingungen erhalten, war Ausgangspunkt für die Synthesen der weiteren Glycosyl-Serin-Bausteine. Nach Einführung einer Schutzgruppe in der 4- und 6-Position ließen sich die Monosaccharide **16** und **17** in 66-91 %-iger Ausbeute mittels der Helferich-Glycosylierung mit den Bromiden **1** bzw. **40** zum T-Antigen-Derivat **18**, **22** und **41** umsetzen. Da die Route über das T-Antigen-Derivat den Hauptsyntheseweg für die weiteren komplexeren Antigene bildete, wurden verschiedene Schutzgruppenmuster getestet. Während eine Variation der Gruppe R¹ keinen entscheidenden Vorteil eröffnete, ließen sich durch Verwendung einer Benzyl- statt einer Acetyl-Schutzgruppe (Rest R²) am Galactoseteil die besten Ausbeuten erzielen. Aus Verbindung **18**

und **22** ließ sich der T-Antigen-Baustein **25** in ca. 51 %-iger Ausbeute in drei Stufen synthetisieren.

Der ST_N-Antigen-Baustein **32** wurde in einer Sialylierungsreaktion mit dem Xanthogenat **29** aus dem Akzeptor **15** erhalten. Diese Reaktion gelang in einer mäßigen Ausbeute von 38-44 %, allerdings regioselektiv. Das so erhaltene Derivat **30** wurde in zwei Stufen und 61-97 %-iger Ausbeute nach Acetylierung und Abspaltung der *tert*-Butylschutzgruppe mit TFA zum fertigen ST_N-Antigen-Baustein **32** umgesetzt. Ausgehend von Verbindung **15** betrug die Gesamtausbeute 27-37 %.

Eine frühe präparative HPLC auf der Stufe des ST_N-Antigen-Derivats **30** war für die Synthese des (2→6)-ST-Antigen-Bausteins **53** notwendig. Dazu wurde zuerst der Akzeptor **30** nach der Helferich-Variante mit dem Galactosylbromid **1** in der 3-Position glycosyliert. Dies gelang jedoch nur in einer Ausbeute von 44 %. Der Weg über ein T-Antigen-Derivat erwies sich als günstiger. Dazu wurden zuerst die acetalischen Schutzgruppen der Verbindungen **18**, **22** und **41** in 64-90 %-iger Ausbeute mit Essigsäure bzw. Cerammoniumnitrat entfernt, und das Produkt dieser Reaktionen dann mit dem Xanthogenat **29** glycosyliert. Die Sialylierungsreaktion mit den Produkten **48**, **50** und **51** gelang in Ausbeuten von 20-71%, abhängig vom Schutzgruppenmuster des Akzeptors. Die besten Ausbeuten lieferte dabei der von Verbindung **41** abgeleitete Akzeptor. Die für die Festphasensynthese einsatzfähigen (2→6)-ST-Antigen-Bausteine **53** und **54** wurden nach Acetylierung und Abspaltung der *tert*-Butylschutzgruppe mit TFA in 61-70 %-iger Ausbeute nach präparative HPLC erhalten.

Die Synthese des (2→3)-Sialyl-T- und Glycophorin-Antigen-Bausteins ging vom T-Antigen-Derivat aus (umrandete Verbindungen in Abb. 4-2). Die Acetyl-Schutzgruppen des T-Antigen-Derivats **41** wurden unter Zemplén-Bedingungen abgespalten (Abb. 4-3). Die vergleichsweise niedrige Ausbeute von 39 % unterstützt den vermuteten Reaktionsmechanismus einer Acetylgruppenwanderung über die 6-Position. Diese ist im Fall der Verbindung **41** notwendigerweise durch eine Benzyl-Schutzgruppe blockiert. Die nachfolgende Sialylierungsreaktion gelang in 49 % Ausbeute mit dem Donor **29**. Das Produkt **43** wurde mit einer Ausbeute von 72 % in den zwei folgenden Stufen acetyliert und dann das Benzylidenacetal mit wäßriger Essigsäure in der Hitze zum Derivat **45** hydrolysiert. Eine weitere Acetylierung und Behandlung mit TFA lieferten den (2→3)-Sialyl-T-Antigen-Baustein **47** in 98 %-iger Ausbeute.

Die durch präparative HPLC gereinigte Verbindung **45** diente als Akzeptor zur Synthese des Glycophorin-Antigen-Bausteins. Die Sialylierungsreaktion gelang in 36 %-iger Ausbeute zum

Derivat **55**, dessen *tert*-Butylschutzgruppe mit TFA leicht entfernt werden konnte, was in 93 %-iger Ausbeute den Glycophorin-Antigen-Baustein **56** lieferte.

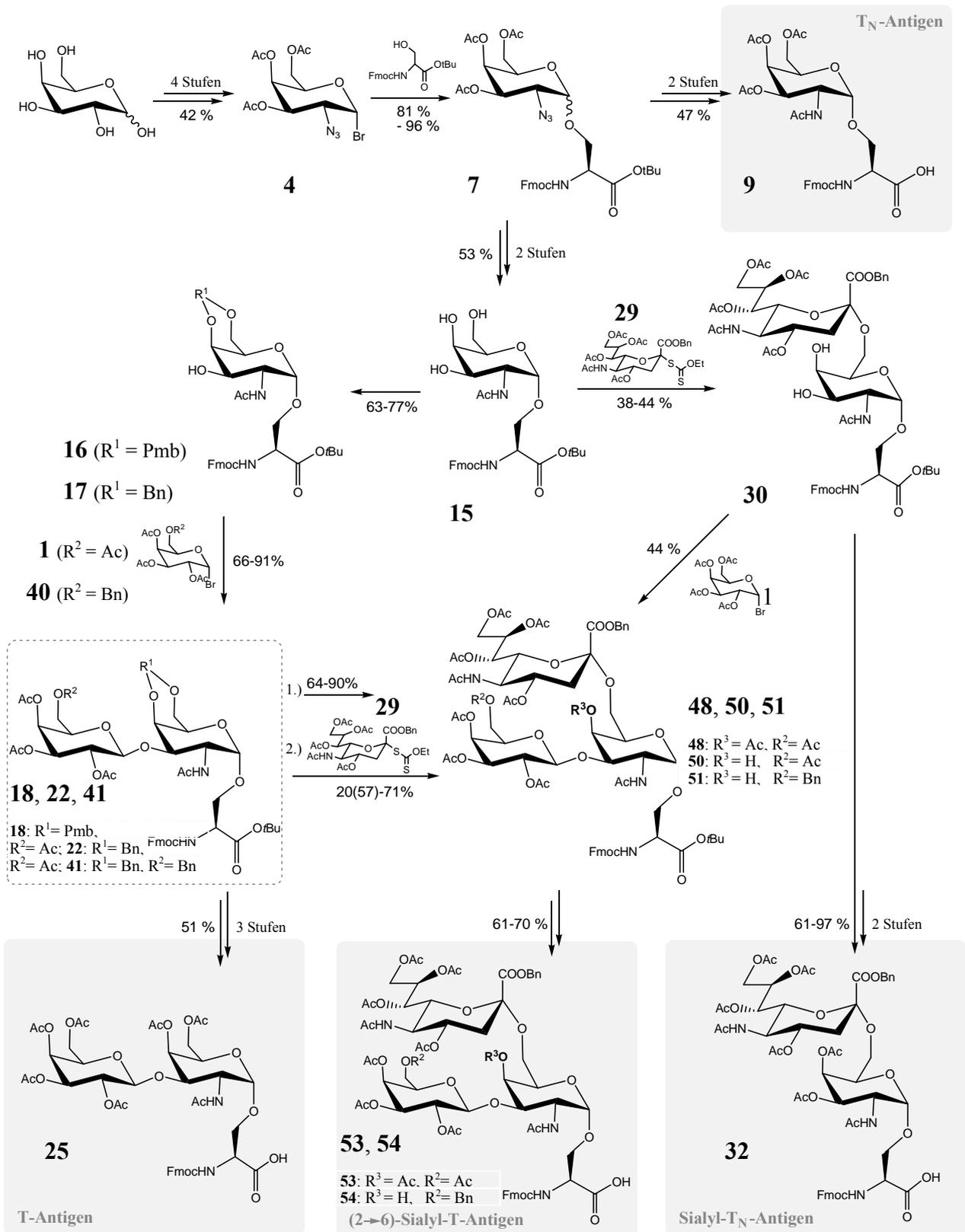


Abb. 4-2: Syntheschema der T_N-, T-, ST_N- und (2→6)-ST-Antigen-Bausteine.

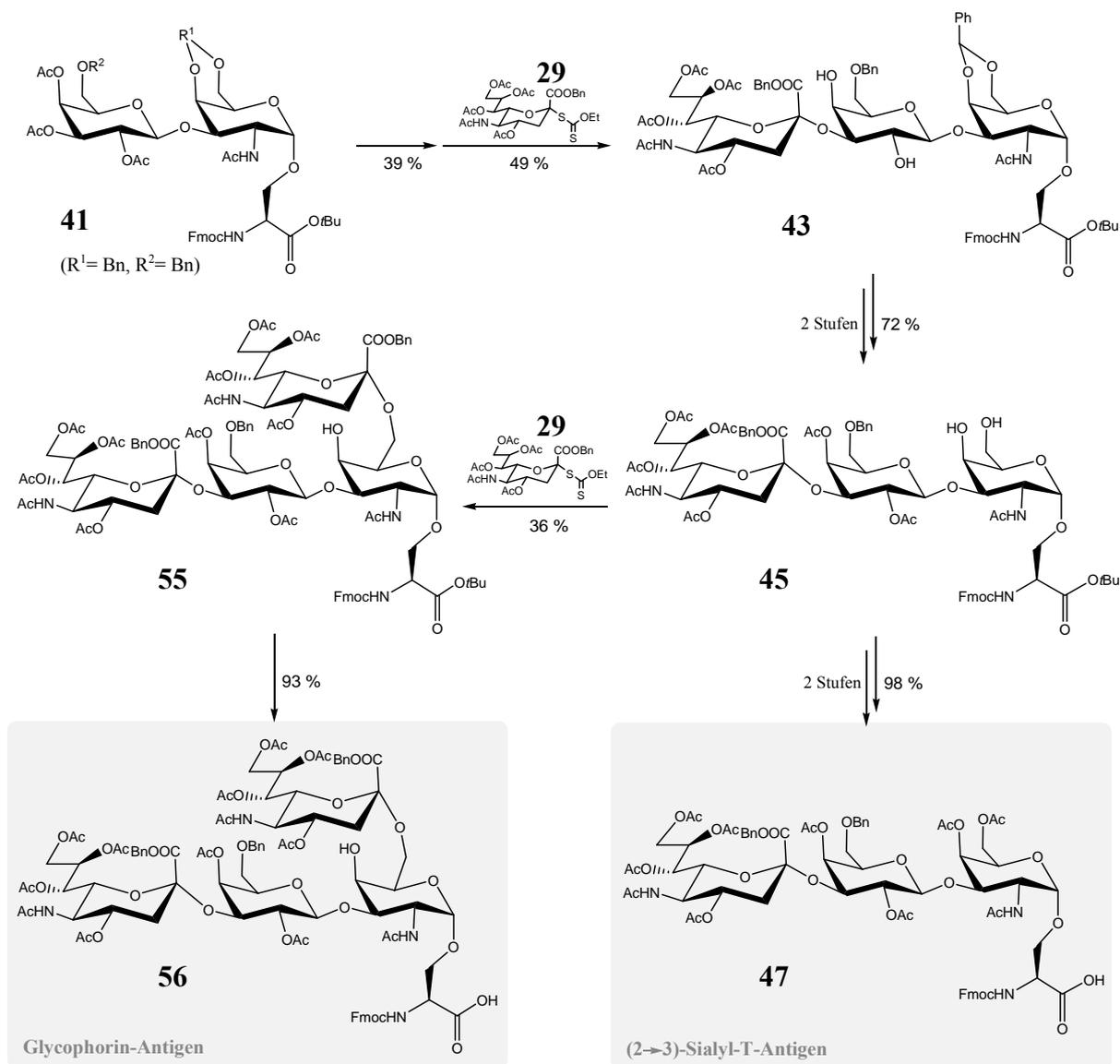


Abb. 4-3: Syntheschema des (2→3)-ST- und Glycophorin-Antigen-Bausteins.

Im nächsten Abschnitt dieser Doktorarbeit wurden die synthetisierten Saccharid-Antigen-Serin-Konjugate in Festphasen-Glycopeptidsynthesen eingesetzt. Zunächst wurde ein mit dem T_N-Antigen glycosyliertes Tricosapeptid hergestellt, dessen Sequenz zentral das β-Turn-Motiv DSQG enthält (Abb. 4-4). Dazu wurden ausgehend von vorbeladenen PHB-Tentagel- und PTMSEL-AMPS-Harzen **64** die Fragmente **79** in 56 % bzw. **82** in 67 %-iger Ausbeute synthetisiert. Die beiden Verbindungen ließen sich in einer Fragmentkondensation zum Tricosapeptid **83** verbinden. Nach Abspaltung vom Harz mit TFA wurde das Glycopeptid **83** in 90 %-iger Ausbeute erhalten. Unter Zemplén-Bedingungen wurden die Acetyl-Schutzgruppen entfernt und nach Reinigung durch Ausschlußchromatographie konnte das Glycopeptid **84** in 73 %-iger Ausbeute isoliert werden. Mittels NMR-spektroskopischen Untersuchungen und folgenden Energieminimierungsberechnungen vom MM2-Typ konnte

eine dreidimensionale Struktur des Glycopeptid **84** ermittelt werden. Der in Abb. 4-4 von Verbindung **84** grau dargestellte Bereich nimmt dabei nicht mehr an einem β -Turn- und Faltblatt-ähnlichen Bereich teil. Die Peptidsequenz des schwarz dargestellten Teils des Glycopeptids **84** wurde für die folgenden Synthesen gewählt.

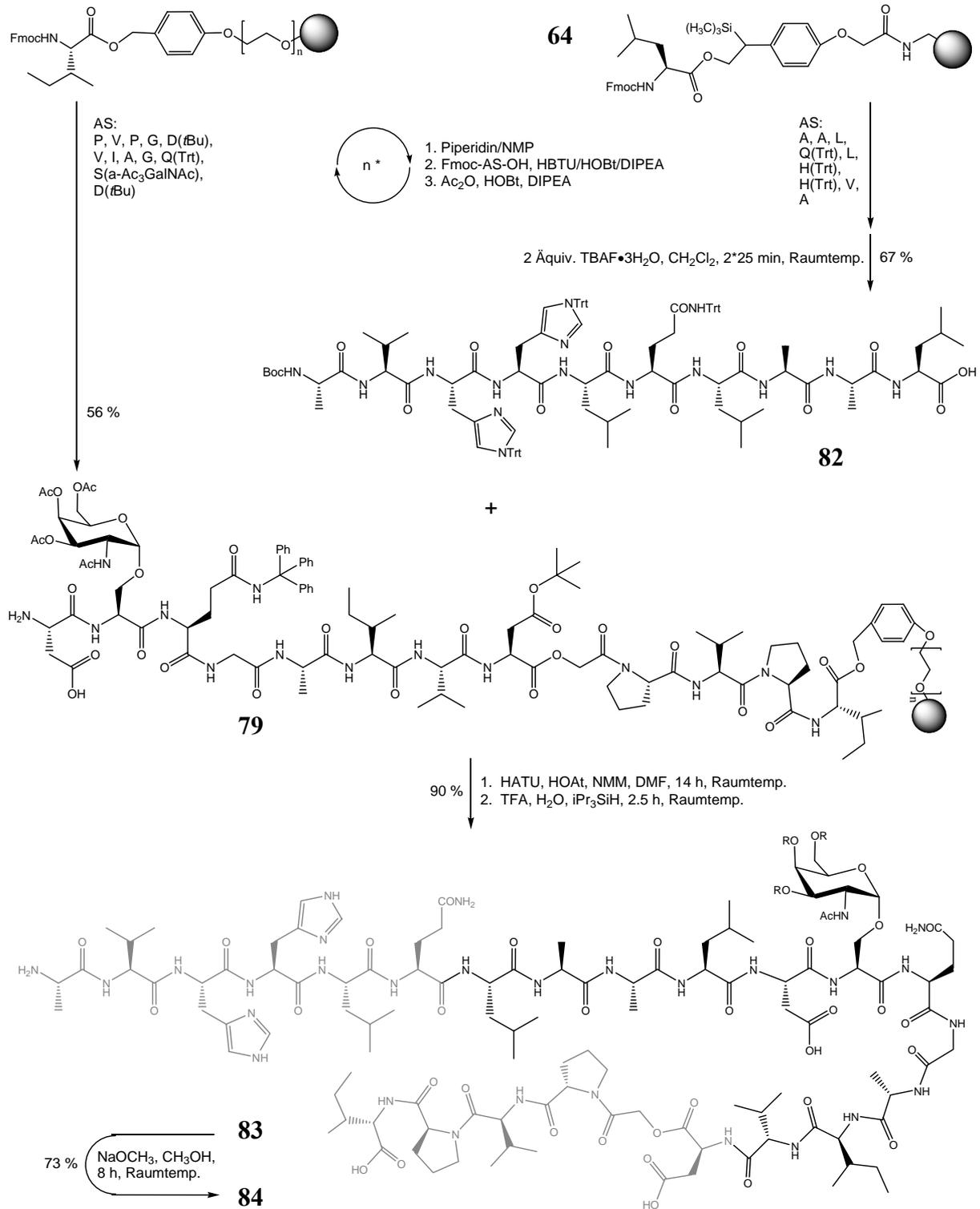


Abb. 4-4: Festphasenglycopeptidsynthese des Tricosapeptids.

Für die Festphasensynthese wurden mit Fmoc-Valin vorbeladene PHB-Tentagel- und PTMSEL-AMPS-Harze **67** eingesetzt (Abb. 4-5). Die Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte für die Festphasensynthesen mit den verschiedenen Saccharid-Antigen-Bausteinen ist sehr ähnlich, und unterscheidet sich im Detail in den Kupplungsbedingungen der Saccharid-Antigen-Serin-Konjugate. Tab. 4-1 faßt die Ausbeuten in Abhängigkeit von den eingesetzten Äquivalenten der Saccharid-Antigen-Bausteine zusammen.

Tab. 4-1: Ausbeuten der Festphasen-Glycopeptidsynthesen und Gesamtausbeuten der (Glyco-)Peptidsynthesen.

Antigen-Baustein	-	9	25	32	53, 54	47	56
eingesetzte Äquivalente	-	3	2	2.5	1.6	1.1	0.5
(Glyco-)Peptid	85	89	92	94	96	100	102
Festphasenausbeute	99 %	78 %	46 %	61 %	bis 84 %	23 %	22 %
Gesamtausbeute	99 %	57 %	23 %	24 %	bis 57 %	17 %	21 %

Die Abspaltung der in Tab. 4-1 aufgeführten Verbindungen vom polymeren Träger erfolgte abhängig vom Typ des Ankers entweder mit TFA oder mit TBAF. Die Ausbeute dieser Reaktion ist in der Ausbeute der Festphasensynthese mit einbezogen. Die Gesamtausbeute beinhaltet zusätzlich die Abspaltung durch Umesterung oder Hydrolyse der Acetyl-Schutzgruppen sowie die hydrogenolytische Spaltung von Benzylestern und Ethern, sofern vorhanden.

Die für Verbindung **102** angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die eingesetzten Äquivalente des Saccharid-Bausteins **56**. Die für das mit den Sialyl-T-Antigen-Bausteinen **53** und **54** synthetisierte Glycopeptid **96** angegebene Ausbeute stellt das optimierte Ergebnis dar. Insgesamt verlief die Festphasen-Glycopeptidsynthese in starker Abhängigkeit vom sterischen Anspruch der Saccharid-Bausteine, wobei dieser von Verbindung **9** ausgehend zunimmt. Die Bausteine **25** und **32** wurden unter Berücksichtigung der eingesetzten Äquivalente mit ähnlichen Ausbeuten gekuppelt. Die Sialyl-T-Antigene **47**, **53** und **54** sowie das Glycophorin-Antigen **56**, die sterisch anspruchvollsten Bausteine, verhalten sich hinsichtlich ihrer Kupplungsausbeuten wiederum ähnlich. Sämtliche so synthetisierten Glycopeptide wurden NMR-spektroskopisch charakterisiert und mittels NOE-Experimenten hinsichtlich ihrer Konformation untersucht. Durch diese Bestimmung der räumlichen Protonen-Protonen-Kontakte konnte mittels Rechnungen zur Energieminimierung, basierend auf MM2-Kraftfeldern, eine dreidimensionale Struktur für die Glycopeptide postuliert werden. Schon der Vergleich der chemischen Verschiebung der α -Protonen der (Glyco-)Peptide zu

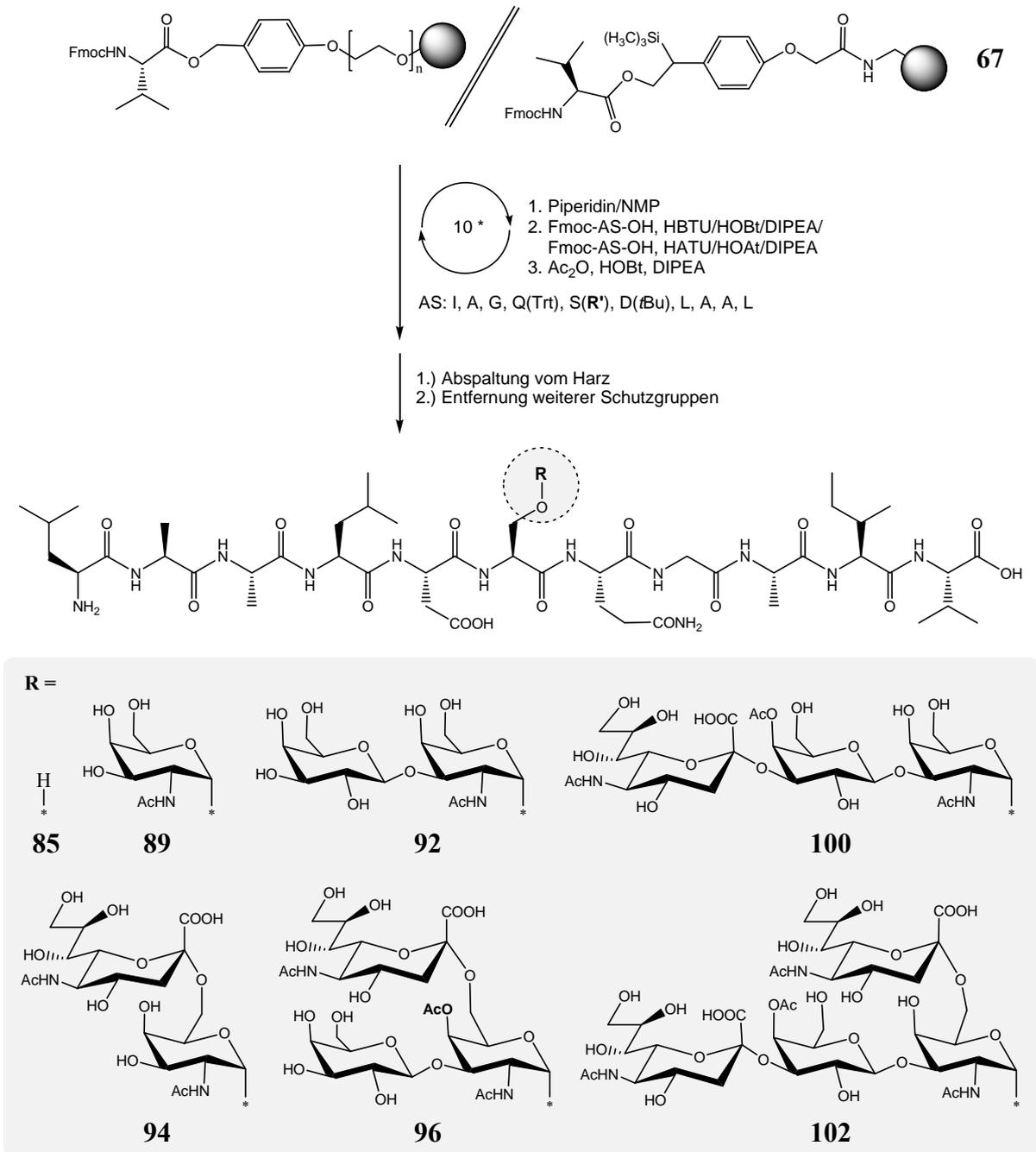


Abb. 4-5: Synthese der Glycopeptide mit der Peptidsequenz LAALDSQGAIV.

random coil-Werten der entsprechenden Aminosäuren (CSD) deutet auf einen Turn im Bereich der Sequenz DSQG hin. Sämtliche synthetisierten Verbindungen **85** bis **102** weisen in der berechneten Struktur eine schleifenartige Konformation in dieser Sequenz auf. Der Einfluß der Saccharid-Antigene ist unterschiedlich, läßt sich aber grob in drei Gruppen einteilen (Abb. 4-6). Die Glycopeptide **89** (T_N-Antigen) und **94** (ST_N-Antigen) führen zu mehrfach gebogenen Sekundärstrukturen, in denen Aminosäuresequenzen zum Teil in helikaler Konformation vorliegen. Die Verbindung **92** (T-Antigen) stellt eine eigene Gruppe dar. Die Sequenz DSQG liegt in diesem Glycopeptid in einer idealen β -Turn nahen

Konformation vor. Die restliche Peptidkette nimmt eine gestreckte Konformation ein, einem antiparallelen Blatt ähnlich. Die dritte Gruppe bilden die Glycopeptide **96**, **100** (Sialyl-T-Antigene) und **102** (Glycophorin-Antigen), die sich durch Kontakte zwischen den hydrophoben Seitenketten auszeichnen, und in einer antiparallelen und weitgehend gestreckten Konformation mit einer aufgeweiteten Schleife um die Sequenz DSQG vorliegen. Das Peptid **85** läßt sich am ehesten der ersten Gruppe zuordnen, allerdings sind die Diederwinkel der Turn-Sequenz deutlich unterschiedlich von denen der an den Glycopeptiden gefundenen Winkel.

Die biologische Aktivität der synthetisierten Verbindungen konnte bis zur Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht untersucht werden. Dies soll in einer Kooperation mit der Charité der Humboldt-Universität Berlin erfolgen.

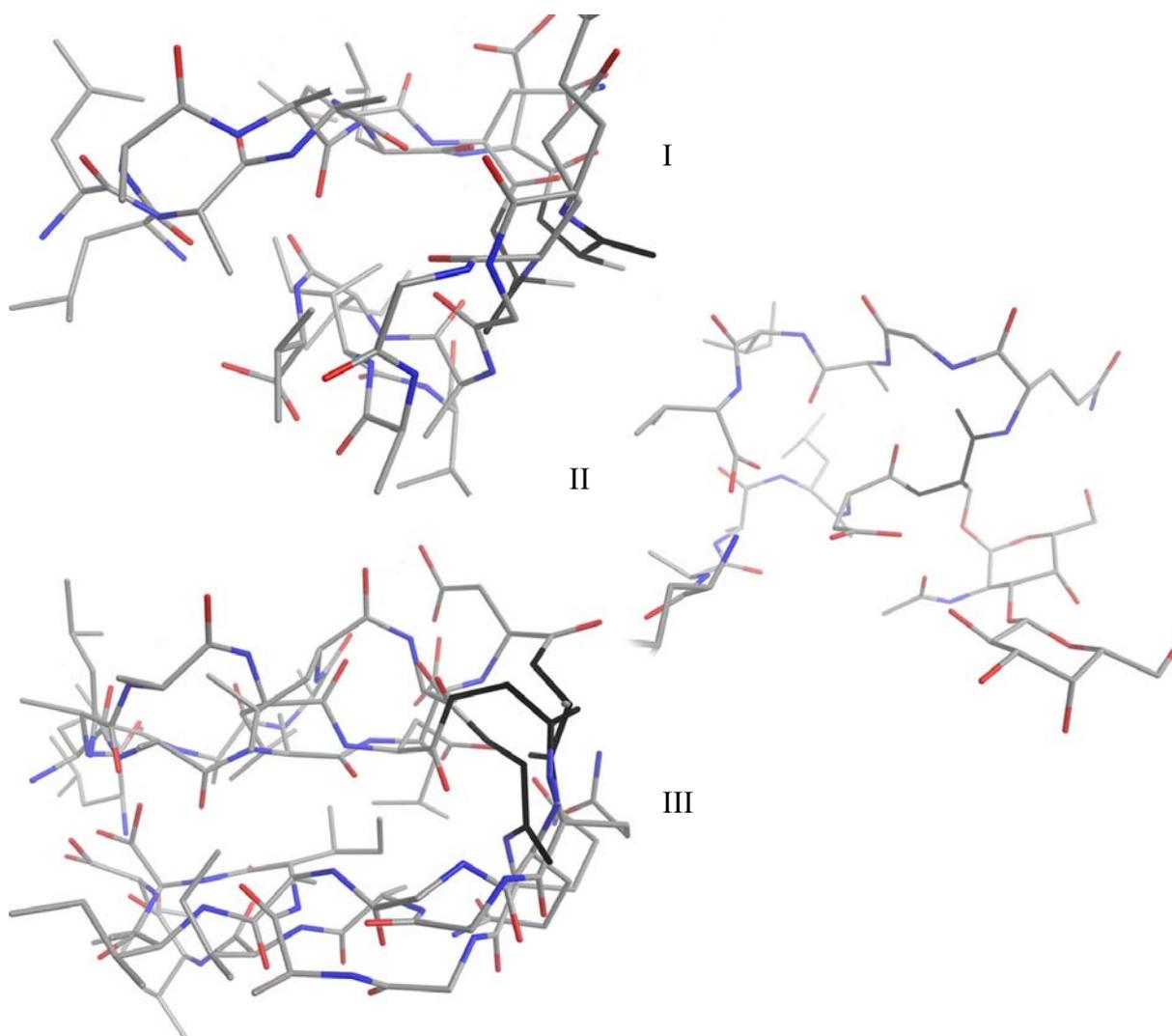


Abb. 4-6: Überlagerung der Glycopeptidstrukturen zu den Gruppen I, II und III.
I: T_N- und ST_N-Antigen; II: T-Antigen; III: Sialyl-T- und Glycophorin-Antigen.
Wasserstoffatome sind ausgelassen, die Aminosäure Serin ist schwarz markiert.
Für die Gruppen I und III ist der das Saccharid-Antigen nicht eingezeichnet.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

Lösungsmittel: Alle Lösungsmittel wurden in der Qualität *pro analysi* (p.a.) bezogen und vor Gebrauch destilliert. Absolute Lösungsmittel wurden nach literaturbekannten Verfahren gewonnen.¹²⁹

Dünnschichtchromatographie: Für die Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumfertigplatten der Firma Merck, beschichtet mit Kieselgel 60_{F254}, verwendet. Die Visualisierung der Produkte erfolgte durch UV-Dedektion mit Licht der Wellenlänge 254 nm sowie durch folgende Färbereagenzien:

Methoxyphenol-Reagenz (1:1-Mischung aus 0.2%-iger ethanolischer Methoxyphenol-Lösung und 2N ethanolischer Schwefelsäure).

Seebach-Reagenz (2.5 g Molibdatophosphorsäure, 1.0 g Cer-(IV)-sulfat-tetrahydrat, 6 ml konzentrierte Schwefelsäure und 94 ml Wasser).

Ninhydrin-Reagenz (1.5 g Ninhydrin in einer Mischung aus 15 mL Essigsäure und 500 mL Methanol).

Die Dünnschichtchromatogramme wurden in die jeweiligen Lösungen getaucht und durch Erhitzen mit einem Heißluftföhn entwickelt.

Chromatographie: Säulenchromatographie wurde unter Normaldruck an Kieselgel mit der Korngröße 0.064-0.200 mm der Firma *ICN Biomedicals*, Eschwege, durchgeführt. Zur Flashchromatographie wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 0.032-0.063 der Firma *ICN Biomedicals*, Eschwege, verwendet. Das Laufmittel wurde durch Redestillation der Eluate aus anderen Chromatographien gewonnen. Laufmittelzusammensetzungen und Säulendimensionierungen sind bei den jeweiligen Substanzen als Volumenverhältnisse aufgeführt. Im Allgemeinen wurde das Mischungsverhältnis der Laufmittel so eingestellt, daß die zu isolierende Substanz einen R_f -Wert von ca. 0.10-0.25 aufweist.

¹²⁹ W. L. F. Armarego, C. L. L. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, 5 ed., Butterworth-Heinemann, Amsterdam, 2003.

Gelpermeationschromatographie: Ausschlußchromatographien an Sephadex G-15 (*Pharmacia*) wurden mit Wasser als Flußmittel durchgeführt. Zur Trennung der Fraktionen wurde ein Detektor (2510) der Fa. *LKB* und ein Schreiber (SE 130) der Fa. *ABB*, Mannheim, in Kombination mit einem Fraktionssammler verwendet.

Drehwerte: Die Drehwerte wurden mit einem *Perkin-Elmer* Polarimeter 241 bei den Wellenlängen $\lambda = 546$ nm und $\lambda = 578$ nm gemessen und auf die Natrium-D-Linie (589.5 nm) extrapoliert. Lösungsmittel, Konzentrationen und Temperaturen sind bei den einzelnen Verbindungen vermerkt.

Festphasensynthesen: Die Festphasensynthesen wurden zum größten Teil mit einem *Perkin-Elmer* ABI 433A Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt. DMF für die Peptidsynthese wurden von der Fa. *Roth*, Karlsruhe, bezogen. NMP für die Peptidsynthese wurde von der Fa. *SDS*, Peypin (Frankreich), erworben. Die polymeren Träger für die Festphasensynthesen wurde im Fall von AMPS-Harz von der Fa. *Novabiochem*, Läuflingen (Schweiz), bezogen und im Fall von TentaGel[®] Harzen von der Fa. *Rapp Polymere*, Tübingen. Fmoc-geschützte Aminosäurebausteine wurden, sofern nicht anders beschrieben, von der Fa. *Novabiochem*, Läuflingen (Schweiz), erhalten.

Der restliche Teil der Festphasensynthesen wurde in einem dem Merrifield Festphasenreaktor nachempfundenen Reaktionsgefäß durchgeführt. Der Reaktor wurde mit einem Rotationsschüttler KS 125 Basic der Fa. *IKA*, Staufen, geschüttelt. Das Reaktionsmonitoring erfolgte durch Beladungsbestimmung (s.u.).

Die *photometrische Beladungsbestimmung* wurde durch eine UV-Absorptionsmessung des Fmoc-Piperidin Adduktes durchgeführt. Dafür wurden 20 mg einer Harzprobe mit 20.1 mL einer 1:1-Mischung aus DMF und Piperidin 45 min. geschüttelt. Von dem Überstand wurde 1 mL aufgenommen und mit der DMF/Piperidin-Mischung auf 10 mL verdünnt. Danach wurde die Lösung an einem *Perkin-Elmer* Lambda 17 UV/VIS-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 278 nm vermessen. Die Beladung berechnet sich nach:

$$c(\text{mmol/g}) = (\text{OD} \{\text{optische Dichte}\} * 10^4) / 10417 \{\text{Extinktionskoeffizient}\}$$

NMR-Spektroskopie: Die NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten gemessen:

Bruker AC-200: 200 MHz ¹H-NMR und 50.5 MHz ¹³C-NMR

Bruker AC-300: 300 MHz ¹H-NMR und 75.5 MHz ¹³C-NMR

Bruker AM-400: 400 MHz ¹H-NMR und 100.6 MHz ¹³C-NMR

Bruker DRX-600: 600 MHz ¹H-NMR und 150.9 MHz ¹³C-NMR

Die angegebenen Werte der chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Tetramethylsilan als Standard ($\delta = 0$ ppm). Die Kennzeichnung der ^1H - und ^{13}C -Signale in der Interpretation der NMR-Spektren erfolgte nach folgendem Schema:

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

Massenspektrometrie: Die FD-Massenspektren wurden mit einem Finnigan-MAT-95-Spektrometer gemessen. Als Matrix wurde *p*-Nitrobenzoesäure (nba) verwendet.

MALDI-TOF Spektren wurden mit einem Tofspec E-Gerät der Firma *Micromass*, Eschborn, aufgenommen, hochaufgelöste Massen mit einem Axima-CFR der Fa. *Kratos*, Eppstein. Als Matrizes wurden 4-Hydroxy- α -cyano-zimtsäure (cca) oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure (dhb) verwendet.

ESI-Spektren wurden mit einem *ThermoQuest* Navigator-Instrument vermessen unter Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel.

Elementaranalysen: Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Labor des Instituts für Organische Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz durchgeführt.

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

Analytische HPLC: Die analytische HPLC wurde mit Hilfe einer *Knauer* Maxi Star K1000 Gradienten-Pumpe, einem Knauer 4-Kanal-Entgaser, einer analytischen Mischkammer sowie einem *Knauer* Diodenarraydetektor DAD2062 (Wellenlängenbereich 200-600 nm) durchgeführt. Es wurde bei einer Flußrate von 1 mL/min gearbeitet. Als Laufmittel dienten Wasser/Acetonitril-Gemische, denen falls vermerkt 0.1 % TFA zugesetzt wurden. Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch ca. 1h im Ultraschallbad entgast. Das HPLC-Wasser wurde einer Millipore-Q-Umkehrosioseanlage entnommen, Acetonitril wurde in HPLC-Qualität bei der Fa. *Fisher-Scientific*, Schwerte, erworben.

Es wurden folgende Säulen verwendet:

Eurospher 100 C18, 5 μm , 250 x 4 mm (Fa. *Knauer*)

Luna C18-2/5 μm , 250 x 4.6 mm (Fa. *Phenomenex*)

Jupiter C18-2/5 μm , 250 x 4.6 mm (Fa. *Phenomenex*)

Verwendete Gradienten:

Gradient A:

Zeit (min)	0	40	60	TFA
Acetonitril (%)	40	100	100	-
Wasser (%)	60	0	0	

Gradient B:

Zeit (min)	0	40	60	TFA
Methanol (%)	40	100	100	-
Wasser (%)	60	0	0	

Gradient C:

Zeit (min)	0	35	60	TFA
Acetonitril (%)	30	100	100	-
Wasser (%)	70	0	0	

Gradient D:

Zeit (min)	0	35	60	TFA
Acetonitril (%)	30	100	100	0.1 %
Wasser (%)	70	0	0	

Gradient E:

Zeit (min)	0	40	60	TFA
Acetonitril (%)	10	100	100	0.1 %
Wasser (%)	90	0	0	

Gradient F:

Zeit (min)	0	35	60	TFA
Acetonitril (%)	05	95	95	0.1 %
Wasser (%)	95	05	05	

Gradient G:

Zeit (min)	0	35	60	TFA
Acetonitril (%)	05	95	95	-
Wasser (%)	95	05	05	

Gradient H:

Zeit (min)	0	35	60	TFA
Acetonitril (%)	05	60	60	0.1 %
Wasser (%)	95	40	40	

Präparative und semipräparative HPLC: Die (semi-)präparative HPLC wurde mit zwei *Knauer* Wellchrom Ministar K500-Pumpen (jeweils mit 50 mL Edelstahlpumpenkopf), einer präparativen Mischkammer und einem *Knauer* Spektralphotometer 287.00 durchgeführt. Bei der präparativen HPLC wurde bei einer Flußrate von 20 mL/min, bei der semipräparativen bei einer Flußrate von 10 mL/min gearbeitet.

Es wurden folgende Säulen verwendet:

Luna C18-2/10 μ m, 250 x 50 mm (Fa. Phenomenex) [Präp.]

Luna C18-2/10 μ m, 250 x 21 mm (Fa. Phenomenex) [Semipräp.]

Jupiter C18-2/10 μ m, 250 x 21 mm (Fa. Phenomenex) [Semipräp.]

Verwendete Gradienten:

Gradient I:

Zeit (min)	0	35	80	TFA
Acetonitril (%)	30	100	100	0.1 %
Wasser (%)	70	0	0	

Gradient J:

Zeit (min)	0	35	80	TFA
Acetonitril (%)	30	100	100	-
Wasser (%)	70	0	0	

Gradient K:

Zeit (min)	0	40	80	TFA
Acetonitril (%)	30	100	100	0.1 %
Wasser (%)	70	0	0	

Gradient L:

Zeit (min)	0	40	80	TFA
Acetonitril (%)	05	100	100	-
Wasser (%)	95	0	0	

Gradient M:

Zeit (min)	0	35	80	TFA
Acetonitril (%)	05	95	95	0.1 %
Wasser (%)	95	05	05	

Gradient N:

Zeit (min)	0	30	80	TFA
Acetonitril (%)	05	50	50	0.1 %
Wasser (%)	95	50	50	

Gradient O:

Zeit (min)	0	45	80	TFA
Methanol (%)	40	100	100	-
Wasser (%)	60	0	0	

Gradient P:

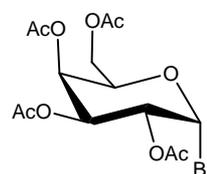
Zeit (min)	0	30	80	TFA
Methanol (%)	30	100	100	0.1 %
Wasser (%)	70	0	0	

5.2 Synthese der Saccharidbausteine

5.2.1 Synthesen zum Kapitel 3.1

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid (**1**)^{130, 131}

Zu einer Lösung von 1 g Galactose in 400 mL Acetanhydrid im 2 L Dreihalskolben werden langsam 4 mL 70 %-ige Perchlorsäure zugetropft.



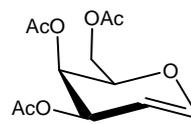
Das Reaktionsgemisch wird auf $\sim 5^\circ\text{C}$ gekühlt. Zur Reaktionslösung werden dann über einen Zeitraum von 1.5 h portionsweise 100 g (0.56 mol) Galactose zugeben, so daß die Temperatur 40°C (Eisbad) nicht überschreitet. Die gelbe Lösung wird 14 h gerührt. Danach wird die Lösung auf 0°C bis 5°C abgekühlt, und es werden 600 mL einer 33%igen HBr-Lösung in Eisessig (mind. 6 Äquiv.) über 2 h zugetropft. Nach 14 h Rühren bei Raumtemp. wird das Lösungsmittel i. Vak. bei einer Heizbadtemperatur von 28°C abdestilliert. Der Rückstand wird in 600 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 200 mL Eis versetzt. Die org. Phase wird abgetrennt und dreimal mit je 200 mL gesättigter NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die org. Phase wird über MgSO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt kann direkt weiter umgesetzt oder zur Verwendung als Glycosyldonor aus PE/EE 20:1 umkristallisiert werden.

Ausb. (Rohprodukt): 230 g (quant.); gelbes zähes Öl; R_F : 0.63 (EE); 0.42 (EE/PE 1:1).

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{BrO}_9$ (411.20) [410.2]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-galactal (**2**)¹³¹

Eine refluxierende Suspension von 60 mL (0.36 mol) N-Methyl-morpholin und 158 g aktiviertem (2.27 mol) Zinkstaub¹³² in 350 mL Essigester¹³³ p.a.



wird unter starkem Rühren (KPG-Rührer) mit einer Lösung von 186 g (0.45 mol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid (**1**) in 400 mL EE innerhalb 1 h versetzt und 3 h unter Rückfluß gerührt. Dann läßt man das Reaktionsgemisch auf Raumtemp. abkühlen. Die Suspension wird über Celite filtriert, das Filtrat zweimal mit je 200 mL H_2O

¹³⁰ M. L. Wolfrom, A. Thompson, *Methods Carbohydr. Chem.*, **1963**, 2, 211.

¹³¹ J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, 13(1), 129-132.

¹³² Der Zinkstaub wird 4 min. in 1N HCl-Lösung suspendiert, abfiltriert, mit wenig Wasser und wenig EE gewaschen und kurz trockengezogen

¹³³ Lediglich über K_2CO_3 destilliert.

mit 15 mL Essigsäure und einmal mit 300 mL einer gesättigten NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Das erhaltene hellbraune Öl wird durch Flashchromatographie an 4 L Kieselgel mit PE/EE 4:1 weiter gereinigt.

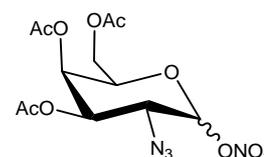
Ausb.: 120 g (0.44 mol; 98%); gelbes Öl; R_F: 0.41 (PE/EE 3:1); R_F: 0.54 (EE/PE 1:2).

FD-MS [m/z] = 273.7+272.6 ([M]⁺, ber.: 273.1 (13.3%), 272.1 (100%)).

C₁₂H₁₆O₇ (272.25) [272.09]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α,β -D-galactopyranosylnitrat (**3**)¹³¹

Eine Suspension von 156.6 g (0.29 mol) Cerammoniumnitrat in 300 mL absol. Acetonitril wird unter Argon auf -20 °C bis -30 °C gekühlt (Aceton/Trockeneisbad) und im Argon-Gegenstrom mit 9.31 g (0.14 mol)



Natriumazid versetzt. Danach wird eine Lösung von 15.10 g (92.2 mmol) Galactal **2**, gelöst in 200 mL absol. Acetonitril, zum Reaktionsgemisch über eine Kanüle gedrückt. Man beobachtet eine starke Gasentwicklung. Nach 20 h Rühren bei -25 °C wird die nun gelbe Suspension mit 500 mL kaltem Essigester versetzt und dreimal mit je 400 mL Eiswasser ausgeschüttelt. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Der erhaltene gelbe Feststoff wird durch Flashchromatographie an 1.5 L Kieselgel mit PE/EE 3:1 gereinigt.

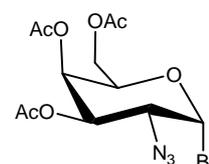
Ausb.: 13.85 g (36.81 mmol; 40% [35%-43%]); farbloser amorpher Feststoff.

R_F: 0.65 (EE); R_F: 0.57 (EE/PE 1:1).

C₁₂H₁₆N₄O₁₀ (376.28) [376.09]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-D-galactopyranosylbromid (**4**)¹³¹

Ein Gemisch aus 13.85 g (36.81 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-D-galactopyranosylnitrat (**3**) und 15.98 g (0.18 mol) LiBr in 250 mL



absol. Acetonitril wrd unter Argon und Lichtausschluß 14 h bei Raumtemp. gerührt. Die orangenfarbene Suspension wird filtriert und das Filtrat eingengt. Der gelbe Rückstand wird in 500 mL CH₂Cl₂ aufgenommen und zweimal mit je 450 mL Wasser ausgeschüttelt. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt.

Ausb. (Rohprodukt): 14.51 g (quant.); gelbes zähes Öl; R_F: 0.66 (EE/PE 1:1); [α]_D²² = +172.8

(c = 1.00, CHCl₃), Lit.¹³¹: [α]_D²² = +188.3 (c = 1.95, CHCl₃).

C₁₂H₁₆BrN₃O₇ (394.18) [393.02]

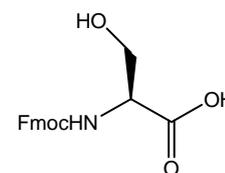
5.2.2 Synthesen zum Kapitel 3.1.1

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-serin (**5**)¹³⁴

Eine Lösung von 5.20 g (50 mmol) L-Serin in 100 mL Acetonitril (p. a.) und 6.96 mL (50 mmol) Triethylamin wird mit 16.9 g (50 mmol) Fmoc-ONSu versetzt. Zur farblosen Suspension werden innerhalb von 15 min. weitere 6.96 mL (50 mmol) Triethylamin zugetropft. Die farblose Lösung wird 30 min. bei Raumtemp. gerührt und dann i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird auf 200 mL einer 1 N HCl-Lösung gegossen, und nach 14 h bei 0 °C wird der Niederschlag abgenutscht. Der Niederschlag wird wieder in 500 mL CH₂Cl₂ gelöst und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösung wird teilweise eingengt und das Produkt mit Petrolether ausgefällt.

Ausb.: 11.10 g (33.9 mmol, 68% [68%-98%]); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.55 (EE/AcOH 1:1). Schmp.: 89-93 °C, Lit.¹³⁴: 90-95 °C, Lit.¹³⁵: 78-85 °C.

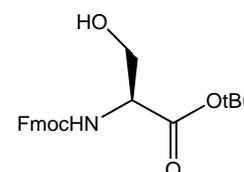
C₁₈H₁₇NO₅ (327.34) [327.11]



N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-serin-*tert*-butylester (**6**)¹³⁶

[Fmoc-Ser-O*t*Bu]

Unter Argon und Lichtausschluß wird ein Gemisch aus 25.18 g (0.12 mol) DCC, 13.02 g (0.18 mol) *tert*-Butanol und 0.80 g (0.01 mol) Kupfer(I)-chlorid drei Tage bei Raumtemp. gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch mit 50 mL absol. CH₂Cl₂ verdünnt, und die grüne Suspension mit 11.10 g (33.91 mmol) Fmoc-Ser-OH **5**, gelöst in 70 mL absol. CH₂Cl₂, versetzt. Der Fortgang der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach ca. 3 h Rühren bei Raumtemp. wird die blaugrüne Suspension i. Vak. bis zur Trockene eingengt. Der grüne Feststoff wird in 200 mL CH₂Cl₂ aufgenommen, einmal mit 100 mL einer 0.1 N HCl-Lösung sowie dreimal mit je 100 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die Lösung wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. 12.98 g Rohprodukt werden durch Flashchromatographie an Kieselgel mit PE/EE 2:1 gereinigt, und aus Diethylether/PE



¹³⁴ J. Habermann, Dissertation, Universität Mainz, 1997, 76.

¹³⁵ G.B. Fields, R.L. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1990, 35, 161.

¹³⁶ G. Braun, Dissertation, Universität Mainz, 1991, 103/104; H. Kunz in: *Preparative Carbohydrate Chemistry*, S. Hanessian, Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1997, 275.

umkristallisiert.

Ausb.: 8.08 g (21.1 mmol, 62% [58%-75%]); farbloser amorpher Feststoff;

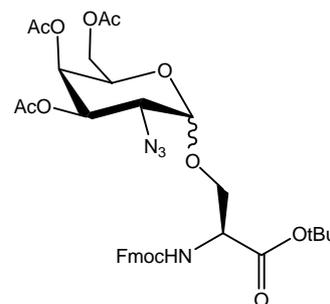
R_F: 0.46 (Tol/EtOH 10:1).

C₂₂H₂₅NO₅ (383.44) [383.17]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-*D*-galactopyranosyl)-*L*-serin-*tert*-butylester (7)¹³⁷**

[Fmoc-Ser(Ac₃GalN₃)-OtBu]

Zu 25 g pulverisiertem, ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å wird eine Lösung von 8.08 g (21.1 mmol) Fmoc-Ser-OtBu (**6**) in 70 mL absol. Toluol und 80 mL absol. CH₂Cl₂ gegeben. Die farblose Suspension wird auf -10 °C gekühlt und im Argon-Gegenstrom mit 8.12 g



(29.5 mmol) Silbercarbonat versetzt. Das Reaktionsgemisch wird unter Argon und Lichtausschluß 30 min. bei -10 °C gerührt. Nach der langsamen Zugabe von 1.05 g (5.06 mmol) Silberperchlorat¹³⁸ in 20 mL absol. Toluol wird das Reaktionsgemisch weitere 20 min. bei -10 °C gerührt. Dann wird zum Reaktionsgemisch über eine Kanüle eine Lösung von 14.51 g (36.81 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-*D*-galactopyranosylbromid **4** in 100 mL absol. Toluol/Dichlormethan (1:1) zugeführt und das Reaktionsgemisch 14 h bei Raumtemp. unter Argon und Lichtausschluß gerührt. Nach Verdünnen mit 100 mL Dichlormethan wird die gelbe Suspension über Celite filtriert, und das Filtrat zweimal mit je 150 mL einer 5 %-igen NaHCO₃-Lösung und einmal mit 100 mL Wasser ausgeschüttelt. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingeengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 1 L Kieselgel mit PE/EE 3:1 gereinigt.

Ausb.: 12.37 g (17.76 mmol, 84% [81%-96%]); hellgelber amorpher Feststoff.

R_F: 0.66 (PE/EE 1:1); FD-MS [m/z] = 698.0+697.0 (41.8%, [M+H]⁺, ber.: 697.3 (100%), 698.3 (38%)).

C₃₄H₄₀N₄O₁₂ (696.71) [696.26]

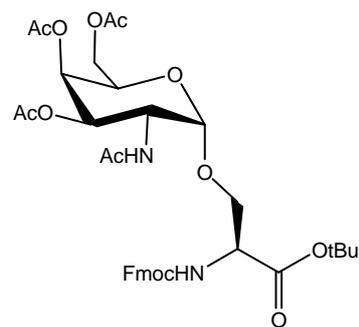
¹³⁷ nach J. Habermann, Dissertation, Universität Mainz 1997; statt einer Benzyl- wird die *t*Butyl-Schutzgruppe verwendet

¹³⁸ Silberperchlorat-Monohydrat wird mehrfach mit absol. Toluol i. Vak. kodestilliert.

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (8)¹³⁹**

[Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OtBu]

In 180 mL eines THF/Acetanhydrid/AcOH-Gemisches 3:2:1 werden 6.28 g (7.73 mmol) Fmoc-Ser(Ac₃GalN₃)-OtBu **7** gelöst und mit 7.50 g (0.12 mol) aktiviertem Zinkstaub¹⁴⁰ versetzt. Die Suspension wird 14 h bei Raumtemp. gerührt, über Celite filtriert



und der Niederschlag mit 250 mL CH₂Cl₂ nachgewaschen. Das Filtrat wird eingengt, zweimal mit je 50 mL Toluol kodestilliert, und der gelbe Rückstand in 200 mL EE aufgenommen. Die hellgelbe Lösung wird nun der Reihe nach mit 150 mL Wasser, 150 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung und wieder 150 mL Wasser ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 500 mL Kieselgel mit PE/EE 1:2 gereinigt sowie das Anomerengemisch aufgespalten.

Ausb.: 4.78 g (6.71 mmol, 87% (64% [59-64%] α , 23% β)); farbloser amorpher Feststoff; R_F: α : 0.43 (EE), β : 0.35 (EE).

α -Anomer:

200 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J_{5,6} = ³J_{4,3} = 6.9 Hz); 7.60 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³J_{1,2} = ³J_{8,7} = 7.3 Hz); 7.35 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 5.72 (d, 1H, NH Fmoc, J_{NH,S- α} = 7.9 Hz); 5.65 (d, 1H, NH GalNHAc, ³J_{NH,H2} = 9.7 Hz); 5.36 (d, 1H, H4, ³J_{4,5} = 3.4 Hz); 5.10 (dd, 1H, H3, ³J_{3,4} = 3.4 Hz, ³J_{3,2} = 11.2 Hz); 4.82 (d, 1H, H1, ³J_{1,2} = 3.0 Hz); 4.65-4.45 (m, 2H, H2, S ^{α}); 4.40 (d, 2H, CH₂-Fmoc, ³J_{CH₂,H9} = 7.8 Hz); 4.25-3.90 (m, 6H, H9-Fmoc, H5, H6a, H6b, S ^{β}); 2.15 (s, 3H, CH₃ OAc); 1.98 (s, 6H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc); 1.92 (s, 3H, CH₃ OAc); 1.45 (s, 9H, CH₃ *t*Bu).

FD-MS [m/z] = 713.2+714.2 ([M+H]⁺, ber.: 713.3 (100%), 714.3 (40%)).

C₃₆H₄₄N₂O₁₃ (712.75) [712.28]

¹³⁹ E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Saleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1*, **1996**, 985.

¹⁴⁰ Der Zinkstaub wurde 5 min. in 2 %-iger CuSO₄-Lösung gerührt, abfiltriert und mit etwas EE gewaschen.

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

[Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OH]

Variante ausgehend von Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OtBu **8**:¹⁴¹

Es werden 3.46 g (4.85 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OtBu (**8**) in 15 mL CH₂Cl₂ p.a. mit 15 mL TFA sowie 2.5 mL Anisol versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 6 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt, und dann mit 40 mL Toluol verdünnt. Das Lösungsmittel wird destillativ entfernt und der Rückstand dreimal mit je 40 mL Toluol kodesilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 250 mL Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH/AcOH/H₂O 94:5:0.5:0.1 vorgereinigt, und dann mittels präparativer HPLC (Säule LUNA, Gradient K) von letzten Verunreinigungen befreit.

Ausb.: 2.34 g (3.56 mmol, 73%); farbloser amorpher Feststoff.

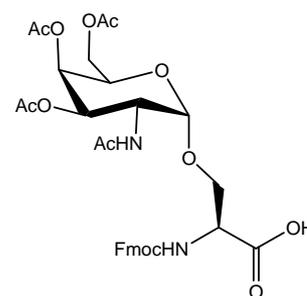
Variante ausgehend von Boc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OtBu **14**:

Es werden 0.35 g (0.59 mmol) Boc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OtBu (**14**) in 4 mL CH₂Cl₂ p.a. gelöst und mit 4 mL TFA sowie 0.3 mL Anisol versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 2 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt, und dann mit 15 mL Toluol verdünnt. Das Lösungsmittel wird destillativ entfernt und der Rückstand dreimal mit je 15 mL Toluol kodesilliert. Der Rückstand wird wieder in 10 mL CH₂Cl₂ gelöst und mit 1.5 Äquiv. Fmoc-OSu (298 mg, 0.89 mmol) versetzt. Nach Aktivierung durch Zugabe von 0.15 mL (0.89 mmol) DIPEA wird die Lösung 14 h bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird mit saurem Ionenaustauscher Dowex 50Wx8 neutralisiert, filtriert, i. Vak. eingeeengt und der Rückstand durch Flashchromatographie an 70 mL Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH/AcOH/H₂O 94:5:0.5:0.1 gereinigt.

Ausb.: 306 mg (0.47 mmol, 79%); farbloser amorpher Feststoff.

R_F: 0.10 (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH/H₂O 94:5:0.5:0.1); [α]_D²² = +76.0 (c = 3.69, CHCl₃); HPLC: (Säule LUNA), Gradient K, R_t = 35.2 min.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.73 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J_{5,6} = ³J_{4,3} = 7.4 Hz); 7.58 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³J_{1,2} = ³J_{8,7} = 6.3 Hz); 7.38-7.12 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 6.25 (d, 1H, NH-Fmoc, J_{NH,S- α} = 7.6 Hz); 6.20 (d, 1H, Ac-NH-Gal, ³J_{NH,H2} = 8.6 Hz); 5.35



¹⁴¹ S. Keil, Dissertation, Universität Mainz, 2000, 76. In der vorliegenden Arbeit wurde Serin statt Threonin verwendet.

(m/s, 1H, H4); 5.17 (dd, 1H, H3, $^3J_{3,4} = 1.96$ Hz, $^3J_{3,2} = 11.4$ Hz); 4.95 (d, 1H, H1, $^3J_{1,2} = 2.4$ Hz); 4.62-4.32 (m, 2H, H2, S $^\alpha$); 4.44 (d, 2H, CH₂-Fmoc, $^3J_{CH_2,H9} = 7.1$ Hz); 4.21-3.95 (m, 6H, H9-Fmoc, H5, H6a, H6b, S $^\beta$); 2.34 (s, 3H, CH₃ OAc); 2.14 (s, 3H, CH₃ OAc); 1.97 (s, 6H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc).

100.6 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 171.1, 170.5, 170.3 (C=O); 156.0 (C=O Urethan); 143.7 (C4a-, C4b-Fmoc); 141.3 (C8a-, C9a-Fmoc); 129.0, 128.2, 127.8, 127.1 (C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc); 125.3, 125.0 (C1-, C8-Fmoc); 120.1 (C4-, C5-Fmoc); 98.6 (C1); 69.4, 68.1, 67.2 (S $^\beta$, C3, C4, C5, OCH₂-Fmoc); 61.9 (C6); 54.5 (S $^\alpha$); 48.0, 47.1 (C2, C9-Fmoc); 22.7, 21.5, 20.7, 20.6 (CH₃ NHAc, 3*CH₃ OAc).

ESI-MS [m/z] = 657.2, 658.2 ([M+H]⁺, ber.: 657.2 (100%), 658.2 (37%)), 679.2 ([M+Na+H]⁺, ber.: 679.6).

C₃₂H₃₆N₂O₁₃ (656.63) [656.22]

Testreaktion zur Einführung der Boc-Schutzgruppe:

Es werden 60.4 mg (0.092 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OH (**9**) in 8 mL DMF/Piperidin 4:1 gelöst und 5 min bei Raumtemp. gerührt. Durch Dünnschichtchromatographie wird die vollständige Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe überprüft, und dann das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird wieder in 10 mL CH₂Cl₂ gelöst und mit 1.2 Äquiv. Fmoc-OSu (37.2 mg, 0.11 mmol) versetzt. Nach Aktivierung durch Zugabe von 18.8 μ L (0.11 mmol) DIPEA wird die Lösung 14 h bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird mit saurem Ionenaustauscher Dowex 50Wx8 neutralisiert, filtriert, i. Vak. eingengt und der Rückstand durch Flashchromatographie an 70 mL Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH/AcOH/H₂O 94:5:0.5:0.1 gereinigt.

Ausb.: 50.8 mg (0.077 mmol, 84%); farbloser amorpher Feststoff.

R_F: 0.10 (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH/H₂O 94:5:0.5:0.1); $[\alpha]_D^{22} = +75.6$ (c = 3.69, CHCl₃); HPLC: (Säule LUNA), Gradient K, R_t = 35.1 min.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.73 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J_{5,6} = ^3J_{4,3} = 7.4$ Hz); 7.58 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $^3J_{1,2} = ^3J_{8,7} = 6.3$ Hz); 7.38-7.12 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 6.25 (d, 1H, NH-Fmoc, $J_{NH,S-\alpha} = 7.6$ Hz); 6.20 (d, 1H, Ac-NH-Gal, $^3J_{NH,H2} = 8.6$ Hz); 5.35 (m/s, 1H, H4); 5.17 (dd, 1H, H3, $^3J_{3,4} = 1.96$ Hz, $^3J_{3,2} = 11.4$ Hz); 4.95 (d, 1H, H1, $^3J_{1,2} = 2.4$ Hz); 4.62-4.32 (m, 2H, H2, S $^\alpha$); 4.44 (d, 2H, CH₂-Fmoc, $^3J_{CH_2,H9} = 7.1$ Hz); 4.21-3.95 (m, 6H, H9-Fmoc, H5, H6a, H6b, S $^\beta$); 2.34 (s, 3H, CH₃ OAc); 2.14 (s, 3H, CH₃ OAc); 1.97 (s, 6H, CH₃ OAc, CH₃ NHAc).

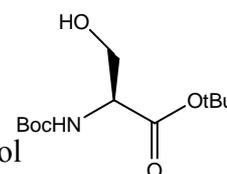
100.6 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 171.1, 170.5, 170.3 (C=O); 156.0 (C=O Urethan); 143.7 (C4a-, C4b-Fmoc); 141.3 (C8a-, C9a-Fmoc); 129.0, 128.2, 127.8, 127.1 (C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc); 125.3, 125.0 (C1-, C8-Fmoc); 120.1 (C4-, C5-Fmoc); 98.6 (C1); 69.4, 68.1, 67.2 (S^β, C3, C4, C5, OCH₂-Fmoc); 61.9 (C6); 54.5 (S^α); 48.0, 47.1 (C2, C9-Fmoc); 22.7, 21.5, 20.7, 20.6 (CH₃ NHAc, 3*CH₃ OAc).

ESI-MS [m/z] = 657.2, 658.2 ([M+H]⁺, ber.: 657.2 (100%), 658.2 (37%)), 679.2 ([M+Na+H]⁺, ber.: 679.6).

C₃₂H₃₆N₂O₁₃ (656.63) [656.22]

***tert*-Butoxycarbonyl-L-serin-*tert*-butylester (12)¹³⁶**

[Boc-Ser-OtBu]



Ein Gemisch aus 70.38 g (0.34 mol) DCC, 50.57 g (0.68 mol) *tert*-Butanol und 1.80 g (0.19 mol) Kupfer(I)-chlorid wird unter Argon und Lichtausschluß fünf Tage bei Raumtemp. gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch mit 200 mL absol. CH₂Cl₂ verdünnt, und die auf 0 °C gekühlte grüne Suspension wird portionsweise mit 20.0 g (97.5 mmol) Boc-Ser-OH (**11**) versetzt. Das Eisbad wird durch ein Wasserbad ersetzt und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Der Fortgang der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Das Reaktionsgemisch wird mit 200 mL CH₂Cl₂ verdünnt und über Celite filtriert, das Filtrat wird einmal mit 150 mL einer 0.1 N HCl-Lösung sowie dreimal mit je 200 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die Lösung wird über MgSO₄ getrocknet, i. Vak. eingengt und mit 100 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt werden durch Flashchromatographie an Kieselgel mit PE/EE 3:1 gereinigt, und aus PE/EE ausgefällt.

Ausb.: 20.51 g (78.5 mmol, 81%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.26 (PE/EE 3:1); [α]_D²² = +8.8 (c = 2.60, CHCl₃), Lit.:¹³⁶ +8.2 (c = 1.00, CHCl₃).

200 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 5.42 (s_b, 1H, NH); 4.22 (m, 1H, α-CH Ser); 3.87 (d, 2H, β-CH₂ Ser, ³J_{α,β} = 3.9 Hz); 2.40 (s_b, 1H, OH); 1.46 (s, 9H, CH₃ *t*Bu); 1.43 (s, 9H, CH₃ *t*Bu).

50.5 MHz-HMQC-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 169.8 (C=O); 155.9 (CO Urethan); 82.6, 80.1 (C_{tert} *t*Bu); 64.0 (β-CH₂ Ser); 56.4 (α-CH Ser); 28.3, 28.0 (CH₃ *t*Bu).

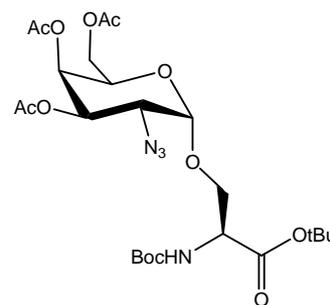
FD-MS [m/z] = 161.2 ([M-Boc+H]⁺, ber.: 161.1); 262.1, 263.1, 264.1 ([M+H]⁺, ber.: 262.2 (100.0%), 263.2 (13.3%), 264.2 (1.0%)).

C₁₂H₂₃NO₅ (261.31) [261.16]

***tert*-Butoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-*D*-galactopyranosyl)-*L*-serin-*tert*-butylester (**13**)**

[Boc-Ser(Ac₃GalN₃)-OtBu]

Zu 28 g pulverisiertem, ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å wird eine Lösung von 14.91 g (57.1 mmol) Boc-Ser-OtBu (**12**) in 110 mL absol. Toluol und 110 mL absol. CH₂Cl₂ gegeben. Die farblose Suspension wird auf -10 °C gekühlt und im Argon-Gegenstrom mit



10.26 g (37.3 mmol) Silbercarbonat versetzt. Das Reaktionsgemisch wird unter Argon und Lichtausschluß 30 min. bei -10 °C gerührt. Nach der langsamen Zugabe von 1.58 g (7.61 mmol) Silberperchlorat¹³⁸ in 30 mL absol. Toluol wird das Reaktionsgemisch weitere 30 min. bei -10 °C gerührt. Dann wird zum Reaktionsgemisch über eine Kanüle eine Lösung von 15.05 g (38.0 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-*D*-galactopyranosylbromid **4** in 120 mL absol. Toluol/Dichlormethan (1:1) zugeführt und das Reaktionsgemisch 14 h bei Raumtemp. unter Argon und Lichtausschluß gerührt. Nach Verdünnen mit 100 mL Dichlormethan wird die gelbe Suspension über Celite filtriert, und das Filtrat zweimal mit je 150 mL einer 5 %-igen NaHCO₃-Lösung und einmal mit 150 mL Wasser ausgeschüttelt. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 2 L Kieselgel mit PE/EE 4:1 gereinigt.

Ausb.: 6.10 g (10.6 mmol, 28%); farbloser amorpher Feststoff, Anomerengemisch.

Nach NMR-Daten liegt ein α/β Verhältnis von ca. 5:2 vor (an H3 normiert);

R_F: 0.61 (PE/EE 1:1).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 5.42 (d, 1H, NH, ³J_{NH,S- α} = 8.6 Hz); 5.35 (d, 1H, H4, ³J_{4,3} = 2.0 Hz); 5.18 (dd, 1H, H3, ³J_{3,4} = 2.0 Hz, ³J_{3,2} = 11.0 Hz); 4.87 (d, 1H, H1, ³J_{1,2} = 3.5 Hz); 4.30-3.80 (m, 6H, H5, H6, α -CH Ser, β -CH₂ Ser); 3.57 (dd, 1H, H2, ³J_{2,1} = 3.5 Hz, ³J_{2,3} = 11.0 Hz); 2.04, 1.97, 1.96 (s, 9H, 3*CH₃ OAc); 1.40, 1.36 (s, 18H, 6*CH₃ tBu). Es tritt eine Signalverdopplung auf (Anomerengemisch).

100.6 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 171.1, 170.5, 170.3 (C=O); 156.0 (C=O Urethan); 99.0 (C1); 70.8, 70.5 (C_{tert} tBu); 69.9 (β -CH₂ Ser); 68.0, 67.3, 66.9 (C3, C4, C5); 61.4 (C6); 57.4 (S ^{α}); 54.4 (C2); 28.2, 27.9 (CH₃ tBu); 20.6, 20.5 (3*CH₃ OAc).

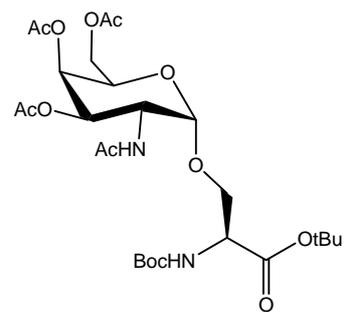
FD-MS [m/z] = 473.9 ([M-Boc+H]⁺, ber.: 474.2); 575.8, 576.8 ([M+H]⁺, ber.: 575.2 (100.0%), 576.3 (26.7%)).

C₂₄H₃₈N₄O₁₂ (574.58) [574.25]

***tert*-Butoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (**14**)¹³⁹**

[Boc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-OtBu]

In 180 mL eines THF/Acetanhydrid/AcOH-Gemisches 9:6:2 werden 6.10 g (10.62 mmol) Fmoc-Ser(Ac₃GalN₃)-OtBu (**13**) gelöst und mit 6.94 g (0.11 mol) aktiviertem Zinkstaub¹⁴⁰ versetzt.



Die Suspension wird 14 h bei Raumtemp. gerührt, über Celite filtriert und der Niederschlag mit 150 mL CH₂Cl₂ nachgewaschen. Das Filtrat wird über MgSO₄ getrocknet, i. Vak. eingengt und zweimal mit je 30 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 1.5 L Kieselgel mit PE/EE 2:1 gereinigt sowie das Anomerengemisch aufgespalten.

Ausb.: α : 2.86 g (4.84 mmol, 46%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.45 (EE); $[\alpha]_D^{22} = +65.4$ (c = 3.50, CHCl₃).

β : 2.31 g (3.91 mmol, 37%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.39 (EE).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 5.78 (d, 1H, NHAc, ³J_{NH,H2} = 9.0 Hz); 5.41 (m, 1H, NHBoc); 5.34 (d, 1H, H4, ³J_{4,3} = 3.1 Hz); 5.08 (dd, 1H, H3, ³J_{3,4} = 3.1 Hz, ³J_{3,2} = 9.6 Hz); 4.80 (d, 1H, H1, ³J_{1,2} = 3.1 Hz); 4.55 (dt, 1H, H2, ³J_{2,1} = 3.1 Hz, ³J_{2,3} = 9.6 Hz, ³J_{H2,NH} = 9.0 Hz); 4.32 (m, 1H, α -CH Ser); 4.14-4.00 (m, 3H, H5, H6); 3.88 (m, 1H, β -CH_AH_B Ser); 3.80 (dd, 1H, β -CH_AH_B Ser, ³J _{β , α} = 2.7 Hz, ³J_{B,A} = 10.6 Hz); 2.14, 2.02, 1.96, 1.92 (s, 12H, 3*CH₃ OAc, CH₃ NHAc); 1.43, 1.42 (s, 18H, 6*CH₃ *t*Bu).

100.6 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 170.9, 170.4, 170.3 (C=O); 155.2 (C=O Urethan); 98.7 (C1); 82.7, 80.3 (C_{tert} *t*Bu); 69.3 (β -CH₂ Ser); 68.4, 67.2, 67.1 (C3, C4, C5); 61.8 (C6); 54.3 (S ^{α}); 47.5 (C2); 28.2, 28.0 (CH₃ *t*Bu); 23.1 (CH₃ NHAc); 20.7, 20.6 (3*CH₃ OAc).

FD-MS [m/z] = 489.9 ([M-Boc+H]⁺, ber.: 490.2); 591.9, 592.9 ([M+H]⁺, ber.: 591.3 (100.0%), 592.3 (28.9%)).

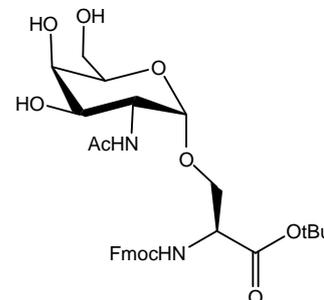
C₂₆H₄₂N₂O₁₃ (590.62) [590.27]

5.2.3 Synthesen zum Kapitel 3.1.2

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-serin-*tert*-butylester (**15**)¹⁴¹

[Fmoc-Ser(α -GalNAc)-*Ot*Bu]

Eine Lösung von 1.84 g (2.58 mmol) Fmoc-Ser(α -Ac₃GalNAc)-*Ot*Bu **8** in 70 mL MeOH p.a. wird tropfenweise mit 1 %-iger Natriummethanolat-Lösung in MeOH versetzt, bis ein pH-Wert zwischen 8.0 und 8.5 erreicht wird (ca. 350 Tropfen). In den folgenden 5 Stunden wird der pH-Wert stündlich durch tropfenweise Zugabe von einer 1 %-igen Natriummethanolat-Lösung in MeOH nachgestellt. Das Reaktionsgemisch wird 14 h bei Raumtemp. nachgerührt. Dann wird die Reaktion durch Zugabe von drei Spatelspitzen saurem Ionenaustauscher Dowex 50Wx8 beendet. Nach 30 min. Rühren bei Raumtemp. wird der Ionenaustauscher abfiltriert, das Filtrat eingengt und der Rückstand durch Flashchromatographie an 200 g Kieselgel mit EE/MeOH 9:1 gereinigt. Soll das Produkt nicht für eine Glycosylierung, sondern z.B. für eine weitere Schutzgruppenmanipulation verwendet werden, empfiehlt es sich, auf die Flashchromatographie zu verzichten, wodurch sich die Ausbeute um ca. 10 % steigern läßt.



Ausb.: 1.09 g (1.86 mmol, 72%); farbloser amorpher Feststoff; R_F : 0.15 (EE/MeOH 9:1).

200 MHz-¹H-NMR (CD₃OD), δ [ppm]: 7.84 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³ $J_{5,6} =$ ³ $J_{4,3} = 6.8$ Hz); 7.72 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³ $J_{1,2} =$ ³ $J_{8,7} = 7.3$ Hz); 7.39 (dm, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 4.83 (d, 1H, H1, ³ $J_{1,2} = 3.4$ Hz); 4.49 (d, 1H, H4, ³ $J_{4,5} = 3.4$ Hz); 4.45-4.23 (m, 4H) + 3.95-3.70 (m, 7H) (H2, H9 Fmoc, S ^{α} , S ^{β} , H2, H3, H5, H6 Gal); 1.98 (s, 3H, CH₃-CO-NH-Gal); 1.50 (s, 9H, *t*Bu)

FD-MS [m/z] = 586.9 (33.2%, [M]⁺, ber.: 586.3); 365.8 (43.3%, [M-Fmoc+H]⁺, ber.: 365.2).

C₃₀H₃₈N₂O₁₀ (586.64) [586.25]

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-*p*-methoxybenzyliden- α -D-galactopyranosyl)-*L*-serin-*tert*-butylester (**16**)⁸⁷

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

Eine Lösung von 2.88 g (4.91 mmol) Fmoc-Ser(α -GalNAc)-*Ot*Bu **15** in 250 mL Acetonitril wird mit 3 mL *p*-Methoxy-benzaldehyddimethylacetal versetzt, mit *p*-Toluolsulfonsäure auf

pH 4 gestellt und 6 h bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit Triethylamin neutralisiert und i. Vak. eingengt. Das gelbe Öl wird dann durch Flashchromatographie an 1.5 L Kieselgel mit PE/EE 1:1 gereinigt.

Ausb.: 2.59 g (3.69 mmol, 76%); farbloser amorpher Feststoff; R_F : 0.30 (EE), 0.19 (PE/EE 1:3); $[\alpha]_D^{22} = +60.5$ (c = 1.07, CH₂Cl₂).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.83 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J_{4,3} = ^3J_{5,6} = 7.6$ Hz); 7.58 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.44-7.14 (m, 6H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 2*H_{meta} Pmb); 6.99 (d, 2H, 2*H_{ortho} Pmb, $^3J_{o,m} = 8.6$ Hz); 6.53 (d, 1H, NH GalNHAc, $^3J_{NH,H2} = 8.4$ Hz); 6.03 (d, 1H, NH Fmoc, $^3J_{NH,S-\alpha} = 7.4$ Hz); 5.48 (s, 1H, CH-Pmb); 4.99 (d, 1H, H1, $^3J_{1,2} = 2.0$ Hz); 4.49-4.31 (m, 4H, H2, CH₂-Fmoc, α -CH Ser); 4.29-4.17 (m, 2H, H9-Fmoc, β -CH₂H_b Ser); 3.98-3.64 (m, 9H, β -CH₂H_b Ser, H3, H4, H5, H6, OCH₃-Pmb); 2.04 (s, 3H, CH₃ GalNHAc); 1.47 (s, 9H, CH₃-*t*Bu). Es tritt teilweise eine durch Konformere der Pmb-Schutzgruppe bedingte Signalverdopplung auf.

103.0 MHz-HMQC-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 174.8, 169.5 (C=O); 160.2 (C_{para}-Pmb); 155.9 (CO-Urethan); 143.6 (C4a-, C4b-Fmoc); 141.3 (C8a-, C9a-Fmoc); 130.0 (C_{ipso}-Pmb); 127.8, 127.7, 127.1 (C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc, C_{tert.}-Pmb); 125.0 (C1-, C8-Fmoc); 120.1, 120.0 (C4-, C5-Fmoc); 114.3, 113.6 (C_{tert.}-Pmb); 101.1 (CH-Pmb); 99.5 (C1); 83.0 (C_{quart}-*t*Bu); 75.3 (C4); 69.4 (C3), 69.1 (β -CH₂ Ser); 67.2 (CH₂-Fmoc); 63.4 (C5); 62.7 (C6); 55.3 (OCH₃ Pmb); 55.0 (α -CH Ser); 50.2 (C2); 47.1 (C9-Fmoc); 28.0 (CH₃-*t*Bu); 23.2 (CH₃ GalNHAc).

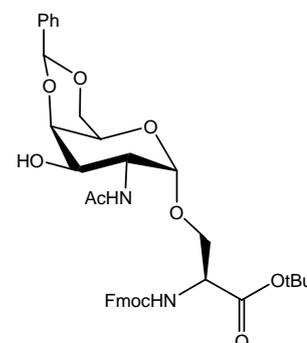
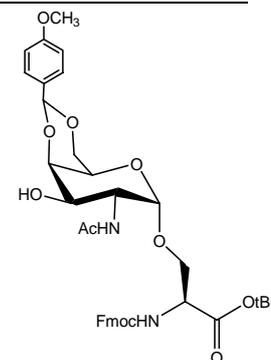
FD-MS [m/z] = 704.6+705.6 ([M]⁺, ber.: 704.3 (100.0%), 705.3 (42.3%)).

C₃₈H₄₄N₂O₁₁ (704.76) [704.29]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (17)**

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

Eine Lösung von 3.64 g (4.91 mmol) Fmoc-Ser(α -GalNAc)-*Ot*Bu **15** in 200 mL Acetonitril wird mit 4 mL Benzaldehyddimethylacetal versetzt, mit *p*-Toluolsulfonsäure auf pH 3.5-4.0 gestellt und 14 h bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit Triethylamin neutralisiert und i. Vak. eingengt. Das gelbe Öl wird durch Flashchromatographie an 1.5 L Kieselgel mit EE gereinigt.



Ausb.: α : 2.76 g (3.91 mmol, 63%); farbloser amorpher Feststoff; R_F : 0.26 (EE); $[\alpha]_D^{22} = +56.3$ (c = 2.70, CHCl₃). β : 1.55 g (2.29 mmol, 36%); farbloser amorpher Feststoff; R_F : 0.07 (EE); $[\alpha]_D^{22} = +2.9$ (c = 2.51, CHCl₃).

α -Anomer:

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.77 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J_{5,6} = ^3J_{4,3} = 7.4$ Hz); 7.58 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.50 (m, 1H, *p*-Ph); 7.40 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $^3J = 7.44$ Hz); 7.37-7.33 (m, 4H, *o,m*-Ph); 7.32 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 6.04 (d, 1H, Ac-NH-Gal, $^3J_{NH,H2} = 8.6$ Hz); 5.78 (d, 1H, NH-Fmoc, $^3J_{NH,S-\alpha} = 8.2$ Hz); 5.52 (s, 1H, CH-Ph); 4.90 (d, 1H, H1, $^3J_{1,2} = 2.4$ Hz); 4.49-4.34 (m, 4H, H2 (4.47), CH₂-Fmoc (4.43+4.36), α -CH Ser (4.41)); 4.23-4.19 (m, 2H, H9-Fmoc, β -CH_aH_b Ser); 4.16 (d, 1H, H4, $^3J_{4,3} = 3.1$ Hz); 3.98-3.93 (m, 2H, β -CH_aH_b Ser (3.96), H6a (3.95)); 3.86-3.80 (m, 2H, H6b (3.84), H3 (3.82)); 3.64 (s_b, 1H, H5); 2.00 (s, 3H, CH₃ GalNHAc); 1.47 (s, 9H, CH₃ *t*Bu).

103.0 MHz-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 129.1 (*o*-Ph); 127.9 (*m*-Ph); 127.6 (C2-, C7-Fmoc); 127.0 (C3-, C6-Fmoc); 126.2 (*p*-Ph); 124.8 (C1-, C8-Fmoc); 120.0 (C4-, C5-Fmoc); 101.1 (CH-Ph); 99.4 (C1); 75.2 (C4); 69.0 (β -CH₂ Ser); 68.9 (C3); 67.1 (CH₂-Fmoc); 63.4 (C5); 62.7 (C6); 54.8 (α -CH Ser); 50.2 (C2); 47.0 (C9-Fmoc); 27.9 (CH₃-*t*Bu); 23.1 (GalNHAc).

β : 400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J_{5,6} = ^3J_{4,3} = 7.4$ Hz); 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $^3J_{1,2} = ^3J_{8,7} = 7.4$ Hz); 7.48 (m, 1H, *p*-Ph); 7.38 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 7.35-7.31 (m, 4H, *o,m*-Ph); 7.29 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 6.24 (bs, 1H, AcNHGal); 5.93 (d, 1H, NH-Fmoc, $^3J_{NH,S-\alpha} = 7.4$ Hz); 5.54 (s, 1H, CH-Ph); 4.70 (d, 1H, H1, $^3J_{1,2} = 8.2$ Hz); 4.44-4.26 (m, 4H, CH₂-Fmoc (4.42+4.35), α -CH Ser (4.41), β -CH_aH_b Ser (4.28)); 4.21 (t, 1H, H9-Fmoc, $^3J_{9,CH2} = 7.1$ Hz); 4.16-4.11 (m, 2H, H4 (4.14), H6a (4.13)); 4.05-3.98 (m, 2H, β -CH_aH_b Ser (4.03), H6b (3.99)); 3.96 (dd, 1H, H3, $^3J_{3,4} = 3.91$ Hz, $^3J_{3,2} = 10.6$ Hz); 3.73 (m, 1H, H2); 3.43 (s_b, 1H, H5); 1.98 (s, 3H, CH₃ GalNHAc); 1.47 (s, 9H, CH₃ *t*Bu).

103.0 MHz-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 129.0 (*o*-Ph); 128.3 (*m*-Ph); 127.7 (C2-, C7-Fmoc); 127.1 (C3-, C6-Fmoc); 126.4 (*p*-Ph); 125.0 (C1-, C8-Fmoc); 120.0 (C4-, C5-Fmoc); 101.2 (CH-Ph); 99.6 (C1); 74.9 (C4); 71.1 (C3); 68.9 (β -CH₂ Ser); 68.8 (C6); 67.0 (CH₂-Fmoc); 66.7 (C5); 55.0 (C2); 54.5 (α -CH Ser); 47.0 (C9-Fmoc); 27.8 (CH₃-*t*Bu); 23.3 (GalNHAc).

ESI-MS [m/z] = 641.5 ([M+Na+H-*t*Bu]⁺, ber.: 641.3), 657.5 ([M+K+H-*t*Bu]⁺, ber.: 657.4); 697.5 ([M+Na]⁺, ber.: 697.3), 713.4 ([M+K]⁺, ber.: 713.4).

ESI-MS hochauflösend [m/z] = 697.2750 ([M+Na]⁺, ber.: 697.2732, $\Delta = 2.58$ ppm);

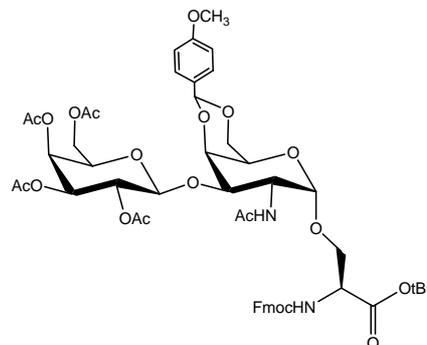
HPLC-Reinheit (254 nm): 92.5%.

$C_{37}H_{42}N_2O_{10}$ (674.74) [674.28]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-*p*-methoxybenzyliden-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (18)⁸⁷**

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

In einer Suspension aus 80 mL CH₂Cl₂/Nitromethan 1:1 und 6 g Molsieb 4 Å werden 2.34 g (3.32 mmol) Fmoc-Ser(α -GalNAc-4,6-*O*-Pmb)-OtBu **16** und 4.09 g (9.96 mmol, 3 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl-



bromid (**1**) eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Nach der Zugabe von 1.67 g (6.64 mmol, 2 Äquiv.) Hg(CN)₂ wird das Reaktionsgemisch weitere 2.5 h bei Raumtemp. gerührt, und dann wieder mit 1.67 g Hg(CN)₂ versetzt. Die Suspension wird nun 14 h bei Raumtemp. gerührt, mit 60 mL CH₂Cl₂ verdünnt und über Celite in 100 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. filtriert. Die org. Phase wird abgetrennt, zweimal mit 100 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung, einmal mit 100 mL einer ges. NaI-Lösung und ein letztes Mal mit 100 mL einer ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die Lösung wird nun über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingeeengt und dann durch Flashchromatographie an 1.5 L Kieselgel mit PE/EE 3:1 \rightarrow 1:1 \rightarrow 0:1 gereinigt.

Ausb.: 2.40 g (2.32 mmol, 70%, Lit.:⁸⁷ 80%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.43 (EE); $[\alpha]_D^{22} = +50.7$ (c = 2.42, CHCl₃).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.82 (d, 2H, H_{Ar}yl Pmb, ³J = 9.0 Hz); 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J_{5,6} = ³J_{4,3} = 7.4 Hz); 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³J_{1,2} = ³J_{8,7} = 7.4 Hz); 7.42 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, ³J_{6,5} = ³J_{3,4} = 7.4 Hz); 7.31 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, ³J_{2,1} = ³J_{7,8} = 7.4 Hz); 6.99 (d, 2H, H_{Ar}yl Pmb, ³J = 9.0 Hz); 5.83 (d, 1H, NH NHAc, ³J_{NH,H2} = 7.6 Hz); 5.65 (d, 1H, NH Ser, ³J_{NH,S α} = 8.6 Hz); 5.47 (s, 1H, CH Acetal); 5.34 (d, 1H, H4'', ³J_{4,3} = 2.7 Hz); 5.17 (dd, H2'', ³J_{2,1} = 7.8 Hz, ³J_{2,3} = 10.2 Hz); 4.96-4.77 (m, 2H, H1, H3''); 4.55-4.33 (m, 3H, α -CH Ser, CH₂ Fmoc); 4.23-3.60 (m, 15H, H1'', H2, H3, H4, H5, H5'', H6, H6'', H9-Fmoc (4.22), β -CH₂ Ser, OCH₃-Pmb (3.78)); 2.14 (s, 3H, CH₃ OAc); 2.05-1.91 (m, 12H, 3* CH₃ OAc, CH₃ NHAc); 1.47 (s, 9H, *t*Bu Ser). Es tritt teilweise eine durch Konformere der Pmb Schutzgruppe bedingte Signalverdopplung auf.

103.0 MHz- ^{13}C -NMR (CDCl_3), δ [ppm]: 170.4, 170.2, 170.1, 169.3 (C=O); 164.6 (C=O Urethan); 160.2 (C_{para} -Pmb); 143.6 (C4a-, C4b-Fmoc); 141.3 (C8a-, C9a-Fmoc); 129.9 (C_{ipso} -Pmb); 127.9, 127.1 (C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc, $\text{C}_{\text{tert.}}$ -Pmb); 124.9 (C1-, C8-Fmoc); 120.1 (C4-, C5-Fmoc); 114.3 ($\text{C}_{\text{tert.}}$ -Pmb); 101.5 (CH-Pmb, C1''); 99.2 (C1); 83.1 ($\text{C}_{\text{quart.}}$ -*t*Bu); 78.1 (C4); 70.9, 70.6, 70.0, 69.0, 68.5 (C2'', C3'', C4'', C5, C5'', β -CH₂ Ser); 67.0 (OCH₂-Fmoc); 66.9 (C3); 62.8, 61.4 (C6, C6''); 55.6, 55.0 (α -CH Ser, OCH₃-Pmb); 47.6, 47.1 (C2, C9-Fmoc); 28.0 (CH₃ *t*Bu); 23.2 (CH₃ NHAc); 20.6 (4*OAc).

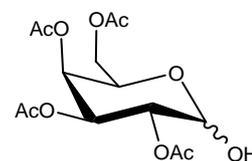
ESI-MS [m/z] = 1034.3, 1035.3, 1036.4 ($[\text{M}]^+$, ber.: 1034.4 (100.0%), 1035.4 (57.8%), 1036.4 (16.4%)).

$\text{C}_{52}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_{20}$ (1035.05) [1034.39]

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetylgalactose (**20**)¹⁴²

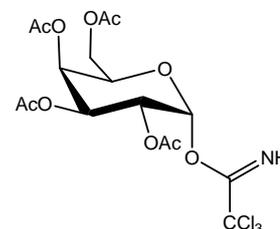
Eine Lösung von 5.00 g (12.8 mmol) Penta-*O*-acetylgalactose in 20 mL DMF wird auf 50 °C erwärmt, mit 1.30 g (15.5 mmol) Hydrazinacetat versetzt und 60 min gerührt. Die auf Raumtemp. abgekühlte Lösung wird mit 50 mL EE verdünnt und zweimal mit 50 mL Wasser sowie einmal mit 50 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung extrahiert. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie an 500 mL Kieselgel mit PE/EE 3:1 gereinigt. Ausb.: 3.30 g (9.5 mmol, 74%, Lit.:¹⁴² 92%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.48 (EE), 0.31 (PE/EE 2:1).

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ (348.30) [348.11]



O-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl)trichloracetimidat (**21**)¹⁴³

Eine Lösung von 4.80 g (13.8 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetylgalactose **20** in 30 mL abs. CH₂Cl₂ wird mit 0.68 g (28.4 mmol) Natriumhydrid als 60 %-ige Dispersion in Mineralöl versetzt. Man beobachtet starke Gasentwicklung. Die Suspension wird langsam mit 3.78 mL Trichloracetonitril versetzt und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Die Suspension wird über Celite filtriert und das Filtrat i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie an 600 mL Kieselgel mit PE/EE 3:1 gereinigt.



¹⁴² H. Herzner, J. Eberling, M. Schultz, J. Zimmer, H. Kunz, *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, 759.

¹⁴³ M. Stumpp, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1249.

Ausb.: 4.55 g (9.2 mmol, 67%, Lit.:¹⁴³ 78%); gelber amorpher Feststoff; 0.19 (PE/EE 3:1).

C₁₆H₂₀Cl₃NO₁₀ (492.69) [491.02]

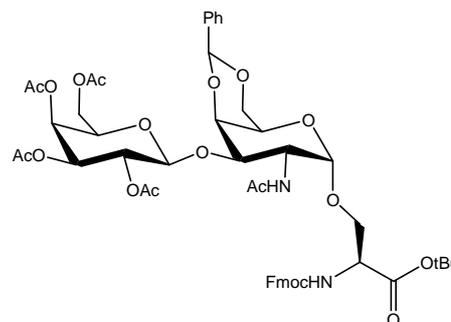
***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-serin-*tert*-butylester (22)⁸⁷**

[Fmoc-Ser([β-Ac₄Gal-(1→3)]-α-GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*O**t*Bu]

Variante mit 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-*D*-galactopyranosylbromid (**1**) als Donor:

In einer Suspension aus 80 mL CH₂Cl₂/Nitromethan 3:1 und 6 g Molsieb 4 Å werden 6.90 g (10.3 mmol)

Fmoc-Ser(α-GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*O**t*Bu (**17**) und 12.7 g (30.8 mmol, 3 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-*D*-galactopyranosylbromid (**1**) eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Nach der Zugabe von 5.17 g (20.5 mmol, 2 Äquiv.) Hg(CN)₂ wird das Reaktionsgemisch weitere 2.5 h bei Raumtemp. gerührt, und dann wieder mit 5.17 g Hg(CN)₂ versetzt. Die Suspension wird nun 14 h bei Raumtemp. gerührt, mit 100 mL CH₂Cl₂ verdünnt und über Celite in 100 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. filtriert. Die org. Phase wird abgetrennt, zweimal mit 150 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung, einmal mit 150 mL einer ges. NaI-Lösung und ein letztes Mal mit 150 mL einer ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die Lösung wird nun über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingeeengt und dann durch Flashchromatographie an 2 L Kieselgel mit PE/EE 1:1 gereinigt.



Ausb.: 6.83 g (6.80 mmol, 66%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.44 (EE).

Variante mit Tetra-*O*-acetyl-α-*D*-galactopyranosyl-trichloracetimidat (**21**) als Donor:

In einer Suspension aus 25 mL absol. CH₂Cl₂ und 1.5 g Molsieb 4 Å werden 910 mg (1.35 mmol) Fmoc-Ser(α-GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*O**t*Bu **17** und 1.33 g (2.70 mmol, 2 Äquiv.) Tetra-*O*-acetyl-α-*D*-galactopyranosyl-trichloracetimidat **21** gelöst und 1 h bei 0 °C gerührt. Nach der Zugabe von 20 μL (0.1 mmol) TMSOTf wird die Suspension weitere 2 h bei 0 °C gerührt, mit 10 mL CH₂Cl₂ verdünnt und über Celite filtriert. Die Lösung wird i. Vak. eingeeengt und dann durch Flashchromatographie an 300 mL Kieselgel mit PE/EE 2:1 gereinigt.

Ausb.: 188 mg (0.09 mmol, 14%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.44 (EE).

200 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 7.77 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, ³J_{5,6} = ³J_{4,3} = 7.4 Hz); 7.59 (m, 2H, H₁-, H₈-Fmoc); 7.44-7.15 (t, 9H, H₂-, H₃-, H₆-, H₇-Fmoc, H_{Aryl} Bn); 5.82 (d, 1H,

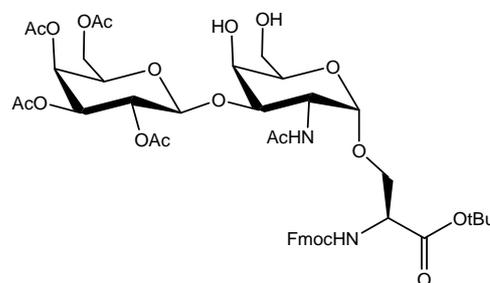
NH NHAc, $^3J_{NH,H2} = 7.6$ Hz); 5.63 (d, 1H, NH Ser, $^3J_{NH,S\alpha} = 8.6$ Hz); 5.49 (s, 1H, CH Acetal); 5.33 (d, 1H, H4'', $^3J_{4,3} = 2.7$ Hz); 5.15 (dd, H2'', $^3J_{2,1} = 7.8$ Hz, $^3J_{2,3} = 10.2$ Hz); 4.96-4.33 (m, 5H, H1, H3'', α -CH Ser, CH₂ Fmoc); 4.23-3.65 (m, 12H, H1'', H2, H3, H4, H5, H5'', H6, H6'', H9-Fmoc, β -CH₂ Ser); 2.12 (s, 3H, CH₃ OAc); 2.06-1.90 (m, 12H, 3*CH₃ OAc, CH₃ NHAc); 1.46 (s, 9H, *t*Bu Ser). Es tritt teilweise eine durch Konformere der Bn-Schutzgruppe bedingte Signalverdopplung auf.

ESI-MS [m/z] = 1027.7, 1028.6 ([M+Na]⁺, ber.: 1027.4 (100.0%), 1028.4 (56.7%)).
 C₅₁H₆₀N₂O₁₉ (1005.02) [1004.38]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (23)**

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

Variante ausgehend von Fmoc-Ser([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Pmb)-OtBu (**18**):^{87,89}



Es werden 2.30 g (2.26 mmol) Fmoc-Ser([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Pmb)-OtBu (**18**) in 50 mL

Acetonitril/Wasser 9:1 gelöst, mit 1.86 g (3.39 mmol, 1.5 Äquiv.) Cerammoniumnitrat versetzt und 1.25 h bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird i. Vak. eingeeignet und durch Flashchromatographie an Kieselgel mit PE/EE 1:15 \rightarrow EE gereinigt.

Ausb.: 1.47 g (1.60 mmol, 71%, Lit.⁸⁷: 76%); farbloser amorpher Feststoff.

Variante ausgehend von Fmoc-Ser([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-OtBu (**22**):⁸⁸

In 50 mL einer Mischung aus Essigsäure/Wasser 4:1 werden 6.74 g (6.71 mmol) Fmoc-Ser([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-OtBu (**22**) gelöst und 1 h bei einer Badtemp. von 85 °C gerührt. Die Lösung wird i. Vak. eingeeignet, mit Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an 1.5 L Kieselgel mit EE \rightarrow EE/MeOH 9:1 gereinigt.

Ausb.: 5.90 g (6.01 mmol, 90%); farbloser amorpher Feststoff.

R_F: 0.43 (EE/MeOH 9:1), 0.18 (EE); [α]_D²² = +48.1 (c = 3.40, CHCl₃), Lit.:⁸⁷ +50.6 (c = 1.00, CH₂Cl₂).

400 MHz-¹H-NMR (CD₃OD), δ [ppm]: 7.83 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 7.69 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 7.41+7.33 (t, 4H, H2-, H3-, H6- H7-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 5.36 (d, 1H, H4'', $^3J_{4,3} = 3.1$ Hz); 5.12 (dd, 1H, H2'', $^3J_{2,3} = 10.17$ Hz, $^3J_{2,1} = 7.8$ Hz); 5.05 (dd, 1H, H3'', $^3J_{3,2} = 10.17$ Hz, $^3J_{3,4} = 3.1$ Hz); 4.76 (d, 1H, H1, $^3J_{1,2} = 3.5$ Hz); 4.72 (d, 1H, H1'', $^3J_{1,2}$

= 7.8 Hz); 4.52-4.41 (m, 3H, OCH₂-Fmoc (4.49+4.42), H₂ (4.44)); 4.34-4.23 (m, 2H, α-CH Ser (4.31), H₉-Fmoc (4.26)); 4.16-4.02 (m, 3H, H₆'' (4.13), H₅'' (4.05)); 4.00-3.68 (m, 6H, H₄ (3.98), β-CH₂H_b Ser (3.91), β-CH_aH_b Ser (3.87), H₅ (3.81), H₃ (3.79), H₆ (3.71)); 2.14-1.91 (m, 15H, 4*CH₃ OAc, CH₃ NHAc (1.95)); 1.46 (s, 9H, CH₃ *t*Bu).

103.0 MHz-¹³C-NMR (CD₃OD), δ[ppm]: 128.8+128.1 (C₂-, C₃-, C₆-, C₇-Fmoc); 126.1 (C₁-, C₈-Fmoc); 121.0 (C₄-, C₅-Fmoc); 102.9 (C₁''); 100.1 (C₁); 78.6 (C₃); 72.5 (C₅); 72.2 (C₃''); 71.8 (C₄); 70.1 (C₂''); 69.7 (C₅''); 68.7 (β-CH₂ Ser); 68.6 (C₄''); 67.9 (OCH₂-Fmoc); 62.4 (C₆, C₆''); 56.6 (α-CH Ser); 49.4 (C₂); 48.3 (C₉-Fmoc); 28.2 (*t*Bu CH₃); 23.1 (NHAc); 20.7-20.4 (OAc). Ausgewählte Signale aus dem HMQC.

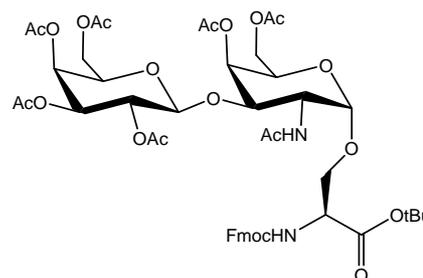
FD-MS [m/z] = 916.5 ([M]⁺, ber.: 916.4), 917.6 ([M+H]⁺, ber.: 917.4).

C₄₄H₅₆N₂O₁₉ (916.92) [916.35]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-serin-*tert*-butylester (24)**

[Fmoc-Ser([β-Ac₄Gal-(1→3)]-α-Ac₂GalNAc)-*Ot*Bu]

Eine Lösung von 1.50 g (1.53 mmol) Fmoc-Ser([β-Ac₄Gal-(1→3)]-α-GalNAc)-*Ot*Bu (**23**) in 30 mL Acetanhydrid/Pyridin 2:1 wird 14 h bei Raumtemp. gerührt. Das



Reaktionsgemisch wird i. Vak. eingengt. Sofern das Edukt nicht schon chromatographisch gereinigt worden war, wird das Rohprodukt durch Flashchromatographie an Kieselgel mit PE/EE 2:1 gereinigt.

Ausb.: 1.49 g (1.49 mmol, 97%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.41 (EE); [α]_D²² = +35.9 (c = 1.90, CHCl₃); HPLC: (Säule LUNA), Gradient A, R_t = 25.4 min.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃+CD₃OD), δ[ppm]: 7.76 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, ³J = 7.4 Hz); 7.61 (d, 2H, H₁-, H₈-Fmoc, ³J = 7.4 Hz); 7.39 (t, 2H, H₃-, H₆-Fmoc, ³J = 7.4 Hz); 7.31 (t, 2H, H₂-, H₇-Fmoc, ³J = 7.4 Hz); 5.36-5.30 (m, 2H, H₄ (5.34), H₄'' (5.32)); 5.01 (dd, 1H, H₂'', ³J_{2,3} = 10.6 Hz, ³J_{2,1} = 7.8 Hz); 4.93 (dd, 1H, H₃'', ³J_{3,2} = 10.6 Hz, ³J_{3,4} = 3.5 Hz); 4.74 (d, 1H, H₁, ³J_{1,2} = 3.1 Hz); 4.60 (d, 1H, H₁'', ³J_{1,2} = 7.8 Hz); 4.51-4.40 (m, 3H, OCH₂-Fmoc (4.49+4.42), H₂ (4.42)); 4.35 (m, 1H, α-CH Ser); 4.26 (t, 1H, H₉-Fmoc, ³J = 6.3 Hz); 4.13-4.04 (m, 4H, H_{6a}'' (4.11), H₆ (4.10), H₅'' (4.06)); 3.96-3.81 (m, 5H, H_{6b}'' (3.94), H₃ (3.91), H₅ (3.86), β-CH₂ Ser (3.83)); 2.15-1.88 (m, 21H, 6*CH₃ OAc, CH₃ NHAc (1.91)); 1.44 (s, 9H, *t*Bu).

103.0 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃+CD₃OD), δ[ppm]: 127.9 (C3-, C6-Fmoc); 127.2 (C2-, C7-Fmoc); 124.9 (C1-, C8-Fmoc); 120.1 (C4-, C5-Fmoc); 101.1 (C1''); 98.8 (C1); 72.9 (C3); 70.9 (C3''); 70.5 (C5); 69.6 (C4); 68.8 (C2''); 68.5 (β-CH₂ Ser); 67.9 (OCH₂-Fmoc); 67.7 (C5''); 67.0 (C4''); 62.9 (C6''); 61.1 (C6); 55.1 (α-CH Ser); 48.8 (C2); 48.3 (C9-Fmoc); 27.9 (*t*Bu CH₃); 22.6 (NHAc); 20.5-20.4 (OAc). Ausgewählte Signale aus dem HMQC.

ESI-MS [m/z] = 1001.7 ([M+H]⁺, ber.: 1001.4); 1023.7 ([M+Na]⁺, ber.: 1023.4); 1039.7 ([M+K]⁺, ber.: 1039.5).

ESI-MS, Hochauflösend [m/z] = 1023.3575 ([M+Na]⁺, ber.: 1023.3581, Δ = 0.59 ppm).

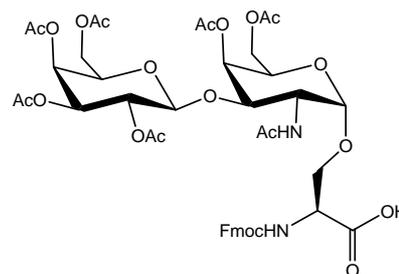
HPLC-Reinheit: mind. 89.9 % (254 nm)

C₄₈H₆₀N₂O₂₁ (1000.99) [1000.37]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-serin (25)**

[Fmoc-Ser([β-Ac₄Gal-(1→3)]-α-Ac₂GalNAc)-OH]

Es werden 2.30 g (2.30 mmol) Fmoc-Ser([β-Ac₄Gal-(1→3)]-α-Ac₂GalNAc)-*Ot*Bu (**24**) mit 1.5 mL Anisol versetzt, in 25 mL TFA gelöst und 1.5 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 30 mL Toluol



verdünnt, das Lösungsmittel wird destillativ entfernt und der Rückstand dreimal mit je 30 mL Toluol kdestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 200 mL Kieselgel mit EE/MeOH 6:1 gereinigt und nach präparativer HPLC (Säule LUNA, Gradient I) wird das reine Anomer erhalten.

Ausb.: 1.14 g (1.21 mmol, 53%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +52.8$ (c = 2.55, DMSO); HPLC: (Säule LUNA), Gradient D, R_t = 19.3 min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ[ppm]: 7.89 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J = 7.8 Hz); 7.71 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³J = 7.4 Hz); 7.66-7.60 (m, 2H, NH Ser (7.6), NH GalNAc (7.6)); 7.41 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc); 7.32 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc); 5.28-5.21 (m, 2H, H4 (5.26), H4'' (5.23)); 4.99 (dd, 1H, H3'', ³J_{3,2} = 9.4 Hz, ³J_{3,4} = 3.5 Hz); 4.85-4.80 (m, 2H, H1'' (4.83), H2'' (4.82)); 4.71 (d, 1H, H1, ³J_{1,2} = 3.9 Hz); 4.38-4.02 (m, 9H, OCH₂-Fmoc (4.36), α-CH Ser (4.27), H9-Fmoc (4.25), H2 (4.18), H5 (4.11), H5'' (4.09), H6a'' (4.07), H6a (4.04)); 3.95-3.72 (m, 5H, H6b (3.93), H3 (3.93), H6b'' (3.82), β-CH₂ Ser (3.79+3.74)); 2.12-1.88 (m, 21H, 6*CH₃ OAc, CH₃ NHAc (1.80)); 1.44 (s, 9H, *t*Bu).

103.0 MHz-¹³C-NMR (DMSO-d₆), δ[ppm]: ~170.4 (6*C=O Ac); 156.1 (C=O Urethan); 144.2 (C4a-, C4b-Fmoc); 141.2 (C8a-, C9a-Fmoc); [135.2 (C_{ipso}-Bn);]128.1 (C3-, C6-Fmoc); 127.5 (C2-, C7-Fmoc); 125.6 (C1-, C8-Fmoc); 120.6 (C4-, C5-Fmoc); 100.5 (C1''); 98.6 (C1); 73.4 (C3); 70.6 (C3''); 70.1 (C5); 69.8 (C4); 68.7 (C2''); 67.8 (β-CH₂ Ser); 67.6 (C5''); 67.5 (C4''); 66.2 (OCH₂-Fmoc); 63.0 (C6''); 61.3 (C6); 54.9 (α-CH Ser); 48.6 (C2); 47.1 (C9-Fmoc); 23.0 (CH₃ NHAc); 21.0-20.8 (CH₃ Ac).

ESI-MS [m/z] = 943.6 ([M]⁻, ber.: 943.3).

ESI-MS, Hochauflösend [m/z] = 945.3174 ([M+H]⁺, ber.: 945.3135, Δ = 4.13 ppm); 967.3000 ([M+Na]⁺, ber.: 967.2955, Δ = 4.65 ppm).

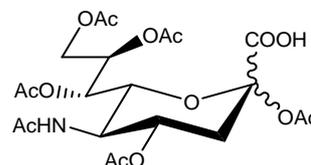
HPLC-Reinheit: 99.8 % (212 nm; Integrationsbereich 8-60 min)

C₄₄H₅₂N₂O₂₁ (944.88) [944.31]

5.2.4 Synthesen zum Kapitel 3.1.3

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-α,β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (26)^{74,93}

[NeuAc₅NAcCOOH]



Im 1 L Rundkolben werden 25 g (80.8 mmol) N-Acetyl-

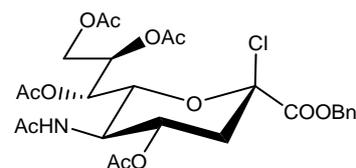
neuraminsäure in 300 mL Pyridin gelöst. Die farblose Suspension wird portionsweise unter Eisbadkühlung mit 150 mL Acetanhydrid versetzt und im Anschluß 45 min bei ca. 0 °C gerührt, gefolgt von 22 h bei Raumtemp. Pyridin und überschüssiges Acetanhydrid werden abdestilliert, und der Rückstand dreimal mit je 60 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird i. Hochvak. getrocknet.

Ausb. (Rohprodukt): 42.52 g (quant.); hellgelber Feststoff; R_F: 0.41 (CH₂Cl₂/EE 5:1).

C₂₁H₂₉NO₁₄ (519.46) [519.16]

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (27)⁹³

[NeuAc₅NAcCOOBn]



Eine Lösung von 8.63 g (16.6 mmol) NeuAc₅NAcCOOH (26) in

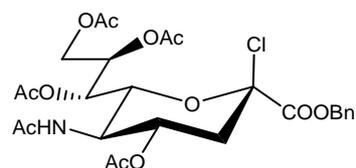
50 mL EtOH wird portionsweise mit einer Lösung von 10.0 g (30.7 mmol) Cs₂CO₃ in 15 mL Wasser versetzt. Nachdem die Gasentwicklung abgeklungen ist, wird 20 min bei Raumtemp. nachgerührt. Die Lösung wird i. Vak. eingengt und dreimal mit je 35 mL Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 80 mL DMF aufgenommen, und innerhalb 1 h werden 28 mL Benzylbromid zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 14 h gerührt und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird in 150 mL Essigester suspendiert und filtriert. Der Niederschlag wird mit 100 mL Essigester nachgewaschen und das vereinte Filtrat wieder eingengt. Das rotbraune Öl wird durch Flashchromatographie an 500 mL Kieselgel mit PE → EE gereinigt.

Ausb.: 8.22 g (14.7 mmol, 89% [86%-89%]); hellgelber Feststoff; R_F(α): 0.29 (EE); R_F(β): 0.22 (EE); [α]_D²² (β) = -25.1 (c = 1.00, CHCl₃).

C₂₈H₃₅NO₁₄ (609.58) [609.21]

Benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylchlorid)onat (28)⁹³

[β -NeuAc₄5NAcCOOBnCl]



Ein Gemisch aus 8.99 g (14.74 mmol) NeuAc₅NAcCOOBn (27),

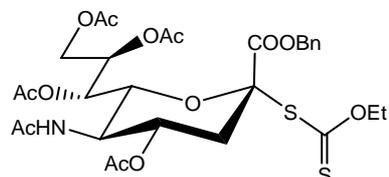
20 mL Acetylchlorid und vier Tropfen Wasser wird 3 d unter Argon und Lichtausschluß bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird eingengt, dreimal mit je 50 mL Toluol kodestilliert und dann i. Vak. getrocknet.

Ausb. (Rohprodukt): 8.68 g (quant.); brauner Feststoff; R_F: 0.31 (EE).

C₂₆H₃₂ClNO₁₂ (585.99) [585.16]

***O*-Ethyl-*S*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]dithiocarbonat (29)⁹³**

[α -NeuAc₄5NAcCOOBnXan]



Die gelbbraune Suspension von 8.63 g (14.7 mmol)

β -NeuAc₄5NAcCOOBnCl (**28**) und 4.25 g (26.5 mmol) Kaliumxanthogenat in 200 mL Ethanol wird unter Argon und Lichtausschluß 14 h bei Raumtemp. gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch mit 300 mL CH₂Cl₂ verdünnt und zweimal mit je 150 mL Wasser¹⁴⁴ ausgeschüttelt. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Das erhaltene violett-schwarze Öl wird durch Flashchromatographie an 300 g Kieselgel mit PE/EE 1:2 → EE gereinigt.

Ausb.: 7.43 g (11.12 mmol, 75% [58%-75%, Umsatz bis zu 94%]); hellgelber amorpher Feststoff; R_F: 0.30 (EE); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +36.0$ (c = 1, CHCl₃), Lit.⁹³: $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +34.1$ (c = 1, CHCl₃).

200 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.40-7.35 (m, 5H, H_{ar}-Bn); 5.35-5.15 (m, 3H, H7', H8', NH); 5.20 (m, 2H, OCH₂-Bn); 4.81 (dt, 1H, H4', ³J_{4',3'e} = 4.5 Hz, ³J_{4',5'} = 11.0 Hz); 4.55 (dd, 1H, H6', ³J_{6',5'} = 10.7 Hz, ³J_{6',7'} = 1.5 Hz); 4.47-3.95 (m, 5H, H9'a, H9'e, OCH₂CH₃, H5'); 2.64 (dd, 1H, H3'e, ³J_{3'e,4'} = 4.6 Hz, ²J_{3'e,3'a} = 12.1 Hz); 2.10, 2.09, 2.07, 2.02, 1.99, 1.86 (s, 19H, Acetyl, H3'a); 1.19 (t, 3H, OCH₂CH₃, J = 7.1 Hz).

ESI-MS [m/z] = 694.3 (40%, [M+Na]⁺, ber.: 694.2).

C₂₉H₃₇NO₁₃S₂ (671.73) [671.17]

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-O- $\{2$ -acetamido-2-deoxy-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-serin-tert-butylester (30**)¹⁴¹**

[Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5AcCOOBn-(2→6))- α -GalNAc)-OtBu]

Zu 10 g gepulverten, über 5 h mit einem Quarzstrahler i. Vak.

ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å werden 3.05 g (5.20 mmol)

Fmoc-Ser(α -GalNAc)-OtBu (**15**), gelöst in 120 mL absol.

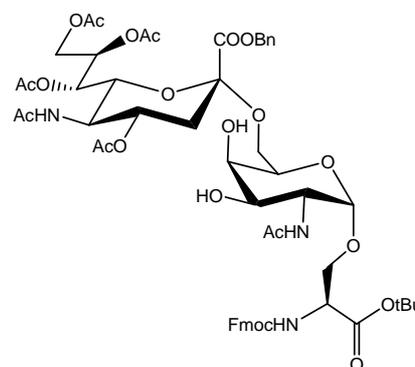
Acetonitril, über eine Kanüle zugegeben. Dann werden 4.31 g

(6.42 mmol) α -NeuAc₄5NAcCOOBnXan **29**, gelöst in 60 mL

absol. CH₂Cl₂, ebenfalls zur Suspension über eine Kanüle zugegeben. Nach Rühren über 1.5 h

bei Raumtemp. unter Argon werden im Argon-Gegenstrom 1.64 g Silbertriflat¹⁴⁵ zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Suspension wird auf -65 °C gekühlt und langsam über einen

Tropftrichter mit 4.01 mL (6.42 mmol) einer auf 0 °C gekühlten 1.6 M CH₃SBr-Lösung



¹⁴⁴ Unter Umständen ist die Zugabe von etwas ges. NaCl-Lösung zur besseren Phasentrennung nötig.

¹⁴⁵ Das Silbertriflat wurde zuvor mind. 4 d im Exikator über Phosphorpentoxid getrocknet

versetzt.¹⁴⁶ Es wird drei Stunden bei -65 °C nachgerührt und die Reaktion mit 4.5 mL Diisopropylamin abgebrochen. Man läßt das Reaktionsgemisch auf Raumtemp. kommen und verdünnt dann mit 300 mL CH₂Cl₂. Es wird über Celite filtriert, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingeengt. Das Rohprodukt wird zweimal mit etwas Toluol kodestilliert, und durch Flashchromatographie an 400 g Kieselgel mit EE → EE/MeOH 10:1 gereinigt. Ein Teil der Substanz wurde durch Präp. HPLC (Gradient J) gereinigt.

Ausb.: 2.40 g (2.29 mmol, 44% [38%-45%]); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.06 (EE); R_F: 0.27 (EE/CH₃OH 9:1); $[\alpha]_D^{22} = +4.8$ (c = 1.00, CH₂Cl₂); HPLC: (Säule LUNA), Gradient C, R_t = 20.2 min.

Fmoc-Ser([β-NeuAc₄5AcCOOBn-(2→6)]-α-GalNAc)-OtBu, ausgewählte Signale:

5.40-5.34 (m, 1+H, H4'); 2.46 (dd, 1H, H3'e, ²J_{3'e,3'a} = 12.9 Hz, ³J_{3'e,4'} = 4.7 Hz).

Fmoc-Ser([α-NeuAc₄5AcCOOBn-(2→6)]-α-GalNAc)-OtBu:

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ[ppm]: 7.88 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J_{5,6} = ³J_{4,3} = 7.4 Hz); 7.75-7.63 (m, 2H, NHAc Neu (7.73), NH Ser (7.65)); 7.71 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³J_{1,2} = ³J_{8,7} = 7.4 Hz); 7.42-7.29 (m, 10H, NHAc Gal (7.40), H2-, H3-, H6- H7-Fmoc (7.40+7.35), H_{Ar} Bn); 5.32-5.14 (m, 4H, OCH₂-Bn (5.30+5.21), H8' (5.24), H7' (5.16)); 4.73 (dt, 1H, H4', ³J_{4,5} = 10.1 Hz, ³J_{4,3} = 4.69 Hz); 4.61 (d, 1H, H1, ³J_{1,2} = 3.52 Hz); 4.58-4.50 (m, 2H, OH); 4.36-4.16 (m, 5H, OCH₂-Fmoc (4.34), H9-Fmoc (4.25), H9'a (4.19), α-CH Ser (4.18)); 4.08-4.02 (m, 3H, H6' (4.06), H9'b (4.06), H2 (4.04)); 3.90 (dd, 1H, H5', ³J_{5,4} = 10.2 Hz, ³J_{5,6} = 20.4 Hz); 3.73-3.54 (m, 6H, H6a (3.71), β-CH₂ Ser (3.68+3.59), H5 (3.64), H3 (3.60), H4 (3.56)); 3.40 (dd, 1H, H6b, ³J_{6b,5} = 5.09 Hz, ²J_{6a,6b} = 9.39 Hz); 2.61 (dd, 1H, H3'e, ²J_{3'e,3'a} = 12.5 Hz, ³J_{3'e,4'} = 3.5 Hz); 2.06, 2.00, 1.97, 1.92 (s, 12H, 4*CH₃ OAc); 1.83-1.66 (m, 7H, CH₃ NHAc Neu (1.81), H3'a (1.71), CH₃ NHAc Gal (1.68)); 1.36 (s, 9H, C(CH₃)₃).

103.0 MHz-¹³C-NMR (DMSO-d₆), δ[ppm]: 170.0, 169.6, 169.3, 169.1, 167.0 (C=O Ac, C1'); 156.1 (C=O Urethan); 143.7 (C4a-, C4b-Fmoc); 140.7 (C8a-, C9a-Fmoc); 135.2 (C_{ipso}-Bn); 128.5, 128.2, 127.7, 127.6, 126.9 (C_{o/mp}-Bn, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc); 125.1 (C1-, C8-Fmoc); 120.0 (C4-, C5-Fmoc); 98.3 (C2'); 98.0 (C1); 81.0 (C(CH₃)₃); 71.9 (C6'); 69.0 (C5); 68.7 (C'4); 67.8 (C8'); 67.7 (C4); 67.2 (C3), 66.9 (C7'); 66.2 (β-CH₂ Ser); 65.5 (OCH₂-Fmoc); 63.5 (C6); 61.8 (OCH₂-Bn); 61.6 (C9'); 54.7 (α-CH Ser); 48.9 (C2); 47.6 (C5'); 46.5 (C9-Fmoc); 37.3 (C3'); 27.5 (C(CH₃)₃); 22.6 (CH₃ NHAc Neu); 22.3 (CH₃ NHAc Gal); 20.4 (CH₃ OAc).

¹⁴⁶ CH₃SBr: 0.88 mL Br₂ und 2.05 mL (CH₃S)₂ werden unter Lichtausschluß und unter Argon-Atm. in 21.5 mL 1,2-Dichlorethan 2 d gerührt.

ESI-MS [m/z] = 1159.0 ([M+Na]⁺, ber.: 1158.4), 1175.1 ([M+K]⁺, ber.: 1174.5).

C₅₆H₆₉N₃O₂₂ (1136.37) [1135.44]

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-deoxy-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-serin-*tert*-butylester (31)**

[Fmoc-Ser([α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -GalAc₂NAc)-*O**t*Bu]

Eine Lösung von 2.70 g (2.38 mmol) Fmoc-Ser([α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -GalNAc)-*O**t*Bu (**30**) in 50 mL Pyridin wird auf 0 °C gekühlt und mit 25 mL Acetanhydrid versetzt. Es wird 14 h bei gerührt (Eisbad auftauen lassen). Die Lösung wird i. Vak. eingengt und mit Toluol kdestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 1.2 L Kieselgel mit EE gereinigt.

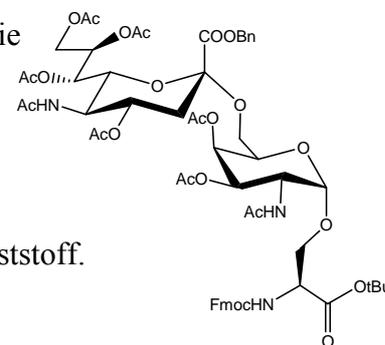
Ausb.: 1.73 g (2.38 mmol, 99% [77%-99%]); farbloser amorpher Feststoff.

R_F: 0.20 (EE); [α]_D²² = +25.7 (c = 1, CHCl₃).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.73 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, ³J_{5,6} = ³J_{4,3} = 7.6 Hz); 7.59 (d, 2H, H₁-, H₈-Fmoc, ³J_{1,2} = ³J_{8,7} = 7.4 Hz); 7.39-7.27 (m, 9H, H₂-, H₃-, H₆- H₇-Fmoc, H_{Aryl} Bn); 5.33-5.08 (m, 5H, H₇' , H₈' , H₄, OCH₂-Bn); 5.01 (dd, 1H, H₃, ³J_{3,2} = 11.4 Hz, ³J_{3,4} = 3.1 Hz); 4.80-4.73 (m, 1H, H₁); 4.52 (dt, 1H, H₄' , ³J_{4,5} = 11.0Hz, ³J_{4,3} = 3.5 Hz); 4.30 (m, 3H, H₂, OCH₂-Fmoc); 4.25-3.75 (m, 10H, H₅' , H₆' , H₉'a, H₉'b, S ^{β} , H₉-Fmoc, H₅, H₆a, S ^{α}); 3.11 (dd, 1H, H₆b, ³J_{6b,5} = 5.1 Hz, ²J_{6b,6a} = 10.2 Hz); 2.55 (dd, 1H, H₃'e, ²J_{3'e,3'a} = 12.9 Hz, ³J_{3'e,4'} = 4.70 Hz); 2.07, 2.06, 2.01, 1.98, 1.96, 1.91, 1.83, 1.78 (s, 25H, 2*CH₃ NHAc, 6*CH₃ OAc, H₃'a); 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃).

50.3 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃, BB, DEPT), δ [ppm]: 170.73, 170.62, 170.30, 170.16m 169.74, 169.29, 167.30 (C=O, C1[']); 155.98 (C=O Urethan); 143.78 (C₄a-, C₄b-Fmoc); 141.30 (C₈a-, C₉a-Fmoc); 134.76 (C_q-Bn); 128.93, 128.81, 128.60, 127.78, 127.13 (C-Bn, C₂-, C₃-, C₆-, C₇-Fmoc); 125.07 (C₁-, C₈-Fmoc); 120.01, 120.09 (C₄-, C₅-Fmoc); 98.93, 98.66 (C₁, C₂[']); 82.91 (C(CH₃)₃); 72.66, 68.90, 68.34, 68.18, 67.86, 67.40, 67.24 (S ^{β} , C₃, C₄, C₅, C₄['], C₆['], C₇['], C₈['], OCH₂-Fmoc); 63.49 (OCH₂-Bn); 62.42 (C₆, C₉[']); 60.39 (S ^{α}); 49.20, 47.45, 47.16 (C₂, C₅['], C₉-Fmoc); 37.76 (C₃[']); 28.04 (C(CH₃)₃); 23.24, 21.02, 20.78 (NHAc, OAc).

FD-MS [m/z] = 1245.3 ([M+Na+H]⁺, ber.: 1242.4482 (100.0%), 1243.4515 (66.7%)); 1021.8 ([M-Fmoc+Na+H]⁺, ber.: 1021.2 (66.7%)); 1001.0 ([M-Fmoc-*t*Bu+Na+K]⁺, ber.: 1001.1).

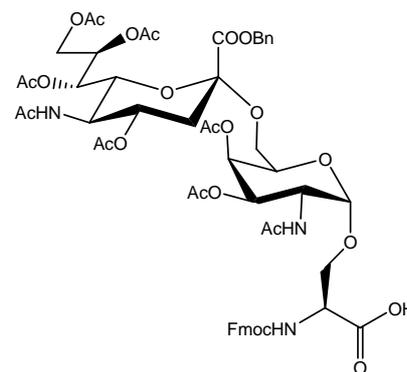


C₆₀H₇₃N₃O₂₄ (1220.24) [1219.46]

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-deoxy-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-serin (32)**

[Fmoc-Ser([α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -GalAc₂NAc)-OH]

Es werden 1.61 g (1.32 mmol) Fmoc-Ser(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α -GalAc₂NAc)-*O*tBu (31) nacheinander mit 10 mL CH₂Cl₂ p.a., 10 mL TFA und 2 mL Anisol versetzt und 6 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 30 mL Toluol verdünnt, die überschüssigen Reagenzien werden destillativ entfernt und der Rückstand dreimal mit je 40 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 150 g Kieselgel mit EE/MeOH 2:1 gereinigt. Durch präparative HPLC Säule LUNA, Gradient J) läßt sich das reine α -Anomer erhalten.



Ausb.: 1.54 g (1.32 mmol, 99%; nach HPLC: 62 %); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.11 (EE); R_F: 0.23 (EE/MeOH 2:1); [α]_D²² = +26.8 (c = 1, DMSO-d₆); HPLC: (Säule LUNA), Gradient E, R_t = 18.8 min.

C ₅₆ H ₆₅ N ₃ O ₂₄	Ber.:	C 57.78	H 5.63	N 3.61
	Gef.:	C 57.40	H 5.51	N 3.24

400 MHz-¹H-NMR, (DMSO-d₆), δ [ppm]: 8.01 (bs, 1H, NH NeuNHAc); 7.87 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J_{5,6} = ³J_{4,3} = 7.4 Hz); 7.73 (d, 1H, NH GalNHAc, ³J_{NH,H2} = 9.8 Hz); 7.68 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³J_{1,2} = ³J_{8,7} = 7.4 Hz); 7.41-7.25 (m, 9H, H2-, H3-, H6- H7-Fmoc, H_{ar}-Bn); 8.01 (bs, 1H, NH-Urethan); 5.29-5.15 (m, 3H, H7', H8', OCH₂-Bn_a); 5.18-5.15 (m, 2H, H4, OCH₂-Bn_b); 4.95 (dd, 1H, H3, ³J_{3,2} = 11.7 Hz, ³J_{3,4} = 2.7 Hz); 4.83 (d, 1H, H1, ³J_{1,2} = 2.4 Hz); 4.71 (dt, 1H, H4', ³J_{4,5} = 11.3 Hz, ³J_{4,3} = 4.7 Hz); 4.30 (d, 2H, S ^{β} , J = 6.7 Hz); 4.23-3.69 (m, 6H, OCH₂-Fmoc, H9-Fmoc, H9', S ^{α}); 4.18-4.14 (m, 1H, H2); 4.04-3.98 (m, 2H, H5, H6'); 3.92-3.84 (m, 1H, H5'); 3.84-3.69 (m, 1H, H6a); 3.11 (dd, 1H, H6b, ³J_{6b,5} = 5.5 Hz, ²J_{6b,6a} = 8.3 Hz); 2.54 (dd, 1H, H3'e, ²J_{3'e,3'a} = 12.1 Hz, ³J_{3'e,4'} = 3.9 Hz); 2.02, 2.00, 1.97, 1.94, 1.91, 1.85, 1.81, 1.66 (s, 25H, 2*CH₃ NHAc, 6*CH₃ OAc, H3'a).

100.6 MHz-¹³C-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 169.79, 169.59, 169.32, 169.14 (C=O, C1'); 159.04 (C=O Urethan); 143.86 (C4a-, C4b-Fmoc); 140.72 (C8a-, C9a-Fmoc); 135.03 (C_{ipso} Bn); 129.45, 128.51, 128.36, 127.89, 127.58, 127.07 (C_{Aryl} Bn, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc);

126.02, 125.12 (C1-, C8-Fmoc); 120.42, 120.09 (C4-, C5-Fmoc); 98.09, 97.96 (C1, C2'); 71.82, 69.03, 67.51, 67.28, 66.81, 65.48 (S^β, C3, C4, C5, C4', C6', C7', C8', OCH₂-Fmoc, OCH₂-Bn); 61.92 (C6, C9'); 59.75 (S^α); 47.64, 46.86, 46.72 (C2, C5', C9-Fmoc); 39.76 (C3'); 22.58, 20.80, 20.54, 20.48, 20.32 (NHAc, OAc).

ESI-MS [m/z] = 1202.8 ([M+K]⁺, ber.: 1202.4); 1186.8 ([M+Na]⁺, 1186.4).

C₅₆H₆₅N₃O₂₄ (1164.14) [1163.40]

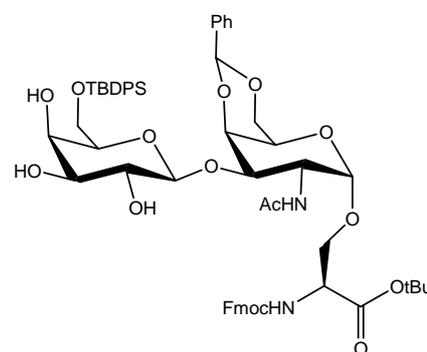
5.2.5 Synthesen zum Kapitel 3.1.4

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[6-(*O*-*tert*-butyl-diphenylsilyl)-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (34)

[Fmoc-Ser([β-6-*O*-TBDPS-Gal-(1→3)]-α-GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*O**t*Bu]

Eine Lösung von 3.50 g (3.50 mmol) Fmoc-Ser([β-Ac₄Gal-(1→3)]-α-GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*O**t*Bu **22** in 30 mL CH₃OH p.

a. wird tropfenweise mit 1 %-iger Natriummethanolat-Lösung in CH₃OH versetzt, bis ein pH-Wert zwischen 8.0 und 8.5 erreicht wird. Die folgenden 8 h wird der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt und der pH-Wert stündlich durch tropfenweise Zugabe von einer



1 %-igen Natriummethanolat-Lösung in CH₃OH nachgestellt. Das Reaktionsgemisch wird durch Zugabe von drei Spatelspitzen saurem Ionenaustauscher Dowex 50Wx8 neutralisiert. Nach 20 min. Rühren bei Raumtemp. wird der Ionenaustauscher abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wird wieder in 15 mL DMF gelöst und mit 477 mg (7.0 mmol) Imidazol sowie 1.16 mL TBDP-Cl versetzt und 2.5 h bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 10 mL Wasser versetzt und 20 min bei Raumtemp. nachgerührt. Die Lösung wird mit 100 mL CH₂Cl₂ verdünnt und zweimal mit je 40 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird dann durch Flashchromatographie an 1 L Kieselgel mit EE/CH₃OH 9:1 gereinigt.

Ausb.: 2.01 g (1.87 mmol, 53%); farbloser amorpher Feststoff; R_F : 0.25 (EE/ CH₃OH 9:1); $[\alpha]_D^{22} = +57.82$ ($c = 3.43$, CH₃OH).

400 MHz-¹H-NMR (CD₃OD), δ [ppm]: 7.79 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J = 7.8$ Hz); 7.72-7.64 (m, 6H, *o*-Ph_{TBDPS} (7.70), H1-, H8-Fmoc (7.66)); 7.47-7.29 (m, 15H, H3-, H6-Fmoc, *m,p*-Ph_{TBDPS}, H_{Aryl} Bn_{GalNAc}, H2-, H7-Fmoc (7.31)); 5.39 (s, 1H, CH Acetal); 4.89 (m, 1H, H1); 4.56-4.48 (m, 2H, H2 (4.54), CH₂H_b Fmoc (4.48)); 4.41-4.30 (m, 4H, H1'' (4.39), CH_aH_b Fmoc (4.37), α -CH Ser (4.37), H4 (4.32)); 4.22 (t, 1H, H9-Fmoc, $^3J = 6.65$ Hz); 4.01-3.88 (m, 7H, H6a'' (3.99), H3 (3.98), H6 (3.93), β -CH₂ Ser (3.91), H5'' (3.80)); 3.76 (m, 1H, H6b''); 3.64 (t, 1H, H5, $^3J = 6.24$ Hz); 3.55-3.49 (m, 2H, H2'' (3.53), H4'' (3.51)); 3.45 (dd, 1H, H3'', $^3J_{3,2} = 9.8$ Hz, $^3J_{3,4} = 3.1$ Hz); 1.94 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.45 (s, 9H, CH₃ *t*Bu_{Ser}); 1.10 (s, 9H, CH₃ *t*Bu_{TBDPS}).

103.0 MHz-¹³C-NMR (CD₃OD), δ [ppm]: 170.4 (C=O NHAc); 156.1 (C=O Urethan); 145.2 (C4a-, C4b-Fmoc, C8a-, C9a-Fmoc); 136.3 (); 130.6-127.3 (C3-, C6-Fmoc, *m,p*-Ph_{TBDPS}, Bn_{GalNAc}); 127.9 (C2-, C7-Fmoc); 125.8 (C1-, C8-Fmoc); 120.7 (C4-, C5-Fmoc); 106.9 (C1''); 101.8 (CH Acetal); 100.6 (C1); 77.0 (C4); 76.4 (C5); 76.1 (C3); 74.4 (C3''); 71.9 (C2''); 69.7 (C6''); 69.7 (C5''); 68.9 (β -CH₂ Ser); 67.6 (OCH₂-Fmoc); 64.4 (C4''); 63.9 (C6); 56.4 (α -CH Ser); 49.5 (C2); 48.1 (C9-Fmoc); 28.0 (CH₃ *t*Bu Ser); 27.1 (CH₃ *t*Bu TBDPS); 22.7 (NHAc). Ausgewählte Signale aus HMQC und BB.

ESI-MS $[m/z] = 1075.7$ ($[M+H]^+$, ber.: 1075.5); 1097.7 ($[M+Na]^+$, ber.: 1097.5).

ESI-MS, Hochauflösend $[m/z] = 1075.4615$ ($[M+H]^+$, ber.: 1075.4618, $\Delta = 0.28$ ppm);

HPLC-Reinheit: 98.0 % (254 nm)

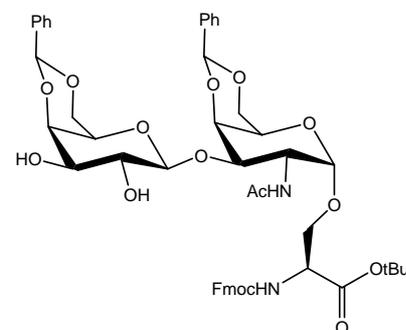
C₅₉H₇₀N₂O₁₅Si (1075.28) [1074.45]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[4,6-*O*-benzyliden- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (35)**

[Fmoc-Ser($[\beta$ -4,6-*O*-Bn-Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-OtBu]

Eine Lösung von 1 g (0.93 mmol) Fmoc-Ser($[\beta$ -6-*O*-TBDPS-Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-OtBu (34) in 20 mL AcOH/H₂O 5:1 wird 3 h bei 85 °C Badtemp. gerührt. Die Lösung wird i. Vak. eingengt und i. Hochvak. getrocknet. Der Rückstand wird danach

in 15 mL DMF gelöst, mit 0.56 mL (3.72 mmol) Benzaldehyddimethylacetal versetzt, mit



p-Toluolsulfonsäure auf pH 4 gestellt und 5 h bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit Triethylamin neutralisiert und i. Vak. eingengt. Das gelbe Öl wird dann durch Flashchromatographie an Kieselgel mit EE/CH₃OH 9:1 gereinigt.

Ausb.: 186 mg (0.20 mmol, 22%); gelber amorpher Feststoff; R_F: 0.28 (EE/CH₃OH 9:1).

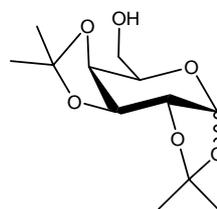
Die aufgenommenen ¹H- und ¹³C-NMR Spektren sind aufgrund der Konformerengemische, verursacht durch die Benzyliden-Schutzgruppen, nicht interpretierbar.

ESI-MS [m/z] = 947.8 ([M+Na]⁺, ber.: 947.4).

C₅₀H₅₆N₂O₁₅ (924.98) [924.37]

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (36)^{147,148}

Eine Suspension aus 30.0 g (0.17 mol) D-Galactose und 67.0 g (0.42 mol) wasserfreiem Kupfersulfat in 500 mL Aceton p.a. wird mit 4 mL konz. Schwefelsäure versetzt und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird filtriert und mit ca. 12 g Calciumhydroxid neutralisiert (20 min rühren lassen). Die Suspension wird über Celite filtriert und das Filtrat i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt kann direkt weiter eingesetzt werden.

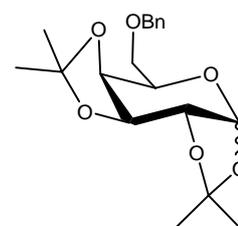


Ausb.: 40.0 g (0.15 mmol, 92%, Lit.:¹⁷ 92%); gelbes Öl; R_F: 0.25 (PE/EE 1:1).

C₁₂H₂₀O₆ (260.28) [260.13]

6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (37)^{103,149}

Eine Lösung von 40.0 g (0.15 mol) 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (36) in 250 mL DMF wird auf 0 °C gekühlt und portionsweise unter Argon mit 13.6 (0.34 mol) einer 60 %-igen Dispersion von Natriumhydrid in Mineralöl versetzt. Nach 0.25 h wird die Kühlung entfernt und 1 h bei Raumtemp. nachgerührt. Dann wird das Reaktionsgemisch wieder auf 0 °C gekühlt und mit 36.2 mL (52.3 g, 0.36 mmol) Benzylbromid in 50 mL DMF per Tropftrichter versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei Raumtemp. gerührt und überschüssiges Natriumhydrid durch Zugabe von 10 mL Methanol vernichtet. Die Suspension wird i. Hochvak. eingengt und der



¹⁴⁷ C. Filser, *Diplomarbeit*, Universität Mainz, 2001.

¹⁴⁸ O. T. Schmidt, in *Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. II* (Eds.: R. L. Whistler, M. L. Wolfrom, J. N. BeMiller), Academic Press Inc., New York, London, 1963, p. 318.

¹⁴⁹ X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* 1994, 50, 6569.

Rückstand in 300 mL CH₂Cl₂ aufgenommen. Man extrahiert dreimal mit je 100 mL Wasser, und getrocknet über MgSO₄. Nachdem das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert wurde wird der Rückstand dreimal mit je 20 mL Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel mit PE/EE 10:1 gereinigt.

Ausb.: 43.1 g (0.13 mmol, 82%, Lit.:¹⁰³ 84%); gelbes Öl; R_F: 0.60 (PE/EE 1:1), 0.44 (PE/EE 3:1); [α]_D²² = -63.3 (c = 1.43, CHCl₃), Lit.:¹⁵⁰ [α]_D²⁰ = -65 ± 0.5 (c = 2.68, CHCl₃).

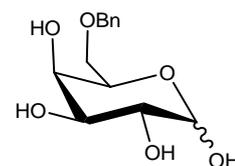
C₁₉H₂₆O₆ (350.41) [350.17]

6-*O*-Benzyl-D-galactose (38)

Es werden 43.0 g (0.12 mol) 6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (37) in 225 mL Eisessig gelöst und mit 75 mL Wasser versetzt. Die Suspension wird bei 85 °C Badtemp. 5 h bei gerührt. Das Reaktionsgemisch wird i. Vak. eingengt und mit Toluol kodestilliert, Der Rückstand wird in 5 mL Methanol gelöst, mit Diethylether ausgefällt und i. Vak. getrocknet.

Ausb.: 27.0 g (0.10 mmol, 83%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.07 (EE).

C₁₃H₁₈O₆ (270.28) [270.11]



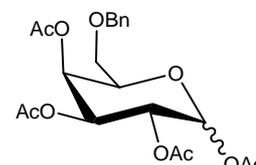
1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-D-galactopyranose (39)

In 300 mL einer Mischung aus Acetanhydrid/Pyridin 2:1 werden 27.0 g (0.10 mol) 6-*O*-Benzyl-D-galactose 38 portionsweise gelöst und 14 h bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird i. Vak. eingengt, in 250 mL CH₂Cl₂ aufgenommen und der Reihe nach mit 100 mL Wasser, zweimal 100 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet, i. Vak. eingengt und dann durch Flashchromatographie an 2.5 L Kieselgel mit PE/EE 5:1 gereinigt.

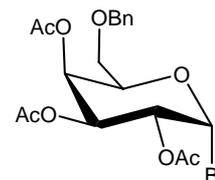
Ausb.: 38 g (0.09 mmol, 87%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.42 (PE/EE 1:1).

FD-MS [m/z] = 437.8, 439.8 ([M]⁺, ber.: 438.2 (100.0%), 439.2 (23.4%)).

C₂₁H₂₆O₁₀ (438.43) [438.15]



¹⁵⁰ N. G. Delaney, V. Madison, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6635.

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosylbromid (40)¹⁵¹[6-OBnAc₃GalBr]

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 9.0 g (20.5 mmol) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-D-galactopyranose **39** in 250 mL CH₂Cl₂ werden über 50 min 45 mL einer 33 %-igen Bromwasserstoff Lösung in Eisessig zugetropft. Der Reaktionsverlauf wird dünnschichtchromatographisch verfolgt, und nach 20 min wird das Reaktionsgemisch mit 50 mL Eiswasser versetzt. Die org. Phase wird abgetrennt und der Reihe nach mit zweimal 80 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung und zweimal 80 mL einer ges. Natriumthiosulfatlösung ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 800 mL Kieselgel mit PE/EE 5:1 gereinigt (es wurde eine breite, kurze Säule verwendet).

Ausb.: 4.70 g (10.2 mmol, 50%, Lit.:¹⁵¹ 58%); heller gelber amorpher Feststoff; R_F: 0.53 (PE/EE 1:1); $[\alpha]_D^{22} = +151.2$ (c = 2.10, CH₂Cl₂).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.36-7.23 (m, 5H, H-Aryl); 6.69 (d, 1H, H1, ³J_{1,2} = 3.9 Hz); 5.56 (d, 1H, H4, ³J_{4,3} = 3.0 Hz); 5.38 (dd, 1H, H3, ³J_{3,2} = 10.6 Hz, ³J_{3,4} = 3.0 Hz); 5.01 (dd, 1H, H2, ³J_{2,1} = 3.9 Hz, ³J_{2,3} = 10.6 Hz); 4.54 (d, 1H, CH_{2a}, ²J_{a,b} = 12.1 Hz); 4.44 (m, 1H, H5); 4.40 (d, 1H, CH_{2b}, ²J_{b,a} = 12.1 Hz); 3.53 (dd, 1H, H6_a, ³J_{6a,5} = 6.3 Hz, ²J_{a,b} = 9.8 Hz); 3.47 (dd, 1H, H6_b, ³J_{6b,5} = 6.6 Hz, ²J_{b,a} = 9.8 Hz); 2.08, 2.02, 1.98 (s, 9H, 3*OAc).

103.0 MHz-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 170.1, 169.8, 169.7 (C=O); 137.3 (C_{quart.} Bn); 128.5, 127.9 (C_{Aryl}); 88.1 (C1); 73.5 (CH₂); 72.1, 68.2, 67.4 (C2, C3, C4, C5); 66.8 (C6); 20.7, 20.6, 20.5 (CH₃ OAc).

C₁₉H₂₃BrO₈ (459.29) [458.06]

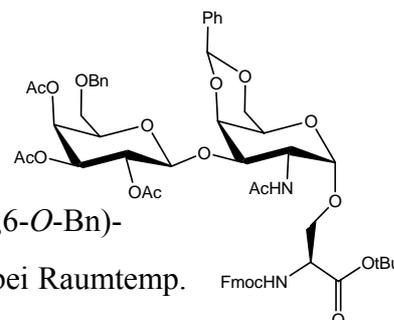
***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (41)**

[Fmoc-Ser([β -6-*O*-BnAc₃Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-OtBu]

In einer Suspension aus 60 mL CH₂Cl₂/Nitromethan 3:1 und 4.5 g

Molsieb 3 Å werden 2.10 g (3.11 mmol) Fmoc-Ser(α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-

OtBu (**17**) und 1.57 g (6.22 mmol, 2 Äquiv.) Hg(CN)₂ eine Stunde bei Raumtemp.



¹⁵¹ M. Lergenmüller, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron* **1998**, 1381.

gerührt. Die Suspension wird auf 0 °C gekühlt und langsam wird über eine Stunde eine Lösung von 4.70 g (10.3 mmol) 6-OBnAc₃GalBr **40** in 40 mL CH₂Cl₂/Nitromethan 3:1 zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird mit weiteren 1.57 g (6.22 mmol, 2 Äquiv.) Hg(CN)₂ versetzt, das Eisbad entfernt und 14 h bei Raumtemp. gerührt.

Das Reaktionsgemisch wird mit 100 mL CH₂Cl₂ verdünnt und über Celite filtriert. Die Lösung wird zweimal mit 60 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit 60 mL einer ges. NaI-Lösung extrahiert. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet, i. Vak. eingeeengt und dann durch Flashchromatographie an 1 L Kieselgel mit einem polarer werdenden Laufmittel PE/EE 1:1 → 1:2 → 1:10 gereinigt.

Ausb.: 2.99 g (2.84 mmol, 91%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.42 (EE);

$[\alpha]_D^{22} = +60.0$ (c = 3.30, CHCl₃).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J = 7.4 Hz); 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³J = 7.4 Hz); 7.54-7.50 (m, 2H, *m*-Bn/Ph); 7.43-7.30 (m, 12H, H3-, H6-Fmoc (7.41), Ph/Bn, H2-, H7-Fmoc (7.32)); 5.74 (d, 1H, NH Ser, ³J = 5.9 Hz); 5.47 (s, 1H, CH Acetal); 5.41 (m, 1H, H4''); 5.15 (dd, H2'', ³J_{2,1} = 7.8 Hz, ³J_{2,3} = 10.2 Hz); 5.01-4.97 (m, 2H, H1 (4.99), H3'' (4.97)); 4.71-4.59 (m, 2H, H1'' (4.69), H2 (4.61)); 4.48-4.39 (m, 5H, CH₂Ph (4.46+4.39), CH₂ Fmoc (4.44+4.37), α-CH Ser (4.41)); 4.29-4.15 (m, 3H, H4 (4.27), H9-Fmoc (4.22), H6a (4.17)); 3.97-3.82 (m, 4H, β-CH₂ Ser (3.95), H3 (3.91), H6b (3.84), H5 (3.84)); 3.60-3.44 (m, 3H, H5'' (3.58), H6ab'' (3.53+3.46)); 2.11-1.94 (3*s, 9H, 3*CH₃ OAc); 1.92 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.47 (s, 9H, CH₃ *t*Bu Ser).

103.0 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 170.3-169.6 (5*C=O Ac); 156.1 (C=O Urethan); 143.8+141.4 (2*C_{ipso} Fmoc); 137.7-137.5 (4*C_{ipso} Aryl); 128.6-127.2 (*o,p*-Bn); 127.9 (C3-, C6-Fmoc); 127.3 (C2-, C7-Fmoc); 126.3 (*m*-Bn); 125.1 (C1-, C8-Fmoc); 120.2 (C4-, C5-Fmoc); 101.2 (C1''); 100.7 (CH Acetal); 99.5 (C1); 75.2 (C4); 74.1 (C3); 73.6 (CH₂ Bn); 72.5 (C5); 72.4 (C_{quart} *t*Bu); 71.2 (C3''); 69.4 (β-CH₂ Ser); 69.2 (C6); 69.1 (C2''); 68.0 (C6''); 67.6 (C4''); 67.3 (OCH₂-Fmoc); 63.6 (C5''); 55.1 (α-CH Ser); 48.3 (C2); 47.2 (C9-Fmoc); 28.1 (CH₃ *t*Bu Ser); 22.4 (CH₃ NHAc); 20.7 (3*CH₃ OAc).

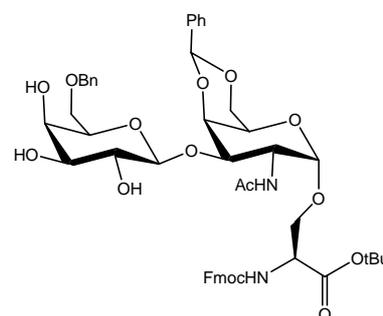
ESI-MS [m/z] = 1075.9 ([M+Na]⁺, ber.: 1075.4).

C₅₆H₆₄N₂O₁₈ (1053.11) [1052.42]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (42)**

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

Eine Lösung von 2.45 g (2.33 mmol) Fmoc-Ser([β -6-*O*-BnAc₃Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*Ot*Bu (41) in 150 mL CH₃OH p.a. wird tropfenweise mit 1 %-iger Natriummethanolat-Lösung in MeOH versetzt, bis ein pH-Wert von ca. 9.5 erreicht ist. Der pH-Wert wird soweit möhlich stündlich



durch tropfenweise Zugabe von einer 1 %-igen Natriummethanolat-Lösung in MeOH nachgestellt. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei Raumtemp. gerührt. Dann wird die Reaktion durch Zugabe von drei Spatelspitzen saurem Ionenaustauscher Dowex 50Wx8 beendet. Nach 30 min. Rühren bei Raumtemp. wird der Ionenaustauscher abfiltriert, das Filtrat eingengt und der Rückstand durch Flashchromatographie an 1 L Kieselgel mit EE gereinigt.

Ausb.: 848 mg (0.92 mmol, 39%); farbloser amorpher Feststoff; R_F : 0.24 (EE/CH₃OH 9:1); $[\alpha]_D^{22} = +88.2$ ($c = 2.90$, CHCl₃); HPLC: (Säule LUNA), Gradient C, $R_t = 25.1$ min.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $^3J = 7.0$ Hz); 7.48 (m, 2H, *m*-Bn/Ph); 7.37 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 7.31-7.16 (m, 10H, Aryl Ph/Bn, H2-, H7-Fmoc); 5.41 (s, 1H, CH Acetal); 4.91 (d, 1H, H1, $^3J_{1,2} = 2.0$ Hz); 4.63-4.40 (m, 5H, H2 (4.61), CH₂Ph (4.49), CH₂H_b Fmoc (4.44), α -CH Ser (4.42)); 4.36-4.29 (m, 2H, CH_aH_b Fmoc (4.34), H4 (4.31)); 4.26 (d, 1H, H1'', $^3J_{1,2} = 7.1$ Hz); 4.21 (t, 1H, H9-Fmoc, $^3J = 6.7$ Hz); 4.11 (m, 1H, H6a); 3.93 (m, 1H, β -CH_aH_b Ser); 3.85-3.64 (m, 6H, β -CH_aH_b Ser (3.83), H3 (3.82), H6b (3.78), H5 (3.74), H6'' (3.66)); 3.58-3.51 (m, 3H, H2'' (3.56), H4'' (3.53), H4''' (3.53)); 3.35 (m, 1H, H5''); 1.96 (s, 3H, NHAc); 1.45 (s, 9H, CH₃ *t*Bu Ser).

103.0 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 169.6 (C=O NHAc/Ser); 156.2 (C=O Urethan); 143.8+141.4 (2* C_{ipso} Fmoc); 137.8 (C_{ipso} Aryl); 128.0-127.0 (*o,p*-Bn); 128.0-127.0 (C2-, C7-Fmoc); 127.8 (C3-, C6-Fmoc); 126.7 (*m*-Bn); 125.1 (C1-, C8-Fmoc); 120.1 (C4-, C5-Fmoc); 105.4 (C1''); 101.0 (CH Acetal); 99.6 (C1); 77.1 (C3); 75.6 (C4); 73.7 (C3''); 73.5 (CH₂ Bn); 73.5 (C5''); [72.4 (C_{quart} *t*Bu);] 70.9 (C2''); 69.7 (C6''); 69.3 (β -CH₂ Ser); 69.0 (C6); 68.9 (C5); 67.2 (CH₂-Fmoc); 63.6 (C4''); 55.1 (α -CH Ser); 48.4 (C2); 47.1 (C9-Fmoc); 28.0 (CH₃ *t*Bu Ser); 23.2 (NHAc).

ESI-MS [m/z] = 949.7 ([M+Na]⁺, ber.: 949.4).

ESI-MS, Hochauflösend [m/z] = 949.3718 ([M+Na]⁺, ber.: 949.3735 (100.0%), Δ = 1.8 ppm);

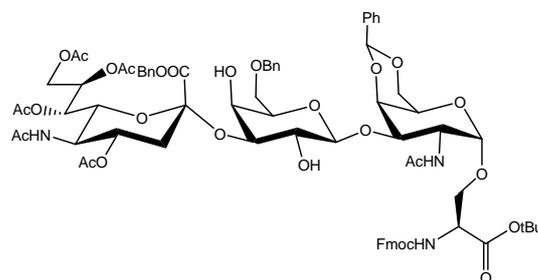
950.3780 ([M+Na]⁺, ber.: 950.3768 (55.6%), Δ = 1.3 ppm).

HPLC-Reinheit: 98.8 % (254 nm)

C₅₀H₅₈N₂O₁₅ (927.00) [926.38]

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

[Fmoc-Ser([(NeuAc₄5NacCOOBn-(2→3))-β-6-*O*BnGal-(1→3)]-α-GalNac-4,6-*O*-Bn)-*O*tBu]



Zu 2.5 g gepulverten, über einem Quarzstrahler i. Vak. ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å werden unter Argon 800 mg (0.863 mmol) Fmoc-Ser([β-6-*O*-BnGal-

(1→3)]-α-GalNac-4,6-*O*-Bn)-*O*tBu (**42**), gelöst in 10 mL absol. Acetonitril, über eine Kanüle zugegeben. Dann werden 1.45 g (2.16 mmol, 2.5 Äquiv.) α-NeuAc₄5NacCOOBnXan **29**, gelöst in 10 mL absol. CH₂Cl₂, ebenfalls zur Suspension über eine Kanüle zugegeben. Es wird 1 h bei Raumtemp. gerührt und dann auf -50 °C gekühlt. Im Argon-Gegenstrom werden 553 mg (2.16 mmol, 2 Äquiv.) Silbertriflat¹⁴⁵, gelöst in 10 mL absol. Acetonitril, zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Suspension wird nun langsam binnen einer Stunde mit 1.35 mL (2.16 mmol, 2 Äquiv.) einer auf ca. -10 °C gekühlten 1.6 M CH₃SBr-Lösung¹⁴⁶ mittels einer Spritzenpumpe versetzt. Es wird 20 min bei -50 °C nachgerührt, dann 14 h bei -30 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0.44 mL Ethyldiisopropylamin abgebrochen. Man läßt das Reaktionsgemisch sich auf Raumtemp. erwärmen und verdünnt dann mit 250 mL CH₂Cl₂. Es wird über Celite filtriert, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt durch Flashchromatographie an 250 mL Kieselgel mit EE → EE/CH₃OH 10:1 gereinigt. Man erhält ein Anomerengemisch, das sich nach Acetylierung und Abspaltung der Benzyliden-Schutzgruppe (siehe **45**) trennen läßt.

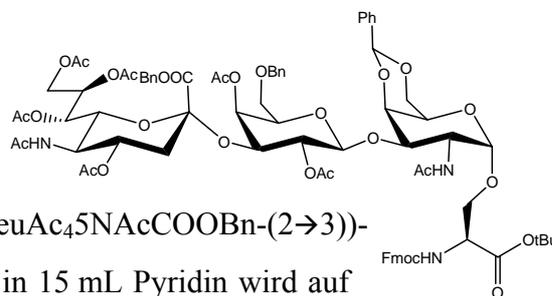
Ausb.: 627 mg (0.425 mmol, 49%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.06 (EE), 0.36 (EE/MeOH 9:1); HPLC: (Säule LUNA), Gradient C, R_t = 22 min.

ESI-MS [m/z] = 1499.1 ([M+Na]⁺, ber.: 1498.6 (100%), 1499.6 (85%)).

C₇₆H₈₉N₃O₂₇ (1476.52) [1475.57]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-3-*O*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α / β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl]-L-serin-*tert*-butylester (44)**

[Fmoc-Ser([(α / β -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→3))- β -6-*O*-Bn-Ac₂Gal-(1→3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*O**t*Bu]



Eine Lösung von 626 mg (0.424 mmol) Fmoc-Ser([(NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→3))- β -6-*O*BnGal-(1→3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*O**t*Bu (43) in 15 mL Pyridin wird auf 0 °C gekühlt und mit 30 mL Acetanhydrid versetzt. Es wird 14 h bei gerührt (Eisbad auftauen lassen). Die Lösung wird i. Vak. eingengt und mit Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 250 mL Kieselgel mit EE → EE/CH₃OH 10:1 gereinigt.

Ausb.: 630 mg (0.404 mmol, 95%); farbloser amorpher Feststoff; R_F : 0.14 (EE); $[\alpha]_D^{22} = +49.0$ ($c = 1.85$, CHCl₃); HPLC: (Säule LUNA), Gradient C, $R_t = 33.9$ min.

α -Anomer: 400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.75 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, ³ $J = 7.44$ Hz); 7.59-7.51 (m, 4H, H₁-, H₈-Fmoc (7.57), *m*-Aryl); 7.43-7.25 (m, 16H, H₃-, H₆-Fmoc (7.41), H₂- H₇-Fmoc, H_{Aryl} Bn, Ph); 6.48 (d, 1H, NH GalNAc, ³ $J = 7.83$ Hz); 5.95 (d, 1H, NH Ser, ³ $J = 8.61$ Hz); 5.57 (m, 1H, H₈'); 5.49-5.41 (m, 2H, CHPh Acetal (5.47), CH_aH_b Bn (5.43)); 5.25 (dd, 1H, H₇', ³ $J_{7,8} = 8.61$ Hz, ³ $J_{7,6} = 2.35$ Hz); 5.12-4.97 (m, 5H, H₁ (5.10), H₂' (5.08), CH_aH_b Bn' (5.07), H₄' (5.06), NH NeuNAc (4.99)); 4.84 (m, 1H, H₄'); 4.70 (d, 1H, H₁'', ³ $J_{1,2} = 7.82$ Hz); 4.59 (dd, 1H, H₂, ³ $J_{2,3} = 9.78$ Hz, ³ $J_{2,1} = 3.52$ Hz); 4.51 (m, 1H, H₃''); 4.47-4.30 (m, 7H, CH₂ Bn'' (4.45), α -CH Ser (4.40), OCH₂-Fmoc (4.39+4.32), H₉'a (4.39), H₄ (4.32)); 4.23-4.01 (m, 3H, H₉-Fmoc (4.21), H_{6a} (4.18), H₅' (4.03)); 3.96-3.83 (m, 6H, H₃ (3.94), β -CH₂ Ser (3.91), H₉'b (3.87), H₅, H₅' (3.85), H_{6b} (3.84)); 3.53-3.42 (m, 3H, H₆' (3.51+3.44), H₆' (3.50)); 2.61 (dd, 1H, H_{3e}', ³ $J_{3e,4} = 4.30$ Hz, ² $J_{e,a} = 12.52$ Hz); 2.22-1.93 (m, 21H, 6*OAc, NHAc GalNAc (1.96)); 1.81 (s, 3H, NHAc NeuNAc); 1.62 (m, 1H, H_{3a}'); 1.45 (s, 9H, CH₃ *O**t*Bu).

103.0 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 170.3-169.9 (C=O); 156.2 (C=O Urethan); 143.9 (C_{4a}-, C_{4b}-Fmoc); 141.4 (C_{8a}-, C_{9a}-Fmoc); 137.9 (C_{ipso}-Bn); 129.1 (C₃-, C₆-Fmoc); 128.9-127.3 (C₂-, C₇-Fmoc, C_{o/m/p}-Bn, C_{o/p}-Ph); 126.5 (C_m-Ph); 125.2 (C₁-, C₈-Fmoc); 120.2 (C₄-, C₅-Fmoc); 101.9 (C₁''); 100.9 (CH Acetal); 99.1 (C₁); 97.0 (C₂'); 82.9 (C_{quart} *t*Bu); 75.2 (C₄); 74.4 (C₃); 73.7 (CH₂ Bn''); 72.5 (C₅, C₅''); 72.5 (C₆'); 71.8 (C₃''); 69.6 (C₂''); 69.5 (β -CH₂ Ser); 69.3 (C₄'); 69.3 (C₆); 68.9 (C₆''); 68.8 (CH₂ Bn'); 68.3 (C₈'); 68.1 (C₄''); 67.8 (C₇'); 67.5 (OCH₂-Fmoc); 63.4 (C₉'); 55.2 (α -CH Ser); 49.0 (C₅'); 48.7 (C₂);

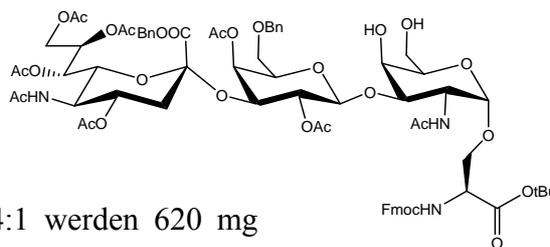
47.3 (C9-Fmoc); 37.6 (C3'); 28.2 (CH₃ OtBu); 23.2 (NHAc NeuNAc); 23.0 (NHAc GalNAc); 21.6-20.9 (6*CH₃ OAc).

ESI-MS [m/z] = 1583.0 ([M+Na]⁺, ber.: 1582.6).

C₈₀H₉₃N₃O₂₉ (1560.60) [1559.59]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-3-*O*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl}-*L*-serin-*tert*-butylester (45)**

[Fmoc-Ser([(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3))- β -6-*O*-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)-OtBu]



In 20 mL einer Mischung aus Essigsäure/Wasser 4:1 werden 620 mg

Fmoc-Ser([(NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3))- β -6-*O*-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-OtBu (44) gelöst und 1 h bei einer Badtemp. von 85 °C gerührt. Die Lösung wird i. Vak. eingengt, mit Toluol kodestilliert und durch semipräparative HPLC (JUPITER, Gradient J) gereinigt.

Ausb.: 371 mg (0.252 mmol, 76%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.41 (EE/CH₃OH 10:1); [α]_D²² = +38.7 (c = 1.50, CH₃OH); HPLC: (Säule LUNA), Gradient C, R_t = 26.9 min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 7.89 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J = 7.4 Hz); 7.75-7.68 (m, 4H, NH Ser (7.7), NH NeuNAc (7.70), H1-, H8-Fmoc (7.70)); 7.47-7.28 (m, 14H, H3-, H6-Fmoc (7.40), NH GalNAc (7.39), H2- H7-Fmoc (7.30), H_{Aryl} Bn (10H)); 5.39 (m, 1H, H8'); 5.33 (d, 1H, CH_aH_b Bn', ²J_{a,b} = 12.9 Hz); 5.26 (dd, 1H, H7', ³J_{7,8} = 9.1 Hz, ³J_{7,6} = 2.4 Hz); 5.09-5.04 (m, 2H, CH_aH_b Bn' (5.07), H4'' (5.06)); 4.82-4.77 (m, 2H, H4' (4.80), H2'' (4.78)); 4.77 (d, 1H, H1'', ³J_{1,2} = 7.8 Hz); 4.68-4.63 (m, 2H, 4-OH (4.66), 6-OH (4.65)); 4.61 (d, 1H, H1, ³J_{1,2} = 3.5 Hz); 4.53 (dd, 1H, H3'', ³J_{3,2} = 3.1 Hz, ³J_{3,4} = 9.0 Hz); 4.48 (m, 1H, CH_aH_b Bn''); 4.45 (d, 1H, CH_aH_b Bn'', ²J_{b,a} = 3.5 Hz); 4.37-4.16 (m, 6H, OCH₂-Fmoc (4.35), H2 (4.30), H9-Fmoc (4.23), α -CH Ser (4.22), H9'a (4.18)); 3.91 (dd, 1H, H9'b, ³J_{9,8} = 5.1 Hz, ²J_{a,b} = 12.5 Hz); 3.86-3.66 (m, 7H, H4 (3.84), H5' (3.84), H5'' (3.78), β -CH₂ Ser (3.75), H3 (3.71), H6' (3.68)); 3.61 (m, 1H, H5); 3.49-3.35 (m, 4H, H6 (3.47), H6'' (3.45+3.37)); 2.52 (m, 1H, H3e'); 2.19-1.84 (m, 21H, 6*CH₃ OAc, NHAc GalNAc (1.95)); 1.67 (s, 3H, NHAc Neu); 1.37-1.34 (m, 10H, CH₃ OtBu (1.36), H3ax' (1.35)).

103.0 MHz-¹³C-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 170.3-169.9 (C=O); 156.1 (C=O Urethan); 143.8 (C4a-, C4b-Fmoc); 140.7 (C8a-, C9a-Fmoc); 138.1 (C_{ipso} Bn); 128.9-127.3 (C2-, C7-Fmoc);

128.5 (C3-, C6-Fmoc); 128.2-127.0 (C_{o/m/p} Bn); 125.1 (C1-, C8-Fmoc); 120.2 (C4-, C5-Fmoc); 101.1 (C1''); 98.4 (C1); 96.1 (C2'); 81.1 (C_{quart} *t*Bu); 72.2 (CH₂ Bn''); 72.2 (C5''); 71.5 (C3''); 71.5 (C5); 71.2 (C3); 71.2 (C6'); 71.1 (C8'); 69.5 (C4'); 69.5 (C2''); 67.7 (CH₂ Bn'); 67.7-67.2 (C4'', C6''); 67.5 (C4); 67.2 (C7'); 66.7 (β -CH₂ Ser); 65.7 (OCH₂-Fmoc); 61.4 (C9'); 60.4 (C6); 55.1 (α -CH Ser); 47.7 (C2); 47.7 (C5'); 46.6 (C9-Fmoc); 37.6 (C3'); 27.6 (CH₃-O*t*Bu); 22.6 (CH₃ NeuNAc); 21.2 (CH₃ GalNAc); 21.2-20.6 (6*CH₃ OAc).

ESI-MS [m/z] = 1495.1 ([M+Na]⁺, ber.: 1494.6).

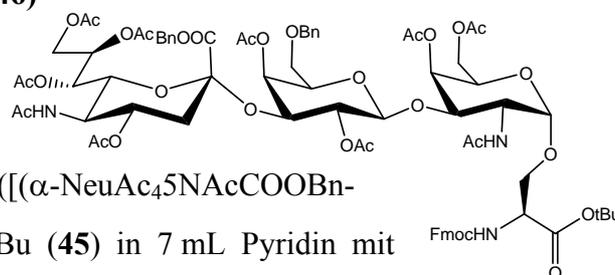
ESI-MS, Hochauflösend [m/z] = 1494.5490 ([M+Na]⁺, ber.: 1494.5479 (100%), Δ = 0.74 ppm); 1495.5527 ([M+Na]⁺, ber.: 1495.5513 (81.2%), Δ = 0.94 ppm); 1496.5555 ([M+Na]⁺, ber.: 1496.5547 (32.5%), Δ = 0.53 ppm).

HPLC-Reinheit: 92.0 % (260 nm)

C₇₃H₈₉N₃O₂₉ (1472.50) [1471.56]

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

[Fmoc-Ser([(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3))- β -Ac₂Gal-6OBn-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)-O*t*Bu]



Es werden 237 mg (0.161 mmol) Fmoc-Ser([(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3))- β -6-*O*-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)-O*t*Bu (**45**) in 7 mL Pyridin mit 14 mL Acetanhydrid versetzt und 14 h bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird i. Vak. eingengt und mit Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 100 mL Kieselgel mit EE/CH₃OH 10:1 gereinigt.

Ausb.: 254 mg (0.161 mmol, 99%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.08 (EE), 0.37 (EE/MeOH = 9:1); [α]_D²² = +46.3 (c = 2.40, CHCl₃).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J = 7.4 Hz); 7.55 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.47-7.18 (m, 14H, H3-, H6-Fmoc (7.38), H2- H7-Fmoc (7.29), H_{Aryl} Bn (10H)); 6.36 (d, 1H, NH GalNAc, ³J = 7.4 Hz); 5.92 (d, 1H, NH Ser, ³J = 8.61 Hz); 5.56 (m, 1H, H8'); 5.45-5.38 (m, 2H, H4''(5.43), CH_aH_b Bn' (5.40)); 5.25 (dd, 1H, H7', ³J_{7,8} = 2.7 Hz, ³J_{7,6} = 8.2 Hz); 5.10 (m, 1H, H4); 5.06 (d, 1H, CH_aH_b Bn', ²J = 8.6 Hz); 5.03-4.97 (m, 3H, H1

(5.01), H2'' (4.99), NH Neu); 4.83 (m, 1H, H4'); 4.60 (d, 1H, H1'', $^3J_{1,2} = 7.83$ Hz); 4.51 (d, 1H, $\underline{\text{CH}}_a\text{H}_b$ Bn'', $^2J = 11.3$ Hz); 4.49 (dd, 1H, H3'', $^3J_{3,2} = 10.2$ Hz, $^3J_{3,4} = 3.1$ Hz); 4.45-4.32 (m, 6H, H2 (4.43), $\underline{\text{CH}}_a\text{H}_b$ Bn'' (4.42), H9'a (4.42), α -CH Ser (4.42), OCH_2 -Fmoc (4.34)); 4.23-4.14 (m, 2H, H9-Fmoc (4.21), H6a (4.16)); 4.09-4.00 (m, 3H, H5 (4.07), H5' (4.04), H3 (4.02)); 3.94-3.77 (m, 5H, H6b (3.92), β -CH₂ Ser (3.89+3.82), H9'b (3.86), H5'' (3.79)); 3.53-3.46 (m, 2H, H6a'' (3.51), H6' (3.48)); 3.39 (dd, 1H, H6b'', $^3J_{6,5} = 6.7$ Hz, $^2J_{a,b} = 9.4$ Hz); 2.52 (dd, 1H, H3e', $^3J_{3,4} = 4.7$ Hz, $^2J_{e,a} = 12.5$ Hz); 2.13-1.92 (m, 27H, 8*CH₃ OAc, CH₃ GalNAc (1.96)); 1.81 (s, 3H, CH₃ NeuNAc); 1.63 (m, 1H, H3ax'); 1.45 (s, 9H, CH₃ OtBu).

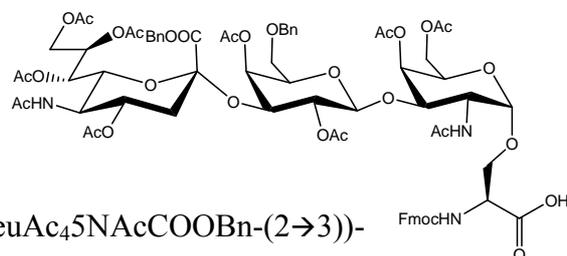
103.0 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 170.6-167.4 (C=O); 156.1 (C=O Urethan); 143.9 (C4a-, C4b-Fmoc); 141.4 (C8a-, C9a-Fmoc); 137.9 (C_{ipso}-Bn); 128.8-127.3 (C2-, C7-Fmoc, C_{o/m/p}-Bn); 127.8 (C3-, C6-Fmoc); 125.1 (C1-, C8-Fmoc); 120.2 (C4-, C5-Fmoc); 100.3 (C1''); 98.2 (C1); 97.0 (C2'); 82.3 (C_{quart} tBu); 73.5 ($\underline{\text{CH}}_2$ Bn''); 73.0 (C3''); 72.5 (C6'); 72.2 (C5''); 71.7 (C3); 69.8 (C2''); 69.2 (C4'); 68.9 (β -CH₂ Ser); 68.5 ($\underline{\text{CH}}_2$ Bn'); 68.4 (C4''); 68.1 (C8'); 68.0 (C6''); 67.9 (C7'); 67.8 (C4); 67.8 (C5); 67.5 (OCH₂-Fmoc); 63.1 (C9'); 63.0 (C6); 54.8 (α -CH Ser); 49.3 (C2); 49.0 (C5'); 47.1 (C9-Fmoc); 37.6 (C3'); 28.1 ($\underline{\text{CH}}_3$ OtBu); 23.1 ($\underline{\text{CH}}_3$ NeuNAc); 23.0 ($\underline{\text{CH}}_3$ GalNAc); 21.2-20.8 (8* $\underline{\text{CH}}_3$ OAc).

ESI-MS [m/z] = 1579.0 ([M+Na]⁺, ber.: 1578.6), 1595.0 ([M+K]⁺, ber.: 1594.7).

C₇₇H₉₃N₃O₃₁ (1556.56) [1555.58]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-3-*O*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl]-L-serin (47)**

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



Es werden 275 mg (0.177 mmol) Fmoc-Ser([(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3))- β -6OBn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)-OtBu (**46**) in 0.5 mL Anisol und 5 mL TFA gelöst und 1.5 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 30 mL Toluol verdünnt, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit je 30 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashfiltration an 100 mL Kieselgel mit CH₂Cl₂/EtOH/AcOH 89:10:1 gereinigt. Durch präparative HPLC (Säule LUNA, Gradient K) wurden Spuren des β -Anomers entfernt.

Ausb.: 265 mg (0.177 mmol, 99 %, 85 % nach HPLC); farbloser amorpher Feststoff; R_F : 0.52 (CH₂Cl₂/EtOH/AcOH 89:10:1); $[\alpha]_D^{22} = +60.2$ (c = 2.10, CHCl₃); HPLC: (Säule LUNA), Gradient C, $R_t = 11.9$ min.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J = 7.8$ Hz); 7.57 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $^3J = 7.0$ Hz); 7.45-7.26 (m, 14H, H3-, H6-Fmoc (7.39), H2- H7-Fmoc (7.28), H_{Aryl} Bn (10H)); 6.85 (d, 1H, NH GalNAc, $^3J = 7.0$ Hz); 5.82 (d, 1H, NH Ser, $^3J = 7.4$ Hz); 5.64 (dt, 1H, H8', $^3J_{8,7} = 2.0$ Hz, $^3J_{8,9} = 8.4$ Hz); 5.44 (m, 1H, H4); 5.40 (d, 1H, CH_aH_b Bn', $^3J_{a,b} = 12.1$ Hz); 5.23 (dd, 1H, H7', $^3J_{7,8} = 2.0$ Hz, $^3J_{7,6} = 8.6$ Hz); 5.18 (d, 1H, H1, $^3J_{1,2} = 3.1$ Hz); 5.09-4.97 (m, 4H, H4'' (5.07), CH₂ Bn' (5.05), NH Neu (5.02), H2'' (4.99)); 4.83 (dt, 1H, H4', $^3J_{4,3} = 4.6$, $^3J_{4,5} = 11.2$ Hz); 4.61 (d, 1H, H1'', $^3J_{1,2} = 8.2$ Hz); 4.57-4.39 (m, 6H, CH_aH_b Bn'' (4.54), α -CH Ser (4.50), H3'' (4.49), CH_aH_b Bn'' (4.44), OCH_aH_b-Fmoc (4.43), H9'a (4.41)); 4.38-4.29 (m, OCH_aH_b-Fmoc (4.36), H2 (4.31)); 4.23-4.12 (m, 2H, H9-Fmoc (4.21), H6a (4.14)); 4.08-3.78 (m, 8H, β -CH₂ Ser (4.06+3.95), H5 (4.05), H5' (4.05), H3 (3.95), H6b (3.94), H9'b (3.87), H5'' (3.80)); 3.54-3.48 (m, 2H, H6a'' (3.52), H6' (3.50)); 3.41 (dd, 1H, H6b'', $^3J_{6,5} = 6.3$ Hz, $^2J_{a,b} = 9.8$ Hz); 2.60 (dd, 1H, H3e', $^3J_{3,4} = 4.6$ Hz, $^2J_{e,a} = 12.5$ Hz); 2.15-1.92 (m, 27H, 8*CH₃ OAc, CH₃ GalNAc (2.09)); 1.81 (s, 3H, CH₃ NeuNAc); 1.63 (m, 1H, H3_{ax}').

103.0 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 172.8-167.4 (C=O); 156.0 (C=O Urethan); 143.9 (C4a-, C4b-Fmoc); 141.4 (C8a-, C9a-Fmoc); 138.0 (C_{ipso} Bn); 129.0-127.1 (C2-, C7-Fmoc, C3-, C6-Fmoc, C_{o/m/p} Bn); 125.1 (C1-, C8-Fmoc); 120.2 (C4-, C5-Fmoc); 101.1 (C1''); 98.3 (C1); 97.0 (C2'); 73.8 (C3); 73.6 (CH₂ Bn''); 72.4 (C5''); 72.3 (C6'); 71.7 (C3''); 69.6 (C2''); 69.3 (C4'); 68.9 (C4); 68.9 (β -CH₂ Ser); 68.8 (CH₂ Bn'); 68.3 (C6''); 68.1 (C4''); 67.9 (C8'); 67.9 (C5); 67.8 (C7'); 67.4 (OCH₂-Fmoc); 63.7 (C9'); 63.1 (C6); 54.7 (α -CH Ser); 50.1 (C2); 49.0 (C5'); 47.3 (C9-Fmoc); 37.5 (C3'); 23.2 (CH₃ NeuNAc); 22.5 (CH₃ GalNAc); 21.4-20.9 (8*CH₃ OAc).

ESI-MS [m/z] = 1522.5+1523,5 ([M+Na]⁺, ber.: 1522.5+1523.5).

ESI-MS, Hochauflösend [m/z] = 1522.5004 ([M+Na]⁺, ber.: 1522.5065 (100.0%), $\Delta = 4.0$ ppm); 1523.5006 ([M+Na]⁺, ber.: 1523.5098 (81.2%), $\Delta = 6.0$ ppm);

1524.5114 ([M+Na]⁺, ber.: 1524.5132 (32.5%), $\Delta = 1.2$ ppm).

HPLC-Reinheit: 99.6 % (254nm, Integrationsbereich 6-40 min)

C₇₃H₈₅N₃O₃₁ (1500.46) [1499.52]

5.2.6 Synthesen zum Kapitel 3.1.5

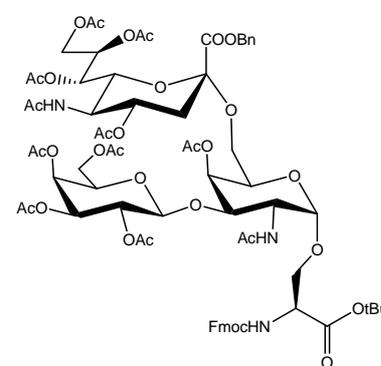
***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-4-*O*-acetyl-2-deoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl]-*L*-serin-*tert*-butylester (48)**

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

Variante ausgehend von

Fmoc-Ser([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)] [α / β -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -GalNAc)-OtBu **50**:

Eine Lösung von 2.40 g (0.77 mmol) Fmoc-Ser([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- [α / β -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -GalNAc)-OtBu (**50**) in 10 mL Pyridin wird auf 0 °C gekühlt und mit 20 mL Acetanhydrid versetzt. Es wird 14 h bei gerührt (Eisbad auftauen lassen). Die Lösung wird i. Vak. eingengt und mit Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 1.5 L Kieselgel mit EE gereinigt.



Ausb.: 1.17 g (0.77 mmol, 99%); farbloser amorpher Feststoff.

Variante ausgehend von Fmoc-Ser([α -NeuAc₄5AcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -GalNAc)-OtBu **30**:

In einer Suspension aus 35 mL CH₂Cl₂, 20 mL Nitromethan und 3.5 g Molsieb 4 Å werden 1.12 g (0.98 mmol) Fmoc-Ser([α -NeuAc₄5AcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -GalNAc)-OtBu (**30**) und 3.23 g (7.84 mmol, 8 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid **1** eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Nach der Zugabe von 1.24 g (4.90 mmol, 5 Äquiv.) Hg(CN)₂ wird das Reaktionsgemisch weitere 2.5 h bei Raumtemp. gerührt, und dann wieder mit 1.24 g Hg(CN)₂ versetzt. Die Suspension wird nun 14 h bei Raumtemp. gerührt, mit 100 mL CH₂Cl₂ verdünnt und über Celite in 60 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. filtriert. Die org. Phase wird abgetrennt, mit 60 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung, zweimal mit 50 mL einer ges. NaI-Lösung und ein letztes Mal mit 60 mL einer ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die Lösung wird nun über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt und dann durch Flashchromatographie an 1.5 L Kieselgel mit EE \rightarrow EE/CH₃OH 5:1 gereinigt.

Ausb.: 828 mg (0.43 mmol, 44%); farbloser amorpher Feststoff.

R_F: 0.14 (EE); [α]_D²² = +29.5 (c = 1.00, CHCl₃); HPLC: (Säule LUNA), Gradient C, R_t (α) = 26.1 min, R_t (β) = 28.4 min.

α : 400 MHz- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ [ppm]: 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 7.58 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc, $^3J = 6.6$ Hz); 7.41-7.29 (m, 9H, H2-, H3-, H6- H7-Fmoc, H_{Ar} Bn); 5.74 (m, 1H, NH Ser); 5.34 (d+m, 2H, H7', H4'' $^3J_{4,3} = 3.5$ Hz); 5.30-5.24 (m, 2H, H8' (5.28), H4 (5.26)); 5.22-5.06 (m, 3H, OCH₂-Bn (5.20+5.15), H2'' (5.08)); 4.93 (dd, 1H, H3'', $^3J_{2,3} = 3.5$ Hz, $^3J_{2,1} = 7.8$ Hz); 4.84-4.78 (m, 2H, H1 (4.82), H4' (4.80)); 4.54 (d, 1H, H1'', $^3J_{1,2} = 7.8$ Hz); 4.50-4.38 (m, 4H, H2 (4.48), OCH₂-Fmoc (4.40+4.32), α -CH Ser (4.40)); 4.27 (dd, 1H, H6a'', $^3J_{6a,5} = 2.4$ Hz, $^2J_{a,b} = 12.1$ Hz); 4.24-4.20 (m, 1H, H9-Fmoc); 4.15-3.88 (m, 11H, H9'a (4.13), H5' (4.07), H9'b (4.07), H6b'' (4.04), H6' (3.98), β -CH₂H_b Ser (3.94), H5 (3.88), H5'' (3.84), H3 (3.81), H6a (3.76), β -CH₂H_b Ser (3.75)); 3.29 (dd, 1H, H6b, $^3J_{6b,5} = 3.5$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 9.4$ Hz); 2.60 (dd, 1H, H3e', $^3J_{3e,4} = 3.5$ Hz, $^2J_{e,a} = 12.5$ Hz); 2.15-1.78 (m, 37H, NHAc GalNAc (1.97), 9*OAc, H3ax' (1.93), NHAc Neu (1.87)); 1.47 (s, 9H, *t*Bu).
 103.0 MHz- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ [ppm]: 128.6-127.3 (C_{o/m/p}-Bn (128.6), C2- (127.3), C3- (128.0), C6- (128.0), C7-Fmoc (127.3)); 125.1 (C1-, C8-Fmoc); 120.2 (C4-, C5-Fmoc); 100.7 (C1); 98.9 (C1''); [81.1 (*t*Bu_{quart});] 73.4 (C3); 72.8 (C6'); 71.0 (C5''); 70.9 (C3''); 69.1 (C4', C5); 68.9 (C2''); 68.5 (C4); 68.4 (C4''); 68.1 (β -CH₂ Ser); 68.0 (OCH₂-Ph); 67.4 (OCH₂-Fmoc); 67.3 (C8'); 66.8 (C7'); 63.9 (C6); 62.6 (C6''); 60.8 (C9'); 55.2 (α -CH Ser); 49.3 (C5'); 48.9 (C2); 47.2 (C9-Fmoc); 37.7 (C3'); 28.2 (CH₃ *t*Bu); 23.4 (CH₃ NHAc); 20.8 (CH₃ OAc). Signale aus dem HMQC.

ESI-MS [m/z] = 1531.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1530.5).

ESI-MS, Hochauflösend [m/z] = 1530.5261 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1530.5321, $\Delta = 3.92$ ppm); 776.7601 ($[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, ber.: 776.7609, $\Delta = 1.03$ ppm).

HPLC-Reinheit: 78.8 % α -Anomer; 19.7 % β -Anomer; die Angabe gilt für die Variante ausgehend von Fmoc-Ser($[\alpha$ -NeuAc₄5AcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -GalNAc)-OtBu **30**; im Fall der Acetylierungsreaktion wird nur ein Anomer beobachtet. Gesamt: 98.5 %;

$\text{C}_{72}\text{H}_{89}\text{N}_3\text{O}_{32}$ (1508.48) [1507.54]

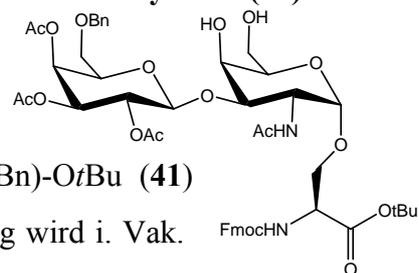
***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (49)**

[Fmoc-Ser($[\beta$ -6-*O*-BnAc₃Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)-OtBu]

In 20 mL einer Mischung aus Essigsäure/Wasser 4:1 werden

470 mg Fmoc-Ser($[\beta$ -6-*O*-BnAc₃Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-OtBu (**41**)

gelöst und 1 h bei einer Badtemp. von 85 °C gerührt. Die Lösung wird i. Vak.



eingengt, mit Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an 200 mL Kieselgel mit EE gereinigt.

Ausb.: 277 mg (0.29 mmol, 64%); farbloser amorpher Feststoff; R_F : 0.16 (EE); $[\alpha]_D^{22} = +39.0$ (c = 2.00, DMSO).

400 MHz- $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), δ [ppm]: 7.90 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 7.70 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $^3J = 7.0$ Hz); 7.63 (d, 1H, NH Ser, $^3J = 8.6$ Hz); 7.46 (d, 1H, NH GalNAc, $^3J = 9.8$ Hz); 7.42 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 7.36-7.22 (m, 7H, H_{Aryl} Bn, H2-, H7-Fmoc (7.32)); 5.30 (d, 1H, H4'', $^3J_{4,3} = 2.74$ Hz); 4.99-4.93 (m, 2H, H3'' (4.98), H2'' (4.95)); 4.84 (d, 1H, H1'', $^3J_{1,2} = 7.04$ Hz); 4.64 (t, 1H, 6-OH, $^3J = 5.48$ Hz); 4.62-4.57 (m, 2H, 4-OH (4.60), H1 (4.59)); 4.48-4.37 (m, 4H, OCH₂Ph (4.46+4.35), CH₂ Fmoc (4.45+4.39)); 4.28-4.20 (m, 3H, H9-Fmoc (4.26), H2 (4.26), α -CH Ser (4.22)); 4.06 (m, 1H, H5''); 3.89 (m, 1H, H4); 3.76-3.67 (m, 3H, β -CH₂ Ser (3.74), H3 (3.69)); 3.61 (m, 1H, H5); 3.49-3.42 (m, 4H, H6 (3.47), H6'' (3.44)); 2.07-1.87 (3*s, 9H, 3*CH₃ OAc); 1.82 (s, 3H, NHAc); 1.36 (s, 9H, CH₃ *tert*Bu Ser).

170.3-169.0 (C=O); 156.1 (C=O Urethan); 143.7 (C4a-, C4b-Fmoc); 140.8 (C8a-, C9a-Fmoc); 137.9 (C_{ipso} Aryl); 127.7-127.1 (*o,m,p*-Bn, C3-/C6-, C2-/C7-Fmoc); 125.2 (C1-, C8-Fmoc); 120.2 (C4-, C5-Fmoc); 101.1 (C1''); 98.4 (C1); 76.4 (C_{quart} *t*Bu); 76.4 (C3); 72.3 (CH₂ Bn, CH₂-Fmoc); 71.7 (C5); 70.9 (C5''); 70.8 (C3''); 68.5 (C2''); 67.5 (C4''); 67.3 (C4); 67.3 (C6''); 66.7 (β -CH₂ Ser); 60.5 (C6); 55.1 (α -CH Ser); 47.6 (C9-Fmoc); 46.6 (C2); 27.6 (CH₃ *t*Bu Ser); 22.9 (CH₃ NHAc); 20.7, 20.4, 20.3 (3*CH₃ OAc).

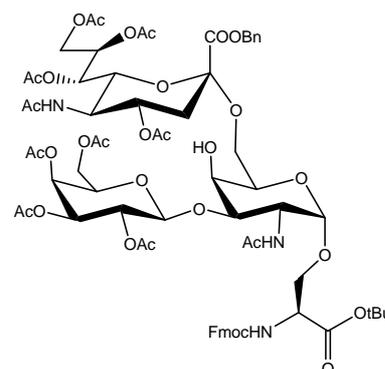
ESI-MS $[m/z] = 931.8$ ($[M-tBu+H+Na]^+$, ber.: 931.3); 987.7 ($[M+Na]^+$, ber.: 987.4).

C₄₉H₆₀N₂O₁₈ (965.00) [964.38]

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α/β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-serin-*tert*-butylester (50)**

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

Zu 15 g gepulverten, über einem Quarzstrahler i. Vak. ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å werden unter Argon 3.70 g (3.73 mmol) [Fmoc-Ser([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)-*Ot*Bu] (**23**)



gelöst in 160 mL absol. Acetonitril, über eine Kanüle zugegeben. Dann werden 5.25 g (7.82 mmol, 1.63 Äquiv.) α -NeuAc₄5NAcCOOBnXan **29**, gelöst in 80 mL absol. CH₂Cl₂, ebenfalls zur Suspension über eine Kanüle zugegeben. Nach Rühren über 1.5 h bei Raumtemp. werden im Argon-Gegenstrom 2.0 g (7.82 mmol, 1.63 Äquiv.) Silbertriflat¹⁴⁵ zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Suspension wird auf -65 °C gekühlt und langsam mit 4.88 mL (7.82 mmol, 1.63 Äquiv.) einer auf 0 °C gekühlten 1.6 M CH₃SBr-Lösung¹⁴⁶ mittels einer Spritzenpumpe versetzt. Es wird drei Stunden bei -65 °C nachgerührt und die Reaktion mit 4.5 mL Diisopropylamin abgebrochen. Man läßt das Reaktionsgemisch auf Raumtemp. erwärmen und verdünnt dann mit 200 mL CH₂Cl₂. Es wird über Celite filtriert, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingeengt. Das Rohprodukt durch Flashchromatographie an 1.5 L Kieselgel mit EE → EE/CH₃OH 9:1 gereinigt. Man erhält nicht nur ein Anomerengemisch; auch die Edukte lassen sich nicht vollständig vom Produkt abtrennen, so daß auf eine ausführliche Analytik verzichtet wurde und eine weitere Reinigung nach Acetylierung der H4-Position erfolgte (Verbindung **48**).

Ausb.: 2.40 g (0.77 mmol, 20 %, 57 % Umsatz); gelber amorpher Feststoff;

R_F: 0.43 (EE/CH₃OH 20:1); 0.08 (EE).

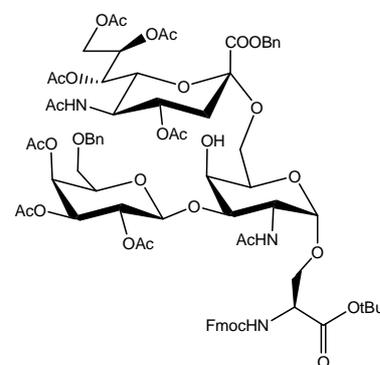
ESI-MS [m/z] = 1488.3, 1489.8 ([M+Na]⁺, ber.: 1488.5 (100.0%), 1489.5 (77.9%)).

C₇₀H₈₇N₃O₃₁ (1466.44) [1465.53]

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α / β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl]-*L*-serin-*tert*-butylester (**51**)**

[Fmoc-Ser([β -6-*O*-Ac₃Gal-(1→3)] [α / β -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)]- α -GalNAc)-OtBu]

Zu 1 g gepulverten, über einem Quarzstrahler i. Vak. ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å werden unter Argon 277 mg (0.287 mmol) Fmoc-Ser([β -6-*O*-Ac₃Gal-(1→3)]- α -GalNAc)-OtBu (**49**), gelöst in 6 mL absol. Acetonitril, über eine Kanüle zugegeben. Dann werden über eine Kanüle 771 mg (1.15 mmol, 4 Äquiv.) α -NeuAc₄5NAcCOOBnXan **29**, gelöst in 6 mL absol. CH₂Cl₂, zur Suspension gegeben. Es wird 0.75 h bei Raumtemp. gerührt und auf -50 °C gekühlt. Im Argon-Gegenstrom werden 294 mg (1.15 mmol, 4 Äquiv.) Silbertriflat¹⁴⁵, gelöst in 6 mL absol. Acetonitril, zum Reaktionsgemisch gegeben Die



Suspension wird nun langsam über eine Stunde mit 1.44 mL (1.15 mmol, 4 Äquiv.) einer auf ca. -10 °C gekühlten 0.8 M CH₃SBr-Lösung (Standard-Darstellung¹⁴⁶, nur doppelte Dichloroethan Menge) mittels einer Spritzenpumpe versetzt. Es wird 20 min bei -50 °C nachgerührt dann 14 h bei -30 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0.24 mL Ethyldiisopropylamin abgebrochen. Man läßt das Reaktionsgemisch auf Raumtemp. erwärmen und verdünnt dann mit 100 mL CH₂Cl₂. Es wird über Celite filtriert, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingeengt. Das Rohprodukt durch Flashchromatographie an 100 mL Kieselgel mit EE → EE/CH₃OH 9:1 gereinigt. Man erhält ein Anomerengemisch.

Ausb.: 307 mg (0.203 mmol, 71%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.22 (EE).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J = 7.8 Hz); 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³J = 7.4 Hz); 7.41-7.27 (m, 14H, H3-, H6-Fmoc (7.39), H2- H7-Fmoc (7.29), H_{Aryl} Bn (10H)); 5.99 (sb, 1H, NH GalNAc); 5.80 (sb, 1H, NH Ser); 5.45-5.12 (m, 7H, H4'' (5.42), H8' (5.36), H7' (5.31), NH Neu' (5.3), CH₂ Bn' (5.23+5.14), H2'' (5.14)); 4.95 (dd, 1H, H3'', ³J_{3,4} = 3.1 Hz, ³J_{3,2} = 10.6 Hz); 4.82 (m, 1H, H4'); 4.72 (bs, 1H, H1); 4.57-4.30 (m, 8H, H1'' (4.53), H2 (4.49), CH₂ Bn'' (4.47+4.34), OCH₂-Fmoc (4.43+4.37), α-CH Ser (4.38), H9'a (4.32)); 4.22 (m, 1H, H9-Fmoc); 4.08 (m, 4H, H5' (4.03), 4-OH (4.05), H6' (4.05), H9'b (4.05)); 3.99-3.85 (m, 2H, H4 (3.96), H6a (3.87)); 3.84-3.64 (m, 5H, H5'' (3.82), H3 (3.77), β-CH₂ Ser (3.71), H5 (3.66)); 3.55 (m, 1H, H6b); 3.46 (dd, 1H, H6a'', ³J_{6,5} = 5.5 Hz, ²J_{a,b} = 9.4 Hz); 3.40 (dd, 1H, H6b'', ³J_{6,5} = 5.5 Hz, ²J_{b,a} = 9.4 Hz); 2.62 (m, 1H, H3e'); 2.16-1.83 (m, 28H, 7*OAc, NHAc Gal (1.94), H3a' (1.89), NHAc Neu (1.86)); 1.46 (s, 9H, CH₃ OtBu). Man beobachtet überlagerte Signale wegen des Anomerengemischs.

103.0 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 170.6-167.4 (C=O); 156.0 (C=O Urethan); 143.9 (C4a-, C4b-Fmoc); 141.5 (C8a-, C9a-Fmoc); 135.0 (C_{ipso} Bn); 128.9-127.2 (C2-, C7-Fmoc, C_{o/m/p} Bn); 128.0 (C3-, C6-Fmoc); 125.1 (C1-, C8-Fmoc); 120.2 (C4-, C5-Fmoc); 101.9 (C1''); 99.0 (C1, C2'); 83.2 (C_{quart} tBu); 77.9 (C5); 73.4 (CH₂ Bn''); 72.9 (C6'); 72.2 (C5''); 70.9 (C3''); 69.2 (C4'); 69.1 (C8'); 69.0 (C2''); 68.9 (C3); 68.4 (β-CH₂ Ser); 68.0 (CH₂ Bn'); 68.0 (C4); 67.6 (C7'); 67.3 (C4''); 67.3 (OCH₂-Fmoc); 67.2 (C6''); 63.7 (C6); 62.6 (C9'); 55.1 (α-CH Ser); 49.3 (C5'); 47.8 (C2); 47.2 (C9-Fmoc); 37.7 (C3'); 28.1 (CH₃ OtBu); 23.2 (CH₃ NHAc Neu, Gal); 21.1-20.8 (7*CH₃ OAc).

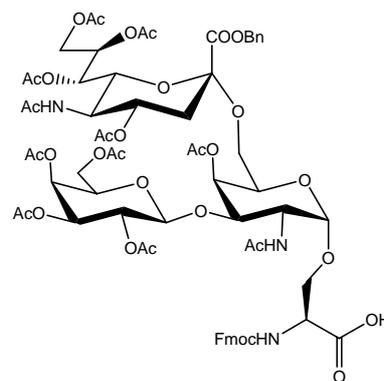
ESI-MS, Hochauflösend [m/z] = 1536.5538, 1537.5564 ([M+Na]⁺, ber.: 1536.5585, Δ = 3.06, 1537.5619, Δ = 3.58 ppm).

C₇₅H₉₁N₃O₃₀ (1514.53) [1513.57]

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-4-*O*-acetyl-2-deoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl]-*L*-serin (53)**

[Fmoc-Ser([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)] [α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -AcGalNAc)-OH]

Es werden 1.15 g (0.76 mmol) Fmoc-Ser([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- [α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -AcGalNAc)-*O**t*Bu (48) in 1 mL Anisol und 10 mL TFA gelöst und 1.5 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 30 mL Toluol verdünnt, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit je 30 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashfiltration an 150 mL Kieselgel mit EE/CH₃OH 6:1 vorgereinigt und dann das Produkt durch präparative HPLC (Säule: Luna, Gradient K) isoliert.



α -Anomer:

Ausb.: 633.4 mg (0.44 mmol, 70%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = +35.8$ ($c = 2.25$, DMSO); HPLC: (Säule LUNA), Gradient D, $R_t = 21.3$ min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆), δ [ppm]: 7.89 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³*J* = 7.8 Hz); 7.75-7.69 (m, 3H, NH Neu (7.73), H1-, H8-Fmoc (7.71)); 7.63 (d, 1H, NH Ser, ³*J* = 8.6 Hz); 7.54 (d, 1H, NH GalNAc, ³*J* = 9.4 Hz); 7.43-7.35 (m, 9H, H2-, H3-, H6- H7-Fmoc, H_{Ar} Bn); 5.28-5.11 (m, 6H, H8' (5.26), OCH₂-Bn (5.22), H4'' (5.20), H4 (5.18), H7' (5.13)); 5.01 (dd, 1H, H3'', ³*J*_{3,2} = 3.5 Hz, ³*J*_{3,4} = 10.2 Hz); 4.85-4.69 (m, 4H, H1'' (4.83), H2'' (4.80), H4' (4.80), H1 (4.71)); 4.38-3.88 (m, 14H, OCH₂-Fmoc (4.36), α -CH Ser (4.27), H9-Fmoc (4.25), H6a (4.18), H2 (4.14), H5 (4.11), H9'a (4.06), H3 (4.03), H6b (3.99), H9'b (3.99), H5'' (3.93), H5' (3.92), H6' (3.90)); 3.79-3.63 (m, 3H, β -CH_aH_b Ser (3.77+3.76), H6a'' (3.65)); 3.15 (dd, 1H, H6b'', ³*J*_{6b,5} = 2.7 Hz, ²*J*_{a,b} = 9.4 Hz); 2.58 (dd, 1H, H3e', ³*J*_{3e,4} = 4.7 Hz, ²*J*_{e,a} = 12.9 Hz); 2.13-1.65 (m, 34H, 9*CH₃ OAc, NHAc GalNAc (1.82), H3ax' (1.68), NHAc Neu (1.67)).

103.0 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆), δ [ppm]: 169.1 (9*C=O Ac); 156.1 (C=O Urethan); 144.2 (C4a-, C4b-Fmoc);] 140.7 (C8a-, C9a-Fmoc); 135.2 (C_{ipso} Bn); 128.2 (C_{o/m/p} Bn); 127.5+126.9 (C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc); 124.9 (C1-, C8-Fmoc); 119.9 (C4-, C5-Fmoc); 99.7 (C1''); 97.7 (C1); 72.0 (C6'); 71.6 (C3); 69.9 (C3''); 69.4 (C5); 69.0 (C7'); 68.9 (C4'); 68.1

(C2''); 67.8 (C5''); 67.7 (C4''); 67.2 (OCH₂-Ph); 66.7 (C8'); 66.6 (β-CH₂ Ser); 66.5 (C4); 65.4 (OCH₂-Fmoc); 63.4 (C6''); 61.6 (C6); 60.6 (C9'); 54.2 (α-CH Ser); 48.0 (C2); 47.4 (C5'); 46.4 (C9-Fmoc); 37.3 (C3'); 22.4 (NHAc GalNAc); 22.3 (NHAc Neu); 20.6-20.0 (9*CH₃ OAc).

β-Anomer:

Ausb.: 145.1 mg (0.10 mmol, 13%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +6.4$ (c = 1.27, DMSO); HPLC: (Säule LUNA), Gradient D, R_t = 22.9 min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ[ppm]: 7.89 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J = 7.4 Hz); 7.73-7.68 (m, 3H, H1-, H8-Fmoc (7.71), NH Neu (7.70)); 7.58-7.46 (m, 2H, NH Ser (7.56), NH GalNAc (7.48)); 7.43-7.35 (m, 9H, H2-, H3-, H6- H7-Fmoc, H_{Ar} Bn); 5.33-4.99 (m, 8H, H7' (5.31), H4'' (5.27), H4 (5.25), OCH₂-Bn (5.19+5.13), H8' (5.13), H3'' (5.02), H4' (5.01)); 4.85-4.72 (m, 3H, H1'' (4.83), H2'' (4.80), H1 (4.74)); 4.61 (m, 1H, H6a); 4.44-3.87 (m, 13H, OCH₂-Fmoc (4.42+4.36), H9-Fmoc (4.26), α-CH Ser (4.25), H2 (4.19), H5 (4.11), H3 (4.05), H9'a (4.04), H6b (4.03), H5'' (3.98), H9'b (3.97), H6' (3.91), H5' (3.89)); 3.79-3.58 (m, 3H, β-CH_aH_b Ser (3.77+3.68), H6a'' (3.60)); 3.41 (dd, 1H, H6b'', ³J_{6b,5} = 5.9, Hz, ²J_{a,b} = 11.0 Hz); 2.38 (dd, 1H, H3e', ³J_{3e,4} = 4.3 Hz, ²J_{e,a} = 12.5 Hz); 2.13-1.67 (m, 34H, 9*CH₃ OAc, NHAc GalNAc (1.82), H3ax' (1.75), NHAc Neu (1.69)).

128.2 (C_{o/m/p}-Bn); 127.5+126.9 (C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc); 124.9 (C1-, C8-Fmoc); 119.9 (C4-, C5-Fmoc); 99.7 (C1''); 98.0 (C1); 72.5 (C6'); 71.2 (C8'); 70.8 (C3); 69.9 (C3''); 69.3 (C7'); 69.3 (C5); 68.5 (C4'); 68.1 (C2''); 67.9 (C4''); 67.3 (C5''); 66.7 (OCH₂-Ph); 66.6 (C4); 66.6 (β-CH₂ Ser); 65.4 (OCH₂-Fmoc); 62.8 (C6''); 61.5 (C6); 60.4 (C9'); 54.2 (α-CH Ser); 48.0 (C2); 47.5 (C5'); 46.3 (C9-Fmoc); 36.6 (C3'); 22.4 (NHAc GalNAc); 22.3 (NHAc Neu); 20.6-20.0 (9*CH₃ OAc).

ESI-MS [m/z] = 1450.6 ([M]⁻, ber.: 1450.5).

ESI-MS, Hochauflösend [m/z] = 1452.4935 ([M+H]⁺, ber.: 1452.4876, Δ = 4.06 ppm).

HPLC-Reinheit: 99.7 % (215 nm, Integrationsbereich 8-60 min)

C₆₈H₈₁N₃O₃₂ (1452.37) [1451.48]

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α/β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-serin (54)**

[Fmoc-Ser([β -6-*O*-Ac₃Gal-(1 \rightarrow 3)] [α/β -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -GalNAc)-*O*tBu]

Es werden 305 mg (0.20 mmol) Fmoc-Ser([β -6-*O*-Ac₃Gal-(1 \rightarrow 3)] [α/β -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -GalNAc)-*O*tBu

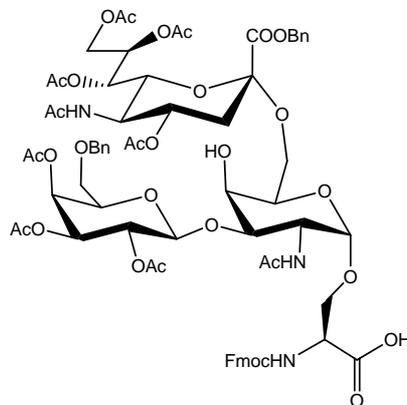
(51) mit 0.5 mL Anisol versetzt, in 10 mL TFA gelöst und 1.75 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Das

Reaktionsgemisch wird mit 30 mL Toluol verdünnt, das Lösungsmittel wird destillativ entfernt und der Rückstand mit 30 mL CH₂Cl₂ kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch semipräparative HPLC (Säule LUNA, Gradient J) gereinigt, und es wird das reine Anomer erhalten.

Ausb.: 180.4 mg (0.13 mmol, 61%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = +27.1$ ($c = 1.00$, CHCl₃); HPLC: (Säule LUNA), Gradient C, $R_t = 8.8$ min.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.72 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, ³ $J = 7.3$ Hz); 7.59 (m, 2H, H₁-, H₈-Fmoc); 7.38-7.24 (m, 14H, H₃-, H₆-Fmoc (7.36), H₂- H₇-Fmoc (7.26), H_{Aryl} Bn (10H)); 6.49 (s_b, 1H, NH GalNAc); 6.17 (s_b, 1H, NH Ser); 5.43-5.27 (m, 4H, CH_aH_b Bn' (5.40), H₈' (5.39), H₄'' (5.39-5.38), H₇' (5.29), 5.13-4.98 (m, 3H, H₂'' (5.11*+5.06*), CH_aH_b Bn' (5.05), NH Neu); 4.97-4.91 (m, 1H, H₁* (4.95), H₃''* (4.93)); 4.87 (dd, 1H, H₃''*, ³ $J_{3,4} = 2.9$ Hz, ³ $J_{3,2} = 10.5$ Hz); 4.80-4.71 (m, 1.5H, H₄' (4.78), H₁* (4.73)); 4.65 (m, 0.5H, α -CH Ser*); 4.51-4.39 (m, 3.5H, H₁''* (4.49), CH_aH_b Bn'' (4.44), OCH₂-Fmoc (4.41)); 4.35-4.18 (m, 5H, H₉'a* (4.33), α -CH Ser* (4.31), β -CH_aH_b Ser (4.31), CH_aH_b Bn'' (4.29), H₉'a* (4.27), H₁''* (4.24), H₉-Fmoc (4.20)); 4.11-3.80 (m, 8.5, H₂* (4.09), H₉'b (4.07), H₅' (4.06), β -CH_aH_b Ser (4.06), H₆' (4.03), 4-OH (4.0), H₄* (3.95+3.90), H_{6a}* (3.90), H₂* (3.85), H₃* (3.83), H_{6a}* (3.82)); 3.76-3.59 (m, 2H, H₃* (3.74), H₅''* (3.72), H₅* (3.63+3.61)); 3.48-3.36 (m, 2.5H, H_{6b}* (3.46+3.45), H_{6a}''* (3.42+3.38), H₅* (3.40)); 3.18 (m, 1H, H_{6b}''); 2.57 (m, 1H, H_{3e}'); 2.11-1.84 (m, 25H, 7*OAc, NHAc Gal (2.05), H_{3a}' (1.86)); 1.81 (m, 3H, NHAc Neu).

103.0 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 170.7-167.3 (C=O); 156.0 (C=O Urethan); 143.9 (C_{4a}-, C_{4b}-Fmoc); 141.3 (C_{8a}-, C_{9a}-Fmoc); 137.4 (C_{ipso}-Bn); 128.9-127.5 (C_{o/m/p}-Bn); 127.8



(C3-, C6-Fmoc); 127.1 (C2-, C7-Fmoc); 125.2 (C1-, C8-Fmoc); 120.0 (C4-, C5-Fmoc); 102.1+102.0 (C1''*); 98.6+98.0 (C1*); 97.0 (C2'); 80.7+78.5 (C5*); 73.3 ($\underline{\text{CH}}_2 \text{ Bn}''$); 72.7 (C6'); 71.9 (C3*); 71.9 (C5''); 70.9+70.7 (C3''*); 69.2 (C4'*); 69.0 (C4'', C4*); 68.9 (C2''*); 68.8 ($\underline{\text{CH}}_2 \text{ Bn}'$, C3*, C5''*); 68.6 (C4''*); 68.5 (C2''*); 67.2 (C6''*); 67.4 (C4*); 67.3 (C8'); 67.3 (C7'); 67.0 (C6''*); 66.8 (OCH₂-Fmoc); 66.8 (β -CH₂ Ser); 63.7+63.2 (C6*); 62.6+62.3 (C9'*); 55.5+54.4 (α -CH Ser*); 52.3 (C2*); 49.1 (C5'); 47.3 (C2*); 47.2-(C9-Fmoc); 37.7 (C3'); 23.2 (NHAc Neu); 23.2 (NHAc Gal); 21.1-20.8 (7*OAc).

Das Zwitterion und ein TFA-Salz liegen nebeneinander vor (ca. 1:1) und führen zur Signalverdopplung. „Halbe“ Protonen sind mit einem Stern markiert, Signale der beiden Formen die zusammenfallen werden nach der sonst verwendeten Nomenklatur beschrieben.

ESI-MS, [m/z] = 1480.5, 1481.5 ([M+Na]⁺, ber.: 1480.5, 1481.5).

ESI-MS, Hochauflösend [m/z] = 1480.4891 ([M+Na]⁺, ber.: 1480.4959 (100.0%), Δ = 4.6 ppm); 1481.4922 ([M+Na]⁺, ber.: 1481.4993 (79.0%), Δ = 4.8 ppm); 1482.5017 ([M+Na]⁺, ber.: 1482.5026 (30.7%), Δ = 0.61 ppm).

C₇₁H₈₃N₃O₃₀ (1458.42) [1457.51]

5.2.7 Synthesen zum Kapitel 3.1.6

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-3-*O*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-serin-*tert*-butylester (55)**

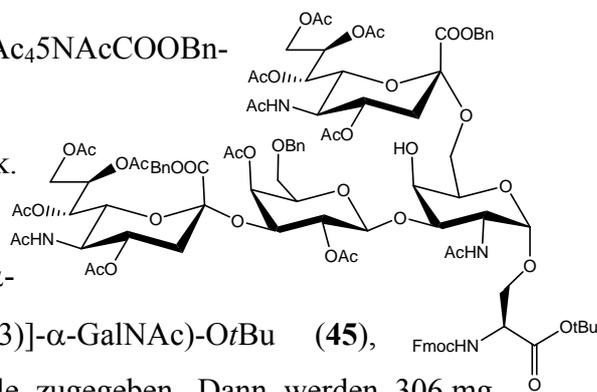
[Fmoc-Ser([α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]([α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)))- β -6-*O*-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)-*O**t*Bu]

Zu 0.7 g gepulverten, über einem Quarzstrahler i. Vak. ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å werden unter

Argon 134 mg (0.091 mmol) Fmoc-Ser([α -

NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3))- β -6-*O*-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)-*O**t*Bu (45),

gelöst in 6 mL absol. Acetonitril, über eine Kanüle zugegeben. Dann werden 306 mg



(0.46 mmol, 5 Äquiv.) α -NeuAc₄5NAcCOOBnXan **29**, gelöst in 6 mL absol. CH₂Cl₂, ebenfalls zur Suspension über eine Kanüle zugegeben. Es wird 0.75 h bei Raumtemp. gerührt und dann auf -50 °C gekühlt. Im Argon-Gegenstrom werden 117 mg (0.46 mmol, 5 Äquiv.) Silbertriflat¹⁴⁵, gelöst in 6 mL absol. Acetonitril, zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Suspension wird nun langsam binnen einer Stunde mit 0.57 mL (0.46 mmol, 5 Äquiv.) einer auf ca. -10 °C gekühlten 0.8 M CH₃SBr-Lösung (Standard-Darstellung¹⁴⁶, nur doppelte Dichlorethan-Menge) mittels einer Spritzenpumpe versetzt. Es wird 10 min bei -50 °C nachgerührt dann 14 h bei -30 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0.094 mL Ethyldiisopropylamin abgebrochen. Man läßt das Reaktionsgemisch sich auf Raumtemp. erwärmen und verdünnt dann mit 100 mL CH₂Cl₂. Es wird über Celite filtriert, und i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt durch Flashchromatographie an 100 mL Kieselgel mit EE → EE/CH₃OH 9:1 gereinigt. Man erhält ein Anomerengemisch, das sich durch semipräparative HPLC (LUNA, Gradient J) trennen läßt.

Ausb.: 64.5 mg (0.032 mmol, 36%); farbloser amorpher Feststoff; R_F: 0.05 (EE), 0.23 (EE/CH₃OH 9:1); $[\alpha]_D^{22} = +22.9$ (c = 5.30, CHCl₃).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.74 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, ³J = 7.4 Hz); 7.57 (m, 2H, H₁-, H₈-Fmoc); 7.45-7.19 (m, 19H, H₃-, H₆-Fmoc (7.39), H₂- H₇-Fmoc (7.29), H_{Aryl} Bn (15H)); 6.41 (d, 1H, NH GalNAc, ³J = 9 Hz); 5.86 (d, 1H, NH Ser, ³J = 8.6 Hz); 5.56 (dt, 1H, H₈'', ³J_{8,7} = 2.4 Hz, ³J_{8,9} = 8.2 Hz); 5.41 (d, 1H, CH_aH_b Bn'', ²J_{a,b} = 12.1 Hz); 5.35 (dt, 1H, H₈''', ³J_{8,7} = 7.4 Hz, ³J_{8,9} = 2.4 Hz); 5.30 (m, 1H, H₇'''); 5.25 (dd, 1H, H₇'', ³J_{7,6} = 2.4 Hz, ³J_{7,8} = 7.4 Hz); 5.19 (d, 1H, CH_aH_b Bn''', ²J_{a,b} = 12.5 Hz); 5.16-5.01 (m, 5H, NH Neu'''(5.14), CH_aH_b Bn'''(5.14), H₄''(5.11), CH_aH_b Bn' (5.06), H₂'' (5.03)); 4.98 (d, 1H, NH Neu', ³J = 10.6 Hz); 4.84-4.78 (m, 3H, H₄' (4.82), H₁ (4.81), H₄''(4.80)); 4.65 (d, 1H, H₁'', ³J_{1,2} = 7.8 Hz); 4.51-4.44 (m, 3H, H₃'' (4.49), H₂ (4.48), CH_aH_b Bn'' (4.46)); 4.40-4.28 (m, 6H, CH_aH_b Bn'' (4.38), α -CH Ser (4.38), OCH₂-Fmoc (4.37+4.31), H₉'a (4.35), H₉''a (4.30)); 4.20 (t, 1H, H₉-Fmoc, ³J = 7.0 Hz); 4.10 (m, 1H, H₉''b); 4.08-3.97 (m, 5H, H(5/6)''(4.06), 4-OH (4.05), H₅' (4.03), H₄ (3.99)); 3.92-3.74 (m, 7H, β -CH₂ Ser (3.90), H₉'b (3.90), H₆a (3.86), H₅'' (3.81), H₅ (3.77), H₃ (3.76)); 3.55 (dd, 1H, H₆b, ³J_{6,5} = 6.7 Hz, ²J_{a,b} = 9.4 Hz); 3.48 (dd, 1H, H₆', ³J_{6,5} = 10.6 Hz, ³J_{6,7} = 2.5 Hz); 3.45-3.34 (m, 2H, H₆'''); 2.63-2.56 (m, 2H, H_{3e}' (2.61), H_{3e}''(2.58)); 2.14-1.88 (m, 34H, 10*CH₃ OAc, NHAc GalNAc (1.96), H_{3a}''(1.90)); 1.84, 1.81 (2*s, 6H, 2*CH₃ NeuNAc); 1.65 (t, 1H, H_{3ax}', J = 12.3 Hz); 1.44 (s, 9H, CH₃ OtBu).

H = GalNAc, H'=(2→3'')-Ac₄NeuNAc, H''=Ac₂GalBn, H'''=(2→6)-Ac₄NeuNAc

103.0 MHz- ^{13}C -NMR (CDCl_3), δ [ppm]: [170.6-167.4 (C=O)]; 156.1 (C=O Urethan); 143.9 (C4a-, C4b-Fmoc); 141.4 (C8a-, C9a-Fmoc); 137.9 (C_{ipso} -Bn); 129.0-127.4 (C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc, $\text{C}_{\text{o/m/p}}$ -Bn); 125.2 (C1-, C8-Fmoc); 120.2 (C4-, C5-Fmoc); 102.1 (C1''); 98.9 (C1); 96.9 (C2', C2'''); 82.9 (C_{quart} *t*Bu); 77.5 (C5); 73.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ Bn''); 73.1 (C6'); 72.4 (C6'''); 72.1 (C5''); 71.8 (C3''); 69.6 (C2''); 69.4 (C8''); 69.2 (C4', C4'''); 68.7 (C3); 68.6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ Bn'); 68.4 (β - CH_2 Ser); 68.2 (C4''); 68.0 (C8'''); 67.9 (C6''); 67.7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ Bn'''); 67.7 (C4); 67.6 (C7'&''); 67.2 (OCH_2 -Fmoc); 63.2 (C6, C9'''); 62.5 (C9'); 54.9 (α -CH Ser); 49.2 (C5'''); 49.0 (C5'); 48.1 (C2); 47.2 (C9-Fmoc); 37.7 (C3'''); 37.6 (C3'); 28.1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$ *Ot*Bu); 23.4 (CH_3 NeuNAc); 21.6 (CH_3 GalNAc); 21.1-20.7 ($10 \cdot \text{CH}_3$ OAc).

C = GalNAc, C'=(2 \rightarrow 3'')-Ac₄NeuNAc, C''=Ac₂GalBn, C'''=(2 \rightarrow 6)-Ac₄NeuNAc

ESI-MS [m/z] = 2044.1, 2045.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2043.7, 2044.7), 2060.1, 2061.1 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 2059.8, 2060.8).

ESI-MS, Hochauflösend [m/z] = 2043.7261 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2043.7326 (90.8%), $\Delta = 3.2$ ppm); 2044.7302 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2044.7359 (100.0%), $\Delta = 2.8$ ppm); 2045.7324 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2045.7393 (54.5%), $\Delta = 3.4$ ppm).

HPLC-Reinheit: 98% (254 nm)

C₉₉H₁₂₀N₄O₄₁ (2022.01) [2020.74]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-3-*O*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl]-L-serin (56)**

[Fmoc-Ser($[\alpha$ -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]($[\alpha$ -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)))- β -6-*O*-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)-OH]

Es werden 53 mg (0.029 mmol) Derivat **55** in 0.2 mL

Anisol und 4 mL TFA gelöst und 1.5 h unter

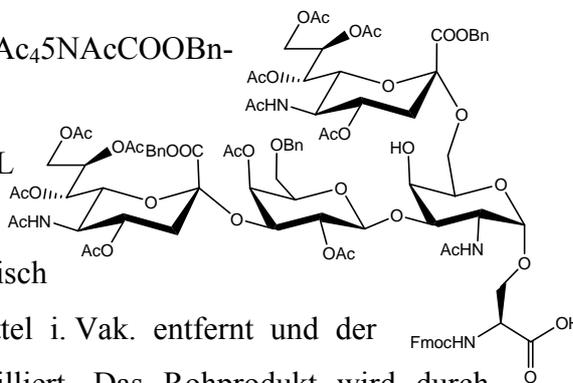
Argon bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch

wird mit 30 mL Toluol verdünnt, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der

Rückstand zweimal mit je 30 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch

semipräparative HPLC (LUNA, Gradient J) gereinigt.

Ausb.: 53.6 mg (0.027 mmol, 93%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +27.5$ ($c = 5.20$, CHCl_3); HPLC: (Säule LUNA), Gradient C, $R_t = 12.4$ min.



400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 7.73 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J = 8.0 Hz); 7.56 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³J = 7.1 Hz); 7.49-7.23 (m, 19H, H3-, H6-Fmoc (7.36), H2- H7-Fmoc (7.26), H_{Aryl} Bn (15H)); 6.80 (d, 1H, NH GalNAc, ³J = 8.2 Hz); 5.88 (d, 1H, NH Ser, ³J = 5.8 Hz); 5.65 (t_b, 1H, H8', ³J_{8,9} = 8.4 Hz); 5.41 (d, 1H, CH_aH_b Bn', ²J_{a,b} = 11.9 Hz); 5.38-5.17 (m, 5H, H8''' (5.36), NH Neu''' (5.3), H7''' (5.30), CH_aH_b Bn''' (5.24), H7' (5.19)); 5.14-4.91 (m, 6H, CH_aH_b Bn''' (5.12), NH Neu' (5.1), H4'' (5.07), CH_aH_b Bn' (5.05), H2'' (5.01), H1 (4.93)); 4.86-4.79 (m, 2H, H4''' (4.84), H4' (4.81)); 4.63 (m, 1H, H1''); 4.49 (dd, 1H, H3'', ³J_{3,4} = 3.3 Hz, ³J_{3,2} = 10.2 Hz); 4.46 (d, 1H, CH_aH_b Bn'', ²J_{a,b} = 12.2 Hz); 4.42-4.27 (m, 7H, OCH₂-Fmoc (4.40+4.29), CH_aH_b Bn'' (4.35), H9'a (4.37), α-CH Ser (4.35), H9'''a (4.31), H2 (4.28)); 4.19-3.89 (m, 10H, H9-Fmoc (4.17), H9'''b (4.09), H(5/6)''' (4.08), H4 (4.05), H5' (4.02), 4-OH (4.0), β-CH₂ Ser (3.96), H6a (3.91)); 3.83-3.78 (m, 3H, H3 (3.81), H5'' (3.81), H9'b (3.80)); 3.68 (m, 1H, H5); 3.56 (dd, 1H, H6b, ³J_{6,5} = 6.0 Hz, ²J_{a,b} = 9.2 Hz); 3.52 (dd, 1H, H6', ³J_{6,5} = 10.8 Hz, ³J_{6,7} = 2.8 Hz); 3.43 (m, 1H, H6a''); 3.35 (dd, 1H, H6b'', ³J_{6,5} = 6.7 Hz, ²J_{a,b} = 9.8 Hz); 2.59-2.55 (m, 2H, H3e' (2.57), H3e''' (2.57)); 2.23-1.87 (m, 34H, 10*CH₃ OAc, CH₃ GalNAc (2.06), H3a''' (1.89)); 1.85, 1.80 (2*s, 6H, 2*CH₃ NeuNAc); 1.64 (t, 1H, H3_{ax}', J = 12.4 Hz).

H = GalNAc, H'=(2→3'')-Ac₄NeuNAc, H''=Ac₂GalBn, H'''=(2→6)-Ac₄NeuNAc

103.0 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 170.6-167.4 (C=O); 155.9 (C=O Urethan); 143.9 (C4a-, C4b-Fmoc); 141.4 (C8a-, C9a-Fmoc); 137.9 (C_{ipso}-Bn); 128.9-127.5 (C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc, C_{o/m/p} Bn); 125.1 (C1-, C8-Fmoc); 120.1 (C4-, C5-Fmoc); 102.5 (C1''); 98.4 (C1); 97.0 (C2', C2'''); 78.5 (C5); 73.4 (CH₂ Bn''); 72.7 (C6'''); 72.2 (C5''); 72.2 (C6'); 71.4 (C3''); 69.3 (C2''); 69.3 (C8'''); 69.2 (C4', C4'''); 69.0 (β-CH₂ Ser); 68.5 (CH₂ Bn'); 68.5 (C3); 68.1 (C4''); 68.0 (C4); 67.9 (C6''); 67.6 (C8'); 67.6 (CH₂ Bn'''); 67.5 (C7'&''); 67.0 (OCH₂-Fmoc); 63.5 (C9'); 63.4 (C6); 62.4 (C9'''); 55.0 (α-CH Ser); 49.2 (C5'''); 49.0 (C5'); 48.7 (C2); 47.2 (C9-Fmoc); 37.5 (C3'&''); 23.1 (CH₃ NeuNAc); 22.7 (CH₃ GalNAc); 21.5-20.8 (10*CH₃ OAc).

C = GalNAc, C'=(2→3'')-Ac₄NeuNAc, C''=Ac₂GalBn, C'''=(2→6)-Ac₄NeuNAc

ESI-MS [m/z] = 1988.7, 1989.7 ([M+Na]⁺, ber.: 1988.7, 1987.7).

ESI-MS, Hochauflösend [m/z] = 1988.6709, 1989.6752 ([M+Na]⁺, ber.: 1988.6733, 1987.6700, Δ = 1.2 ppm).

HPLC-Reinheit: 99.1% (254 nm, Integrationsbereich 6-40 min)

C₉₅H₁₁₂N₄O₄₁ (1965.91) [1964.68]

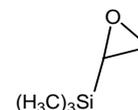
5.3 Synthesen der PTMSEL-Ankersysteme

5.3.1 Synthesen zum Kapitel 3.2.1

2-Trimethylsilyloxiran (**58**)¹⁰⁷

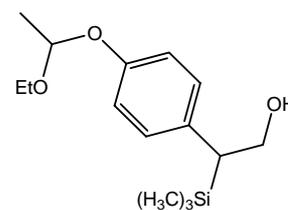
Die Verbindung wurde nach literaturbekannten Verfahren¹⁰⁷ hergestellt.

Ausb.: 74%-78%; farblose Flüssigkeit; Sdp. (370 mbar): 78 °C



[2-p-(1-Ethoxyethoxy-)phenyl-2-trimethylsilyl]ethanol (**59**)¹⁰⁷

Eine hellgelbe Lösung von 24.55 mL (135.0 mmol) 1-(4-Bromphenoxy)-1-ethoxyethan in 150 mL absol. Diethylether wird unter Argon auf -45 °C gekühlt und mittels einer Spritze binnen 15 min. mit 84.37 mL einer 1.6 M n-BuLi-Lösung in Hexan versetzt. Nach 30 min. Rühren bei -40 °C läßt man die Lösung auf 0 °C erwärmen und rührt 90 min. bei dieser Temperatur. Das Reaktionsgemisch wird unter Argon in einen ausgeheizten Tropftrichter überführt und zu einer Suspension von 12.29 g (65.5 mmol) Cu(I)I in 40 mL absol. Diethylether bei 0 °C innerhalb von 1.5 h zugetropft. Die braune Suspension wird bei -50 °C mittels einer Spritze mit 3.90 mL (26.8 mmol) 2-Trimethylsilyloxiran **58** versetzt. Es wird drei Stunden bei dieser Temperatur nachgerührt, dann das Aceton/Trockeneis-Kältebad gegen ein Eis/Kochsalz-Kältebad ausgetauscht und weitere 12 h bei -20 °C bis -5 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 30 mL einer ges. NH₄Cl-Lösung versetzt und 20 min. bei Raumtemp. gerührt. Nach Verdünnen mit 300 mL Essigester wird dreimal mit je 200 mL einer ges. NH₄Cl-Lösung ausgeschüttelt, die org. Phase über MgSO₄ getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 800 mL Kieselgel mit PE/EE 8:1, versetzt mit 1 % Triethylamin, gereinigt.



Ausb.: 6.44 g (22.79 mmol, 85%); gelbes Öl; R_F: 0.49 (PE/EE 6:1).

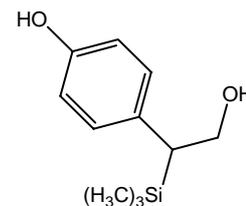
200 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 6.91 (d, 2H, H_{Ar}yl, ³J = 8.8 Hz); 6.67 (d, 2H, H_{Ar}yl, ³J = 8.8 Hz); 5.38 (q, 1H, O-CH-O, ³J = 5.2 Hz); 4.75-4.55 (m, 1H, OH); 4.1-3.3 (m, 4H, CH₂-OH, CH₃-CH₂-O); 2.41-2.25 (m, 1H, TMS-CH); 1.28 (d, 3H, CH-CH₃, ³J = 5.74 Hz); -0.06 (s, 9H, Si(CH₃)₃).

FD-MS [m/z] = 282.7 ([M]⁺, ber.: 282.2); 283.7 ([M+H]⁺, ber.: 283.2).

C₁₅H₂₆O₃Si (282.45) [282.17]

(2-p-Hydroxyphenyl-2-trimethylsilyl)ethanol (60)¹⁰⁷

Eine Lösung von 6.43 g (22.8 mmol) [2-p-(1-Ethoxyethoxy-)phenyl-2-trimethylsilyl]ethanol **59** in 100 mL Methanol p. a. wird mit 201.7 mg (0.80 mmol) Pyridinium-toluolsulfonat, gelöst in 6 mL Methanol p. a., versetzt, und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand durch Flashchromatographie an 400 mL Kieselgel mit PE/EE 4:1 gereinigt. Das noch leicht verunreinigte Produkt wird aus EE/PE umkristallisiert.



Ausb.: 4.09 g (19.42 mmol, 85%); farblose Kristalle; R_F : 0.15 (PE/EE 3:1); Schmp.: 141 °C, Lit.¹⁰⁷: 138-141 °C.

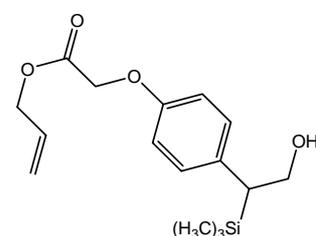
200 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 8.96 (s_b, 1H, OH Phenol); 6.85 (d, 2H, H_{Aryl}, ³J = 8.3 Hz); 6.62 (d, 2H, H_{Aryl}, ³J = 8.3 Hz); 4.5-4.1 (s_b, 1H, OH); 3.83-3.68 (m, 2H, CH₂-OH); 2.17 (t, 1H, TMS-CH, ³J = 6.8 Hz); -0.10 (s, 9H, Si(CH₃)₃).

FD-MS [m/z] = 210.6 (100%, [M]⁺, ber.: 210.1).

C₁₁H₁₈O₂Si (210.35) [210.11]

4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxyessigsäureallylester (61)¹⁰⁷

In 90 mL Aceton p.a. werden 3.72 g (17.7 mmol) (2-p-Hydroxyphenyl-2-trimethylsilyl)-ethanol **60** gelöst und unter Argon mit 2.80 g (20.3 mmol) K₂CO₃ sowie 380 mg KI versetzt. Zur rosa farbenen Suspension werden mit einer Spritze 2.45 mL (21.1 mmol) Chloressigsäureallylester gegeben, worauf nach kurzer Zeit ein



Farbumschlag zu Gelb erfolgt. Das Reaktionsgemisch wird 14 h bei Raumtemp. und unter Lichtausschluß gerührt. Am nächsten Tag werden nochmals 2.00 g (14.5 mmol) K₂CO₃, 300 mg KI und 1.5 mL (12.9) Chloressigsäureallylester zur Suspension gegeben. Die Suspension wird 14 h gerührt, über Celite filtriert, und der Niederschlag mit 200 mL Aceton nachgewaschen. Das vereinte Filtrat wird eingeeengt und der ölige gelbe Rückstand durch Flashchromatographie an 250 g Kieselgel mit PE/EE 10:1 gereinigt.

Ausb.: 4.41 g (14.30 mmol, 81% [70-81%]); hellgelbes Öl, das nach Lagern im Kühlschrank als farbloser Feststoff kristallisiert; R_F : 0.23 (PE/EE 3:1); Schmp.: 27 °C, Lit.¹⁰⁷: 27-28 °C; $[\alpha]_D^{22} = -1.1$ (c = 1.00, CHCl₃).

200 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.01 (d, 2H, H_{Aryl}, ³J = 8.3 Hz); 6.83 (d, 2H, H_{Aryl}, ³J = 8.8 Hz); 5.81-6.00 (m, 1H, CH=CH₂); 5.31 (dd, 1H, CH=CH_AH_B, ²J_{gem} = 16.3 Hz,

$^3J_{vic} = 1.5$ Hz); 5.24 (dd, 1H, CH=CH_AH_B, $^2J_{gem} = 10.5$ Hz, $^3J_{vic} = 1.5$ Hz); 4.69 (d, 2H, CH₂-CH=CH₂, $^3J = 5.5$ Hz); 4.61 (s, 2H, O-CH₂-C=O); 4.12-3.89 (m, 2H, CH-CH₂-OH); 2.37 (dd, 1H, TMS-CH, $^3J_1 = 4.4$ Hz, $^3J_2 = 11.2$ Hz); 1.57 (s_b, 1H, OH); -0.07 (s, 9H, Si(CH₃)₃).

FD-MS [m/z] = 308.7, 309.7 ([M]⁺, ber.: 308.1 (100.0%), 309.1 (17.8%)).

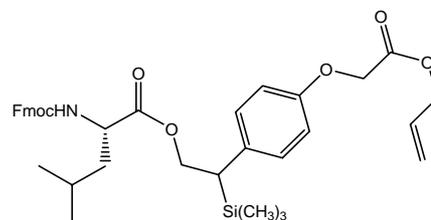
C₁₆H₂₄O₄Si (308.45) [308.14]

5.3.2 Synthesen zum Kapitel 3.2.2

4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-leucyloxy)-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxy-essigsäureallylester (**62**)¹⁵²

[Fmoc-Leu-PTMSE-Allylester]

Unter Argon werden 2.10 g (6.81 mmol) 4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)ethyl]-phenoxyessigsäureallylester **61** in 40 mL absol. CH₂Cl₂ gelöst, mit 3.01 g (8.51 mmol, 1.25



Äquiv.) Fmoc-Leu-OH versetzt und auf 0 °C gekühlt. Danach werden 83 mg (0.68 mmol, 0.1 Äquiv.) 4-DMAP und 1.76 g (8.51 mmol, 1.25 Äquiv.) DCC zum Reaktionsgemisch gegeben, und es wird 5 h bei 0 °C nachgerührt. Die Suspension wird über Celite filtriert, der Niederschlag mit 100 mL CH₂Cl₂ nachgewaschen und das vereinigte Filtrat zweimal mit je 150 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg und einmal mit 150 mL Wasser ausgeschüttelt. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 1 L Kieselgel mit PE/EE 15:1 gereinigt.

Ausb.: 3.22 g (5.00 mmol, 73%, Umsatz 88%); farbloses zähes Öl; R_f: 0.34 (PE/EE 3:1); $[\alpha]_D^{22} = -11.5$ (c = 1.93, CHCl₃).

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 7.76 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, $^3J_{5,6} = ^3J_{4,3} = 7.4$ Hz); 7.60-7.55 (m, 2H, H₁-, H₈-Fmoc); 7.40 (t, 2H, H₃-, H₆-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 7.31 (t, 2H, H₂-, H₇-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 6.95 (d, 2H, H_{Ar}. *p*-Phenoxy, $^3J = 7.43$ Hz); 6.80 (d, 2H, H_{Ar}yl *p*-Phenoxy, $^3J = 7.4$ Hz); 5.97-5.86 (m, 1H, CH=CH₂); 5.35-5.24 (m, 2H, CH=CH₂); 5.19, 5.07 (d/dd, 1H, NH, $2^*^3J = 8.6$ Hz, $^5J = 12.9$ Hz); 4.72-4.66 (m, 2H, α-CH Leu, O-CH₂-CH=CH₂); 4.59-4.53 (m, 2H, O-CH₂-C=O); 4.41-4.16 (m, 5H, TMS-CH-CH₂-O,

¹⁵² nach Methode von: M. Wagner, H. Kunz, *Synlett* **2000**, 400; Patent

$\underline{\text{CH}}_2\text{-Fmoc}$, H9-Fmoc); 2.57-2.49 (m, 1H, TMS-CH); 1.75-1.20 (m, 3H, β -, γ - CH_2 Leu); 0.95-0.69 (m, 6H, δ - CH_3 Leu); -0.01 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

103.0 MHz-NMR (CDCl_3), δ [ppm]: 173.2 (C=O Ester Leu); 168.7 (Allylester); 155.9 155.6 (C=O Urethan, C_{ipso} Ar-O); 143.9, 143.8 (C4a-, C4b-Fmoc); 141.3 (C8a-, C9a-Fmoc); 133.4 (C_{ipso} Ar-CH); 131.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$); 128.4 (2 Aryl); 127.7 (C3-C6-Fmoc); 127.0 (C2-, C7-Fmoc); 125.1 (C1-, C8-Fmoc); 119.9 (C4-, C5-Fmoc); 119.0 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 114.6 (Aryl); 66.9, 66.3, 65.7, 65.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Fmoc}$, TMS-CH- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$, O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$); 52.5 (α - CH_2 Leu); 47.2 (C9-Fmoc); 41.9, 41.8 (β - CH_2 Leu); 36.4 (TMS- $\underline{\text{C}}\text{H}$); 24.6, 24.6 (γ - CH_2 Leu); 22.8, 22.6, 22.4, 21.9 (δ - CH_3 Leu); -2.7 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

Signalverdopplung wegen Vorliegens zweier Diastereomere.

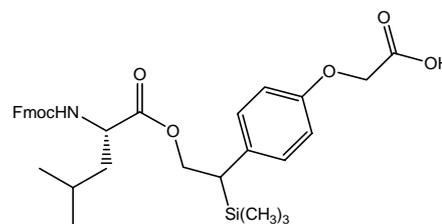
FD-MS [m/z] = 643.8, 644.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 644.3 (100.0%), 645.3 (41.2%).

$\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{NO}_7\text{Si}$ (643.84) [643.30]

4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-leucyloxy)-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxy-essigsäure (**63**)¹⁵²

[Fmoc-Leu-PTMSE]

Eine Lösung von 3.14 g (4.88 mmol) Fmoc-Leu-PTMSE-Allylester **62** in 40 mL THF sowie eine Lösung 1.13 g



(6.34 mmol, 1.3 Äquiv.) *p*-Toluolsulfinsäure-Natrium-Salz in 60 mL MeOH werden entgast, und unter Argon und Lichtausschluß zu 80 mg $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ über eine Kanüle zugeführt. Das Reaktionsgemisch wird 14 h bei Raumtemp. gerührt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie an 700 mL Kieselgel mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ 95:4:0.5:0.1 gereinigt.

Ausb.: 1.89 g (3.13 mmol, 64%); farbloser Feststoff; R_F : 0.37 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2//\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 95:5:0.5); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -16.3$ ($c = 2.49$, CHCl_3).

400 MHz- ^1H -NMR (CDCl_3), δ [ppm]: 8.32 (s_b, 1H, COOH); 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J_{5,6} = ^3J_{4,3} = 7.4$ Hz); 7.58 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $^3J_{1,2} = ^3J_{8,7} = 7.4$ Hz); 7.39 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 7.30 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $^3J = 7.4$ Hz); 6.95 (d, 2H, H_{Ar} *p*-Phenoxy, $^3J = 8.2$ Hz); 6.80 (d, 2H, H_{Ar} *p*-Phenoxy, $^3J = 7.4$ Hz); 5.13 (dd, 1H, NH, $^3J = 8.6$ Hz, $^5J = 18.4$ Hz); 4.71 (t, 1H, α -CH Leu, $^3J = 11.7$ Hz); 4.57 (s, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-C}=\text{O}$); 4.42-4.16 (m, 5H, TMS-CH- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-O}$, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Fmoc}$, H9-Fmoc); 2.57-2.49 (m, 1H, TMS-CH); 1.54-1.20 (m, 3H, β -, γ - CH_2 Leu); 0.85-0.69 (m, 6H, δ - CH_3 Leu); -0.01 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

103.0 MHz-HMQC-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 212.3 (COOH); 173.3, 172.8 (C=O Ester Leu); 155.9 155.2 (C=O Urethan, C_{ipso} Ar-O); 143.9, 143.7 (C4a-, C4b-Fmoc); 141.2 (C8a-, C9a-Fmoc); 133.6 (C_{ipso} Ar-CH); 132.2, 132.1 (2 Aryl); 128.6, 128.5 (C3-C6-Fmoc); 127.7, 127.0 (C2-, C7-Fmoc); 125.1 (C1-, C8-Fmoc); 119.9 (C4-, C5-Fmoc); 114.6 (Aryl); 66.9, 66.4, 65.0 (CH₂-Fmoc, TMS-CH-CH₂O); 52.5 (α-CH₂ Leu); 47.1 (C9-Fmoc); 41.7, 41.6 (β-CH₂ Leu); 36.4 (TMS-CH); 24.6, 24.5 (γ-CH₂ Leu); 22.6, 22.4, 21.9, 21.8 (δ-CH₃ Leu); -2.7 (Si(CH₃)₃).

Teilweise Signalverdopplung wegen Vorliegens zweier Diastereomere.

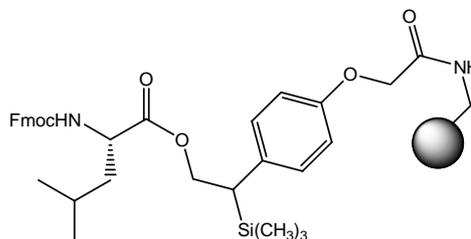
FD-MS [m/z] = 604.0, 605.0 ([M+H]⁺, ber.: 604.3 (100.0%), 605.3 (37.8%)).

C₃₄H₄₁NO₇Si (603.78) [603.27]

Beladung von AMPS-Harz mit 4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-leucyloxy)-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxyessigsäure (**64**)¹⁵²

[Fmoc-Leu-AMPS-Konjugat]

Im Festphasenreaktor werden 3.49 g AMPS-Harz (200-400 mesh, 1.42 mmol/g Beladung) vorgelegt und 30 min. mit 35 mL absol. CH₂Cl₂ aufgequollen. Parallel



wird eine Lösung von 1.49 mg (2.48 mmol) Fmoc-Leu-PTMSE **63** in 55 mL absol. CH₂Cl₂ und 15 mL DMF p. a. nacheinander mit 337 mg (2.48 mmol) HOAt, 795 mg (2.48 mmol) TBTU und 0.54 mL (4.96 mmol) *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wird 20 min. bei Raumtemp. gerührt und dann über eine Kanüle zum Harz in den Festphasenreaktor gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 14 h bei Raumtemp. geschüttelt. Die Lösungsmittel werden abfiltriert, und das Harz wird dreimal mit je 30 mL DMF und dreimal mit je 30 mL CH₂Cl₂ gewaschen. Danach wird das Harz mit 80 mL Pyridin/Acetanhydrid 3:1 versetzt und 45 min bei Raumtemp. geschüttelt. Die Lösungsmittel werden abfiltriert, und das Harz wird viermal mit je 30 mL DMF und viermal abwechselnd mit 30 mL MeOH und 30 mL CH₂Cl₂ gewaschen. Das Harz wird i. Hochvak. getrocknet.

Ausb.: 4.81 g (2.41 mmol AS, 97%) beladenes Harz.

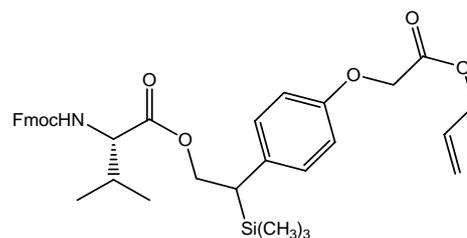
Beladung: 0.513 mmol/g.

4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-valyloxy)-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxy-essigsäureallylester (65)^{73,107}

Die Verbindung wurde nach literaturbekanntem Verfahren¹⁰⁷ hergestellt; der Syntheseweg entspricht dem von Verbindung **62**.

Ausb.: 99%; farbloses Öl.

$[\alpha]_D^{22} = -9.9$ ($c = 2.09$, CHCl_3), Lit.:^{73,107} $[\alpha]_D^{24} = -10.1$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

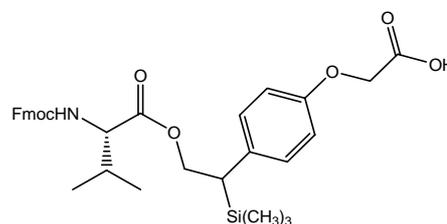


4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-valyloxy)-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxy-essigsäure (66)^{73,107}

Die Verbindung wurde nach literaturbekanntem Verfahren¹⁰⁷ hergestellt; der Syntheseweg entspricht dem von Verbindung **63**.

Ausb.: 17%, Umsatz 80%.

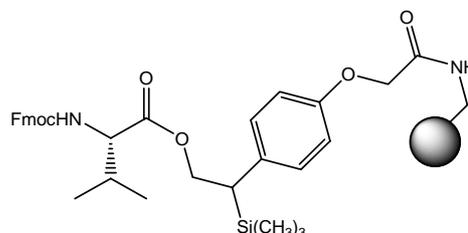
$[\alpha]_D^{22} = -8.5$ ($c = 1.09$, CHCl_3), Lit.:^{73,107} $[\alpha]_D^{24} = -8.4$ ($c = 1.00$, CHCl_3).



Beladung von AMPS-Harz mit 4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-valyloxy)-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxyessigsäure (67)^{73,107}

Die Verbindung wurde nach literaturbekanntem Verfahren¹⁰⁷ hergestellt; der Syntheseweg entspricht dem von Verbindung **64**.

Ausb.: 77%; Beladung: 0.368 mmol/g.

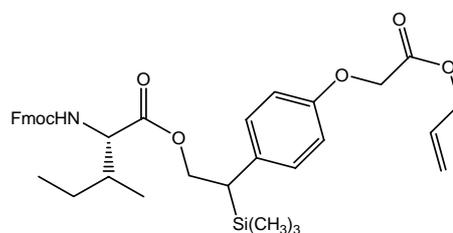


4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-isoleucyloxy)-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxy-essigsäureallylester (68)^{73,107}

Die Verbindung wurde nach literaturbekanntem Verfahren¹⁰⁷ hergestellt; der Syntheseweg entspricht dem von Verbindung **62**.

Ausb.: 99%; farbloses Öl.

$[\alpha]_D^{22} = -8.7$ ($c = 1.56$, CHCl_3), Lit.:^{73,107} $[\alpha]_D^{24} = -7.0$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

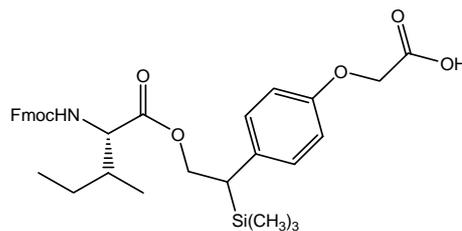


4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-isoleucyloxy)-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxy-essigsäure (69)^{73,107}

Die Verbindung wurde nach literaturbekannten Verfahren¹⁰⁷ hergestellt; der Syntheseweg entspricht dem von Verbindung **63**.

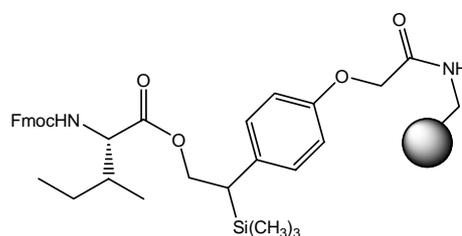
Ausb.: 98%; farbloser Schaum.

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -8.0$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^{73,107} $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -6.1$ (c = 0.50, CHCl₃).

**Beladung von AMPS-Harz mit 4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-isoleucyloxy)-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxyessigsäure (70)**^{73,107}

Die Verbindung wurde nach literaturbekannten Verfahren¹⁰⁷ hergestellt; der Syntheseweg entspricht dem von Verbindung **64**.

Ausb.: 56%; Beladung: 0.262 mmol/g.



5.4 Automatisierte Festphasensynthese

5.4.1 Allgemeines Kupplungsprotokoll

Es wurde nach dem Fmoc-Kupplungsprotokoll verfahren und ein Perkin-Elmer ABI 433A Peptidsynthesizer eingesetzt. Dazu wird ein mit einer Fmoc-geschützten Aminosäure vorbeladenes Tentagelharz oder Aminomethylpolystyrolharz in einem Reaktor vorgelegt. Die Fmoc-Abspaltungen wird durch dreimal 2.5 minütige Behandlung mit einer 20 %-igen Lösung von Piperidin in NMP erreicht. Die sequentiellen Kupplungen der Fmoc-geschützten Aminosäuren erfolgt mit einer Lösung aus 1 mmol Aminosäure, 1 mmol HBTU, 1 mmol HOBt und 2 mmol DIPEA in NMP. Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz zur Acetylierung eventuell verbliebener freier Aminogruppen 5 min mit 0.5 M Ac₂O, 0.125 M DIPEA und 0.015 M HOBt in NMP behandelt (Capping). Darauf folgend wird wieder die Fmoc-Gruppe abgespalten und der nächste Kupplungsschritt durchgeführt. Nach jedem Reaktionsschritt wird die Reaktionslösung durch Filtration entfernt, das Harz gründlich mit NMP/CH₂Cl₂ gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Eine starke Durchmischung der Reagenzien im Reaktor wird durch Vortex-Schütteln erreicht.

5.4.2 Synthesen zum Kapitel 3.3.2

N-Acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-β-*tert*-butyl-L-asparagyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl)-*N*-γ-trityl-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucin (72)

[Ac-AALD(*t*Bu)S(α-Ac₃GalNAc)Q(Trt)GAI-OH]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 381.5 mg (0.10 mmol) Fmoc-Ile-PTMSEL-AMPS-Konjugat **70** beladen. Die Kupplung der ersten drei Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182). Für den Einbau des Saccharidbausteins wird die automatische Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt, und das Harz mit einer extern angesetzten Lösung aus 131.3 mg (0.20 mmol) Fmoc-Ser(α-GalAc₃NAc)-OH **9**, 76.1 mg (0.20 mmol) HATU und 27.2 mg (0.20 mmol) HOAt in 2 mL NMP, aktiviert mit 0.20 mL 2 M DIPEA in NMP, versetzt. Das Harz wird mit dieser Lösung 3 h stark geschüttelt und mit NMP gewaschen. Die Kupplung der Glycosylaminosäure wird wiederholt (identische Vorgehensweise). Die restlichen vier Aminosäuren werden wieder nach dem allgemeinen

Kupplungsprotokoll angeknüpft, beginnend mit einem Wasch-, folgend mit einem Cappingschritt. Nach der letzten Kupplung wird die *N*-terminale Schutzgruppe abgespalten, *N*-acetyliert und danach das Harz mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen und i. Hochvak. getrocknet. Man erhält 473 mg beladenes Harz.

Das Harz wird in einen Festphasenreaktor überführt und mit 10 mL CH₂Cl₂ gequollen. Zum Harz wird eine Lösung von 63.1 mg TBAF•3H₂O (0.20 mmol, 2 Äquiv.) in 2 mL CH₂Cl₂ gegeben und bei Raumtemp. 30 min. geschüttelt. Die Abspalllösung wird abfiltriert, und das Harz mit 10 mL CH₂Cl₂ nachgewaschen. Die vereinten CH₂Cl₂-Phasen werden mit 10 mL Wasser versetzt. Der Abspaltvorgang wird mit 18.9 mg TBAF•3H₂O (0.06 mmol) in 10 mL CH₂Cl₂ wiederholt. Die beiden CH₂Cl₂/Wasser-Gemische (ca. 60 mL) werden vereint, und die org. Phase abgetrennt. Die org. Phase wird mit 40 mL Wasser extrahiert und dann i. Vak. eingengt, und i. Hochvak. getrocknet. Man erhält eine saubere Verbindung, die ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt werden kann.

Ausb.(Rohprodukt): 107.3 mg (0.07 mmol, 71%); farbloser amorpher Feststoff; HPLC: (Säule JUPITER), Gradient A, R_t = 22.5 min.

400 MHz-¹H-NMR (CD₃OD), δ[ppm]: 7.26-7.14 (m, 15H, Trt); 5.40 (d, 1H, H4); 5.21 (dd, 1H, H3, ³J₃₄ = 3.5Hz, ³J₃₂ = 11.4Hz); 4.85 (m, 1H, H1 (unter H₂O-Peak)); 4.67 (m, 1H, α-CH Asp); 4.58-4.55 (m, 1H, α-CH Ser); 4.46-4.13 (m, 8H, 3*α-CH Ala, α-CH Gln, α-CH Ile, H2 (4.45), H5 (4.33), H6a (4.15)); 4.04-3.97 (m, 2H, α-CH Leu, H6b); 3.93-3.84 (m, 2H, α-CH₂ Gly); 3.35 (m, 2H, β-CH₂ Ser_{a/b}); 2.80-2.70 (m, 1H, β-CH_aH_b Asp); 2.57-2.42 (m, 1H, β-CH_aH_b Asp); 2.12 (s, 3H, CH₃ NHAc); 2.07-1.90 (m, 14H, γ-CH₂ Gln, 3*CH₃ OAc, CH₃ NHAc); 1.74-1.46 (m, 4H, β-CH Ile, β-CH₂ Gln, γ-CH Leu); 1.42 (s, 9H, *t*Bu); 1.41-1.21 (m, 13H, β-CH₂ Leu, γ-CH₂ Ile, 3*β-CH₃ Ala); 0.98-0.85 (m, 12H, 2*δ-CH₃ Leu, γ-CH₃ Ile, δ-CH₃ Ile).

MALDI-MS [m/z] = 1482.3 ([M-*t*Bu+Na+2H]⁺, ber.: 1481.7), 1488.3 ([M-*t*Bu+Na+Li+H]⁺, ber.: 1487.6), 1504.3 ([M-*t*Bu+K+Li+H]⁺, ber.: 1503.7), 1553.2 ([M+K]⁺, ber.: 1552.8), 1560.2 ([M+K+Li]⁺, ber.: 1559.7), 1576.2 ([M+K+Na]⁺, ber.: 1575.8).

C₇₄H₁₀₃N₁₁O₂₃ (1514.67) [1513.72]

***N*-Acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-glutaminyglycyl-L-alanyl-L-iso-leucin (73)**

[Ac-AALDS(α -GalNAc)QGAI-OH]

Eine Lösung von 70.0 mg (0.05 mmol) Ac-AALD(*t*Bu)S(α -Ac₃GalNAc)Q(Trt)GAI-OH **72** in 10 mL TFA, versetzt mit 0.1 mL H₂O und 0.1 mL Triisopropylsilan, wird im fest verschlossenen Glaskolben 3 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand mit 10 mL DMF kodestilliert.

Das Glycopeptid wird in 20 mL CH₃OH gelöst und mit 1 %-iger CH₃ONa Lösung in CH₃OH auf pH 9.5 gestellt und dann 14 h bei Raumtemp. gerührt. Mittels analyt. HPLC (Säule JUPITER, Gradient F) wird das Ende der Reaktion festgestellt. Das Reaktionsgemisch wird durch Zugabe von 6 Tropfen AcOH leicht angesäuert (pH 5.5) und dann i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird in 20 mL Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Der farblose amorphe Feststoff wird durch Ausschlußchromatographie mit Wasser als Laufmittel an einer Sephadex G-15 Phase gereinigt.

Ausb.: 33.5 mg (0.031 mmol, 66 %); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = +9.4$ (*c* = 0.38, DMSO); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient F, *R*_t = 6.2 min.

400 MHz-¹H-NMR (D₂O), δ [ppm]: 4.88 (d, 1H, H1, ³*J* = 3.5 Hz); 4.61 (t, 1H, α -CH Asp, ³*J* = 3.1 Hz); 4.49 (m, 1H, α -CH Ser); 4.42-4.20 (m, 5H, α -CH Gln (4.3), 3* α -CH Ala (4.3-4.2), α -CH Leu (4.2)); 4.16 (dd, 1H, H2, ³*J*_{2,1} = 3.5 Hz, ³*J*_{2,3} = 11.0 Hz); 4.07 (d, 1H, α -CH Ile); 4.02-3.68 (m, 9H, α -CH₂ Gly (3.8), β -CH₂ Ser_{a/b} (3.9, 3.8), H3 (3.89), H4 (4.02), H5 (3.85), H6 (3.72)); 2.75-2.65 (m, 2H, β -CH₂ Asp); 2.38 (t, 2H, γ -CH₂ Gln, ³*J* = 7.0 Hz); 2.01 (m, 4H, β -CH_aH_b Gln, CH₃ NHAc); 1.90 (m, 4H, β -CH_aH_b Gln, CH₃ GalNHAc); 1.86-1.80 (m, 1H, β -CH Ile); 1.68-1.55 (m, 3H, β -CH₂ Leu, γ -CH Leu); 1.41-1.33 (m, 10H, γ -CH_aH_b Ile, 3* β -CH₃ Ala); 1.18-1.08 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.93-0.83 (m, 12H, 2* δ -CH₃ Leu, γ -CH₃ Ile, δ -CH₃ Ile).

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆/D₂O 70:30), δ [ppm]: 8.23 (m, 1H, NH Gln); 4.59 (d, 1H, H1, ³*J* = 3.4 Hz); 4.39-4.33 (m, 2H, α -CH Asp (4.35), α -CH Ser(4.37)); 4.35-4.00 (m, 6H, H2 (4.16), 3* α -CH Ala (4.1), α -CH Leu (4.13), α -CH Gln (4.07)); 3.85 (d, 1H, α -CH Ile, ³*J* = 5.1 Hz); 3.74-3.43 (m, 9H, α -CH₂ Gly (3.71), H3 (3.70), H4 (3.61), H5 (3.61), β -CH₂ Ser (3.47), H6 (3.46)); 2.41 (m, 2H, β -CH₂ Asp); 2.12 (t, 2H, γ -CH₂ Gln, ³*J* = 7.4 Hz); 1.95-1.80 (m, 8H, β -CH_aH_b Gln (1.91), CH₃ NHAc (1.84), β -CH_aH_b Gln (1.82), CH₃ GalNHAc (1.81)); 1.68-1.60 (m, 1H, β -CH Ile); 1.55-1.41 (m, 3H, γ -CH Leu (1.51), β -CH₂ Leu (1.43));

1.35-1.12 (m, 10H, γ -CH_aH_b Ile (1.3), 3* β -CH₃ Ala (1.2)); 0.93 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.79-0.68 (m, 12H, 2* δ -CH₃ Leu (0.74), δ -CH₃ Ile (0.72), γ -CH₃ Ile (0.70)).

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 8.71 (d, 1H, NH Ile, ³J = 8.2 Hz); 8.68-8.10 (m, 7H, NH Ala (8.6, 8.45 ³J = 7.4 Hz), NH Asp (8.43), NH Ser (8.35), NH Leu, NH Gly, NH GalNHAc); 7.79 (d, 1H, NH Ala, ³J = 8.2 Hz); 7.50 (sb, 1H, NH ϵ -Gln); 6.71 (sb, 1H, NH ϵ -Gln); 4.62 (d, 1H, H1, ³J = 3.1 Hz); 4.56 (m, 1H, α -CH Ser); 4.48 (m, 1H, α -CH Asp (4.35)); 4.35-4.00 (m, 6H, H2 (4.26), 3* α -CH Ala (4.24, 4.08), α -CH Leu (4.26), α -CH Gln (4.18)); 3.74-3.43 (m, 10H, α -CH Ile (3.79), H3 (3.71), α -CH₂ Gly (3.69), H5 (3.63), H4 (3.62), β -CH_aH_b Ser (3.51), H6 (3.48), β -CH_aH_b Ser (3.42)); 2.40 (m, 2H, β -CH₂ Asp); 2.08 (t, 2H, γ -CH₂ Gln, ³J = 7.4 Hz); 1.95-1.80 (m, 8H, β -CH₂ Gln (1.92), CH₃ NHAc (1.84), CH₃ GalNHAc (1.81)); 1.72-1.55 (m, 2H, β -CH Ile (1.70), γ -CH Leu (1.58)); 1.55-1.41 (m, 2H, β -CH₂ Leu (1.45), γ -CH_aH_b Ile (1.44)); 1.35-1.02 (m, 10H, 3* β -CH₃ Ala (1.22, 1.15), γ -CH_aH_b Ile (1.07)); 0.89-0.70 (m, 12H, 2* δ -CH₃ Leu (0.85, 0.79), δ -CH₃ Ile (0.79), γ -CH₃ Ile (0.74)).

103.0 MHz-HMQC-NMR (DMSO-d₆/D₂O 70:30), δ [ppm]: 98.1 (C1); 71.8 (C5); 70.2 (C6); 68.7 (C3); 67.8 (C4); 61.4 (β -CH₂ Ser); 59.7 (α -CH Ile); 54.1 (C2); 53.8 (α -CH Gln); 52.2 (α -CH Leu); 51.6 (α -CH Asp, α -CH Ser); 49.4 (α -CH Ala); 42.8 (α -CH₂ Gly); 40.6 (β -CH₂ Leu); 40.0 (β -CH₂ Asp); 38.4 (β -CH Ile); 32.0 (γ -CH₂ Gln); 27.7 (β -CH₂ Gln); 25.1 (γ -CH₂ Ile); 24.9 (γ -CH Leu); 23.1, 22.8 (NHCOCH₃); 21.9 (δ -CH₃ Leu); 18.7 (β -CH₃ Ala); 16.4 (γ -CH₃ Ile); 12.4 (δ -CH₃ Ile).

103.0 MHz-HMQC-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 97.9 (C1); 71.5 (C5); 69.8 (C6); 67.9 (C3); 67.3 (C4); 60.5 (β -CH₂ Ser); 58.5 (α -CH Ile); 53.9 (C2); 52.8 (α -CH Gln); 51.6 (α -CH Leu); 50.4 (α -CH Asp); 50.0 (α -CH Ser); 49.8, 48.1 (α -CH Ala); 42.1 (α -CH₂ Gly); 40.4 (β -CH₂ Leu); 39.5 (β -CH₂ Asp); 37.5 (β -CH Ile); 31.6 (γ -CH₂ Gln); 27.7 (β -CH₂ Gln); 25.1 (γ -CH₂ Ile); 23.9 (γ -CH Leu); 22.9 (δ -CH₃ Leu); 22.5 (NHCOCH₃); 21.3 (δ -CH₃ Leu); 18.0, 17.7 (β -CH₃ Ala); 15.6 (γ -CH₃ Ile); 11.8 (δ -CH₃ Ile).

MALDI-MS [m/z] = 891.4 ([M-GalNAc(C₈H₁₄NO₅)+Li-H]⁺, ber.: 891.3), 913.9 ([M-GalNAc(C₈H₁₄NO₅)+Li+Na-H]⁺, ber.: 914.3), 935.1 ([M-GalNAc(C₈H₁₄NO₅)+Li+2Na-3H]⁺, ber.: 935.3), 1112.5 ([M+Na]⁺, ber.: 1112.5), 1134.7 ([M+K+Li-H]⁺, ber.: 1134.4), 1156.1 ([M+K+Li+Na-2H]⁺, ber.: 1156.5).

C₄₅H₇₅N₁₁O₂₀ (1090.14) [1089.52]

5.4.3 Synthesen zum Kapitel 3.3.3

N-Acetyl-L-alanyl-L-valyl-*N*^{imm}-trityl-L-histidyl-*N*^{imm}-trityl-L-histidyl-L-leucyl-*N*-γ-trityl-L-glutaminyll-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucin (75)

[Ac-AVH(Trt)H(Trt)LQ(Trt)LAAL-OH]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 510.0 mg (0.25 mmol) Fmoc-Leu-AMPS-Konjugat **64** beladen. Die Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182). Nach der letzten Kupplung wird die *N*-terminale Schutzgruppe abgespalten, *N*-acetyliert und danach das Harz mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen und i. Hochvak. getrocknet. Man erhält 845.5 mg beladenes Harz.

Das Harz wird in einen Festphasenreaktor überführt und mit 10 mL CH₂Cl₂ gequollen. Zum Harz wird eine Lösung von 157.8 mg TBAF•3H₂O (0.50 mmol, 2 Äquiv.) in 10 mL CH₂Cl₂ gegeben und bei Raumtemp. 25 min. geschüttelt. Die Abspaltungslösung wird abfiltriert, und das Harz mit 15 mL CH₂Cl₂ nachgewaschen. Die vereinten CH₂Cl₂-Phasen werden mit 15 mL Wasser versetzt. Der Abspaltvorgang wird mit 47.3 mg TBAF•3H₂O (0.15 mmol) in 15 mL CH₂Cl₂ wiederholt. Die beiden CH₂Cl₂/Wasser-Gemische werden vereint, und die org. Phase abgetrennt. Die org. Phase wird mit 40 mL Wasser extrahiert und dann i. Vak. eingeengt. Das Rohprodukt kann direkt weiter umgesetzt werden (HPLC-Reinheit: 93.4 % (227 nm); Säule JUPITER, Gradient B (+0.1 % TFA)).

Ausb.: 335.7 mg (0.18 mmol, 73%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -11.8$ (c = 1.59, CHCl₃); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient B (+0.1 % TFA), R_t = 20.6 min.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ[ppm]: 7.68, 7.50, 7.44, 7.41, 7.35 (b_s, 11H, 2*NH Ala, NH Gln, 2*NH His, 3*NH Leu, NH Val, NHAc (7.41)); 7.30-7.00 (m, 50H, 4*H_{Ar} His, 3*Trt, NH_aH_b ε-Gln (7.27)); 6.63 (m, 1H, NH_aH_b ε-Gln); 4.33-4.25 (m, 2H, α-CH Leu (4.32), α-CH Ala (4.27)); 4.21-3.94 (m, 7H, 2*α-CH Ala (4.19, 4.15), 2*α-CH His (4.13, 4.07), 2*α-CH Leu (4.05, 3.98), α-CH Gln (3.99)); 3.77 (d, 1H, α-CH Val, ³J = 5.50 Hz); 3.02-2.94 (m, 2H, β-CH₂ His); 2.54-2.40 (m, 4H, β-CH₂ His (2.50), γ-CH₂ Gln (2.43)); 2.19, 2.03 (m, 2H, β-CH_aH_b Gln); 1.89-1.84 (m, 4H, CH₃ NHAc (1.87), β-CH Val (1.86)); 1.78-1.51 (m, 8H, 3*γ-CH Leu (1.62, 1.73), 3*β-CH_aH_b Leu (a: 1.76, 1.70, 1.68, b: 1.61, 1.55, 1.53)); 1.37 (m, 6H, 2*β-CH₃ Ala); 1.17 (m, 3H, β-CH₃ Ala); 0.89-0.83 (m, 6H, 2*δ-CH₃ Leu (0.88, 0.85)); 0.76-0.73 (m, 18H, 4*δ-CH₃ Leu (0.75, 0.74), 2*γ-CH₃ Val (0.75)).

TBAF-Verunreinigung: 0.97+1.38+1.57+3.02 (3:2:2:2).

103.0 MHz-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 144.3, 141.8 (C_{ipso} Trt); 129.5, 129.4 (C_{para} Trt); 128.5, 128.1, 128.0 (C_{ortho} Trt); 127.9, 127.6, 126.7 (C_{meta} Trt); 70.1 (C_{quart} Trt); 60.8 (α -CH Val); 56.5, 55.7 (α -CH His); 55.0 (α -CH Gln); 54.0, 53.7, 51.7 (α -CH Leu); 50.2, 49.4, 48.8 (α -CH Ala); 40.1, 38.9 (β -CH₂ Leu); 33.5 (γ -CH₂ Gln, β -CH₂ His); 29.4 (β -CH₂ His); 29.3 (β -CH Val); 26.1 (β -CH₂ Gln); 24.5, 24.3 (γ -CH Leu); 22.8, 22.6, 21.1, 20.9 (δ -CH₃ Leu); 22.1 (NHC(O)CH₃); 18.5 (γ -CH₃ Val); 17.1, 16.3 (β -CH₃ Ala).

MALDI-MS [m/z] = 1621.9 ([M+Na+H-Trt]⁺, ber.: 1621.9); 1842.0 ([M+2H]⁺, ber.: 1841.0); 1864.0 ([M+Na+H]⁺, ber.: 1864.0); 1885.9 ([M+K+Li]⁺, ber.: 1886.0); 1902.1 ([M+K+Na]⁺, ber.: 1902.1).

C₁₀₈H₁₂₅N₁₅O₁₃ (1839.96) [1841.24]

***N*-Acetyl-*N*- γ -trityl-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl- β -*tert*-butyl-L-asparagyl-glycyl-L-prolyl-L-valyl-L-prolyl-L-isoleucin (77)**

[Ac-Q(Trt)GAIVD(*t*Bu)GPVPI-OH]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 381.5 mg (0.10 mmol) Fmoc-Ile-PTMSEL-AMPS-Konjugat **70** beladen. Die Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182). Nach der letzten Kupplung wird die *N*-terminale Schutzgruppe abgespalten, *N*-acetyliert und danach das Harz mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen und i. Hochvak. getrocknet. Man erhält 512 mg beladenes Harz.

Das Harz wird in einen Festphasenreaktor überführt und mit 10 mL CH₂Cl₂ gequollen. Zum Harz wird eine Lösung von 63.1 mg TBAF•3H₂O (0.20 mmol, 2 Äquiv.) in 2 mL CH₂Cl₂ gegeben und bei Raumtemp. 30 min. geschüttelt. Die Abspalllösung wird abfiltriert, und das Harz mit 10 mL CH₂Cl₂ nachgewaschen. Die vereinten CH₂Cl₂-Phasen werden mit 10 mL Wasser versetzt. Der Abspaltvorgang wird mit 18.9 mg TBAF•3H₂O (0.06 mmol) in 10 mL CH₂Cl₂ wiederholt. Die beiden CH₂Cl₂/Wasser-Gemische (ca. 60 mL) werden vereint, und die org. Phase abgetrennt. Die org. Phase wird mit 40 mL Wasser extrahiert (zur besseren Phasentrennung kann auch ges. NaCl-Lösung, mit 6 Tropfen AcOH angesäuert, verwendet werden) und dann i. Vak. eingeengt. Das Rohprodukt wird durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient O) gereinigt.

Ausb.: 79.0 mg (0.056 mmol, 56%); farbloser amorpher Feststoff; HPLC: (Säule JUPITER), Gradient B, R_t = 40.0 min.

400 MHz-¹H-NMR (CD₃OD), δ [ppm]: 7.27-7.19 (m, 15H, 3*Ph Trt (m: 7.25, o: 7.24, p: 7.21)); 4.96 (m, 1H, α -CH Asp); 4.67-4.43 (m, 8H, α -CH Gln (4.65), 2* α -CH Val (4.65),

2* α -CH Pro (4.60, 4.47), α -CH Ala (4.57), α -CH Ile² (4.49) α -CH Ile¹ (4.45)); 4.17 (m, 2H, α -CH₂ Gly¹); 3.94-3.82 (m, 3H, α -CH₂ Gly² (3.92), δ -CH_aH_b Pro¹ (3.84)); 3.71-3.51 (m, 3H, δ -CH_aH_b Pro¹ (3.69), δ -CH_aH_b Pro² (3.61), δ -CH_aH_b Pro² (3.53)); 2.81-2.62 (m, 2H, β -CH_aH_b Asp (2.79, 2.64)); 2.14-1.80 (m, 19H, γ -CH₂ Gln (2.12), 2* β -CH Val (2.10), 2* γ -CH₂ Pro (2.08, 1.94), 2* β -CH_aH_b Pro (2.08, 1.94), CH₃ NHAc^o (2.02), β -CH_aH_b Gln (2.00), β -CH_aH_b Gln (1.92), β -CH Ile¹ (1.91), β -CH Ile² (1.82)); 1.58-1.54 (m, 2H, 2* γ -CH_aH_b Ile); 1.41 (s, 9H, *t*Bu); 1.37-1.20 (m, 5H, β -CH₃ Ala (1.35), 2* γ -CH_aH_b Ile (1.22)); 1.03-0.85 (m, 24H, 4* γ -CH₃ Val (1.01-0.91), 2* γ -CH₃ Ile (0.96, 0.90), 2* δ -CH₃ Ile (0.91, 0.87)).

103.0 MHz-HMQC-NMR (CD₃OD), δ [ppm]: 139.9 (Ar_{ipso} Trt); 129.7 (Ar_{ortho} Trt); 128.4 (Ar_{meta} Trt); 127.5 (Ar_{para} Trt); 71.6 (C_{tert} *t*Bu); 61.1, 59.3 (α -CH Pro); 61.0 (2* α -CH Val); 59.3 (α -CH Ile¹); 57.5 (α -CH Ile²); 50.9 (α -CH Asp); 50.1 (α -CH Ala); 48.7 (δ -CH₂ Pro¹); 47.5 (δ -CH₂ Pro²); 43.1 (α -CH₂ Gly²); 42.8 (α -CH₂ Gly¹); 38.7 (β -CH Ile¹); 38.1 (β -CH₂ Asp); 37.9 (β -CH Ile²); 32 (2* β -CH Val); 30.2 (γ -CH₂ Gln, β -CH₂ Gln); 28.1 (CH₃ *t*Bu); 25.8 (γ -CH₂ Ile); 25.6 (β , γ -CH₂ Pro); 20.7 (NHCOCH₃); 19.6-18.5 (γ -CH₃ Val); 18.5 (β -CH₃ Ala); 16.0 (γ -CH₃ Ile); 11.8, 11.2 (δ -CH₃ Ile).

MALDI-MS [m/z] = 1413.1 ([M+Li]⁺, ber.: 1411.7); 1427.7 ([M+Na]⁺, ber.: 1427.8); 1449.8 ([M+Li+K-H]⁺, ber.: 1449.8).

C₇₃H₁₀₄N₁₂O₁₆ (1405.68) [1404.77]

***N*-Acetyl-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-asparagyl-glycyl-L-prolyl-L-valyl-L-prolyl-L-isoleucin (78)**

[Ac-QGAIVDGPVPI-OH]

Eine Lösung von 77.0 mg (0.055 mmol) Ac-Q(Trt)GAIVD(*t*Bu)GPVPI-OH **77** in 10 mL TFA, versetzt mit 0.1 mL H₂O und 0.1 mL Triisopropylsilan, wird im fest verschlossenen Glaskolben 3 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand mit 10 mL DMF, gefolgt von 10 mL Toluol, kodestilliert. Der Rückstand wird mit Ether gewaschen, und dann i. Vak. getrocknet. Das schlecht lösliche Rohprodukt (60.9 mg) wird durch präparative HPLC (Säule LUNA, Gradient P) gereinigt.

Ausb.: 49.9 mg (0.045 mmol, 82%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -14.1$ (c = 1.05, DMSO); HPLC: (Säule LUNA), Gradient P, R_t = 32.6 min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 8.65-7.65 (m, 9H, NH- Ala (8.63), Ile (8.33+8.01), Asp (8.22), Val (8.20), Gly (7.73), Gln (7.67)); 7.5-6.6 (s, 3H, NH-Ac, ϵ -NH₂ Gln); 4.63-4.10

(m, 9H, α -CH Asp (4.60), 2* α -CH Val (4.52+4.43), α -CH Ala (4.38), 2* α -CH Ile (4.35+4.25), 2* α -CH Pro (4.19+4.15), α -CH Gln (4.18)); 3.75-3.33 (m, 8H, 2* α -CH₂ Gly (a=3.72 b=3.55), 2* δ -CH₂ Pro (3.46+3.36)); 2.73-2.52 (m, 2H, β -CH₂ Asp); 2.15-1.72 (m, 19H, γ -CH₂ Gln (2.13), NHCOCH₃ (2.04), β -CH₂ Gln (1.97+1.76), β -CH Val (1.95), 2* β -CH₂ Pro (1.90+1.75), 2* γ -CH₂ Pro (1.79), 2* β -CH Ile (1.75)); 1.44-1.40 (m, 2H, γ -CH₂ Ile); 1.23-1.02 (m, 5H, β -CH₃ Ala (1.20), γ -CH₂ Ile (1.20+1.05)); 0.90-0.75 (m, 24H, 2* γ -CH₃ Val, 2* γ -CH₃ Ile, 2* σ -CH₃ Ile).

59.0, 58.2 (α -CH Val); 57.2, 56.1 (α -CH Pro); 55.8 (α -CH Ile); 52.7 (α -CH Gln); 49.3 (α -CH Asp); 48.2 (α -CH Ala); 47.2 (α -CH₂ Gly); 46.8, 46.2 (σ -CH₂ Pro); 36.1 (β -CH Ile); 35.5 (β -CH Asp); 31.9 (γ -CH₂ Gln); 30.4 (β -CH Val); 28.5 (β -CH₂ Gln); 24.1 (γ -CH₂ Ile); 24.0 (β , γ -CH₂ Pro); 21.5 (CH₃ NHAc); 18.2 (β -CH₃ Ala); 18.0 (γ -CH₃ Val); 15.5 (γ -CH₃ Ile); 11.0 (δ -CH₃ Ile). Ausgewählte Signale aus HMQC.

MALDI-MS [m/z] = 1106.6 ([M]⁺, ber.: 1106.6), 1118.9 ([M+Na+Li-H₂O]⁺, ber.: 1118.5), 1140.7 ([M+2Na+Li-H-H₂O]⁺, ber.: 1140.5), 1163.6 ([M+K+H₂O]⁺, ber.: 1163.7).

C₅₀H₈₂N₁₂O₁₆ (1107.26) [1106.60]

L-Asparagyl-L-seryl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valyl-L-asparagyl-glycyl-L-prolyl-L-valyl-L-prolyl-L-isoleucin (80)

[H-DS(α -Ac₃GalNAc)QGAIVDGPVPI-OH 80] sowie

[H-D(*t*Bu)S(α -Ac₃GalNAc)Q(Trt)GAIVD(*t*Bu)GPVPI-PHB-Tentagel 79]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 530 mg (0.10 mmol) Fmoc-Ile-PHB-Tentagel-Harz beladen. Die Kupplung der ersten zehn Aminosäuren (Pro bis Gln(Trt)) erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182). Für den Einbau des Glycosylaminosäure-Bausteins wird die automatische Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt, und das Harz mit einer extern angesetzten Lösung aus 186.8 mg (0.30 mmol) Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAc)-OH **9**, 114.2 mg (0.30 mmol) HATU und 40.8 mg (0.30 mmol) HOAt in 2 mL NMP, aktiviert mit 0.30 mL 2 M DIPEA in NMP, versetzt. Das Harz wird mit dieser Lösung 3 h stark geschüttelt, abfiltriert und mit NMP gewaschen. Die letzte Aminosäure (Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH) wird wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll gekuppelt, beginnend mit einem Wasch-, danach folgt ein Cappingschritt. Nach der letzten Kupplung wird die N-terminale Schutzgruppe abgespalten

und danach das Harz mit NMP und CH_2Cl_2 gewaschen und i. Hochvak. getrocknet. Man erhält 694 mg beladenes Harz. Der Großteil des Harzes wird für die Fragmentkupplung aufbewahrt, 22 mg werden zur Analyse in einen Festphasenreaktor überführt und mit etwas CH_2Cl_2 gequollen. Zum Harz werden 5 mL TFA, 0.2 mL Triisopropylsilan und 0.2 mL Wasser gegeben und das Harz wird 1 h bei Raumtemp. geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und mit 5 mL CH_2Cl_2 nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt, mit Toluol kodestilliert, mit Diethylether gewaschen und i. Hochvak. getrocknet.

Ausb. (Harz): 694 mg (max. 95%).

Analyse der abgespaltenen Substanz $\text{H-D}^1\text{S}(\text{Ac}_3\text{GalNAc})\text{QGAIVDGPVPI}^{13}\text{-OH}$:

400 MHz- $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6), δ [ppm]: 8.75 (d, 1H, ω -NH-Asp, $^3J = 7.8$ Hz); 8.34 (d, 1H, NH-Ala, $^3J = 7.9$ Hz); 8.28-8.20 (m, 5H, NH-Val (8.25), NH-Asp⁸ (8.23), NH-Gly⁹ (8.23), NH-Ser² (8.23), NH-Gln³ (8.22)); 8.04-7.96 (m, 2H, NH-Ile⁶ (8.02), NH-Ile¹³ (7.96)); 7.77-7.64 (m, 3H, NH-Gly⁴ (7.75), NH-Val¹¹ (7.69), NHAc (7.65)); 7.33, 7.08 (s, 2H, ϵ -NH₂-Gln); 5.29 (d, 1H, H4, $^3J_{3,4} = 3.1$ Hz); 4.96 (dd, 1H, H3, $^3J_{3,4} = 3.1$ Hz, $^3J_{3,2} = 11.7$ Hz); 4.88 (d, 1H, H1, $^3J_{1,2} = 3.0$ Hz); 4.59-4.55 (m, 3H, 2* α -CH Asp (4.57), α -CH Ser (4.57)); 4.45-4.31 (m, 3H, 2* α -CH Pro (4.42), α -CH Ala (4.35)); 4.25-4.11 (m, 7H, H2 (4.23), H5 (4.20), α -CH Ile (4.14), α -CH Gln (4.24), α -CH Val (4.16)); 4.05, 3.97 (m, 2H, H6_{a,b}); 3.83-3.38 (m, 10H, 2* α -CH₂ Gly (3.76), 2* δ -CH₂ Pro (3.65+3.51), β -CH₂ Ser (3.74)); 2.67, 2.49 (m, 4H, 2* β -CH₂ Asp); 2.15-2.07 (m, 5H, γ -CH₂ Gln (2.10), NHCOCH₃ (2.09)); 2.00-1.66 (m, 23, 2* β -CH₂ Pro (1.99+1.77), 3*OCOCH₃ (1.97, 1.87, 1.82), 2* β -CH Val (1.95), β -CH₂ Gln (1.90+1.80), 2* γ -CH₂ Pro (1.79), 2* β -CH Ile (1.69)); 1.27-1.13 (m, 7H, 2* γ -CH₂ Ile (1.22), β -CH₃ Ala (1.16)); 0.91-0.75 (m, 24H, 2* σ -CH₃ Ile (0.80), 2* γ -CH₃ Val (0.78), 2* γ -CH₃ Ile (0.78)).

69.8 (C3); 67.8 (C4); 67.4 (β -CH₂ Ser); 66.3 (C5); 61.5 (C6); 59.1 (α -CH Gln, α -CH Val); 57.0 (α -CH Ile); 52.8 (α -CH Ser); 52.6 (α -CH Pro); 49.3 (α -CH Asp); 47.9 (α -CH Ala); 47.1 (σ -CH₂ Pro); 46.7 (C2); 41.7 (α -CH₂ Gly); 36.1 (β -CH Ile); 36.0-35.0 (β -CH Asp); 31.2 (γ -CH₂ Gln); 30.4 (β -CH Val); 30.0-29.0 (β -CH₂ Gln); 24.6 (β,γ -CH₂ Pro); 23.8 (γ -CH₂ Ile); 20.6 (NHAc, OAc); 18.2 (β -CH₃ Ala); 17.5 (γ -CH₃ Val); 15.2 (γ -CH₃ Ile); 11.4, 11.0 (δ -CH₃ Ile). Ausgewählte Signale aus HMQC.

MALDI-MS [m/z] = 1595.2 ($[\text{M}]^+$, ber.: 1595.8); 1617.6 ($[\text{M}+\text{Na}-\text{H}]^+$, ber.: 1617.8); 1634.7 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 1634.9); 1656.5 ($[\text{M}+\text{Na}+\text{K}-\text{H}]^+$, ber.: 1656.9); 1672.7 ($[\text{M}+2\text{K}-\text{H}]^+$, ber.: 1673.0); 1694.7 ($[\text{M}+\text{Na}+2\text{K}-2\text{H}]^+$, ber.: 1695.0); 1710.8 ($[\text{M}+3\text{K}-2\text{H}]^+$, ber.: 1711.1).

$\text{C}_{69}\text{H}_{109}\text{N}_{15}\text{O}_{28}$ (1596.69) [1595.76]

***tert*-Butoxycarbonyl-L-alanyl-L-valyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-*N*^{im}-trityl-L-histidyl-L-leucyl-*N*- γ -trityl-L-glutaminyll-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucin (82)**

[Boc-AVH(Trt)H(Trt)LQ(Trt)LAAL-OH]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 510.0 mg (0.25 mmol) Fmoc-Leu-AMPS-Konjugat **64** beladen. Die Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182), auch die letzte Aminosäure (Boc-Ala-OH) wird dem Protokoll folgend gekuppelt; das Harz wird direkt danach mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen und i. Hochvak. getrocknet. Man erhält 831 mg beladenes Harz.

Das Harz wird in einen Festphasenreaktor überführt und mit 15 mL CH₂Cl₂ gequollen. Zum Harz wird eine Lösung von 157.8 mg TBAF•3H₂O (0.50 mmol, 2 Äquiv.) in 15 mL CH₂Cl₂ gegeben und bei Raumtemp. 25 min. geschüttelt. Die Abspalllösung wird abfiltriert, und das Harz mit 10 mL CH₂Cl₂ nachgewaschen. Die vereinten CH₂Cl₂-Phasen werden mit 20 mL Wasser versetzt. Der Abspaltvorgang wird mit 47.3 mg TBAF•3H₂O (0.15 mmol) in 15 mL CH₂Cl₂ wiederholt. Die beiden CH₂Cl₂/Wasser-Gemische werden vereint, und die org. Phase abgetrennt. Die org. Phase wird mit 40 mL Wasser extrahiert und dann i. Vak. eingeengt. Das sehr reine Rohprodukt kann direkt weiter umgesetzt werden.

Ausb.: 317 mg (0.167 mmol, 67%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -13.5$ (c = 1.15, CHCl₃ (95 %) + DMSO (5 %)).

Das Produkt liegt als N-Tetrabutylammoniumsalz vor:

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃ + 5 % DMSO-d₆), δ [ppm]: 7.17-6.75 (m, 51H, H_{Aryl}: 3*Trt, 2*Imidazol); 4.08-3.55 (m, 10H, 3* α -CH Ala (3.99, 3.84), α -CH Gln (3.72), 2* α -CH His (3.72), 3* α -CH Leu (4.04, 3.72), α -CH Val (3.58)); 2.91 (m, 2H, α -CH₂ *n*Bu); 2.65 (m, 4H, 2* β -CH₂ His); 1.97 (m, 2H, γ -CH₂ Gln); 1.78 (m, 2H, β -CH₂ Gln); 1.55-0.85 (m, 31H, 3* β -CH₃ Ala (1.13), 3*CH₃ Boc (1.11), β -CH₂ *n*Bu (1.36), γ -CH₂ *n*Bu (1.12), 3* β -CH₂ Leu (1.50, 1.45, 1.35), 3* β -CH₂ Leu (1.52, 1.38)); 0.72 (t, 3H δ -CH₃ *n*Bu, ³J = 7.05 Hz); 0.65-0.40 (m, H, 6* δ -CH₃ Leu (0.62, 0.58, 0.51, 0.45, 0.43), 2* γ -CH₃ Val (0.44)).

100.6 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃ + 5 % DMSO-d₆), δ [ppm]: 130.4, 129.4, 128.7, 128.5, 128.1, 127.21 (Trt); 60.4 (α -CH Val); 58.6 (α -CH₂ *n*Bu); 55.8, 54.7, 54.2 (α -CH His/Gln/Leu); 51.3 (α -CH Leu); 50.6, 49.4 (α -CH Ala); 40.0, 39.1 (β -CH₂ Leu); 28.3 (CH₃-Boc); 24.5, 24.4 (β -CH₂ Leu); 24.0 (γ -CH₂ *n*Bu); 23.0, 22.8, 22.6, 21.5, 21.3, 21.0 (δ -CH₃ Leu); 19.8 (γ -CH₂ *n*Bu); 19.0 (γ -CH₃ Val); 16.8 (β -CH₃); 13.5 (δ -CH₃ *n*Bu). Ausgewählte Signale aus HMQC.

C₁₁₁H₁₃₁N₁₅O₁₄

(1899.32)

[1898.00]

L-Alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-histidyl-L-leucyl-L-glutaminyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-iso-leucyl-L-valyl-L-asparagyl-glycyl-L-prolyl-L-valyl-L-prolyl-L-iso-leucin (83)

[H-AVHHLQLAALDS(α -Ac₃GalNAc)QGAIVDGPVPI-OH]

Der Festphasenreaktor wird mit 681 mg (max. 0.096 mmol) H-D(*t*Bu)S(α -Ac₃GalNAc)-Q(Trt)GAIVD(*t*Bu)GPVPI-PHB-Tentagel-Harz (**79**) beladen. Das Harz wird in 10 mL DMF gequollen und mit einer Lösung aus 301 mg (0.159 mmol) Boc-AVH(Trt)H(Trt)-LQ(Trt)LAAL-OH (**82**), 60.3 mg (0.159 mmol) HATU und 21.5 mg (0.159 mmol) HOAt in 15 mL DMF, aktiviert mit 35 μ L *N*-Methylmorpholin, versetzt. Das Harz wird 14 h geschüttelt. Dann wird es zweimal mit je 10 mL DMF, dreimal mit je 20 mL CH₂Cl₂ gewaschen und i. Hochvak. getrocknet. Man erhält 815 mg beladenes Harz.

Zum Harz werden 1 mL Triisopropylsilan, 1 mL Wasser und 20 mL TFA gegeben und das Harz wird 2.5 h bei Raumtemp. geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und zweimal mit je 10 mL TFA nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt und mit CH₂Cl₂ kodestilliert. Der Rückstand wird einmal mit 40 mL und einmal mit 10 mL Diethylether gewaschen (zur Trennung muß u.U. zentrifugiert werden). Das Glycopeptid wird in Wasser gelöst und lyophilisiert. Das Produkt kann ohne weitere Reinigung (HPLC-Reinheit: 96 % (215 nm); Säule JUPITER, Gradient C) verwendet werden.

Ausb.: 230.9 mg (0.086 mmol, 90 %); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -10.3$ (c = 3.22, DMSO); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient C, R_t = 6.9 min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 8.71 (d, 1H, NH Asp, ³J = 8.2 Hz); 8.40 (d, 1H, NH His, ³J = 7.8 Hz); 8.35-7.63 (m, 19H, 4*NH Ala, NH Asp (8.22), 2*NH Gly (8.17, 7.72), 2*NH Gln (8.04), 2*NH Ile, 3*NH Leu, NH Ser (8.18), 3*NH Val, NHAc); 7.35-7.10 (m, 6H, 2*NH_aH_b ϵ -Gln (7.34, 7.28), 4*Ar-H His); 6.84 (s_b, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln); 6.81 (s_b, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln); 5.30 (s, 1H, H4); 5.00 (m, 1H, H3); 4.85 (b_s, 1H, H1); 4.62-4.11 (m, 22H, 2* α -CH His (4.60), 2* α -CH Asp (4.58), 2* α -CH Gln (4.50), α -CH Ser (4.50), 2* α -CH Pro (4.42), H2, H5, 3* α -CH Ala (4.36, 4.24), 3* α -CH Leu (4.27, 4.24), 2* α -CH Ile (4.19-4.14), 3* α -CH Val (4.19-4.14)); 4.05-3.88 (m, 4H, α -CH₂ Gly, α -CH Ala_o (3.91), H6 (3.90)); 3.83-3.35 (m, 8H, α -CH₂ Gly (3.77), β -CH_aH_b Ser (3.70), δ -CH_aH_b Pro (3.67), β -CH_aH_b Ser (3.65), δ -CH_aH_b Pro (3.53), δ -CH₂ Pro (3.39)); 3.03-2.93 (m, 4H, 2* β -CH₂ His); 2.68-2.49 (m, 4H, 2* β -CH_aH_b Asp); 2.12-2.05 (m, 7H, 2* γ -CH₂ Gln, CH₃ OAc); 2.00-1.70 (m, 26H, 2* β -CH_aH_b Gln (1.99, 1.87), 2*CH₃ OAc (1.97, 1.87), 3* β -CH Val (1.93), 2* γ -CH₂ Pro

(1.85, 1.75), 2* β -CH₂ Pro (1.82), CH₃ NHAc (1.81), 2* β -CH_{aH_b} Gln (1.79, 1.73), 2* β -CH Ile (1.72)); 1.58-1.54 (m, 3H, 3* γ -CH Leu); 1.45-1.40 (m, 10H, 2* γ -CH₂ Ile (1.42), 3* β -CH₂ Leu (1.41)); 1.25 (d, 3H, β -CH₃ Ala_o, ³J = 6.65Hz); 1.20-1.14 (m, 9H, 3* β -CH₃ Ala); 0.92-0.75 (m, 48H, 6* δ -CH₃ Leu (0.84, 0.81), 2* δ -CH₃ Ile (0.83, 0.78), 2* γ -CH₃ Ile (0.80), 6* γ -CH₃ Val).

103.0 MHz-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 123.8, 123.0 (Ar-H His); 91.9 (C1); 67.4 (β -CH₂ Ser); 62.5 (C3); 61.5 (C4); 60.5 (C5); 58.9 (α -CH Pro); 58.5 (α -CH Ser); 57.6-56.3 (α -CH Ile, α -CH Val); 55.5 (C6); 52.6 (α -CH Gln); 52.3, 50.9 (α -CH Leu); 51.3 (α -CH His); 49.3 (α -CH Asp); 48.1, 47.8 (α -CH Ala); 47.0, 46.8 (δ -CH₂ Pro); 42.5 (α -CH₂ Gly); 41.5 (C2); 40.6 (β -CH₂ Leu); 36.1 (β -CH Ile); 35.9 (β -CH₂ Asp); 31.2 (γ -CH₂ Gln); 30.3 (β -CH Val); 28.8, 27.5 (β -CH₂ Gln); 27.0 (β -CH₂ His); 24.3 (γ -CH₂ Ile); 24.2 (β , γ -CH₂ Pro); 23.8 (γ -CH Leu); 22.9, 21.3 (δ -CH₃ Leu); 22.5 (NHCOCH₃); 20.3 (OAc); 19-17.7 (γ -CH₃ Val); 18.0, 17.1 (β -CH₃ Ala); 15.2 (γ -CH₃ Ile); 10.9 (δ -CH₃ Ile). Ausgewählte Signale aus HMQC.

MALDI-MS [m/z] = 2650.9 ([M+H]⁺, ber.: 2650.4); 2672.8 ([M+Na]⁺, ber.: 2672.4); 2688.8 ([M+K]⁺, ber.: 2688.5); 2694.8 ([M+Li+K-H]⁺, ber.: 2695.4); 2710.8 ([M+Na+K-H]⁺, ber.: 2710.5); 2716.7 ([M+Na+K+Li-2H]⁺, ber.: 2716.4).

C₁₁₈H₁₈₈N₃₀O₃₉ (2650.93) [2649.37]

L-Alanyl-L-valyl-L-histidyl-L-histidyl-L-leucyl-L-glutaminyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-iso-leucyl-L-valyl-L-asparagyl-glycyl-L-prolyl-L-valyl-L-prolyl-L-iso-leucin (84)

[H-AVHHLQLAALDS(α -Ac₃GalNAc)QGAIVDGPVPI-OH]

Man löst 230.9 mg (0.086 mmol) H-AVHHLQLAALDS(α -Ac₃GalNAc)QGAIVDGPVPI-OH (**83**) in 26 mL CH₃OH und stellt mit 1 %-iger CH₃ONa Lösung in CH₃OH auf pH 9.5 ein. Die Lösung wird ca. 8 h bei Raumtemp. gerührt. Mittels analyt. HPLC (Säule JUPITER, Gradient F) wird das Ende der Reaktion festgestellt. Das Reaktionsgemisch wird durch Zugabe von 6 Tropfen AcOH leicht angesäuert (pH 5.5) und dann i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird i. Vak. eingengt und durch Ausschlußchromatographie in Wasser an einer Sephadex G-15 Phase gereinigt.

Ausb.: 159.9 mg (0.063 mmol, 73 %); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -42.3$ (c = 3.41, DMSO); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient D, R_t = 6.0 min.

NMR-Resonanzen gleicher, mehrfach auftretender Aminosäuren, die nicht eindeutig nur einer Aminosäure zugeordnet werden konnten, sind mit einem Ziffern paar (z.B. „1/2“ bzw. „1,2“) indiziert.

H-	A	V	H	H	L	Q	L	A	A	L	D	S _Z	Q	G	A	I	V	D	G	P	V	P	I	-OH
	4	1	2	1	2/3	2	2/3	1/2	3	1	1/2	-	1	2	1/2	2	3	1/2	1	1/2	2	1/2	1	

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ[ppm]: 8.48-7.33 (m, 26H, NH: Gln¹ (8.44), Ser (8.35), Ile² (8.29), His¹ (8.27), His² (8.26), Gly² (8.25), Val² (8.16), Asp^{1,2} (8.14), Gly¹ (8.11), Val¹ (8.08), Ala^{1,2} (7.94), Gln² (7.94), Ala⁴ (7.91), Ala³ (7.88), Leu¹ (7.84), Leu^{2,3} (7.76), Val³ (7.75), Ile¹ (7.73), NHAc (7.59), NH_aH_b ε-Gln¹ (7.48), NH_aH_b ε-Gln² (7.35), 2*Ar-H His^{1,2}); 6.86-6.70 (m, 4H, 2*Ar-H His^{1,2}, NH_aH_b ε-Gln² (6.82), NH_aH_b ε-Gln¹ (6.73)); 4.68-4.02 (m, 22H, H1 (4.61), 2*α-CH Asp^{1,2} (4.60), α-CH His¹ (4.42), 2*α-CH^{1,2} Pro (4.40), α-CH Ser (4.38), α-CH His² (4.35), α-CH Val¹ (4.35), α-CH Leu¹ (4.32), α-CH Gln² (4.24), 2*α-CH Ala^{1,2} (4.23), 2*α-CH Leu^{2,3} (4.23), α-CH Gln¹ (4.17), α-CH Ile² (4.16), α-CH Val² (4.16), α-CH Val³ (4.14), α-CH Ala³ (4.04), α-CH Ile¹ (4.04), H2 (4.04)); 3.78-3.40 (m, 16H, α-CH Ala⁴ (3.75), α-CH_aH_b Gly¹ (3.73), H5 (3.72), α-CH_aH_b Gly² (3.73), δ-CH_aH_b Pro¹ (3.67), β-CH₂ Ser (3.66), H4 (3.63), α-CH_aH_b Gly² (3.62), H3 (3.61), α-CH_aH_b Gly² (3.59), H6_a (3.52), δ-CH_aH_b Pro¹ (3.50), δ-CH_aH_b Pro² (3.49), H6_a (3.46), δ-CH_aH_b Pro² (3.42)); 2.90-2.80 (m, 4H, 2*β-CH₂ His^{1,2}); 2.58-2.40 (m, 4H, 2*β-CH_aH_b Asp^{1,2}); 2.12-1.68 (m, 24H, 2*γ-CH₂ Gln^{1,2} (2.09), 3*β-CH Val^{1,2,3} (1.96), 2*β-CH_aH_b Gln^{1,2} (1.88), CH₃ NHAc (1.85), 2*β-CH₂ Pro^{1,2} (1.85), 2*γ-CH₂ Pro^{1,2} (1.85), 2*β-CH_aH_b Gln^{1,2} (1.81), 2*β-CH Ile^{1,2} (1.72)); 1.56-1.40 (m, 11H, 3*γ-CH Leu^{1,2,3} (1.54), 3*β-CH₂ Leu^{1,2,3} (1.43), 2*γ-CH_aH_b Ile^{1,2} (1.42)); 1.25-1.09 (m, 13H, β-CH₃ Ala⁴ (1.23), 3*β-CH₃ Ala^{1,2,3} (1.18), γ-CH_aH_b Ile¹ (1.11)); 1.03 (m, 1H, γ-CH_aH_b Ile²); 0.89-0.75 (m, 48H, 6*δ-CH₃ Leu, 2*δ-CH₃ Ile, 2*γ-CH₃ Ile, 6*γ-CH₃ Val).

103.0 MHz-NMR (DMSO-d₆), δ[ppm]: 97.6 (C1); 71.4 (C3); 69.9 (C5); 67.4 (C4); 66.1 (β-CH₂ Ser); 60.4 (C6); 59.0 (α-CH Pro^{1,2}); 59.0 (α-CH Val^{1,2}); 57.2 (α-CH Ile²); 57.2 (α-CH Val³); 57.1 (α-CH Ile¹); 55.5 (α-CH Gln²); 53.2 (α-CH His^{1,2}); 53.2 (α-CH Ser); 52.7 (α-CH Gln¹); 51.1 (α-CH Leu^{1,2}); 49.7 (α-CH Asp^{1,2}); 49.3 (α-CH Ala³); 49.3 (C2); 48.3 (α-CH Ala⁴); 48.2 (α-CH Ala^{1,2}); 48.2 (α-CH Leu³); 47.0 (δ-CH₂ Pro¹); 45.7 (δ-CH₂ Pro²); 42.3 (α-CH₂ Gly²); 41.3 (α-CH₂ Gly¹); 40.3 (β-CH₂ Leu^{1,2,3}); 36.4 (β-CH Ile^{1,2}); 31.5 (γ-CH₂ Gln^{1,2}); 30.1 (β-CH Val^{1,2,3}); 29.0 (β-CH₂ His^{1,2}); 27.5 (β-CH₂ Gln^{1,2}); 24.3 (γ-CH₂ Ile^{1,2}); 24.0 (β,γ-CH₂ Pro^{1,2}); 23.8 (γ-CH Leu^{1,2,3}); 22.9 (δ-CH₃ Leu^{1,2,3}); 22.7 (NHCOCH₃); 18.9,

18.1, 17.7 (γ -CH₃ Val^{3,2,1}); 18.6 (β -CH₃ Ala⁴); 17.8 (β -CH₃ Ala^{1,2,3}); 15.3 (γ -CH₃ Ile^{1,2}); 11.0 (δ -CH₃ Ile^{1,2}). Ausgewählte Signale aus HMQC.

MALDI-MS [m/z] = 2525.1 ([M+H]⁺, ber.: 2524.3); 2547.3 ([M+Na]⁺, ber.: 2547.3); 2569.5 ([M+K+Li-H]⁺, ber.: 2569.3).

C₁₁₂H₁₈₂N₃₀O₃₆ (2524.82) [2523.33]

5.4.4 Synthesen zum Kapitel 3.3.4

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (85)

[H-LAALDSQGAIV-OH]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 526.3 mg (0.10 mmol) Fmoc-Val-PHB-Tentagel-Harz beladen. Die Kupplung der Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182). Die letzte *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten und das Harz wird mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen.

Man überführt es in einen Festphasenreaktor und quillt es mit etwas CH₂Cl₂. Zum Harz werden 1 mL Triisopropylsilan, 1 mL Wasser und 20 mL TFA gegeben und das Harz wird 2.5 h bei Raumtemp. geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und mit 10 mL CH₂Cl₂ nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird mit 25 mL kaltem Diethylether gewaschen (zur Trennung muß u.U. zentrifugiert werden). Das schlecht lösliche Peptid wird in Wasser suspendiert und lyophilisiert. Der Rückstand wird durch präparative HPLC (Säule LUNA, Gradient N) gereinigt.

Ausb.: 109.6 mg (0.099 mmol, 99%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -38.7$ (c = 2.20, DMSO/H₂O 7:3); HPLC: (Säule LUNA), Gradient H, R_t = 31.8 min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 8.66 (d, 1H, NH Ala¹, ³J = 7.4 Hz); 8.24 (d, 1H, NH Asp, ³J = 7.4 Hz); 8.12-8.04 (m, 5H, NH Leu^o (8.10), NH Leu² (8.10), NH Gly (8.06), NH Gln (8.06)); 7.93-7.84 (m, 4H, NH Ala² (7.91), NH Val (7.88), NH Ile (7.86), NH Ala³ (7.86)); 7.71 (d, 1H, NH Ser, ³J = 7.4 Hz); 7.24 (s_b, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln); 6.77 (s_b, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln); 4.55 (dd, 1H, α -CH Asp, ³J_a = 7.4 Hz, ³J_b = 13.3 Hz); 4.40-4.18 (m, 7H, α -CH Ala¹ (4.38), α -CH Ala² (4.35), α -CH Leu² (4.28), α -CH Ala³ (4.28), α -CH Ser (4.25), α -CH Ile

(4.23), α -CH Gln (4.20)); 4.11 (dd, 1H, α -CH Val, $^3J_a = 5.5$ Hz, $^3J_b = 8.2$ Hz); 3.77 (m, 1H, α -CH ω -Leu); 3.72+3.67 (2*d, 2H, α -CH_aH_b Gly, $^3J_{a,b} = 5.7$ Hz); 3.62-3.48 (m, 2H, β -CH_aH_b Ser (3.60), β -CH_aH_b Ser (3.50)); 2.72 (dd, 1H, β -CH_aH_b Asp, $^3J_{a,b} = 5.9$ Hz, $^3J_{a,\alpha} = 16.4$ Hz); 2.51 (m, 1H, β -CH_aH_b Asp); 2.10 (t, 2H, γ -CH₂ Gln, $^3J = 6.9$ Hz); 2.05-1.90 (m, 2H, β -CH Val (2.03), β -CH_aH_b Gln (1.92)); 1.77-1.41 (m, 9H, β -CH_aH_b Gln (1.75), β -CH Ile (1.71), γ -CH ω -Leu (1.63), γ -CH Leu² (1.57), β -CH₂ ω -Leu (1.51), β -CH₂ Leu² (1.43), γ -CH_aH_b Ile (1.43)); 1.25-1.15 (m, 9H, β -CH₃ Ala¹ (1.23), β -CH₃ Ala³ (1.19), β -CH₃ Ala² (1.17)); 1.07 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.91-0.77 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu, 2* γ -CH₃ Val (0.87, 0.85), γ -CH₃ Ile (0.83), δ -CH₃ Ile (0.79)).

103.0 MHz-¹³C-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 173.8 (CO Amid ϵ -Gln); 172.7 (COOH ω -Leu); 172.1 (COOH Asp); 171.9, 171.8, 171.4, 171.2, 171.1, 170.4, 169.9, 168.4, 168.1 (CO Amid); 61.3 (β -CH₂ Ser); 56.9 (α -CH Val); 56.5 (α -CH Ile); 54.9 (α -CH Ser); 52.4 (α -CH Gln); 50.6 (α -CH Leu²); 50.5 (α -CH ω -Leu); 49.2 (α -CH Asp); 47.8 (3* α -CH Ala); 41.7 (α -CH₂ Gly); 40.8 (β -CH₂ Leu²); 40.1 (β -CH₂ ω -Leu); 36.4 (β -CH Ile); 35.7 (β -CH₂ Asp); 31.3 (γ -CH₂ Gln); 29.6 (β -CH Val); 27.4 (β -CH₂ Gln); 24.1 (γ -CH₂ Ile); 23.9 (γ -CH Leu²); 23.9 (γ -CH ω -Leu); 22.9, 22.4, 21.8, 21.3 (δ -CH₃ Leu); 18.0 (3* β -CH₃ Ala); 18.7, 17.9 (2* γ -CH₃ Val); 15.0 (γ -CH₃ Ile); 10.9 (δ -CH₃ Ile).

MALDI-MS [m/z] = 1058.0 ([M+H]⁺, ber.: 1057.6); 1080.0 ([M+Na]⁺, ber.: 1079.6); 1095.7 ([M+K]⁺, ber.: 1095.7); 1101.9 ([M+2Na-H]⁺, ber.: 1101.6); 1117.9 ([M+K+Na-H]⁺, ber.: 1117.7).

C₄₆H₈₀N₁₂O₁₆ (1057.20) [1056.58]

5.4.5 Synthesen zum Kapitel 3.3.5

***tert*-Butoxycarbonyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl- β -*tert*-butyl-L-asparagyl-L-seryl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-N- γ -trityl-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (86)**

[Boc-LAALD(*t*Bu)S(α -Ac₃GalNAc)Q(Trt)GAIV-OH **86**]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 299.7 mg (0.11 mmol) Fmoc-Val-AMPS-Konjugat **67** beladen. Die Kupplung der ersten vier Aminosäuren erfolgt nach dem

allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182). Für den Einbau des Saccharidbausteins wird die automatische Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt, und das Harz mit einer extern angesetzten Lösung aus 144.5 mg (0.22 mmol) Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAc)-OH (**9**), 83.7 mg (0.22 mmol) HATU und 29.9 mg (0.22 mmol) HOAt in 2 mL NMP, aktiviert mit 48.3 μ L (0.44 mmol) *N*-Methylmorpholin, versetzt. Das Harz wird mit dieser Lösung 3 h stark geschüttelt und mit NMP gewaschen. Die restlichen fünf Aminosäuren werden wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll gekuppelt, beginnend mit einem Wasch-, danach folgt ein Cappingschritt. Die letzte Abspaltung der *N*-terminalen Boc-Schutzgruppe wird ausgelassen. Das Harz wird mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen, in einen Festphasenreaktor überführt und mit 10 mL CH₂Cl₂ gequollen. Zum Harz wird eine Lösung von 63.1 mg TBAF \cdot 3H₂O (0.20 mmol, \sim 2 Äquiv.) in 2 mL CH₂Cl₂ gegeben und bei Raumtemp. 30 min. geschüttelt. Die Abspalllösung wird abfiltriert, und das Harz mit 10 mL CH₂Cl₂ nachgewaschen. Die vereinten CH₂Cl₂-Phasen werden mit 10 mL Wasser versetzt. Der Abspaltvorgang wird mit 18.9 mg TBAF \cdot 3H₂O (0.06 mmol) in 10 mL CH₂Cl₂ wiederholt. Die beiden CH₂Cl₂/Wasser-Gemische werden vereint, und die org. Phase abgetrennt. Die org. Phase wird mit 15 mL Wasser extrahiert und dann i. Vak. eingengt, und i. Hochvak. getrocknet.

Bedingt durch teilweise verstopfte Leitungen des Synthesizers wurde nur wenig Produkt erhalten, neben einer Vielzahl von Nebenprodukten entstand die (recht ungewöhnliche) frühzeitige Abbruchsequenz Ac-S(α -Ac₃GalNAc)Q(Trt)GAIV-OH **87**. Entsprechend wurde eine Reinigung mittels semipräparativer HPLC (Säule JUPITER, Gradient L) notwendig.

Ausb.: 17.0 mg (0.0095 mmol, 8.7%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -1.9$ ($c = 1.30$, CH₃OH); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient G, $R_{\text{t}} = 25.5$ min.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 7.83-7.27 (m, 11H, NH Gly (7.81), NH Gln (7.69), NH Ala (7.65, 7.43, 7.29), NH Ser (7.56), NH Asp (7.54), GalNHAc (7.39), NH Ile (7.33), NH Leu (7.31), NH Val (7.29)); 7.14-7.08 (m, 16H, H_{Aryl} Trt, NH ϵ -Gln); 5.24 (d, 1H, H4, ³ $J_{4,3} = 2.7$ Hz); 5.03 (dd, 1H, H3, ³ $J_{3,4} = 2.7$ Hz, ³ $J_{3,2} = 11.3$ Hz); 4.79 (d, 1H, H1, ³ $J_{1,2} = 3.5$ Hz); 4.49 (dd, 1H, α -CH Asp, ³ $J = 4.7, 9.8$ Hz); 4.41 (dd, 1H, H2, ³ $J_{2,1} = 3.5$ Hz, ³ $J_{2,3} = 11.3$ Hz); 4.31 (dd, 1H, α -CH Ser, ³ $J = 4.7, 7.4$ Hz); 4.25-4.20 (m, 3H, α -CH Val (4.23), 2* α -CH Ala (4.22)); 4.15-4.02 (m, 3H, H5 (4.13), α -CH Ile (4.11), α -CH Gln (4.04)); 4.01-3.83 (m, 5H, H6a (3.99), α -CH Leu (3.98), α -CH Ala (3.93), β -CH_aH_b Ser (3.90), H6b (3.86)); 3.80-3.64 (m, 4H, α -CH_aH_b Gly (3.78), β -CH_aH_b Ser (3.75), α -CH ω -Leu (3.73), α -CH_aH_b Gly (3.67)); 2.76-2.64 (m, 2H, β -CH₂ Asp); 2.35 (t, 2H, γ -CH₂ Gln, ³ $J = 7.8$ Hz); 2.07-1.99 (m, 5H, β -CH

Val (2.05), β -CH_aH_b Gln (2.04), CH₃ OAc (2.01)); 1.93-1.78 (m, 11H, β -CH_aH_b Gln (1.91), CH₃ NHAc (1.82), CH₃ OAc (1.82, 1.80), β -CH Ile (1.81)); 1.61-1.55 (m, 3H, β -CH_aH_b Leu (1.59), γ -CH ω -Leu (1.58), γ -CH Leu (1.58)); 1.44-1.24 (m, 31H, β -CH_aH_b Leu (1.42), γ -CH_aH_b Ile (1.39), β -CH₂ ω -Leu (1.38), 6*CH₃ *t*Bu (1.36, 1.27), 3* β -CH₃ Ala (1.27)); 1.03 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.85-0.67 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu (0.83, 0.78, 0.76, 0.70), 2* γ -CH₃ Val (0.82, 0.80), γ -CH₃ Ile (0.78), δ -CH₃ Ile (0.73)).

103.0 MHz-NMR (CDCl₃), δ [ppm]: 128.5-126.4 (Trt); 98.3 (C1); 68.2 (C3); 67.1 (C4); 66.5 (C5); 66.3 (β -CH₂ Ser); 61.4 (C6); 58.2 (α -CH Ile); 57.5 (α -CH Val); 55.1 (α -CH Ser); 54.9 (α -CH ω -Leu); 54.2 (α -CH Gln); 54.0 (α -CH Leu); 51.5 (α -CH Asp); 51.5, 2*49.6 (3* α -CH Ala); 47.0 (C2); 43.0 (α -CH₂ Gly); 39.9 (β -CH₂ ω -Leu); 39.0 (β -CH₂ Leu); 36.4 (β -CH₂ Asp); 36.1 (β -CH Ile); 32.9 (γ -CH₂ Gln); 30.4 (β -CH Val); 28.1, 27.8 (6*CH₃ *t*Bu); 26.5 (β -CH₂ Gln); 24.6 (γ -CH Leu, γ -CH ω -Leu, γ -CH₂ Ile); 22.7, 22.6, 21.3, 21.1 (δ -CH₃ Leu); 22.4 (CH₃ NHAc); 20.4 (3*CH₃ OAc); 18.5, 17.7 (γ -CH₃ Val); 16.5 (3* β -CH₃ Ala); 15.3 (γ -CH₃ Ile); 10.8 (δ -CH₃ Ile). Daten ausschließlich aus HMQC.

MALDI-MS [m/z] = 1807.6, 1808.6 ([M+Na]⁺, ber.: 1806.9, 1807.9); 1824.7 ([M+K]⁺, ber.: 1822.9, 1823.9).

C₈₈H₁₂₉N₁₃O₂₆ (1785.04) [1783.92]

Abbruchsequenz Ac-S(α -Ac₃GalNAc)Q(Trt)GAIV-OH **87**:

Ausb.: 32.0 mg (0.027 mmol, 24.5%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -1.6$ (c = 1.30, CH₃OH); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient G, R_t = 17.7 min.

MALDI-MS [m/z] = 1210.0, 1211.0 ([M+Na]⁺, ber.: 1209.5, 1210.5); 1226.0, 1227.0 ([M+K]⁺, ber.: 1225.5, 1226.5).

C₅₉H₇₈N₈O₁₈ (1187.29) [1186.54]

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (88)

[H-LAALDS(α -Ac₃GalNAc)QGAIV-OH]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 526.3 mg (0.10 mmol) Fmoc-Val-PHB-Tentagel-Harz beladen. Die Kupplung der ersten vier Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182). Für den Einbau des Saccharidbausteins wird die automatische Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt, und das Harz wird

mit einer extern angesetzten Lösung versetzt, bestehend aus 196.8 mg (0.30 mmol) Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAc)-OH (**9**), 114.1 mg (0.30 mmol) HATU und 40.8 mg (0.30 mmol) HOAt in 2 mL NMP, aktiviert mit 0.30 mL einer Lösung aus 2 M DIPEA in NMP. Das Harz wird 3 h stark geschüttelt und mit NMP gewaschen. Die restlichen fünf Aminosäuren werden wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll gekuppelt, beginnend mit einem Wasch-, danach folgt ein Cappingschritt. Die letzte *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten und das Harz wird mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen.

Man überführt es in einen Festphasenreaktor und quillt es mit etwas CH₂Cl₂. Zum Harz werden 1 mL Triisopropylsilan, 1 mL Wasser und 20 mL TFA gegeben und das Harz wird 2.5 h bei Raumtemp. geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und mit 10 mL TFA nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. eingeeengt und mit CH₂Cl₂ kodestilliert. Der Rückstand wird einmal mit 40 mL und einmal mit 10 mL kaltem Diethylether gewaschen (zur Trennung muß u.U. zentrifugiert werden). Das Glycopeptid wird in Wasser gelöst und lyophilisiert.

Ausb.: 108.4 mg (0.078 mmol, 78%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -18.2$ ($c = 1.37$, DMSO/H₂O 7:3); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient H, $R_t = 28.8$ min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆/D₂O 7:3), δ [ppm]: 7.03 (d, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln, ³ $J = 8.6$ Hz); 6.75 (d, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln, ³ $J = 8.6$ Hz); 5.23 (d, 1H, H₄, ³ $J_{4,3} = 2.7$ Hz); 4.99 (dd, 1H, H₃, ³ $J_{3,4} = 2.7$ Hz, ³ $J_{3,2} = 11.4$ Hz); 4.80 (d, 1H, H₁, ³ $J_{1,2} = 3.5$ Hz); 4.51 (t, 1H, α -CH Asp, ³ $J_{\alpha,\beta} = 6.7$ Hz); 4.42 (t, 1H, α -CH Ser, ³ $J_{\alpha,\beta} = 5.5$ Hz); 4.24-3.90 (m, 11H, 2* α -CH Ala (4.22), H₂ (4.20), α -CH Leu (4.15), H₅ (4.15), α -CH Ala (4.13), α -CH Ile (4.11), α -CH Gln (4.09), α -CH Val (4.06), H_{6a} (3.99), H_{6b} (3.92)); 3.75-3.62 (m, 5H, β -CH_aH_b Ser (3.73), α -CH Leu^o (3.71), α -CH₂ Gly (3.68), β -CH_aH_b Ser (3.64)); 2.69 (dd, 2H, β -CH_aH_b Asp, ³ $J_{\alpha,\beta} = 6.7$ Hz, ³ $J_{a,b} = 7.2$ Hz); 2.13 (m, 2H, γ -CH₂ Gln); 2.05-1.78 (m, 15H, CH₃ OAc (2.03), β -CH Val (2.00), β -CH_aH_b Gln (1.91), CH₃ OAc (1.91, 1.83), CH₃ NHAc (1.80), β -CH_aH_b Gln (1.80)); 1.68 (m, 1H, β -CH Ile); 1.57-1.35 (m, 7H, γ -CH Leu^o (1.55), β -CH_aH_b Leu^o (1.53), γ -CH Leu (1.49), β -CH_aH_b Leu^o (1.47), β -CH₂ Leu (1.41), γ -CH_aH_b Ile (1.37)); 1.20-1.16 (m, 9H, 3* β -CH₃ Ala); 1.00 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.85-0.71 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu, 2* γ -CH₃ Val, γ -CH₃ Ile (0.77), δ -CH₃ Ile (0.73)).

103.0 MHz-NMR (DMSO-d₆/D₂O 7:3), δ [ppm]: 98.4 (C₁); 68.8 (C₃); 68.0 (C₄); 67.9 (β -CH₂ Ser); 67.1 (C₅); 62.4 (C₆); 58.3 (α -CH Val); 58.0 (α -CH Ile); 53.8 (α -CH Ser); 53.7 (α -CH Gln); 52.3 (α -CH Leu); 51.7 (α -CH ω -Leu); 50.3 (α -CH Asp); 49.5, 49.4 (3* α -CH Ala); 47.9 (C₂); 42.8 (α -CH₂ Gly); 40.9 (β -CH₂ Leu); 40.7 (β -CH₂ ω -Leu); 37.0 (β -CH Ile); 36.1

(β -CH₂ Asp); 31.9 (γ -CH₂ Gln); 30.7 (β -CH Val); 27.8 (β -CH₂ Gln); 25.1 (γ -CH₂ Ile); 25.0 (γ -CH Leu); 24.4 (γ -CH ω -Leu); 23.7, 23.3, 22.5, 22.1 (δ -CH₃ Leu); 23.1 (CH₃ NHAc); 21.2 (3*CH₃ OAc); 18.6 (γ -CH₃ Val); 18.1 (3*\mathbf{\beta}-CH₃ Ala); 16.0 (γ -CH₃ Ile); 11.7 (δ -CH₃ Ile).

Daten ausschließlich aus HMQC.

MALDI-MS [m/z] = 1387.5 ([M+H]⁺, ber.: 1386.7); 1409.6 ([M+Na]⁺, ber.: 1408.7); 1425.5 ([M+K]⁺, ber.: 1424.8); 1431.4 ([M+K+Li-H]⁺, ber.: 1430.7); 1447.5 ([M+K+Na-H]⁺, ber.: 1446.8).

C₆₀H₉₉N₁₃O₂₄ (1386.50) [1385.69]

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-glutaminyglycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (89)

[H-LAALDS(α -GalNAc)QGAIV-OH]

Man löst 90.1 mg (0.065 mmol) H-LAALDS(α -Ac₃GalNAc)QGAIV-OH (**88**) in 30 mL CH₃OH und stellt mit 1 %-iger CH₃ONa Lösung in CH₃OH (~20 Tropfen) auf pH 9.5 ein. Die Lösung wird ca. 4 h bei Raumtemp. gerührt. Mittels analyt. HPLC (Säule JUPITER, Gradient H) wird das Ende der Reaktion festgestellt. Die Lösung wird mit saurem Ionenaustauscher Dowex 50Wx8 neutralisiert und filtriert. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt und der Rückstand durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient N) gereinigt.

Ausb.: 60.0 mg (0.047 mmol, 73%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -1.1$ (c = 2.10, DMSO); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient H, R_t = 22.7 min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 8.65 (d, 1H, NH Ala³, ³J = 7.4 Hz); 8.24 (d, 1H, NH Asp, ³J = 7.0 Hz); 8.18-7.85 (m, 10H, NH Gly (8.16), ω -NH₂ Leu (8.10), NH Ala² (8.09), NH Gln (7.98), NH Ala¹ (7.95), NH Ser (7.91), NH Ile, Leu, Val (7.87)); 7.33-7.24 (m, 2H, NH GalNHAc (7.31), NH_aH_b ϵ -Gln (7.26)); 6.78 (s_b, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln); 4.60 (d, 1H, H1, ³J_{1,2} = 3.1 Hz); 4.54 (dd, 1H, α -CH Asp, ³J _{α , β a} = 7.4 Hz, ³J _{α , β b} = 13.3 Hz); 4.44-3.40 (m, 19H, α -CH Ser (4.42), α -CH Ala³ (4.37), α -CH Ala¹ (4.34), α -CH Leu (4.29), α -CH Ala² (4.26), α -CH Ile (4.21), α -CH Gln (4.20), α -CH Val (4.10), H2 (4.05), α -CH_aH_b Gly (3.80), α -CH ω -Leu (3.76), H5 (3.70), β -CH_aH_b Ser (3.62), α -CH_aH_b Gly (3.60), H4 (3.57), H3 (3.57), β -CH_aH_b Ser (3.50), H6a (3.50), H6b (3.42)); 2.71 (m, 1H, β -CH_aH_b Asp); 2.52 (m, 1H, β -CH_aH_b Asp); 2.12-2.00 (m, 3H, γ -CH₂ Gln (2.10), β -CH Val (2.02)); 1.92-1.40 (m, 12H, β -CH_aH_b Gln (1.88), CH₃ NHAc (1.85), β -CH_aH_b Gln (1.76), β -CH Ile (1.71), γ -CH ω -Leu (1.62), γ -CH Leu (1.56), β -CH₂ ω -Leu (1.49), γ -CH_aH_b Ile (1.43) β -CH₂ Leu (1.42)); 1.23-1.13 (m, 9H,

β -CH₃³ Ala (1.21), β -CH₃² Ala (1.18), β -CH₃¹ Ala (1.15)); 1.04 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.90-0.77 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu, 2* γ -CH₃ Val (0.85), γ -CH₃ Ile (0.82), δ -CH₃ Ile (0.79)).

103.0 MHz-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 173.8 (CO Amid ω -Gln); 172.7 (COOH); 171.9 (β -COOH Asp); 171.3, 171.2, 171.1, 168.4, 168.1 (C=O); 97.6 (C1); 71.1 (C3); 70.9 (C5); 67.7 (C4); 66.4 (β -CH₂ Ser); 60.4 (C6); 56.9 (α -CH Val); 56.6 (α -CH Ile); 52.4 (α -CH Ser); 52.3 (α -CH Gln); 50.6 (2* α -CH Leu); 49.3 (α -CH Asp); 49.3 (C2); 47.9 (3* α -CH Ala); 41.7 (α -CH₂ Gly); 40.7 (β -CH₂ Leu); 40.2 (β -CH₂ ω -Leu); 36.5 (β -CH Ile); 35.7 (β -CH₂ Asp); 31.3 (γ -CH₂ Gln); 29.7 (β -CH Val); 27.7 (β -CH₂ Gln); 24.2 (γ -CH₂ Ile); 23.9 (γ -CH Leu); 23.4 (γ -CH ω -Leu); 23.1, 22.5, 21.7, 21.4 (4* δ -CH₃ Leu); 22.9 (CH₃ NHAc); 19.0, 17.9 (2* γ -CH₃ Val); 18.3, 18.1, 17.8 (3* β -CH₃ Ala); 15.2 (γ -CH₃ Ile); 11.0 (δ -CH₃ Ile).

MALDI-MS [m/z] = 1261.4 ([M+H]⁺, ber.: 1260.7); 1267.9 ([M+Li]⁺, ber.: 1266.6); 1283.6 ([M+Na]⁺, ber.: 1282.7); 1299.1 ([M+K]⁺, ber.: 1298.8); 1305.5 ([M+K+Li-H]⁺, ber.: 1304.7); 1321.5 ([M+K+Na-H]⁺, ber.: 1320.8).

C₅₄H₉₃N₁₃O₂₁ (1260.39) [1259.66]

5.4.6 Synthesen zum Kapitel 3.3.6

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-(2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-iso-leucyl-L-valin (90)

[H-LAALDS([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)QGAIV-OH]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 263.0 mg (0.05 mmol) Fmoc-Val-PHB-Tentagel-Harz beladen. Die Kupplung der ersten vier Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182). Für den Einbau des Saccharidbausteins wird die automatische Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt, und das Harz wird mit einer extern angesetzten Lösung versetzt, bestehend aus 94.4 mg (0.10 mmol) Fmoc-Ser([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)-OH **25**, 38.0 mg (0.10 mmol) HATU und 16.6 mg (0.10 mmol) HOAt in 2 mL NMP, aktiviert mit 0.50 mL einer Lösung aus 0.4 M DIPEA in NMP. Das Harz wird 4 h stark geschüttelt und mit NMP gewaschen. Die restlichen fünf Aminosäuren werden wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll gekuppelt,

beginnend mit einem Wasch-, dann erfolgt ein Cappingschritt. Die letzte *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten und das Harz wird mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen.

Man überführt es in einen Festphasenreaktor und quillt es mit etwas CH₂Cl₂. Zum Harz werden 1 mL Triisopropylsilan, 1 mL Wasser und 15 mL TFA gegeben und das Harz wird 2 h bei Raumtemp. geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und mit 5 mL TFA nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt und mit CH₂Cl₂ kodestilliert. Der Rückstand wird einmal mit 20 mL und einmal mit 10 mL kaltem Diethylether gewaschen (zur Trennung muß u.U. zentrifugiert werden). Das Glycopeptid wird i. Vak. getrocknet. Man erhält 80 mg eines farblosen amorphen Feststoffes, der durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient M) gereinigt wird.

Ausb.: 38.2 mg (0.023 mmol, 46%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -0.5$ (*c* = 2.10, DMSO/H₂O 7:3); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient F, *R*_t = 22.0 min.

400 MHz-¹H-NMR (CD₃OD), δ [ppm]: 5.46 (d, 1H, H1, ³*J*_{1,2} = 3.1 Hz); 5.35 (d, 1H, H1'', ³*J*_{1,2} = 3.5 Hz); 5.09 (dd, 1H, H3'', ³*J*_{3,4} = 3.5 Hz, ³*J*_{3,2} = 10.6 Hz); 5.02 (m, 1H, H2''); 4.86-4.81 (m, 2H, H1 (4.84), H1'' (4.83)); 4.71 (m, 1H, α -CH Asp); 4.56 (m, 1H, α -CH Ser); 4.49-4.43 (m, 3H, α -CH Ala^{1,2}, H2); 4.39-4.30 (m, 5H, α -CH Leu² (4.37), α -CH Ala³ (4.35), α -CH Ile (4.34), α -CH Val (4.34), α -CH Gln (4.32)); 4.22-4.06 (m, 6H, H5'' (4.20), H3 (4.17), H6/H6'' (4.13), H5 (4.08)); 3.97-3.90 (m, 4H, β -CH_aH_b Ser (3.95), α -CH₂ Gly (3.93), α -CH Leu¹ (3.92)); 3.73 (m, 1H, β -CH_aH_b Ser); 2.94 (m, 2H, β -CH₂ Asp); 2.40 (m, 2H, γ -CH₂ Gln); 2.19-2.01 (m, 24H, β -CH Val (2.17), β -CH_aH_b Gln (2.15), 6*CH₃ OAc (2.13-1.93), CH₃ NHAc (2.04), β -CH_aH_b Gln (2.03)); 1.85 (m, 1H, β -CH Ile); 1.74-1.57 (m, 8H, γ -CH Leu^{1,2} (1.72), β -CH₂ Leu¹ (1.71), β -CH₂ Leu² (1.61), γ -CH_aH_b Ile (1.59)); 1.39-1.35 (m, 9H, β -CH₃ Ala); 1.18 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 1.03-0.88 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu, 2* γ -CH₃ Val (0.97), γ -CH₃ Ile (0.95), δ -CH₃ Ile (0.90)).

103.0 MHz-NMR (CD₃OD), δ [ppm]: 102.3 (C1''); 99.2 (C1); 75.0 (C3); 72.0 (C3''); 71.2 (C5); 71.1 (C4); 69.0 (C2''); 68.6 (C5''); 68.2 (C4''); 67.5 (β -CH₂ Ser); 62.0 (C6/C6''); 58.7 (α -CH Ile, α -CH Val); 54.8 (α -CH Gln); 54.7 (α -CH Ser); 53.4 (α -CH Leu²); 52.5 (α -CH Leu¹); 51.1 (α -CH Asp); 50.3 (α -CH Ala³); 50.1 (α -CH Ala^{1,2}); 50.0 (C2); 43.2 (α -CH₂ Gly); 41.4 (β -CH₂ Leu^{1,2}); 37.6 (β -CH Ile); 36.0 (β -CH₂ Asp); 32.3 (γ -CH₂ Gln); 31.6 (β -CH Val); 28.1 (β -CH₂ Gln); 25.7 (γ -CH₂ Ile); 25.2 (γ -CH Leu^{1,2}); 23.1-21.7 (δ -CH₃ Leu); 23.0 (NHAc Gal); 20.7-20.3 (6*OAc); 19.3+17.9 (γ -CH₃ Val); 17.9 (β -CH₃ Ala^{1,2,3}); 15.2 (γ -CH₃ Ile); 11.0 (δ -CH₃ Ile). Daten ausschließlich aus HMQC.

MALDI-MS $[m/z] = 1654.6$ ($[M+Na+H-AcO]^+$, ber.: 1654.8); 1697.2 ($[M+Na]^+$, ber.: 1696.8); 1712.4 ($[M+K]^+$, ber.: 1712.9).

$C_{72}H_{115}N_{13}O_{32}$ (1674.75) [1673.78]

L-Glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (91)

[Ac-QGAIV-OH]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 263.0 mg (0.05 mmol) Fmoc-Val-PHB-Tentagel-Harz beladen. Die Kupplung der Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182). Die letzte *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten, *N*-acetyliert und das Harz wird mit NMP und CH_2Cl_2 gewaschen.

Man überführt es in einen Festphasenreaktor und quillt es mit etwas CH_2Cl_2 . Zum Harz werden 1 mL Triisopropylsilan, 1 mL Wasser und 15 mL TFA gegeben und das Harz wird 2.5 h bei Raumtemp. geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und mit 5 mL CH_3OH nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird mit 25 mL kaltem Diethylether gewaschen (zur Trennung muß u.U. zentrifugiert werden). Das schlecht lösliche Peptid wird i. Vak. getrocknet. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient M) gereinigt.

Ausb.: 14.3 mg (0.027 mmol, 54%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -9.1$ ($c = 1.43$, DMSO/ H_2O 7:3); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient F, $R_t = 14.0$ min.

400 MHz- 1H -NMR (DMSO- d_6 / D_2O 7:3), δ [ppm]: 4.20 (m, 1H, α -CH Ala); 4.11-4.04 (m, 3H, α -CH Ile (4.09), α -CH Gln (4.08), α -CH Val (4.06)); 3,70 (m, 2H, α - CH_2 Gly); 2.15 (t, 2H, γ - CH_2 Gln, $^3J = 7.44$ Hz); 1.98 (m, 1H, β -CH Val); 1.91-1.84 (m, 4H, β - CH_2H_b Gln (1.89), $NHAc$ (1.86)); 1.77-1.68 (m, 2H, β - CH_2H_b Gln (1.75), β -CH Ile (1.70)); 1.52+1.37 (m, 2H, γ - CH_2 Ile); 1.18 (m, 3H, β - CH_3 Ala); 0.83-0.74 (m, 12H, 2* γ - CH_3 Val (0.81), γ - CH_3 Ile (0.77), δ - CH_3 Ile (0.74)).

103.0 MHz-NMR (DMSO- d_6 / D_2O 7:3), δ [ppm]: 58.4 (α -CH Val); 58.3 (α -CH Ile); 53.8 (α -CH Gln); 50.3 (α -CH Ala³); 49.7 (α -CH Ala); 42.8 (α - CH_2 Gly); 37.1 (β -CH Ile); 32.0 (γ - CH_2 Gln); 30.6 (β -CH Val); 27.9 (β - CH_2 Gln); 25.1 (γ - CH_2 Ile); 23.0 (CH_3 NHAc); 19.7+18.6 (γ - CH_3 Val); 18.2 (β - CH_3 Ala); 16.0 (γ - CH_3 Ile); 11.5 (δ - CH_3 Ile).

Daten ausschließlich aus HMQC.

ESI-MS $[m/z] = 551.4$ ($[M+Na]^+$, ber.: 551.3); 567.4 ($[M+K]^+$, ber.: 567.4).

$C_{23}H_{40}N_6O_8$ (528.60) [528.29]

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-glutaminyglycyl-L-alanyl-L-iso-leucyl-L-valin (92)

[H-LAALDS([β -Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)QGAIV-OH]

Man löst 35.0 mg (0.021 mmol) H-LAALDS([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)QGAIV-OH (**90**) in 10 mL CH₃OH und stellt mit 1 %-iger CH₃ONa Lösung in CH₃OH auf pH 9.5 ein. Die Lösung wird ca. 4 h bei Raumtemp. gerührt. Mittels analyt. HPLC (Säule JUPITER, Gradient F) wird das Ende der Reaktion festgestellt. Die Lösung wird mit 6 Tropfen AcOH neutralisiert i. Vak. eingeengt. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient M) gereinigt.

Ausb.: 15.2 mg (0.011 mmol, 51%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = +8.1$ (c = 1.52, DMSO); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient F, R_t = 12.8 min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 8.66 (d, 1H, NH Ala³, ³J = 7.4 Hz); 8.30-8.22 (m, 2H, NH Asp (8.28), NH Gly (8.24)); 8.14 (d, 1H, NH Ala^{1/2}, ³J = 7.4 Hz); 8.09 (m, 1H, NH Leu¹); 8.01 (m, 2H, NH Ser, NH Gln); 7.95 (d, 1H, NH Ile, ³J = 7.4 Hz); 7.92-7.87 (m, 3H, NH Val (7.90), NH Leu² (7.89), NH Ala^{1/2}); 7.47 (d, 1H, NH GalNHAc, ³J = 8.61 Hz); 7.30 (s_b, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln); 6.82 (s_b, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln); 4.69 (d, 1H, H₁, ³J_{1,2} = 3.1 Hz); 4.57-4.20 (m, 10H, α -CH Asp (4.55), α -CH Ser (4.45), α -CH Ala^{1,3} (4.38), α -CH Ile (4.35), α -CH Leu² (4.33), α -CH Ala² (4.31), H₁' (4.30), H₂ (4.24), α -CH Gln (4.22)); 4.12 (dd, 1H, α -CH Val, ³J_a = 5.9 Hz, ³J_b = 8.2 Hz); 3.94 (m, 1H, H₄); 3.85-3.25 (m, 15H, α -CH_aH_b Gly (3.83), α -CH Leu¹ (3.78), H₃ (3.70), β -CH_aH_b Ser (3.69), H₅ (3.62), H₄' (3.62), α -CH_aH_b Gly (3.62), H₆'/H_{6a} (3.52), β -CH_aH_b Ser (3.51), H₆'/H_{6b} (3.44), H₅' (3.35), H₂' (3.34), H₃' (3.27)); 2.72 (dd, 1H, β -CH_aH_b Asp, ³J _{α,β} = 5.1 Hz, ³J_{a,b} = 17.2 Hz); 2.54 (m, 1H, β -CH_aH_b Asp); 2.14-2.02 (m, 3H, γ -CH₂ Gln (2.12), β -CH Val (2.04)); 1.92-1.41 (m, 13H, β -CH_aH_b Gln (1.90), NHAc (1.81), β -CH_aH_b Gln (1.77), β -CH Ile (1.72), γ -CH Leu¹ (1.64), γ -CH Leu² (1.59), β -CH₂ Leu¹ (1.52), γ -CH_aH_b Ile (1.45), β -CH₂ Leu² (1.43)); 1.24-1.15 (m, 9H, β -CH₃ Ala (3: 1.22, 2: 1.18, 1: 1.17)); 1.05 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.92-0.78 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu, 2* γ -CH₃ Val (0.87), γ -CH₃ Ile (0.83), δ -CH₃ Ile (0.80)).

103.0 MHz-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 104.2 (C₁''); 97.8 (C₁); 76.8 (C₃); 75.0 (C₅''); 72.9 (C₃''); 70.9 (C₅); 70.6 (C₂''); 67.9 (C₄''); 67.2 (C₄); 66.7 (β -CH₂ Ser); 60.2 (C₆/C₆''); 56.9 (α -CH Val); 56.9 (α -CH Ser); 56.5 (α -CH Ile); 52.3 (α -CH Gln); 50.5 (α -CH Leu¹); 50.4 (α -CH Leu²); 49.3 (α -CH Asp); 47.9 (C₂); 47.7 (α -CH Ala^{1,2,3}); 41.5 (α -CH₂ Gly); 40.9

(β -CH₂ Leu²); 40.0 (β -CH₂ Leu¹); 36.4 (β -CH Ile); 35.6 (β -CH₂ Asp); 31.2 (γ -CH₂ Gln); 29.6 (β -CH Val); 27.6 (β -CH₂ Gln); 24.0 (γ -CH₂ Ile); 23.7 (γ -CH Leu²); 23.3 (γ -CH Leu¹); 22.9-21.3 (δ -CH₃ Leu); 22.7 (NHAc Gal); 18.7+17.6 (γ -CH₃ Val); 18.0+17.8 (β -CH₃ Ala^{1,2,3}); 15.0 (γ -CH₃ Ile); 10.9 (δ -CH₃ Ile). Daten ausschließlich aus HMQC.

MALDI-MS [m/z] = 1444.7 ([M+Na]⁺, ber.: 1444.7); 1481.8 ([M+Na+K-H]⁺, ber.: 1482.8); 1489.5 ([M+3Na-2H]⁺, ber.: 1488.7).

ESI-MS, Hochauflösend [m/z] = 1422.7166 ([M+H]⁺, ber.: 1422.7210, Δ = 3.09 ppm).

HPLC-Reinheit: 99% (214 nm)

C₆₀H₁₀₃N₁₃O₂₆ (1422.53) [1421.71]

5.4.7 Synthesen zum Kapitel 3.3.7

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-{2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-deoxy-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-glutaminyglycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (93)

[H-LAALDS(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α -Ac₂GalNAc)QGAIV-OH]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 526.3 mg (0.10 mmol) Fmoc-Val-PHB-Tentagel-Harz beladen. Die Kupplung der ersten vier Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182). Für den Einbau des Saccharidbausteins wird die automatische Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt, und das Harz wird mit einer extern angesetzten Lösung versetzt, bestehend aus 291.0 mg (0.25 mmol) Fmoc-Ser([α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -GalAc₂NAc)-OH **32**, 95.1 mg (0.25 mmol) HATU und 34.0 mg (0.25 mmol) HOAt in 2 mL NMP, aktiviert mit 0.25 mL einer Lösung aus 2 M DIPEA in NMP. Das Harz wird 3 h stark geschüttelt und mit NMP gewaschen. Die restlichen fünf Aminosäuren werden wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll gekuppelt, beginnend mit einem Wasch-, danach folgt ein Cappingschritt. Die letzte N-terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten und das Harz wird mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen.

Man überführt es in einen Festphasenreaktor und quillt es mit etwas CH₂Cl₂. Zum Harz werden 1 mL Triisopropylsilan, 1 mL Wasser und 20 mL TFA gegeben und das Harz wird

2.5 h bei Raumtemp. geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und mit 10 mL TFA nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. eingeengt und mit CH₂Cl₂ kodestilliert. Der Rückstand wird einmal mit 40 mL und einmal mit 10 mL kaltem Diethylether gewaschen (zur Trennung muß u.U. zentrifugiert werden). Das Glycopeptid wird in Wasser gelöst und lyophilisiert. Man erhält 142.8 mg eines gelben amorphen Feststoffes, der durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient N) gereinigt wird.

Ausb.: 116.0 mg (0.061 mmol, 61%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -7.4$ (c = 1.41, DMSO/H₂O 7:3); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient H, R_t = 37.4 min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆/D₂O 7:3), δ [ppm]: 7.30 (sb, 5H, H_{Ar} Bn); 7.02 (d, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln, ³J = 8.6 Hz); 6.75 (d, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln, ³J = 8.6 Hz); 5.16-5.04 (m, 5H, CH₂-Bn (5.14), H7'', H8'' (5.12), H4 (5.06)); 4.91 (q, 1H, H3, ³J_{3,4} = 2.6 Hz, ³J_{3,2} = 11.5 Hz); 4.77 (d, 1H, H1, ³J_{1,2} = 2.7 Hz); 4.65 (m, 1H, H4''); 4.51 (m, 1H, α -CH Asp); 4.39 (m, 1H, α -CH Ser); 4.25-4.03 (m, 9H, 2* α -CH Ala^{1,2} (4.23), α -CH Leu² (4.16), H2 (4.15), α -CH Ala³ (4.12), H9a'' (4.12), α -CH Ile (4.11), α -CH Gln (4.07), α -CH Val (4.05)); 3.98-3.87 (m, 3H, H6'' (3.96), H9b'' (3.92), H5 (3.89)); 3.82-3.58 (m, 8H, H5'' (3.80), β -CH_aH_b Ser (3.74), α -CH ω -Leu (3.71), β -CH_aH_b Ser (3.67), α -CH₂ Gly (3.67), H6a (3.64), H6b (3.60)); 2.76 (m, 1H, β -CH_aH_b Asp); 2.61 (m, 1H, β -CH_aH_b Asp); 2.49 (m, 1H, H3_{eq}''); 2.13 (m, 2H, γ -CH₂ Gln); 2.01-1.77 (m, 24H, 6*CH₃ OAc, β -CH Val (1.98), β -CH_aH_b Gln (1.89), β -CH_aH_b Gln (1.80), CH₃ NHAc (1.79)); 1.70-1.60 (m, 5H, β -CH Ile (1.68), CH₃ NHAc'' (1.66), H3_{ax}'') (1.62)); 1.57-1.34 (m, 7H, γ -CH ω -Leu (1.55), β -CH_aH_b ω -Leu (1.53), γ -CH Leu (1.50), β -CH_aH_b ω -Leu (1.47), β -CH₂ Leu (1.40), γ -CH_aH_b Ile (1.36)); 1.21-1.13 (m, 9H, β -CH₃ Ala¹ (1.19), 2* β -CH₃ Ala^{2,3} (1.15)); 1.00 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.84-0.70 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu, 2* γ -CH₃ Val (0.79), γ -CH₃ Ile (0.76), δ -CH₃ Ile (0.72)).

103.0 MHz-NMR (DMSO-d₆/D₂O 7:3), δ [ppm]: 129.7 (Ar-Bn); 98.7 (C1); 72.8 (C6''); 70.2 (C4''); 69.2 (C3); 68.8 (CH₂Ph); 68.2 (C5); 68.1 (C4, C7'', C8''); 67.6 (β -CH₂ Ser); 63.0 (C6, C9''); 58.5 (α -CH Val); 58.3 (α -CH Ile); 54.3 (α -CH Ser); 54.1 (α -CH Gln); 52.5 (α -CH Leu²); 52.0 (α -CH ω -Leu); 50.8 (α -CH Asp); 50.0, 49.9 (3* α -CH Ala); 49.0 (C5''); 48.1 (C2); 43.1 (α -CH₂ Gly); 41.1 (β -CH₂ Leu); 41.0 (β -CH₂ ω -Leu); 38.5 (C3''); 37.3 (β -CH Ile); 36.3 (β -CH₂ Asp); 32.2 (γ -CH₂ Gln); 30.9 (β -CH Val); 28.1 (β -CH₂ Gln); 25.3 (γ -CH₂ Ile); 25.2 (γ -CH Leu²); 24.8 (γ -CH ω -Leu); 23.9, 23.5, 22.8, 22.5 (δ -CH₃ Leu); 23.5 (CH₃ NHAc); 23.4 (CH₃ NHAc''); 21.6 (6*CH₃ OAc); 20.0, 18.9 (2* γ -CH₃ Val); 18.4 (3* β -CH₃ Ala); 16.2 (γ -CH₃ Ile); 11.8 (δ -CH₃ Ile). Daten ausschließlich aus HMQC.

MALDI-MS $[m/z] = 1893.7$ ($[M+H]^+$, ber.: 1893.9); 1899.7 ($[M+Li]^+$, ber.: 1899.8); 1916.6 ($[M+Na]^+$, ber.: 1915.9); 1932.8 ($[M+K]^+$, ber.: 1932.0); 1955.5 ($[M+K+Na-H]^+$, ber.: 1954.0).

$C_{84}H_{128}N_{14}O_{35}$ (1893.99) [1892.87]

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-{2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-deoxy-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-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (94)

[H-LAALDS(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α -Ac₂GalNAc)QGAIV-OH]

Man löst 95.0 mg (0.050 mmol) H-LAALDS(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α -Ac₂GalNAc)-QGAIV-OH (**93**) in 15 mL entgastem CH₃OH und versetzt die Lösung unter Argon mit 15 mg Palladium auf Kohle. Das Argon-Schutzgas wird dreimal gegen Wasserstoff ausgetauscht. Die Suspension wird unter Wasserstoff Atm. 14 h bei Raumtemp. gerührt, und dann durch einen Membranfilter filtriert. Die Lösung wird mit 15 mL CH₃OH verdünnt und mit 1 %-iger CH₃ONa Lösung in CH₃OH (~20 Tropfen) auf pH 9.5 eingestellt. Die Lösung wird ca. 4 h bei Raumtemp. gerührt. Mittels analyt. HPLC (Säule JUPITER, Gradient H) wird das Ende der Reaktion festgestellt. Die Lösung wird mit saurem Ionenaustauscher Dowex 50Wx8 neutralisiert und filtriert. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt und der Rückstand durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient N) gereinigt.

Ausb.: 31.1 mg (0.020 mmol, 40%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -0.5$ (c = 1.20, DMSO/H₂O 7:3); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient H, $R_t = 17.3$ min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 8.64 (d, 1H, NH Ala¹, ³J = 7.4 Hz); 8.23 (d, 1H, NH Asp, ³J = 7.1 Hz); 8.16 (m, 1H, NH Gly); 8.11-8.06 (m, 3H, NH Ala³ (8.09), NH Leu ^{ω} (8.08)); 7.99-7.85 (m, 7H, NH Gln (7.97), NH Ser (7.96), NH Ala² (7.95), NHAc Neu (7.94), NH Ile (7.89), NH Leu² (7.87), NH Val (7.87)); 7.28-7.24 (m, 2H, NH_aH_b ϵ -Gln, NHAc Gal); 6.78 (sb, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln); 4.61 (d, 1H, H1, ³J_{1,2} = 3.1 Hz); 4.56 (dd, 1H, α -CH Asp, ³J_a = 7.4 Hz, ³J_b = 13.3 Hz); 4.45-4.21 (m, 7H, α -CH Ser (4.43), α -CH Ala¹ (4.38), α -CH Ala² (4.34), α -CH Leu² (4.31), α -CH Ala³ (4.28), α -CH Gln (4.24), α -CH Ile (4.23)); 4.13-4.04 (m, 2H, α -CH Val (4.11), H2 (4.06)); 3.84 (d, 1H, α -CH_aH_b Gly, ³J_{a,b} = 6.3 Hz); 3.80-3.49 (m, 12H, α -CH ω -Leu (3.78), β -CH_aH_b Ser (3.65), H5 (3.64), H4 (3.63), H6a (3.61), H9a'' (3.61), H8'' (3.61), α -CH_aH_b Gly (3.58), H3 (3.56), H5'' (3.55), H4'' (3.52),

β -CH_aH_b Ser (3.51)); 3.40-3.36 (m, 3H, H6b, H9b'', H7''); 3.27 (m, 1H, H6''); 2.72 (dd, 1H, β -CH_aH_b Asp, $^3J_{a,b} = 4.9$ Hz, $^3J_{a,\alpha} = 16.6$ Hz); 2.57-2.47 (m, 2H, β -CH_aH_b Asp (2.55), H3_{eq}''); (2.49)); 2.13-2.00 (m, 3H, γ -CH₂ Gln (2.11), β -CH Val (2.02)); 1.90-1.84 (m, 4H, β -CH_aH_b Gln (1.88), NHAc Neu (1.86)); 1.77-1.41 (m, 13H, β -CH_aH_b Gln (1.75), NHAc Gal (1.74), β -CH Ile (1.71), γ -CH ω -Leu (1.64), γ -CH Leu² (1.57), H3_{ax}'') (1.55), β -CH₂ ω -Leu (1.52), β -CH₂ Leu² (1.43), γ -CH_aH_b Ile (1.43)); 1.24-1.15 (m, 9H, β -CH₃ Ala¹ (1.22), β -CH₃ Ala³ (1.18), β -CH₃ Ala² (1.16)); 1.05 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.92-0.77 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu, 2* γ -CH₃ Val (0.86, 0.85), γ -CH₃ Ile (0.82), δ -CH₃ Ile (0.79)).

103.0 MHz-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 97.5 (C1); 73.2 (C7''); 70.6 (C8''); 69.1 (C5); 68.5 (C6''); 67.7 (C4); 67.4 (C3); 66 (C4''); 63.1 (C6, C9''); 62.6 (β -CH₂ Ser); 56.8 (α -CH Val); 56.4 (α -CH Ile); 52.2 (α -CH Ser); 52.1 (α -CH Gln); 51.6 (C5''); 50.5 (α -CH ω -Leu); 50.4 (α -CH Leu²); 49.3 (α -CH Asp); 48.9 (C2); 47.7 (3* α -CH Ala); 41.6 (α -CH₂ Gly); 40.6 (β -CH₂ Leu²); 40.1 (β -CH₂ ω -Leu, C3''); 36.3 (β -CH Ile); 35.6 (β -CH₂ Asp); 31.1 (γ -CH₂ Gln); 29.5 (β -CH Val); 27.7 (β -CH₂ Gln); 24.0 (γ -CH₂ Ile); 23.8 (γ -CH Leu²); 23.2 (γ -CH ω -Leu); 22.7, 22.4, 21.6, 21.3 (δ -CH₃ Leu); 22.6 (NHAc Neu); 22.4 (NHAc Gal); 19.7 (β -CH₃ Ala²); 18.0 (β -CH₃ Ala¹); 17.9 (β -CH₃ Ala³); 18.7, 17.8 (2* γ -CH₃ Val); 15.0 (γ -CH₃ Ile); 10.8 (δ -CH₃ Ile). Daten ausschließlich aus HMQC.

MALDI-MS [m/z] = 1058.2 ([M-(α -Neu-4-NAc-(2 \rightarrow 6)- α -GalNAc)+2H]⁺, ber.: 1057.6); 1581.1 ([M+Na+Li-H]⁺, ber.: 1579.8 (100.0%), 1580.8 (72.8%)); 1588.8 ([M+K]⁺, ber.: 1589.7); 1610.9 ([M+K+Na-H]⁺, ber.: 1611.7); 1619.0 ([M+3Na-2H]⁺, ber.: 1617.7 (100.0%), 1618.7 (72.3%)), 1626.8 ([M+2K-H]⁺, ber.: 1627.7).

C₆₅H₁₁₀N₁₄O₂₉ (1551.65) [1550.76]

5.4.8 Synthesen zum Kapitel 3.3.8

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-(2-acetamido-4-O-acetyl-2-deoxy-3-O-[2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-glutaminyglycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (95)

[H-LAALDS([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)] [α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -AcGalNAc)QGAIV-OH]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 263.0 mg (0.05 mmol) Fmoc-Val-PHB-Tentagel-Harz beladen. Die Kupplung der ersten vier Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182). Für den Einbau des Saccharidbausteins wird die automatische Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt, und das Harz wird mit einer extern angesetzten Lösung versetzt, bestehend aus 120.0 mg (0.08 mmol) Fmoc-Ser([β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)] [α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)]- α -AcGalNAc)-OH (53), 30.4 mg (0.10 mmol) HATU und 10.4 mg (0.10 mmol) HOAt in 2 mL NMP, aktiviert mit 0.40 mL einer Lösung aus 0.4 M DIPEA in NMP. Das Harz wird 4 h stark geschüttelt und mit NMP gewaschen. Die restlichen fünf Aminosäuren werden wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll gekuppelt, beginnend mit einem Wasch-, danach folgt ein Cappingschritt. Die letzte N-terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten und das Harz wird mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen.

Das Harz wird in einen Festphasenreaktor überführt und mit etwas CH₂Cl₂ gequollen. Zum Harz werden 1 mL Triisopropylsilan, 1 mL Wasser und 15 mL TFA gegeben und das Harz wird 2 h bei Raumtemp. geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und mit 5 mL TFA nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. eingeeengt und mit Toluol und CH₂Cl₂ kodestilliert. Der Rückstand wird zweimal mit 4 mL kaltem Diethylether gewaschen (zur Trennung muß u.U. zentrifugiert werden). Das Glycopeptid wird i. Vak. getrocknet.

Ausb.: 91.3 mg (0.042mmol, 84%); farbloser amorpher Feststoff; [α]_D²² = -12.6 (c = 1.10, CH₃OH); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient F, R_t = 20.7 min.

400 MHz-¹H-NMR (CD₃OD), δ [ppm]: 7.46-7.36 (m, 5H, Bn); 5.36-5.24 (m, 6H, H4''(5.34), H7'-H8' (5.34), H4 (5.32), CH₂Ph (5.26)); 5.09-4.78 (m, 5H, H3''(5.07), H2''(5.00), H1 (4.85), H1'' (4.80), H4'(4.80)); 4.71 (m, 1H, α -CH Asp); 4.54-4.26 (m, 10H, α -CH Ser (4.52), α -CH Ala^{1,2,3} (4.46-4.36), α -CH Leu² (4.41), H2 (4.41), α -CH Ile (4.32), α -CH Val (4.32), α -CH Gln (4.30), H9a'(4.28)); 4.18-3.73 (m, 14H, H6/H6'' (4.16), H6' (4.12), H5

(4.08), H₃ (4.08), H_{9b'} (4.07), β-CH_aH_b Ser (4.01), H_{5''}(4.00), H_{5'} (3.99), α-CH Leu¹ (3.91), α-CH₂ Gly (3.88), β-CH_aH_b Ser (3.75)); 2.96 (m, 2H, β-CH₂ Asp); 2.69 (dd, 1H, H_{3_{eq}'}, ³J_{3e,4} = 4.7 Hz, ²J_{e,a} = 12.9 Hz); 2.35 (m, 2H, γ-CH₂ Gln); 2.19-1.57 (m, 43H, β-CH Val (2.17), β-CH_aH_b Gln (2.15), 9*OAc's (2.15-1.93), β-CH_aH_b Gln (2.07), NHAc Gal (2.05), β-CH Ile (1.86), NHAc Neu (1.82), H_{3_{ax}'} (1.81), β-CH₂ Leu¹ (1.75+1.68), γ-CH Leu^{1,2} (1.72), β-CH₂ Leu² (1.62), γ-CH_aH_b Ile (1.59)); 1.36 (m, 9H, β-CH₃ Ala); 1.17 (m, 1H, γ-CH_aH_b Ile); 1.03-0.88 (m, 24H, 4*δ-CH₃ Leu, 2*γ-CH₃ Val (0.96), γ-CH₃ Ile (0.94), δ-CH₃ Ile (0.90)). 103.0 MHz-NMR (CD₃OD), δ[ppm]: 129.4-129.2 (C_{Aryl}); 102.1 (C1''); 99.0 (C1); 74.6 (C3); 73.0 (C6'); 71.9 (C3''); 71.3 (C5); 71.0 (C4); 70.5 (C4'); 69.9 (C2''); 69.7 (C5''); 69.2 (C8'); 68.6 (CH₂Ph); 68.2 (C7', C4''); 67.1 (β-CH₂ Ser); 63.1 (C9'); 61.8 (C6/C6''); 58.8 (α-CH Ile, α-CH Val); 55.1 (α-CH Ser); 54.7 (α-CH Gln); 53.4 (α-CH Leu²); 52.6 (α-CH Leu¹); 51.1 (α-CH Asp); 50.0 (C2, α-CH Ala^{1,2,3}); 49.7 (C5'); 43.3 (α-CH₂ Gly); 41.4 (β-CH₂ Leu^{1,2}); 38.7 (C3'); 37.7 (β-CH Ile); 36.2 (β-CH₂ Asp); 32.3 (γ-CH₂ Gln); 31.5 (β-CH Val); 27.9 (β-CH₂ Gln); 25.6 (γ-CH₂ Ile); 25.4 (γ-CH Leu^{1,2}); 23.2-21.7 (δ-CH₃ Leu); 23.1 (NHAc Gal); 22.4 (NHAc Neu); 21.0-20.2 (9*OAc); 19.4+17.9 (γ-CH₃ Val); 17.9 (β-CH₃ Ala^{1,2,3}); 15.6 (γ-CH₃ Ile); 11.1 (δ-CH₃ Ile). Daten ausschließlich aus HMQC.

MALDI-MS [m/z] = 2204.9 ([M+Na]⁺, ber.: 2204.0).

C₉₆H₁₄₄N₁₄O₄₃ (2182.24) [2180.95]

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-(2-acetamido-4-O-acetyl-2-deoxy-3-O-β-D-galactopyranosyl-6-O-[benzyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (96)

[H-LAALDS([β-Gal-(1→3)][α-Neu5NAcCOOBn-(2→6)]-α-AcGalNAc)QGAIV-OH]

Man löst 75.0 mg (34 μmol) H-LAALDS([β-Ac₄Gal-(1→3)][α-NeuAc₄5NAcCOOBn-(2→6)]-α-AcGalNAc)QGAIV-OH (**95**) in 15 mL entgastem CH₃OH und versetzt die Lösung unter Argon mit 15 mg Palladium auf Kohle. Das Argon-Schutzgas wird dreimal gegen Wasserstoff ausgetauscht. Die Suspension wird unter Wasserstoff Atm. 14 h bei Raumtemp. gerührt, und dann durch einen Membranfilter filtriert. Mittels analyt. HPLC (Säule JUPITER, Gradient F) wird das Ende der Reaktion festgestellt. Die Lösung wird mit 15 mL CH₃OH verdünnt und mit 1 %-iger CH₃ONa Lösung in CH₃OH (~20 Tropfen) auf pH 10.5 eingestellt. Die Lösung wird 10 h bei Raumtemp. gerührt und der Reaktionsverlauf mittels analyt. HPLC (Säule

JUPITER, Gradient F) überwacht. Die Lösung wird mit saurem Ionenaustauscher Dowex 50Wx8 neutralisiert und filtriert. Das Filtrat wird i. Vak. eingengt und der Rückstand durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient M) gereinigt.

Ausb.: 40.2 mg (24 μmol , 68%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +6.3$ ($c = 3.60$, DMSO); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient F, $R_t = 11.4$ min.

400 MHz- $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), δ [ppm]: 8.66 (d, 1H, NH Ala^I, $^3J = 7.4$ Hz); 8.30-8.23 (m, 2H, NH Asp (8.28), NH Gly (8.25)); 8.19-8.02 (m, 4H, NH Ser (8.17), NH Ala^{III} (8.14), NH Leu^I (8.10), NeuNHAc (8.04)); 7.96-7.87 (m, 5H, Ala^{II} (7.94), NH Leu⁴ (7.88), NH Ile, Gln (7.91), NH Val (7.89)); 7.57 (d, 1H, GalNHAc, $^3J = 8.2$ Hz); 7.28 (sb, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln); 6.81 (sb, 1H, NH_aH_b ϵ -Gln); 5.30 (sb, 1H, H4); 4.79 (d, 1H, H1, $^3J_{1,2} = 2.7$ Hz); 4.56-4.17 (m, 10H, α -CH Asp (4.54), α -CH Ser (4.46), α -CH Ala^I (4.39), α -CH Ala^{II} (4.37), α -CH Leu⁴ (4.36), α -CH Ala^{III} (4.32), H1'' (4.29), α -CH Ile (4.24), α -CH Gln (4.23), H2 (4.19)); 4.12 (dd, 1H, α -CH Val, $^3J_{\alpha,\beta} = 5.9$ Hz, $^3J_{\alpha\text{NH}_i} = 8.2$ Hz); 3.99-3.75 (m, 5H, H3'' (3.97), H3 (3.95), α -CH_aH_b Gly (3.85), α -CH Leu^I (3.78), β -CH_aH_b Ser (3.77)); 3.65-3.43 (m, 11H, H9a' (3.63), α -CH_aH_b Gly (3.61), H4'' (3.61), H5 (3.60), H6a'/H6a''/H4' (3.55), H5' (3.50), β -CH_aH_b Ser (3.49), H6b/H6b'' (3.45)); 3.41-3.22 (m, 6H, H9b' (3.39), H5''/H7' (3.32), H6' (3.30), H8' (3.25), H2'' (3.24)); 2.70 (m, 1H, β -CH_aH_b Asp); 2.56-2.47 (m, 2H, β -CH_aH_b Asp (2.54), H3_{eq}' (2.49)); 2.13-1.68 (m, 15H, γ -CH₂ Gln (2.11), β -CH Val (2.03), H4:OAc (2.01), β -CH_aH_b Gln (1.90), NHAc Neu (1.87), NHAc Gal (1.83), β -CH_aH_b Gln (1.77), β -CH Ile (1.70)); 1.66-1.42 (m, 8H, γ -CH Leu^I (1.64), γ -CH Leu⁴ (1.59), β -CH₂ Leu^I (1.51), H3_{ax}' (1.48), γ -CH_aH_b Ile (1.46), β -CH₂ Leu⁴ (1.44)); 1.24-1.15 (m, 9H, β -CH₃ Ala^I (1.22), β -CH₃ Ala^{III} (1.18), β -CH₃ Ala^{II} (1.17)); 1.07 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.94-0.78 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu (0.90-0.86, 0.82), 2* γ -CH₃ Val (0.87-0.86), γ -CH₃ Ile (0.84), δ -CH₃ Ile (0.80)).

103.0 MHz-NMR (DMSO- d_6), δ [ppm]: 103.7 (C1''); 97.5 (C1); 75.1 (C5''); 73.4 (C3''); 73.2 (C7'); 73.0 (C8'); 71.2 (C5); 70.6 (C2''); 69.5 (C4); 68.3 (C6'); 67.7 (C4''); 67.6 (C3); 66.2 (β -CH₂ Ser); 66.1 (C4'); 62.7 (C9'); 60.0 (C6/C6''); 56.8 (α -CH Val); 56.5 (α -CH Ile); 52.4 (α -CH Ser); 52.1 (α -CH Gln); 51.9 (C5'); 50.4 (α -CH Leu); 49.4 (α -CH Asp); 48.4 (C2); 47.7 (α -CH Ala^{1,2,3}); 41.5 (α -CH₂ Gly); 40.9 (β -CH₂ Leu⁴); 40.1 (β -CH₂ Leu^I); 39.8 (C3'); 36.3 (β -CH Ile); 35.7 (β -CH₂ Asp); 31.1 (γ -CH₂ Gln); 29.5 (β -CH Val); 27.6 (β -CH₂ Gln); 24.0 (γ -CH₂ Ile); 23.7 (γ -CH Leu⁴); 23.2 (γ -CH Leu^I); 22.9-21.3 (δ -CH₃ Leu); 22.6 (NHAc Gal); 22.3 (NHAc Neu); 20.4 (OAc); 18.7+17.6 (γ -CH₃ Val); 18.0 (β -CH₃ Ala^{I,III}); 17.8 (β -CH₃ Ala^{II}); 15.0 (γ -CH₃ Ile); 10.8 (δ -CH₃ Ile).

MALDI-MS $[m/z] = 1778.2$ ($[M+Na]^+$, ber.: 1777.8).

$C_{73}H_{122}N_{14}O_{35}$ (1755.82) [1754.82]

5.4.9 Synthesen zum Kapitel 3.3.9

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-{2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[2,4-di-O-acetyl-3-O-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)-6-O-benzyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl}-L-glutaminyglycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (97)

[H-LAALDS([$\{\alpha$ -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)} $\}$)- β -Ac₃Gal-6-O-Bn-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)QGAIV-OH]

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wird mit 263.0 mg (0.05 mmol) Fmoc-Val-PHB-Tentagel-Harz beladen. Die Kupplung der ersten vier Aminosäuren erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.4.1, S. 182). Für den Einbau des Saccharidbausteins wird die automatische Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt, und das Harz wird mit einer extern angesetzten Lösung versetzt, bestehend aus 120.0 mg (0.08 mmol) Fmoc-Ser([$\{\alpha$ -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)) $\}$)- β -Ac₂Gal-6-OBn-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)-OH (47), 30.4 mg (0.10 mmol) HATU und 10.4 mg (0.10 mmol) HOAt in 2 mL NMP, aktiviert mit 0.40 mL einer Lösung aus 0.4 M DIPEA in NMP. Das Harz wird 4 h stark geschüttelt und mit NMP gewaschen. Die restlichen fünf Aminosäuren werden wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll gekuppelt, beginnend mit einem Wasch-, danach folgt ein Cappingschritt. Die letzte N-terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten und das Harz wird mit NMP und CH₂Cl₂ gewaschen.

Das Harz wird in einen Festphasenreaktor überführt und mit etwas CH₂Cl₂ gequollen. Zum Harz werden 1 mL Triisopropylsilan, 1 mL Wasser und 15 mL TFA gegeben und das Harz wird 2 h bei Raumtemp. geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und mit 5 mL TFA nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. eingeeengt und mit Toluol und CH₂Cl₂ kodestilliert. Der Rückstand wird zweimal mit 4 mL kaltem Diethylether gewaschen (zur Trennung muß u.U. zentrifugiert werden). Das Glycopeptid wird i. Vak. getrocknet und durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient M) gereinigt.

Ausb.: 14.0 mg (0.0065 mmol, 13%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -2.6$ ($c = 1.00$, CH₃OH); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient F, $R_t = 25.7$ min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 8.65 (d, 1H, NH Ala², ³ $J = 7.8$ Hz); 8.18-7.87 (m, 11H, NH: Gly (8.16), Asp/Ser (8.15), Ala¹/Leu² (8.10/7.90), Leu¹ (8.09), Ala³ (8.00), GalNHAc (7.92), Ile (7.90), Val (7.90), Gln (7.89)); 7.70 (m, 1H, NH NeuNHAc); 7.46-7.36 (m, 10H, Bn); 5.42-5.06 (m, 6H, H8' (5.36), CH₂Ph Neu (5.25), H7' (5.23), H4'', H4); 4.96-4.17 (m, 17H, H2'' (4.9), H4' (4.81), H1'', H1, H3'', α -CH Asp (4.56), α -CH Ser (4.52), CH₂Ph Gal (4.44), α -CH Ala³ (4.41), α -CH Ala² (4.38), H2 (4.3), α -CH Leu² (4.281), α -CH Ala¹ (4.27), α -CH Ile (4.23), α -CH Gln (4.19), H9a'(4.19)); 4.14-4.08 (m, 2H, α -CH Val (4.12), H6a); 4.08-3.99 (m, 2H, H6' (4.05), β -CH_aH_b Ser (4.01)); 3.99-3.38 (m, 12H, H5, H9b' (3.93), H3, H6b, H6'', H5' (3.83), H5''(3.8), α -CH₂ Gly (3.79), α -CH Leu¹ (3.78), β -CH_aH_b Ser (3.75)); 2.71 (m, 1H, β -CH_aH_b Asp); 2.55-2.49 (m, 2H, β -CH_aH_b Asp (2.53), H3_{eq}' (2.51)); 2.19-1.83 (m, 32H, γ -CH₂ Gln (2.15), 8*CH₃ OAc (2.10-1.85), NHAc Gal (2.1), β -CH Val (2.03), β -CH_aH_b Gln (1.95), β -CH_aH_b Gln (1.85)); 1.74-1.33 (m, 12H, β -CH Ile (1.72), γ -CH Leu^{1,2} (1.72), NHAc Neu (1.7), β -CH₂ Leu¹ (1.53+1.49), γ -CH_aH_b Ile (1.42), β -CH₂ Leu² (1.42), H3_{ax}' (1.35)); 1.25-1.14 (m, 9H, β -CH₃ Ala³ (1.23), β -CH₃ Ala¹ (1.18), β -CH₃ Ala² (1.16)); 1.07 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.98-0.82 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu, γ -CH₃ Ile (0.94), 2* γ -CH₃ Val (0.89), δ -CH₃ Ile (0.85)).

103.0 MHz-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 129.4-129.2 (C_{Aryl}); 104.4 (C1''); 97.7 (C1); 77.1 (C3); 72.2 (C6', CH₂ Gal); 69.8-67.6 (C3'', C5, C4, C4', C2'', C5'', C8', CH₂Ph, C7', C4'', C6''); 67.5 (β -CH₂ Ser); 61.5-60.5 (C9', C6); 57.1 (α -CH Ile, α -CH Val); 56.7 (α -CH Ser); 52.6-50.7 (α -CH Gln, α -CH Leu^{1,2}, α -CH Asp); 49.4-48.0 (C2, α -CH Ala^{1,2,3}, C5'); 43.5 (α -CH₂ Gly); 41.8 (β -CH₂ Leu^{1,2}); 38.9 (β -CH Ile); 38.7 (C3'); 36.6 (β -CH₂ Asp); 31.4 (γ -CH₂ Gln); 30.8 (β -CH Val); 28.0 (β -CH₂ Gln); 24.2 (γ -CH₂ Ile); 24.1 (γ -CH Leu^{1,2}); 23.2-20.7 (δ -CH₃ Leu, NHAc Gal, NHAc Neu, 8*OAc); 18.4-17.9 (γ -CH₃ Val, β -CH₃ Ala^{1,2,3}); 15.3 (γ -CH₃ Ile); 11.1 (δ -CH₃ Ile).

MALDI-MS $[m/z] = 2169.9$ ($[M+Na-2AcOH]^+$, ber.: 2169.0); 2211.8 ($[M+Na-AcOH]^+$, ber.: 2211.0); 2228.5 ($[M]^+$, ber.: 2229.0); 2254.4 ($[M+Na]^+$, ber.: 2253.0 (100.0%), 2254.0 (55.6%)).

C₁₀₁H₁₄₈N₁₄O₄₂ (2230.32) [2228.99]

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-{2-acetamido-2-desoxy-3-O-[4-O-acetyl-3-O-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl}-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (100)

[H-LAALDS([α -Neu5NAcCOOH-(2 \rightarrow 3)]- β -4-O-AcGal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)QGAIV-OH]

Man löst 22.0 mg (0.0090 mmol) Fmoc-LAALDS([α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)]- β -Ac₃Gal-6-O-Bn-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)QGAIV-OH (**99**) in 10 mL entgastem CH₃OH, versetzt mit 0.5 mL AcOH. Zur Lösung werden unter Argon 10 mg Palladium auf Kohle gegeben. Das Argon-Schutzgas wird gegen eine Wasserstoff Atmosphäre ausgetauscht. Die Suspension wird unter Wasserstoff Atm. 14 h bei Raumtemp. gerührt, und dann durch einen Membranfilter filtriert. Mittels analyt. HPLC (Säule JUPITER, Gradient F) wird das Ende der Reaktion festgestellt. Die Lösung wird vollständig i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird wieder in 10 mL CH₃OH gelöst und mit 1 %-iger CH₃ONa Lösung in CH₃OH auf pH 11 eingestellt. Die Lösung wird 24 h bei Raumtemp. gerührt und der Reaktionsverlauf mittels analyt. HPLC (Säule JUPITER, Gradient F) überwacht. Die Lösung wird mit drei Tropfen AcOH neutralisiert und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient M) gereinigt.

Ausb.: 10.0 mg (0.0058 mmol, 72%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -9.5$ (c = 0.90, H₂O); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient F, $R_t = 16.7$ min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 8.64 (d, 1H, NH Ala^A, ³J = 7.4 Hz); 8.37 (d, 1H, NH Asp, ³J = 8.2 Hz); 8.21-7.80 (m, 11H, NH: Gly (8.19), NeuNHAc (8.19), Gln (8.11), Val (8.09), Ala^B (8.08), Leu¹ (NH₂, 8.05), Ala^C (7.89), Leu⁴ (7.89), Ser (7.88), GalNHAc (7.88), Ile (7,82)); 7.24+7.11+6.96 (s, 3-6H, NH₃⁺ ϵ -Gln, Leu¹); 4.62-3.92 (m, 14H, HI (4.60), α -CH Asp (4.56), HI'' (4.50), α -CH Ala^A (4.38), α -CH Ala^C (4.33), H3'' (4.30), α -CH Leu⁴ (4.29), α -CH Ala^B (4.26), α -CH Ile (4.23), α -CH Gln (4.14), α -CH Val (4.13), α -CH Ser (4.11), H2 (4.10), H3 (3.90)); 3.81-3.50 (14H, m, α -CH Leu¹ (3.79), β -CH_AH_B Ser (3.74), α -CH₂ Gly (3.70+3.64), H6' (3.67), H4, H4'', H5, H9a'(3.60), H4' (3.55), H5', H6, H6'', β -CH_AH_B Ser (3.50), H9b' (3.40), H5''(3.35), H2'', H7', H8' (3.30)); 2.81-2.50 (m, 3H, β -CH₂ Asp (2.79-2.66), H3_{eq}' (2.50)); 2.10-2.01 (m, 3H, γ -CH₂ Gln (2.08), β -CH Val (2.03)); 1.90-1.70 (m, 14H, 4''OAc (1.88), β -CH_aH_b Gln (1.85), NHAc Gal (1.84), NHAc Neu (1.76), β -CH Ile (1.72)); 1.70-1.40 (m, 9H, β -CH_aH_b Gln (1.69), γ -CH Leu¹ (1.62), γ -CH Leu⁴ (1.58), H3_{ax}' (1.50), β -CH₂ Leu¹ (1.48), γ -CH_aH_b Ile (1.43), β -CH₂ Leu⁴ (1.42)); 1.24-1.14 (m, 9H, β -CH₃

Ala^A (1.22), β -CH₃ Ala^B (1.18), β -CH₃ Ala^C (1.16)); 1.05 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.89-0.78 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu, 2* γ -CH₃ Val (0.87+0.86), γ -CH₃ Ile (0.83), δ -CH₃ Ile (0.80)).

Kursiv gedruckte Protonensignale sind nur der Vollständigkeit halber angegeben, gerundet auf 0.05 ppm und basierend auf den Spektren von vorangegangenen Glycopeptiden. In den Spektren dieser Verbindung konnten sie wegen mangelnder Signalintensität nicht eindeutig nach- bzw. zugewiesen werden.

103.0 MHz-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 57.3 (α -CH Val); 57.2 (α -CH Ser); 56.7 (α -CH Ile); 52.6 (α -CH Gln); 50.7-50.6 (α -CH Leu^{1,4}); 48.0-47.9 (α -CH Ala^{A,B,C}); 41.9 (α -CH₂ Gly); 40.7 (β -CH₂ Leu⁴); 40.3 (β -CH₂ Leu¹); 36.6 (β -CH Ile); 31.3 (γ -CH₂ Gln); 29.7 (β -CH Val); 27.4 (β -CH₂ Gln); 24.2 (γ -CH₂ Ile); 24.0 (γ -CH Leu⁴); 23.6 (γ -CH Leu¹); 22.8+21.6 (δ -CH₃ Leu); 22.5 (NHAc Gal); 22.4 (NHAc Neu); 22.0 (4''OAc); 18.9+18.2 (γ -CH₃ Val); 18.1-17.9 (β -CH₃ Ala^{A,B,C}); 15.2 (γ -CH₃ Ile); 11.0 (δ -CH₃ Ile). Ausgewählte Signale aus dem HMQC.

MALDI-MS [m/z] = 1747.5 ([M-2OH+2H+Na]⁺, ber.: 1747.8); 1659.9 ([M-2CO₂-2OH+2H+Na]⁺, ber.: 1656.8 (79%)); 1614.9 ([M-3CO₂-2OH+2H+Na]⁺, ber.: 1614.9 (78%)); 1442.3 ([M-Sialyl(C₁₁H₁₈NO₈)-CO₂+H+Na]⁺, ber.: 1442.7); 1429.0 ([M-Sialyl-CO₂-CH₃+2H+Na]⁺, ber.: 1428.7); 1414.1 ([M-Sialyl-CO₂-2CH₃+3H+Na]⁺, ber.: 1414.7); 1399.3 ([M-Sialyl-2CO₂+H+Na]⁺, ber.: 1398.7); 1340.2 ([M-CH₃CO-Sialyl-OH-2CO₂+3H+Na]⁺, ber.: 1340.7); 1326.6 ([M-CH₃CO-Sialyl-OH-CH₃-2CO₂+4H+Na]⁺, ber.: 1326.7); 1312.1 ([M-CH₃CO-Sialyl-OH-2CH₃-2CO₂+5H+Na]⁺, ber.: 1312.6); 1297.9 ([M-CH₃CO-Sialyl-2OH-2CH₃-2CO₂+6H+Na]⁺, ber.: 1297.7 (62%)). Die starke Fragmentierung der Probe wird durch eine hohe Laser-Energie verursacht, ohne die allerdings überhaupt kein Signal (außer Matrix-Signalen) nachgewiesen werden kann.

C₇₃H₁₂₂N₁₄O₃₅ (1755.82) [1754.82]

5.5 Manuelle Festphasensynthese

5.5.1 Allgemeines Kupplungsprotokoll

Es wurde das Fmoc-Kupplungsprotokoll und eine dem Merrifield-Festphasenreaktor nachempfundene Glasapparatur benutzt. Dazu wird ein mit einer Fmoc-geschützten Aminosäure vorbeladenes Tentagelharz oder Aminopolystyrolharz in der Apparatur vorgelegt. Die Fmoc-Abspaltungen wird durch eine doppelte 2.5 minütige Behandlung mit einer 20 %-igen Lösung von Piperidin in NMP erreicht. Nach der Abspaltung wird das Harz mit 5 mL NMP, 10 mL DCM und wieder 5 mL NMP gewaschen. Zur sequentiellen Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren wird das Harz mit ein paar Tropfen DCM gequollen, und mit 3 mL NMP versetzt. Die Aminosäure (1 mmol bzw. 0.5 mmol bei Verwendung von 0.05 mmol beladenem Harz) wird in 1mL NMP im 1.5 mL Eppendorfbehälter gelöst, und mit 1 Äquivalent 0.25 M Kupplungsreagenz (s.u.) versetzt und mit 2 Äquivalenten DIPEA aktiviert. Das Gemisch wird zum Harz gegeben, das dann 1 h bei Raumtemp. geschüttelt wird. Die Lösung wird abgezogen und kurz mit 5 mL CH₂Cl₂ gewaschen. Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz zur Acetylierung eventuell verbliebener freier Aminogruppen mit 5mL Cappingreagenz (s.u.) versetzt und 10 min geschüttelt. Dann wird es mit 5 mL NMP gewaschen. Darauf folgend beginnt der Zyklus wieder mit der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und dem nächsten Kupplungsschritt. Die Kupplung eines Saccharidbausteines erfolgt in ähnlicher Weise wie die einer Aminosäure; Reagenzien und Bedingungen sind bei den einzelnen Verbindungen angegeben. Sind alle Aminosäuren gekuppelt wird das Harz mit 5 mL NMP, 10 mL DCM, 5 mL NMP und wieder 10 mL CH₂Cl₂ gewaschen.

Die Abspaltung vom Harz erfolgt in der Regel nach folgender Prozedur: das Harz wird mit 0.5 mL Triisopropylsilan und 0.5 mL H₂O versetzt, und die Ankerspaltung durch Zugabe von 5 mL TFA gestartet. Das Harz wird 2 h geschüttelt, die TFA-Phase abgelassen, das Harz mit 4 mL TFA gefolgt von etwas DCM nachgespült. Die vereinigten Phasen werden eingeeengt und mit kaltem Diethylether gewaschen.

Verwendete Reagentienlösungen:

0.25 M Kupplungsreagenz: 3.83 g HOBt werden mit DMF auf 100 mL aufgefüllt (klare Lösung), und darin wiederum 9.49 g HBTU gelöst.

Cappingreagenz: 4.75 mL Ac₂O, 2.25 mL DIPEA und 0.2 g HOBt werden mit NMP auf 100 mL aufgefüllt.

5.5.2 Synthesen zum Kapitel 3.3.9

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-*O*-{2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-3-*O*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl}-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (99)**

[Fmoc-LAALDS([$\{\alpha$ -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)} $\}$)- β -Ac₃Gal-6-*O*-Bn-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)QGAIV-OH]

Der Festphasenreaktor wird mit 259.0 mg (0.057 mmol) Fmoc-Val-PHB-Tentagel-Harz beladen. Die Kupplung der Aminosäuren und die Abspaltung vom Tentagel-Harz erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.5.1, S. 216). Für den Einbau des Saccharidbausteins wird das in 3 mL NMP suspendierte Harz mit einer extern angesetzten Lösung versetzt, bestehend aus 97.0 mg (0.065 mmol) Fmoc-Ser([$\{\alpha$ -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3)) $\}$)- β -Ac₂Gal-6-*O*-Bn-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)-OH (47) und 259 μ L 0.25 M Kupplungsreagenz (Kap. 5.5.1, S. 216) in 2 mL NMP, aktiviert mit 22.2 μ L DIPEA. Das Harz wird 2 h geschüttelt und mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die restlichen Aminosäuren werden wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll gekuppelt und aufgearbeitet. Das nach Abspaltung vom Harz erhaltene Glycopeptid wird i. Vak. getrocknet und durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient M) gereinigt.

Ausb.: 28.7 mg (0.012 mmol, 23%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -4.8$ ($c = 1.60$, CHCl₃); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient F, $R_{\text{t}} = 30.4$ min.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃ + MeOD 15:1), δ [ppm]: 7.98-7.77 (m, 8H, NH: Asp (7.96), Ala/Ser/Val (7.86/7.52/7.39), Gly (7.84), Gln/Leu⁴ (7.79/7.37)); 7.68 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³*J* = 7.4 Hz); 7.51 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.46-7.38 (m, 2H, NH: Ile (7.45), GalNHAc (7.40)); 7.35-7.14 (m, 14H, H3-, H6-Fmoc (7.32), H2- H7-Fmoc (7.22), H_{Aryl} Bn (10H)); 6.78-6.74 (m, 2H, NH: Leu¹, NH NeuNHAc); 5.36 (m, 1H, H8³); 5.31 (d, 1H, H4, ³*J*_{4,3} = 2.4 Hz); 5.28 (d, 1H, CH_aH_bPh Neu, ²*J* = 12.1 Hz); 5.20 (dd, 1H, H7³, ³*J*_{7,8} = 2.6 Hz, ³*J*_{7,6} = 8.8 Hz); 5.01-4.95 (m, 2H, H4³ (4.99), CH_aH_bPh Neu (4.97)); 4.85 (d, 1H, H1, ³*J*_{1,2} = 2.7 Hz); 4.78 (dd, 1H, H2³, ³*J*_{2,3} = 8.4 Hz, ³*J*_{2,1} = 9.8 Hz); 4.72 (m, 1H, H4³); 4.60-4.53 (m, 2H, H1³ (4.58), α -CH Asp (4.55)); 4.47-4.11 (m, 17H, 2*CH₂Ph (4.45+4.38), β -CH₂ Ser (4.44+4.31), H3³ (4.37), H2 (4.36), α -CH Ser (4.30), α -CH Val (4.29), α -CH Ala^{2,3} (4.27), α -CH Ile

(4.17), H9a'(4.17), α -CH Leu⁴ (4.14), H9-Fmoc (4.14), α -CH Gln (4.13)); 4.07-3.65 (m, 11H, α -CH Ala¹ (4.05), H6a (3.99), H5 (3.98), H3 (3.92), α -CH Leu¹ (3.87), H6b (3.87), H5' (3.85), H9b' (3.83), α -CH₂ Gly (3.80-3.72), H5''(3.67)); 3.47-3.43 (m, 2H, H6', H6a''); 3.32 (dd, 1H, H6b'', ³J_{6,5} = 9.4 Hz, ²J_{a,b} = 6.9 Hz); 2.85+2.75 (2*dd, 2H, β -CH_aH_b Asp, ³J _{α,β} = 5.6 Hz, ²J_{a,b} = 16.9 Hz); 2.51 (dd, 1H, H3_{eq}', ³J_{3,4} = 4.7 Hz, ²J_{eq,ax} = 12.5 Hz); 2.26-2.22 (m, 2H, γ -CH₂ Gln); 2.14-1.67 (m, 34H, 8*OAc (2.12-1.86), β -CH Val (2.09), β -CH₂ Gln (2.05), NHAc Gal (1.91), β -CH Ile (1.80), NHAc Neu (1.69)); 1.59-1.41 (m, 8H, 2* γ -CH Leu (1.57), β -CH₂ Leu⁴ (1.53), H3_{ax}' (1.51), γ -CH_aH_b Ile (1.44), β -CH₂ Leu¹ (1.43)); 1.31-1.20 (m, 9H, 3* β -CH₃ Ala); 1.04 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.87-0.74 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu, 2* γ -CH₃ Val (0.85+0.83), γ -CH₃ Ile (0.80), δ -CH₃ Ile (0.76)).

103.0 MHz-NMR (CDCl₃ + MeOD 15:1), δ [ppm]: 128.7-127.2 (C_{Aryl}); 124.9 (C1, C8 Fmoc); 119.8 (C4, C5 Fmoc); 101.2 (C1''); 98.0 (C1); 73.4 (CH₂ Gal, CH₂ Fmoc); 73.1 (C3); 71.7 (C5''); 71.6 (C6'); 71.5 (C3''); 69.8 (C4, C2''); 69.5 (C4'); 68.4 (CH₂Ph Neu); 67.9 (C6''); 67.7 (C4''); 67.6 (C8'); 67.4 (C5); 67.0 (C7'); 67.0 (β -CH₂ Ser); 62.8 (C6); 62.2 (C9'); 58.3 (α -CH Ile); 57.5 (α -CH Val); 55.8 (α -CH Ser); 54.8 (α -CH Leu¹); 53.8 (α -CH Gln); 50.8 (α -CH Ala); 50.6 (α -CH Asp); 49.3 (2* α -CH Ala); 48.8 (C2); 48.4 (C5'); 46.9 (α -CH Leu⁴, C9 Fmoc); 43.1 (α -CH₂ Gly); 40.3 (β -CH₂ Leu¹); 39.6 (β -CH₂ Leu⁴); 37.3 (C3'); 36.1 (β -CH Ile); 35.1 (β -CH₂ Asp); 31.6 (γ -CH₂ Gln); 30.5 (β -CH Val); 26.3 (β -CH₂ Gln); 24.8 (γ -CH₂ Ile); 24.6 (γ -CH Leu^{1,4}); 22.6 (CH₃ NHAc Gal); 22.6+21.3 (δ -CH₃ Leu); 22.4 (CH₃ NHAc Neu); 21.3-20.5 (8*CH₃ OAc); 18.9+17.5 (γ -CH₃ Val); 16.9+16.6 (3* β -CH₃ Ala); 15.2-(γ -CH₃ Ile); 10.8 (δ -CH₃ Ile).

MALDI-MS [m/z] = 2452.5 ([M+H]⁺, ber.: 2452.1); 2476.6 ([M+Na]⁺, ber.: 2276.1); 2491.2 ([M+K]⁺, ber.: 2491.2).

C₁₁₆H₁₅₈N₁₄O₄₄ (2451.06) [2451.06]

5.5.3 Synthesen zum Kapitel 3.3.10

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-3-*O*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-glutaminyglycyl-L-alanyl-L-iso-leucyl-L-valin (101)**

[Fmoc-LAALDS([α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6))][(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3))- β -6-*O*-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)QGAIV-OH]

Der Festphasenreaktor wird mit 227.3 mg (0.05 mmol) Fmoc-Val-PHB-Tentagel-Harz beladen. Die Kupplung der Aminosäuren und die Abspaltung vom Tentagel-Harz erfolgt nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll (Kap. 5.5.1, S. 216). Für den Einbau des Saccharidbausteins wird das in 3 mL NMP suspendierte Harz mit einer extern angesetzten Lösung versetzt, bestehend aus 53.0 mg (0.026 mmol) Fmoc-Ser([α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6))][(α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3))- β -6-*O*-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)-OH (**56**) und 104 μ L 0.25 M Kupplungsreagenz (Kap. 5.5.1, S. 216) in 2 mL NMP, aktiviert mit 8.9 μ L DIPEA. Das Harz wird 3 h geschüttelt und mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die restlichen Aminosäuren werden wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll gekuppelt und aufgearbeitet, jedoch *nicht* mit Diethylether gewaschen. Das nach Abspaltung vom Harz erhaltene Glycopeptid wird i. Vak. getrocknet und durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient M) gereinigt.

Ausb.: 16.8 mg (0.0058 mmol, 22%); farbloser amorpher Feststoff.

$[\alpha]_D^{22} = -5.2$ ($c = 1.10$, CH₃OH); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient F, $R_t = 30.7$ min.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃ + CH₃OD 10:1), δ [ppm]: 7.71 (d, 2H, H₄-, H₅-Fmoc, ³ $J = 7.4$ Hz); 7.55 (d, 2H, H₁-, H₈-Fmoc, ³ $J = 7.1$ Hz); 7.37-7.23 (m, 19H, H₃-, H₆-Fmoc (7.34), H₂- H₇-Fmoc (7.25), H_{Aryl} Bn (15H)); 5.44 (m, 1H, H₈'); 5.33 (d, 1H, CH_aH_bPh', ² $J = 12.3$ Hz); 5.24-4.97 (m, 7H, H₈''' (5.22), H₇' + H₇''' (5.22), CH₂Ph''' (5.07), H₄'' (5.05), CH_aH_bPh' (4.99)); 4.92-4.62 (m, 5H, H₂'' (4.90), H₁ (4.86), H₄''' (4.75), H₄' (4.71), H₁'' (4.64)); 4.49-4.27 (m, 12H, H₃'' (4.47), CH₂Ph Fmoc + CH₂Ph Bn'' (4.44+4.33), β -CH₂ Ser (4.40+4.32), α -CH Asp (4.40), α -CH Ser (4.36), α -CH Val (4.36), H₂ (4.36), α -CH Ala (4.29)); 4.28-3.72 (m, 19H, H_{9a}' + H_{9a}''' (4.26), α -CH Gln (4.21), α -CH Ile (4.19), H₉-Fmoc

(4.17), α -CH Leu⁴ (4.17), 2* α -CH Ala (4.1), H9b''' (4.06), α -CH₂ Gly (3.97-3.66), H3 (3.95), H5 (3.92), α -CH Leu¹ (3.92), H5'+H5''' (3.90), H6 (3.83+3.74), H9b' (3.83), H5'' (3.77), H4 (3.75)); 3.49-3.31 (m, 4H, H6'+H6''' (3.47), H6'' (3.42+3.33)); 2.86-2.74 (m, 2H, β -CH₂ Asp); 2.63-2.53 (m, 2H, H3_{eq}', H3_{eq}'''); 2.27-1.72 (m, 46H, γ -CH₂ Gln (2.27), 10*OAc (2.18-1.92), β -CH Val (2.13), β -CH₂ Gln (2.11-2.00), NHAc Gal (1.93), NHAc Neu''' (1.83), H3_{ax}''' (1.83), β -CH Ile (1.81), NHAc Neu (1.74), 2* β -CH₂ Leu (1.65+1.49), 2* γ -CH Leu (1.61), H3_{ax}' (1.57), γ -CH_aH_b Ile (1.49)); 1.31-1.27 (m, 9H, 3* β -CH₃ Ala); 1.05 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.93-0.76 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu, 2* γ -CH₃ Val (0.88+0.87), γ -CH₃ Ile (0.84), δ -CH₃ Ile (0.79)).

H: α -GalNAc, H': (2 \rightarrow 3)- α -NeuNAc, H'': β -Gal, H''': (2 \rightarrow 6)- α -NeuNAc

103.0 MHz-NMR (CDCl₃ + CH₃OD 10:1), δ [ppm]: 128.7-127.2 (C_{Aryl} Bn, Fmoc 2,3,6,7); 125.0 (C1, C8 Fmoc); 120.0 (C4, C5 Fmoc); 101.9 (C1''); 98.0 (C1); 73.4 (CH₂ Gal Bn, CH₂ Fmoc); 72.6 (C3); 72.0 (C5''); 71.8 (C6', C6'''); 71.3 (C3''); 69.9 (C2''); 69.6 (C8'''); 69.5 (C4', C4'''); 68.8 (C4); 68.4 (CH₂Ph Neu'); 68.3 (C4''); 67.9 (C6''); 67.8 (C8'); 67.8 (C5); 67.5 (CH₂Ph Neu'''); 67.3 (C7', C7'''); 67.1 (β -CH₂ Ser); 63.1 (C6); 62.6 (C9'); 62.4 (C9'''); 58.5 (α -CH Ile); 57.3 (α -CH Ser); 57.3 (α -CH Val); 55.2 (α -CH Leu¹); 53.9 (α -CH Gln); 51.1 (α -CH Ala); 49.5 (2* α -CH Ala); 49.3 (α -CH Asp); 48.6 (C5', C5'''); 48.0 (C2); 47.1 (α -CH Leu⁴, C9 Fmoc); 43.2 (α -CH₂ Gly); 40.6 (β -CH₂ Leu); 40.0 (β -CH₂ Leu); 37.5 (C3'''); 37.2 (C3'); 36.5 (β -CH Ile); 35.6 (β -CH₂ Asp); 31.7 (γ -CH₂ Gln); 30.7 (β -CH Val); 26.5 (β -CH₂ Gln); 25.1 (γ -CH₂ Ile); 24.6 (γ -CH Leu^{1,4}); 22.7 (NHAc Neu'''); 22.6-21.8 (δ -CH₃ Leu); 22.6 (NHAc Gal); 22.6 (NHAc Neu'); 21.3-20.8 (10*OAc); 19.0+17.8 (γ -CH₃ Val); 17.5-17.1 (3* β -CH₃ Ala); 15.2 (γ -CH₃ Ile); 11.0 (δ -CH₃ Ile).

C: α -GalNAc, C': (2 \rightarrow 3)- α -NeuNAc, C'': β -Gal, C''': (2 \rightarrow 6)- α -NeuNAc

MALDI-MS [m/z] = 2551.6 ([M-Fmoc-4Ac+4H+Na]⁺, ber.: 2550.1, 2551.1); 2593.3 ([M-Fmoc-3Ac+3H+Na]⁺, ber.: 2592.1, 2593.1); 2635.0 ([M-Fmoc-2Ac+2H+Na]⁺, ber.: 2634.1, 2635.1); 2676.9 ([M-Fmoc-Ac+H+Na]⁺, ber.: 2676.1); 2941.4 ([M+Na]⁺, ber.: 2941.2).

C₁₃₈H₁₈₅N₁₅O₅₄ (2918.01) [2916.22]

L-Leucyl-L-alanyl-L-alanyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-O-{2-acetamido-2-desoxy-3-O-[4-O-acetyl-3-O-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]-6-O-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)- α -D-galactopyranosyl}-L-glutaminyl-glycyl-L-alanyl-L-isoleucyl-L-valin (102)

[H-LAALDS($[\alpha$ -Neu5NAcCOOH-(2 \rightarrow 6))][(α -Neu5NAcCOOH-(2 \rightarrow 3))- β -4-OAcGal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)QGAIV-OH]

Man löst 14.8 mg (0.0051 mmol) Fmoc-LAALDS($[\alpha$ -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 6))-[α -NeuAc₄5NAcCOOBn-(2 \rightarrow 3))- β -6-O-Bn-Ac₂Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc)QGAIV-OH (**101**) in 10 mL entgastem CH₃OH, versetzt mit 0.5 mL AcOH. Zur Lösung werden unter Argon 10 mg Palladium auf Kohle gegeben. Das Argon-Schutzgas wird gegen eine Wasserstoff-Atmosphäre ausgetauscht. Die Suspension wird unter Wasserstoff Atm. 14 h bei Raumtemp. gerührt, und dann durch einen Membranfilter filtriert. Mittels analyt. HPLC (Säule JUPITER, Gradient F) wird das Ende der Reaktion festgestellt. Die Lösung wird vollständig i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird wieder in 10 mL CH₃OH gelöst und mit 1 %-iger CH₃ONa Lösung in CH₃OH auf pH 11 eingestellt. Die Lösung wird 24 h bei Raumtemp. gerührt und der Reaktionsverlauf mittels analyt. HPLC (Säule JUPITER, Gradient F) überwacht. Die Lösung wird mit drei Tropfen AcOH neutralisiert und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird durch semipräparative HPLC (Säule JUPITER, Gradient M) gereinigt.

Ausb.: 9.9 mg (0.0048 mmol, 96%); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -8.3$ (c = 0.99, H₂O); HPLC: (Säule JUPITER), Gradient F, R_t = 12.3 min.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 9.41 (s, 1H (bis zu 4H möglich), COOH); 8.67 (d, 1H, NH Ala^A, ³J = 7.8 Hz); 8.22-8.10 (m, 7H, NH: 2*NeuNHAc (8.20+8.05), Gly (8.18), Asp (8.15), Leu¹ (NH₂, 8.12), Gln (8.12)); 9.94-7.83 (m, 7H, NH: Ala^{B,C} (7.92), Leu⁴ (7.91), Ser (7.91), GalNHAc (7.91/7.85), Val (7.90), Ile (7,85)); 6.83+6.67 (s, 3-6H, NH₃⁺ ϵ -Gln, Leu¹); 4.84 (m, 1H, H4''); 4.63-4.56 (m, 3H, H1'' (4.61), H1 (4.59), α -CH Asp (4.59)); 4.40-4.09 (m, 9H, α -CH Ala^A (4.38), α -CH Ala^C (4.36), α -CH Leu⁴ (4.30), α -CH Ala^B (4.30), α -CH Ile (4.23), α -CH Ser (~4.21), H2 (4.21), α -CH Gln (4.14), α -CH Val (4.11)); 3.97-3.29 (m, 25H, H3'' (3.95), α -CH₂ Gly (3.83+3.68), H5 (3.83), α -CH Leu¹ (3.78), H4 (3.72), H2'' (3.70), H4''' (3.68), β -CH₂ Ser (3.68-3.66), H3 (3.66), H6 (3.64+3.61), H5'+H5''' (3.59+3.48), H4' (3.56), H6'' (3.47), H6' (3.67), H9'+H9''' (3.46+3.42), H6'+H6''' (3.35+3.30); H7'+H7''' (3.34), H5'' (3.31)); 3.19 (m, 2H, H8', H8'''); 2.75-2.47 (m, 4H, β -CH₂ Asp (2.73+2.58),

$H3_{eq}' + H3_{eq}'''$ (2.50)); 2.20-1.83 (m, 16H, 4''OAc (2.18), γ -CH₂ Gln (2.11), NHAc Gal (2.07), β -CH Val (2.03), 2*NHAc Neu (1.87), β -CH_aH_b Gln (1.85)); 1.82-1.42 (m, 11H, $H3_{ax}'''$ (1.80), β -CH Ile (1.72), β -CH_aH_b Gln (1.70), γ -CH Leu¹ (1.66), γ -CH Leu⁴ (1.58), β -CH₂ Leu¹ (1.52), $H3_{ax}'$ (1.50), γ -CH_aH_b Ile (1.46), β -CH₂ Leu⁴ (1.44)); 1.24-1.15 (m, 9H, β -CH₃ Ala^A (1.22), β -CH₃ Ala^B (1.18), β -CH₃ Ala^C (1.17)); 1.07 (m, 1H, γ -CH_aH_b Ile); 0.90-0.78 (m, 24H, 4* δ -CH₃ Leu, 2* γ -CH₃ Val (0.88+0.87), γ -CH₃ Ile (0.83), δ -CH₃ Ile (0.80)). H: α -GalNAc, H': (2 \rightarrow 3)- α -NeuNAc, H'': β -Gal-4OAc, H''': (2 \rightarrow 6)- α -NeuNAc

Die vier kursiv gedruckten Signale der Neuraminsäure-Protonen sind nur der Vollständigkeit halber angegeben, gerundet auf 0.05 ppm und basieren auf den Erfahrungen aus Spektren vorangegangener Glycopeptide. In den Spektren dieser Verbindung konnten sie wegen mangelnder Signalintensität nicht nachgewiesen werden.

103.0 MHz-NMR (DMSO-d₆), δ [ppm]: 101.3 (C1''); 97.7 (C1); 75.9 (C3); 74.8 (C5''); 73.9 (C3''); 73.7 (C8', C8'''); 73.4 (C7', C7'''); 70.9 (C2''); 69.2 (C4); 69.1 (C4''); 68.1 (C6', C6'''); 67.6 (C5); 66.5+66.3 (C4', C4'''); 63.0 (β -CH₂ Ser); 62.8 (C9', C9'''); 62.6 (C6); 59.9 (C6''); 57.1 (α -CH Val); 56.7 (α -CH Ser); 53.7 (α -CH Ile); 52.4 (α -CH Gln); 52.1+51.4 (C5', C5'''); 50.8 (α -CH Leu¹); 50.7 (α -CH Leu⁴); 49.4 (α -CH Asp); 48.0 (3* α -CH Ala); 47.4 (C2); 43.2 (α -CH₂ Gly); 40.7 (β -CH₂ Leu⁴); 40.4 (β -CH₂ Leu¹); 36.5 (β -CH Ile); 35.9 (β -CH₂ Asp); 31.4 (γ -CH₂ Gln); 29.7 (β -CH Val); 27.6 (β -CH₂ Gln); 24.2 (γ -CH₂ Ile); 24.0 (γ -CH Leu⁴); 23.5 (γ -CH Leu¹); 23.0+21.6 (δ -CH₃ Leu); 22.6 (CH₃ NHAc Neu', CH₃ NHAc Neu'''); 20.7 (CH₃ NHAc Gal); 19.4 (CH₃ OAc); 18.9+17.9 (γ -CH₃ Val); 18.1 (3* β -CH₃ Ala); 15.2 (γ -CH₃ Ile); 11.0 (δ -CH₃ Ile).

C: α -GalNAc, C': (2 \rightarrow 3)- α -NeuNAc, C'': β -Gal, C''': (2 \rightarrow 6)- α -NeuNAc

MALDI-MS [m/z] = 1560.2 ([M-Ac-Sialyl((C₁₁H₁₈NO₈))-3CO₂-2CH₃-OH+3H+Na]⁺, ber.: 1559.8); 1576.0 ([M-Ac-Sialyl-3CO₂-2CH₃+2H+Na]⁺, ber.: 1575.8); 1588.5 ([M-Ac-Sialyl-3CO₂-CH₃+H+Na]⁺, ber.: 1588.5); 1604.2 ([M-Ac-Sialyl-3CO₂+Na]⁺, ber.: 1603.8); 1808.9 ([M-Ac-4CO₂-3CH₃+3H+Na]⁺, ber.: 1808.9); 1851.4 ([M-Ac-4CO₂+Na]⁺, ber.: 1850.9 (100%), 1851.9 (87%)); 1866.8 ([M-Ac-3CO₂-2CH₃+2H+Na]⁺, ber.: 1866.9); 1880.6 ([M-Ac-3CO₂-CH₃+H+Na]⁺, ber.: 1880.9); 1894.5 ([M-Ac-3CO₂+Na]⁺, ber.: 1894.9); 2070.4 ([M+Na]⁺, ber.: 2068.9 (100%), 2069.9 (93%)). Die starke Fragmentierung der Probe wird durch eine hohe Laser-Energie verursacht, ohne die allerdings überhaupt kein Signal (außer Matrix-Signalen) nachgewiesen werden kann.

C₈₄H₁₃₉N₁₅O₄₃ (2047.08) [2045.92]

6 Literaturverzeichnis

- [1] A.Varki, *Glycobiol.* **1993**, 3, 97.
- [2] H. Lid, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 1.
- [3] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683.
- [4] H.-D. Jakubke, „Peptide“ Spektrum, akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.
- [5] R. P. McEver, K. L. Moore, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 11025.
- [6] S. Hakomori, *Cancer Res.* **1985**, 45, 2405.
- [7] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, Wiley-VCH Weinheim **1999**.
- [8] I. Brockhausen, H. Schachter, J. F. G. Vliegenthart (Hrsg.), *Glycoproteins*, Elsevier, Amsterdam **1995**, 201.
- [9] J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, 6, 355.
- [10] S. Hakomori, *Cancer Res.* **1985**, 45, 2405.
- [11] I. Brockhausen, J. Yang, N. Dickinson, S. Ogata, S. H. Itzkowitz, *Glycoconj. J.* **1998**, 15, 595.
- [12] S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. M. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, 49, 197.
- [13] C. A. Janeway, P. Travers, *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford **1995**.
- [14] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, 69, 11.
- [15] T. Yagi, M. Takeichi, *Genes & Develop.* **2000**, 14, 1169.
- [16] B. Nagar, M. Overduin, M. Ikura, J. M. Rini, *Nature* **1996**, 380, 360.
- [17] S. Kandikonda, D. Oda, R. Niederman, B. C. Sorkin, *Cell Adhes. Commun.* **1996**, 4, 13.
- [18] M. Takeichi, *Science* **1991**, 251, 1451; *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, 7, 619.
- [19] O. Huber, C. Bierkamp, R. Kemler, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, 8, 685.
- [20] M. Boubelik, L. Draberova, P. Draber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 224, 283.
- [21] M. S. Steinberg, M. Takeichi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 91, 206.
- [22] A.W. Koch, S. Pokutta, A. Lustig, J. Engel, *Biochemistry*, **1997**, 15, 3507.
- [23] S. Pokutta, K. Herrenknecht, R. Kemler, J. Engel, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 223, 1019.
- [24] B. Nagar, M. Overduin, M. Ikura, J. M. Rini, *Nature* **1996**, 380, 360.
- [25] S. Pokutta, K. Herrenknecht, R. Kemler, J. Engel, *Eur. J. Biochem* **1994**, 223, 1019.
- [26] D. Leckband, S. Sivasankar, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, 12, 587.
- [27] S. Sivasankar, B. Gumbiner, D. Leckband, *Biophys. J.* **2001**, 80, 1758.
- [28] S. Chappius-Flament et al., *J. Cell Biol.* **2001**, 154, 231-243.
- [29] K.L. Lutz, T.J. Siahaan, in: *Peptides: Chemistry, Structure and Biology. Proceedings of the 14th American Peptide Symposium*, Eds. P. T. P. Kaumaya, R. S. Hodges, Mayflower Scientific Ltd., Kingswinford, England, **1996**, 88, 8024.

- [30] A. Leroy, V. Noe, M. Mareel, H. Nelis, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 228.
- [31] O.W. Blaschuk, R. Sullivan, S. David, Y. Pouliot, *Dev. Biol.* **1990**, *139*, 227.
- [32] J. Willems, E. Bruyneel, V. Noe, H. Sledgers, A. Zwijsen, R.-M. Mège, M. Mareel, *FEBS Lett.* **1995**, *363*, 289.
- [33] B. Gumbiner, K. Simons, *J. Cell Biol.* **1986**, *102*, 457.
- [34] H. McNeill, M. Ozawa, R. Kemler, W. J. Nelson, *Cell* **1990**, *62*, 309.
- [35] M. Takeichi, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1993**, *5*, 806.
- [36] S. Jothy, S. B. Munro, L. LeDuy, D. McClure, O. W. Blaschuk, *Cancer Metastasis Rev.* **1995**, *14*, 363.
- [37] A.-K. Perl, P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb, G. Christofori, *Nature* **1998**, *392*, 190.
- [38] M. J. Bussemakers, R. J. van Moorselaar, L. A. Giroldi, T. Ichikawa, J. T. Isaacs, M. Takeichi, F. M. Debruyne, J.A. Schalken, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2916.
- [39] E. Y. Jones, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 602.
- [40] K. I. Tong, P. Yau, M. Overduin, S. Bagby, T. Porumb, M. Takeichi, M. Ikura, *FEBS Lett.* **1994**, *352*, 318.
- [41] M. Overduin, T.S. Harvey, S. Bagby, K. I. Tong, P. Yau, M. Takeichi, M. Ikura, *Science* **1995**, *267*, 386.
- [42] R. J. Poljak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 3440.
- [43] B. Nagar, M. Overduin, M. Ikura, J. M. Rini, *Nature* **1996**, *380*, 360.
- [44] Y. Shirayoshi, A. Nose, K. Iwasaki, M. Takeichi, *Cell Struct. Funct.* **1986**, *11*, 245.
- [45] R. J. Harris, M. W. Spellman, *Glycobiology* **1993**, *3*, 219.
- [46] D. Berndorff, R. Gessner, B. Kreft, N. Schnoy, A.-M. Lajous-Petter, N. Loch, W. Reutter, M. Hortsch, R. Tauber, *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 1353.
- [47] R. B. Thomson, P. Igarashi, D. Biemesderfer, R. Kim, A. Abu-Alfa, M. Soleimani, P. S. Aronson, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 17594-601.
- [48] Softwarepaket MacMolly Tetra 3.7, Modul „Align“; Soft Gene, Berlin.
- [49] B. Kreft, D. Berndorff, A. Böttinger, S. Finnemann, D. Wedlich, M. Hortsch, R. Tauber, R. Gessner, *J. Cell Biol.* **1997**, *136*, 1109.
- [50] A. Boettinger, B. Kreft, C. Fieger, B. Dlouhy, D. Berndorff, R. Gessner, R. Tauber; „*Molecular cloning of human LI-cadherin: evidence for a novel type of cadherin within the cadherin superfamily.*“ **1994**; submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- [51] B. Angres, L. Kirn, R. Jung, R. Gessner, R. Tauber, *Dev. Dyn.* **2001**, *221*, 182.
- [52] D. G. Silberg, G. P. Swain, E. R. Suh, P. G. Traber, *Gastroenterology* **2000**, *119*, 961-71.
- [53] T. Hinoi, P. C. Lucas, R. Kuick, S. Hanash, K. R. Cho, E. R. Fearon, *Gastroenterology* **2002**, *123*, 1565-1577.
- [54] C. Grötzinger, J. Kneifel, D. Patschan, N. Schnoy, I. Anagnostopoulos, S. Faiss, R. Tauber, B. Wiedenmann, R. Gebner, *Gut* **2001**, *49*, 73-81.
- [55] M. Takamura, M. Sakamoto, Y. Ino, T. Shimamura, T. Ichida, S. Hirohashi, *Cancer Sci.* **2003**, *94*, 425-430.
- [56] a.) H. Kunz, M. Schultz, in D.G. Large, C.D. Warren (Hrsg.): *Glycopeptides and related compounds*, Marcel Dekker, Inc., New York, **1997**, 23; b.) H. Kunz, *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 1223.

- [59] G.B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *35*, 161.
- [60] S.H. Cohen-Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10531.
- [61] U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 359.
- [62] O. Setz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813.
- [63] A. Schleyer, M. Meldal, M. Renil, H. Paulson, K. Bock, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2064.
- [64] a) J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3915;
b) J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *Science* **1995**, *269*, 202;
c) K. A. Savin, J. C. G. Woo, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4183.
- [65] Chem3D, Version 9.0, © 1986-2004 CambridgeSoft.
- [66] Allinger, N. L., *J. Amer. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8127.
- [67] U. Burkert, N. L. Allinger, *Molecular Mechanics*, American Chemical Society: Washington, DC, **1982**.
- [69] D.H. Lo, M.A. Whitehead, *Can. J. Chem.* **1968**, *46*, 2027; G.D. Zeiss, M. A. Whitehead, *J. Chem. Soc. A* **1971**, 1727-1738.
- [70] W.H.E. Schwarz, *Theoret. Chim. Acta* **1972**, *24*, 29-34.
- [71] C. Soto et al., *The Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270* (7), 3063-3067.
- [72] (a) H. Sticht, P. Bayer, D. Willbold, S. Dames, C. Hilbich, K. Beyreuther, R. W. Frank, P. Rösch, *Eur. J. Biochem* **1995**, *233*, 293-298. (b) M. Coles, W. Bicknell, A. A. Watson, D. P. Fairlie, D. J. Craik, *Biochemistry* **1998**, *37*, 11064-11077.
- [73] M. Wagner, Dissertation, Universität Mainz, **2001**.
- [74] S. Keil, Dissertation Universität Mainz **2000**.
- [75] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 629.
- [76] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*(1), 129.
- [77] R. Lemieux, R.M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244.
- [78] J. Habermann, Dissertation, Universität Mainz **1997**, 76.
- [79] G. Braun, Dissertation, Universität Mainz **1991**, 103.
- [80] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89.
- [81] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. I*, **1996**, 985.
- [82] nach der allgemeinen Reaktionsführung aus *Synthesis* **1978**, 671.
- [83] W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957.
- [84] B. Helferich, K. Weis, *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 314.
- [85] M. Stumpp, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1249.
- [86] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 763. R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213.
R. R. Schmidt, *Pure App. Chem.* **1989**, *61*, 1257.
- [87] T. Reipen, Dissertation, Universität Mainz, **2002**.
- [88] M. Smith, R. Rammler, I. H. Goldberg, H. G. Khordua, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430.
- [89] K. Toshima, S. Mukaiyama, T. Yoshida, T. Tamai, K. Tatsuta, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *32*, 6155.
- [90] A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, K. Hotta, H. Ishida, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, *10*, 493.
- [91] R.R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, 694; I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. Hervé du Penhoat, J.-M. Mallet, V. Michon, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1993**, *246*, 23.

- [92] T. J. Martin, R. Brescello, A. Toepfer, R. R. Schmidt, *Glycoconjugate J.* **1993**, *10*, 16.
- [93] A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35-42.
- [94] O. Kanie, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 501.
- [95] W. Birberg, H. Lönn, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7457.
- [96] A. Kuhn, Diplomarbeit, Universität Mainz, **2001**.
- [97] F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, C13.
- [98] H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, *125*, 47
- [99] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5229 & 5233.
- [100] Martichonoh, G. M. Whitesides, *JOC* **1996**, *61*, 1702; S. Thea, G. Cevasco, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 2865.
- [101] O. T. Schmidt in *Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol II* (Hrsg.: R. L. Whister, M. L. Wolfrom, J. N. BeMiller), Academic Press Inc., New York, London, **1963**, 318.
- [102] X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6569.
- [103] K. Donsbach, Diplomarbeit, Universität Mainz, **1996**.
- [104] C. Brocke, Dissertation, Universität Mainz, **2002**.
- [106] M. Wagner, H. Kunz, *Deutsche Patentanmeldung*, **2001**, 10116252.9; M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chemie* **2002**, *114*, 315-319.
- [107] 1. M. Wagner, H. Kunz, *Synlett* **2000**, 400; 2. M. Wagner, H. Kunz, *Z. Naturforsch.* **2002**, *57b*, 928-936.
- [108] N. Prileschajew, *Ber.* **1909**, *42*, 4811.
- [109] M. Rothe, J. Mazánek, *Angew. Chemie.* **1972**, *84*, 290.
- [110] M. Rothe, J. Mazánek, *Liebigs Ann. Chemie.* **1974**, 439.
- [111] E. Bayer, W. Rapp, *Chem. Pept. Protein* **1986**, *3*, 3.
- [112] M. Wagner, Dissertation, Universität Mainz, **2001**.
- [113] M. M. Dhingra, *Indian J. Biochem. Biophys.* **1992**, *29*, 458.
- [114] E. R. Stimson, Y. C. Meinwald, G. T. Montelione, H. A. Scheraga, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 569.
- [115] R. Gessner, B. Kreft, N. Schnoy, A. M. Lajous-Petter, N. Loch, W. Reutter, M. Hortsch, R. Tauber, *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 1353.
- [119] H.-D. Jakubke, *Peptide*, Spektrum Akademischer Verlag, **1996**.
- [120] a) K. Wüthrich, „*NMR of Proteins and Nucleic Acids*“, Wiley, New York, **1986**. b) K. Wüthrich, *Angewandte Chemie* **2003**, *115* (29), 3462.
- [121] H. Kessler, S. Seip; NMR of Peptides - in: *Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists* (Eds.: W.R. Croasmun, R.M.K. Carlson) VCH Publishers, New York, **1994**, 619-654.
- [122] D. Neuhaus, M. P. Williamson, „*The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*“, VCH Publishers, New York, **1989**.
- [123] J. N. S. Evans, *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, **1995**.
- [124] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647.
- [125] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 311–333.

-
- [126] D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 67.
- [127] J. Rizzo, M. D. Bruch, *Structure Determination of Biological Macromolecules in NMR-Spectroscopy Techniques*, 2nd Edition, **1996**, ed. M. D. Bruch.
- [128] J. S. Richardson, *Protein Chem.* **1981**, *34*, 167.
- [129] W. L. F. Armarego, C. L. L. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, 5 ed., Butterworth-Heinemann, Amsterdam, **2003**.
- [130] M. L. Wolfrom, A. Thompson, *Methods Carbohydr. Chem.*, **1963**, *2*, 211.
- [131] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13(1)*, 129-132.
- [134] J. Habermann, Dissertation, Universität Mainz, **1997**, 76.
- [135] G.B. Fields, R.L. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1990**, *35*, 161.
- [136] G. Braun, Dissertation, Universität Mainz, **1991**, 103/104; H. Kunz in: *Preparative Carbohydrate Chemistry*, S. Hanessian, Marcel Dekker Inc., New York, USA, **1997**, 275.
- [137] nach J. Habermann, Dissertation, Universität Mainz **1997**; statt einer Benzyl- wird die *t*Butyl-Schutzgruppe verwendet
- [139] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Saleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1*, **1996**, 985.
- [141] S. Keil, Dissertation, Universität Mainz, **2000**, 76. In der vorliegenden Arbeit wurde Serin statt Threonin verwendet.
- [142] H. Herzner, J. Eberling, M. Schultz, J. Zimmer, H. Kunz, *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, 759.
- [143] M. Stumpp, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1249.
- [147] C. Filser, *Diplomarbeit*, Universität Mainz, **2001**.
- [148] O. T. Schmidt, in *Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. II* (Eds.: R. L. Whistler, M. L. Wolfrom, J. N. BeMiller), Academic Press Inc., New York, London, **1963**, p. 318.
- [149] X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6569.
- [150] N. G. Delaney, V. Madison, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6635.
- [151] M. Lergenmüller, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron* **1998**, 1381.
- [152] nach Methode von: M. Wagner, H. Kunz, *Synlett* **2000**, 400; Patent

7 Spektrenanhang

7.1 Substanzenkatalog

Nummer, Name	NMR-Spektrum
1: 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-galactopyranosylbromid	-
2: 3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-galactal	-
3: 3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-azido-2-desoxy- α,β -D-galactopyranosylnitrat	-
4: 3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-azido-2-desoxy-D-galactopyranosylbromid	-
5: <i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-serin	-
6: <i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-serin- <i>tert</i> -butylester	-
7: Fmoc-Ser(Ac ₃ GalN ₃)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	-
8: Fmoc-Ser(α -Ac ₃ GalNAc)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	-
9: Fmoc-Ser(α -Ac ₃ GalNAc)-OH	-
10: H-Ser(α -Ac ₃ GalNAc)-OH	-
11: Boc-Ser-OH	-
12: Boc-Ser- <i>O</i> <i>t</i> Bu	-
13: Boc-Ser(Ac ₃ GalN ₃)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	-
14: Boc-Ser(α -Ac ₃ GalNAc)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	-
15: Fmoc-Ser(α -GalNAc)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	-
16: Fmoc-Ser(α -GalNAc-4,6- <i>O</i> -Pmb)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	-
17: Fmoc-Ser(α -GalNAc-4,6- <i>O</i> -Bn)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	-
18: Fmoc-Ser([β -Ac ₄ Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6- <i>O</i> -Pmb)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	-
19: Ac ₅ Gal	-
20: 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetylgalactose	-
21: <i>O</i> -(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-galactopyranosyl)trichloracetimidat	-
22: Fmoc-Ser([β -Ac ₄ Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -GalNAc-4,6- <i>O</i> -Bn)- <i>O</i> <i>t</i> Bu	-

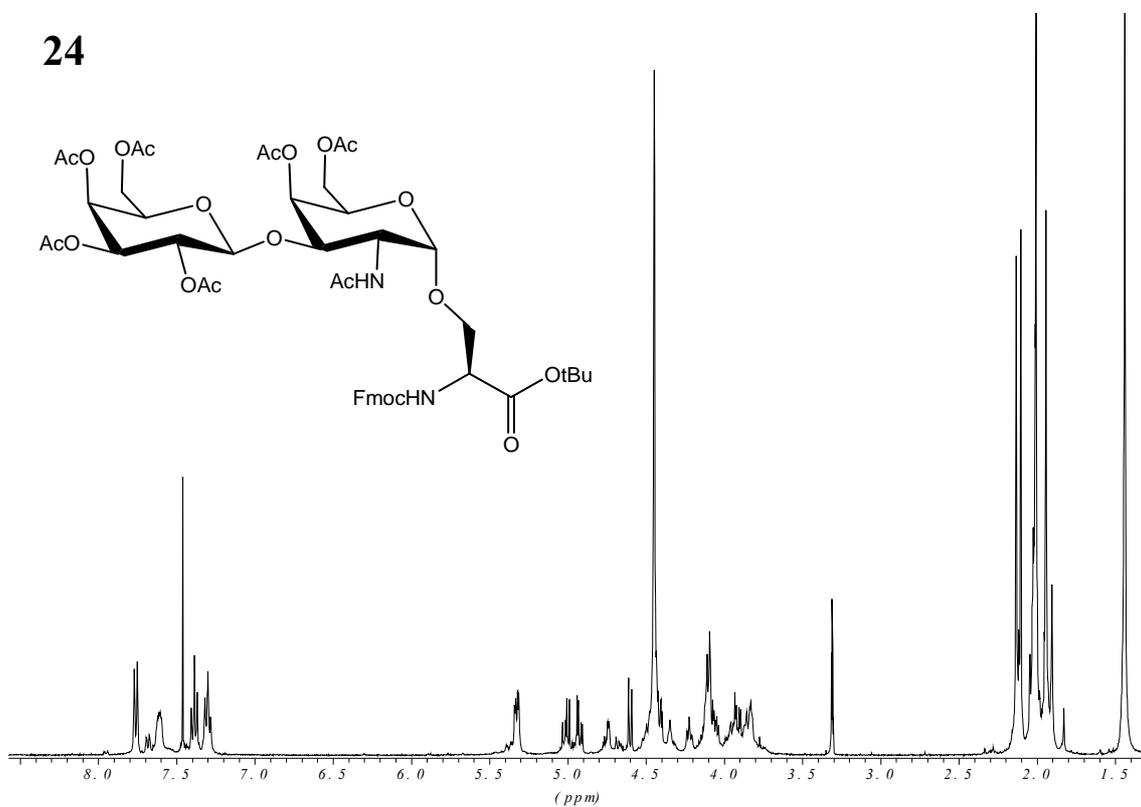
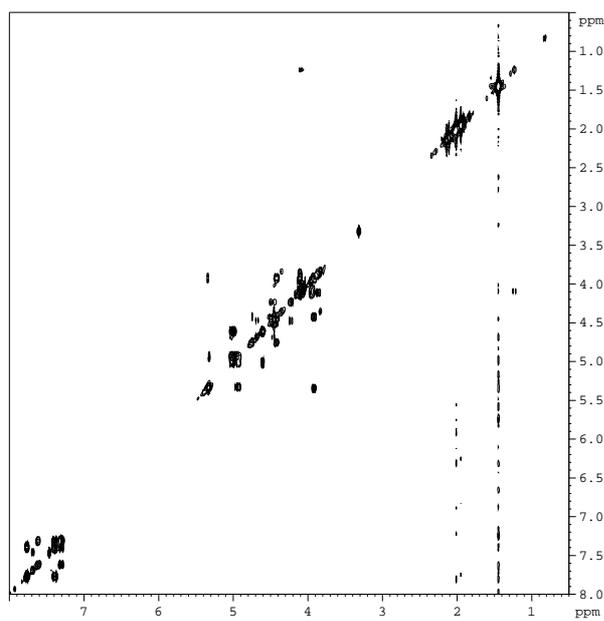
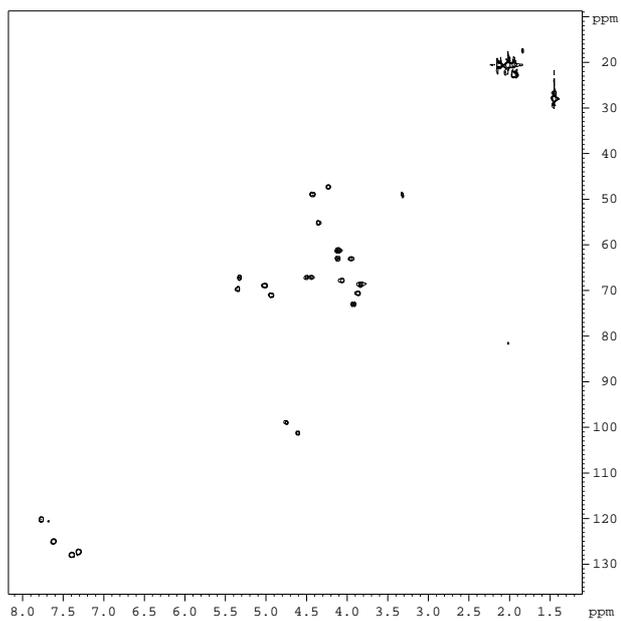
23: Fmoc-Ser($[\beta$ -Ac ₄ Gal-(1→3)]- α -GalNAc)- <i>Ot</i> Bu	-
24: Fmoc-Ser($[\beta$ -Ac ₄ Gal-(1→3)]- α -Ac ₂ GalNAc)- <i>Ot</i> Bu	232
25: Fmoc-Ser($[\beta$ -Ac ₄ Gal-(1→3)]- α -Ac ₂ GalNAc)-OH	233
26: NeuAc ₅ NAcCOOH	-
27: NeuAc ₅ NAcCOOBn	-
28: β -NeuAc ₄ 5NAcCOOBnCl	-
29: α -NeuAc ₄ 5NAcCOOBnXan	-
30: Fmoc-Ser($[\alpha$ -NeuAc ₄ 5AcCOOBn-(2→6)]- α -GalNAc)- <i>Ot</i> Bu	-
31: Fmoc-Ser($[\alpha$ -NeuAc ₄ 5NAcCOOBn-(2→6)]- α -GalAc ₂ NAc)- <i>Ot</i> Bu	-
32: Fmoc-Ser($[\alpha$ -NeuAc ₄ 5NAcCOOBn-(2→6)]- α -GalAc ₂ NAc)-OH	234
33: Fmoc-Ser($[\beta$ -Gal-(1→3)]- α -GalNAc-4,6- <i>O</i> -Bn)- <i>Ot</i> Bu	-
34: Fmoc-Ser($[\beta$ -6- <i>O</i> -TBDPS-Gal-(1→3)]- α -GalNAc-4,6- <i>O</i> -Bn)- <i>Ot</i> Bu	-
35: Fmoc-Ser($[\beta$ -4,6- <i>O</i> -Bn-Gal-(1→3)]- α -GalNAc-4,6- <i>O</i> -Bn)- <i>Ot</i> Bu	-
36: 1,2:3,4-Di- <i>O</i> -isopropyliden- α -D-galactopyranose	-
37: 6- <i>O</i> -Benzyl-1,2:3,4-Di- <i>O</i> -isopropyliden- α -D-galactopyranose	-
38: 6- <i>O</i> -Benzyl-D-galactose	-
39: 1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -Benzyl-D-galactopyranose	-
40: 2,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -Benzyl- α -D-galactopyranosylbromid	-
41: Fmoc-Ser($[\beta$ -6- <i>O</i> -BnAc ₃ Gal-(1→3)]- α -GalNAc-4,6- <i>O</i> -Bn)- <i>Ot</i> Bu	-
42: Fmoc-Ser($[\beta$ -6- <i>O</i> -BnGal-(1→3)]- α -GalNAc-4,6- <i>O</i> -Bn)- <i>Ot</i> Bu	-
43: Fmoc-Ser($[($ NeuAc ₄ 5NAcCOOBn-(2→3))- β -6 <i>OBn</i> Gal-(1→3)]- α -GalNAc-4,6 <i>OBn</i>)- <i>Ot</i> Bu	-
44: Fmoc-Ser($[($ NeuAc ₄ 5NAcCO ₂ Bn-(2→3))- β -6 <i>OBn</i> Ac ₂ Gal-(1→3)]- α -GalNAc-4,6 <i>OBn</i>)- <i>Ot</i> Bu	-
45: Fmoc-Ser($[($ α -NeuAc ₄ 5NAcCOOBn-(2→3))- β -6- <i>O</i> -Bn-Ac ₂ Gal-(1→3)]- α -GalNAc)- <i>Ot</i> Bu	-
46: Fmoc-Ser($[($ α -NeuAc ₄ 5NAcCO ₂ Bn-(2→3))- β -Ac ₂ Gal6 <i>OBn</i> -(1→3)]- α -Ac ₂ GalNAc)- <i>Ot</i> Bu	235
47: Fmoc-Ser($[($ α -NeuAc ₄ 5NAcCO ₂ Bn-(2→3))- β -Ac ₂ Gal6 <i>OBn</i> -(1→3)]- α -Ac ₂ GalNAc)-OH	236
48: Fmoc-Ser($[\beta$ -Ac ₄ Gal-(1→3)] $[\alpha$ -NeuAc ₄ 5NAcCOOBn-(2→6)]- α -AcGalNAc)- <i>Ot</i> Bu	-
49: Fmoc-Ser($[\beta$ -6- <i>O</i> -BnAc ₃ Gal-(1→3)]- α -GalNAc)- <i>Ot</i> Bu	-

50: Fmoc-Ser($[\beta\text{-Ac}_4\text{Gal-(1}\rightarrow\text{3)}][\alpha/\beta\text{-NeuAc}_4\text{5NAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{6)}]\text{-}\alpha\text{-GalNAc-O}t\text{Bu}$)	-
51: Fmoc-Ser($[\beta\text{-6-OBnAc}_3\text{Gal-(1}\rightarrow\text{3)}][\alpha/\beta\text{-NeuAc}_4\text{5NAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{6)}]\text{-}\alpha\text{-GalNAc-O}t\text{Bu}$)	237
52: Fmoc-Ser($[\beta\text{-Ac}_4\text{Gal-(1}\rightarrow\text{3)}][\alpha/\beta\text{-NeuAc}_4\text{5NAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{6)}]\text{-}\alpha\text{-GalNAc-OH}$)	238
53: Fmoc-Ser($[\beta\text{-Ac}_4\text{Gal-(1}\rightarrow\text{3)}][\alpha\text{-NeuAc}_4\text{5NAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{6)}]\text{-}\alpha\text{-AcGalNAc-OH}$)	239
54: Fmoc-Ser($[\beta\text{-6-O-Ac}_3\text{Gal-(1}\rightarrow\text{3)}][\alpha\text{-NeuAc}_4\text{5NAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{6)}]\text{-}\alpha\text{-GalNAc-OH}$)	-
55: Fmoc-Ser($[\alpha\text{-NeuAc}_4\text{5NAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{6)}][(\alpha\text{-NeuAc}_4\text{5NAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{3)})\text{-}\beta\text{-6-O-Bn-Ac}_2\text{Gal-(1}\rightarrow\text{3)}]\text{-}\alpha\text{-GalNAc-O}t\text{Bu}$)	240
56: Fmoc-Ser($[\alpha\text{-NeuAc}_4\text{5NAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{6)}][(\alpha\text{-NeuAc}_4\text{5NAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{3)})\text{-}\beta\text{-6-O-Bn-Ac}_2\text{Gal-(1}\rightarrow\text{3)}]\text{-}\alpha\text{-GalNAc-OH}$)	241
57: Trimethylsilylethen	-
58: 2-Trimethylsilyloxiran	-
59: (2-p-Ethoxyethoxyphenyl-2-trimethylsilyl)ethanol	-
60: (2-p-Hydroxyphenyl-2-trimethylsilyl)ethanol	-
61: 4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxyessigsäureallylester	-
62: Fmoc-Leu-PTMSEL-Allylester	242
63: Fmoc-Leu-PTMSEL	243
64: Fmoc-Leu-PTMSEL-AMPS-Konjungat	-
65: Fmoc-Val-PTMSEL-Allylester	-
66: Fmoc-Val-PTMSEL	-
67: Fmoc-Val-PTMSEL-AMPS-Konjungat	-
68: Fmoc-Ile-PTMSEL-Allylester	-
69: Fmoc-Ile-PTMSEL	-
70: Fmoc-Ile-PTMSEL-AMPS-Konjungat	-
71: Ac-AALD(<i>t</i> Bu)S(Ac ₃ GalNAc)Q(Trt)GAI-PTMSEL	-
72: Ac-AALD(<i>t</i> Bu)S(Ac ₃ GalNAc)Q(Trt)GAI-OH	-
73: Ac-AALDS(GalNAc)QGAI-OH	244
74: Ac-AVH(Trt)H(Trt)LQ(Trt)LAAL-PTMSEL	-
75: Ac-AVH(Trt)H(Trt)LQ(Trt)LAAL-OH	-
76: Ac-Q(Trt)GAIVD(<i>t</i> Bu)GPVPI-PTMSEL	-

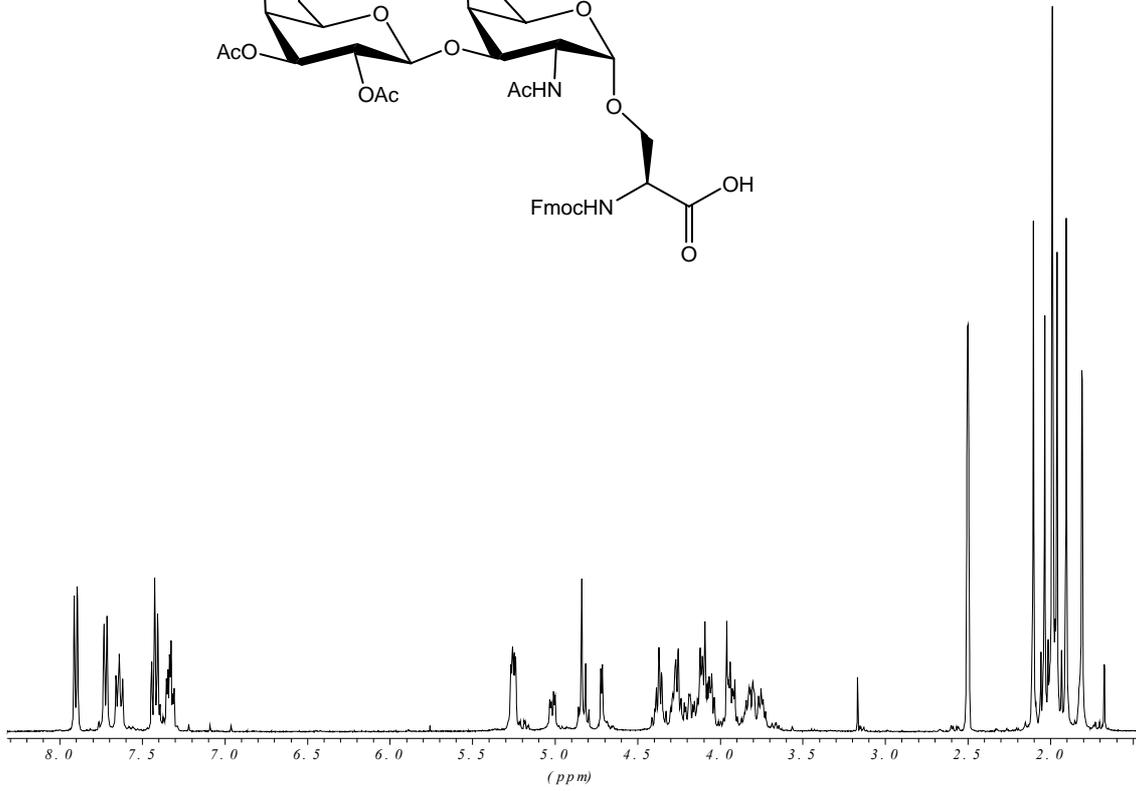
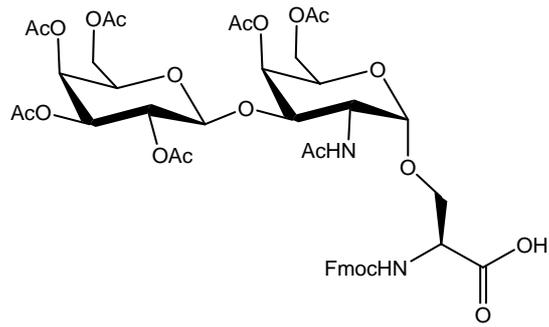
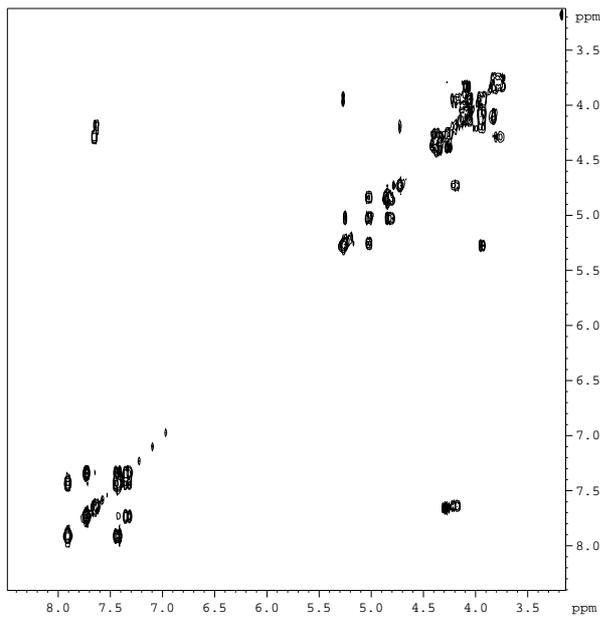
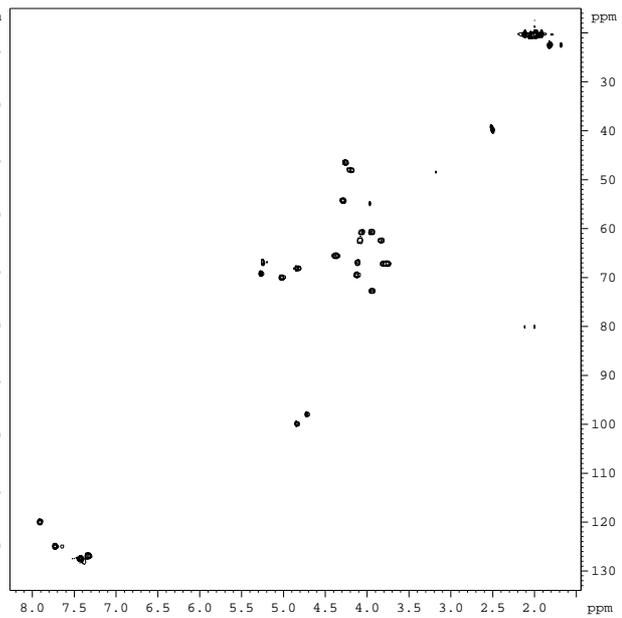
77: Ac-Q(Trt)GAIVD(<i>t</i> Bu)GPVPI-OH	-
78: Ac-QGAIVDGPVPI-OH	246
79: H-D(<i>t</i> Bu)S(Ac ₃ GalNAc)Q(Trt)GAIVD(<i>t</i> Bu)GPVPI-PHB-Tentagel	-
80: H-DS(Ac ₃ GalNAc)QGAIVDGPVPI-OH	-
81: Boc-AVH(Trt)H(Trt)LQ(Trt)LAAL-PTMSEL	-
82: Boc-AVH(Trt)H(Trt)LQ(Trt)LAAL-OH	-
83: H-AVHHLQLAALDS(α -Ac ₃ GalNAc)QGAIVDGPVPI-OH	-
84: H-AVHHLQLAALDS(α -GalNAc)QGAIVDGPVPI-OH	247
85: H-LAALDSQGAIV-OH	249
86: Boc-LAALD(<i>t</i> Bu)S(α -Ac ₃ GalNAc)Q(Trt)GAIV-OH	-
87: Ac-S(α -Ac ₃ GalNAc)Q(Trt)GAIV-OH	-
88: H-LAALDS(α -Ac ₃ GalNAc)QGAIV-OH	251
89: H-LAALDS(T _N)QGAIV-OH	252
90: H-LAALDS(T _{ges.})QGAIV-OH	254
91: Ac-QGAIV-OH	-
92: H-LAALDS(T)QGAIV-OH	255
93: H-LAALDS(α -NeuAc ₄ -4-NAc-COOBn-(2→6)- α -Ac ₂ GalNAc)QGAIV-OH	257
94: H-LAALDS((2-6)-ST _N)QGAIV-OH	258
95: H-LAALDS((2→6)-ST _{ges.})QGAIV-OH	260
96: H-LAALDS((2→6)-ST-4OAc)QGAIV-OH	261
97: H-LAALDS(2,3-ST _{ges.})QGAIV-OH	263
98: H-LAALDS(2,3-ST)QGAIV-OH	-
99: Fmoc-LAALDS(2,3-ST _{ges.})QGAIV-OH	264
100: H-LAALDS(2,3-ST-4OAc)QGAIV-OH	265
101: Fmoc-LAALDS(S ₂ T _{ges.})QGAIV-OH	267
102: H-LAALDS(S ₂ T-4OAc)QGAIV-OH	268

7.2 Spektren

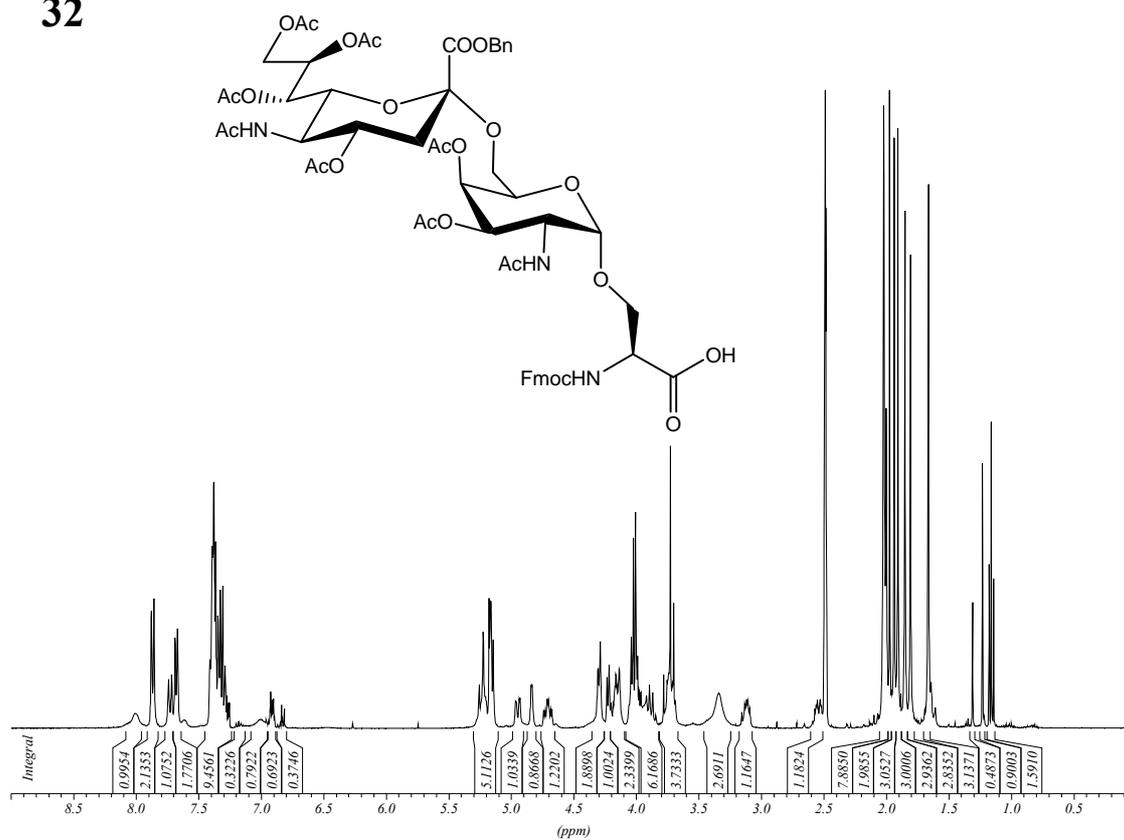
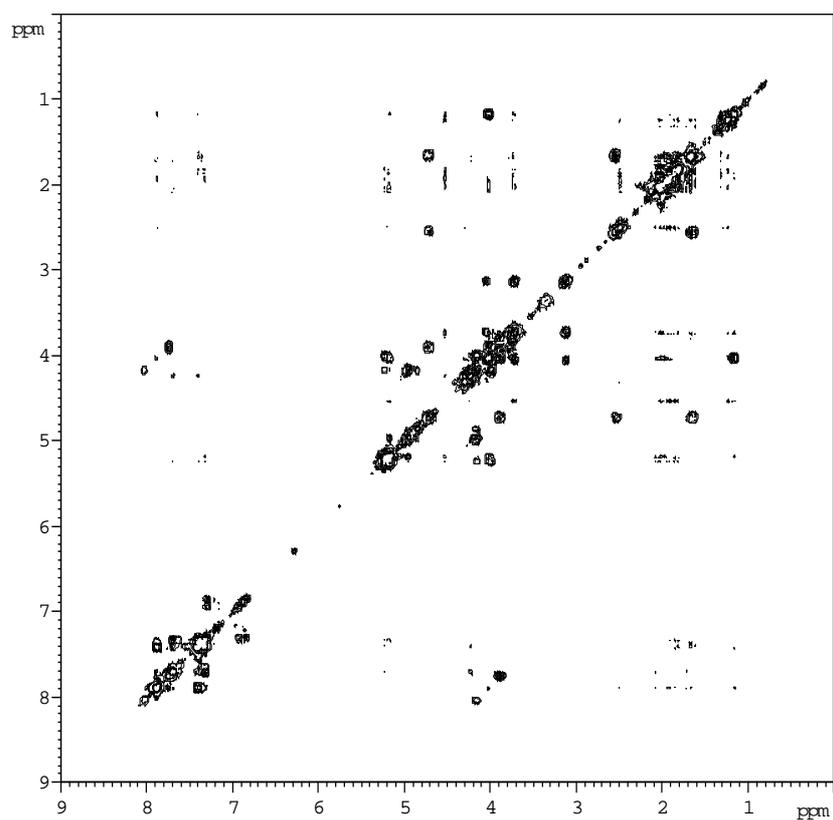
24

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

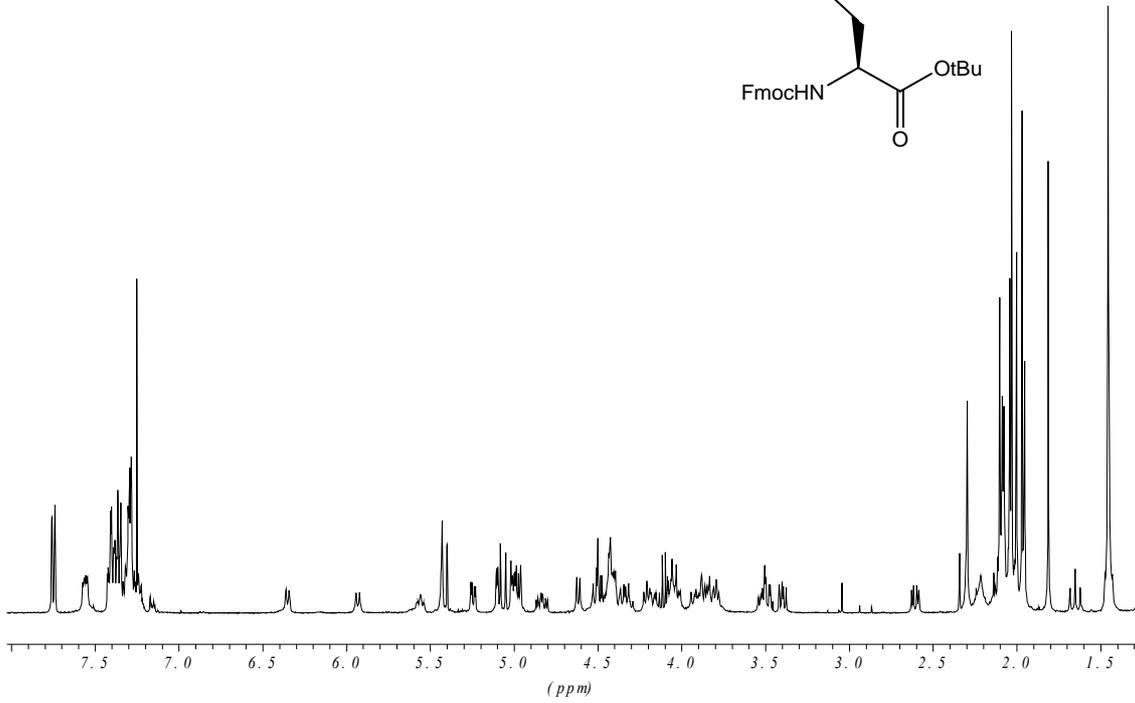
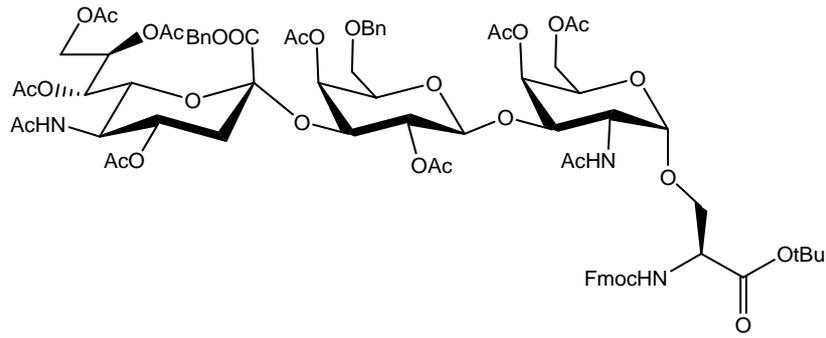
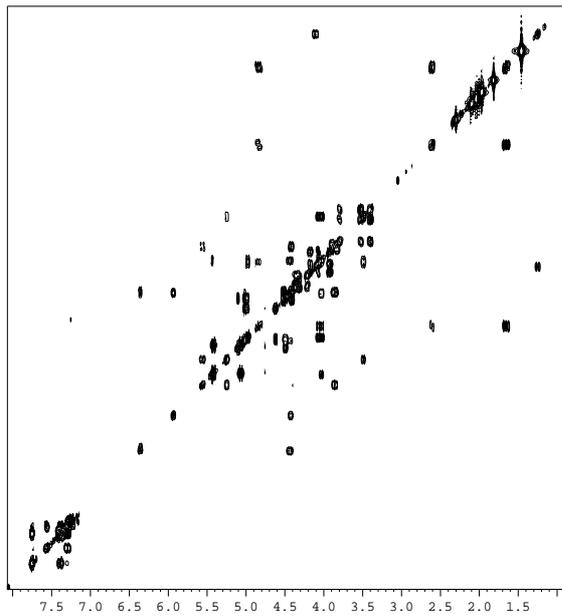
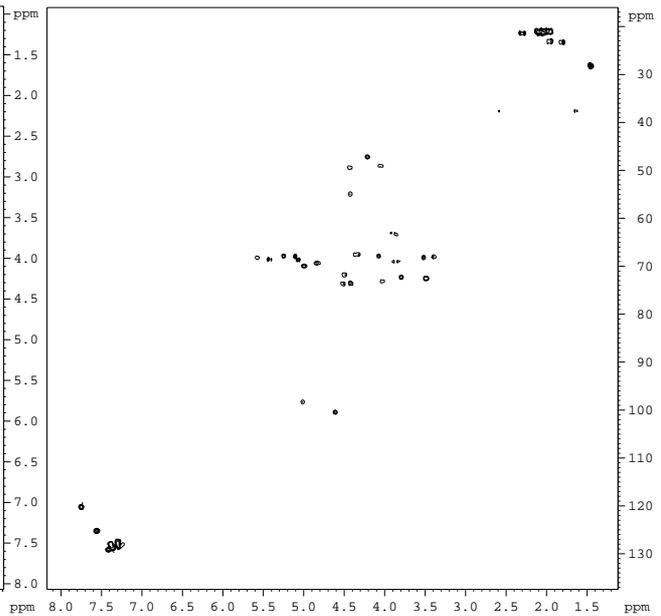
25

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

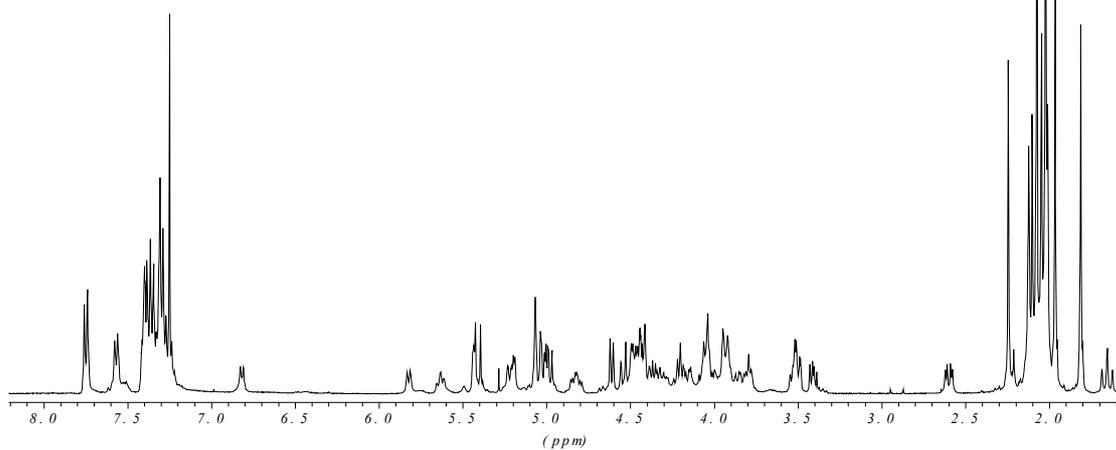
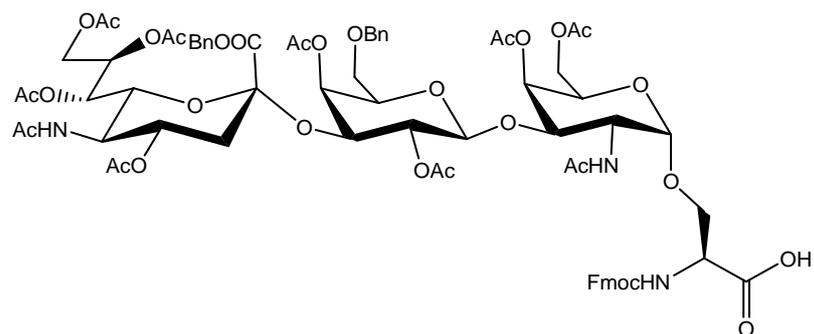
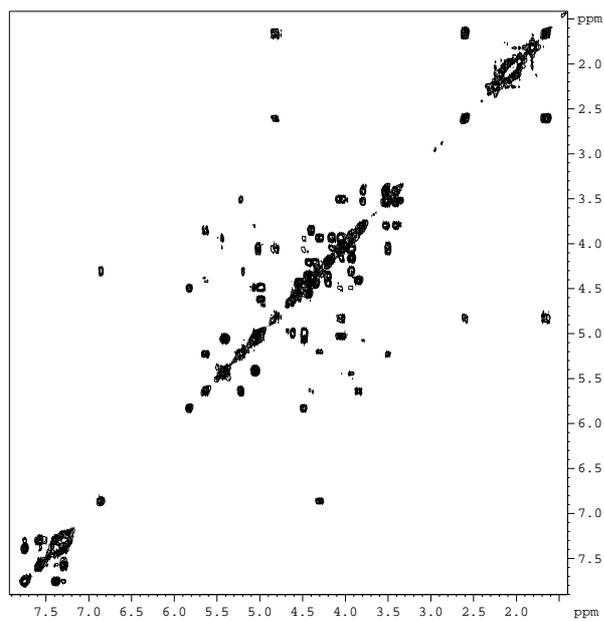
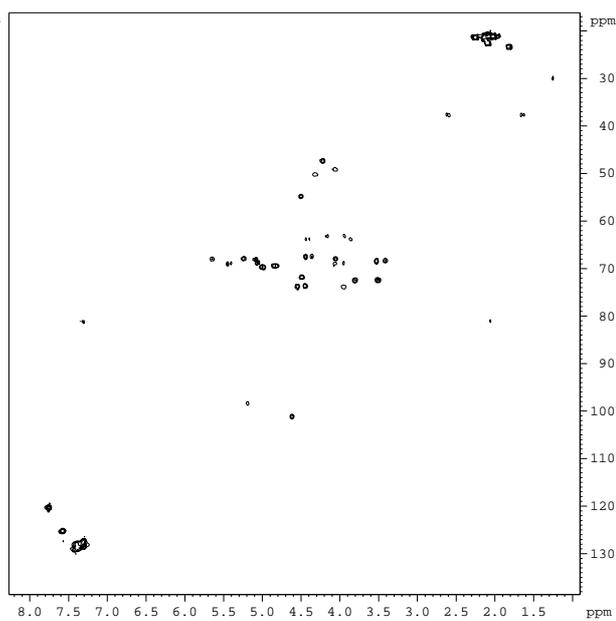
32

 $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ 

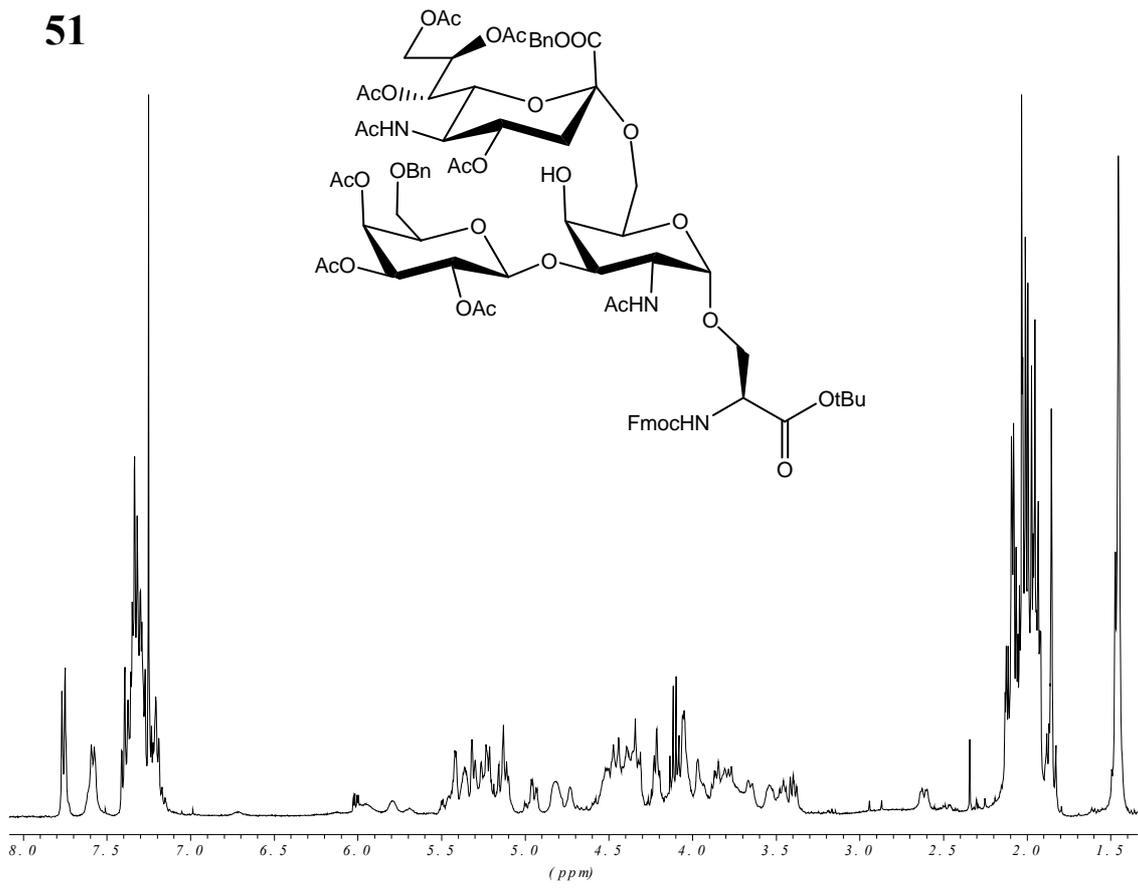
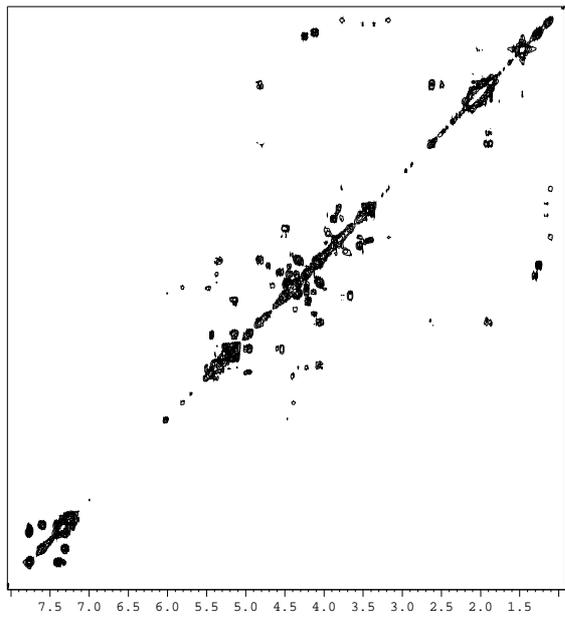
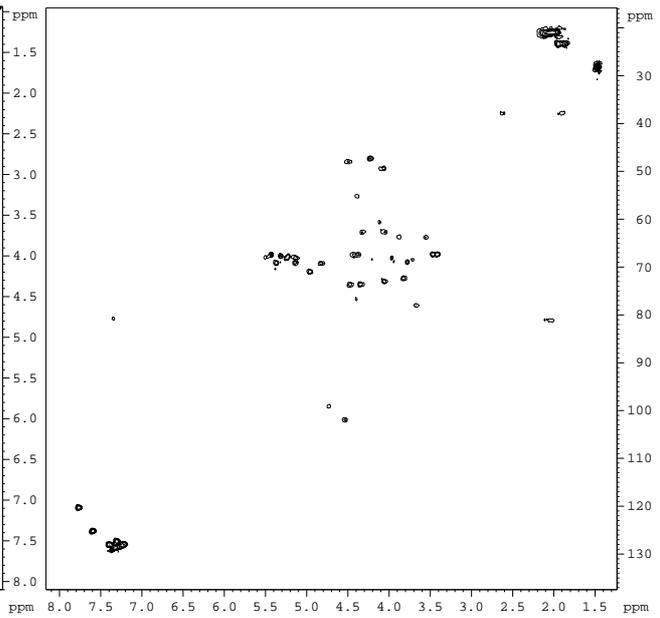
46

¹H-¹H-COSY¹H-¹³C-HMQC

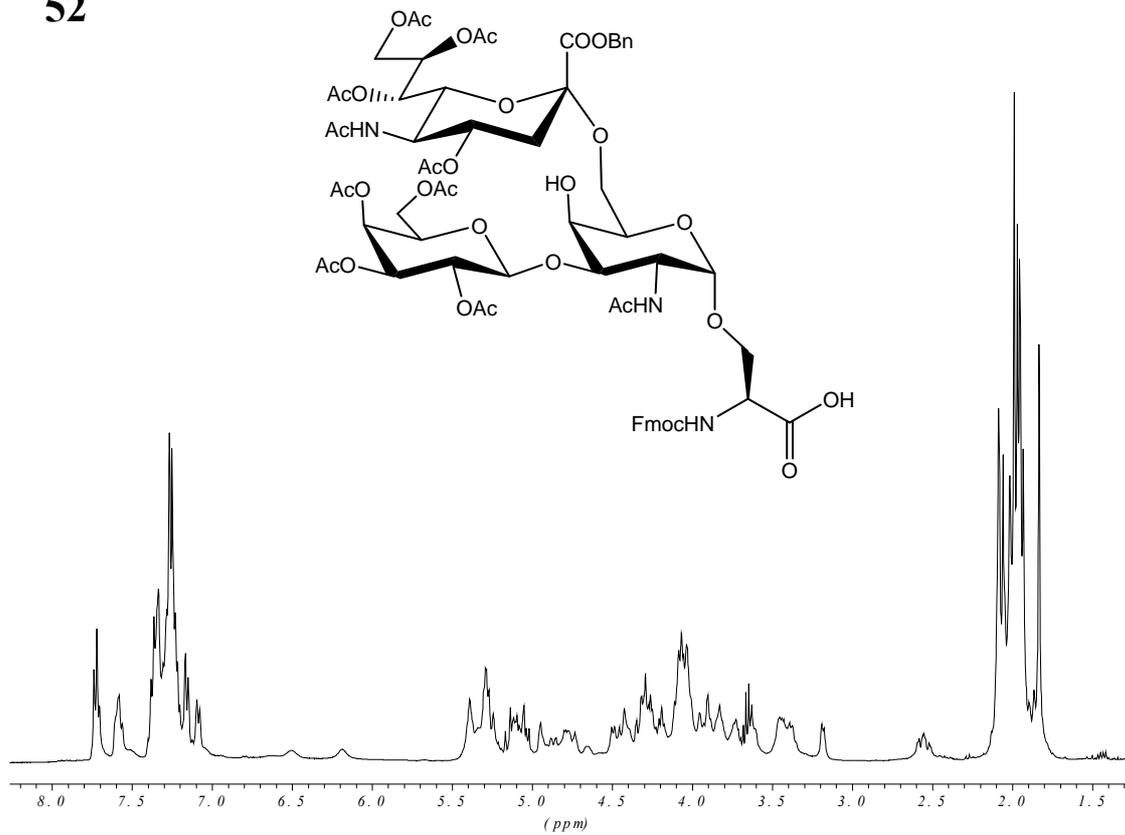
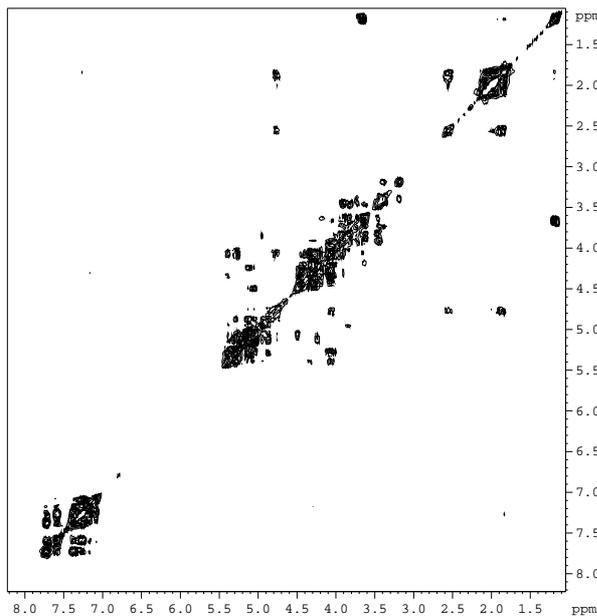
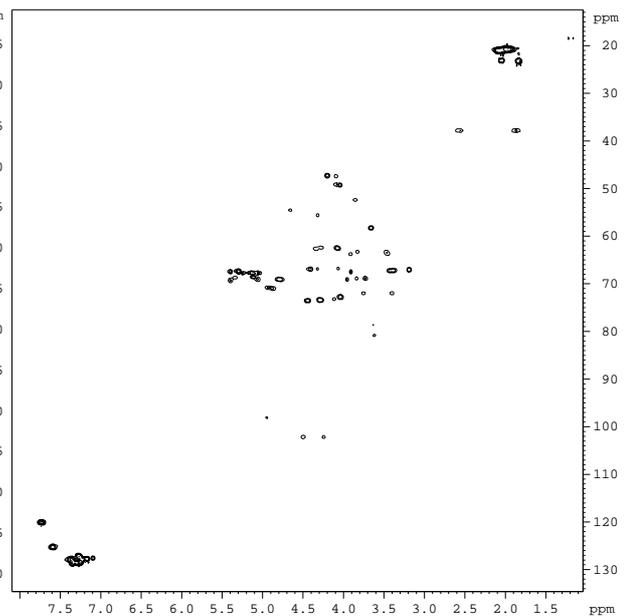
47

 $^1\text{H}-^1\text{H-COSY}$  $^1\text{H}-^{13}\text{C-HMQC}$ 

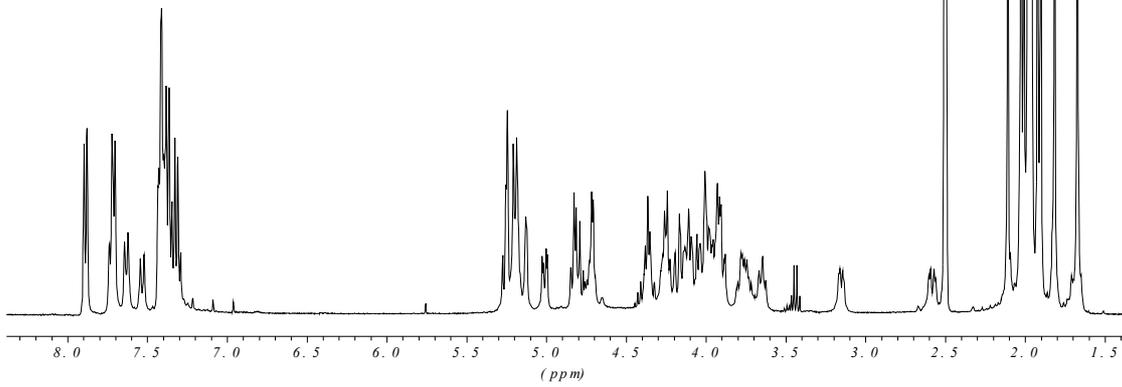
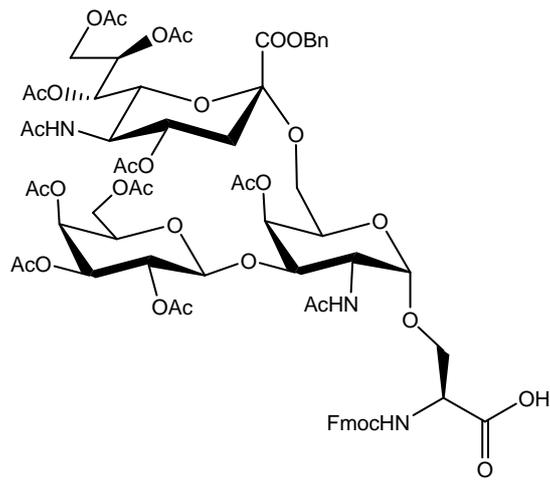
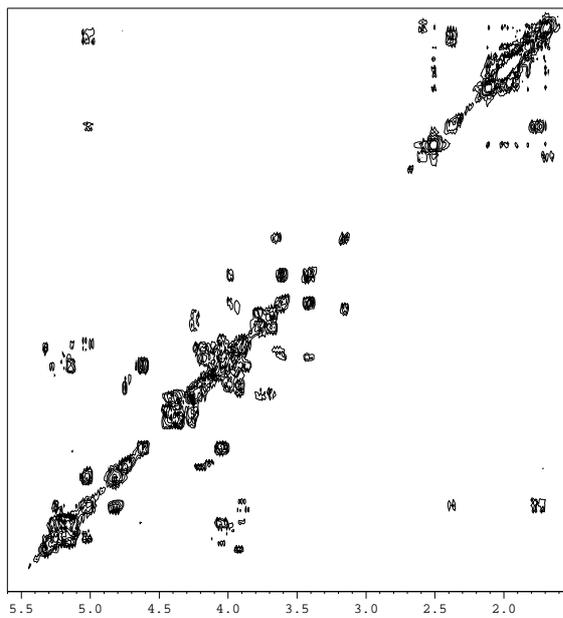
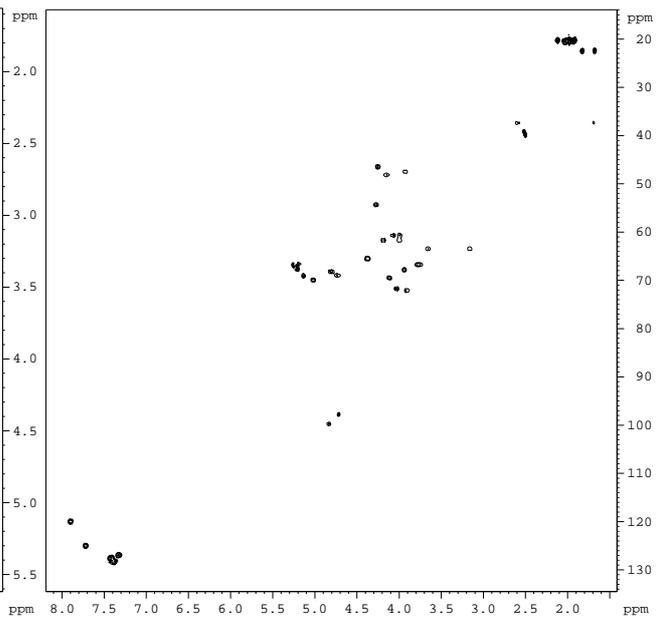
51

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

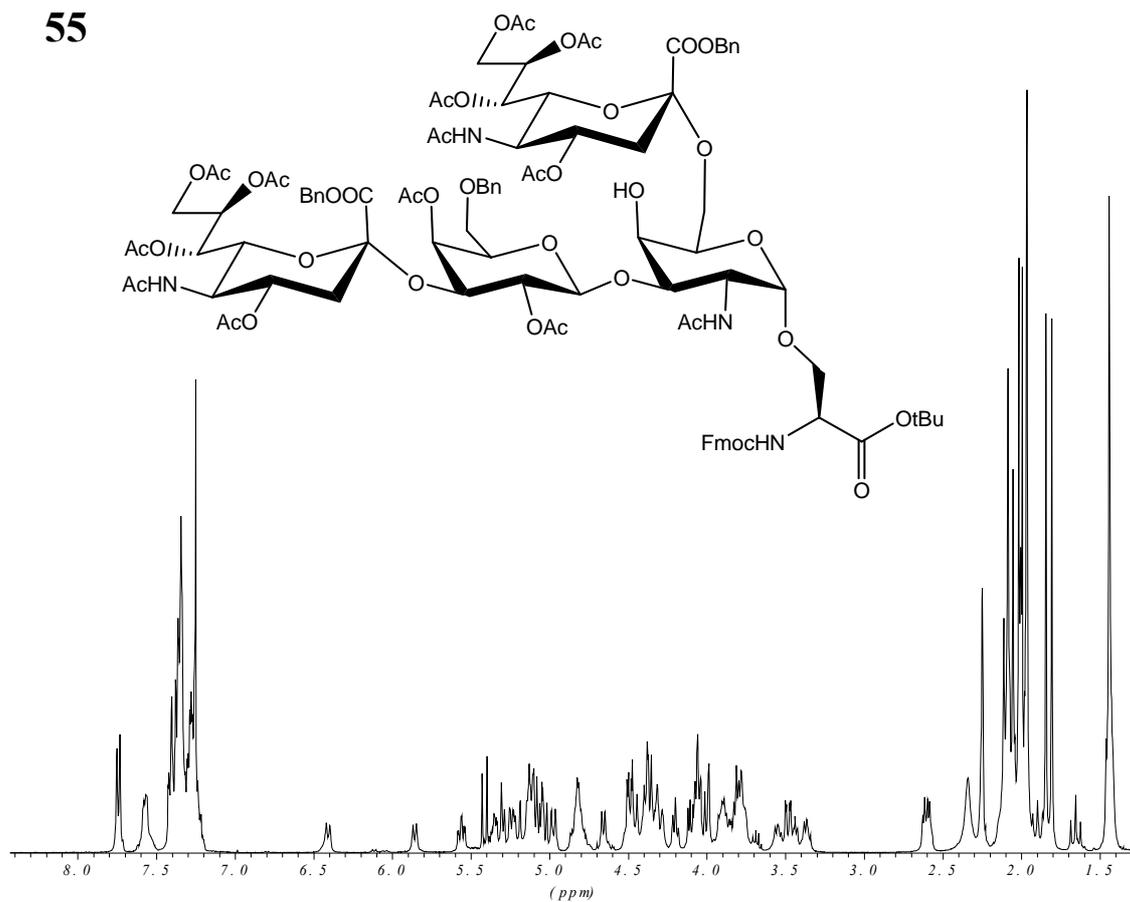
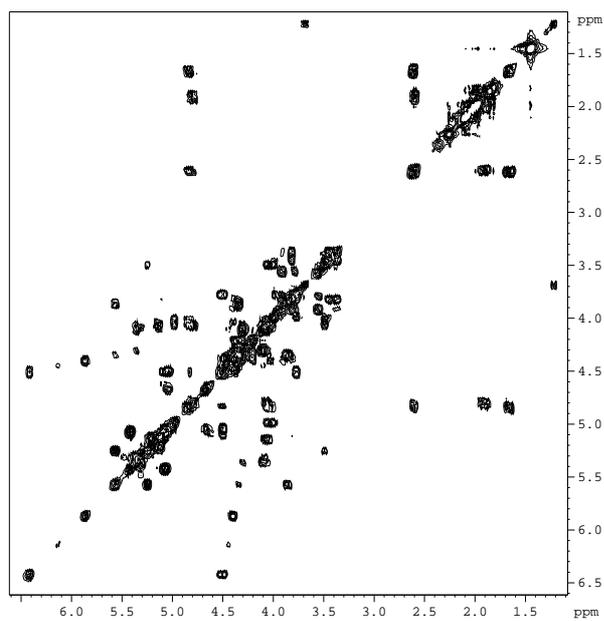
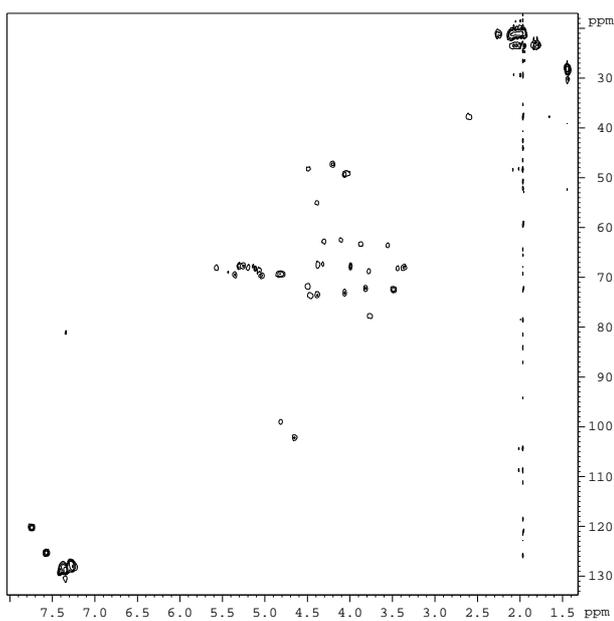
52

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

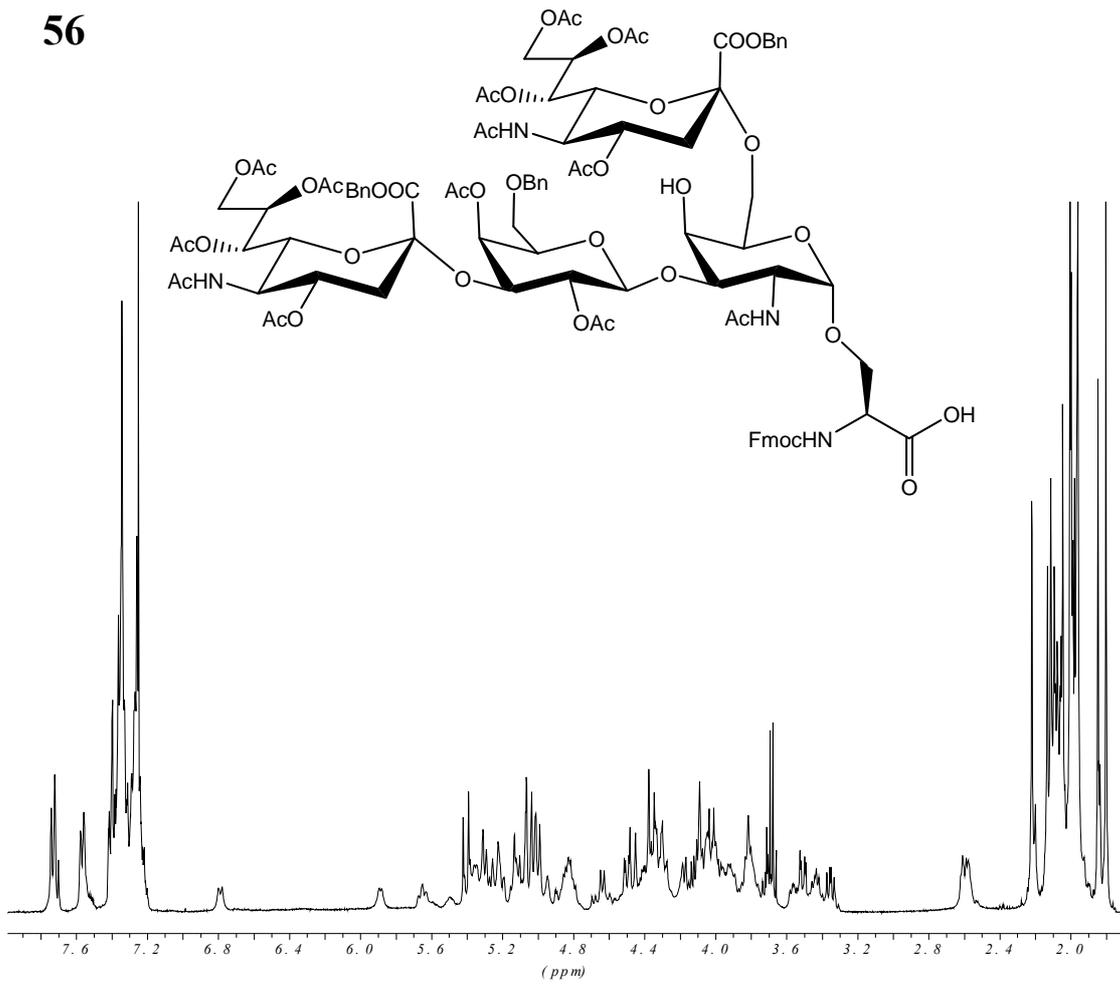
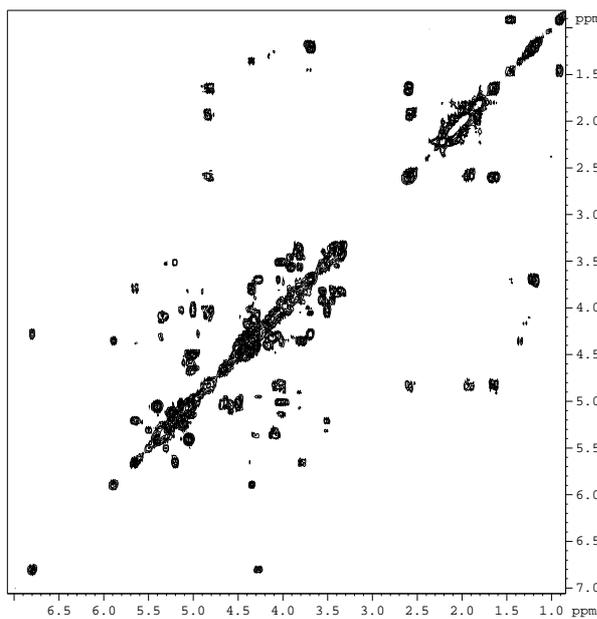
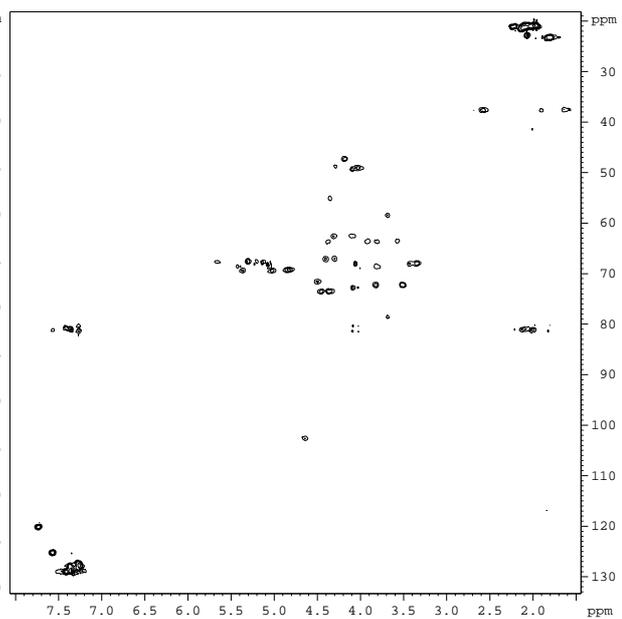
53

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

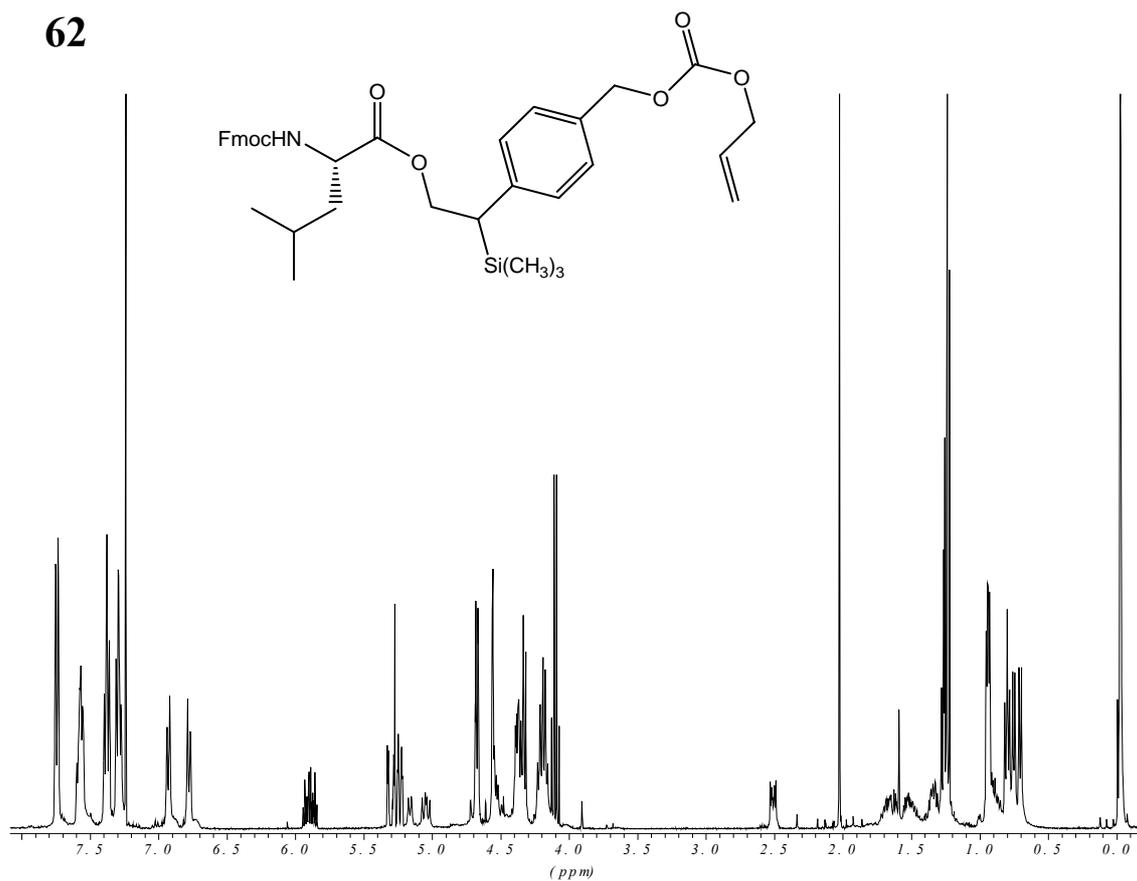
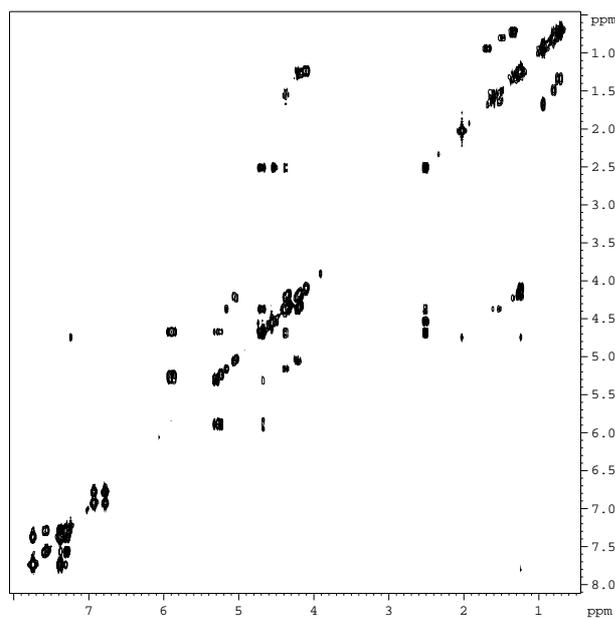
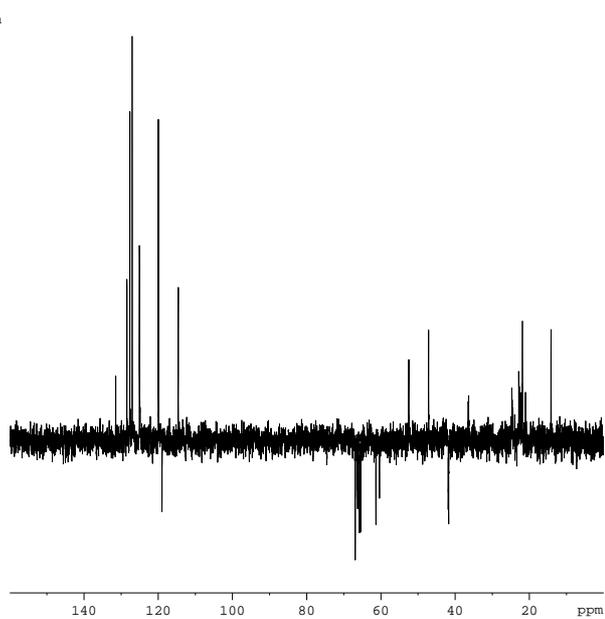
55

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

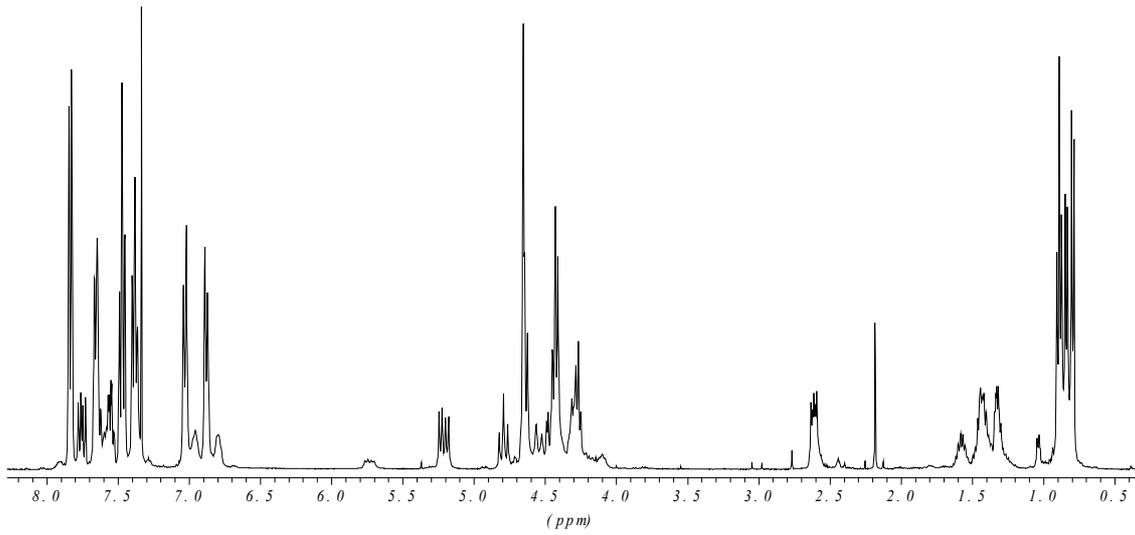
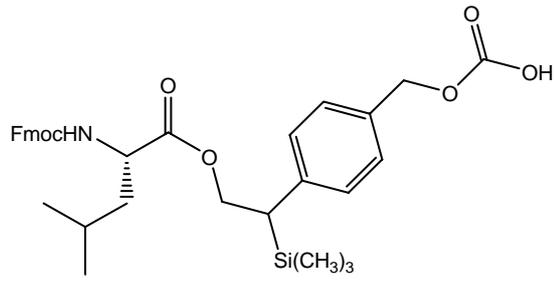
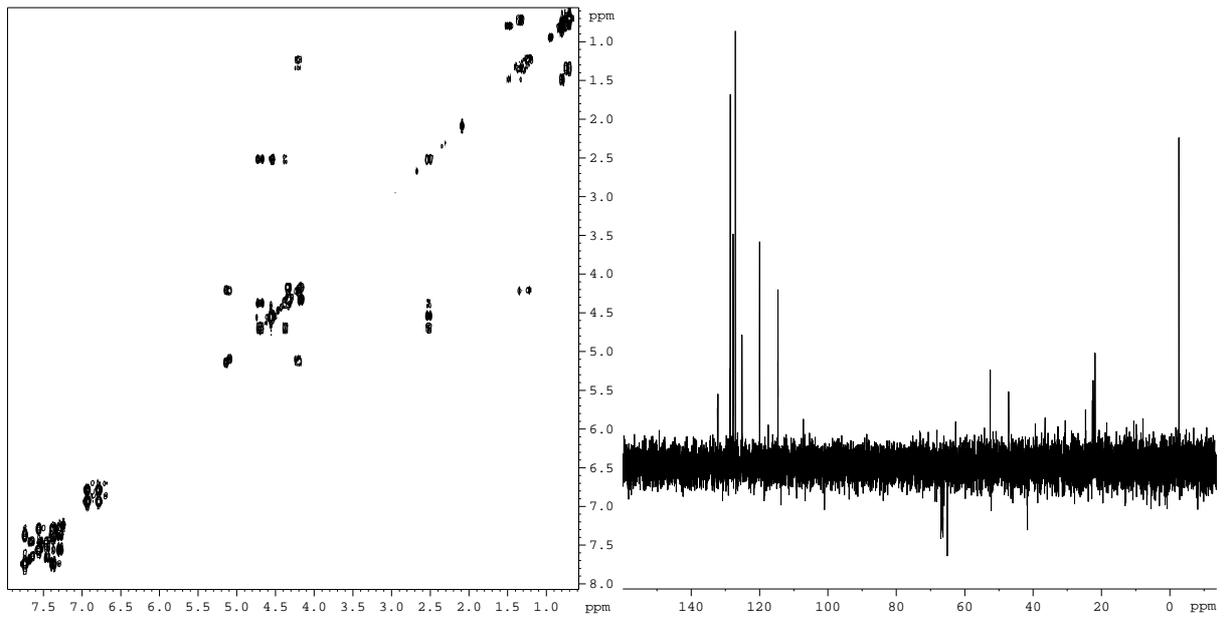
56

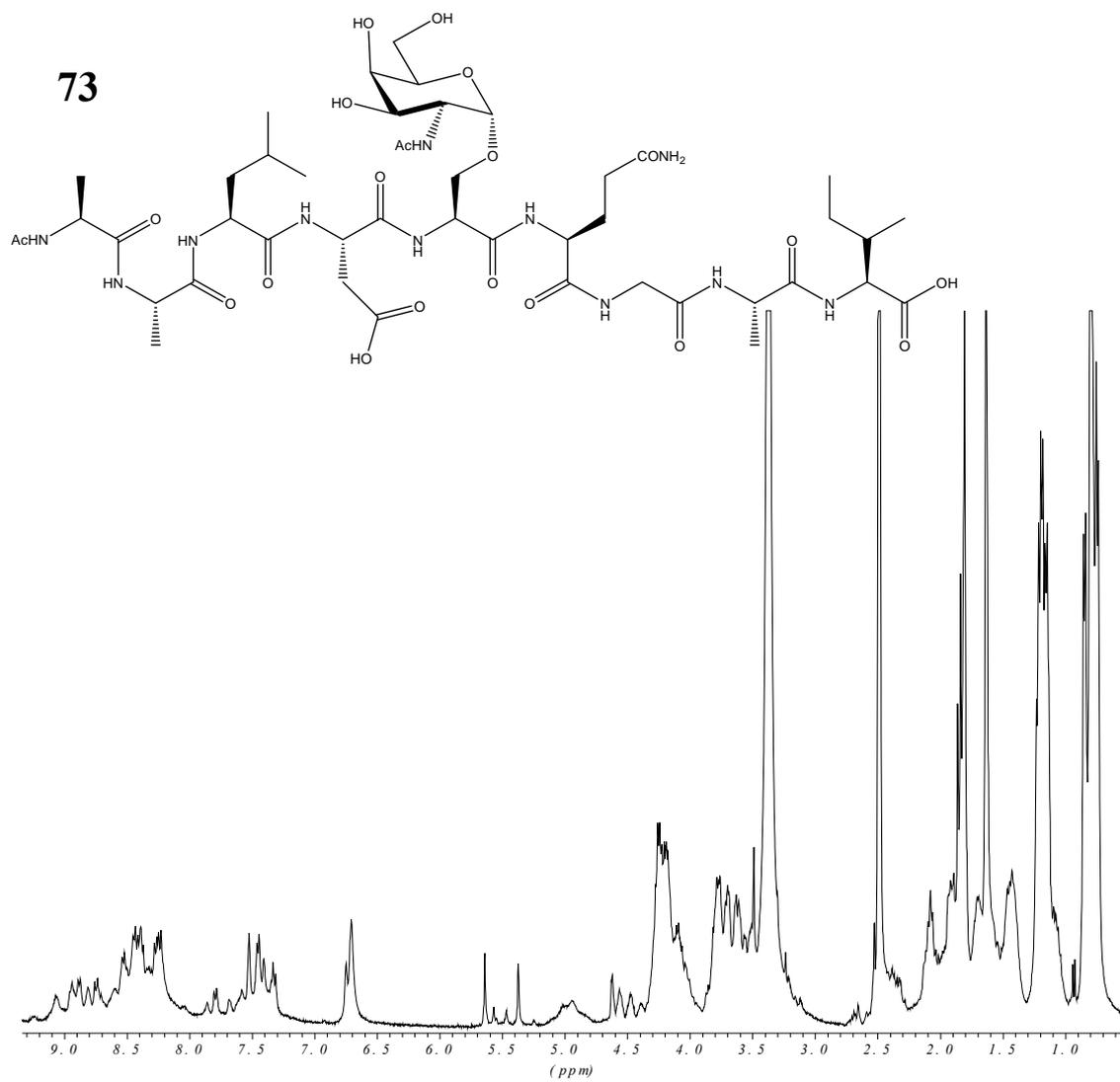
 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

62

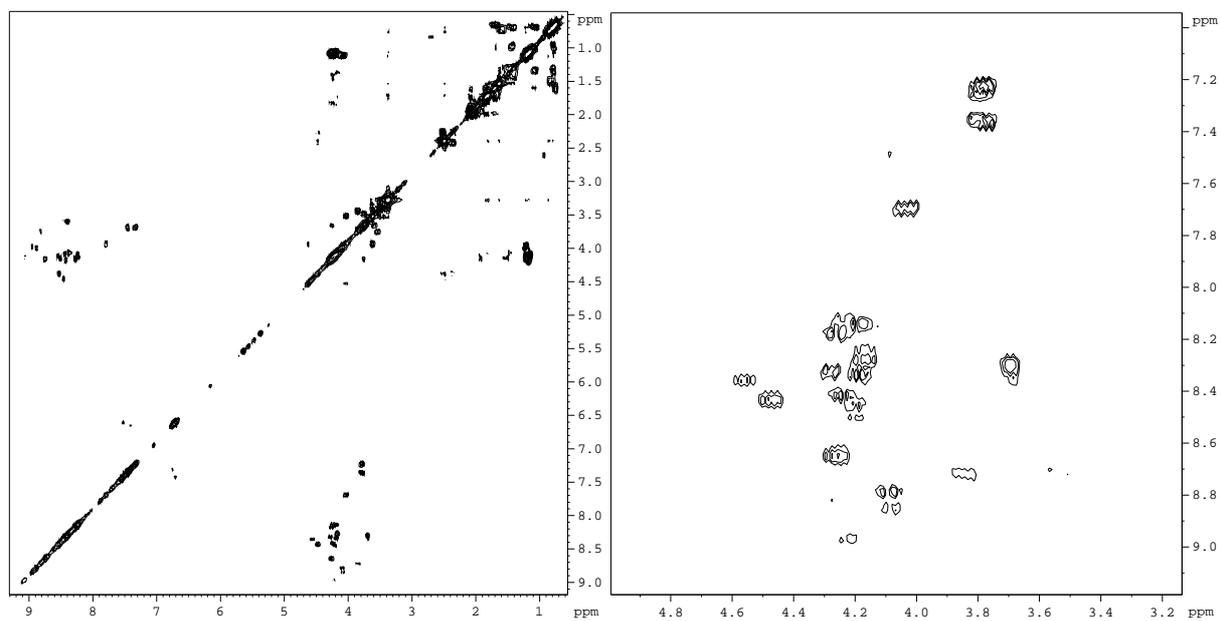
 ^1H - ^1H -COSY ^{13}C -DEPT

63

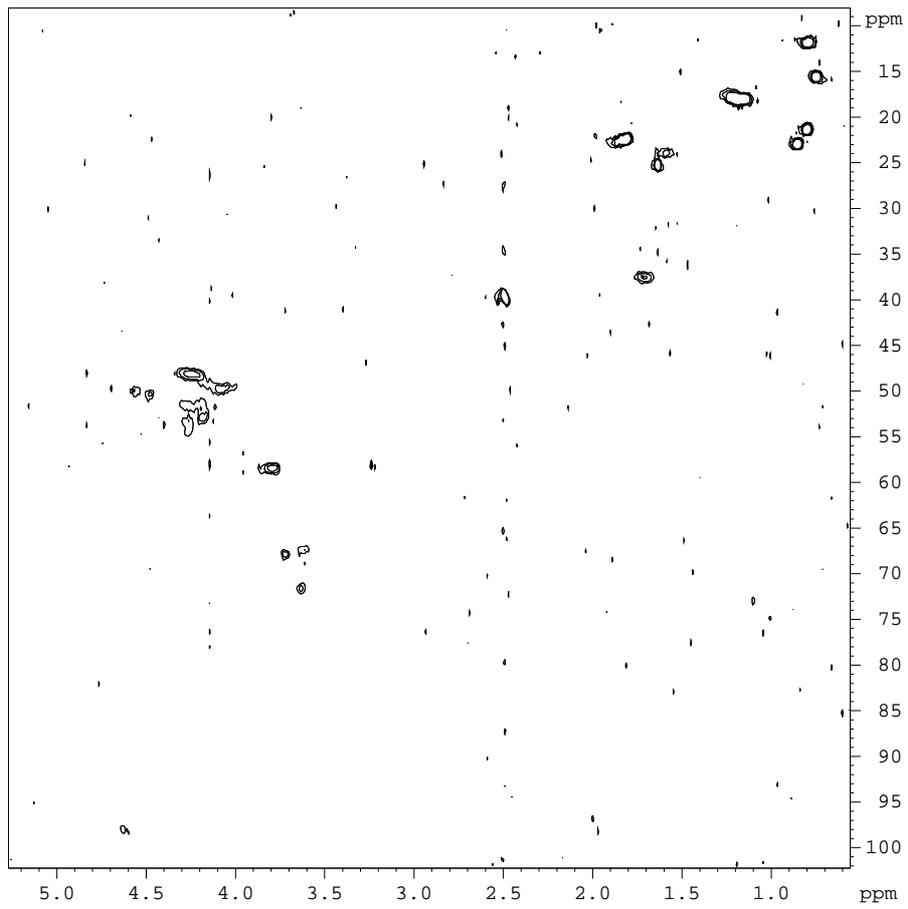
¹H-¹H-COSY¹³C-DEPT



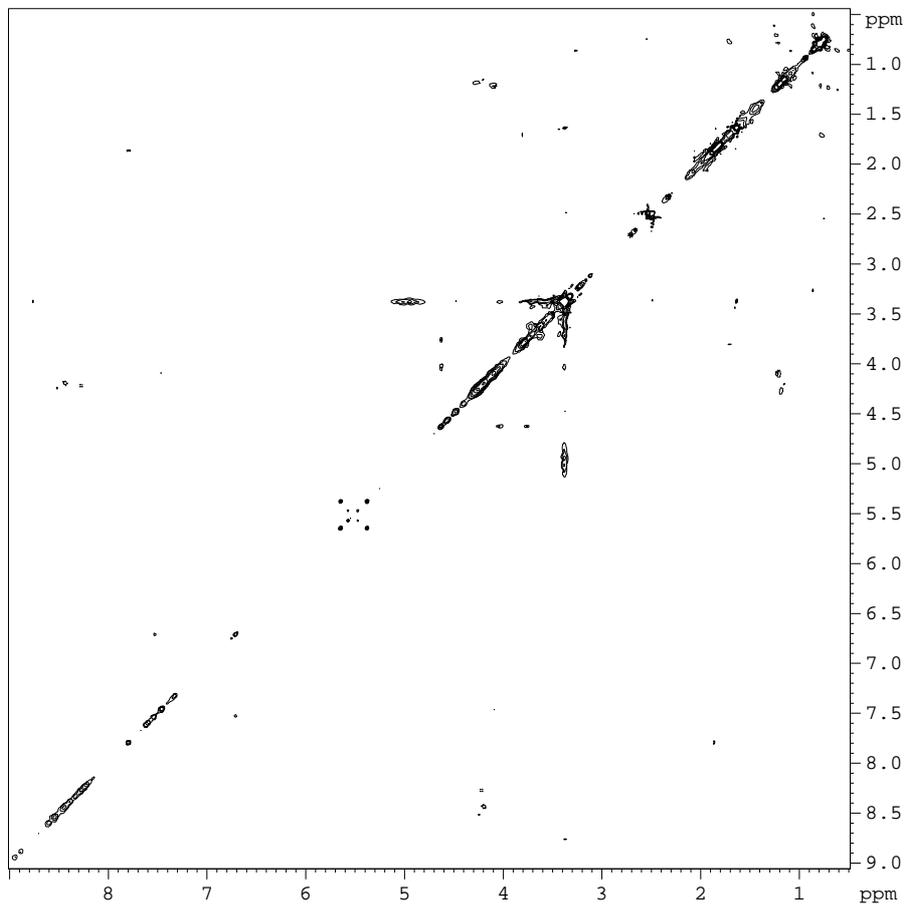
¹H-¹H-COSY



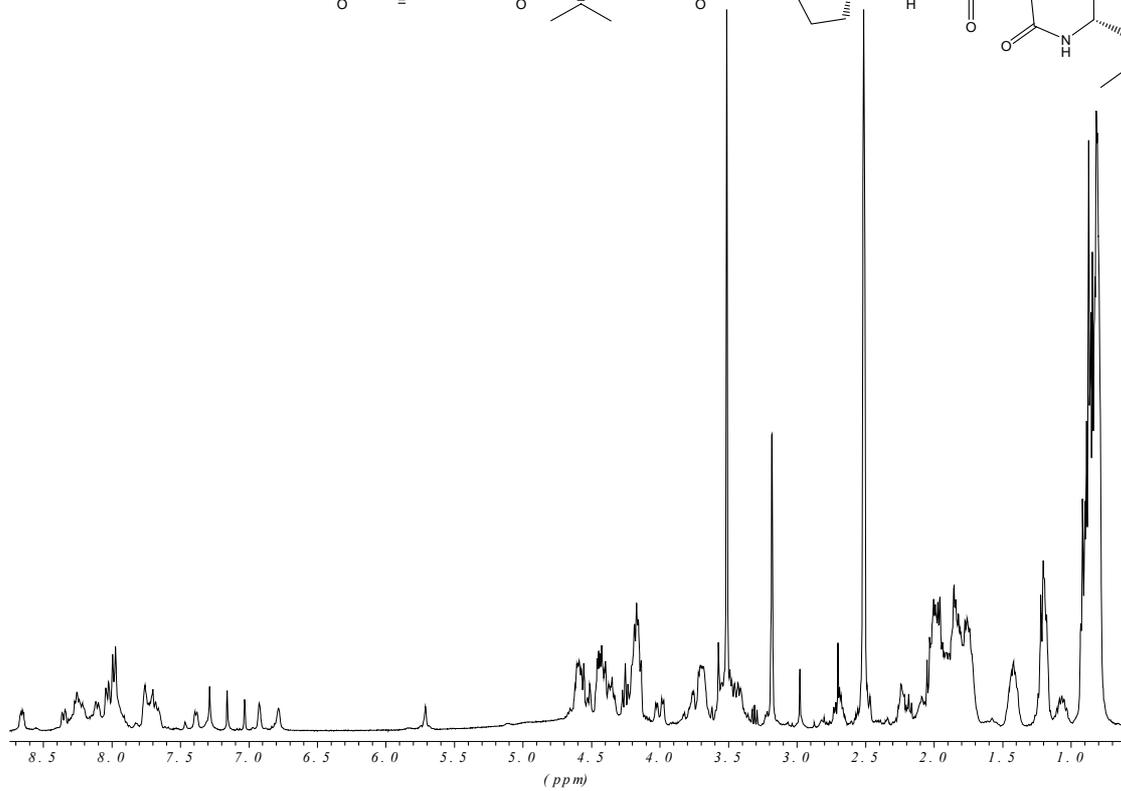
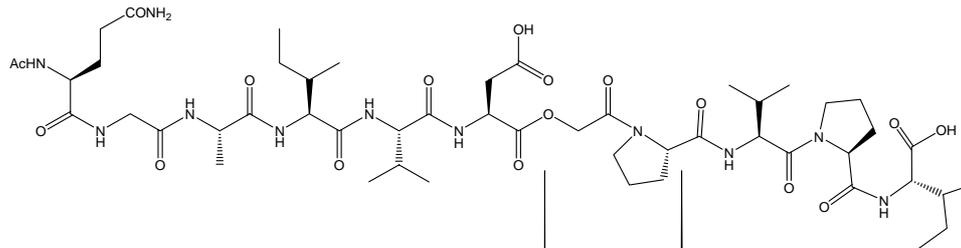
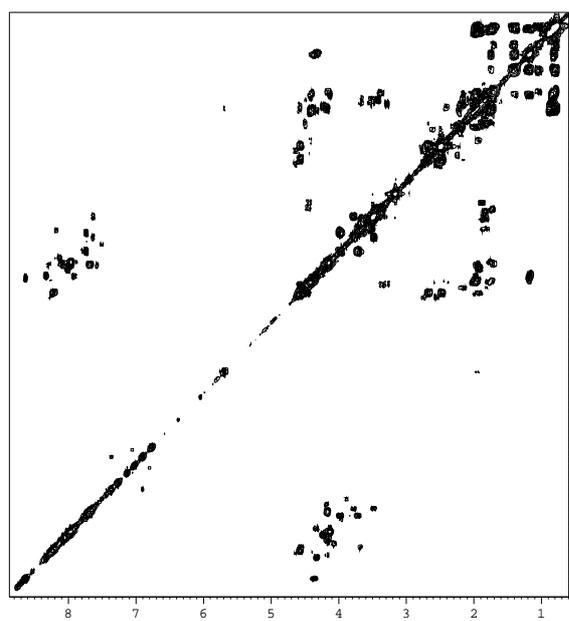
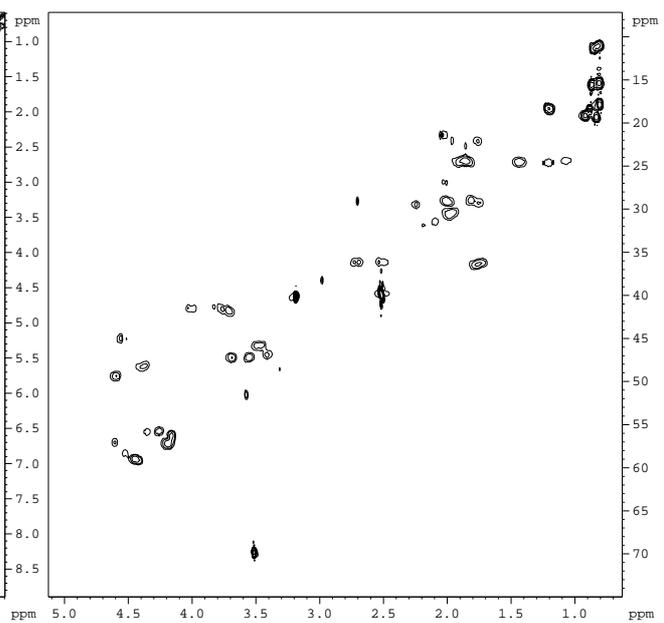
$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -
H
M
Q
C

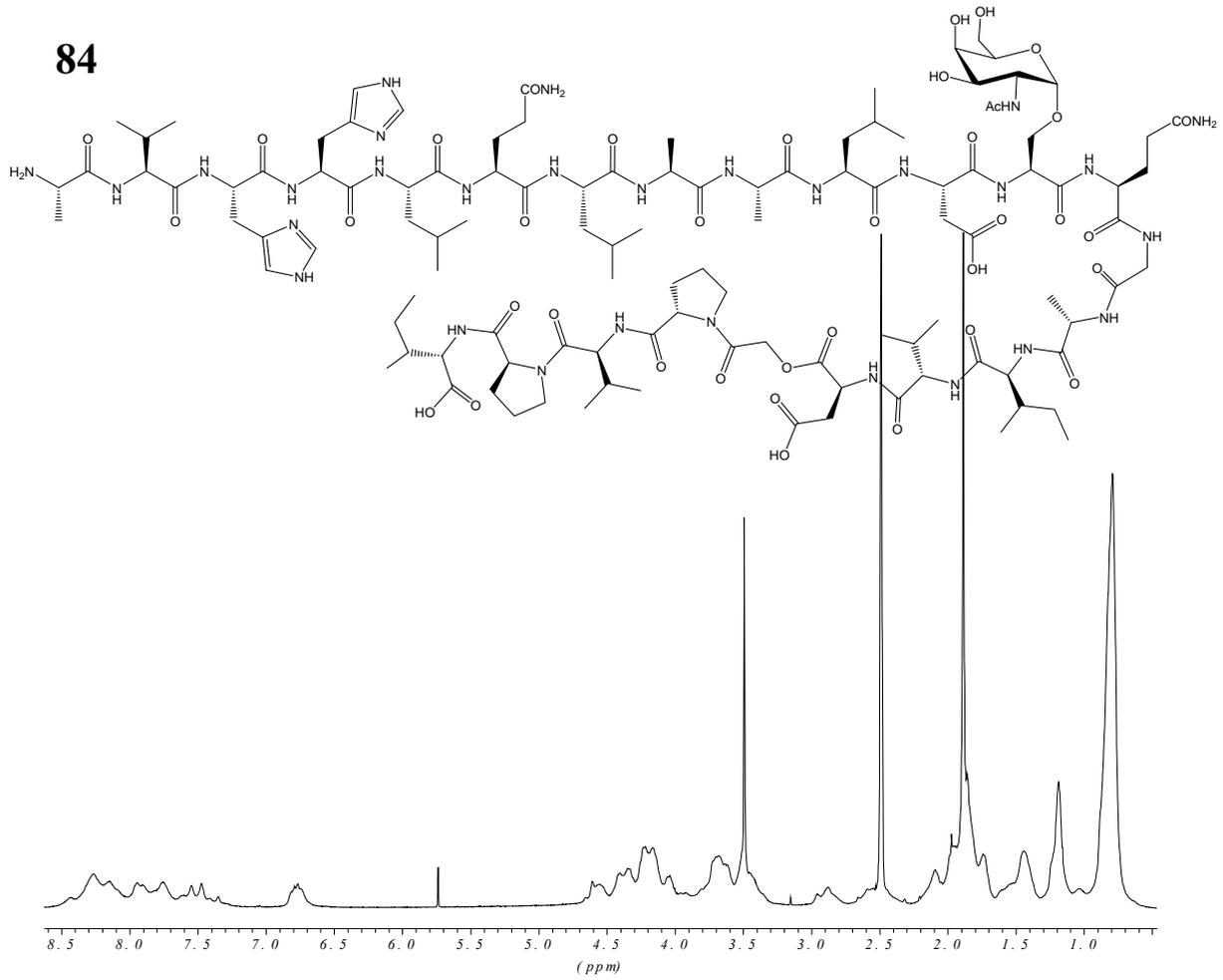
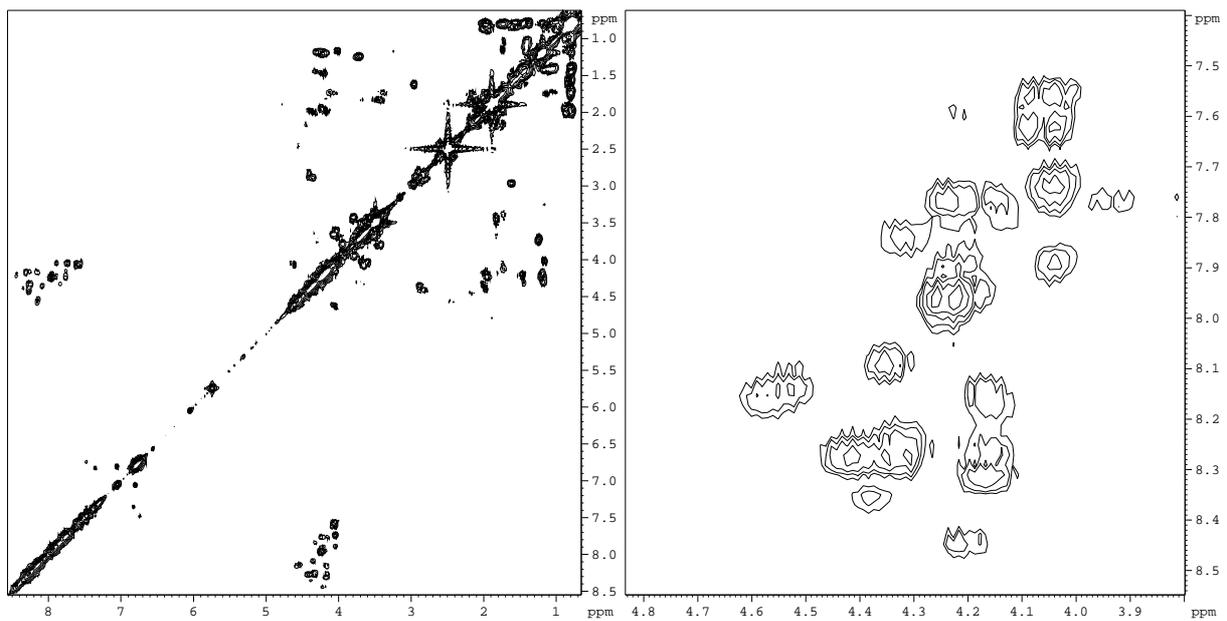


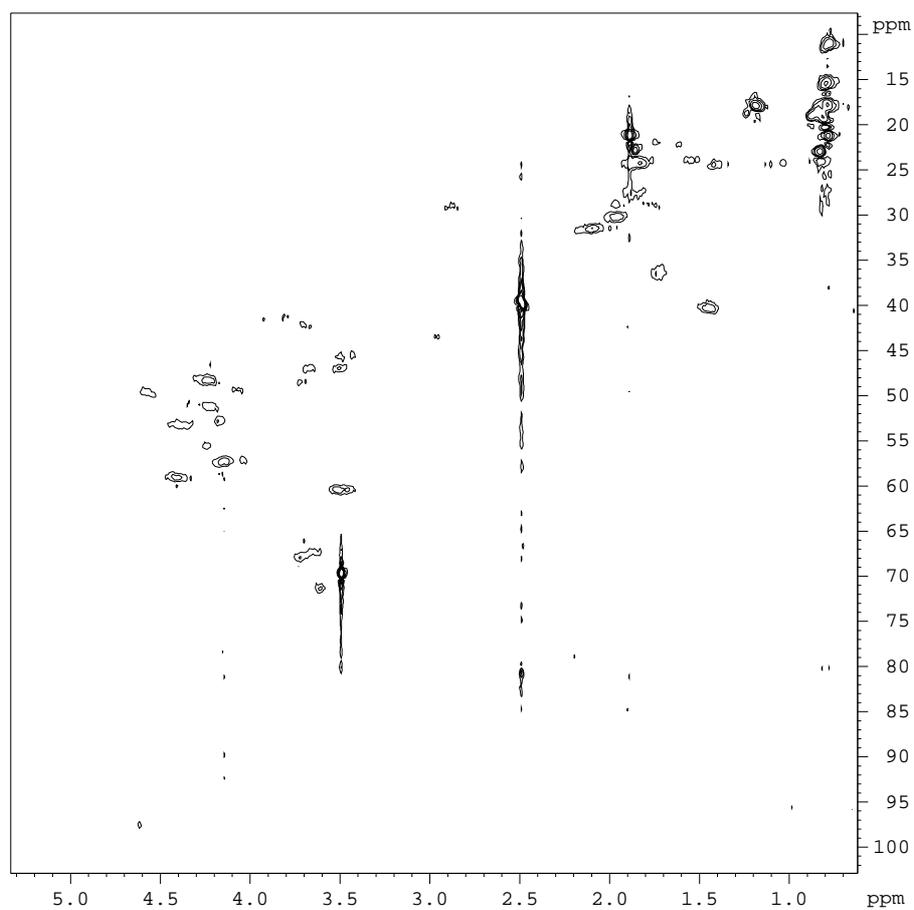
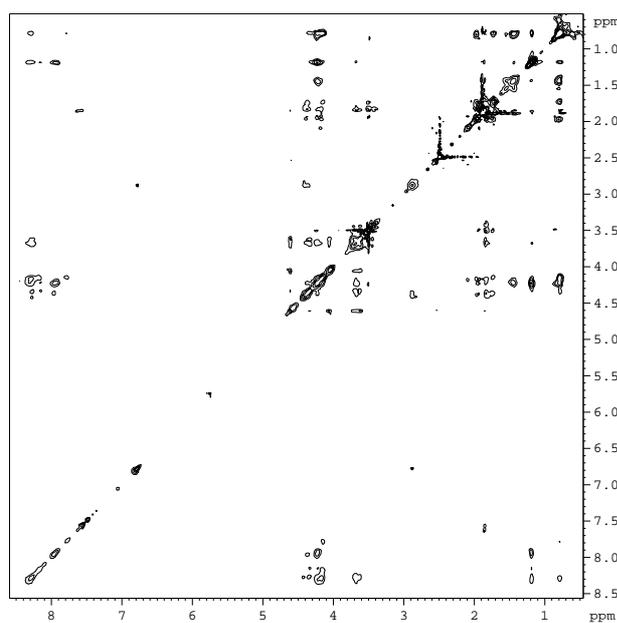
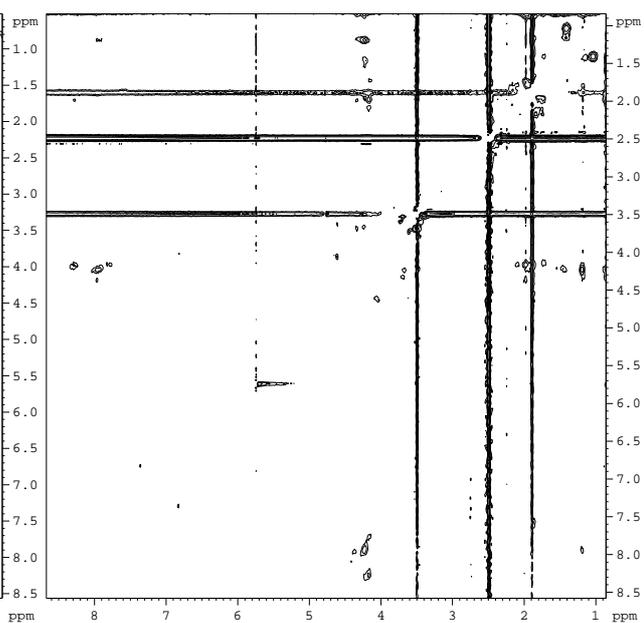
$^1\text{H}-^1\text{H}$ -
N
O
E
S
Y

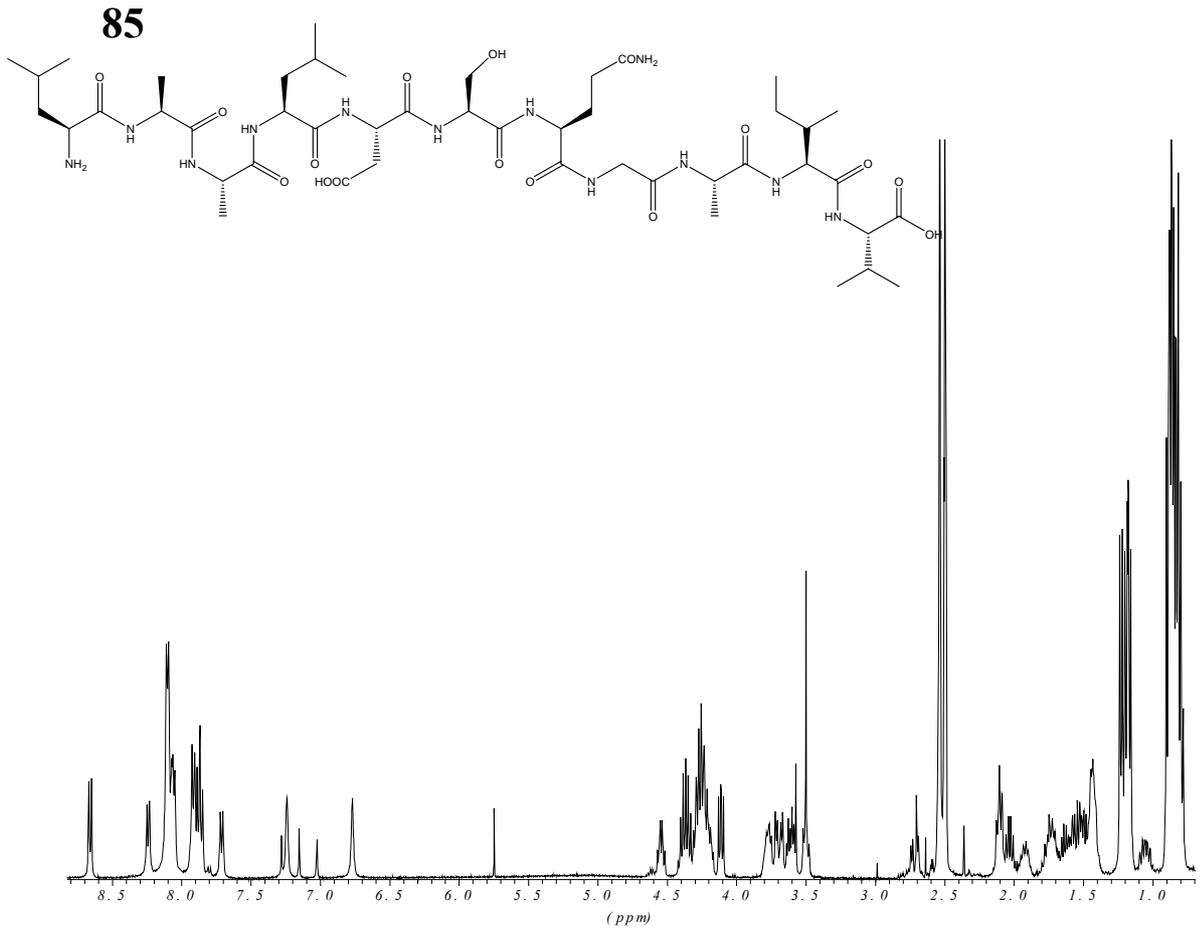
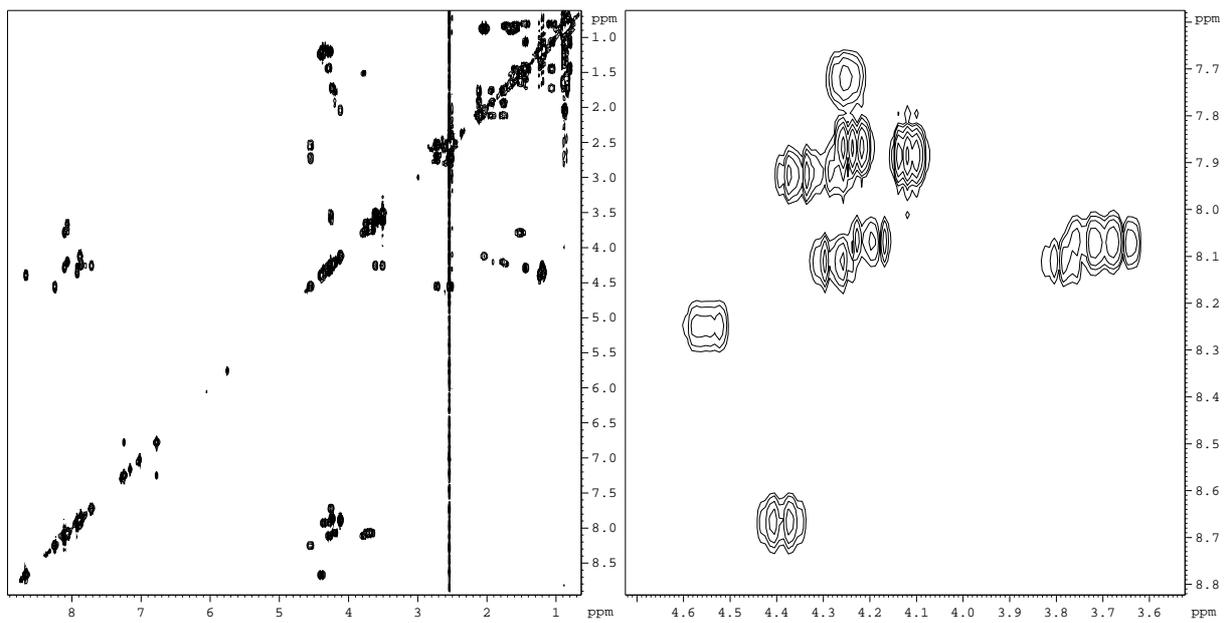


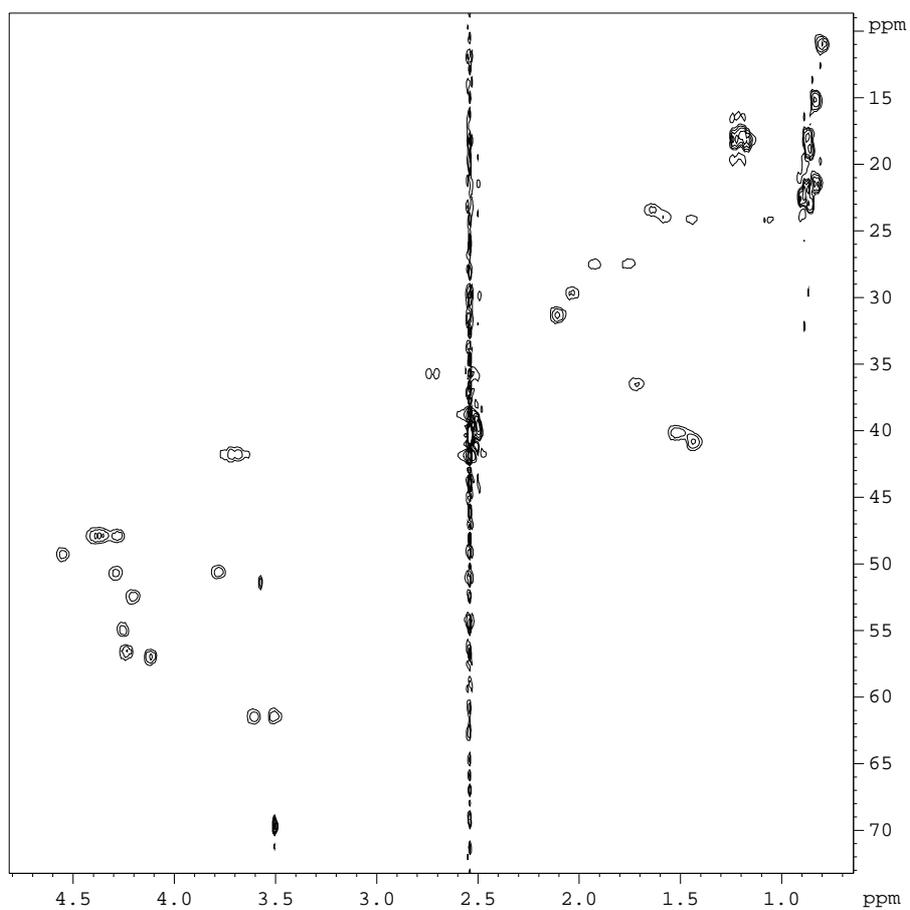
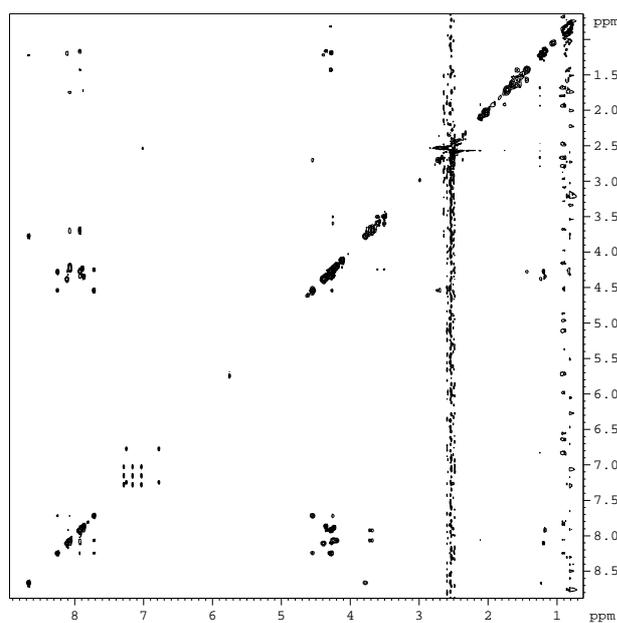
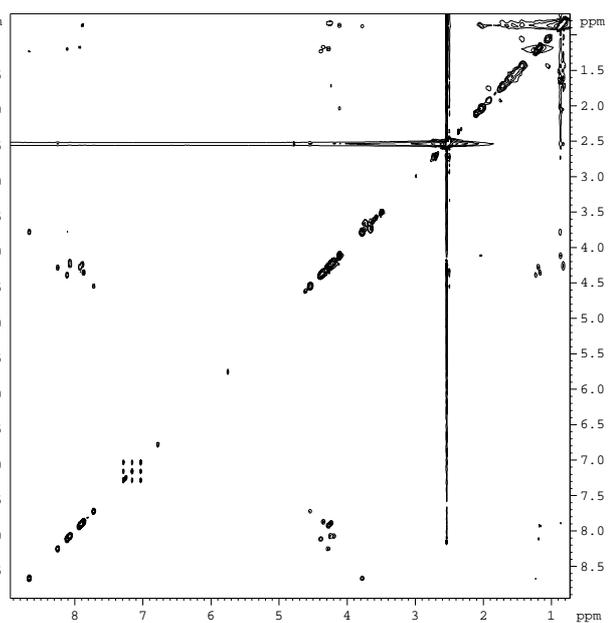
78

¹H-¹H-COSY¹H-¹³C-HMQC

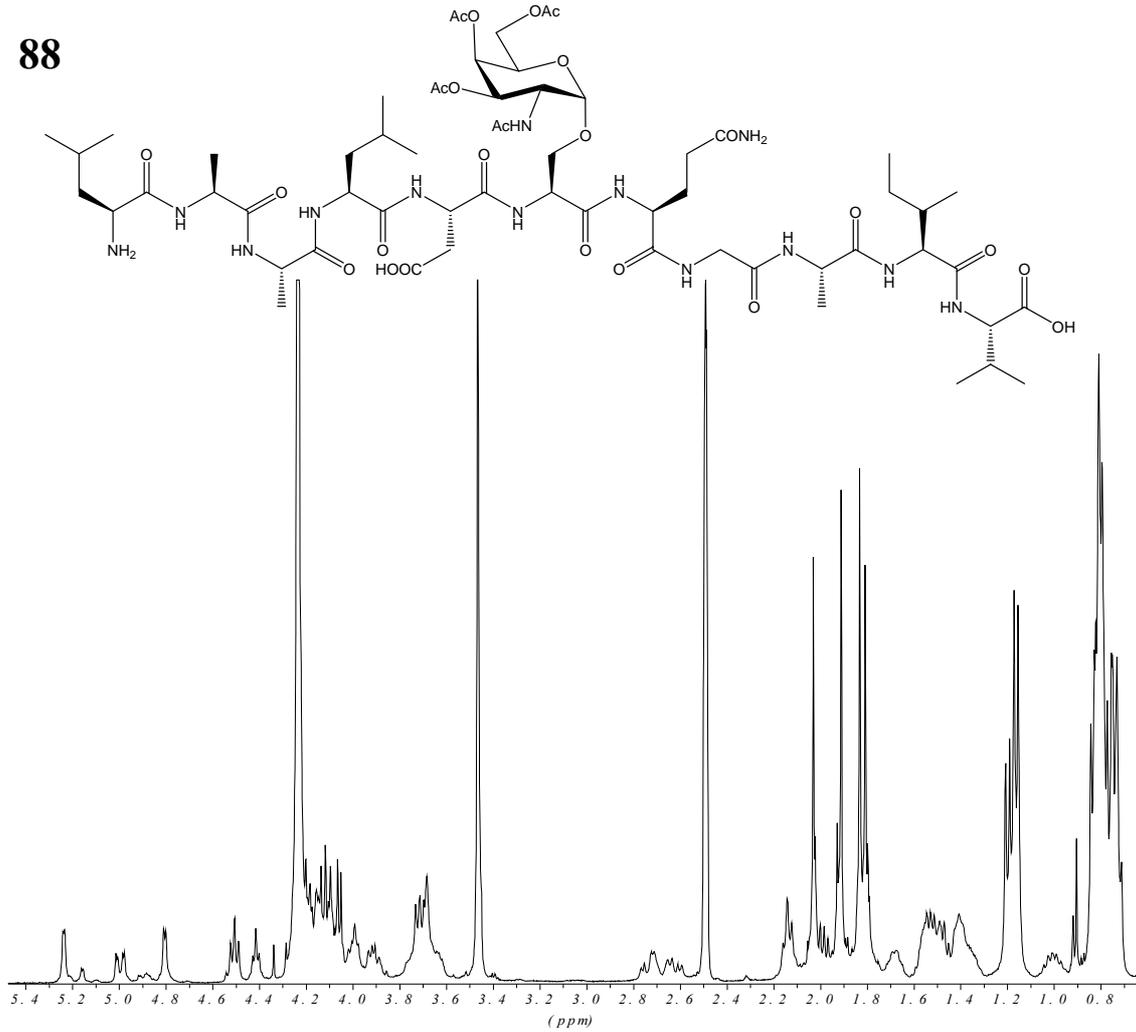
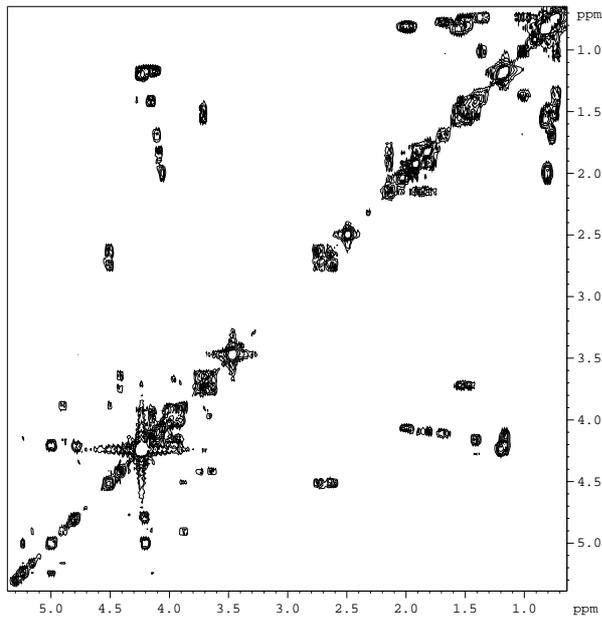
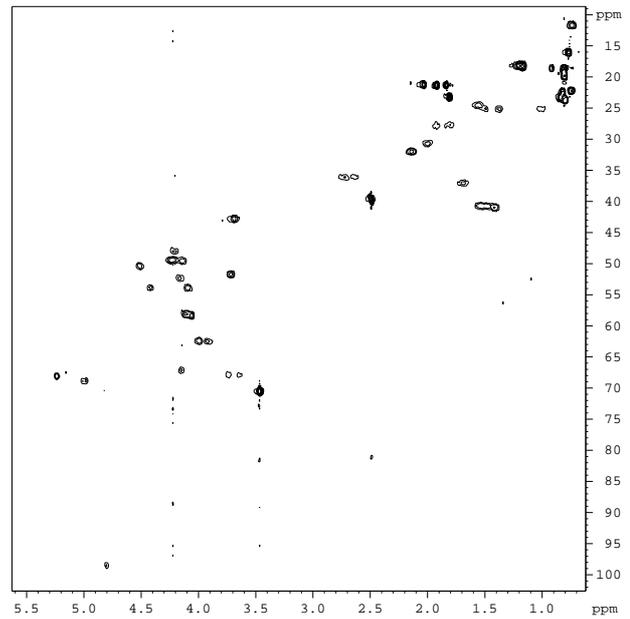
 ^1H - ^1H -COSY

^1H - ^1H -COSY ^1H - ^1H -NOESY ^1H - ^1H -ROESY

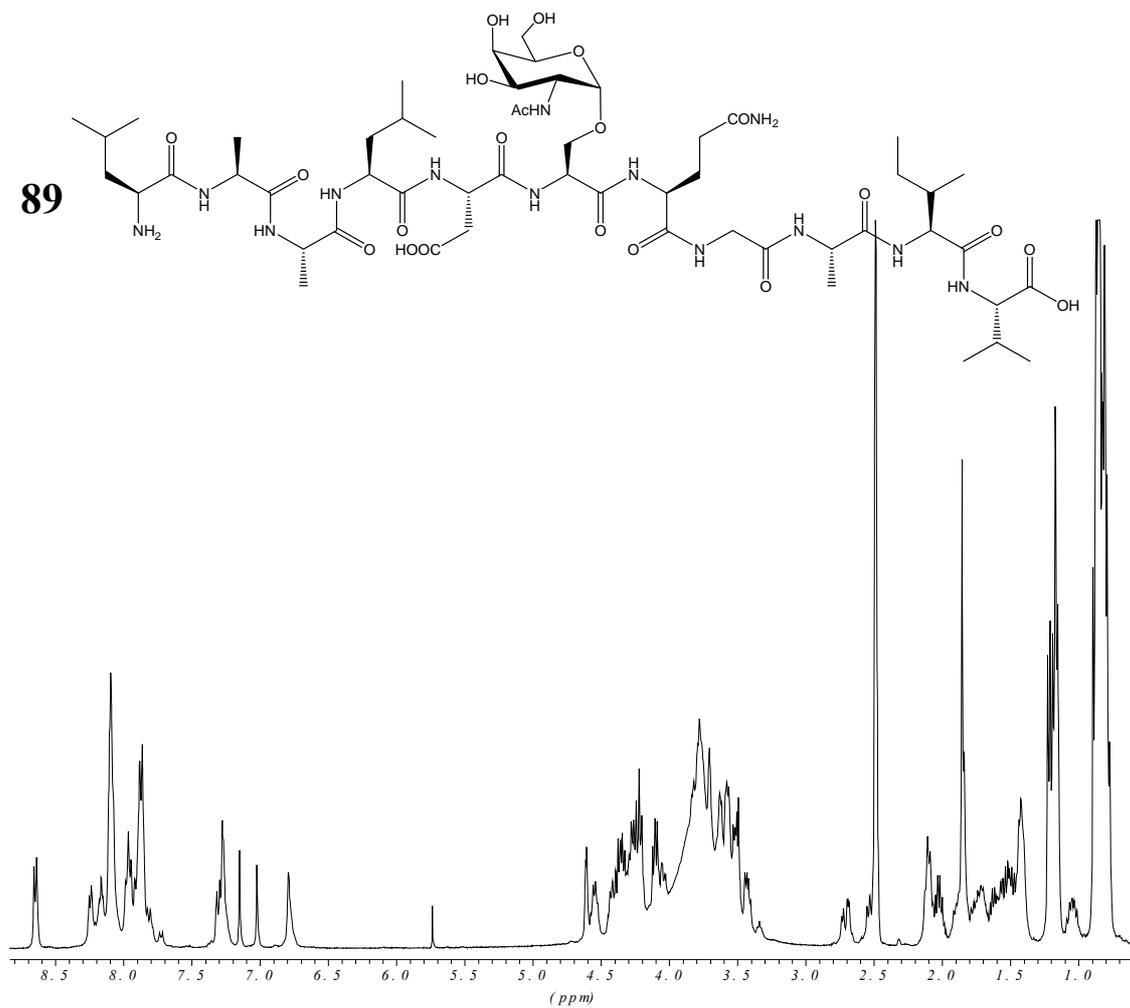
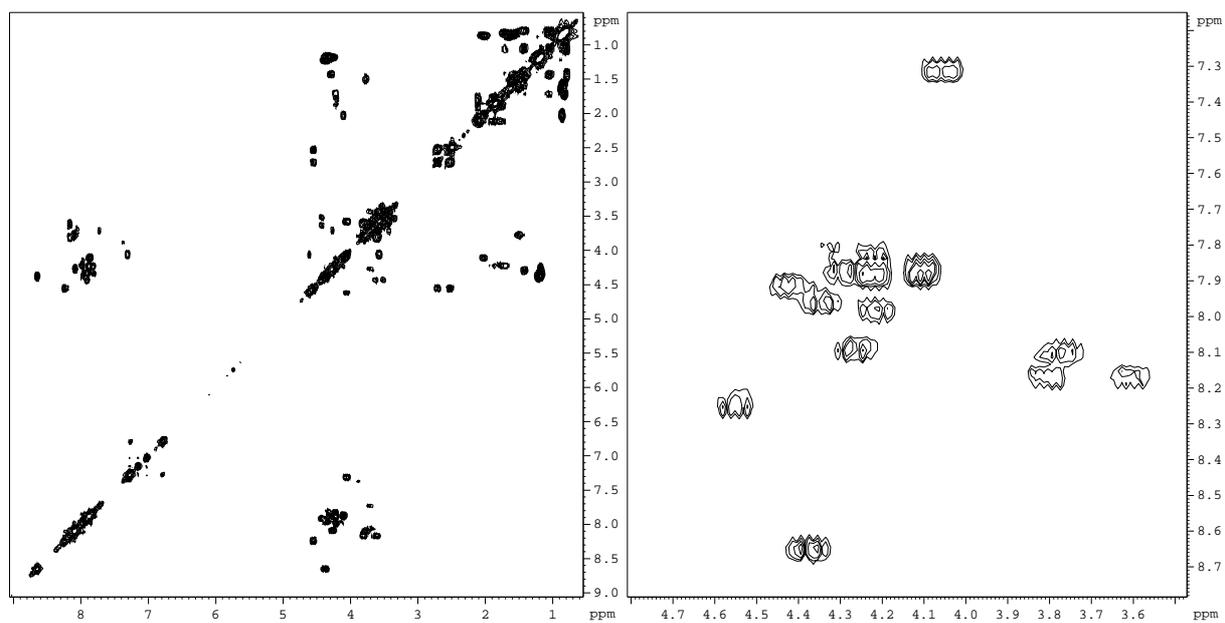
 ^1H - ^1H -COSY

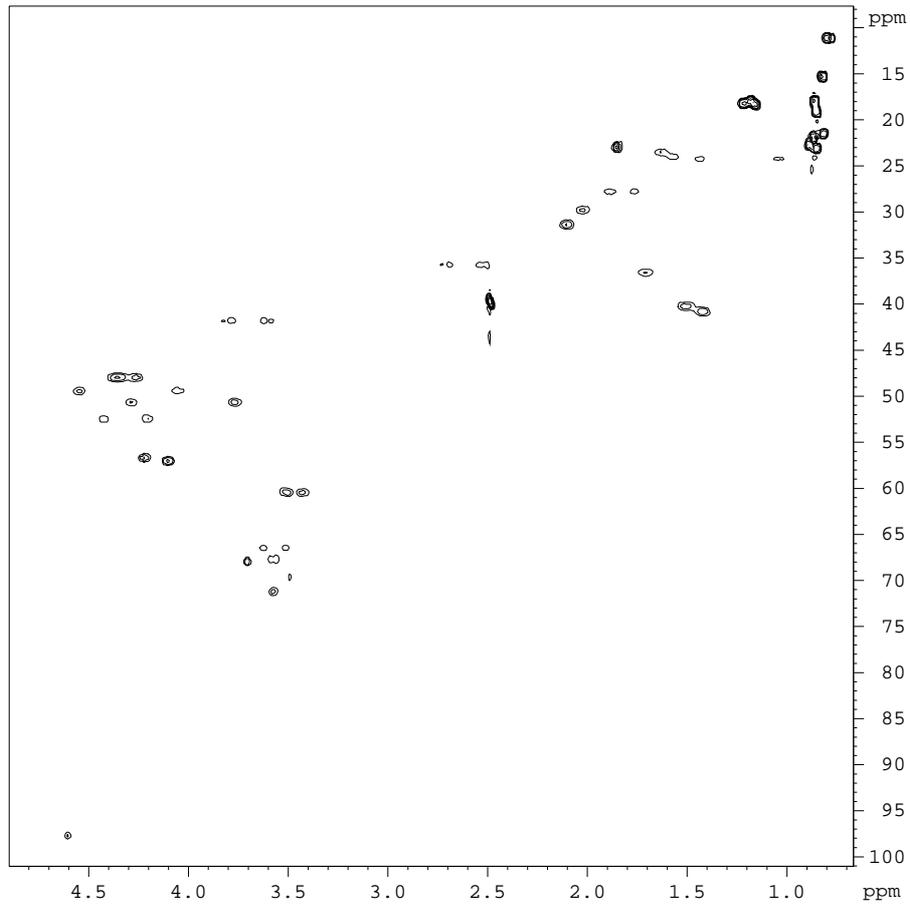
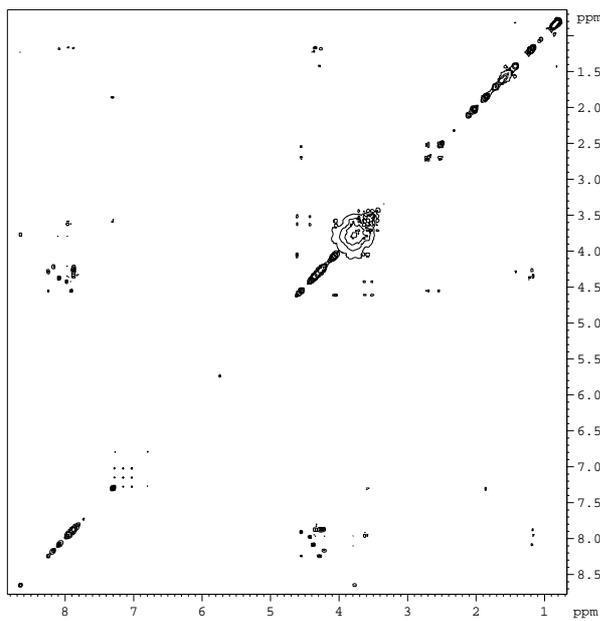
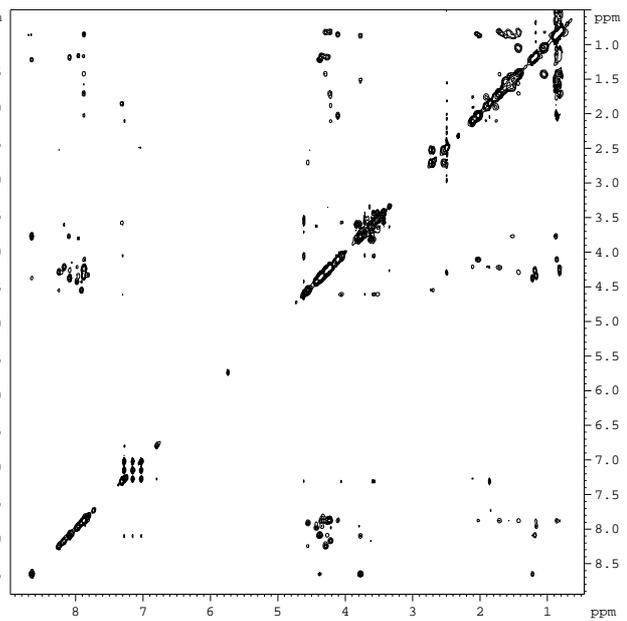
$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -HMQC $^1\text{H}-^1\text{H}$ -NOESY $^1\text{H}-^1\text{H}$ -ROESY

88

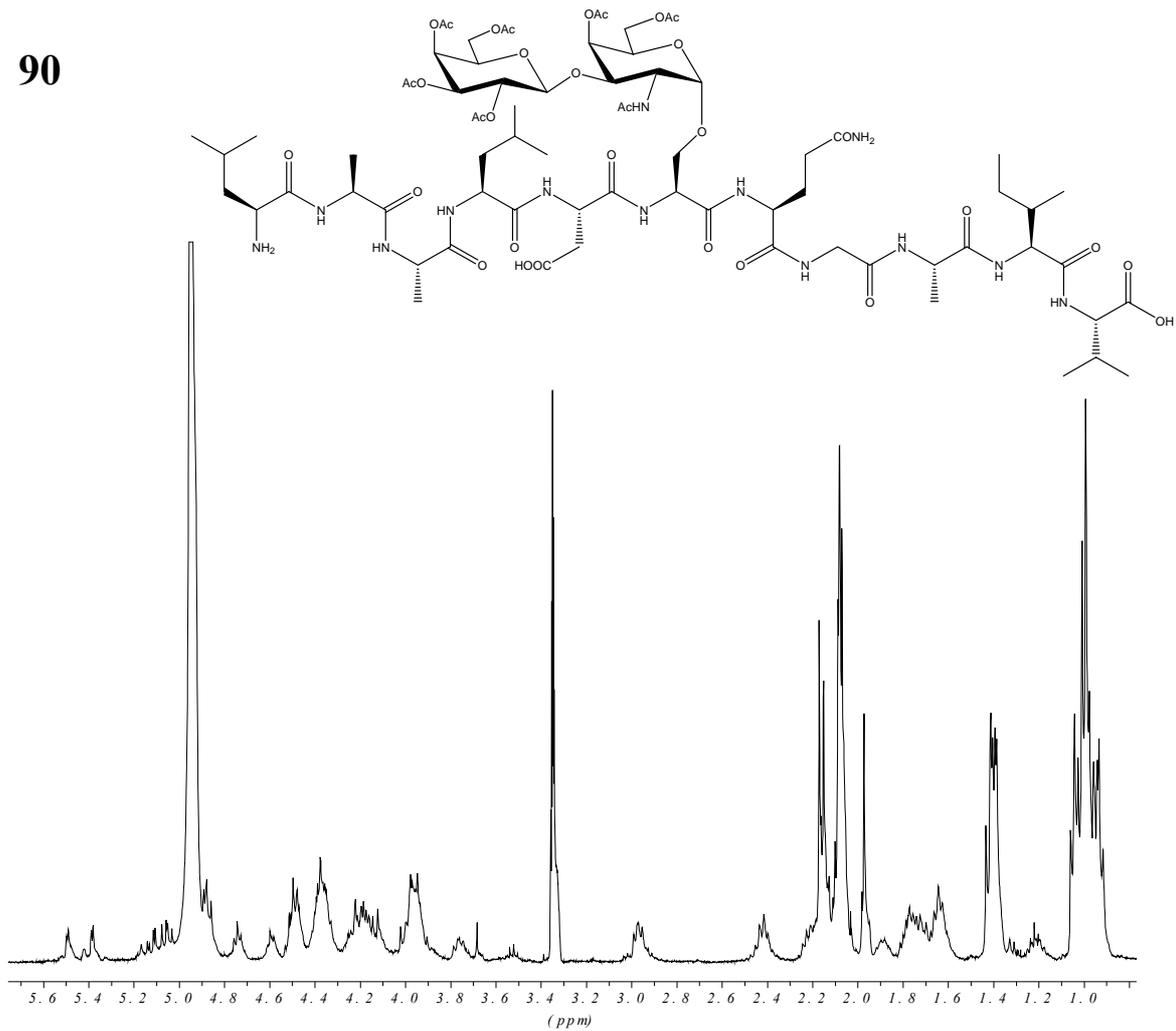
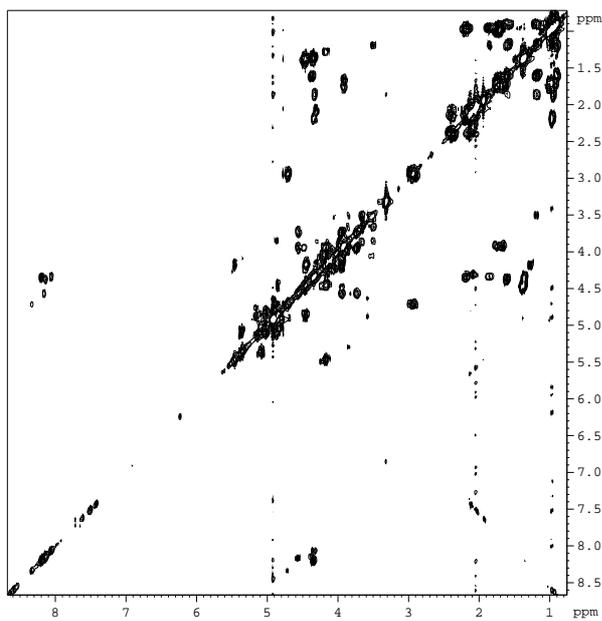
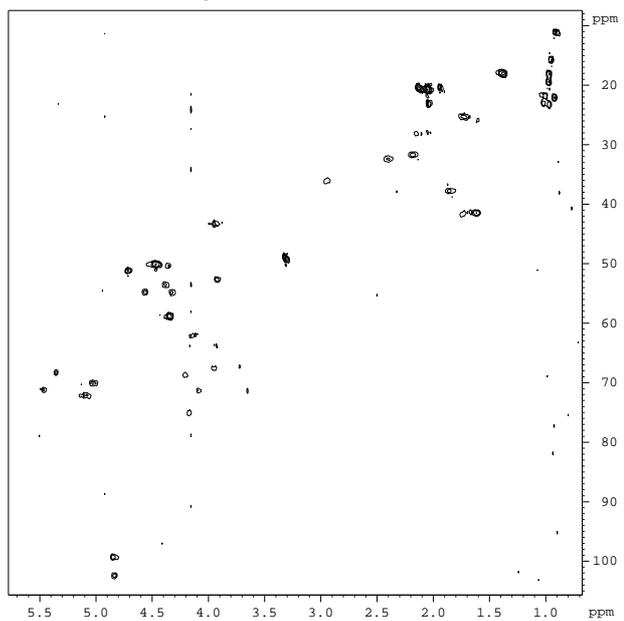
 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

89

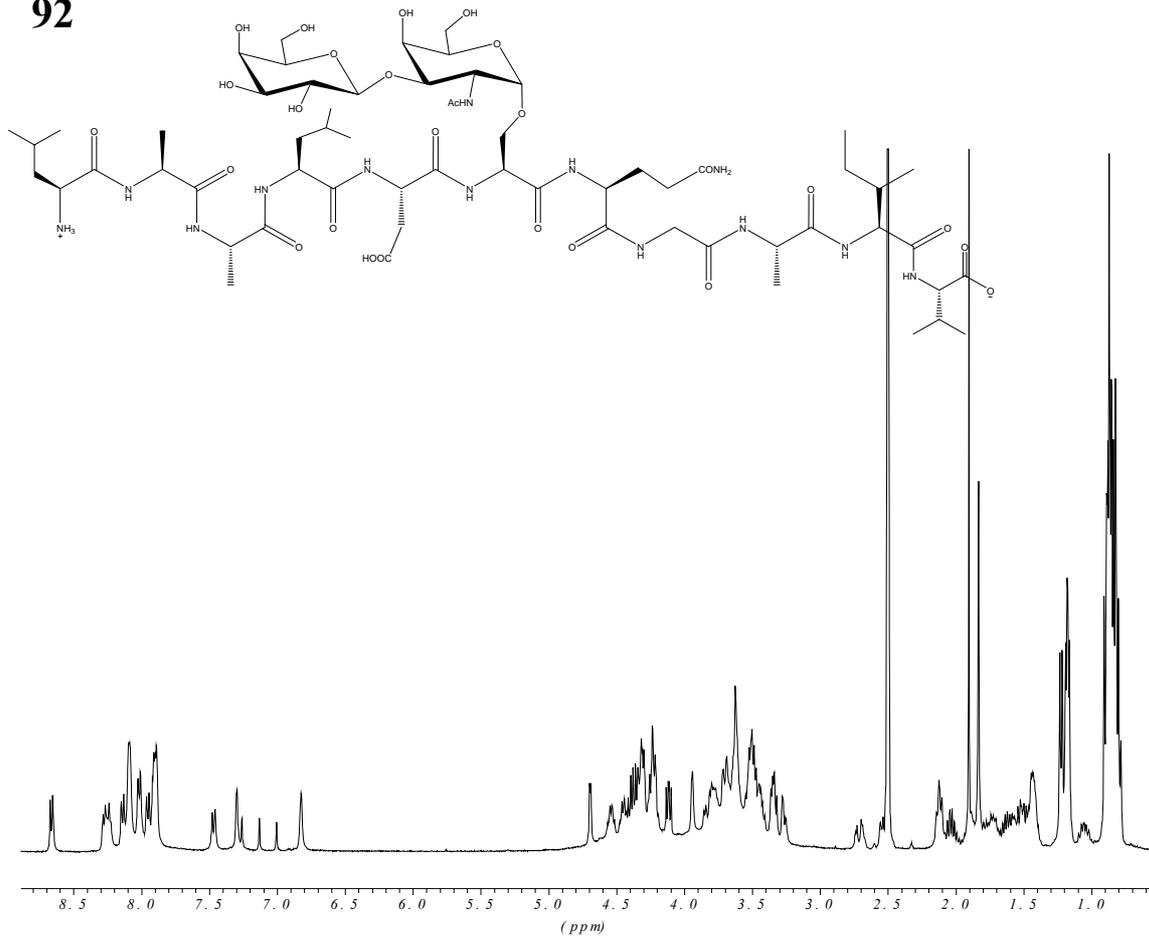
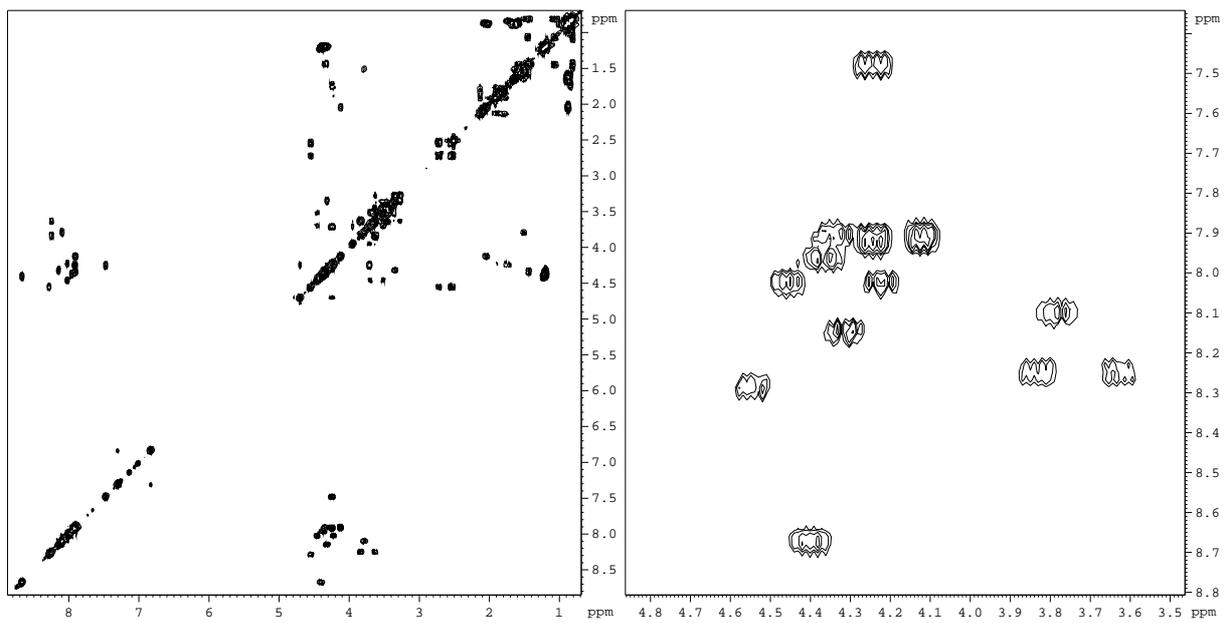
 ^1H - ^1H -COSY

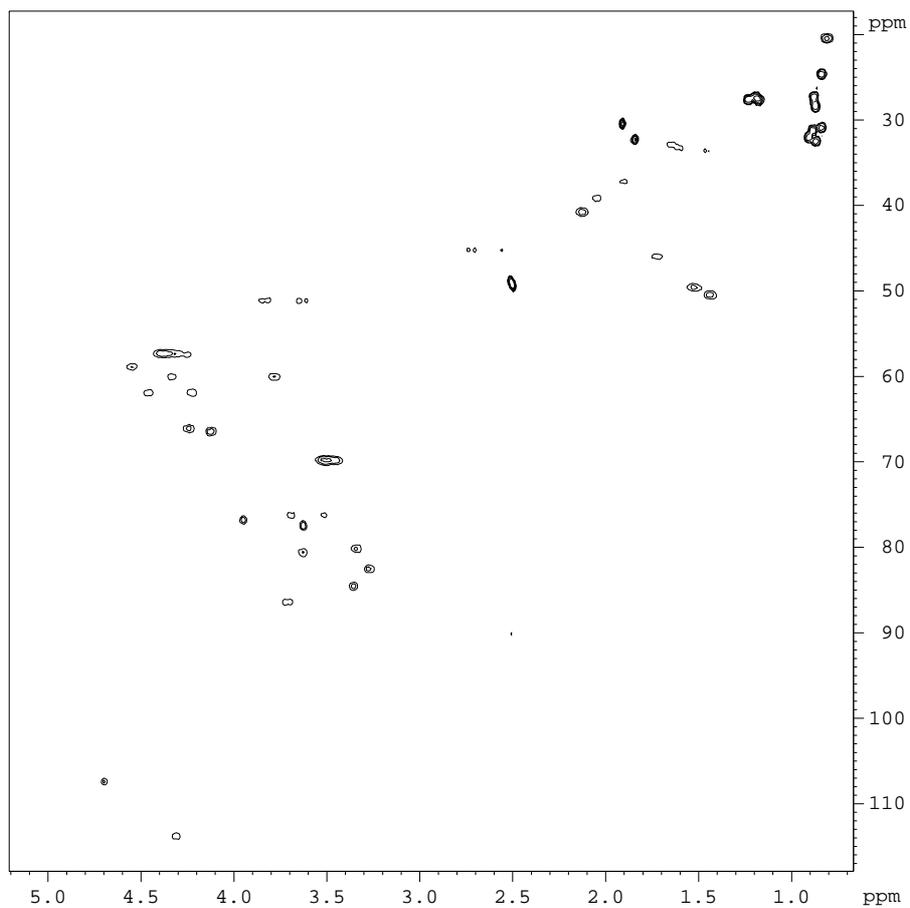
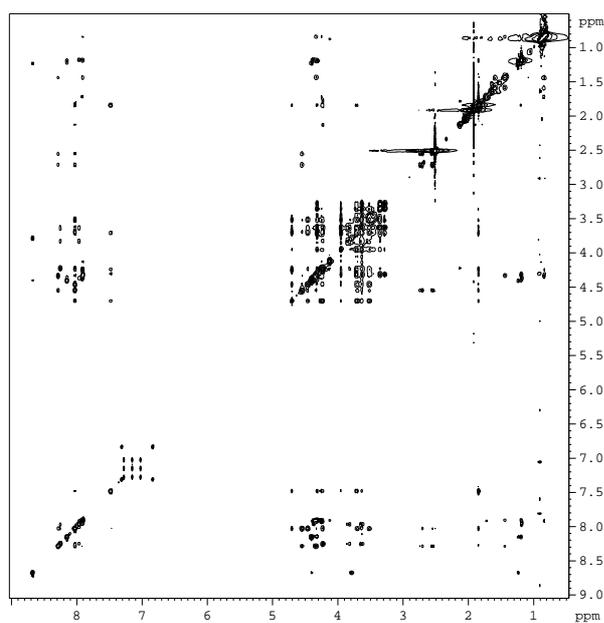
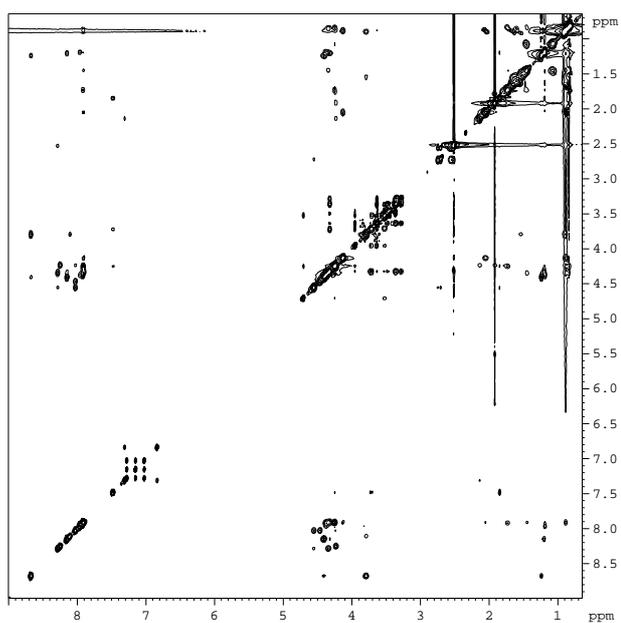
$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -HMQC $^1\text{H}-^1\text{H}$ -NOESY $^1\text{H}-^1\text{H}$ -ROESY

90

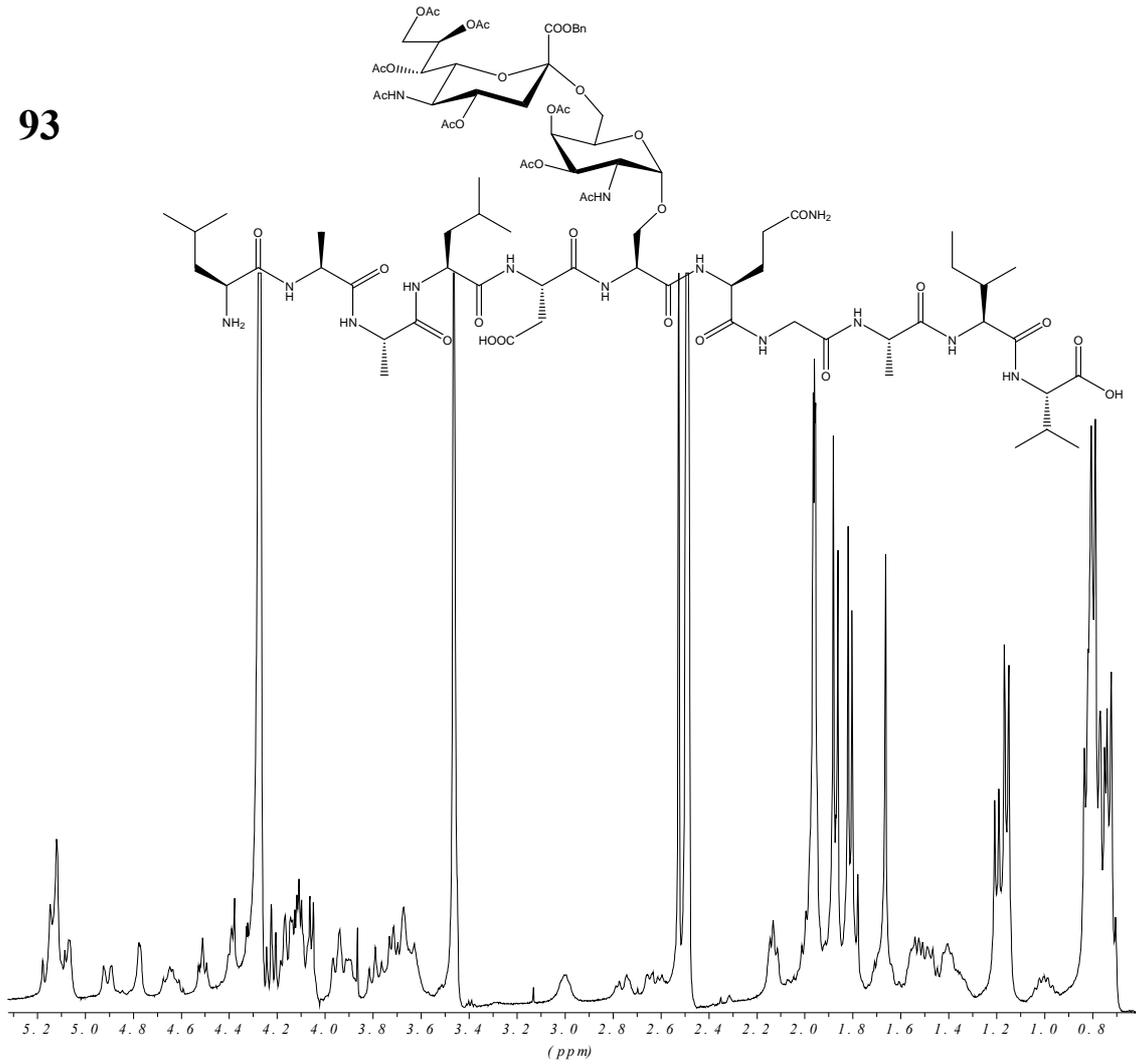
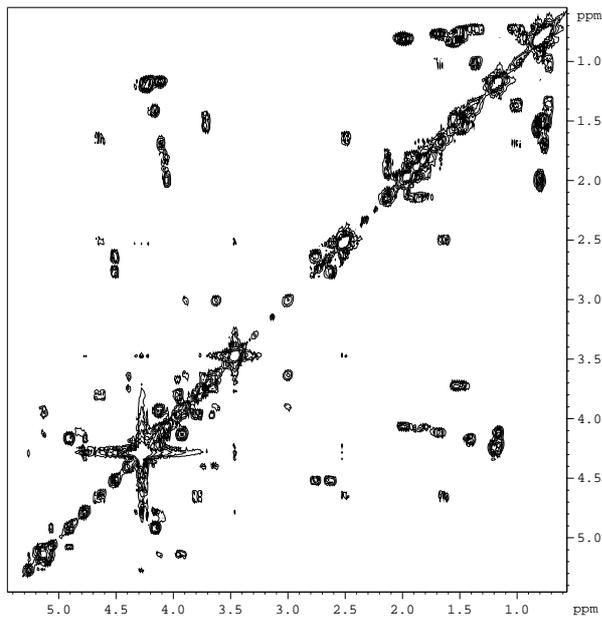
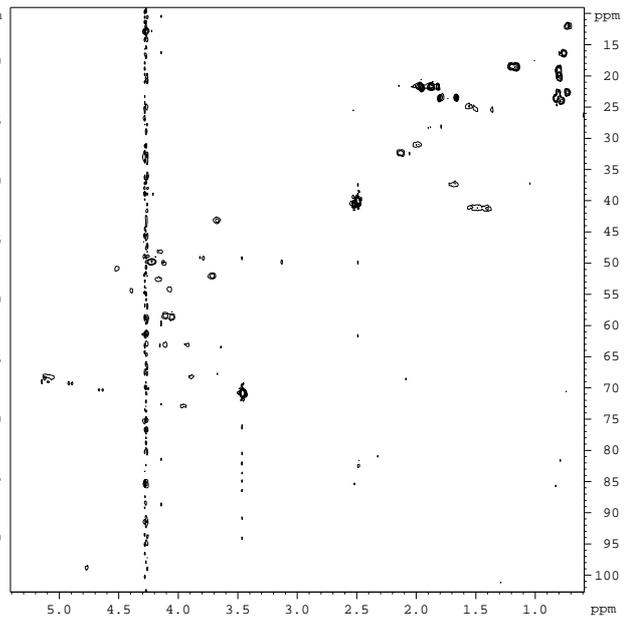
 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

92

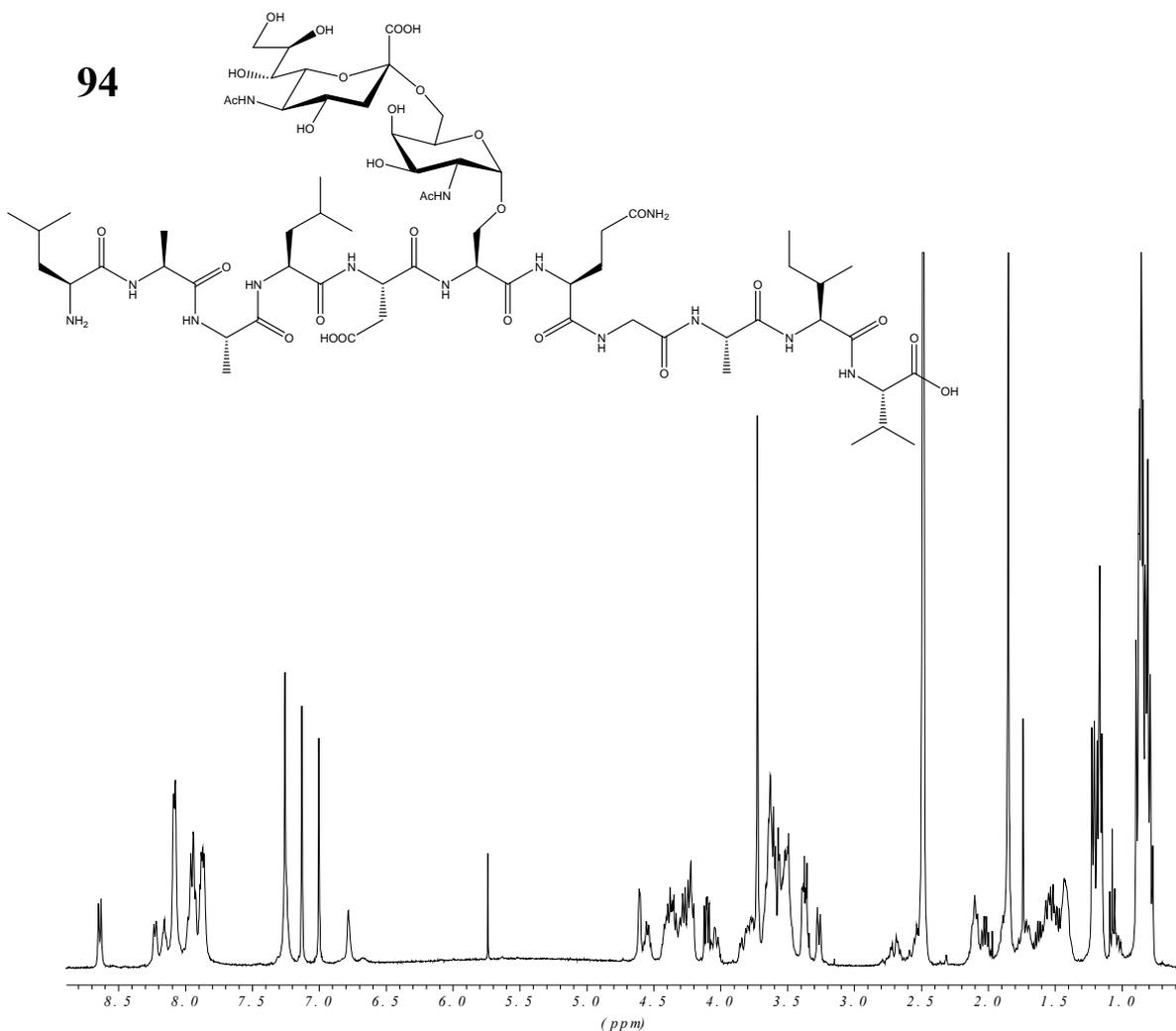
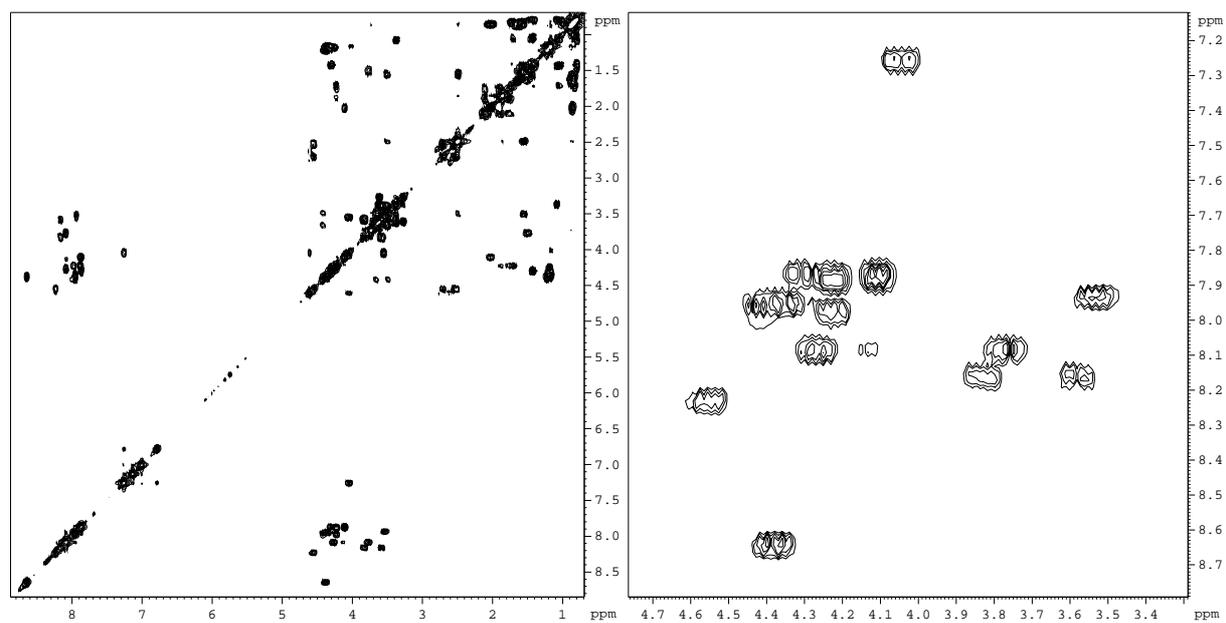
 ^1H - ^1H -COSY

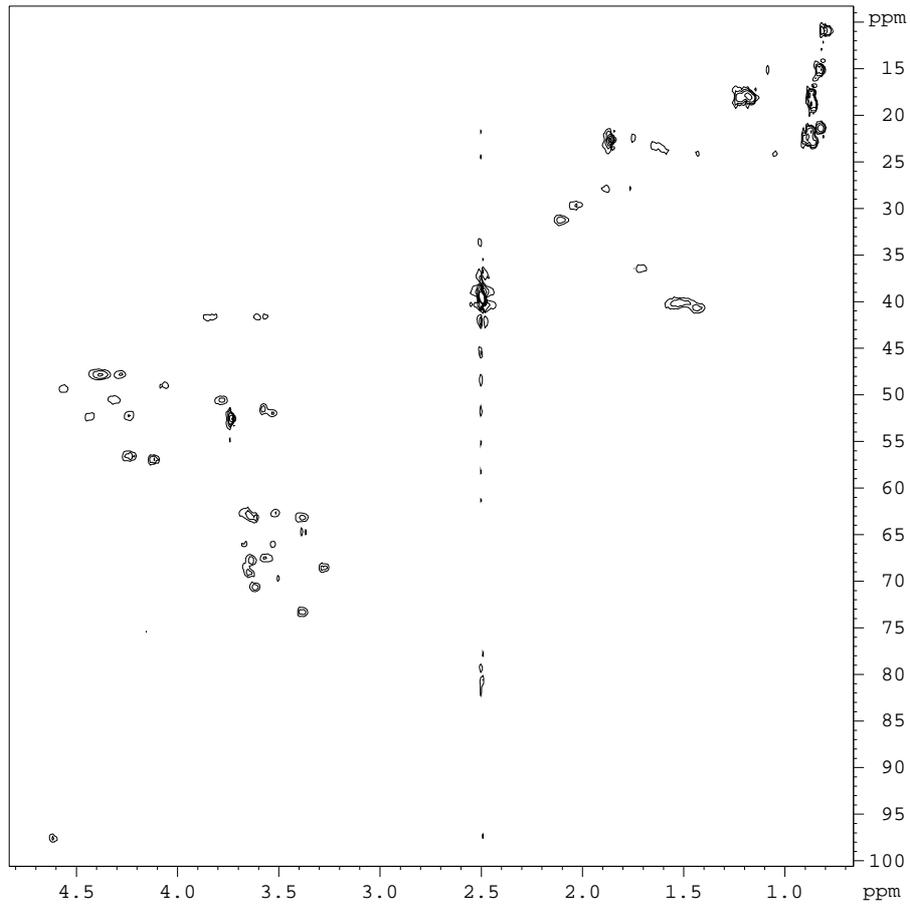
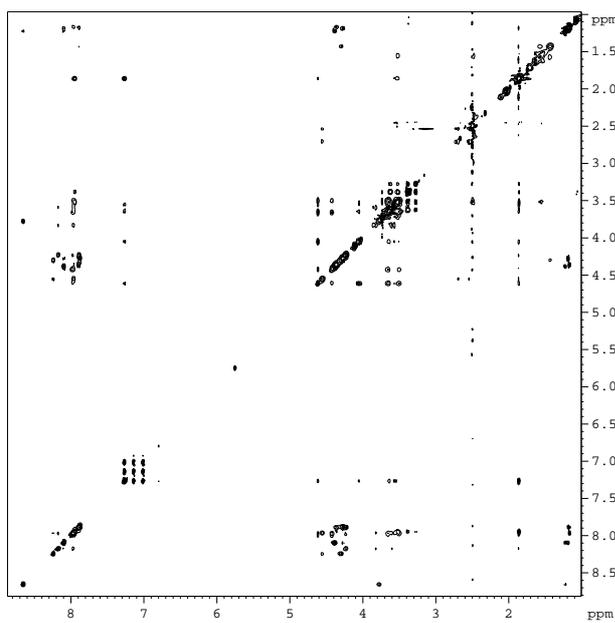
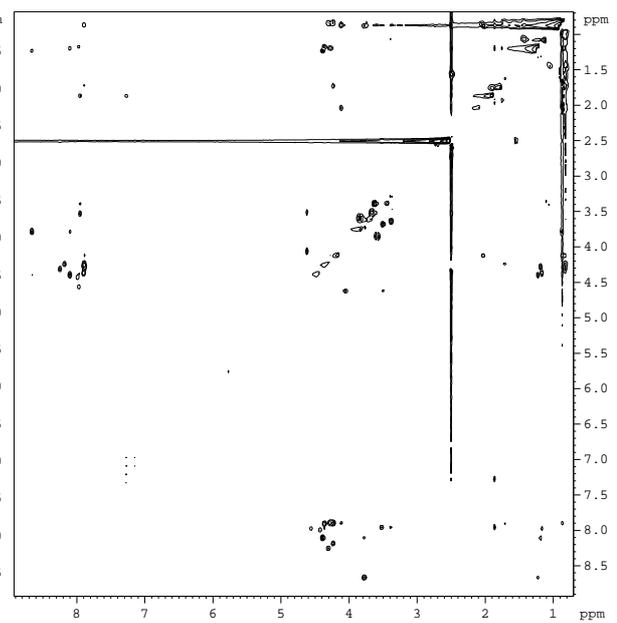
$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -HMQC $^1\text{H}-^1\text{H}$ -NOESY $^1\text{H}-^1\text{H}$ -ROESY

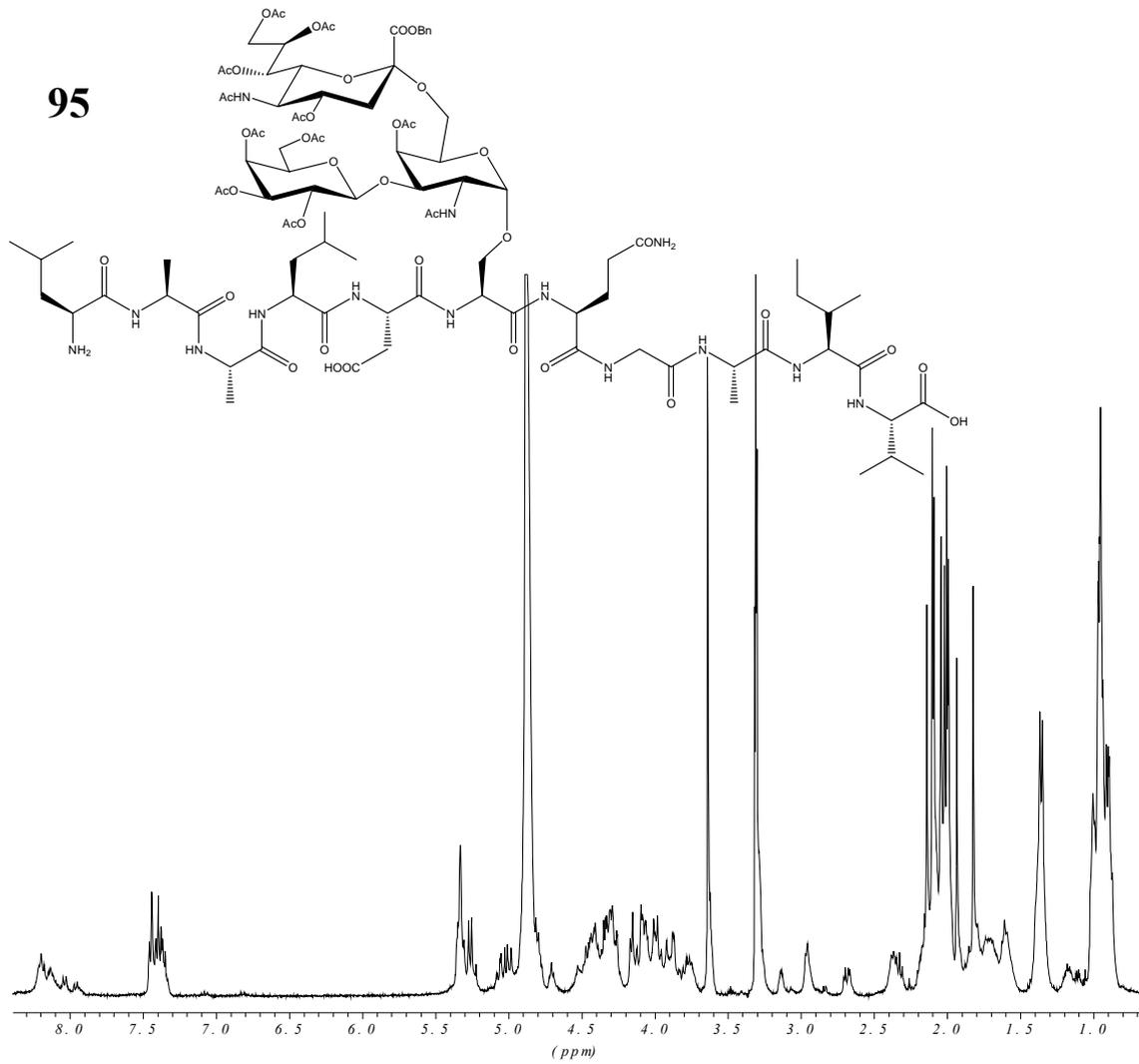
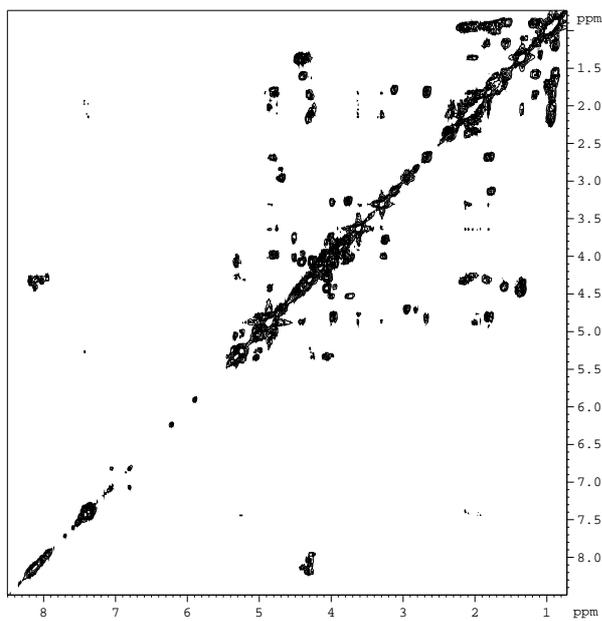
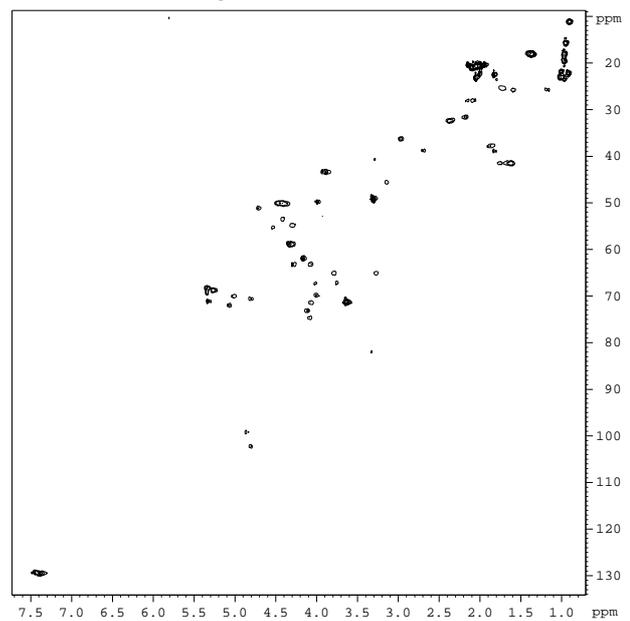
93

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

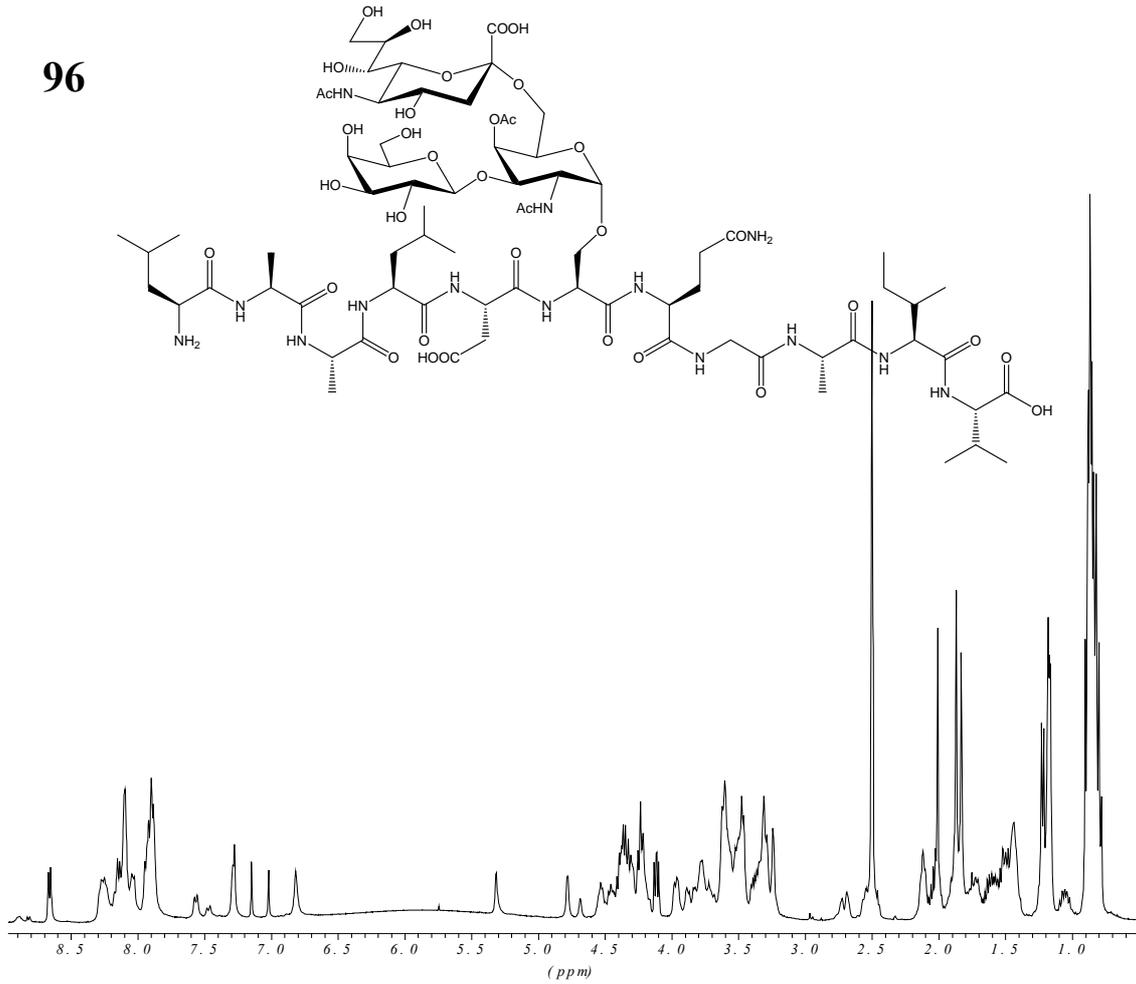
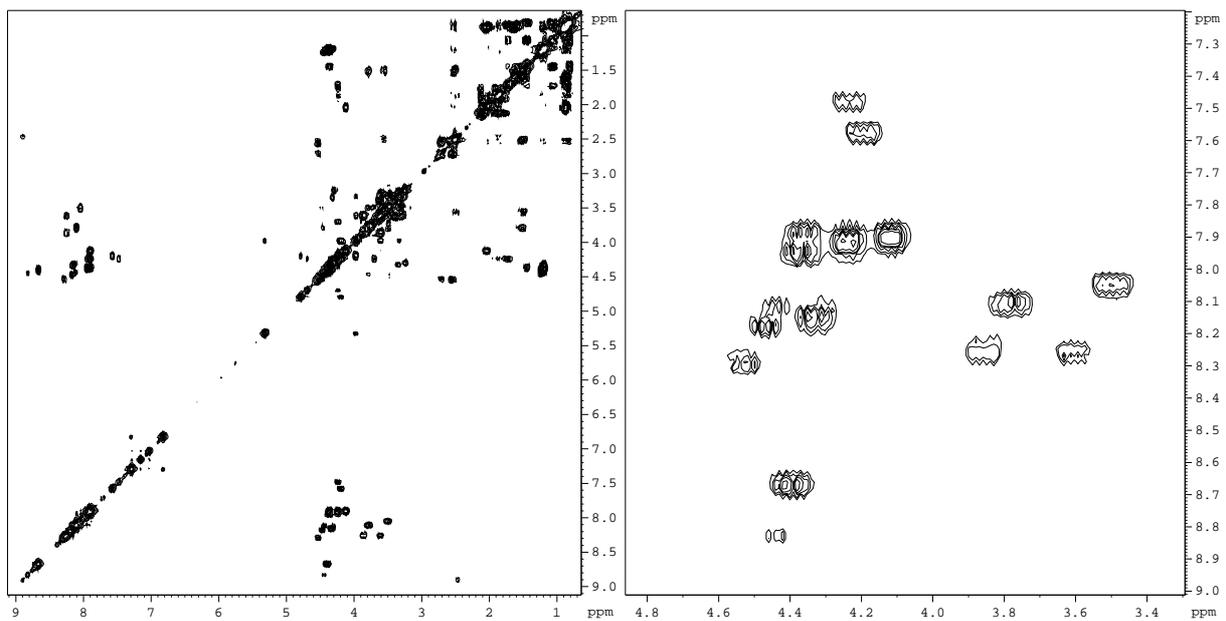
94

 ^1H - ^1H -COSY

^1H - ^{13}C -HMQC ^1H - ^1H -NOESY ^1H - ^1H -ROESY

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

96

 ^1H - ^1H -COSY

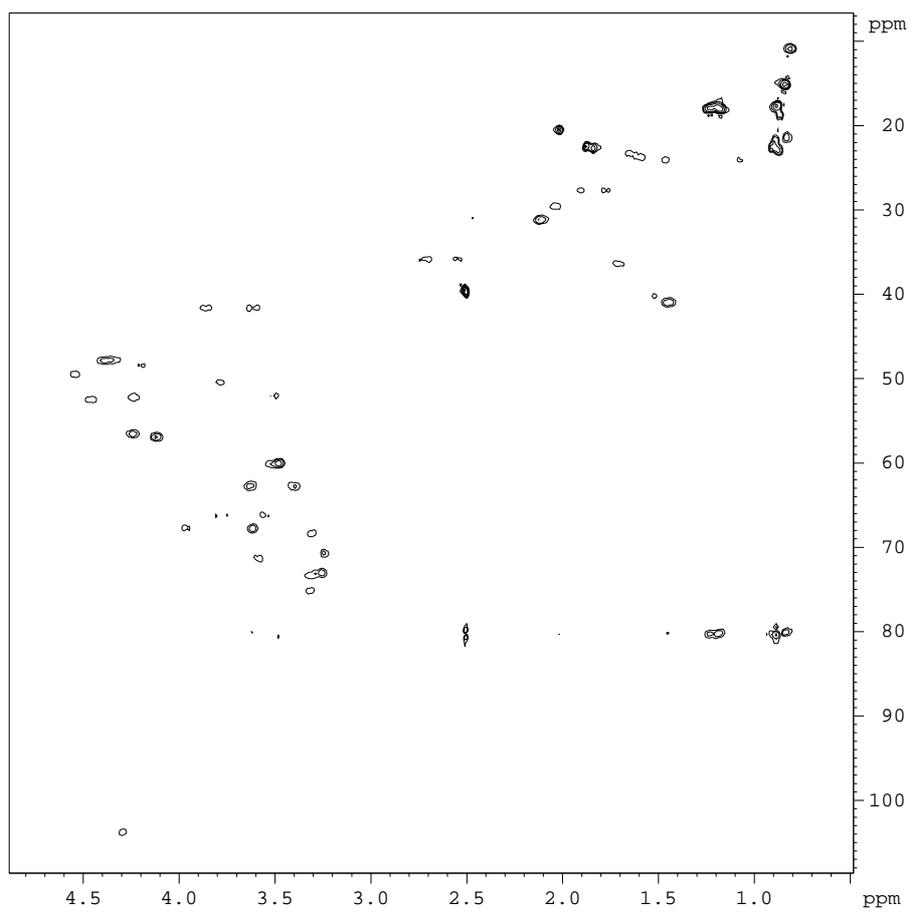
$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -

H

M

Q

C

 $^1\text{H}-^1\text{H}$ -

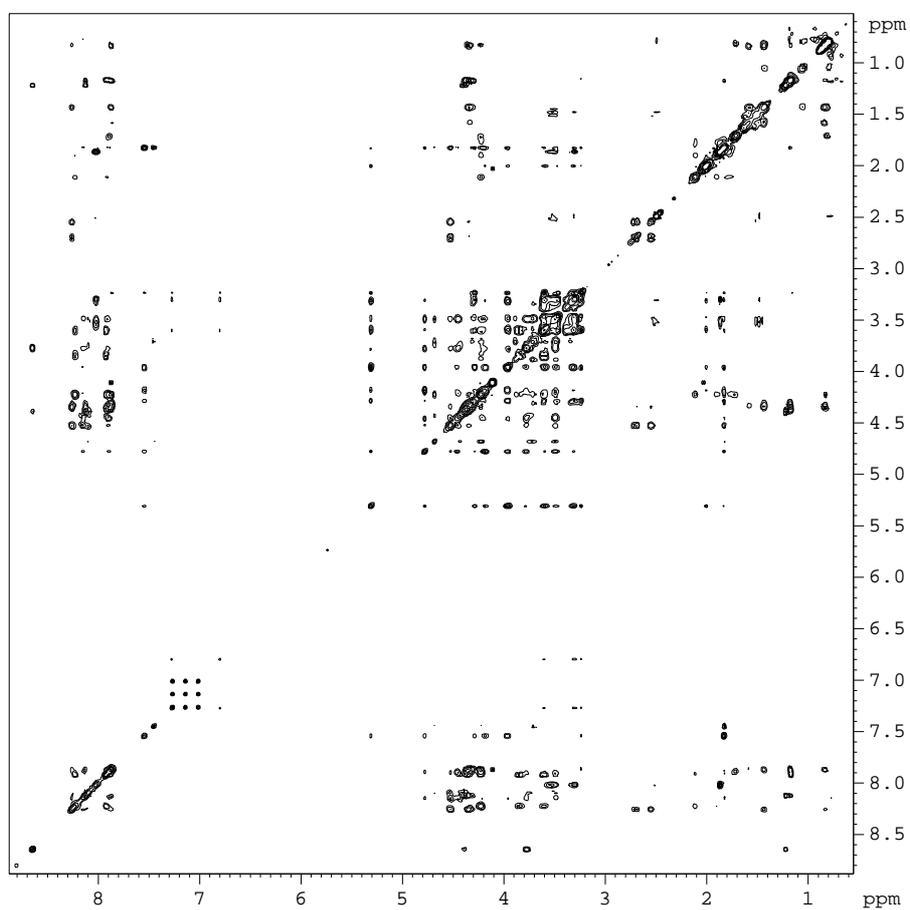
N

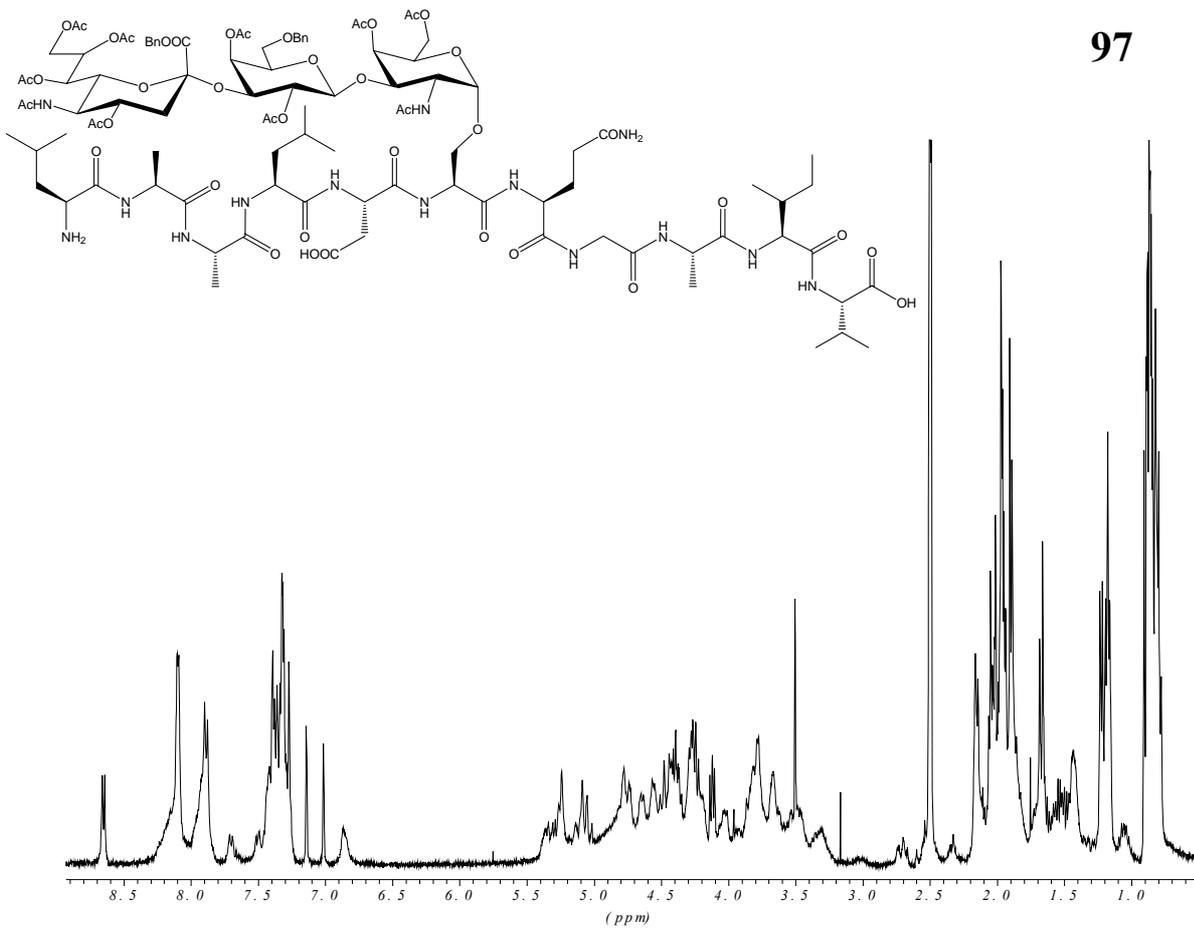
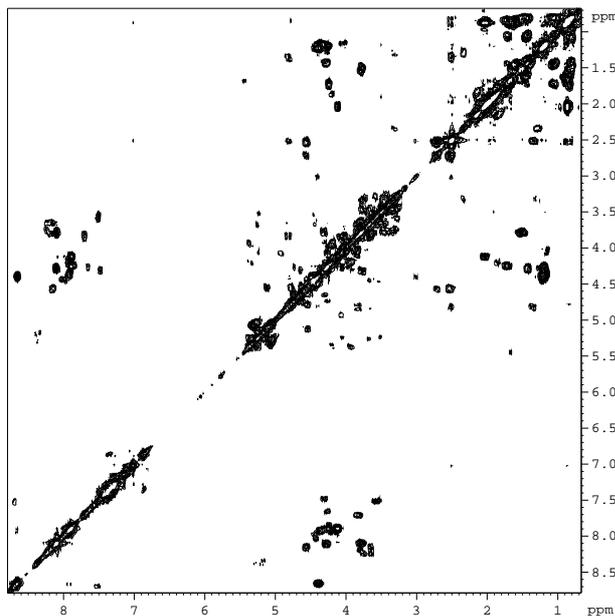
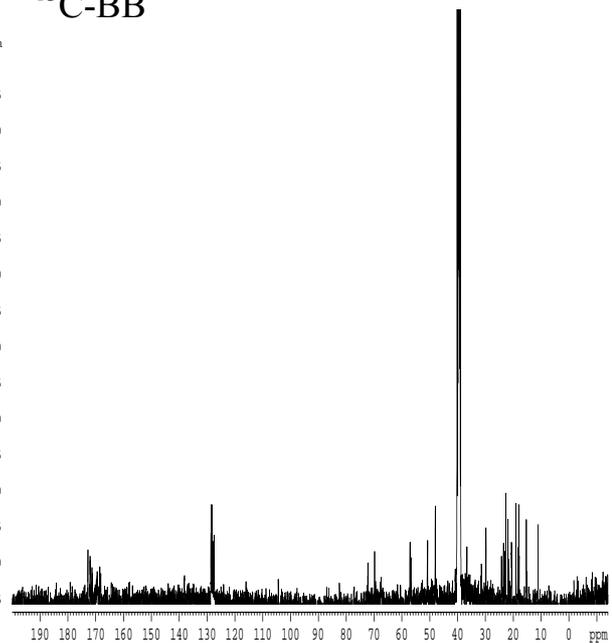
O

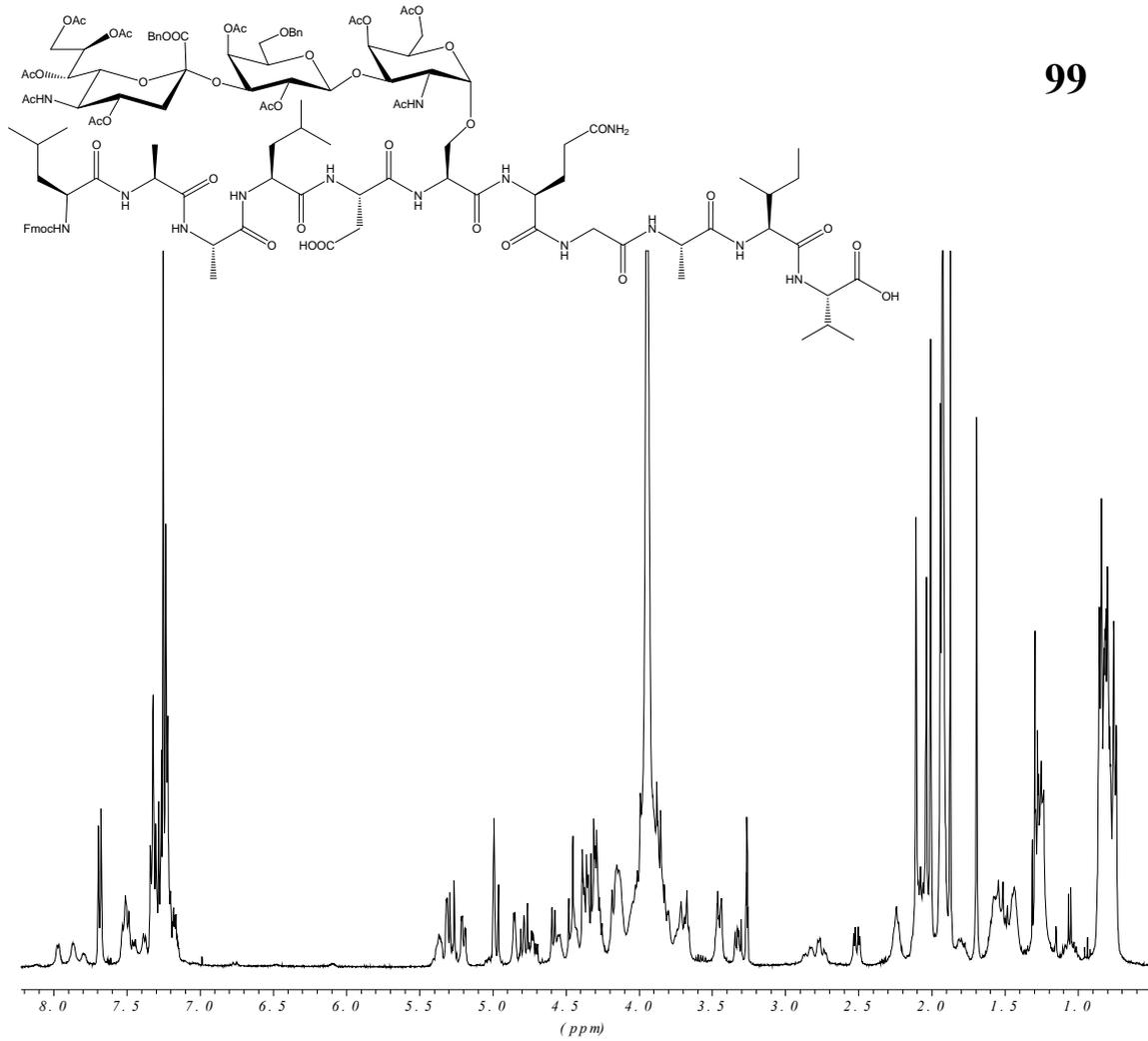
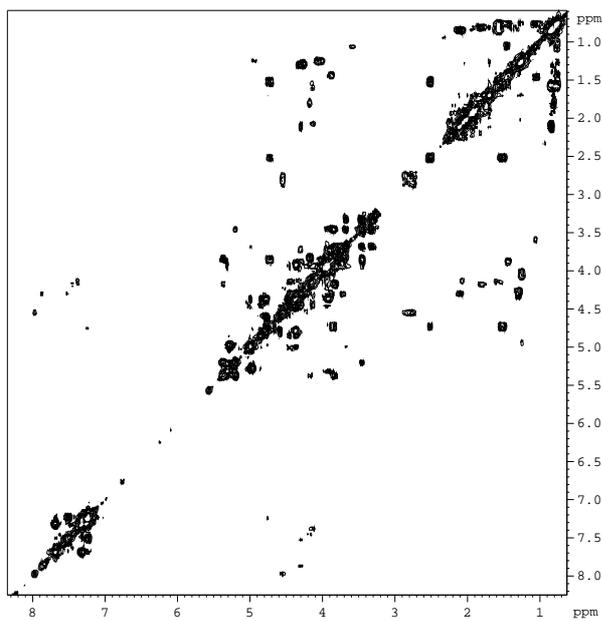
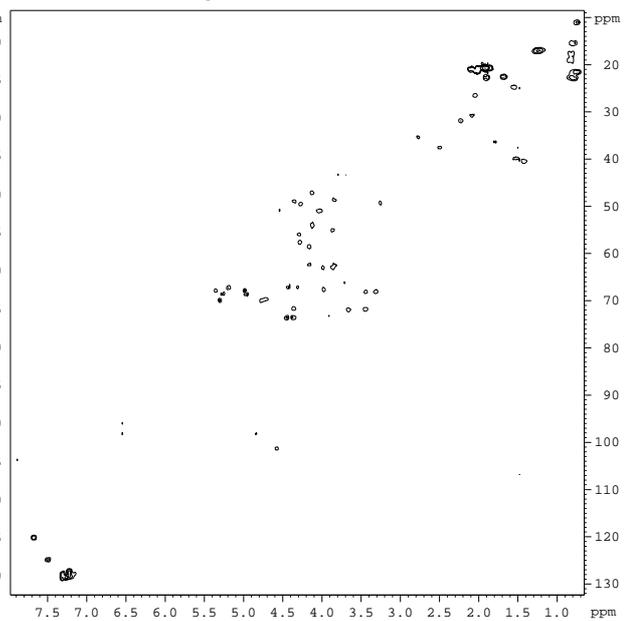
E

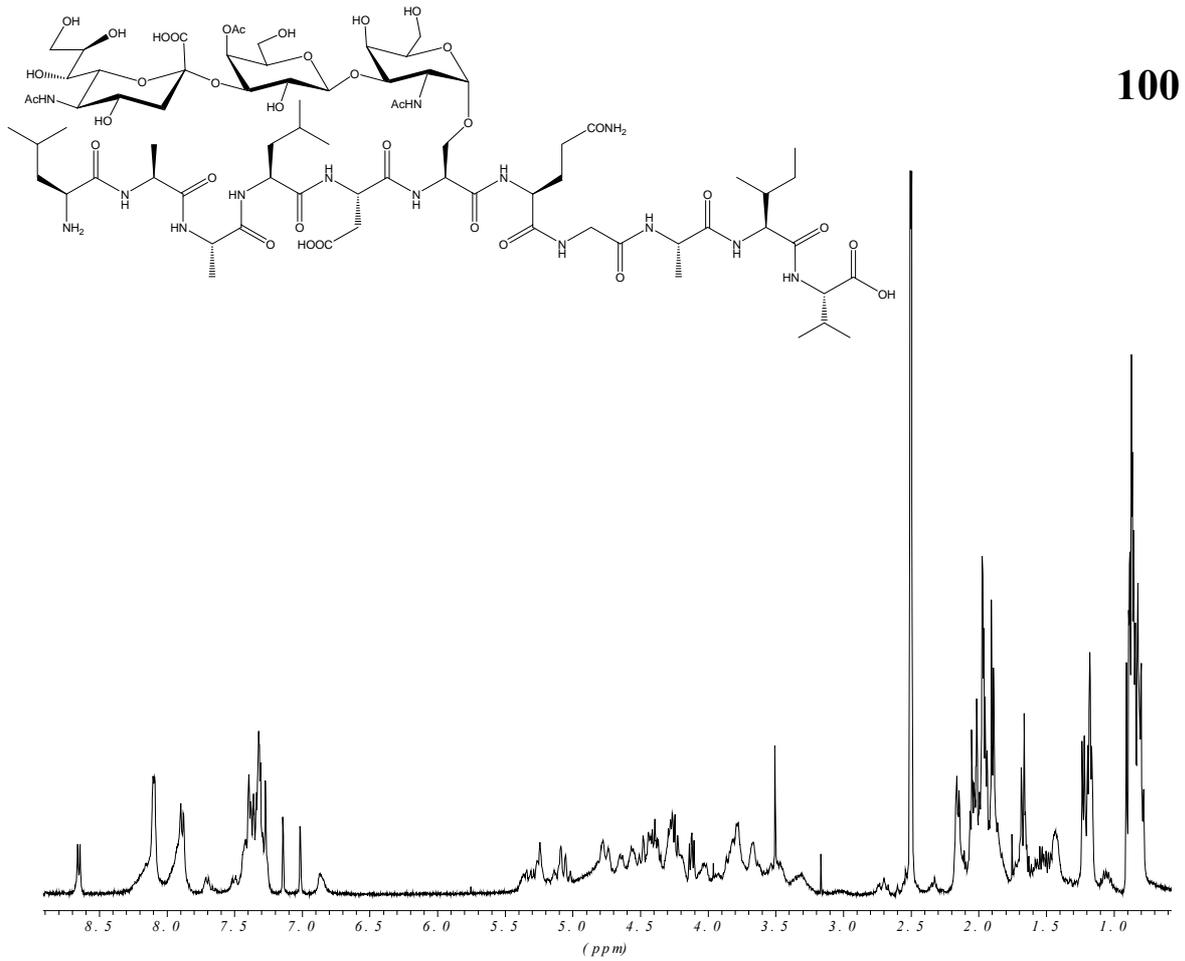
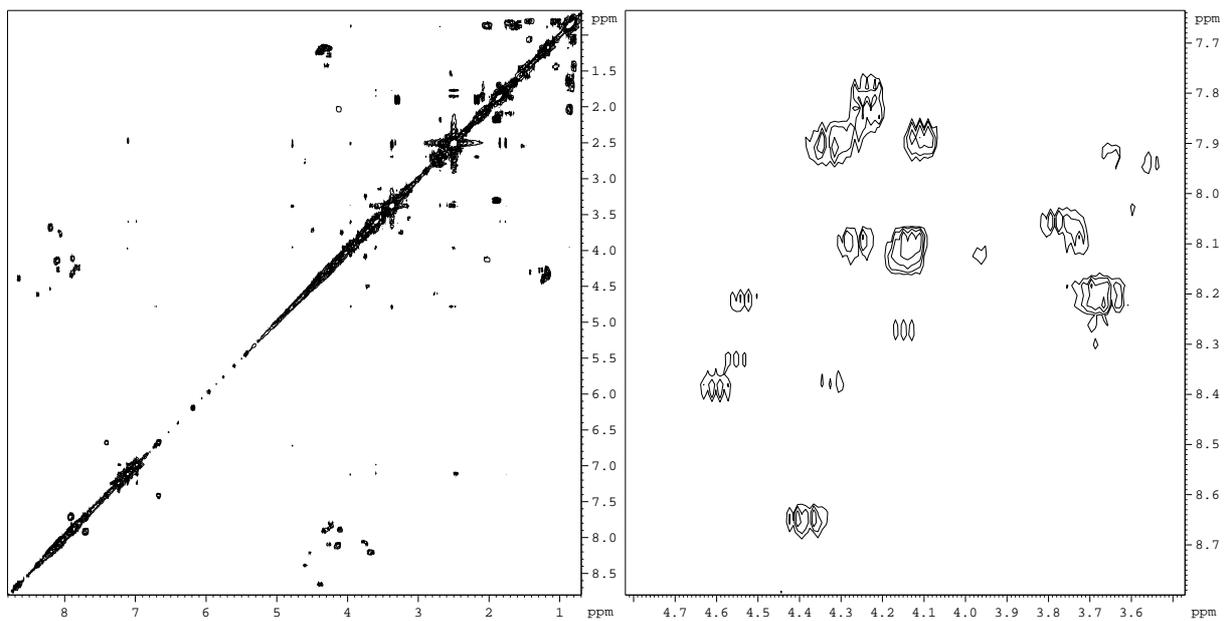
S

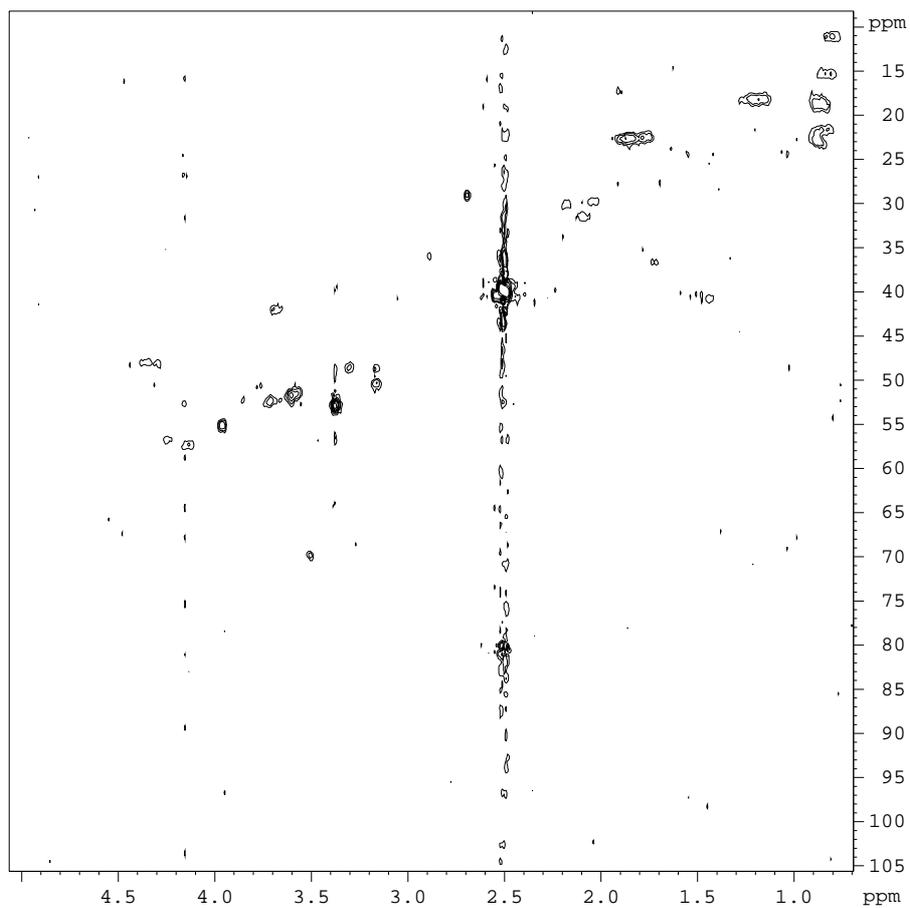
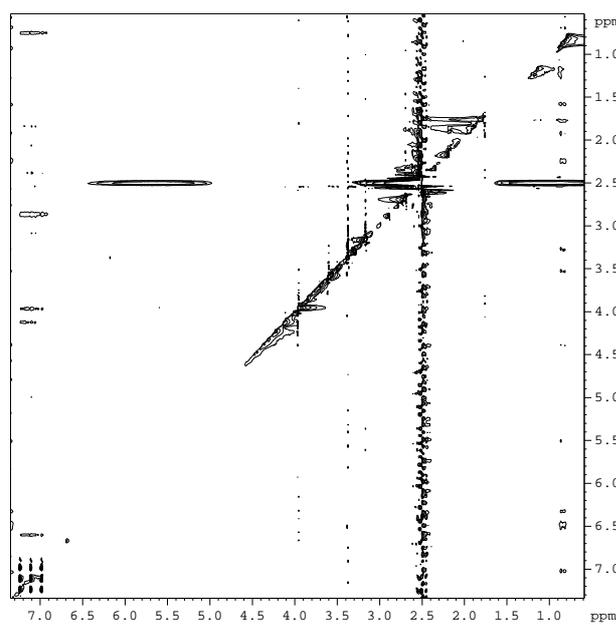
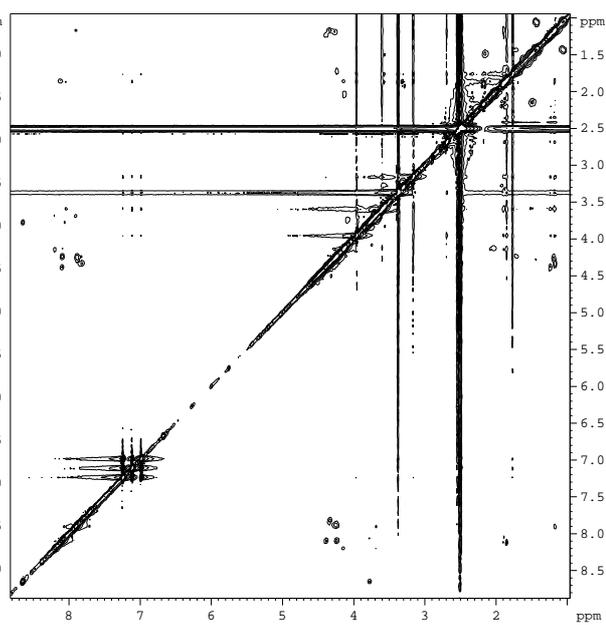
Y



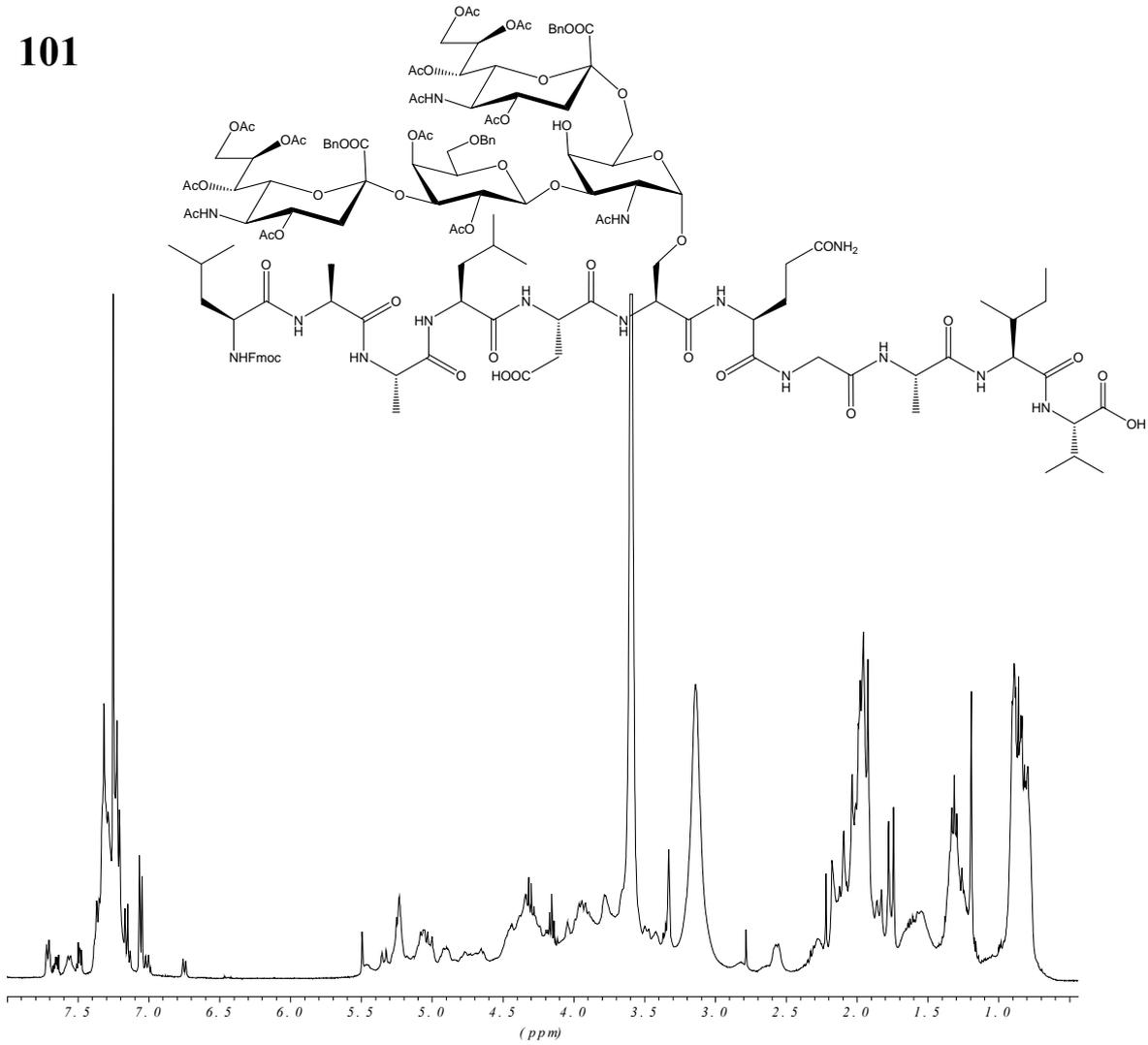
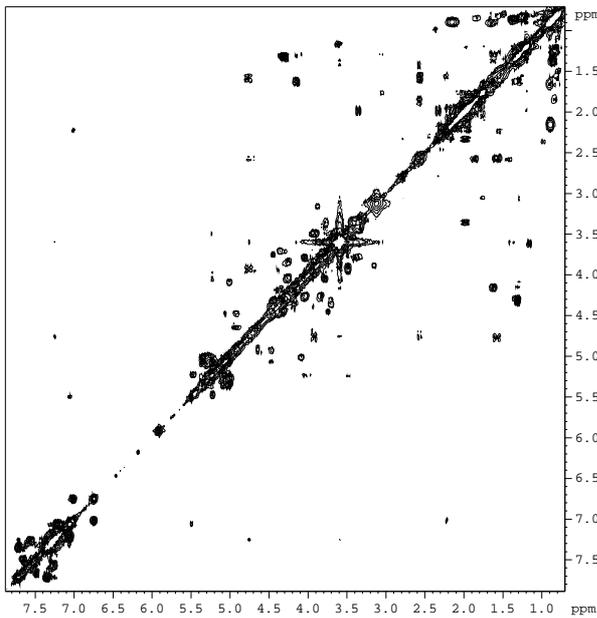
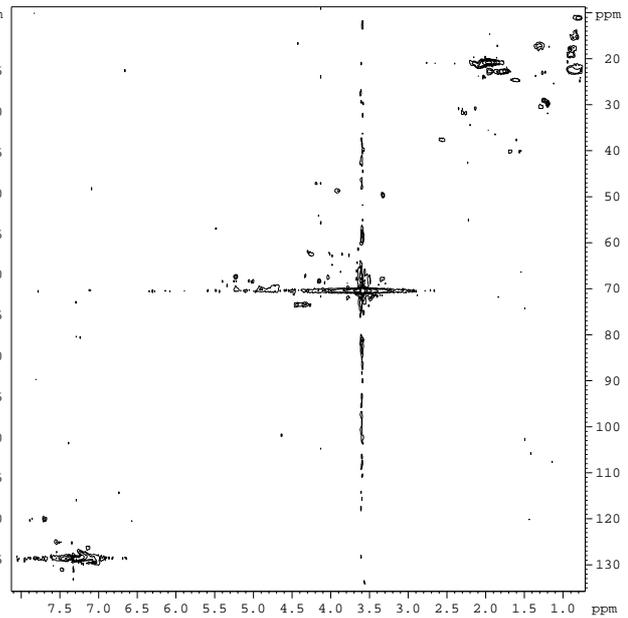
 ^1H - ^1H -COSY ^{13}C -BB

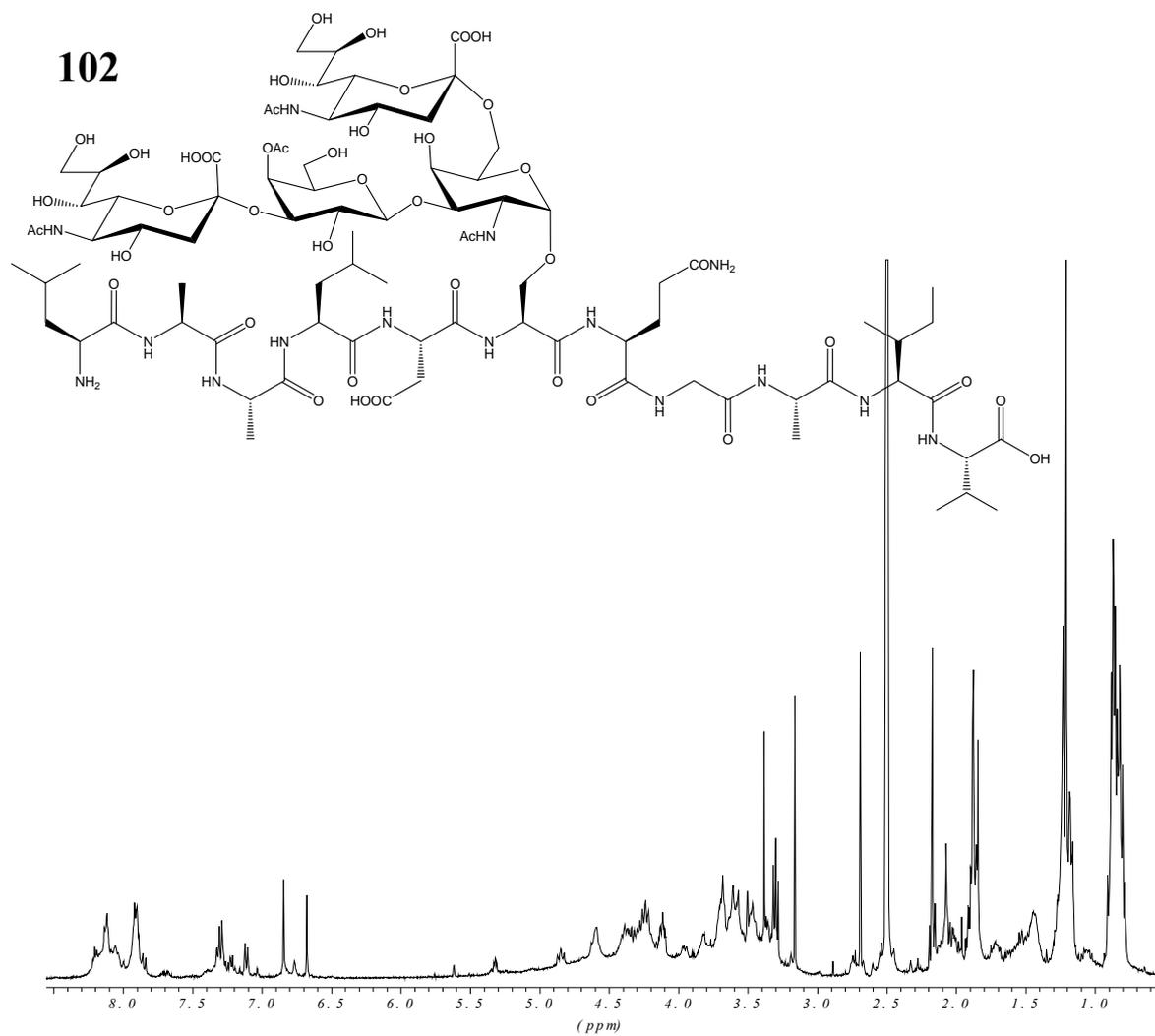
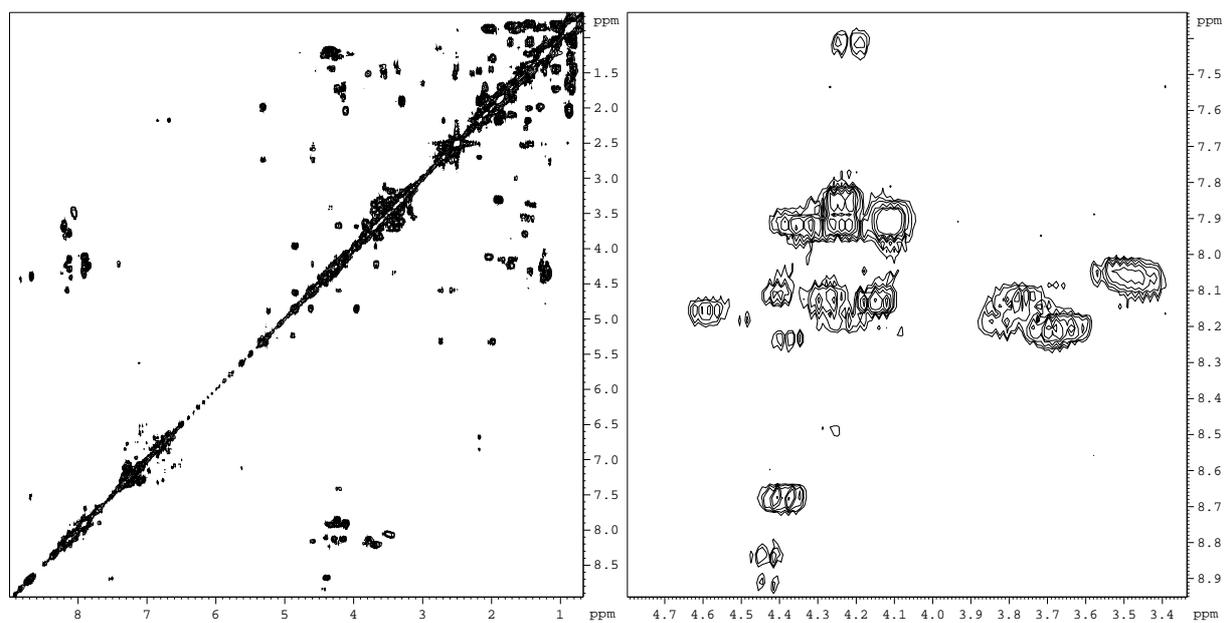
 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

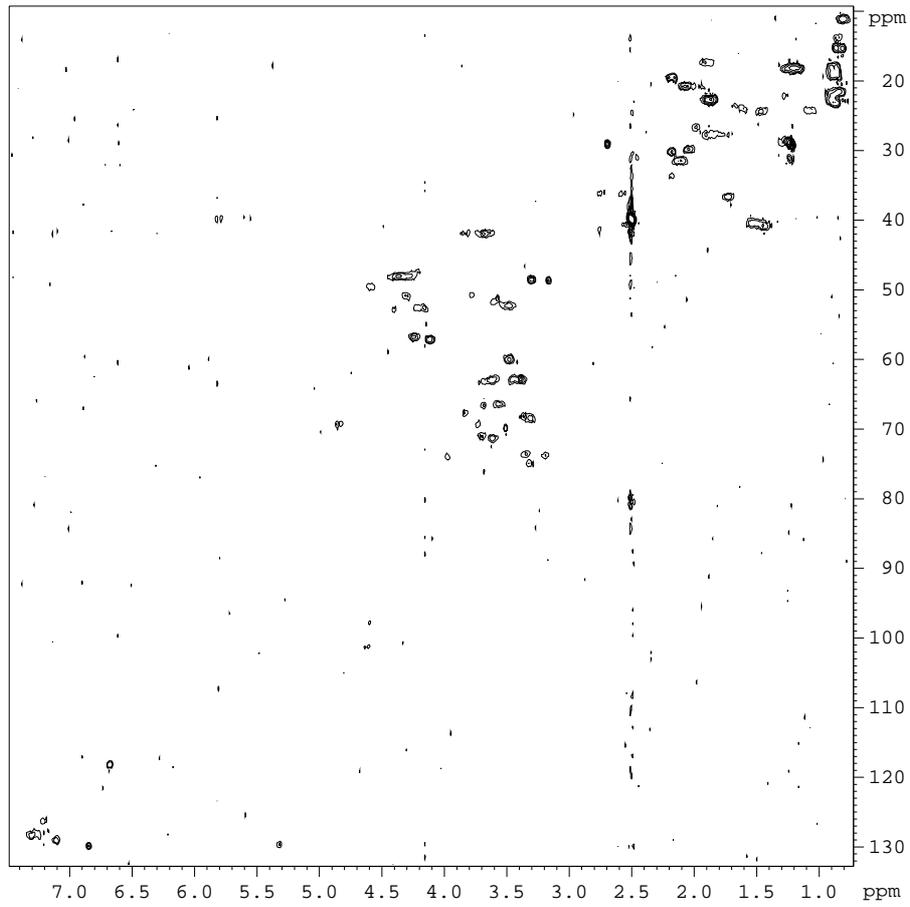
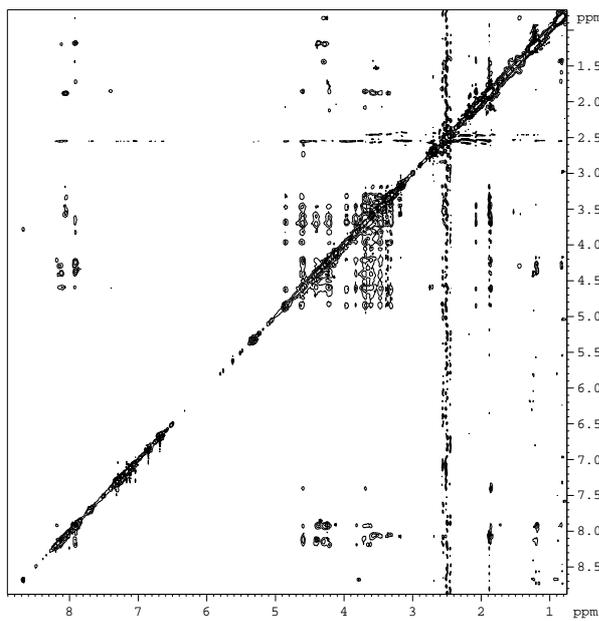
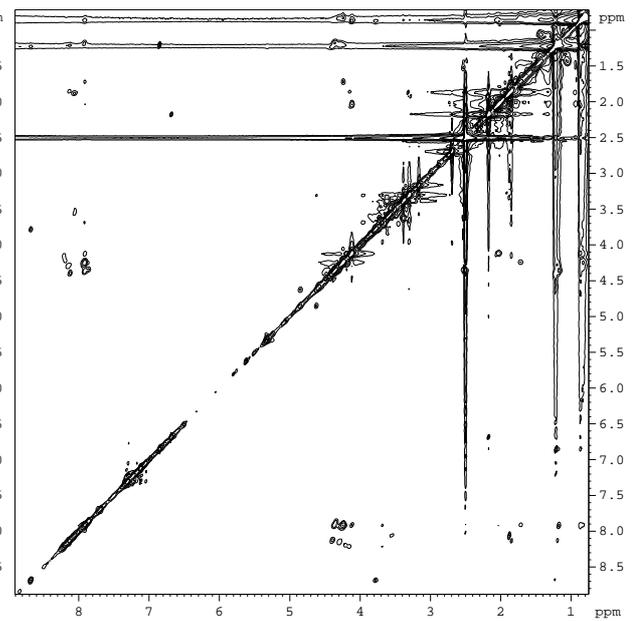
 $^1\text{H}-^1\text{H-COSY}$ 

$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -HMQC $^1\text{H}-^1\text{H}$ -NOESY $^1\text{H}-^1\text{H}$ -ROESY

101

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HMQC

 ^1H - ^1H -COSY

$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -HMQC $^1\text{H}-^1\text{H}$ -NOESY $^1\text{H}-^1\text{H}$ -ROESY

DANKSAGUNG

Vorrangig gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. ***, der mit seinem Interesse und seiner Hilfsbereitschaft, verbunden mit der Gewährung von größtmöglichem Freiraum und Entfaltungsmöglichkeiten, entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Ich möchte mich für die freundliche Aufnahme in seine große akademische Familie, seine immerwährende Bereitschaft zur Diskussion, sowie die Möglichkeit zur Teilnahme an Symposien, bedanken.

Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern des Arbeitskreises, die durch Ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. An dieser Stelle sei auch Frau *** sehr herzlich für ihre hilfsbereite Unterstützung im Sekretariat gedankt. Für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts bin ich *** sowie *** zu besonderem Dank verpflichtet.

Meinen Kollegen *** danke ich für die Messung zahlreicher ESI-MS-Spektren. Des weiteren gilt mein Dank *** und insbesondere *** für die oftmals nicht einfachen MALDI-TOF Analysen.

Frau *** sei für die Durchführung von NMR-Experimenten gedankt, besonders aber *** für die Aufnahme zahlreicher NMR-Daten sowie seiner freundlichen Hilfestellung, wann immer NMR-spektroskopische Fragen auftraten.

*** danke ich für ihren Einsatz bei der Durchführung einer Vielzahl an automatisierten Peptidsynthesen

Für die angenehme, hilfsbereite Atmosphäre und die schöne Zeit im und ums Labor herum möchte ich mich bei meinen Freunden, vor allen meinen Laborkollegen im „***-Exil“ ganz herzlich bedanken.

Nicht zuletzt danke ich im Besonderen meiner Familie für ihre Unterstützung während meiner gesamten Studienzzeit.

